

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS
MÉDICAS

Polimorfismos genéticos dos genes CYP19A1
e NFkB1 e o risco de melanoma cutâneo.

Gabriela Fortes Escobar

Porto Alegre

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

Polimorfismos genéticos dos genes CYP19A1 e NFKB1 e o risco de melanoma cutâneo.

Gabriela Fortes Escobar

Orientador: Prof. Dr. Renato Marchiori Bakos

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre

2014

CIP - Catalogação na Publicação

Escobar, Gabriela Fortes

Polimorfismos genéticos dos genes CYP19A1 e NFKB1
e o risco de melanoma cutâneo / Gabriela Fortes
Escobar. -- 2015.

77 f.

Orientador: Renato Marchiori Bakos.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2015.

1. Melanoma Cutâneo. 2. Polimorfismos genéticos.
3. Genética. I. Bakos, Renato Marchiori, orient. II.
Título.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Suzana e José Luiz, que sempre incentivaram meu crescimento pessoal e profissional. Agradeço ao seu amor e apoio incondicional.

Ao Guilherme, por todo o seu carinho, compreensão e ajuda, mais uma vez mostrando o quanto é importante para mim.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Renato Marchiori Bakos, por me introduzir no mundo fascinante dos tumores cutâneos e da dermatoscopia e por ser fundamental na minha formação como dermatologista. Agradeço por toda sua atenção, incansável apoio e entusiasmo em ensinar.

Ao Prof. Dr. Lúcio Bakos, pelos valiosos ensinamentos que sempre levarei comigo, essenciais na minha formação como dermatologista, desde suas primeiras aulas que assisti quando era acadêmica. Agradeço sua disposição de sempre compartilhar seu imenso conhecimento da dermatologia.

À Prof^a. Dra. Tânia Cestari, chefe do serviço de dermatologia do HCPA, que desde o início me acolheu no mundo da pesquisa, quando eu ainda era acadêmica de medicina, e me incentivou a seguir adiante.

Aos Professores Dra. Patrícia Ashton-Prolla, Prof. Sidney Santos, Prof^a. Sidia Maria Callegari Jacques pela oportunidade de trabalhar em conjunto nesse projeto e por toda sua ajuda.

Aos demais preceptores do Departamento de Dermatologia: Professor Dr. Luis Fernando Bopp Muller, Dra. Miriam Peres, Dra. Ane Pires, Dra. Isabel Kuhl, Dra. Márcia Zampese, Dra. Letícia Eidt, Dra. Gabriela Maldonado, Dra. Perla Procianoy, Dra. Nicolle Mazzotti pelos ensinamentos e pela contribuição na minha formação.

Ao meu irmão, Lucas, por estar sempre ao meu lado. Às minhas avós, Vera e Isa, por sempre estarem na torcida, vibrando com as minhas conquistas.

Aos colegas de residência e de mestrado pela amizade e pelos aprendizados que compartilhamos.

Aos funcionários do serviço de dermatologia do HCPA, pela disponibilidade para ajudar.

Aos pacientes por sua participação no estudo, permitindo que novas descobertas sejam feitas e a que a medicina possa sempre estar evoluindo.

Ao FINE e CNPQ pelo incentivo financeiro.

RESUMO

Título: Polimorfismos genéticos dos genes NFKB1 e CYP19A1 e o risco de melanoma cutâneo.

Base teórica

O melanoma é a principal causa de morte por câncer de pele, embora corresponda a 1% de todos os tumores malignos. A etiologia do melanoma é complexa, envolvendo fatores genéticos, fenotípicos e ambientais. O fator nuclear- κ B (NF- κ B) tem um papel fundamental na resposta imune e na inflamação, modulando a expressão de quimiocinas e citocinas inflamatórias. Além disso, a sua ativação pode induzir a transcrição de inibidores de apoptose e fatores associados com crescimento tumoral, angiogênese e metástases. O polimorfismo 94 ins/del ATTG (rs28362491) localiza-se no gene NFKB1 e tem sido associado a vários tipos de neoplasias. Na população sueca, o genótipo ATTG₂/ATTG₂ foi associado com risco de melanoma. O gene CYP19A1 codifica a enzima aromatase, um membro da família do citocromo P450. A aromatase é expressa em tecidos extragonadais, incluindo a pele, e a sua atividade já foi demonstrada em células de melanoma maligno. Uma das variantes de CYP19A1, o TCT ins/del (rs11575899) foi associada com o aumento de incidência de neoplasias, embora com resultados variados. No entanto, não existem estudos deste polimorfismo e melanoma.

Objetivo:

O objetivo deste estudo caso-controle foi examinar as duas variantes genéticas do gene NFKB1 (rs28362491) e CYP19A1 (rs11575899) e sua relação com a susceptibilidade ao melanoma em uma população do sul do Brasil.

Métodos:

Um total de 117 casos de melanoma cutâneo e 116 controles foram recrutados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil. O consentimento informado por escrito foi obtido de todos os participantes antes da inclusão no estudo. O fototipo foi documentado, assim como dados das lesões tumorais de melanoma cutâneo. Os genótipos das variantes dos genes NFKB1 (rs28362491) e

CYP19A1 (rs11575899) foram analisados a partir de DNA genômico utilizando método de PCR e análise de fragmentos.

Resultados:

A frequência do genótipo dos pacientes com melanoma foi significativamente diferente dos controles. O genótipo ATTG₂/ATTG₂ mostrou associação com o risco de melanoma (OR=1,78; IC 95% 1,06-3,00; p = 0,03). Além disso, a associação parece ter um efeito dose: para cada alelo ins no genótipo, o risco de melanoma aumentava (OR=1,51; IC 95% 1,08-2,11; p=0,017). Em relação ao polimorfismo CYP19A1, a frequência do genótipo 11 (del/del) foi maior nos pacientes do que os controles (OR=1,85; IC 95% 1,06-3,22; p = 0,03). O genótipo 11 foi mais prevalente no grupo de fototipos claros quando comparados aos mais escuros (67,9% x 51,0% respectivamente; p = 0,016).

Conclusões:

Os genótipos ATTG₂/ATTG₂ (rs28362491) do gene NFkB1 e del/del (rs11575899) do gene CYP19A1 estão associados com o risco de desenvolver melanoma e parecem ser marcadores genéticos de suscetibilidade para a neoplasia na população Sul-brasileira.

Palavras chave:

Melanoma cutâneo, polimorfismo genético, NFkB1, CYP19A1, Brasil

ABSTRACT

Title: Polymorphisms in NFKB1 and CYP19A1 genes and risk of cutaneous melanoma.

Background:

Melanoma is a leading cause of death from skin cancers, although it represents 1% of all malignant tumors. The etiology of melanoma is complex, involving genetic, phenotypical and environmental factors. The Nuclear factor- κ B (NF- κ B) has a critical role in the innate and adaptive immune responses and inflammation, modulating the expression of chemokines and inflammatory cytokines. In addition, its activation can induce the transcription of inhibitors of apoptosis and factors that are associated with tumor angiogenesis, metastasis and growth. The 94 ins/del ATTG (rs28362491) polymorphism located in the NFKB1 gene has been associated to various cancers types. In melanoma, the ATTG₂/ATTG₂ genotype of NFKB1 was correlated with increased risk in the Swedish population. The CYP19A1 gene encodes the enzyme aromatase, a member of the cytochrome P450 superfamily. Aromatase is expressed in extragonadal sites, including the skin, and its activity has been demonstrated in malignant melanoma tissue. One of CYP19A1 variants, the TCT insertion/deletion at intron 4 (rs11575899) has been associated with increased incidence of cancer, albeit with conflicting results. However, no studies addressing this polymorphism and melanoma have been conducted.

Objectives:

The aim of the present case–control study was to examine two genetic variations at the NFKB1 gene (rs28362491) and the CYP19A1 gene (rs11575899) and their relation to melanoma susceptibility in a southern Brazilian population.

Methods:

A total of 117 cases of cutaneous melanoma and 116 controls were recruited at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil. Written informed consent was obtained from all patients prior to inclusion in the study. Skin phototype was documented, as well as data from primary lesions of patients with cutaneous

melanoma. The genotypes of variants of genes NFKB1 (rs28362491) and CYP19A1 (rs11575899) were analyzed in both groups with genomic DNA samples.

Results:

The overall genotype frequency of melanoma patients was significantly different from controls. The frequency for ATTG₂/ATTG₂ genotype in the logistic regression demonstrated an association between the variant and melanoma patients (OR=1.78; 95%CI: 1.06-3.00; p=0.03). Likewise, this association was found to have a dose effect: for each ins allele in the genotype, the risk of melanoma increased (OR=1.51; 95%CI: 1.08-2.11; p=0.017). Regarding the CYP19A1 polymorphism, frequency of genotype 11 (del/del) was higher in the patients than the controls (OR=1.85; 95% CI 1.06-3.22; p=0.03). Interestingly, the genotype 11 was more common in the fair skin group (67.9% versus 51.0% in the lighter and darker phototypes, respectively; p=0.016).

Conclusions:

The NFKB1 ATT₂/ATTG₂ (rs28362491) genotype and the CYP19A1 del/del genotype (rs11575899) are significantly associated with melanoma risk and appear to be a genetic marker of susceptibility in melanoma in our southern Brazilian population.

Key Words:

Cutaneous melanoma, Genetic polymorphisms, NFKB1, CYP19A1, Brazil

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

FIGURA 1: A estrutura da família NF-kB.....	32
FIGURA 2: A ativação de NF-kB.....	33
FIGURA 3: Ações do NF-kB.....	34
FIGURA 4: Vias de ativação constitucional do NF-kB.....	35
FIGURA 5: A estrutura do polimorfismo -94 ins/del ATTG.....	37
FIGURA 6: A via de síntese do estrógeno.....	40
FIGURA 7: O polimorfismo +/- TCT do gene CYP19A1.....	41

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

TABLE 1: Distribution of age, gender and skin color.....	75
TABLE 2: Genotypic frequencies of -94ins/del ATTG (rs28362491) polymorphism of gene NFKB1 in melanoma cases and controls.....	75
TABLE 3: Genotypic frequencies of TCT ins/del polymorphism of gene CYP19A1 in melanoma cases and controls.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS

α -MSH: *α -Melanocyte-Stimulating Hormone* (Hormônio estimulante de melanócitos α)

A- adenina

AMP: *adenosine monophosphate* (adenosina monofosfato)

AMPc: *Cyclic adenosine monophosphate* (adenosina monofosfato cíclico)

ARF: *alternative reading frame* (matriz de leitura alternativa)

AUC: *area under the receiver operator curve* (area embaixo da curva de característica de operação do receptor)

BP: *base pairs* (pares de bases)

C: citosina

CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CDKN2A: *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A* (inibidor da quinase dependente da ciclina 2A)

CDK4: *cyclin-dependent kinase 4* (quinase dependente da ciclina 4)

CEC: carcinoma espinocelular

CMM: *cutaneous malignant melanoma* (melanoma maligno cutâneo)

CPD: *cyclobutane pyrimidine dimers* (dímeros de pirimidina ciclobutano)

CXCL1: *chemokine (C-X-C motif) ligand 1 - melanoma growth stimulatory activity* (quimiocina CXC ligando 1- estimulador da atividade de crescimento do melanoma)

CYP19 – *cytochrome P450 family 19 subfamily A* (citocromo p450 da família 19, subfamília A)

CYP19A1: *cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1* (citocromo p450 da família 19, subfamília A, polipeptídeo 1)

del: deleção

DNA: ***deoxyribonucleic acid*** (ácido desoxirribonucleico)

FAMMM: *familial atypical multiple mole melanoma syndrome* (síndrome familiar dos múltiplos nevos atípicos e melanomas)

G: guanina

G1: *Gap 1 of cell cycle* (intervalo 1 do ciclo celular)

GenoMEL: *Melanoma Genetics Consortium* (Consórcio de Genética do Melanoma)

GWAS: *Genome-wide association study* (estudo de associação genômica ampla)

HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

IC: intervalo de confiança

IκB: *inhibitor of kappa B* (inibidor do kappa B)

Ikk: *inhibitor of kappa B kinase* (quinase do inibidor do kappa B)

IL: *interleukin* (interleucina)

INCA: Instituto Nacional do Câncer

ins: inserção

k-Da: *kilo dalton* (quilo dalton)

LMM: *lentiginous malignant melanoma* (lentigo maligno melanoma)

MAF: *minor allele frequencies* (menor frequência alélica)

MALT: *mucosal-associated lymphoid tissue* (tecido linfóide associado à mucosa)

MC1R: *melanocortin-1 receptor* (receptor de melanocortina 1)

MES: melanoma de espalhamento superficial

MITF: *Microphthalmia-associated transcription factor* (fator de transcrição associado à microftalmia)

MMis: *in situ malignant melanoma* (melanoma *in situ*)

MSH: *melanocyte stimulator hormone* (hormônio estimulador de melanócito)

MPM: *multiple primary melanoma* (melanoma primário múltiplo)

MPMA: mudança percentual da média anual

mRNA: **M**essenger **r**ibonucleic **a**cid (ácido ribonucléico mensageiro)

nm: nanômetro

NMM: *nodular malignant melanoma* (melanoma nodular)

NF- κ B – *nuclear factor-kappa B* (fator nuclear kappa B)

NFKB1 – gene do *nuclear factor-kappa B* (fator nuclear kappa B)

ns: *non significant* (não significativo)

OR: *odds ratio* (razão de chances)

p14: proteína 14

p16: proteína 16

p53: proteína 53

PCR: *Polymerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase)

PR: *prevalence ratio* (razão de prevalência)

pRb: proteína Retinoblastoma

RHC: *red hair color* (cor de cabelo ruivo)

RR: risco relativo

S: *Synthesis of cell cycle* (síntese do ciclo celular)

SND: Síndrome do nevo displásico

SNP: *single nucleotide polymorphism* (polimorfismo de nucleotídeo único)

T: timina

TNF- α : *tumor necrosis factor α* (fator de necrose tumoral α)

UV: ultravioleta

UVA: ultravioleta A

UVB: ultravioleta B

VDR: vitamin D receptor

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações.....	17
2.2 Melanoma Cutâneo – Aspectos Gerais.....	18
2.2.1 Definição.....	18
2.2.2 Aspectos epidemiológicos.....	18
2.2.3 Aspectos clínico-histológicos e prognóstico.....	19
2.3 Melanoma cutâneo: Fatores de risco.....	21
2.3.1 Fatores ambientais.....	21
2.3.2 Fatores constitucionais.....	23
2.3.2.1 Nevos melanocíticos.....	23
2.3.2.2 Características fenotípicas.....	24
2.3.2.3 Ancestralidade.....	26
2.3.2.4 História de neoplasias cutâneas não-melanoma.....	26
2.4 Fatores genéticos.....	26
2.4.1 Mutações em genes de alta penetrância.....	27
2.4.1.1 Gene CDKN2A.....	27
2.4.1.2 Gene CDK4.....	29
2.4.2 Mutações de média penetrância:.....	29
2.4.2.1 MC1R.....	29
2.4.2.2 MITF.....	30
2.4.3 Mutações em gens de baixa penetrância.....	30
2.4.3.1 Polimorfismos de nucleotídeo único (SNP).....	31
2.5 NF- κ B.....	31
2.5.1 Aspectos gerais.....	31
2.5.2 Ações do NF- κ B.....	34

2.5.3 NF- κ B e Melanoma.....	36
2.5.4 O polimorfismo do gene NF κ B1.....	36
2.5.4.1 O polimorfismo do gene NF κ B1 e melanoma.....	39
2.6 O Gene CYP19A1.....	39
2.6.1 Polimorfismos do gene CYP19A1 e neoplasias.....	40
2.6.2 O gene CYP19A1 (Aromatase) e a pele.....	41
2.7 A Interação entre os genes CYP19A1 e NF κ B1.....	42
3. OBJETIVOS.....	43
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO.....	44
5. ARTIGO EM INGLÊS.....	58
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	77

1. INTRODUÇÃO

As três principais neoplasias malignas cutâneas são o carcinoma basocelular, o carcinoma epidermóide e o melanoma maligno. Embora o melanoma seja o menos freqüente destes, destaca-se por ser a maior causa de morte por uma doença de pele. (1,2)

A incidência de melanoma cutâneo tem aumentado mundialmente. No Brasil, as estimativas para este ano são aproximadamente de 6.000 novos casos por 100 mil habitantes. (3) A região sul do Brasil, devido a fatores genéticos e fenotípicos, concentra quase um terço dos casos do país. Sendo assim, esta neoplasia mostra-se um desafio para a saúde pública na região.

