



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

CAROLINE TORRICELLI

ANÁLISE FUNCIONAL DO POLIMORFISMO c.938-325G>A DO GENE *MITF*,  
ENVOLVIDO COM A MELANOGÊNESE, EM MELANOMA CUTÂNEO

CAMPINAS

2019

CAROLINE TORRICELLI

ANÁLISE FUNCIONAL DO POLIMORFISMO c.938-325G>A DO GENE *MITF*,  
ENVOLVIDO COM A MELANOGÊNESE, EM MELANOMA CUTÂNEO

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da  
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos  
exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciências na área  
de Clínica Médica.

ORIENTADOR: PROF. DR. GUSTAVO JACOB LOURENÇO

COORIENTADORA: PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. CARMEN SILVIA PASSOS LIMA

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO  
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA  
ALUNA CAROLINE TORRICELLI, E ORIENTADA  
PELO PROF. DR. GUSTAVO JACOB LOURENÇO.

CAMPINAS

2019

**Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s):** FAPESP, 2016/02193-9; CAPES, 4570/2018; CNPq, 402873/2016-5

**ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-1544-8591>

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas  
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

T637a Torricelli, Caroline, 1992-  
Análise funcional do polimorfismo c.938-325G>A do gene *MITF*, envolvido com a melanogênese, em melanoma cutâneo / Caroline Torricelli. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Gustavo Jacob Lourenço.

Coorientador: Carmen Silvia Passos Lima.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Melanoma. 2. Risco. 3. Prognóstico. 4. Variação genética. 5. Fator de transcrição associado à microftalmia. 6. Processamento de RNA. I. Lourenço, Gustavo Jacob, 1978-. II. Lima, Carmen Silvia Passos, 1957-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

#### Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Functional analysis of *MITF* c.938-325G>A polymorphism, enrolled in melanogenesis, in cutaneous melanoma

**Palavras-chave em inglês:**

Melanoma

Risk

Prognosis

Genetic variation

Microphthalmia-associated transcription factor

RNA splicing

**Área de concentração:** Clínica Médica

**Titulação:** Mestra em Ciências

**Banca examinadora:**

Gustavo Jacob Lourenço [Orientador]

Manoela Marques Ortega

Márcia Torresan Delamain

**Data de defesa:** 18-01-2019

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

---

## **BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO**

**CAROLINE TORRICELLI**

---

---

**ORIENTADOR: PROF. DR. GUSTAVO JACOB LOURENÇO**

**COORIENTADORA: PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. CARMEN SILVIA PASSOS LIMA**

---

---

### **MEMBROS:**

**1. PROF. DR. GUSTAVO JACOB LOURENÇO**

**2. PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. MANOELA MARQUES ORTEGA**

**3. PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. MÁRCIA TORRESAN DELAMAIN**

---

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

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

---

**Data: 18 de Janeiro de 2019**

---

## **Dedicatória**

*Aos pacientes que enfrentam diariamente a luta contra o câncer.  
Aos cuidadores que se esforçam para proporcionar melhor qualidade  
de vida aos pacientes.*

## **Epígrafe**

*“Um dia, o câncer será apenas um signo...”*

(Autor desconhecido)

## **Agradecimentos**

Primeiramente agradeço a Deus por me guiar para o local certo, no melhor momento de minha vida, para realizar o tão sonhado mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa de mestrado, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo financiamento deste trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Gustavo Jacob Lourenço, pela oportunidade concedida e pelo voto de confiança em me acolher para poder trabalhar com pessoas tão responsáveis, honestas e humanas, agradeço por toda a motivação e pela seriedade ao lidar com as adversidades diárias e por ter me ensinado da melhor maneira possível como é ser um ótimo pesquisador.

À minha coorientadora, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Carmen Silvia Passos Lima, por toda a experiência e conhecimento compartilhados ao longo do mestrado, pelo incentivo e pela acolhida.

A todos os membros do Laboratório de Genética do Câncer, em especial à Janet, à Gabriela, à Leisa e à Ericka, que desde o início foram suporte para lidar com todas as adversidades de um projeto de pesquisa, me auxiliaram nas mais diversas dúvidas, experimentos, foram ombro amigo e moradia, agradeço pelo companheirismo ao longo do tempo que estivemos trabalhando juntas. Também agradeço aos outros companheiros de laboratório Cristiane, Juliana, Bruna, Tuany, Daniel, João Pedro e Gisele, que de certa forma estiveram presentes e construíram um ambiente agradável de trabalho e aprendizado.

À bióloga Ana Paula Dalla Costa do Laboratório de Fisiopatologia Cardiovascular, por disponibilizar a estrutura do laboratório para a realização de parte dos experimentos e por todo o conhecimento compartilhado ao longo de toda a jornada.

Ao Dr. Roberto Schreiber e à Dr<sup>ª</sup>. Layde Paim do Laboratório de Biologia Cardiovascular, por disponibilizarem a estrutura do laboratório para a realização de parte dos experimentos, pela troca de experiências e pelo ótimo convívio.

Ao Dr. José Augusto Rinck Júnior e à Dr<sup>ª</sup>. Lígia Traldi Macedo do ambulatório de Oncologia Clínica e à Dr<sup>ª</sup>. Renata Ferreira Magalhães do ambulatório de Dermatologia do Hospital de Clínicas da Unicamp, por todo o auxílio com as informações clínicas e do tumor dos pacientes inseridos no estudo.

À Dr<sup>ª</sup>. Dulcineia Martins de Albuquerque do Laboratório de Hemoglobina e Genoma do Hemocentro por todo o auxílio com as análises de sequenciamento.

À Dr<sup>a</sup>. Lúcia Helena de Siqueira do Hemocentro por toda a troca de experiência em relação às padronizações de técnicas de biologia molecular, pelo conhecimento compartilhado e prontidão em nos auxiliar.

Ao Mestre Guilherme Augusto da Silva Nogueira por todo o auxílio com a técnica de *western blotting* e por toda a troca de experiência.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Dioze Guadagnini e à técnica Heloísa do Laboratório de Investigação Clínica em Resistência à Insulina por nos permitir o uso e manuseio do equipamento para revelação das membranas de *western blotting* e captura de imagens.

Aos pacientes com melanoma cutâneo e aos doadores de sangue, por aceitarem participar no estudo e pela iniciativa em contribuir para a pesquisa em oncologia. Como também às enfermeiras e enfermeiros que coletaram as amostras de sangue dos pacientes e controles do estudo.

E essencialmente, aos meus pais Edmar e Eliana, ao meu irmão Luigi, ao meu noivo Gian e sua família, que são minha base. Agradeço por entenderem meus momentos de estudo e trabalho, por me apoiarem e por estarem sempre ao meu lado, pela paciência e pelo amor dedicado a mim e por sempre aplaudirem cada conquista.

## RESUMO

Nosso grupo de pesquisadores identificou milhares de variantes gênicas de base única (SNVs) associadas a alteração do risco do melanoma cutâneo (MC) por meio da genotipagem em larga escala com microarranjos de DNA (SNV array 6.0, Affymetrix®). A SNV *MITF* rs7623610 (c.938-325G>A) destacou-se entre elas, pois está localizada na região regulatória do processamento do RNA mensageiro (*splicing*) do gene *MITF*, um importante regulador da via da melanogênese. Assim, os objetivos do estudo foram de avaliar se os diferentes genótipos da referida SNV influenciam o risco de ocorrência do MC em uma amostra de tamanho adequado, os aspectos clínicos e do tumor, o prognóstico dos pacientes, a expressão gênica e proteica do *MITF* e das *SF1* e *HNRNPA1* (proteínas regulatórias do *splicing*) e a eficiência do mecanismo de *splicing*. Os genótipos de 247 pacientes com MC e 280 controles foram identificados por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real. O RNA e proteínas de amostras de leucócitos de sangue periférico de 41 pacientes e 83 controles foram utilizados para avaliar a expressão do *MITF*, *SF1* e *HNRNPA1* por meio da PCR quantitativa e o conteúdo proteico de controles por meio da técnica de *western blotting*. A eficiência do mecanismo de *splicing* foi avaliada por meio do ensaio do minigene repórter em linhagem celular de melanoma. As diferenças entre os grupos foram avaliadas pela regressão logística múltipla, teste *t*, análise de variância, Mann-Whitney e Kruskal Wallis. Os tempos de sobrevida livre de progressão (SLP) e sobrevida específica de melanoma (SEM) foram estimados pelos métodos de Kaplan-Meier e de Cox. A frequência do genótipo *MITF* AA foi maior em pacientes do que em controles (27,9% vs. 20,7%;  $p=0,02$ ). Indivíduos com o referido genótipo estiveram sob risco cerca duas vezes maior de desenvolver o MC do que os outros. O genótipo *MITF* AA foi mais comum em pacientes com tumores em estágios avançados do que os outros (46,2% vs. 24,9%,  $p=0,007$ ). A SEM foi menor em pacientes com o genótipo *MITF* AA (77,1% vs. 90,1%;  $p=0,03$ ) e com os genótipos GA ou AA (79,4% vs. 90,1%;  $p=0,04$ ). Pacientes ou controles portadores do genótipo *MITF* AA apresentaram menor expressão de *HNRNPA1* do que aqueles com os outros genótipos (0,32 unidades arbitrárias (UAs) vs. 0,88 UAs;  $p=0,009$  e 1,07 UAs vs. 1,30 UAs,  $p=0,03$ , respectivamente). Células de melanoma portadoras do minigene com o alelo A da referida SNV apresentaram menor expressão do minigene *MITF*. Nossos resultados sugerem que a SNV *MITF* rs7623610 constitui importante fator herdado para o risco e prognóstico do MC.

**Palavras-chave:** Melanoma; Risco; Prognóstico; Variação Genética; *Fator de Transcrição Associado à Microftalmia*; Processamento de RNA.

## ABSTRACT

Our group of researchers identified thousands of single-nucleotide gene variants (SNVs) associated with altered risk of cutaneous melanoma (MC) through large-scale genotyping with DNA microarray (SNV array 6.0, Affymetrix®). The SNV *MITF* rs7623610 (c.938-325G>A) stood out among them, because it is located in the splicing regulatory region of *MITF* gene, an important regulator of the melanogenesis pathway. Thus, the objectives of the study were to evaluate if the different genotypes of the referred SNV influence the risk of CM occurrence in a sample of adequate size, clinical and tumor aspects, the prognosis of patients, gene and protein expression of *MITF* and of *SF1* and *HNRNPA1* (splicing regulatory proteins) and the efficiency of the splicing mechanism. The genotypes of 247 MC patients and 280 controls were identified by real-time polymerase chain reaction (PCR). The RNA and protein samples from peripheral blood leukocytes from 41 patients and 83 controls were used to evaluate the expression of *MITF*, *SF1* and *HNRNPA1* by quantitative PCR and the protein content of controls by the western blotting technique. The splicing mechanism efficiency was evaluated by the minigene reporter assay in melanoma cell line. The differences between groups were assessed by multiple logistic regression, t-test, variance analysis, Mann-Whitney and Kruskal Wallis. The progression-free survival (SLP) and melanoma-specific survival (MSS) times were estimated using Kaplan-Meier and Cox methods. The frequency of *MITF* AA genotype was higher in patients than in controls (27.9% vs. 20.7%,  $p=0.02$ ). Individuals with the referred genotype were at about twice as likely the risk of developing MC than the others. *MITF* AA genotype was more common in patients with advanced stage tumors than the others (46.2% vs. 24.9%,  $p=0.007$ ). MSS was lower in patients with *MITF* AA genotype (77.1% vs. 90.1%,  $p=0.03$ ) and with GA or AA genotype (79.4% vs. 90.1%,  $p=0.04$ ). Patients or controls with *MITF* AA genotype presented lower expression of *HNRNPA1* than those with the other genotypes (0.32 arbitrary units (AUs) vs. 0.88 AUs;  $p=0.009$  and 1.07 AUs vs. 1.30 AUs,  $p=0.03$ , respectively). Melanoma cells carrying the minigene with the A allele of the referred SNV had lower expression of the *MITF* minigene. Our results suggest that SNV *MITF* rs7623610 is an important inherited factor for MC risk and prognosis.

**Keywords:** Melanoma; Risk; Prognosis; Genetic Variation; *Microphthalmia-Associated Transcription Factor*; RNA splicing.

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Representação de células malignas de melanoma cutâneo em processo de invasão das camadas cutâneas	19
<b>Figura 2.</b> Representação esquemática da classificação “ABCDE” para a diferenciação de nevo comum e melanoma cutâneo	22
<b>Figura 3.</b> Representação esquemática da via da melanogênese associada ao receptor de melanocortina 1	29
<b>Figura 4.</b> Representação esquemática do mecanismo do processamento do RNA mensageiro (RNAm) e de <i>splicing</i> alternativo	33
<b>Figura 5.</b> Representação esquemática da ligação das proteínas regulatórias do <i>splicing</i> fator de <i>splicing</i> 1 (SF1) e heteroribonucleoproteína heterogênea A1 (hnRNP A1) às regiões potencializadoras e silenciadoras	35
<b>Figura 6.</b> Etapas da seleção variante genética de base única (SNV) <i>MITF</i> rs7623610	37
<b>Figura 7.</b> Representação esquemática de um gráfico de pontos com as distribuições dos genótipos do polimorfismo <i>MITF</i> rs7623610	46
<b>Figura 8.</b> Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo para visualização dos fragmentos 5S, 18S e 28S referente ao RNA ribossômico	48
<b>Figura 9.</b> Representação esquemática dos minigenes inseridos no vetor de expressão pcDNA3.1+N-eGFP	55
<b>Figura 10.</b> Curvas de probabilidades de sobrevida livre de progressão dos 210 pacientes com melanoma cutâneo, estratificados por sexo, localização do tumor, índice de Breslow, nível de Clark e estágio clínico.	72

<b>Figura 11.</b>	Curvas de probabilidades de sobrevida livre de progressão dos 210 pacientes com melanoma cutâneo, estratificados pelos genótipos da SNV <i>MITF</i> rs7623610	73
<b>Figura 12.</b>	Curvas de probabilidades de sobrevida específica de melanoma dos 210 pacientes com melanoma cutâneo, estratificados por sexo, índice de Breslow, nível de Clark e estágio clínico.	74
<b>Figura 13.</b>	Curvas de probabilidades de sobrevida específica de melanoma dos 210 pacientes com melanoma cutâneo, estratificados pelos genótipos da SNV <i>MITF</i> rs7623610	75
<b>Figura 14.</b>	Expressão do gene <i>MITF</i> em amostras de leucócitos de sangue periférico de 37 pacientes estratificados por genótipos e alelos da variante <i>MITF</i> rs7623610	79
<b>Figura 15.</b>	Expressão do gene <i>HNRNPA1</i> em amostras de leucócitos de sangue periférico de 40 pacientes estratificados por genótipos e alelos da variante <i>MITF</i> rs7623610	81
<b>Figura 16.</b>	Expressão do gene <i>SFI</i> em amostras de leucócitos de sangue periférico de 41 pacientes estratificados por genótipos e alelos da variante <i>MITF</i> rs7623610	83
<b>Figura 17.</b>	Expressão do gene <i>MITF</i> em amostras de leucócitos de sangue periférico de 74 controles estratificados por genótipos e alelos da variante <i>MITF</i> rs7623610	85
<b>Figura 18.</b>	Expressão do gene <i>HNRNPA1</i> em amostras de leucócitos de sangue periférico de 83 controles estratificados por genótipos e alelos da variante <i>MITF</i> rs7623610	87
<b>Figura 19.</b>	Expressão do gene <i>SFI</i> em amostras de leucócitos de sangue periférico de 63 controles estratificados por genótipos e alelos da variante <i>MITF</i> rs7623610	89
<b>Figura 20.</b>	Níveis da proteína MITF de acordo com a variante <i>MITF</i>	92

rs7623610 em amostras de leucócitos de sangue periférico de 9444 indivíduos controles por *western blotting*

- Figura 21.** Níveis da proteína hnRNP A1 de acordo com a variante *MITF* rs7623610 em amostras de leucócitos de sangue periférico de 40 indivíduos controles por *western blotting* 94
- Figura 22.** Níveis da proteína SF1 de acordo com a variante *MITF* rs7623610 em amostras de leucócitos de sangue periférico de 40 indivíduos controles por *western blotting* 96
- Figura 23.** Placa de Petri contendo meio de cultura LB ágar e colônias de bactérias *E. coli* DH5 $\alpha$ . 97
- Figura 24.** Representação dos produtos gerados pelos distintos minigenes expressando as variantes G e A da SNV rs7623610 do gene *MITF* 98

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
<b>Tabela 1.</b> Símbolos dos genes, sequência dos iniciadores, concentração ideal de cada iniciador e eficiência das curvas de fluorescência de cada um dos referidos genes	51
<b>Tabela 2.</b> Frequências das distribuições dos 247 pacientes com melanoma cutâneo e 280 controles de acordo com as características clínicas	60
<b>Tabela 3.</b> Frequências das distribuições dos 247 pacientes com melanoma cutâneo de acordo com os aspectos do tumor	61
<b>Tabela 4.</b> Frequências dos genótipos do polimorfismo <i>MITF</i> rs7623610 em 247 pacientes com melanoma cutâneo e 280 controles	64
<b>Tabela 5.</b> Frequências dos genótipos do polimorfismo <i>MITF</i> rs7623610 em 247 pacientes com melanoma cutâneo de acordo com as características clínicas	66
<b>Tabela 6.</b> Frequências dos genótipos do polimorfismo <i>MITF</i> rs7623610 em 247 pacientes com melanoma cutâneo de acordo com as características do tumor	68
<b>Tabela 7.</b> Sobrevida livre de progressão e sobrevida específica de melanoma dos 210 pacientes com melanoma cutâneo, estratificados por aspectos clínicos, tumorais e genótipos do polimorfismo <i>MITF</i> rs7623610 em análise univariada e multivariada de Cox	76
<b>Tabela 8.</b> Expressão gênica do <i>MITF</i> de 37 amostras dos leucócitos de sangue periférico de pacientes de acordo com os genótipos e alelos da variante <i>MITF</i> rs7623610	78
<b>Tabela 9.</b> Expressão gênica do <i>HNRNPA1</i> de 40 amostras dos leucócitos de sangue periférico de pacientes de acordo com os genótipos e alelos da variante <i>MITF</i> rs7623610	80
<b>Tabela 10.</b> Expressão gênica do gene <i>SFI</i> de 41 amostras dos leucócitos	82

de sangue periférico de pacientes de acordo com os genótipos e alelos da variante *MITF* rs7623610

<b>Tabela 11.</b>	Expressão gênica do <i>MITF</i> de 74 amostras dos leucócitos de sangue periférico de controles de acordo com os genótipos e alelos da variante <i>MITF</i> rs7623610	84
<b>Tabela 12.</b>	Expressão gênica do <i>HNRNPA1</i> de 83 amostras dos leucócitos de sangue periférico de indivíduos saudáveis de acordo com os genótipos e alelos da variante <i>MITF</i> rs7623610	86
<b>Tabela 13.</b>	Expressão gênica do <i>SF1</i> de 63 amostras dos leucócitos de sangue periférico de indivíduos saudáveis de acordo com os genótipos e alelos da variante <i>MITF</i> rs7623610	88
<b>Tabela 14.</b>	Especificações dos anticorpos primários e secundários utilizados na técnica de <i>western blotting</i> e as concentrações de uso obtidas após padronização	90
<b>Tabela 15.</b>	Quantificação relativa da proteína MITF de 44 amostras dos leucócitos de sangue periférico de indivíduos saudáveis de acordo com os genótipos da variante <i>MITF</i> rs7623610	91
<b>Tabela 16.</b>	Quantificação relativa da proteína hnRNP A1 de 40 amostras dos leucócitos de sangue periférico de indivíduos saudáveis de acordo com os genótipos da variante <i>MITF</i> rs7623610	93
<b>Tabela 17.</b>	Quantificação relativa da proteína SF1 de 40 amostras dos leucócitos de sangue periférico de indivíduos saudáveis de acordo com os genótipos a variante <i>MITF</i> rs7623610	95

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
A	Base nitrogenada adenina
ACTB	Actina beta
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
bHLH-LZ	Domínio <i>basic helix-loop-helix leucine zipper</i>
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
CCD	<i>Charge-Coupled Device</i>
cDNA	DNA complementar
C <sub>24</sub> H <sub>39</sub> NaO <sub>4</sub>	Desoxicolato de sódio
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
COMMAD	Coloboma; Osteopetrose; Microftalmia; Macrocefalia; Albinismo; Surdez
Ct	<i>Cycle threshold</i>
CT	Tomografia computadorizada
DAVID	<i>Visualization and Integrated Discovery</i>
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMEM	Meio de cultura <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
EDTA	Anticoagulante ácido etilenodiamino tetracético
ESE	<i>Exon splicing enhancer</i>
ESS	<i>Exon splicing silencer</i>
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FV	Fase de crescimento vertical
FR	Fase de crescimento radial
g	Gramma
G	Base nitrogenada guanina

GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
HR	<i>Hazard ratio</i>
HW	Hardy-Weinberg
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IC	Intervalo de confiança
ICNIRP	Comissão internacional de proteção à radiação não-ionizante
IFN	Interferon
INCA	Instituto Nacional de Câncer
ISE	<i>Intron splicing enhancer</i>
ISS	<i>Intron splicing silencer</i>
kDa	Kilodaltons
KM	Kaplan-Meier
L	Litro
LDH	Enzima lactato desidrogenase
LiCl	Cloreto de lítio
M	Molar
MC	Melanoma cutâneo
mg	Miligrama
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de magnésio
MITF	<i>Microphthalmia associated transcription fator</i>
mL	Mililitro
mM	Milimolar
N	Número
NaCl	Cloreto de sódio
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	Ortovanadato de sódio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	Nanograma
nM	Nanomolar
OR	<i>Odds ratio</i> (razão das chances)
pA	Cauda poli-A

pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PET- CT	<i>Positron Emission Tomography - Computed Tomography</i>
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
$R^2$	Coeficiente de correlação de Pearson
RIPA	Ensaio de radioimunoprecipitação
RNA	Ácido ribonucleico
RNA <sub>m</sub>	RNA mensageiro
rpm	Rotação por minuto
rs	Número de referência da variante genética
RT-PCR	Reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SEM	Sobrevida específica de melanoma
SFB	Soro fetal bovino
SK-MEL-28	Linhagem celular humana de melanoma maligno
SLP	Sobrevida livre de progressão
SNP	Polimorfismo gênico de base única
SNV	Variante genética de base única
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
<i>Taq</i>	Enzima polimerase <i>Termus aquaticus</i>
TE	Tampão Tris-EDTA
UA	Unidade arbitrária
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta do tipo A
UVB	Ultravioleta do tipo B
V	Voltagem elétrica
vs	<i>versus</i>
$\chi^2$	Qui-quadrado

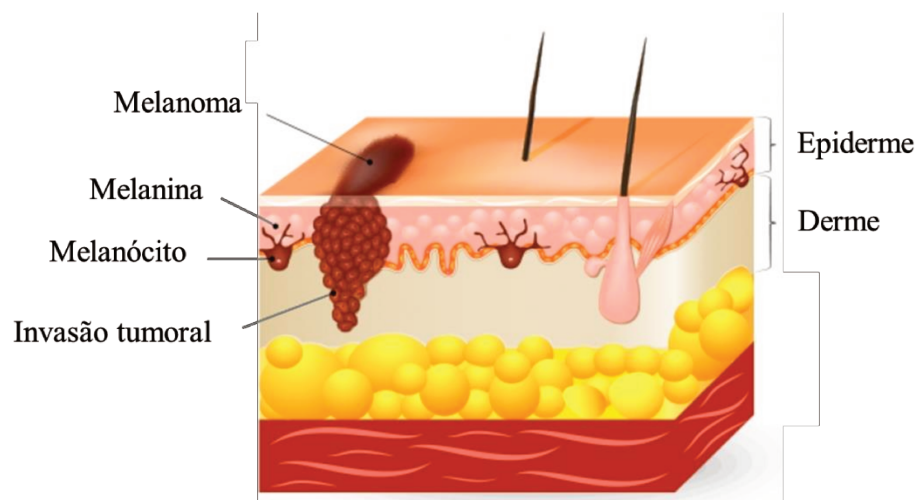
## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>39</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>40</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>59</b>
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>99</b>
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>108</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>109</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>137</b>

## INTRODUÇÃO

### Considerações iniciais

O melanoma cutâneo (MC) se origina da transformação maligna dos melanócitos, que são células localizadas na camada basal da epiderme (Schadendorf & Hauschild, 2014). Os melanócitos produzem a melanina, que é o pigmento que determina a cor da pele, dos olhos e dos cabelos (Schadendorf & Hauschild, 2014) (**Figura 1**). A melanina tem um papel importante na proteção do DNA das células da pele contra a ação nociva da radiação ultravioleta (UV) emitida pelo sol (Jhappan *et al.*, 2003).



**Figura 1.** Representação de células malignas de melanoma cutâneo em processo de invasão das camadas cutâneas (epiderme e derme) e do pigmento melanina produzido pelos melanócitos (Adaptado de *Skin & Cancer Foundation Inc.*, 2018)

As taxas de incidência mundiais de MC variam nas diferentes populações do mundo (Ferlay *et al.*, 2013). De acordo com os dados do Projeto Globocan da Agência Internacional de Pesquisa em Câncer recentemente publicados, foram estimados para o ano de 2018 cerca de 288 mil novos casos de MC, sendo 151 mil em homens e 137 mil em mulheres e o número esperado de mortes pela doença é de 61 mil indivíduos (Bray *et al.*, 2018). Os continentes que possuem as maiores taxas de incidência de MC a cada 100 mil habitantes, em ordem decrescente são, respectivamente, a Oceania, seguida da Europa, Américas, África e Ásia (Bray *et al.*, 2018).

Segundo dados da Sociedade Americana de Câncer, foram estimados cerca de 91 mil novos casos de MC nos Estados Unidos para o ano de 2018, sendo aproximadamente 55 mil em homens e 36 mil em mulheres, enquanto que o número de mortes esperado é de 9,3 mil indivíduos (*American Cancer Society*, 2018).

No Brasil, os tumores de pele são os mais incidentes e representam 28,5% de todos os tumores malignos (Instituto Nacional de Câncer, 2018). Os do tipo melanoma apresentam baixa incidência, aproximadamente 4% das neoplasias de pele no país, no entanto, possuem elevada taxa de letalidade devido ao seu potencial metastático (Instituto Nacional de Câncer, 2018) e a refratariedade à terapêutica medicamentosa (Livingstone *et al.*, 2012). Para o biênio 2018/2019, o Instituto Nacional de Câncer estima para o Brasil cerca de 6,2 mil novos casos de MC, sendo 2,9 mil em homens e 3,3 mil em mulheres e as maiores taxas de incidência por 100 mil habitantes encontram-se na região sul do Brasil (Instituto Nacional de Câncer, 2018).

### **Aspectos clínicos**

As taxas de incidência do MC são maiores conforme a idade aumenta, sendo a maioria dos casos diagnosticada entre 50 a 79 anos (Fernandes & Calmon, 2011). A incidência também é maior em homens do que em mulheres (Siegel *et al.*, 2016). Isso se deve ao fato das mulheres serem diagnosticadas mais precocemente que os homens (58 vs. 65 anos, respectivamente) (Howlader *et al.*, 2014) e seus tumores são diagnosticadas mais em estágio localizado, além disso, ambos os gêneros refletem diferenças na exposição aos raios UV em atividades recreativas e ocupacionais (Miller *et al.*, 2016).

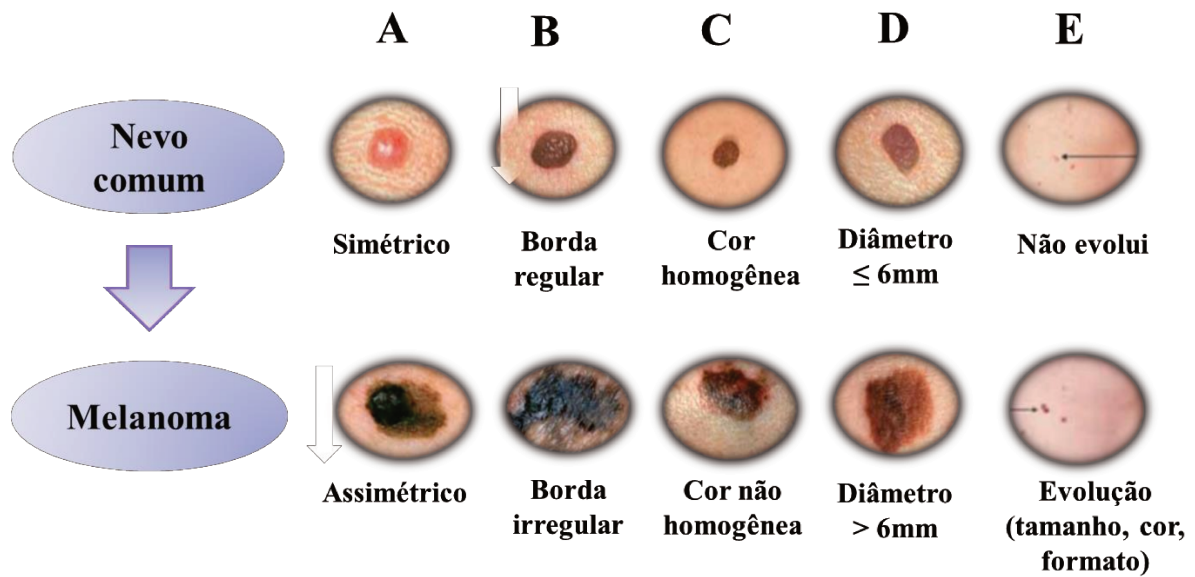
O MC acomete predominantemente indivíduos com pele, cabelos e olhos claros, presença de nevos atípicos e efélides, incapacidade de bronzeamento e propensão a queimaduras, quando expostos ao sol (Gandini *et al.*, 2005a; Gandini *et al.*, 2005b; Gandini *et al.*, 2005c). Considerando a ancestralidade da população brasileira, as taxas de incidência de MC são maiores para aqueles indivíduos descendentes da população europeia (Bakos *et al.*, 2009).

### Aspectos do tumor

A localização primária do MC em homens caucasianos é mais frequente no tronco, principalmente no dorso, e em mulheres, nos membros inferiores, excluindo-se os pés (Stanienda-Sokól *et al.*, 2017). Enquanto que, para as populações africanas e asiáticas, as regiões mais frequentes do MC são as palmo-plantares, o leito ungueal e as mucosas (Caini *et al.*, 2009).

O diagnóstico do MC é realizado por meio da exérese da lesão, pela qual os médicos removem todo o tumor, método conhecido como biópsia excisional (Balch *et al.*, 2001) e os fragmentos tumorais são incluídos em parafina e submetidos à avaliação histológica por patologistas (Slingluff *et al.*, 2011), a partir disso, o MC pode ser classificado em quatro subtipos histológicos principais: o extensivo superficial, o nodular, o lentigo maligna e o lentiginoso acral (Rastrelli *et al.*, 2013).

Para auxiliar no diagnóstico da doença, a classificação ABCDE é utilizada mundialmente e determina características presentes em nevos comuns, por exemplo, a coloração uniforme, o formato chato ou levemente elevado, sendo redondos ou ovais e durante muitos anos mantêm sua cor, a forma e o tamanho (Balch *et al.*, 2009). Enquanto que sua transformação maligna pode gerar outra lesão, o MC, que apresenta características como assimetria (A), bordas irregulares (B), coloração de diferentes tons em sua extensão (C), diâmetro maior que 6 mm (D) e é considerada uma lesão que evolui ao longo do tempo em relação à cor, a forma e o tamanho (E) (*The Skin Cancer Foundation*, 2018) (**Figura 2**). Além disso, deve ser observada sua textura, se há a presença de descamação, ulceração, sangramento e prurido (Giorgi *et al.*, 2012).



**Figura 2.** Representação esquemática da classificação “ABCDE” para a diferenciação de nevo comum e melanoma cutâneo (Adaptado de: *The Skin Cancer Foundation*, 2018)

Inicialmente, o tumor apresenta fase de crescimento radial e, em seguida, fase de crescimento vertical com invasão das camadas cutâneas, e isso pode resultar na disseminação do tumor pelas vias linfática e hematogênica, as chamadas metástases (Miller *et al.*, 2006), sendo que as principais ocorrem na região cerebral (Galli *et al.*, 2019). Para verificação dos níveis de invasão do tumor na pele, foram propostos cinco níveis de invasão por Clark (1969) (Clark *et al.*, 1969). Assim, o nível I é representado pelo melanoma *in situ*, com crescimento apenas na camada da epiderme, no nível II há invasão de células do tumor para a derme papilar, no nível III elas se acumulam na interface entre a derme papilar e a reticular, no nível IV há invasão da derme reticular e no nível V ocorre invasão da camada subcutânea (Clark *et al.*, 1969).

Em decorrência da subjetividade da classificação pelo nível de invasão, foi desenvolvida uma medida do tumor mais objetiva (Breslow & Macht, 1978). A medida da espessura do tumor por Breslow mede a capacidade do tumor em invadir a derme e o tecido subcutâneo em milímetros (mm) (Downing *et al.*, 2008), por meio da dimensão vertical da lesão, destacando-se o ponto mais profundo de invasão até o topo da camada da epiderme (Breslow, 1970). Esse procedimento foi realizado por meio de uma ocular micrométrica para avaliar os pontos de corte: menor que 0,76 mm; 0,76 a 1,49 mm; 1,50 a 2,49 mm; 2,50 a 4,00 mm e maior que 4,00 mm (Breslow, 1970).

Recentemente, o *Melanoma Staging Committee* da *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) revisou o sistema de estadiamento para o MC, com o intuito de incorporar fatores clínicos e patológicos que refletiam a biologia do tumor (Balch *et al.*, 2000). Assim, os especialistas passaram a utilizar os seguintes pontos de corte para o índice de Breslow: menor que 1,00 mm; 1,01 mm a 2,00 mm; 2,01 a 4,00 mm e superior a 4,00 mm (Balch *et al.*, 2009). Ambos os níveis de Clark e os índices de Breslow são utilizados como fatores isolados de maior impacto no prognóstico dos pacientes com MC e compõem aspectos essenciais na determinação do estágio em que o tumor se encontra ao diagnóstico (Spatz *et al.*, 2010).

O principal sistema de estadiamento utilizado para a determinação do prognóstico e da terapêutica adequada a ser ministrada para pacientes com o MC é o TNM, que considera a extensão do acometimento do tumor na pele e tecidos adjacentes (T), a presença ou não de ulceração no tumor (a, b) e a identificação de metástases para linfonodos regionais (N) ou distantes (M). Deste modo, a classificação por estadiamento clínico é definida por: 0, Ia, Ib, IIa, IIb, IIc, III e IV e por estadiamento patológico: 0, Ia, Ib, IIa, IIb, IIc, IIIa, IIIb, IIIc, IIId e IV, segundo recomendações do *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) (Amin *et al.*, 2017). A primeira classificação é utilizada para os pacientes diagnosticados com melanoma antes do tratamento e definida a partir de aspectos dos exames físico e complementar, da história clínica e sintomas e da análise da biópsia, enquanto que a segunda classificação é utilizada para os pacientes em que a cirurgia foi a primeira forma definitiva de tratamento e baseia-se nos achados cirúrgicos e no exame anatomopatológico (Instituto Nacional de Câncer, 2018).

A porcentagem de pacientes que vive cinco anos após o diagnóstico é chamada de taxa de sobrevida (Balch *et al.*, 2001). No Brasil, as taxas de sobrevivência em cinco anos para pacientes com MC diagnosticados com tumores em estágio I são de 91,4%, em estágio II de 70,1%, em estágio III de 46,5% e em estágio IV de 26,1% (Vazquez *et al.*, 2015). A melhoria na eficácia da prevenção da doença, como também ao diagnóstico precoce, maior acessibilidade a tratamentos adequados e diferenças individuais na biologia do câncer, refletem em maiores taxas de sobrevida para pacientes com MC (De Angelis *et al.*, 2014).

As tentativas de prevenção e diagnóstico precoce são primordiais para o MC, uma vez que a detecção de lesão em estágio inicial pode ser curável mas, com a presença de metástases, o tumor torna-se praticamente fatal (Swetter *et al.*, 2012).

Assim, dentre as modalidades terapêuticas para portadores de MC, estão a excisão cirúrgica do tumor, a quimioterapia, a radioterapia e a imunoterapia (Testori *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2016). A modalidade terapêutica a ser escolhida depende do nível de acometimento das camadas cutâneas e do estágio em que o tumor se encontra ao diagnóstico (Howlader *et al.*, 2015). Além disso, a excisão cirúrgica tumoral pode ser acompanhada da ampliação de margens, por meio da qual uma porção da pele próxima ao tumor é retirada para análise, com o intuito de verificar a presença ou ausência de formação tumoral na região (Balch *et al.*, 2001). Ainda, a linfadenectomia pode ser realizada para a retirada dos gânglios linfáticos próximos ao tumor, se os mesmos estiverem comprometidos por células tumorais (Balch *et al.*, 2001).

### **Aspectos ambientais e constitucionais**

O MC se desenvolve devido à interação entre fatores ambientais e genéticos (Gandini *et al.*, 2005b; Moan *et al.*, 2014).

O fator de risco ambiental mais estabelecido é a exposição aos raios UV do sol (Moan *et al.*, 2014), principalmente na infância (Gandini *et al.*, 2005b). A radiação UV do tipo A (UVA) corresponde a mais de 90% da radiação solar, responsável por danificar o DNA indiretamente pela formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Mouret *et al.*, 2012). As EROs induzem processos celulares que incluem formação de radicais livres que alteram a estrutura e permeabilidade da membrana plasmática celular, promovem danos no DNA e apoptose (morte celular programada) (Tedesco *et al.*, 1997). Enquanto que a radiação UV do tipo B (UVB) é absorvida diretamente pela epiderme e danifica o DNA das células do epitélio da pele (queratinócitos) e os melanócitos, devido à formação de dímeros de pirimidina ciclobutano e fotoprodutos de pirimidina-pirimidona, que alteram a estrutura do DNA (Svobodova *et al.*, 2011).

Os danos diretos e indiretos ao DNA podem ser reparados, estabelecendo-se a função celular normal, ou permanecem e a célula prossegue para a divisão, podendo sofrer apoptose e ser eliminada do tecido, prevenindo a formação de células neoplásicas (Mitchell *et al.*, 1999). Assim, o reparo de danos ao DNA é necessário para manter a integridade genômica e assim, evitar o início de processos fotocarcinogênicos (Sarasin & Kauffmann, 2008).

Para indivíduos suscetíveis, com a cor de pele, dos olhos e dos cabelos claros, a radiação UV também pode induzir a formação de nevos na pele, e o número elevado destes foi associado à maior exposição solar (Gandini *et al.*, 2005a). O risco para o desenvolvimento do MC pode aumentar em até sete vezes em indivíduos que possuem mais de 100 nevos (Gandini *et al.*, 2005a).

Indivíduos com a cor de pele mais escura produzem mais melanina, razão pela qual têm menos risco de desenvolver o câncer de pele (Balch *et al.*, 2001). Em contraste, a frequência do MC é maior em indivíduos com a cor da pele branca, do gênero masculino e expostos à luz solar natural ou artificial (Howlader *et al.*, 2015). Além disso, indivíduos com a cor do cabelo e dos olhos claros, com histórico familiar de melanoma (Gandini *et al.*, 2005c), com alta quantidade de sardas na pele (Grulich *et al.*, 2007) e que realizaram bronzeamento artificial na infância ou na adolescência, possuem maior suscetibilidade em desenvolver a doença (Gandini *et al.*, 2014).

Em adição, outro fator de risco para o MC é o fototipo cutâneo considerado inicial (I e II), por meio do qual é possível distinguir diferentes fenótipos de pigmentação da pele como também de sensibilidade ao sol e essa classificação foi proposta por Fitzpatrick, em 1988, que descreve fototipos de I a VI, de acordo com a pigmentação após exposição à radiação UV (Plensdorf; Martinez, 2009). Assim, indivíduos com fototipo cutâneo I possuem cor de pele branca, muito sensível ao sol e nunca bronzeiam; II possuem pele branca, sensível ao sol e sujeita a bronzear; III possuem pele morena clara; IV, pele morena moderada; V, pele morena escura e VI, pele negra (Fitzpatrick, 1988).

### **Aspectos genéticos**

Interações de eventos endógenos e exógenos ocorrem para que haja a proliferação anormal dos melanócitos em melanoma e grande progresso tem sido feito para a descoberta da base genética para a formação do MC (Bastian, 2014).

A primeira evidência genética do surgimento do MC se deve a alterações na linhagem germinativa, constituindo o melanoma hereditário (Lesueur *et al.*, 2008). Um exemplo de síndrome hereditária que pode predispor indivíduos ao MC é o Xeroderma Pigmentoso, por meio da qual pode ocorrer a deficiência do mecanismo de reparo de DNA por excisão de nucleotídeos, impossibilitando os indivíduos de corrigir esses danos causados pela radiação UV, tornando-os suscetíveis ao desenvolvimento do MC (Knudson, 2002). Ao passo que na síndrome de Li-Fraumeni, mutações herdadas no gene *TP53* podem resultar em acúmulos de danos genéticos promovendo a formação de tumores na pele (Curiel-

Lewandrowski *et al.*, 2011). A proteína p53, codificada pelo referido gene, é um fator de transcrição que é ativado quando há sinais de danos celulares e pode interromper a proliferação de células alteradas, agindo diretamente no controle do ciclo celular (Box & Terzian, 2008). Em adição, mutações em genes supressores tumorais de alta penetrância, que diz respeito à expressividade do gene em desenvolver determinado fenótipo (Eggermont *et al.*, 2014), como o *CDKN2A* e o *CDK4*, podem ser identificadas entre 20 e 40% de casos de tumor hereditário (Udayakumar & Tsao, 2009).

Aproximadamente 10% dos pacientes com MC apresentam histórico familiar da doença (dois ou mais parentes próximos), indicando o envolvimento de genes de baixa prevalência e alta penetrância (Eggermont *et al.*, 2014). Enquanto que cerca de 90% dos casos compreendem os MCs esporádicos, originados de mutações somáticas acumuladas em indivíduos ao longo da vida (Fernandez-Pol & Douglas, 2000), sendo os alelos de alta prevalência e baixa penetrância a causa mais frequente desse tipo de tumor (Eggermont *et al.*, 2014). Além disso, os MCs esporádicos podem ser resultantes de interações genéticas com agentes mutagênicos secundários, como a radiação UV (Bastian, 2014).

A transformação melanocítica ocorre após um acúmulo sequencial de alterações genéticas e moleculares (Palmieri *et al.*, 2009). O MC possui uma maior carga mutacional quando comparado aos tumores de pele (Hodis *et al.*, 2012; Alexandrov *et al.*, 2013). Deste modo, uma avaliação do perfil molecular de pacientes com MC pode ser realizada a fim de se propor uma classificação que revele quais genes ou vias estão sendo afetadas (Palmieri, *et al.*, 2013).

Apesar de alguns mecanismos da patogênese do MC não terem sido ainda desvendados, existem diversas vias que controlam a proliferação, divisão e morte celulares, e genes relacionados à sua tumorigênese (Palmieri, *et al.*, 2013). Variações em genes que controlam essas vias podem levar a mudanças no microambiente tumoral, na angiogênese, em processos inflamatórios (Sever & Brugge, 2015) e em genes envolvidos na regulação da progressão do ciclo celular e na sobrevivência da célula, associadas à patogênese do melanoma (Curtin *et al.*, 2005). Como exemplo, mutações somáticas nos genes *BRAF* e *NRAS*, estão presentes em aproximadamente 70% dos MCs (Eggermont *et al.*, 2014).

Um tipo de variação genética herdada, chamada de variante genética de base única (SNV), presente numa frequência maior que um e menor que 99% na população geral, é caracterizada pela alteração de uma única base do DNA, determinando assim, diferenças fenotípicas entre indivíduos (Parmigiani & Camargo, 2004). Diferenças individuais geradas por SNVs em genes que participam do processo de pigmentação cutânea e bronzeamento em resposta à radiação UV, como nos genes *KIT* (rs759083 e rs13135792), *MYO7A* (rs3758708), *ADAMTS20* (rs1510521), *TYR* (rs17793678, rs1126809 e rs1393350), *MCR1* (rs1805007, rs1805008 e rs1805009); relacionados ao controle do ciclo celular, como o gene *PIGU* (rs1885120 e rs910873) e à diferenciação celular, como o gene *SLC45A2* (rs35405 e rs16891982) (Chatzinasiou *et al.*, 2011; Ibarrola-Villava *et al.*, 2011), cujos alelos codificam quantidades distintas de proteínas ou proteínas com atividades funcionais variadas, estão associados com maior suscetibilidade ao desenvolvimento do MC (Chatzinasiou *et al.*, 2011; Ibarrola-Villava *et al.*, 2011).

### **Melanogênese**

Os melanócitos realizam o processo de produção e distribuição de melanina, denominado melanogênese (Lin & Fisher, 2007). A síntese da melanina ocorre em organelas denominadas melanossomos (Yamaguchi & Hearing, 2009). Quando a síntese de melanina está completa, os melanossomos maduros são transferidos através de projeções nos melanócitos à área perinuclear dos queratinócitos próximos, presentes na epiderme (Lin & Fisher, 2007; Park *et al.*, 2009), se posicionam sobre o núcleo e conferem proteção contra a exposição à radiação UV e consequentes danos ao DNA (Harrington *et al.*, 2011).

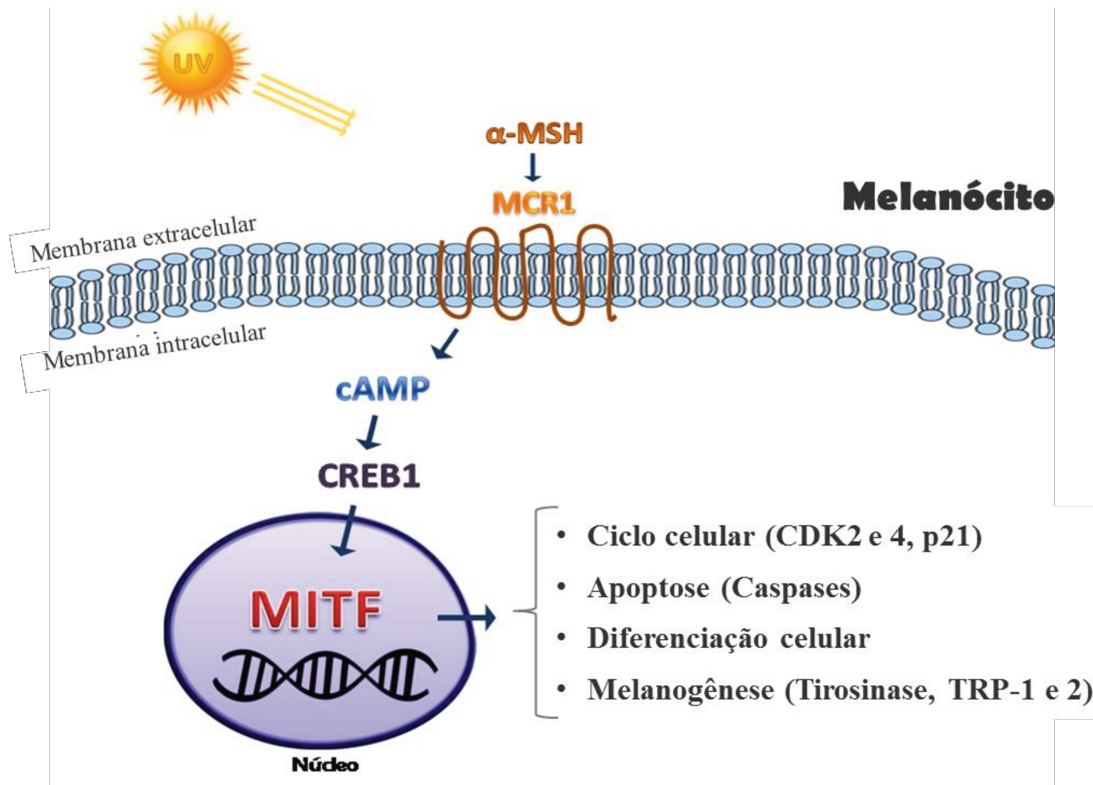
Nesse processo, podem ser formados dois tipos de melanina: a eumelanina (predomina a cor marrom ou preta), mais presente em indivíduos de pele escura, e a feomelanina (constitui a cor amarelada ou avermelhada), encontrada em indivíduos de pele e cabelos mais claros (Tsatmali *et al.*, 2002), já que a pigmentação da pele de cada indivíduo é determinada geneticamente pelo nível de melanina e pode ser regulada por fatores intrínsecos (endócrinos e inflamatórios) ou extrínsecos (radiação UV e drogas) (Costin & Hearing, 2007; Yamaguchi & Hearing, 2009).

O processo da melanogênese pode ser ativado por vias mediadas pela proteína quinase C (PKC), adenosina monofosfato cíclico (cAMP), quinases MAPK/ERK (MEK) e sítio de integração relacionado à Wingless (WNT) e podem ser ativadas de modo *upstream* por: receptor de tirosino quinase (KIT) (ligante: fator de célula-tronco (SCF)) e receptor de melanocortina 1 (MC1R) (ligantes: hormônio estimulante de melanócitos alfa ( $\alpha$ -MSH), hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) e a proteína estimulante agonista (ASP)) (D' Mello *et al.*, 2016).

Dentre essas vias, uma merece destaque, a que é mediada por cAMP, que é ativada da seguinte forma: os raios UV promovem a produção do  $\alpha$ MSH em queratinócitos, que por sua vez, estimulam o MC1R presente na membrana dos melanócitos, resultando em uma cascata de sinalização mediada por cAMP que estimula, por exemplo, o gene *CREB1* (proteína de ligação ao elemento responsivo cAMP) a ativar o gene *MITF* (fator de transcrição associado à microftalmia), que pertence a uma família de fatores de transcrição que está envolvida com a regulação do desenvolvimento, diferenciação, proliferação e sobrevivência dos melanócitos (Hsiao & Fisher, 2014) (**Figura 3**), como também está presente na patogênese e no desenvolvimento do melanoma (Yokoyama *et al.*, 2011).

O MITF induz a síntese de melanina dentro dos melanossomos e a proliferação dos melanócitos (Harrington *et al.*, 2011; Nasti & Timares, 2015), por meio da transcrição de genes como o da tirosinase (*TYR*), das proteínas 1 e 2 relacionadas à tirosinase (*TRP-1* e *TRP-2*) (responsáveis pela formação do pigmento melanina), das ciclinas dependentes de quinase 2 e 4 (*CDK2* e *CDK4*) e do *p21* (proliferação dos melanócitos) (Levy *et al.*, 2006).

O silenciamento da expressão da proteína CREB1 em linhagens de melanoma metastático humano (A375SM e C8161-c9) suprimiu o MITF e o crescimento do tumor (Dobroff *et al.*, 2009). Os níveis celulares de MITF são a base para a heterogeneidade do melanoma, pois altos níveis da proteína promovem a proliferação e a diferenciação de células tumorais, em contrapartida, os baixos níveis permitem invasão e metástases (Vachtenhein & Ondrusová, 2015).



**Figura 3.** Representação esquemática da via da melanogênese associada ao receptor de melanocortina 1 (adaptada de Rodriguez & Setaluri, 2014). Os raios ultravioletas (UV) promovem a produção do hormônio estimulante de melanócitos alfa ( $\alpha$ -MSH) em queratinócitos, que por sua vez, estimulam o receptor de melanocortina 1 (MCR1) dos melanócitos, resultando numa sinalização mediada por adenosina monofosfato cíclico (cAMP) que estimula o gene *CREB1* (proteína de ligação ao elemento responsivo cAMP), que ativa o gene que codifica um fator de transcrição associado à microftalmia (*MITF*), este que induz a transcrição de genes, como da tiosinase e das proteínas 1 e 2 relacionadas à tiosinase (*TYR*, *TRP-1* e *TRP-2*), responsáveis pela formação do pigmento melanina, da ciclina dependente de quinase 2 e 4 (*CDK2* e *CDK4*) e o *p21*, importantes na proliferação celular, diferenciação celular e as caspases na apoptose

## **MITF**

O gene *MITF* está localizado no braço curto do cromossomo 3 na região 13 (3p13) (Levy *et al.*, 2006) e está organizado em 10 éxons e nove íntrons (Hershey & Fisher, 2005; Hou & Pavan, 2008; Cheli *et al.*, 2010).

Há muitos anos, o fenótipo de microftalmia foi identificado em camundongos com olhos extremamente reduzidos e despigmentados, devido a um locus mutante, *mi*, que posteriormente foi chamado de *Mitf* (Hertwig, 1942). A falta de pigmentação nesses animais era causada pela falta de melanócitos e não por defeitos na via da melanogênese (Hodgkinson *et al.*, 1993). Além disso, uma mutação em heterozigose no gene *MITF* pode levar à síndrome autossômica dominante de Waardenburg tipo IIA, que é caracterizada por deficiência na pigmentação de olhos e cabelos, como também surdez (Hughes *et al.*, 1994). Uma mutação em homozigose no mesmo gene está associada à síndrome COMMAD, sendo a sigla correspondente ao fenótipo clínico que o paciente apresenta, como mau desenvolvimento dos olhos, osteopetrose, microftalmia, macrocefalia, albinismo e perda de audição (George *et al.*, 2016; Lewis, 2017).

Já é bem estabelecido que o gene *MITF* possui múltiplas isoformas, e que elas são expressas de distintos promotores do gene, em diferentes tecidos e perfis de expressão (Fuse *et al.*, 1996). A isoforma M, ou também conhecida como MITF-M é expressa quase exclusivamente em melanócitos (Fuse *et al.*, 1996). Todas as isoformas de MITF descritas compartilham um domínio de ligação de DNA *basic helix-loop-helix leucine zipper* (bHLH-Zip) (Levy *et al.*, 2006). Cada isoforma pode ser diferenciada por sequências N-terminais específicas, codificadas pelos primeiros éxons de cada uma, designados como: 1M, 1H, 1A, 1B, 1C, 1D, 1E e 1J, todas as isoformas compartilham da mesma região *downstream* de transativação e o domínio bHLH-LZ, codificados pelos éxons 2 a 9 (Hallsson *et al.*, 2007; Tsuchida *et al.*, 2009).

Diversos genes podem modular a expressão do *MITF* negativamente ou positivamente, contribuindo assim para a patofisiologia do melanoma (Wellbrock *et al.*, 2008). Um exemplo é o gene *BRAF*, responsável por controlar os níveis intracelulares da proteína MITF através de dois mecanismos opostos: indução da degradação proteica (redução direta de MITF) e estímulo de fatores de transcrição que aumentam a expressão da proteína (aumento indireto de MITF) (Wellbrock *et al.*, 2008). Em adição, sua atividade pode ser modulada positivamente pelo *CREB1* e pela *PKA* (proteína quinase A), que participam da via da melanogênese (Busca & Ballotti, 2000).

Após sua ativação pela proteína CREB1, o MITF passa a controlar a expressão de diversas enzimas de pigmentação, como a TYR, a TYRP1 e a TYRP2, e marcadores de diferenciação melanocítica (Lin & Fisher, 2007). Se há baixa atividade do MCR1, consequente de variantes genéticas em seu gene codificador, podem ser encontrados baixos níveis de cAMP e MITF e, como consequência, expressão fraca de TYR, levando a uma maior síntese de feomelanina, um pigmento mais claro (Nguyen & Fisher, 2018). De maneira oposta, alta atividade do MCR1, pode gerar elevados níveis de cAMP e MITF e, consequentemente, levar a alta expressão de TYR, e maior síntese do pigmento mais escuro eumelanina (Nguyen & Fisher, 2018).

Além do CREB1, outros fatores de transcrição já foram reportados na regulação transcricional do MITF, como o PAX3 (*paired box gene 3*), o SRY (*sex-determining region Y*), o SOX10 (*box-10*), o LEF1 (*lymphoid enhancer-binding factor 1*) e o ONECUT2 (*one cut domain 2*) (Kawakami & Fisher, 2017). E sua regulação pós-transcricional é modulada por meio de modificações químicas, como a fosforilação e ubiquitinação (Hsiao & Fisher, 2014). A fosforilação pode ser feita pela MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), RSK (*ribosomal S6 kinase*) e p38 (Hemesath *et al.*, 1998; Takeda *et al.*, 2000; Mansky *et al.*, 2002) e a ubiquitinação por c-Kit (*tyrosine-protein kinase Kit*) (Wu *et al.*, 2000), USP13 (*ubiquitin-specific protease 13*) (Zhao *et al.*, 2011) e UCHL1 (*ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1*) (Seo *et al.*, 2017). Existem também proteínas repressoras de sua atividade transcricional, como a PIAS3 (*protein inhibitor of activated STAT 3*) (Levy *et al.*, 2002), a FOXD3 (*forkhead box D3*), a POU3F2 (*POU Class 3 homeobox 2*), o TGF- $\beta$  (*transforming growth factor beta*) e a ALX3 (*aristaless-like homeobox 3*) (Kawakami & Fisher, 2017).

O MITF é considerado um mestre em regulação transcricional que orquestra processos de desenvolvimento e diferenciação na linhagem melanocítica, desde seus estágios iniciais (Nguyen & Fisher, 2018), principalmente pela transcrição das enzimas TYR, TYRP1 e TYRP2, responsáveis pela síntese do pigmento melanina (Lin & Fisher, 2007), como também MLANA/ MART1, SILV/ PMEL17/ GP100 (Du *et al.*, 2003), GPR143 (*G protein-coupled receptor 143*) e RAB27A (*member RAS oncogene family*) essenciais na maturação dos melanossomos (Hoek *et al.*, 2008; Cheli *et al.*, 2010).

Em adição, o MITF regula a transcrição de diversos genes essenciais no controle do ciclo celular, sobrevivência e diferenciação melanocítica, como a CDK2 (*cyclin-dependent kinase 2*), o TBX2 (*T-box transcription factor 2*), o  $p21^{Cip1}$ , o  $p16^{Ink4a}$ , o BCL2 (*B-cell lymphoma 2*) e a PDE4D3 (*phosphodiesterase 4D3*) (Hoek *et al.*, 2008; Cheli *et al.*, 2010). Além disso, regula o metabolismo e estresse oxidativo por meio de PGC1 $\alpha$  (*peroxisome*

*proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1  $\alpha$* ) e APEX1/REF1 (*apurinic/apurimidinic endonuclease I/redox factor 1*) (Liu *et al.*, 2009; Haq *et al.*, 2013).

