

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

INVESTIGAÇÃO DE POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA  
RELACIONADOS À PIGMENTAÇÃO E ASSOCIAÇÃO COM  
RISCO PARA MELANOMA EM AMOSTRA DO RIO GRANDE  
DO SUL

LARISSA BRUSSA REIS

PORTO ALEGRE

2016

Larissa Brussa Reis

Investigação de polimorfismos de base única relacionados à  
pigmentação e associação com risco para Melanoma em amostra do Rio  
Grande do Sul

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

Orientador: Patricia Ashton-Prolla

Porto Alegre

2016  
FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

Reis, Larissa Brussa  
INVESTIGAÇÃO DE POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA  
RELACIONADOS À PIGMENTAÇÃO E ASSOCIAÇÃO COM RISCO  
PARA MELANOMA EM AMOSTRA DO RIO GRANDE DO SUL /  
Larissa Brussa Reis. -- 2016.  
86 f.

Orientadora: Patricia Ashton Prolla.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa  
de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto  
Alegre, BR-RS, 2016.

1. Polimorfismos genéticos. 2. Melanoma. 3.  
Oncogenética. I. Prolla, Patricia Ashton, orient. II.  
Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados  
fornecidos pelo(a) autor(a).

FOLHA DE APROVAÇÃO DA BANCA EXAMINADORA  
LARISSA BRUSSA REIS

Investigação de polimorfismos de base única relacionados à pigmentação e associação com risco para Melanoma em amostra do Rio Grande do Sul.

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

Porto Alegre, 14 de Dezembro de 2016.

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a dissertação Investigação de polimorfismos de base única relacionados à pigmentação e associação com risco para Melanoma em amostra do Rio Grande do Sul, elaborada por Larissa Brussa Reis, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Médicas.  
Comissão Examinadora:

---

Pós Dr. Caio Cesar Silva de Cerqueira (Perito Criminal no Instituto de Criminalística da Superintendência da Polícia Técnico-Científica do Estado de São Paulo).

---

Prof. Dra. Ida Vanessa Doederlein Schwartz (Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul / Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas).

---

Prof. Dr. Rodrigo Pereira Duquia (Professor adjunto II de Dermatologia Universidade Federal Ciências da Saúde de Porto Alegre).

---

Prof. Dra. Sandra Leistner Segal (Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul / Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas).

---

Prof. Dra. Patricia Ashton-Prolla – Orientadora

Dedico este trabalho ao meu companheiro  
Vinícius Lucietto Piccinini que esteve ao meu  
lado nos momentos mais difíceis desta  
caminhada, transformando escuridão em  
alegria e luz.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todas as pessoas que me auxiliaram ao longo desta jornada.

Em primeiro lugar, agradeço à minha mãe, que embora não esteja presente fisicamente, continua sendo minha maior inspiração e me ensinou as coisas mais valiosas do mundo: força, honestidade e amor ao próximo.

À minha orientadora Patricia Ashton-Prolla, por ser um exemplo e uma inspiração, pela confiança depositada, pelos ensinamentos e por todo o auxílio na elaboração deste trabalho.

Ao professor Renato Bakos, por ceder as amostras investigadas neste trabalho e por sempre se demonstrar solícito para sanar meus questionamentos.

À pós-doutora Fernanda Sales Luiz Vianna pelo acolhimento, pela paciência em transpor seu conhecimento e por todo auxílio nas análises estatísticas.

Aos colegas do Laboratório de Medicina Genômica pela recepção, pelos momentos de descontração e por terem sido amáveis e compreensivos em diversas situações.

Aos amigos Clévia Rosset, Igor Vieira, Liliane Todeschini, Patrícia Silva e Gustavo Stumpf por compartilharem além de seus conhecimentos, infinitas risadas e momentos de alegria, por tornarem tudo mais leve e mais divertido.

À minha família pelo apoio nos momentos difíceis, por estarem junto, mesmo longe. Especialmente aos meus irmãos Paula e Rafael Brussa Reis, minha cunhada Catiuce Reis e meus sobrinhos Rafaela, Lucas e Bruna por transbordarem meu coração de amor e serem os melhores amigos que eu poderia ter.

À minha segunda família Lucietto Piccinini, por absolutamente todo o apoio e por serem tão especiais e presentes na minha vida, sempre carinhosos e atenciosos.

Aos participantes deste estudo, e à todas as pessoas que contribuem com a pesquisa científica neste planeta.

## RESUMO

O melanoma é uma doença complexa, associada com diversos fatores de risco genéticos e ambientais. Este o tipo mais agressivo de câncer de pele e origina-se nos melanócitos, as células da pele produtoras de pigmento nos mamíferos. Polimorfismos de base única (*Single Nucleotide Polymorphisms* - SNPs) presentes em genes envolvidos na pigmentação têm sido descritos envolvidos na modulação de risco para o melanoma, porém o conhecimento neste campo ainda é bastante limitado. Neste estudo, foi avaliado o efeito de quatro SNPs em quatro genes de pigmentação: *TYR* (rs1126809), *HERC2* (rs1129038), *SLC24A5* (rs1426654) e *SLC45A2* (rs16891982) no aumento de risco para melanoma, usando análises de regressão logística multivariada e redução de dimensão multifatorial (MDR), em uma abordagem caso-controle. Em 255 indivíduos (120 pacientes com melanoma e 135 controles sem melanoma) provenientes do Rio Grande do Sul, Brasil, identificamos associação com o risco para melanoma em três dos quatro SNPs investigados (*HERC2* rs1129038,  $P=0.017$ ; *SLC24A5* rs1426654,  $P<0.001$ ; e *SLC45A2* rs16891982,  $P=0.002$ ). Além disso, a interação entre rs1426654 e rs16891982 (genótipos AA e GG, respectivamente), aumentou significamente o risco para melanoma nas análises de regressão logística multivariada e análises de MDR [OR = 6.936 (CI 95%: 1.607 – 50.294),  $P= 0.022$ ]. Estes resultados contribuem para o conhecimento atual, indicando que esses SNPs contribuem para o aumento de risco de desenvolvimento de melanoma.

**Palavras-chave:** Melanoma, Pigmentação da pele, Polimorfismos genéticos, rs1126809, rs1129038, rs1426654, rs16891982.

## ABSTRACT

The melanoma is a complex disease, associated with several environmental and genetic risk factors. This is the most aggressive type of skin cancer and originates in melanocytes, the pigment producing skin cells in mammals. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in pigmentation genes have been describe in melanoma risk modulation but our knowledge in the field is still limited. Here, we assessed the effect of SNPs in four pigmentation genes – *TYR* (rs1126809), *HERC2* (rs1129038), *SLC24A5* (rs1426654), and *SLC45A2* (rs16891982) on increase of melanoma risk using multivariate logistic regression and a multifactorial dimension reduction (MDR) analysis, in a case-control approach. In 255 individuals (120 melanoma patients and 135 controls free melanoma) from Rio Grande do Sul, Brazil, we identified an association of melanoma risk with three of the four SNPs studied (*HERC2* rs1129038,  $P=0.017$ ; *SLC24A5* rs1426654,  $P<0.001$ ; and *SLC45A2* rs16891982,  $P=0.002$ ). In addition, the interaction between rs1426654 and rs16891982 (AA and GG genotypes, respectively) significantly increased the risk of melanoma [OR = 6.936 (CI 95%: 1.607 – 50.294),  $P= 0.022$ ] in both MRD and multivariate logistic regression analyses. Our results contribute to the current knowledge, indicating that SNPs contribute to the increase risk of melanoma.

**Key words:** Melanoma, Skin Pigmentation, Genetic polymorphisms, rs1126809, rs1129038, rs1426654, rs16891982.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estratégia de busca de referências bibliográficas sobre as bases que fundamentam os objetivos deste estudo. -----	06
Figura 2: Representação esquemática das camadas que compõem a pele, com a presença dos melanócitos e formação do melanoma. -----	09
Figura 3: Representação esquemática da “regra do ABCD” para identificação da malignização de pintas e lesões iniciais do melanoma. -----	13
Figura 4: Representação do mapa do mundo e a distribuição da luz ultravioleta. ---	15
Figura 5: Esquema do marco teórico deste trabalho. -----	29

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação de fototipos de acordo com a Tabela de Fitzpatrick, 1988--18	
Tabela 2: Informações dos SNPs investigados neste estudo -----	20

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CANDELA – Consórcio para Análise da Diversidade e Evolução na América Latina

CBC – Carcinoma Basocelular

CEC - Carcinoma Espinocelular

cm – centímetros

IDH – Índice de Desenvolvimento Humano

IARC – *International Agency for Research on Cancer* (Agência Internacional de Pesquisas em Câncer)

IFPCS - *International Federation of Pigment Cell Societies* (Federação Internacional de Sociedades de pigmentação de células)

INCA – Instituto Nacional do Câncer

MI – *Melanin index* (índice de melanina)

NIH – National Institute of Health (Instituto Nacional de Saúde)

RS – Rio Grande do Sul

SBD – Sociedade Brasileira de Dermatologia

SNP – *Single Nucleotide Polymorphism* (Polimorfismo de base única)

UVA – Radiação ultravioleta A

UVB - Radiação ultravioleta B

UVC - Radiação ultravioleta C

UVR – Radiação ultravioleta

WHO – *World Health Organization* (Organização Mundial da Saúde)

## ÍNDICE

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>2</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>5</b>
<b>2.1 ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES.....</b>	<b>5</b>
<b>2.2 CÂNCER DE PELE.....</b>	<b>7</b>
<b>2.3 O MELANOMA.....</b>	<b>8</b>
2.3.1 Tipos de melanoma.....	10
2.3.2 Relação da radiação ultravioleta e o melanoma.....	13
<b>2.4 A PIGMENTAÇÃO EM HUMANOS.....</b>	<b>16</b>
2.4.1 Genômica da Pigmentação.....	18
<b>3 MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>29</b>
<b>4 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>31</b>
<b>5 OBJETIVOS.....</b>	<b>33</b>
<b>5.1 OBJETIVO PRIMÁRIO.....</b>	<b>33</b>
<b>5.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS.....</b>	<b>33</b>
<b>6 STROBE STATEMENT.....</b>	<b>34</b>
<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>36</b>
<b>8 ARTIGO.....</b>	<b>48</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>49</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>50</b>
<b>Results.....</b>	<b>51</b>
<b>Discussion.....</b>	<b>53</b>
<b>Materials and Methods.....</b>	<b>57</b>
<b>References.....</b>	<b>60</b>
<b>9 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>74</b>
<b>10 PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>75</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A pigmentação visível da pele, cabelos e olhos em humanos depende primariamente da presença de melanina nesses tecidos. A melanina é produzida por células específicas chamadas de melanócitos, que podem absorver radiação ultravioleta (UVR) e sobreviver consideravelmente ao estresse genotóxico. Além de sintetizar melanina em vesículas chamadas melanossomos, os melanócitos promovem fotoproteção e termoregulação (LIN; FISHER, 2007). A distribuição de melanina nos tecidos afeta dramaticamente a cor visível, e as diferenças na pigmentação podem surgir pela variação em número, tamanho, composição e distribuição dos melanossomos, enquanto que o número de melanócitos mantém-se relativamente constante (YAMAGUCHI; HEARING, 2011). Em adição às variações fisiológicas relacionadas com a síntese e distribuição da melanina, a pigmentação constitutiva é um traço poligênico e muitos *loci* já foram identificados em espécies de mamíferos, através da caracterização da ocorrência natural ou dos efeitos de mutações induzidas nos níveis de melanina (STURM; LARSSON, 2009). Apesar de dezenas de genes já terem sido previamente associados com pigmentação da pele em diversas populações (MCEVOY, 2006; HAN *et al.*, 2008; QUILLEN; SHRIVER, 2011; CERQUEIRA *et al.*, 2012), ainda é bastante limitado o conhecimento sobre a atuação deles na determinação de fenótipos. Alguns genes associados à pigmentação humana carregam polimorfismos de base única – conhecidos como *SNPs* (*Single Nucleotide Polymorfirsm*), que são associados à variabilidade de pigmentação de pele, cabelos e olhos.

O Consórcio para Análise da Diversidade e Evolução na América Latina – CANDELA – é um consórcio internacional multidisciplinar que envolve pesquisadores focados em estudar a diversidade biológica dos latino-americanos. Objetivando reunir dados de populações altamente miscigenadas, o CANDELA analisa amostras oriundas do México, Colômbia, Peru, Chile e Brasil, permitindo pela primeira vez a abordagem de uma ampla gama de questões relevantes à pesquisa antropológica, biológica e médica nessas populações (<https://www.ucl.ac.uk/candela/portuguese/inicio>). Cerqueira *et al.*, 2014, analisou uma possível associação entre 18 *SNPs* e o Índice de Melanina (*Melanin Index* –MI)

em 500 amostras oriundas de participantes do Projeto CANDELA nascidos no Rio Grande do Sul (RS) e na Bahia (BA). Foram encontrados quatro *SNPs* associados com as duas populações brasileiras: *TYR* rs1126809 (p.Arg402Gln), *HERC2* rs1129038 (3'UTR), *SLC24A5* rs1426654 (p.Thr111Ala) e *SLC45A2* rs16891982 (p.Phe374Leu), sendo dois deles diferencialmente associados com a população do RS: rs1426654 e rs16891982 (CERQUEIRA *et al.*, 2014).

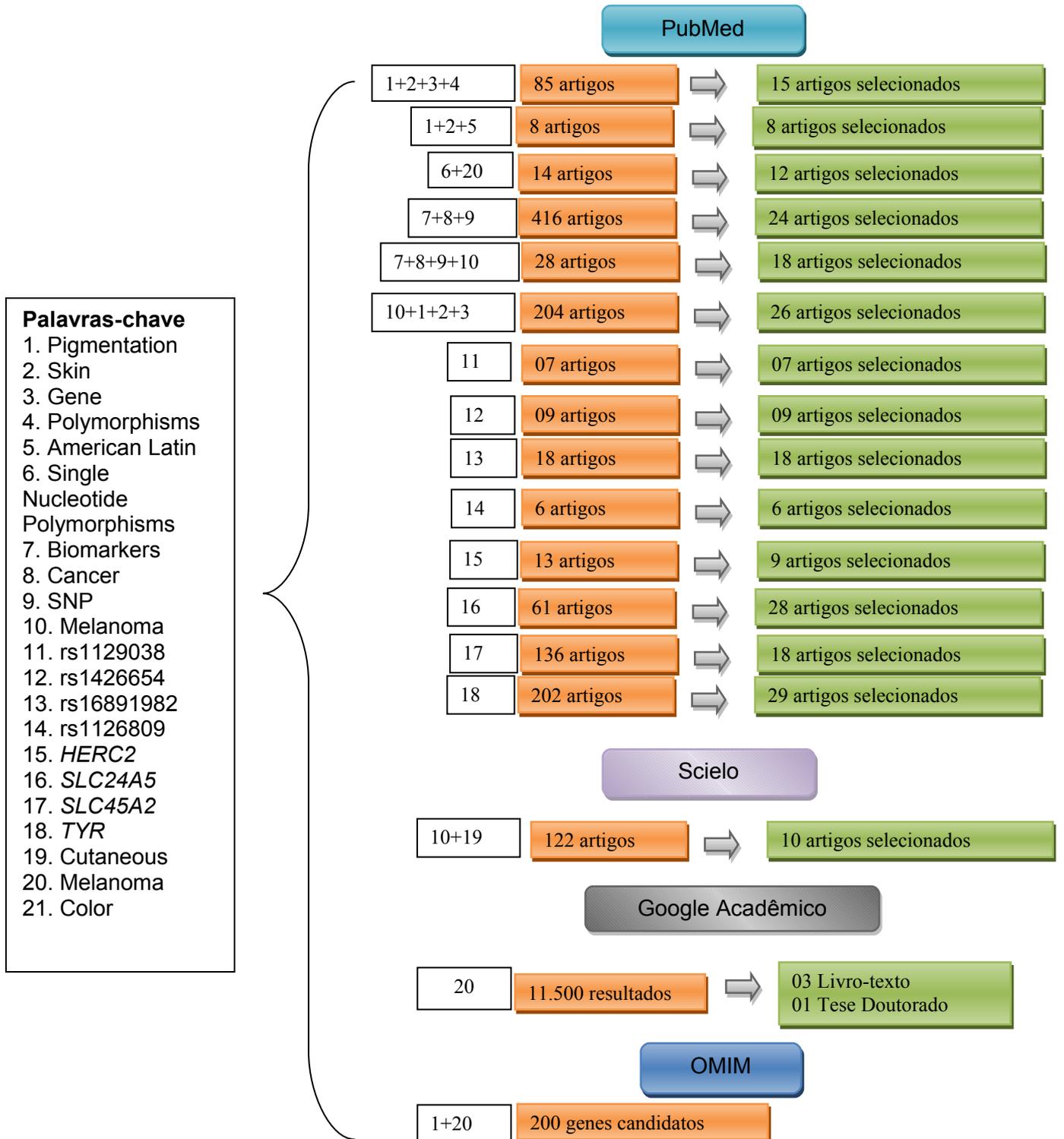
Os genes envolvidos na determinação da cor da pele e resposta ao bronzeamento são potencialmente aplicados em investigações de predisposição ao melanoma, podendo conferir susceptibilidade ou resistência ao desenvolvimento desta neoplasia, e em última análise, podem ser usados como preditores de risco para a doença na população em geral (LIN; FISCHER, 2007; MILLER; MIHM, 2006). O melanoma é um tumor originário de melanócitos e corresponde a aproximadamente 1% de todos os tumores malignos, sendo a principal causa de morte entre todos os tipos de câncer de pele, devido a sua grande propensão a metástases (GARBE; LEITER, 2009). Segundo dados do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), a taxa bruta no Brasil para 2016 é de 5.62 a cada 100.000 habitantes (consolidado). As maiores taxas do país encontram-se na região Sul, com uma taxa bruta de incidência de 16.09/100.000 e no Rio Grande do Sul, 15.8/100.000 habitantes, com 850 novos casos ao ano (SILVA *et al.*, 2015). O conhecimento corrente nos permite afirmar que o desenvolvimento do melanoma é um processo complexo que envolve a interação de fatores de risco ambientais, fenotípicos e genéticos (KYPREOU *et al.*, 2016). Além da susceptibilidade individual, determinada por variantes genéticas, incluem-se nesses fatores a idade, o gênero, o grau de exposição solar e a localização anatômica do local de exposição, além da história a priori e familiar de melanoma. Melanomas podem ocorrer em qualquer lugar na pele, mas as incidências entre homens e mulheres diferem. As taxas de mortalidade tendem a ser mais altas nos homens e essa diferença relaciona-se a detecção tardia, localização dos tumores no corpo e subsequente prognóstico atrelado (LIAN; MIHM JUNIOR, 2014). Acredita-se que a relação de condições climáticas associadas à pele clara e a aspectos culturais de exposição solar potencializa os riscos de desenvolvimento do melanoma em locais com alta incidência de radiação ultravioleta (ERDMANN *et al.*, 2012), como ocorre no RS (BAKOS, *et al.* 2002). Vários fatores de risco para o desenvolvimento de

melanoma já foram identificados, e as associações entre genes e a susceptibilidade a esta neoplasia estão sendo cada vez melhor elucidadas com auxílio de consórcios estabelecidos entre diferentes países, que contribuem com dados genéticos de diferentes populações. O projeto internacional *1000 Genomes* é um exemplo de colaboração nesse sentido, abrangendo cientistas e agências de fomento do Japão, Reino Unido, Canadá, Nigéria, China e Estados Unidos. O projeto tem como objetivo colaborar com essas análises através do desenvolvimento de um mapa de haplótipo do genoma humano, identificando e catalogando as similaridades e diferenças entre as sequências de DNA dos seres humanos (SUDMANT *et al.*, 2015). Iniciativas como essa reforçam a importância do estudo de biomarcadores específicos de determinadas populações, que possam ter potencial relevância diagnóstica e/ou prognóstica para doenças complexas como o melanoma e enfatizam a importância de reconhecer o padrão genotípico de uma população para melhor compreensão do comportamento genético de tumores e possibilita orientação adequada aos indivíduos que apresentam maior susceptibilidade.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES

Este trabalho é focado nos aspectos relacionados às bases genéticas da variação na pigmentação da pele devido à presença de polimorfismos de base única, que foram identificados na população sul-rio-grandense do Brasil e como esses polimorfismos podem estar envolvidos com a susceptibilidade ao melanoma, uma das principais doenças relacionadas. A estratégia de busca envolveu as bases de dados Scielo, PubMed, Google Acadêmico e banco de dados OMIM, no período de 1983 a 2016. Foram realizadas buscas através dos termos “*pigmentation*”, “*skin*”, “*genes*”, “*polymorphisms*”, “*american latin population*”, “*biomarkers*”, “*cancer*”, “*SNP*”, “*Melanoma*”, “rs1129038”, “rs1426654”, “rs16891982”, “rs1126809”, “*HERC2 gene*”, “*SLC24A5 gene*”, “*SLC45A2 gene*”, “*TYR gene*” e suas combinações. O esquema de busca está apresentado na Figura 4.



