



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

JOYCE RIBEIRO MOURA BRASIL ARNAUT

**PREVALÊNCIA DAS MUTAÇÕES EM GENES DE PREDISPOSIÇÃO AO
MELANOMA HEREDITÁRIO NOS PACIENTES DO INCA**

Orientadores: Prof^ª. Dra. Andreia Cristina de Melo
Prof. Dr. Jorge Ricardo Machado

RIO DE JANEIRO

2022



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

JOYCE RIBEIRO MOURA BRASIL ARNAUT

**PREVALÊNCIA DAS MUTAÇÕES EM GENES DE PREDISPOSIÇÃO AO
MELANOMA HEREDITÁRIO NOS PACIENTES DO INCA**

Dissertação apresentada ao Instituto Nacional de Câncer como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Oncologia

Orientadores: Prof^a. Dra. Andreia Cristina de Melo
Prof. Dr. Jorge Ricardo Machado

**RIO DE JANEIRO
2022**

A745p Arnaut, Joyce Ribeiro Moura Brasil
Prevalência das mutações em genes de predisposição ao melanoma hereditário nos pacientes do
INCA. / Joyce Robeiro Moura Brasil Arnaut – Rio de Janeiro, 2022.
79 f. il. Color.

Dissertação (Mestrado em Oncologia) – Programa de Pós-Graduação em Oncologia, Instituto
Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2022.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Andreia Cristina de Melo

CoOrientador: Prof. Dr. Jorge Ricardo Machado

1. Melanoma. 2. Melanoma Hereditário. 3. CDKN2A. 4. CDK4. 5. Aconselhamento Genético.
6. Testes Genéticos. I. (Orient.). Melo, Andreia Cristina de. II. (CoOrient.). Machado, Jorge Ricardo.
III. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. IV. Título.

CDD 616.99477

Catálogo na fonte
Kátia Simões CRB7/5952



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação
INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER**

Pós-Graduação em Oncologia

JOYCE RIBEIRO MOURA BRASIL ARNAUT

**PREVALÊNCIA DAS MUTAÇÕES EM GENES DE PREDISPOSIÇÃO AO
MELANOMA HEREDITÁRIO NOS PACIENTES DO INCA**

ORIENTADORES: Prof^a. Dra. Andreia Cristina de Melo
Prof. Dr. Jorge Ricardo Machado

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Miguel Angelo Martins Moreira
Prof. Dr. Vinicius de Lima Vazquez
Prof. Dr. Patrícia Abrão Possik
Prof. Dr. Luiz Henrique de Lima Araujo – Suplente I
Prof. Dr. Alberto Julius Alves Wainstein – Suplente II

RIO DE JANEIRO

2022



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

**PREVALÊNCIA DAS MUTAÇÕES EM GENES DE PREDISPOSIÇÃO AO MELANOMA
HEREDITÁRIO NOS PACIENTES DO INCA**

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Joyce Ribeiro Moura Brasil Arnaut

Introdução: O melanoma é considerado o câncer de pele mais letal com incidência crescente nas últimas décadas. Cerca de 10% dos casos são classificados como melanoma hereditário (MH). A predisposição genética geralmente se manifesta como idade de início precoce e múltiplos melanomas cutâneos. Diversos genes estão envolvidos na suscetibilidade ao melanoma. *CDKN2A*, o principal, e *CDK4* foram os primeiros genes de alto risco descobertos. Além do melanoma, as famílias também são mais propensas a desenvolver outros tumores, como o câncer de pâncreas. A identificação de famílias de risco e genes envolvidos é de grande importância, uma vez que são recomendadas diferentes formas de vigilância oncológica.

Objetivos: Identificar a prevalência das mutações germinativas em *CDKN2A* e *CDK4* em pacientes do INCA com critérios clínicos para MH. Descrever as características fenotípicas e histopatológicas.

Materiais e métodos: O desenho de estudo foi observacional descritivo transversal. Foram incluídos 69 pacientes de acordo com os critérios clínicos para MH. Todos foram encaminhados para aconselhamento genético e coleta de amostras de sangue periférico. Para análise mutacional dos genes, utilizou-se amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida de sequenciamento genômico. As variantes encontradas foram classificadas de acordo com sua patogenicidade utilizando os critérios da *American College of Medical Genetics* (ACMG).

Resultados: Foram recrutados 30 homens (43,5%) e 39 mulheres (56,5%) e a idade média do primeiro diagnóstico de melanoma foi de 44,8 anos (DP±17,83). A maior parte dos pacientes apresentou fototipo II (44,9%), mais do que 50 nevos melanocíticos (76,8%), síndrome do nevo atípico (72,5%), história de queimadura solar (76,8%) e múltiplos melanomas primários sem história familiar desse tumor (74,3%). Foram observados 200 melanomas. A maioria dos tumores teve índice de Breslow $\leq 1,0$ mm (84,5%), localização no tronco (60,5%) e subtipo histológico extensivo superficial (22,5%). Foram encontradas 4 variantes nos éxons de *CDKN2A* em 7 pacientes (c.305C>A, c.26T>A, c.361G>A e c.442G>A), 2 variantes na região 5'UTR em 5 pacientes (c.-25C>T e c.-33G>C) e 2 variantes na região 3'UTR em 21 pacientes (c.*29C>G e c.*69C>T). Apenas uma variante provavelmente patogênica (c.305C>A) foi identificada em um paciente (1,4%). Não foi encontrada nenhuma variante em *CDK4*.

Discussão: Este é o primeiro estudo sobre MH realizado no INCA e no Rio de Janeiro. No Brasil, é a maior coorte unicêntrica de pacientes com critérios clínicos para MH submetida à pesquisa de variantes nos genes *CDKN2A* e *CDK4*. A baixa prevalência de mutações pode ser devida a algumas limitações deste estudo. Existem outros genes de alto risco para MH que não foram avaliados e a técnica utilizada para a pesquisa das variantes (sequenciamento) não contempla todas as possibilidades de alterações. É possível que a predisposição ao melanoma na população do estudo seja proveniente da interação entre os fatores ambientais e as características fenotípicas de risco. Os achados são compatíveis com os dados brasileiros publicados, os quais também revelam baixa prevalência de variantes patogênicas (0-15,3%).

Conclusão: A prevalência de mutações no gene *CDKN2A* foi de 1,4% na população de pacientes do INCA que preenchem os critérios clínicos para MH.

ABSTRACT

Introduction: Melanoma is considered the most lethal skin cancer and its incidence has increased during the past decades. About 10% of cases are classified as hereditary melanoma (HM). Genetic predisposition usually manifests itself clinically as early onset and multiple cutaneous melanomas. Several genes have been identified as involved to melanoma susceptibility. CDKN2A and CDK4 were the first high-risk genes discovered. Beyond melanoma, families are also more prone to develop other malignancies, such as pancreatic cancer. The identification of risk families and involved genes is of great importance, since different forms of oncological surveillance are recommended.

Objectives: Identify the prevalence of germline mutations in CDKN2A and CDK4 in INCA patients meeting clinical criteria for HM. Describe the phenotypic and histopathological characteristics and correlate the presence of mutations with these data.

Materials and methods: The study design was cross-sectional descriptive. A total of 69 patients meeting clinical criteria for HM were included. Patients were referred for genetic counseling and peripheral blood collection. For mutational analysis of genes, amplification by polymerase chain reaction (PCR) followed by genomic sequencing was used. The variants found were classified according to their pathogenicity using the criteria of the American College of Medical Genetics (ACMG).

Results: A total of 30 men (43.5%) and 39 women (56.5%) were recruited and the mean age at first diagnosis of melanoma was 44.8 years ($SD \pm 17.83$). Most patients had phototype II (44.9%), more than 50 melanocytic nevi (76.8%), atypical nevus syndrome (72.5%), history of sunburn (76.8%) and multiple primary melanomas without a family history of this tumor (74.3%). 200 melanomas were observed. Most tumors had a Breslow index ≤ 1.0 mm (84.5%), location in the trunk (60.5%) and superficial spreading histological subtype (22.5%). Four variants were found in CDKN2A exons in 7 patients (c.305C>A, c.26T>A, c.361G>A e c.442G>A), 2 variants in the 5'UTR region in 5 patients (c.-25C>T and c.-- 33G>C) and 2 variants in the 3'UTR region in 21 patients (c.*29C>G and c.*69C>T). Only one likely pathogenic variant (c.305C>A) was identified in one patient (1.4%). No variant was found in CDK4.

Discussion: This is the first study about HM carried out at INCA and in Rio de Janeiro. In Brazil, it is the largest single-center cohort of patients meeting clinical criteria for HM submitted to the search for variants in the CDKN2A and CDK4 genes. The low prevalence of mutations can be explained by limitations of this study. There are other high-risk genes for HM that have not been evaluated and the technique for searching variants (sequencing) does not cover all the possibilities of alterations. It is possible that the predisposition to melanoma in the study population comes from the interaction between environmental factors and phenotypic risk characteristics. The findings are consistent with published Brazilian data, which have also revealed a low prevalence of pathogenic variants (0-15.3%).