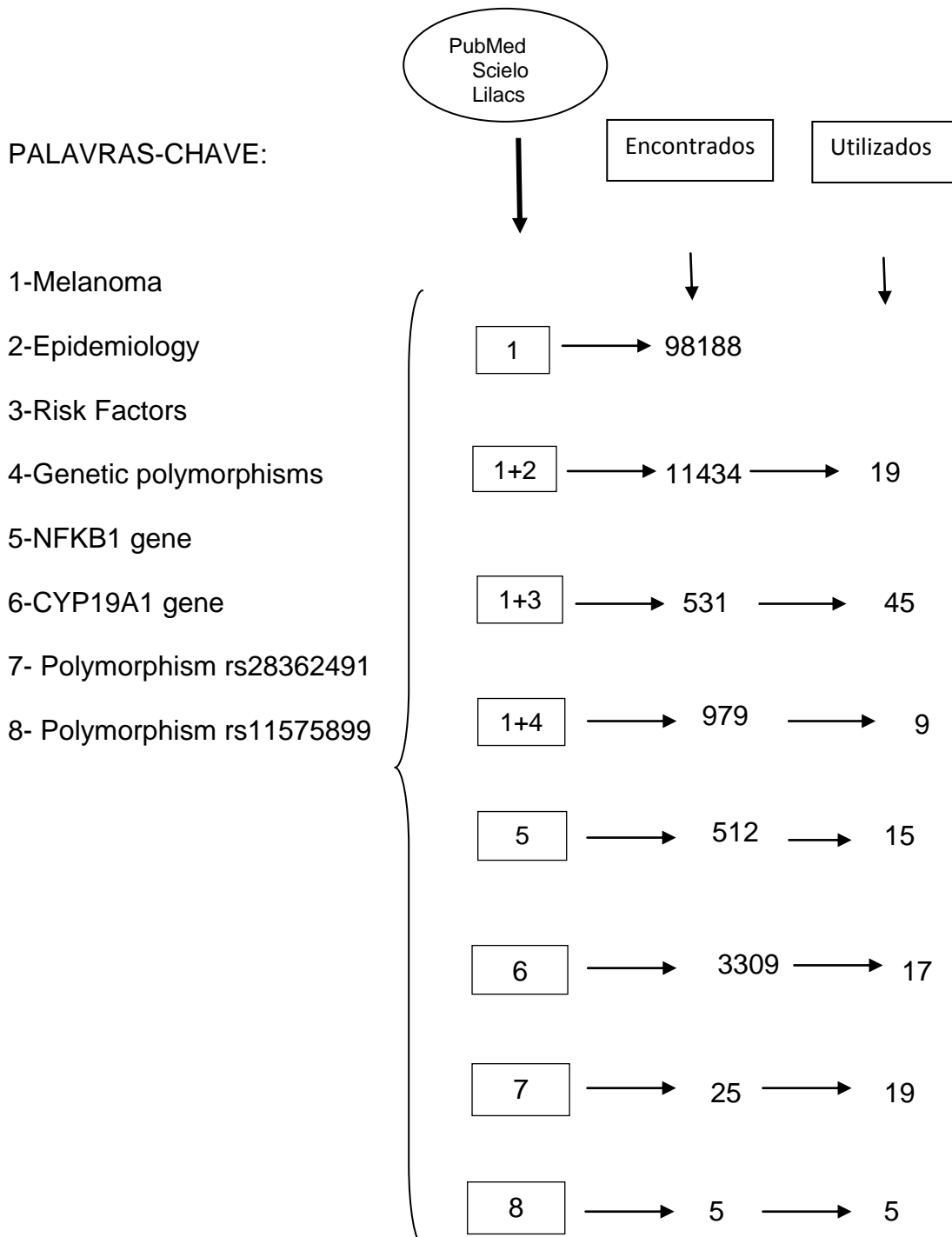
A etiologia do melanoma é multifatorial e complexa, sendo que os principais fatores de risco podem ser divididos em genéticos, ambientais e fenotípicos. (4,5,6,7) Descobertas novas na área da genética tem possibilitado compreender, cada vez mais, a patogênese do melanoma. Entretanto, é de extrema importância realizar estudos genéticos em populações distintas, pois podem existir variações étnicas e populacionais, assim como interações de polimorfismos e mutações com fatores não genéticos. (8,9) A identificação de indivíduos geneticamente predispostos ao melanoma pode ser importante para direcionar intervenções de vigilância e diagnóstico precoce. Além disso, a pesquisa na área genética ajuda a desenvolver novas opções de tratamento, como por exemplo, o uso de Vemurafenib em pacientes com melanoma e a mutação V600E no B-Raf.

O melanoma cutâneo, quando diagnosticado precocemente, é potencialmente curável, enquanto a morbimortalidade é elevada quando diagnosticado em estágios mais avançados. Medidas voltadas para a prevenção primária e secundária podem ajudar a prevenir casos, identificar indivíduos com maior risco, possibilitando o diagnóstico precoce e, conseqüentemente, diminuindo a mortalidade e os gastos relacionados com seu tratamento. (10)

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações

A revisão da literatura foi focada nos fatores associados com o melanoma, fatores de risco e genética. Foram revisados, também, dados sobre epidemiologia em geral e sobre os genes NFKB1 e CYP19A1. Os termos utilizados para a pesquisa no PubMed/Medline/Scielo/Lilacs foram: “*Melanoma*”; “*epidemiology*”; “*risk factors*”; “*genetic polymorphisms*”; “*NFKB1 gene*”; “*CYP19A1 gene*”; “”.



2.2 Melanoma Cutâneo – Aspectos Gerais

2.2.1 Definição

O melanoma é uma neoplasia maligna originada dos melanócitos, células responsáveis pela pigmentação cutânea.(1,11) Corresponde a cerca de 1% dos tumores malignos e é a maior causa de morte por doença de pele.(1,2)

2.2.2 Aspectos epidemiológicos

A incidência de melanoma cutâneo tem aumentado mundialmente na população caucasiana nas últimas décadas. Na Europa, estudos de base populacional têm mostrado aumento na incidência de melanoma para ambos os gêneros. (12,13) Nos Estados Unidos, Geller *et al.* mostraram um aumento de incidência de 17 vezes em homens e 9 vezes em mulheres, no período de 1950 a 2007. (14) De forma similar, uma análise populacional realizada no Canadá, entre o período de 1970 a 2007, também confirmou um aumento de incidência de melanoma, sendo que a mudança percentual da média anual (MPMA) foi 3,7% em homens e 2,9% em mulheres. (15) Na Austrália, onde o melanoma foi a quarta neoplasia mais freqüente e a oitava causa de mortalidade por câncer no ano de 2007, a incidência duplicou no período de 1982 a 2007.(16) Embora não seja totalmente compreendido, o aumento na incidência mundial de melanoma pode estar relacionada a diversos fatores, incluindo melhores taxas de detecção e registros do tumor, além da crescente exposição à radiação ultravioleta nas últimas décadas em atividades recreacionais e câmeras de bronzeamento artificial. (15,17)

Em relação à mortalidade, vários estudos também mostram seu aumento nas últimas décadas. Nos Estados Unidos, houve a triplicação da taxa de mortalidade em homens e a duplicação em mulheres. (14) No Canadá, as taxas também foram maiores em homens (MPMA= 2,3% e 0,8% em homens e mulheres, respectivamente). (15) Na Austrália, o aumento passou de 4,7 para 5,7 mortes por 100.000 habitantes, com uma sobrevida em 5 anos de 94% para mulheres e 89% para homens. (16)

No Brasil, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), a estimativa de incidência de melanoma no ano de 2014 será de 5.890 novos casos

por 100 mil habitantes. (3) A incidência de melanoma na região sul do Brasil é maior que a média nacional, apresentando 920 e 880 novos casos, respectivamente, em homens e mulheres no ano de 2014. (3) Esses valores representam aproximadamente um terço dos melanomas de todo o país, com uma taxa bruta por 100.000 habitantes de 6,55 para homens e de 6,03 para mulheres. (3) Os estados dessa região apresentam a maior proporção de descendentes de imigrantes europeus, principalmente alemães e italianos, cujos traços fenotípicos os tornam mais suscetível ao melanoma. (1,2,18,19,20)

Confirmando o aumento de incidência observado internacionalmente, um estudo realizado no sul do Brasil mostrou que a incidência quintuplicou entre o período de 1980 e 2009. (21) Paralelamente, a mortalidade associada ao tumor tem aumentado no nosso país. Entre 1980 e 2005, MPMA para todo o país foi de 1,1%. (22) Além disso, a mortalidade foi maior entre os idosos, apresentado uma taxa de 2,8% nos indivíduos acima de 70 anos. (22) Na região sul, um estudo realizado na cidade de Passo Fundo, Rio Grande do Sul, mostrou uma taxa de mortalidade de 2,16 por 100.000 pacientes/ano, com uma taxa de sobrevida de 5 anos de 95,4% para mulheres e de 83,8% para homens. (17)

2.2.3 Aspectos clínico-histológicos e prognóstico

Os melanomas cutâneos primários podem ser divididos em quatro subgrupos, de acordo com seu padrão de crescimento: espalhamento superficial, lentigo maligno, nodular e acral.(11,23)

O melanoma de espalhamento superficial é a forma mais comum (70%) e ocorre geralmente entre os 30 e 50 anos de idade, em indivíduos de fototipos mais baixos. (11,23) Localizam-se mais frequentemente no tronco nos homens e membros inferiores nas mulheres, podendo surgir *de novo* ou a partir de nevos pré-existentes. (23) Tem como característica histológica uma fase inicial lenta de crescimento horizontal na epiderme e derme superior, um a cinco anos antes de uma rápida fase posterior de crescimento vertical para camadas mais profundas da pele.(11,23) Na histologia, pode ser observada a proliferação assimétrica de ninhos melanocíticos na epiderme e derme, com bordas pouco delimitadas e ausência de maturação dos melanócitos dérmicos. (23,24) Além disso, podem ser vistos

melanócitos pagetóides, pleomorfismo celular, hipercromasia e mitoses. Quando ocorre regressão, a histologia evidencia um tecido vascularizado na derme papilar, que pode estar acompanhado de melanófagos. (24)

O melanoma nodular representa 15 a 30% e ocorre mais comumente no tronco, cabeça e pescoço de homens. (24) Este subgrupo não apresenta uma fase de crescimento horizontal, mostrando desde o início crescimento vertical e comportamento agressivo. (11) Caracteriza-se histologicamente pela ausência de disseminação intra-epidérmica ou limitada a três cones interpapilares lateralmente à invasão dérmica do nódulo. (24)

O lentigo maligno melanoma (LMM) perfaz 5 a 15% dos melanomas, ocorre em áreas fotoexpostas de idosos e possui um comportamento biológico menos agressivo, decorrente de uma fase de crescimento histológico horizontal lenta. (23) Devido à sua localização em pele fotoexposta, apresenta na histologia elastose solar. (24) A fase *in situ* do lentigo maligna é longa e apenas 5% tornam-se invasivos, sendo então chamados de LMM. Apresentam geralmente atrofia da epiderme e melanócitos fusiformes, sendo menos freqüente observar melanócitos pagetóides. (24) O tumor também demonstra predileção pelo acometimento de estruturas anexiais, como os folículos pilosos. (23)

O melanoma acral é uma forma incomum, correspondendo a 5 a 10% dos melanomas. (23) Pode acometer a região palmoplantar ou o aparelho ungueal e ocorre geralmente em idosos. (11) Além disso, é a forma mais comum de melanoma em negros e asiáticos. (23,24) Na histologia, caracteriza-se por apresentar melanócitos fusiformes e alongamento lentiginoso dos cones interpapilares. (24) Na camada córnea, podem ser observados melanócitos e grânulos de melanina distribuídos de forma irregular. (23)

Em relação ao prognóstico, os subtipos nodular, seguido do acral, são os que apresentam as maiores taxas de mortalidade. Em um estudo de base populacional realizado nos Estados Unidos, a sobrevida em cinco anos para o subtipo nodular foi de 69,4% e de 81,2% para o acral. (25) Por outro lado, os subtipos de espalhamento superficial e lentigo maligno apresentam taxas maiores de sobrevida em cinco anos (95,8% e 96,3%, respectivamente). (25) Confirmando tais achados, um estudo

conduzido no Brasil mostrou um risco maior de mortalidade nos subtipos nodular (OR=1,96; IC 95% 1,49-2,58) e acral (OR=2,68; IC 95% 1,49-2,58), quando comparados ao subtipo de espalhamento superficial. (26)

2.3 Melanoma cutâneo: Fatores de risco

A etiologia do melanoma é multifatorial e complexa. (7,27,28) Os fatores de risco para o desenvolvimento de melanoma podem ser divididos em genéticos, ambientais e fenotípicos. (5,6,7,23) No primeiro grupo, estão incluídos a história familiar de nevos atípicos ou melanoma; fototipo (cor da pele e do cabelo, juntamente com capacidade de bronzear-se) e as mutações e polimorfismos genéticos. (1,5,23) Dentre os fatores ambientais, o principal é a radiação ultravioleta (7), sendo os maiores fatores de risco a exposição solar intermitente e intensa; o número total de queimaduras solares durante a infância e adolescência e a latitude do local de residência. (1,2,5,23) Nos fatores fenotípicos, resultados da interação entre os aspectos genotípicos e ambientais, incluí-se um número elevado de nevos melanocíticos, múltiplos nevos atípicos, presença de efélides e história pessoal prévia de melanoma. (1,5,23)

2.3.1 Fatores ambientais

A radiação ultravioleta (RUV) é o principal fator de risco ambiental envolvido na gênese do melanoma. (7,27,28,29) Além disso, sua importância reside também no fato de ser o único fator de risco potencialmente modificável para o desenvolvimento desta neoplasia. (27)

A radiação UV promove dano ao DNA das células ao desencadear a produção de fotoprodutos diméricos, mutações genéticas, estresse oxidativo, inflamação e imunossupressão. (7) A radiação UVB (290-320nm) pode causar danos importantes ao DNA, ao induzir a formação de dímeros de pirimidina ciclobutano (CPD) e 6-4 pirimidina-pirimidona. (30) Já a radiação UVA (320-400 nm) causa estresse oxidativo, ao induzir a produção de radicais livres e quebras simples em uma das cadeias de DNA. (30) De forma complementar, mutações que envolvem genes de reparo ao DNA ou apoptose também podem estar relacionados ao processo de fotocarcinogênese. (30)

Gandini *et al.* realizaram uma metanálise de estudos que avaliaram a exposição solar e o risco de desenvolver melanoma. (31) Nesse trabalho, enquanto a exposição solar total mostrou uma associação modesta com o melanoma (RR=1,34; IC 95% 1,02-1,77), o padrão de exposição intensa intermitente foi o que conferiu um risco maior (RR=1,61; IC 95% 1,31-1,99). (31) A exposição solar intensa intermitente é o que ocorre, por exemplo, em férias, viagens e atividades recreacionais, em uma pele que não está acostumada com o sol. (27) Ao contrário, a exposição crônica, muitas vezes associada a atividades laborais, não mostrou associação significativa nessa metanálise (RR=0,95; 95% CI 0,87-1,04) (31), embora outro estudo tenha mostrado um aumento de risco de lentigo maligno melanoma. (32)

Queimaduras solares também aumentam o risco de melanoma e podem ser um indício de exposição solar intermitente intensa. (27) Na metanálise descrita acima (31), a história prévia de queimaduras solares na infância duplica o risco de melanoma (RR=1,99; IC 95% 1,45-2,74), entretanto o risco parece ser menor para episódios na vida adulta (RR=1,53; IC 95% 1,26-1,86). (31) Bakos *et al.*(19), ao quantificar o número de episódios de queimaduras solares ao longo da vida, demonstraram que pacientes com 30 ou mais episódios, em relação a indivíduos que nunca haviam sofrido queimaduras solares, apresentavam um risco maior de desenvolver melanoma (OR = 11,4; IC 95% 2,0-27,1). De forma complementar, outro estudo mostrou que os fatores ambientais têm um papel importante na ocorrência de melanoma na região sul do Brasil, evidenciado pela história freqüente de queimaduras solares, pequeno número de melanomas diagnosticados em áreas fotocobertas e elevada prevalência de fototipo I. (2)

O uso de aparelhos de bronzeamento artificial também é um fator de risco para melanoma. Esses aparelhos emitem predominantemente radiação UVA, porém muitas vezes em quantidades maiores em uma sessão do que a emitida pelo sol durante uma atividade realizada ao meio dia. (27,33) Indivíduos que já realizaram bronzeamento artificial, comparados com os que nunca o fizeram, apresentam um risco maior de melanoma (OR=1,82; IC 95% 1,47-2,26). (34) Além disso, a primeira exposição a uma câmara de bronzeamento artificial antes dos 35 anos também mostra um aumento de risco (OR= 1,75; IC 95% 1,35-2,26). (33)

Além da radiação ultravioleta, outro fator ambiental relacionado ao melanoma parece ser a exposição a pesticidas. Dennis *et al.* encontraram um risco maior de desenvolver melanoma associado à exposição ao *maneb/mancozeb* (OR= 2,4; IC 95%, 1,2–4,9; p = 0,006), *parathion* (OR= 2,4; IC 95%, 1,3–4,4; p = 0,003) e *carbaryl* (OR= 1,7; IC 95% 1,1–2,5; p = 0,013). (35) Gallagher *et al.* também mostram uma associação entre o risco de melanoma e os níveis plasmáticos de bifenil policlorados não-dioxinas (OR=7,02; IC 95%: 2,30–21,43). (36)

2.3.2 Fatores constitucionais

2.3.2.1 Nevos melanocíticos

Os nevos podem ser precursores e também marcadores de risco de melanoma. (27,29) Em relação ao risco conferido pelos nevos, Holly *et al.* mostraram que a presença de mais de 50 nevos aumentava o risco de melanoma (RR=5,4; p=0,008). (39) Posteriormente, Gandini *et al.* (40) realizaram uma metanálise e encontraram uma associação estatisticamente significativa entre o número total de nevos (comuns e atípicos) e melanoma. O risco existia, inclusive, para um pequeno número de nevos comuns (16-40 nevos, RR=1,47; IC 95% 1,36-1,59), sendo mais significativo conforme o aumento do número nevos (100-120 nevos, RR=6,89; IC 95% 4,63-10,25). (40) Além disso, também havia uma associação entre a contagem de nevos nos braços e melanoma: o risco de melanoma em indivíduos com 11 a 15 nevos comuns nos braços era aproximadamente cinco vezes maior que o risco daqueles que não possuíam nevos nesse local anatômico. (40) Uma explicação para o risco conferido pela presença de múltiplos nevos pode ser devido à exposição solar; além disso, sabe-se que aproximadamente 25% dos melanomas são associados a nevos pré-existentes confirmados histologicamente. (40,41)

Nevos atípicos estão presentes em 2 a 5% de adultos caucasianos, sendo geralmente maiores e de aparência mais irregular que nevos comuns. (40) Alguns critérios clínicos podem ser utilizados para facilitar sua caracterização: tamanho maior que 5 mm, bordas mal definidas, cores variadas, contorno irregular ou a presença de eritema. (40,42,43) Além disso, critérios dermatoscópicos também já foram descritos: assimetria de estruturas, término abrupto de rede na periferia, mais de 2 cores, presença de estrias periféricas, véu azul-acinzentado, regressão,

glóbulos ou pontos periféricos ou com disposição irregular. (42) Muitas vezes o termo “nevo atípico” é utilizado clinicamente para designar lesões potencialmente suspeitas, que poderiam apresentar displasia histológica, entretanto, nem sempre há correlação clínico-histológica. (40) A presença de nevos displásicos, independentemente do número total de nevos, constitui um fator de risco para melanoma (RR=10; IC 95% 5,04-20,32). (40) De forma complementar, outro estudo realizado com uma amostra de pacientes com história prévia de melanoma mostrou que a chance de ter um novo melanoma em cinco anos duplicava se o paciente possuía algum nevo displásico. (44)