O *MITF* é um modulador da proliferação em melanócitos (Carreira *et al.*, 2005). Altos níveis de expressão do *MITF* em linhagens celulares de melanoma MEL202, MEL501 e MELAN-A foram associados com a parada do ciclo celular na fase G1 (crescimento celular), através da indução de proteínas inibitórias do ciclo celular p16 e p21 (Carreira *et al.*, 2005; Loercher *et al.*, 2005).

Contudo, o papel do *MITF* na proliferação melanocítica é controverso, pois, dependendo do seu nível de atividade, pode promover ou inibir esse processo, de modo que o nível de atividade elevado promove diferenciação celular, o intermediário permite proliferação, o baixo confere um fenótipo invasivo e o ausente leva à senescência celular ou apoptose (Goding, 2011; Vachtenheim & Ondrusová, 2015). Além disso, há evidência de que a superexpressão do *MITF* provoque resistência a fármacos no tratamento do melanoma, tornando-os menos suscetíveis a inibidores direcionados (Müller, 2014).

Além disso, verificando-se a expressão do *MITF* em tecidos de tumor humano, a amplificação do gene *MITF* foi observada em 10% dos MCs primários e cerca de 20% em MCs metastáticos, contudo não houve amplificação nos tecidos de nevos benignos testados, indicando que ele possa apresentar função de oncogene (Garraway *et al.*, 2005), levando à formação de tumores, transformando o fenótipo celular normal de mortalidade para o de imortalidade (Yuspa, 1984).

Perfis moleculares são úteis para prever respostas ao tratamento dos pacientes com MC e existem estudos de perfis de expressão gênica que têm o intuito de classificar os tumores e definir o prognóstico (Sotiriou & Piccart, 2007). Contudo, a utilização de alterações genéticas como marcadores para o diagnóstico, prognóstico ou propostas terapêuticas é limitado (Shadendorf *et al.*, 2018).

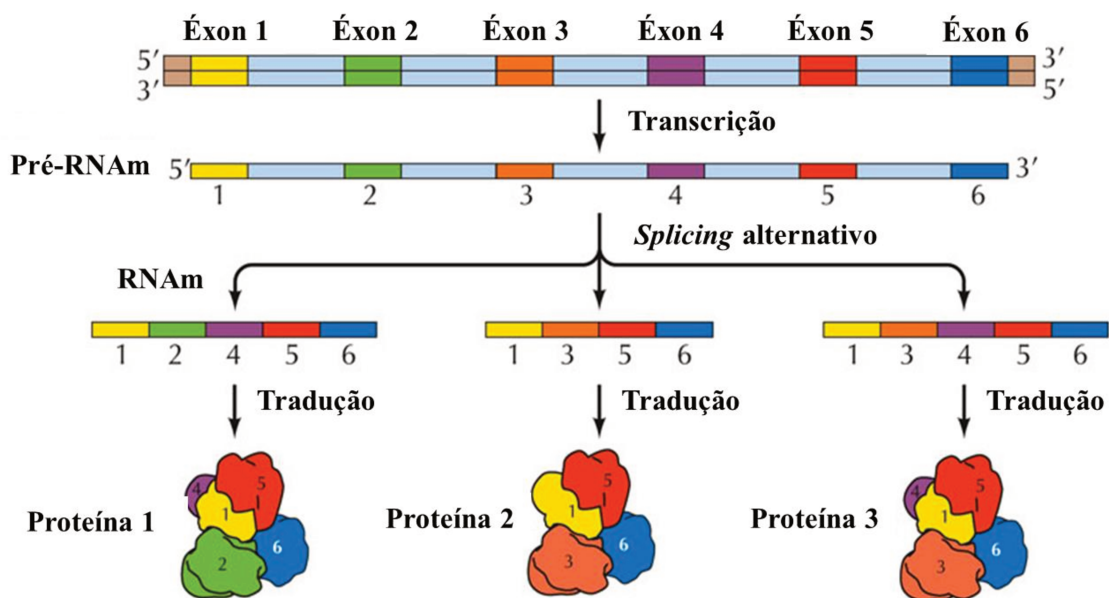
O único relato da variante de estudo SNV rs7623610 no gene *MITF* na literatura é o de Anno e colaboradores (2008), o qual identificou alelos em múltiplos loci em SNVs associados com diferenças de cor de pele, em indivíduos caucasianos dos Estados Unidos e mongólicos do Japão e os resultados para a SNV rs7623610 não foram significativos para nenhum grupo (Anno *et al.*, 2008). Foram identificadas SNVs no gene *MITF* em íntrons, aparentemente sem nenhum significado clínico: rs373660547 (G>A ou G>C), rs376704147 (C>T), rs766938558 (C>G ou C>T), rs766938558 (C>G ou C>T), rs779387274 (C>T), rs876657867 (A>G) (Duzkale *et al.*, 2013) rs181810413 (C>G), rs554738793 (G>A ou

G>T), rs886038272 (C>A) (Richards *et al.*, 2015) e rs1036051 (C>T) (Bandah-Rozenfeld *et al.*, 2010).

### Processamento do RNA mensageiro (RNAm) (*splicing*)

Os genes são submetidos ao mecanismo de *splicing*, pelo qual há a formação do RNAm maduro e consequente produção de proteínas (Pan *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008).

O processamento do RNAm compreende, de modo geral, quatro fases: (1) *capping*, (2) *splicing* alternativo, (3) clivagem e (4) poliadenilação. De modo que, o *capping* da porção final 5' do RNA permite a tradução do RNAm e o recrutamento de proteínas envolvidas com o *splicing* alternativo e a poliadenilação, como também evita a degradação do transcrito por 5' e 3' éxonucleases (Ramanathan *et al.*, 2016). O *splicing* alternativo do pré-RNAm é um mecanismo pós transcricional de regulação gênica, pelo qual um único gene pode codificar diversas isoformas de proteínas e isso aumenta a diversidade proteômica (Fu & Ares, 2014; Hinkle *et al.*, 2018) (**Figura 4**). A clivagem do pré-RNAm é realizada pela RNA Polimerase II, seguido da adição de uma cauda de adeninas ao final da porção 3' do pré-RNAm, para também prevenir sua degradação (Hinkle *et al.*, 2018).



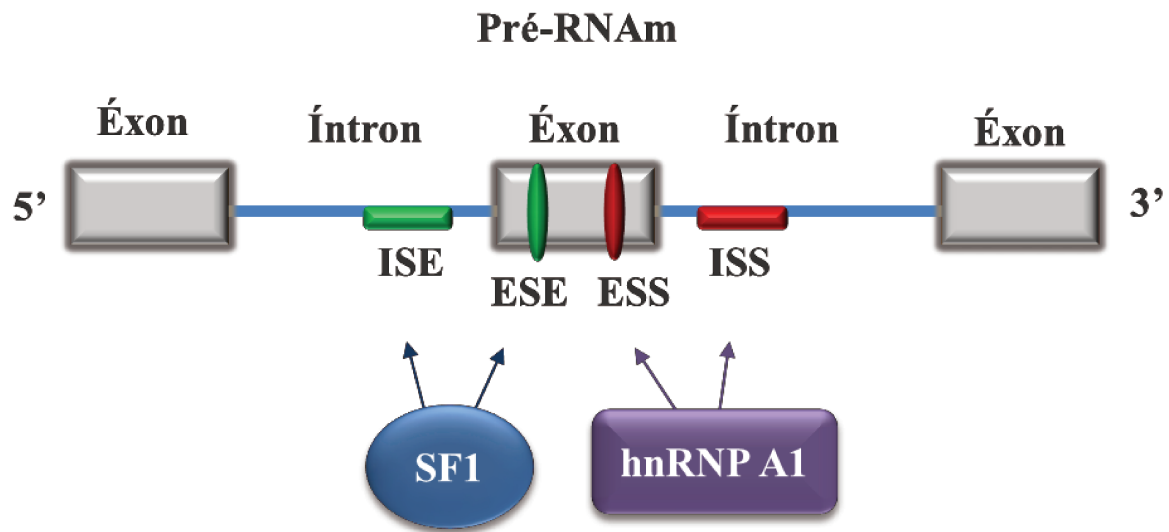
**Figura 4.** Representação esquemática do mecanismo do processamento do RNA mensageiro (RNAm) e de *splicing* alternativo. Esse processo consiste na remoção dos íntrons de um RNA recém-sintetizado (Pré-RNAm), seguido da junção dos éxons, estes que podem ser agrupados de maneiras distintas, gerando isoformas de proteínas. Os éxons estão representados pelos retângulos de cores amarela, verde, laranja, roxa,

vermelha e azul escura, e os íntrons pelos retângulos de cor azul clara (Adaptada de: Alberts *et al.*, 2002)

O *splicing* é realizado por um complexo de proteínas, como pequenas partículas de ribonucleoproteínas nucleares (snRNPs U1, U2, U4, U5 e U6) e mais de 200 outras proteínas (Nguyen *et al.*, 2015; Nguyen *et al.*, 2016; Wan *et al.*, 2016). Além disso, requerem elementos regulatórios *cis*, como também fatores *trans*, que se associam para dar início ao mecanismo de *splicing*, por meio da formação do spliceossomo (Wang & Burge, 2008; Wahl *et al.*, 2009; Matera *et al.*, 2014). Os elementos *cis* estão localizados em junções de éxons e íntrons nos sítios de *splicing* 5' e 3' e também no *branch point* (Wang & Burge, 2008).

Para que ocorra o *splicing* corretamente, existem sequências regulatórias que são essenciais para o reconhecimento dos sítios de *splicing* pelas proteínas reguladoras desse processo, estas que estão distintamente expressas nos mais diversos tecidos (Fu & Ares, 2012). Essas sequências estão presentes em éxons (*exonic splicing enhancers* (ESEs) e *exonic splicing silencers* (ESSs)) e em íntrons (*intronic splicing enhancers* (ISEs) e *intronic splicing silencers* (ISSs)) (Shepard & Hertel, 2009; Busch & Hertel, 2012). Duas famílias de proteínas regulatórias estão muito presentes nesse processo, as proteínas ricas em serina/arginina (SRs) e as ribonucleoproteínas heterogêneas nucleares (hnRNPs), que podem promover ou inibir o *splicing* (Shepard & Hertel, 2009; Busch & Hertel, 2012). Membros da família hnRNP não possuem o domínio rico em serina/arginina e tendem a promover a retirada de éxons, podem agir como repressores ou ativadores do *splicing* (Martinez-Contreras *et al.*, 2006; Martinez-Contreras *et al.*, 2007) (**Figura 5**).

Além destes, outros fatores de *splicing* (SFs) participam na modulação do RNAm, como a SF1, a qual reconhece uma sequência intrônica, chamada de *branch point*, interage com a mesma e dá início à formação do spliceossomo (Chen & Manley, 2009; Will & Luhrmann, 2011). A sequência *branch point* é um pouco divergente em mamíferos, sendo representada pelas bases 'YNCURAY', na qual 'Y' corresponde a uma pirimidina (C, T ou U), 'R' a uma purina (G ou A), 'N' a qualquer nucleotídeo, 'C' a citosina e 'A' a adenina (sublinhada) (Berglund *et al.*, 1997). A proteína SF1 pertence a uma família de proteínas que realizam transdução de sinais e ativam o RNA, assim mutações presentes em sítios de ligação dessas proteínas podem afetar o reconhecimento do *branch point* e consequentemente o *splicing* (Berglund *et al.*, 1997; Rain *et al.*, 1998) (**Figura 5**).



**Figura 5.** Representação esquemática da ligação das proteínas regulatórias do *splicing* fator de *splicing* 1 (SF1) e heteroribonucleoproteína heterogênea A1 (hnRNP A1) às regiões potencializadoras no íntron (ISE) e no éxon (ESE), inibitórias no íntron (ISS) e no éxon (ESS), presentes no RNA recém-sintetizado (Pré-RNA), por meio de análise *in silico* (Desmet *et al.*, 2009). Os éxons estão representados pelos quadrados de cor cinza, e os íntrons pela linha de cor azul escura

Vale comentar que mutações intrônicas, em sítios doadores ou aceptores de *splicing*, são comumente identificadas em cânceres, podendo afetar as sequências ESEs e ESSs em éxons (Supek *et al.*, 2014). Mutações presentes em sequências reguladoras do processamento do RNA de genes associados ao desenvolvimento do câncer, podem afetar os componentes centrais para que o *splicing* ocorra e a expressão desses genes (Karni *et al.*, 2007; Anczuków *et al.*, 2012; Jensen *et al.*, 2014), levando assim, à progressão tumoral (Singh & Eyras, 2017). Assim, a identificação dessas alterações é importante para a compreensão da biologia do tumor (Singh & Eyras, 2017).

Estudos já verificaram que alterações tanto no *splicing* constitutivo, como no alternativo, estão relacionadas com diversos tipos de câncer, incluindo o MC (Pan *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008, Danan-Gotthold *et al.*, 2015; Dvinge & Bradley, 2015).

Variantes localizados em íntrons de genes podem influenciar o mecanismo de *splicing* por meio da inserção, inibição ou aumento de ligação de proteínas regulatórias, como o fator de *splicing* 1 (SF1) e a ribonucleoproteína heterogênea A1 (hnRNP A1) (Pagani &

Baralle, 2004; Baralle & Baralle, 2005) e, assim, controlar a expressão de genes relacionados com o processo de carcinogênese (Murakami *et al.*, 2007).

A presença de SNVs foram associadas com a retenção de íntrons, principalmente em genes supressores tumorais (Jung *et al.*, 2015), como exemplo, o gene *MET* (*MET proto-oncogene*) em câncer de pulmão (Ma *et al.*, 2003; *Cancer Genome Atlas Research Network*, 2014) e o *NOTCH1* em leucemia linfóide crônica (Puente *et al.*, 2015). Ainda, a expressão alterada de proteínas regulatórias do *splicing* estão relacionadas à tumorigênese (Karni *et al.*, 2007; Karni *et al.*, 2008; Anczuków *et al.*, 2012; Zhang & Manley, 2013; Jensen *et al.*, 2014).

### Seleção da SNV de estudo

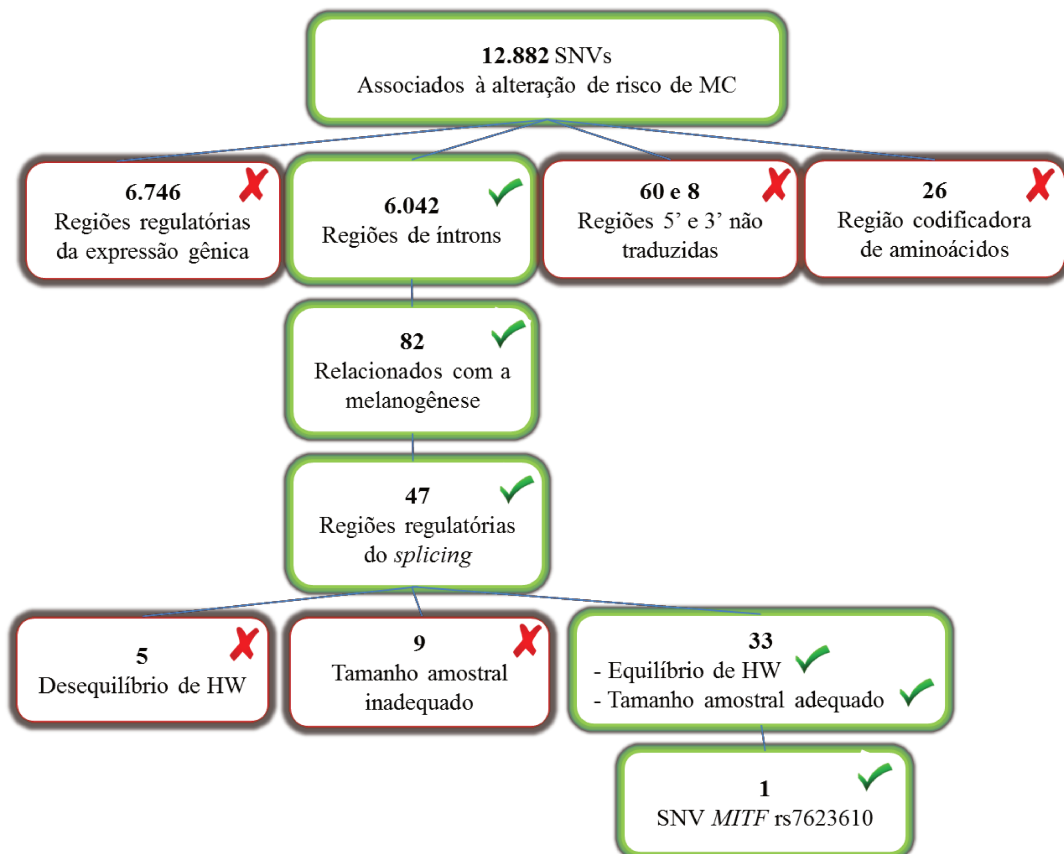
Anteriormente, o nosso grupo de pesquisadores identificou 12.882 SNVs associadas à alteração de risco de MC (Oliveira, 2017). O estudo foi conduzido em amostras de sangue periférico de 103 pacientes com MC e 103 controles por meio da genotipagem em larga escala com microarranjos de DNA (SNV array 6.0, Affymetrix®). Foram identificadas, pela primeira vez, 26 SNVs (0,2%) localizadas na região codificadora de aminoácidos, 8 (0,1%) e 60 (0,5%) SNVs localizadas em regiões 5'- e 3'- não traduzidas, respectivamente, 6.042 (46,9%) SNVs localizadas em regiões de íntrons e 6.746 (52,3%) em regiões regulatórias da expressão gênica (Oliveira, 2017) (**Figura 6**).

Com o presente estudo, damos continuidade ao estudo anterior, com a validação de parte dos resultados obtidos anteriormente em número substancialmente maior de indivíduos e com a caracterização dos papéis dos alelos da SNV selecionado.

Para restringir os marcadores genéticos identificados anteriormente pela genotipagem em larga escala, selecionamos inicialmente apenas os SNVs localizadas em íntrons de genes que atuam na melanogênese e que podem alterar o mecanismo de *splicing*, por meio dos bancos de dados *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID) (Huang *et al.*, 2009a; Huang *et al.*, 2009b), do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (Geer *et al.*, 2010); e do programa computacional *Human Splicing Finder* (Desmet *et al.*, 2009). Assim, selecionamos 82 das 6.042 SNVs localizadas em íntrons, que estiveram em genes relacionados com a melanogênese, a seguir 47 (das 82 SNVs) estiveram localizadas em regiões de regulação do *splicing* (**Figura 6**).

A seguir, foram selecionadas as SNVs em que os genótipos dos indivíduos saudáveis estiveram em equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW) e cujos tamanhos amostrais, calculados por normas definidas por Beiguelman (Beiguelman, 1995), tendo como base as frequências genotípicas observadas em indivíduos saudáveis (populações: residentes em Utah

com ancestralidade do norte e oeste europeus (CEU); chineses Han em Pequim, China (HCB); japoneses em Tóquio, Japão (JPT); indianos Gujarati em Houston, Texas, EUA (GIH); ancestrais de mexicanos em Los Angeles, Califórnia (MEX); ancestrais africanos no sudoeste dos EUA (ASW); grupo étnico Luhya em Webuye, Quênia (LWK); grupo étnico Maasai no Quênia (MKK)) do *International Hapmap 3 Consortium* (International HapMap 3 Consortium *et al.*, 2010) (N= 193). Assim, das 47 SNVs, cinco estiveram em desequilíbrio de HW e nove SNVs não apresentaram o tamanho amostral adequado. Assim, 33 (dos 47 SNVs) apresentaram os critérios de inclusão para o presente estudo. Entretanto, visando a factibilidade do mesmo, optamos por avaliar a SNV c.938-325G>A (rs7623610), localizada no gene *MITF*, que é um importante fator de transcrição de genes associados com a melanogênese (**Figura 6**).



**Figura 6.** Etapas da seleção da variante de base única (SNV) *MITF* rs7623610, em meio a 12.882 SNVs associadas à alteração de risco de melanoma cutâneo (MC) identificados em estudo anterior (Oliveira, 2017), por meio da genotipagem em larga escala com microarranjos de DNA (SNV array 6.0, Affymetrix®). HW: Hardy-Weinberg

**SNV *MITF* rs7623610**

A SNV c.938-325G>A (rs7623610) no gene *MITF*, selecionada para o estudo, é caracterizada pela troca da base nitrogenada guanina (G) por adenina (A) na posição -325 do íntron 7. Por meio da análise *in silico* realizada anteriormente através do programa computacional *Human Splicing Finder* (Desmet *et al.*, 2009), observou-se que o alelo G pode proporcionar a inibição da região de ligação do SF1, além da inserção de região de ligação da hnRNP A1, quando comparado com o alelo A, e assim, possivelmente alterar a eficiência do mecanismo de *splicing*.

Vale comentar que o papel dos diferentes alelos G e A na expressão do gene e na modulação do *splicing* é desconhecido e até onde atinge nosso conhecimento, não existem estudos sobre a SNV rs7623610 na literatura.

Considerando que 1) não há estudos prévios que avaliaram a influência do SNV *MITF* rs7623610 no risco de MC, 2) não são conhecidos os papéis dos alelos desta SNV na modulação da *MITF* e 3) indivíduos de nossa população heterogênea e miscigenada (Alves-Silva *et al.*, 2000; Carvalho-Silva *et al.*, 2011) recebem altos índices de radiação UV (Schuch *et al.*, 2012), nos pareceu importante a identificação do papel do SNV *MITF* rs7623610 no risco de ocorrência, nos aspectos clínicos e do tumor e na sobrevida de pacientes com MC.

## OBJETIVOS

### Objetivo geral

Verificar a influência da SNV c.938-325G>A (rs7623610) do gene *MITF* na ocorrência e prognóstico do MC.

### Objetivos específicos

Verificar se os distintos genótipos (homozigoto ancestral GG, heterozigoto GA e homozigoto variante AA) da SNV *MITF* rs7623610 influenciam:

- O risco de ocorrência do MC utilizando tamanho amostral adequado;
- Os aspectos clínicos dos pacientes com MC (idade, sexo, cor da pele, fototipo cutâneo, exposição solar, tipo de exposição solar, queimadura solar e presença de nevos);
- As características do tumor (localização primária, tipo histológico, fase de crescimento, ulceração, índice de Breslow, nível de Clark e estágio clínico);
- A sobrevida livre de progressão (SLP) e a sobrevida específica de melanoma (SEM) dos pacientes com MC;
- A expressão dos genes *MITF*, *SF1* e *HNRNPA1* em amostras de sangue periférico de pacientes com MC e de indivíduos saudáveis;
- A expressão das proteínas MITF, SF1 e HNRNPA1, em amostras de sangue periférico de indivíduos saudáveis, e;
- A eficiência do mecanismo de *splicing* do gene *MITF* em linhagem celular de melanoma cutâneo humana.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Aspectos éticos

Todos os procedimentos inerentes ao estudo foram realizados após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (**Anexo 1**) pelos indivíduos que aceitaram participar do mesmo. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da UNICAMP (Parecer nº 1.438.601, CAAE: 53641216.3.0000.5404) (**Anexo 2**).

O estudo molecular foi realizado em amostras de DNA, RNA e proteínas totais do sangue periférico obtido por ocasião da punção venosa realizada para a coleta de exames necessários ao diagnóstico ou segmento clínico dos pacientes e de punção venosa em controles, no momento da doação de sangue. O estudo molecular também foi realizado em linhagem celular SK-MEL-28 da *American Type Culture Collection* (ATCC®, HTB-72™, Estados Unidos). Nenhum material adicional dos pacientes ou dos controles foi coletado.

### População do estudo

Para verificar a influência da SNV *MITF* rs7623610 no risco de ocorrência do MC, nos aspectos clínicos e do tumor, e na sobrevida dos pacientes, foram avaliados 247 pacientes com MC atendidos por ocasião do diagnóstico ou seguimento clínico nos ambulatórios de Oncologia Clínica e de Dermatologia do Hospital de Clínicas da UNICAMP, atendidos no período de agosto de 1988 a maio de 2018. Foram excluídos do estudo os pacientes com MC sem tumor primário definido, com tumor localizado em mucosas ou região ocular, ou também aqueles diagnosticados com o tipo histológico acral ou amelanocítico. Foram também avaliados 280 doadores de sangue (controles) do Centro de Hematologia e Hemoterapia da UNICAMP. O tamanho amostral do estudo teve como base as frequências dos genótipos da referida SNV em indivíduos saudáveis de outras populações do mundo, uma vez que não há esta informação na população brasileira, e foi calculado segundo as normas descritas por Beiguelman (1995) (Beiguelman, 1995). O tamanho amostral do estudo foi de 193 pacientes (**Anexo 3**).

Para verificar os papéis dos distintos genótipos (GG, GA e AA) da referida SNV nas expressões dos genes *MITF* (via da melanogênese), *SF1* e *HNRNPA1* (mecanismo de *splicing*), foram avaliadas amostras de RNA total de leucócitos do sangue periférico de 41 pacientes com MC e 83 controles. Para verificar os papéis dos referidos genótipos no conteúdo proteico do MITF, SF1 e hnRNP A1, foram utilizadas amostras de proteínas totais de leucócitos de sangue periférico de 44 controles. O número de indivíduos com cada

genótipo que foi utilizado para as análises de expressões gênica e proteica, foi calculado por normas definidas por Beiguelman (1995) (Beiguelman, 1995).

Vale comentar que as amostras dos pacientes com MC e dos controles estavam disponíveis no banco de amostras do Laboratório de Genética do Câncer da FCM da UNICAMP. O armazenamento das referidas amostras foi aprovado anteriormente pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FCM da UNICAMP (Parecer nº 424/2006).

Para verificar os papéis dos distintos alelos (G e A) da referida SNV na eficiência do mecanismo de *splicing* do gene *MITF*, o ensaio do minigene repórter foi realizado na linhagem celular de melanoma humano SK-MEL-28 (ATCC®, HTB-72™, Estados Unidos), que foi geneticamente modificada para apresentar os minigenes com as regiões dos alelos de interesse da referida SNV.

#### **Aspectos clínicos dos indivíduos inseridos no estudo**

Os dados relativos à identificação, à idade e ao sexo de todos os pacientes e controles foram obtidos pelo pesquisador responsável. As características clínicas, como a cor da pele, o fototipo cutâneo, a exposição solar, o tipo de exposição, queimaduras solares prévias e a presença de nevos em pacientes e controles foram obtidas por meio de questionários específicos (**Anexo 4**).

A idade dos pacientes foi calculada a partir da data de diagnóstico do tumor cutâneo primário e a idade dos indivíduos saudáveis foi obtida no momento da entrevista e coleta da amostra. O sexo foi classificado em feminino e masculino. A cor da pele foi autodeterminada por cada indivíduo em branca e não branca (amarela, parda ou negra). A classificação do fototipo cutâneo foi definida por meio de critérios estabelecidos por Fitzpatrick (1988) (Fitzpatrick, 1988).

A exposição solar foi determinada para aqueles indivíduos que se expuseram ao sol por mais de duas horas ao dia e por mais de 10 anos, sendo o tipo de exposição solar considerada intermitente quando relacionada a atividades recreativas em menos de 50% na semana ou férias, crônica quando o indivíduo exerce atividade laboral ou domiciliar em mais de 50% do tempo sob exposição e sem exposição, quando não enquadrado nas definições anteriores (Rigel *et al.*, 1983; Bosserhoff, 2017).

Indivíduos que sofreram queimadura solar foram considerados aqueles que relataram a ocorrência de dor, eritema com ou sem formação de bolhas por mais de 24 horas em pelo menos um evento em qualquer fase da vida (Fortes *et al.*, 2011).

Os indivíduos portadores de nevos foram considerados aqueles com pelo menos um nevo melanocítico maior que 2 mm de diâmetro em qualquer área do corpo (exceto no couro cabeludo, púbis e região perineal, não avaliadas ao exame físico). Os pacientes foram categorizados de acordo com protocolo de identificação da *International Agency for Research on Cancer* (IARC) em: sem ou com poucos nevos ( $\leq 20$ ), com moderado número (20 a 50) ou muitos nevos ( $> 50$ ) (English & Mac Lennan, 1990).

### **Aspectos do tumor dos pacientes com MC**

Os pacientes foram classificados de acordo com a localização topográfica do MC: cabeça ou pescoço, tronco, membros superiores e inferiores, como descrito previamente (Stierner *et al.*, 1992).

O diagnóstico de MC foi realizado por meio do exame anatomopatológico de cortes histológicos de fragmentos do tumor incluídos em parafina e corados com hematoxilina e eosina (Landman *et al.*, 2003). Os dados da localização primária do tumor, do tipo histológico, da fase de crescimento, da ulceração, do índice de Breslow, do nível de Clark e do estágio clínico foram coletados do laudo do exame anatomopatológico, presente no prontuário de cada paciente.

O estágio clínico do tumor foi determinado com base nos achados histológicos, nos exames de imagem (radiografia do tórax, ultrassonografia do abdome, ressonância magnética ou tomografia computadorizada (CT) do tórax ou abdome, tomografia computadorizada por emissão de pósitrons (PET-CT), e ainda ressonância magnética de crânio e cintilografia óssea, em casos com suspeita clínica de infiltração no sistema nervoso central ou óssea, definindo assim, a presença ou ausência de metástases à distância) e da dosagem da enzima lactato desidrogenase (LDH), de acordo com os critérios estabelecidos pela *American Joint Committee on Cancer* (Balch *et al.*, 2009).

## Tratamento dos pacientes com MC

A ampliação de margem foi realizada de acordo com recomendações convencionais, quando a excisão inicial foi apenas procedimento diagnóstico (Gillgren *et al.*, 2011). A pesquisa de linfonodo sentinela foi indicada para pacientes com índice de Breslow maior que 1,0 mm, porém não foi um procedimento obrigatório, pois observou-se que não houve nenhuma alteração na curva de sobrevida câncer específica, em estudo prospectivo e randomizado (Morton *et al.*, 2014).

O tratamento adjuvante com interferon alfa 2b (IFN alfa 2b) constitui modalidade terapêutica com questionável benefício na sobrevida global de pacientes com MC (apenas 11% de aumento) (Mocellin *et al.*, 2010), mas com ganho real na sobrevida livre de recidiva (aumento de 18%), especialmente em esquemas de longa duração (1 a 5 anos) e com doses intermediárias ou altas do fármaco (Lens *et al.*, 2002; Wheatley *et al.*, 2003; Mocellin *et al.*, 2010). Por serem tratamentos com alta toxicidade, é necessária a discussão dos riscos e benefícios do tratamento adjuvante com cada paciente, cabendo uma decisão conjunta médico-paciente, sobre a sua realização (Kirkwood *et al.*, 1996). A discussão do tratamento adjuvante com IFN alfa 2b ocorreu em especial com pacientes com linfonodos acometidos ou com tumores com índice de Breslow maior que 4,0 mm (Kirkwood *et al.*, 1996).

Os pacientes com metástase única ou recidiva operável foram submetidos à exérese cirúrgica com objetivo de ressecção completa do tumor (Sondak *et al.*, 2014), e aqueles com recidiva inoperável ou com metástases múltiplas receberam a monoquimioterapia com dacarbazina (Sasse *et al.*, 2007).

A radioterapia foi utilizada no tratamento local de pacientes com impossibilidade cirúrgica, pois apresenta pouco impacto no tratamento do MC, tendo apenas papel paliativo, principalmente em lesões sangrantes, metástases ósseas ou cerebrais (Burmeister *et al.*, 2012).

## Cultivo da linhagem celular

As células da linhagem SK-MEL-28 foram cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (Gibco<sup>®</sup>, Estados Unidos), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco<sup>®</sup>, Estados Unidos) e 1% de penicilina-streptomicina (100 U/mL) (Gibco<sup>®</sup>, Estados Unidos), em atmosfera umidificada com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. O meio de cultura foi substituído duas a três vezes por semana e, ao atingir cerca de 80% de confluência, as células foram removidas por meio do reagente tripsina 0,25% (Gibco<sup>®</sup>, Estados Unidos) e foram recultivadas ou utilizadas para a realização dos experimentos.

As culturas celulares foram utilizadas em um número limitado de divisões, com estoques de células congeladas em nitrogênio líquido para uniformidade dos experimentos futuros, garantindo células fenotipicamente semelhantes. Vale comentar que as células foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) (**Anexo 5**).

### **Determinação dos genótipos da SNV *MITF* rs7623610**

#### **Extração do DNA genômico**

O DNA genômico foi obtido das amostras de leucócitos do sangue periférico dos pacientes com MC (N= 247) e controles (N= 280) por meio da técnica de extração de DNA com cloreto de lítio (LiCl) e proteinase K (Woodhead *et al.*, 1986), com modificações.

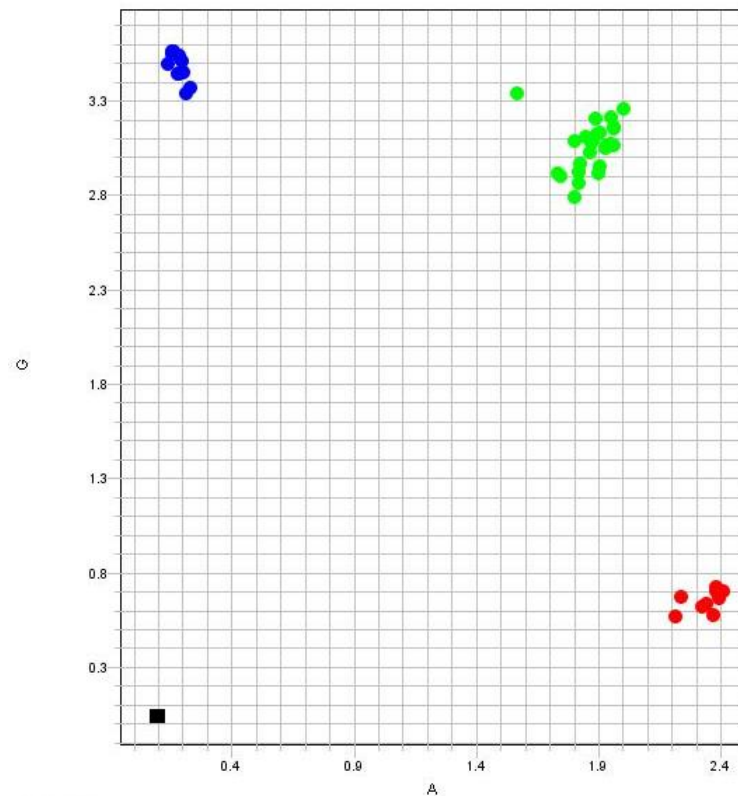
Resumidamente, as amostras de sangue periférico, coletadas com anticoagulante ácido etilenodiamino tetracético (EDTA), foram lisadas em 1mL de tampão de lise (320mM sacarose; 10mM Tris-HCl pH 7,5; 5mM cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>) e 1% Triton X-100). Posteriormente, o concentrado de células obtido foi ressuspensionado em 400μL de tampão de digestão (10mM Tris-HCl pH 7,5; 10mM EDTA; 10mM cloreto de sódio (NaCl) e 0,5% dodecil sulfato de sódio (SDS) e proteinase K (20mg/mL) por 2 horas a 55°C. Em seguida, foram adicionados 200μL de 7,5M LiCl às amostras e estas foram incubadas a -20°C por pelo menos 15 minutos. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rotações por minuto (rpm) por 10 minutos e ao sobrenadante foi adicionado 1mL de etanol absoluto gelado. O DNA precipitado foi centrifugado a 13.000rpm por 10 minutos, seguido de duas lavagens com etanol 70% e ressuspensionado em tampão TE (2M tris base e 0,2M EDTA, pH 8,0), sendo armazenado a -20°C até o próximo passo.

O DNA genômico extraído foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo para verificação de sua integridade. A concentração e a pureza do DNA de cada amostra foram determinadas por meio do espectrofotômetro NanoDrop ND-2000 (Thermo Scientific<sup>®</sup>, Estados Unidos) e o DNA foi armazenado a -20°C até o momento da genotipagem.

### Genotipagem da SNV *MITF* rs7623610

Os genótipos da SNV *MITF* c.938-325G>A (rs7623610) foram obtidos por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real utilizando os ensaios para genotipagem TaqMan<sup>®</sup> (referência: C\_29012190\_10) (Applied Biosystems<sup>®</sup>, Estados Unidos). A PCR em tempo real foi realizada com cerca de 50 nanogramas (ng) de DNA, 0,5µL de *SNV Genotyping Assay Mix* 1X (contendo dois pares de sondas e dois fluorocromos detectores: FAM<sup>®</sup> e VIC<sup>®</sup>), 5µL de *TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix* 1X (contendo a *Taq* DNA polimerase, desoxiribonucleotídeos (dNTPs) e solução tampão com componentes otimizadores da reação) e água estéril para um volume final de 10µL. As condições de amplificação consistiram na ativação inicial da *Taq* DNA polimerase a 95°C por 10 minutos, seguidos de 45 ciclos de incubação a 92°C por 15 segundos e a 60°C por 1 minuto. Controles positivos (genótipos já estabelecidos) e negativos (água estéril) foram utilizados em todas as reações de genotipagem.

Vale comentar que 15% das amostras, selecionadas aleatoriamente, foram genotipadas novamente, como controle de qualidade do procedimento, com 100% de concordância entre as análises. Os resultados de genotipagem foram visualizados e analisados no programa *StepOne<sup>™</sup> Software* versão 2.3 (Applied Biosystems<sup>®</sup>, Estados Unidos) (**Figura 7**).



**Figura 7.** Representação esquemática de um gráfico de pontos com as distribuições dos genótipos da variante *MITF* rs7623610 em pacientes com melanoma cutâneo e controles analisados pelo programa *StepOne™ Software* (Applied Biosystems®, Estados Unidos) após a reação em cadeia da polimerase em tempo real. O alelo G (eixo Y) e o alelo A (eixo X) representam o alelo ancestral e variante da referida variante genética. Os círculos azuis, verdes e vermelhos representam, respectivamente, genótipos homozigotos ancestrais, heterozigotos e homozigotos variantes. O quadrado em preto representa o controle negativo (água estéril) da reação

## Avaliação da expressão gênica

### Extração do RNA total

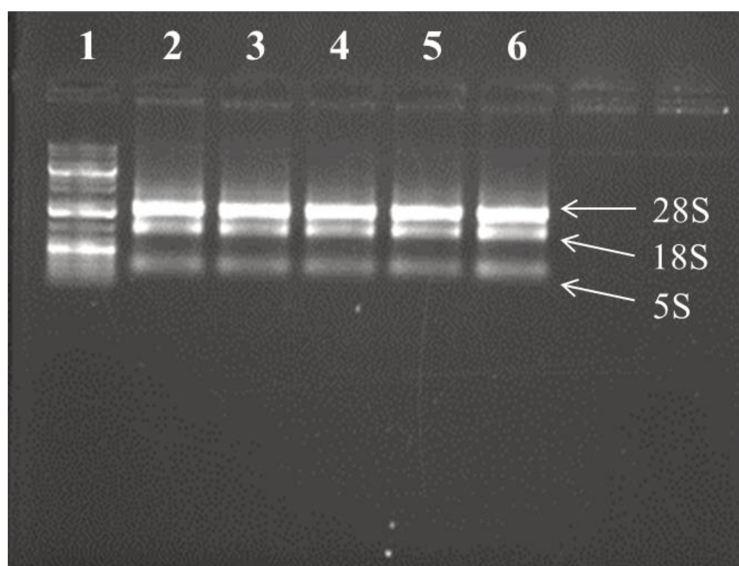
O RNA total foi obtido das amostras de leucócitos do sangue periférico de pacientes (N= 41) e controles (N= 83) e da linhagem celular SK-MEL-28 (com os genótipos homozigoto GG e homozigoto AA da referida SNV) por meio do reagente Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen<sup>®</sup>, Estados Unidos) e clorofórmio.

Resumidamente, as amostras de leucócitos do sangue periférico dos pacientes e dos controles foram lisadas por meio do reagente Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen<sup>®</sup>, Estados Unidos) e a seguir, foram adicionados 200µL de clorofórmio. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 13000rpm por 15 minutos a 4°C. O RNA total presente na fase aquosa foi precipitado com 500µL de isopropanol gelado, centrifugado novamente e submetido a uma lavagem com etanol 75%. Posteriormente, o RNA foi ressuspensionado em água estéril com dietilpírocarbonato (DEPC) (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Estados Unidos) e armazenado a -80°C até o próximo passo. A concentração e pureza do RNA foram determinadas por meio do espectrofotômetro NanoDrop ND-2000 (NanoDrop Technologies<sup>®</sup>, Estados Unidos).

Considerando os pacientes com MC, 37 amostras foram utilizadas para avaliação da expressão do gene *MITF* (15 com o genótipo GG, 16 com o GA e seis com o AA); 40 amostras para o gene *HNRNPA1* (15 com o genótipo GG, 18 com o GA e sete com o AA); 41 amostras para o gene *SF1* (16 com o genótipo GG, 18 com o GA e sete com o AA), sendo todos determinados pela SNV *MITF* rs7623610.

Considerando os indivíduos controles, 74 amostras foram utilizadas para avaliação da expressão do gene *MITF* (28 com o genótipo GG, 23 com o GA e 23 com o AA); 83 amostras para o gene *HNRNPA1* (32 com genótipo GG, 29 com o GA e 22 com o AA); 63 amostras para o gene *SF1* (22 com o genótipo GG, 23 com o GA e 18 com o AA), sendo todos determinados pela SNV *MITF* rs7623610.

A integridade das amostras de RNA foi avaliada pela visualização da presença dos fragmentos de RNAs ribossomais (5S, 18S e 28S) por meio da eletroforese em gel de agarose 1%, corados com brometo de etídeo (**Figura 8**). A concentração do RNA total foi determinada por meio do espectrofotômetro NanoDrop ND-2000 (Thermo Scientific<sup>®</sup>, Estados Unidos). O RNA foi armazenado a -80°C até o momento da síntese do DNA complementar (cDNA).



**Figura 8.** Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo para visualização dos fragmentos 5S, 18S e 28S referente aos RNAs ribossomais. O marcador do tamanho de bases (1 kilobase) está representado na coluna 1. A integridade das amostras de RNA de indivíduos do estudo está apresentada nas colunas 2, 3, 4, 5 e 6

### Síntese do cDNA

As amostras de RNA provenientes dos leucócitos do sangue periférico de pacientes com MC, de controles e da linhagem celular SK-MEL-28 foram submetidas à síntese de cDNA com o conjunto de reagentes do kit *Maxima First Strand cDNA Synthesis* (Life Technologies<sup>®</sup>, Estados Unidos), de modo que as mesmas foram anteriormente tratadas com a enzima DNase (New England Biolabs<sup>®</sup>, Estados Unidos), para afastar a contaminação por DNA.

O cDNA foi obtido a partir de 1µg de RNA, utilizando-se 1µL de oligo(dT) 50µM, 2µL de dNTPs 10mM, 4µL de solução tampão 5X, 1µL de inibidor de RNase e 1µL da enzima transcriptase reversa (200U), em todas as amostras. A mistura foi incubada por 60 minutos a 42°C e por 5 minutos a 70°C, em termociclador (Eppendorf<sup>®</sup>, Alemanha). Os cDNAs obtidos foram armazenados a -80°C até o próximo passo.

A verificação da síntese de cDNA foi realizada por meio da amplificação do gene da actina beta (*ACTB*) por meio da PCR. Para tal, foram utilizados 5µL de solução tampão *Taq* DNA polimerase 10X, 1µL de MgCl<sub>2</sub> 50mM, 1µL de dNTPs 10mM, 1µL dos iniciadores direto (5'-AAGAGATGGCCACGGCTGCT-3') e indireto (5'- TCGCTCCAACCGACTGC TGT-3'), na concentração de 10mM, 0,5µL de *Taq* DNA polimerase (5U/µL), 1µL de cDNA

e água estéril para um volume final de 50µL. O programa do termociclador teve início a 94°C por 3 minutos, seguido por 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 58°C por 45 segundos, 72°C por 1 minuto e foi finalizado a 72°C por 7 minutos. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, com visualização de um fragmento com 640 pares de bases (pb).

### **Quantificação da expressão gênica por meio da PCR quantitativa (qPCR)**

A determinação da expressão dos genes *ACTB*, *MITF*, *HNRNPA1* e *SF1* foi realizada por meio da qPCR. A qPCR é um método de quantificação da expressão gênica que tem como base o monitoramento da fluorescência emitida pela ligação do corante *SYBR Green* à fita de DNA recém sintetizada, em cada ciclo da PCR. A fluorescência emitida é captada por uma câmara CCD (*Charge-Coupled Device*), acoplada ao equipamento *StepOnePlus*<sup>®</sup> (Applied Biosystems<sup>®</sup>, Estados Unidos). Quando o programa do equipamento detecta o aumento da fluorescência (fase inicial) associada ao aumento exponencial do produto da PCR (fase *log*), determina também o valor do *cycle threshold* (CT). Quanto maior a expressão de um gene, mais precoce é a amplificação do mesmo e menor é o CT.

Vale comentar que o gene *ACTB* foi utilizado como controle endógeno em todas as reações de qPCR. Os iniciadores para a amplificação dos genes *MITF*, *HNRNPA1*, *SF1* e *ACTB* foram desenhados por meio dos programas *IDT SciTools RealTime qPCR Assay* ([www.idtdna.com/scitools/Applications/RealTimePCR/](http://www.idtdna.com/scitools/Applications/RealTimePCR/)) e *OligoAnalyzer 3.1* ([www.idtdna.com/calc/analyzer](http://www.idtdna.com/calc/analyzer)) e, posteriormente, analisados nos programas *BLAST* ([blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)) e *UCSC in silico PCR* ([genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr](http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr)), para verificar as suas especificidades.

Foram realizadas qPCRs com os iniciadores direto e indireto nas concentrações de 100nM, 150nM e 300nM para identificar a concentração ideal dos mesmos para cada um dos genes a ser avaliado. As sequências e a concentração ideal de cada iniciador obtida durante a fase exponencial das curvas de fluorescência e a eficiência das curvas de fluorescência estão apresentadas na **Tabela 1**.

A quantificação da expressão dos genes *MITF*, *SF1* e *HNRNPA1* foi realizada com 300ng de cDNA de cada amostra, 6µL do reagente *SYBR Green PCR Master Mix*<sup>®</sup> (Applied Biosystems<sup>®</sup>, Estados Unidos), composto pelo corante *SYBR*<sup>®</sup> *Green*, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, solução tampão e *Taq AmpliGold*, e com os iniciadores específicos. O programa do termociclador em tempo real consistiu de incubação inicial a 95°C por 10 minutos, seguido de

40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Todas as reações foram realizadas em triplicata e utilizando-se controles negativos (água estéril) em cada experimento.

Os resultados da qPCR para cada gene foram obtidos pelo equipamento *StepOnePlus*<sup>®</sup> (Applied Biosystems<sup>®</sup>, Estados Unidos), em forma de gráficos de fluorescência *versus* o número de ciclos da qPCR. A partir das curvas de fluorescência, uma reta foi gerada pelo referido programa, pela qual foi calculado o coeficiente de correlação da reta. A qPCR foi considerada confiável e reprodutiva quando as amplificações apresentaram 95-110% de eficiência de amplificação, definidas como a identificação do coeficiente de correlação de Pearson ( $R^2$ ) maior do que 0,95 a cada ciclo em triplicata e a presença de inclinação da reta entre -3,1 e 3,6 (**Tabela 1**).

A expressão dos genes de estudo *MITF*, *HNRNPA1* e *SFI* foi normalizada considerando-se a expressão do gene controle (*ACTB*). A expressão de cada gene foi calculada pela aplicação da fórmula aritmética  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak & Schmittgen, 2001). Para tanto, a quantificação da fluorescência na fase exponencial da qPCR foi convertida em dados de expressão gênica ou Ct. Foram calculadas as médias entre os valores de Ct obtidos das reações, realizadas em triplicata, para cada amostra. A derivação aritmética  $\Delta Ct$  foi a diferença entre o Ct dos genes de estudo e o Ct do gene controle. A seguir, foi aplicada a fórmula  $\Delta\Delta Ct$ , que foi a diferença entre o  $\Delta Ct$  de cada amostra e o  $\Delta Ct$  da amostra calibradora (média obtida das amostras com o genótipo ancestral GG). Após este passo, foi aplicada a fórmula aritmética  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  e gerado o valor da expressão gênica.

**Tabela 1.** Símbolos dos genes, sequência dos iniciadores, concentração ideal de cada iniciador e eficiência das curvas de fluorescência de cada um dos referidos genes

Gene	Iniciadores	Concentração ideal dos iniciadores	Eficiência de amplificação (%)	Coefficiente de inclinação da reta	Coefficiente de determinação ( $R^2$ )
<i>ACTB</i>	Direto: 5'-AGG CCA ACC GCG AGA AG -3'	150 nM	100,91	-3,30	0,99
	Indireto: 5'-ACA GCC TGG ATA GCA ACG TAC A -3'				
<i>MITF</i>	Direto: 5'- AGT CTG AAG CAA GAG CAC TG-3'	300 nM	100,53	-3,30	0,99
	Indireto: 5'-GCG CAT GTC TGG ATC ATT TG -3'				
<i>SFI</i>	Direto: 5'- TCG CTT AAA TGG GAC CCT TC-3'	300 nM	106,16	-3,18	0,99
	Indireto: 5'-GGC CTT TGG AAT TTA CAG TCT G -3'				
<i>HNRNPA1</i>	Direto: 5'- TTT GCC TTT GTA ACC TTT GAC G-3'	300 nM	105,99	-3,18	0,99
	Indireto: 5'-ACC TCT TTG GCT GGA TGA AG -3'				

*ACTB*: actina beta (controle endógeno), *MITF*: fator de transcrição associado à microftalmia, *SFI*: fator de *splicing* 1, *HNRNPA1*: ribonucleoproteína heterogênea nuclear A1, nM: nano molar

## **Quantificação do conteúdo proteico**

### **Extração de proteínas totais**

As proteínas totais foram obtidas de amostras de leucócitos do sangue periférico de 44 indivíduos controles. Considerando a proteína MITF, 44 amostras foram utilizadas (18 com o genótipo GG, 13 com o GA e 13 com o AA); 40 amostras para a proteína hnRNP A1 (12 com genótipo GG, 17 com o GA e 11 com o AA) e 40 amostras para a proteína SF1 (13 com o genótipo GG, 14 com o GA e 13 com o AA), sendo todos determinados pela SNV *MITF* rs7623610.

Para a extração, o tampão para ensaio de radioimunoprecipitação (RIPA)-modificado (50mM Tris-HCl pH 7,4; 1mM EDTA; 150mM NaCl; 1% NP-40; 0,25% deoxicolato de sódio ( $C_{24}H_{39}NaO_4$ ); 0,1% SDS; 5mM fluoreto de sódio; 2mM ortovanadato de sódio ( $Na_3VO_4$ ) e inibidores de fosfatases e proteases) foram utilizados.

As proteínas extraídas foram quantificadas pelo método de Lowry (1951) (Lowry *et al.*, 1951) e diluídas em tampão de amostra Laemmili (1970) (Laemmili, 1970) (300mM Tris-HCl pH 6,8; 10% SDS; 50% glicerol; 0,1% azul de bromofenol; 20%  $\beta$ -mercaptoetanol), na proporção de 4:1, seguidas de desnaturação a 95°C. As proteínas totais extraídas foram armazenadas a -80°C até o momento da avaliação da quantificação relativa.

### **Quantificação relativa das proteínas por meio da técnica de *western blotting***

A determinação do conteúdo proteico das MITF, hnRNP A1 e SF1 foi realizada por meio da técnica de *western blotting*. Este método permite a imunodeteção de proteínas após a separação destas por eletroforese em gel de poliacrilamida e transferência, por corrente elétrica, para uma membrana adsorvente (Ghosh *et al.*, 2014). Posteriormente, essa membrana é incubada com anticorpos específicos para a proteína de interesse, a qual é detectada por meio de uma reação de quimioluminescência (Ghosh *et al.*, 2014).

Inicialmente, as amostras de proteínas totais previamente extraídas e precipitadas, de indivíduos controles, foram aplicadas em gel de poliacrilamida 10% com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) em diferentes concentrações: 30 40, 50 e 60 microgramas por microlitro ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) para verificar a quantidade ideal necessária para a padronização dos anticorpos, que foram posteriormente incubados. A concentração de 50  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  foi escolhida e utilizada para todos os experimentos.

Vale comentar que os níveis da proteína GAPDH foram utilizados como controle em todas as reações. De modo resumido, a partir da quantificação das proteínas totais, 50 $\mu\text{g}$  de cada amostra foram aplicadas em gel SDS-PAGE 10% e foram submetidas à corrida

eletroforética por 3 horas a 90V. Posteriormente, foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose por cerca de 1 hora e 30 minutos a 120V.

A imunomarcagem das proteínas de interesse foi iniciada com o bloqueio de interações não específicas entre a membrana de nitrocelulose e os anticorpos utilizados por meio da solução com 5% de leite desnatado em TBS-T (25mM tris base; 125mM NaCl; 0,05% tween 20, pH 8,0) *overnight*, e, então foram incubadas com os anticorpos primários anti-MITF de camundongo (NB100-56561), anti-hnRNP A1 de camundongo (NB100-672) (Novus Biologicals® e R&D Systems®, Estados Unidos), anti-SF1 de camundongo (H00007536-M01), e anti-GAPDH de coelho (sc-25778) (Santa Cruz Biotechnology®, Estados Unidos) (controle da reação), sendo todos em solução com 3% de albumina de soro bovino (BSA) em tampão TBS-T (*overnight*, temperatura de 4°C), seguidas pela incubação dos respectivos anticorpos secundários conjugados à peroxidase anti-camundongo (ab97046) e anti-coelho (ab97051) (Abcam®, Estados Unidos) durante 1 hora e 30 minutos à temperatura ambiente. A reação de quimiluminescência foi analisada utilizando-se o equipamento *ChemiDoc™ MP Imaging system* (Bio-Rad Laboratories, Estados Unidos) com os reagentes do kit *SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate* (Thermo Scientific®, Estados Unidos). As imagens obtidas na reação foram analisadas pelo software *Image Lab™* versão 6.0.1 (Bio-Rad Laboratories, Estados Unidos).

O cálculo da quantificação relativa de densidade dos fragmentos obtidos das proteínas MITF (aproximadamente 55 kDa), hnRNP A1 (34 kDa) e SF1 (aproximadamente 70 kDa) foi realizado por meio da razão entre a proteína de interesse e uma amostra calibradora para cada uma (genótipo GG como referência), como também para a proteína controle GAPDH respectiva. Os valores obtidos de cada razão (entre a proteína de interesse com amostra calibradora e a proteína controle GAPDH respectiva com a amostra calibradora respectiva) foram divididos um pelo outro, com o intuito de normalização da reação, obtendo-se assim, o valor final da quantificação relativa (Hammond *et al.*, 2013).

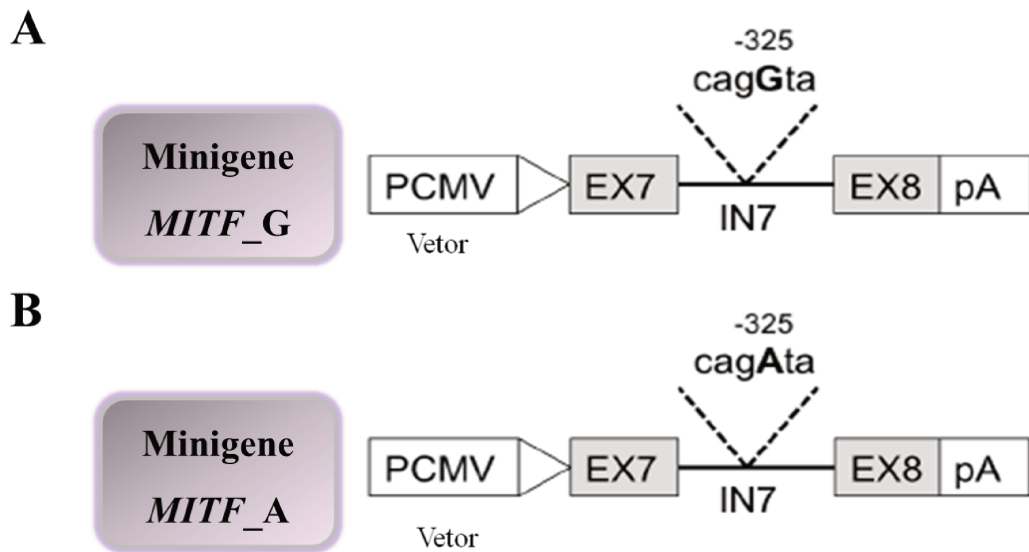
### **Eficiência do *splicing***

Para verificar os papéis dos distintos alelos (G e A) da SNV *MITF* rs7623610 na eficiência do mecanismo de *splicing* do gene *MITF*, o ensaio do minigene repórter foi realizado. Este ensaio é um método que permite avaliar a eficiência do mecanismo de *splicing* por meio da clonagem da região genômica de interesse (alelos ancestral e variante de SNVs) em vetores de expressão gênica (Cooper, 2005; Gaildrat *et al.*, 2010).

É importante comentar que a região genômica deve conter, além dos éxons de interesse, as regiões regulatórias do *splicing* localizadas nos íntrons. A eficiência do mecanismo de *splicing* pode ser avaliada por meio da visualização e quantificação dos tamanhos dos fragmentos gerados pelos distintos minigenes (Cooper, 2005; Gaildrat *et al.*, 2010).

Os dois minigenes foram construídos pela empresa GenScript® (Estados Unidos) (**Anexos 6 e 7**) com a utilização do vetor de expressão gênica denominado pcDNA3.1+ N-eGFP (**Anexo 8**). Além das regiões controladoras da expressão gênica, o referido vetor possui um gene de resistência ao antibiótico ampicilina, utilizado para selecionar as bactérias que receberam o plasmídeo recombinante após a transformação, e um gene de resistência ao antibiótico neomicina, utilizado com o intuito de selecionar as células que foram modificadas geneticamente pelo plasmídeo recombinante após o processo de transfecção, além disso, ele também possui a sequência do gene *GFP* (*Green Fluorescent Protein*), que proporciona a monitorização da localização do gene de interesse fundido com o da *GFP in vitro*, funcionando assim, como um gene repórter após transfecção.

O minigene *MITF\_G* foi construído com a inclusão do éxon 7, íntron 7 e éxon 8 do gene *MITF* (**Figura 9A**). Na posição -325 do intron 7, foi inserida a base G, relacionada ao alelo ancestral da SNV rs7623610 do gene *MITF*, e o minigene *MITF\_A* foi construído com a inclusão do éxon 7, íntron 7 e éxon 8 do gene *MITF* (**Figura 9B**). Na posição -325 do intron 7, foi inserida a base A, relacionada ao alelo variante da SNV rs7623610 do gene *MITF*.