Conclusion: The prevalence of mutations in the CDKN2A gene was 1.4% in the INCA patient population meeting clinical criteria for HM.

Dedico este trabalho à minha família. Vocês são a razão da minha vida. Para
você, todo o meu amor.

Agradecimentos

Como em tudo em minha vida, começo agradecendo a Deus. Sem Ele, nada seria possível. Ele permitiu a realização deste projeto, e ao lado dos melhores companheiros. Ele me deu as forças necessárias e me sustentou até aqui.

Agradeço a Ele por ter colocado em meu caminho cada membro deste grupo de pesquisa. Tive a oportunidade de participar de um autêntico trabalho em equipe. Absolutamente tudo que está escrito nesta dissertação foi fruto da minha interação com pessoas incrivelmente estudiosas, dedicadas e amorosas, tomadas pelo espírito de serviço e ensino. Cada uma desempenhando seu papel único e fundamental.

Obrigada aos meus queridos orientadores, Dra. Andreia Melo e Dr. Jorge Machado. Vocês foram verdadeiros Mestres em quem me espelharei e me inspirarei para toda a vida. Estiveram comigo desde o início, estipulando cada meta a ser atingida, fornecendo todos os recursos para meu aprendizado, revisando cada palavra e raciocínio, elucidando toda e qualquer dúvida. Vocês guiaram cada passo e abriram todos os caminhos para que eu pudesse avançar. Sempre cuidando e ensinando, incansavelmente.

Obrigada às queridas companheiras de pesquisa, Dra. Ana Cláudia Evangelista e Dra. Isabella Guimarães. Vocês foram pilares fundamentais para a realização deste estudo. Cada paciente envolvido neste projeto necessitou da colaboração preciosa do trabalho de vocês. Obrigada também por todas as sugestões, discussões e esclarecimentos que tanto me ajudaram em tudo que eu não podia compreender.

Obrigada à biomédica Elizângela Rodrigues, que trabalhou com as amostras deste estudo e com quem fiz os treinamentos no laboratório; à Dra. Laila Gallo, pela colaboração no aconselhamento genético; à Dra. Patrícia Possik, pelo fornecimento da linhagem de melanoma; à equipe do Laboratório de Genética do INCA, pelo auxílio com o sequenciamento; à Sra. Joelma, pelo transporte das amostras; e aos pacientes, pela generosa e voluntária participação. A contribuição de vocês foi essencial e valiosa em diferentes etapas da realização deste estudo.

Obrigada à querida equipe que trabalhou diretamente comigo durante a realização deste projeto na Dermatologia do INCA: Dr. Dolival Lobão, Dra. Gabriella Campos, Dra. Luiza Kassuga, Dr. Ayres Cunha, Dr. João Paulo Yamagata e Dr. Thales Azevedo. Obrigada também aos médicos *fellows*, estagiários e aos

funcionários da seção. O auxílio e o apoio de vocês, principalmente durante a identificação e recrutamento dos pacientes, foram imprescindíveis.

E, finalmente, agradeço a Deus por ter me abençoado com uma família que sempre me apoiou. Não tenho palavras para agradecer meu marido, Marcos Aurélio, que sonhou comigo desde o início a conquista deste título. Que compreendeu minha ausência para me dedicar aos estudos. Que cuidou da nossa filhinha, Isabela, quando eu não podia. Sempre me incentivando em cada etapa, realçando as vitórias, consolando as derrotas. E que sempre me motivou na busca pelo crescimento pessoal, profissional e espiritual.

Agradeço também, infinitamente, aos meus queridos pais, Gelson e Mariselma. Meus grandes exemplos, que sempre me ensinaram a importância do estudo, do trabalho honesto, da caridade e da fé. Obrigada por terem, além de tudo, constituído a sólida rede de apoio dentro da minha casa, ao lado das queridas funcionárias Aparecida e Djanira. Com a ajuda de vocês, eu tive tranquilidade para estudar e seguir.

Tenho, portanto, muito a agradecer. Tantas pessoas especiais e tantos aprendizados inestimáveis ao longo do caminho. Peço a Deus que eu consiga honrar cada gota do auxílio que todos vocês me deram com muito amor, muita gratidão e contínua evolução. Obrigada!

Sumário

Lista de tabelas.....	xi
Lista de figuras.....	xii
1.Introdução.....	13
2.Objetivos.....	28
3.Materiais e métodos.....	28
4.Resultados.....	35
5.Discussão.....	48
6.Perspectivas.....	56
7.Conclusões.....	57
Referências.....	58
Anexo I.....	70
Anexo II.....	71
Anexo III.....	74
Anexo IV.....	79

Lista de tabelas

Tabela 1.1: Principais genes associados ao melanoma.

Tabela 1.2: Vigilância oncológica no paciente carreador de mutação em *CDKN2A*.

Tabela 3.1: Classificação de Fitzpatrick adaptada.

Tabela 3.2. Sequência dos iniciadores.

Tabela 4.1. Principais características clínicas e histopatológicas observadas.

Tabela 4.2.: Características dos pacientes com melanoma pessoal e familiar (1º e 2º graus).

Tabela 4.3.: Variantes identificadas e frequências.

Tabela 4.4: Associação entre características clínicas/histopatológicas e as variantes p.A148T, c.*29C>G e c.*69C>T.

Tabela 5.1.: Classificação das variantes pelos critérios da ACMG.

Lista de figuras

Figura 1.1: Representação esquemática do gene *CDKN2A*.

Figura 1.2: Critérios sugeridos para testes genéticos no Brasil.

Figura 4.1. Eletroferograma do éxon 1 α do gene *CDKN2A* (p.M9K).

Figura 4.2. Eletroferograma do éxon 2 do gene *CDKN2A* (p.A102E).

Figura 4.3. Eletroferograma do éxon 2 do gene *CDKN2A* (p.A121T/p14).

Figura 4.4. Eletroferograma do éxon 2 do gene *CDKN2A*. (p.A148T).

Figura 4.5. Eletroferograma da região 5'UTR do gene *CDKN2A* (c.-33G>C).

Figura 4.6. Eletroferograma da região 5'UTR do gene *CDKN2A* (c.-25C>T).

Figura 4.7. Eletroferograma do éxon 2 do gene *CDK4* na linhagem de melanoma SKMEL-28.

1. **Introdução**

O melanoma é um tumor maligno que surge da proliferação descontrolada de melanócitos. A incidência de melanoma tem aumentado nas últimas décadas, representando o 6º câncer mais comum nos países desenvolvidos (SOURA et al., 2016a; “U.S. Cancer Statistics Data Visualizations Tool | CDC”, 2019). O melanoma é considerado o câncer de pele mais letal, responsável por cerca de 60.000 mortes por ano no mundo, de acordo com a estimativa do GLOBOCAN para 2018 (BRAY et al., 2018). Segundo o Instituto Nacional de Câncer, a incidência ajustada estimada para o ano de 2020 foi de 4.200 casos/ano para homens e 4.250 casos/ano para mulheres (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2019). Além disso, a taxa de incidência mediana na população brasileira quase dobrou entre 2000 e 2013 (DE MELO et al., 2018). Apesar disso, o Brasil é considerado um país com baixa incidência de melanoma - a taxa de incidência estimada ajustada por 100.000 pessoas é de 2,01 para o sexo masculino e 1,78 para o sexo feminino (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2019). No entanto, existem diferenças regionais significativas. Um estudo realizado no estado de São Paulo mostrou que cerca de dez municípios possuem altas taxas de incidência de melanoma (taxa de incidência ajustada superior a 10 para cada 100.000 habitantes) (AMANCIO; NASCIMENTO, 2014). Além disso, as taxas de incidência estimadas ajustadas por 100 mil pessoas em Santa Catarina são de 10,05 para homens e 7,99 para mulheres (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2019).

A etiologia do melanoma tem sido atribuída principalmente a fatores ambientais (exposição à luz ultravioleta em pessoas com suscetibilidade fenotípica) e, com menor frequência, à predisposição genética (POTRONY et al., 2015). Cerca de 90% dos casos de melanoma são considerados esporádicos e apenas 10% são classificados como melanoma hereditário. Contudo, entre os pacientes com histórico familiar de melanoma, não necessariamente há variantes patogênicas envolvidas. Uma parte dos melanomas nessas famílias podem ser esporádicos, relacionados a características compartilhadas entre os familiares, como os hábitos de exposição solar e as características fenotípicas (GOLDSTEIN; TUCKER, 2001). A predisposição genética geralmente se manifesta clinicamente como múltiplos melanomas cutâneos e diagnóstico em idade precoce.