**Figura 1. Estratégia de busca de referências bibliográficas sobre as bases que fundamentam os objetivos deste estudo.** Este é o resultado da busca da combinação das 21 palavras-chave utilizadas, entre os anos 1983 a 2016. Figura original.

## 2.2 CÂNCER DE PELE

Segundo os dados mais recentes da Agência Internacional de Pesquisas em Câncer (IARC) e da Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer é a maior causa de morbidade e mortalidade no mundo. Os números são expressivos: foram estimados aproximadamente 14 milhões de novos casos e 8 milhões de mortes relacionadas no ano de 2012, afetando populações de todos os países e regiões. Essas estimativas correspondem a taxas de incidência de 182/100.000 habitantes e níveis de mortalidade de 102/100.000 habitantes (LIAN; MIHM JUNIOR, 2014). A pele é o sítio mais comum de câncer em humanos. A incidência de câncer de pele – também chamado de câncer de pele não melanoma - aumentou consideravelmente nas últimas décadas. As pesquisas focadas em pele têm dado contribuições chave para o entendimento da biologia e bioquímica da patogênese do câncer de pele (BALMAIN; YUSPA, 2014).

Atualmente, no mundo todo ocorrem cerca de 2 a 3 milhões de novos casos de câncer de pele por ano, sendo um terço de todos os tumores. Um a cada cinco norte-americanos poderão desenvolver a doença ao longo da vida (LIAN; MIHM JUNIOR, 2014). No Brasil, o câncer de pele é o tipo de câncer mais frequente, e corresponde a 30% de todos os novos casos de tumores registrados no país. Para o ano de 2016 são estimados 176 mil novos casos de câncer de pele e 1769 mortes decorrentes da doença, sendo 1000 homens e 769 mulheres (SILVA *et al.*, 2015).

Devido à heterogeneidade da pele, o câncer de pele pode se apresentar de diferentes formas, que se intitulam: Câncer de pele não-Melanoma, que inclui o Carcinoma basocelular (CBC) e o Carcinoma de células escamosas (CEC) e o Melanoma. O Carcinoma basocelular é o tipo de câncer não melanoma mais comum no mundo todo, e apesar de sua exata incidência ainda ser desconhecida, muitos estudos indicam que as taxas crescem a cada ano. O aumento observado de incidência pode ser atribuído, em parte, ao reforço na detecção e consciência do câncer de pele pela população. A longevidade aumentada da população também pode contribuir com o aumento da incidência de CBC, contudo, dados recentes sugerem que a incidência está aumentando também em idade jovem (KWASNIAK; GARCIA-ZUAZAGA, 2011). O CBC típico

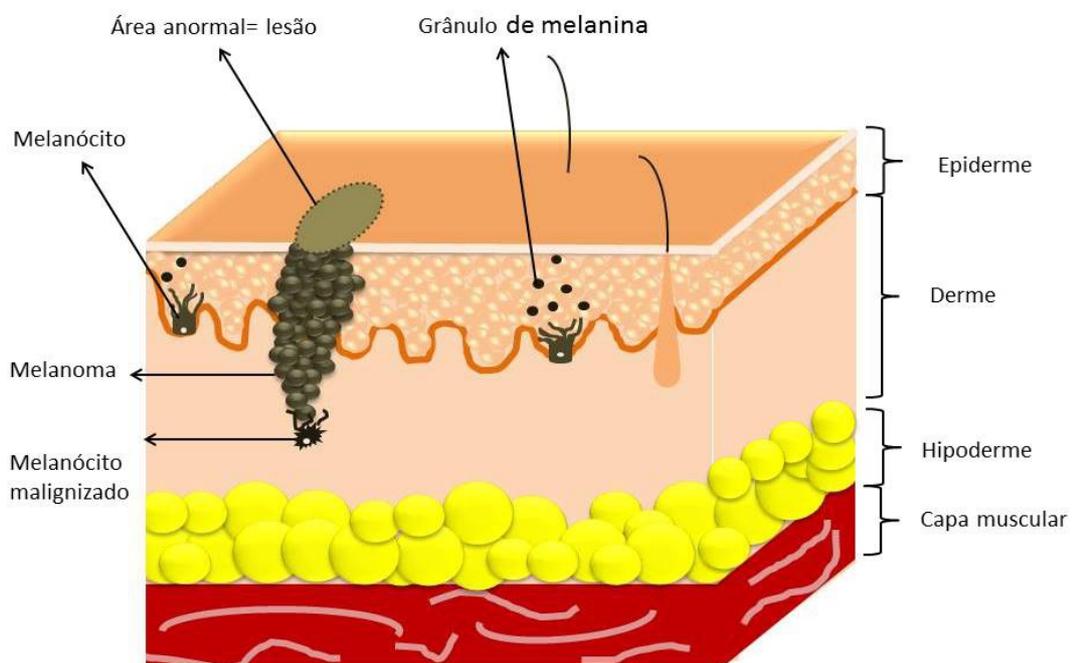
apresenta-se como nódulos ou pápulas (lesões sólidas na pele, com menos de um cm de diâmetro) peroladas e telangiectásicas (apresentam dilatação anormal dos capilares sanguíneos) com ou sem ulceração, ou como manchas endurecidas que apresentam bordas discretas e podem ser pigmentadas. Morfologicamente, o CBC engloba um grupo de tumores epiteliais intradermais, caracterizados pelo componente celular primário que se assemelha as células basais indiferenciadas da epiderme e seus apêndices (KASPER *et al.*, 2012).

O Carcinoma de células escamosas, também conhecido como Carcinoma espinocelular, representa 20% de todos os cânceres de pele não melanoma e é considerado como uma “ameaça mortal” devido a sua alta capacidade de originar metástases em qualquer órgão do corpo. Os fatores envolvidos no potencial metastático incluem invasão profunda, características histológicas, localização, tamanho horizontal, envolvimento perineural, recorrência tumoral, excisão tumoral incompleta, múltiplos tumores, características individuais dos pacientes (como imunossupressão) e marcadores genéticos e moleculares (como por exemplo, o EGFR - receptor de fator de crescimento epidermal, marcador encontrado superexpresso). Atualmente, estudos demonstram que o CEC é diagnosticado em uma taxa de 15-35 a cada 100.000 pessoas e é esperado um aumento de 2-4% por ano (BURTON; ASHACK; KHACHEMOUNE, 2016). Os CEC tipicamente comportam-se de forma indolente e podem ser curados com destruição local ou métodos cirúrgicos, sendo pequena a parcela que evolui para tumor metastático e induz significativa morbidade e mortalidade (FU; AASI; HOLLMIG, 2016).

### 2.3 O MELANOMA

O melanoma é definido como uma neoplasia derivada de melanócitos, que envolve transformações malignas destas células, que acumulam alterações genéticas, levando a anormal proliferação e disseminação (VULTUR; HERLYN, 2013). Algumas características do processo de malignificação de melanócitos, resultando em melanoma, foram descritas pela primeira vez em 1987, através de análises de linhagens celulares de melanomas e comparação com melanócitos saudáveis, onde foram descritas diferenças morfológicas e identificados 34

antígenos diferenciais secretados na superfície de células de melanoma (HOUGHTON *et al.*, 1987). Trata-se do tipo mais letal de câncer de pele devido a sua grande possibilidade de disseminação à distancia (surgimento de metástases), e sua incidência vem aumentando em níveis alarmantes (YAMAGUCHI; HEARING, 2014). Na figura 2 é possível visualizar, de maneira esquemática, como ocorre o surgimento de um melanoma na pele.



**Figura 2: Representação esquemática das camadas que compõem a pele, com a presença dos melanócitos e formação do melanoma.** Epiderme: camada mais externa e visível da pele, cuja principal função é atuar como uma barreira de proteção; Derme: camada abaixo da epiderme, composta por muitos vasos sanguíneos e terminações nervosas que recebem estímulos traduzidos em sensações como frio, dor, calor e vibrações; Hipoderme: última camada da pele, formada basicamente por células de gordura, apoia e une a epiderme e a derme ao resto do corpo e mantém a temperatura corporal do corpo; Melanócitos: células responsáveis pela produção dos grânulos de melanina, que contém o biopolímero melanina, responsável pela tonalidade da pele, olhos e cabelos; Melanócito malignizado: representado nesta figura como um melanócito transformado que dá origem ao melanoma; Área anormal=lesão: manifestação externa do melanoma, são os nevos na pele com características anormais.

Figura adaptada da Associação Colombiana de Dermatologia e Cirurgia Dermatológica, 2016. Figura original.

O melanoma é um tumor predominante entre pessoas de pele branca, e a sua incidência se correlaciona com as coordenadas geográficas de latitudes dos seus locais de residência (PARKIN *et al.*, 2002). De acordo com Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) da Organização Mundial da Saúde (OMS), foram diagnosticados 232.000 novos casos de melanoma e registradas 55.000 mortes decorrentes da doença em 2014. Entre os continentes, podemos citar as maiores estimativas para a Europa, América do Norte e Oceania com 100.442 (2.9%), 74.515 (4.2%) e 14.980 (9.6%) novos casos, respectivamente, registrados em 2014 (LIAN; MIHM JUNIOR, 2014). Embora o melanoma não seja um dos cânceres mais frequentes na América do Sul, a localização geográfica do continente pode apresentar-se como um fator de risco para esta população. No Brasil, este tipo de câncer representa 4% das neoplasias malignas da pele. As estimativas para 2016 são 5.670 novos casos, sendo 3.000 homens e 2.670 mulheres e 1.547 mortes causadas por melanoma, sendo 903 homens e 644 mulheres. As maiores taxas do país são registradas no Sul do país, acometendo 8 a cada 100.000 indivíduos (SILVA *et al.*, 2015).

O percentual de melanoma familiar corresponde a 5% a 10% de todos os casos, e são causados por mutações germinativas em genes de pré-disposição ao câncer, incluindo *CDKN2A*, *CDK4*, *TERT*, *MITF*, *BAP1*, entre outros (RANSOHOFF *et al.*, 2016; SOURA *et al.*, 2016). Contudo, a maior parte dos casos diagnosticados é associada a mutações somáticas de baixa penetrância em múltiplos genes, tais como *MITF*, *PIK3CA*, *KIT*, *CTLA4*, *BRAF*, *MGMT* e *MC1R* (PINTO *et al.*, 2016).

### **2.3.1 Tipos de melanoma**

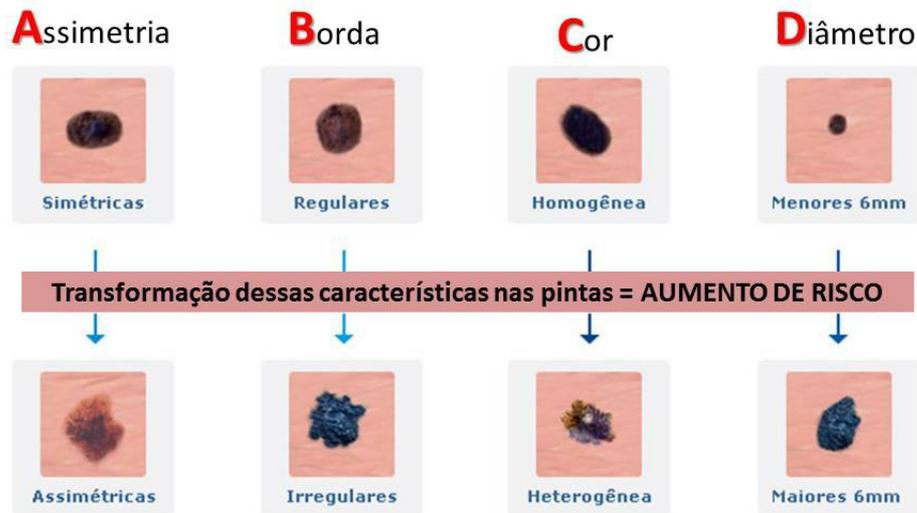
O melanoma é classificado em quatro subtipos distintos: melanoma de espalhamento superficial, melanoma esclerose nodular, melanoma lentigo maligno e melanoma lentiginoso acral. A característica comum entre eles é o crescimento radial mais lento do que o crescimento vertical dos melanócitos

alterados, e posterior invasão destes em outros tecidos. O melanoma de espalhamento superficial é o mais comum, responsável por cerca de 70% de todos os casos de melanoma no mundo, apresenta uma leve predominância no sexo feminino e um prognóstico considerado favorável quando comparado às outras manifestações de melanoma. A forma esclerose nodular é responsável por 15 a 30% de todos os casos, apresenta crescimento vertical agressivo e disseminação rápida. A forma lentigo maligno ocorre em cerca de 4 a 10% dos pacientes e apresenta bom prognóstico devido à fase de crescimento radial ocorrer em média durante 5 a 15 anos. O melanoma lentigo acral representa de 35 a 60% dos casos em pessoas com pigmentação escura, afro-americanos, asiáticos e hispânicos, e a sua principal manifestação ocorre nas palmas das mãos, solas dos pés e leitos ungueais. Apresenta fase de crescimento vertical muito agressiva, sendo a forma de pior prognóstico, junto com o tipo esclerose nodular (TOY; LIU; CAMPBELL, 2012; GREENWALD; FRIEDMAN; OSMAN, 2012).

Os padrões vasculares encontrados na forma de espalhamento superficial incluem lesões planas, áreas rosa-avermelhadas sem estrutura definida e lesões polimórficas. Já na forma de melanoma esclerose nodular, as lesões possuem características distintas, como pápulas firmes em forma de nódulo, com superfície lisa, áspera ou enrugada e podem ser de coloração marrom-escura, preta, preto-azulada e em até 50% dos casos, podem ser rosa-avermelhadas. As manifestações clínicas da forma lentigo maligno são as mais difíceis de detectar e de diferenciar de outras manifestações benignas, como as queratoses seborréicas e as queratoses pigmentadas, por exemplo. Elas se distribuem nas áreas expostas ao sol – principalmente no rosto – e tendem a desenvolver características progressivas como manchas finas e acinzentadas e pontos de coloração cinza-ardósia, que apresentam maior assimetria na densidade da pigmentação cinza quando comparadas com as lesões benignas. Também pode surgir hiperpigmentação assimétrica dos folículos capilares, com células anormais oriundas destes e obliteração dos mesmos. A forma de melanoma acral-lentiginoso afeta igualmente homens e mulheres, e ao contrário das demais, não apresenta relação com a exposição solar. As lesões mais comuns

ocorrem nas solas dos pés, apresentam crescimento lento e são comumente confundidas com manchas inofensivas (CUNLIFFE, 2012).

Freqüentemente, os primeiros sinais de melanoma apresentam-se como mudanças no tamanho, formato e cor de nevos e manchas presentes na pele. Também podem surgir novos nevos e manchas, que podem ser escuras, anormais e com aspecto desagradável (HOWLADER *et al.*, 2016 ). Preconiza-se aos pacientes prestarem atenção aos sinais iniciais, que são resumidos pela Sociedade Brasileira de Dermatologia (SBD) como “regra do ABCD”, para auxiliar na identificação de lesão maligna suspeita e sinalizar a necessidade de avaliação médica. Na figura 3 é possível visualizar o sistema de identificação dos sinais iniciais de melanoma. Outra medida adotada para prevenção é a “calculadora” disponibilizada no site da SBD (<http://www.controleosol.com.br/calculadora/>), que auxilia na identificação do risco para câncer de pele a partir de informações disponibilizadas pelo usuário, que incluem características pigmentares, hábitos de vida e frequência de exposição ao sol (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA, 2016). A remoção cirúrgica é o primeiro tratamento para todos os estágios de melanoma. Outros tratamentos incluem quimioterapia e radioterapia, além de terapias biológicas e alvo-específicas. Terapias biológicas aumentam a habilidade do próprio corpo para reagir ao câncer. Terapias alvo-específicas usam substâncias que atacam as células cancerígenas sem causar danos às células normais (HOWLADER *et al.*, 2016).



**Figura 3: Representação esquemática da “regra do ABCD” para identificação da malignização de nevos e lesões iniciais do melanoma.** Figura adaptada de Sociedade Brasileira de Dermatologia, 2016.

### 2.3.2 Relação da radiação ultravioleta e o melanoma

O risco atual para melanoma parece ser modulado por variáveis ambientais, relacionadas com a exposição à radiação solar. O principal fator de risco conhecido para o desenvolvimento do melanoma é a exposição excessiva ao sol. Os danos dessa exposição solar são cumulativos, tornando o tempo de exposição ao longo da vida outro fator de risco importante (LIAN; MIHM JUNIOR, 2014).

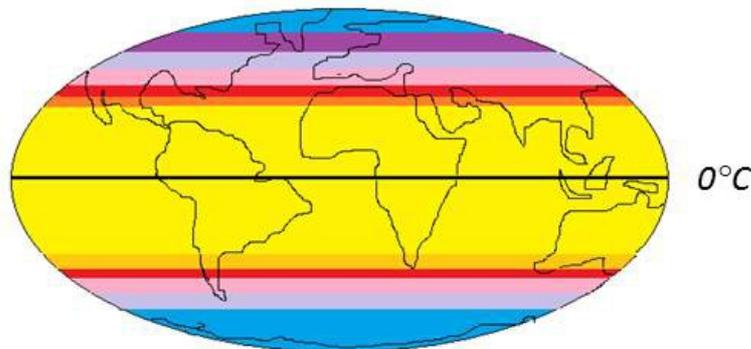
A radiação ultravioleta (UVR) é um tipo de onda eletromagnética proveniente de a luz solar que contribui potencialmente para o desenvolvimento de cerca de 80% dos casos de melanoma, especialmente em peles muito sensíveis. As ondas eletromagnéticas representam formas de energia radiante, que são mensuradas por seu comprimento de onda, por sua frequência ou pela energia dos seus fótons. O espectro eletromagnético compreende a eletricidade estática (não alternante) e os campos magnéticos de baixa frequência (baixa energia, grande comprimento de onda); os campos eletromagnéticos de radiofrequência; as micro-ondas; a radiação óptica (infravermelho, luz visível, radiação

ultravioleta) e a radiação ionizante (alta energia, ondas de comprimento muito curto). A interação de vários tipos de radiação com os sistemas biológicos é compreendida a nível celular. Essa interação é determinada pela intensidade da radiação, pela energia relacionada à mesma e pela energia absorvida pelo tecido exposto. A radiação ionizante e ultravioleta é conhecida por causar câncer, porém algumas dúvidas ainda permanecem a respeito dos mecanismos exatos de atuação e os efeitos relacionados à dosagem e a susceptibilidade (ARMSTRONG; KRICKERB, 2001). A radiação ionizante também é empregada em tratamentos de câncer, especialmente os que focam na destruição das células malignas do tecido acometido. As doses terapêuticas são pré-calculadas e aplicadas por um determinado período a um volume de tecido que engloba o tumor (SILVA *et al.*, 2015).