**Figura 9.** Representação esquemática dos minigenes inseridos no vetor de expressão pcDNA3.1+N-eGFP. (PCMV) região promotora do vetor; (EX) éxon; (IN) íntron; (pA) sinalização da cauda poli A no vetor. Os retângulos em cinza representam os éxons e as linhas entre eles representam os íntrons. As linhas pontilhadas representam as regiões dos íntrons onde está localizada a variante de base única (SNV) (letra maiúscula em negrito). Minigenes com a região da SNV *MITF* c.938-325G>A localizado no íntron 7, distante 325 bases do éxon 8

#### Transformação dos plasmídeos com cada minigene em bactérias *E. coli* DH5α

Os plasmídeos, pcDNA3.1+\_G e pcDNA3.1+\_A, foram transformados em bactérias *E. coli* DH5α (Life Technologies®, Estados Unidos) quimicamente competentes. Em suma, cerca de 50μL de bactérias entraram em contato com 5μL de cada plasmídeo recombinante (cerca de 50ng), após, cada mistura foi incubada em gelo por 30 minutos, seguido de choque térmico a 42°C por 40 segundos e incubadas novamente em gelo por 2 minutos. Em seguida, foram acrescentados 300μL de meio de cultura SOC (20g/L triptona; 5g/L extrato de levedura; 0,5g/L NaCl; 2,5mM cloreto de potássio (KCl); 10mM MgCl<sub>2</sub>; 10mM MgSO<sub>4</sub> e 20mM glicose). Após, as bactérias foram incubadas a 37°C por 1 hora sob agitação moderada (200rpm). Os produtos das transformações foram semeados em placas de Petri contendo meio de cultura LB ágar (10g/L triptona; 5g/L extrato de levedura; 10g/L NaCl e 15g/L ágar) com antibiótico seletivo ampicilina (100μg/mL) e incubadas a 37°C por aproximadamente 18 horas. Após esse período, observou-se o crescimento de colônias isoladas transformadas (que incorporaram o plasmídeo de interesse) na placa de Petri. As

colônias selecionadas foram submetidas à expansão, separadamente em tubos de polipropileno contendo 5mL de meio LB líquido (10g/L triptona; 5g/L extrato de levedura; 10g/L NaCl) com antibiótico ampicilina (100µg/mL) a 37°C por cerca de 18 horas sob agitação moderada (200rpm).

Após os processos de transformação e expansão, os clones obtidos foram submetidos à extração do DNA plasmidial por meio do kit *QIAprep Spin Miniprep* (Qiagen®, Alemanha). A concentração e a pureza do DNA plasmidial foram determinadas por meio do espectrofotômetro NanoDrop ND-2000 (NanoDrop Technologies®, Estados Unidos). Nessa etapa, a inserção e a orientação dos fragmentos foram confirmadas por meio do Sequenciador Sanger 3730xL (Applied Biosystems®, Estados Unidos), para posterior transfecção.

### **Transfecção dos plasmídeos**

No dia anterior ao da transfecção celular, foram cultivadas  $5 \times 10^5$  células da linhagem celular SK-MEL-28 por frasco de cultivo de 25cm<sup>2</sup>, em condições ideais para seu crescimento e manutenção, descritas previamente, até atingirem aproximadamente 60% de confluência.

Para o processo de transfecção, foram utilizados os plasmídeos recombinantes pcDNA3.1+\_G (alelo ancestral), pcDNA3.1+\_A (alelo variante) e o vetor de expressão pcDNA3.1+ vazio (**Anexos 6, 7 e 8**), utilizado como controle interno das reações, para minimizar as diferenças das transfecções entre os grupos. Os ensaios foram realizados em três experimentos independentes, obtendo-se ao final transfecções em triplicata.

No procedimento de transfecção, foram utilizados 5µg dos plasmídeos de interesse (pcDNA3.1+\_G, pcDNA3.1+\_A) em 1mL de meio de cultura Opti-MEM® (Gibco®, Estados Unidos). Os plasmídeos foram incubados com 10µL do reagente Lipofectamina™ 2000 (Invitrogen™, Estados Unidos) à temperatura ambiente por 20 minutos. Nessa etapa, forma-se um complexo de DNA plasmidial e lipossomo, sendo este capaz de ser incorporado pela célula SK-MEL-28.

As misturas de plasmídeo-Lipofectamina™ foram distribuídas nas células dos respectivos frascos de cultivo já contendo 4mL de meio DMEM puro, sem suplementação com SFB ou antibiótico. Após 6 horas da transfecção, descartou-se o meio e adicionou-se 5mL de meio DMEM contendo 2% de SFB (Gibco®, Estados Unidos) e 1% de penicilina/estreptomicina (100U/mL) (Cultilab®, Brasil) por frasco de cultivo. As células foram mantidas em atmosfera umidificada com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C durante 48 horas, até o momento da extração de RNA e síntese de cDNA de cada amostra.

### Ensaio do minigene repórter

Após 48 horas, as células transfectadas foram lavadas com tampão PBS (*Phosphate-buffered saline*) pH 7,4, tripsinizadas, transferidas para tubos cônicos de 15mL e centrifugadas na velocidade de 1300rpm por 5 minutos para a obtenção do botão de células, o sobrenadante foi descartado. Em seguida, as células foram ressuspensas e lavadas em 1mL de tampão PBS e transferidas para tubos cônicos de 1,5mL e centrifugadas novamente na velocidade de 1300rpm durante 5 minutos e o sobrenadante foi descartado com cuidado, após, foram incubadas em gelo para posterior extração de RNA e síntese de cDNA, como descrito previamente.

Após os referidos procedimentos, a amplificação das regiões de cada minigene foi realizada por meio da PCR transcriptase reversa (RT-PCR), que é uma reação da transcriptase reversa em amostras de RNA (fita única) para a síntese de cDNA, e ao cDNA aplica-se a técnica de PCR, utilizando-se iniciadores específicos: direto 5'- AGT CTG AAG CAA GAG CAC TG -3' e indireto 5'- GGA TCA TTT GAC TTG GGA ATC -3'. A síntese de cDNA foi realizada conforme técnica descrita anteriormente.

Os iniciadores para a amplificação por meio da PCR, das regiões dos referidos minigenes *MITF\_G* (alelo ancestral) e *MITF\_A* (alelo variante) da SNV *MITF* rs7623610 foram desenhados com o auxílio dos programas descritos anteriormente.

As PCRs foram realizadas utilizando-se cerca de 100ng de cDNA de cada minigene (*MITF\_G* e *MITF\_A*), 0,75µL de sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>) 50mM, 2,5µL de solução tampão 10X, 0,5µL de dNTPs 10mM, 0,5µL de iniciadores direto e indireto (10µM) e 0,5µL de *Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity* (5U/µL) (Thermo Scientific®, Estados Unidos). As misturas foram incubadas inicialmente por 2 minutos a 94°C, seguidas de 40 ciclos de 40 segundos a 94°C, 40 segundos a 50°C e 7 minutos a 68°C, e extensão final de 10 minutos a 68°C. Após a amplificação, os referidos fragmentos, totalizando 133pb, foram visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, para a verificação dos respectivos tamanhos gerados, como também diferentes intensidades de imagem pelos distintos minigenes, seguindo as recomendações de Cooper (2005) e Gaildrat (2010) (Cooper, 2005; Gaildrat *et al.*, 2010).

Para a visualização e análise dos fragmentos gerados foi utilizado o software *ImageJ®* (National Institutes of Health, Estados Unidos) (Seo *et al.*, 2013).

## Análise estatística

O teste de verificação do equilíbrio de HW foi realizado com o intuito de verificar se ocorreu distribuição preferencial de algum dos genótipos em pacientes e controles (Beiguelman, 1995).

A significância estatística das diferenças entre grupos foi calculada por meio do teste da probabilidade exata de Fisher ou qui-quadrado e por regressão logística múltipla. As determinações dos riscos de ocorrência do MC, a que os pacientes e controles foram submetidos, foram calculadas pela regressão logística múltipla, em que foram obtidas as razões das chances (ORs) e calculadas considerando intervalo de confiança (IC) de 95% e ajustadas pela idade mediana (anos), cor da pele, exposição solar e presença de nevos.

A SLP foi calculada a partir da data da cirurgia até a data da primeira recidiva, progressão ou morte pelos efeitos do tumor, ou data do último seguimento. A SEM foi calculada a partir da data do diagnóstico até a data do óbito determinado pela doença ou a data do último seguimento. Os tempos de SLP e SEM foram estimados por meio das curvas de Kaplan-Meier (KM) e a comparação entre as curvas foi realizada por meio do teste de *log-rank*. O fator prognóstico de cada variável foi avaliado por meio da análise univariada de Cox. Após a análise univariada, todas as variáveis que apresentaram  $p < 0,10$  foram incluídas na análise multivariada de Cox. Após a análise multivariada, foram considerados significativos os fatores prognósticos com  $p$  valor  $< 0,05$ .

Considerando as análises de expressão gênica, da quantificação relativa de proteínas e da expressão dos minigenes, inicialmente a distribuição normal das amostras foi avaliada por meio do teste de Shapiro-Wilk. Para os resultados de expressão gênica, proteica e do minigene, que apresentaram distribuição normal, o teste  $t$  e a análise de variância (ANOVA) foram utilizados e os que apresentaram distribuição não normal, foram utilizadas as análises de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis, com a finalidade de comparar os valores obtidos de indivíduos com os diferentes genótipos.

Valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados significativos. Todas as análises foram realizadas por meio do programa estatístico SPSS 21.0 (SPSS Incorporation®, Estados Unidos).

## RESULTADOS

### Aspectos clínicos dos indivíduos inseridos no estudo

Quinhentos e vinte e sete indivíduos foram incluídos no estudo, sendo 247 pacientes diagnosticados com MC e 280 indivíduos saudáveis (controles). As distribuições individualizadas dos pacientes e controles de acordo com as características clínicas e os aspectos do tumor estão apresentadas nos **Anexos 9, 10 e 12**, respectivamente.

As frequências das distribuições dos 247 pacientes com MC e 280 controles de acordo com a idade, o sexo, a cor da pele, o fototipo cutâneo, a exposição solar, o tipo de exposição, queimaduras solares prévias e a presença de nevos estão apresentadas na **Tabela 2**.

A idade dos pacientes ao diagnóstico variou entre 16 e 94 anos (mediana: 55 anos). A maior parte dos pacientes autodeterminaram-se brancos, expuseram-se ao sol ao longo da vida, sendo pouco mais da metade com exposição do tipo crônica ou queimaduras solares prévias, e a maioria com mais de 50 nevos em todo o corpo.

A idade dos controles variou entre 19 e 67 anos (mediana: 47 anos). A maioria dos controles autodeterminou-se com cor de pele branca, pouco mais da metade não se expôs ao sol ao longo da vida, sendo que quando expostos, predominou-se a exposição do tipo intermitente, a maior parte não declarou queimaduras solares prévias e apresentou menos de 50 nevos em todo o corpo.

Os pacientes foram mais velhos, mais expostos ao sol, predominando a exposição do tipo crônica, referiram mais queimaduras solares ao longo da vida e declararam maior presença de nevos pelo corpo do que os controles. Essas diferenças foram corrigidas em todas as comparações de frequências dos genótipos em pacientes e controles por análise estatística pertinente.

Frequências similares para o sexo e fototipo cutâneo estiveram presentes entre pacientes e controles.

**Tabela 2.** Frequências das distribuições dos 247 pacientes com melanoma cutâneo e 280 controles de acordo com as características clínicas

Aspectos	Pacientes N (%)	Controles N (%)	Valor de <i>p</i>
<b>Idade (anos)</b>			
≤ 55	125 (50,6%)	229 (81,8%)	<b>&lt;0,0001</b>
> 55	122 (49,4%)	51 (18,2%)	
<b>Sexo</b>			
Masculino	130 (52,6%)	145 (51,8%)	0,84
Feminino	117 (47,4%)	135 (48,2%)	
<b>Cor da pele</b>			
Branca	231 (93,5%)	231 (82,5%)	<b>&lt;0,0001</b>
Não Branca	16 (6,5%)	49 (17,5%)	
<b>Fototipo cutâneo<sup>1,2</sup></b>			
I-II	154 (66,7%)	164 (60,1%)	0,12
III-VI	77 (33,3%)	109 (39,9%)	
<b>Exposição solar<sup>1</sup></b>			
Sim	196 (83,1%)	126 (45,0%)	<b>&lt;0,0001</b>
Não	40 (16,9%)	154 (55,0%)	
<b>Tipo de exposição solar<sup>1</sup></b>			
Nenhuma ou intermitente	96 (44,2%)	210 (75,0%)	<b>&lt;0,0001</b>
Crônica	121 (55,8%)	70 (25,0%)	
<b>Queimadura solar<sup>1</sup></b>			
Sim	132 (58,4%)	65 (23,9%)	<b>&lt;0,0001</b>
Não	94 (41,6%)	207 (76,1%)	

<b>Nevos<sup>1</sup></b>			
$\leq 50$	183 (75,9%)	260 (98,1%)	<b>&lt;0,0001</b>
$> 50$	58 (24,1%)	05 (1,9%)	

(N) número de indivíduos; <sup>1</sup>O número de pacientes e controles divergiu do total citado no estudo (N= 247 e N= 280, respectivamente), pois não foi possível obter informação consistente sobre algumas variáveis; <sup>2</sup>Classificação estabelecida por Fitzpatrick (1988); os valores de *p* considerados significativos estão apresentados em negrito

### Aspectos do tumor

As distribuições individualizadas dos 247 pacientes com MC por aspectos biológicos do tumor estão apresentadas no **Anexo 10**.

As frequências das distribuições dos 247 pacientes com MC e dos 280 controles estratificados por aspectos biológicos do tumor estão apresentadas na **Tabela 3**.

A maior parte dos pacientes apresentou tumor com crescimento vertical, não ulcerado, ausência de metástases regionais e à distância e em estágios iniciais. Pouco mais da metade dos tumores era do tipo extensivo superficial, classificado com o índice de Breslow  $\leq 1,5$  mm e níveis III e IV de Clark e cerca de metade dos pacientes apresentou tumor na região do tronco.

**Tabela 3.** Frequências das distribuições dos 247 pacientes com melanoma cutâneo de acordo com os aspectos do tumor

<b>Aspectos</b>	<b>Pacientes N (%)</b>
<b>Localização do tumor</b>	
Cabeça e pescoço	46 (18,6%)
Tronco	118 (47,8%)
Membro superior	40 (16,2%)
Membro inferior	43 (17,4%)

---

<b>Tipo histológico*</b>	
Extensivo superficial	119 (57,2%)
Lentigo maligna	26 (12,5%)
Nodular	63 (30,3%)
<b>Fase de crescimento*</b>	
Vertical	140 (72,5%)
Radial	53 (27,5%)
<b>Ulceração*</b>	
Sim	81 (36,7%)
Não	140 (63,3%)
<b>Índice de Breslow*</b>	
< 1,5 mm	123 (52,8%)
≥ 1,5 mm	110 (47,2%)
<b>Nível de Clark*</b>	
I	31 (13,2%)
II	42 (17,9%)
III	60 (25,5%)
IV	94 (40,0%)
V	08 (3,4%)
<b>Estágio clínico*</b>	
0	30 (12,3%)
I	92 (37,7%)
II	83 (34,0%)
III	27 (11,1%)
IV	12 (4,9%)

---

---

**Metástase**

Sim	13 (5,7%)
Não	216 (94,3%)

---

\*O número de pacientes divergiu do total citado no estudo (N= 247), pois não foi possível obter informações consistentes de alguns casos inseridos no estudo

**Tratamento dos pacientes com MC**

Dos 247 pacientes incluídos no estudo, 241 (97,6%) foram submetidos ao tratamento cirúrgico com remoção da lesão e 182 (73,7%) realizaram a ampliação de margens cirúrgicas. A pesquisa do linfonodo sentinela foi realizada em 48 pacientes (19,4%), 10 (4,0%) apresentaram comprometimento linfonodal e 26 (10,5%) foram submetidos à linfadenectomia.

Os tratamentos complementares foram divididos em três linhas, em primeira linha foram ministrados para 30 pacientes (12,1%) (16 receberam quimioterapia com dacarbazina, nove com cisplatina, vimblastina e dacarbazina (CVD), três com carboplatina e paclitaxel (CP), um com vemurafenib e um o dado não foi obtido). Em segunda linha, foram ministrados para nove pacientes (quatro receberam quimioterapia com dacarbazina, dois com paclitaxel, um com CP, um com CVD e um recebeu imunoterapia com ipilimumab). E em terceira linha, foram ministrados para três pacientes (um recebeu quimioterapia com CP, um com dabrafenib e trametinib e um recebeu imunoterapia com pembrolizumab). Além disso, quatro pacientes (1,6%) foram submetidos à radioterapia adjuvante.

**Determinação dos genótipos da SNV *MITF* rs7623610**

As distribuições individualizadas dos 247 pacientes com MC e 280 controles de acordo com os genótipos da SNV *MITF* rs7623610 estão apresentadas nos **Anexos 11 e 13**, respectivamente.

As amostras dos controles estiveram em equilíbrio de HW ( $\chi^2 = 0,92$ ,  $p = 0,33$ ) no locus do *MITF* c.938-325G>A (rs7623610). Entretanto, as amostras dos pacientes estiveram em desequilíbrio de HW para o referido locus ( $\chi^2 = 4,40$ ,  $p = 0,03$ ).

As frequências das distribuições dos 247 pacientes com MC e dos 280 controles estratificados por genótipos da SNV rs7623610 do gene *MITF*, isolados e combinados, estão apresentadas na **Tabela 4**.

**Tabela 4.** Frequências dos genótipos da variante *MITF* rs7623610 em 247 pacientes com melanoma cutâneo e 280 controles

<b>Genótipos</b> <i>MITF</i> rs7623610	<b>Pacientes</b> N (%)	<b>Controles</b> N (%)	<b>Valor de</b> <i>p</i>	<b>OR* (IC 95%)</b>
GG	71 (28,7)	92 (32,9)		Referência
GA	107 (43,3)	130 (46,4)	0,85	1,04 (0,63-1,72)
AA	69 (28,0)	58 (20,7)	<b>0,05</b>	1,73 (1,00-3,06)
GG	71 (28,7)	92 (32,9)		Referência
GA ou AA	176 (71,3)	188 (67,1)	0,49	1,17 (0,74-1,85)
GG ou GA	178 (72,1)	222 (79,3)		Referência
AA	69 (27,9)	58 (20,7)	<b>0,02</b>	1,76 (1,07-2,89)
GG ou AA	140 (56,7)	150 (53,6)		Referência
GA	107 (43,3)	130 (46,4)	0,18	1,33 (0,86-2,04)
Alelo G	0,50	0,56		Referência
Alelo A	0,50	0,44	0,06	1,32 (0,98-1,79)

(OR) razão das chances; (IC) intervalo de confiança; \* ajustada por idade, cor da pele, exposição solar e nevus; os valores de *p* significativos estão apresentados em negrito

A frequência do genótipo *MITF* AA foi maior em pacientes com MC do que em controles (27,9% *versus* 20,7%, *p*= 0,02), assim indivíduos portadores deste genótipo tiveram 1,76 vezes mais chances de desenvolver o MC do que indivíduos com os outros genótipos (GG ou GA).

As frequências dos outros genótipos isolados e em diferentes combinações e dos alelos G e A, foram similares em pacientes e controles

**Avaliação dos aspectos clínicos e do tumor com a SNV *MITF* rs7623610**

As frequências das distribuições dos genótipos da SNV *MITF* rs7623610 em 247 pacientes com MC, estratificados por aspectos clínicos (idade, sexo, cor da pele, fototipo cutâneo, exposição solar, tipo de exposição, queimadura solar e presença de nevos) e por características do tumor (localização, tipo histológico, fase de crescimento, ulceração, espessura de Breslow, nível de Clark e estágio TNM) estão apresentadas nas **Tabelas 5 e 6**, respectivamente.

**Tabela 5.** Frequências dos genótipos da variante *MITF* rs7623610 em 247 pacientes com melanoma cutâneo de acordo com as características clínicas

MITF rs7623610									
Aspecto	GG	GA ou AA	Valor de	GG ou GA	AA	Valor de	GG ou AA	GA	Valor de
	N (%)	N (%)	<i>P</i>	N (%)	N (%)	<i>P</i>	N (%)	N (%)	<i>P</i>
Idade mediana (anos)									
≤ 55	42 (33,6%)	83 (66,4%)	0,08	95 (76,0%)	30 (24,0%)	0,16	72 (57,6%)	53 (42,4%)	0,76
> 55	29 (23,8%)	93 (76,2%)		83 (68,0%)	39 (32,0%)		68 (55,7%)	54 (44,3%)	
Sexo									
Masculino	38 (29,2%)	92 (70,8%)	0,85	94 (72,3%)	36 (27,7%)	0,92	74 (56,9%)	56 (43,1%)	0,93
Feminino	33 (28,2%)	84 (71,8%)		84 (71,8%)	33 (28,2%)		66 (56,4%)	51 (43,6%)	
Cor da pele									
Branco	64 (27,7%)	167 (72,3%)	0,25	166 (71,9%)	65 (28,1%)	1,00	129 (55,8%)	102 (44,2%)	0,43
Não branco	07 (43,8%)	09 (56,3%)		12 (75,0%)	04 (25,0%)		11 (68,7%)	05 (31,3%)	
Fototipo cutâneo <sup>1,2</sup>									
I - II	44 (28,6%)	110 (71,4%)	1,00	106 (68,8%)	48 (31,2%)	0,14	92 (59,7%)	62 (40,3%)	0,18
III - VI	22 (28,6%)	55 (71,4%)		60 (77,9%)	17 (22,1%)		39 (50,6%)	38 (49,4%)	

**Exposição solar<sup>1</sup>**

Sim	54 (27,6%)	142 (72,4%)	0,52	143 (73,0%)	53 (27,0%)	0,30	107 (54,6%)	89 (45,4%)	0,13
Não	13 (32,5%)	27 (67,5%)		26 (65,0%)	14 (35,0%)		27 (67,5%)	13 (32,5%)	

**Tipo exposição solar<sup>1</sup>**

Nenhuma ou intermitente	30 (31,3%)	66 (68,7%)	0,71	72 (75,0%)	24 (25,0%)	0,43	54 (56,3%)	42 (43,7%)	0,71
Crônica	35 (28,9%)	86 (71,1%)		85 (70,2%)	36 (29,8%)		71 (58,7%)	50 (41,3%)	

**Queimadura solar<sup>1</sup>**

Sim	42 (31,8%)	90 (68,2%)	0,30	25 (26,7%)	40 (30,3%)	0,54	82 (62,1%)	50 (37,9%)	0,13
Não	24 (25,5%)	70 (74,5%)		69 (73,4%)	25 (26,6%)		49 (52,1%)	45 (47,9%)	

**Nevos<sup>1</sup>**

≤ 50	50 (27,3%)	133 (72,7%)	0,42	128 (69,9%)	55 (30,1%)	0,38	105 (57,4%)	78 (42,6%)	0,94
> 50	19 (32,8%)	39 (67,2%)		44 (75,9%)	14 (24,1%)		33 (56,9%)	25 (43,1%)	

(N) número de indivíduos; <sup>1</sup>O número de pacientes divergiu do total citado no estudo (N= 247), pois não foi possível obter informação consistente sobre algumas variáveis; <sup>2</sup>Classificação estabelecida por Fitzpatrick (1988)

**Tabela 6.** Frequências dos genótipos da variante *MITF* rs7623610 em 247 pacientes com melanoma cutâneo de acordo com as características do tumor

MITF rs7623610									
Aspecto	GG	GA ou AA	Valor de	GG ou GA	AA	Valor de	GG ou AA	GA	Valor de
	N (%)	N (%)	<i>p</i>	N (%)	N (%)	<i>p</i>	N (%)	N (%)	<i>p</i>
Localização do tumor									
Cabeça ou tronco	50 (30,5%)	114 (69,5%)	0,39	123 (75,0%)	41 (25,0%)	0,14	91 (55,5%)	73 (44,5%)	0,59
Membros	21 (25,3%)	62 (74,7%)		55 (66,3%)	28 (33,7%)		49 (59,0%)	34 (41,0%)	
Tipo histológico <sup>1,2</sup>									
ES + LM	43 (29,7%)	102 (70,3%)	0,26	106 (73,1%)	39 (26,9%)	0,34	82 (56,6%)	63 (43,4%)	0,89
Nodular	14 (22,2%)	49 (77,8%)		42 (66,7%)	21 (33,3%)		35 (55,6%)	28 (44,4%)	
Fase de crescimento <sup>1</sup>									
Vertical	36 (25,7%)	104 (74,3%)	0,16	97 (69,3%)	43 (30,7%)	0,74	79 (56,4%)	61 (43,6%)	0,33
Horizontal	19 (35,8%)	34 (64,2%)		38 (71,7%)	15 (28,3%)		34 (64,2%)	19 (35,8%)	
Ulceração <sup>1</sup>									
Sim	16 (19,8%)	65 (80,2%)	0,06	53 (65,4%)	28 (34,6%)	0,10	44 (54,3%)	37 (45,7%)	0,84
Não	44 (31,4%)	96 (68,6%)		106 (75,7%)	34 (24,3%)		78 (55,7%)	62 (44,3%)	

Índice de Breslow (mm) <sup>1,2</sup>									
≤ 1,5	36 (29,3%)	87 (70,7%)	0,73	93 (75,6%)	30 (24,4%)	0,26	66 (53,7%)	57 (46,3%)	0,48
> 1,5	30 (27,3%)	80 (72,7%)		76 (69,1%)	34 (30,9%)		64 (58,2%)	46 (41,8%)	
Nível de Clark <sup>1,2</sup>									
I - II	25 (34,2%)	48 (65,8%)	0,15	52 (71,2%)	21 (28,8%)	0,72	46 (63,0%)	27 (37,0%)	0,11
III - V	41 (25,3%)	121 (74,7%)		119 (73,5%)	43 (26,5%)		84 (51,9%)	78 (48,1%)	
Estágio clínico <sup>1,2</sup>									
0 - II	62 (30,2%)	143 (69,8%)	0,07	154 (75,1%)	51 (24,9%)	0,007	113 (55,1%)	92 (44,9%)	0,45
III - IV	06 (15,4%)	33 (84,6%)		21 (53,8%)	18 (46,2%)		24 (61,5%)	15 (38,5%)	

(N) número de indivíduos; (ES) Extensivo superficial; (LM) Lentigo maligna; <sup>1</sup>O número de pacientes divergiu do total citado no estudo (N= 247), pois não foi possível obter informação consistente sobre algumas variáveis; <sup>2</sup>De acordo com critério do *American Joint Committee on Cancer*

Analisando-se os aspectos clínicos, as frequências dos genótipos da SNV *MITF* rs7623610 foram similares em pacientes estratificados por idade, sexo, cor da pele, fototipo cutâneo, exposição solar, tipo de exposição, queimadura solar e presença de nevos (**Tabela 5**).

Em relação aos aspectos do tumor, o genótipo *MITF* c.938-325AA foi mais comum em pacientes diagnosticados com tumores em estágios avançados (III ou IV) do que em estágios iniciais (0, I ou II) (46,2% *versus* 24,9%,  $p= 0,007$ ). Enquanto que, frequências similares dos genótipos da SNV *MITF* rs7623610 foram observadas em pacientes estratificados por localização do tumor, tipo histológico, fase de crescimento, ulceração, espessura de Breslow e nível de Clark (**Tabela 6**).

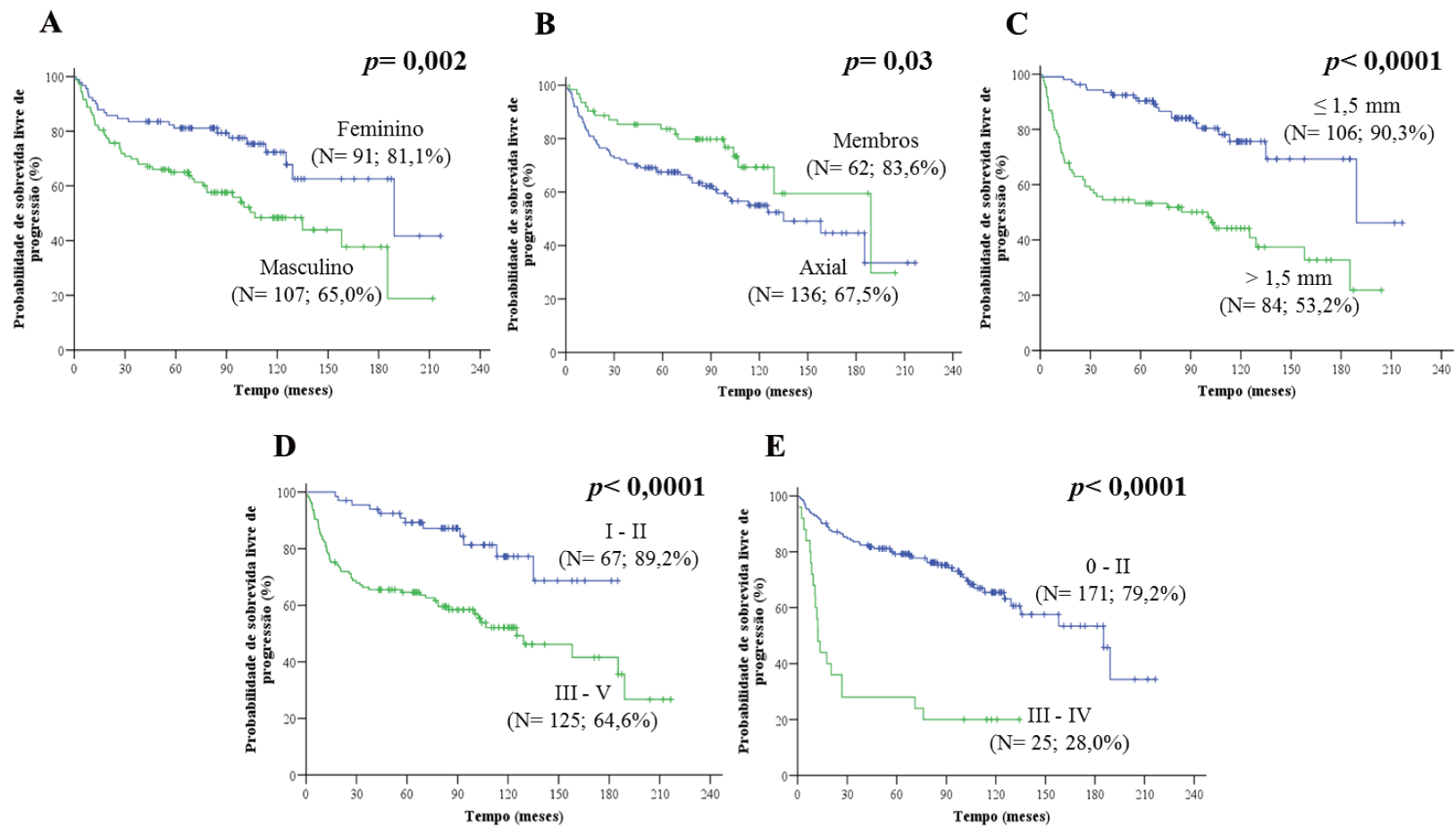
### **Avaliação da sobrevida dos pacientes**

Foram obtidos dados consistentes para as análises de sobrevivência de 210 pacientes com MC, os quais foram incluídos nas análises de SLP e SEM.

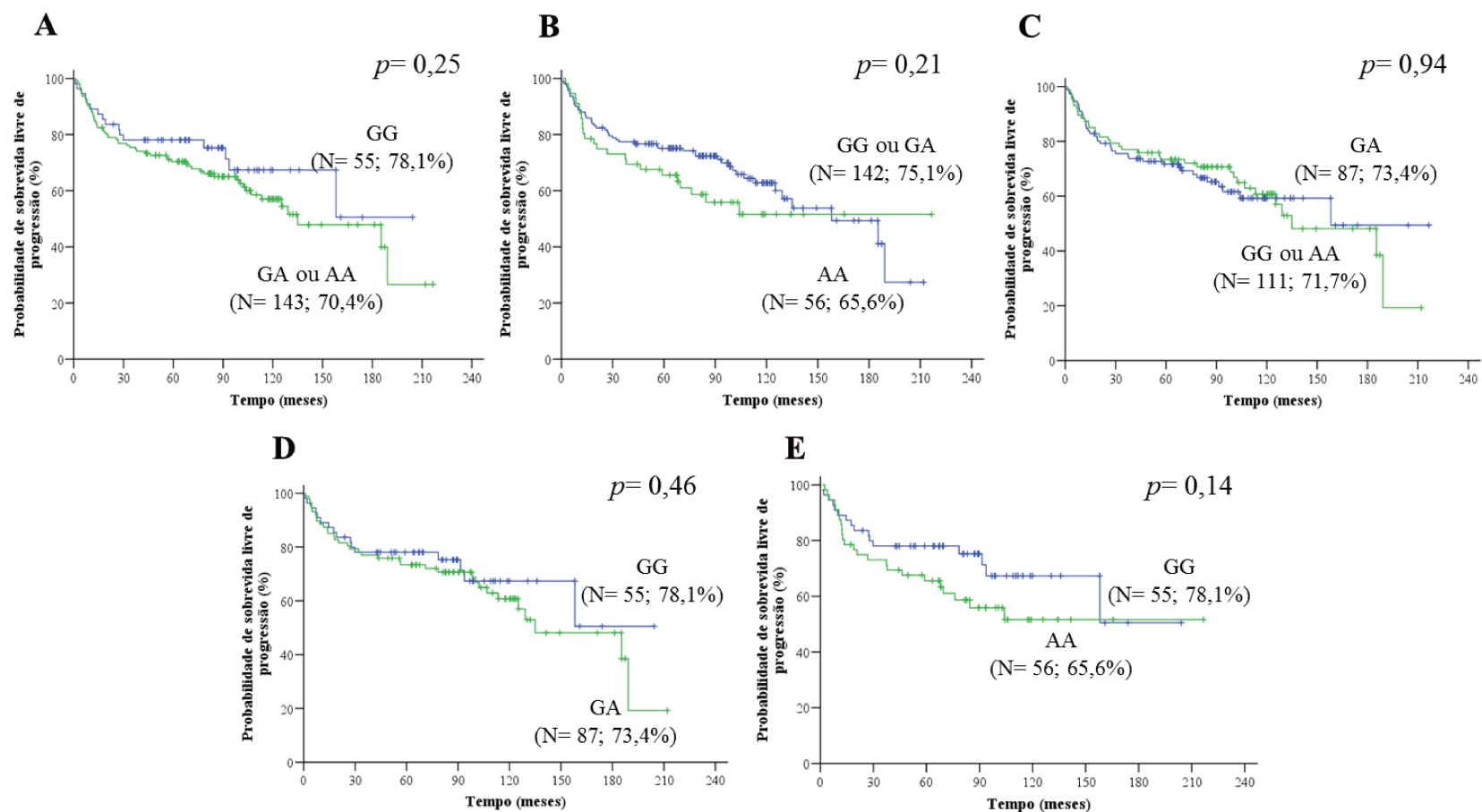
O tempo mediano de seguimento foi de 91 meses (variação: 5-216 meses) e análise do estudo foi realizada em Outubro de 2018. No momento da análise, 136 pacientes estavam vivos sem doença, nove estavam vivos com a doença e 65 estavam mortos (43 devido a causas relacionadas à doença e 22 devido a outras causas). As taxas de SLP e de SEM, em 60 meses, dos pacientes analisados foram de 72,4% e 82,9%, respectivamente.

Aos 60 meses de acompanhamento clínico, a SLP foi menor em pacientes do sexo masculino (65,0% *versus* 81,1%;  $p= 0,002$ ) (**Figura 10A**), em tumores localizados na região axial (67,5% *versus* 83,6%;  $p= 0,03$ ) (**Figura 10B**), com índice de Breslow maior que 1,5 mm (53,2% *vs.* 90,3%;  $p< 0,0001$ ) (**Figura 10C**), nível de Clark III, IV ou V (64,6% *vs.* 89,2%;  $p< 0,0001$ ) (**Figura 10D**) e estágio clínico III ou IV (28,0% *vs.* 79,2%,  $p< 0,0001$ ) (**Figura 10E**), por meio das estimativas de Kaplan-Meier. Na análise univariada de Cox, as diferenças entre os grupos permaneceram as mesmas (**Tabela 7**). Na análise multivariada de Cox, pacientes com tumores localizados na região axial, índice de Breslow maior que 1,5 mm e estágio clínico avançado (III ou IV), apresentaram riscos 1,98, 3,02, 3,12 vezes maior de apresentar progressão, recidiva ou evoluir a óbito devido à doença, respectivamente (**Tabela 7**). Aspectos como a idade, a cor da pele, bem como os distintos genótipos da SNV *MITF* rs7623610 isolados ou agrupados (**Figura 11**) não influenciaram a SLP dos pacientes com MC (**Tabela 7**).

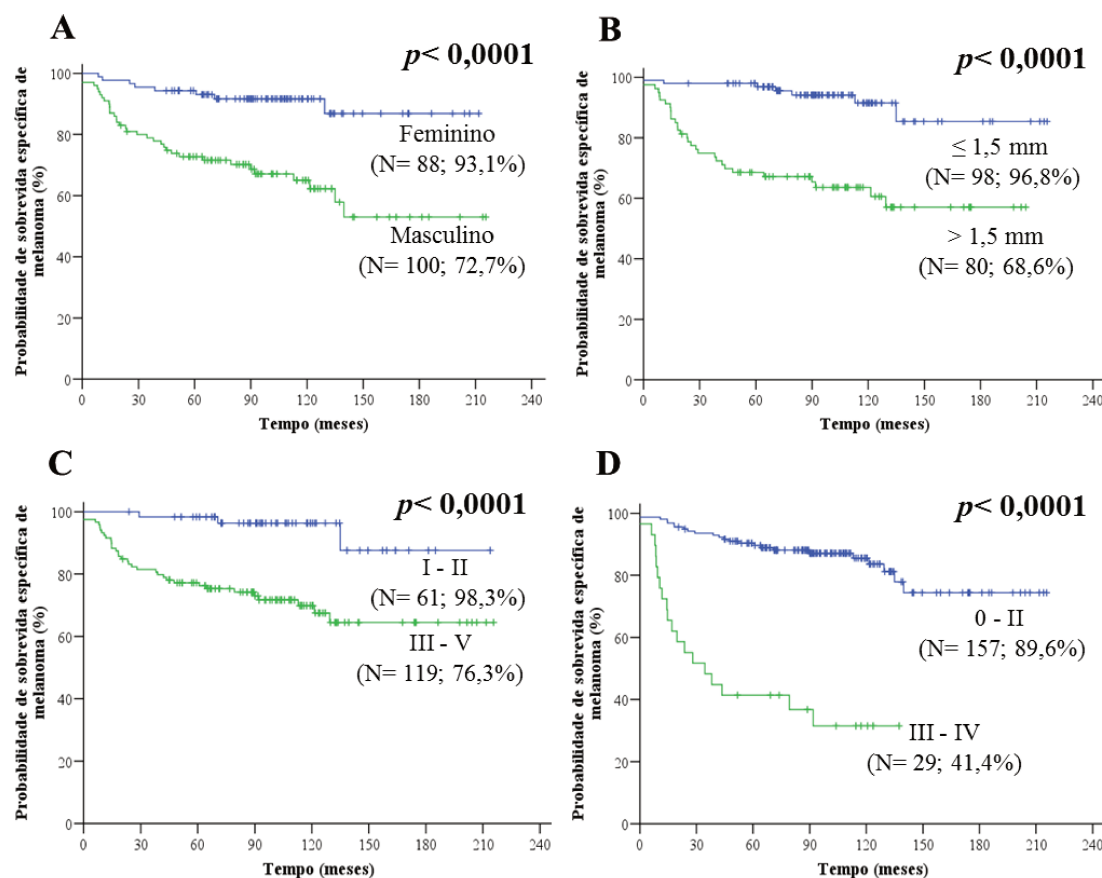
Aos 60 meses de acompanhamento clínico, a SEM foi menor em pacientes do sexo masculino (78,6% *versus* 86,8%;  $p < 0,0001$ ) (**Figura 12A**), em tumores com índice de Breslow maior que 1,5 mm (68,6% *vs.* 96,8%;  $p < 0,0001$ ) (**Figura 12B**), nível de Clark III, IV ou V (76,3% *vs.* 98,3%;  $p < 0,0001$ ) (**Figura 12C**) e estágio clínico III ou IV (41,4% *vs.* 89,6%,  $p < 0,0001$ ) (**Figura 12D**), com o genótipo GA ou AA da SNV *MITF* rs7623610 (79,4% *vs.* 90,1%;  $p = 0,04$ ) (**Figura 13A**) e com o genótipo AA da SNV *MITF* rs7623610 isolado (77,1% *vs.* 90,1%;  $p = 0,03$ ) (**Figura 13E**), por meio das estimativas de Kaplan-Meier. Na análise univariada de Cox, as diferenças entre os grupos permaneceram as mesmas do teste de *log-rank*. Na análise multivariada de Cox (ajustada por sexo, índice de Breslow, nível de Clark e estágio clínico), pacientes com tumores com índice de Breslow maior que 1,5 mm e estágio clínico avançado (III ou IV), apresentaram riscos 3,44, 4,47, 3,90 vezes maior de evoluir para o óbito devido à doença, respectivamente. Aspectos como a idade, a cor da pele, a localização do tumor, bem como alguns agrupamentos de genótipos da SNV *MITF* rs7623610 não influenciaram a SEM dos pacientes com MC (**Tabela 7**).



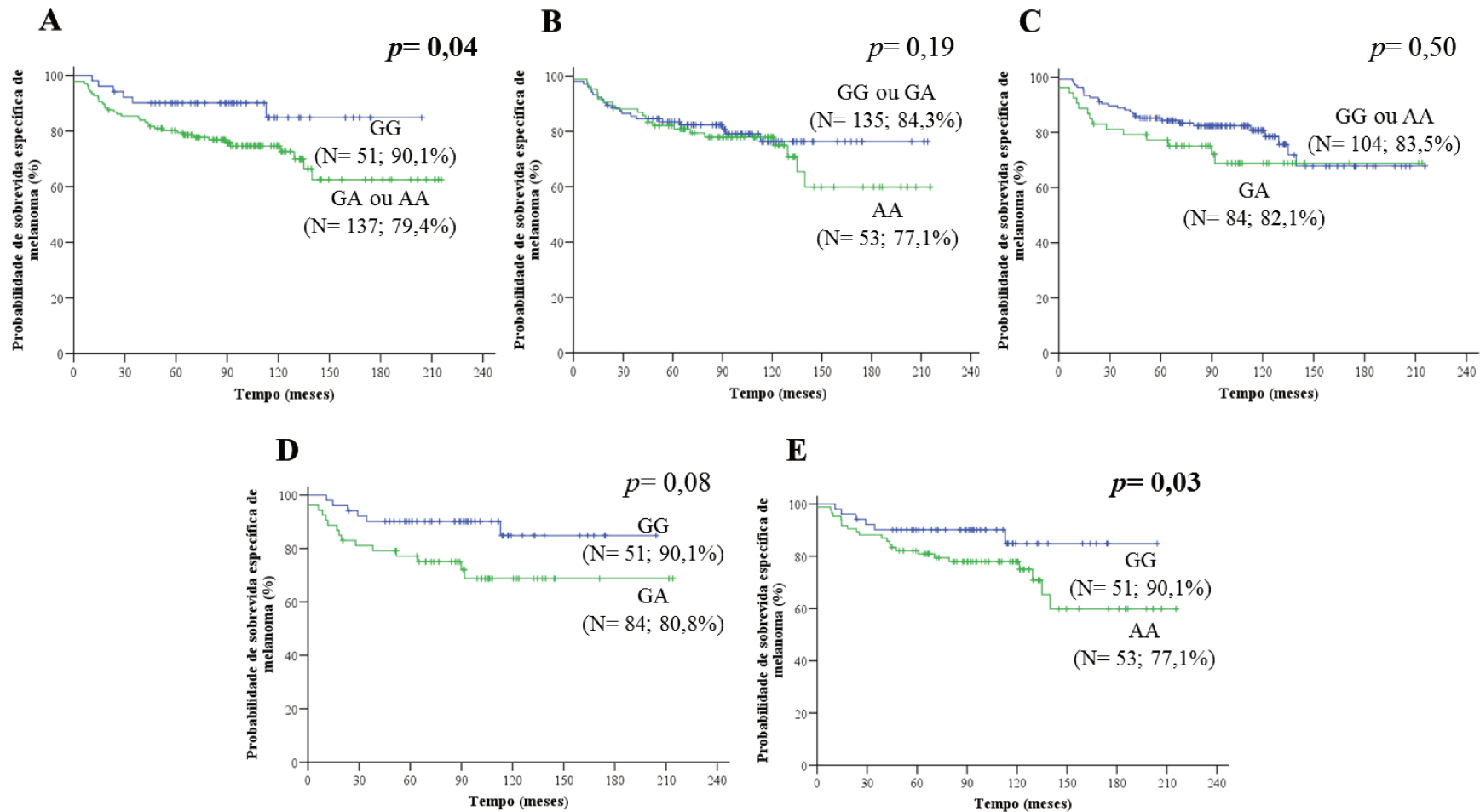
**Figura 10.** Curvas de probabilidades de sobrevida livre de progressão dos 210 pacientes com melanoma cutâneo, estratificados por (A) sexo, (B) localização do tumor, (C) índice de Breslow, (D) nível de Clark e (E) estágio clínico. Valores entre parênteses são porcentagens de sobrevida aos 60 meses de seguimento



**Figura 11.** Curvas de probabilidades de sobrevida livre de progressão dos 210 pacientes com melanoma cutâneo, estratificados pelos genótipos da SNV *MITF* rs7623610 (A) GG *versus* GA ou AA, (B) GG ou GA *versus* AA, (C) GG ou AA *versus* GA, (D) GG *versus* GA e (E) GG *versus* AA. Valores entre parênteses são porcentagens de sobrevida aos 60 meses de seguimento



**Figura 12.** Curvas de probabilidades de sobrevida específica de melanoma dos 210 pacientes com melanoma cutâneo, estratificados por (A) sexo, (B) índice de Breslow, (C) nível de Clark e (D) estágio clínico. Valores entre parênteses são porcentagens de sobrevida aos 60 meses de seguimento



**Figura 13.** Curvas de probabilidades de sobrevida específica de melanoma dos 210 pacientes com melanoma cutâneo, estratificados pelos genótipos da SNV *MITF* rs7623610 (A) GG versus GA ou AA, (B) GG ou GA versus AA, (C) GG ou AA versus GA, (D) GG versus GA e (E) GG versus AA. Valores entre parênteses são porcentagens de sobrevida aos 60 meses de seguimento

**Tabela 7.** Sobrevida livre de progressão e sobrevida específica de melanoma dos 210 pacientes com melanoma cutâneo, estratificados por aspectos clínicos, tumorais e genótipos da variante *MITF* rs7623610 em análise univariada e multivariada de Cox

≤ 1,5 mm	106/21	Referência	<b>&lt;0,0001</b>	Referência	<b>&lt;0,0001</b>	98/07	Referência	<b>&lt;0,0001</b>	Referência	<b>0,001</b>
> 1,5 mm	84/48	3,85 (2,30-6,45)		3,02 (1,76-5,18)		80/30	6,15 (2,70-14,02)		4,47 (1,90-10,50)	
<b>Nível de Clark*</b>										
I - II	67/12	Referência	<b>&lt;0,0001</b>	Referência	0,38	61/03	Referência	<b>0,001</b>	Referência	0,27
III - V	125/59	3,16 (1,69-5,89)		1,39 (0,66-2,94)		119/35	6,91 (2,12-22,48)		2,14 (0,55-8,29)	
<b>Estágio clínico*</b>										
0 - II	171/54	Referência	<b>&lt;0,0001</b>	Referência	<b>&lt;0,0001</b>	157/24	Referência	<b>&lt;0,0001</b>	Referência	<b>&lt;0,0001</b>
III - IV	25/20	4,93 (2,91-8,34)		3,12 (1,75-5,55)		29/19	7,60 (4,09-14,10)		3,90 (1,96-7,74)	
<b>MITF rs7623610</b>										
GG	55/16	Referência	0,46	NA		51/06	Referência	0,08	Referência	0,14
GA	87/35	1,24 (0,68-2,25)				84/22	2,18 (0,88-5,40)		2,10 (0,77-5,71)	
AA	56/24	1,58 (0,84-2,99)	0,15	NA		53/15	2,68 (1,04-6,92)	<b>0,04</b>	1,59 (0,48-5,19)	0,44
GG	55/16	Referência	0,25	NA		51/06	Referência	<b>0,05</b>	Referência	0,22
GA ou AA	143/59	1,37 (0,79-2,39)				137/37	2,37 (1,00-5,61)		1,82 (0,69-4,80)	
GG ou GA	142/51	Referência	0,21	NA		135/28	Referência	0,19	NA	
AA	56/24	1,36 (0,83-2,21)				53/15	1,51 (0,81-2,84)			
GG ou AA	111/40	Referência	0,94	NA		104/21	Referência	0,50	NA	
GA	87/35	1,01 (0,64-1,60)				84/22	1,22 (0,67-2,22)			

(SLP) sobrevida livre de progressão; (SEM) sobrevida específica de melanoma; (N) número; (HR) *hazard ratio*; (IC) intervalo de confiança; (mm) milímetros; (NA) não avaliado na análise multivariada de Cox; \*o número total de indivíduos diferiu do valor do estudo (N= 210), pois não foi possível obter informações consistentes sobre as variáveis de alguns indivíduos. As diferenças significativas entre os grupos estão apresentadas em negrito

## Quantificação da expressão gênica por meio da PCR quantitativa (qPCR)

### Avaliação da expressão gênica em pacientes

As distribuições individualizadas das amostras de pacientes com MC em relação à expressão dos genes *ACTB*, *MITF*, *HNRNPA1* e *SFI*, como também aos genótipos da SNV *MITF* rs7623610 estão apresentados nos **Anexos 14, 15 e 16**.

### Gene *MITF*

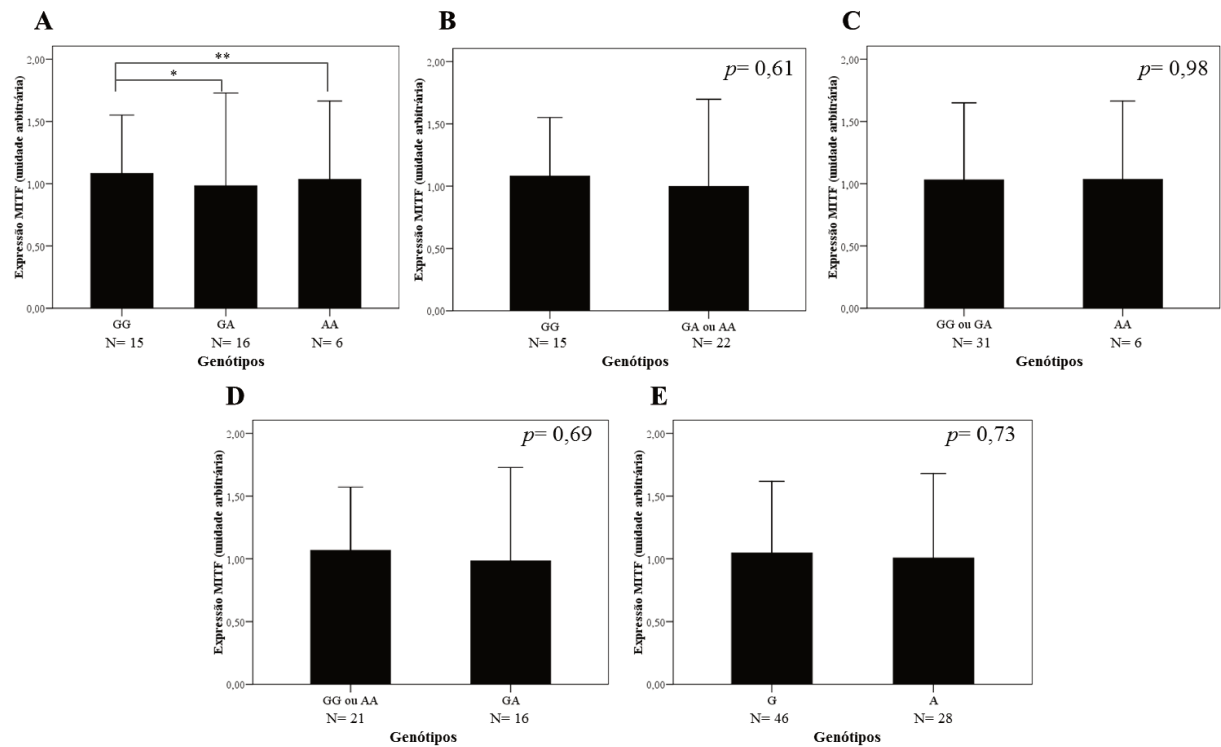
As expressões do gene *MITF* em amostras dos leucócitos de sangue periférico de 37 pacientes com MC, para os diferentes genótipos e os distintos alelos da SNV *MITF* rs7623610 avaliados no estudo, estão apresentadas na **Tabela 8**.

**Tabela 8.** Expressão gênica do *MITF* de 37 amostras dos leucócitos de sangue periférico de pacientes de acordo com os genótipos e alelos da variante *MITF* rs7623610

Genótipos <i>MITF</i> (rs7623610)	N	Média (UA)	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo	Valor de <i>p</i>
GG	15	1,08	0,84	0,47	0,58	2,05	Referência
GA	16	0,98	0,93	0,74	0,05	2,32	0,52
AA	6	1,03	1,16	0,62	0,20	1,79	1,00
GG	15	1,08	0,84	0,47	0,58	2,05	Referência
GA ou AA	22	0,99	1,06	0,70	0,05	2,32	0,61
GG ou GA	31	1,03	0,84	0,61	0,05	2,32	Referência
AA	6	1,03	1,16	0,62	0,20	1,79	0,98
GG ou AA	21	1,06	0,88	0,50	0,20	2,05	Referência
GA	16	0,98	0,93	0,74	0,05	2,32	0,69
Alelo G	46	1,04	0,84	0,56	0,05	2,32	Referência
Alelo A	28	1,00	1,06	0,67	0,05	2,32	0,73

(N) número de indivíduos; (UA) unidade arbitrária

Considerando os valores de expressão do gene *MITF* em pacientes com MC, os níveis de RNAm apresentaram-se similares para indivíduos com os genótipos isolados ou agrupados, como também para os alelos da SNV *MITF* rs7623610 (**Figura 14**).



**Figura 14.** Expressão do gene *MITF* em amostras de leucócitos de sangue periférico de 37 pacientes estratificados por genótipos e alelos da variante *MITF* rs7623610 (**A**) GG, GA e AA (\* $p=0,52$ ; \*\* $p=1,00$ ), (**B**) GG *versus* GA ou AA, (**C**) GG ou GA *versus* AA, (**D**) GG ou AA *versus* GA e (**E**) alelos G e A

### Gene *HNRNPA1*

As expressões do gene *HNRNPA1* em amostras dos leucócitos de sangue periférico de 40 pacientes com MC, para os diferentes genótipos e os distintos alelos da SNV *MITF* rs7623610 avaliados no estudo, estão apresentadas na **Tabela 9**.

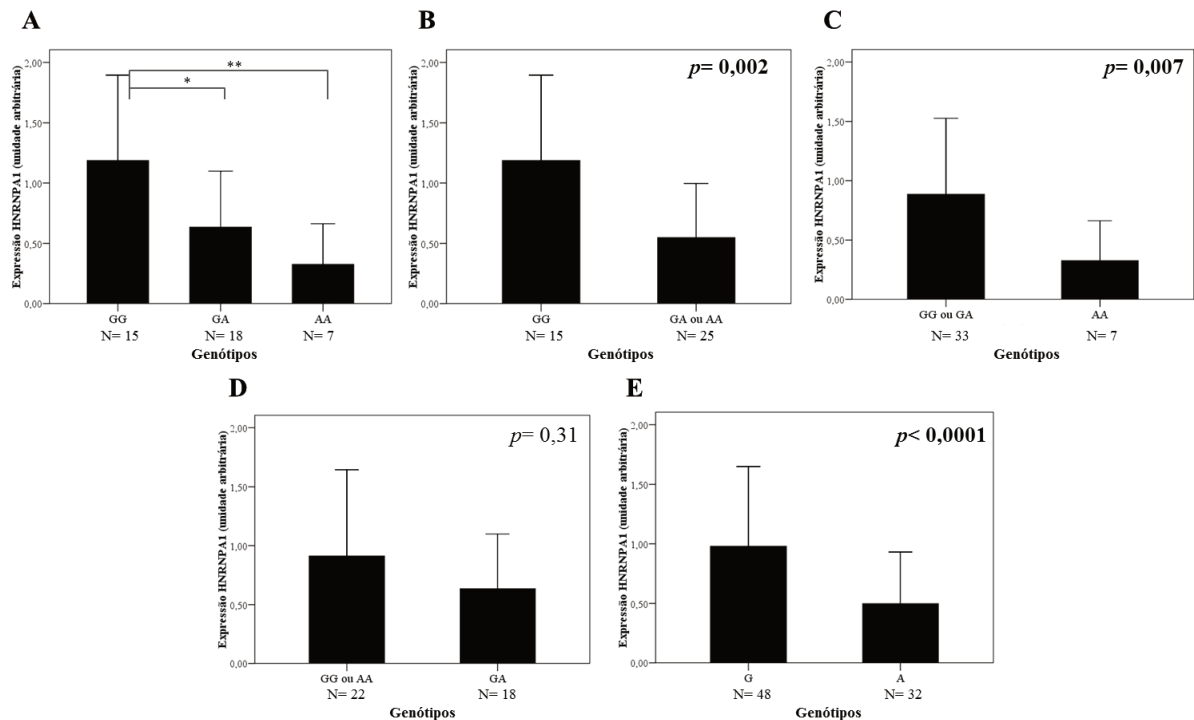
**Tabela 9.** Expressão gênica do *HNRNPA1* de 40 amostras dos leucócitos de sangue periférico de pacientes de acordo com os genótipos e alelos da variante *MITF* rs7623610

Genótipos <i>MITF</i> (rs7623610)	N	Média (UA)	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo	Valor de <i>p</i>
GG	15	1,18	1,24	0,70	0,33	2,75	Referência
GA	18	0,63	0,59	0,46	0,05	1,74	<b>0,01</b>
AA	7	0,32	0,14	0,33	0,05	0,98	<b>0,001</b>
GG	15	1,18	1,24	0,70	0,33	2,75	Referência
GA ou AA	25	0,54	0,46	0,44	0,05	1,74	<b>0,002</b>
GG ou GA	33	0,88	0,67	0,64	0,05	2,75	Referência
AA	7	0,32	0,14	0,33	0,05	0,98	<b>0,009</b>
GG ou AA	22	0,91	0,81	0,73	0,05	2,75	Referência
GA	18	0,63	0,59	0,46	0,05	1,74	0,31
Alelo G	48	0,97	0,88	0,67	0,05	2,75	Referência
Alelo A	32	0,49	0,44	0,43	0,05	1,74	<b>&lt; 0,0001</b>

(N) número de indivíduos; (UA) unidade arbitrária

Considerando os valores de expressão do gene *HNRNPA1*, os níveis de RNAm do genótipo *MITF* c.938-325GG foram maiores considerando os genótipos GA ou AA isolados (N; média (UA); desvio padrão (DP)): GG (15; 1,18; 0,70) *versus* GA (18; 0,63; 0,46) e *versus* AA (7; 0,32; 0,33);  $p= 0,01$  e  $p= 0,001$ , respectivamente. Os níveis de RNAm do genótipo GG também foram maiores considerando os genótipos GA ou AA agrupados: GG (15; 1,18; 0,70) *versus* GA ou AA (25; 0,54; 0,44);  $p= 0,002$ . Os níveis de RNAm dos genótipos agrupados GG ou GA também foram maiores considerando o genótipo AA isolado: GG ou GA (33; 0,88; 0,64) *versus* AA (7; 0,32; 0,33);  $p= 0,009$ . Os níveis de RNAm do alelo G também foram maiores comparando-se com o alelo A: G (48; 0,97; 0,67) *versus* AA (32; 0,49; 0,43);  $p < 0,0001$  (**Figura 15**).