Famílias predispostas têm um risco ao longo da vida de desenvolver melanoma cerca de 30 a 70 vezes maior do que a população em geral (HANSEN et al., 2004). As famílias afetadas também são mais propensas a desenvolver outras malignidades, como câncer de pâncreas e carcinoma de células renais (GOLDSTEIN et al., 1995; BERTOLOTTO et al., 2011). Além disso, a possível influência das mutações na resposta ao tratamento (HELGADOTTIR et al., 2020) e na sobrevida (HELGADOTTIR et al., 2016) já foi descrita. Portanto, a identificação de famílias em risco tem impacto na prevenção do câncer e nas medidas ativas de vigilância (LEACHMAN et al., 2017).

1.2. Principais genes de suscetibilidade ao melanoma

Nas últimas décadas, diversos genes foram identificados na suscetibilidade ao melanoma (Tabela 1.1) (AOUDE et al., 2015b; POTRONY et al., 2015; READ; WADT; HAYWARD, 2016; VISSER; VAN DER STOEP; GRUIS, 2019). Recentemente, publicamos um artigo de revisão sobre os principais genes de predisposição, as indicações de teste genético e as recomendações de acompanhamento clínico e vigilância oncológica (Anexo I).

Os genes podem ser divididos em três categorias de acordo com o risco relativo (RR) de desenvolver a doença ao longo do tempo: alta penetrância (RR >5), média penetrância (RR entre 2-5) e baixa penetrância (RR <2) (DOMCHEK et al., 2013).

Os genes de alta penetrância conhecidos são: *CDKN2A*, *CDK4*, *BAP1*, *POT1*, *ACD*, *TERT* e *TERF2IP* (CANNON-ALBRIGHT et al., 1992; KAMB et al., 1994; GOLDSTEIN; TUCKER, 1995; ZUO et al., 1996; SOUFIR et al., 1998; CARBONE et al., 2013; ROBLES-ESPINOZA et al., 2014; AOUDE et al., 2015a; HARLAND et al., 2016). Esses genes estão associados a aproximadamente 50% dos casos de MH (READ; WADT; HAYWARD, 2016). A frequência relativamente baixa de mutações de alta penetrância sugere que o melanoma é herdado como uma doença poligênica envolvendo múltiplos genes e fatores de risco ambientais.

A presença de múltiplos genes de média e de baixa penetrância também contribui para a predisposição ao melanoma, principalmente quando combinada com alta exposição à radiação ultravioleta - o principal fator de risco ambiental para o desenvolvimento de melanoma (BADENAS et al., 2012). Foram identificadas variantes de média penetrância em genes envolvidos na variação da pigmentação

natural, como *MC1R* e *MITF* (GOLDSTEIN et al., 2005; YOKOYAMA et al., 2011; ROSSI et al., 2019).

Além disso, outros genes como *TP53* (MAI et al., 2016), *RBI* (TONOREZOS et al., 2020), *BRCA2* (GUMASTE et al., 2015) e *PTEN* (BUBIEN et al., 2013), relacionados a outras síndromes clássicas de predisposição hereditária ao câncer, também podem aumentar o risco de melanoma.

Tabela 1.1: Principais genes associados ao melanoma hereditário.

Gene	Proteína	Função	Fenótipo e Malignidades	Prevalência das mutações
<i>CDKN2A</i>	p16 ^{INK4a}	regula a transição da fase G1 para S	Múltiplos nevos melanocíticos atípicos. Múltiplos melanomas primários. Câncer de pâncreas, pulmão, esôfago, mama. Câncer gástrico, colorretal e outros (GOLDSTEIN et al., 1995; BORG et al., 2000; HELGADOTTIR et al., 2014; SOURA et al., 2016a; TOUSSI et al., 2020)	0-40% das famílias predispostas ao melanoma (GOLDSTEIN et al., 2007; GRAZZIOTIN et al., 2013; ROSSI et al., 2019)
	Alto risco	p14 ^{ARF}	estabilização da p53	Melanoma, astrocitoma, neurofibromas e schwannomas (SOURA et al., 2016a; TOUSSI et al., 2020)
<i>CDK4</i>	CDK4	regula a transição da fase G1 para S	Múltiplos nevos melanocíticos atípicos. Múltiplos melanomas primários. Câncer pancreático, pulmonar, esofágico, gástrico, colorretal e de mama (PUNTERVOLL et al., 2013; SOURA et al., 2016a)	0,68%-1,4% das famílias predispostas ao melanoma (POTRONY et al., 2015; HARLAND et al., 2016)

<i>BAP1</i>	BAP1	diferenciação celular e resposta a danos ao DNA	BAPomas cutâneos. Melanomas cutâneos e uveais, mesotelioma, carcinoma de células renais, carcinoma basocelular, meningioma e outros (WANG et al., 2016; ZHANG et al., 2019)	<1% das famílias propensas ao melanoma (AOUDE et al., 2015b; POTRONY et al., 2015; ZHANG et al., 2019)
<i>POT1</i>	POT1	manutenção dos telômeros	Melanoma, glioma, câncer colorretal e de tireoide, angiosarcoma cardíaco, leucemia linfocítica crônica (PASTORINO et al., 2020; TOUSSI et al., 2020)	0,48%-1,7% das famílias propensas ao melanoma (ROBLES-ESPINOZA et al., 2014; POTRONY et al., 2015; TOUSSI et al., 2020)
<i>ACD</i>	ACD	manutenção dos telômeros	Melanoma, câncer de mama, ovário, colo de útero, cólon, pulmão, rim, vias urinárias, próstata, esôfago e outros (SOURA et al., 2016b; TOUSSI et al., 2020)	<1% das famílias propensas ao melanoma (AOUDE et al., 2015a, 2015b; POTRONY et al., 2015)
<i>TERT</i>	Subunidade catalítica da telomerase	alongamento dos telômeros	Múltiplos nevos melanocíticos. Melanoma, câncer de ovário, rim, bexiga, mama, brônquios e carcinoma basocelular (HARLAND et al., 2016; SOURA et al., 2016b; TOUSSI et al., 2020)	0,04%-0,7% das famílias propensas ao melanoma (POTRONY et al., 2015; HARLAND et al., 2016)

	<i>TERF2IP</i>	TERF2IP	manutenção dos telômeros	Melanoma, câncer de mama, ovário, colo de útero, cólon, pulmão, rim, vias urinárias, próstata e esôfago, linfomas e leucemias (TOUSSI et al., 2020)	<1% das famílias propensas ao melanoma (AOUDE et al., 2015a, 2015b; POTRONY et al., 2015)
Médio risco	<i>MITF</i>	MITF	desenvolvimento e diferenciação de melanócitos	Múltiplos nevos melanocíticos, pele clara e olhos não azuis. Melanoma, carcinoma de células renais, câncer de mama e pâncreas, linfoma (YOKOYAMA et al., 2011; STURM et al., 2014; POTRONY et al., 2015; SOURA et al., 2016b; TOUSSI et al., 2020)	1,6% - 2,8% dos pacientes com melanoma (BERTOLOTTI et al., 2011; YOKOYAMA et al., 2011; GHIORZO et al., 2013; CICCARESE et al., 2020)
	<i>MC1R</i>	MC1R	regula a produção de melanina pelos melanócitos	Cabelo ruivo, pele clara, sardas e sensibilidade à RUV (alelos R). Melanoma (FARGNOLI et al., 2010; TOUSSI et al., 2020)	61-66% dos pacientes com melanoma (pelo menos uma variante principal do <i>MC1R</i>) (WILLIAMS et al., 2011; PASQUALI et al., 2015)

1.2.1. *Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A)*

O *CDKN2A* é o principal gene de alto risco para melanoma. A mutação germinativa desse locus é encontrada em aproximadamente 20 a 40% dos casos de melanoma hereditário. Contudo, sua frequência e penetrância variam amplamente de acordo com a região geográfica (GOLDSTEIN et al., 2007; ASHTON-PROLLA et al., 2008; DE ÁVILA et al., 2014; PUIG et al., 2016). Um estudo realizado nos Estados Unidos, na Europa e na Austrália, identificou uma variação de prevalência de 20-57% (GOLDSTEIN et al., 2007). Também foi descrita uma importante variação na penetrância: aos 80 anos, a penetrância foi de 0,58 na Europa, 0,76 nos EUA e 0,91 na Austrália. Os portadores geralmente têm numerosos nevos melanocíticos atípicos e múltiplos melanomas primários. Os melanomas extensivo superficial e *in situ* são os subtipos histológicos mais frequentes (GIRONI et al., 2018).

O *CDKN2A* foi o primeiro gene associado à susceptibilidade ao melanoma (CANNON-ALBRIGHT et al., 1992; HUSSUSSIAN et al., 1994; KAMB et al., 1994; GOLDSTEIN; TUCKER, 1995). Localizado no cromossomo 9p21, apresenta quatro éxons (1 α , 1 β , 2 e 3) que codificam duas proteínas supressoras de tumor não relacionadas, p16^{INK4a} e p14^{ARF}, traduzidas em quadros de leitura diferentes, a partir de transcritos provenientes de *splicing* alternativo (Figura 1.1). Consequentemente, p16^{INK4a} e p14^{ARF} não são isoformas e têm funções distintas nas células.