Além disso, famílias com múltiplos indivíduos com nevos displásicos podem ser classificados como portadores da Síndrome do Nevo Displásico (SND), que se caracteriza pela presença de múltiplos nevos atípicos e um aumento no risco de desenvolver melanoma. (45) A primeira descrição da síndrome foi realizada por Reimer *et al.* em 1978, sendo que também ficou conhecida como síndrome do nevo B-K, em referência às iniciais dos sobrenomes das primeiras famílias estudadas. (46) Posteriormente, Kraemer *et al.* criaram novas subclassificações: SND esporádica (A); SND familiar (B); SND esporádica com história pessoal de melanoma (C); SND familiar e história pessoal ou familiar de melanoma (D1) e SND familiar com ao menos dois membros com melanoma (D2). (45) Em 1988 Rigel *et al.* criaram uma classificação de risco de melanoma para pacientes com SND, de acordo com a história pessoal e familiar de melanoma. (43) Assim, ambos grupos mostraram que existe um amplo espectro de risco de melanoma em relação à síndrome, variando de casos de indivíduos isolados apenas com nevos atípicos, até a descrição da Síndrome FAMMM (síndrome familiar dos múltiplos nevos atípicos e melanomas). (47)

2.3.2.2 Características fenotípicas

Em sua metanálise, Gandini *et al.* estudaram diferentes características fenotípicas e determinaram seu risco relativo para desenvolvimento de melanoma.(37) Indivíduos de fototipo I apresentaram um risco duas vezes maior de desenvolver melanoma, quando comparados com o fototipo IV (RR=2,09; IC 95%

1,67-2,58). Da mesma forma, indivíduos fototipo I e II também apresentavam um risco maior quando comparados com pessoas que nunca sofrem queimaduras e que se bronzeiam facilmente (RR=2,99; IC 95% 1,75-5,12). (37) Em relação à cor da íris, olhos azuis e verdes mostraram um discreto aumento de risco (RR=1,47; IC 95% 1,28-1,69 e RR= 1,61; IC 95% 1,06-2,45, respectivamente). (37) A densidade de efélides (alta versus baixa), que além de representar a suscetibilidade ao sol também mostra o grau de exposição solar, duplicou o risco de melanoma (RR= 2,10; IC 95% 1,80-2,45). (37) Entretanto, das características fenotípicas, a que mostrou maior significância foi a cor do cabelo: indivíduos ruivos, quando comparados ao controle de cabelos escuros, quase tiveram o risco quadruplicado (RR=3,64; IC 95% 2,56-5,37), enquanto o cabelo loiro conferiu um risco intermediário (RR=1,96; IC 95% 1,41-2,74). (37) Confirmando os achados acima, Bakos *et al.* demonstraram que, de vários fatores fenotípicos de risco, a variável com maior poder preditivo para o risco de melanoma cutâneo no nosso meio foi a cor do cabelo (AUC: 0,71, IC 95%: 0,62-0,79). (48)

Estudos com resultados semelhantes foram realizados no Brasil. Bakos *et al* (19), ao estudar uma amostra no Rio Grande do Sul, encontraram que indivíduos com fototipo I e II, quando comparados aos de fototipo III e IV, também apresentavam maior risco de melanoma (OR= 2,7; IC 95% 1,3-5,6). A presença de efélides também foi considerada um fator de risco para melanoma (OR= 2,3; IC 95% 1,2-4,3). (19) Em outra amostra brasileira, na cidade de São Paulo, Gonçalves *et al.* (30) encontraram características fenotípicas associadas com risco de melanoma: cabelo ruivo ou loiro e olhos azuis ou verdes aumentaram o risco em mais de 4 vezes (OR=4,33; IC 95% 2,23-8,40 e OR=4,65; IC 95% 2,55-8,49, respectivamente), enquanto a presença de efélides mostrou um risco menor (OR= 2,41; IC 95% 1,53-3,82). (30)

As características fenotípicas são, evidentemente, inter-relacionadas, e provavelmente interagem de forma a determinar a sensibilidade à radiação UV e, conseqüentemente, ao risco de melanoma. (37) Além disso, possivelmente o maior risco conferido pela cor do cabelo possa ser explicado por sua facilidade de determinar e separar em grupos distintos, comparado com, por exemplo, a cor da pele, capacidade de bronzear-se e o fototipo. (37)

2.3.2.3 Ancestralidade

Sabe-se que no Brasil há uma grande miscigenação, resultado de uma mistura entre a população indígena autóctone, escravos africanos e ondas migratórias européias e asiáticas. (49) Em relação à ancestralidade, um estudo realizado na região sul do Brasil (Porto Alegre, RS), encontrou que ascendentes germânicos e italianos conferiam um risco para melanoma (OR= 3,5; IC 95% 1,8-6,7 e OR=9,7; IC 95% 3,9-24,2, respectivamente). (49) Já a ancestralidade indígena mostrou-se como um fator protetor (OR=0,16; IC 95% 0,04-0,7). (49) De forma semelhante, outro estudo encontrou que a presença de três ou quatro descendentes europeus aumentava o risco de melanoma (OR=4,68; IC 95% 2,66-8,24). (30) O risco relacionado com a ascendência européia pode ser explicado por características fenotípicas, como o fototipo, mas também por mutações genéticas trazidas por esses povos. (49)

2.3.2.4 História de neoplasias cutâneas não-melanoma

História prévia de neoplasias cutâneas não-melanoma, lesões pré-cancerosas ou presença de dano actínico também conferem um risco maior de melanoma (OR= 4,28; IC 95%: 2,80-6,55). (37) Além disso, a micose fungóide também parece aumentar o risco de melanoma (RR=15,3; IC 95% 7,0-33,8), provavelmente devido aos efeitos dos tratamentos imunossupressores ou de alterações genéticas na proteína supressor tumoral p16. (38)

2.4 Fatores genéticos

Entre os fatores genéticos, aproximadamente 8 a 10% dos pacientes diagnosticados com melanoma apresentam história familiar positiva para essa neoplasia. (50,51) Conseqüentemente, história familiar de melanoma confere aproximadamente um aumento de 2 vezes no risco para melanoma nos demais membros da família. (37) O melanoma familiar, além de fatores genéticos, também

pode ser explicado pelo fato de indivíduos da mesma família geralmente compartilharem características fenotípicas e exposição a fatores de risco semelhantes, como a radiação UV. (28)

Estima-se que 10% de todos os casos de melanoma sejam causados por mutações germinativas em genes de suscetibilidade, sendo assim considerados hereditários. Os principais genes associados são o CDKN2A, CDK4 e MC1R. (1,52) Em relação ao melanoma familiar, são considerados fatores de risco: 2 ou mais parentes em primeiro grau com o diagnóstico, idade precoce ao diagnóstico (<40 anos), história de múltiplos melanomas primários e história familiar de carcinoma de pâncreas. (7,52)

2.4.1 Mutações em genes de alta penetrância

Dos genes implicados com a suscetibilidade ao melanoma, dois são considerados de alta penetrância: CDKN2A e CDK4. (7,28) Devido à alta penetrância destes genes, geralmente há múltiplos casos de melanoma nas famílias afetadas. (7) Esses genes tem padrão autossômico dominante (28), apresentando uma chance de transmissão vertical de 50%.

2.4.1.1 Gene CDKN2A

O gene CDKN2A (inibidor da quinase dependente da ciclina 2A) é um supressor tumoral localizado no cromossomo 9p21, que codifica duas proteínas diferentes. (28) A primeira, p16, inibe a atividade da ciclina do CDK4, impedindo que a proteína do retinoblastoma seja fosforilada. Como consequência, a célula não atravessa o ponto de controle G1 do ciclo celular e a divisão e proliferação celular é bloqueada. (28,53) A segunda proteína, p14ARF, inibe a degradação da proteína p53, induzindo a parada do ciclo celular ou apoptose. (7,54) Mutações afetando apenas o p14ARF são raras.

Aproximadamente 20%-40% das famílias com três ou mais indivíduos com melanoma apresentam mutações germinais de CDKN2A, mas essa estimativa varia muito conforme a população estudada. Entretanto, a chance de possuir a mutação em um indivíduo com melanoma, porém sem história familiar é extremamente baixo,

sendo aproximadamente 1%. (7) Bishop *et al.*(55) demonstraram que a penetrância da mutação CDKN2A varia conforme a amostra populacional: 58% na Europa e 91% na Austrália, aos 80 anos. Um estudo semelhante, porém em uma amostra populacional, encontrou uma penetrância menor, de 28% aos 80 anos. Adicionalmente, o risco de familiares de indivíduos com a mutação desenvolver melanoma é de 16% aos 80 anos, enquanto o risco na população geral seria de 2,6% nessa faixa etária. (56) Em relação ao melanoma familiar, a chance de encontrar uma mutação no gene varia conforme o número de familiares acometidos, iniciando de 10,9% para 2 familiares e atingindo 66,7% quando há 5 casos na família. (57) Maubec *et al.* também mostraram uma incidência de mutação no gene CDKN2A semelhante em famílias com apenas 2 casos de melanoma (13%), porém apresentaram aumento de incidência quando a idade de diagnóstico da neoplasia era menor que 50 anos (22%) e quando havia história de melanoma múltiplo primário (29%). (58)

Além disso, o CDKN2A parece aumentar o risco de câncer de pâncreas: um estudo mostrou que as famílias com melanoma e a mutação tinham mais casos da neoplasia, comparado com as famílias sem a mutação (28% versus 6%, respectivamente; $p < 0,0001$). (59) Recentemente, outro estudo também confirmou o aumento de risco de câncer de pâncreas em indivíduos com a mutação na família (PR=2,99; $p=0,012$), além de mostrar associação com outras neoplasias, como câncer de pulmão (PR=3,04; $p < 0,001$) e mama (PR=2,19; $p=0,018$). (57)

No nosso meio, alguns estudos também avaliaram o gene CDKN2A no contexto do melanoma cutâneo. Grazziotin *et al.*(18), em uma amostra de 33 casos e 29 controles na cidade de Porto Alegre, não observaram mutações nos genes CDKN2A ou CDK4. Esse estudo mostrou uma tendência a infreqüentes variantes em loci polimórficos do gene CDKN2A e no gene MC1R nos casos, porém sem valores estatisticamente significativos. Nesta mesma população, Ashton-Prolla *et al.* (2) analisaram geneticamente uma amostra de 30 indivíduos com risco de melanoma hereditário e detectaram em 6,9% mutações dos gene CDKN2A, enquanto 13,33% apresentavam o polimorfismo A148T do gene CDKN2A. Subseqüentemente, Bakos *et al.* (20) demonstraram sua presença em 12,6% dos pacientes com melanoma, enquanto apenas em 3,9% no grupo controle ($p=0,009$),

confirmando o papel da variante p.A148T do gene CDKN2A como um alelo de suscetibilidade com baixa penetrância para melanoma. Além disso, esse estudo mostrou que todos os indivíduos com o polimorfismo e melanoma referiam ascendência européia, principalmente germânica, e apresentaram alelos de ancestralidade genética também majoritariamente de origem européia. (20)

2.4.1.2 Gene CDK4

O CDK4 (quinase dependente de ciclina 4) é um oncogene localizado no cromossomo 12q14 envolvido na via da proteína do retinoblastoma. (60) Mutações no CDK4 inibem a ligação do p16, permitindo à célula atravessar a fase G1/S, promovendo assim a proliferação celular desordenada. (11,60,61) A mutação é extremamente rara, sendo descritas em apenas algumas famílias mundialmente. Em um estudo com 466 famílias com melanoma familiar, a mutação CDK4 foi encontrada em 2% dos indivíduos. (59)

2.4.2 Mutações de média penetrância:

2.4.2.1 MC1R

O gene receptor de melanocortina-1 (MC1R), localizado no cromossomo 16q24.3, codifica o receptor do hormônio estimulador de melanócito (MSH) e está envolvido no processo de pigmentação. (11) Após ligação do MSH-MC1R, ocorre produção de AMP cíclico, resultando na transcrição da tirosinase e produção de melanina. (11,62) A feomelanina (amarelo-vermelha) é fotossensível e potencialmente mutagênica, pois produz radicais livres ao ser exposta à radiação ultravioleta. (61,63) Já a eumelanina (marrom-enebecida) é fotoprotetora. (61,63) Variantes do MC1R estão envolvidos na pigmentação da pele e cabelos através da regulação da produção da eumelanina e feomelanina, contribuindo no risco de melanoma. Trata-se de um gene extremamente polimórfico que contribui na configuração de diferentes fenótipos dependendo da quantidade de feomelanina e eumelanina. O fenótipo de cabelos vermelhos (*red hair color* – RHC), por exemplo, caracteriza-se pelo cabelo ruivo, olhos e pele clara, incapacidade de bronzear-se e a presença de efélides. (62,63,64) Entretanto, esse risco também pode ser independente das características fenotípicas, possivelmente podendo atuar por mecanismos diversos da pigmentação na patogênese do melanoma, demonstrando

a importância de algumas destas variantes como marcador independente de risco para melanoma. (6,37,64) Mais de 80 variantes já foram descritas, sendo a p.D84E, p.R142H, p.R151C, p.I155T, p.R160W, p.R163Q, p.V60L, p.V92M e p.D294H as mais associadas ao risco de MM. (65,66) As variantes ligadas à ocorrência de RHC duplicam o risco de melanoma por cada alelo RHC na população, enquanto nas famílias com melanoma o risco aumenta três vezes. (7,67) Além disso, a co-herança de variantes de MC1R e CDKN2A aumenta significativamente a penetrância do CDKN2A e o risco de melanoma. (67)

2.4.2.2 MITF

O gene Fator de Transcrição associado à Microftalmia (MITF) é um oncogene localizado no cromossomo 3p14. (28) É responsável pela regulação do desenvolvimento e diferenciação de melanócitos e também está envolvido na patogênese do melanoma. (68) A variante p.E318K parece aumentar o risco de melanoma, assim como também de câncer renal, pois indivíduos portadores do polimorfismo apresentam um risco cinco vezes maior de desenvolver carcinoma renal e/ou melanoma. (69)

2.4.3 Mutações em gens de baixa penetrância

Estudos de GWAS (*Genome-wide association study*) têm descoberto inúmeros novos loci que podem ter associação com o risco de melanoma. Recentemente, Ward *et al.* realizaram uma revisão sobre os genes de suscetibilidade e prognóstico no melanoma, e sumarizaram os genes de baixa penetrância em 5 grupos: relacionados com a contagem de nevos e pigmentação; relacionados com o sistema imune; relacionados com o reparo ao DNA; relacionados com o metabolismo e relacionados aos polimorfismos do receptor de vitamina D. (61) Além disso, a cada ano novos loci de genes com possível suscetibilidade ao melanoma são descobertos.

Contudo, o impacto de genes de baixa penetrância no desenvolvimento de melanoma é pequeno. (7) Entretanto, a co-herança de vários genes de baixa penetrância pode predispor ao desenvolvimento do melanoma, principalmente quando associado a outros fatores de risco, como a radiação ultravioleta. (7)

2.4.3.1 Polimorfismos de nucleotídeo único (SNP):

Um SNP é uma substituição estável de uma base no DNA genômico, cuja frequência é maior que 1%, em ao menos um grupo populacional. (70,71) A possibilidade de analisar SNPs permite estudar muitos loci relacionados com doenças e verificar em quais variantes a alteração do nucleotídeo altera a função ou expressão de determinado gene. (70,72) Dessa forma, novos genes de suscetibilidade de baixa penetrância podem ser identificados. (7,73) Na investigação de variantes genéticas, SNPs podem ser descobertos através de estudos de GWAS ou através da seleção de genes candidatos. (70,73) Após a descrição do SNP, deve-se avaliar a associação do mesmo com uma determinada doença, por meio de estudos de caso-controle ou coorte, determinando assim, respectivamente, o OR e risco relativo. (70) Desta forma, não são considerados causadores de doenças, mas sim modificadores de risco. (71) Entretanto, estima-se que apenas 10% dos SNPs do genoma são funcionais, tendo assim o potencial de alterar algum processo biológico. (72) A maioria dos SNPs aparentemente associados a neoplasias possuem um efeito pequeno, como um OR estimado <1.5 com alelos de frequência menor (MAF) maiores que 10%. (73) Em melanoma, o uso de GWAS já documentou alguns novos loci com pequenos efeitos, que podem levar à descoberta de novos mecanismos relacionados com a fisiopatogenia do melanoma. (73)

Similarmente, variantes compostas por uma única inserção/deleção de base (indels), embora não sejam formalmente consideradas SNP's, são muitas vezes descobertos durante estudos de SNP e classificados em bancos de SNPs. (71)

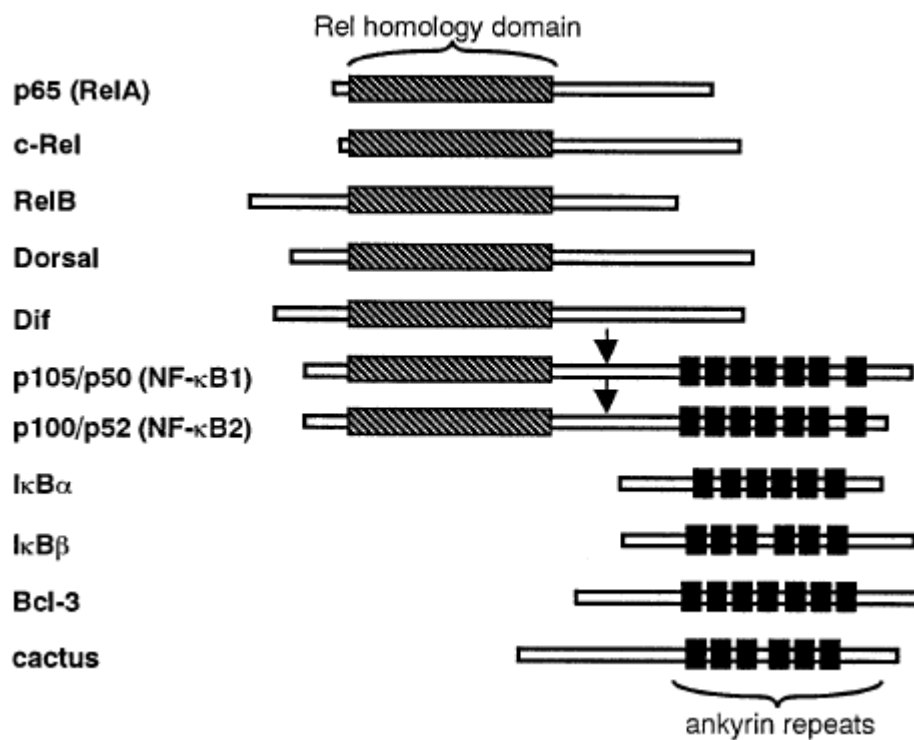
2.5 NF- κ B

2.5.1 Aspectos gerais

O Fator Nuclear- κ B (NF- κ B) foi identificado em 1986 como um fator de transcrição que se ligava ao local acentuador (*enhancer*) das imunoglobulinas kappa em células B produtoras de imunoglobulinas de cadeia leve. (74) Posteriormente, foi

visto o NF- κ B também podia ser encontrado em outras tipos de células. (75) A família do NF- κ B é transcrito pelo gene NFKB1, localizado no cromossomo 4q24 (76) e é formada por 5 proteínas: NF- κ B1(p50/p105), NF- κ B2 (p52/p100), RelA (p65), RelB, c-Rel. (77,78,79) Duas dessas proteínas, o NF- κ B1 e NF- κ B2, contém múltiplas cópias de repetições de anquirina na extremidade C, sendo que após o seu processamento ocorre liberação das subunidades p50 e p52 (Figura 1). (78)

Figura 1. A estrutura da família NF- κ B.