Enquanto que níveis de RNAm similares foram observados quando comparados os genótipos GG ou AA agrupados com o genótipo GA isolado: GG ou AA (22; 0,91; 0,73) *versus* GA (18; 0,63; 0,46) (**Figura 15**).



**Figura 15.** Expressão do gene *HNRNPA1* em amostras de leucócitos de sangue periférico de 40 pacientes estratificados por genótipos e alelos da variante *MTF* rs7623610 (**A**) GG, GA e AA (\* $p = 0,01$ ; \*\* $p = 0,001$ ), (**B**) GG *versus* GA ou AA, (**C**) GG ou GA *versus* AA, (**D**) GG ou AA *versus* GA e (**E**) alelos G e A

### Gene *SFI*

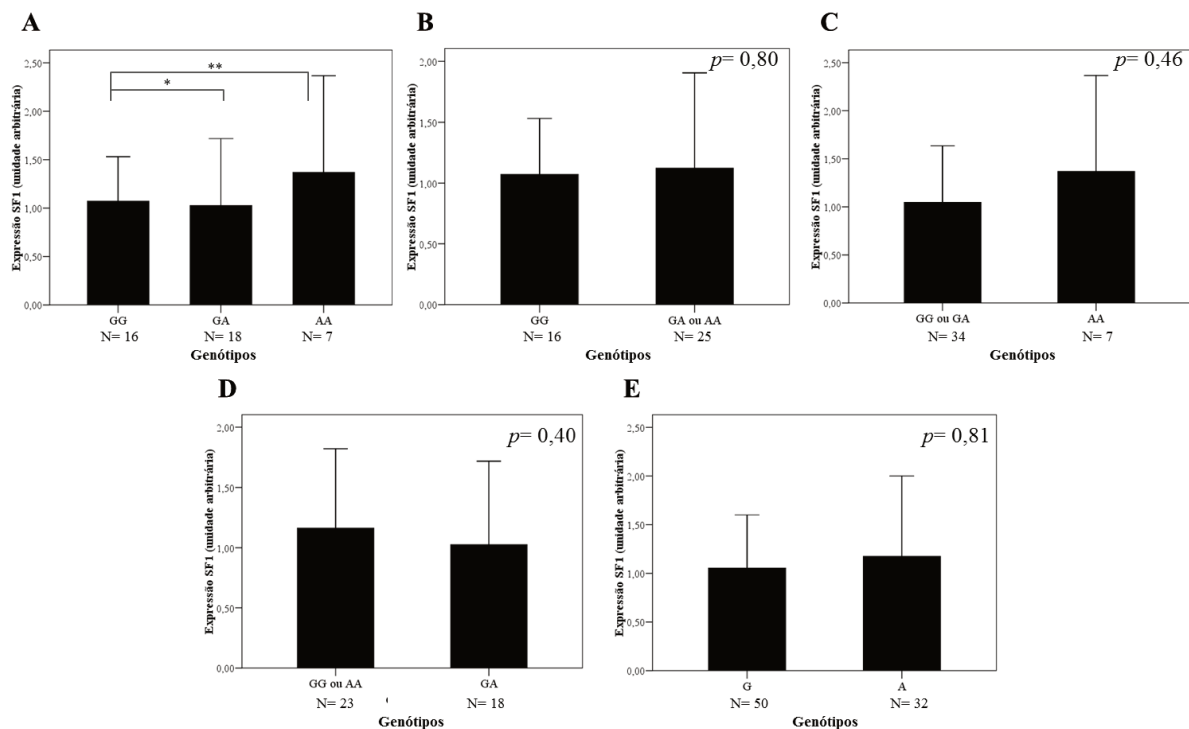
As expressões do gene *SFI* em amostras dos leucócitos de sangue periférico de 41 pacientes com MC, para os diferentes genótipos e os distintos alelos do SNV *MTF* rs7623610 avaliados no estudo, estão apresentadas na **Tabela 10**.

**Tabela 10.** Expressão gênica do gene *SFI* de 41 amostras dos leucócitos de sangue periférico de pacientes de acordo com os genótipos e alelos da variante *MITF* rs7623610

<b>Genótipos <i>MITF</i> (rs7623610)</b>	<b>N</b>	<b>Média (UA)</b>	<b>Mediana</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>Valor de <i>p</i></b>
GG	16	1,07	0,95	0,45	0,54	2,40	Referência
GA	18	1,02	0,81	0,69	0,24	3,05	0,55
AA	7	1,37	1,30	0,99	0,15	2,93	0,62
GG	16	1,07	0,95	0,45	0,54	2,40	Referência
GA ou AA	25	1,12	0,85	0,78	0,15	3,05	0,80
GG ou GA	34	1,04	0,89	0,58	0,24	3,05	Referência
AA	7	1,37	1,30	0,99	0,15	2,93	0,46
GG ou AA	23	1,16	0,99	0,65	0,15	2,93	Referência
GA	18	1,02	0,81	0,69	0,24	3,05	0,40
Alelo G	50	1,05	0,91	0,54	0,24	3,05	Referência
Alelo A	32	1,17	0,96	0,82	0,15	3,05	0,81

(N) número de indivíduos; (UA) unidade arbitrária

Considerando os valores de expressão do gene *SFI* em pacientes com MC, os níveis de RNAm apresentaram-se similares para indivíduos com os genótipos isolados ou agrupados, como também para os alelos da SNV *MITF* rs7623610 (**Figura 16**).



**Figura 16.** Expressão do gene *SF1* em amostras de leucócitos de sangue periférico de 41 pacientes estratificados por genótipos e alelos da variante *MITF* rs7623610 (A) GG, GA e AA (\* $p=0,55$ ; \*\* $p=0,62$ ), (B) GG versus GA ou AA, (C) GG ou GA versus AA, (D) GG ou AA versus GA e (E) alelos G e A

### Avaliação da expressão gênica em controles

As distribuições individualizadas das amostras de indivíduos saudáveis em relação à expressão dos genes *ACTB*, *MITF*, *HNRNPA1* e *SF1*, como também os genótipos para a SNV *MITF* rs7623610 estão apresentados nos **Anexos 17, 18 e 19**.

### Gene *MITF*

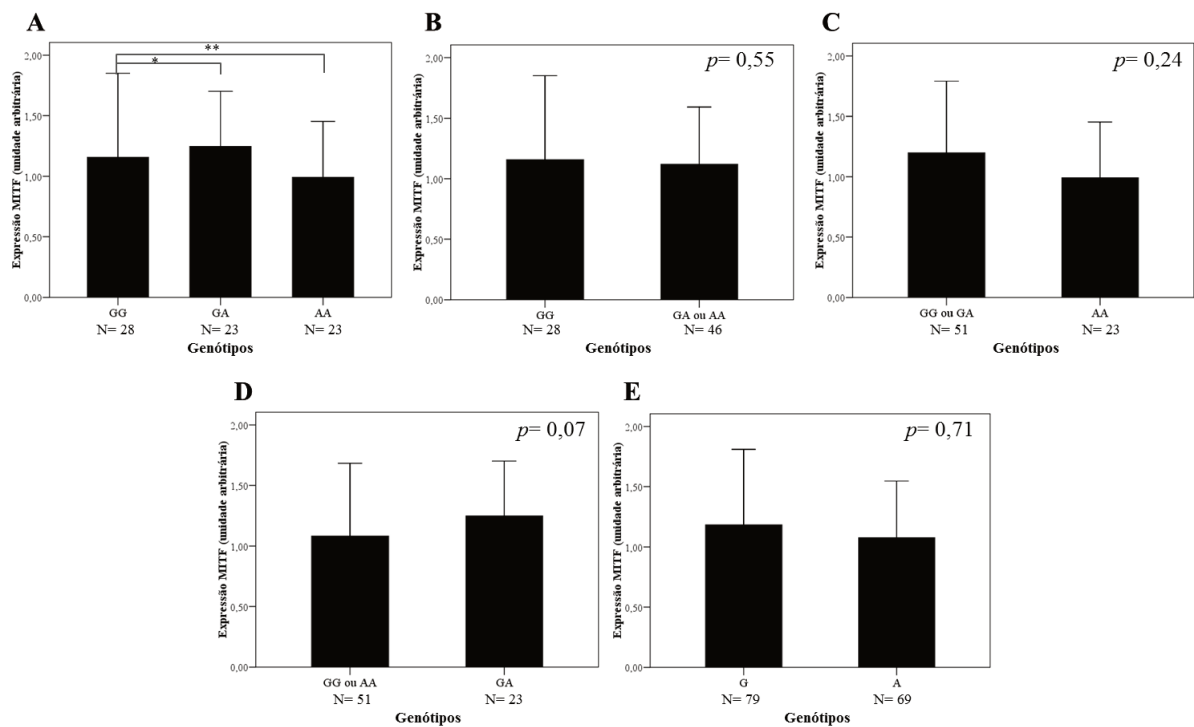
As expressões do gene *MITF* em amostras dos leucócitos de sangue periférico de 74 controles, para os diferentes genótipos e os distintos alelos da SNV *MITF* rs7623610 avaliados no estudo, estão apresentadas na **Tabela 11**.

**Tabela 11.** Expressão gênica do *MITF* de 74 amostras dos leucócitos de sangue periférico de controles de acordo com os genótipos e alelos da variante *MITF* rs7623610

<b>Genótipos <i>MITF</i> (rs7623610)</b>	<b>N</b>	<b>Média (UA)</b>	<b>Mediana</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>Valor de <i>p</i></b>
GG	28	1,15	0,95	0,69	0,34	3,18	Referência
GA	23	1,24	1,10	0,45	0,45	2,10	0,16
AA	23	0,99	0,95	0,46	0,23	1,78	0,69
GG	28	1,15	0,95	0,69	0,34	3,18	Referência
GA ou AA	46	1,12	1,06	0,47	0,23	2,10	0,55
GG ou GA	51	1,19	1,05	0,59	0,34	3,18	Referência
AA	23	0,99	0,95	0,46	0,23	1,78	0,24
GG ou AA	51	1,08	0,95	0,59	0,23	3,18	Referência
GA	23	1,24	1,10	0,45	0,45	2,10	0,07
Alelo G	79	1,18	1,01	0,62	0,34	3,18	Referência
Alelo A	69	1,07	1,05	0,46	0,23	2,10	0,71

(N) número de indivíduos; (UA) unidade arbitrária

Considerando os valores de expressão do gene *MITF* em indivíduos saudáveis, os níveis de RNAm apresentaram-se similares para indivíduos com os genótipos isolados ou agrupados, como também para os alelos da SNV *MITF* rs7623610 (**Figura 17**).



**Figura 17.** Expressão do gene *MITF* em amostras de leucócitos de sangue periférico de 74 controles estratificados por genótipos e alelos da variante *MITF* rs7623610 (A) GG, GA e AA (\* $p=0,16$ ; \*\* $p=0,69$ ), (B) GG *versus* GA ou AA, (C) GG ou GA *versus* AA, (D) GG ou AA *versus* GA e (E) alelos G e A

### Gene *HNRNPA1*

As expressões do gene *HNRNPA1* em amostras dos leucócitos de sangue periférico de 83 controles, para os diferentes genótipos e os distintos alelos da SNV *MITF* rs7623610 avaliados no estudo, estão apresentadas na **Tabela 12**.

**Tabela 12.** Expressão gênica do *HNRNPA1* de 83 amostras dos leucócitos de sangue periférico de indivíduos saudáveis de acordo com os genótipos e alelos da variante *MITF* rs7623610

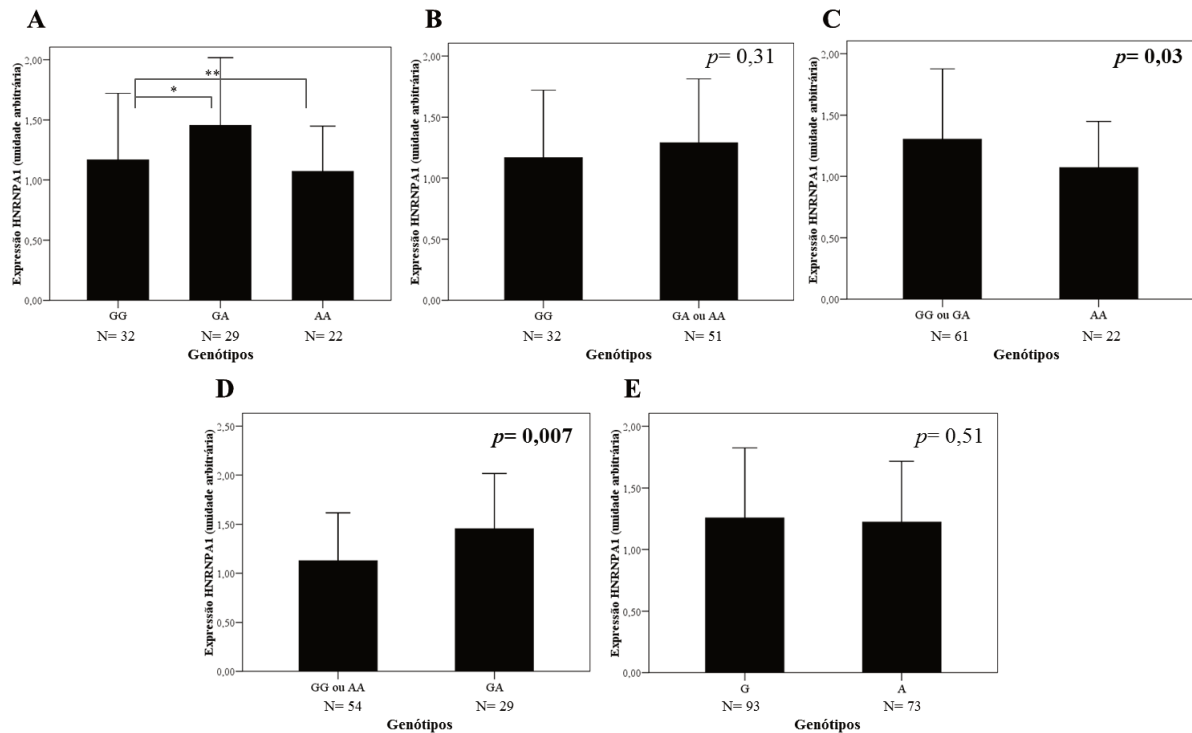
Genótipos <i>MITF</i> (rs7623610)	N	Média (UA)	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo	Valor de <i>p</i>
GG	32	1,16	1,33	0,55	0,19	2,70	Referência
GA	29	1,45	1,45	0,56	0,49	3,00	<b>0,04</b>
AA	22	1,07	1,11	0,37	0,28	1,83	0,45
GG	32	1,16	1,33	0,55	0,19	2,70	Referência
GA ou AA	51	1,28	1,16	0,52	0,28	3,00	0,31
GG ou GA	61	1,30	1,34	0,57	0,19	3,00	Referência
AA	22	1,07	1,11	0,37	0,28	1,83	<b>0,03</b>
GG ou AA	54	1,12	1,14	0,48	0,19	2,70	Referência
GA	29	1,45	1,45	0,56	0,49	3,00	<b>0,007</b>
Alelo G	93	1,25	1,34	0,56	0,19	3,00	Referência
Alelo A	73	1,22	1,15	0,49	0,28	3,00	0,51

(N) número de indivíduos; (UA) unidade arbitrária

Considerando os valores de expressão do gene *HNRNPA1*, os níveis de RNAm do genótipo *MITF* c.938-325GG foram maiores considerando o genótipo GA isolado (N; média (UA); DP): GG (32; 1,16; 0,55) *versus* GA (29; 1,45; 0,56);  $p=0,04$ . Os níveis de RNAm dos genótipos agrupados GG ou GA também foram maiores considerando o genótipo AA isolado: GG ou GA (61; 1,30; 0,57) *versus* AA (22; 1,07; 0,37);  $p=0,03$ . Os níveis de RNAm dos genótipos agrupados GG ou AA também foram maiores considerando o genótipo GA isolado: GG ou AA (54; 1,12; 0,48) *versus* GA (29; 1,45; 0,56);  $p=0,007$  (**Figura 18**).

Enquanto que níveis de RNAm similares foram observados quando comparado o genótipo GG isolado com o genótipo AA isolado: GG (32; 1,16; 0,55) *versus* AA (22; 1,07; 0,37), quando comparado o genótipo GG isolado com os genótipos GA ou AA agrupados: GG

(32; 1,16; 0,55) *versus* GA ou AA (51; 1,28; 0,52) e quando comparados o alelo G aos do alelo A: G (93; 1,25; 0,56) *versus* A (73; 1,22; 0,49) (**Figura 18**).



**Figura 18.** Expressão do gene *HNRNPA1* em amostras de leucócitos de sangue periférico de 83 controles estratificados por genótipos e alelos da variante *MITF* rs7623610 (**A**) GG, GA e AA (\*p= 0,04; \*\*p= 0,45), (**B**) GG *versus* GA ou AA, (**C**) GG ou GA *versus* AA, (**D**) GG ou AA *versus* GA e (**E**) alelos G e A

### Gene *SFI*

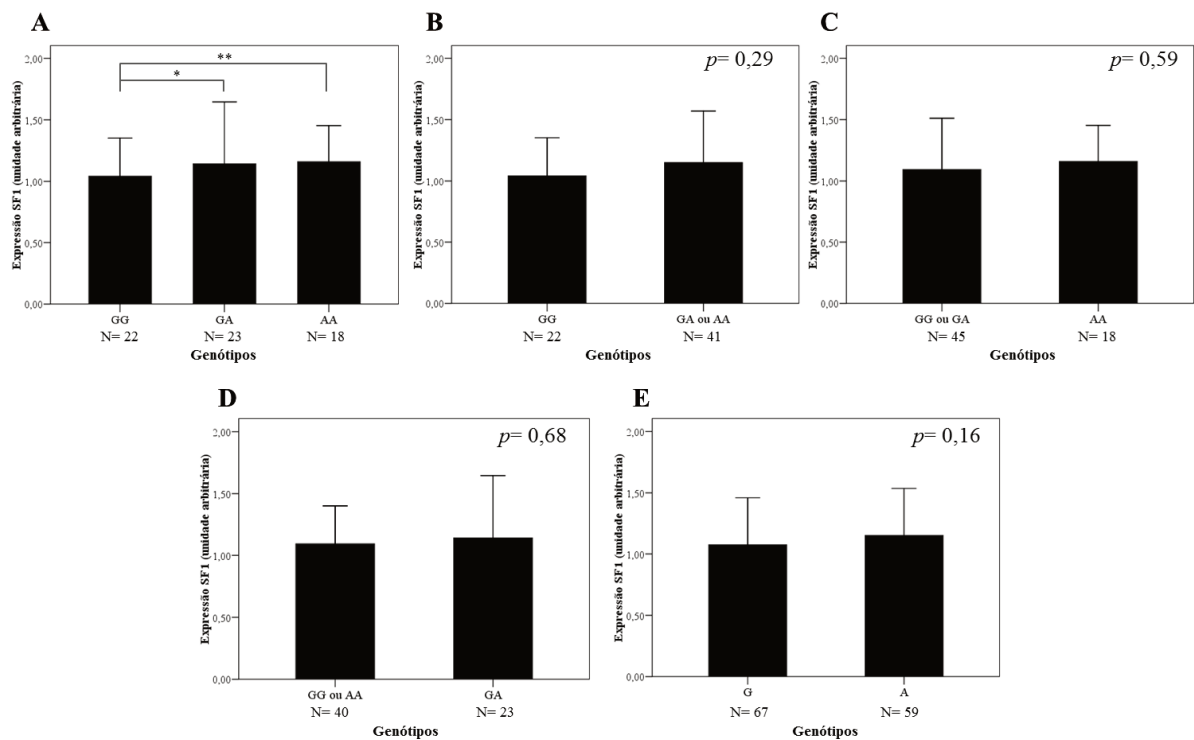
As expressões do gene *SFI* em amostras dos leucócitos de sangue periférico de 63 controles, para os diferentes genótipos e os distintos alelos da SNV *MITF* rs7623610 avaliados no estudo, estão apresentadas na **Tabela 13**.

**Tabela 13.** Expressão gênica do *SFI* de 63 amostras dos leucócitos de sangue periférico de indivíduos saudáveis de acordo com os genótipos e alelos da variante *MITF* rs7623610

Genótipos <i>MITF</i> (rs7623610)	N	Média (UA)	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo	Valor de <i>p</i>
GG	22	1,04	0,98	0,30	0,58	1,70	Referência
GA	23	1,14	1,07	0,50	0,38	2,12	0,42
AA	18	1,15	1,13	0,29	0,67	1,74	0,23
GG	22	1,04	0,98	0,30	0,58	1,70	Referência
GA ou AA	41	1,15	1,11	0,41	0,38	2,12	0,29
GG ou GA	45	1,09	1,03	0,41	0,38	2,12	Referência
AA	18	1,15	1,13	0,29	0,67	1,74	0,59
GG ou AA	40	1,09	1,05	0,30	0,58	1,74	Referência
GA	23	1,14	1,07	0,50	0,38	2,12	0,68
Alelo G	67	1,07	1,02	0,38	0,38	2,12	Referência
Alelo A	59	1,15	1,11	0,38	0,38	2,12	0,16

(N) número de indivíduos; (UA) unidade arbitrária

Considerando os valores de expressão do gene *SFI* em indivíduos saudáveis, os níveis de RNAm apresentaram-se similares para indivíduos com os genótipos isolados ou agrupados, como também para os alelos da SNV *MITF* rs7623610 (**Figura 19**).



**Figura 19.** Expressão do gene *SF1* em amostras de leucócitos de sangue periférico de 63 controles estratificados por genótipos e alelos da variante *MITF* rs7623610 (A) GG, GA e AA (\* $p=0,42$ ; \*\* $p=0,23$ ), (B) GG versus GA ou AA, (C) GG ou GA versus AA, (D) GG ou AA versus GA e (E) alelos G e A

## Quantificação do conteúdo proteico

### Extração de proteínas totais

A distribuição individualizada das amostras de proteínas totais extraídas de leucócitos do sangue periférico de 44 indivíduos controles, a quantidade extraída em microgramas por microlitro ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), a quantidade necessária em  $\mu\text{L}$  para atingir a concentração de 50  $\mu\text{g}$  a ser aplicada em gel para a técnica de *western blotting* e os distintos genótipos da SNV *MITF* rs7623610 estão apresentados no **Anexo 20**.

Em adição, a distribuição individualizada dos valores de expressão das proteínas MITF, hnRNP A1, SF1 e GAPDH por meio da quantificação relativa pela técnica de *western blotting* em amostras de sangue periférico de controles e seus respectivos genótipos da variante *MITF* rs7623610

### Padronização da concentração dos anticorpos

As especificações dos anticorpos primários e secundários utilizados no estudo como também as concentrações obtidas, após padronização, estão apresentadas na **Tabela 14**.

**Tabela 14.** Especificações dos anticorpos primários e secundários utilizados na técnica de *western blotting* e as concentrações de uso obtidas após padronização

Anticorpos primários e secundários	Clonalidade	Produzido em	Empresa	Código	Concentração de uso
Anti-MITF (21D1418)	Monoclonal	Camundongo	Novus Biologicals	NB100-56561	1,5 µg/mL
Anti-hnRNP A1 (4B10)	Monoclonal	Camundongo	Novus Biologicals	NB100-672	0,5 µg/mL
Anti-SF1 (2E12)	Monoclonal	Camundongo	Novus Biologicals	H00007536-M01	1,5 µg/mL
Anti-GAPDH (FL-335)	Policlonal	Coelho	Santa Cruz	sc-25778	1:1000
Anti-camundongo	---	Coelho	Abcam	ab97046	1:10000
Anti-coelho	---	Cabra	Abcam	ab97051	1:10000

(µg/mL) micrograma/mililitro

## Quantificação das proteínas por meio da técnica de *western blotting*

### Proteína MITF

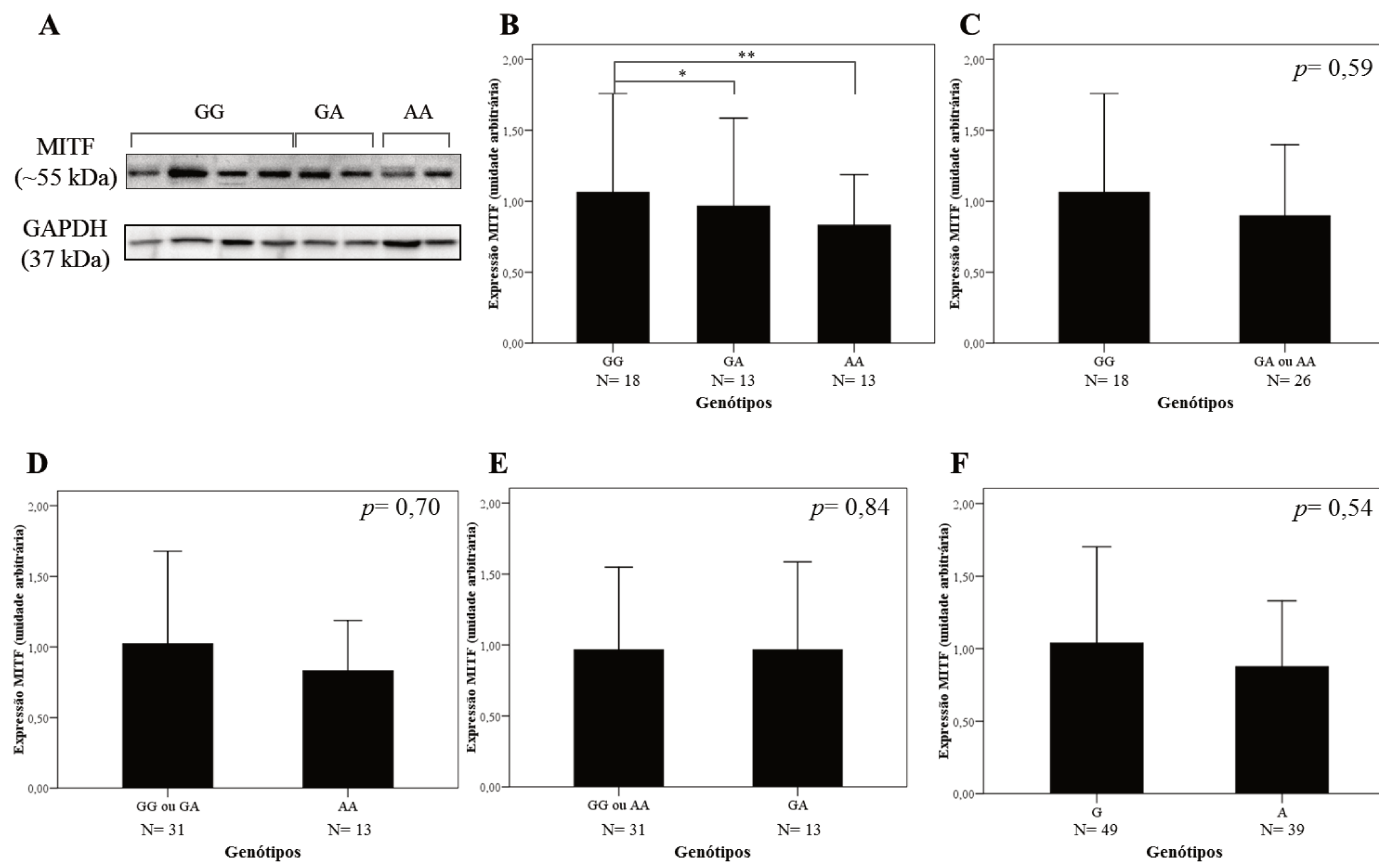
A quantificação relativa da proteína MITF em amostras dos leucócitos de sangue periférico de 44 controles, para os diferentes genótipos e alelos da SNV *MITF* rs7623610 avaliados no estudo, estão apresentadas na **Tabela 15**.

**Tabela 15.** Quantificação relativa da proteína MITF de 44 amostras dos leucócitos de sangue periférico de indivíduos saudáveis de acordo com os genótipos da variante *MITF* rs7623610

Genótipos <i>MITF</i> (rs7623610)	N	Média (UA)	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo	Valor de <i>p</i>
GG	18	1,06	0,84	0,69	0,30	2,94	Referência
GA	13	0,96	0,69	0,61	0,27	2,28	0,66
AA	13	0,83	0,76	0,35	0,16	1,58	0,32
GG	18	1,06	0,84	0,69	0,30	2,94	Referência
GA ou AA	26	0,89	0,75	0,49	0,16	2,28	0,59
GG ou GA	31	1,02	0,83	0,65	0,27	2,94	Referência
AA	13	0,83	0,76	0,35	0,16	1,58	0,70
GG ou AA	31	0,96	0,83	0,58	0,16	2,94	Referência
GA	13	0,96	0,69	0,61	0,27	2,28	0,84
Alelo G	49	1,03	0,83	0,66	0,27	2,94	Referência
Alelo A	39	0,87	0,76	0,45	0,16	2,28	0,54

(N) número de indivíduos; (UA) unidade arbitrária

Considerando os valores do conteúdo proteico em indivíduos saudáveis, os níveis da proteína MITF apresentaram-se similares para indivíduos com os genótipos isolados ou agrupados, como também para os alelos da SNV *MITF* rs7623610 (**Figura 20**).



**Figura 20.** Níveis da proteína MITF de acordo com a variante *MITF* rs7623610 em amostras de leucócitos de sangue periférico de 44 indivíduos controles por *western blotting*. As médias da quantificação relativa das bandas foram calculadas a partir da relação MITF/ GAPDH. **(A)** Conteúdo das proteínas MITF e GAPDH com aproximadamente 55 e 37 kilodaltons (kDa), respectivamente; **(B)** GG, GA e AA (\* $p=0,66$ ; \*\* $p=0,32$ ), **(C)** GG *versus* GA ou AA, **(D)** GG ou GA *versus* AA, **(E)** GG ou AA *versus* GA e **(F)** alelos G e A

### Proteína hnRNP A1

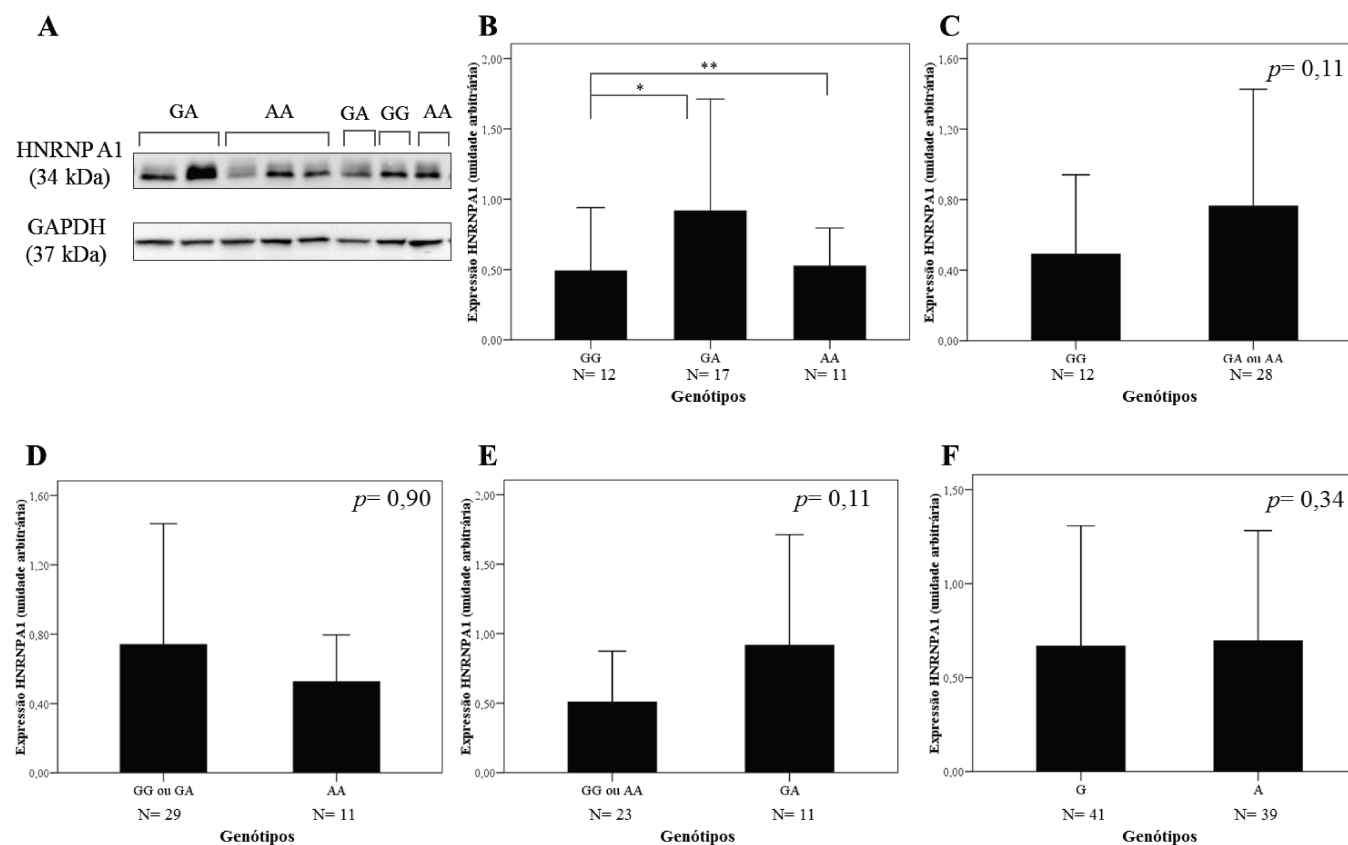
A quantificação relativa da proteína hnRNP A1 em amostras dos leucócitos de sangue periférico de 40 controles, para os diferentes genótipos e alelos da SNV *MITF* rs7623610 avaliados no estudo, estão apresentadas na **Tabela 16**.

**Tabela 16.** Quantificação relativa da proteína hnRNP A1 de 40 amostras dos leucócitos de sangue periférico de indivíduos saudáveis de acordo com os genótipos da variante *MITF* rs7623610

Genótipos <i>MITF</i> (rs7623610)	N	Média (UA)	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo	Valor de <i>p</i>
GG	12	0,49	0,32	0,44	0,05	1,49	Referência
GA	17	0,91	0,69	0,79	0,17	3,13	0,07
AA	11	0,52	0,54	0,26	0,13	0,93	0,82
GG	12	0,49	0,32	0,44	0,05	1,49	Referência
GA ou AA	28	0,76	0,57	0,66	0,13	3,13	0,11
GG ou GA	29	0,74	0,54	0,69	0,05	3,13	Referência
AA	11	0,52	0,54	0,26	0,13	0,93	0,90
GG ou AA	23	0,50	0,46	0,36	0,05	1,49	Referência
GA	11	0,91	0,69	0,79	0,17	3,13	0,11
Alelo G	41	0,66	0,46	0,63	0,05	3,13	Referência
Alelo A	39	0,69	0,57	0,58	0,13	3,13	0,34

(N) número de indivíduos; (UA) unidade arbitrária

Considerando os valores do conteúdo proteico em indivíduos saudáveis, os níveis da proteína hnRNP A1 apresentaram-se similares para indivíduos com os genótipos isolados ou agrupados, como também para os alelos da SNV *MITF* rs7623610 (**Figura 21**).



**Figura 21.** Níveis da proteína hnRNP A1 de acordo com a variante *MITF* rs7623610 em amostras de leucócitos de sangue periférico de 40 indivíduos controles por *western blotting*. As médias da quantificação relativa das bandas foram calculadas a partir da relação hnRNP A1/ GAPDH. (A) Conteúdo das proteínas hnRNP A1 e GAPDH com aproximadamente 34 e 37 kilodaltons (kDa), respectivamente; (B) GG, GA e AA (\*p= 0,07; \*\*p= 0,82), (C) GG versus GA ou AA, (D) GG ou GA versus AA, (E) GG ou AA versus GA e (F) alelos G e A

### Proteína SF1

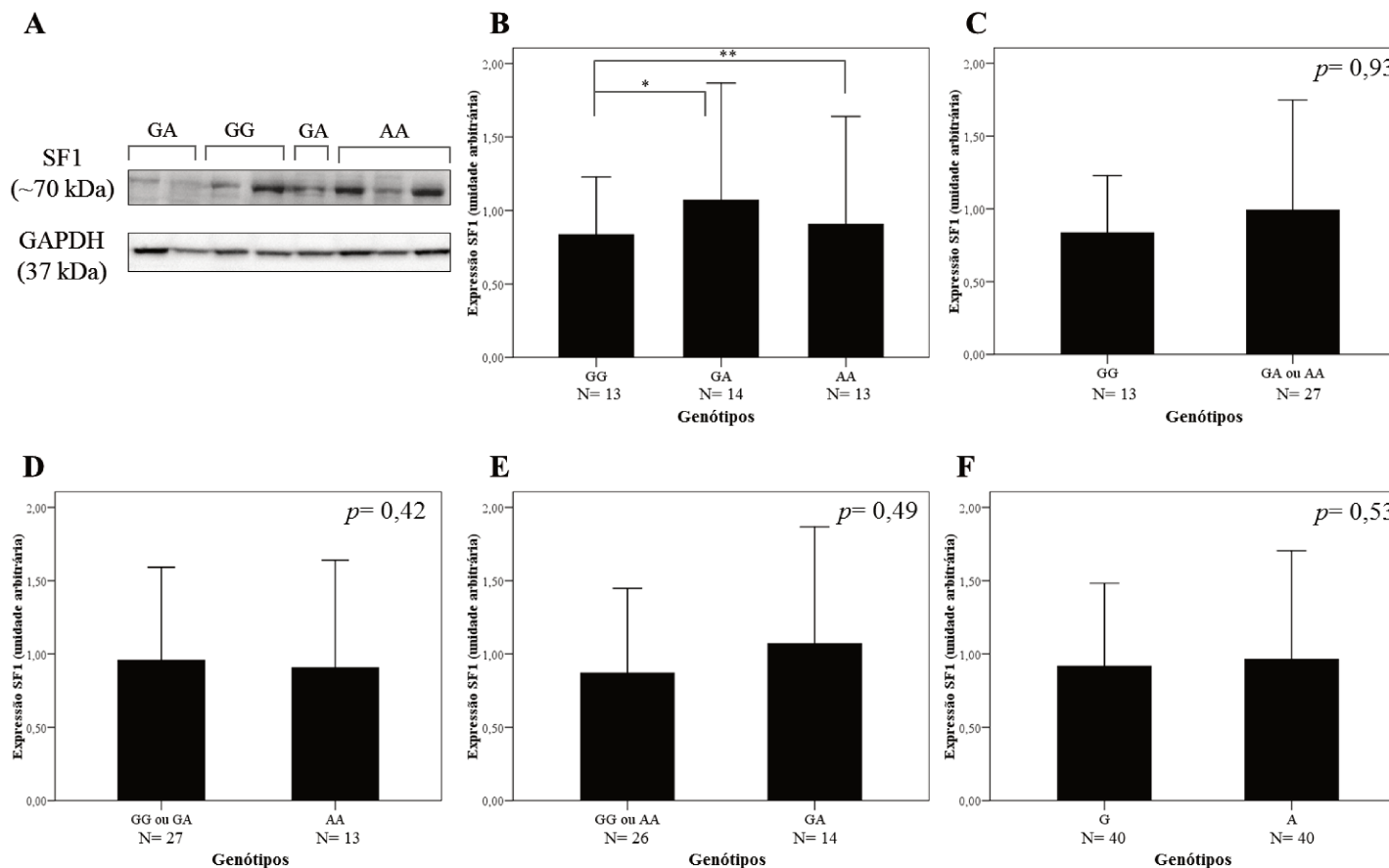
A quantificação relativa da proteína SF1 em amostras dos leucócitos de sangue periférico de 40 controles, para os diferentes genótipos e alelos da SNV *MITF* rs7623610 avaliados no estudo, estão apresentadas na **Tabela 17**.

**Tabela 17.** Quantificação relativa da proteína SF1 de 40 amostras dos leucócitos de sangue periférico de indivíduos saudáveis de acordo com os genótipos a variante *MITF* rs7623610

Genótipos <i>MITF</i> (rs7623610)	N	Média (UA)	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo	Valor de <i>p</i>
GG	13	0,83	1,00	0,39	0,19	1,70	Referência
GA	14	1,07	0,85	0,79	0,24	2,60	0,58
AA	13	0,90	0,79	0,73	0,22	2,72	0,44
GG	13	0,83	1,00	0,39	0,19	1,70	Referência
GA ou AA	27	0,99	0,79	0,75	0,22	2,72	0,93
GG ou GA	27	0,95	1,00	0,63	0,19	2,60	Referência
AA	13	0,90	0,79	0,79	0,22	2,72	0,42
GG ou AA	26	0,87	0,85	0,57	0,19	2,72	Referência
GA	14	1,07	0,85	0,79	0,24	2,60	0,49
Alelo G	40	0,91	1,00	0,56	0,19	2,60	Referência
Alelo A	40	0,96	0,79	0,74	0,22	2,72	0,53

(N) número de indivíduos; (UA) unidade arbitrária

Considerando os valores do conteúdo proteico em indivíduos saudáveis, os níveis da proteína SF1 apresentaram-se similares para indivíduos com os genótipos isolados ou agrupados, como também para os alelos da SNV *MITF* rs7623610 (**Figura 22**).

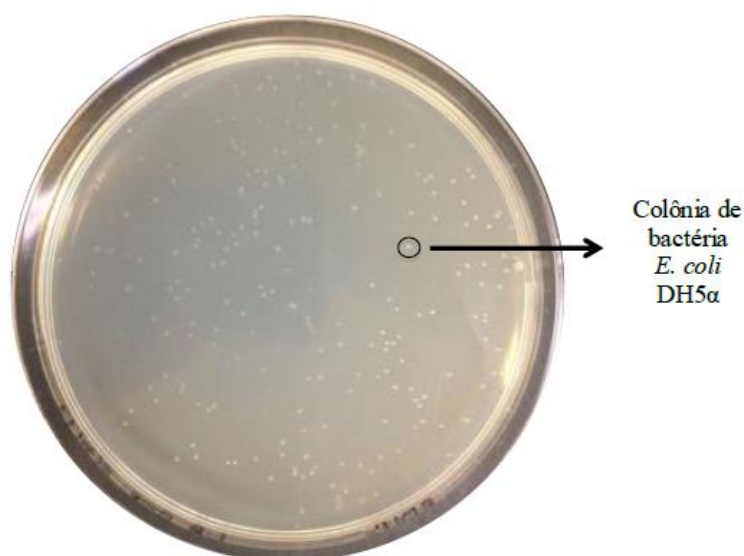


**Figura 22.** Níveis da proteína SF1 de acordo com a variante *MITF* rs7623610 em amostras de leucócitos de sangue periférico de 40 indivíduos controles por *western blotting*. As médias da quantificação relativa das bandas foram calculadas a partir da relação hnRNP A1/ GAPDH. **(A)** Conteúdo das proteínas SF1 e GAPDH com aproximadamente 70 e 37 kilodaltons (kDa), respectivamente; **(B)** GG, GA e AA (\* $p= 0,58$ ; \*\* $p= 0,44$ ), **(C)** GG *versus* GA ou AA, **(D)** GG ou GA *versus* AA, **(E)** GG ou AA *versus* GA e **(F)** alelos G e A

### Eficiência do *splicing*

#### Transformação dos plasmídeos com cada minigene em bactérias *E. coli* DH5 $\alpha$

Os plasmídeos recombinantes pCDNA3.1(+)\_*MITF*\_G e pCDNA3.1(+)\_*MITF*\_A adquiridos da empresa GenScript® (Estados Unidos), após transformados em bactérias competentes *E. coli* DH5 $\alpha$ , foram confirmados pelo crescimento das mesmas em meio de cultura LB contendo o antibiótico ampicilina (**Figura 23**).



Colônia de  
bactéria  
*E. coli*  
DH5 $\alpha$

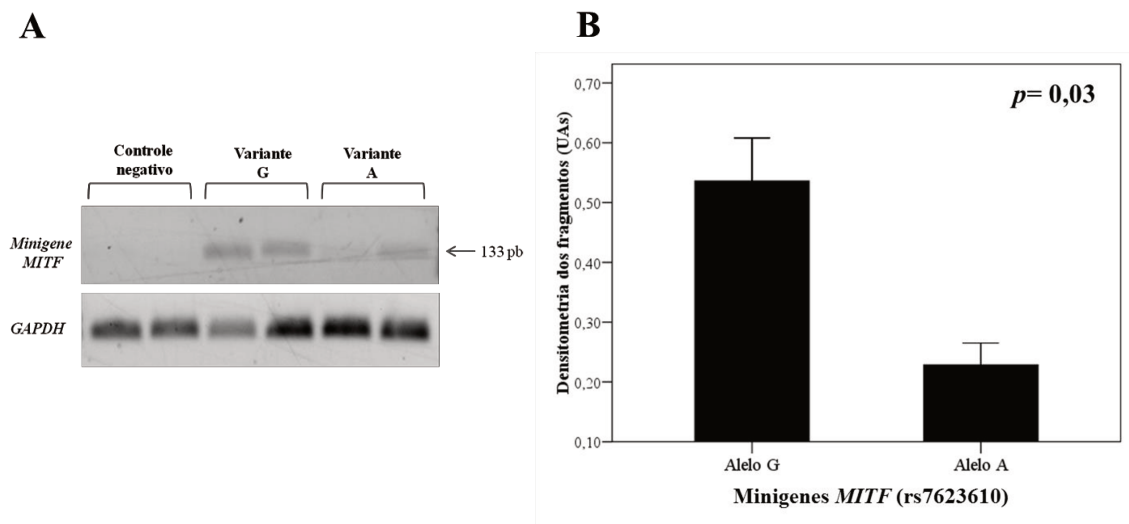
**Figura 23.** Placa de Petri contendo meio de cultura LB ágar e colônias de bactérias *E. coli* DH5 $\alpha$ . As bactérias transformadas com os plasmídeos recombinantes pCDNA3.1(+)\_*MITF*\_G e pCDNA3.1(+)\_*MITF*\_A apresentam resistência ao antibiótico ampicilina

A extração do DNA plasmidial das bactérias transformadas contendo os plasmídeos recombinantes pCDNA3.1(+)\_*MITF*\_G e pCDNA3.1(+)\_*MITF*\_A foi realizada e as sequências e orientação dos fragmentos inseridos nos referidos vetores foram confirmadas por meio de sequenciamento automático. Após a confirmação, foi realizada a transfecção dos plasmídeos recombinantes na linhagem celular SK-MEL-28.

## Transfecção dos plasmídeos

### Ensaio do minigene repórter

A avaliação da quantificação e a representação dos tamanhos dos fragmentos gerados pelos distintos minigenes pCDNA3.1(+)\_*MITF*\_G e pCDNA3.1(+)\_*MITF*\_A estão apresentados na **Figura 24**.



**Figura 24.** (A) Representação dos produtos gerados pelos distintos minigenes expressando as variantes G e A da SNV rs7623610 do gene *MITF* em gel de agarose 1%, obtidos da RT-PCR de células de melanoma humano (SK-MEL-28) transfectadas com os referidos minigenes. O fragmento gerado corresponde a 133 pares de bases (pb). O controle negativo dos ensaios de transfecção celulares, corresponde ao vetor pCDNA3.1(+) vazio. O gene *GAPDH* foi utilizado como controle para normalização dos valores gerados pelos distintos minigenes, em três experimentos independentes. (B) Níveis de expressão dos minigenes *MITF* com o alelo G e com o alelo A de acordo com a variante *MITF* rs7623610

Os fragmentos gerados pelos distintos minigenes apresentaram tamanho similar (133 pb) (**Figura 24A**).

O nível médio de expressão do minigene *MITF* com o alelo A foi menor quando comparado ao minigene *MITF* com o alelo G (média (DP): 0,22 (0,03) vs. 0,53 (0,07);  $p = 0,03$ ) (**Figura 24B**).

## DISCUSSÃO

O MC é um tumor de baixa incidência, ele corresponde a 4% dos tumores de pele; no entanto, ele é um tumor de alta letalidade devido ao alto potencial metastático (Instituto Nacional de Câncer, 2018). O MC resulta da transformação maligna dos melanócitos da pele, que são as células responsáveis pela produção da melanina, pigmento protetor natural da pele (Jhappan *et al.*, 2003).

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento do MC são os ambientais, como a exposição aos raios UVA e UVB do sol; e os fatores constitutivos, como cor da pele, olhos e cabelos claros, a presença de muitos nevus, maior sensibilidade ao sol e às queimaduras solares, principalmente na infância ou adolescência, como também o histórico familiar de melanoma (Fears *et al.*, 2006).

A combinação de fatores prognósticos já estabelecidos com parâmetros genéticos e moleculares pode beneficiar a sobrevida dos pacientes com MC (Gandini *et al.*, 2005). Assim, a identificação de novos marcadores genéticos se faz necessário para identificar populações de risco, além de definir novas estratégias terapêuticas.

O método de genotipagem em larga escala pode ser utilizado para a seleção e a identificação de novos marcadores genéticos relacionados com o surgimento de tumores (Mao *et al.*, 2007). Por meio do referido método, nosso grupo de pesquisadores identificou 12.882 variantes genéticas associadas com alterações do risco de MC em amostras de 103 pacientes com MC e 103 controles (Oliveira, 2017). Em meio às variantes identificadas, a SNV c.938-325G>A (rs7623610) do gene *MITF*, localizado em uma região regulatória do *splicing*, foi considerado de maior interesse entre elas. Com o presente estudo, validamos os resultados obtidos anteriormente, em um número substancialmente maior de indivíduos.

Neste estudo, avaliamos o papel da SNV *MITF* rs7623610, envolvido com a melanogênese, no risco de desenvolvimento do MC, nos aspectos clínicos e do tumor, e no prognóstico dos pacientes.

Inicialmente, as características clínicas dos indivíduos e do tumor dos pacientes foram analisadas, com o intuito de verificar se a amostra foi representativa da doença em nosso meio e, em seguida, os papéis dos diferentes genótipos da SNV no gene *MITF* na susceptibilidade ao MC, bem como nas manifestações clínicas e do tumor, e no prognóstico foram verificados.

### Aspectos clínicos dos pacientes

Quando os nossos pacientes com MC foram distribuídos por idade, observamos que a idade mediana foi de 55 anos, semelhante à encontrada em estudos no mundo (Balch *et al.*, 2001; Jemal *et al.*, 2004; Lachiewicz *et al.*, 2008) e no Brasil (Konrad *et al.*, 2011; Naser, 2011, Vazquez *et al.*, 2015).

A distribuição dos nossos pacientes por sexo indicou que não houve preferência por nenhum dos grupos. No mundo, o tumor é observado com maior frequência em homens (Jemal *et al.*, 2011). Em países ao norte e região ocidental da Europa, a incidência do MC ocorre mais em mulheres, em contrapartida, em países da região central, leste e sul, a maior incidência é observada em homens (Forsea *et al.*, 2012). A relação da incidência de MC e mulheres deve-se a elevadas taxas de hormônios reprodutivos, ocorrendo aumento da pigmentação, ou devido a fatores comportamentais socioculturais (Lea *et al.*, 2007). Nos Estados Unidos, a incidência do MC é maior em homens (Seigel *et al.*, 2018). No Brasil, segundo dados do INCA de 2016, o MC foi mais incidente em homens (Instituto Nacional de Câncer, 2016).

Em relação à cor da pele, o MC acomete principalmente indivíduos com pele branca, corroborando com estudos brasileiros (Naser, 2011; Konrad *et al.*, 2011; Moreno *et al.*, 2012) e em outros países (Eide & Weinstock, 2005; De Vries & Coebergh, 2005; Tucker, 2009; Ferlay *et al.*, 2015). Isso se deve ao fato de que indivíduos com pele clara têm menor capacidade de proteção aos efeitos ocasionados pela exposição à radiação UV do sol, devido a maior produção do pigmento do tipo feomelanina (menor efeito filtrante dos raios UV) do que o do tipo eumelanina (maior função foto protetiva), este sendo produzido em maior quantidade por indivíduos de pele mais escura (Raimondi *et al.*, 2008; Kanavy & Gerstenblith, 2011). Considerando a população brasileira como heterogênea e miscigenada (Pena *et al.*, 2011), a caracterização étnica dos indivíduos inseridos no estudo não foi realizada. Em contrapartida, alguns estudos brasileiros anteriormente demonstraram a presença de maior número de sujeitos com ancestralidade europeia e maior risco para o desenvolvimento do MC (Vallarelli *et al.*, 2010; Luiz *et al.*, 2012; da Silva *et al.*, 2016).

Em adição, as características fenotípicas pigmentares mais frequentes de pacientes com MC são a cor de pele, olhos e cabelos claros (Gandini *et al.*, 2005; Fears *et al.*, 2006), sendo um padrão comumente encontrado em indivíduos com elevada fotossensibilidade ao sol (Luiz *et al.*, 2012). Devido à intensa miscigenação entre europeus, ameríndios, asiáticos e negroides, cor de olhos e cabelos claros são menos frequentes na população brasileira (Pena *et*

*al.*, 2011). Apesar disso, os fototipos cutâneos I e II, que determinam maior sensibilidade da pele ao sol, foram muito frequentes nos pacientes inseridos no estudo, e essa característica também está associada ao aumento no risco de ocorrência do MC (Olsen *et al.*, 2010).

Aproximadamente 56% dos pacientes com MC em nosso estudo, referiram ter se exposto ao sol de forma crônica, ou seja, relacionada à ocupação exercida pelos mesmos, principalmente em ambientes externos. É bem estabelecido que a exposição crônica à radiação UV esteja fortemente associada a alterações patológicas na pele que levam à formação do câncer (Stiefel & Schwack, 2015). Estudos nos quais foram realizadas dosagens da radiação UV demonstraram que a exposição ocupacional à radiação solar em diversos trabalhadores expostos, como empreiteiros e agricultores, excede os limites considerados seguros pela Comissão Internacional de Proteção à Radiação Não-Ionizante (ICNIRP), e isso pode aumentar significativamente o risco para MC (Reinart *et al.*, 2013; Vuong *et al.*, 2014).

Considerando episódios de queimadura solar, aproximadamente 58% dos pacientes inseridos no estudo afirmaram terem tido queimaduras, provocadas pelo sol, ao longo da vida. Esse dado apresentou semelhança com o descrito em estudos epidemiológicos prévios (Kennedy *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2016). É bem estabelecido que a frequência de queimaduras severas anteriores, principalmente na infância e adolescência, está relacionada ao risco de desenvolvimento do MC (Bakos *et al.*, 2002; Lancet, 2014).

Outro aspecto de risco importante para o surgimento do MC é a presença de múltiplos nevos (Argenziano *et al.*, 2012). Adultos com 25 ou mais nevos comuns adquiridos ( $\geq 2\text{mm}$ ) ou com um ou mais nevos displásicos ( $\leq 5\text{mm}$ ) têm duas vezes mais chances de desenvolver MC do que indivíduos com menos de 25 nevos comuns ou com nenhum nevo displásico (Bataille *et al.*, 1996; Grulich *et al.*, 1996; Tucker *et al.*, 1997). Em nosso estudo, indivíduos com nevos em quantidade maior que 50 foram mais frequentes no grupo de pacientes. Porém, os nevos foram apenas quantificados e não classificados, deste modo, conclusões consistentes sobre sua associação com o desenvolvimento do tumor não podem ser afirmadas.

### **Aspectos do tumor**

Referindo-se à localização primária do tumor no grupo de pacientes, as maiores frequências foram encontradas no tronco e nos membros (inferiores, seguidos de superiores), em nosso estudo, corroborando com dados encontrados na literatura (Bakos *et al.*, 2002; Berwick *et al.*, 2005; Vazquez *et al.*, 2015; Stanienda-Sokól *et al.*, 2017; Gironi *et al.*, 2018;

Moscarella *et al.*, 2018). Há maior incidência de MC em locais mais susceptíveis à exposição solar (Caini *et al.*, 2009; Nagore *et al.*, 2010).

Em relação ao tipo histológico do tumor, aproximadamente 57% dos pacientes do estudo apresentaram melanomas do tipo extensivo superficial, seguidos por nodular (~ 30%) e lentigo maligna (~ 12%), esses dados seguem os padrões de outros estudos (Van der Rhee *et al.*, 2011; Vazquez *et al.*, 2015; Taylor *et al.*, 2016; Gironi *et al.*, 2018; Ghiasvand *et al.*, 2018).

Considerando a fase de crescimento tumoral, em nosso estudo, cerca de 73% correspondeu à fase vertical (FV) e 27% à radial (FR). O termo radial se refere à lesão que se expande pelo crescimento ao longo dos raios de um círculo imperfeito, formando uma lesão em forma de placa na pele, e à medida que progride, a classificação ABCDE da lesão se modifica (Elder, 2016). Se não tratado, o MC de FR pode se tornar de FV, e nesta fase a doença progride de forma maligna, mitoticamente ativa e com capacidade de invasão e metástase (Roncati & Pisciolli, 2018). Assim, o prognóstico do MC se deve ao tipo de fase de crescimento em que se encontra (Roncati & Pisciolli, 2018).