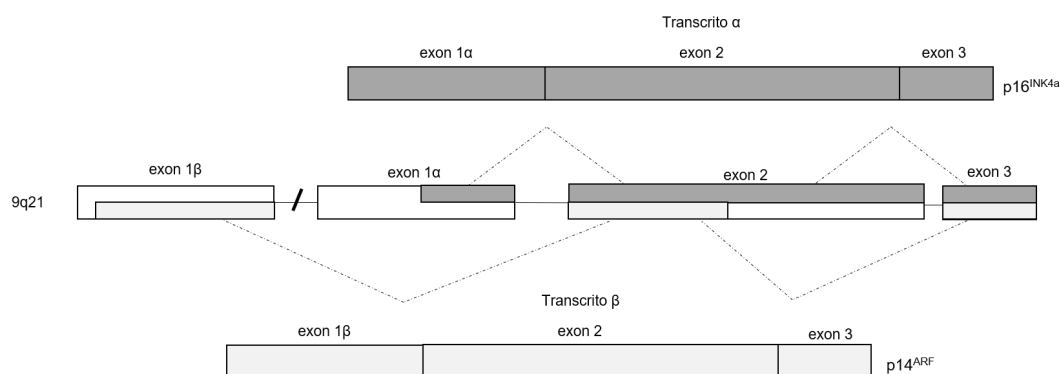


Figura 1.1: Representação esquemática do gene *CDKN2A*. O gene *CDKN2A* codifica dois transcritos por *splicing* alternativo, p16^{INK4a} e p14^{ARF}, que diferem em seu primeiro éxon. Éxons 1α, 2 e 3 codificam p16^{INK4a}. Éxon 1β, 2 e 3, ligados em um quadro de leitura diferente e transcritos usando um promotor diferente, codificam p14^{ARF}.

A proteína p16^{INK4a}, codificada pelo transcrito α (proveniente dos éxons 1α, 2 e 3), funciona como um regulador de ciclo celular. Ela inibe os complexos de fosforilação dependentes de ciclina 4(CDK4)/6-ciclina D1 e previne a fosforilação da proteína do retinoblastoma (pRb). Uma pRb hipofosforilada associa-se a fatores de transcrição E2F e bloqueia sua capacidade de ativar a transcrição de diversas proteínas necessárias para a transição da fase G1 para S. Portanto, a perda de função do p16^{INK4a} aumenta a atividade CDK4/6-ciclina D1 quinase, que promove a hiperfosforilação de pRb, que não é mais capaz de regular pontos de checagem de ciclo celular (SERRANO; HANNON; BEACH, 1993; GIACINTI; GIORDANO, 2006).

A segunda proteína codificada por *CDKN2A*, p14^{ARF}, é produzida a partir do transcrito β dos éxons 1β, 2 e 3. p14^{ARF} é uma proteína supressora de tumor que tem um papel fundamental na regulação do ciclo celular, senescência e apoptose. Uma das funções mais bem definidas do p14^{ARF} está ligada ao eixo p53-MDM2. A interação do p14^{ARF} com o MDM2 impede a ubiquitinação mediada pelo MDM2, a exportação nuclear e a degradação da p53 pelo proteossoma. Isso permite a estabilização da p53 e, conseqüentemente, a expressão de genes alvo que levam à restrição do ciclo celular, apoptose ou senescência (ZHANG; XIONG; YARBROUGH, 1998; KO; HAN; SONG, 2018). Portanto, a inativação do locus

CDKN2A desempenha um papel importante na resposta aos danos celulares, proliferação celular e apoptose.

As variantes patogênicas são predominantemente do tipo *missense* e se encontram distribuídas ao longo de toda a proteína (AOUDE et al., 2015b). As mais comuns são p.M53I, p.G101W, p.R24P, p.V126D, p.L32P, p.R112_L113insR, c.225_243del19 e c.32_33ins9-32 (GOLDSTEIN et al., 2006). Variantes na região promotora de *CDKN2A* (c.-34G>T) e em região intrônica profunda (c.IVS2-105A>G) também estão entre as mais frequentes (GOLDSTEIN et al., 2006).

No Brasil, apenas 4 estudos foram publicados para avaliar a frequência das mutações de *CDKN2A* em pacientes com critérios clínicos para melanoma hereditário (HUBER; RAMOS, 2006; ASHTON-PROLLA et al., 2008; GRAZZIOTIN et al., 2013; DE ÁVILA et al., 2014). A maior coorte apresentou 59 pacientes da região Sudeste (DE ÁVILA et al., 2014). Considerando os trabalhos brasileiros, as variantes patogênicas identificadas foram c.-34G>T (4 casos), p.P48T (4 casos), p.G101 W (1 caso), p.M53I (1 caso) e c.IVS2- 105A>G (1 caso).

Goldstein et al. (GOLDSTEIN et al., 1995) mostraram um risco 22 vezes maior de desenvolver câncer de pâncreas em pacientes com mutação *CDKN2A*. A mutação fundadora *p16-Leiden* foi descrita como a que apresenta o maior risco de desenvolver câncer de pâncreas ao longo da vida (em torno de 16%) (LEVIN; MÆHLE, 2017). Além do melanoma e do câncer de pâncreas, a mutação *CDKN2A* foi descrita em um amplo espectro de tipos de câncer, como: câncer de mama, astrocitoma, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, carcinoma pulmonar de células não pequenas, carcinoma esofágico de células escamosas, câncer gástrico, câncer colorretal, carcinoma epitelial ovariano e câncer de próstata (BORG et al., 2000; HELGADOTTIR et al., 2014; SOURA et al., 2016a; LEACHMAN et al., 2017). Entre os portadores de mutação *CDKN2A*, o risco ao longo da vida de qualquer câncer não melanoma foi estimado em 59% aos 85 anos (MUKHERJEE et al., 2012).

1.2.2. Cyclin-dependent kinase 4 (CDK4)

O *CDK4* foi o segundo gene de alto risco identificado (ZUO et al., 1996; SOUFIR et al., 1998). O *CDK4* está localizado no cromossomo 12q14 e desempenha um papel importante na progressão do ciclo celular normal. Mutações germinativas em *CDK4* impactam na mesma via que as mutações em *CDKN2A*.

Até o momento, apenas duas variantes patogênicas de *CDK4* foram identificadas (p.R24C e p.R24H) em apenas um pequeno número de famílias com melanoma (ZUO et al., 1996; SOUFIR et al., 1998; MOLVEN et al., 2005; PUNTERVOLL et al., 2013; AOUDE et al., 2015b). Essas variantes raras ocorrem no códon 24 do éxon 2, levando à substituição da arginina por cisteína ou histidina. A arginina neste códon é fundamental para permitir que p16^{INKa} se ligue à CDK4. Substituições desse aminoácido resultam, portanto, na atividade cinase constitucional de CDK4, promovendo crescimento descontrolado, heterogeneidade tumoral, invasão e metástase (SOUFIR et al., 1998; PUNTERVOLL et al., 2013). As mutações nesse sítio são, portanto, oncogênicas.

Fenotipicamente, as famílias carreadoras são indistinguíveis daquelas com mutações *CDKN2A*, apresentando melanoma cutâneo de início precoce, múltiplos melanomas primários, múltiplos nevos melanocíticos atípicos e associação com diferentes tipos de câncer (PUNTERVOLL et al., 2013; AOUDE et al., 2015b; SOURA et al., 2016a).

Um estudo com 17 famílias carreadoras de mutação em *CDK4* revelou que 41,7% dos pacientes com melanoma apresentavam múltiplos melanomas primários. A penetrância da mutação aos 50 anos foi de 74,2% (PUNTERVOLL et al., 2013).

1.3. Teste genético para melanoma: quando solicitar?

Antes de solicitar um teste genético, há questões a serem abordadas para estabelecer a sua validade clínica e a sua utilidade. As variantes estão associadas ao risco de melanoma? Quais variantes ou classes de variantes estão associadas a esse risco? Qual é a magnitude desse risco? Quais são os métodos utilizados para estimar esse risco? Todas essas perguntas devem ser consideradas (EASTON et al., 2015).

O aconselhamento genético deve ser oferecido às famílias de risco para uma melhor compreensão de sua susceptibilidade genética e das possibilidades de testes, para apoio psicológico e esclarecimento das medidas de prevenção primária e secundária (BADENAS et al., 2012; POTRONY et al., 2015; LEVIN; MÆHLE, 2017). O aconselhamento pode estimular o autoexame da pele, o uso diário adequado do protetor solar, a redução da exposição à radiação ultravioleta e a adesão às consultas médicas e exames de rotina (HANSEN et al., 2004; “Genetic Counseling”, 2008; ASPINWALL et al., 2013; POTRONY et al., 2015; LEVIN; MÆHLE, 2017). O aconselhamento genético pode beneficiar, inclusive, as famílias

sem mutação identificada. Isso porque esses indivíduos têm um risco duas vezes maior de desenvolver melanoma devido a outros genes de suscetibilidade não conhecidos e aos fatores ambientais. Essas famílias podem ser participantes de protocolos de pesquisa para novos genes de predisposição (HANSEN et al., 2004; POTRONY et al., 2015).