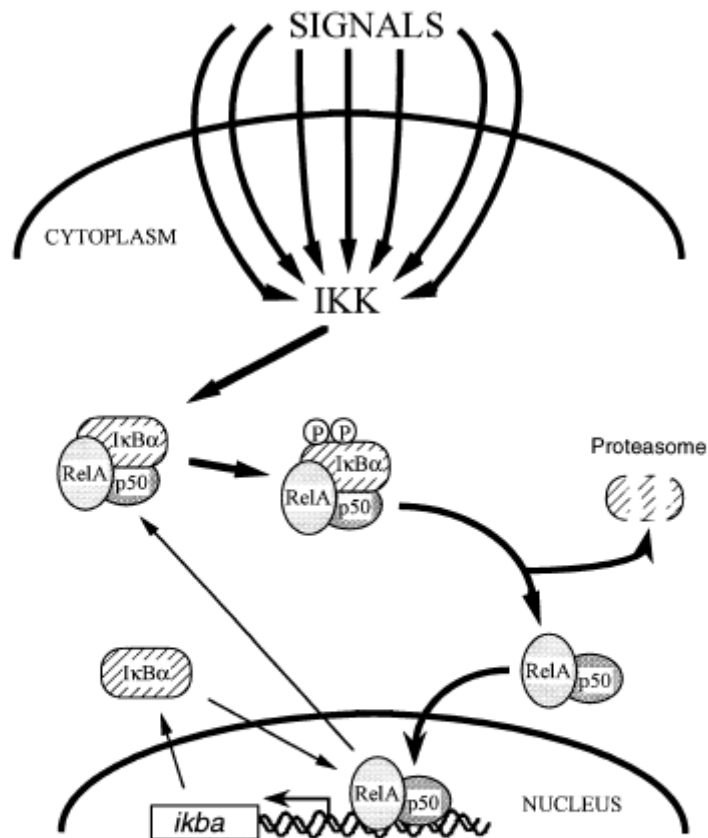


Extraído de: Baldwin AS Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol.* 1996; 14: 649-83.

A forma ativa do NF- κ B, que se liga ao DNA, é dimérica. (78) Embora muitas formas diméricas já tenham sido descritas, a forma heterodimérica NF- κ B p50 e p65/Rel A, codificado respectivamente pelos genes NFKB1 and RelA, é a forma

mais comum. (77,78) A vantagem de ter vários dímeros distintos é que cada um pode reconhecer alvos diferentes no DNA, aumentando a capacidade de controlar de diversas formas a expressão gênica. (78) Em situações normais, o NF- κ B está seqüestrado no citoplasma, formando complexos inativos com o seu inibidor (I κ B). (78,80) Vários estímulos, incluindo partículas bacterianas ou virais, citocinas, fatores de crescimento ou radicais livres, podem ativar o NF- κ B. (77) Após este estímulo, o seu inibidor sofre o processo de fosforilação e ubiquitinação, liberando o NF- κ B para migrar ao núcleo. (78,79) No núcleo, liga-se a regiões promotoras do DNA genômico, ativando assim a transcrição de mais de 150 genes diferentes, contribuindo para o balanço entre a sobrevivência e apoptose celular (Figura 2). (80,81)

Figura 2: A ativação de NF- κ B.



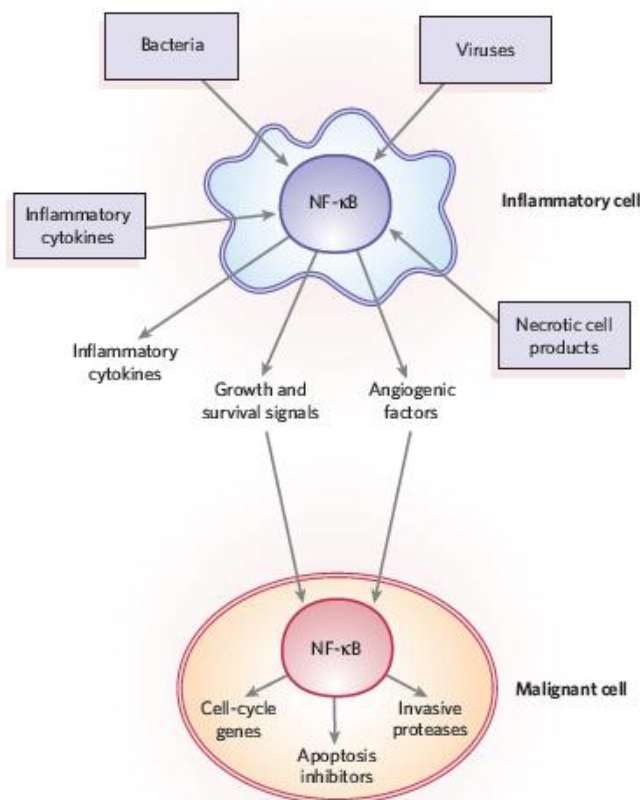
Extraído de: Gilmore TD. The Rel/NF-kappaB signal transduction pathway: introduction. *Oncogene*. 1999; 18(49): 6842-4.

2.5.2 Ações do NF- κ B:

Os fatores de transcrição da família NF- κ B regulam muitos processos biológicos de defesa, como a resposta imune adaptativa e inata e as reações de fase aguda. (77) A ativação inapropriada do NF- κ B também já foi relacionada com estados inflamatórios, no qual estimula a expressão de citocinas (TNF- α , IL6 e IL-10). (81,82,83) Por outro lado, sua ausência ou diminuição de ativação pode causar imunodeficiência. (84) Sendo assim, é vital para mecanismos imunológicos fisiológicos, mas pode ser danoso se desregulado. (77)

Além de quimiocinas e citocinas inflamatórias, o NF- κ B tem um papel importante na transcrição de inibidores da apoptose, assim como de fatores associados com o crescimento tumoral, angiogênese e capacidade de metastatizar (Figura 3). (80,84,85)

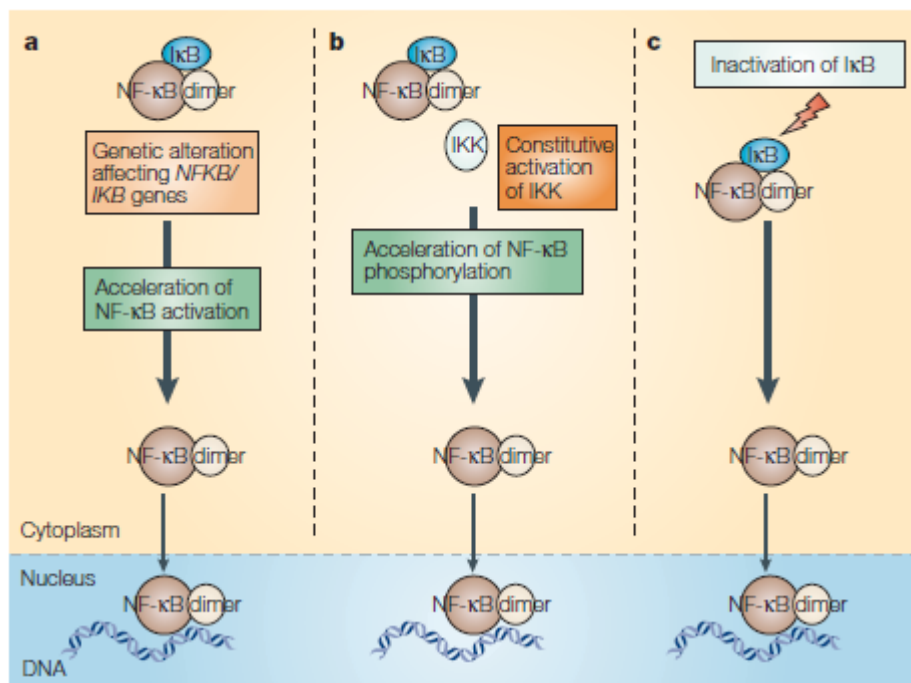
Figura 3. Ações do NF- κ B



Extraído de: Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. Nature. 2006; 441(7092): 431-6.

A ativação constitucional do NF- κ B pode ocorrer por três vias: por alterações genéticas afetando os genes NFKB1 ou I κ B; ativação constitucional da I κ k (*inhibitor of kappa B kinase*) que leva à fosforilação e degradação do inibidor I κ B; ou inativação do inibidor I κ B (Figura 4). (85) Por essas características, tem sido cada vez mais envolvido na oncogênese. (85,86)

Figura 4. Vias de ativação constitucional do NF- κ B.



Extraído de: Nakanishi C, Toi M. Nuclear factor-kappaB inhibitors as sensitizers to anticancer drugs. Nat Rev Cancer. 2005; 5(4) :297-309.

Foi demonstrado que vários tumores apresentam ativação constitucional do NF- κ B como, por exemplo: melanoma, leucemia, linfoma, mieloma múltiplo, fibrossarcoma e carcinomas de mama, pulmão, colorretal, tireóide, pâncreas, próstata e ovário. (80) Entretanto, dependendo do tipo de célula no qual age, o NF- κ B pode promover ou inibir carcinogênese. (84) Nos queratinócitos da pele, por exemplo, já foi demonstrado que a inibição seletiva do NF- κ B pode aumentar a frequência de apoptose e causar o desenvolvimento espontâneo de carcinomas

espinocelulares (CEC). (87,88) Outro achado interessante é que muitos agentes quimioterápicos estimulam a ativação do NF- κ B, o que potencialmente pode gerar quimiorresistência, ao inibir a apoptose inclusive das células tumorais. (85)

Nos processos biológicos, existe uma convergência entre inflamação e proliferação neoplásica. Diversas neoplasias apresentam uma associação com estados inflamatórios crônicos como as hepatites virais e o hepatocarcinoma e os linfomas MALT (mucosal-associated lymphoid tissue) e a *Helicobacter pylori*.(84) Após ativação do NF- κ B, as células inflamatórias podem produzir fatores que estimulam o crescimento, sobrevivência e vascularização de células neoplásicas. (84)

2.5.3 NF- κ B e Melanoma

No melanoma, a ativação de NF- κ B pode estar aumentada, favorecendo a progressão tumoral. (89,90,91) Nessa neoplasia, o NF- κ B promove a produção de quimiocinas que estimulam o crescimento das células neoplásicas, como o CXCL1 (*melanoma growth stimulatory activity*) e a IL-8. Essas quimiocinas estão associados ao crescimento tumoral, angiogênese e à capacidade de metastatizar. (80,92) Atuando por vias complementares, o melanoma pode apresentar uma ativação constitucional do I κ B, o que acelera a degradação do I κ B e promove a ativação do NF- κ B. (89) Outra observação interessante é que a radiação UVB estimula a atividade do NF- κ B, independente do dano causado ao DNA, explicando uma fração do seu papel na gênese deste tumor. (93)

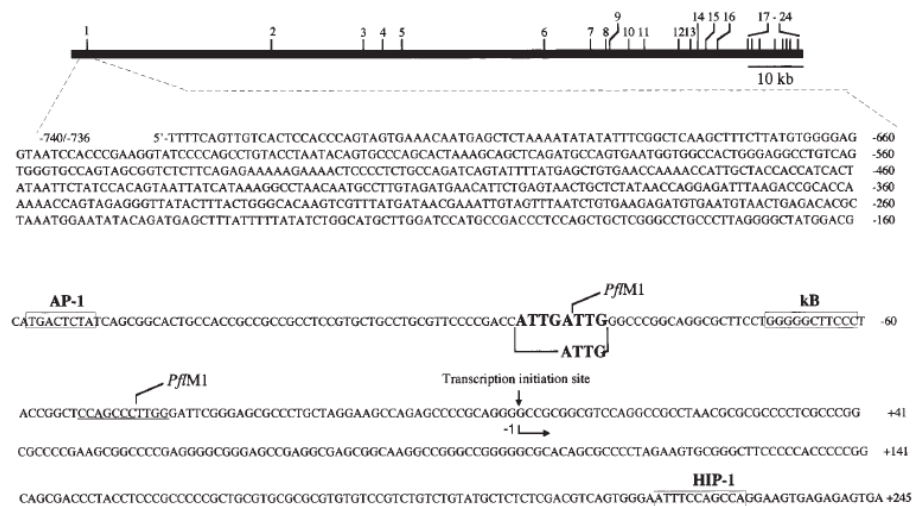
Por sua vez, em melanomas avançados e metastáticos, o aumento da atividade de NF- κ B inibe a apoptose, mantendo a proliferação tumoral. (89) Além disso, a expressão do seu inibidor, I κ B, está diminuída em melanomas metastáticos, quando comparados a condições benignas, como os nevos intradérmicos. (90)

2.5.4 O polimorfismo do gene NFKB1

A primeira descrição na literatura do polimorfismo rs28362491 do gene NFKB1 foi realizada por Karban *et al.*(81), em 2004, em uma amostra de pacientes

com doença inflamatória intestinal nos Estados Unidos. Os autores seqüenciaram uma região promotora do gene (Figura 5) e encontraram uma inserção/deleção de quatro bases na região promotora 5' (-94 ins/del ATTG). Este polimorfismo envolve a deleção de múltiplos nucleotídeos e está localizado entre dois pontos-chaves de regulação promotora do gene. (81)

Figura 5. A estrutura do polimorfismo -94 ins/del ATTG.



Extraído de: Karban AS *et al.* Functional annotation of a novel NFKB1 promoter polymorphism that increases risk for ulcerative colitis. *Hum Mol Genet.* 2004; 13(1): 35-45

Nesse estudo, o alelo de deleção (ATTG₁- del) mostrou, *in vitro*, diminuição importante da atividade promotora e menor produção da proteína NF- κ B p50/p105. (81) Em contraste, ao aplicar este novo polimorfismo descoberto na sua amostra de casos e controles, perceberam que o genótipo homocigoto del/del aumentava o risco de colite ulcerativa (OR=1,59). (81) Nesse trabalho, os autores sugeriram que a diminuição da atividade do NF- κ B1 no grupo del/del poderia prejudicar a capacidade do cólon de proteger-se contra bactérias, predispondo assim os pacientes ao desenvolvimento de colite ulcerativa. (81) Paradoxalmente, Bank *et al.* (83), em uma população dinamarquesa, encontraram um risco menor de desenvolver Doença de Crohn em indivíduos com o alelo del (OR= 0,80, IC 95% 0,65–1,00; p=0,05). Os

autores sugerem que a diminuição da expressão da subunidade p50 do NF- κ B poderia ser a causa da queda na resposta inflamatória, sendo assim associado a um risco menor de Doença de Crohn. (83)

A associação do polimorfismo (-94 ins/del ATTG) e neoplasias apresenta resultados variáveis conforme a população estudada. As discrepâncias entre os resultados podem ser causadas pelas diferenças étnicas e interações entre outros fatores genéticos, assim como ambientais. (8,9) Além disso, os estudos também variam conforme suas metodologias e tamanhos de amostra. (8,9)

O alelo del mostrou-se um fator de risco para câncer de bexiga (94), câncer de pulmão (95), hepatocarcinoma em pacientes chineses (9) e câncer colorretal em suecos (96) e dinamarqueses (97).

Em contraste, o alelo ins foi associado com o risco de câncer oral escamoso (76,98), câncer de ovário (8), carcinoma escamoso cervical (99), câncer gástrico (100), câncer de próstata (101), câncer nasofaríngeo (102), carcinoma renal (103), hepatocarcinoma em pacientes taiwaneses (104) e câncer colorretal em malásios (105). Esses estudos sugerem que o risco conferido pelo alelo ins provavelmente seja devido à inibição da apoptose e à promoção da proliferação celular decorrente do estímulo da expressão do p50 (NFKB1). (8,86)

Na tentativa de estudar o real impacto do polimorfismo (-94ins/del ATTG) nas neoplasias, várias metanálises foram conduzidas. Zou *et al.*(106), em 2011, não encontraram uma associação entre o polimorfismo e risco de neoplasia. Entretanto, na análise de subgrupos, a presença do alelo del foi considerada um fator de proteção na população asiática, enquanto se mostrou um fator de risco na população caucasiana. (106) No mesmo ano, Wang *et al.* (107) mostraram que o genótipo del/del (ATTG₁/ATTG₁) apresentava um risco menor para câncer, comparado ao ins/ins (OR=0,74; IC 95% 0,57-0,97). Contudo, diferente do estudo anterior, a associação foi presente apenas na análise estratificada do grupo de asiáticos, não sendo significativa no grupo de caucasianos. (107) Posteriormente, Yang *et al.* (86), em 2014, realizaram uma nova metanálise, confirmando o risco associado ao genótipo ins/ins (OR=1,47; IC 95% 1,11-1,93). Recentemente publicado, Nian *et al.*(108) também comprovaram a diminuição de risco de

neoplasias associado ao genótipo del/del (OR=0,74; IC 95% 0,58-0,96). Nesses últimos dois trabalhos, ao estratificar entre os subgrupos, o efeito foi mantido apenas no grupo étnico asiático, não sendo significativo no grupo dos caucasianos. Sendo assim, o polimorfismo -94ins/del ATTG tem uma influência regulatória no gene NFKB1 e apresenta um papel em diversas neoplasias. (76)

2.5.4.1 O polimorfismo do gene NFKB1 e melanoma

A importância do polimorfismo -94ins/del ATTG já foi estudada no melanoma. (109) Bu *et al.* (109), ao estudar uma amostra sueca de 185 pacientes com melanoma e 438 controles, encontraram que o alelo ins estava relacionado com um risco para melanoma, especialmente na forma homozigótica ATTG₂/ATTG₂ (OR: 1,58; IC 95% 1,09-2,28). Esse genótipo foi mais associado com o sexo masculino e idade acima dos 65 anos. (109) No grupo do melanoma, pacientes com o genótipo ATTG₁ apresentavam tumores mais finos e com menores níveis de Clark ao diagnóstico (p=0.025). Adicionalmente, a frequência do genótipo ATTG₁/ATTG₁ foi maior em pacientes com melanomas em áreas anatômicas expostas à radiação UV de forma intermitente (p=0.037). (109) Sendo assim, o gene NFKB1 pode estar envolvido na suscetibilidade para o melanoma e polimorfismos funcionais desse gene podem também ser preditores biológicos para a progressão do tumor. (109)

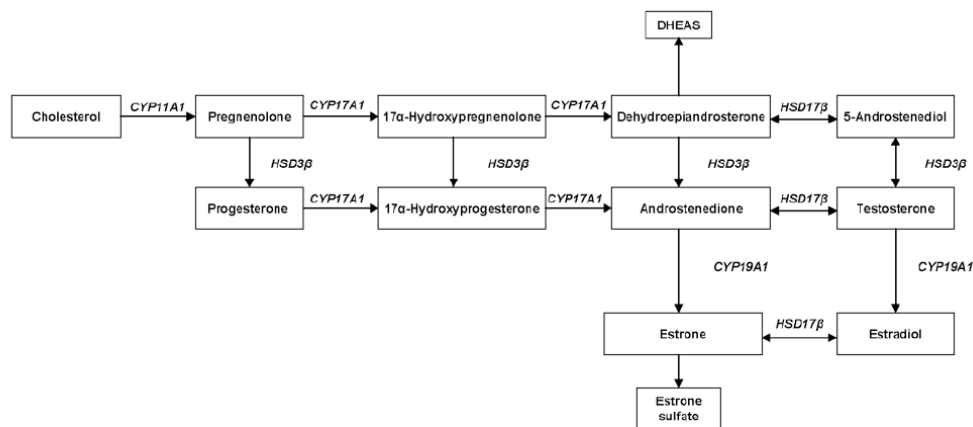
Até o presente momento, este é o único estudo relacionando a presença do polimorfismo -94 ins/del ATTG do gene NFKB1 e o risco de desenvolver melanoma. Estudos em populações distintas são necessários para comprovar a validade externa dos resultados.