Tumores ulcerados estão representados em cerca de 37% de nossos casos, semelhante ao dado encontrado em estudo prévio conduzido no Brasil (Moreno *et al.*, 2012). Enquanto que em um estudo realizado nos Estados Unidos, cerca de 12% dos tumores eram ulcerados (Kosary *et al.*, 2014). Em pacientes com tumores ulcerados, a sobrevida global em cinco anos foi menor do que para os tumores não ulcerados (Barnhill *et al.*, 1996). Apesar de tumores mais espessos serem mais comumente ulcerados (Balch *et al.*, 2001), a ulceração é um fator que pode interferir na evolução da doença, independentemente da espessura do tumor (Balch *et al.*, 2009). A discrepância entre as frequências de tumores ulcerados no Brasil e nos Estados Unidos pode ter ocorrido devido à demora no diagnóstico e início do tratamento em nosso país.

Em nosso estudo, aproximadamente 47% dos pacientes foram diagnosticados com tumores mais espessos (índice de Breslow maior ou igual a 1,5 mm), semelhante aos resultados obtidos em outros estudos do nosso país (Moreno *et al.*, 2012; Vazquez *et al.*, 2015). O índice de Breslow é considerado o maior fator prognóstico para melanoma invasivo, pacientes com tumores menos espessos que 0,76 mm foram considerados de baixo risco para desenvolvimento do MC; de 0,76 a 1,50 mm foram considerados de risco intermediário baixo; acima de 1,50 mm foram considerados de risco intermediário alto e para aqueles mais espessos que 4,00 mm, alto risco (Mervic, 2012).

Tumores com nível de Clark III, IV ou V estiveram presentes em nosso grupo de pacientes numa frequência de aproximadamente 69%, semelhante a dados encontrados em outros estudos no Brasil (Luiz *et al.*, 2012; Moreno *et al.*, 2012; Vazquez *et al.*, 2015) e acima de frequências encontradas em estudos na população europeia (Masback *et al.*, 2002; Gironi *et al.*, 2018), americana e australiana (Balch *et al.*, 2001), provavelmente pelo diagnóstico em fase mais tardia de desenvolvimento do tumor em nosso país. Em lesões de nível I, as células do MC são restritas à epiderme, em nível II essas células atingem a derme papilar, em nível III as células preenchem a derme papilar, em nível IV há a infiltração da derme reticular e em V, as células atingem o tecido subcutâneo (Mervic, 2012). Como variável isolada, o nível de invasão está altamente associado à evolução da doença (Barnhill *et al.*, 1996).

Considerando o estágio clínico dos pacientes do estudo, observamos que aproximadamente 84% deles foram diagnosticados com tumores em estágios iniciais (0, I ou II), 16% em estágios avançados (III ou IV) e cerca de 6% apresentaram metástases locais ou distantes. Os dados obtidos foram semelhantes aos encontrados em outros estudos no Brasil (Moreno *et al.*, 2012; Vazquez *et al.*, 2015) e nos Estados Unidos (Siegel *et al.*, 2018).

Frente ao exposto, referindo-se aos aspectos clínicos e do tumor, observamos que os pacientes inseridos no estudo apresentaram características semelhantes às observadas em estudos brasileiros e do mundo, de modo que a nossa casuística constitui uma amostra representativa do MC e pode ser utilizada para a avaliação de outros fatores na origem e prognóstico da doença.

### SNV *MITF* rs7623610 em pacientes e controles

As amostras de controles estiveram em equilíbrio de HW para o locus da SNV *MITF* c.938-325G>A, indicando que não houve distribuição preferencial dos genótipos e que a amostra é representativa da população geral e que, portanto, pode ser utilizada para o estudo.

As características de pacientes e controles foram semelhantes na distribuição da maioria das características individuais. Como houve diferença estatística entre a idade, a cor da pele, a exposição solar e a presença de nevos do grupo de pacientes com MC comparado ao grupo de controles, as nossas análises subsequentes considerando ambos os grupos foram corrigidas por estas diferenças.

Em nossa amostra, a SNV *MITF* rs7623610 esteve associado com o risco de ocorrência do MC. Indivíduos portadores do genótipo homozigoto AA estiveram sob risco aproximadamente duas vezes maior de desenvolver o MC do que aqueles com o genótipo homozigoto GG ou heterozigoto GA. Até onde atinge o nosso conhecimento, não há estudos da referida SNV em associação com câncer ou qualquer outra doença. Vale comentar que nossos resultados, em tamanho amostral adequado, confirmaram os resultados da genotipagem em larga escala obtidos anteriormente (Oliveira, 2017) e também indicaram, pela primeira vez, evidência de que a referida SNV tem associação com o risco herdado de ocorrência do tumor.

A referido SNV (rs7623610) determina a troca da base nitrogenada guanina por uma adenina na posição -325 do íntron 7 do gene *MITF* (Geer *et al.*, 2010). Por meio de análise *in silico* (Desmet *et al.*, 2009), observamos que o alelo A pode alterar o sítio de ligação da proteína hnRNP A1, associada com a modulação do mecanismo de *splicing*, e/ou inserir um sítio de ligação da proteína SF1, que dá início ao processamento do RNAm; e assim, a variante A talvez possa alterar a eficiência do mecanismo de *splicing*, com consequente diminuição da expressão de *MITF*.

De fato, nós observamos que as células de melanoma portadoras do alelo A da referida SNV apresentaram menor expressão do minigene *MITF* quando comparadas com aquelas portadoras do alelo G.

Ainda, nós observamos que os pacientes com MC e os indivíduos saudáveis portadores do genótipo *MITF* AA apresentaram menores níveis de RNAm da *HNRNPA1* quando comparados aos portadores dos outros genótipos. Entretanto, não observamos diferenças na expressão da proteína hnRNP A1 entre os indivíduos portadores dos distintos

genótipos da SNV *MITF* rs7623610. Acreditamos que esse fato ocorreu devido ao número limitado de amostras de proteínas avaliadas.

Com base nesses resultados, acreditamos que a SNV *MITF* rs7623610 possa alterar sítios de ligação de proteínas regulatórias do *splicing*, como a hnRNP A1, com consequente alteração da eficiência desse mecanismo e menor expressão do *MITF*.

Como moduladora do mecanismo de *splicing*, a hnRNP A1 participa da regulação da expressão gênica (He & Smith, 2009; Jean-Philippe *et al.*, 2013), além do fato de participar da família de proteínas silenciadoras do mecanismo de *splicing* (Goina *et al.*, 2008; Xodo *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2012). E em MC, a baixa expressão da proteína hnRNP A1 já foi relacionada com o desenvolvimento tumoral (Kim *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2017). Assim, acreditamos que a hnRNP A1 possa influenciar de forma negativa a expressão do *MITF*, este que apresenta papel controverso na literatura (Goding, 2011).

Frente ao exposto, é possível que indivíduos portadores do alelo A da SNV *MITF* rs7623610 apresentem maior risco de ocorrência de MC devido à menor expressão do *MITF*, modulado pela proteína regulatória do *splicing* hnRNP A1.

Até onde atinge o nosso conhecimento, não há estudos de associação da SNV *MITF* rs7623610 com o risco de ocorrência de MC. Assim, os nossos resultados indicam, pela primeira vez, evidência que a referida SNV constitui um importante fator no risco herdado de ocorrência do tumor.

### **SNV *MITF* rs7623610 e aspectos clínicos e do tumor dos pacientes**

Na avaliação da influência dos genótipos da SNV *MITF* rs7623610 com os aspectos clínicos dos pacientes, observamos que as frequências dos distintos genótipos foram similares para as características: idade, sexo, cor da pele, fototipo cutâneo, exposição solar, tipo de exposição, queimadura solar e presença de nevus.

Em relação aos aspectos do tumor, a frequência do genótipo AA foi mais comum em pacientes diagnosticados com tumores em estágios avançados (III ou IV) do que em estágios iniciais (0, I ou II), demonstrando que indivíduos com este genótipo, além de estarem sob maior risco de desenvolver o MC, estão mais propensos a tumores agressivos.

De fato, observamos que o genótipo AA foi associado com menor expressão do *MITF*. Estudos apontaram que a baixa expressão do *MITF* confere ao MC um fenótipo invasivo e com maior propensão a metástases (Goding, 2011; Hartman & Czyz, 2015; Vachtenheim & Ondrusová, 2015). Além disso, a baixa expressão também foi relacionada à

progressão tumoral e baixa sobrevida em pacientes com MC (Salti *et al.*, 2000; Selzer *et al.*, 2002), e essas características estão diretamente relacionadas a estágios avançados do tumor.

Até o momento, não há estudos que associaram a SNV *MITF* rs7623610 com as características clínicas ou do tumor em pacientes com MC ou em outros tipos de câncer.

### **Análises de sobrevivência**

Observamos que as taxas de SLP e SEM, em cinco canos, dos nossos pacientes foram cerca de 72,4% e 82,9%, respectivamente, similar a de pacientes com MC de estudos prévios (Miller *et al.*, 2016; Rockberg *et al.*, 2016; Gomez *et al.*, 2018).

Verificamos que pacientes do sexo masculino e aqueles que apresentaram tumores localizados na região axial, com índice de Breslow maior do que 1,5 mm, com níveis de Clark III, IV ou V e estágio clínico avançado (III ou IV), apresentaram prognóstico desfavorável, como já reportado em estudos anteriores (Buettner *et al.*, 2005; Schrama *et al.*, 2011; Mervic, 2012; Siegel *et al.*, 2018). Frente ao exposto, podemos afirmar que a nossa amostra é representativa da população, podendo ser utilizada para avaliação de outras variáveis como fatores prognósticos na doença.

Observamos que a SNV *MITF* rs7623610 alterou a SEM dos pacientes com MC. Aqueles com genótipo AA de modo isolado ou agrupado (GA ou AA) tiveram cerca de três e 2,4 vezes mais chance, respectivamente, de morrerem pela doença do que os pacientes com os demais genótipos, atuando como possível fator de prognóstico no MC.

Frente ao exposto, é possível que pacientes portadores do genótipo AA da SNV *MITF* rs7623610 apresentaram pior SEM devido à menor expressão do MITF, que já foi reportada estando relacionada à progressão tumoral, maior presença de metástases e à baixa sobrevida de pacientes com MC (Salti *et al.*, 2000; Selzer *et al.*, 2002), principalmente pela supressão da expressão do MITF pela via da MAPK e  $\beta$ -catenina (Vance & Goding, 2004; Hoek & Goding, 2010).

Entretanto, estamos cientes de que, estes resultados devem ser validados em estudos posteriores com pacientes de diversas regiões do Brasil e do mundo. Em adição, são necessários outros estudos funcionais de expressão gênica em linhagem celular de melanoma humano (SK-MEL-28) utilizando-se vetores de expressão contendo os RNAs mensageiros completos com as variantes G e A da SNV rs7623610 do gene *MITF*, para assim verificar seus papéis na expressão do gene *MITF*, como também dos genes que codificam as proteínas regulatórias de *splicing* do estudo, *HNRNPA1* e *SF1*, em células tumorais. Para que assim,

sejam identificados os indivíduos sob risco elevado de desenvolver o MC e que mereçam receber recomendações adicionais para a prevenção da doença, exames dermatológicos periódicos para a detecção precoce de lesões, e para seleccionar aqueles que receberão terapêutica mais agressiva do que outros.

## CONCLUSÕES

Nossos resultados sugerem que a SNV c.938-325G>A (rs7623610) localizada no gene *MITF*:

- Influenciou o risco de ocorrência do MC em nossa amostra. Indivíduos portadores do genótipo AA estiveram sob maior risco de desenvolvimento do tumor do que indivíduos com os genótipos GG ou GA;
- Não influenciou as características clínicas (idade, sexo, cor da pele, fototipo cutâneo, exposição solar, tipo de exposição solar, queimadura solar e presença de nevus) dos pacientes com MC inseridos em nosso estudo;
- Influenciou o estágio clínico dos pacientes com MC inseridos em nosso estudo. O genótipo AA foi mais comum entre os pacientes diagnosticados com estágios clínicos avançados (III ou IV);
- Alterou a SEM em pacientes inseridos em nosso estudo portadores dos genótipos GA ou AA, como também naqueles com o genótipo AA isolado;
- Alterou a expressão do gene *HNRNPA1* em nossas amostras. Pacientes e controles com MC e com o genótipo AA, apresentaram maiores níveis de expressão do gene *HNRNPA1*;
- Influenciou a eficiência do mecanismo de *splicing* do gene *MITF*. O minigene com o alelo A apresentou menor expressão de *MITF*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell. 4<sup>th</sup> edition. New York: Garland Science; 2002. 1616 p.

Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Aparicio SA, Behjati S, Biankin AV, et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*. 2013 Aug 22;500(7463):415-21.

Alves-Silva J, da Silva Santos M, Guimarães PE, Ferreira AC, Bandelt HJ, Pena SD, et al. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am J Hum Genet*. 2000 Aug;67(2):444-61.

American Cancer Society. Cancer Facts and Figures 2018. Atlanta: American Cancer Society; 2018.

Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershenwald JE, Brookland RK, et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin*. 2017 Mar;67(2):93-99.

Anczuków O, Rosenberg AZ, Akerman M, Das S, Zhan L, Karni R, et al. The splicing factor SRSF1 regulates apoptosis and proliferation to promote mammary epithelial cell transformation. *Nat Struct Mol Biol*. 2012 Jan 15;19(2):220-8.

Anno S, Abe T, Yamamoto T. Interactions between SNP alleles at multiple loci contribute to skin color differences between caucasoid and mongoloid subjects. *Int J Biol Sci*. 2008 Mar 31;4(2):81-6.

Argenziano G, Zalaudek I, Hofmann-Wellenhof R, Bakos RM, Bergman W, Blum A, et al. Total body skin examination for skin cancer screening in patients with focused symptoms. *J Am Acad Dermatol*. 2012 Feb;66(2):212-9.

Arning S, Grüter P, Bilbe G, Krämer A. Mammalian splicing factor SF1 is encoded by variant cDNAs and binds to RNA. *RNA*. 1996 Aug;2(8):794-810.

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

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

Balch CM, Buzaid AC, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, Fleming ID, et al. A new American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *Cancer*. 2000 Mar 15;88(6):1484-91.

Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol*. 2009 Dec 20;27(36):6199-206.

Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JE, Thompson JF, Reintgen DS, Cascinelli N, et al. Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J Clin Oncol*. 2001 Aug 15;19(16):3622-34.

Bandah-Rozenfeld D, Collin RW, Banin E, van den Born LI, Coene KL, Siemiatkowska AM, et al. Mutations in IMPG2, encoding interphotoreceptor matrix proteoglycan 2, cause autosomal-recessive retinitis pigmentosa. *Am J Hum Genet*. 2010 Aug 13;87(2):199-208.

Baralle D, Baralle M. Splicing in action: assessing disease causing sequence changes. *J Med Genet*. 2005 Oct;42(10):737-48.

Barnhill RL, Fine JA, Roush GC, Berwick M. Predicting five-year outcome for patients with cutaneous melanoma in a population-based study. *Cancer*. 1996 Aug 1;78(3):427-32.

Bastian BC. The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia. *Annu Rev Pathol*. 2014;9:239-71.

Bataille V, Bishop JA, Sasieni P, Swerdlow AJ, Pinney E, Griffiths K, et al. Risk of cutaneous melanoma in relation to the numbers, types and sites of naevi: a case-control study. *Br J Cancer*. 1996 Jun;73(12):1605-11.

Beiguelman B. Dinâmica dos genes nas famílias e populações. 2 ed. Ribeirão Preto: SGB, p. 1-472, 1995.

Berger MF, Hodis E, Heffernan TP, Deribe YL, Lawrence MS, Protopopov A, et al. Melanoma genome sequencing reveals frequent PREX2 mutations. *Nature*. 2012 May 9;485(7399):502-6.

Berglund JA, Chua K, Abovich N, Reed R, Rosbash M. The splicing factor BBP interacts specifically with the pre-mRNA branchpoint sequence UACUAAC. *Cell*. 1997 May 30;89(5):781-7

Berwick M, Armstrong BK, Ben-Porat L, Fine J, Krickler A, Eberle C, et al. Sun exposure and mortality from melanoma. *J Natl Cancer Inst*. 2005 Feb 2;97(3):195-9

Beusch I, Barraud P, Moursy A, Cléry A, Allain FH. Tandem hnRNP A1 RNA recognition motifs act in concert to repress the splicing of survival motor neuron exon 7. *Elife*. 2017 Jun 26;6. pii: e25736.

Bharti K, Liu W, Csermely T, Bertuzzi S, Arnheiter H. Alternative promoter use in eye development: the complex role and regulation of the transcription factor MITF. *Development*. 2008 Mar;135(6):1169-78.

Bosserhoff AK. Melanoma Development: Molecular Biology, Genetics and Clinical Application. Springer. 2017 Jan; 2<sup>nd</sup> edition. 447.

Box NF, Terzian T. The role of p53 in pigmentation, tanning and melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2008 Oct;21(5):525-33.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018 Nov;68(6):394-424.

Breslow A, Macht SD. Evaluation of prognosis in Stage I cutaneous melanoma. *Plast Reconstr Surg*. 1978 Mar;61(3):342-6.

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

Buettner PG, Leiter U, Eigentler TK, Garbe C. Development of prognostic factors and survival in cutaneous melanoma over 25 years: An analysis of the Central Malignant

Melanoma Registry of the German Dermatological Society. *Cancer*. 2005 Feb 1;103(3):616-24.

Burmeister BH, Henderson MA, Ainslie J, Fisher R, Di Iulio J, Smithers B, et al. Adjuvant radiotherapy versus observation alone for patients at risk of lymph-node field relapse after therapeutic lymphadenectomy for melanoma: a randomised trial. *Lancet Oncol*. 2012 Jun;13(6):589-97.

Buscà R, Ballotti R. Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. *Pigment Cell Res*. 2000 Apr;13(2):60-9.

Busch A, Hertel KJ. Evolution of SR protein and hnRNP splicing regulatory factors. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2012 Jan-Feb;3(1):1-12.

Buvoli M, Biamonti G, Tsoulfas P, Bassi MT, Ghetti A, Riva S, et al. cDNA cloning of human hnRNP protein A1 reveals the existence of multiple mRNA isoforms. *Nucleic Acids Res*. 1988 May 11;16(9):3751-70.

Caini S, Gandini S, Sera F, Raimondi S, Fargnoli MC, Boniol M, et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma according to anatomical site and clinico-pathological variant. *Eur J Cancer*. 2009 Nov;45(17):3054-63.

Caini S, Gandini S, Sera F, Raimondi S, Fargnoli MC, Boniol M, et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma according to anatomical site and clinico-pathological variant. *Eur J Cancer*. 2009 Nov;45(17):3054-63.

Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature*. 2014 Jul 31;511(7511):543-50.

Carreira S, Goodall J, Aksan I, La Rocca SA, Galibert MD, Denat L, et al. Mitf cooperates with Rb1 and activates p21Cip1 expression to regulate cell cycle progression. *Nature*. 2005 Feb 17;433(7027):764-9.

Carvalho-Silva DR, Santos FR, Rocha J, Pena SD. The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. *Am J Hum Genet*. 2001 Jan;68(1):281-6.

Chatzinasiou F, Lill CM, Kypreou K, Stefanaki I, Nicolaou V, Spyrou G, et al. Comprehensive field synopsis and systematic meta-analyses of genetic association studies in cutaneous melanoma. *J Natl Cancer Inst.* 2011 Aug 17;103(16):1227-35.

Cheli Y, Ohanna M, Ballotti R, Bertolotto C. Fifteen-year quest for microphthalmia-associated transcription factor target genes. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2010 Feb;23(1):27-40.

Chen M, David CJ, Manley JL. Concentration-dependent control of pyruvate kinase M mutually exclusive splicing by hnRNP proteins. *Nat Struct Mol Biol.* 2012 Feb 5;19(3):346-54.

Chen M, Manley JL. Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009 Nov;10(11):741-54.

Clark WH Jr, et al. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res.* 1969 Mar;29(3):705-27.

Cooper TA. Use of minigene systems to dissect alternative splicing elements. *Methods.* 2005 Dec;37(4):331-40.

Corbo C, Orrù S, Salvatore F. SRp20: an overview of its role in human diseases. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 Jun 21;436(1):1-5.

Costin GE, Hearing VJ. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *FASEB J.* 2007;21:976-94.

Curiel-Lewandrowski C, Speetzen LS, Cranmer L, Warneke JA, Loescher LJ. Multiple primary cutaneous melanomas in Li-Fraumeni syndrome. *Arch Dermatol.* 2011 Feb;147(2):248-50.

Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med.* 2005 Nov 17;353(20):2135-47.

da Silva WC, Oshiro TM, de Sá DC, Franco DD, Festa Neto C, Pontillo A. Genotyping and differential expression analysis of inflammasome genes in sporadic malignant melanoma

reveal novel contribution of CARD8, IL1B and IL18 in melanoma susceptibility and progression. *Cancer Genet.* 2016 Oct;209(10):474-480.

Dallaire F, Dupuis S, Fiset S, Chabot B. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 and UP1 protect mammalian telomeric repeats and modulate telomere replication in vitro. *J Biol Chem.* 2000 May 12;275(19):14509-16.

Danan-Gotthold M, Golan-Gerstl R, Eisenberg E, Meir K, Karni R, Levanon EY. Identification of recurrent regulated alternative splicing events across human solid tumors. *Nucleic Acids Res.* 2015 May 26;43(10):5130-44.

De Angelis R, Sant M, Coleman MP, Francisci S, Baili P, Pierannunzio D, et al. Cancer survival in Europe 1999-2007 by country and age: results of EUROCORE-5-a population-based study. *Lancet Oncol.* 2014 Jan;15(1):23-34.

de Giorgi V, Savarese I, Rossari S, Gori A, Grazzini M, Crocetti E, et al. Features of small melanocytic lesions: does small mean benign? A clinical-dermoscopic study. *Melanoma Res.* 2012 Jun;22(3):252-6.

de Vries E, Coebergh JW. Melanoma incidence has risen in Europe. *BMJ.* 2005 Sep 24;331(7518):698.

Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, Collod-Bérout G, Claustres M, Bérout C. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res.* 2009 May;37(9):e67.

D'Mello SA, Finlay GJ, Baguley BC, Askarian-Amiri ME. Signaling Pathways in Melanogenesis. *Int J Mol Sci.* 2016 Jul 15;17(7). pii: E1144.

Dobroff AS, Wang H, Melnikova VO, Villares GJ, Zigler M, Huang L, Bar-Eli M. Silencing cAMP response element-binding protein (CREB) identifies CYR61 as a tumor suppressor gene in melanoma. *J Biol Chem.* 2009 Sep 18;284(38):26194-206.

Downing A, Yu XQ, Newton-Bishop J, Forman D. Trends in prognostic factors and survival from cutaneous melanoma in Yorkshire, UK and New South Wales, Australia between 1993 and 2003. *Int J Cancer.* 2008 Aug 15;123(4):861-6.

Du J, Miller AJ, Widlund HR, Horstmann MA, Ramaswamy S, Fisher DE. MLANA/MART1 and SILV/PMEL17/GP100 are transcriptionally regulated by MITF in melanocytes and melanoma. *Am J Pathol.* 2003 Jul;163(1):333-43.

Duzkale H, Shen J, McLaughlin H, Alfares A, Kelly MA, Pugh TJ, et al. A systematic approach to assessing the clinical significance of genetic variants. *Clin Genet.* 2013 Nov;84(5):453-63.

Dvinge H, Bradley RK. Widespread intron retention diversifies most cancer transcriptomes. *Genome Med.* 2015 May 15;7(1):45.

Eggermont AM, Spatz A, Robert C. Cutaneous melanoma. *Lancet.* 2014 Mar 1;383(9919):816-27.

Eide MJ, Weinstock MA. Association of UV index, latitude, and melanoma incidence in nonwhite populations--US Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program, 1992 to 2001. *Arch Dermatol.* 2005 Apr;141(4):477-81.

Elder DE. Melanoma progression. *Pathology.* 2016 Feb;48(2):147-54.

English DR, MacLennan R, Rivers J, Kelly J, Armstrong BK. Epidemiological studies of melanocytic naevi: protocol for identifying and recording naevi. IARC internal report no 90/002, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 1990.

Ennen M, Keime C, Kobi D, Mengus G, Lipsker D, Thibault-Carpentier C, et al. Single-cell gene expression signatures reveal melanoma cell heterogeneity. *Oncogene.* 2015 Jun;34(25):3251-63.

Erlitzki R, Fry M. Sequence-specific binding protein of single-stranded and unimolecular quadruplex telomeric DNA from rat hepatocytes. *J Biol Chem.* 1997 Jun 20;272(25):15881-90.

Fears TR, Guerry D, Pfeiffer RM, Sagebiel RW, Elder DE, Halpern A, et al. Identifying individuals at high risk of melanoma: a practical predictor of absolute risk. *J Clin Oncol.* 2006;24(22):3590-6.

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015 Mar 1;136(5):E359-86.

Ferlay JSI, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr>.

Fernandes NC, Calmon R. Cutaneous melanoma: a prospective study of 42 cases. *An Bras Dermatol*. 2011 Nov-Dec;86(6):1233-5.

Fernandez-Pol JA, Douglas MG. Molecular interactions of cancer and age. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2000 Feb;14(1):25-44.

Fitzpatrick TB. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch Dermatol*. 1988 Jun;124(6):869-71.

Forsea AM, Del Marmol V, de Vries E, Bailey EE, Geller AC. Melanoma incidence and mortality in Europe: new estimates, persistent disparities. *Br J Dermatol*. 2012 Nov;167(5):1124-30.

Fortes C, Mastroeni S, Boffetta P, Innocenzi L, Antonelli G, Giovino R, et al. Polymorphisms of GSTM1 and GSTT1, sun exposure and the risk of melanoma: a case-control study. *Acta Derm Venereol*. 2011 May;91(3):284-9.

Franceschi S, Levi F, Randimbison L, La Vecchia C. Site distribution of different types of skin cancer: new aetiological clues. *Int J Cancer*. 1996 Jul 3;67(1):24-8.

Fu XD, Ares M Jr. Context-dependent control of alternative splicing by RNA-binding proteins. *Nat Rev Genet*. 2014 Oct;15(10):689-701.

Fuse N, Yasumoto K, Suzuki H, Takahashi K, Shibahara S. Identification of a melanocyte-type promoter of the microphthalmia-associated transcription factor gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996 Feb 27;219(3):702-7.

Gaggioli C, Buscà R, Abbe P, Ortonne JP, Ballotti R. Microphthalmia-associated transcription factor (MITF) is required but is not sufficient to induce the expression of melanogenic genes. *Pigment Cell Res.* 2003 Aug;16(4):374-82.

Gaildrat P, Killian A, Martins A, Tournier I, Frébourg T, Tosi M. Use of splicing reporter minigene assay to evaluate the effect on splicing of unclassified genetic variants. *Methods Mol Biol.* 2010;653:249-57.

Galli G, Cavalieri S, Di Guardo L, Cimminiello C, Nichetti F, Corti F, et al. Combination of Immunotherapy and Brain Radiotherapy in Metastatic Melanoma: A Retrospective Analysis. *Oncol Res Treat.* 2019 Mar 5:1-6.

Gandini S, Autier P, Boniol M. Reviews on sun exposure and artificial light and melanoma. *Prog Biophys Mol Biol.* 2011 Dec;107(3):362-6.

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

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

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

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

Gandini S, Stanganelli I, Magi S, Mazzoni L, Medri M, Agnoletti V, et al. Melanoma attributable to sunbed use and tan seeking behaviours: an Italian survey. *Eur J Dermatol.* 2014 Jan-Feb;24(1):35-40.

Garraway LA, Widlund HR, Rubin MA, Getz G, Berger AJ, Ramaswamy S, et al. Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature.* 2005 Jul 7;436(7047):117-22.

Geer LY, Marchler-Bauer A, Geer RC, Han L, He J, He S, et al. The NCBI BioSystems database. *Nucleic Acids Res.* 2010 Jan; 38:D492-6

George A, Zand DJ, Hufnagel RB, Sharma R, Sergeev YV, Legare JM, et al. Biallelic Mutations in MITF Cause Coloboma, Osteopetrosis, Microphthalmia, Macrocephaly, Albinism, and Deafness. *Am J Hum Genet.* 2016 Dec 1;99(6):1388-1394.

Ghiasvand R, Robsahm TE, Green AC, Rueegg CS, Weiderpass E, Lund E, et al. Association of Phenotypic Characteristics and UV Radiation Exposure With Risk of Melanoma on Different Body Sites. *JAMA Dermatol.* 2018 Nov 21.

Ghosh R, Gilda JE, Gomes AV. The necessity of and strategies for improving confidence in the accuracy of western blots. *Expert Rev Proteomics.* 2014 Oct;11(5):549-60.

Gillgren P, Drzewiecki KT, Niin M, Gullestad HP, Hellborg H, Månsson-Brahme E, et al. 2-cm versus 4-cm surgical excision margins for primary cutaneous melanoma thicker than 2 mm: a randomised, multicentre trial. *Lancet.* 2011 Nov 5;378(9803):1635-42.

Gironi LC, Colombo E, Pasini B, Giorgione R, Farinelli P, Zottarelli F, et al. Melanoma-prone families: new evidence of distinctive clinical and histological features of melanomas in CDKN2A mutation carriers. *Arch Dermatol Res.* 2018 Sep 15.

Goding CR Commentary. A picture of Mitf in melanoma immortality. *Oncogene.* 2011 May 19;30(20):2304-6.

Goina E, Skoko N, Pagani F. Binding of DAZAP1 and hnRNPA1/A2 to an exonic splicing silencer in a natural BRCA1 exon 18 mutant. *Mol Cell Biol.* 2008 Jun;28(11):3850-60.

Gomez GVB, Rinck-Junior JA, Oliveira C, Silva DHL, Mamoni RL, Lourenço GJ, et al. PDCD1 gene polymorphisms as regulators of T-lymphocyte activity in cutaneous melanoma risk and prognosis. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2018 Mar;31(2):308-317.

Grosso AR, Martins S, Carmo-Fonseca M. The emerging role of splicing factors in cancer. *EMBO Rep.* 2008 Nov;9(11):1087-93.

Grulich AE, Bataille V, Swerdlow AJ, Newton-Bishop JA, Cuzick J, Hersey P, et al. Naevi and pigmentary characteristics as risk factors for melanoma in a high-risk population: a case-control study in New South Wales, Australia. *Int J Cancer*. 1996 Aug 7;67(4):485-91.

Grulich AE, van Leeuwen MT, Falster MO, Vajdic CM. Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis. *Lancet*. 2007 Jul 7;370(9581):59-67.

Hallsson JH, Haflidadóttir BS, Schepsky A, Arnheiter H, Steingrímsson E. Evolutionary sequence comparison of the Mitf gene reveals novel conserved domains. *Pigment Cell Res*. 2007 Jun;20(3):185-200.

Hammond M, Kohn J, Oh K, Piatti P, Liu N. A Method for Greater Reliability in Western Blot Loading Controls—Stain-Free Total Protein Quantitation. *Bio-Rad Bulletin*: 6360, 2013.

Han SP, Tang YH, Smith R. Functional diversity of the hnRNPs: past, present and perspectives. *Biochem J*. 2010 Sep 15;430(3):379-92.

Haq R, Shoag J, Andreu-Perez P, Yokoyama S, Edelman H, Rowe GC, et al. Oncogenic BRAF regulates oxidative metabolism via PGC1 $\alpha$  and MITF. *Cancer Cell*. 2013 Mar 18;23(3):302-15.

Harrington CR, Beswick TC, Leitenberger J, Minhajuddin A, Jacobe HT, Adinoff B. Addictive-like behaviours to ultraviolet light among frequent indoor tanners. *Clin Exp Dermatol*. 2011 Jan;36(1):33-8.

Hartman ML, Czyz M. MITF in melanoma: mechanisms behind its expression and activity. *Cell Mol Life Sci*. 2015 Apr;72(7):1249-60.

He Y, Brown MA, Rothnagel JA, Saunders NA, Smith R. Roles of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A and B in cell proliferation. *J Cell Sci*. 2005 Jul 15;118(Pt 14):3173-83.

He Y, Smith R. Nuclear functions of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A/B. *Cell Mol Life Sci*. 2009 Apr;66(7):1239-56.

Hemesath TJ, Price ER, Takemoto C, Badalian T, Fisher DE. MAP kinase links the transcription factor Microphthalmia to c-Kit signalling in melanocytes. *Nature*. 1998 Jan 15;391(6664):298-301.

Hershey CL, Fisher DE. Genomic analysis of the Microphthalmia locus and identification of the MITF-J/Mitf-J isoform. *Gene*. 2005 Feb 28;347(1):73-82.

Hertwig P. Neue Mutationen und Kopplungsgruppen bei der Hausmaus. *Z. Indukt. Abstammungs-Vererbungslehre*. 1942;80(1):220–246. German.

Hinkle ER, Wiedner HJ, Black AJ, Giudice J. RNA processing in skeletal muscle biology and disease. *Transcription*. 2018 Dec 17.

Hodgkinson CA, Moore KJ, Nakayama A, Steingrímsson E, Copeland NG, Jenkins NA, et al. Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-zipper protein. *Cell*. 1993 Jul 30;74(2):395-404.

Hoek KS, Schlegel NC, Eichhoff OM, Widmer DS, Praetorius C, Einarsson SO, et al. Novel MITF targets identified using a two-step DNA microarray strategy. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2008 Dec;21(6):665-76.

Hou L, Arnheiter H, Pavan WJ. Interspecies difference in the regulation of melanocyte development by SOX10 and MITF. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Jun 13;103(24):9081-5.

Hou L, Pavan WJ. Transcriptional and signaling regulation in neural crest stem cell-derived melanocyte development: do all roads lead to Mitf? *Cell Res*. 2008 Dec;18(12):1163-76.

Howlander N, Noone AM, Krapcho M, Garshell J, Miller D, Altekruse SF, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2012, National Cancer Institute. Bethesda, MD; 2015. Available from: [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2012/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2012/).

Hsiao JJ, Fisher DE. The roles of microphthalmia-associated transcription factor and pigmentation in melanoma. *Arch Biochem Biophys*. 2014 Dec 1;563:28-34.

Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc*. 2009a;4(1):44-57.

Huang da W, Sherman BT, Zheng X, Yang J, Imamichi T, Stephens R, et al. Extracting biological meaning from large gene lists with DAVID. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2009b Sep;Chapter 13:Unit 13.11.

Hughes AE, Newton VE, Liu XZ, Read AP. A gene for Waardenburg syndrome type 2 maps close to the human homologue of the microphthalmia gene at chromosome 3p12-p14.1. *Nat Genet*. 1994 Aug;7(4):509-12.

IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Solar and ultraviolet radiation. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*. 1992;55:1-316.

Ibarrola-Villava M, Fernandez LP, Alonso S, Boyano MD, Peña-Chilet M, Pita G, et al. A customized pigmentation SNV array identifies a novel SNV associated with melanoma predisposition in the SLC45A2 gene. *PLoS One*. 2011 Apr 29;6(4):e19271.

Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2018: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva; 2018. Available from: <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/>

International HapMap 3 Consortium, Altshuler DM, Gibbs RA, Peltonen L, Altshuler DM, Gibbs RA, et al. Integrating common and rare genetic variation in diverse human populations. *Nature*. 2010 Sep 2;467(7311):52-8.

Jean-Philippe J, Paz S, Caputi M. hnRNP A1: the Swiss army knife of gene expression. *Int J Mol Sci*. 2013 Sep 16;14(9):18999-9024.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011 Mar-Apr;61(2):69-90.

Jemal A, Clegg LX, Ward E, Ries LA, Wu X, Jamison PM, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2001, with a special feature regarding survival. *Cancer*. 2004 Jul 1;101(1):3-27.

Jensen MA, Wilkinson JE, Krainer AR. Splicing factor SRSF6 promotes hyperplasia of sensitized skin. *Nat Struct Mol Biol*. 2014 Feb;21(2):189-97.

Jhappan C, Noonan FP, Merlino G. Ultraviolet radiation and cutaneous malignant melanoma. *Oncogene* 2003; 22: 3099-3112

Jung H, Lee D, Lee J, Park D, Kim YJ, Park WY, et al. Intron retention is a widespread mechanism of tumor-suppressor inactivation. *Nat Genet.* 2015 Nov;47(11):1242-8.

Jurica MS, Moore MJ. Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins. *Mol Cell.* 2003 Jul;12(1):5-14.

Kanavy HE, Gerstenblith MR. Ultraviolet radiation and melanoma. *Semin Cutan Med Surg.* 2011 Dec;30(4):222-8.

Karakousis CP, Puleo CA, Coventry BJ, Kashani-Sabet M, Smithers BM, Paul E, et al. Final trial report of sentinel-node biopsy versus nodal observation in melanoma. *N Engl J Med.* 2014 Feb 13;370(7):599-609.

Karni R, de Stanchina E, Lowe SW, Sinha R, Mu D, Krainer AR. The gene encoding the splicing factor SF2/ASF is a proto-oncogene. *Nat Struct Mol Biol.* 2007 Mar;14(3):185-93.

Karni R, Hippo Y, Lowe SW, Krainer AR. The splicing-factor oncoprotein SF2/ASF activates mTORC1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Oct 7;105(40):15323-7.

Kawakami A, Fisher DE. The master role of microphthalmia-associated transcription factor in melanocyte and melanoma biology. *Lab Invest.* 2017 Jun;97(6):649-656.

Kennedy C, Bajdik CD, Willemze R, De Gruijl FR, Bouwes Bavinck JN; Leiden Skin Cancer Study. The influence of painful sunburns and lifetime sun exposure on the risk of actinic keratoses, seborrheic warts, melanocytic nevi, atypical nevi, and skin cancer. *J Invest Dermatol.* 2003 Jun;120(6):1087-93.

Kim HR, Kim H, Jung BJ, You GE, Jang S, Chung DK. Lipoteichoic acid isolated from *Lactobacillus plantarum* inhibits melanogenesis in B16F10 mouse melanoma cells. *Mol Cells.* 2015;38(2):163-70.

Kirkwood JM, Strawderman MH, Ernstoff MS, Smith TJ, Borden EC, Blum RH. Interferon alfa-2b adjuvant therapy of high-risk resected cutaneous melanoma: the Eastern Cooperative Oncology Group Trial EST 1684. *J Clin Oncol.* 1996 Jan;14(1):7-17.

Knudson AG. Cancer genetics. *Am J Med Genet.* 2002 Jul 22;111(1):96-102.

Konieczkowski DJ, Johannessen CM, Abudayyeh O, Kim JW, Cooper ZA, Piris A, et al. A melanoma cell state distinction influences sensitivity to MAPK pathway inhibitors. *Cancer Discov.* 2014 Jul;4(7):816-27.

Konrad P, Fabris MR, Melao S, Blanco LF. Histopathological and epidemiological profile of cases of primary cutaneous melanoma diagnosed in Criciúma-SC between 2005 and 2007. *An Bras Dermatol.* 2011 May-Jun;86(3):457-61.

Kosary CL, Altekruse SF, Ruhl J, Lee R, Dickie L. Clinical and prognostic factors for melanoma of the skin using SEER registries: collaborative stage data collection system, version 1 and version 2. *Cancer.* 2014 Dec 1;120 Suppl 23:3807-14.

LaBranche H1, Dupuis S, Ben-David Y, Bani MR, Wellinger RJ, Chabot B. Telomere elongation by hnRNP A1 and a derivative that interacts with telomeric repeats and telomerase. *Nat Genet.* 1998 Jun;19(2):199-202.

Lachiewicz AM, Berwick M, Wiggins CL, Thomas NE. Epidemiologic support for melanoma heterogeneity using the surveillance, epidemiology, and end results program. *J Invest Dermatol.* 2008 May;128(5):1340-2.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227(5259):680-5.

Landman G, Miller H, Fillus N, Maceira JMP, Marques M, Costa MB, et al. Consenso para laudo anatomopatológico do melanoma cutâneo. Grupo Multicêntrico e Multidisciplinar Brasileiro para Estudo do Melanoma (GBM). *Acta Oncológica Brasileira.* 2003 23:504-510.

Lea CS, Holly EA, Hartge P, Lee JS, Guerry D 4th, Elder DE, et al. Reproductive risk factors for cutaneous melanoma in women: a case-control study. *Am J Epidemiol.* 2007 Mar 1;165(5):505-13.

Lens MB, Dawes M. Interferon alfa therapy for malignant melanoma: a systematic review of randomized controlled trials. *J Clin Oncol.* 2002 Apr 1;20(7):1818-25.

Lesueur F, de Lichy M, Barrois M, Durand G, Bombled J, Avril MF, et al. The contribution of large genomic deletions at the CDKN2A locus to the burden of familial melanoma. *Br J Cancer*. 2008 Jul 22;99(2):364-70.

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

Levy C, Nechushtan H, Razin E. A new role for the STAT3 inhibitor, PIAS3: a repressor of microphthalmia transcription factor. *J Biol Chem*. 2002 Jan 18;277(3):1962-6.

Lewis R [Internet]. Two Rare Disorders Hide a Third: COMMAD Syndrome – [updated 2017 Feb 28; cited 2018 Nov 01]. Available from: <https://www.raredr.com/contributor/ricki-lewis-phd/2017/02/commad-syndrome>.

Li L, Feng J, Chen Y, Li S, Ou M, Sun W, Tang L. Estradiol shows anti-skin cancer activities through decreasing MDM2 expression. *Oncotarget*. 2017 Jan 31;8(5):8459-8474. doi: 10.18632/oncotarget.14275.

Li M, Zhu F, Hong N, Zhang L, Hong Y. Alternative transcription generates multiple Mitf isoforms with different expression patterns and activities in medaka. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2014 Jan;27(1):48-58.

Lin JY, Fisher DE. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature*. 2007 Feb 22;445(7130):843-50.

Liu F, Fu Y, Meyskens FL Jr. MiTF regulates cellular response to reactive oxygen species through transcriptional regulation of APE-1/Ref-1. *J Invest Dermatol*. 2009 Feb;129(2):422-31.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8.

Livingstone E, Zimmer L, Vaubel J, Schadendorf D. Current advances and perspectives in the treatment of advanced melanoma. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2012 May;10(5):319-25.

Loercher AE, Tank EM, Delston RB, Harbour JW. MITF links differentiation with cell cycle arrest in melanocytes by transcriptional activation of INK4A. *J Cell Biol.* 2005 Jan 3;168(1):35-40.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951 Nov;193(1):265-75.

Luiz OC, Gianini RJ, Gonçalves FT, Francisco G, Festa-Neto C, Sanches JA, et al. Ethnicity and cutaneous melanoma in the city of Sao Paulo, Brazil: a case-control study. *PLoS One.* 2012;7(4):e36348.

Ma PC, Kijima T, Maulik G, Fox EA, Sattler M, Griffin JD, et al. c-MET mutational analysis in small cell lung cancer: novel juxtamembrane domain mutations regulating cytoskeletal functions. *Cancer Res.* 2003 Oct 1;63(19):6272-81.

Mansky KC, Sankar U, Han J, Ostrowski MC. Microphthalmia transcription factor is a target of the p38 MAPK pathway in response to receptor activator of NF-kappa B ligand signaling. *J Biol Chem.* 2002 Mar 29;277(13):11077-83.

Mao X, Young BD, Lu YJ. The application of single nucleotide polymorphism microarrays in cancer research. *Curr Genomics.* 2007 Jun;8(4):219-28.

Martinez-Contreras R, Cloutier P, Shkreta L, Fiset JF, Revil T, Chabot B. hnRNP proteins and splicing control. *Adv Exp Med Biol.* 2007;623:123-47.

Martinez-Contreras R, Fiset JF, Nasim FU, Madden R, Cordeau M, Chabot B. Intronic binding sites for hnRNP A/B and hnRNP F/H proteins stimulate pre-mRNA splicing. *PLoS Biol.* 2006 Feb;4(2):e21.

Måsbäck A, Olsson H, Westerdahl J, Sandberg T, Borg A, Jonsson N, et al. Clinical and histopathological features of malignant melanoma in germline CDKN2A mutation families. *Melanoma Res.* 2002 Dec;12(6):549-57.

Masuda T, Esumi N. SOX9, through interaction with microphthalmia-associated transcription factor (MITF) and OTX2, regulates BEST1 expression in the retinal pigment epithelium. *J Biol Chem.* 2010 Aug 27;285(35):26933-44.

Matera AG, Wang Z. A day in the life of the spliceosome. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014 Feb;15(2):108-21.

Maurer M, Somasundaram R, Herlyn M, Wagner SN. Immunotargeting of tumor subpopulations in melanoma patients: A paradigm shift in therapy approaches. *Oncoimmunology.* 2012 Nov 1;1(8):1454-1456.

Mervic L. Prognostic factors in patients with localized primary cutaneous melanoma. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat.* 2012;21(2):27-31

Miller AJ, Mihm MC Jr. Melanoma. *N Engl J Med.* 2006 Jul 6;355(1):51-65.

Miller KD, Siegel RL, Lin CC, Mariotto AB, Kramer JL, Rowland JH, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. *CA Cancer J Clin.* 2016 Jul;66(4):271-89.

Mitchell DL, Greinert R, de Gruijl FR, Guikers KL, Breitbart EW, Byrom M, et al. Effects of chronic low-dose ultraviolet B radiation on DNA damage and repair in mouse skin. *Cancer Res.* 1999 Jun 15;59(12):2875-84.

Moan JE, Baturaite Z, Dahlback A, Porojnicu AC. Ultraviolet radiation and cutaneous malignant melanoma. *Adv Exp Med Biol.* 2014;810:359-74.

Mocellin S, Pasquali S, Rossi CR, Nitti D. Interferon alpha adjuvant therapy in patients with high-risk melanoma: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2010 Apr 7;102(7):493-501.

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

Moscarella E, Bombonato C, Pampena R, Kyrgidis A, Benati E, Piana S, et al. Pigmented skin lesions displaying regression features: dermoscopy and reflectance confocal microscopy criteria for diagnosis. *Exp Dermatol.* 2018 Dec 2.

Mouret S, Forestier A, Douki T. The specificity of UVA-induced DNA damage in human melanocytes. *Photochem Photobiol Sci.* 2012 Jan;11(1):155-62.

Müller J, Krijgsman O, Tsoi J, Robert L, Hugo W, Song C, et al. Low MITF/AXL ratio predicts early resistance to multiple targeted drugs in melanoma. *Nat Commun*. 2014 Dec 15;5:5712.

Murakami H, Arnheiter H. Sumoylation modulates transcriptional activity of MITF in a promoter-specific manner. *Pigment Cell Res*. 2005 Aug;18(4):265-77.

Murakami M, Iwata Y, Funaba M. Expression and transcriptional activity of alternative splice variants of Mitf exon 6. *Mol Cell Biochem*. 2007 Sep;303(1-2):251-7.

Nagore E, Hueso L, Botella-Estrada R, Alfaro-Rubio A, Serna I, Guallar J, et al. Smoking, sun exposure, number of nevi and previous neoplasias are risk factors for melanoma in older patients (60 years and over). *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2010 Jan;24(1):50-7.

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

Nasti TH, Timares L. MC1R, eumelanin and pheomelanin: their role in determining the susceptibility to skin cancer. *Photochem Photobiol*. 2015 Jan-Feb;91(1):188-200.

Nguyen NT, Fisher DE. MITF and UV responses in skin: From pigmentation to addiction. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2018 Jul 17.

Nguyen TH, Galej WP, Bai XC, Savva CG, Newman AJ, Scheres SH, et al. The architecture of the spliceosomal U4/U6.U5 tri-snRNP. *Nature*. 2015 Jul 2;523(7558):47-52.

Nguyen THD, Galej WP, Bai XC, Oubridge C, Newman AJ, Scheres SHW, et al. Cryo-EM structure of the yeast U4/U6.U5 tri-snRNP at 3.7 Å resolution. *Nature*. 2016 Feb 18;530(7590):298-302.

Oliveira C. Identificação de genes de suscetibilidade herdada para o melanoma cutâneo por genotipagem em larga escala [tese]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas; 2017.

Olsen CM, Carroll HJ, Whiteman DC. Estimating the attributable fraction for melanoma: a meta-analysis of pigmentary characteristics and freckling. *Int J Cancer*. 2010 Nov 15;127(10):2430-45.

Pagani F, Baralle FE. Genomic variants in exons and introns: identifying the splicing spoilers. *Nat Rev Genet.* 2004 May;5(5):389-96.

Palmieri G, Capone M, Ascierto ML, Gentilcore G, Stroncek DF, Casula M, et al. Main roads to melanoma. *J Transl Med.* 2009 Oct 14;7:86.

Palmieri G, Colombino M, Sini MC, Ascierto PA, Lissia A, Cossu A. Chapter 2: Targeted Therapies in Melanoma: Successes and Pitfalls. *In: Licensee In Tech;* 2013.

Pan Q, Shai O, Lee LJ, Frey BJ, Blencowe BJ. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat Genet.* 2008 Dec;40(12):1413-5.

Park HY, Kosmadaki M, Yaar M, Gilchrest BA. Cellular mechanisms regulating human melanogenesis. *Cell Mol Life Sci.* 2009;66:1493-506.

Parmigiani, RB, Camargo, AA. Cap. 1: O genoma humano e o câncer. p.3-11. *In: Carlos Gil Ferreira; José Cláudio Rocha. Oncologia Molecular.* 1 ed. Editora Atheneu: São Paulo, 2004. 469p.

Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy Fde S, et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One.* 2011 Feb 16;6(2):e17063.

Perego M, Tortoreto M, Tragni G, Mariani L, Deho P, Carbone A, et al. Heterogeneous phenotype of human melanoma cells with in vitro and in vivo features of tumor-initiating cells. *J Invest Dermatol.* 2010 Jul;130(7):1877-86.

Plensdorf S, Martinez J. Common pigmentation disorders. *Am Fam Physician.* 2009 Jan 15;79(2):109-16.

Puente XS, Beà S, Valdés-Mas R, Villamor N, Gutiérrez-Abril J, Martín-Subero JI, et al. Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature.* 2015 Oct 22;526(7574):519-24.

Raimondi S, Sera F, Gandini S, Iodice S, Caini S, Maisonneuve P, et al. MC1R variants, melanoma and red hair color phenotype: a meta-analysis. *Int J Cancer*. 2008 Jun 15;122(12):2753-60.

Rain JC, Rafi Z, Rhani Z, Legrain P, Krämer A. Conservation of functional domains involved in RNA binding and protein-protein interactions in human and *Saccharomyces cerevisiae* pre-mRNA splicing factor SF1. *RNA*. 1998 May;4(5):551-65.

Ramanathan A, Robb GB, Chan SH. mRNA capping: biological functions and applications. *Nucleic Acids Res*. 2016 Sep 19;44(16):7511-26.

Rastrelli M, Alaibac M, Stramare R, Chiarion Sileni V, Montesco MC, Vecchiato A, et al. Melanoma m (zero): diagnosis and therapy. *ISRN Dermatol*. 2013 Apr 11;2013:616170.

Reinau D, Weiss M, Meier CR, Diepgen TL, Surber C. Outdoor workers' sun-related knowledge, attitudes and protective behaviours: a systematic review of cross-sectional and interventional studies. *Br J Dermatol*. 2013 May;168(5):928-40.

Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015 May;17(5):405-24.

Rigel DS, Friedman RJ, Levenstein MJ, Greenwald DI. Relationship of fluorescent lights to malignant melanoma: another view. *J Dermatol Surg Oncol*. 1983 Oct;9(10):836-8.

Rockberg J, Amelio JM, Taylor A, Jørgensen L, Ragnhammar P, Hansson J. Epidemiology of cutaneous melanoma in Sweden-Stage-specific survival and rate of recurrence. *Int J Cancer*. 2016 Dec 15;139(12):2722-2729.

Rodríguez CI, Setaluri V. Cyclic AMP (cAMP) signaling in melanocytes and melanoma. *Arch Biochem Biophys*. 2014 Dec 1;563:22-7.

Roncati L, Pisciolli F. AJCC 8th Edition (2017) versus AJCC 7th Edition (2010) in thin melanoma staging. *Neoplasma*. 2018 Sep 19;65(5):651-655.

Salti GI, Manougian T, Farolan M, Shilkaitis A, Majumdar D, Das Gupta TK. Microphthalmia transcription factor: a new prognostic marker in intermediate-thickness cutaneous malignant melanoma. *Cancer Res.* 2000 Sep 15;60(18):5012-6.

Sarasin A, Kauffmann A. Overexpression of DNA repair genes is associated with metastasis: a new hypothesis. *Mutat Res.* 2008 Jul-Aug;659(1-2):49-55.

Saravanaperumal SA, Pediconi D, Renieri C, La Terza A. Alternative splicing of the sheep MITF gene: novel transcripts detectable in skin. *Gene.* 2014 Nov 15;552(1):165-75.

Sasse AD, Sasse EC, Clark LG, Ulloa L, Clark OA. Chemoimmunotherapy versus chemotherapy for metastatic malignant melanoma. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007 Jan 24;(1):CD005413.

Schadendorf D, Hauschild A. Melanoma in 2013: Melanoma--the run of success continues. *Nat Rev Clin Oncol.* 2014 Feb;11(2):75-6.

Schadendorf D, van Akkooi ACJ, Berking C, Griewank KG, Gutzmer R, Hauschild A, et al. Melanoma. *Lancet.* 2018 Sep 15;392(10151):971-984.

Schimmer BP, Cordova M, Tsao J, Frigeri C. A polymorphic form of steroidogenic factor 1 associated with ACTH receptor deficiency in mouse adrenal cell mutants. *Ann N Y Acad Sci.* 2003 Jun;994:147-53.

Schrama D, Scherer D, Schneider M, Zapatka M, Bröcker EB, Schadendorf D, et al. ERCC5 p.Asp1104His and ERCC2 p.Lys751Gln polymorphisms are independent prognostic factors for the clinical course of melanoma. *J Invest Dermatol.* 2011 Jun;131(6):1280-90.

Schuch AP, Yagura T, Makita K, Yamamoto H, Schuch NJ, Agnez-Lima LF, et al. DNA damage profiles induced by sunlight at different latitudes. *Environ Mol Mutagen.* 2012 Apr;53(3):198-206.

Seberg HE, Van Otterloo E, Cornell RA. Beyond MITF: Multiple transcription factors directly regulate the cellular phenotype in melanocytes and melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2017 Sep;30(5):454-466.

Selzer E, Wacheck V, Lucas T, Heere-Ress E, Wu M, Weilbaecher KN, et al. The melanocyte-specific isoform of the microphthalmia transcription factor affects the phenotype of human melanoma. *Cancer Res.* 2002 Apr 1;62(7):2098-103.

Seo EY, Jin SP, Sohn KC, Park CH, Lee DH, Chung JH. UCHL1 Regulates Melanogenesis through Controlling MITF Stability in Human Melanocytes. *J Invest Dermatol.* 2017 Aug;137(8):1757-1765.

Seo S, Takayama K, Uno K, Ohi K, Hashimoto R, Nishizawa D, et al. Functional analysis of deep intronic SNP rs13438494 in intron 24 of PCLO gene. *PLoS One.* 2013 Oct 22;8(10):e76960.

Sever R, Brugge JS. Signal transduction in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015 Apr 1;5(4). pii: a006098.

Shepard PJ, Hertel KJ. The SR protein family. *Genome Biol.* 2009;10(10):242.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin.* 2016 Jan-Feb;66(1):7-30.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin.* 2018 Jan;68(1):7-30.

Singh B, Eyraas E. The role of alternative splicing in cancer. *Transcription.* 2017 Mar 15;8(2):91-98.

Slingluff CI Jr, Flaherty K, Rosenberg SA, et al.: Cutaneous melanoma. In: DeVita VT Jr, Lawrence TS, Rosenberg SA: *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. 9th edition. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins, 2011, pp 1643-91.

Somasundaram R, Villanueva J, Herlyn M. Intratumoral heterogeneity as a therapy resistance mechanism: role of melanoma subpopulations. *Adv Pharmacol.* 2012;65:335-59.

Sondak VK, Gibney GT. Surgical management of melanoma. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2014 Jun;28(3):455-70.

Sotiriou C, Piccart MJ. Taking gene-expression profiling to the clinic: when will molecular signatures become relevant to patient care? *Nat Rev Cancer.* 2007 Jul;7(7):545-53.

Spatz A, Stock N, Batist G, van Kempen LC. The biology of melanoma prognostic factors. *Discov Med*. 2010 Jul;10(50):87-93.

Stanienda-Sokół K, Salwowska N, Sławińska M, Wicherska-Pawłowska K, Lorenc A, Wcisło-Dziadecka D et al. Primary Locations of Malignant Melanoma Lesions Depending on Patients' Gender and Age. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2017 Nov 26;18(11):3081-3086.

Stanienda-Sokół K, Salwowska N, Sławińska M, Wicherska-Pawłowska K, Lorenc A, Wcisło-Dziadecka D, et al. Primary Locations of Malignant Melanoma Lesions Depending on Patients' Gender and Age. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2017 Nov 26;18(11):3081-3086.

Stiefel C, Schwack W. Photoprotection in changing times - UV filter efficacy and safety, sensitization processes and regulatory aspects. *Int J Cosmet Sci*. 2015 Feb;37(1):2-30.

Stierner U, Augustsson A, Rosdahl I, Suurküla M. Regional distribution of common and dysplastic naevi in relation to melanoma site and sun exposure. A case-control study. *Melanoma Res*. 1992 Jan-Feb;1(5-6):367-75.

Supek F, Miñana B, Valcárcel J, Gabaldón T, Lehner B. Synonymous mutations frequently act as driver mutations in human cancers. *Cell*. 2014 Mar 13;156(6):1324-1335.

Svobodová AR, Galandáková A, Sianská J, Doležal D, Ulrichová J, Vostálová J. Acute exposure to solar simulated ultraviolet radiation affects oxidative stress-related biomarkers in skin, liver and blood of hairless mice. *Biol Pharm Bull*. 2011;34:471-9.

Swetter SM, Pollitt RA, Johnson TM, Brooks DR, Geller AC. Behavioral determinants of successful early melanoma detection: role of self and physician skin examination. *Cancer*. 2012 Aug 1;118(15):3725-34.