A UVR provém naturalmente do Sol e é classificada em três tipos: ultravioleta A (UVA) com maior comprimento de onda, de 315-400nm; ultravioleta B (UVB), com 280-315 nm e ultravioleta C (UVC) com menor comprimento de onda, de 100-280nm. A radiação UVA é a menos bloqueada pela camada de ozônio na atmosfera, compondo 95% de toda a radiação que alcança a superfície terrestre. Os 5% restantes dessa composição é a radiação do tipo UVB. A maior parte da radiação UVB que alcança a Terra é dispersa ou absorvida por moléculas de oxigênio, de ozônio e de água na atmosfera. O nível de radiação ultravioleta que incide sobre a superfície terrestre (sendo principalmente UVA) varia com a latitude, altitude, hora do dia, período do ano, cobertura de nuvens e outros fatores atmosféricos, que incluem ainda a poluição do ar e o reflexo de superfícies vizinhas, como neve e água. Na superfície do globo terrestre, os maiores níveis de incidência registrados localizam-se em paralelos próximos à Linha do Equador (paralelo 0°). O continente africano, por exemplo, recebe as maiores e mais uniformes quantidades, enquanto nas regiões mais distantes do paralelo 0°, como o norte da Eurásia, as quantidades incidentes são quase insignificantes (KESMINIENE; SCHÜZ, 2014; JABLONSKI; CHAPLIN, 2010). Na figura 4 é possível ver uma representação do mapa-múndi e as diferentes quantidades de incidência de UVR. Com a deterioração da camada de ozônio, a atmosfera perde gradativamente a sua capacidade de filtro terrestre, diminuindo sua atividade de proteção contra a UVR que atinge a superfície da Terra. São

estimados que cada 10% de deterioração na camada de ozônio resultará em 300.000 casos de câncer de pele não melanoma e 4.500 casos de melanoma (KESMINIENE; SCHÜZ, 2014). Considera-se que a melanina presente nas células da pele atue como um tipo de blindagem direta para proteção contra a UVR. Além disso, a pigmentação constitutiva, bem como a capacidade de bronzeamento, também se relaciona com a diminuição do risco (LIN; FISHER, 2007). O padrão de pigmentação da pele é dinâmico e adaptativo e o aumento facultativo da quantidade de melanina em resposta a exposição à radiação ultravioleta (UVR) – conhecido por bronzeamento – pode promover a proteção da pele exposta (GREAVES *et al.*, 2014).

Por tratar-se de uma doença complexa, além dos fatores de risco ambientais existem os fatores de risco individuais para o desenvolvimento do melanoma. Ter a pele clara, olhos azuis, verdes ou castanhos claros, cabelos loiros ou ruivos, uma tendência a apresentar mais queimaduras na pele do que bronzeamento, e a presença de numerosos nevos e sardas são alguns desses fatores, além do histórico familiar (LIAN; MIHM JUNIOR, 2014).



**Figura 4: Representação do mapa do mundo e a distribuição da radiação ultravioleta.** A intensidade de (UVR) é indicada pela graduação das cores quentes para as cores frias. Nos locais próximos a Linha do Equador (0°C) é possível encontrar os maiores índices de UVR, representados pela escala de cores quentes (amarelo laranja e vermelho). À medida que ocorre o afastamento do paralelo 0°C, a incidência de UVR diminui, representada pela escala de cores frias (rosa claro, lilás, roxo e azul). Essa forte correlação entre pigmentação

da pele e localização geográfica sugere que as variações genéticas são resultado de interação com o ambiente. Figura adaptada de Jablonski; Chaplin, 2010.

Atualmente, a prevenção primária do melanoma baseia-se em reconhecer pacientes com maior propensão ao seu desenvolvimento, com base em características fenotípicas aparentes, como a cor da pele. Porém, sabe-se que a ancestralidade dos indivíduos é um fator importante a ser investigado a nível molecular. Avaliar a presença de polimorfismos em alelos de alta frequência em determinada população é importante para a identificação de subgrupos que possam apresentar maior risco de desenvolvimento desta neoplasia, bem como orientar medidas mais adequadas de prevenção (BAKOS *et al.*, 2011). As evidências epidemiológicas de aumento na incidência de melanoma em indivíduos de pele clara datam de estudos desde 1983, e sugerem relação com maior exposição à luz solar (MACKIE, 1983). Contudo, a associação entre exposição à luz solar e desenvolvimento do melanoma não é linear, e a exata sequência de eventos responsáveis pelo início do tumor até a expressão clínica dos sintomas ainda não está claramente definida.

## 2.4 A PIGMENTAÇÃO EM HUMANOS

A pigmentação em humanos talvez seja o traço com taxa de evolução mais rápida em nossa espécie, exemplificada por populações relativamente próximas que apresentam grandes diferenças nos níveis de pigmentação média. Muitos pesquisadores sugerem que o escurecimento na pigmentação de pele ocorreu em ancestrais pré-humanos, após a perda de pelos que protegiam a pele clara (QUILLEN; SHRIVER, 2011).

Existem diversas moléculas que são responsáveis pela pigmentação dos tecidos do organismo. O sistema de pigmentação da pele, olhos e cabelos humanos é dependente primeiramente da produção de um biopolímero absorvedor de luz visível chamado melanina, que ocorre em estruturas chamadas de melanócitos epidermais, oculares e foliculares (NORDLUND, 1998). A contribuição dos melanócitos na pigmentação é conservada através de muitas espécies (LIN;

FISHER; 2007). Os grânulos de melanina são sintetizados usando o aminoácido Tirosina, que é convertida em DOPA através de hidroxilação e posteriormente oxidado, virando Dopaquinona, através da enzima fundamental no processo de melanogênese, a Tirosinase (TYR). A Dopaquinona pode seguir por duas vias alternativas, dependendo a presença do aminoácido Cisteína. Quando ausente, a Dopaquinona dá origem ao DHI (5,6-dihidroindole) e ao DHICA (5,6-dihidroindole-2-ácido carboxílico), constituintes da chamada eumelanina, enquanto que na presença de Cisteína, a Dopaquinona origina a feomelanina (revisado por PARRA, 2007). As vesículas onde ocorrem os processos de melanogênese são chamadas de melanossomos. Os dois maiores tipos de melanossomos são produzidos e nomeados de acordo com o tipo de melanina que contém. O eumelassomo é maior (~0,9 x 0,3 um) e tem formato elipsoidal, contendo matriz glicoproteica altamente ordenada, que integra a produção de eumelanina, com pigmentos nas cores preto e marrom. A feomelanina engloba pigmentos vermelho e amarelo, e é produzida nos feomelanossomos, que são menores e esféricos (~0,7 um de diâmetro), compostos por uma matriz glicoproteica desorganizada (revisado por STURM; TEASDALE; BOX, 2001). A eumelanina e a feomelanina são, em última instância, os pigmentos que determinam a vasta graduação de cores da pele, no espectro de luz visível para as retinas humanas. As bases genéticas dos mecanismos envolvidos na síntese desses dois pigmentos podem estar relacionadas também com desordens e doenças. Entre indivíduos de diferentes origens étnicas, encontram-se diferenças quantificáveis no grau de melanização e distribuição de melanossomos (NORDLUND, 1998). O padrão de distribuição de melanina é determinado no nascimento e não depende da exposição solar. Diferenças no grau de melanização, bem como as diferenças químicas nos pigmentos melânicos são os fatores determinantes na graduação visual da cor da pele. Essas diferenças são determinadas por diretrizes genéticas que estabelecem diferentes padrões ainda no desenvolvimento embrionário (STURM; TEASDALE; BOX, 2001).

Thomas B. Fitzpatrick, médico do Departamento de Dermatologia de Harvard, conhecido hoje como “o pai da medicina dermatológica moderna” e “o mais influente dermatologista dos últimos cem anos”, foi um dos primeiros pesquisadores no campo da pigmentação da pele e da sua relação com o melanoma. Segundo ele, existem seis tipos de pele entre os indivíduos, com quantidades e componentes de

pigmentação diferentes, que são determinadas por fatores genéticos e ambientais, tais como reação a exposição solar e hábitos de bronzamento. A tabela de Fitzpatrick (The Fitzpatrick Skin-Type Chart) é uma escala que classifica os tipos de pele de acordo com cor constitutiva e à resposta a luz ultravioleta. A partir das observações feitas por Fitzpatrick, foi possível determinar padrões para classificação dos tipos de pele, que variam entre o tipo I – peles altamente sensíveis, que sempre reagem com queimaduras à exposição solar e nunca se bronzeiam – até o tipo VI – peles insensíveis ao sol e altamente pigmentadas (FITZPATRICK, 1988). Os tipos de pele classificados, conhecidos como fototipos, estão expostos na Tabela 1 e são utilizados comumente na prática dermatológica para associação com risco de desenvolvimento de melanoma.

**Tabela 1 - Classificação de fototipos de acordo com a Tabela de Fitzpatrick, 1988**

Fototipos	Cor da pele sem exposição ao Sol	
I	Branca	Pele altamente sensível ao sol, sempre se queima nunca se bronzeia.
II	Branca	Pele muito sensível ao sol, queima-se facilmente, bronzeia-se minimamente.
III	Branca	Pele sensível ao sol queima-se razoavelmente, bronzeia-se lentamente.
IV	Marrom clara	Pele minimamente sensível ao sol, bronzeia-se sempre moderadamente.
V	Marrom escura	Pele insensível ao sol, raramente se queima, sempre bronzeia-se.
VI	Negra	Pele insensível ao sol, raramente se queima, sempre bronzeia-se.

### 2.4.1 Genes envolvidos na pigmentação

Além de a pele ser a principal barreira protetora contra ao ambiente externo, os melanócitos presentes em sua constituição são responsáveis por prover, entre outras coisas, a foto proteção e a termo regulação do organismo (LIN; FISHER; 2007). As características fenotípicas de pele clara, sardas e cabelo alaranjado e/ou avermelhado são associadas com grandes quantidades de feomelanina e pequenas quantidades de eumelanina, produto da perda de função de alelos no gene Receptor Melanocortina 1 – *MC1R* (BARSH, 2003). Devido a variações em sua constituição

genética, sabe-se que a melanina influencia tanto na pigmentação humana quanto no risco de câncer (revisado por GREAVES, 2014). Até o momento, foram descritos mais de 125 genes envolvidos na regulação da pigmentação, e muitos (pelo menos 25) afetam a biogênese ou a função dos melanossomos (MORICE-PICARD *et al.*, 2014).

As diferenças na pigmentação entre os membros da espécie humana constituem um dos principais e mais enigmáticos fenótipos conhecidos. Existe uma enorme gama de cor de pele, cuja variação pode estar correlacionada com climas, continentes e/ou culturas, e da qual conhecemos muito pouco a respeito da arquitetura genética envolvida. Na identificação dos genes candidatos envolvidos na pigmentação da pele, torna-se interessante investigar mutações raras, conhecidas por ocasionar fenótipos extremos, como as formas mendelianas de albinismo (BARSH, 2003). Existem mais de 350 *loci* putativos identificados e catalogados em genes envolvidos com coloração no banco de dados da “*International Federation of Pigment Cell Societies*” (IFPCS) (<http://www.espcr.org/micemut/>), que engloba as sociedades Europeia, Pan-americana, Japonesa e Asiática responsáveis por pesquisas de pigmentação celular. Embora a maioria desses 350 *loci* ter sido identificada em modelos de camundongos, evidências sobre a influência de variantes raras em genes de pigmentação humana estão crescendo cada vez mais (MONTOLIU; OETTING; BENNETT, 2016).

O genoma humano contém significativa variação genética. As alterações mais comuns encontradas no genoma humano são as mutações pontuais ocasionadas por substituições de pares de bases únicos, que podem ser do tipo transições (A por G ou C por T) ou transversões (A por T ou C por G). Essas mutações são chamadas de “polimorfismos de base única”, ou “*Single Nucleotide Polymorphism* (SNP)” e se localizam espalhados em todo o genoma. O estudo desses polimorfismos em diferentes subpopulações contribui para o entendimento de nossa história genética e evolutiva e para prever a susceptibilidade de indivíduos para doenças como câncer e cardiopatias. Os SNPs variam entre as populações, estando presentes ou ausentes e apresentando diferentes frequências. Através de técnicas como as citadas inicialmente por Lewontin em 1972, porém enormemente aperfeiçoadas e precisas, os SNPs estão auxiliando cada vez mais na identificação

de genes causadores e de genes implicados na susceptibilidade a doenças de base genética, como por exemplo câncer, esclerose lateral amiotrófica e artrite reumatoide (SNUSTAD; SIMMONS, 2013). Na tabela 2 estão resumidos os genes e polimorfismos investigados neste trabalho.

**Tabela 2 - Informações dos SNPs investigados neste estudo<sup>1</sup>**

SNP	Gene	Localização Cromossômica	Localização Gênica <sup>2</sup>	Tipo de alteração	Alelo ancestral	MAF*
rs1126809	<i>TYR</i>	11q	Éxon (p.Arg402Gln)	Transversão <i>missense</i> G>A	A	A=0.1770
rs1129038	<i>HERC2</i>	15q13.1	Primeira variante 3' UTR do gene	Transversão <i>missense</i> G>A	G	A=0.4927
rs1426654	<i>SLC24A5</i>	15q21.1	Éxon (p.Ala111Thr)	Transversão <i>missense</i> G>A	G	G=0.2283
rs16891982	<i>SLC45A2</i>	5p13.2	Éxon (p.Phe374Leu)	Transição <i>missense</i> C>G	C	G=0.3507

<sup>1</sup>Dados obtidos no bancos de dados Exome Aggregation Consortium; <sup>2</sup>Posição no gene e mudança na proteína.

\*MAF= *Minor allele frequency*

#### 2.4.1.1 O gene *TYR* e o SNP rs1126809

O gene *TYR* é responsável por codificar a enzima Tirosinase, que possui um papel fundamental na biosíntese da melanina. Trata-se de uma oxidase contendo cobre, que funciona na formação de pigmentos tais como melanina e outros compostos polifenólicos. Além disso, participa dos processos biológicos de proliferação celular. A proteína codificada tem duas isoformas já identificadas e sua sequência tem 529 aminoácidos e seu peso molecular é de 60393Da. Este gene é localizado no cromossomo 11, possui seis éxons e três transcritos e seu produto principal catalisa os primeiros dois passos e pelo mais um passo subsequente na conversão do aminoácido tirosina em melanina (AUTON *et al.*, 2015).

Mutações patológicas neste gene são descritas como as responsáveis por diferentes tipos de uma doença genética chamada Albinismo Oculocutâneo (OCA), que é ocasionada por uma redução substancial de melanina no globo ocular. Um dos exemplos de OCA mais conhecido é a OCA tipo 1, uma desordem autossômica recessiva que caracteriza-se pela ausência completa de melanina na pele, olhos e cabelos. Essa desordem é caracterizada por uma completa ausência da atividade da Tirosinase. Os pacientes se apresentam com ausência de melanina logo após o nascimento e manifestam aumento da sensibilidade à UVR com predisposição ao câncer de pele. As anomalias visuais incluem diminuição da acuidade, nistagmo, estrabismo e fotofobia (KALAHROUDI *et al.*, 2014). A doença OCA tipo 2 se diferencia do tipo 1 devido a mudanças fenotípicas, como os cabelos que se apresentam brancos ao nascimento e rapidamente tornam-se amarelos ou loiros. Os pacientes manifestam quantidades mínimas ou moderadas de pigmento cutâneo e ocular (CAMAND *et al.*, 2000). Outra característica associada a este gene é a susceptibilidade ao melanoma (GUDBJARTSSON *et al.*, 2008; BISHOP, *et al.* 2009; DUFFY *et al.*, 2010).

Além de mutações patológicas, polimorfismos considerados não patológicos já foram descritos neste gene, e resultam na variação normal de pigmentação da pele (LÓPEZ; ALONSO, 2014). Já foram descritos 7118 polimorfismos de base única, além de três elementos regulatórios de expressão gênica na região deste gene (KERSEY *et al.*, 2015).

O SNP rs1126809 (c.1205G>A, p.Arg402Gln) é uma variante do tipo missense, que ocorre no éxon 4 do gene *TYR*. A mudança de nucleotídeo acarreta mudança de aminoácido na proteína Tirosinase. Esse SNP é associado com OCA tipo 1, OCA tipo 1B, vitiligo (JIN *et al.*, 2012), câncer de pele (NAN *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2013), pigmentação de pele, olhos (azuis/verdes) e cabelos (CERQUEIRA *et al.*, 2014; DURSO *et al.*, 2014), queimaduras de sol e bronzeamento (NAN *et al.*, 2009), Síndrome de Waardenburg associada a albinismo ocular (CHIANG; SPECTOR; MCGREGOR, 2009). Nas populações africanas, leste e sul asiáticas, este SNP apresenta frequências alélicas similares para o alelo ancestral G (0.991, 0.999, 0.946, respectivamente). A população europeia parece apresentar um perfil ligeiramente diferente, com uma frequência de 0.748 (AUTON *et al.*, 2015).

Para o Rio Grande do Sul a frequência registrada deste alelo é 0.81 (CERQUEIRA *et al.*, 2014).

#### 2.4.1.2 O gene *HERC2* e o polimorfismo rs1129038

A família de genes humanos *HERC* abrange seis genes, que codificam dois diferentes tipos de polipeptídeos. De maneira geral, as proteínas HERC caracterizam-se por conter um domínio HECT e um domínio RCC1-like (GARCIA-GONZALO; ROSA, 2005). A principal função associada ao gene *HERC2* é sua participação nos processos de Ubiquitinação. Ele codifica uma grande proteína E3 ligase com o domínio HECT que interage com a via RNF8, uma das responsáveis pelo recrutamento da proteína ubiquitina em resposta a quebras na dupla fita de DNA que ativam a resposta de dano ao DNA (revisado por SCHWERTMAN; BEKKER-JENSEN; MAILAND, 2016). As quinases de resposta ao dano no DNA ATM, ATR e DNAPK também interagem na mesma região, e a associação de *HERC2* com RNF8 aumentou após a exposição das células à radiação ionizante para indução de danos. Depleção do gene *HERC2* na linhagem celular HEK239T não prejudicou o acúmulo de RNF8 nos sítios de dano, mas causou falhas no processo de poli-ubiquitinação da histona H2A e acúmulo de fatores de sinalização e de reparo de danos ao DNA (BEKKER-JENSEN *et al.*, 2010). Também já foi demonstrada a atividade de *HERC2* como regulador da atividade da proteína p53, que é essencial em diversos processos celulares, incluindo a resposta de dano ao DNA. Cubillos-Rojas *et al.*, sugere que o papel da proteína HERC2 na interação com p53 seria durante a oligomerização da proteína (CUBILLOS-ROJAS *et al.*, 2014). Outra interação descoberta recentemente é a de *HERC2* como uma E3 ligase que ubiquitina a proteína BRCA1 para sua degradação durante a fase S do ciclo celular. Seu domínio HECT interage com o domínio N-terminal de BRCA1, marcando-a para degradação (WU *et al.*, 2010). O modelo animal proposto por Ji e colaboradores foi um camundongo que teve mutação induzida por componentes químicos (*jdf2*). Os alelos mutantes resultaram em defeitos nas vesículas secretoras neuromusculares, defeitos na região do acrossoma nos espermatozoides do animal e letalidade juvenil (WALKOWICZ *et al.*, 1999).

O gene *HERC2* possui 12 transcritos, com um total de 147 éxons em sua fita reversa, além de 17 elementos regulatórios, como promotores, sítios de ligação a fatores de transcrição e reforçadores (*enhancers*). Sua sequência tem 4834 aminoácidos e seu peso molecular é de 527228Da (KERSEY *et al.*, 2015). Este gene foi mapeado na localização cromossômica 15q11-q13 e tem sua região regulatória envolvida na expressão constitutiva de outro gene, o *OCA2*, relacionado à pigmentação e associado por conferir risco a predisposição ao melanoma em diversas populações (DUFFY, 2003). A região 15q13, onde *HERC2* foi identificado, está ligada a determinação de cores na íris humana (KAYSER *et al.*, 2008). Mutações no gene *HERC2* são associadas com a doença tipo-Angelman, uma desordem neuronal autossômico-recessiva, que possui fenótipo similar a Síndrome de Angelman. A proteína mutante possui uma meia-vida menor do que a proteína selvagem, responsável por uma significativa redução dos níveis de proteína nos indivíduos afetados. Essa redução é associada com um atraso no neurodesenvolvimento dos portadores (HARLALKA *et al.*, 2012). Outro estudo mostrou associação do gene a um atraso cognitivo do espectro autista (PUFFENBERGER *et al.*, 2012).

O gene *HERC2* tem 14039 SNPs e a maioria deles está relacionada com pigmentação da pele, cabelos e olhos. O SNP *rs1129038*, localizado na região não-traduzida 3'UTR do gene, é responsável pela troca A>G na posição 215437 do cromossomo 15 (15q13.1). O genoma humano codifica de 3 a 12 pseudogenes *HERc2*, a maioria localizados no braço q do cromossomo 15 (KERSEY *et al.*, 2015).