2.6 O Gene CYP19A1

O produto do gene CYP19A1, localizado no cromossomo 15q21, é a enzima aromatase, uma proteína de 58 k-Da que pertence à família do citocromo P450. (110,111,112,113) A aromatase cataliza a conversão (Figura 6) de andrógenos (testosterona e androstenediona) em estrógenos (estradiol e estrona, respectivamente). (110,113) Além disso, é essencial para a síntese de colesterol e o

metabolismo de xenobióticos e de ácidos graxos. (113) Em humanos, a enzima é expressa nas gônadas, pele, placenta, músculo, cérebro, ossos e tecido adiposo das mamas. (110,114) O estrógeno é importante em ambos sexos para os ossos e gônadas, sendo essencial no sexo feminino para o desenvolvimento do órgão reprodutor. (112) Por outro lado, quando a enzima encontra-se ativada excessivamente, pode estar associada a doenças como o câncer de mama e a endometriose. (111)

Figura 6 – A via de síntese do estrógeno.



Extraído de: Olson SH *et al.* Variants in hormone biosynthesis genes and risk of endometrial cancer. *Cancer Causes Control*. 2008; 19(9): 955-63.

2.6.1 Polimorfismos do gene CYP19A1 e neoplasias

Inúmeros polimorfismos genéticos do gene CYP19A1 já foram descritos. (115,116) A maioria são SNP de regiões não funcionais, entretanto há SNPs não-sinônimos de áreas codificadas e variantes que podem modificar a função da enzima, causando alterações nos níveis de estrógenos. (113,117) O polimorfismo rs11575899 é uma inserção/deleção de três pares de bases (TCT) no intron 4 do gene CYP19A1 (Figura 7). (113,118)

Figura 7. O polimorfismo +/- TCT do gene CYP19A1.

GENE	SNP	dbSNP	Forward primer	Reverse primer	Probe sequences
CYP17	t-34c	rs743572	GGG TAG CCC TTT AAA AGG CCT	GTG GCT GGG TGC CGG	CTC TTC TAC TCC ACC GCT GTC TAT CTT GC CTC TTC TAC TCC ACT GCT GTC TAT CTT GCC T
CYP17	c198t	rs6162	CCC TGG TGG GCA GCC T	TTT CTG CAG CTT GAA GAA GTT GTT AT	CCT CCC CAG ACA TGG CCA TAT GC CCT CCC CAG ACA GGG CCA TAT GC
CYP17	g255t	rs6163	AAC TTC TTC AAG CTG CAG AAA AAA TA	TGG CCG ACA ATC ACT GTA GTC	CCC CAT CTA TTC TGT TCG TAT GGG CAC CCC CAT CTA TTC GGT TCG TAT GGG CAC
CYP19	IVS4 [tct]+/-		GGA AAA CAA CTC GAC CCT TCT TTA	TAT GAT TTC AAA AAA GGC ACA TTC A	TAG CTA CAA TCT TCT TTT T* TTA GCT ACA ATC TTT TTT GTC TA*

Extraído de: Dunning *et al.* Polymorphisms associated with circulating sex hormone levels in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst.* 2004; 96 (12): 936-45.

A inserção TCT já foi associada com aumento da incidência de condições hiperestrogênicas. (113) Já a deleção mostrou níveis reduzidos de estradiol e menores taxas de estradiol/testosterona. (119) Em uma revisão incluindo cinco estudos sobre o polimorfismo e os níveis de estrógenos, três não encontraram associação significativa e dois mostraram que o alelo ins pode contribuir para aumentar os níveis de estrógeno. (115)

Em relação ao risco de doenças, o alelo del foi associado com um aumento de risco de câncer de próstata (120), câncer de mama em coreanas (121) e endometriose (122). Por outro lado, o alelo del parece diminuir o risco de câncer de endométrio (123), o que pode ser explicado pelos menores níveis séricos de estrógeno relacionado com o alelo del. (119)

Entretanto, existem estudos que não encontraram associação entre o polimorfismo ins/del TCT e o risco de câncer de mama. Trabalhos desenvolvidos na Inglaterra (118,119), Estados Unidos (124) e China (117) não conseguiram mostrar relação entre essa neoplasia e o polimorfismo rs11575899.

2.6.2 O gene CYP19A1 (Aromatase) e a pele

A aromatase é expressa em muitos tecidos extra-gonadais e pode ser encontrada em fibroblastos, na unidade pilossebácea, pele não-genital e queratinócitos (125). Além disso, melanócitos normais também podem expressar

receptores de estrógenos, mostrando que o hormônio pode influenciar a proliferação celular e a produção de melanina. (126)

A atividade da aromatase já foi demonstrada em células de melanoma. (127) Estrógenos, de forma cumulativa e dose dependente, também podem aumentar o risco de melanoma. (128) Entretanto, até o presente momento, não há estudos que investiguem a associação do polimorfismo rs11575899 da enzima aromatase e o melanoma.

2.7 A Interação entre os genes CYP19A1 e NFKB1

Os hormônios sexuais podem influenciar a resposta inflamatória e modular o crescimento celular e apoptose através da cascata do NF- κ B. (129,130). O aumento de citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-1 e IL-6) pode induzir a atividade da enzima aromatase, causando maiores níveis de estrógenos em respostas inflamatórias. (129) Por sua vez, o estrógeno pode aumentar a resposta inflamatória ao ativar o NF- κ B, além de bloquear a apoptose e estimular a proliferação celular. (129)

Para tentar unir os dois conceitos, Slattery *et al.* (131) estudaram a interação entre polimorfismos do gene NFKB1 e CYP19A1 em pacientes com câncer de cólon e reto, porém diferentes dos estudados neste presente trabalho. Ao mostrar interações estatisticamente significativas entre os polimorfismos e o risco de desenvolver essas neoplasias, os autores demonstraram a possibilidade de o estrógeno contribuir na patogênese do câncer através do caminho da inflamação. (131) Além disso, anti-estrógenos e inibidores da aromatase são muitas vezes usados como anti-neoplásicos, por bloquearem a via do NF- κ B e induzirem a apoptose. (130) Contudo, até o presente momento, não há estudos sobre os polimorfismos rs11575899 do gene CYP19A1 e rs28362491 do gene NFKB1 e melanoma.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos Principais

Estudar as variantes genéticas rs28362491 no gene NFKB1 e rs11575899 no gene CYP19A1 e sua relação com a susceptibilidade ao melanoma em uma população do sul do Brasil.

3.2 Objetivos secundários

Estudar a relação dos polimorfismos rs28362491 e rs11575899 com características fenotípicas, gênero e idade dos indivíduos.

Verificar a associação entre os polimorfismos e características do tumor, como a localização, tipo histológico, índice de Breslow e nível de Clark.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO

1- Carvalho CA, Cunha ME, Giugliani R, Bakos L, Ashton-Prolla P. Hereditary melanoma: prevalence of risk factors in a group of patients in Southern Brazil. *An Bras Dermatol* 2004; 79(1): 53-60

2- 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.

3- Estimativa 2014: A incidência de câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva; Rio de Janeiro; INCA 2014. <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24042014.pdf>

4- Zalaudek I, Grinschgl S, Argenziano G, Marghoob AA, Blum A, Richtig E *et al*. Age-related prevalence of dermoscopy patterns in acquired melanocytic naevi. *Br J Dermatol*. 2006; 154(2): 299-304.

5- Mar V, Wolfe R, Kelly JW. Predicting melanoma risk for the Australian population. *Australas J Dermatol*. 2011; 52(2): 109-16.

6- Puig S. A new era in melanoma. *Dermatol Ther*. 2012; 25(5): 389-91.

7- Badenas C, Aguilera P, Puig-Butillé JA, Carrera C, Malvehy J, Puig S. Genetic counseling in melanoma. *Dermatol Ther*. 2012; 25(5): 397-402.

8- Huo ZH, Zhong HJ, Zhu YS, Xing B, Tang H. Roles of functional NFKB1 and β -TrCP insertion/deletion polymorphisms in mRNA expression and epithelial ovarian cancer susceptibility. *Genet Mol Res*. 2013; 12(3): 3435-43.

9- Gao J, Xu HL, Gao S, Zhang W, Tan YT, Rothman N *et al*. Genetic polymorphism of NFKB1 and NFKBIA genes and liver cancer risk: a nested case-control study in Shanghai, China. *BMJ Open*. 2014; 4(2): e004427.

10- Guy GP Jr, Ekwueme DU, Tangka FK, Richardson LC. Melanoma treatment costs: a systematic review of the literature, 1990-2011. *Am J Prev Med*. 2012; 43(5): 537-45.

11- Ibrahim N, Haluska FG. Molecular pathogenesis of cutaneous melanocytic neoplasms. *Annu Rev Pathol.* 2009; 4: 551-79.

12- Hunter HL, Dolan OM, McMullen E, Donnelly D, Gavin A. Incidence and survival in patients with cutaneous malignant melanoma: experience in a U.K. population, 1984-2009. *Br J Dermatol.* 2013; 168(3): 676-8.

13- Rossi S, Crocetti E, Capocaccia R, Gatta G. Estimates of cancer burden in Italy. *Tumori.* 2013; 99(3): 416-24.

14- Geller AC, Clapp RW, Sober AJ, Gonsalves L, Mueller L, Christiansen CL *et al.* Melanoma epidemic: an analysis of six decades of data from the Connecticut Tumor Registry. *J Clin Oncol.* 2013; 31(33): 4172-8.

15- Kachuri L, De P, Ellison LF, Semenciw R. Cancer incidence, mortality and survival trends in Canada, 1970-2007. *Chronic Dis Inj Can.* 2013; 33(2): 69-80.

16- Australian Institute of Health and Welfare. Cancer survival and prevalence in Australia: period estimates from 1982 to 2010. *Asia Pac J Clin Oncol.* 2013; 9(1): 29-39.

17- Borges SZ, Bakos L, Cartell A, Wagner M, Agostini A, Lersch E. Distribution of clinical-pathological types of cutaneous melanomas and mortality rate in the region of Passo Fundo, RS, Brazil. *Int J Dermatol.* 2007; 46(7): 679-86.

18- Grazziotin TC, Rey MC, Bica CG, Pinto LA, Bonamigo RR, Puig-Butille JA *et al.* Genetic variations of patients with familial or multiple melanoma in Southern Brazil. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2013; 27(2): 179-85.

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

20- Bakos RM, Besch R, Zoratto GG, Godinho JM, Mazzotti NG, Ruzicka T *et al.* The CDKN2A p.A148T variant is associated with cutaneous melanoma in Southern Brazil. *Exp Dermatol.* 2011; 20(11): 890-3.

- 21- Naser N. Cutaneous melanoma: a 30-year-long epidemiological study conducted in a city in southern Brazil, from 1980-2009. *An Bras Dermatol.* 2011; 86(5): 932-41.
- 22- Mendes GL, Koifman RJ, Koifman S. Mortality frequency and trends attributed to melanoma in Brazil from 1980-2005. *J Toxicol Environ Health A.* 2010; 73(13-14): 850-7.
- 23- Nestle FO, Halpern AC. Melanoma. In: Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RP. *Dermatology.* Spain: Mosby Elsevier 2008. Pg 1745-1769.
- 24- Rapini RP. Neoplasias Melanocíticas. In: Rapini RP. *Dermatopatologia Prática.* Di Livros 2007. Pg 273-278.
- 25- Pollack LA, Li J, Berkowitz Z, Weir HK, Wu XC, Ajani UA *et al.* Melanoma survival in the United States, 1992 to 2005. *J Am Acad Dermatol.* 2011; 65 (5 Suppl 1): S78-86.
- 26- Quintella Mendes GL, Koifman S. Socioeconomic status as a predictor of melanoma survival in a series of 1083 cases from Brazil: just a marker of health services accessibility? *Melanoma Res.* 2013; 23(3): 199-205.
- 27- Psaty EL, Scope A, Halpern AC, Marghoob AA. Defining the patient at high risk for melanoma. *Int J Dermatol.* 2010; 49(4): 362-76.
- 28- Hill VK, Gartner JJ, Samuels Y, Goldstein AM. The genetics of melanoma: recent advances. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2013; 14: 257-79.
- 29- Tucker MA. Melanoma epidemiology. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2009; 23(3): 383-95.
- 30- Gonçalves FT Francisco G, de Souza SP, Luiz OC, Festa-Neto C, Sanches JA *et al.* European ancestry and polymorphisms in DNA repair genes modify the risk of melanoma: a case-control study in a high UV index region in Brazil. *J Dermatol Sci.* 2011; 64(1): 59-66.

31- Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Picconi O, Boyle P *et al.* Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *Eur J Cancer.* 2005; 41(1): 45-60.

32- Elwood JM, Gallagher RP, Worth AJ, Wood WS, Pearson JC. Etiological differences between subtypes of cutaneous malignant melanoma: Western Canada Melanoma Study. *J Natl Cancer Inst.* 1987; 78(1): 37-44.

33- International Agency for Research on Cancer Working Group on artificial ultraviolet (UV) light and skin cancer. The association of use of sunbeds with cutaneous malignant melanoma and other skin cancers: A systematic review. *Int J Cancer.* 2007; 120(5): 1116-22.

34- Ferrucci LM, Vogel RI, Cartmel B, Lazovich D, Mayne ST. Indoor tanning in businesses and homes and risk of melanoma and nonmelanoma skin cancer in 2 US case-control studies. *J Am Acad Dermatol.* 2014; pii: S0190-9622(14) 01663-6.

35- Dennis LK, Lynch CF, Sandler DP, Alavanja MC. Pesticide use and cutaneous melanoma in pesticide applicators in the agricultural health study. *Environ Health Perspect.* 2010; 118(6): 812-7.

36- Gallagher RP, Macarthur AC, Lee TK, Weber JP, Leblanc A, Mark Elwood J *et al.* Plasma levels of polychlorinated biphenyls and risk of cutaneous malignant melanoma: a preliminary study. *Int J Cancer.* 2011; 128(8): 1872-80.

37- Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Zanetti R, Masini C *et al.* Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors. *Eur J Cancer.* 2005; 41(14): 2040-59.

38- Pielop JA, Brownell I, Duvic M. Mycosis fungoides associated with malignant melanoma and dysplastic nevus syndrome. *Int J Dermatol.* 2003; 42(2): 116-22.

39- Holly EA, Kelly JW, Shpall SN, Chiu SH. Number of melanocytic nevi as a major risk factor for malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol.* 1987; 17(3): 459-68.

40- Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Abeni D, Boyle P *et al.* Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. *Eur J Cancer.* 2005; 41(1): 28-44.

41- Bevona C, Goggins W, Quinn T, Fullerton J, Tsao H. Cutaneous melanomas associated with nevi. *Arch Dermatol.* 2003; 139(12): 1620-4.

42- Lipoff JB, Scope A, Dusza SW, Marghoob AA, Oliveria SA, Halpern AC. Complex dermoscopic pattern: a potential risk marker for melanoma. *Br J Dermatol.* 2008; 158(4): 821-4.

43- Rigel DS, Rivers JK, Friedman RJ, Kopf AW. Risk gradient for malignant melanoma in individuals with dysplastic naevi. *Lancet.* 1988; 1(8581): 352-3.

44- Ferrone CR, Ben Porat L, Panageas KS, Berwick M, Halpern AC, Patel A *et al.* Clinicopathological features of and risk factors for multiple primary melanomas. *JAMA.* 2005; 294(13): 1647-54.

45- Kraemer KH, Greene MH, Tarone R, Elder DE, Clark WH Jr, Guerry D 4th. Dysplastic naevi and cutaneous melanoma risk. *Lancet.* 1983; 2(8358): 1076-7.

46- Reimer RR, Clark WH Jr, Greene MH, Ainsworth AM, Fraumeni JF Jr. Precursor lesions in familial melanoma. A new genetic preneoplastic syndrome. *JAMA.* 1978; 239(8): 744-6.

47- Lynch HT, Fusaro RM, Pester J, Lynch JF. Familial atypical multiple mole melanoma (FAMMM) syndrome: genetic heterogeneity and malignant melanoma. *Br J Cancer.* 1980; 42(1): 58-70.

48- Bakos L, Mastroeni S, Bonamigo RR, Melchi F, Pasquini P, Fortes C. A melanoma risk score in a Brazilian population. *An Bras Dermatol.* 2013; 88(2): 226-32.

49- Bakos L, Masiero NC, Bakos RM, Burtet RM, Wagner MB, Benzano D. European ancestry and cutaneous melanoma in Southern Brazil. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2009; 23(3): 304-7.