Sztiller-Sikorska M, Koprowska K, Jakubowska J, Zalesna I, Stasiak M, Duechler M, et al. Sphere formation and self-renewal capacity of melanoma cells is affected by the microenvironment. *Melanoma Res*. 2012 Jun;22(3):215-24.

Takeda K, Takemoto C, Kobayashi I, Watanabe A, Nobukuni Y, Fisher DE, et al. Ser298 of MITF, a mutation site in Waardenburg syndrome type 2, is a phosphorylation site with functional significance. *Hum Mol Genet*. 2000 Jan 1;9(1):125-32.

Taylor NJ, Handorf EA, Mitra N, Avril MF, Azizi E, Bergman W, et al. Phenotypic and Histopathological Tumor Characteristics According to CDKN2A Mutation Status among Affected Members of Melanoma Families. *J Invest Dermatol*. 2016 May;136(5):1066-1069.

Tedesco AC, Martínez L, González S. Photochemistry and photobiology of actinic erythema: defensive and reparative cutaneous mechanisms. *Braz J Med Biol Res*. 1997 May;30(5):561-75.

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

The Lancet Editorial Board Skin cancer: prevention is better than cure. *Lancet*. 2014 Aug 09;384(9942):470.

The Skin Cancer Foundation [Internet]. Do You Know Your ABCDEs?; 2018. Available from: <https://www.skincancer.org/skin-cancer-information/melanoma/melanoma-warning-signs-and-images/do-you-know-your-abcdes>.

Tsatmali M, Ancans J, Thody AJ. Melanocyte function and its control by melanocortin peptides. *J HistochemCytochem*. 2002;50:125-33.

Tsuchida S, Takizawa T, Abe K, Okamoto M, Tagawa M. Identification of microphthalmia-associated transcription factor isoforms in dogs. *Vet J*. 2009 Nov;182(2):283-93.

Tucker MA, Crutcher WA, Hartge P, Sagebiel RW. Familial and cutaneous features of dysplastic nevi: a case-control study. *J Am Acad Dermatol*. 1993 Apr;28(4):558-64.

Tucker MA, Halpern A, Holly EA, Hartge P, Elder DE, Sagebiel RW, et al. Clinically recognized dysplastic nevi. A central risk factor for cutaneous melanoma. *JAMA*. 1997 May 14;277(18):1439-44.

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

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

- Vachtenheim J, Ondrušová L. Microphthalmia-associated transcription factor expression levels in melanoma cells contribute to cell invasion and proliferation. *Exp Dermatol*. 2015 Jul;24(7):481-4.
- Vallarelli AF, Harrison SL, Souza EM. Melanocytic nevi in a Brazilian community of predominantly Dutch descent (1999-2007). *An Bras Dermatol*. 2010 Jul-Aug;85(4):469-77.
- Van der Rhee JI, Krijnen P, Gruis NA, de Snoo FA, Vasen HFA, Putter H, et al. Clinical and histologic characteristics of malignant melanoma in families with a germline mutation in CDKN2A. *J Am Acad Dermatol*. 2011 Aug;65(2):281-288.
- Vazquez Vde L, Silva TB, Vieira M de A, de Oliveira AT, Lisboa MV, de Andrade DA, et al. Melanoma characteristics in Brazil: demographics, treatment, and survival analysis. *BMC Res Notes*. 2015 Jan 16;8:4.
- Vuong K, McGeechan K, Armstrong BK; AMFS Investigators; GEM Investigators, Cust AE. Occupational sun exposure and risk of melanoma according to anatomical site. *Int J Cancer*. 2014 Jun 1;134(11):2735-41.
- Wahl MC, Will CL, Lührmann R. The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell*. 2009 Feb 20;136(4):701-18.
- Wan R, Yan C, Bai R, Wang L, Huang M, Wong CC, et al. The 3.8 Å structure of the U4/U6.U5 tri-snRNP: Insights into spliceosome assembly and catalysis. *Science*. 2016 Jan 29;351(6272):466-75.
- Wang ET, Sandberg R, Luo S, Khrebtkova I, Zhang L, Mayr C, et al. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature*. 2008 Nov 27;456(7221):470-6.
- Wang Z, Burge CB. Splicing regulation: from a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code. *RNA*. 2008 May;14(5):802-13.
- Wellbrock C, Rana S, Paterson H, Pickersgill H, Brummelkamp T, Marais R. Oncogenic BRAF regulates melanoma proliferation through the lineage specific factor MITF. *PLoS One*. 2008 Jul 16;3(7):e2734.

Wheatley K, Ives N, Hancock B, Gore M, Eggermont A, Suci S. Does adjuvant interferon-alpha for high-risk melanoma provide a worthwhile benefit? A meta-analysis of the randomised trials. *Cancer Treat Rev*. 2003 Aug;29(4):241-52.

Widmer DS, Cheng PF, Eichhoff OM, Belloni BC, Zipser MC, Schlegel NC, et al. Systematic classification of melanoma cells by phenotype-specific gene expression mapping. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2012 May;25(3):343-53.

Will CL, Lührmann R. Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011 Jul 1;3(7). pii: a003707.

Woodhead JL, Fallon R, Figuered H, Longdale J, Malcom AD(1986) Alternative methodology of gene diagnosis. In: Davies KE (ed) *Human genetic diseases: a practical approach*. Oxford: IRL Press, 1986. pp 51–64.

Wu M, Hemesath TJ, Takemoto CM, Horstmann MA, Wells AG, Price ER, et al. c-Kit triggers dual phosphorylations, which couple activation and degradation of the essential melanocyte factor Mi. *Genes Dev*. 2000 Feb 1;14(3):301-12.

Wu S, Cho E, Li WQ, Weinstock MA, Han J, Qureshi AA. History of Severe Sunburn and Risk of Skin Cancer Among Women and Men in 2 Prospective Cohort Studies. *Am J Epidemiol*. 2016 May 1;183(9):824-33.

Xodo L, Paramasivam M, Membrino A, Cogoi S. Protein hnRNPA1 binds to a critical G-rich element of KRAS and unwinds G-quadruplex structures: implications in transcription. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*. 2008;(52):159-60.

Yamaguchi Y, Hearing VJ. Physiological factors that regulate skin pigmentation. *Biofactors*. 2009;35:193-9.

Yokoyama S, Woods SL, Boyle GM, Aoude LG, MacGregor S, Zismann V, et al. A novel recurrent mutation in MITF predisposes to familial and sporadic melanoma. *Nature*. 2011 Nov 13;480(7375):99-103.

Yokoyama S, Woods SL, Boyle GM, Aoude LG, MacGregor S, Zismann V, et al. A novel recurrent mutation in MITF predisposes to familial and sporadic melanoma. *Nature*. 2011 Nov 13;480(7375):99-103.

Yuspa SH. Molecular and cellular basis for tumor promotion in mouse skin. Princess Takamatsu Symp. 1983;14:315-26.

Zhang J, Manley JL. Misregulation of pre-mRNA alternative splicing in cancer. Cancer Discov. 2013 Nov;3(11):1228-37.

Zhao X, Fiske B, Kawakami A, Li J, Fisher DE. Regulation of MITF stability by the USP13 deubiquitinase. Nat Commun. 2011 Aug 2;2:414.

Zhu Z, Liu W, Gotlieb V. The rapidly evolving therapies for advanced melanoma-Towards immunotherapy, molecular targeted therapy, and beyond. Crit Rev Oncol Hematol. 2016 Mar;99:91-9.

## ANEXO 1

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**Título da pesquisa:** Influência de polimorfismos na via JAK/STAT na suscetibilidade e prognóstico em pacientes com melanoma cutâneo

**Nomes dos responsáveis:** Gabriela Vilas Bôas Gomez e Profa. Dra. Carmen Silvia Passos Lima

**Número do CAAE:** 58186316.1.0000.5404

Você está sendo convidado a participar como voluntário de um estudo. Este documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, visa assegurar seus direitos como participante e é elaborado em duas vias, uma que deverá ficar com você e outra com o pesquisador.

Por favor, leia com atenção e calma, aproveitando para esclarecer suas dúvidas. Se houver perguntas antes ou mesmo depois de assiná-lo, você poderá esclarecê-las com o pesquisador. Se preferir, pode levar para casa e consultar seus familiares ou outras pessoas antes de decidir participar. Se você não quiser participar ou retirar sua autorização, a qualquer momento, não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo.

Participando do estudo você está sendo convidado a fornecer, apenas uma vez, uma amostra de sangue a ser coletada em veia de um dos braços (12 ml) para avaliação de uma predisposição pessoal para o desenvolvimento de melanoma cutâneo por meio da análise de segmentos de DNA, RNA e proteína do gene *JAK* e *STAT*, via de sinalização importante na regulação e no desenvolvimento tumoral. Nenhum material adicional será coletado.

Você **não** deve participar deste estudo se existir impossibilidade de seguir as orientações do pesquisador. A coleta de sangue não constitui um procedimento de risco à sua saúde, mas, você poderá sentir dor de pequena intensidade e de curta duração no local de punção da veia e, eventualmente, poderá aparecer mancha roxa que vai desaparecer em alguns dias. Os benefícios do estudo não são imediatos para nenhum dos participantes. Entretanto, acreditamos que os resultados deste estudo poderão contribuir para o melhor entendimento sobre o funcionamento genético do melanoma.

É importante comentar que a sua participação neste estudo não prevê nenhum tipo de ressarcimento. Se necessário, o participante desta pesquisa terá direito à indenização em caso de qualquer tipo de dano recorrente dos procedimentos realizados para a participação neste estudo, como previsto no Código Civil Brasileiro. Além disso, em caso de eventos adversos o participante tem direito a atendimento gratuito pelo tempo

necessário até a resolução do mesmo.

Você tem a garantia de que sua identidade será mantida em sigilo e nenhuma informação será dada a outras pessoas que não façam parte da equipe de pesquisadores. Na divulgação dos resultados desse estudo, seu nome não será citado. Você poderá sair do estudo a qualquer momento e isso não prejudicará o seu atendimento na UNICAMP. Caso você esteja interessado, você terá o direito de saber o resultado do exame e qual o significado do mesmo, através da marcação de uma consulta no ambulatório do Hospital das Clínicas da UNICAMP em uma quarta-feira do horário das 9 às 12h, pelo telefone (19) 3521-8695, com a pesquisadora Gabriela Vilas Bôas Gomez ou com Profa. Dra Carmen Silvia Passos Lima que darão esclarecimentos necessários para o seu caso.

Outros estudos de predisposição genética só poderão ser realizados com o seu sangue após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) e, caso você concorde com o armazenamento:

( ) concordo em participar do presente estudo, porém NÃO AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, devendo o mesmo ser descartado ao final desta pesquisa.

( ) concordo em participar do presente estudo e AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, sendo necessário meu consentimento a cada nova pesquisa, que deverá ser aprovada pelo CEP institucional e, se for o caso, pela CONEP.

Em caso de dúvidas sobre o estudo, você poderá entrar em contato com as pesquisadoras Gabriela Vilas Bôas Gomez ou com a Profa. Dra. Carmen Silvia Passos todos os dias da semana no horário das 9 às 17h, no Laboratório de Genética do Câncer da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP localizado no prédio FCM 08, Rua: Vital Brasil, 50; CEP 13083-888, Barão Geraldo, Campinas, São Paulo; e pelos telefones (19) 3521-9120 e (19) 3521-8695. Em caso de denúncias ou reclamações sobre sua participação e sobre questões éticas do estudo, você pode entrar em contato com a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNICAMP: Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126; CEP 13083-887, Campinas, São Paulo; telefone (19) 3521-8936; fax (19) 3521-7187; e-mail: cep@fcm.unicamp.br. O CEP é responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos, visando preservar a dignidade, os direitos, a segurança e o bem-estar dos participantes da pesquisa.

Após ter sido esclarecimento sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e o incômodo que esta possa acarretar, aceito participar:

Nome do(a) participante: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

(Assinatura do participante ou nome e assinatura do seu responsável LEGAL)

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

Asseguro ter cumprido as exigências da resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguro, também, ter explicado e fornecido uma cópia deste documento ao participante. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP perante o qual o projeto foi apresentado. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante.

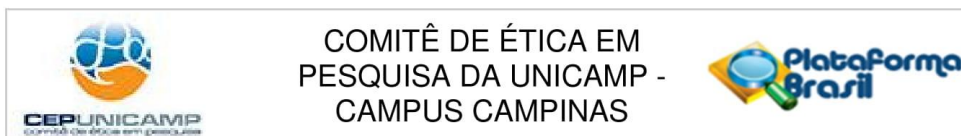
\_\_\_\_\_

(Assinatura do pesquisador)

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

Rubrica do pesquisador: \_\_\_\_\_ Rubrica do participante: \_\_\_\_\_

## ANEXO 2



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

## DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Análise funcional de genes polimórficos envolvidos com a melanogênese em melanoma cutâneo

**Pesquisador:** Gustavo Jacob Lourenço

**Área Temática:** Genética Humana:  
(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

**Versão:** 1

**CAAE:** 53641216.3.0000.5404

**Instituição Proponente:** Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

## DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.438.601

## Apresentação do Projeto:

"Nós identificamos, recentemente e pela primeira vez, 12.882 novos polimorfismos gênicos de base única (SNPs) associados ao risco do melanoma cutâneo (MC), por meio da genotipagem em larga escala com microarranjos de DNA (SNP array 6.0, Affymetrix®), em 103 portadores do tumor e 103 controles. Três novos SNPs localizados em regiões regulatórias do processamento do RNA mensageiro (splicing) de genes relacionados com a melanogênese, ADCY3 c.675+9196T>G (rs11900505), CREB1 c.303+373G>A (rs10932201) e MITF c.938-325A>G (rs7623610), foram considerados de maior interesse entre eles. As quantidades e as funções das proteínas codificadas pelos alelos selvagens e variantes dos SNPs não foram ainda determinadas. Frente ao exposto, os objetivos do presente estudo são os de verificar se os genótipos dos referidos SNPs influenciam: 1) o risco de ocorrência do MC, os aspectos clínicos e as características do tumor; 2) a sobrevida livre de progressão e a sobrevida global dos pacientes com MC; 3) as expressões dos genes ADCY3, CREB1 e MITF; e 4) a eficácia do mecanismo de splicing dos genes ADCY3, CREB1 e MITF. Para atingir os referidos objetivos, o DNA genômico do sangue periférico de 250 pacientes com MC e 250 controles será analisado para identificar os genótipos de cada SNP por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real, com ensaios TaqMan® (Applied Biosystems®). A

**Endereço:** Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

**Bairro:** Barão Geraldo

**CEP:** 13.083-887

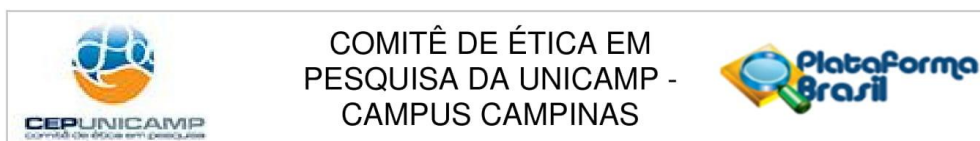
**UF:** SP

**Município:** CAMPINAS

**Telefone:** (19)3521-8936

**Fax:** (19)3521-7187

**E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 1.438.601

expressão de cada gene será avaliada em RNA total de amostras de sangue periférico de controles (15 com o genótipo homozigoto selvagem, 15 heterozigotos e 15 homozigotos variantes de cada SNP) por meio da PCR quantitativa, com iniciadores, reagentes específicos, e o corante SYBR green (Applied Biosystems®). A eficácia do mecanismo de splicing será analisada por meio do ensaio do minigene repórter em linhagem celular de melanoma (A-375). A significância estatística das diferenças entre os grupos será calculada por meio dos testes de Fisher ou qui-quadrado e pela regressão logística múltipla. Os tempos de sobrevida serão avaliados pelo método de Kaplan-Meier e por análises uni e multivariada de Cox. Os resultados das diferenças de expressão gênica serão avaliados por meio dos testes t e ANOVA ou Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. A eficiência do mecanismo de splicing será avaliada por meio da análise dos tamanhos dos fragmentos gerados pelos distintos minigenes. Acreditamos que nossos resultados contribuirão para definir os papéis dos SNPs na produção das proteínas e de seus papéis na predisposição herdada ao MC."

#### **Objetivo da Pesquisa:**

Nesta pesquisa, pretende-se avaliar o envolvimento de três polimorfismos gênicos com a melanogênese em melanoma cutâneo. Especificamente: Verificar se os genótipos dos SNPs ADCY3 c.675+9196T>G (rs11900505), CREB1 c.303+373G>A (rs10932201) e MITF c.938-325A>G (rs7623610) influenciam: 1) o risco de ocorrência do MC, nos aspectos clínicos e as características do tumor; 2) a sobrevida livre de progressão e a sobrevida global dos pacientes com MC; 3) as expressões dos genes ADCY3, CREB1 e MITF; e 4) a eficácia do mecanismo de splicing dos genes ADCY3, CREB1 e MITF.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

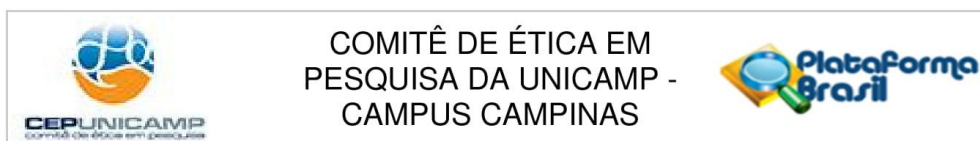
A pesquisa será desenvolvida com material já colhido e mantido no biorrepositório do Laboratório de Genética do Câncer. Assim, não há riscos ou desconfortos associados a procedimentos de colheita de amostras. Todavia, foram identificados riscos associados à confidencialidade (sigilo da identidade do participante).

Não há benefícios diretos aos participantes.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de uma pesquisa apresentada pelo Prof Dr Gustavo Jacob Lourenço do Laboratório de Genética do Câncer-FCM-Unicamp. Nesta pesquisa, pretende-se avaliar o envolvimento de três polimorfismos gênicos com a melanogênese em melanoma cutâneo (MC), especificamente nos aspectos clínicos e biológicos do tumor, e na sobrevida dos pacientes. Para isso, pretende-se

**Endereço:** Rua Tessália Vieira de Camargo, 126  
**Bairro:** Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887  
**UF:** SP **Município:** CAMPINAS  
**Telefone:** (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 1.438.601

analisar 500 amostras de DNA, 250 pertencentes a pacientes com MC, atendidos nos ambulatórios de Oncologia Clínica e de Dermatologia do Hospital de Clínicas da UNICAMP (durante o período de abril de 2000 a fevereiro de 2014) e 250 participantes controles, doadores de sangue do HEMOCENTRO da Unicamp (controles). Será incluído no estudo apenas o material biológico de indivíduos (pacientes com melanoma cutâneo e controles) que assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido aplicado anteriormente, com a opção de armazenamento das amostras no biorrepositório do Laboratório de Genética do Câncer. Além das análises laboratoriais envolvendo genotipagem e análise da expressão gênica, haverá uso de fontes secundárias de dados (prontuários dos participantes) para obter-se informações relacionados a evolução clínica dos pacientes.

O regulamento do biorrepositório garante que caso o pesquisador encontre dados que possam modificar o prognóstico ou tratamento dos sujeitos de pesquisa, tais informações serão transmitidas aos participantes e/ou anexadas ao prontuário para conhecimento da equipe clínica.

#### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

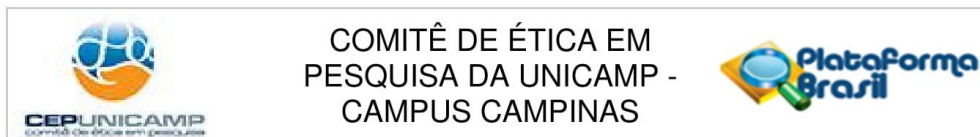
Foram apresentados:

1. Folha de rosto assinada pela pesquisadora responsável, Gustavo Jacob Lourenço e por Ivan Felizardo Contrera Toro, diretor da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, instituição indicada como proponente;
2. Formulário da Plataforma Brasil com as informações básicas sobre o projeto;
3. Projeto completo;
4. Regulamento do biorrepositório;
5. Carta assinada pela Profa.Dr. Carmen Sílvia Passos Lima autorizando a transferência das amostras armazenadas no biorrepositório do Laboratório de Genética do Câncer para realização do estudo proposto. A carta informa que o armazenamento das amostras teve parecer favorável do CEP por meio do parecer 424/2006.

#### **Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Conclusão: Não há pendências ou inadequações.

**Endereço:** Rua Tessália Vieira de Camargo, 126  
**Bairro:** Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887  
**UF:** SP **Município:** CAMPINAS  
**Telefone:** (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

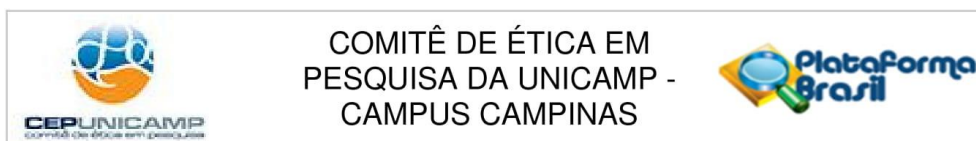


Continuação do Parecer: 1.438.601

**Considerações Finais a critério do CEP:**

- O sujeito de pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (quando aplicável).
- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (quando aplicável).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.
- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.
- Lembramos que segundo a Resolução 466/2012, item XI.2 letra e, "cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento".

**Endereço:** Rua Tessália Vieira de Camargo, 126  
**Bairro:** Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887  
**UF:** SP **Município:** CAMPINAS  
**Telefone:** (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 1.438.601

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_661337.pdf	17/02/2016 15:46:20		Aceito
Declaração de Pesquisadores	Transferencia_amstras.pdf	17/02/2016 15:40:37	Gustavo Jacob Lourenço	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Dispensa_TCLE.pdf	17/02/2016 15:40:04	Gustavo Jacob Lourenço	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Biorrepositorio.pdf	17/02/2016 15:38:12	Gustavo Jacob Lourenço	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	17/02/2016 15:35:46	Gustavo Jacob Lourenço	Aceito
Folha de Rosto	Folha_rosto.pdf	17/02/2016 15:35:24	Gustavo Jacob Lourenço	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

CAMPINAS, 29 de Março de 2016

---

**Assinado por:**  
**Renata Maria dos Santos Celeghini**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Rua Tessália Vieira de Camargo, 126  
**Bairro:** Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887  
**UF:** SP **Município:** CAMPINAS  
**Telefone:** (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

## ANEXO 3

Cálculo do tamanho amostral e frequências dos distintos genótipos e alelos da variante *MITF* rs7623610 (c.938-325G>A)

Grupo*	Amostra	Genótipos			Alelos		Tamanho amostral**
		GG (%)	GA (%)	AA (%)	G (%)	A (%)	
HapMap - CEU	224	56 (25,0)	122 (54,5)	46 (20,5)	234 (52,2)	214 (47,8)	47
HapMap - HCB	90	32 (32,6)	48 (53,3)	10 (11,1)	112 (62,2)	68 (37,8)	70
HapMap - JPT	172	50 (29,1)	92 (53,5)	30 (17,4)	192 (55,8)	152 (44,2)	54
HapMap - GIH	176	60 (34,0)	80 (45,5)	36 (20,5)	200 (56,8)	152 (43,2)	56
HapMap - MEX	100	34 (34,0)	50 (50,0)	16 (16,0)	118 (59,0)	82 (41,0)	61
HapMap - ASW	98	68 (69,4)	28 (28,6)	2 (2,0)	164 (83,7)	32 (16,3)	219
HapMap - LWK	178	160 (89,9)	18 (10,1)	0 (0,0)	338 (94,9)	18 (5,1)	802
HapMap - MKK	286	202 (70,6)	80 (28,0)	4 (1,4)	124 (84,6)	88 (15,4)	235
<b>Média</b>							<b>193</b>

\*dados e siglas obtidos do International Hapmap 3 Consortium et al. (2010): CEU – Residentes em Utah com ancestralidade do norte e oeste europeus; HCB – Chineses Han em Pequim, China; JPT - Japoneses em Tóquio, Japão; GIH – Indianos Gujarati em Houston, Texas, EUA; MEX – Ancestrais de mexicanos em Los Angeles, Califórnia; ASW – Ancestrais africanos em SW, EUA; LWK – Grupo étnico Luhya em Webuye, Quênia; MKK – Grupo étnico Maasai no Quênia; \*\*cálculo definido por Beiguelman (1995);

## ANEXO 4

**Ficha de Coleta dos Dados Clínicos de Pacientes e Dados do Tumor**

- 1) Nome: \_\_\_\_\_ HC: \_\_\_\_\_
- 2) Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_
- 3) Dados tumorais:
- 2.1) Data do diagnóstico: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_
  - 2.2) Índice de Breslow (mm): \_\_\_\_\_
  - 2.3) Níveis de Clark: I( ☐ ) II( ☐ ) III( ☐ ) IV( ☐ ) V( ☐ )
  - 2.4) T: is( ☐ ) 1a( ☐ ) 1b( ☐ ) 2a( ☐ ) 2b( ☐ ) 3a( ☐ ) 3b( ☐ ) 4a( ☐ ) 4b( ☐ )
  - 2.5) N: 0( ☐ ) 1a( ☐ ) 1b( ☐ ) 2a( ☐ ) 2b( ☐ ) 2c( ☐ ) 3( ☐ )
  - 2.6) M: 0( ☐ ) X( ☐ ) 1a( ☐ ) 1b( ☐ ) 1c( ☐ )
  - 2.7) EC: 0( ☐ ) IA( ☐ ) IB( ☐ ) IIA( ☐ ) IIB( ☐ ) IIC( ☐ ) IIIA( ☐ ) IIIB( ☐ ) IIIC( ☐ ) IV( ☐ )
  - 2.8) Localização do tumor: \_\_\_\_\_
  - 2.9) Tipo de crescimento: \_\_\_\_\_
  - 2.10) Ulceração: Sim ( ☐ ) Não ( ☐ )
- 4) Caracteres pessoais:
- 3.1) Cor da pele: Branca( ☐ ) Negra( ☐ ) Parda( ☐ )
  - 3.2) Cor dos olhos: Azul( ☐ ) Verde( ☐ ) Castanho( ☐ ) Preto( ☐ )
  - 3.3) Cor do cabelo: Preto( ☐ ) Castanho( ☐ ) Loiro( ☐ ) Ruivo( ☐ )
  - 3.4) Sardas: Sim( ☐ ) Não( ☐ )
  - 3.5) Nevos: <20 ( ☐ ) 20-50 ( ☐ ) >50 ( ☐ )
  - 3.6) Fototipo: I( ☐ ) II( ☐ ) III( ☐ ) IV( ☐ ) V( ☐ ) VI( ☐ ) (Classificação Fitzpatrick)
- 5) Antecedentes pessoais:
- 4.1) Exposição solar: Sim( ☐ ) Não( ☐ ) Por quanto tempo: \_\_\_\_\_ anos  
Tipo de exposição: \_\_\_\_\_
  - 4.2) Queimaduras solares prévias: Sim( ☐ ) Não( ☐ )
  - 4.3) Câncer de pele não melanoma: Sim( ☐ ) Não( ☐ )
  - 4.4) Câncer de pele melanoma: Sim( ☐ ) Não( ☐ )
  - 4.5) Outro tipo de câncer: Sim ( ☐ ) Não( ☐ )
  - 4.6) Doença auto-imune: Sim ( ☐ ) Não ( ☐ )
- 6) Antecedente familiares:
- 5.1) Câncer de pele não melanoma na família: \_\_\_\_\_
  - 5.2) Câncer de pele melanoma na família: \_\_\_\_\_
  - 5.3) Outro tipo de câncer na família: \_\_\_\_\_

### Ficha de Coleta dos Dados Clínicos de Controles

#### 1) Identificação

Nome: \_\_\_\_\_

Nº Hemocentro: \_\_\_\_\_

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

Telefone: \_\_\_\_\_

#### 2) Caracteres Pessoais:

2.1) Sexo: Feminino ( ) Masculino ( )

2.2) Cor da Pele: Branca( ) Negra( ) Parda( ) Amarela ( )

2.3) Cor dos olhos: Azul( ) Verde( ) Castanho( ) Preto( )

2.4) Cabelo: Preto( ) Castanho( ) Loiro( ) Ruivo( )

2.5) Sardas: nenhuma/raras ( ) algumas/muitas( )

2.6) Nevos: <20( ) 20-50( ) >50( )

2.7) Fototipo: I( ) II( ) III( ) IV( ) V( ) VI( )

Grupo	Eritema	Bronzeado	Sensib.
I Branca	Sempre	Nunca	Muito sensível
II Branca	Sempre	Às vezes	Sensível
III Morena clara	Moderado	Moderado	Normal
IV Morena moderada	Pouco	Sempre	Normal
V Morena escura	Raro	Sempre	Pouco sensível
VI Negra	Nunca	Pele muito pigmentada	Insensível

#### 3) Antecedentes pessoais:

3.1) Fumo: Sim( ) Não( ) Quantidade/Tipo: \_\_\_\_\_ Por quanto tempo: \_\_\_\_\_ anos

3.2) Etilismo: Sim( ) Não( ) Quantidade/Tipo: \_\_\_\_\_ Por quanto tempo: \_\_\_\_\_ anos

3.3) Exposição Solar: Sim( ) Não( ) Por quanto tempo: \_\_\_\_\_ anos

3.4) Queimaduras Solares Infância (até 14 anos) por ano: Não ( ) 1x( ) 1-6x ( ) >7x ( )

3.5) Queimaduras Solares Adolescência (até 15-19 anos) por ano: Não ( ) 1x( ) 1-6x ( ) >7x ( )

3.6) Ocupação exposto ao sol: Sim ( ) Não ( ) Qual? \_\_\_\_\_

3.7) Tipo de exposição solar: Nenhum ( ) Intermitente ( ) Crônica ( )

3.8) Anos de exposição ao Sol: 0( ) ≤ 20 ( ) >20 ( )

3.9) Histórico de outro tipo de câncer: Sim ( ) Não ( )

#### 4) Antecedente Familiares:

4.1) Câncer de Pele Não Melanoma: Negativo( ) Positivo( ) 1 ou mais da família com CA de pele

4.2) Câncer de Pele Melanoma: Negativo ( ) Positivo ( ) 1 ou mais da família com melanoma

4.3) Histórico de Câncer: Negativo ( ) Positivo ( ) com histórico de pai e mãe

#### 5) Padrão de dieta: (A = maior que preconizada; B = menor que preconizada; P = preconizada)

Carnes (2 a 3 porções diárias): ..... Vegetais (3 a 5 porções diárias): .....

Frutas (2 a 4 porções diárias): ..... Cereais (pão, arroz, massa) (6 a 11 porções diárias): .....

OBSERVAÇÕES: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

## ANEXO 5



**RELATÓRIO DE ENSAIO**  
**Nº STR.009/18 - Liberação 00**

**DADOS DO CLIENTE**

**Endereço:** Rua Vital Brasil, nº 50, Bairro Cidade Universitária "Zeferino Vaz" - Cidade Campinas - Estado: SP -  
**CEP:** 13083-888 - Caixa  
**Postal:** (19)35218695  
**Nome/E-mail:** Gustavo Jacob Lourenço

**ENSAIO**

Autenticidade celular

**CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA**

**Amostra:** SK-MEL-28 - **Código BCRJ:** 0289

**RESULTADO FINAL PARA A AMOSTRA**

Amelogenin: X,Y  
D2S1338: 18  
D19S433: 14  
CSF1PO: 10,12  
TPOX: 12,8  
THO1: 7  
vWA: 16, 19  
D16S539: 9,12  
D7S820: 9,3,10  
D13S317: 11,12  
D5S818: 11,13  
FGA: 19  
D3S1358: 16,18  
D18S51: 12,16  
D8S1179: 13  
D21S11: 28,29

**METODOLOGIA DE ENSAIO**

Método STR (*Short Tandem Repeats*)

**OBSERVAÇÕES**

O resultado do ensaio refere-se somente à amostra analisada neste relatório.  
Este relatório só pode ser reproduzido por completo. A reprodução parcial requer autorização do BCRJ.

Antonio Martins Monteiro  
Curador do Banco de Células do Rio de Janeiro  
Signatário Autorizado  
Duque de Caxias, 28 de agosto de 2018.

## ANEXO 6



Make Research Easy  
CONFIDENTIAL

# Certificate of Analysis

**Project ID:** U2003DC150-2

**Construct Information:**

**Gene Name:** minigene MITF pcDNA3.1+N-eGFP

**Clone ID:** H18051

**Gene Length:** 4713 bp

**Cloning Vector:** pcDNA3.1+N-eGFP

**Cloning Strategy:** EcoRI / XhoI

QC Items	Specifications	Results	
<b>Sequencing Alignment</b>	Sequencing results are consistent with the targeted insert sequence.	Pass	Consistent
<b>Vector Sequence</b>	The flanking sequences of the cloning site are correct.	Pass	Correct Shown in the SQD file
<b>Restriction Digests</b>	The size of inserted fragment is correct and free of unexpected bands suggesting contamination.	Pass	Correct Shown in attachment 1
<b>DNA Quality</b>	Miniprep: 4 µg OD260/280=1.8~2.0 Free of contamination	Pass	≥ 4 µg OD260/280=1.83 Pure
<b>Quality grade</b>	Research Grade	Pass	Research Grade
<b>Appearance</b>	Clear and free of foreign particles.	Pass	Clear Free of foreign particles
<b>Additional Test</b>		N/A	

**NOTE**

Shipping at	Plasmid Storing at	Bacstab Storing at	Glycerol Stock Storing at
Room Temperature	-20°C	4°C	-20°C/-80°C

*Morgan*

**Certified by:**

**Date:** 04/08/2018

Thank you for your patronage to our Gene services! To maintain this working relationship, we shall be grateful if you can add our webpage URL into your lab website. As a token of appreciation, you will be rewarded by 1,000 EZcoupon™ points. For more information, please contact us by e-mail at web@genscript.com.

For research use only

860 Centennial Ave., Piscataway, NJ 08854, USA

Toll-Free: 1-877-436-7274

Tel: 1-732-885-9188

Fax: 1-732-210-0262

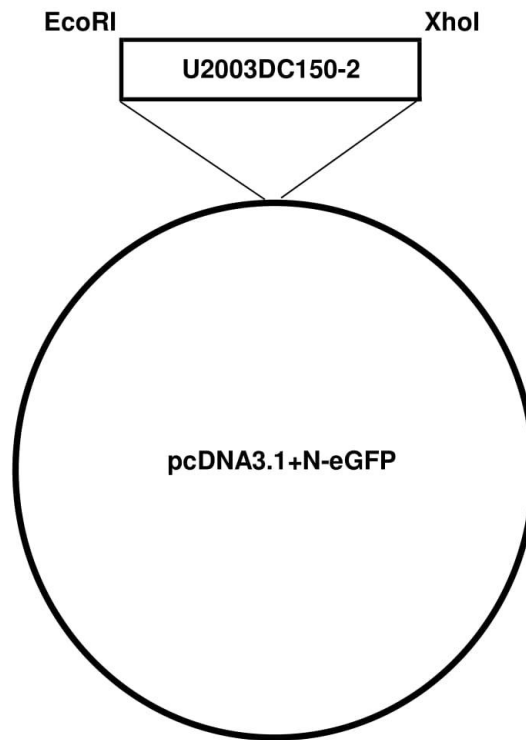
Email: order@genscript.com

Web: www.genscript.com

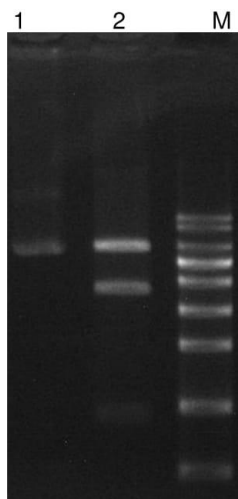
Attachment 1

### Plasmid Construct Map

The gene was cloned in pcDNA3.1+N-eGFP by EcoRI / XhoI.

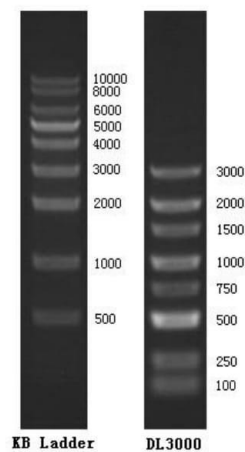


### Enzyme Digestion



Lane M: KB Ladder  
Lane 1: U2003DC150-2 plasmid  
Lane 2: U2003DC150-2 plasmid digested  
by EcoRI and XhoI

**Digestion Conditions:**  
About 300ng plasmid digested  
Digestion in water-bath, 37°C for 40 minutes  
1% Agarose Gel



For research use only

860 Centennial Ave., Piscataway, NJ 08854, USA

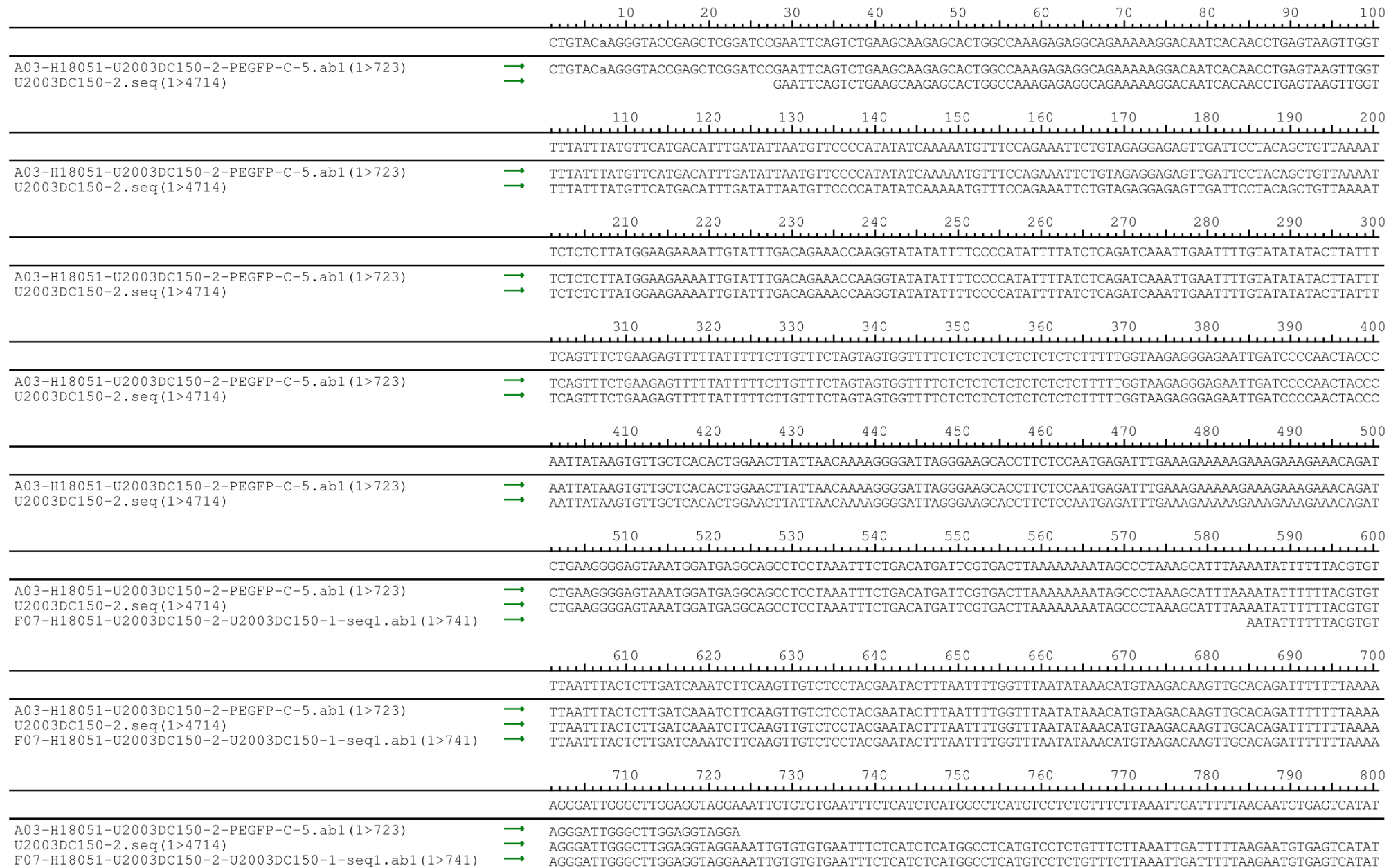
Toll-Free: 1-877-436-7274

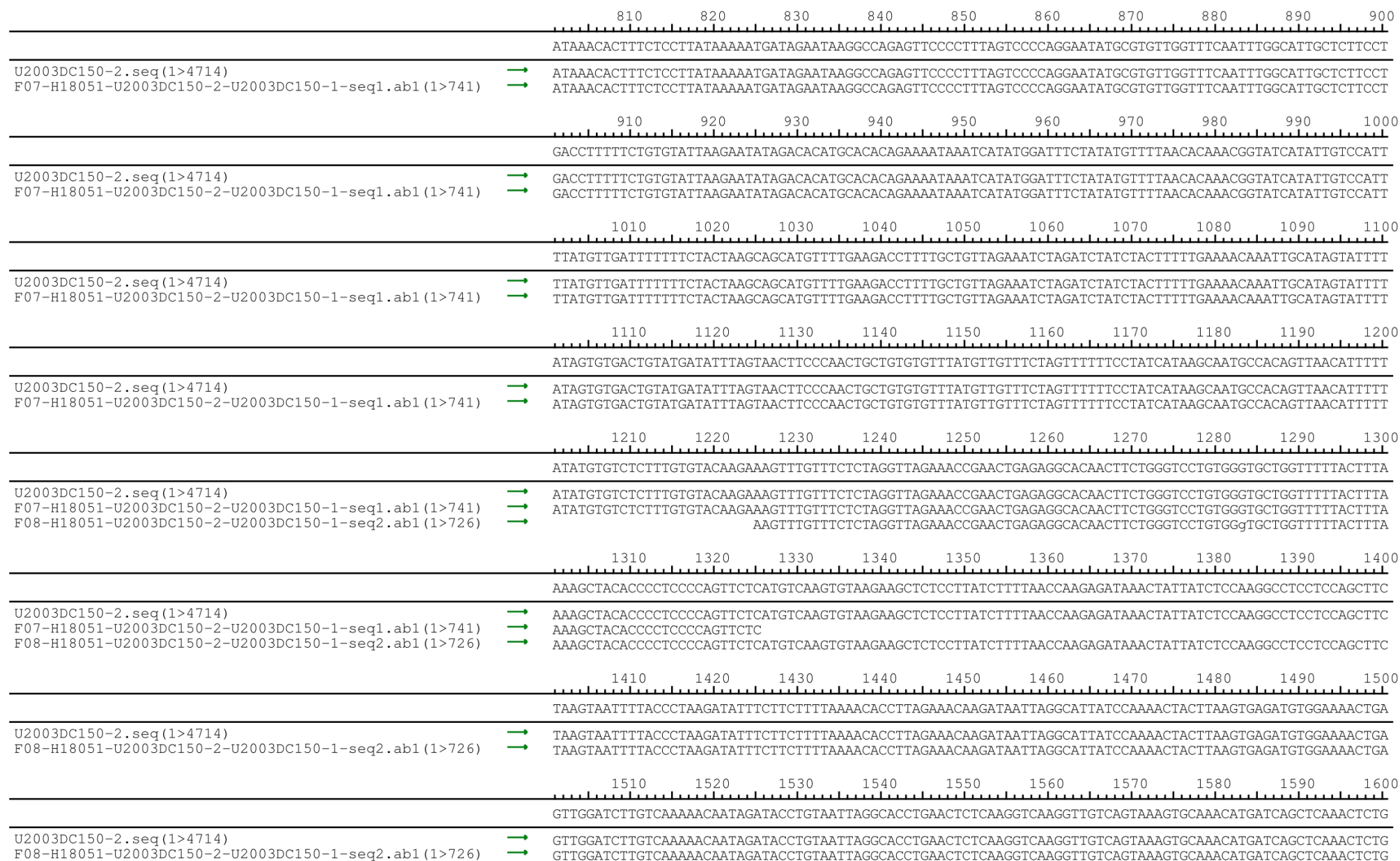
Tel: 1-732-885-9188

Fax: 1-732-210-0262

Email: [order@genscript.com](mailto:order@genscript.com)

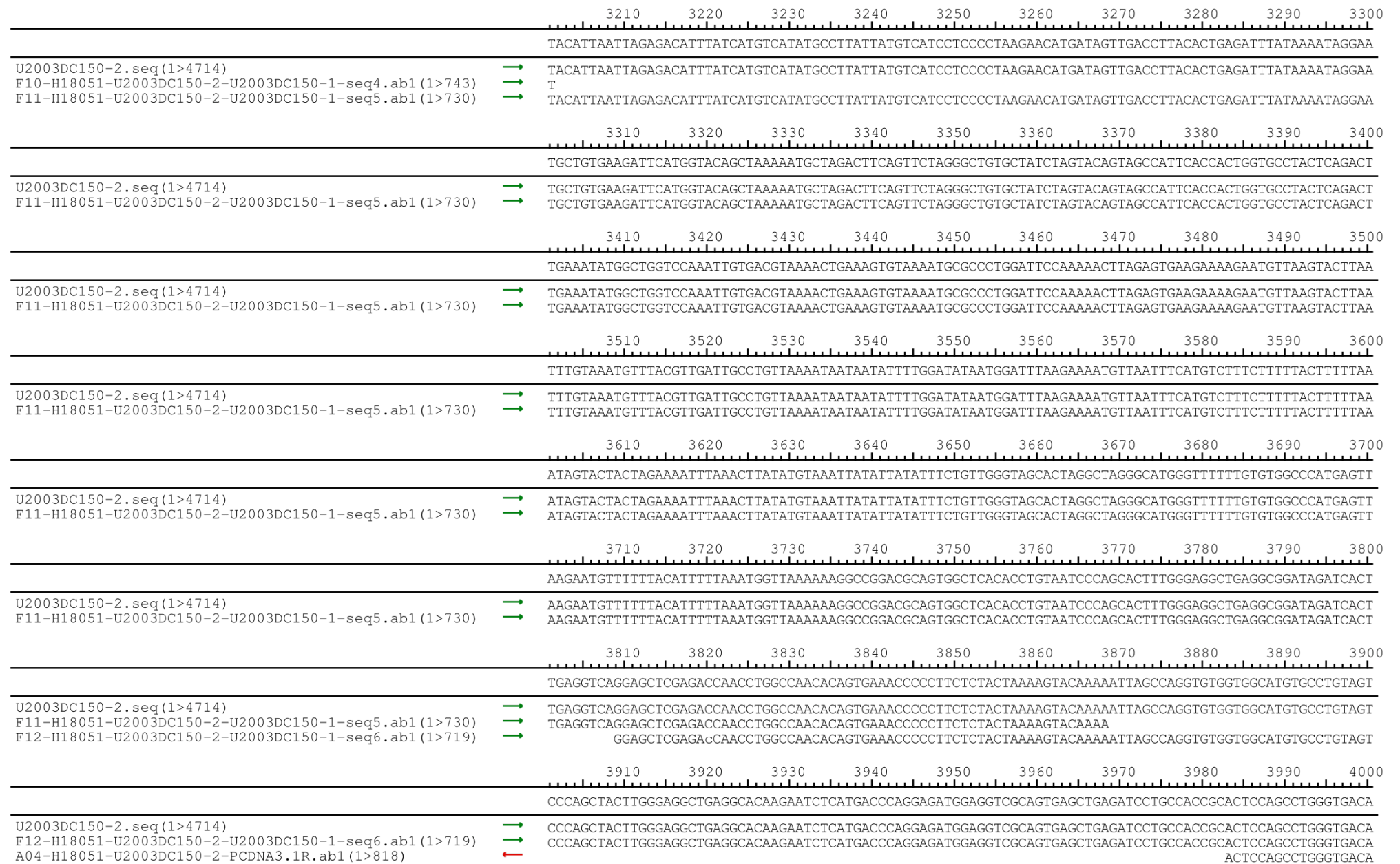
Web: [www.genscript.com](http://www.genscript.com)













## ANEXO 7



Make Research Easy  
CONFIDENTIAL

# Certificate of Analysis

Project ID: U2003DC150-3

Construct Information:

Gene Name: MITF variant

Clone ID: H19948

Cloning Vector: pcDNA3.1+N-eGFP

Gene Length: 4713 bp

Cloning Strategy: EcoRI / XhoI

QC Items	Specifications	Results	
Sequencing Alignment	Sequencing results are consistent with the targeted insert sequence.	Pass	Consistent
Vector Sequence	The flanking sequences of the cloning site are correct.	Pass	Correct Shown in the SQD file
Restriction Digests	The size of inserted fragment is correct and free of unexpected bands suggesting contamination.	Pass	Correct Shown in attachment 1
DNA Quality	Miniprep: 4 µg OD260/280=1.8~2.0 Free of contamination	Pass	≥ 4 µg OD260/280=1.88 Pure
Quality grade	Research Grade	Pass	Research Grade
Appearance	Clear and free of foreign particles.	Pass	Clear Free of foreign particles
Additional Test		N/A	

## NOTE

Shipping at	Plasmid Storing at	Bacstab Storing at	Glycerol Stock Storing at
Room Temperature	-20℃	4℃	-20℃/-80℃

*Morgan*

Certified by:

Date: 04/15/2018

Thank you for your patronage to our Gene services! To maintain this working relationship, we shall be grateful if you can add our webpage URL into your lab website. As a token of appreciation, you will be rewarded by 1,000 EZcoupon™ points. For more information, please contact us by e-mail at web@genscript.com.

For research use only

860 Centennial Ave., Piscataway, NJ 08854, USA

Toll-Free: 1-877-436-7274

Tel: 1-732-885-9188

Fax: 1-732-210-0262

Email: order@genscript.com

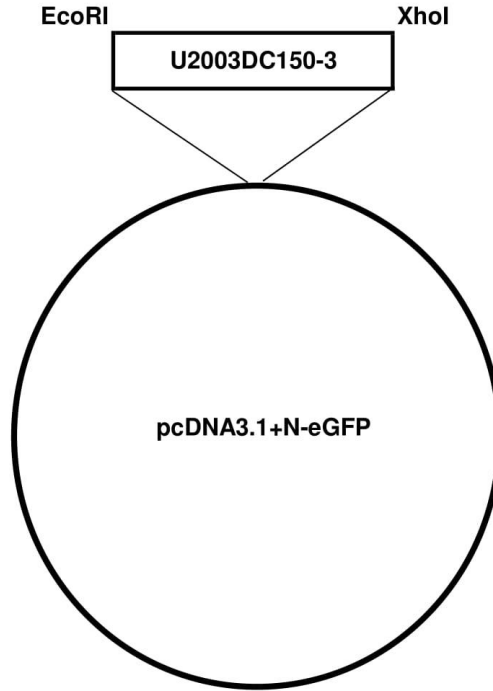
Web: www.genscript.com

Page 1 of 2

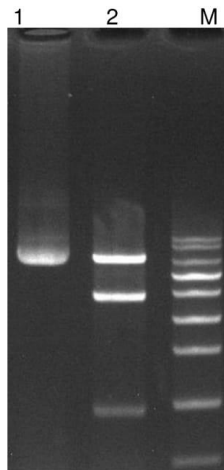
Attachment 1

### Plasmid Construct Map

The gene was cloned in pcDNA3.1+N-eGFP by EcoRI / XhoI.