Foi observada pela primeira vez por Eiberg e colaboradores, uma associação significativa do alelo A deste SNP com fenótipo de olhos azuis em famílias Dinamarquesas – um haplótipo fundador contendo o *rs12913832* e o *rs1129038* foi identificado entre as pessoas com olhos azuis na Dinamarca, Turquia e Jordânia. Ensaio funcionais de expressão *in vitro* em células humanas de carcinoma do cólon mostraram a presença do alelo A como um efeito inibitório na atividade de *OCA2* (EIBERG *et al.*, 2008). Este SNP também já foi associado com Vitiligo, através de múltiplas observações e do projeto 1000 Genomas (JIN *et al.*, 2012).

As maiores frequências do alelo variante (A) deste SNP são encontradas em populações europeias, sendo encontradas nos bancos de dados *Exome Aggregation Consortium* (ExaC) e *1000 Genomes* as seguintes frequências: 0.74 e 0.64, respectivamente (AUTON *et al.*, 2015; LEK *et al.*, 2016). A frequência deste alelo em amostra do Rio Grande do Sul foi de 0.44 (CERQUEIRA *et al.*, 2014).

#### 2.4.1.3 O gene *SLC24A5* e o SNP rs1426654

Lamason e colaboradores postularam as primeiras afirmações acerca da associação do gene *SLC24A5* com mecanismos de pigmentação. Estudando este gene em peixes zebrafishes (*Danio rerio*), eles identificaram a forma mutante do gene como a responsável pela despigmentação dos melanossomos da pele e do epitélio na retina do animal. O peixe mutante foi chamado de *zebrafish golden*, e possui um atraso na formação e deposição da melanina durante a embriogênese. A forma selvagem do peixe apresenta melanossomos numerosos e densos e a pigmentação normal. Existe 68% de identidade entre os aminoácidos do modelo animal *zebrafish golden* e os mamíferos, suportando a conclusão de que se trata de genes ortólogos (LAMASON *et al.*, 2005).

Nos humanos, este gene possui 18 éxons na fita reversa e codifica uma proteína de membrana intracelular associada à regulação da concentração de íons. Trata-se da proteína NCKX5, trocadora predominante nos melanócitos, que provavelmente transporta um íon  $\text{Ca}^{2+}$  e um íon  $\text{K}^+$  para dentro do melanossomo e expulsa 4 íons  $\text{Na}^+$  para o citoplasma (GINGER *et al.*, 2007). Mais especificamente, a proteína NCKX5 aparece como uma trans-membrana no Complexo de Golgi dos melanossomos. Esta proteína tem duas isoformas descritas, e a mais abundante possui em sua sequência 500 aminoácidos e seu peso molecular é de 54888 Da. São conhecidos quatro transcritos do gene *SLC24A5*. Não existem elementos regulatórios localizados na região deste gene, bem como não existem muitas informações sobre a sua expressão gênica (UNIPROT CONSORTIUM, 2014).

Existem evidências de mutações neste gene associadas em doenças como o Albinismo oculocutâneo tipo 6 (OCA6). Essa desordem é caracterizada por uma redução ou completa perda de melanina na pele, cabelos e olhos. Os pacientes demonstram uma pigmentação ausente ou reduzida, frequentemente acompanhada

por sintomas como fotofobia, estrabismo, deficiência visual moderada à severa e nistagmo (WEI *et al.*, 2013). Além disso, o gene *SLC24A5* tem diferentes polimorfismos associados com pigmentação da pele, cabelos e olhos em diversas populações (SULEM *et al.*, 2007). Já foram descritos 1229 SNPs neste gene. O SNP rs1426654 (c.331A>G p.Ala111Thr) ocasiona a troca A>G na posição 18316 do cromossomo 15 (15q21.1). Situado na região codificadora do gene, é responsável pela troca entre os aminoácidos Treonina e Alanina no terceiro éxon do gene. Este polimorfismo tem um alto impacto na variação da pigmentação da pele, e a diferença de frequências que apresenta entre seus alelos é correspondente a diferenças na cor da pele entre europeus e africanos (SOEJIMA; KODA, 2006). O alelo ancestral G tem alta frequência entre populações mais pigmentadas, como africanos, americanos indígenas e leste-asiáticos, enquanto o alelo variante A é predominante em europeus (LAMASON *et al.*, 2005; NORTON *et al.*, 2006). Este SNP foi descoberto pelo projeto HapMap e atualmente é considerado o polimorfismo que apresenta maior efeito único dentre todos os implicados em diferenças de cor de pele entre europeus e oeste-africanos. O alelo variante encontra-se fixado entre a maioria dos europeus, sendo raro em leste-asiáticos e africanos, sugerindo que mutações responsáveis pela pigmentação clara não são compartilhadas entre as populações (QUILLEN; SHRIVER, 2011).

Em uma amostra italiana (n=184), o SNP aparece como monomórfico em todos os cromossomos italianos testados, sendo o alelo A o único encontrado. Frequências alélicas mais equilibradas foram encontradas em populações asiáticas da Mongólia (n=115), com 64% dos indivíduos portando o alelo G (GIARDINA *et al.*, 2008). A frequência alélica deste SNP foi determinada em diversas amostras representando as populações mundiais e foi demonstrado que o alelo A é bem representado apenas em populações europeias (frequência de 0,975) (SOEJIMA; KODA, 2006). A frequência do alelo derivado é similar nos estudos de SOEJIMA; KODA, 2006; LAMASON *et al.*, 2005 e SMITH *et al.*, 2004. Nessas populações, o rs1426654 parece sofrer uma “seleção purificadora” devido à fixação do alelo variante que confere a pele clara e uma melhor adaptação aos locais onde os níveis de incidência de UVR são menores (revisado por LÓPEZ *et al.*, 2014).

Em estudos com amostras brasileiras, o comportamento deste SNP é similar e também associado com diferenças na pigmentação, sendo o alelo A relacionado com pele clara (LEITE *et al.*, 2011; DURSO *et al.*, 2014). A frequência registrada deste alelo para a população do Rio Grande do Sul é de 0.9 (90%) (CERQUEIRA *et al.*, 2014).

#### 2.4.1.4 O gene *SLC45A2* e o polimorfismo rs16891982

A primeira clonagem posicional bem sucedida no gene *SLC45A2* ocorreu em modelo de peixes Medaka e revelou que o gene é responsável por codificar um transportador envolvido na síntese de melanina. Trata-se de uma proteína que possui 576 aminoácidos, 12 domínios transmembrana e apresenta 55% de identidade com a proteína humana, expressa pelo gene equivalente em humanos. O alelo b deste gene em Medakas, em condição de homozigose, origina uma variação de peixe vermelho-alaranjado. A formação de melanina nos mutantes bb é bastante leve, com erros na distribuição dos melanossomos. Nas clonagens em Medaka foram encontradas mutações em sete dos oito mutantes examinados para o locus b, relacionadas com pigmentação dos peixes (FUKAMACHI; SHIMADA; SHIMA, 2001). Em três linhagens humanas de melanona, foi identificado um antígeno chamado de proteína AIM1, composta por 530 aminoácidos. Análises moleculares detectaram o gene *SLC45A2* codificando dois transcritos, um com 1,7kb e outro com 2,8kb, em altos percentuais nas linhagens celulares de melanoma (HARADA *et al.*, 2001). O gene foi mapeado no braço p do cromossomo 5, contendo 10 éxons, abrangendo uma região de aproximadamente 40kb (NEWTON *et al.*, 2001).

O gene *SLC45A2* é um membro da família de carreadores de solutos, e codifica uma proteína que faz parte da membrana melanossomal chamada MATP, cujo funcionamento completo é desconhecido, mas sabe-se que é uma proteína requerida para a síntese normal de melanina (HARADA *et al.* 2001). Esta proteína tem um tamanho de 530 aminoácidos e sua massa molecular é de 58268 Da. Já foram encontradas múltiplas variantes transcritas, codificando diferentes isoformas desta proteína. Além disso, essa proteína já foi identificada em muitos organismos, tais como *Rattus norvegicus* (ratos), *Danio rerio* (peixes), *Mus musculus* (camundongos), *Canis lupus familiaris* (cães), *Bos taurus* (touros) e *Gallus gallus*

(galos) e em todos eles associada com transportador proteico (KERSEY *et al.*, 2015).

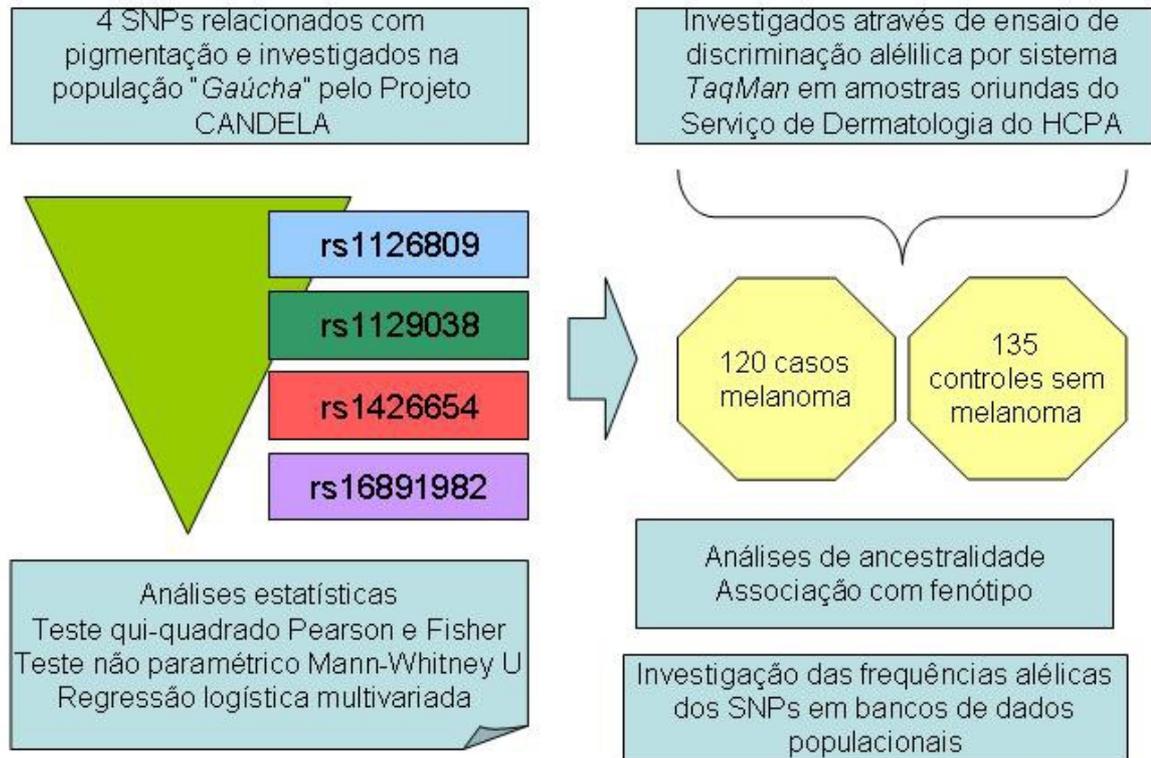
Este gene possui 89 mutações descritas, sendo 56 mutações tipo *missense*, 2 mutações regulatórias, 17 pequenas deleções, 5 pequenas inserções, uma pequena inserção/deleção, 4 grandes deleções e uma grande inserção (UNIPROT CONSORTIUM, 2014). Mutações no gene *SLC45A2* foram relacionadas com Albinismo oculocutâneo tipo 4 em uma amostra de pacientes italianos. Trata-se de uma desordem de pigmentação caracterizada por biossíntese de melanina reduzida na pele, olhos e cabelos. Os pacientes demonstram pigmentação reduzida ou ausente associada com anormalidades do albinismo cutâneo clássico, que incluem diminuição visual, hipoplasia macular, displasia óptica, vasos coronais atípicos e nistagmo (MAURI *et al.*, 2014). Existem 2467 SNPs descritos na região de *SLC45A2*. Através da segunda fase do projeto *1000 Genomes* que analisou em torno de três milhões de polimorfismos, foi possível determinar o envolvimento deste gene com a pigmentação na pele (AUTON *et al.*, 2015).

O SNP rs16891982 (c.1122C>G p.Phe374Leu) é uma variante do tipo *missense*, responsável pela troca C>G na posição 38088 do cromossomo 5 (5p13.2). Situado na região codificadora do gene, o SNP é responsável pela troca entre os aminoácidos Fenilalanina e Leucina (Phe374Leu). O alelo G foi encontrado com alta frequência em populações Caucasianas, enquanto o alelo C foi associado com pigmentação mais escura de pele, cabelos e olhos nas populações com ancestralidade europeia (GRAF; HODGSON; VAN DAAL, 2005). A associação deste polimorfismo com susceptibilidade ao melanoma foi confirmada pela primeira vez em Europeus no estudo de Stacey e colaboradores, que avaliou células basais de carcinoma em 3.326 casos e 5.439 controles (STACEY *et al.*, 2009). Investigando a distribuição do alelo G em populações da Eurásia e África, a frequência alélica mais alta foi observada em alemães (0.965); franceses e italianos mostraram um valor menor (0.615). Indianos e bangladeshes do sul da Ásia apresentaram baixas frequências deste alelo (0.147 e 0.059, respectivamente) (YUASA *et al.*, 2006). Dois estudos demonstram associação deste SNP com proteção para o melanoma. Analisada em 1019 pacientes de melanoma Caucasionos e 1466 controles foi encontrado uma diminuição de risco relacionada aos genótipos G/C e C/C

( $P=2.12 \times 10^{-15}$ ) (GUEDJ *et al.*, 2008). Em espanhóis foi encontrada a mesma associação de genótipos com a proteção para o melanoma, em uma amostra caso-controle de 376 indivíduos (FERNANDEZ *et al.*, 2008). Ambas as associações permaneceram significativas em modelo de regressão logística multivariada, levando em consideração características fenotípicas e fatores de risco para melanoma.

SOEJIMA e KODA relatam que a seleção direcional atuou ou está atuando em *SCL45A2* na população europeia devido a uma “*selective sweep*” na região circundante de p.Phe374Leu. É possível também que uma seleção natural similar tenha atuado ou esta atuando no gene *SLC24A5* em populações europeias pela mesma reação (SOEJIMA; KODA, 2006). Para a população do Rio Grande do Sul o comportamento do alelo G é similar ao de europeus, com uma frequência de 0.77 (77%) (CERQUEIRA *et al.*, 2014).

### 3 MARCO TEÓRICO



**Figura 5: Esquema do marco teórico deste trabalho.** Descrição da relação das informações apresentadas no esquema: a partir do trabalho publicado por Cerqueira *et al*, 2014, foram identificados quatro SNPs na população gaúcha participante do Projeto CANDELA, relacionados com a pigmentação. Sabendo que as bases genéticas do melanoma envolvem transformações malignas que iniciam nos melanócitos, e que esta é uma neoplasia prevalente nesta população, o presente projeto propôs um estudo experimental caso-controle que objetivou a investigação desses polimorfismos em amostras de pacientes com melanoma e controles saudáveis obtidas do Serviço de Dermatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Além das análises de genotipagem realizadas em DNA extraído de sangue periférico, foram realizadas análises de ancestralidade e correlação das frequências genotípicas com os fototipos dos participantes do estudo. Pretende-se com os achados do estudo realizado, contribuir para o entendimento das bases

moleculares da amostra, contribuir com dados de frequências genótípicas e alélicas de representantes da população do Rio Grande do Sul, relacionar as frequências obtidas com características fenotípicas de pigmentação e aumento de risco para melanoma, obter possíveis biomarcadores de susceptibilidade ao melanoma e colaborar com dados que possam ser úteis em painéis de investigação de polimorfismos, com atenção especial na identificação de portadores e possíveis medidas de prevenção para esta neoplasia.

#### 4 JUSTIFICATIVA

O melanoma é uma neoplasia potencialmente fatal e que vem apresentando um aumento sensível de incidência nas populações brancas de diversos países do mundo. É o tipo mais fatal entre os cânceres de pele, causado pela transformação de melanócitos (células produtoras de pigmento) que acumulam alterações genéticas levando a uma proliferação e disseminação anormais (VULTUR; HERLYN, 2013). Sua etiologia é considerada heterogênea e complexa e diversos estudos vêm tentando colaborar na compreensão dos principais mecanismos da patogênese dessa neoplasia e de como ocorre a contribuição de fatores genéticos para o desenvolvimento da doença. A região Sul do Brasil possui os maiores índices de melanoma do país, e vários fatores ambientais e fenotípicos são sugeridos como fatores de risco, além da influência genética na pré-disposição. Atualmente, a prevenção do melanoma baseia-se em reconhecer os pacientes mais susceptíveis a desenvolvê-la, os quais geralmente apresentam as características fenotípicas de possuir nevos em grande quantidade, fototipos I, II e III cabelos ruivos e loiros e olhos claros como os principais aspectos. Além disso, a presença de mais de um caso de melanoma na família, foto exposição exagerada e o histórico de queimaduras solares ao longo da vida também são aspectos levados em consideração. Em linhas gerais, recomenda-se que o indivíduo sob risco procure um dermatologista ao primeiro sinal de surgimento de novas manchas ou sinais na pele, ou modificações na cor, tamanho e bordas de lesões antigas, permitindo identificar possíveis cânceres em formação (SILVA *et al.*, 2015). Porém, essas recomendações são úteis apenas após o surgimento dos sinais iniciais, além de serem passíveis de interpretações errôneas por parte dos pacientes que muitas vezes não tomam conhecimento desses primeiros sinais. Ou seja, muitos indivíduos podem vir a desenvolver manchas, nevos, feridas e sinais característicos do tumor sem se dar conta da gravidade que está associada à evolução desses sinais.

Os polimorfismos genéticos de baixa penetrância, incluindo SNPs, podem interagir com fatores ambientais (principalmente com a radiação UV) e contribuir para aumentar a susceptibilidade ao melanoma. Além disso, esses polimorfismos podem ser capazes de diagnosticar portadores de mutações associadas ao desenvolvimento de melanoma antes da sua expressão nos indivíduos. Portanto, os

SNPs podem ser usados como biomarcadores associados a um aumento de risco para o desenvolvimento da doença, sugerindo, por exemplo, acompanhamento clínico mais frequente do portador.

Tendo em vista a escassez de estudos em populações brasileiras associando SNPs em genes de pigmentação ao melanoma, uma abordagem molecular de caráter exploratório foi proposta, visando investigar se existia associação entre os SNPs *TYR* rs1126809, *HERC2* rs1129038, *SLC24A5* rs1426654 e *SLC45A2* rs16891982 – presentes em genes envolvidos na pigmentação em humanos - com o aumento de risco para melanoma.

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 OBJETIVO PRIMÁRIO

O presente projeto de pesquisa tem como objetivo geral avaliar as frequências alélicas e genotípicas de quatro polimorfismos - rs1126809 no gene *TYR*, rs1129038 no gene *HERC2*, rs1426654 no gene *SLC24A5* e rs16891982 no gene *SLC45A2*; em pacientes com melanoma e indivíduos sem o diagnóstico de melanoma (controles) e verificar se há associação destes com a doença.

### 5.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

a) Verificar a existência de diferença nas frequências alélicas e genotípicas entre casos e controles;

b) Avaliar se a amostra está em equilíbrio de Hardy-Weinberg para os polimorfismos investigados, e comparar as frequências alélicas e genotípicas encontradas com as frequências obtidas pelo projeto CANDELA;

c) Acessar características fenotípicas da amostra e correlacionar a presença de alelos com as características clínicas de apresentação, tais como cor da pele, cabelos e olhos, idade ao diagnóstico, tipo de melanoma, sexo, número de nevos entre outras;

d) Verificar se existe aumento de risco para melanoma através de análise de *Odds ratio* (razão de chances) nos portadores de alelos específicos;

e) Verificar associação de sinergia/epistasia entre os polimorfismos por análise em software MDR – *Multi Dimension Reduction*;

f) Acessar o perfil de ancestralidade da amostra obtido por painel de marcadores informativos de ancestralidade *INDELS*. Verificar a existência de diferença estatística no perfil de ancestralidade entre casos e controles;

g) Correlacionar a presença de alelos específicos com o perfil de ancestralidade. Verificar se os portadores de alelos fixados em diferentes populações possuem perfil de ancestralidade diferente dos não portadores.