50- Grange F, Chompret A, Guilloud-Bataille M, Guillaume JC, Margulis A, Prade M *et al.* Comparison between familial and nonfamilial melanoma in France. *Arch Dermatol.* 1995; 131(10): 1154-9.

51- Hayward NK. Genetics of melanoma predisposition. *Oncogene.* 2003; 22(20): 3053-62.

52- Lindor NM, Greene MH. The concise handbook of family cancer syndromes. Mayo Familial Cancer Program. *J Natl Cancer Inst.* 1998; 90(14): 1039-71.

53- Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature.* 1993; 366(6456): 704-7.

54- Pomerantz J, Schreiber-Agus N, Liégeois NJ, Silverman A, Alland L, Chin L *et al.* The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell.* 1998; 92(6): 713-23.

55- Bishop DT, Demenais F, Goldstein AM, Bergman W, Bishop JN, Bressac-de Paillerets B *et al.* Geographical variation in the penetrance of CDKN2A mutations for melanoma. *J Natl Cancer Inst.* 2002; 94(12): 894-903.

56- Begg CB, Orlow I, Hummer AJ, Armstrong BK, Kricker A, Marrett LD *et al.* Lifetime risk of melanoma in CDKN2A mutation carriers in a population-based sample. *J Natl Cancer Inst.* 2005; 97(20): 1507-15.

57- Potrony M, Puig-Butillé JA, Aguilera P, Badenas C, Carrera C, Malveyh J *et al.* Increased prevalence of lung, breast, and pancreatic cancers in addition to melanoma risk in families bearing the cyclin-dependent kinase inhibitor 2A mutation: Implications for genetic counseling. *J Am Acad Dermatol.* 2014; pii: S0190-9622(14)01652-1.

58- Maubec E, Chaudru V, Mohamdi H, Blondel C, Margaritte-Jeannin P, Forget S *et al.* Familial melanoma: clinical factors associated with germline CDKN2A mutations according to the number of patients affected by melanoma in a family. *J Am Acad Dermatol.* 2012; 67(6): 1257-64.

59- Goldstein AM, Chan M, Harland M, Gillanders EM, Hayward NK, Avril MF *et al.* High-risk melanoma susceptibility genes and pancreatic cancer, neural system tumors, and uveal melanoma across GenoMEL. *Cancer Res.* 2006 ; 66(20): 9818-28.

60- Zuo L, Weger J, Yang Q, Goldstein AM, Tucker MA, Walker GJ *et al.* Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. *Nat Genet.* 1996; 12(1): 97-9.

61- Ward KA, Lazovich D, Hordinsky MK. Germline melanoma susceptibility and prognostic genes: a review of the literature. *J Am Acad Dermatol.* 2012; 67(5): 1055-67.

62- Schiöth HB, Phillips SR, Rudzish R, Birch-Machin MA, Wikberg JE, Rees JL. Loss of function mutations of the human melanocortin 1 receptor are common and are associated with red hair. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 260(2): 488-91.

63- Valverde P, Healy E, Sikkink S, Haldane F, Thody AJ, Carothers A *et al.* The Asp84Glu variant of the melanocortin 1 receptor (MC1R) is associated with melanoma. *Hum Mol Genet.* 1996; 5(10):1663-6.

64- Han J, Kraft P, Colditz GA, Wong J, Hunter DJ. Melanocortin 1 receptor variants and skin cancer risk. *Int J Cancer.* 2006; 119(8): 1976-84.

65- Raimondi S, Sera F, Gandini S, Iodice S, Caini S, Maisonneuve P *et al.* MC1R variants, melanoma and red hair color phenotype: a meta-analysis. *Int J Cancer.* 2008; 122(12) :2753-60.

66- Williams PF, Olsen CM, Hayward NK, Whiteman DC. Melanocortin 1 receptor and risk of cutaneous melanoma: a meta-analysis and estimates of population burden. *Int J Cancer.* 2011; 129(7): 1730-40.

67- Fargnoli MC, Gandini S, Peris K, Maisonneuve P, Raimondi S. MC1R variants increase melanoma risk in families with CDKN2A mutations: a meta-analysis. *Eur J Cancer.* 2010; 46(8): 1413-20.

68- Levy C, Khaled M, Fisher DE. MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends Mol Med*. 2006; 12(9): 406-14.

69- Bertolotto C, Lesueur F, Giuliano S, Strub T, de Lichy M, Bille K *et al*. A SUMOylation-defective MITF germline mutation predisposes to melanoma and renal carcinoma. *Nature*. 2011; 480(7375): 94-8.

70- Taylor JG, Choi EH, Foster CB, Chanock SJ. Using genetic variation to study human disease. *Trends Mol Med*. 2001; 7(11): 507-12.

71- Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene*. 1999; 234(2): 177-86.

72- Wjst M. Target SNP selection in complex disease association studies. *BMC Bioinformatics*. 2004; 12; 5:92.

73- Kim HK, Chanock SJ. Genome-wide association studies in melanoma: off to a good start. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2012; 25(2): 231-3.

74- Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*. 1986; 46(5): 705-16.

75- Sen R, Baltimore D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell*. 1986; 47(6): 921-8.

76- Lin SC, Liu CJ, Yeh WI, Lui MT, Chang KW, Chang CS. Functional polymorphism in NFKB1 promoter is related to the risks of oral squamous cell carcinoma occurring on older male areca (betel) chewers. *Cancer Lett*. 2006; 243(1): 47-54.

77- Baldwin AS Jr. Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease. *J Clin Invest*. 2001; 107(1): 3-6.

78- Baldwin AS Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol*. 1996; 14: 649-83.

79- Gilmore TD. The Rel1/NF-kappa B/I kappa B signal transduction pathway and cancer. *Cancer Treat Res*. 2003; 115: 241-65.

80- Richmond A. Nf-kappa B, chemokine gene transcription and tumour growth. *Nat Rev Immunol.* 2002; 2(9): 664-74.

81- Karban AS, Okazaki T, Panhuysen CI, Gallegos T, Potter JJ, Bailey-Wilson JE. Functional annotation of a novel NFKB1 promoter polymorphism that increases risk for ulcerative colitis. *Hum Mol Genet.* 2004; 13(1): 35-45.

82- Tan BH, Ross JA, Kaasa S, Skorpen F, Fearon KC. Identification of possible genetic polymorphisms involved in cancer cachexia: a systematic review. *J Genet.* 2011; 90(1): 165-77.

83- Bank S, Andersen PS, Burisch J, Pedersen N, Roug S, Galsgaard J *et al.* Polymorphisms in the inflammatory pathway genes TLR2, TLR4, TLR9, LY96, NFKBIA, NFKB1, TNFA, TNFRSF1A, IL6R, IL10, IL23R, PTPN22, and PPARG are associated with susceptibility of inflammatory bowel disease in a Danish cohort. *PLoS One.* 2014; 9(6): e98815.

84- Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature.* 2006; 441(7092): 431-6.

85- Nakanishi C, Toi M. Nuclear factor-kappaB inhibitors as sensitizers to anticancer drugs. *Nat Rev Cancer.* 2005; 5(4) :297-309.

86- Yang X, Li P, Tao J, Qin C, Cao Q, Gu J *et al.* Association between NFKB1 -94ins/del ATTG Promoter Polymorphism and Cancer Susceptibility: An Updated Meta-Analysis. *Int J Genomics.* 2014; 2014: 612972.

87- Van Hogerlinden M, Rozell BL, Ahrlund-Richter L, Toftgård R. Squamous cell carcinomas and increased apoptosis in skin with inhibited Rel/nuclear factor-kappaB signaling. *Cancer Res.* 1999; 59(14): 3299-303.

88- Van Hogerlinden M, Auer G, Toftgård R. Inhibition of Rel/Nuclear Factor-kappaB signaling in skin results in defective DNA damage-induced cell cycle arrest and Ha-ras- and p53-independent tumor development. *Oncogene.* 2002; 21(32): 4969-77.

89- Ueda Y, Richmond A. NF-kappaB activation in melanoma. *Pigment Cell Res.* 2006; 19(2): 112-24.

90- McNulty SE, del Rosario R, Cen D, Meyskens FL Jr, Yang S. Comparative expression of NFkappaB proteins in melanocytes of normal skin vs. benign intradermal naevus and human metastatic melanoma biopsies. *Pigment Cell Res.* 2004; 17(2): 173-80.

91- Yang J, Richmond A. Constitutive IkappaB kinase activity correlates with nuclear factor-kappaB activation in human melanoma cells. *Cancer Res.* 2001; 61(12): 4901-9.

92- Huang S, DeGuzman A, Bucana CD, Fidler IJ. Nuclear factor-kappaB activity correlates with growth, angiogenesis, and metastasis of human melanoma cells in nude mice. *Clin Cancer Res.* 2000; 6(6): 2573-81.

93- Simon MM, Aragane Y, Schwarz A, Luger TA, Schwarz T. UVB light induces nuclear factor kappa B (NF kappa B) activity independently from chromosomal DNA damage in cell-free cytosolic extracts. *J Invest Dermatol.* 1994; 102(4): 422-7.

94- Li P, Gu J, Yang X, Cai H, Tao J, Yang X *et al.* Functional promoter -94 ins/del ATTG polymorphism in NFKB1 gene is associated with bladder cancer risk in a Chinese population. *PLoS One.* 2013; 8(8): e71604.

95- Oltulu YM, Coskunpinar E, Ozkan G, Aynaci E, Yildiz P, Isbir T *et al.* Investigation of NF-kB1 and NF-kBIA gene polymorphism in non-small cell lung cancer. *Biomed Res Int.* 2014; 2014: 530381.

96- Lewander A, Butchi AK, Gao J, He LJ, Lindblom A, Arbman G *et al.* Polymorphism in the promoter region of the NFKB1 gene increases the risk of sporadic colorectal cancer in Swedish but not in Chinese populations. *Scand J Gastroenterol.* 2007; 42(11): 1332-8.

97- Andersen V, Christensen J, Overvad K, Tjønneland A, Vogel U. Polymorphisms in NFkB, PXR, LXR and risk of colorectal cancer in a prospective study of Danes. *BMC Cancer.* 2010; 10: 484.

98- Lin CW, Hsieh YS, Hsin CH, Su CW, Lin CH, Wei LH *et al.* Effects of NFKB1 and NFKBIA gene polymorphisms on susceptibility to environmental factors and the clinicopathologic development of oral cancer. *PLoS One.* 2012; 7(4): e35078.

99- Zhou B, Qie M, Wang Y, Yan L, Zhang Z, Liang A *et al.* Relationship between NFKB1 -94 insertion/deletion ATTG polymorphism and susceptibility of cervical squamous cell carcinoma risk. *Ann Oncol.* 2010; 21(3): 506-11.

100- Lo SS, Chen JH, Wu CW, Lui WY. Functional polymorphism of NFKB1 promoter may correlate to the susceptibility of gastric cancer in aged patients. *Surgery.* 2009; 145(3): 280-5.

101- Zhang P, Wei Q, Li X, Wang K, Zeng H, Bu H *et al.* A functional insertion/deletion polymorphism in the promoter region of the NFKB1 gene increases susceptibility for prostate cancer. *Cancer Genet Cytogenet.* 2009; 191(2): 73-7.

102- Zhou B, Rao L, Li Y, Gao L, Wang Y, Chen Y *et al.* A functional insertion/deletion polymorphism in the promoter region of NFKB1 gene increases susceptibility for nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Lett.* 2009; 275(1): 72-6.

103- Cai H, Sun L, Cui L, Cao Q, Qin C, Zhang G *et al.* A functional insertion/deletion polymorphism (-94 ins/del ATTG) in the promoter region of the NFKB1 gene is related to the risk of renal cell carcinoma. *Urol Int.* 2013; 91(2): 206-12.

104- Cheng CW, Su JL, Lin CW, Su CW, Shih CH, Yang SF *et al.* Effects of NFKB1 and NFKBIA gene polymorphisms on hepatocellular carcinoma susceptibility and clinicopathological features. *PLoS One.* 2013; 8(2): e56130.

105- Mohd Suzairi MS, Tan SC, Ahmad Aizat AA, Mohd Aminudin M, Siti Nurfatimah MS, Andee ZD *et al.* The functional -94 insertion/deletion ATTG polymorphism in the promoter region of NFKB1 gene increases the risk of sporadic colorectal cancer. *Cancer Epidemiol.* 2013; 37(5): 634-8.

106- Zou YF, Yuan FL, Feng XL, Tao JH, Ding N, Pan FM *et al.* Association between NFKB1 -94ins/delATTG promoter polymorphism and cancer risk: a meta-analysis. *Cancer Invest.* 2011; 29(1): 78-85.

107- Wang X, Lu P, Xu L, Xu Y, Shi Z, Xu J et al. Updated meta-analysis of NFkappaB1 -94ins/Delattg promoter polymorphism and cancer risk based on 19 case-control studies. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2011; 12(10): 2479-84.

108- Nian X, Zhang W, Li L, Sun Y, Sun E, Han R. Meta-analysis of studies on the association between the NF- κ B1-94ins/del ATTG promoter polymorphism and cancer. *Tumour Biol*. 2014 Sep 5. [Epub ahead of print]

109- Bu H, Rosdahl I, Sun XF, Zhang H. Importance of polymorphisms in NF-kappaB1 and NF-kappaBI alpha genes for melanoma risk, clinicopathological features and tumor progression in Swedish melanoma patients. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2007; 133(11): 859-66.

110- Umamaheswaran G, Dkhar SA, Kalaivani S, Anjana R, Revathy M, Jaharamma M *et al*. Haplotype structures and functional polymorphic variants of the drug target enzyme aromatase (CYP19A1) in South Indian population. *Med Oncol*. 2013; 30(3): 665.

111- Bulun SE, Sebastian S, Takayama K, Suzuki T, Sasano H, Shozu M. The human CYP19 (aromatase P450) gene: update on physiologic roles and genomic organization of promoters. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2003; 86(3-5): 219-24.

112- Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MM, Graham-Lorence S *et al*. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr Rev*. 1994; 15(3): 342-55.

113- Czajka-Oraniec I, Simpson ER. Aromatase research and its clinical significance. *Endokrynol Pol*. 2010; 61(1): 126-34.

114- Bulun SE, Takayama K, Suzuki T, Sasano H, Yilmaz B, Sebastian S. Organization of the human aromatase p450 (CYP19) gene. *Semin Reprod Med*. 2004; 22(1): 5-9.

115- Olson SH, Bandera EV, Orlov I. Variants in estrogen biosynthesis genes, sex steroid hormone levels, and endometrial cancer: a HuGE review. *Am J Epidemiol*. 2007; 165(3): 235-45.

116- Ma CX, Adjei AA, Salavaggione OE, Coronel J, Pelleymounter L, Wang L *et al.* Human aromatase: gene resequencing and functional genomics. *Cancer Res.* 2005; 65(23): 11071-82.

117- Chen C, Sakoda LC, Doherty JA, Loomis MM, Fish S, Ray RM *et al.* Genetic variation in CYP19A1 and risk of breast cancer and fibrocystic breast conditions among women in Shanghai, China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008; 17(12): 3457-66.

118- Healey CS, Dunning AM, Durocher F, Teare D, Pharoah PD, Luben RN *et al.* Polymorphisms in the human aromatase cytochrome P450 gene (CYP19) and breast cancer risk. *Carcinogenesis.* 2000; 21(2): 189-93.

119- Dunning AM, Dowsett M, Healey CS, Tee L, Luben RN, Folkard E *et al.* Polymorphisms associated with circulating sex hormone levels in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst.* 2004; 96 (12): 936-45.

120- Huang YC, Chen M, Lin MW, Chung MY, Chang YH, Huang WJ *et al.* CYP19 TCT tri-nucleotide Del/Del genotype is a susceptibility marker for prostate cancer in a Taiwanese population. *Urology.* 2007; 69 (5): 996-1000.

121- Kim JY, Lee CS, Kim HO, Jo YH, Lee J, Jung MH *et al.* The association between genetic polymorphisms in CYP19 and breast cancer risk in Korean women. *Oncol Rep.* 2009; 22(3): 487-92.

122- Kado N, Kitawaki J, Obayashi H, Ishihara H, Koshiba H, Kusuki I *et al.* Association of the CYP17 gene and CYP19 gene polymorphisms with risk of endometriosis in Japanese women. *Hum Reprod.* 2002; 17(4): 897-902.

123- Olson SH, Orlov I, Bayuga S, Sima C, Bandera EV, Pulick K *et al.* Variants in hormone biosynthesis genes and risk of endometrial cancer. *Cancer Causes Control.* 2008; 19(9): 955-63.

124- Olson JE, Ingle JN, Ma CX, Pelleymounter LL, Schaid DJ, Pankratz VS *et al.* A comprehensive examination of CYP19 variation and risk of breast cancer using two haplotype-tagging approaches. *Breast Cancer Res Treat.* 2007; 102(2): 237-47.

125- Zouboulis CC, Chen WC, Thornton MJ, Qin K, Rosenfield R. Sexual hormones in human skin. *Horm Metab Res.* 2007; 39(2): 85-95.

126- Jee SH, Lee SY, Chiu HC, Chang CC, Chen TJ. Effects of estrogen and estrogen receptor in normal human melanocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994; 199(3): 1407-12.

127- Santen RJ, Santner SJ, Harvey HA, Lipton A, Simmonds M, Feil PD *et al.* Marked heterogeneity of aromatase activity in human malignant melanoma tissue. *Eur J Cancer Clin Oncol.* 1988; 24(12): 1811-6.

128- Koomen ER, Joosse A, Herings RM, Casparie MK, Guchelaar HJ, Nijsten T. Estrogens, oral contraceptives and hormonal replacement therapy increase the incidence of cutaneous melanoma: a population-based case-control study. *Ann Oncol.* 2009; 20(2): 358-64.

129- Cutolo M1, Sulli A, Capellino S, Villaggio B, Montagna P, Seriolo B *et al.* Sex hormones influence on the immune system: basic and clinical aspects in autoimmunity. *Lupus.* 2004; 13(9): 635-8.

130- Riggins RB, Bouton AH, Liu MC, Clarke R. Antiestrogens, aromatase inhibitors, and apoptosis in breast cancer. *Vitam Horm.* 2005; 71: 201-37.

131- Slattery ML, Lundgreen A, Herrick JS, Kadlubar S, Caan BJ, Potter JD *et al.* Variation in the CYP19A1 gene and risk of colon and rectal cancer. *Cancer Causes Control.* 2011; 22(7): 955-63.