Em 2009, foi publicada uma diretriz internacional estabelecendo os critérios clínicos para a seleção de pacientes para a realização do teste da mutação em *CDKN2A* (LEACHMAN et al., 2009). Para países com baixa incidência de melanoma (taxa de incidência ajustada inferior a 10 para cada 100.000 habitantes) como Itália, França e Brasil, foi sugerida a “regra dos 2”: ocorrência de dois ou mais melanomas cutâneos no mesmo indivíduo; ou um caso de melanoma invasivo com um ou mais casos de melanoma e/ou câncer de pâncreas em parentes de primeiro ou segundo grau. Para países com alta incidência de melanoma (taxa de incidência ajustada superior a 10 para cada 100.000 habitantes), como os Estados Unidos e a Austrália, o critério sugerido é a “regra dos 3”: ocorrência de três ou mais melanomas no mesmo indivíduo; ou um indivíduo com melanoma invasivo e dois ou mais casos de melanoma e/ou câncer de pâncreas em parentes de primeiro ou segundo grau (LEACHMAN et al., 2009).

Em famílias com múltiplos casos de melanoma, o teste deve ser inicialmente feito no indivíduo mais jovem diagnosticado com câncer ou naquele com características clínicas fortemente sugestivas de predisposição (LEACHMAN et al., 2017). Se o indivíduo tiver um teste negativo, mas a história familiar for fortemente sugestiva de uma síndrome de predisposição ao câncer hereditário, existe a possibilidade de tratar-se de um câncer esporádico no contexto de uma família com síndrome hereditária. Nesse cenário, outro membro da família deve ser avaliado (LEACHMAN et al., 2017).

O melanoma hereditário apresenta um padrão de herança autossômico dominante. Descendentes do probando têm 50% de chance de herdar a variante patogênica. Os pais do probando também devem ser testados, tendo em vista a chance de carregarem a mutação (HANSEN et al., 2004; BADENAS et al., 2012; SOURA et al., 2016a).

1.4. Teste genético para melanoma: quando ampliar o painel?

Conforme discutido no artigo do Anexo I, há uma tendência mundial para a solicitação de painéis genéticos ampliados, que podem ser valiosos para uma melhor compreensão do melanoma hereditário no futuro. De fato, diante das recentes descobertas e da disponibilidade comercial dos testes, a avaliação de outros genes de suscetibilidade além do *CDKN2A* e *CDK4* em famílias de risco pode ser uma estratégia interessante. Entretanto, de acordo com a Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO), para que o teste genético seja custo-efetivo, é necessária uma probabilidade de positividade pré-teste de 10%. Portanto, o teste genético é mais bem indicado quando oferecido a grupos específicos (HANSEN et al., 2004; POTRONY et al., 2015; PASTORINO et al., 2020). Nesse sentido, considerando a raridade das outras mutações e a realidade de países como o Brasil - onde poucos estudos foram realizados nesse campo (ASHTON-PROLLA et al., 2008; GRAZZIOTIN et al., 2013; DE ÁVILA et al., 2014; PUIG et al., 2016) e onde os recursos financeiros devem ser otimizados – é sugerida uma abordagem individualizada dos pacientes, de acordo com o histórico familiar e genes provavelmente estão envolvidos (Figura 1.2).

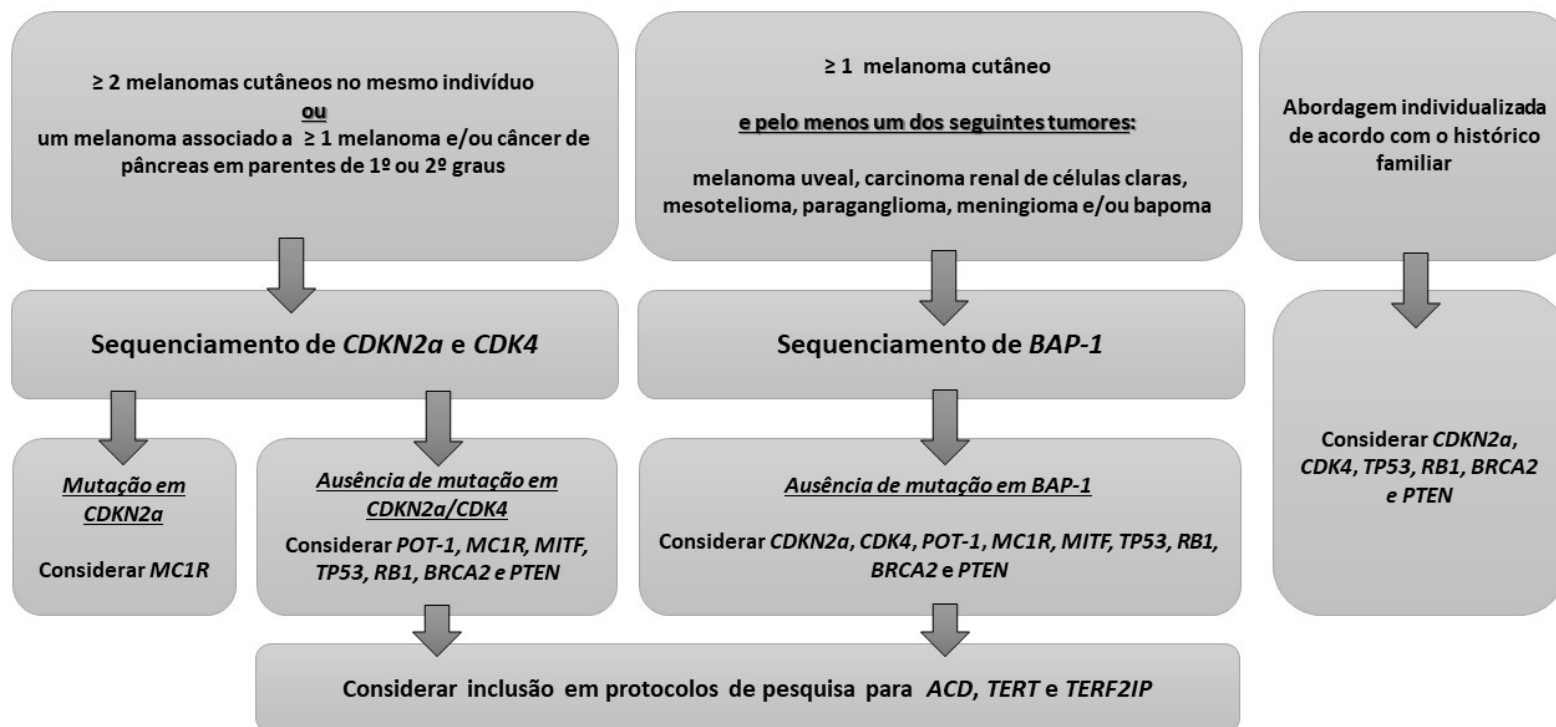


Figura 1.2: Critérios sugeridos para testes genéticos no Brasil. Adaptado de Leachman *et al.* (LEACHMAN et al., 2009, 2017), AAD (SWETTER et al., 2019) e diretrizes francesas (AVRIL et al., 2015).

1.5. Melanoma hereditário: como acompanhar?

A vigilância oncológica recomendada para os portadores de mutação em *CDKN2A* está resumida na Tabela 1.2. O *International Melanoma Genetics Consortium* recomenda um acompanhamento dermatológico intensivo a partir dos 10 anos de idade. Inicialmente, o exame dermatológico deve incluir o mapeamento corporal total com dermatoscopia digital (MCTD). Posteriormente, é sugerido exame clínico a cada 3 a 6 meses e MCTD a cada 6 meses (KEFFORD et al., 1999; SOURA et al., 2016a). Durante a puberdade ou gravidez, quando os nevos melanocíticos podem ser instáveis, são indicados exames dermatológicos mais frequentes. Também é indicado auto exame mensal da pele realizado pelo próprio paciente ou familiar (KEFFORD et al., 1999; NCCN, [s.d.]). Além disso, considerando o risco ao longo da vida de desenvolver câncer de pâncreas, recomenda-se a vigilância pancreática contínua por uma equipe multidisciplinar (SYNGAL et al., 2015). A diretriz do *International Cancer of the Pancreas Screening Consortium* recomenda o início da vigilância aos 40 anos ou 10 anos antes da idade de diagnóstico do parente mais jovem afetado. A triagem inicial deve incluir ultrassom endoscópico e ressonância magnética/colangiopancreatografia magnética retrógrada (RM/MRCP). Durante o acompanhamento, os pacientes devem ser submetidos à vigilância anual por meio de exames de imagem. Se alguma anormalidade for identificada, uma equipe multidisciplinar deve decidir entre o acompanhamento a curto prazo ou exames complementares adicionais, como aspiração por agulha fina e/ou cirurgia (CANTO et al., 2013; GOGGINS et al., 2020).