## 6 STROBE STATEMENT— checklist of items that should be included in reports of observational studies

	Item No	Recommendation
<b>Title and abstract</b>	1	(a) Indicate the study's design with a commonly used term in the title or the abstract (b) Provide in the abstract an informative and balanced summary of what was done and what was found
<b>Introduction</b>		
<b>Background/rationale</b>	2	Explain the scientific background and rationale for the investigation being reported
<b>Objectives</b>	3	State specific objectives, including any prespecified hypotheses
<b>Methods</b>		
<b>Study design</b>	4	Present key elements of study design early in the paper
<b>Setting</b>	5	Describe the setting, locations, and relevant dates, including periods of recruitment, exposure, follow-up, and data collection
<b>Participants</b>	6	(a) <i>Cohort study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants. Describe methods of follow-up <i>Case-control study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of case ascertainment and control selection. Give the rationale for the choice of cases and controls <i>Cross-sectional study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants (b) <i>Cohort study</i> —For matched studies, give matching criteria and number of exposed and unexposed <i>Case-control study</i> —For matched studies, give matching criteria and the number of controls per case
<b>Variables</b>	7	Clearly define all outcomes, exposures, predictors, potential confounders, and effect modifiers. Give diagnostic criteria, if applicable
<b>Data sources/measurement</b>	8*	For each variable of interest, give sources of data and details of methods of assessment (measurement). Describe comparability of assessment methods if there is more than one group
<b>Bias</b>	9	Describe any efforts to address potential sources of bias
<b>Study size</b>	10	Explain how the study size was arrived at
<b>Quantitative variables</b>	11	Explain how quantitative variables were handled in the analyses. If applicable, describe which groupings were chosen and why
<b>Statistical methods</b>	12	(a) Describe all statistical methods, including those used to control for confounding (b) Describe any methods used to examine subgroups and interactions (c) Explain how missing data were addressed (d) <i>Cohort study</i> —If applicable, explain how loss to follow-up was addressed <i>Case-control study</i> —If applicable, explain how matching of cases and controls was addressed <i>Cross-sectional study</i> —If applicable, describe analytical methods taking account of sampling strategy (e) Describe any sensitivity analyses

<b>Results</b>		
<b>Participants</b>	13*	(a) Report numbers of individuals at each stage of study—eg numbers potentially eligible, examined for eligibility, confirmed eligible, included in the study, completing follow-up, and analysed (b) Give reasons for non-participation at each stage (c) Consider use of a flow diagram
<b>Descriptive data</b>	14*	(a) Give characteristics of study participants (eg demographic, clinical, social) and information on exposures and potential confounders (b) Indicate number of participants with missing data for each variable of interest (c) <i>Cohort study</i> —Summarise follow-up time (eg, average and total amount)
<b>Outcome data</b>	15*	<i>Cohort study</i> —Report numbers of outcome events or summary measures over time <i>Case-control study</i> —Report numbers in each exposure category, or summary measures of exposure <i>Cross-sectional study</i> —Report numbers of outcome events or summary measures
<b>Main results</b>	16	(a) Give unadjusted estimates and, if applicable, confounder-adjusted estimates and their precision (eg, 95% confidence interval). Make clear which confounders were adjusted for and why they were included (b) Report category boundaries when continuous variables were categorized (c) If relevant, consider translating estimates of relative risk into absolute risk for a meaningful time period
<b>Other analyses</b>	17	Report other analyses done—eg analyses of subgroups and interactions, and sensitivity analyses
<b>Discussion</b>		
<b>Key results</b>	18	Summarise key results with reference to study objectives
<b>Limitations</b>	19	Discuss limitations of the study, taking into account sources of potential bias or imprecision. Discuss both direction and magnitude of any potential bias
<b>Interpretation</b>	20	Give a cautious overall interpretation of results considering objectives, limitations, multiplicity of analyses, results from similar studies, and other relevant evidence
<b>Generalisability</b>	21	Discuss the generalisability (external validity) of the study results
<b>Other information</b>		
<b>Funding</b>	22	Give the source of funding and the role of the funders for the present study and, if applicable, for the original study on which the present article is based

\*Give information separately for cases and controls in case-control studies and, if applicable, for exposed and unexposed groups in cohort and cross-sectional studies.

Note: An Explanation and Elaboration article discusses each checklist item and gives methodological background and published examples of transparent reporting. The STROBE checklist is best used in conjunction with this article (freely available on the Web sites of PLoS Medicine at <http://www.plosmedicine.org/>, Annals of Internal Medicine at <http://www.annals.org/>, and Epidemiology at <http://www.epidem.com/>). Information on the STROBE Initiative is available at [www.strobe-statement.org](http://www.strobe-statement.org).

## 7 REFERÊNCIAS

ARMSTRONG, Bruce K.; KRICKERB, Anne. The epidemiology of UV induced skin cancer. **Journal Of Photochemistry And Photobiology B: Biology**, [s.i.], v. 63, p.8-18, ago. 2001.

AUTON, Adam et al. A global reference for human genetic variation. **Nature**, [s.i.], v. 526, n. 7571, p.68-74, 30 set. 2015. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://www.internationalgenome.org/>>. Acesso em: 15 out. 2016.

BAKOS, Lucio et al. Sunburn, sunscreens, and phenotypes: some risk factors for cutaneous melanoma in southern Brazil. **International Journal Of Dermatology**, [s.i.], v. 41, p.557-562, 2002.

BAKOS, Renato M. et al. The CDKN2A p.A148T variant is associated with cutaneous melanoma in Southern Brazil. **Experimental Dermatology**, [s.i.], v. 20, n. 11, p.890-893, 6 set. 2011. Wiley-Blackwell.

BALMAIN, Allan; YUSPA, Stuart H.. Milestones in Skin Carcinogenesis: The Biology of Multistage Carcinogenesis. **Journal Of Investigative Dermatology**, [s.i.], v. 134, p.2-7, out. 2014. Elsevier BV.

BARSH, Gregory S. What Controls Variation in Human Skin Color? **Plos Biology**, [s.i.], v. 1, n. 1, p.019-022, 13 out. 2003. Public Library of Science (PLoS).

BEKKER-JENSEN, Simon et al. HERC2 coordinates ubiquitin-dependent assembly of DNA repair factors on damaged chromosomes. **Nature Cell Biology**, [s.i.], v. 12, p.80-87, jan. 2010.

BISHOP, D Timothy et al. Genome-wide association study identifies three loci associated with melanoma risk. **Nature Genetics**, [s.i.], v. 41, n. 8, p.920-925, 5 jul. 2009. Springer Nature.

BURTON, Kyle A.; ASHACK, Kurt A.; KHACHEMOUNE, Amor. Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: A Review of High-Risk and Metastatic

Disease. **American Journal Of Clinical Dermatology**, [s.l.], v. 17, n. 5, p.491-508, 29 jun. 2016. Springer Nature.

CAMAND, Olivier et al. Mutation Analysis of the Tyrosinase Gene in Oculocutaneous Albinism. **Human Mutation**, [s.l.], v. 409, p.1-6, nov. 2000.

CERQUEIRA, Caio C S et al. Predicting homo pigmentation phenotype through genomic data: From neanderthal to James Watson. **American Journal Of Human Biology**, [s.l.], v. 24, n. 5, p.705-709, 12 mar. 2012. Wiley-Blackwell.

CERQUEIRA, Caio Cesar Silva de et al. Implications of the Admixture Process in Skin Color Molecular Assessment. **Plos One**, [s.l.], v. 9, n. 5, p.1-7, 8 maio 2014. Public Library of Science (PLoS).

CHIANG, Pei-wen; SPECTOR, Elaine; MCGREGOR, Tracy L.. Evidence suggesting digenic inheritance of Waardenburg syndrome type II with ocular albinism. **American Journal Of Medical Genetics Part A**, [s.l.], v. 149, n. 12, p.2739-2744, dez. 2009. Wiley-Blackwell.

CONSORTIUM, Uniprot. UniProt: a hub for protein information. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 43, n. 1, p.204-212, 27 out. 2014. Oxford University Press (OUP). Disponível em: <<http://www.uniprot.org/>>. Acesso em: 12 ago. 2016.

CUBILLOS-ROJAS, M. et al. The E3 Ubiquitin Protein Ligase HERC2 Modulates the Activity of Tumor Protein p53 by Regulating Its Oligomerization. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 289, n. 21, p.14782-14795, 9 abr. 2014. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB).

CUNLIFFE, TIM. Melanoma – Primary Care Dermatology Society, 2012. Disponível em:< <http://www.pcids.org.uk/clinical-guidance/melanoma-an-overview1>>. Acesso em 07 out. 2016.

DERMATOLOGIA, Sociedade Brasileira de. **Calculadora de risco para Câncer de pele**. Disponível em: <<http://www.sbd.org.br/calculadora-de-risco-de-cancer-da-pele/>>. Acesso em: 11 nov. 2016.

DUFFY, D. L.. Interactive effects of MC1R and OCA2 on melanoma risk phenotypes. **Human Molecular Genetics**, [s.l.], v. 13, n. 4, p.447-461, 17 dez. 2003. Oxford University Press (OUP).

DUFFY, David L. et al. Multiple Pigmentation Gene Polymorphisms Account for a Substantial Proportion of Risk of Cutaneous Malignant Melanoma. **Journal Of Investigative Dermatology**, [s.l.], v. 130, n. 2, p.520-528, fev. 2010. Elsevier BV.

DURSO, Danielle Fernandes et al. Association of Genetic Variants with Self-Assessed Color Categories in Brazilians. **Plos One**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.1-8, 8 jan. 2014. Public Library of Science (PLoS).

EIBERG, Hans et al. Blue eye color in humans may be caused by a perfectly associated founder mutation in a regulatory element located within the HERC2 gene inhibiting OCA2 expression. **Human Genetics**, [s.l.], v. 123, n. 2, p.177-187, 3 jan. 2008. Springer Nature.

ERDMANN, Friederike et al. International trends in the incidence of malignant melanoma 1953-2008-are recent generations at higher or lower risk? **International Journal Of Cancer**, [s.l.], v. 132, n. 2, p.385-400, 21 maio 2012. Wiley-Blackwell.

FERNANDEZ, L.p. et al. SLC45A2: a novel malignant melanoma-associated gene. **Human Mutation**, [s.l.], v. 29, n. 9, p.1161-1167, set. 2008. Wiley-Blackwell.

FITZPATRICK, Thomas B.. The Validity and Practicality of Sun-Reactive Skin Types I Through VI. **Archives Dermatology**, [s.i.], v. 124, p.869-871, jun. 1988.

FU, Teresa; AASI, Sumaira Z.; HOLLMIG, S. Tyler. Management of High-Risk Squamous Cell Carcinoma of the Skin. **Current Treatment Options In Oncology**, [s.l.], v. 17, n. 7, p.1-15, 4 jun. 2016. Springer Nature.

FUKAMACHI, Shoji; SHIMADA, Atsuko; SHIMA, Akihiro. Mutations in the gene encoding B, a novel transporter protein, reduce melanin content in medaka. **Nature Genetics**, [s.l.], v. 28, n. 4, p.381-385, 1 ago. 2001. Springer Nature.

GARBE, Claus; LEITER, Ulrike. Melanoma epidemiology and trends. **Clinics In Dermatology**, [s.l.], v. 27, n. 1, p.3-9, jan. 2009. Elsevier BV.

GARCIA-GONZALO, F. R.; ROSA, J. L.. The HERC proteins: functional and evolutionary insights. **Cellular And Molecular Life Sciences**, [s.l.], v. 62, n. 16, p.1826-1838, 17 jun. 2005. Springer Nature.

GIARDINA, Emiliano et al. Haplotypes in SLC24A5 Gene as Ancestry Informative Markers in Different Populations. **Current Genomics**,[s.i.], v. 9, p.110-114, ago. 2008.

GINGER, R. S. et al. SLC24A5 Encodes a trans-Golgi Network Protein with Potassium-dependent Sodium-Calcium Exchange Activity That Regulates Human Epidermal Melanogenesis. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 283, n. 9, p.5486-5495, 11 dez. 2007. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB).

GRAF, Justin; HODGSON, Richard; VAN DAAL, Angela. Single nucleotide polymorphisms in theMATP gene are associated with normal human pigmentation variation. **Human Mutation**, [s.l.], v. 25, n. 3, p.278-284, 2005. Wiley-Blackwell.

GREAVES, M.. Was skin cancer a selective force for black pigmentation in early hominin evolution? **Proceedings Of The Royal Society B: Biological Sciences**, [s.l.], v. 281, n. 1781, p.1-10, 26 fev. 2014. The Royal Society.

GREENWALD, Holly S.; FRIEDMAN, Erica B.; OSMAN, Iman. Superficial spreading and nodular melanoma are distinct biological entities. **Melanoma Research**, [s.l.], v. 22, n. 1, p.1-8, fev. 2012. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health).

GUDBJARTSSON, Daniel F et al. ASIP and TYR pigmentation variants associate with cutaneous melanoma and basal cell carcinoma. **Nature Genetics**, [s.l.], v. 40, n. 7, p.886-891, 18 maio 2008. Springer Nature.

GUEDJ, Mickaël et al. Variants of theMATP/SLC45A2gene are protective for melanoma in the French population. **Human Mutation**, [s.l.], v. 29, n. 9, p.1154-1160, set. 2008. Wiley-Blackwell.

HAN, Jiali et al. A Genome-Wide Association Study Identifies Novel Alleles Associated with Hair Color and Skin Pigmentation. **Plos Genetics**, [s.l.], v. 4, n. 5, p.1-11, 16 maio 2008. Public Library of Science (PLoS).

HARADA, M et al. Melanoma-Reactive CD8+ T cells recognize a novel tumor antigen expressed in a wide variety of tumor types. **Journal Of Immunotherapy**, [s.i.], v. 4, p.323-333, ago. 2001.

HARLALKA, Gaurav V et al. Mutation of HERC2 causes developmental delay with Angelman-like features. **Journal Of Medical Genetics**, [s.l.], v. 50, n. 2, p.65-73, 14 dez. 2012. BMJ.

HOUGHTON, Alan N . et al. PHENOTYPIC HETEROGENEITY OF MELANOMA. **The Journal Of Experimental Medicine: Jem**, [s.i.], p.812-829, mar. 1987.

HOWLADER, N. et al. **SEER Cancer Statistics Review, 1975-2013**. 2015. Elaborado por Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, Bishop K, Altekruse SF, Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds).. Disponível em: <[http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2013/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2013/)>. Acesso em: 15 ago. 2016.

IBARROLA-VILLAVA, Maider et al. Genetic analysis of three important genes in pigmentation and melanoma susceptibility: CDKN2A, MC1R and HERC2/OCA2. **Experimental Dermatology**, [s.l.], v. 19, n. 9, p.836-844, 12 ago. 2010. Wiley-Blackwell.

JABLONSKI, N. G.; CHAPLIN, G.. Human skin pigmentation as an adaptation to UV radiation. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 107, n. 2, p.8962-8968, 5 maio 2010. Proceedings of the National Academy of Sciences.

JIN, Ying et al. Genome-wide association analyses identify 13 new susceptibility loci for generalized vitiligo. **Nature Genetics**, [s.l.], v. 44, n. 6, p.676-680, 6 maio 2012. Springer Nature.

KALAHROUDI, Vadiéh Ghodsinejad et al. Two Novel Tyrosinase (TYR) Gene Mutations with Pathogenic Impact on Oculocutaneous Albinism Type 1 (OCA1). **Plos One**, [s.l.], v. 9, n. 9, p.1-10, 12 set. 2014. Public Library of Science (PLoS).

KASPER, Maria et al. Basal cell carcinoma — molecular biology and potential new therapies. **Journal Of Clinical Investigation**, [s.l.], v. 122, n. 2, p.455-463, 1 fev. 2012. American Society for Clinical Investigation.

KAYSER, Manfred et al. Three Genome-wide Association Studies and a Linkage Analysis Identify HERC2 as a Human Iris Color Gene. **The American Journal Of Human Genetics**, [s.l.], v. 82, n. 2, p.411-423, fev. 2008. Elsevier BV.

KERSEY, Paul Julian et al. Ensembl Genomes 2016: more genomes, more complexity. **Nucleic Acids Res**, [s.l.], v. 44, n. 1, p.574-580, 17 nov. 2015. Oxford University Press (OUP). Disponível em: <<http://www.ebi.ac.uk/>>. Acesso em: 25 out. 2016.

KESMINIENE, Ausrele; SCHÜZ, Joachim. Radiation: ionizing, ultraviolet, and electromagnetic: Ultraviolet radiation. In: STEWART, Bernard W.; WILD, Christopher P.. **World Cancer Report 2014**. Lyon: International Agency For Research On Cancer, 2014. p. 143-150.

KWASNIAK, Laura A.; GARCIA-ZUAZAGA, Jorge. Basal cell carcinoma: evidence-based medicine and review of treatment modalities. **International Journal Of Dermatology**, [s.l.], v. 50, p.545-568, mar. 2011.

KYPREOU, Katerina P. et al. Prediction of Melanoma Risk in a Southern European Population Based on a Weighted Genetic Risk Score. **Journal Of Investigative Dermatology**, [s.l.], v. 136, n. 3, p.690-695, mar. 2016. Elsevier BV.

LAMASON, R. L.. SLC24A5, a Putative Cation Exchanger, Affects Pigmentation in Zebrafish and Humans. **Science**, [s.l.], v. 310, n. 5755, p.1782-1786, 16 dez. 2005. American Association for the Advancement of Science (AAAS).

LEITE, Tailce K. M. et al. Genomic Ancestry, Self-Reported “Color” and Quantitative Measures of Skin Pigmentation in Brazilian Admixed Siblings. **Plos One**, [s.l.], v. 6, n. 11, p.1-9, 2 nov. 2011. Public Library of Science (PLoS).

LEK, Monkol et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. **Nature**, [s.l.], v. 536, n. 7616, p.285-291, 17 ago. 2016. Springer Nature.

LIAN, Christine Guo; MIHM JUNIOR, Martin C.. Skin Cancer: Cutaneous Melanoma. In: LYON. BERNARD W. STEWART. (Comp.). **World Cancer Report 2014**. Lyon: International Agency For Research On Cancer, 2014. p. 495-502.

LIN, Jennifer Y.; FISHER, David E.. Melanocyte biology and skin pigmentation. **Nature**, [s.l.], v. 445, n. 22, p.843-850, fev. 2007.

LONDON, University College et al. **CANDELA - Consortium for the Analysis of the Diversity and Evolution of Latin America**. Disponível em: <<https://www.ucl.ac.uk/candela>>. Acesso em: 16 abr. 2015.

LÓPEZ, Saioa et al. The Interplay between Natural Selection and Susceptibility to Melanoma on Allele 374F of SLC45A2 Gene in a South European Population. **Plos One**, [s.l.], v. 9, n. 8, p.1-13, 5 ago. 2014. Public Library of Science (PLoS). .

LÓPEZ, Saioa; ALONSO, Santos. Evolution of Skin Pigmentation Differences in Humans. **Els**, [s.l.], p.1-9, 16 jun. 2014. Wiley-Blackwell.

LUIZ, Olinda C.; GIANINI, Reinaldo. J.; GONÇALVES, Fernanda. T. et al. Ethnicity and Cutaneous Melanoma in the City of São Paulo, Brazil: A Case-Control Study. **Plos One**, v.7, edição 4, p. 1-7, abril, 2012.

MACKIE, Rm. The pathogenesis of cutaneous malignant melanoma. **British Medical Journal**, [s.l.], p.1568-1569, nov. 1983.

MAURI, Lucia et al. SLC45A2 mutation frequency in Oculocutaneous Albinism Italian patients doesn't differ from other European studies. **Gene**, [s.l.], v. 533, n. 1, p.398-402, jan. 2014. Elsevier BV.

MCEVOY, B.. The genetic architecture of normal variation in human pigmentation: an evolutionary perspective and model. **Human Molecular Genetics**, [s.l.], v.15, n. 2, p.176-181, 15 out. 2006. Oxford University Press (OUP).

MILLER, Arlo J.; MIHM, Martin C.. Melanoma. **New England Journal Of Medicine**, [s.l.], v. 355, n. 1, p.51-65, 6 jul. 2006. New England Journal of Medicine (NEJM/MMS).

MONTOLIU, L; OETTING, Ws; BENNETT, Dc. **Color Genes**. European Society for Pigment Cell Research. World Wide Web. Disponível em: <<http://www.espcr.org/micemut>>. Acesso em: 02 de junho de 2016.

MORICE-PICARD, Fanny; LASSEAUX, Eulalie; FRANÇOIS, Stéphane et al. *SLC24A5* Mutations Are Associated with Non-Syndromic Oculocutaneous Albinism. **Journal of Investigative Dermatology**, v.134, p. 568-571, 2014.