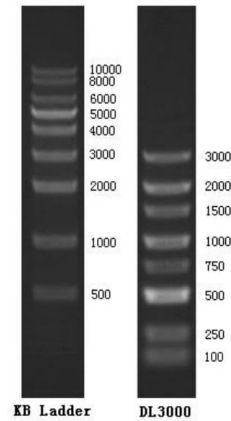


### Enzyme Digestion



Lane M: KB Ladder  
Lane 1: U2003DC150-3 plasmid  
Lane 2: U2003DC150-3 plasmid digested  
by EcoRI and XhoI

**Digestion Conditions:**  
About 300ng plasmid digested  
Digestion in water-bath, 37°C for 40 minutes  
1% Agarose Gel



For research use only

860 Centennial Ave., Piscataway, NJ 08854, USA

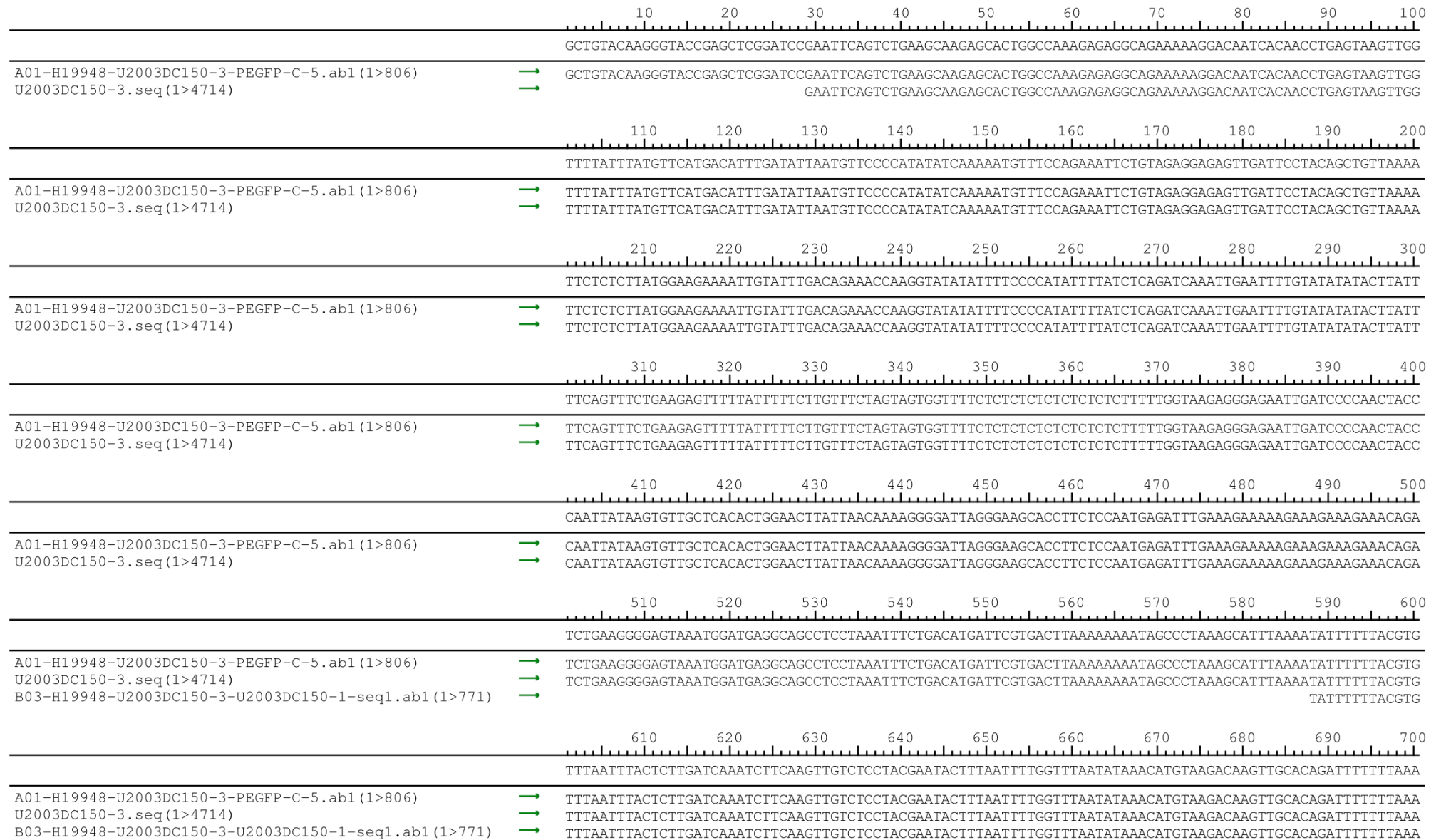
Toll-Free: 1-877-436-7274

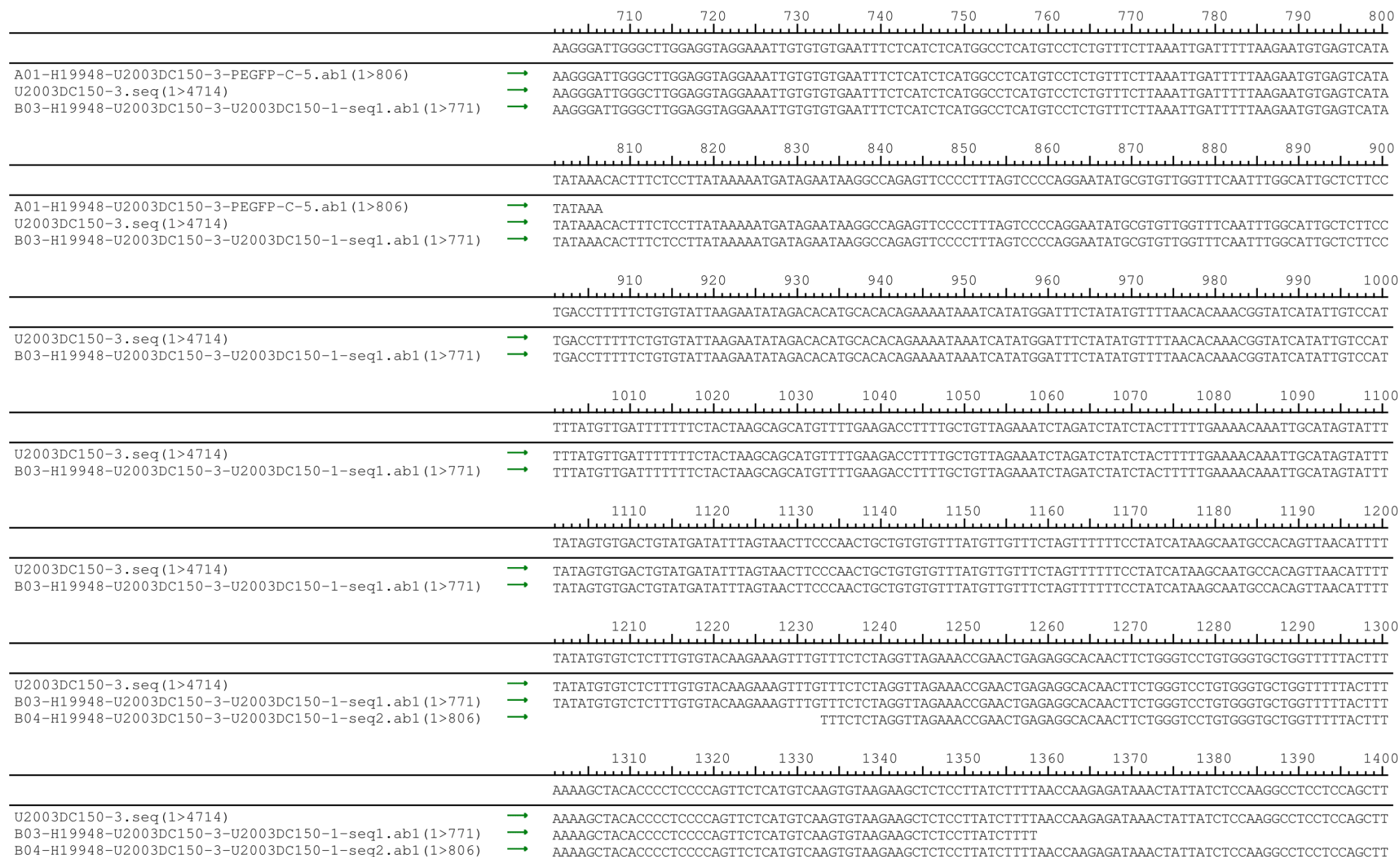
Tel: 1-732-885-9188

Fax: 1-732-210-0262

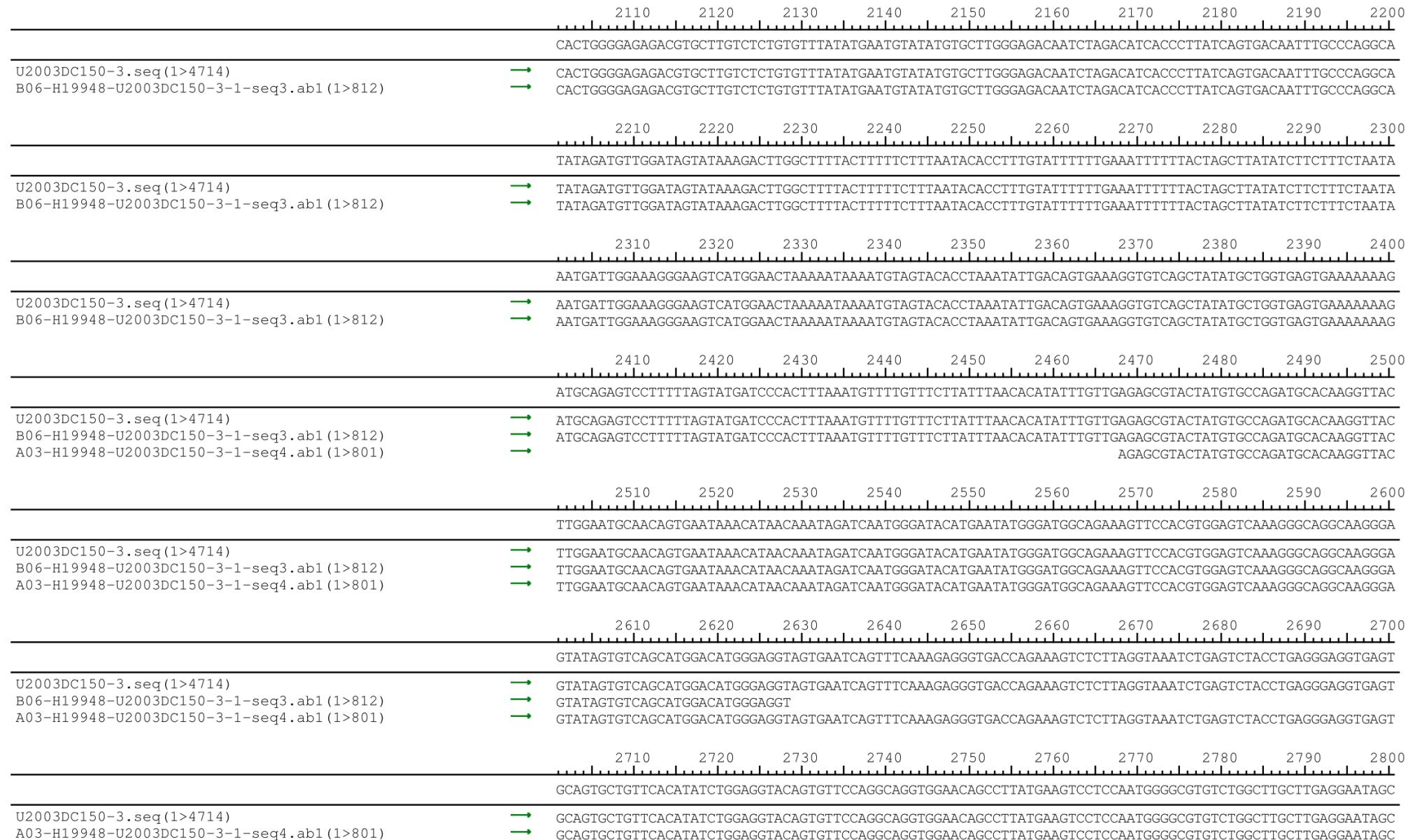
Email: [order@genscript.com](mailto:order@genscript.com)

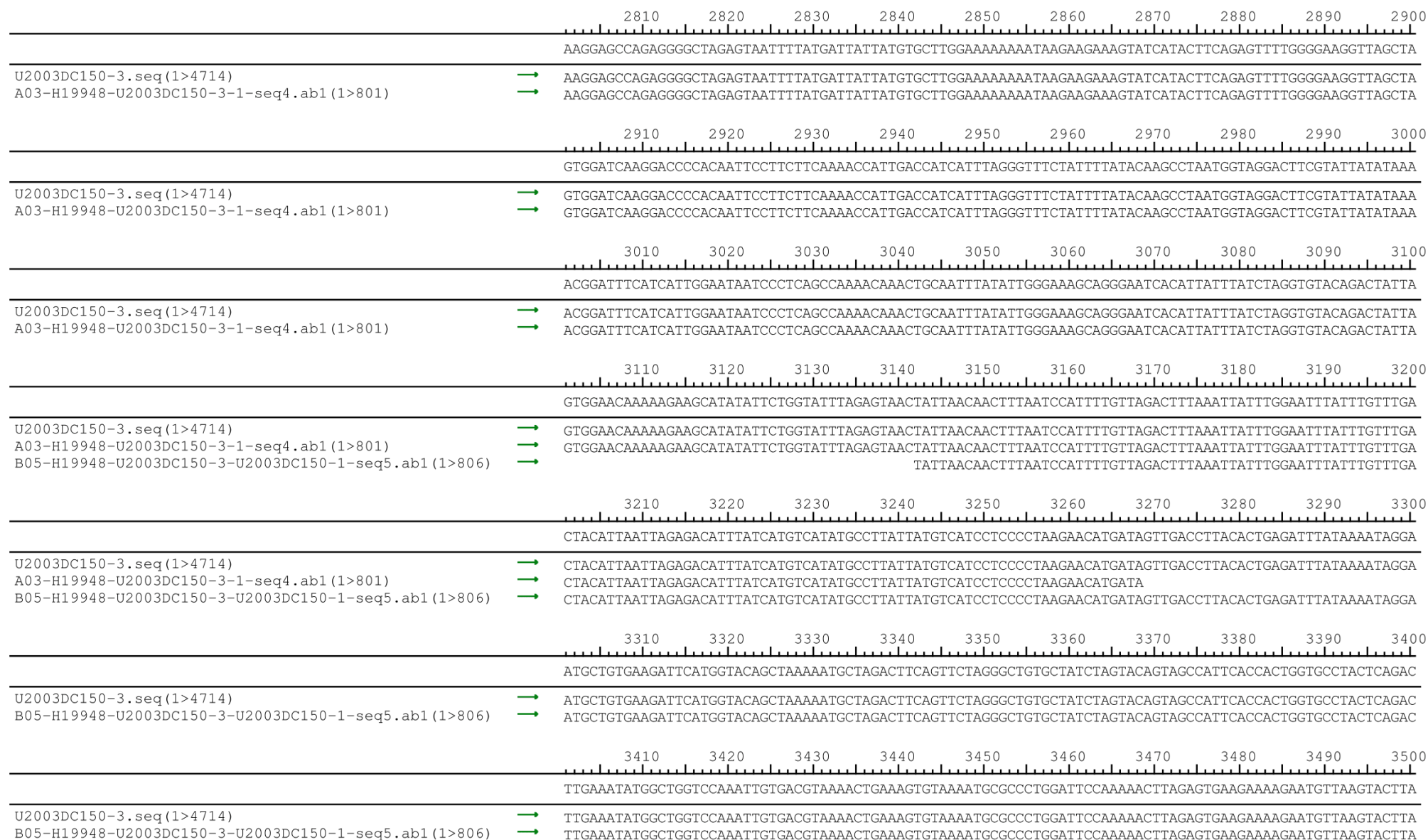
Web: [www.genscript.com](http://www.genscript.com)

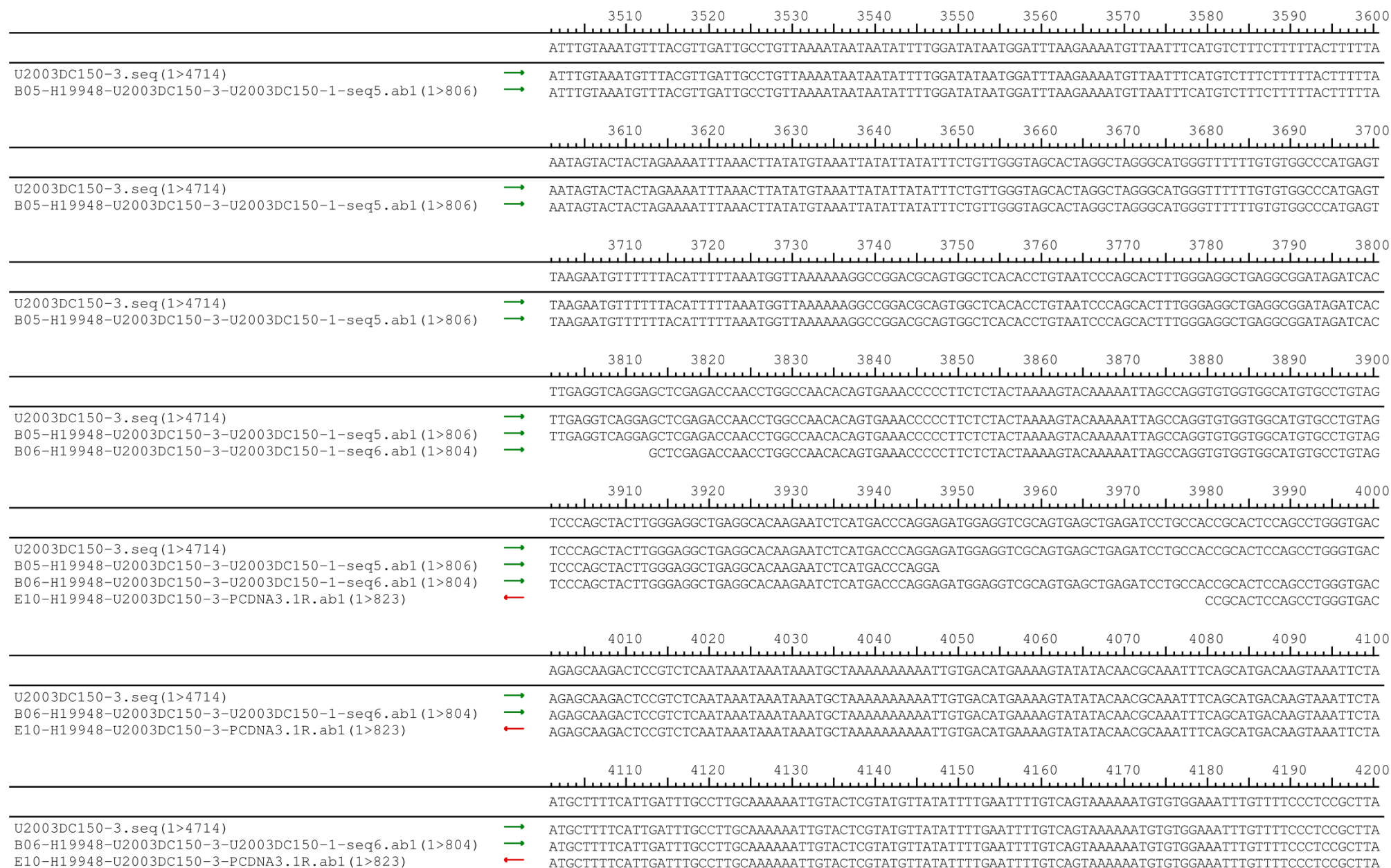


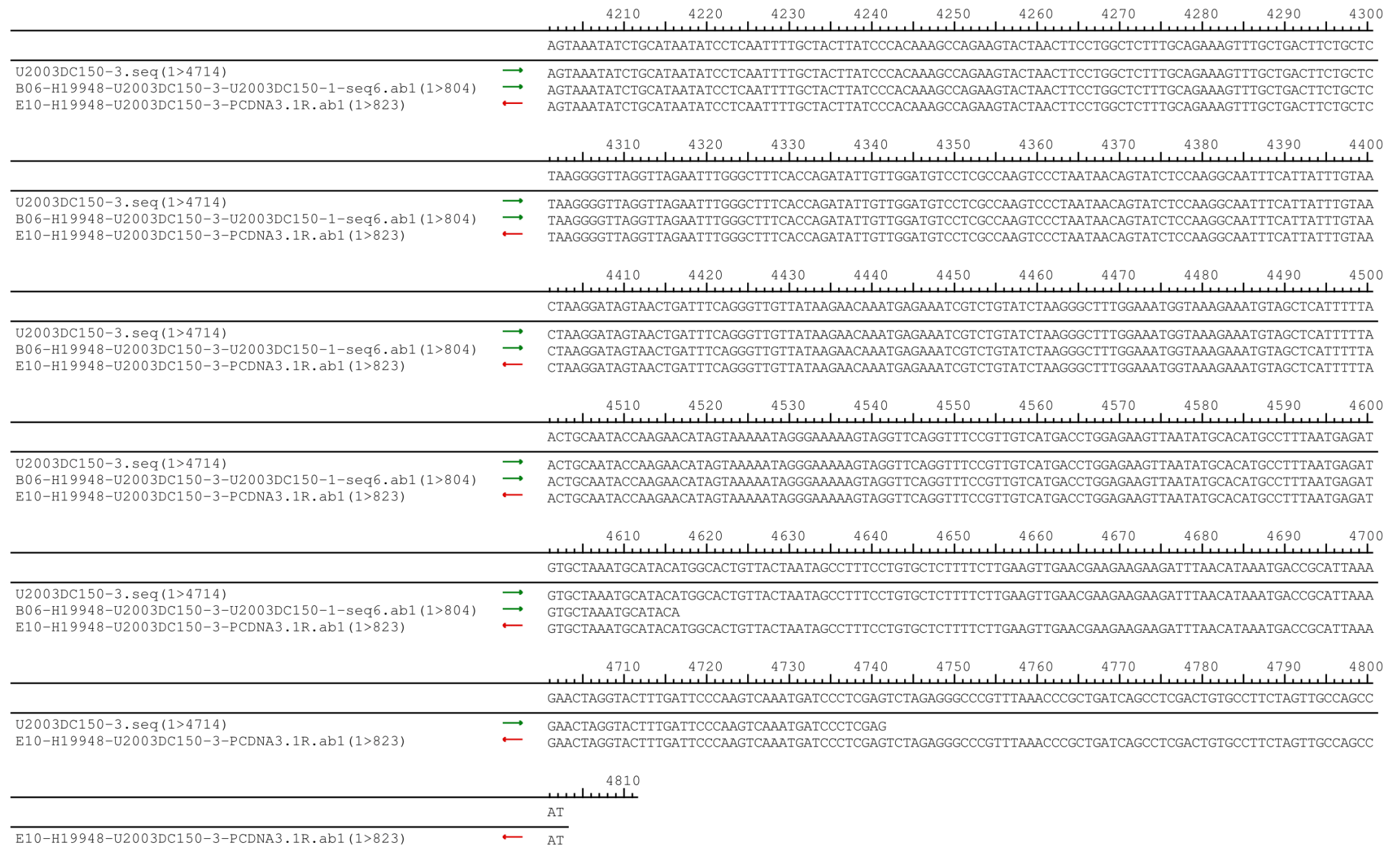






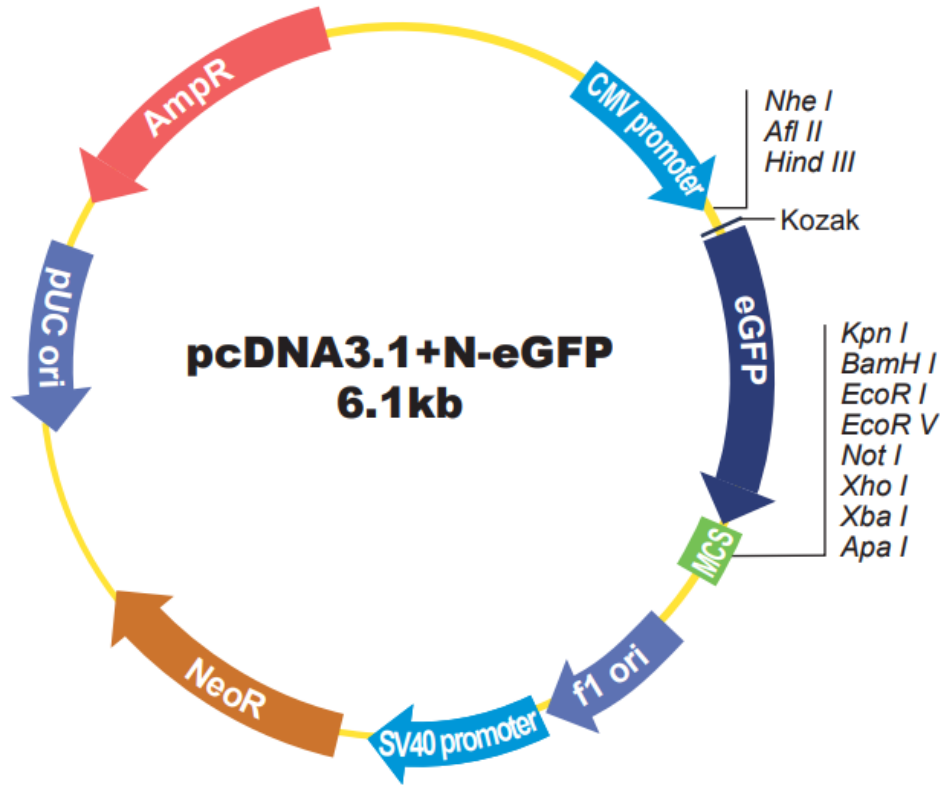






**ANEXO 8**

Vetor de expressão pCDNA3.1+N-eGFP (6.160 pb) (GenScript®)



## ANEXO 9

Distribuição dos 247 pacientes com melanoma cutâneo de acordo com a idade, o sexo, a cor da pele, o fototipo cutâneo, a exposição solar, o tipo de exposição, a queimadura solar e a presença de nevus

Nº	Sigla	Idade	Sexo	Cor da pele	Fototipo cutâneo	Exposição solar	Tipo de exposição	Queimadura solar	Nevos
1	AS	71	M	B	I	Sim	Crônica	Sim	≤ 50
2	AID	76	F	B	I	Sim	Intermitente	Não	≤ 50
3	AC	67	M	NB	IV	Sim	Crônica	Sim	≤ 50
4	BGS	53	M	B	II	Sim	Intermitente	Sim	≤ 50
5	BJBG	79	M	B	III	Sim	Crônica	Não	≤ 50
6	BGL	56	F	B	III	Sim	Crônica	Não	≤ 50
7	CV	47	M	B	I	Sim	Intermitente	Sim	> 50
8	CF	73	M	B	II	Sim	NA	Não	≤ 50
9	DSF	40	F	B	I	Sim	Crônica	Sim	≤ 50
10	EAM	33	F	B	I	NA	NA	NA	NA
11	GMG	30	F	NB	III	Não	Nenhuma	Sim	≤ 50
12	JS	23	F	B	II	Não	Nenhuma	Não	> 50
13	JDJ	63	M	B	I	Sim	Crônica	Sim	> 50
14	LPA	20	F	B	III	Não	Nenhuma	Não	≤ 50
15	MPR	53	F	B	I	Sim	Crônica	Não	≤ 50
16	MPB	81	F	B	III	Sim	Crônica	Não	≤ 50
17	MSBM	35	F	B	II	Sim	Crônica	Sim	≤ 50
18	ORG	76	M	B	I	Sim	Crônica	Não	≤ 50
19	RFG	31	M	B	NA	NA	NA	NA	> 50
20	RCCM	45	F	B	II	Sim	Intermitente	Sim	> 50
21	RLL	50	M	B	III	Sim	Crônica	Sim	≤ 50
22	RRS	64	F	B	III	Sim	Crônica	Sim	≤ 50
23	SQ	32	F	B	NA	NA	NA	NA	≤ 50
24	WC	37	F	B	III	Sim	Crônica	Sim	≤ 50
25	LMS	82	F	B	II	Não	Nenhuma	Não	≤ 50
26	NPJ	37	M	B	II	Sim	Intermitente	Sim	≤ 50

27	MCS	66	M	B	II	Sim	Crônica	Sim	$\leq 50$
28	DCG	68	F	B	III	Não	Nenhuma	Sim	$\leq 50$
29	MIAN	45	F	B	II	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
30	JMP	50	M	B	I	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
31	SML	63	F	B	II	Sim	Crônica	Sim	$\leq 50$
32	CG	54	M	B	II	Sim	Intermitente	Sim	$\leq 50$
33	RS	37	M	B	NA	NA	NA	NA	$\leq 50$
34	MABH	53	F	B	III	Sim	Intermitente	Não	$> 50$
35	JAN	64	M	B	III	Sim	NA	Não	$\leq 50$
36	ABS	67	F	B	NA	NA	NA	NA	NA
37	HB	45	M	NB	IV	Sim	Crônica	Sim	$> 50$
38	AB	71	M	B	III	Sim	Crônica	Sim	$> 50$
39	MAS	72	F	B	NA	Sim	Crônica	NA	NA
40	MRS	70	M	B	I	Sim	Crônica	Sim	$\leq 50$
41	MAAS	46	F	B	I	Não	Nenhuma	Sim	$\leq 50$
42	ZSM	58	F	NB	IV	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
43	IBCP	60	F	B	III	Não	Nenhuma	Sim	$\leq 50$
44	NPPA	37	F	B	II	Sim	Crônica	Sim	$\leq 50$
45	PAV	56	M	B	II	Sim	Crônica	Sim	$> 50$
46	MLBF	68	F	B	NA	NA	NA	NA	$\leq 50$
47	SB	44	M	B	I	Sim	Crônica	Sim	$> 50$
48	JB	64	M	B	III	Sim	Crônica	Sim	$\leq 50$
49	OZ	86	M	B	NA	Sim	NA	NA	$> 50$
50	PLF	32	F	B	III	Sim	Intermitente	Sim	$> 50$
51	LSL	84	F	B	II	Sim	Crônica	Não	$> 50$
52	HCZ	79	F	B	II	Sim	Crônica	Não	$> 50$
53	WC	49	M	B	II	Sim	Crônica	Sim	$\leq 50$
54	AM	66	F	B	I	Sim	Intermitente	Não	$\leq 50$
55	RLAS	42	F	B	III	Sim	NA	Não	$\leq 50$
56	RB	29	F	B	III	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
57	AB	68	M	B	I	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
58	ADCN	55	M	B	NA	Sim	Crônica	NA	$\leq 50$
59	LCSA	52	F	B	II	Não	Nenhuma	Não	$> 50$
60	ACF	62	F	B	III	Sim	Crônica	Sim	$\leq 50$

61	JCM	69	M	B	III	Sim	Intermitente	Não	$\leq 50$
62	LFS	46	F	B	III	Sim	Crônica	Sim	$\leq 50$
63	FC	70	M	B	I	Sim	Crônica	Sim	$> 50$
64	ABM	60	F	B	II	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
65	VLAD	67	F	B	II	Sim	Intermitente	Não	$\leq 50$
66	ALA	46	M	B	III	Sim	Intermitente	Não	$\leq 50$
67	SMN	56	M	B	I	Sim	Crônica	Sim	$\leq 50$
68	WS	74	M	B	II	Sim	NA	NA	$\leq 50$
69	EAM	40	F	B	II	Sim	NA	Sim	$\leq 50$
70	ACM	72	F	B	III	Sim	Crônica	Sim	$\leq 50$
71	BF	55	M	B	III	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
72	PJFO	55	M	B	III	Não	Nenhuma	Sim	$\leq 50$
73	NLDT	25	F	B	III	Sim	NA	Sim	$\leq 50$
74	BJP	66	M	NB	V	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
75	MCCT	40	F	B	NA	Sim	NA	NA	$\leq 50$
76	JBO	79	M	B	III	Sim	Crônica	Sim	$\leq 50$
77	FDC	38	M	B	III	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
78	VSA	48	F	B	III	Sim	NA	Não	$\leq 50$
79	ABG	78	F	B	II	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
80	JGM	63	M	B	III	Sim	Crônica	Sim	$\leq 50$
81	ESA	30	F	B	NA	NA	NA	NA	$\leq 50$
82	RAS	64	M	B	I	Sim	NA	Sim	$\leq 50$
83	GM	68	M	B	III	Sim	Intermitente	Não	$\leq 50$
84	JAS	55	M	B	NA	Sim	Crônica	Sim	$\leq 50$
85	JWF	34	F	B	II	Sim	NA	Sim	$\leq 50$
86	ND	64	M	B	I	Sim	NA	Não	$> 50$
87	PN	73	M	B	III	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
88	AS	47	M	B	III	Sim	Crônica	Sim	$\leq 50$
89	MCBR	56	F	B	I	Não	Nenhuma	Sim	$\leq 50$
90	VJ	52	M	B	II	Sim	Crônica	Sim	$\leq 50$
91	JB	40	M	B	NA	Sim	NA	NA	NA
92	HNO	59	F	B	II	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
93	SRJ	56	M	B	III	Sim	Crônica	Sim	$\leq 50$
94	NA	76	M	B	III	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$

95	LFBS	35	F	B	III	Sim	Intermitente	Não	$\leq 50$
96	LMM	71	F	B	II	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
97	JERS	63	M	B	II	Sim	Intermitente	Sim	$> 50$
98	LRCN	63	M	B	NA	Sim	NA	NA	$\leq 50$
99	AGO	50	M	B	II	Sim	Crônica	Não	$> 50$
100	MF	49	M	B	III	Não	Nenhuma	Sim	$\leq 50$
101	ER	38	M	B	III	Sim	NA	Sim	$\leq 50$
102	JFPO	25	F	B	III	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
103	WJBF	57	M	NB	VI	Não	Nenhuma	Sim	$\leq 50$
104	MEKS	45	F	NB	II	Sim	NA	Sim	$\leq 50$
105	AF	78	M	B	III	Sim	Intermitente	Não	$\leq 50$
106	JCV	49	M	B	III	Sim	Crônica	NA	$\leq 50$
107	IA	67	F	B	II	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
108	MJS	72	M	B	NA	NA	NA	NA	$\leq 50$
109	MC	73	M	B	III	Sim	Intermitente	NA	$\leq 50$
110	APS	78	F	B	III	Sim	Crônica	NA	$\leq 50$
111	AMMT	37	F	B	III	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
112	ICOS	51	F	B	II	Sim	Crônica	Sim	$\leq 50$
113	VP	38	M	B	III	NA	NA	NA	$\leq 50$
114	ST	62	F	NB	VI	Não	Nenhuma	Sim	$\leq 50$
115	BG	88	M	B	I	Sim	Crônica	Sim	$\leq 50$
116	MLAS	42	M	B	II	Sim	Crônica	Sim	$\leq 50$
117	RJG	53	M	B	III	Sim	Intermitente	Sim	$\leq 50$
118	CAB	41	M	B	III	Sim	Crônica	Sim	$> 50$
119	JAM	60	M	B	III	Sim	Crônica	Sim	$> 50$
120	JARJ	43	M	B	II	Sim	Intermitente	Sim	$\leq 50$
121	AMLG	36	F	B	III	Sim	NA	Sim	$\leq 50$
122	LWE	89	F	B	NA	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
123	ETA	46	M	NB	V	Sim	Intermitente	Não	$\leq 50$
124	TMM	24	F	B	II	Sim	Intermitente	Não	$> 50$
125	ML	77	M	B	III	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
126	AAB	59	F	B	II	Sim	NA	Não	$\leq 50$
127	MGB	56	F	B	II	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
128	RBS	25	F	B	III	Não	Nenhuma	Sim	$\leq 50$

129	RAM	26	M	B	II	Sim	Crônica	Sim	$\leq 50$
130	LVCN	37	M	B	I	Sim	Crônica	Sim	$\leq 50$
131	EMC	71	F	B	III	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
132	SLPB	30	F	B	I	Não	Nenhuma	Sim	$\leq 50$
133	AGS	29	M	B	III	Sim	Intermitente	Sim	$\leq 50$
134	AES	75	M	B	II	Sim	Intermitente	Sim	$\leq 50$
135	JCSS	46	M	NB	IV	Sim	Crônica	Sim	NA
136	JCP	51	M	B	I	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
137	GFP	34	M	NB	IV	Sim	Crônica	Sim	$\leq 50$
138	MJC	61	F	B	II	Sim	Crônica	Sim	$\leq 50$
139	FRG	60	F	B	I	Sim	Crônica	Sim	$\leq 50$
140	ERM	58	M	B	II	Não	Nenhuma	Não	$> 50$
141	CET	46	M	B	II	Sim	Intermitente	Sim	$\leq 50$
142	CA	47	M	B	II	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
143	OCA	65	F	B	I	Sim	Crônica	Não	$> 50$
144	AZO	82	F	B	II	Sim	Crônica	Sim	$\leq 50$
145	ACF	73	M	B	I	Sim	Crônica	Sim	$\leq 50$
146	MIG	82	F	B	I	Sim	Crônica	Sim	$\leq 50$
147	DGO	38	M	B	II	Sim	Crônica	Sim	$\leq 50$
148	VRC	44	M	B	I	Sim	Intermitente	Sim	$\leq 50$
149	RAFP	47	F	B	II	Sim	Crônica	Não	$> 50$
150	CRPI	39	F	B	I	Sim	Intermitente	Não	$> 50$
151	ADF	46	M	B	I	Sim	Crônica	Sim	$> 50$
152	MIAT	43	F	B	III	Sim	Intermitente	Sim	$\leq 50$
153	AC	88	M	B	II	Sim	Crônica	Sim	$\leq 50$
154	RMLR	47	F	B	II	Sim	Crônica	Sim	$> 50$
155	FRS	37	M	B	III	Sim	Intermitente	Sim	$\leq 50$
156	RCO	19	M	B	III	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
157	EFS	46	M	B	I	Sim	Crônica	Sim	$\leq 50$
158	BTMS	47	M	B	III	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
159	JBTM	66	M	B	III	Sim	Crônica	Sim	$\leq 50$
160	JBM	30	M	B	II	Não	Nenhuma	Sim	$\leq 50$
161	AMGA	50	F	B	II	Sim	Intermitente	Sim	$> 50$
162	RNB	84	F	B	II	Sim	Crônica	Não	$> 50$

163	AMJP	66	F	B	II	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
164	MMB	32	M	B	II	Sim	Intermitente	Não	$\leq 50$
165	ASL	63	M	B	II	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
166	RABB	37	F	B	II	Sim	Intermitente	Sim	$\leq 50$
167	CLS	71	M	B	II	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
168	MMB	62	M	B	NA	NA	NA	NA	NA
169	LJR	61	M	B	II	Sim	Crônica	Não	$> 50$
170	EPB	71	F	B	I	Sim	Crônica	Sim	$\leq 50$
171	DASA	29	F	B	II	Sim	Intermitente	Sim	$\leq 50$
172	MGM	62	F	B	I	Sim	Crônica	Sim	$\leq 50$
173	EMF	58	M	B	I	Sim	Intermitente	Sim	$\leq 50$
174	EMT	60	F	B	I	Sim	Intermitente	Não	$\leq 50$
175	MCTG	51	F	B	I	Sim	Intermitente	Sim	$\leq 50$
176	AF	86	M	B	II	Sim	NA	Sim	$\leq 50$
177	AAEJ	37	M	B	II	Sim	Intermitente	Sim	$> 50$
178	SBV	32	F	B	II	Sim	Intermitente	Sim	$> 50$
179	TVSM	50	F	B	II	Sim	Crônica	Sim	$\leq 50$
180	IAB	50	M	B	II	Sim	Crônica	Sim	$> 50$
181	ICQM	33	F	B	I	Sim	Crônica	Não	$> 50$
182	FM	31	M	B	I	Sim	Intermitente	Sim	$> 50$
183	AT	49	M	B	II	Sim	Intermitente	Não	$> 50$
184	CB	53	M	B	II	Sim	Intermitente	Não	$\leq 50$
185	JSN	40	F	B	II	Sim	Intermitente	Não	$\leq 50$
186	MADC	63	F	B	I	Sim	Crônica	Sim	$> 50$
187	BABZ	56	F	B	I	Sim	Crônica	Sim	$> 50$
188	WAD	45	M	B	II	Sim	Intermitente	Sim	$> 50$
189	KDP	23	F	B	I	Não	Nenhuma	Sim	$> 50$
190	DBS	75	F	B	II	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
191	AMR	58	F	B	II	Sim	Intermitente	Não	$> 50$
192	LRO	44	M	B	II	Sim	Crônica	Sim	$> 50$
193	FRS	73	M	B	I	Não	Nenhuma	Sim	$> 50$
194	LSS	63	F	B	I	Sim	Crônica	Sim	$> 50$
195	CILP	58	F	B	II	Sim	Crônica	Sim	$\leq 50$
196	TAPB	63	F	B	III	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$

197	EV	56	F	B	I	Sim	Intermitente	Sim	> 50
198	AC	52	M	B	II	Sim	Intermitente	Sim	> 50
199	MAML	89	F	NB	IV	NA	NA	NA	≤ 50
200	WCP	81	M	B	III	Sim	Crônica	Sim	> 50
201	PBL	77	M	B	II	Sim	Crônica	Não	≤ 50
202	MECG	59	F	B	I	Sim	Intermitente	Não	≤ 50
203	MCS	30	M	B	II	Sim	Crônica	Sim	≤ 50
204	AM	73	M	B	II	Não	Nenhuma	Sim	≤ 50
205	EDJGW	65	F	B	II	Sim	Crônica	Sim	≤ 50
206	RF	58	M	B	II	Sim	Intermitente	Sim	> 50
207	LMS	54	M	B	I	Sim	Crônica	Sim	≤ 50
208	EMJ	62	F	B	II	Sim	Crônica	Sim	≤ 50
209	SPM	72	M	B	I	Sim	Intermitente	Sim	> 50
210	CJCN	30	F	B	III	Não	Nenhuma	Não	> 50
211	JVMN	43	M	B	III	Sim	Crônica	Sim	≤ 50
212	AGS	39	M	NB	V	Não	Nenhuma	Não	≤ 50
213	AL	76	M	B	I	Sim	Intermitente	Sim	≤ 50
214	PSJ	38	M	NB	III	Não	Nenhuma	Sim	≤ 50
215	JAM	77	M	B	II	Sim	Crônica	Não	≤ 50
216	RAM	44	M	B	II	Sim	Crônica	Sim	≤ 50
217	JSS	76	M	B	II	Sim	Crônica	Não	≤ 50
218	NCA	68	F	B	I	Sim	Crônica	Sim	≤ 50
219	ERS	55	M	B	II	Sim	Crônica	Sim	≤ 50
220	ARGB	22	M	B	II	Sim	Crônica	Não	≤ 50
221	MFO	94	F	B	II	Sim	Crônica	Não	≤ 50
222	JMFM	55	F	B	I	Sim	Intermitente	Sim	≤ 50
223	JP	46	M	B	I	Sim	Crônica	Sim	≤ 50
224	JAB	57	M	NB	IV	Sim	Crônica	Não	≤ 50
225	SBC	31	F	B	II	Não	Nenhuma	Não	≤ 50
226	IAA	58	M	B	II	Sim	Crônica	Sim	≤ 50
227	LCM	67	M	B	II	Sim	Crônica	Não	> 50
228	ARBS	41	F	B	II	Sim	Crônica	Não	≤ 50
229	LAVV	55	F	B	II	Sim	Crônica	Não	> 50
230	MBA	59	F	B	II	Sim	Crônica	Não	> 50

231	JCS	54	M	B	II	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
232	LMG	40	F	B	I	Sim	Intermitente	Não	$\leq 50$
233	DHS	16	M	B	I	Sim	Intermitente	Sim	$> 50$
234	JGS	81	M	NB	IV	Sim	Crônica	Sim	$\leq 50$
235	SAA	38	F	B	II	Sim	Crônica	Sim	$\leq 50$
236	CW	73	M	B	I	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
237	VLSA	61	F	B	II	Sim	Intermitente	Não	$> 50$
238	MTBB	35	F	B	II	Sim	Intermitente	Sim	$> 50$
239	PGRB	31	F	B	III	Não	Nenhuma	Não	$> 50$
240	CAS	67	M	B	I	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
241	LCV	52	F	B	III	Sim	Crônica	Sim	$\leq 50$
242	LVAA	56	F	B	II	Sim	Intermitente	Sim	$\leq 50$
243	JP	78	F	B	II	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
244	MIBR	67	F	B	I	Sim	Crônica	Sim	$\leq 50$
245	EBB	42	F	B	I	Sim	Intermitente	Sim	$\leq 50$
246	EFS	46	M	B	I	Sim	Crônica	Sim	$\leq 50$
247	LOFS	63	M	B	I	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$

---

(F) Feminino; (M) Masculino; (B) Branca; (NB) Não branca; (NA) Não avaliado

## ANEXO 10

Distribuição dos 247 pacientes com melanoma cutâneo de acordo com a localização primária do tumor, o tipo histológico, a fase de crescimento, a presença de ulceração, o índice de Breslow, o nível de Clark e o estágio clínico ao diagnóstico

Nº	Sigla	Localização primária	Tipo histológico	Fase de crescimento	Ulceração	Índice Breslow	Nível Clark	Estágio clínico
1	AS	T	ES	NA	Não	> 1,5	IV	IIA
2	AID	MS	ES	Horizontal	Sim	≤ 1,5	I	IA
3	AC	CP	N	Vertical	Sim	> 1,5	IV	IIB
4	BGS	MI	ES	Vertical	Sim	> 1,5	V	IIIC
5	BJBG	T	ES	Vertical	Não	> 1,5	IV	IIIC
6	BGL	MS	ES	Horizontal	Não	≤ 1,5	I	in situ
7	CV	MI	N	Vertical	Não	> 1,5	III	IIIA
8	CF	MS	ES	Vertical	Não	≤ 1,5	II	IA
9	DSF	T	N	NA	Sim	> 1,5	II	IIB
10	EAM	MS	NA	Vertical	Não	NA	III	IIA
11	GMG	MS	N	Vertical	Não	≤ 1,5	IV	IB
12	JS	MS	ES	NA	Não	≤ 1,5	III	IA
13	JDJ	T	ES	Vertical	Sim	≤ 1,5	III	IB
14	LPA	MI	ES	Vertical	Não	≤ 1,5	II	IA
15	MPR	MS	LM	Vertical	Não	> 1,5	IV	IIB
16	MPB	T	LM	Vertical	Não	≤ 1,5	II	IA
17	MSBM	MI	N	Vertical	Sim	> 1,5	III	IIA
18	ORG	CP	LM	NA	Não	≤ 1,5	II	IA
19	RFG	T	ES	Horizontal	Não	≤ 1,5	IV	IB
20	RCCM	T	ES	Horizontal	Não	≤ 1,5	II	IA
21	RLL	T	ES	Horizontal	Não	≤ 1,5	II	IA
22	RRS	MI	ES	Horizontal	Não	≤ 1,5	III	IB
23	SQ	T	ES	Vertical	Não	≤ 1,5	III	IA
24	WC	T	ES	Vertical	Sim	> 1,5	IV	IIB
25	LMS	CP	ES	Vertical	Não	≤ 1,5	III	IA

26	NPJ	MS	ES	Vertical	Não	$\leq 1,5$	III	IA
27	MCS	T	LM	Horizontal	Não	$\leq 1,5$	I	in situ
28	DCG	MS	N	Vertical	Sim	$> 1,5$	IV	IB
29	MIAN	T	ES	Vertical	Não	$> 1,5$	IV	IIB
30	JMP	T	ES	Vertical	Não	$\leq 1,5$	III	IA
31	SML	MI	ES	Vertical	Não	$> 1,5$	IV	IIA
32	CG	T	ES	Horizontal	Não	$\leq 1,5$	I	in situ
33	RS	MS	N	NA	Sim	$> 1,5$	IV	IIIB
34	MABH	MS	ES	NA	Não	$\leq 1,5$	II	IA
35	JAN	CP	LM	NA	Não	$\leq 1,5$	I	in situ
36	ABS	T	N	Vertical	Sim	$> 1,5$	IV	IIC
37	HB	T	N	Vertical	Não	$> 1,5$	IV	IIC
38	AB	T	N	Vertical	Sim	$> 1,5$	IV	IIIC
39	MAS	T	ES	NA	Não	$\leq 1,5$	I	in situ
40	MRS	T	LM	NA	Não	$\leq 1,5$	I	in situ
41	MAAS	MS	ES	Horizontal	Não	$\leq 1,5$	II	IA
42	ZSM	T	N	Vertical	Sim	$\leq 1,5$	III	IIA
43	IBCP	CP	N	Vertical	Sim	$> 1,5$	IV	IIA
44	NPPA	T	ES	Vertical	Não	$\leq 1,5$	II	IA
45	PAV	T	ES	Vertical	Não	$\leq 1,5$	III	IA
46	MLBF	T	ES	Vertical	NA	$\leq 1,5$	II	IA
47	SB	T	ES	Vertical	Não	$\leq 1,5$	II	IA
48	JB	CP	NA	NA	Não	$\leq 1,5$	I	in situ
49	OZ	CP	LM	Vertical	Sim	$> 1,5$	V	IIC
50	PLF	T	N	Vertical	Sim	$> 1,5$	IV	IIB
51	LSL	T	N	NA	Não	$> 1,5$	III	IB
52	HCZ	CP	N	Vertical	Não	$\leq 1,5$	III	IA
53	WC	CP	ES	Vertical	Não	$\leq 1,5$	II	IA
54	AM	CP	ES	Horizontal	Não	$\leq 1,5$	I	in situ
55	RLAS	T	ES	Vertical	Sim	$> 1,5$	III	IIC
56	RB	T	N	Vertical	Sim	$> 1,5$	IV	IIC
57	AB	CP	NA	Vertical	Sim	$> 1,5$	V	IIC
58	ADCN	CP	ES	Horizontal	Não	$\leq 1,5$	II	IA
59	LCSA	MI	ES	Horizontal	Não	$\leq 1,5$	II	IA

60	ACF	MI	ES	Horizontal	Não	$\leq 1,5$	II	IA
61	JCM	T	ES	Horizontal	Não	$\leq 1,5$	I	in situ
62	LFS	MI	ES	Horizontal	Não	$\leq 1,5$	I	in situ
63	FC	T	NA	NA	Não	$\leq 1,5$	III	IA
64	ABM	MI	N	Vertical	Sim	$> 1,5$	IV	IIB
65	VLAD	MI	ES	Horizontal	Não	$\leq 1,5$	II	in situ
66	ALA	T	N	NA	Sim	$\leq 1,5$	IV	IIA
67	SMN	CP	ES	NA	Sim	$\leq 1,5$	III	IA
68	WS	T	LM	Horizontal	Não	$\leq 1,5$	I	in situ
69	EAM	MI	ES	Vertical	Não	$\leq 1,5$	III	IA
70	ACM	MI	N	Vertical	Sim	$> 1,5$	III	IIB
71	BF	T	N	Vertical	Sim	$> 1,5$	III	IIC
72	PJFO	CP	NA	NA	Não	$> 1,5$	IV	IIB
73	NLDT	MI	NA	NA	NA	$> 1,5$	III	IIIB
74	BJP	T	NA	NA	NA	NA	NA	IIB
75	MCCT	MI	ES	Vertical	Não	$\leq 1,5$	II	IA
76	JBO	CP	N	NA	Sim	$> 1,5$	IV	IIC
77	FDC	MI	NA	NA	NA	$\leq 1,5$	III	IIIA
78	VSA	T	NA	NA	NA	$> 1,5$	III	IIB
79	ABG	T	ES	Vertical	Sim	$> 1,5$	IV	IIIC
80	JGM	T	N	Vertical	Sim	NA	NA	IV
81	ESA	T	ES	Horizontal	Não	$\leq 1,5$	II	IA
82	RAS	MS	NA	NA	NA	$> 1,5$	IV	IIB
83	GM	T	ES	Vertical	Não	$\leq 1,5$	III	IIIA
84	JAS	T	N	Vertical	Sim	$> 1,5$	III	IIB
85	JWF	T	NA	NA	NA	$\leq 1,5$	III	IA
86	ND	MS	NA	NA	NA	$> 1,5$	IV	IIB
87	PN	T	N	Vertical	Não	$> 1,5$	IV	IIIC
88	AS	MI	ES	Vertical	Não	$\leq 1,5$	IV	IA
89	MCBR	T	N	Vertical	Não	$> 1,5$	IV	IB
90	VJ	T	ES	Vertical	Não	$\leq 1,5$	III	IA
91	JB	T	NA	NA	Não	$> 1,5$	IV	IIA
92	HNO	MI	LM	NA	Não	$> 1,5$	IV	IIA
93	SRJ	T	ES	Vertical	Não	$\leq 1,5$	II	IA

94	NA	MS	N	Horizontal	Sim	> 1,5	III	IIC
95	LFBS	CP	ES	Vertical	Não	> 1,5	IV	IIA
96	LMM	T	N	NA	Não	> 1,5	IV	IIB
97	JERS	T	ES	Vertical	Sim	> 1,5	IV	IIC
98	LRCN	T	N	Horizontal	Não	> 1,5	IV	IIIC
99	AGO	T	N	Vertical	Sim	> 1,5	IV	IV
100	MF	T	NA	NA	NA	> 1,5	IV	IIIA
101	ER	CP	NA	NA	NA	> 1,5	NA	IIB
102	JFPO	T	NA	NA	NA	≤ 1,5	III	IIB
103	WJBF	MI	NA	NA	NA	≤ 1,5	III	IIIC
104	MEKS	MI	NA	NA	NA	> 1,5	III	IIIB
105	AF	CP	N	NA	Sim	> 1,5	IV	IIC
106	JCV	T	N	Vertical	Não	> 1,5	III	IIA
107	IA	MS	LM	Horizontal	Não	≤ 1,5	II	IA
108	MJS	T	ES	Vertical	Não	≤ 1,5	III	IB
109	MC	T	ES	Vertical	Não	> 1,5	III	IIA
110	APS	MI	LM	NA	Sim	> 1,5	V	IIC
111	AMMT	MS	ES	Horizontal	Não	≤ 1,5	III	IA
112	ICOS	MS	ES	Vertical	Não	> 1,5	IV	IIA
113	VP	MI	NA	NA	NA	≤ 1,5	III	IB
114	ST	T	NA	NA	NA	> 1,5	III	IIIB
115	BG	T	N	Vertical	Sim	> 1,5	IV	IIC
116	MLAS	MS	LM	NA	Sim	≤ 1,5	IV	IIA
117	RJG	T	ES	Vertical	Não	≤ 1,5	II	IA
118	CAB	MS	ES	Vertical	Não	≤ 1,5	IV	IB
119	JAM	MS	LM	Vertical	Não	≤ 1,5	IV	IB
120	JARJ	MS	ES	Horizontal	Não	≤ 1,5	I	IB
121	AMLG	T	ES	Vertical	Não	≤ 1,5	IV	IB
122	LWE	CP	LM	Horizontal	Não	≤ 1,5	I	in situ
123	ETA	T	N	NA	Sim	> 1,5	IV	IIIB
124	TMM	CP	ES	Vertical	Sim	> 1,5	III	IIC
125	ML	CP	LM	Horizontal	Não	≤ 1,5	I	in situ
126	AAB	MI	ES	Vertical	Sim	> 1,5	IV	IIA
127	MGB	T	ES	Vertical	NA	≤ 1,5	II	IA

128	RBS	MS	N	Vertical	Sim	> 1,5	III	IIIB
129	RAM	CP	N	Vertical	Sim	> 1,5	IV	IIIC
130	LVCN	MS	NA	Vertical	Sim	NA	IV	IV
131	EMC	T	ES	Vertical	Não	> 1,5	IV	IIB
132	SLPB	CP	N	Vertical	Não	> 1,5	IV	IIIC
133	AGS	MI	NA	NA	Sim	NA	NA	IIC
134	AES	CP	ES	Vertical	Sim	> 1,5	IV	IV
135	JCSS	T	NA	NA	NA	NA	NA	IIB
136	JCP	MI	NA	NA	NA	NA	NA	IIB
137	GFP	MI	NA	NA	NA	NA	NA	IV
138	MJC	MS	N	Vertical	Sim	> 1,5	IV	IIC
139	FRG	MS	ES	Vertical	Não	≤ 1,5	III	IB
140	ERM	CP	N	Vertical	Sim	> 1,5	III	IIC
141	CET	T	ES	Vertical	Não	≤ 1,5	IV	IIIA
142	CA	T	N	NA	Sim	> 1,5	IV	IIC
143	OCA	MS	ES	Vertical	Não	≤ 1,5	III	IB
144	AZO	MI	NA	Vertical	Sim	> 1,5	IV	IV
145	ACF	CP	N	NA	Sim	> 1,5	IV	IIC
146	MIG	T	N	Vertical	Sim	> 1,5	IV	IIIC
147	DGO	T	ES	Vertical	Não	> 1,5	III	IB
148	VRC	T	N	Vertical	Sim	> 1,5	IV	IIB
149	RAFP	T	ES	Vertical	Não	> 1,5	III	IIIC
150	CRPI	MI	ES	NA	Não	≤ 1,5	II	IA
151	ADF	T	ES	Vertical	Não	≤ 1,5	III	IA
152	MIAT	T	ES	Vertical	Não	≤ 1,5	II	IA
153	AC	CP	LM	Vertical	Não	> 1,5	IV	IIA
154	RMLR	MS	ES	Vertical	Não	≤ 1,5	II	IA
155	FRS	T	ES	Horizontal	Não	≤ 1,5	II	IA
156	RCO	CP	NA	Horizontal	Não	≤ 1,5	I	in situ
157	EFS	CP	ES	Horizontal	Não	≤ 1,5	I	in situ
158	BTMS	T	NA	NA	NA	NA	III	NA
159	JBTM	CP	LM	Vertical	Sim	≤ 1,5	IV	IB
160	JBM	MS	ES	Horizontal	Não	≤ 1,5	II	IA
161	AMGA	MS	ES	NA	Não	≤ 1,5	I	in situ

162	RNB	MI	N	Vertical	Sim	> 1,5	III	IIC
163	AMJP	CP	LM	Vertical	Não	≤ 1,5	II	IA
164	MMB	T	ES	Vertical	Não	≤ 1,5	III	IA
165	ASL	T	ES	Vertical	Sim	> 1,5	IV	IIIC
166	RABB	MS	ES	Horizontal	Não	≤ 1,5	II	IA
167	CLS	CP	LM	Horizontal	Não	≤ 1,5	I	in situ
168	MMB	T	N	Vertical	Sim	> 1,5	IV	IIC
169	LJR	T	N	NA	Sim	> 1,5	IV	IIB
170	EPB	T	N	Vertical	Sim	> 1,5	IV	IIC
171	DASA	CP	ES	Horizontal	Não	NA	NA	NA
172	MGM	MI	ES	Horizontal	Não	≤ 1,5	I	in situ
173	EMF	MI	ES	Vertical	Não	≤ 1,5	III	IA
174	EMT	MI	N	Vertical	Não	> 1,5	IV	IIB
175	MCTG	T	ES	Vertical	Não	≤ 1,5	IV	IA
176	AF	T	N	NA	Não	> 1,5	IV	IIA
177	AAEJ	T	ES	Horizontal	Não	≤ 1,5	I	in situ
178	SBV	T	ES	NA	NA	≤ 1,5	III	IA
179	TVSM	T	N	Vertical	Sim	> 1,5	V	IIC
180	IAB	T	ES	Horizontal	Não	≤ 1,5	I	in situ
181	ICQM	MI	ES	Vertical	Não	≤ 1,5	III	IA
182	FM	T	ES	Vertical	Não	≤ 1,5	III	IB
183	AT	T	LM	Vertical	NA	> 1,5	II	IIC
184	CB	T	N	Vertical	Sim	> 1,5	IV	IIIC
185	JSN	T	ES	Vertical	Não	≤ 1,5	IV	IA
186	MADC	CP	ES	Vertical	Não	≤ 1,5	II	IA
187	BABZ	MI	ES	Vertical	Não	≤ 1,5	IV	IB
188	WAD	T	N	Vertical	Sim	> 1,5	IV	IIC
189	KDP	T	ES	Vertical	Não	≤ 1,5	III	IA
190	DBS	T	LM	Horizontal	Não	≤ 1,5	II	IA
191	AMR	T	ES	Vertical	Não	≤ 1,5	III	IA
192	LRO	T	N	Vertical	Sim	> 1,5	III	IIB
193	FRS	MS	ES	Horizontal	Não	≤ 1,5	II	IA
194	LSS	MI	ES	Vertical	Não	> 1,5	IV	IIIB
195	CILP	MI	ES	Horizontal	Não	> 1,5	II	IIA

196	TAPB	MS	LM	Vertical	Não	$\leq 1,5$	III	IA
197	EV	CP	ES	Horizontal	Não	$\leq 1,5$	II	IA
198	AC	T	ES	Vertical	Não	$> 1,5$	IV	IB
199	MAML	CP	N	Vertical	Sim	$\leq 1,5$	IV	IIC
200	WCP	MS	N	Vertical	Sim	$> 1,5$	V	IIIC
201	PBL	T	ES	Vertical	Sim	$> 1,5$	IV	IIC
202	MECG	MS	ES	Horizontal	Não	$\leq 1,5$	II	IA
203	MCS	T	ES	Horizontal	Não	$\leq 1,5$	I	in situ
204	AM	CP	N	NA	Sim	$> 1,5$	II	IIA
205	EDJGW	T	N	Vertical	Sim	$> 1,5$	IV	IIC
206	RF	T	ES	Vertical	Sim	$> 1,5$	IV	IIC
207	LMS	T	ES	Vertical	Não	$\leq 1,5$	III	IA
208	EMJ	T	ES	Horizontal	Não	$\leq 1,5$	II	IA
209	SPM	CP	ES	Vertical	Não	$\leq 1,5$	IV	IB
210	CJCN	T	ES	Vertical	Não	$> 1,5$	IV	IB
211	JVMN	T	ES	Horizontal	Não	$\leq 1,5$	I	in situ
212	AGS	MI	ES	Vertical	Sim	$> 1,5$	IV	IIC
213	AL	T	NA	NA	NA	NA	NA	IIC
214	PSJ	MI	ES	Horizontal	Sim	$> 1,5$	III	IV
215	JAM	CP	LM	Vertical	Sim	$> 1,5$	IV	IIC
216	RAM	T	ES	Vertical	Não	$> 1,5$	IV	IIB
217	JSS	CP	NA	Vertical	Sim	NA	NA	IIIC
218	NCA	MI	NA	Vertical	Sim	$> 1,5$	IV	IIA
219	ERS	MS	NA	NA	NA	NA	NA	IV
220	ARGB	MS	ES	Vertical	Sim	$\leq 1,5$	IV	IA
221	MFO	T	N	Vertical	Sim	$> 1,5$	IV	IIC
222	JMFM	T	ES	Vertical	Sim	$> 1,5$	IV	NA
223	JP	MS	N	Vertical	Sim	$> 1,5$	IV	IIC
224	JAB	CP	ES	Horizontal	Não	$\leq 1,5$	I	in situ
225	SBC	MI	ES	Horizontal	Não	$\leq 1,5$	I	in situ
226	IAA	T	NA	NA	Não	$\leq 1,5$	II	IA
227	LCM	T	N	Vertical	Sim	$> 1,5$	V	IV
228	ARBS	T	ES	Horizontal	Não	$\leq 1,5$	II	IA
229	LAVV	T	ES	Vertical	Não	$\leq 1,5$	IV	IB

230	MBA	T	NA	Vertical	Sim	> 1,5	IV	IV
231	JCS	MI	N	Vertical	Sim	> 1,5	IV	IV
232	LMG	CP	NA	NA	NA	NA	NA	IIB
233	DHS	CP	ES	Horizontal	Não	$\leq 1,5$	I	in situ
234	JGS	CP	NA	Horizontal	Não	$\leq 1,5$	I	in situ
235	SAA	T	ES	Vertical	Não	> 1,5	III	IB
236	CW	T	LM	Vertical	Sim	$\leq 1,5$	III	IA
237	VLSA	T	ES	Vertical	Não	$\leq 1,5$	IV	IA
238	MTBB	MS	NA	Vertical	NA	> 1,5	IV	IIB
239	PGRB	T	ES	Vertical	Não	$\leq 1,5$	IV	IB
240	CAS	MS	N	Vertical	Sim	> 1,5	IV	IIC
241	LCV	T	N	Vertical	Sim	> 1,5	IV	IV
242	LVAA	MI	NA	Horizontal	Não	$\leq 1,5$	I	in situ
243	JP	CP	LM	Horizontal	Não	$\leq 1,5$	II	IA
244	MIBR	MI	N	Vertical	Sim	> 1,5	V	IIC
245	EBB	T	ES	Vertical	Não	> 1,5	IV	IB
246	EFS	CP	NA	Horizontal	Não	$\leq 1,5$	I	in situ
247	LOFS	T	LM	Horizontal	Não	$\leq 1,5$	I	in situ

---

(CP) Cabeça ou pescoço; (MS) Membro superior; (MI) Membro inferior; (T) Tronco; (ES) Extensivo superficial; (LM) Lentigo maligna; (N) Nodular; (NA) Não avaliado

## ANEXO 11

Distribuição dos 247 pacientes com melanoma cutâneo de acordo com os genótipos da variante *MITF* rs7623610

Nº	Sigla	SNV <i>MITF</i> rs7623610
1	AS	GG
2	AID	GA
3	AC	GA
4	BGS	AA
5	BJBG	GA
6	BGL	GG
7	CV	AA
8	CF	AA
9	DSF	AA
10	EAM	GA
11	GMG	GA
12	JS	GA
13	JDJ	AA
14	LPA	GG
15	MPR	GA
16	MPB	GG
17	MSBM	GG
18	ORG	GA
19	RFG	GG
20	RCCM	GA
21	RLL	GA
22	RRS	GA
23	SQ	GA
24	WC	GG
25	LMS	GA
26	NPJ	GG
27	MCS	GG