Em geral, recomenda-se um baixo limiar para indicar biópsias de pele para essas famílias (HANSEN et al., 2004; LEACHMAN et al., 2017). As famílias com *pedigree* ou com mutações fortemente relacionadas aos tumores internos devem ser seguidas de acordo com os sinais e sintomas clínicos e/ou com ressonância magnética anual (LEACHMAN et al., 2017).

Ainda não há protocolos bem estabelecidos para o acompanhamento de pacientes portadores de mutação em *CDK4* devido à raridade dos casos (AOUDE et al., 2015b).

Tabela 1.2: Vigilância oncológica no paciente carreador de mutação em *CDKN2A*

Gene	Câncer	Abordagem	Frequência	Referências
<i>CDKN2A</i>		Exame dermatológico	3-6 meses	
	Melanoma	Mapeamento corporal total com dermatoscopia	6-6 meses	(CANTO et al., 2013; SOURA et al., 2016a; DALY et al., 2020;
	Câncer de pâncreas	Triagem inicial com ultrassom endoscópico e/ou colangiressonância RNM abdominal se disponível	12-12 meses	GOGGINS et al., 2020)
		Encaminhar para geneticista		

1.6. Melanoma hereditário: prognóstico

Há poucos estudos na literatura avaliando o impacto das mutações no prognóstico. Helgadottir *et al.* sugeriram uma sobrevida menor em indivíduos com melanoma portadores de mutação germinativa em *CDKN2A*, quando comparados com casos de melanoma esporádico (HELGADOTTIR et al., 2016, 2017). Além disso, mutações somáticas do *CDKN2A* já foram associadas ao aumento da proliferação tumoral, aumento do risco de metástase e redução da sobrevida em pacientes com melanoma cutâneo (HELGADOTTIR et al., 2020).

Recentemente, Helgadottir *et al.* avaliaram o efeito da imunoterapia em 19 pacientes com mutações germinativas em *CDKN2A* e diagnosticados com melanoma metastático. Foi demonstrada uma resposta terapêutica superior quando comparados aos dados históricos já publicados em ensaios clínicos. Esses achados sugerem que as mutações em *CDKN2A* podem ser fatores preditivos para uma boa resposta à imunoterapia. O que poderia ser justificado pela alta carga mutacional encontrada em tumores com mutações *CDKN2A* (HELGADOTTIR et al., 2020).

No entanto, um estudo de caso-controle de melanoma metastático constatou que o tempo de progressão da doença, sobrevida depois da primeira metástase e sobrevida global foram semelhantes nos casos de melanoma familiar e melanoma não familiar (HORNBUCKLE et al., 2003). Além disso, um grande estudo de

análise populacional de indicadores prognósticos em relação à sobrevida específica e global do melanoma sugeriu que os melanomas que ocorrem no contexto da predisposição hereditária não têm um comportamento biológico significativamente diferente (FLORELL et al., 2005).

2. Objetivos

2.1. Objetivo primário

Identificar a prevalência das mutações germinativas nos genes *CDKN2A* e *CDK4* em pacientes matriculados no INCA com critérios clínicos para melanoma hereditário.

2.2. Objetivos secundários

Descrever as características fenotípicas da população em estudo.

Descrever as características histopatológicas do melanoma cutâneo da população em estudo.

Correlacionar a presença das mutações com dados fenotípicos e histopatológicos.

3. Materiais e métodos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do INCA (CAAE 05757119.8.0000.5274) e foi conduzido em concordância com as boas práticas clínicas (Anexo II).

3.1. Desenho do estudo: Estudo observacional descritivo transversal.

3.2. População do estudo: Pacientes matriculados no Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, em acompanhamento na dermatologia, com os critérios clínicos para o diagnóstico de melanoma hereditário no período de fevereiro de 2019 a outubro de 2020.

3.3. Critérios de Inclusão

1. Presença de dois ou mais melanomas no mesmo paciente ou paciente com um melanoma e um ou mais casos de melanoma e/ou câncer de pâncreas em parentes de 1º ou 2º grau.

2. Confirmação do melanoma cutâneo do paciente por meio de exame histopatológico realizado no INCA.

3. Confirmação do melanoma cutâneo e/ou câncer de pâncreas dos familiares por meio de exame histopatológico, registros médicos ou atestado de óbito.

4. Assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.

3.4. Critérios de Exclusão:

-Presença de xeroderma pigmentoso.

-Presença de albinismo oculocutâneo.

-Presença de síndrome de Cowden.

-Presença de outras síndromes genéticas, que aumentem a susceptibilidade ao melanoma, não relacionadas aos genes avaliados na população em estudo.

3.5. Fluxo dos pacientes:

Foram recrutados 69 pacientes em acompanhamento na seção de dermatologia do INCA (HC1). Após a obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo III), foram coletados os dados clínicos e histopatológicos (Anexo IV) e os pacientes foram encaminhados para consulta pré-teste genético no ambulatório de aconselhamento genético do INCA (HC1). Após, os pacientes foram agendados para a coleta das amostras de sangue periférico no HC1. As amostras foram imediatamente levadas ao laboratório, onde foram armazenadas. Todos os pacientes serão agendados no ambulatório de aconselhamento genético para o aconselhamento pós teste genético e entrega do resultado.

3.6. Avaliação dermatológica: Os pacientes foram avaliados quanto às características fenotípicas conforme a ficha de coleta de dados apresentada no Anexo III.

Para a definição do fototipo, foi utilizada a classificação de Fitzpatrick adaptada (Tabela 3.1) (FITZPATRICK, 1988).

Tabela 3.1: Classificação de Fitzpatrick adaptada

Fototipo	Características cutâneas
I	Pele branca. Sempre se queima, nunca bronzeia.
II	Pele branca. Frequentemente se queima, bronzeia com dificuldade.
III	Pele branca. Às vezes se queima, bronzeia.
IV	Pele branca. Raramente se queima, bronzeia com facilidade.
V	Pele morena.
VI	Pele negra.

A densidade de efélides nos ombros e membros superiores foi avaliada como uma proporção da superfície cutânea acometida. Em uma escala 0 a 100%, dividida em grupos de 20%, em que 0 corresponde a nenhuma efélide, 20% e 40% correspondem a baixa densidade de efélides, 60 a 100% correspondem a alta densidade de efélides (SÁ et al., 2018).

O nevo atípico clínico foi definido como aquele maior ou igual a 5mm. Na presença de componente papuloso, o componente maculoso deveria apresentar duas das seguintes características: assimetria, bordas irregulares e/ou cores variáveis (SÁ et al., 2018).

A síndrome do nevo atípico foi definida de acordo com a classificação de Newton *et al.* (NEWTON et al., 1993): 1) presença de dois ou mais nevos atípicos clínicos; 2) presença de mais de 100 nevos maiores do que 2mm, se entre 20 e 50 anos. Se menor que 20 anos ou maior que 50 anos, presença de mais de 50 nevos; 3) localização atípica: mais do que um nevo em nádegas ou dorso dos pés; 4) mais do que um nevo na região anterior do couro cabeludo ou mais do que uma pigmentação na íris. A presença de três critérios ou mais define a síndrome do nevo atípico.

3.7. Avaliação histopatológica

As características histológicas dos melanomas foram obtidas por meio do exame histopatológico realizado na Divisão de Anatomia Patológica do INCA, conforme ficha de coleta de dados apresentada no Anexo III.

3.8. Coleta, processamento das amostras de sangue periférico e extração de DNA

As amostras de sangue periférico de cada paciente, devidamente identificadas, foram coletadas em dois tubos (contendo o anticoagulante EDTA) de 5 mL cada e levadas, imediatamente, ao Laboratório de Pesquisa Translacional para o processamento. Em seguida os leucócitos (*buffy-coat*) foram separados por centrifugação em gradiente de densidade com auxílio de Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, Suécia), de acordo com as instruções do fabricante.

Posteriormente, o DNA genômico foi obtido dos leucócitos utilizando o kit *QIAamp DNA blood mini kit* (Qiagen, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. Esse procedimento manual é composto por quatro etapas: lise celular, ligação do DNA genômico do lisado celular à membrana da coluna, lavagem do DNA adsorvido à membrana da coluna e eluição do DNA genômico.

O DNA genômico dos pacientes foram quantificados utilizando NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies). A estimativa da contaminação por sal e proteína nas amostras foi feita pela razão de absorbância a 260/230 nm e 260/280 nm, respectivamente, e valores entre 1,7 e 2,0 foram considerados com grau de pureza satisfatório. As amostras concentradas foram diluídas com água livre de nuclease para uma concentração final de 20 ng/μL. A integridade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed™ (Invitrogen, EUA) em tampão TBE (45mM TRIS, 45mM de ácido bórico, 1mM EDTA, pH 8,0), utilizando como referencial o marcador de peso molecular 1Kb (Invitrogen, EUA). O resultado foi verificado em fotodocumentador (ChemiDoc MP, Bio-Rad, EUA) sob luz UV. As amostras foram então armazenadas em freezer -80°C até as análises subsequentes.