NAN, Hongmei et al. Genetic variants in pigmentation genes, pigmentary phenotypes, and risk of skin cancer in Caucasians. **International Journal Of Cancer**, [s.l.], v. 125, n. 4, p.909-917, 15 ago. 2009. Wiley-Blackwell.

NEWTON, J. M. et al. Mutations in the Human Orthologue of the Mouse underwhite Gene (uw) Underlie a New Form of Oculocutaneous Albinism, OCA4. **The American Society Of Human Genetics**, [s.i.], v. 69, p.981-988, ago. 2001.

NORDLUND, James. Sunscreens and Sun Protection. In: NORDLUND, James. **Vitiligo: A Monograph on the Basic and Clinical Science**. [s.i.]: Wiley, 1998. p. 218-221.

NORTON, H. L. et al. Genetic Evidence for the Convergent Evolution of Light Skin in Europeans and East Asians. **Molecular Biology And Evolution**, [s.l.], v. 24, n. 3, p.710-722, 5 dez. 2006. Oxford University Press (OUP).

PARKIN, D. M. et al. **Cancer Incidence in Five Continents**. 8. ed. Lyon: International Agency For Research On Cancer, 2002. 831 p.

PARRA, Esteban J.. Human pigmentation variation: Evolution, genetic basis, and implications for public health. **American Journal Of Physical Anthropology**, [s.l.], v. 134, n. 45, p.85-105, 2007. Wiley-Blackwell.

PINTO, Rosamaria et al. The next generation of metastatic melanoma: uncovering the genetic variants for anti-BRAF therapy response. **Oncotarget**, [s.l.], v. 7, n. 18, p.25135-25149, fev. 2016.

PUFFENBERGER, Erik G. et al. A homozygous missense mutation inHERC2associated with global developmental delay and autism spectrum disorder. **Human Mutation**, [s.l.], v. 33, n. 12, p.1639-1646, 12 nov. 2012. Wiley-Blackwell.

QUILLEN, Ellen E.; SHRIVER, Mark D.. Unpacking Human Evolution to Find the Genetic Determinants of Human Skin Pigmentation. **Journal Of Investigative Dermatology**, [s.l.], v. 131, p.5-7, nov. 2011. Elsevier BV.

RANSOHOFF, Katherine J. et al. Familial skin cancer syndromes. **Journal Of The American Academy Of Dermatology**, [s.l.], v. 74, n. 3, p.423-434, mar. 2016. Elsevier BV.

SCHWERTMAN, Petra; BEKKER-JENSEN, Simon; MAILAND, Niels. Regulation of DNA double-strand break repair by ubiquitin and ubiquitin-like modifiers. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s.l.], v. 17, n. 6, p.379-394, 23 maio 2016. Springer Nature.

SILVA, Ministério da Saúde Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da et al. **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Coordenação de Prevenção e Vigilância, 2015. 122 p.

SMITH, Michael W. et al. A High-Density Admixture Map for Disease Gene Discovery in African Americans. **The American Society Of Human Genetics**, [s.l.], v. 74, p.1001-1013, abr. 2004.

SOEJIMA, Mikiko; KODA, Yoshiro. Population differences of two coding SNPs in pigmentation-related genes SLC24A5 and SLC45A2. **International Journal Of Legal Medicine**, [s.l.], v. 121, n. 1, p.36-39, 18 jul. 2006. Springer Nature.

SOURA, Efthymia et al. Hereditary melanoma: Update on syndromes and management. **Journal Of The American Academy Of Dermatology**, [s.l.], v. 74, n. 3, p.411-420, mar. 2016. Elsevier BV.

STACEY, Simon N et al. New common variants affecting susceptibility to basal cell carcinoma. **Nature Genetics**, [s.l.], v. 41, n. 8, p.909-914, 5 jul. 2009. Springer Nature.

STURM, Richard A.; LARSSON, Mats. Genetics of human iris colour and patterns. **Pigment Cell & Melanoma Research**, [s.l.], v. 22, n. 5, p.544-562, out. 2009. Wiley-Blackwell.

STURM, Richard A.; TEASDALE, Rohan D.; BOX, Neil F.. Human pigmentation genes: identification, structure and consequences of polymorphic variation. **Gene** **277**, [s.i.], p.49-62, ago. 2001.

SUDMANT, Peter H. et al. An integrated map of structural variation in 2,504 human genomes. **Nature**, [s.l.], v. 526, n. 7571, p.75-81, 30 set. 2015. Nature Publishing Group.

SULEM, Patrick et al. Genetic determinants of hair, eye and skin pigmentation in Europeans. **Nature Genetics**, [s.l.], v. 39, n. 12, p.1443-1452, 21 out. 2007. Springer Nature.

TOY, Eugene C.; LIU, Terrence H.; CAMPBELL, Andre R. Case Files Surgery. 4ª edição. Estados Unidos: McGraw-Hill, 2012. 522 p.

VULTUR, Adina; HERLYN, Meenhard. SnapShot: Melanoma. **Cancer Cell**, [s.l.], v.23, n.5, p.706-706, maio 2013. Elsevier BV.

WALKOWICZ, M et al. Molecular characterization of radiation- and chemically induced mutations associated with neuromuscular tremors, runting, juvenile lethality,

and sperm defects in jdf2 mice. **Mammalian Genome**, [s.l.], v. 10, p.870-878, set. 1999.

WEI, Ai-hua et al. Exome Sequencing Identifies SLC24A5 as a Candidate Gene for Nonsyndromic Oculocutaneous Albinism. **Journal Of Investigative Dermatology**, [s.l.], v. 133, n. 7, p.1834-1840, jul. 2013. Elsevier BV.

WU, W. et al. HERC2 Is an E3 Ligase That Targets BRCA1 for Degradation. **Cancer Research**, [s.l.], v. 70, n. 15, p.6384-6392, 14 jul. 2010. American Association for Cancer Research (AACR).

YAMAGUCHI, Y.; HEARING, V. J.. Melanocytes and Their Diseases. **Cold Spring Harbor Perspectives In Medicine**, [s.l.], v. 4, n. 5, p.1-19, 1 maio 2014. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

YUASA, I. et al. Distribution of the F374 Allele of the SLC45A2 (MATP) Gene and Founder-Haplotype Analysis. **Annals Of Human Genetics**, [s.l.], v. 70, n. 6, p.802-811, nov. 2006. Wiley-Blackwell.

ZHANG, M. et al. Genome-wide association studies identify several new loci associated with pigmentation traits and skin cancer risk in European Americans. **Human Molecular Genetics**, [s.l.], v. 22, n. 14, p.2948-2959, 1 abr. 2013. Oxford University Press (OUP).

**8 ARTIGO**

O artigo será submetido para a revista *Journal of Investigative Dermatology*.

**Skin pigmentation polymorphisms are associated with increased risk of Melanoma in individuals from the Southern of Brazil.**

Larissa Brussa Reis<sup>1,2</sup>, Fernanda Sales Luiz Vianna<sup>1,3</sup>, Renato Bakos<sup>2,4</sup>, Vanessa Cristina Jacovas<sup>5</sup>, Gabriel de Souza Macedo<sup>1</sup>, Sidney Santos<sup>6</sup>, Patrícia Ashton-Prolla<sup>1-3\*</sup>

<sup>1</sup>Experimental Research Service, Laboratory of Genomics Medicine, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil.

<sup>2</sup>Post-graduate program in Medical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

<sup>3</sup>Post-graduate program in Genetics and Molecular Biology, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

<sup>4</sup>Dermatology Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil.

<sup>5</sup>Department of Genetics, Biosciences Institute, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

<sup>6</sup>Laboratory of Human and Medical Genetics, Federal University of Pará (UFPA), Belém, Pará, Brazil

\*Corresponding author.

## Abstract

Melanoma is a complex disease, associated with several environmental and genetic risk factors. It is the most aggressive type of skin cancer and originates in melanocytes the pigment producing skin cells. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in pigmentation genes have been described in melanoma risk modulation but our knowledge in the field is still limited. Here, we assessed the effect of SNPs in four pigmentation genes – *TYR* (rs1126809), *HERC2* (rs1129038), *SLC24A5* (rs1426654), and *SLC45A2* (rs16891982) on melanoma risk using multivariate logistic regression and a multifactorial reduction (MDR) analysis, in a case-control approach. In 255 individuals (120 melanoma patients and 135 controls) from Southern Brazil, we identified an association of melanoma with three of the four SNPs studied (*HERC2* rs1129038,  $P=0.017$ ; *SLC24A5* rs1426654,  $P<0.001$ ; and *SLC45A2* rs16891982,  $P=0.002$ ). In addition, the interaction between rs1426654 and rs16891982 (AA and GG genotypes, respectively) significantly increased the risk of melanoma [OR = 6.936 (CI 95%: 1.607 – 50.294),  $P= 0.022$ ] in both MRD and multivariate logistic regression analyses. Our results contribute to the current knowledge indicating that SNPs in pigmentation genes contribute to the risk of melanoma.

**Key words:** Melanoma, Skin Pigmentation, Genetic polymorphisms.

## Introduction

Melanoma is the most aggressive skin tumor, and its incidence has been correlated with latitude of residence occurring most frequently in fair skinned individuals (Bishop *et al.*, 2007; Yamaguchi and Hearing, 2014). Thus, the risk of developing melanoma varies markedly according to skin pigmentation and the geographical area, mostly because skin penetrant ultraviolet radiation is one of the major risk factors for the disease (Armstrong *et al.*, 2001; Chang *et al.*, 2009; Lian; Mihm Junior, 2014). Currently, Australia and New Zealand have the highest incidence and mortality rates of melanoma in the world. In those two countries, the risk of developing melanoma before the age of 75 is 1 in 24 for males and 1 in 34 for females (Erdmann *et al.* 2012)

In Brazil, melanoma represents 4% of all skin cancers. The national estimative for 2016 is 5,670 new cases of melanoma, and the highest incidence rates per region are predicted for Southern Brazil reaching 8/100,000 individuals (Silva *et al.*, 2016). The higher incidence rates in the South can be attributed to the geographical location – the southernmost state of Brazil, Rio Grande do Sul has almost the same latitude as Australia (30.0346° S, 51.2177° W) and to the significant contribution of Europeans to the population (Lando *et al.*, 1992; Pesavento, 2014; Bakos, *et al.*, 2011).

Approximately 5% to 10% of melanomas are caused by germline mutations in cancer predisposition genes including *CDKN2A*, *CDK4*, *TERT*, *MITF*, *BAP1*, among others (Ransohoff *et al.*, 2016; Saura *et al.*, 2016). However, in the majority of the diagnosed melanomas, highly penetrant germline mutations are not identified and the development of the tumor is associated with somatic mutations in multiple genes. Driver somatic mutations in several genes have been described in association with the development of melanoma, including mutations in *MITF*, *PIK3CA*, *KIT*, *CTLA4*, *BRAF*, *MGMT* and *MC1R* (Pinto *et al.*, 2016). In addition, there is evidence for the contribution of single nucleotide polymorphisms (SNP) as modifiers of the phenotype. Several SNPs have been proposed as risk modulators for melanoma (Box *et al.*, 2001; Bishop *et al.*, 2009, Gibbs *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2013). Interestingly, some of these SNPs are located in genes of the melanogenic pathway and have been

identified in association with melanoma in diverse populations across the world, including *MC1R*, *TYR* and *SLC45A2* (Duffy, et al., 2010; Helsing *et al.*, 2012; Amos, 2011).

The aim of this study is to assess the association of SNPs in four genes involved in the pigmentation pathway and evaluated in Southern Brazil population by CANDELA Project (*TYR*, *HERC2*, *SLC24A5* and *SLC45A2*) with melanoma, in a geographical region of high incidence rates of the disease.

## Results

Demographic and clinical information of the 255 individuals included in this study are summarized in Table 1. Most of the recruited individuals were female and were above the age of 50 years at recruitment. A very high proportion (96.1%) had a white constitutive skin color before sun exposure - I, II and III skin types. Among melanoma patients, the average age at diagnosis was 53.72 years ( $SD \pm 15.5$ ) and 23.5% had *in situ* tumors or tumors confined to the epidermis (Balch *et al.*, 2009; NCCN Guidelines, 2016). The most common histological subtype observed was superficial spreading (Table 2). Regarding ancestry, a trihybrid ancestry profile was observed with a very significant contribution of Europeans. The proportion of African and Native-American markers was very small. There was no statistically significant difference between ancestry profiles in cases and controls (Table 1). However, carriers of fixed alleles in European populations had a different ancestry profile when compared to non carriers ( $P < 0.001$ ).

## Genotyping

All SNPs studied were in Hardy-Weinberg equilibrium and the minor allele frequencies (MAFs) of rs1126809, rs1426654 and rs16891982 were in agreement with the global MAF reported in the Exome Aggregation Consortium (ExAC) and 1000 genomes databases. A statistically significant difference in genotypic and allelic frequencies of cases and controls was observed for SNPs rs142654, rs16891982 and rs1129038 (Table 3).

### Genetic variants and skin pigmentation

The behavior of SNPs in the skin pigmentation determination was evaluated. Details from the comparative data on the association between genotypic frequencies and skin pigmentation parameters in cases and controls are shown in Table S1. Just only the SNP rs1126809 *TYR* did not have association with pigimentary characteristics (except for association with darkness hair, in cases sample,  $P=0.0018$ ). All the other SNPs demonstrated association between specific genotypes and phenotypical differences. The SNP *HERC2* rs1129038 has the larger number of associations. The GG genotype was more frequent in individuals with light skin and eyes and blond hair, both in cases and controls ( $P<0.001$  for all analysis). The SNP *SLC24A5* rs1426654 was associated with lighter skin and eyes, just in the control group ( $P=0.0017$ ). The SNP *SLC45A2* rs16891982 showed the GG genotype more frequent in light skin and hair (red, blond and light brown) both in cases and controls groups ( $P>0.001$  and  $P=0.008$ ;  $P<0.001$  and  $P=0.004$ , for cases and controls, respectively). The same genotype was associated with light eyes, but just among cases group ( $P<0.001$ ).

### Genetic variants as risk factors for melanoma

Three of the four SNPs studied were associated with melanoma. The rs1129038 GG and rs16891982 GG genotypes, as well as the presence of at least one rs1426654 G allele were more frequently observed in cases than controls ( $P=0.0017$ ,  $P=0.002$ , and  $P<0.001$ , respectively). When adjusting for considerable risk factors (sex, age, eye color, skin type and number of nevi) the contribution of these genotypes in association with melanoma remained strong, suggesting that may be an independent increment in risk associated with these genotypes. The odds ratios (OR) for melanoma associated with each of the possible genotypes are presented in Table 4. The most significant odds ratios were those observed for *SLC24A5* rs1426654 genotype AA [OR = 6.018 (95% confidence interval: 1.848 - 27.744),  $P=0.007$ ] and for *SLC45A2* rs16891982 genotype GG [OR = 2.068 (95% CI: 1.031 - 4.278),  $P=0.044$ ]. The most significant risk, an OR= 6.936 (95% CI: 1.607 - 50.294;  $P=0.022$ ) was observed with the presence of genotypes *SLC24A5* rs1426654 genotype AA

and *SLC45A2* rs16891982 GG, indicating a possible interaction between these two genes in melanoma (Table 5). Further analyses using the bivariate model MDR showed synergistic gene–gene interaction specifically for the rs1426654 AA and rs16891982 GG genotypes ( $P < 0.001$ ) (Figure 1).

## Discussion

In this study the frequencies of four SNPs present in genes involved in the determination of human pigmentation were analyzed in patients with melanoma and controls from southern Brazil (Rio Grande do Sul State, RS), a region with a high incidence of this disease. We corroborate the association of some genotypes with features of light pigmentation, more frequently observed in European descendents, and we identified the association of two genotypes with higher risk for the development of melanoma.

Pigmentation is a polygenic trait, and several variants have been identified that affect melanin levels (Sturm *et al.*, 2009). Three of the four SNPs investigated - *TYR* rs1126809, *SLC24A5* rs1426654 and *SLC45A2* rs16891982 - are present in genes involved in the synthesis of melanosomes - the vesicles where melanin production and deposition occurs - and their precursors. These polymorphisms have an important role in the determination of light pigmentation in European individuals (Sulem *et al.*, 2007; Norton *et al.*, 2006), and demonstrated at least one association with the pigmentation characteristics investigated in our sample. The vast majority of the individuals investigated here had fair skin, which is in agreement with the result observed in the evaluation of ancestry, which proved to be predominantly European. The same association of European ancestry and fair skin, eyes and hair was previously demonstrated in a sample of 1594 individuals from the same geographic region of the present study (Ruiz-Linares *et al.*, 2014).

This result is not representative of the tri-hybrid pattern of Brazilian miscegenation, but reflects the contribution of mass colonization by Europeans in the state of Rio Grande do Sul (Pesavento, 2014). Data from the CANDELA consortium, which investigated individuals from the RS population, show a somewhat lower proportion of European ancestry than observed here, about 85% (Cerqueira *et al.*, 2014).

Similarly, two other studies with individuals from the capital of RS report proportions of European ancestry of 82% and 79.5% (Ruiz-Linares *et al.*, 2014; Pena *et al.*, 2011). Although in Brazil a great contribution of European heritage is observed. However, the geographic distribution the different ancestral populations identified in ancestry studies is heterogeneous, with the highest percentages of Eurodescendants seen in the south of the country, Afrodescendants in the Northeast and Amerindians in the North and Northwest (Manta *et al.*, 2013; Maciel *et al.*, 2007) The different percentages of ancestry found among Brazilian regions can be attributed to the miscigenation and immense territorial extension of the country, which resulted in different colonization processes and specific ancestral contributions even among populations of neighboring regions (Santos *et al.*, 2015). Just as there are regional differences in the proportions of ancestral populations, we also expect heterogeneity in the frequency of genetic variants of specific genes, especially those related to skin, eyes and hair pigmentation.

The non-synonymous SNP *TYR* rs1126809 (p.Arg402Gln) has been previously associated with light pigmentation of the skin, and is frequent in Caucasians. Its presence results in the reduction of the activity of tyrosinase, the key enzyme in the first step of the melanin production pathway, and some authors have postulated that this SNP could be directly related to an increased risk for the occurrence of melanoma, which was actually observed in two studies, one with European individuals and the other with Australians (Nan *et al.*, 2009, Gudbjartsson *et al.*, 2008, Bishop, *et al.*, 2009). In the present study, we did not observe a consistent association of this SNP with pigmentation nor with risk for melanoma.

SNP rs1129038, which occurs in the non-coding region 3'UTR of the *HERC2* gene was previously associated with light pigmentation and with Vitiligo (Jin *et al.*, 2012; Eiberg *et al.*, 2008). In a study of blue-eyed Brazilians, this SNP was also associated with this phenotypic characteristic (Freire-Aradas *et al.*, 2014). More recently, its association with light hair pigmentation in a European sample was described (Söchtig *et al.*, 2001). Our results demonstrate an association of this SNP with lighter pigmentation of the skin, eyes and hair corroborating previous studies.

Finally, SNPs *SLC24A5* rs1426654 and *SLC45A2* rs16891982 were shown to be associated with light pigmentation (skin, eyes and hair) and also risk for melanoma. The *SLC24A5* missense variant rs1426654 (p.Ala111Thr) was first described in the zebrafish model, as responsible for the golden phenotype, resulting from a delay in melanin production during embryonic fish development (Lamason *et al.*, 2005). It has also been shown in melanocyte cultures that the homozygous C leads to an increase in *SLC24A5* gene transcripts and a consequent increase in tyrosinase activity and melanin production (Cook *et al.*, 2009). The decrease in the frequency of the C allele is gradual from Africa to Europe, indicating that the selection pressure of the A allele acts on the determination of the clear skin in places where the intensity of UV radiation is lower (Lamason *et al.*, 2005; Sabeti *et al.*, 2007, Canfield *et al.*, 2014). Evidence for natural selection makes this SNP a frequent component of ancestral informative panels and informative phenotype markers (Giardina *et al.*, 2008). In our study, we confirmed the association of the AA genotype with fair skin and light eyes, and identified allelic frequencies consistent with the frequencies observed in European populations (Lian; Mihm Junior, 2014; Auton, 2015) and in previous studies with Brazilians from other regions (Durso *et al.*, 2013, Lima; Gonçalves; Fridman, 2015). SNP *SLC45A2* rs16891982 is also widely studied as to its relationship with pigmentation in different populations. The *SLC45A2* gene encodes the MATP carrier protein involved in melanin synthesis and experimental studies in zebrafish, mice and yeast have clearly demonstrated that the presence of the missense variant rs16891982 (p.Phe374Leu) results in a decrease in the activity of this protein (Fukamachi *et al.*, 2001; Reinders & Ward, 2015). This SNP is also considered an ancestry informative marker (AIM) to differentiate European populations, because the frequency of the 374Phe allele is similar to that of the *SLC24A5* 111Ala allele and both are under strong positive selection in Europeans (Soejima & Koda, 2007). Corroborating with the theory of vitamin D synthesis, which proposes that light skin is a feature selected to compensate for the lower solar incidence in populations living far from the Equator (Jablonski & Chaplin, 2010), it has been demonstrated that in African populations, located 16 degrees latitude below Equator, the 374Leu allele is fixed (Lucotte & Yuasa, 2013). In our sample, the homozygous genotype for the *SLC45A2* G allele was more frequent among individuals with light pigmentation characteristics in the skin, eyes and hair and allelic frequencies were similar to those found in Europeans (Yuasa *et al.*, 2006).