5. ARTIGO EM INGLÊS

Title: Polymorphisms in the genes CYP19A and NFKB1 and the risk of cutaneous melanoma

Authors: Gabriela Fortes Escobar^{1,2}, Sidney E. Santos³, Patricia Ashton-Prolla⁴, Sidia Maria Callegari Jacques⁵, Renato Marchiori Bakos^{1,2}

Affiliations:

1- Department of Dermatology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Brazil;

2- Postgraduate Program in Medical Sciences - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil

3- Laboratory of Human and Medical Genetics, Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém, Brazil

4- Department of Genetics (UFRGS) and Experimental Research Center and Medical Genetics Service, HCPA, Porto Alegre, Brazil;

5- Department of Statistics - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil

Correspondance Author: Gabriela Fortes Escobar – Rua Ramiro Barcellos 2350, CEP 90035-903, Porto Alegre, Brazil. gabrieladermatologia@yahoo.com

Abstract

Background:

Melanoma is a leading cause of death from skin cancers, although it represents 1% of all malignant tumors. The etiology of melanoma is complex, involving genetic, phenotypical and environmental factors. The Nuclear factor- κ B (NF- κ B) has a critical role in the innate and adaptive immune responses and inflammation, modulating the expression of chemokines and inflammatory cytokines. In addition, its activation can induce the transcription of inhibitors of apoptosis and factors that are associated with tumor angiogenesis, metastasis and growth. The 94 ATTG ins/del (rs28362491) polymorphism located in the NFKB1 gene has been associated to various cancers types. In melanoma, ATTG₂/ATTG₂ genotype of NFKB1 was correlated with risk in the Swedish population. The CYP19A1 gene

encodes the enzyme aromatase, a member of the cytochrome P450 superfamily. Aromatase is expressed in extragonadal sites, including the skin, and its activity has been demonstrated in malignant melanoma tissue. One of CYP19A1 variants, the TCT insertion/deletion at intron 4 (rs11575899) has been associated with increased incidence of cancer, albeit with conflicting results. However, no studies addressing this polymorphism and melanoma have been conducted.

Objectives:

The aim of the present case–control study was to examine two genetic variations at the NFKB1 gene (rs28362491) and the CYP19A1 gene (rs11575899) and their relation to melanoma susceptibility in a southern Brazilian population.

Methods:

A total of 117 cases of cutaneous melanoma and 116 controls were recruited at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil. Written informed consent was obtained from all patients prior to inclusion in the study. Skin phototype was documented, as well as data from primary lesions of patients with cutaneous melanoma. The genotypes of gene variants NFKB1 (rs28362491) and CYP19A1 (rs11575899) were analyzed in both groups by genomic DNA samples.

Results:

The overall genotype frequency of melanoma patients was significantly different from that of controls. The frequency for $ATTG_2/ATTG_2$ genotype in the logistic regression adjusted for skin color demonstrated an association between the variant and melanoma patients (OR=1.78; 95%CI: 1.06-3.00; p=0.03). Likewise, this association was found to have a dose effect: for each ins allele in the genotype, the risk of melanoma increased (OR=1.51; 95%CI: 1.08-2.11; p=0.017). Regarding the CYP19A1 polymorphism, frequency of genotype 11 (del/del) was higher in patients than controls (OR=1.85; 95% CI 1.06-3.22; p=0.03). Interestingly, the genotype 11 was more common in the fair skin group (67.9% versus 51.0% in the lighter and darker phototypes, respectively; p=0.016).

Conclusions:

The NFKB1 ATT2/ATTG2 (rs28362491) genotype and the CYP19A1 del/del genotype (rs11575899) are significantly associated with melanoma risk and appear to be a genetic marker of susceptibility in melanoma in our southern Brazilian population.

Key Words:

Cutaneous melanoma, Genetic polymorphisms, NFKB1, CYP19A1, Brazil

Introduction

The incidence of cutaneous melanoma (CM) has been increasing worldwide for several decades.[1,2,3,4,5,6] The highest incidences of melanoma in Brazil occur in the southern region [7,8] It might be partially explained by previous immigration flows to this region, especially Italian and German, determining phenotypical characteristics similar to those of European populations and contributing to the susceptibility to melanoma. [9]

The etiology of melanoma is complex, involving genetic, phenotypical and environmental factors. Among the genetic risk factors mutations in high penetrance (CDKN2A and CDK4) and medium penetrance (MC1R and MITF) genes play a role in some patients. [10] Although the impact of low inheritance genes is weak, co-inheritance of more than one low penetrance gene or the association with environment risks, such as UV radiation, may result in more pronounced risk for melanoma. [10]

The Nuclear factor- κ B (NF- κ B) was initially described in 1986 and it is transcribed by the NFKB1 gene, located on chromosome 4q24. [11,12] It consists of a family of five members: p50 (NF- κ B1), p52 (NF- κ B2), p65 (RelA), c-Rel (Rel), and RelB. [11] The active form of NF- κ B, which binds to DNA, is dimeric. [13] There are several dimeric forms, although the heterodimeric form NF- κ B p50 and p65/Rel A, encoded respectively by the genes NFKB1 and RelA, is the most common form. [13,14] The advantage of having several distinct dimers is that each one can

recognize different DNA targets, increasing the ability to control various forms of gene expression. [13]

In unstimulated conditions, NF- κ B is sequestered in the cytoplasm and bound to its inhibitor, I κ B. After stimulation, the kinase cascade activates the I κ K-complex (I κ B kinase complex), which phosphorylates and degrades the NF- κ B inhibitor I κ B. This leads to the release and translocation of NF- κ B to the nucleus, where gene transcription is initiated. [15,16] NF- κ B has a critical role in the innate and adaptive immune responses and inflammation, modulating the expression of chemokines and inflammatory cytokines. [17] In addition, its activation can induce the transcription of inhibitors of apoptosis and factors that are associated with tumor angiogenesis, metastasis and growth. [17]

Several tumors have been shown to have constitutive activation of NF- κ B. [17] In melanoma, the activation of NF- κ B may be increased, favoring tumor progression. [18,19] It has been demonstrated that this tumor may present with a constitutional activation of the I κ K, causing a faster degradation of I κ B, thereby activating the NF- κ B. [18] Furthermore, NF- κ B can induce the production of chemokines that stimulate the growth of neoplastic cells, such as CXCL1 (melanoma growth stimulatory activity) and IL-8 (interleukin 8), contributing to tumor angiogenesis, progression, and metastasis. [17,20] Additionally, in metastatic melanoma, upregulation of NF- κ B activity also inhibits apoptosis and enhances tumor proliferation. [18]

Several polymorphic sites in NF- κ B have been identified. [21] Karban *et al*, [22] described for the first time a four nucleotides insertion/deletion, -94ins/del ATTG (rs28362491) polymorphism, located between two putative key promoter regulatory elements in the NFKB1 gene. This potentially functional polymorphism has been associated with human diseases, such as inflammatory bowel disease [22] and various cancers types. However, the true risk associated to each allele of the polymorphism has been conflicting. The del allele has been shown to increase the risk of bladder cancer [23], pulmonary cancer [24], hepatocarcinoma in Chinese [25] and colorectal cancer in the Swedish and Danish populations [26,27]. However, the ins allele has been reported to increase the risk of oral cancer [12,28], ovarian cancer [29], cervical cancer [30], gastric cancer [31], nasopharyngeal carcinoma [32], prostate cancer [33], hepatocarcinoma in Taiwan [16] and colorectal cancer in

Malaysia [34]. Regarding the association between -94ins/del ATTG and melanoma, Bu *et al.* [21] described that ATTG insertion polymorphism of NFKB1 was correlated with melanoma risk in the Swedish population, especially, in the ATTG₂/ATTG₂ (ins/ins) genotype. However, this is the only study with melanoma patients.

The CYP19A1 gene is localized at chromosome 15q21 and it encodes the enzyme aromatase, a member of the cytochrome P450 superfamily. [35,36] The enzyme is responsible for the conversion of androgens (testosterone and androstenedione) to estrogens (estradiol, and estrone, respectively). [37] In humans, aromatase is expressed in the gonads and in additional extragonadal sites, including the skin. [36,37] Moreover, aromatase activity has been demonstrated even in malignant melanoma tissue. [38]

Several genetic polymorphisms in the CYP19A1 gene have been described. [39] One of CYP19A1 variants, the TCT insertion/deletion at intron 4 (rs11575899), has been associated with increased incidence of hyperestrogenic conditions. [37] A link between the CYP19 TCT del allele and susceptibility to cancers has been shown, such as prostate cancer [40] and breast cancer in Korea [41]. However, studies conducted in England [42,43], United States [44] and China [45] failed to show the association between this polymorphism and breast cancer. Also, the risk of endometrial cancer was lower among women homozygous for the genotype del/del [46], which can be explained by the lower serum levels of estrogen related to the allele del. [44] Although aromatase activity can be found in melanoma cells, no studies addressing the polymorphism TCT insertion/deletion of the CYP19A1 gene and its association to melanoma have been conducted.

Therefore, the aim of the present case–control study was to examine the genetic variations rs28362491 at the NFKB1 gene and rs11575899 at the CYP19A1 gene and its correlation to melanoma susceptibility in a southern Brazilian population.

Material and Methods

Patients:

A total of 117 cases of cutaneous melanoma, diagnosed between September 2007 and November 2008, were included. The case group consisted in 28 familiar

melanoma or multiple primary melanoma (MPM) patients and 99 sporadic melanoma patients. Patients with a positive family history of cutaneous melanoma in first-, second-, and third-degree relatives were described as having a positive family history, similarly to other studies [7]. Patients with more than one primary lesion were considered MPM cases. The mean age at recruitment of the 117 patients with melanoma was 56.2 years, and 70 (59.8%) were women. All diagnoses were confirmed by pathology reports. The 116 individuals of the control group were recruited consecutively among patients who presented to the outpatient clinic of the same Dermatology department for an initial consultation or regular follow-up for diseases other than skin cancer. Patients of the control group had no personal or family history of melanoma; their mean age at recruitment was 57.8 years and 73 (62.9%) were female. Within the patients and control groups, there were no familial relations. Written informed consent was obtained from all patients prior to inclusion in the study, according to an Institutional Review Board-approved protocol. All patients willing to participate were clinically examined. Skin phototype was documented, as well as data from primary lesions of patients with cutaneous melanoma, such as localization, histopathological subtypes, Breslow thickness and Clark levels.

Materials

Genomic DNA samples were obtained from peripheral lymphocytes of individuals according to the 'salting out' method. The INDEL polymorphism in the NFKB1 promoter (rs28362491) was genotyped by Polymerase Chain Reaction using primers Forward-6FAM-5'TATGGACCGCATGACTCTATCA3' and Reverse-6FAM-5'GGCTCTGGCATCCTAGCAG3', which amplify 154bp (allele DEL) and 158bp (allele INS). For the polymorphism in the *CYP19A1* gene (rs11575899), the primers used were F-6FAM-5'TGCATGAGAAAGGCATCATATT3' and R-5'AAAAGGCACATTCATAGACAAAAA3', which amplify 125bp and 122bp, respectively, for the alleles INS and DEL. The PCR was performed in a final volume of 12.5 μ l containing buffer 1_PCR with 3 mM of MgCl₂, 125 mM of each dNTP, 2 U of Platinum® Taq DNA Polymerase (*Invitrogen Life Technologies*, Carlsbad, CA), and 20 ng of genomic DNA. The conditions of the thermal cycles of the PCR were: 11 min at 95°C; followed by 1 min at 94°C, 1 min at 60°C, and 2 min at 70°C for 10 cycles; 1 min at 90°C, 1 min at 60°C, and 2 min at 70°C for 17 cycles; and a final extension of

60 min at 60°C. Before the capillary electrophoresis, a PCR product of 1 ml was added to 8.5 µl of deionized formamide HI - DI (*Applied Biosystems*, Foster City, CA) and 0.5 µl GeneScan 500 LIZ pattern-sized (*Applied Biosystems*). The amplicons were separated using the ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (*Applied Biosystems*) and were analyzed with the software v3.2 GeneMapper ID (*Applied Biosystems*).

Statistics

Two-sided Fisher's exact test was used to analyze the different frequencies of the genotype between cases and controls. Odds ratio and their 95% confidence intervals (CIs) for allelic frequencies were also calculated in the cases and controls groups. Also, multivariate logistic regression analysis was performed to obtain the adjusted odds ratios (OR) for melanoma risk of each polymorphism. Chi square test or Fisher's exact test were used, as appropriate, to test for the significance of clinical and histological data in patients with melanoma. Data were analysed using the SPSS statistical package version 12.0 (SPSS Inc., Chicago IL, USA). The statistical significance was considered at $p < 0.05$. Phototypes were analyzed in two groups (1+2 versus 3+4+5). Breslow thickness was analyzed in two groups (<1.0 and ≥ 1.0 mm) and Clark level in two groups (I + II and III + IV +V). Tumor location was registered and divided in three groups: head and neck, trunk and limbs.

Results

The studied sample was composed of 117 melanoma patients and 116 controls (143 females and 47 males). Mean age was 56.2 for cases and 57.9 for controls. Skin type distribution was also similar in both groups. (Table 1) The most frequent histopathologic subtype in the sample, superficial spreading melanoma, was present in 52.1% of cases, followed by the nodular subtype in 18.8%. The majority of the lesions were located on the trunk (45.3%), followed by the limbs (35.9%) and head/neck (18.8%).

NFKB1

The overall genotype frequency of melanoma patients was significantly different from that of controls. The frequency for ATTG₂/ATTG₂ genotype in the logistic regression demonstrated an association between the variant and melanoma patients (OR=1.78; 95% CI: 1.06-3.00; p=0.03). Likewise, this association was found to have a dose effect: for each ins allele in the genotype, the risk of melanoma increased (OR=1.51; 95% CI: 1.08-2.11; p=0.017). These results are shown in Table 2. Regarding the analysis of ATTG variant and tumor characteristics, no associations were found with the histopathologic subtypes, tumor localization or Clark and Breslow levels.

CYP19A1

Distribution of the genotypes was found to be significantly different between melanoma patients and controls being the frequency of genotype 11 (del/del) higher in melanoma patients (OR = 1.85, 95%CI: 1.06–3.22; p=0.03), shown in Table 3. Although the association was not statistically significant, our study found a trend towards thin melanomas and the genotype 11. While 67.4% of the genotype 11 presented with melanomas with Breslow thickness of less than 1mm, this was only found in 48.5% of patients that presented with the genotypes 12 or 22 (p=0.055). However, we found no association between this genetic variant and histopathologic subtypes, tumor localization or Clark levels.

Discussion

Since the description of the -94ins/del ATTG (rs28362491) polymorphism by Karban *et al.* [22], several studies have investigated its association with cancers and conflicting evidence has been published. As an attempt to study the real impact of this polymorphism (-94 ins/del ATTG) in cancer, a meta-analysis was conducted by Zou *et al.* in 2011. [47] In this study, no association was found between this polymorphism and risk of malignancy, but in subgroup analysis, the presence of the del allele was considered a protective factor in the Asian population, while it was a risk factor in the Caucasian population. [47] In the same year, Wang *et al.* [48] demonstrated that the genotype del/del (ATTG₁/ATTG₁) had a lower risk for cancer, compared to ins/ins (OR = 0.74, 95% CI 0.57-0.97). However, unlike the previous

study, the association was present only in the Asian group and was not significant in the Caucasian group. [48] Subsequently, Yang *et al.* [49], in 2014, performed a new meta-analysis, confirming the risk associated with ins/ins genotype (OR = 1.47, 95% CI 1.11-1.93). Recently published, Nian *et al.* [50] also demonstrated the decreased risk of cancer associated with the genotype del/del (OR = 0.74, 95% CI 0.58-0.96). However, when the results were stratified in the ethnic subgroups in the last two reports, the effect was only maintained in the Asian group. This raises the possibility that there may be ethnic differences in genotypes and that polymorphisms may also interact with non-genetic risk factors. [25,29] Therefore, studies in different populations are crucial to access the real significance of these findings.

To date, only one study has attempted to evaluate the association between this polymorphism and melanoma risk. [21] In this present report, we found evidence suggesting a link between the NFKB1 ATTG₂/ATTG₂ (ins/ins) genotype and susceptibility to melanoma in a Southern Brazilian population (OR=1.79; CI 95% 1.03-2.94; p=0.039). Our association reinforces the previous results of a Swedish study, which also found the NFKB1 gene to be involved in susceptibility to melanoma. In this previous report, Bu *et al.* [21], studied a sample of 185 melanoma patients and 438 controls and found that the ins allele was associated with a risk for melanoma, especially in homozygous form ATTG₂/ATTG₂ (OR=1.58; 95% CI 1.09-2.28). The probable explication for these results may be the association between the ins allele and its effects inhibiting apoptosis and promoting cell proliferation, through an enhanced promoter activity and NFKB1 mRNA expression (p50). [22,23]

Regarding tumor characteristics, Bu *et al.* found an association between the genotype ATTG₁/ATTG₁ and lower Clark (p=0.028) and thinner Breslow levels (p=0.025) at diagnosis, raising the possibility that this polymorphism may also be a biological predictor of tumor progression. [21] However, in our study, we did not find an association between the variant of NFKB1 and Breslow or Clark levels; we especulate that it might be due to our reduced sample size.