3.9. Sequência dos iniciadores

A construção dos iniciadores foi feita a partir das sequências referência para os genes CDK4 e CDKN2A obtidas no banco de dados do NCBI

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Os oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados e analisados, *in silico*, utilizando o programa Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>) e submetidos a testes para minimizar estruturas secundárias como *hairpins*, *self* e *hetero-dimers*, além de verificar o segmento amplificado. Os éxons de interesse foram amplificados utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores descritos na Tabela 3.2.

Tabela 3.2: Sequência dos iniciadores

Primers	Sequências	Tamanho	Referência
CDK4_Exon2_F	TTTGGTGATAGGAGTCTGTGATT	350 pb	
CDK4_Exon2_R	CCCCTTCTCTACAGATCATCA		
CDKN2A_E1b_F	TCCCAGTCTGCAGTTAAGG	412 pb	FARGNOLI et al., 1998
CDKN2A_E1b_R	GTCTAAGTCGTTGTAACCCG		
CDKN2A_Ea_1_F	ACCGGAGGAAGAAAGAGGAG	393 pb	
CDKN2A_Ea_1_R	TTCTGAAAACCTCCCCAGGAA		
CDKN2A_Ea_2_F	ACCGGAGGAAGAAAGAGGAG	254 pb	
CDKN2A_Ea_2_R	GGCCTCCGACCGTAACTATT		
CDKN2A_Ea_3_F	ATGGAGCCTTCGGCTGACT	221 pb	
CDKN2A_Ea_3_R	AGAATCGAAGCGCTACCTGA		
CDKN2A_E2_1_F	GGGGCTTGTGTGGGGGTCTG	247pb	BETTI et al., 2016
CDKN2A_E2_1_R	CAGCACCACCAGCGTGTC		
CDKN2A_E2_2_F	GACCCCGCCACTCTCACC	309pb	
CDKN2A_E2_2_R	GTGCTGGAAAATGAATGCTCTG		
CDKN2A_E3_F	CAGTGGACTAGCTGCTGGAC	401pb	
CDKN2A_E3_R	ATATAAATGGACATTTACGGTAGTGGG		

3.10. Amplificação por PCR

A análise mutacional dos genes foi realizada utilizando-se amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida de sequenciamento genômico. Os éxons de interesse foram amplificados utilizando-se os pares de oligonucleotídeos iniciadores descritos anteriormente (Tabela 3.2). Os genes de interesse foram amplificados por PCR utilizando os reagentes do kit *Taq DNA polimerase Platinum®* (Invitrogen, EUA) e desoxirribonucleotídeos trifosfato (dNTP) (Invitrogen, EUA). As condições de PCR para cada par de primers foram otimizadas utilizando-se uma amostra referência (linhagem celular de melanoma,

SKMEL-28 e pool de DNA de doadores) realizando testes de gradiente de temperatura de anelamento.

Alíquotas de todos os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% corado com GelRed™ (Invitrogen, EUA) em tampão TBE, utilizando como referencial o marcador de peso molecular 100Kb (Invitrogen, EUA). Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados através de iluminação com luz UV utilizando o equipamento de fotodocumentação ChemiDoc (BioRad, EUA).

3.11. Purificação

Para eliminar qualquer substância que pudesse inibir a reação de sequenciamento, os produtos de PCR foram purificados através da utilização do kit *illustra GFX™ PCR DNA and GEL Band Purification* (GE Healthcare, EUA) seguindo o protocolo do fabricante. Uma alíquota dos produtos de PCR purificados foram, então, analisados em gel de agarose 2% corado com GelRed™ (Invitrogen, EUA) em tampão de eletroforese (TBE), visualizados no fotodocumentador (ChemiDoc MP, Bio-Rad, EUA) sob luz UV. Os produtos purificados foram armazenados a -20°C até seu uso.

3.12. Sequenciamento automático

O sequenciamento foi realizado pelo Laboratório de Genética do Instituto Nacional de Câncer, utilizando o sequenciador automático de capilar 3130XL DNA Analyzer (Applied Biosystems, EUA). Para a reação de sequenciamento, foi empregado o kit do reagente *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (ThermoFisher, EUA), de acordo com as condições padronizadas previamente no nosso laboratório. As reações foram realizadas em placas de 96 poços para um volume final de 10µL. Foram adicionados 1,0µL da solução *BigDye* contendo ddNTPs, 1,5µL de tampão de sequenciamento 5x (*BigDye*, ThermoFisher, EUA), DNA purificado (4 - 5µL), água livre de nucleases e os respectivos iniciadores (senso ou anti-senso a 5mM). O controle de qualidade das reações foi realizado utilizando o pGEM 3Zf (+) e o primer M13 (-21) provenientes do próprio kit de sequenciamento, que são fornecidos já prontos para uso. As amostras foram acondicionadas em uma placa de sequenciamento, e logo após levadas ao

termociclador *Veriti™ 96-Well Thermal Cycler* para a realização das etapas do ciclo.

Os produtos de reação de sequenciamento foram, então, precipitados para retirada de ddNTPs livres que poderiam interferir na leitura da sequência de DNA. Para isso, a placa foi centrifugada seguida da adição 30µL de isopropanol 75% (v/v) em cada poço da placa, homogeneização manual por 10 segundos e incubação sob abrigo da luz por 15 minutos. Posteriormente, as amostras foram submetidas a uma centrifugação a 2600 g a 4°C por 45 minutos, o sobrenadante foi descartado e, então, 50 µL de etanol 75% (v/v) foram adicionados em cada poço. A placa foi novamente centrifugada a 2600 g a 4°C e o sobrenadante descartado, seguida de incubação a 60°C por 10 minutos sob o abrigo da luz para garantir a eliminação do etanol residual. O precipitado foi ressuspensionado em 10µL de formamida HiDi (ThermoFisher, EUA) para desnaturação e submetidos à eletroforese capilar no sequenciador automático.

3.13. Análise das alterações nas sequências dos genes

As sequências obtidas no sequenciador foram analisadas no programa *Chromas PRO* versão 1.41 (Technelysium Pty Ltd, Australia). Os eletroferogramas foram analisados manualmente e alinhados com as sequências referência obtidas no banco de dados do NCBI (RefSeqGene CDKN2A LGR_11 NG_007485; RefSeqGene CDK4 LRG_490 NG_007484). A descrição das variantes encontradas seguiu as recomendações da *Human Genome Variation Society* (HGVS), classificadas de acordo com sua patogenicidade utilizando os critérios da *American College of Medical Genetics* (ACMG) (RICHARDS et al., 2015).

3.14. Análise estatística

Foi realizada análise descritiva com valores percentuais para as variáveis categóricas e com média e desvio-padrão para as variáveis contínuas.

O teste exato de Fisher foi usado para comparar as características clínicas e histopatológicas entre os seguintes grupos: i) pacientes com variantes na região 3'UTR e pacientes sem variantes na região 3'UTR; ii) pacientes com a variante p.A148T e pacientes sem a variante p.A148T. Foi considerado $p < 0,05$ como significativo em todas as análises. O pacote estatístico *Statistical Package for*

Social Science – SPSS® versão 21 (IBM, EUA) foi utilizado para a análise estatística e confecção das tabelas de frequência.

3.15. Financiamento

O Laboratório de Pesquisa Translacional da Coordenação de Pesquisa Clínica do INCA utilizou recursos próprios para o desenvolvimento deste estudo.

4. Resultados

4.1. Dados clínicos e histopatológicos

Foram incluídos 69 pacientes, cujas principais características clínicas e histopatológicas estão demonstradas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Principais características clínicas e histopatológicas observadas.

	Pacientes/Probandos	
Sexo	Feminino	39 (56,5%)
	Masculino	30 (43,5%)
Idade do primeiro diagnóstico do melanoma	0-20	7 (10,1%)
	21-40	23 (33,3%)
	>40	39 (56,5%)
Fototipo	I	9 (13%)
	II	31 (44,9%)
	III	22 (31,9%)
	IV	4 (5,8%)
	V	3 (4,3%)
Densidade de efélides nos ombros e membros superiores	Ausência de efélides (0)	13 (18,8%)
	Baixa densidade (20/40)	21 (36,2%)
	Alta densidade (60/80/100)	31 (44,9%)
Presença da síndrome do nevo atípico	Sim	50 (72,5%)
	Não	19 (27,5%)
História de queimadura solar na infância, adolescência ou vida adulta	Sim	53 (76,8%)
	Não	16 (23,2%)
Localização do melanoma	Cabeça e Pescoço	15 (7,5%)
	Tronco	121 (60,5%)
	Membros superiores	34 (17%)
	Membros Inferiores	22 (11%)
	Outra / Desconhecida	8 (4%)

Subtipo histológico do melanoma	Nodular	5 (2,5%)
	Extensivo superficial	45 (22,5)
	Lentigo maligno	5 (2,5%)
	Outro / Desconhecido	145 (72,5%)
Breslow	≤ 1mm	169 (84,5)
	> 1mm	26 (13%)
	Desconhecido	5 (2,5%)

Foram recrutados 30 homens (43,5%) e 39 mulheres (56,5%). A idade média do primeiro diagnóstico de melanoma foi de 44,8 anos (DP±17,83). Sete pacientes (10,1%) foram diagnosticados com 20 anos ou menos e 23 pacientes (33,3%) na faixa etária de 21 a 40 anos. Em 39 pacientes (56,6%), o primeiro diagnóstico ocorreu após os 41 anos.