Although all SNPs associated with light pigmentation were also associated with melanoma, this result changed after analysis with multivariate logistic regression, adjusted for the risk factors gender, age, eye hair, and skin color, and number of Nevi. We considered this analysis essential to identify whether the variants studied could be considered independent risk factors for the occurrence of melanoma. Thus, with this evaluation, only SNPs *SLC24A5* rs1426654 and *SLC45A2* rs16891982 remained strongly associated with risk for the development of melanoma. The homozygous genotypes of the variant alleles of both SNPs (AA for rs1426654 and GG for rs16891982, considered as the determinant alleles of fair skin in Europeans), were related to the greatest increase in risk. As expected, the ancestral profile of the carriers of these genotypes was different from the non-carrier profile, with a higher proportion of European ancestry among carriers.

When we performed an interaction analysis between SNPs *SLC24A5* rs1426654 and *SLC45A2* rs16891982, the combination of homozygous genotypes showed a significant increased risk for melanoma. The independent effects of each of the SNPs were also compared to the interaction of both by a second analysis (MDR), corroborating the interaction results obtained through logistic regression. The detailed analysis showed that *SLC24A5* rs1426654 had the highest odds ratio for melanoma, but together, the two polymorphisms presented a strong linear interaction, negative syntropy and redundant entropy, suggesting a joint action for the increased risk for melanoma. Although an association between SNP rs16891982 and melanoma has been previously described in Europeans (its protection-related CG and CC genotypes), this is the first study to verify an association of genetic variants in genes related to pigmentation and risk for melanoma in Southern Brazil (Fernandez *et al.*, 2008, Guedj *et al.*, 2008, Barrett *et al.* 2012; Amos *et al.*, 2013; Stefanaki *et al.*, 2013).

In conclusion, the results of this study confirm that the same variants involved in the determination of light pigmentary characteristics in Europeans act to define pigmentation in individuals from southern Brazil and demonstrate that some SNPs in genes related to pigmentation confer an independent increase in risk for melanoma in the same region. Additional studies should be performed to verify whether the

same genetic variants confer risk for the development of melanoma in other regions of Brazil and Latin America.

## Materials and Methods

### Samples and genotyping

This case-control study was conducted at a public University Hospital, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) in Southern Brazil and was approved by the Institutional Ethics Committee. Overall, 255 unrelated individuals were recruited for the study between September 2007 and November 2008. All participants were born in the State of Rio Grande do Sul, the southernmost State of Brazil. Of these, 120 had been diagnosed with melanoma and 135 were patients that visited the dermatology clinic in the same institution for cancer-unrelated skin problems. Among the 120 melanoma cases, 19 had a family history of melanoma and/or multiple melanomas. None of the individuals included in the control group reported a family history of the disease. Demographic variables, pigmentation traits (eye and hair color), skin phototype, tanning ability, and clinical information were documented after a dermatologic evaluation, in both cases and controls. Genomic DNA was obtained from peripheral blood using the 'salting out' method (Miller et al., 1998) and concentration and purity were determined using a NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, USA). All samples were genotyped for four SNPs in pigmentation-related genes: rs1126809 (*TYR*), rs1129038 (*HERC2*), rs1426654 (*SLC24A5*) and rs16891982 (*SLC45A2*) (Cerqueira *et al.*, 2014). Genotyping was performed using Human Custom TaqMan® SNP Genotyping Assays 40X (Applied Biosystems, USA; Assay IDs: AHBKFKH; C\_48033-10; C\_2908190\_10; C\_2842665\_10, respectively). Allelic specific probes were used as follows: the rs1126809 in exon 6 of *TYR* gene (c.1205G>A, p.Arg402Gln); the rs1129038, an intronic variant 3'UTR of *HERC2* gene; the rs1426654 in exon 3 of *SLC45A4* gene (c.331A>G p.Thr111Ala) and the rs16891982 in exon 5 of *SLC45A2* gene (c.1122C>G p.Phe374Leu). These four SNPs were selected based on the results of the Consortium for the Analysis of the Diversity and Evolution of Latin America (CANDELA, <http://www.ucl.ac.uk/silva/candela>), the largest study on morphologic diversity of Latin American populations published to date (Cerqueira *et*

*al.* 2014). The molecular reactions were conducted using 20 ng of genomic DNA in a StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA). Allelic discrimination and analysis was performed using the TaqMan® Genotyper Software v.2.2.

## Ancestry analysis

Since admixed population structure is a well-known confounding factor in association studies, ancestry profiles of all individuals recruited was evaluated using a panel containing 61 biallelic validated short insertion/deletion polymorphisms (INDELs) (Ramos et al., 2016). Of these, 48 were previously published by Santos et al., 2010.

## Statistical analysis

Genotype and allele frequencies were obtained by simple counting. Differences between groups were compared using Pearson's chi square or Fisher's exact tests. All tests were two-tailed and significance level was set at 0.05. Mann-Whitney U Test was performed to compare the ancestry profiles between cases and controls, between the five skin types and between carriers and non-carriers of fixed alleles in European populations. The minor allele frequencies (MAFs) found in all SNPs were compared to the global MAF of two population databases: Exome Aggregation Consortium (<http://exac.broadinstitute.org/>) and to 1000genomes (<http://www.internationalgenome.org/index.html>).

To estimate the risk of melanoma associated with selected variants, we calculated odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (95% CIs) using multivariate logistic regression analysis. Statistical significance was assessed using the likelihood approach. We adjusted for the following potential confounders in a multivariate model: age (continuous variable), sex, skin type according to the Fitzpatrick scale [skin type I: light and white skin, always burns, never tan; skin type II: white skin, usually burns, tans less than average and with difficulty; skin type III: white to olive skin, sometimes burns (mildly), average tan; skin type IV: rarely burns, tans more than average; skin type V: brown skin, no burns, always tans; skin type VI: black skin, never burns and always tans)] eye (blue, green, light brown, dark brown, black) and hair color (blonde, red, light brown, dark brown) and number of nevi (more or less than 50 nevi identified after complete examination of the skin surface - entire body). We chose these variants for adjustment since they are established risk factors for melanoma (Society, 2016; Silva *et al.*, 2016; Fitzpatrick, 1988). Statistical analyses were performed using SPSS®, version 18 (IBM, USA).

Higher-order gene-gene interactions among the SNPs which were associated in the logistic regression analysis were used to perform a nonparametric and genetic model-free multifactor dimensionality reduction (MDR) approach (v. 2.0 beta 7.0). MDR analysis was performed to verify the contribution of each SNP found in the interaction. The bivariate model of MDR was projected with rs1426654 and rs16891982. The model with the highest testing balance accuracy and with the cross-validation consistency of >5 out of 10 was selected as the best model. Statistical significance was determined using a 1000-fold permutation test.

### **Conflict of Interest**

The authors state no conflict of interest.

### **Acknowledgments**

This work was supported by grants from FIPE/HCPA, Brazil. We thank the patients for their participation.

## References

AMOS, C. I. et al. Genome-wide association study identifies novel loci predisposing to cutaneous melanoma. **Human Molecular Genetics**, [s.l.], v. 20, n. 24, p.5012-5023, 17 set. 2011. Oxford University Press (OUP).

ARMSTRONG, Bruce K.; KRICKERB, Anne. The epidemiology of UV induced skin cancer. **Journal Of Photochemistry And Photobiology B: Biology**, [s.i.], v. 63, p.8-18, ago. 2001.

BARRETT, Jennifer H et al. Genome-wide association study identifies three new melanoma susceptibility loci. **Nature Genetics**, [s.l.], v. 43, n. 11, p.1108-1113, 9 out. 2011. Springer Nature.

BAKOS, Renato M. et al. The CDKN2A p.A148T variant is associated with cutaneous melanoma in Southern Brazil. **Experimental Dermatology**, [s.l.], v. 20, n. 11, p.890-893, 6 set. 2011. Wiley-Blackwell.

BALCH, C. M. et al. Final Version of 2009 AJCC Melanoma Staging and Classification. **Journal Of Clinical Oncology**, [s.l.], v. 27, n. 36, p.6199-6206, 16 nov. 2009. American Society of Clinical Oncology (ASCO).

BISHOP, D Timothy et al. Genome-wide association study identifies three loci associated with melanoma risk. **Nature Genetics**, [s.l.], v. 41, n. 8, p.920-925, 5 jul. 2009. Springer Nature.

BOX, Neil F. et al. MC1R Genotype Modifies Risk of Melanoma in Families Segregating CDKN2A Mutations. **The American Society Of Human Genetics**, [s.i.], p.765-773, ago. 2001.

CANFIELD, V. A. et al. Molecular Phylogeography of a Human Autosomal Skin Color Locus Under Natural Selection. **G3: Genes|genomes|genetics**, [s.l.], v. 3, n. 11, p.2059-2067, 18 set. 2013. Genetics Society of America.

CERQUEIRA, Caio Cesar Silva de et al. Implications of the Admixture Process in Skin Color Molecular Assessment. **Plos One**, [s.l.], v. 9, n. 5, p.1-7, 8 maio 2014. Public Library of Science (PLoS).

CHEN, Steven T.; GELLER, Alan C.; TSAO, Hensin. Update on the Epidemiology of Melanoma. **Current Dermatology Reports**, [s.l.], v. 2, n. 1, p.24-34, 12 jan. 2013. Springer Nature.

COOK, Anthony L. et al. Analysis of Cultured Human Melanocytes Based on Polymorphisms within the SLC45A2/MATP, SLC24A5/NCKX5, and OCA2/P Loci. **Journal Of Investigative Dermatology**, [s.l.], v. 129, n. 2, p.392-405, fev. 2009. Elsevier BV.

DUFFY, David L. et al. Multiple Pigmentation Gene Polymorphisms Account for a Substantial Proportion of Risk of Cutaneous M. **Journal Of Investigative Dermatology**, [s.l.], v. 130, n. 2, p.520-528, fev. 2010. Elsevier BV.

DURSO, Danielle Fernandes et al. Association of Genetic Variants with Self-Assessed Color Categories in Brazilians. **Plos One**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.1-8, 8 jan. 2014. Public Library of Science (PLoS).

EIBERG, Hans et al. Blue eye color in humans may be caused by a perfectly associated founder mutation in a regulatory element located within the HERC2 gene inhibiting OCA2 expression. **Human Genetics**, [s.l.], v. 123, n. 2, p.177-187, 3 jan. 2008. Springer Nature.

ERDMANN, Friederike et al. International trends in the incidence of malignant melanoma 1953-2008-are recent generations at high. **International Journal Of Cancer**, [s.l.], v. 132, n. 2, p.385-400, 21 maio 2012. Wiley-Blackwell.

FERNANDEZ, L.p. et al. SLC45A2: a novel malignant melanoma-associated gene. **Human Mutation**, [s.l.], v. 29, n. 9, p.1161-1167, set. 2008. Wiley-Blackwell.

FITZPATRICK, Thomas B.. The Validity and Practicality of Sun-Reactive Skin Types I Through VI. **Archives Dermatology**, [s.l.], v. 124, p.869-871, jun. 1988.

FUKAMACHI, Shoji; SHIMADA, Atsuko; SHIMA, Akihiro. Mutations in the gene encoding B, a novel transporter protein, reduce melanin content in medaka. **Nature Genetics**, [s.l.], v. 28, n. 4, p.381-385, 1 ago. 2001. Springer Nature.

FREIRE-ARADAS, A. et al. Exploring iris colour prediction and ancestry inference in admixed populations of South America. **Forensic Science International: Genetics**, [s.l.], v. 13, p.3-9, nov. 2014. Elsevier BV.

GIARDINA, Emiliano et al. Haplotypes in SLC24A5 Gene as Ancestry Informative Markers in Different Populations. **Current Genomics**, [s.i.], v. 9, p.110-114, ago. 2008.

GIBBS, D. C. et al. Inherited Genetic Variants Associated with Occurrence of Multiple Primary Melanoma. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, [s.l.], v. 24, n. 6, p.992-997, 2 abr. 2015. American Association for Cancer Research (AACR).

GUDBJARTSSON, Daniel F et al. ASIP and TYR pigmentation variants associate with cutaneous melanoma and basal cell carcinoma. **Nature Genetics**, [s.l.], v. 40, n. 7, p.886-891, 18 maio 2008. Springer Nature.

GUEDJ, Mickaël et al. Variants of the MATP/SLC45A2 gene are protective for melanoma in the French population. **Human Mutation**, [s.l.], v. 29, n. 9, p.1154-1160, set. 2008. Wiley-Blackwell.

HELSING, Per et al. MC1R, ASIP, TYR, and TYRP1 gene variants in a population-based series of multiple primary melanomas. **Genes, Chromosomes And Cancer**, [s.l.], v. 51, n. 7, p.654-661, 23 mar. 2012. Wiley-Blackwell.

JABLONSKI, N. G.; CHAPLIN, G.. Human skin pigmentation as an adaptation to UV radiation. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 107, n. 2, p.8962-8968, 5 maio 2010. Proceedings of the National Academy of Sciences.

JIN, Ying et al. Genome-wide association analyses identify 13 new susceptibility loci for generalized vitiligo. **Nature Genetics**, [s.l.], v. 44, n. 6, p.676-680, 6 maio 2012. Springer Nature.

LIMA, Felícia de Araújo; GONÇALVES, Fernanda de Toledo; FRIDMAN, Cintia. SLC24A5 and ASIP as phenotypic predictors in Brazilian population for forensic purposes. **Legal Medicine**, [s.l.], v. 17, n. 4, p.261-266, jul. 2015. Elsevier BV.

LAMASON, R. L.. SLC24A5, a Putative Cation Exchanger, Affects Pigmentation in Zebrafish and Humans. **Science**, [s.l.], v. 310, n. 5755, p.1782-1786, 16 dez. 2005. American Association for the Advancement of Science (AAAS).

LIAN, Christine Guo; MIHM JUNIOR, Martin C.. Skin Cancer: Cutaneous Melanoma. In: LYON. BERNARD W. STEWART. (Comp.). **World Cancer Report 2014**. Lyon: International Agency For Research On Cancer, 2014. p. 495-502.

MACIEL, Luana Gomes Lopes et al. Afro-Derived Amazonian Populations: Inferring Continental Ancestry and Population Substructure. **Human Biology**, [s.l.], v. 83, n. 5, p.627-636, out. 2011. Human Biology (The International Journal of Population Biology and Genetics).

MANTA, Fernanda Saloum Neves et al. Analysis of genetic ancestry in the admixed Brazilian population from Rio de Janeiro using 46 autosomal ancestry-informative indel markers. **Annals Of Human Biology**, [s.l.], v. 40, n. 1, p.94-98, 15 nov. 2012. Informa Healthcare.

NAN, Hongmei et al. Genetic variants in pigmentation genes, pigmentary phenotypes, and risk of skin cancer in Caucasians. **International Journal Of Cancer**, [s.l.], v. 125, n. 4, p.909-917, 15 ago. 2009. Wiley-Blackwell.

NORTON, H. L. et al. Genetic Evidence for the Convergent Evolution of Light Skin in Europeans and East Asians. **Molecular Biology And Evolution**, [s.l.], v. 24, n. 3, p.710-722, 5 dez. 2006. Oxford University Press (OUP).

PENA, Sérgio D. J. et al. The Genomic Ancestry of Individuals from Different Geographical Regions of Brazil Is More Uniform Than Expected. **Plos One**, [s.l.], v. 6, n. 2, p.1-9, 16 fev. 2011. Public Library of Science (PLoS).

PESAVENTO, Sandra Jatahy. O IMIGRANTE NA POLÍTICA RIO-GRANDENSE. In: BARROS, Eliane Cruxên et al. **RS: Imigração & Colonização**. 2. ed. Porto Alegre: Mercado Aberto, 1992. p. 156-194.

PESAVENTO, Sandra Jatahy. O Rio Grande de São Pedro. In: PESAVENTO, Sandra Jatahy. **A História no Rio Grande do Sul**. 9. ed. Porto Alegre: Martins Livreiro, 2014. p. 9-34.

PINTO, Rosamaria et al. The next generation of metastatic melanoma: uncovering the genetic variants for anti-BRAF therapy re. **Oncotarget**, [s.l.], v. 7, n. 18, p.25135-25149, fev. 2016.

RAMOS, Bruna Ribeiro de Andrade et al. Neither self-reported ethnicity nor declared family origin are reliable indicators of genomic ancestry. **Genetica**, [s.l.], v. 144, n. 3, p.259-265, 17 mar. 2016. Springer Nature.

RANSOHOFF, Katherine J. et al. Familial skin cancer syndromes. **Journal Of The American Academy Of Dermatology**, [s.l.], v. 74, n. 3, p.423-434, mar. 2016. Elsevier BV.

REINDERS, Anke; WARD, John. Investigating polymorphisms in membrane-associated transporter protein SLC45A2, using sucrose transporters as a model. **Molecular Medicine Reports**, [s.l.], p.1393-1398, 10 mar. 2015. Spandidos Publications.

RUIZ-LINARES, Andrés et al. Admixture in Latin America: Geographic Structure, Phenotypic Diversity and Self-Perception of Ancestry Based on 7,342 Individuals. **Plos Genetics**, [s.l.], v. 10, n. 9, p.1-13, 25 set. 2014. Public Library of Science (PLoS).

SABETI, Pardis C. et al. Genome-wide detection and characterization of positive selection in human populations. **Nature**, [s.l.], v. 449, n. 7164, p.913-918, 18 out. 2007. Springer Nature.

SANTOS, Ney P.c. et al. Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative

marker (AIM) panel. **Human Mutation**, [s.l.], v. 31, n. 2, p.184-190, fev. 2010. Wiley-Blackwell.

SILVA, Ministério da Saúde Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da et al. **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Coordenação de Prevenção e Vigilância, 2015. 122 p.

SOCIETY, American Cancer. **Risk factors for melanoma skin cancer**. 2016. Disponível em: <<http://www.cancer.org/cancer/skincancer-melanoma/detailedguide/melanoma-skin-cancer-risk-factors>>. Acesso em: 12 out. 2016.

SOEJIMA, Mikiko; KODA, Yoshiro. Population differences of two coding SNPs in pigmentation-related genes SLC24A5 and SLC45A2. **International Journal Of Legal Medicine**, [s.l.], v. 121, n. 1, p.36-39, 18 jul. 2006. Springer Nature.

SOURA, Efthymia et al. Hereditary melanoma: Update on syndromes and management. **Journal Of The American Academy Of Dermatology**, [s.l.], v. 74, n. 3, p.411-420, mar. 2016. Elsevier BV.

STEFANAKI, Irene et al. Replication and Predictive Value of SNPs Associated with Melanoma and Pigmentation Traits in a Southern European Case-Control Study. **Plos One**, [s.l.], v. 8, n. 2, p.1-10, 5 fev. 2013. Public Library of Science (PLoS).

STURM, Richard A.; LARSSON, Mats. Genetics of human iris colour and patterns. **Pigment Cell & Melanoma Research**, [s.l.], v. 22, n. 5, p.544-562, out. 2009. Wiley-Blackwell.

SULEM, Patrick et al. Genetic determinants of hair, eye and skin pigmentation in Europeans. **Nature Genetics**, [s.l.], v. 39, n. 12, p.1443-1452, 21 out. 2007. Springer Nature.