Melanocytes can also express estrogen receptors, indicating that the hormone may influence cell proliferation and melanin production. [51] Additionally, aromatase activity has also been demonstrated in melanoma cells. [38] Estrogens, in a cumulative and dose-dependent manner, also appear to increase the risk of

melanoma. [52] However, to date, no previous studies have investigated the association of rs11575899 polymorphism of the gene CYP19A1 (aromatase) and melanoma. In this present investigation, we observed a link between the CYP19A1 TCT 11 (del/del) genotype and susceptibility to melanoma in a southern Brazilian population (OR=1.85; 95% CI 1.06-3.22; p=0.03). To our knowledge, this is the first report of such an association. This result confirms previous studies that demonstrated a relation between the del allele and susceptibility to prostate cancer [40] and breast cancer [41]. However, similarly to the NFKB1 gene, perhaps the CYP19A1 gene polymorphism risk also depends on ethnic and non-genetic factors, since others studies have failed to show association in breast cancer [42,43,44,45] and one has even shown smaller risks of endometrial cancer in patients with del/del genotype. [46]

Regarding the functional aspects of the 3 base-pair TCT insertion/deletion polymorphism, the ins allele appears to be associated with higher estrogen levels [53], whereas the del allele has been reported to reduced estradiol and estrogens to androgens ratio. [42,46] However, other studies have failed to demonstrate an association between the genotypes and hormonal levels. [53] Although the repercussions on hormonal levels are beyond the scope of the study, we found it intriguing that the increased risk of melanoma related to the del allele could be associated to lower levels of estrogens, a hormone that can possibly stimulate melanocytes. [51]

Sex hormones may influence the inflammatory response and modulate cell growth and apoptosis cascade through the NF- κ B. [54,55] The increase in inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 and IL-6) can induce the activity of the aromatase enzyme, causing increased levels of estrogens in inflammatory responses. [54] In turn, estrogen may also increase the inflammatory response by activating the NF- κ B pathway, in addition to blocking apoptosis and stimulating cell proliferation. [54]

In line with the possible association between NFKB1 and CYP19A1 genes, Slattery *et al.* [56] studied the interaction between different polymorphisms of these genes in patients with colon and rectal cancer. They found statistically significant interactions between polymorphisms and the risk of developing these cancers,

suggesting that estrogen may influence risk through an inflammation-related mechanism. [56] Estrogens can enhance the expression of markers of cell growth and proliferation, whereas testosterone may induce an increase of markers indicating DNA damage and apoptosis. [54] In addition, the NF- κ B signaling is one of the key pathways through which anti-estrogens and aromatase inhibitors exert their effects as antineoplastic drugs. [55]

Recent discoveries related to melanoma pathogenesis are helping us understand this complex disease. It is of great importance to also study genetic factors conferring susceptibility risks for melanoma, which in turn can aid to identify individuals at increased risk and implement programs for prevention and early diagnosis.

A potential limitation of our study was that the transcription activity of the polymorphic genes was not accessed, such as p50 for the NFKB1 gene and estrogen levels for the CYP19A1 gene. In addition, our study population is considered a hospital-based population, with selected individuals, that may lack external validity of data.

Conclusion

In summary, the results of our case-control study suggest that the NFKB1 ATTG₂/ATTG₂ (rs28362491) genotype and the CYP19A1 del/del genotype (rs11575899) are significantly associated with melanoma risk and appear to be genetic markers of susceptibility in melanoma in our southern Brazilian population.

Keywords: Cutaneous melanoma, Genetic polymorphisms, NFKB1, CYP19A1, Brazil

Conflicts of Interest: The authors state no conflicts of interest.

References

1- Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Abeni D, Boyle P *et al.* Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. *Eur J Cancer.* 2005; 41(1): 28-44.

2- Mendes GL, Koifman RJ, Koifman S. Mortality frequency and trends attributed to melanoma in Brazil from 1980-2005. *J Toxicol Environ Health A*. 2010; 73(13-14): 850-7.

3- Geller AC, Clapp RW, Sober AJ, Gonsalves L, Mueller L, Christiansen CL *et al*. Melanoma epidemic: an analysis of six decades of data from the Connecticut Tumor Registry. *J Clin Oncol*. 2013; 31(33): 4172-8.

4- Australian Institute of Health and Welfare. Cancer survival and prevalence in Australia: period estimates from 1982 to 2010. *Asia Pac J Clin Oncol*. 2013; 9(1): 29-39.

5- Kachuri L, De P, Ellison LF, Semenciw R. Cancer incidence, mortality and survival trends in Canada, 1970-2007. *Chronic Dis Inj Can*. 2013; 33(2): 69-80.

6- Hunter HL, Dolan OM, McMullen E, Donnelly D, Gavin A. Incidence and survival in patients with cutaneous malignant melanoma: experience in a U.K. population, 1984-2009. *Br J Dermatol*. 2013; 168(3): 676-8.

7- 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.

8- Estimativa 2014: A incidência de câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva; Rio de Janeiro; INCA 2014. <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24042014.pdf>

9- Carvalho CA, Cunha ME, Giugliani R, Bakos L, Ashton-Prolla P. Hereditary melanoma: prevalence of risk factors in a group of patients in Southern Brazil. *An Bras Dermatol* 2004; 79(1): 53-60

10- Badenas C, Aguilera P, Puig-Butillé JA, Carrera C, Malveyh J, Puig S. Genetic counseling in melanoma. *Dermatol Ther*. 2012; 25(5): 397-402.

11- Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*. 1986; 46(5): 705-16.

12- Lin SC, Liu CJ, Yeh WI, Lui MT, Chang KW, Chang CS. Functional polymorphism in NFKB1 promoter is related to the risks of oral squamous cell carcinoma occurring on older male areca (betel) chewers. *Cancer Lett.* 2006; 243(1): 47-54.

13- Baldwin AS Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol.* 1996; 14: 649-83.

14- Baldwin AS Jr. Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease. *J Clin Invest.* 2001; 107(1): 3-6.

15- Bank S, Andersen PS, Burisch J, Pedersen N, Roug S, Galsgaard J *et al.* Polymorphisms in the inflammatory pathway genes TLR2, TLR4, TLR9, LY96, NFKBIA, NFKB1, TNFA, TNFRSF1A, IL6R, IL10, IL23R, PTPN22, and PPARG are associated with susceptibility of inflammatory bowel disease in a Danish cohort. *PLoS One.* 2014; 9(6): e98815.

16- Cheng CW, Su JL, Lin CW, Su CW, Shih CH, Yang SF *et al.* Effects of NFKB1 and NFKBIA gene polymorphisms on hepatocellular carcinoma susceptibility and clinicopathological features. *PLoS One.* 2013; 8(2): e56130.

17- Richmond A. Nf-kappa B, chemokine gene transcription and tumour growth. *Nat Rev Immunol.* 2002; 2(9): 664-74.

18- Ueda Y, Richmond A. NF-kappaB activation in melanoma. *Pigment Cell Res.* 2006; 19(2): 112-24.

19- Yang J, Richmond A. Constitutive I kappa B kinase activity correlates with nuclear factor-kappaB activation in human melanoma cells. *Cancer Res.* 2001; 61(12): 4901-9.

20- Huang S, DeGuzman A, Bucana CD, Fidler IJ. Nuclear factor-kappaB activity correlates with growth, angiogenesis, and metastasis of human melanoma cells in nude mice. *Clin Cancer Res.* 2000; 6(6): 2573-81.

21- Bu H, Rosdahl I, Sun XF, Zhang H. Importance of polymorphisms in NF-kappaB1 and NF-kappaBI alpha genes for melanoma risk, clinicopathological

features and tumor progression in Swedish melanoma patients. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2007; 133(11): 859-66.

22- Karban AS, Okazaki T, Panhuysen CI, Gallegos T, Potter JJ, Bailey-Wilson JE. Functional annotation of a novel NFKB1 promoter polymorphism that increases risk for ulcerative colitis. *Hum Mol Genet.* 2004; 13(1): 35-45.

23- Li P, Gu J, Yang X, Cai H, Tao J, Yang X *et al.* Functional promoter -94 ins/del ATTG polymorphism in NFKB1 gene is associated with bladder cancer risk in a Chinese population. *PLoS One.* 2013; 8(8): e71604.

24- Oltulu YM, Coskunpinar E, Ozkan G, Aynaci E, Yildiz P, Isbir T *et al.* Investigation of NF- κ B1 and NF- κ BIA gene polymorphism in non-small cell lung cancer. *Biomed Res Int.* 2014; 2014: 530381.

25- Gao J, Xu HL, Gao S, Zhang W, Tan YT, Rothman N *et al.* Genetic polymorphism of NFKB1 and NFKBIA genes and liver cancer risk: a nested case-control study in Shanghai, China. *BMJ Open.* 2014; 4(2): e004427.

26- Andersen V, Christensen J, Overvad K, Tjønneland A, Vogel U. Polymorphisms in NFkB, PXR, LXR and risk of colorectal cancer in a prospective study of Danes. *BMC Cancer.* 2010; 10: 484.

27- Lewander A, Butchi AK, Gao J, He LJ, Lindblom A, Arbmán G *et al.* Polymorphism in the promoter region of the NFKB1 gene increases the risk of sporadic colorectal cancer in Swedish but not in Chinese populations. *Scand J Gastroenterol.* 2007; 42(11): 1332-8.

28- Lin CW, Hsieh YS, Hsin CH, Su CW, Lin CH, Wei LH *et al.* Effects of NFKB1 and NFKBIA gene polymorphisms on susceptibility to environmental factors and the clinicopathologic development of oral cancer. *PLoS One.* 2012; 7(4): e35078.

29- Huo ZH, Zhong HJ, Zhu YS, Xing B, Tang H. Roles of functional NFKB1 and β -TrCP insertion/deletion polymorphisms in mRNA expression and epithelial ovarian cancer susceptibility. *Genet Mol Res.* 2013; 12(3): 3435-43.

30- Zhou B, Qie M, Wang Y, Yan L, Zhang Z, Liang A *et al.* Relationship between NFKB1 -94 insertion/deletion ATTG polymorphism and susceptibility of cervical squamous cell carcinoma risk. *Ann Oncol.* 2010; 21(3): 506-11.

31- Lo SS, Chen JH, Wu CW, Lui WY. Functional polymorphism of NFKB1 promoter may correlate to the susceptibility of gastric cancer in aged patients. *Surgery.* 2009; 145(3): 280-5.

32- Zhou B, Rao L, Li Y, Gao L, Wang Y, Chen Y *et al.* A functional insertion/deletion polymorphism in the promoter region of NFKB1 gene increases susceptibility for nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Lett.* 2009; 275(1): 72-6.

33- Zhang P, Wei Q, Li X, Wang K, Zeng H, Bu H *et al.* A functional insertion/deletion polymorphism in the promoter region of the NFKB1 gene increases susceptibility for prostate cancer. *Cancer Genet Cytogenet.* 2009; 191(2): 73-7.

34- Mohd Suzairi MS, Tan SC, Ahmad Aizat AA, Mohd Aminudin M, Siti Nurfatimah MS, Andee ZD *et al.* The functional -94 insertion/deletion ATTG polymorphism in the promoter region of NFKB1 gene increases the risk of sporadic colorectal cancer. *Cancer Epidemiol.* 2013; 37(5): 634-8.

35- Lindor NM, Greene MH. The concise handbook of family cancer syndromes. Mayo Familial Cancer Program. *J Natl Cancer Inst.* 1998; 90(14): 1039-71.

36- Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MM, Graham-Lorence S *et al.* Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr Rev.* 1994; 15(3): 342-55.

37- Czajka-Oraniec I, Simpson ER. Aromatase research and its clinical significance. *Endokrynol Pol.* 2010; 61(1): 126-34.

38- Santen RJ, Santner SJ, Harvey HA, Lipton A, Simmonds M, Feil PD *et al.* Marked heterogeneity of aromatase activity in human malignant melanoma tissue. *Eur J Cancer Clin Oncol.* 1988; 24(12): 1811-6.

39- Ma CX, Adjei AA, Salavaggione OE, Coronel J, Pelleymounter L, Wang L *et al.* Human aromatase: gene resequencing and functional genomics. *Cancer Res.* 2005; 65(23): 11071-82.

40- Huang YC, Chen M, Lin MW, Chung MY, Chang YH, Huang WJ *et al.* CYP19 TCT tri-nucleotide Del/Del genotype is a susceptibility marker for prostate cancer in a Taiwanese population. *Urology.* 2007; 69 (5): 996-1000.

41- Kim JY, Lee CS, Kim HO, Jo YH, Lee J, Jung MH *et al.* The association between genetic polymorphisms in CYP19 and breast cancer risk in Korean women. *Oncol Rep.* 2009; 22(3): 487-92.

42- Dunning AM, Dowsett M, Healey CS, Tee L, Luben RN, Folkard E *et al.* Polymorphisms associated with circulating sex hormone levels in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst.* 2004; 96 (12): 936-45.

43- Healey CS, Dunning AM, Durocher F, Teare D, Pharoah PD, Luben RN *et al.* Polymorphisms in the human aromatase cytochrome P450 gene (CYP19) and breast cancer risk. *Carcinogenesis.* 2000; 21(2): 189-93.

44- Olson JE, Ingle JN, Ma CX, Pelleymounter LL, Schaid DJ, Pankratz VS *et al.* A comprehensive examination of CYP19 variation and risk of breast cancer using two haplotype-tagging approaches. *Breast Cancer Res Treat.* 2007; 102(2): 237-47.

45- Chen C, Sakoda LC, Doherty JA, Loomis MM, Fish S, Ray RM *et al.* Genetic variation in CYP19A1 and risk of breast cancer and fibrocystic breast conditions among women in Shanghai, China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008; 17(12): 3457-66.

46- Olson SH, Orlov I, Bayuga S, Sima C, Bandera EV, Pulick K *et al.* Variants in hormone biosynthesis genes and risk of endometrial cancer. *Cancer Causes Control.* 2008; 19(9): 955-63.

47- Zou YF, Yuan FL, Feng XL, Tao JH, Ding N, Pan FM *et al.* Association between NFKB1 -94ins/delATTG promoter polymorphism and cancer risk: a meta-analysis. *Cancer Invest.* 2011; 29(1): 78-85.

48- Wang X, Lu P, Xu L, Xu Y, Shi Z, Xu J *et al.* Updated meta-analysis of NFkappaB1 -94ins/Delattg promoter polymorphism and cancer risk based on 19 case-control studies. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2011; 12(10): 2479-84.

49- Yang X, Li P, Tao J, Qin C, Cao Q, Gu J *et al.* Association between NFkB1 -94ins/del ATTG Promoter Polymorphism and Cancer Susceptibility: An Updated Meta-Analysis. *Int J Genomics.* 2014; 2014: 612972.

50- Nian X, Zhang W, Li L, Sun Y, Sun E, Han R. Meta-analysis of studies on the association between the NF- κ B1-94ins/del ATTG promoter polymorphism and cancer. *Tumour Biol.* 2014 Sep 5. [Epub ahead of print]

51- Jee SH, Lee SY, Chiu HC, Chang CC, Chen TJ. Effects of estrogen and estrogen receptor in normal human melanocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994; 199(3): 1407-12.

52- Koomen ER, Joosse A, Herings RM, Casparie MK, Guchelaar HJ, Nijsten T. Estrogens, oral contraceptives and hormonal replacement therapy increase the incidence of cutaneous melanoma: a population-based case-control study. *Ann Oncol.* 2009; 20(2): 358-64.

53- Olson SH, Bandera EV, Orlov I. Variants in estrogen biosynthesis genes, sex steroid hormone levels, and endometrial cancer: a HuGE review. *Am J Epidemiol.* 2007; 165(3): 235-45.

54- Cutolo M1, Sulli A, Capellino S, Villaggio B, Montagna P, Seriolo B *et al.* Sex hormones influence on the immune system: basic and clinical aspects in autoimmunity. *Lupus.* 2004; 13(9): 635-8.

55- Riggins RB, Bouton AH, Liu MC, Clarke R. Antiestrogens, aromatase inhibitors, and apoptosis in breast cancer. *Vitam Horm.* 2005; 71: 201-37.

56- Slattery ML, Lundgreen A, Herrick JS, Kadlubar S, Caan BJ, Potter JD *et al.* Variation in the CYP19A1 gene and risk of colon and rectal cancer. *Cancer Causes Control.* 2011; 22(7): 955-63.

TABLES:

Table 1. Distribution of age, gender and skin color in cases and controls.

	Melanoma Group (n=117)	Control Group (n=116)	P
Age (years) Mean	56.2	57.9	ns
Gender (%)			
Male	47 (40.2%)	43 (37.1%)	ns
Female	70 (59.8%)	73 (62.9%)	
Skin Color (%)			
I + II	72 (61.5%)	61 (52.6%)	ns
III + IV + V	45 (38.5%)	55 (47.4%)	

Table 2. Genotypic frequencies of -94ins/del ATTG (rs28362491) polymorphism of gene NFKB1 in melanoma cases and controls

	Genotype			N	p	OR
	ATTG ₁ /ATTG ₁	ATTG ₁ /ATTG ₂	ATTG ₂ /ATTG ₂			
Melanoma Group	19 (16.2%)	37 (31.6%)	61 (52.1%)	117	0.017	1.51 (1.08-2.11)
Control Group	31 (26.7%)	41 (35.3%)	44 (37.9%)	116		
	ATTG ₁ /ATTG ₁ + ATTG ₁ /ATTG ₂	ATTG ₂ /ATTG ₂				
Melanoma Group	56 (47.9%)	61 (52.1%)		117		
Control Group	72 (62.1%)	44 (37.95)		116		
OR	1	1.78 (1.06-3.00)			p=0.03	

Table 3. Genotypic frequencies of TCT ins/del polymorphism of gene CYP19A1 in melanoma cases and controls

	Genotype		N ^a	p	OR ^b
	11	12+22			
Melanoma Group	47 (40.9%)	68 (59.1%)	115	0.045	1.78 (1.01-3.12)
Control Group	31 (27.1%)	83 (72.8%)	114		

a: Two melanoma patients and 2 control group patients did not have the CYP19A1 genotype assessed. b: OR adjusted for phototype.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O artigo apresentado avalia aspectos genéticos importantes envolvidos na gênese do melanoma. O resultado de um estudo anterior, acerca do polimorfismo rs28362491 do gene NFKB1 e sua associação com o risco de melanoma cutâneo, foi reforçado. Embora em uma amostra populacional distinta (Suécia), nosso estudo apresentou resultados similares ao trabalho anterior. Além disso, mostramos que um polimorfismo rs11575899 do gene CYP19A1, já associado com outras neoplasias, também pode aumentar o risco de melanoma.

O campo da genética e sua associação na patogênese de diversas neoplasias são extensos. Cada nova descoberta possibilita compreender um pouco mais os processos biológicos e hereditários que acompanham as doenças. Além disso, permite identificar indivíduos que apresentam maior suscetibilidade, auxiliando sua inclusão em grupos de risco para monitoramento. O reconhecimento de grupos de risco, bem como as atividades de educação sobre a fotoproteção e o auto-exame, favorecem o diagnóstico precoce do melanoma.

A importância do nosso estudo reside também no fato de ter sido conduzido em um país em desenvolvimento, no qual existe um número ainda reduzido de estudos, quando comparado a países desenvolvidos, abordando o melanoma e genética. Como foi visto anteriormente, as frequências de diferentes polimorfismos variam muito conforme o grupo étnico e populacional. Além disso, a vasta maioria dos estudos são conduzidos na Ásia, Estados Unidos ou Europa. Sendo assim, nosso estudo também contribui mostrando resultados de um grupo populacional totalmente distinto.