28	DCG	GG
29	MIAN	GG
30	JMP	GA
31	SML	GA
32	CG	GA
33	RS	AA
34	MABH	GG
35	JAN	GA
36	ABS	GA
37	HB	GG
38	AB	AA
39	MAS	GA
40	MRS	GG
41	MAAS	AA
42	ZSM	AA
43	IBCP	GA
44	NPPA	AA
45	PAV	GA
46	MLBF	AA
47	SB	GA
48	JB	GA
49	OZ	AA
50	PLF	GA
51	LSL	AA
52	HCZ	GA
53	WC	GG
54	AM	GA
55	RLAS	AA
56	RB	GA
57	AB	GG
58	ADCN	GG
59	LCSA	GG
60	ACF	AA
61	JCM	GA

62	LFS	AA
63	FC	GG
64	ABM	AA
65	VLAD	AA
66	ALA	GA
67	SMN	GA
68	WS	AA
69	EAM	AA
70	ACM	GG
71	BF	GA
72	PJFO	GA
73	NLDT	GA
74	BJP	AA
75	MCCT	GA
76	JBO	GA
77	FDC	GG
78	VSA	GA
79	ABG	GA
80	JGM	AA
81	ESA	GA
82	RAS	AA
83	GM	GA
84	JAS	AA
85	JWF	GA
86	ND	GG
87	PN	AA
88	AS	GA
89	MCBR	AA
90	VJ	GA
91	JB	GA
92	HNO	AA
93	SRJ	AA
94	NA	AA
95	LFBS	GA

96	LMM	GG
97	JERS	GA
98	LRCN	GA
99	AGO	AA
100	MF	AA
101	ER	GG
102	JFPO	GG
103	WJBF	GA
104	MEKS	GA
105	AF	GA
106	JCV	GA
107	IA	AA
108	MJS	GG
109	MC	GA
110	APS	GA
111	AMMT	GA
112	ICOS	AA
113	VP	GA
114	ST	GG
115	BG	GA
116	MLAS	GA
117	RJG	AA
118	CAB	GG
119	JAM	GA
120	JARJ	GG
121	AMLG	GA
122	LWE	GG
123	ETA	GA
124	TMM	GA
125	ML	GG
126	AAB	GA
127	MGB	AA
128	RBS	AA
129	RAM	AA

130	LVCN	GA
131	EMC	GA
132	SLPB	GG
133	AGS	GA
134	AES	GA
135	JCSS	GG
136	JCP	GA
137	GFP	GG
138	MJC	GA
139	FRG	AA
140	ERM	AA
141	CET	GA
142	CA	AA
143	OCA	GG
144	AZO	AA
145	ACF	GA
146	MIG	AA
147	DGO	GG
148	VRC	GG
149	RAFP	GG
150	CRPI	GG
151	ADF	GG
152	MIAT	GA
153	AC	GA
154	RMLR	GA
155	FRS	GG
156	RCO	GA
157	EFS	AA
158	BTMS	GG
159	JBTM	AA
160	JBM	GG
161	AMGA	GA
162	RNB	GA
163	AMJP	GA

164	MMB	GA
165	ASL	AA
166	RABB	AA
167	CLS	GA
168	MMB	GG
169	LJR	GA
170	EPB	GA
171	DASA	GG
172	MGM	AA
173	EMF	GA
174	EMT	GA
175	MCTG	GG
176	AF	AA
177	AAEJ	GA
178	SBV	GA
179	TVSM	AA
180	IAB	GA
181	ICQM	AA
182	FM	AA
183	AT	GG
184	CB	GA
185	JSN	GG
186	MADC	AA
187	BABZ	GA
188	WAD	GA
189	KDP	GG
190	DBS	GA
191	AMR	GA
192	LRO	GG
193	FRS	GG
194	LSS	AA
195	CILP	GG
196	TAPB	GA
197	EV	GA

198	AC	GA
199	MAML	GG
200	WCP	GA
201	PBL	GG
202	MECG	AA
203	MCS	GG
204	AM	GG
205	EDJGW	GA
206	RF	GG
207	LMS	AA
208	EMJ	GG
209	SPM	AA
210	CJCN	AA
211	JVMN	GA
212	AGS	AA
213	AL	AA
214	PSJ	AA
215	JAM	GA
216	RAM	GG
217	JSS	AA
218	NCA	GA
219	ERS	AA
220	ARGB	AA
221	MFO	GG
222	JMFM	GG
223	JP	GG
224	JAB	GG
225	SBC	GA
226	IAA	GA
227	LCM	GA
228	ARBS	GA
229	LAVV	GA
230	MBA	AA
231	JCS	GA

232	LMG	GG
233	DHS	GG
234	JGS	GG
235	SAA	GG
236	CW	GA
237	VLSA	GG
238	MTBB	GG
239	PGRB	GA
240	CAS	GA
241	LCV	GG
242	LVAA	GG
243	JP	AA
244	MIBR	AA
245	EBB	AA
246	EFS	AA
247	LOFS	AA

---

(SNV) variante de base única

## ANEXO 12

Distribuição dos 280 controles de acordo com a idade, o sexo, a cor da pele, o fototipo cutâneo, a exposição solar, o tipo de exposição, a queimadura solar e a presença de nevus

Nº	Sigla	Idade	Sexo	Cor da pele	Fototipo cutâneo	Exposição solar	Tipo de exposição	Queimadura solar	Nevus
1	VAMMS	50	F	B	III	Não	Nenhuma	Não	> 50
2	ROF	56	M	B	II	Sim	Crônica	Sim	≤ 50
3	LLAS	57	F	B	II	Não	Nenhuma	Não	≤ 50
4	JFA	54	M	B	I	Não	Nenhuma	Não	≤ 50
5	SEP	51	F	B	III	Não	Nenhuma	Sim	≤ 50
6	PRS	55	M	B	I	Não	Nenhuma	Não	≤ 50
7	SMCM	51	F	B	II	Não	Nenhuma	Não	≤ 50
8	CAM	49	M	B	I	Não	Nenhuma	Sim	≤ 50
9	LCFC	47	M	B	I	Não	Nenhuma	Sim	> 50
10	MFSP	49	F	B	I	Não	Nenhuma	Não	≤ 50
11	LBP	53	M	B	II	Sim	Crônica	Sim	≤ 50
12	ASN	67	M	B	III	Sim	Intermitente	Sim	≤ 50
13	DF	53	M	NB	IV	Sim	Crônica	Não	≤ 50
14	LAC	38	F	B	I	Não	Nenhuma	Não	≤ 50
15	VJB	50	M	B	III	Não	Nenhuma	Não	≤ 50
16	JS	55	M	B	I	Sim	Crônica	Não	≤ 50
17	JAR	61	M	B	I	Não	Nenhuma	Não	NA
18	JCA	51	F	B	I	Sim	Intermitente	Não	≤ 50
19	JBR	47	M	B	I	Sim	Crônica	Sim	≤ 50
20	LCCS	47	M	B	III	Sim	Intermitente	Não	≤ 50

21	VCV	51	F	NB	IV	Sim	Intermitente	Não	NA
22	MAT	54	M	B	III	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
23	JSS	59	M	B	II	Sim	Intermitente	Sim	$\leq 50$
24	JLR	47	M	B	II	Sim	Intermitente	Não	$\leq 50$
25	AAS	50	M	NB	III	Sim	Crônica	Sim	$\leq 50$
26	IAPM	50	F	B	II	Sim	Intermitente	Não	$\leq 50$
27	EAR	47	M	B	I	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
28	FCM	33	F	B	I	Sim	Intermitente	Não	$\leq 50$
29	RCM	33	F	B	III	Sim	Intermitente	Não	NA
30	DCA	38	F	B	III	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
31	MCR	48	F	B	II	Não	Nenhuma	Não	$> 50$
32	VDG	50	M	B	III	Não	Nenhuma	Não	NA
33	SCJ	57	M	B	I	Sim	Crônica	Não	NA
34	PPS	54	M	B	III	Não	Nenhuma	Não	NA
35	MAPF	57	F	NB	VI	Não	Nenhuma	Sim	NA
36	AECB	51	F	B	III	Sim	Intermitente	Não	NA
37	MCG	44	F	B	II	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
38	CAM	53	M	B	II	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
39	CAGV	56	F	B	II	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
40	MAP	47	M	B	III	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
41	AAS	53	M	NB	V	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
42	MRQ	53	F	B	I	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
43	JLB	53	M	B	II	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
44	LRP	47	M	B	II	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
45	FRD	37	F	B	III	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
46	SLB	49	M	B	III	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$

47	VB	47	M	B	II	Não	Nenhuma	Sim	$\leq 50$
48	SCM	38	F	NB	V	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
49	MCD	53	F	B	II	Sim	Intermitente	Sim	$\leq 50$
50	IV	59	F	B	I	Não	Nenhuma	Sim	$\leq 50$
51	MMR	58	M	B	III	Sim	Intermitente	Não	$\leq 50$
52	LRSS	52	F	B	III	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
53	ACOD	46	F	B	III	Sim	Intermitente	Sim	$\leq 50$
54	IB	52	F	B	II	Sim	Intermitente	Sim	$\leq 50$
55	JAF	58	M	B	II	Sim	Intermitente	Não	$\leq 50$
56	HM	41	F	NB	IV	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
57	MAG	50	F	NB	IV	Sim	Crônica	NA	$\leq 50$
58	CBS	54	M	NB	III	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
59	LACC	48	M	B	II	Sim	Intermitente	Não	$\leq 50$
60	ACC	59	M	NB	III	Sim	Intermitente	Não	$\leq 50$
61	FBA	47	M	B	II	Sim	Intermitente	Não	$\leq 50$
62	MCA	34	F	NB	IV	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
63	EGS	48	M	NB	IV	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
64	MG	52	M	B	II	Sim	Crônica	Sim	$\leq 50$
65	MAM	59	M	NB	IV	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
66	MLFS	55	F	B	III	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
67	SR	52	M	NB	V	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
68	ALPR	55	M	B	III	Sim	Intermitente	Sim	$\leq 50$
69	NÃO	47	F	B	III	Sim	Intermitente	Sim	$\leq 50$
70	DBM	24	M	NB	IV	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
71	IAM	49	M	NB	III	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
72	DRS	45	M	B	II	Sim	Intermitente	Não	$\leq 50$

73	AP	48	M	B	III	Sim	Intermitente	Não	$\leq 50$
74	GMS	46	M	NB	IV	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
75	GJL	35	M	B	I	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
76	ARL	27	M	B	I	Sim	Crônica	Sim	$\leq 50$
77	RBR	46	M	B	II	Sim	Crônica	Sim	$> 50$
78	JEN	52	M	NB	IV	Sim	Crônica	Sim	$\leq 50$
79	CRM	39	M	B	II	Sim	Intermitente	Sim	$\leq 50$
80	KMM	28	M	B	I	Não	Nenhuma	Sim	$> 50$
81	AAF	53	M	B	II	Sim	Intermitente	Não	$\leq 50$
82	FXS	31	F	NB	VI	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
83	MAJ	50	F	NB	III	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
84	FSR	37	F	B	III	Sim	Crônica	Sim	$\leq 50$
85	RSP	52	M	B	III	Sim	Intermitente	Sim	$\leq 50$
86	BTCP	55	F	B	II	Sim	Intermitente	Sim	$\leq 50$
87	ACS	36	F	B	III	Não	Nenhuma	Sim	$\leq 50$
88	LAM	47	M	B	I	Sim	Crônica	Sim	$\leq 50$
89	JCS	58	M	NB	V	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
90	MAP	60	F	NB	VI	Não	Nenhuma	Sim	$\leq 50$
91	AJC	48	M	B	II	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
92	IFS	50	F	B	II	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
93	MEFS	60	F	B	II	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
94	HACF	52	M	B	III	Sim	Intermitente	Não	$\leq 50$
95	ERS	49	M	B	I	Sim	Intermitente	Sim	$\leq 50$
96	EFS	47	F	NB	IV	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
97	AF	60	M	B	II	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
98	EFA	47	M	B	II	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$

99	MAS	41	F	B	II	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
100	JCC	53	M	B	II	Sim	Crônica	Sim	$\leq 50$
101	LERR	19	M	B	I	Sim	Intermitente	Não	$\leq 50$
102	ACPB	40	F	B	I	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
103	LSO	32	F	B	III	Sim	Intermitente	Não	$\leq 50$
104	MCAS	45	F	B	II	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
105	ESG	46	M	B	II	Não	Nenhuma	Sim	$\leq 50$
106	TBSM	54	F	NB	V	Sim	Intermitente	Não	$\leq 50$
107	MCVDA	37	F	B	I	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
108	ALF	29	F	B	I	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
109	MHMM	29	F	B	II	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
110	FRBC	46	M	B	I	Sim	Intermitente	Não	$\leq 50$
111	MAS	58	F	B	II	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
112	ELM	37	M	NB	IV	Sim	Intermitente	Não	$\leq 50$
113	JAI	33	F	B	III	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
114	CR	35	M	B	II	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
115	MIEL	50	F	B	I	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
116	DMPS	45	F	B	III	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
117	FJBS	46	M	B	II	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
118	PAMP	55	M	B	III	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
119	MAOP	42	F	B	II	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
120	CZCF	60	F	B	III	Não	Nenhuma	Sim	$\leq 50$
121	JCL	51	M	B	II	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
122	JOCL	59	M	B	I	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
123	CNK	33	F	B	I	Não	Nenhuma	Sim	$\leq 50$
124	RABB	45	F	B	II	Sim	Intermitente	Sim	$\leq 50$

125	IFM	60	F	B	II	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
126	SMT	30	F	B	I	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
127	CMCP	45	F	B	I	Não	Nenhuma	Sim	$\leq 50$
128	TSC	28	F	NB	III	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
129	GOABL	37	F	B	II	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
130	DBP	36	M	NB	IV	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
131	IMS	42	F	B	II	Não	Nenhuma	Sim	$\leq 50$
132	MAS	48	F	B	I	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
133	IC	36	F	B	I	Não	Nenhuma	Sim	$\leq 50$
134	RMS	36	F	B	I	Não	Nenhuma	Sim	$\leq 50$
135	DBS	38	F	B	III	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
136	ACJ	52	M	B	I	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
137	MAGM	56	F	B	II	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
138	EBC	53	M	B	I	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
139	CSR	36	F	B	I	Não	Nenhuma	Sim	$\leq 50$
140	BRQF	56	F	B	I	Não	Nenhuma	Sim	$\leq 50$
141	IJM	53	F	B	I	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
142	CFL	34	F	NB	V	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
143	MABM	55	F	B	I	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
144	GDBM	31	F	B	II	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
145	LC	46	F	B	I	Sim	Intermitente	Não	$\leq 50$
146	GR	36	F	B	I	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
147	JLRS	63	M	B	II	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
148	LLS	38	M	NB	VI	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
149	RAP	55	M	B	II	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
150	DMC	37	F	B	II	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$

151	ALMC	49	F	B	II	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
152	ACNS	33	F	B	I	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
153	RSM	47	F	B	I	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
154	MFSM	40	F	B	I	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
155	FCD	59	M	B	II	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
156	ABS	55	M	B	II	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
157	RTV	63	M	B	I	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
158	SRL	28	F	B	I	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
159	ESA	34	F	B	I	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
160	ACF	41	F	B	I	Não	Nenhuma	Sim	$\leq 50$
161	MAMA	36	F	B	II	Não	Nenhuma	Sim	$\leq 50$
162	WG	53	M	B	II	Sim	Intermitente	Não	$\leq 50$
163	LCDP	44	F	B	I	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
164	PDS	31	F	B	I	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
165	MC	35	M	B	I	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
166	ASAL	39	F	NB	III	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
167	ACS	39	F	B	I	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
168	CLMD	40	F	B	II	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
169	TCR	30	F	B	I	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
170	NSB	46	M	NB	V	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
171	IPSA	50	F	B	I	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
172	JIA	56	M	B	II	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
173	VSLC	31	F	B	II	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
174	CGPM	48	F	B	II	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
175	ARB	40	M	NB	V	Sim	Intermitente	Não	$\leq 50$
176	MSP	59	F	B	III	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$

177	AP	44	F	B	III	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
178	MRC	57	M	B	I	Não	Nenhuma	Sim	$\leq 50$
179	ACA	29	M	NB	III	Sim	Intermitente	Não	$\leq 50$
180	MLFCD	42	F	B	I	Sim	Intermitente	Não	$\leq 50$
181	TES	36	F	NB	III	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
182	MFS	33	F	B	I	Não	Nenhuma	Sim	$\leq 50$
183	AS	48	M	B	II	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
184	JBS	48	M	NB	V	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
185	FHP	27	M	B	II	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
186	AMFSML	36	F	B	I	Não	Nenhuma	Sim	$\leq 50$
187	ORS	52	M	B	I	Não	Nenhuma	Sim	$\leq 50$
188	MAOPS	36	F	B	II	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
189	ASJL	38	M	NB	IV	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
190	DBC	47	F	NB	IV	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
191	VSA	38	F	NB	III	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
192	ROF	42	F	B	II	Não	Nenhuma	Sim	$\leq 50$
193	AC	34	M	B	I	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
194	JO	29	M	B	II	Sim	Intermitente	Sim	$\leq 50$
195	RAS	41	M	NB	IV	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
196	AM	60	M	B	NA	Não	Nenhuma	NA	NA
197	DFA	56	M	B	NA	Não	Nenhuma	NA	NA
198	ALM	49	F	B	NA	Não	Nenhuma	NA	NA
199	RLAN	57	F	B	NA	Não	Nenhuma	NA	NA
200	JTP	57	M	B	NA	Não	Nenhuma	NA	NA
201	AJC	55	M	B	NA	Não	Nenhuma	NA	NA
202	VTVV	54	F	B	NA	Não	Nenhuma	NA	NA

203	TGMP	31	M	B	II	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
204	WGM	30	M	B	III	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
205	SRO	30	F	B	II	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
206	JLP	43	M	B	III	Sim	Intermitente	Não	$\leq 50$
207	OE	45	M	B	II	Não	Nenhuma	Sim	$\leq 50$
208	JSP	36	F	NB	IV	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
209	BLO	62	M	NB	VI	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
210	ALPM	50	F	B	I	Sim	Crônica	Sim	$\leq 50$
211	HVSLM	29	M	B	II	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
212	JCD	63	M	B	II	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
213	ACS	32	M	B	II	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
214	MCLA	33	F	NB	IV	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
215	SAA	49	M	B	III	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
216	DA	46	M	NB	IV	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
217	JA	32	M	B	II	Sim	Intermitente	Não	$\leq 50$
218	PBJAM	47	F	B	II	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
219	EAFS	41	M	B	III	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
220	TFTA	31	M	B	III	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
221	VAB	37	F	B	II	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
222	JRS	34	F	B	III	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
223	GNP	36	F	B	II	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
224	PGP	34	M	B	III	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
225	LCON	44	F	B	II	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
226	SRAFS	43	F	B	III	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
227	NAPD	57	F	B	III	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
228	RCBP	53	F	B	II	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$

229	LSR	53	M	NB	V	Sim	Intermitente	Não	$\leq 50$
230	AMF	41	M	NB	IV	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
231	EWL	39	M	NB	III	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
232	AMP	43	F	B	III	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
233	IAM	62	M	B	II	Sim	Crônica	Sim	$\leq 50$
234	LC	60	F	B	III	Sim	Intermitente	Não	$\leq 50$
235	RAS	31	M	B	III	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
236	JCB	45	M	B	II	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
237	RATM	33	F	B	II	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
238	VZF	38	M	B	III	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
239	ALF	56	F	B	III	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
240	KE	38	F	B	II	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
241	ASR	34	M	NB	IV	Sim	Intermitente	Não	$\leq 50$
242	TLA	33	F	B	I	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
243	AFS	45	M	B	III	Não	Nenhuma	Sim	$\leq 50$
244	FJBS	48	M	B	II	Sim	Intermitente	Sim	$\leq 50$
245	LLSP	36	F	NB	V	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
246	TRM	30	M	B	II	Sim	Intermitente	Não	$\leq 50$
247	FVGA	40	M	NB	IV	Sim	Intermitente	Não	$\leq 50$
248	RV	64	M	B	II	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
249	RPF	32	M	B	II	Sim	Intermitente	Sim	$\leq 50$
250	MLF	41	M	B	III	Sim	Crônica	Sim	$\leq 50$
251	VMM	49	M	B	II	Não	Nenhuma	Sim	$\leq 50$
252	AAS	37	M	B	III	Sim	Intermitente	Sim	$\leq 50$
253	HAN	43	M	B	II	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
254	EFG	47	M	B	II	Sim	Intermitente	Não	$\leq 50$

255	SMOM	44	F	B	III	Sim	Intermitente	Não	$\leq 50$
256	FPS	43	M	B	III	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
257	GPS	42	F	B	II	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
258	ERO	50	F	B	III	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
259	JJP	57	F	B	III	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
260	WBA	55	M	B	II	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
261	CVO	58	M	B	III	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
262	CRLJ	52	M	B	II	Não	Nenhuma	Sim	$\leq 50$
263	LAM	56	M	B	II	Sim	Intermitente	Não	$\leq 50$
264	EPF	55	M	B	II	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
265	MOSS	60	M	B	I	Sim	Intermitente	Sim	$\leq 50$
266	LHRPF	52	F	B	I	Não	Nenhuma	Sim	$\leq 50$
267	MRCM	54	F	B	II	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
268	ESFV	50	F	B	III	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
269	OG	59	M	B	II	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
270	JLA	55	M	B	I	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
271	SMTJ	54	F	B	II	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
272	NALF	58	M	B	II	Sim	Intermitente	Não	$\leq 50$
273	MMIM	58	F	B	I	Sim	Crônica	Sim	$\leq 50$
274	RMD	48	F	B	III	Não	Nenhuma	Não	$\leq 50$
275	ICD	54	M	B	III	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
276	NAB	63	M	B	II	Sim	Crônica	Sim	$\leq 50$
277	TACS	60	M	B	I	Não	Nenhuma	Sim	$\leq 50$
278	MCLS	59	F	B	III	Sim	Intermitente	Não	$\leq 50$
279	RS	55	M	B	III	Sim	Crônica	Não	$\leq 50$
280	FTH	56	M	B	II	Não	Nenhuma	Sim	$\leq 50$

(F) Feminino; (M) Masculino; (B) Branca; (NB) Não branca; (NA) Não avaliado

## ANEXO 13

Distribuição dos 280 controles de acordo com os genótipos da variante *MITF* rs7623610

Nº	Sigla	SNV <i>MITF</i> rs7623610
1	VAMMS	GG
2	ROF	GA
3	LLAS	AA
4	JFA	GA
5	SEP	GG
6	PRS	GA
7	SMCM	AA
8	CAM	GA
9	LCFC	GA
10	MFSP	GA
11	LBP	AA
12	ASN	GA
13	DF	GA
14	LAC	GG
15	VJB	GG
16	JS	GA
17	JAR	GG
18	JCA	GG
19	JBR	GA
20	LCCS	GG
21	VCV	AA
22	MAT	GG
23	JSS	GG
24	JLR	GA
25	AAS	GG
26	IAPM	AA
27	EAR	GG
28	FCM	GA
29	RCM	GA

30	DCA	GA
31	MCR	GA
32	VDG	GG
33	SCJ	GG
34	PPS	AA
35	MAPF	GA
36	AECB	GG
37	MCG	GA
38	CAM	GA
39	CAGV	GA
40	MAP	GA
41	AAS	AA
42	MRQ	GG
43	JLB	GG
44	LRP	GG
45	FRD	GA
46	SLB	GA
47	VB	GA
48	SCM	GA
49	MCD	GA
50	IV	GG
51	MMR	GG
52	LRSS	GA
53	ACOD	GG
54	IB	GA
55	JAF	GA
56	HM	GA
57	MAG	GG
58	CBS	GA
59	LACC	GA
60	ACC	GA
61	FBA	GA
62	MCA	GG
63	EGS	GA

64	MG	AA
65	MAM	GA
66	MLFS	GG
67	SR	GA
68	ALPR	GG
69	NÃO	GG
70	DBM	AA
71	IAM	GA
72	DRS	GA
73	AP	GA
74	GMS	GG
75	GJL	AA
76	ARL	GA
77	RBR	GG
78	JEN	GG
79	CRM	AA
80	KMM	AA
81	AAF	AA
82	FXS	AA
83	MAJ	GA
84	FSR	GA
85	RSP	GA
86	BTCP	GA
87	ACS	GG
88	LAM	GA
89	JCS	GG
90	MAP	GG
91	AJC	AA
92	IFS	GA
93	MEFS	GA
94	HACF	AA
95	ERS	GG
96	EFS	GA
97	AF	GA

98	EFA	GA
99	MAS	AA
100	JCC	AA
101	LERR	GG
102	ACPBM	GG
103	LSO	AA
104	MCAS	AA
105	ESG	AA
106	TBSM	GA
107	MCVDA	AA
108	ALF	GA
109	MHMM	GA
110	FRBC	AA
111	MAS	AA
112	ELM	GA
113	JAI	AA
114	CR	GA
115	MIEL	GA
116	DMPS	GA
117	FJBS	GA
118	PAMP	GG
119	MAOP	GG
120	CZCF	AA
121	JCL	GA
122	JOCL	GG
123	CNK	GA
124	RABB	AA
125	IFM	GA
126	SMT	GA
127	CMCP	GA
128	TSC	AA
129	GOABL	GG
130	DBP	GA
131	IMS	AA

132	MAS	GG
133	IC	AA
134	RMS	AA
135	DBS	GA
136	ACJ	GG
137	MAGM	GA
138	EBC	GA
139	CSR	GA
140	BRQF	AA
141	IJM	AA
142	CFL	GG
143	MABM	AA
144	GDBM	GG
145	LC	GA
146	GR	GA
147	JLRS	GA
148	LLS	GA
149	RAP	GG
150	DMC	GA
151	ALMC	AA
152	ACNS	GG
153	RSM	GA
154	MFSM	GA
155	FCD	GG
156	ABS	GA
157	RTV	GG
158	SRL	GA
159	ESA	GA
160	ACF	AA
161	MAMA	GG
162	WG	GA
163	LCDP	GA
164	PDS	GA
165	MC	GG

166	ASAL	GG
167	ACS	GA
168	CLMD	GA
169	TCR	GA
170	NSB	GG
171	IPSA	GG
172	JIA	GG
173	VSLC	GA
174	CGPM	GA
175	ARB	GG
176	MSP	AA
177	AP	GA
178	MRC	AA
179	ACA	GA
180	MLFCD	GG
181	TES	AA
182	MFS	GA
183	AS	GG
184	JBS	GA
185	FHP	GG
186	AMFSML	GG
187	ORS	AA
188	MAOPS	GG
189	ASJL	GA
190	DBC	AA
191	VSA	GA
192	ROF	GA
193	AC	GG
194	JO	GA
195	RAS	GA
196	AM	GA
197	DFA	GA
198	ALM	GG
199	RLAN	AA

200	JTP	GA
201	AJC	GA
202	VTVV	GA
203	TGMP	AA
204	WGM	GG
205	SRO	GA
206	JLP	GA
207	OE	GG
208	JSP	GA
209	BLO	GG
210	ALPM	GG
211	HVSLM	GA
212	JCD	GG
213	ACS	GA
214	MCLA	GG
215	SAA	GG
216	DA	GA
217	JA	AA
218	PBJAM	AA
219	EAFS	AA
220	TFTA	GA
221	VAB	GA
222	JRS	GG
223	GNP	AA
224	PGP	GG
225	LCON	GG
226	SRAFS	AA
227	NAPD	AA
228	RCBP	GG
229	LSR	GA
230	AMF	GG
231	EWL	GG
232	AMP	GA
233	IAM	GA

234	LC	GG
235	RAS	GG
236	JCB	GG
237	RATM	AA
238	VZF	AA
239	ALF	GA
240	KE	GA
241	ASR	AA
242	TLA	GA
243	AFS	GG
244	FJBS	GA
245	LLSP	GG
246	TRM	AA
247	FVGA	GA
248	RV	GG
249	RPF	GA
250	MLF	GA
251	VMM	AA
252	AAS	GA
253	HAN	GG
254	EFG	GG
255	SMOM	GA
256	FPS	GG
257	GPS	GA
258	ERO	GG
259	JJP	GA
260	WBA	GG
261	CVO	GA
262	CRLJ	GG
263	LAM	GG
264	EPF	GA
265	MOSS	GG
266	LHRPF	GA
267	MRCM	AA

268	ESFV	GA
269	OG	GG
270	JLA	AA
271	SMTJ	GG
272	NALF	GG
273	MMIM	GG
274	RMD	GA
275	ICD	GA
276	NAB	AA
277	TACS	AA
278	MCLS	GA
279	RS	GA
280	FTH	GG

---

(SNV) variante de base única

## ANEXO 14

Análise da expressão gênica (Ct) dos genes da *ACTB* e do *MITF* em pacientes

Nº	Iniciais	Média Ct <i>ACTB</i>	Média Ct <i>MITF</i>	$2^{-\Delta\Delta CT^*}$	SNV <i>MITF</i> rs7623610
1	GMG	14,62	24,73	1,42	GA
2	WC	15,09	26,17	0,72	GG
3	ML	14,83	24,83	1,53	GG
4	SLPB	16,56	26,44	1,66	GG
5	CA	14,74	24,51	1,79	AA
6	ADF	14,06	24,96	0,82	GG
7	MIAT	14,89	24,66	1,79	GA
8	RNB	20,72	31,00	1,26	GA
9	DCS	16,70	29,07	0,30	GA
10	ICQM	17,37	27,38	1,51	AA
11	AT	18,59	28,30	1,87	GG
12	CB	15,26	25,74	1,09	GA
13	JSN	16,00	27,14	0,69	GG
14	MADC	15,15	25,39	1,29	AA
15	BABZ	15,54	24,93	2,32	GA
16	DBS	14,90	24,90	1,53	GA
17	AMR	14,94	24,56	1,99	GA
18	CILP	14,93	25,21	1,26	GG
19	TAPB	15,78	25,68	1,63	GA
20	EMJ	22,61	32,19	2,05	GG
21	SPM	17,16	27,73	1,03	AA
22	BAM	13,93	24,87	0,79	GG
23	VAOG	21,26	33,08	0,43	GA
24	ARBS	18,12	29,11	0,77	GA
25	LAVV	19,30	32,85	0,13	GA
26	MBA	16,83	28,80	0,39	AA
27	JCS	16,97	31,37	0,07	GA
28	DHS	17,13	27,91	0,89	GG

29	JGS	23,70	34,63	0,80	GG
30	SAA	15,42	26,10	0,95	GG
31	CN	17,54	28,67	0,70	GA
32	VLSA	19,26	30,65	0,59	GG
33	MTBB	16,64	27,50	0,84	GG
34	PGRB	15,13	29,86	0,06	GA
35	CAS	16,30	28,91	0,25	GA
36	LVAA	20,39	31,39	0,76	GG
37	JP	18,05	30,97	0,20	AA

---

\* fórmula aritmética  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak & Schmittgen, 2001); (SNV) variante de base única

## ANEXO 15

Análise da expressão gênica (Ct) dos genes da *ACTB* e do *HNRNPA1* em pacientes

Nº	Iniciais	Média Ct <i>ACTB</i>	Média Ct <i>HNRNPA1</i>	$2^{-\Delta\Delta CT^*}$	SNV <i>MITF</i> rs7623610
1	GMG	14,88	17,92	0,53	GA
2	WC	15,20	17,96	0,64	GG
3	ML	15,07	17,90	0,61	GG
4	SLPB	17,47	19,58	1,00	GG
5	CA	14,61	20,00	0,10	AA
6	ADF	14,43	17,34	0,58	GG
7	MIAT	14,88	17,63	0,64	GA
8	RNB	20,55	21,86	1,75	GA
9	DCS	16,66	20,10	0,40	GA
10	ICQM	17,23	19,36	0,99	AA
11	AT	18,67	20,47	1,24	GG
12	CB	15,45	18,13	0,67	GA
13	JSN	16,48	18,16	1,34	GG
14	MADC	14,93	18,21	0,44	AA
15	BABZ	15,47	19,04	0,36	GA
16	DBS	14,70	17,18	0,77	GA
17	AMR	14,96	17,46	0,77	GA
18	CILP	14,95	18,56	0,35	GG
19	TAPB	15,83	18,79	0,56	GA
20	EMJ	21,32	22,06	2,59	GG
21	SPM	16,76	19,98	0,46	AA
22	JAM	19,42	24,12	0,17	GA
23	RAM	14,61	18,32	0,33	GG
24	NAOG	21,31	23,11	1,24	GA
25	ARBS	18,33	21,07	0,65	GA
26	LAVV	19,33	25,64	0,05	GA
27	MBA	17,18	22,08	0,14	AA
28	JCS	17,34	23,37	0,07	GA

29	DHS	17,17	18,88	1,32	GG
30	SAA	15,55	17,35	1,25	GG
31	CW	17,49	19,50	1,07	GA
32	VLSA	19,17	21,18	1,07	GG
33	MTBB	16,61	18,30	1,33	GG
34	PGRB	15,47	19,95	0,19	GA
35	CAS	15,98	20,07	0,25	GA
36	LCV	20,77	21,41	2,76	GG
37	LVAA	20,07	21,71	1,39	GG
38	JP	16,75	23,01	0,06	AA
39	AMGA	23,14	24,87	1,30	GA
40	MIBR	20,89	26,77	0,07	AA

---

\* fórmula aritmética  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak & Schmittgen, 2001); (SNV) variante de base única

## ANEXO 16

Análise da expressão gênica (Ct) dos genes da *ACTB* e do *SF1* em pacientes

Nº	Iniciais	Média Ct <i>ACTB</i>	Média Ct <i>SF1</i>	$2^{-\Delta\Delta CT^*}$	SNV <i>MITF</i> rs7623610
1	GMG	14,79	19,88	0,75	GA
2	WC	14,87	19,75	0,87	GG
3	ML	14,75	19,56	0,91	GG
4	SLPB	16,86	21,83	0,82	GG
5	CA	14,63	19,44	0,86	AA
6	ADF	14,27	19,14	0,88	GG
7	MIAT	14,87	19,36	1,08	GA
8	RNB	20,36	23,79	2,23	GA
9	DCS	16,61	21,57	0,77	GA
10	ICQM	17,16	20,87	1,84	AA
11	AT	18,55	22,76	1,39	GG
12	CB	15,11	20,05	0,79	GA
13	JSN	16,42	20,31	1,74	GG
14	MADC	14,76	18,26	2,13	AA
15	BABZ	15,19	19,24	1,46	GA
16	DBS	14,52	18,95	1,11	GA
17	AMR	15,02	19,41	1,15	GA
18	CILP	14,84	18,25	2,40	GG
19	TAPB	15,66	18,63	3,06	GA
20	EMJ	20,37	25,52	0,72	GG
21	SPM	16,75	19,79	2,93	AA
22	JAM	18,73	23,74	0,74	GA
23	RAM	14,10	18,53	1,19	GG
24	NAOG	23,34	29,35	0,37	GA
25	ARBS	18,22	24,79	0,25	GA
26	LAVV	19,08	25,70	0,24	GA
27	MBA	17,14	21,35	1,30	AA

28	JCS	17,25	22,85	0,50	GA
29	DHS	16,92	21,58	1,01	GG
30	JGS	22,45	27,68	0,68	GG
31	SAA	15,28	19,80	1,11	GG
32	CW	17,43	22,26	0,85	GA
33	VLSA	18,90	24,44	0,55	GG
34	MTBB	16,48	21,18	0,99	GG
35	PGRB	15,46	19,84	1,16	GA
36	CAS	15,82	20,11	1,23	GA
37	LCV	20,61	25,73	0,74	GG
38	LVAA	19,97	24,44	1,15	GG
39	JP	16,43	22,42	0,38	AA
40	AMGA	23,13	28,18	0,73	GA
41	MIBR	20,76	28,06	0,15	AA

---

\* fórmula aritmética  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak & Schmittgen, 2001); (SNV) variante de base única

## ANEXO 17

Análise da expressão gênica (Ct) dos genes da *ACTB* e do *MITF* em controles

Nº	Iniciais	Média Ct <i>ACTB</i>	Média Ct <i>MITF</i>	$2^{-\Delta\Delta CT^*}$	SNV <i>MITF</i> rs7623610
1	RKB	13,40	24,37	0,91	AA
2	RLAN	13,67	24,43	1,05	AA
3	RFP	16,14	25,30	3,19	GG
4	LBA	13,31	25,70	0,34	AA
5	RPG	13,61	22,88	2,94	GG
6	GASN	12,56	24,51	0,46	GA
7	ACS	11,88	21,66	2,07	GG
8	ARD	12,34	22,34	1,78	GG
9	MES	14,13	24,48	1,39	AA
10	RABB	13,03	24,02	0,90	AA
11	CNK	13,90	24,52	1,16	GA
12	AJPA	15,86	27,27	0,67	GG
13	JOCL	16,38	28,49	0,41	GG
14	GSMB	12,48	23,36	0,97	GA
15	EMG	12,64	23,62	0,90	AA
16	BVP	13,19	23,94	1,06	GG
17	BRS	14,69	27,58	0,24	AA
18	ARG	13,52	23,85	1,41	AA
19	SMT	12,54	23,72	0,79	GA
20	RBCP	12,75	23,65	0,95	GA
21	DZ	12,99	24,25	0,74	GG
22	MAS	13,50	24,26	1,05	GG
23	IMS	12,83	24,03	0,78	AA
24	ALC	12,51	23,22	1,08	AA
25	TSC	12,63	23,81	0,79	AA
26	LB	12,89	23,40	1,25	AA
27	CLMD	14,70	25,45	1,05	GA
28	TCR	13,48	23,81	1,41	GA

29	JIA	13,96	24,76	1,02	GG
30	WGM	14,30	24,90	1,17	GA
31	LCDP	14,84	24,70	1,95	GA
32	MC	15,48	25,71	1,51	GG
33	ASAL	13,05	25,07	0,44	GG
34	CGPM	15,60	25,42	2,02	GA
35	MAMA	13,43	23,33	1,91	GG
36	ABS	15,44	25,44	1,77	GA
37	ACF	16,57	26,56	1,79	AA
38	RSM	14,67	25,42	1,06	GA
39	MRC	13,10	24,70	0,59	AA
40	MLFCD	13,24	24,43	0,78	GG
41	AS	12,85	23,79	0,93	GG
42	FHP	14,23	26,59	0,35	GG
43	AMFSML	13,22	24,34	0,81	GG
44	ORS	12,68	23,58	0,96	AA
45	MAOPS	13,53	24,39	0,98	GG
46	ASJL	12,79	23,79	0,88	GA
47	DBC	13,65	25,72	0,42	AA
48	ROF	16,63	26,65	1,76	GA
49	AC	13,04	24,39	0,69	GG
50	JO	15,37	25,37	1,78	GA
51	TGMP	13,06	24,96	0,48	AA
52	WGM	12,90	24,19	0,73	GG
53	SRO	13,13	23,82	1,11	GA
54	JLP	15,43	26,36	0,93	GA
55	OE	13,13	24,12	0,89	GG
56	JSP	12,85	24,03	0,78	GA
57	HVSLM	12,81	23,24	1,32	GA
58	SAA	13,02	23,26	1,50	GG
59	DA	13,46	23,22	2,10	GA
60	JÁ	12,14	22,83	1,10	AA
61	PBJAM	12,67	22,69	1,75	AA
62	EAFS	18,38	29,01	1,14	AA

63	TFTA	15,03	25,35	1,42	GA
64	JRS	15,77	26,24	1,28	GG
65	NAPD	13,47	23,71	1,51	AA
66	LC	13,13	24,30	0,79	GG
67	RAS	12,99	23,48	1,26	GG
68	JCB	13,14	23,75	1,17	GG
69	RCBP	13,92	24,88	0,91	GG
70	ALF	15,09	25,77	1,11	GA
71	KE	15,69	26,94	0,75	GA
72	ASR	15,89	28,25	0,35	AA
73	LLSP	15,70	27,39	0,55	GG
74	CRMD	12,67	22,74	1,70	AA

---

\* fórmula aritmética  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak & Schmittgen, 2001); (SNV) variante de base única

## ANEXO 18

Análise da expressão gênica (Ct) dos genes da *ACTB* e do *HNRNPA1* em controles

Nº	Iniciais	Média Ct <i>ACTB</i>	Média Ct <i>HNRNPA1</i>	$2^{-\Delta\Delta Ct^*}$	SNV <i>MITF</i> rs7623610
1	RFP	15,81	19,18	1,08	GG
2	RPG	13,36	15,40	2,71	GG
3	ACS	11,61	15,25	0,90	GG
4	ARD	11,91	15,38	1,01	GG
5	AJPA	15,55	18,39	1,56	GG
6	JOLC	15,95	18,87	1,47	GG
7	BVP	13,24	16,19	1,45	GG
8	DZ	13,46	16,33	1,53	GG
9	MAS	13,01	15,76	1,66	GG
10	GOABL	14,38	19,63	0,29	GG
11	LMS	18,23	24,09	0,19	GG
12	ACJ	13,81	16,87	1,35	GG
13	AM	12,43	15,72	1,14	GG
14	IPSA	13,82	16,61	1,61	GG
15	JIA	13,53	16,13	1,84	GG
16	MC	14,95	17,63	1,74	GG
17	ASAL	12,44	16,53	0,65	GG
18	FHP	13,30	18,28	0,35	GG
19	MAOPS	12,78	17,48	0,43	GG
20	WGM	12,28	15,35	1,33	GG
21	OE	12,48	15,38	1,50	GG
22	SAA	12,32	15,37	1,35	GG
23	LC	12,53	15,85	1,12	GG
24	RAS	12,45	15,76	1,12	GG
25	JCB	12,54	15,59	1,34	GG
26	RCBP	12,97	15,81	1,55	GG
27	AFS	17,42	21,42	0,70	GG
28	LLSP	14,79	18,72	0,73	GG

29	EJC	18,87	21,33	2,02	GA
30	CNK	12,92	16,22	1,13	GA
31	SMT	11,83	15,57	0,84	GA
32	RBCP	12,87	15,68	1,58	GA
33	LHAOS	12,76	15,63	1,53	GA
34	DBP	12,25	15,71	1,01	GA
35	CEB	13,42	16,88	1,01	GA
36	WR	13,45	16,77	1,12	GA
37	AA	14,00	17,43	1,04	GA
38	FEOM	19,85	21,75	3,00	GA
39	VAB	15,74	19,33	0,93	GA
40	CLMD	14,18	16,54	2,17	GA
41	TCR	12,87	15,84	1,43	GA
42	WGM	13,88	16,49	1,83	GA
43	LCDP	14,48	17,17	1,73	GA
44	PDS	14,90	18,52	0,90	GA
45	CGPM	15,30	17,94	1,79	GA
46	FH	14,69	17,27	1,87	GA
47	ESA	12,85	16,61	0,82	GA
48	SRL	13,73	15,96	2,38	GA
49	BFP	14,89	17,39	1,97	GA
50	AS	12,31	15,33	1,37	GG
51	AMFSML	12,34	16,82	0,50	GG
52	ASJL	12,39	16,89	0,49	GA
53	ROF	15,62	18,31	1,73	GA
54	AC	12,65	18,03	0,27	GG
55	SRO	12,51	15,11	1,83	GA
56	JSP	12,38	15,60	1,20	GA
57	HVSLM	12,47	15,40	1,47	GA
58	ALF	14,37	17,32	1,45	GA
59	KE	14,83	18,76	0,73	GA
60	RKB	13,22	16,12	1,49	AA
61	RLAN	12,84	16,41	0,94	AA
62	LBA	12,94	16,85	0,74	AA

63	MÊS	13,79	16,39	1,83	AA
64	RABB	12,29	15,63	1,10	AA
65	EMG	12,46	15,87	1,05	AA
66	BRS	14,47	19,35	0,38	AA
67	ARG	13,38	16,45	1,33	AA
68	IMS	12,47	15,87	1,06	AA
69	ALC	12,22	15,48	1,16	AA
70	TSC	12,05	15,02	1,42	AA
71	IJM	12,16	15,81	0,89	AA
72	LB	12,55	15,80	1,17	AA
73	MRC	12,60	17,26	0,44	AA
74	MLFCD	12,55	15,46	1,48	GG
75	ORS	12,36	15,95	0,93	AA
76	DBC	13,49	18,77	0,29	AA
77	JO	14,44	17,70	1,16	GA
78	TGMP	12,40	15,67	1,15	AA
79	JÁ	11,61	14,73	1,28	AA
80	PBJAM	11,92	15,23	1,13	AA
81	NAPD	12,96	15,77	1,60	AA
82	ASR	15,37	18,91	0,95	AA
83	CRMD	12,42	15,60	1,23	AA

---

\* fórmula aritmética  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak & Schmittgen, 2001); (SNV) variante de base única

## ANEXO 19

Análise da expressão gênica (Ct) dos genes da *ACTB* e do *SFI* em controles

Nº	Iniciais	Média Ct <i>ACTB</i>	Média Ct <i>SFI</i>	$2^{-\Delta\Delta CT^*}$	SNV <i>MITF</i> rs7623610
1	JOLC	16,47	20,86	1,49	GG
2	GOABL	14,48	19,90	0,73	GG
3	ACJ	13,70	17,90	1,70	GG
4	AM	12,37	17,08	1,20	GG
5	JIA	13,45	19,19	0,59	GG
6	MC	15,22	20,33	0,91	GG
7	ASAL	12,60	16,89	1,60	GG
8	FHP	13,63	18,52	1,06	GG
9	MAOPS	13,22	18,09	1,07	GG
10	WGM	12,30	17,64	0,77	GG
11	OE	12,66	17,92	0,82	GG
12	SAA	12,51	17,45	1,02	GG
13	LC	12,94	18,31	0,76	GG
14	RAS	12,70	17,74	0,96	GG
15	JCB	12,69	18,11	0,73	GG
16	RCBP	13,26	17,97	1,20	GG
17	AFS	17,46	22,68	0,84	GG
18	LLSP	15,02	19,50	1,40	GG
19	EJC	18,25	24,13	0,53	GA
20	CNK	13,12	17,52	1,48	GA
21	SMT	12,07	16,81	1,17	GA
22	DBP	12,49	16,88	1,50	GA
23	FEOM	19,73	23,74	1,95	GA
24	VAB	15,61	19,73	1,81	GA
25	CLMD	13,99	18,91	1,03	GA
26	TCR	13,02	18,34	0,79	GA
27	WGM	14,03	18,89	1,08	GA

28	LCDP	14,39	19,36	1,00	GA
29	CGPM	15,01	19,75	1,18	GA
30	FH	14,50	19,67	0,87	GA
31	ESA	13,08	16,96	2,12	GA
32	SRL	13,29	18,45	0,88	GA
33	BFP	14,91	19,66	1,16	GA
34	AS	12,52	17,88	0,77	GG
35	AMFSML	12,42	16,95	1,36	GG
36	ASJL	12,34	17,42	0,93	GA
37	ROF	15,70	21,29	0,65	GA
38	AC	12,79	17,94	0,88	GG
39	SRO	12,56	18,21	0,62	GA
40	JSP	12,65	17,23	1,31	GA
41	ALF	14,57	18,48	2,08	GA
42	KE	15,34	19,91	1,32	GA
43	RLAN	13,18	17,81	1,26	AA
44	RABB	12,36	16,86	1,39	AA
45	IMS	12,53	17,17	1,26	AA
46	ALC	12,44	16,60	1,75	AA
47	TSC	12,28	16,79	1,37	AA
48	IJM	12,27	17,04	1,15	AA
49	LB	12,54	17,12	1,32	AA
50	BVF	18,00	22,83	1,10	AA
51	ACF	16,25	20,66	1,47	AA
52	MRC	12,87	17,87	0,97	AA
53	MLFCD	12,44	17,33	1,06	GG
54	ORS	12,65	17,46	1,11	AA
55	DBC	13,57	18,64	0,94	AA
56	JO	14,54	20,69	0,44	GA
57	TGMP	12,54	18,08	0,67	AA
58	JLP	14,81	21,17	0,38	GA
59	JÁ	11,45	16,69	0,83	AA
60	PBJAM	12,14	17,32	0,87	AA
61	EAFS	18,56	23,59	0,96	AA

62	NAPD	13,07	18,31	0,83	AA
63	ASR	15,44	19,72	1,62	AA

---

\* fórmula aritmética  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak & Schmittgen, 2001); (SNV) variante de base única

## ANEXO 20

Distribuição dos dados de quantificação da extração das proteínas totais de amostras do sangue periférico de controles e os respectivos genótipos para a variante *MITF* rs7623610

Número	Sigla	Quantidade extraída (µg/µL)	Quantidade em µL (50 µg)	SNV <i>MITF</i> rs7623610
1	HBJ	3,055	20,46	GA
2	CAM	1,779	35,14	GA
3	AVLP	2,554	24,48	GG
4	CO	1,611	38,79	GA
5	GJL	2,756	22,68	AA
6	GASN	2,279	27,43	GA
7	LLA	3,555	17,58	GA
8	EFDC	4,805	13,01	GG
9	CSPL	2,656	23,54	GG
10	DA	3,655	17,10	GA
11	BFR	2,018	30,97	AA
12	BFP	1,644	38,01	GA
13	GR	1,262	49,54	AA
14	LKM	2,461	25,39	GG
15	VD	1,322	47,27	GA
16	SJC	2,355	26,53	AA
17	GAT	1,862	33,56	GG
18	GVBG	1,476	42,34	GA
19	WLO	1,094	57,14	AA
20	LS	2,595	24,09	GG
21	CT	1,758	35,56	AA
22	JKS	3,047	20,51	GG
23	MAF	3,214	19,45	GA
24	ASJJ	5,272	11,86	GG
25	LMG	2,461	25,40	GA

26	MACF	3,477	17,98	GA
27	CZ	1,674	37,33	GA
28	SEDCJ	2,272	27,51	GG
29	DM	2,153	29,03	GA
30	APDC	1,667	37,50	GA
31	ICF	1,705	36,66	AA
32	GSS	1,536	40,69	GA
33	ACR	1,534	40,73	AA
34	LNTDF	3,777	16,55	GG
35	JFOM	2,544	24,56	GG
36	SQS	1,553	40,23	GG
37	SCO	3,493	17,89	AA
38	JSR	1,315	47,52	GG
39	TZC	4,18	14,95	AA
40	MRRO	2,548	24,52	AA
41	LHS	4,685	13,34	AA
42	MASS	2,432	25,70	GA
43	CCM	3,594	17,39	GG
44	SCGC	3,745	16,69	AA
45	MFMS	2,725	22,93	AA
46	GSRQ	2,423	25,79	GG

(µg) micrograma; (µL) microlitro; (SNV) variante de base única

## ANEXO 21

Distribuição dos valores de expressão da proteína MITF por meio da quantificação relativa pela técnica de *western blotting* em amostras de sangue periférico de controles e seus respectivos genótipos da variante *MITF* rs7623610

Nº	Sigla	Quantificação relativa MITF	Quantificação relativa GAPDH	Valor de expressão corrigido pelo GAPDH	SNV <i>MITF</i> rs7623610
1	ICF	0,97	1,02	0,95	AA
2	ACR	0,60	0,69	0,88	AA
3	LNTDF	1,04	0,81	1,28	GG
4	ASJJ	0,57	0,82	0,69	GG
5	EFDC	1,76	2,94	0,60	GG
6	JKS	1,80	2,38	0,75	GG
7	LKM	1,08	1,78	0,61	GG
8	LLA	1,37	2,11	0,65	GA
9	APDC	1,54	2,20	0,70	GA
10	MACF	1,19	2,03	0,59	GA
11	WLO	1,50	2,03	0,74	AA
12	CT	1,73	2,67	0,65	AA
13	LS	1,50	0,61	2,46	GG
14	GSRQ	3,30	1,12	2,94	GG
15	SQS	1,42	1,14	1,25	GG
16	VD	1,91	1,04	1,83	GG
17	CO	1,96	0,86	2,28	GA
18	DM	1,68	0,82	2,05	GA
19	SJC	1,81	1,58	1,14	AA
20	TZC	1,46	0,92	1,58	AA
21	GAT	1,00	1,00	1,00	GG
22	BOB	0,87	1,04	0,84	GG
23	JSR	0,72	0,70	1,03	GG
24	LOC	0,74	0,86	0,85	GG

25	GUBG	0,98	1,08	0,91	GA
26	JJS	1,08	1,10	0,98	GA
27	HBJ	1,11	1,64	0,68	GA
28	GJL	1,09	0,98	1,11	AA
29	GR	0,93	0,86	1,08	AA
30	CSPL	0,43	0,68	0,64	GG
31	SCO	0,66	1,36	0,49	AA
32	BFP	0,38	0,30	1,28	GA
33	MRRO	0,51	0,74	0,69	AA
34	MFMS	0,74	0,96	0,77	AA
35	SEDCJ	0,71	0,70	1,02	GG
36	LHS	0,25	1,53	0,16	AA
37	SCGC	0,95	1,67	0,57	AA
38	MASS	1,85	1,40	1,32	GA
39	CAM	0,56	1,64	0,34	GA
40	MAF	0,56	2,11	0,27	GA
41	CZ	0,97	1,85	0,52	GA
42	JFOM	0,83	1,47	0,56	GG
43	AVLP	0,70	1,35	0,52	GG
44	CCM	0,44	1,46	0,30	GG

---

(SNV) variante de base única

## ANEXO 22

Distribuição dos valores de expressão da proteína hnRNP A1 por meio da quantificação relativa pela técnica de *western blotting* em amostras de sangue periférico de controles e seus respectivos genótipos da variante *MITF* rs7623610

Nº	Sigla	Quantificação relativa hnRNP A1	Quantificação relativa GAPDH	Valor de expressão corrigido pelo GAPDH	SNV <i>MITF</i> rs7623610
1	ACR	0,56	0,95	0,59	AA
2	CT	0,40	1,01	0,40	GG
3	JKS	0,50	1,08	0,47	GG
4	LNTDF	0,65	0,92	0,71	GG
5	EFDC	1,49	1,61	0,93	GG
6	LKM	0,96	0,64	1,49	GG
7	LLA	1,08	1,30	0,83	GA
8	APDC	4,53	1,45	3,13	GA
9	MACF	1,15	0,89	1,29	GA
10	MLO	0,86	1,02	0,84	AA
11	GSS	0,07	0,40	0,18	GA
12	CZ	1,77	1,07	1,65	GA
13	GASN	0,62	0,79	0,78	GA
14	TZC	0,58	0,68	0,84	AA
15	GAT	0,16	0,61	0,26	GG
16	CO	0,09	0,51	0,17	GA
17	LMG	1,20	0,82	1,46	GA
18	CSPL	0,11	0,84	0,14	GG
19	SEDCJ	0,08	0,43	0,18	GG
20	SJC	1,00	1,07	0,93	AA
21	DA	0,21	1,02	0,20	GA
22	CCM	1,00	1,00	1,00	GG
23	ASJJ	0,08	1,59	0,05	GG
24	HBJ	0,40	1,91	0,21	GA

25	MRRO	0,17	1,30	0,13	AA
26	MFMS	0,23	0,88	0,26	AA
27	ICF	0,65	1,29	0,50	GA
28	DM	0,33	0,60	0,55	GA
29	GSRQ	0,09	0,81	0,12	GG
30	BFP	0,78	1,12	0,70	GA
31	MASS	1,75	0,91	1,91	GA
32	GR	0,28	1,10	0,25	AA
33	LHS	0,66	1,09	0,60	AA
34	BFR	0,48	0,98	0,49	AA
35	VD	0,45	0,78	0,57	GA
36	SCGC	0,65	1,19	0,55	AA
37	SCO	0,28	0,96	0,29	AA
38	CAM	0,19	0,93	0,20	GA
39	MAF	1,42	1,13	1,26	GA
40	JFOM	0,18	1,14	0,16	GG

---

(SNV) variante de base única

## ANEXO 23

Distribuição dos valores de expressão da proteína SF1 por meio da quantificação relativa pela técnica de *western blotting* em amostras de sangue periférico de controles e seus respectivos genótipos da variante *MITF* rs7623610

Nº	Sigla	Quantificação relativa SF1	Quantificação relativa GAPDH	Valor de expressão corrigido pelo GAPDH	SNV <i>MITF</i> rs7623610
1	ACR	0,54	1,19	0,46	AA
2	MFMS	0,40	1,27	0,32	AA
3	BOB	1,00	1,00	1,00	GG
4	JKS	0,28	1,51	0,19	GG
5	JSR	0,38	0,85	0,45	GG
6	LKM	0,58	1,15	0,50	GG
7	BFR	0,39	1,77	0,22	AA
8	EFDC	1,08	0,98	1,11	GG
9	LLA	1,46	1,14	1,29	GA
10	APDC	0,47	0,92	0,51	GA
11	MACF	0,65	0,59	1,10	GA
12	WLO	0,88	0,88	1,00	AA
13	CT	0,81	0,94	0,86	AA
14	TZC	0,14	0,44	0,33	AA
15	CZ	0,39	0,90	0,43	GA
16	HBJ	0,22	0,62	0,35	GA
17	LNTDF	0,51	0,79	0,64	GG
18	CSPL	0,43	0,50	0,84	GG
19	MAF	0,57	0,95	0,60	GA
20	JFOM	1,00	1,00	1,00	GG
21	GASN	4,71	1,81	2,60	GA
22	LMG	2,08	1,54	1,35	GA
23	MASS	1,85	0,93	2,00	GA
24	MRRO	2,44	1,14	2,15	AA

25	ASJJ	1,00	1,00	1,00	GG
26	SJC	4,16	1,53	2,72	AA
27	CAM	5,36	2,16	2,48	GA
28	LMG	0,34	1,42	0,24	GA
29	DM	0,31	0,86	0,36	GA
30	SEDCJ	0,45	1,07	0,42	GG
31	GSRQ	1,00	1,00	1,00	GG
32	BFP	0,63	1,13	0,56	GA
33	GJL	0,82	1,22	0,67	AA
34	GR	0,42	0,88	0,48	AA
35	ICF	1,02	1,28	0,80	AA
36	LHS	1,21	1,36	0,89	AA
37	SCGC	1,04	1,15	0,91	AA
38	CCM	1,00	1,00	1,00	GG
39	LOC	1,07	0,63	1,70	GG
40	JJS	1,14	1,02	1,11	GA

---

(SNV) variante de base única