SÖCHTIG, Jens et al. Exploration of SNP variants affecting hair colour prediction in Europeans. **Int J Legal Med**, [s.l.], v. 129, n. 5, p.963-975, 11 jul. 2015. Springer Science + Business Media.

YAMAGUCHI, Y.; HEARING, V. J.. Melanocytes and Their Diseases. **Cold Spring Harbor Perspectives In Medicine**, [s.l.], v. 4, n. 5, p.1-19, 1 maio 2014. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

YUASA, I. et al. Distribution of the F374 Allele of the SLC45A2 (MATP) Gene and Founder-Haplotype Analysis. **Annals Of Human Genetics**, [s.l.], v. 70, n. 6, p.802-811, nov. 2006. Wiley-Blackwell.

**Table 1. Characteristics of samples included in study.**

	<b>Global*</b>	<b>Cases*</b>	<b>Controls*</b>
	n=255 (%)	n= 120 (%)	n=135 (%)
<b>Sex</b>			
Female	157 (61.6)	73 (60.8)	84 (62.2)
<b>Age<sup>1</sup></b>			
≥ 50 years old	180 (70.6)	78 (65)	102 (75.6)
< 50 years old	75 (29.4)	42 (35)	33 (24.4)
<b>Mean ages (SD)<sup>a</sup></b>	57.01	56.31 (15.5)	58.28 (13.7)
<b>Phototypes</b>			
I	9 (3.5)	7 (5.8)	2 (1.5)
II	136 (53.3)	66 (55)	70 (51.8)
III	100 (39.2)	42 (35)	58 (43)
IV	7 (2.7)	4 (3.3)	3 (2.2)
V	3 (1.2)	1 (0.8)	2 (1.5)
<b>Hair color</b>			
Blond	52 (20.4)	30 (25)	22 (16.3)
Red	11 (4.3)	9 (7.5)	2 (1.5)
Light Brown	82 (32.1)	39 (32.5)	43 (31.8)
Dark Brown	89 (35)	32 (26.7)	57 (42.2)
Black	21 (8.2)	10 (8.3)	11 (8.1)
<b>Eyes color</b>			
Blue	70 (28.1)	39 (33.3)	31 (23.5)
Green	47 (18.9)	27 (23)	20 (15.1)
Brown	131 (52.6)	51 (43.6)	80 (60.6)
Black	1 (0.4)	0	1 (0.7)
<b>Number of nevi</b>			
≥50	41 (16.5)	33 (28.2)	8 (6.1)
<50	207 (83.5)	84 (71.8)	123 (93.9)
<b>Number of dysplastic nevi</b>			
≥5	17 (6.8)	15 (12.8)	2 (1.5)
<4	231 (93.1)	102 (87.1)	129 (98.5)
<b>Ancestrality profile<sup>bc</sup></b>			
European	0.971	0.972	0.971
African	0.010	0.011	0.010
Native-american	0.013	0.013	0.012

<sup>a</sup>SD:standard deviation; <sup>b</sup>ancestrality profiles obtained for Ancestral Informative Markers (AIMs) *indels* panel; <sup>c</sup>Date presented as median of percentile ancestry component;

<sup>1</sup>Samples age at recruitment.

\*Totals may vary because of missing values

**Table 2. Characteristics of patients with melanoma<sup>1</sup>.**

<b>Mean age at diagnosis (SD)<sup>a</sup></b>	53.72 (15.5)
<b>Breslow thickness/TNM Staging<sup>1</sup></b>	<b>n (%)</b>
in situ/ Tis	26 (22.6)
≤ 1.0 mm/ T1	41 (35.6)
1.01 - 2 mm/ T2	23 (20)
2 - 4 mm/ T3	14 (12.2)
>4 mm/ T4	11 (9.6)
<b>Histological subtype</b>	
Acral lentiginous	2 (1.8)
Superficial spreading	78 (72.2)
Nodular melanoma	20 (18.5)
Lentigo maligna	8 (7.4)
<b>Multiple primary melanoma</b>	
Yes	8 (6.7)
No	112 (93.3)
<b>History familiar Melanoma</b>	
Yes	19 (15.8)
No	101 (84.2)

<sup>1</sup>The Breslow thickness and TNM Staging according to National Comprehensive Cancer Network (NCCN) guidelines

<sup>a</sup>SD:standard deviation.

**Table 3. Allelic and genotypic frequencies of the polymorphisms rs1126809 (*TYR*), rs1129038 (*HERC2*), rs1426654 (*SLC24A5*) and rs16891982 (*SLC45A2*) in individuals with Melanoma and controls.**

Gene	Chr.	Position <sup>a</sup>	SNP	Min. Allele <sup>b</sup>	MAF <sup>b</sup>	Allelic frequency	Genot ypes	Cases n (%)	Controls n (%)	p value
<i>TYR</i>	11	Exonic (p.Arg402Gln)	rs1126809	A	0.1770	A - 0.2	AA	0	0	1.000 <sup>2</sup>
						G - 0.8	GA	48 (40)	53 (39.3)	
							GG	72 (60)	82 (60.7)	
<i>HERC2</i>	15	Intronic (3'UTR)	rs1129038	G	0.4927	A - 0.45	AA	24 (20)	38 (28.1)	0.017 <sup>2</sup>
						G - 0.55	GA	45 (37.5)	61 (45.2)	
							GG	51 (42.5)	36 (26.7)	
<i>SLC24A5</i>	15	Exonic (p.Ala111Thr)	rs1426654	G	0.2283	A - 0.94	AA	117(97.5)	111 (82.2)	<0.001 <sup>1</sup>
						G - 0.06	GA	2 (1.7)	23 (17)	
							GG	1 (0.8)	1 (0.7)	
<i>SLC45A2</i>	5	Exonic (p.Phe374Leu)	rs16891982	C	0.3597	G - 0.86	GG	103(85.8)	93 (68.9)	0.002 <sup>1</sup>
						C - 0.14	CG	16 (13.3)	32 (23.7)	
							CC	1 (0.8)	10 (7.4)	

<sup>a</sup>Position in genome and protein change; <sup>b</sup>Dates of The Exome Aggregation Consortium (ExAC)

<sup>1</sup>Fisher chi-square for associating comparing the distribution of categorical variables in cases and controls subjects; <sup>2</sup>Pearson chi-square for associating comparing the distribution of categorical variables in cases and controls subjects. P values are two-sided

**Table 4. Principal effect and Odds ratios (OR) for melanoma in relation to the presence of different genotypes studied, considering each SNP individually.**

SNP	Genotype	OR	95% CI	<i>p</i>
<b>Model 1*</b>				
rs1129038	GG	1		
	GA	0.946	0.457 - 1.965	0.881
	GG	1.365	0.494 - 3.800	0.549
<b>Model 2*</b>				
rs1426654	GG/GA	1		
	AA	6.018	1.848 - 27.744	<b>0.007</b>
<b>Model 3*</b>				
rs16891982	CC/CG	1		
	GG	2.068	1.031 - 4.278	<b>0.044</b>
<b>Model 4*</b>				
rs1126809	GG/ GA	1		
	AA	0.8015	0.465 - 1.442	0.485

\*Model adjusted to the following risk factors: sex, age, eye color, hair color, phototype, and number of nevi.

**Table 5. OR for melanoma of the interaction of polymorphisms rs1426654 and rs16891982.**

Interaction	Genotypes	OR	95% CI	<i>p</i>
<b>Model 5*</b>				
rs1426654 <sup>a</sup> -	AG/GG - CG/CC	1		
	AA - CG/CC	3.823	0.801 - 29.369	0.129
rs16891982 <sup>b</sup>	AG/GG - GG	0.958	0.039 - 12.596	0.974
	AA - GG	6.936	1.607 - 50.294	<b>0.022</b>

\*Model adjusted to the following risk factors: sex, age, eye color, hair color, phototype, and number of nevi.

<sup>a</sup>protection allele is G and risk allele is A; <sup>b</sup>protection allele is C and risk allele is G

**Supplementary Table 1. SNPs rs1126809 (TYR), rs1129038 (HERC2), rs1426654 (SLC24A5), rs16891982 (SLC45A2) and risk factors for melanoma**

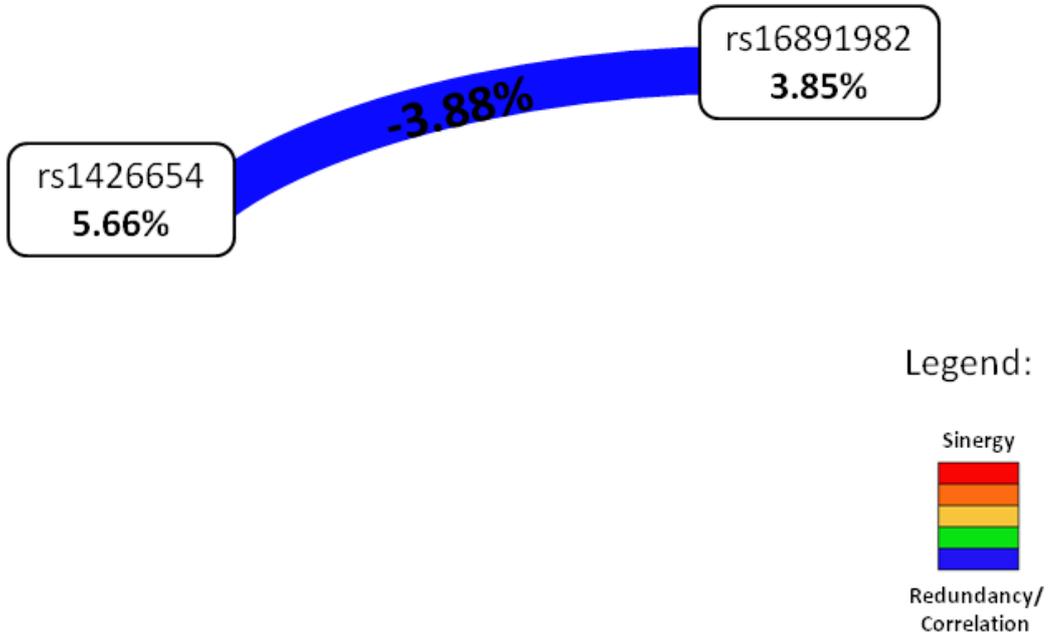
Genotypes n (%)

SNP	Risk Factor	Cases n=120				Controls n=135			
		AA	GA	GG	<i>p value</i>	AA	GA	GG	<i>p value</i>
rs1126809	Phototype light <sup>a</sup>	0	29	44	0.939 <sup>1</sup>	0	32	40	0.187 <sup>1</sup>
	Phototype dark <sup>b</sup>	0	19	28		0	21	42	
	Eyes ligh <sup>c</sup>	0	31	35	0.088 <sup>1</sup>	0	23	29	0.287 <sup>1</sup>
	Eyes dark <sup>d</sup>	0	16	35		0	28	52	
	Hair blonde	0	14	16	0	14	8		
	Hair red	0	1	8	0	1	1		
	Hair light brown	0	17	22	0.332 <sup>1</sup>	0	21	22	0.008 <sup>1</sup>
	Hair dark brown	0	11	21		0	15	42	
	Hair Black	0	5	5	0	2	9		
rs1129038		AA	GA	GG		AA	GA	GG	
	Phototype light <sup>a</sup>	7	24	42	<0.001 <sup>2</sup>	9	31	32	<0.001 <sup>1</sup>
	Phototype dark <sup>b</sup>	17	21	9		29	31	3	
	Eyes ligh <sup>c</sup>	2	14	50	<0.001 <sup>1</sup>	2	16	33	<0.001 <sup>1</sup>
	Eyes dark <sup>d</sup>	21	29	1		36	43	2	
	Hair blonde	0	11	19	1	8	13		
	Hair red	1	2	6	0	2	0		
	Hair light brown	5	18	16	0.001 <sup>1</sup>	9	20	14	<0.001 <sup>1</sup>
	Hair dark brown	13	11	8		25	25	7	
Hair Black	5	3	2	3	7	1			
rs1426654		AA	GA	GG		AA	GA	GG	
	Phototype light <sup>a</sup>	72	0	1	0.157 <sup>1</sup>	65	7	0	0.017 <sup>1</sup>
	Phototype dark <sup>b</sup>	45	2	0		46	16	1	
	Eyes ligh <sup>c</sup>	65	1	0	0.719 <sup>1</sup>	50	1	0	0.001 <sup>1</sup>
	Eyes dark <sup>d</sup>	49	1	1		59	21	1	
	Hair blonde	30	0	0	21	1	0		
	Hair red	9	0	0	2	0	0		
	Hair light brown	39	0	0	0.334 <sup>1</sup>	36	6	1	0.161 <sup>1</sup>
	Hair dark brown	30	1	1		46	11	0	
Hair Black	9	1	0	6	5	0			
rs16891982		GG	CG	CC		GG	CG	CC	
	Phototype light <sup>a</sup>	68	5	0	0.008 <sup>1</sup>	60	12	0	<0.001 <sup>1</sup>
	Phototype dark <sup>b</sup>	35	11	1		33	20	10	
	Eyes ligh <sup>c</sup>	60	6	0	0.078 <sup>1</sup>	44	7	0	0.001 <sup>1</sup>
	Eyes dark <sup>d</sup>	40	10	1		47	24	10	
	Hair blonde	29	1	0	19	3	0		
	Hair red	7	2	0	1	1	0		
	Hair light brown	38	1	0	<0.001 <sup>1</sup>	39	4	0	0.004 <sup>1</sup>
	Hair dark brown	25	6	1		30	20	7	
Hair Black	4	6	0	4	4	3			

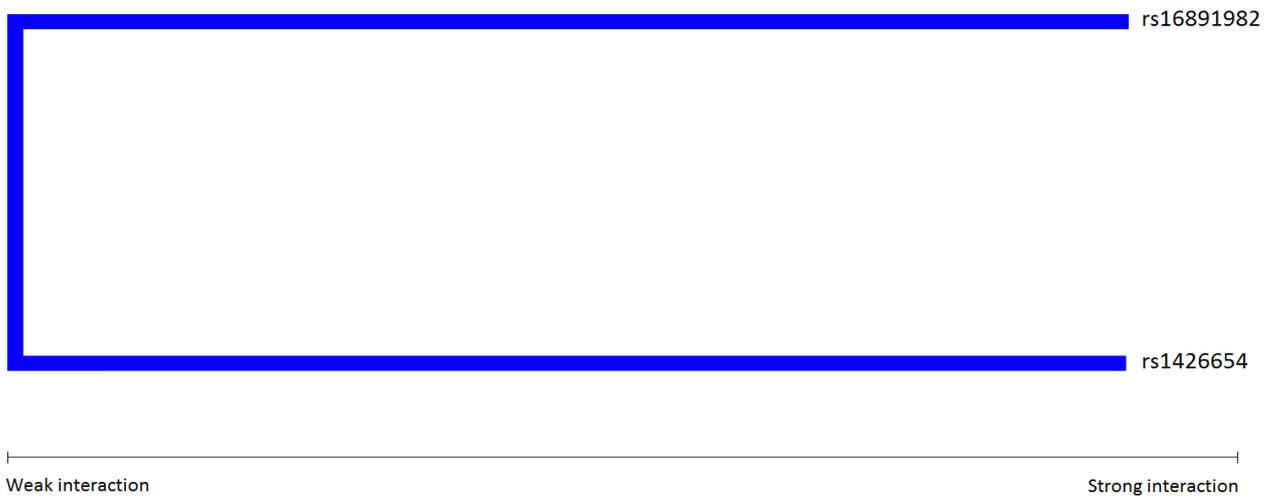
<sup>a</sup>Phototypes I+II; <sup>b</sup>Phototypes III+IV+V; <sup>c</sup>Blue and green; <sup>d</sup>Brown and black

<sup>1</sup>Fisher chi-square test; <sup>2</sup>Pearson chi-square test.

Figure 1  
1 A)



1 B)



1 C)

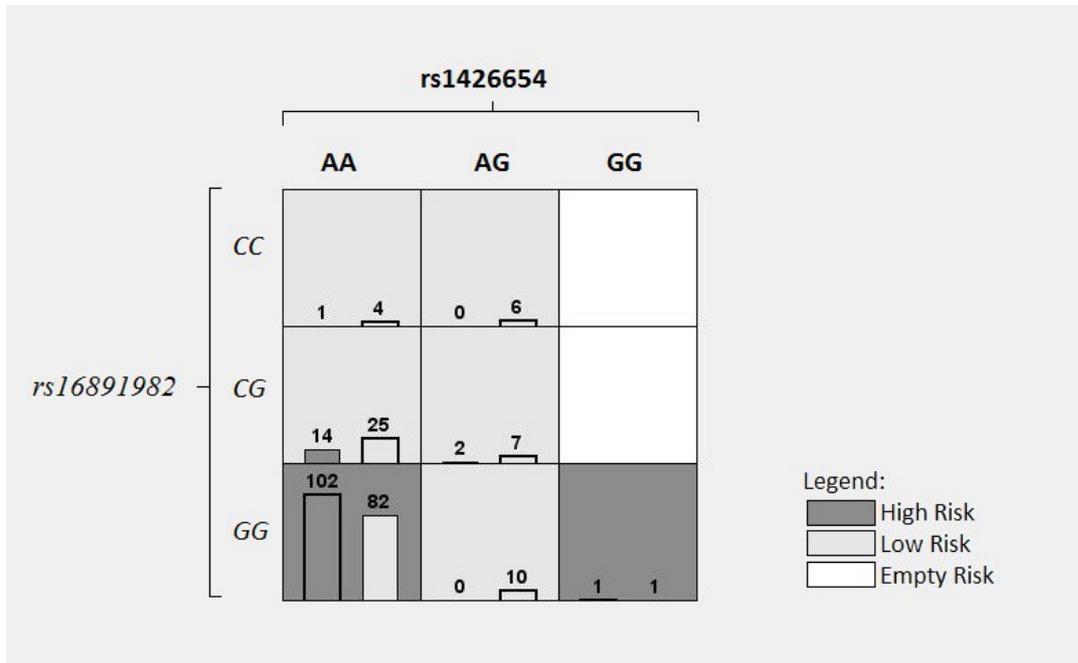


Figure 1. Multifactor Dimensionality Reduction (MDR) interaction models. **(A)** Interaction circle graph comprised of nodes with pairwise connections between them. Values in nodes represent information gain (IG) of individual genes (main effect), while values between nodes are the IG of each pairwise combination (interaction effects). The type of interaction is showed by color of the line. The blue line represents negative entropy, redundancy or linkage disequilibrium. **(B)** The dendrogram graphic shows the level of interaction between attributes. The colors used have the same definition like showed in the interaction circle graph. **(C)** The rs1426654 and rs16891982 interaction to risk with melanoma skin cancer development. A high-frequency genotype combination is displayed in dark square, while low-frequency combinations are in lightly shaded. For each cell, the left bar indicates the absolute number of cases and the right bar the absolute number of controls.

## 9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através dos resultados encontrados neste estudo foi possível verificar uma associação de genótipos em SNPs presentes em genes de pigmentação com o aumento de risco para o melanoma. Os resultados confirmam que as mesmas variantes envolvidas na determinação das características claras de pigmentação em Europeus atuam para definir a pigmentação clara em indivíduos do Sul do Brasil. Além disso, foi demonstrado que dois dos SNPs investigados – rs1426654 em SLC24A5 e rs16891982 em SLC45A2 – conferem um aumento de risco independente para melanoma nesta mesma região.

Espera-se que os resultados encontrados contribuam para o entendimento da diversidade alélica encontrada em genes relacionados à pigmentação em populações brasileiras, e possam futuramente ser utilizados em painéis de identificação de polimorfismos de susceptibilidade ao melanoma.

## 10 PERSPECTIVAS FUTURAS

Como perspectiva futura em relação ao trabalho, seria interessante verificar a interação destes SNPs em amostras de melanoma de outras populações brasileiras que apresentem diferentes percentuais de ancestralidade europeia, bem como em populações latino-americanas, a fim de verificar se a associação de aumento de risco na presença desses SNPs se repete nessas populações. Outra perspectiva interessante é realizar um ensaio funcional em melanócitos de fibroblastos extraídos de células dos pacientes portadores da combinação de genótipos associada com o aumento de risco. Este ensaio permitiria analisar a expressão das proteínas envolvidas na síntese de melanina, que poderia ser associada à condição de melanoma.