A maior parte dos pacientes apresentava fototipo II (n=31, 44,9%), cabelo castanho/preto (n=38, 55,1%) e olhos castanhos/pretos (n=39, 56,5%). História de queimadura solar foi relatada em 76,8% dos casos e apenas dois (2,9%) pacientes relataram história de bronzeamento artificial. Em relação à presença de efélides, 44,9% apresentavam alta densidade nos membros superiores e ombros. A maioria dos pacientes apresentava pelo menos um nevo atípico clínico (n=62, 89,9%) e mais do que 50 nevos melanocíticos (n=53, 76,8%). A síndrome do nevo atípico foi identificada em 72,5% dos casos.

A maioria dos pacientes apresentou múltiplos melanomas primários (MMP) sem história familiar desse tumor (n=52, 74,3%). Trinta e dois pacientes apresentaram dois melanomas (46,4%) e 28 tiveram três ou mais melanomas (40,6%). Entre os últimos, três pacientes apresentaram oito melanomas.

Dezoito pacientes (25,7%) apresentavam tanto história pessoal como familiar de melanoma (MF). Entre eles, 12 pacientes também apresentavam história familiar de outras neoplasias malignas internas (Tabela 4.2). O adenocarcinoma de mama foi reportado na história familiar (primeiro e segundo grau) por sete pacientes, constituindo a neoplasia mais frequentemente relatada. Apenas dois pacientes tinham história familiar de câncer de pâncreas (um parente de primeiro e outro de segundo grau).

Tabela 4.2: Características dos pacientes com melanoma pessoal e familiar (1 e 2º graus).

Paciente	Número de melanomas	Número de familiares com melanoma	Neoplasias malignas na família
1	1	3	-
4	1	1	Câncer de pâncreas, mama e de sistema nervoso central
6	1	1	Câncer de mama, estômago e de próstata; leucemia e neuroblastoma.
8	3	2	Câncer de endométrio, tireoide, rim e colorretal.
12	2	2	Câncer de pulmão
22	3	1	Câncer colorretal
23	2	2	Câncer de pâncreas, laringe e estômago
24	1	2	-
28	1	2	Câncer de mama e de próstata; Linfoma de Hodgkin
37	2	1	Câncer de útero
39	2	1	Câncer de mama e de próstata; Linfoma de Hodgkin
40	2	2	Câncer de mama
42	2	1	Câncer colorretal e de útero
50	1	3	Câncer de mama
51	2	2	Câncer de mama
64	1	2	Câncer de estômago
66	1	1	-
69	1	1	-

Apenas 4 pacientes (5,8%) apresentavam história pessoal de outra neoplasia: um com câncer de mama; um com câncer colorretal; um com carcinoma espinocelular de língua; e um com leucemia mieloide crônica e câncer colorretal. Nenhum paciente apresentou história pessoal de câncer de pâncreas. Houve

diagnóstico de câncer de pele não melanoma (carcinoma basocelular e/ou espinocelular) em 19 pacientes (27,5%).

Ao todo, foram observados 200 melanomas, sendo 117 (58,5%) em mulheres e 83 (41,5%) em homens. A maioria dos tumores (n=169, 84,5%) eram melanomas iniciais com índice de Breslow $\leq 1,0$ mm. Apenas 4 pacientes (5,8%) apresentaram melanoma com estadiamento avançado (III e IV) pelo AJCC 8ª edição.

A localização anatômica mais frequente dos tumores foi o tronco (n=121, 60,5%), seguido pelos membros superiores (n=34, 17%). Tanto entre homens (n=48) como em mulheres (n=73), a maioria dos melanomas também ocorreu no tronco (57,8% e 62,39%, respectivamente). Nas mulheres, 22,5% ocorreu nos membros inferiores, sendo a terceira localização mais frequente.

Embora a maior parte dos tumores não tenha sido classificada (n=140, 70%), o subtipo histológico predominante foi o melanoma extensivo superficial (n=45, 22,5%). Não houve diagnóstico de melanoma acral.

4.2. Análise molecular

O estudo molecular dos quatro éxons do locus *CKDN2A* (1 β , 1 α , 2 e 3) e do éxon 2 do gene *CDK4* foram realizados em todos os indivíduos selecionados para o estudo. Todas as variantes detectadas foram confirmadas no DNA da amostra adicional coletada de cada paciente.

Foram encontradas 4 variantes nos éxons de *CDKN2A* em sete pacientes, duas variantes na região 5'UTR em quatro pacientes e duas variantes na região 3'UTR em 25 pacientes (Tabela 4.3). Dois casos apresentaram mais de uma variante simultaneamente.

Tabela 4.3: Variantes identificadas e frequências.

Elemento gênico	Variantes				Frequência
	p16 Nucleotídeo	p16 Proteína	p14 Nucleotídeo	p14 Proteína	
5'UTR					
	(-) 33G>C	-	-	-	2 (2,9%)
	(-) 25C>T	-	-	-	2 (2,9%)
Éxon 1α					
	c.26T>A	M9K	N/A	N/A	1 (1,42%)
Éxon 2					
	c.442G>A	A148T	-	-	5 (7,1%)
	c.305C>A	A102E	c.348C>A	G116G	1 (1,42%)
	c.318G>A	V106V	c.361G>A	A121T	1 (1,42%)
3'UTR					
c.*29C>G	-	-	-	-	16 (23,2%)
c.*69 C>T	-	-	-	-	9 (13%)

A variante *missense* rs145445140 (p.M9K) localizada no éxon 1 α foi identificada em paciente com três melanomas sem história familiar de melanoma ou de outras neoplasias (Figura 4.1)

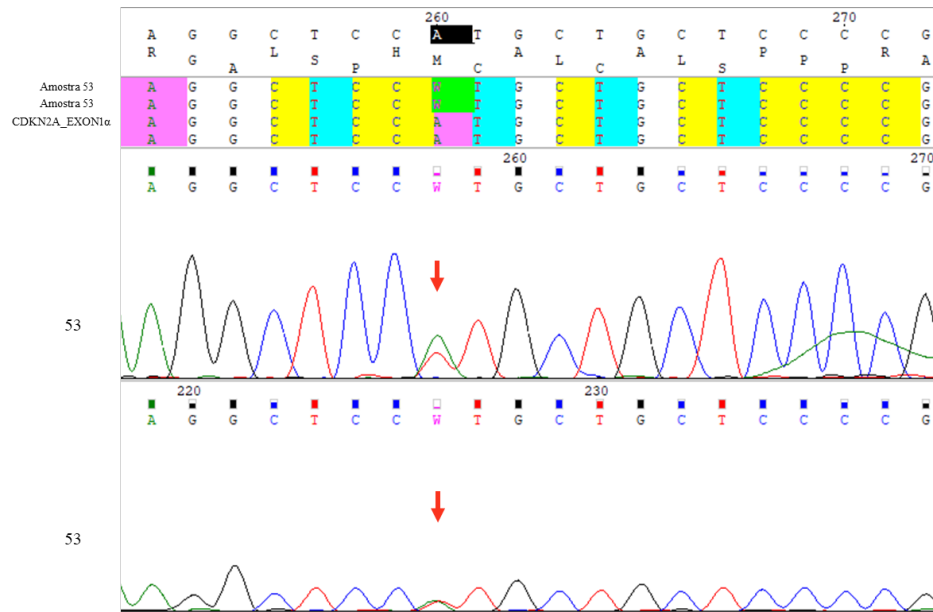


Figura 4.1. Eletroferograma do éxon 1 α do gene *CDKN2A*. As setas em vermelho indicam a variante *missense* c.26T>A (p.M9K) caracterizada pela substituição T→A. As duas replicatas da amostra 53 estão representadas.

A variante *missense* rs137854598 (p.A102E) localizada no éxon 2 foi identificada em um paciente com história pessoal de dois melanomas diagnosticados antes dos 40 anos de idade (Figura 4.2). Também apresentava histórico familiar (mesmo lado) de melanoma (parente de 1 $^\circ$ grau não incluído no estudo), câncer colorretal (2 $^\circ$ grau) e câncer de útero (2 $^\circ$ grau).

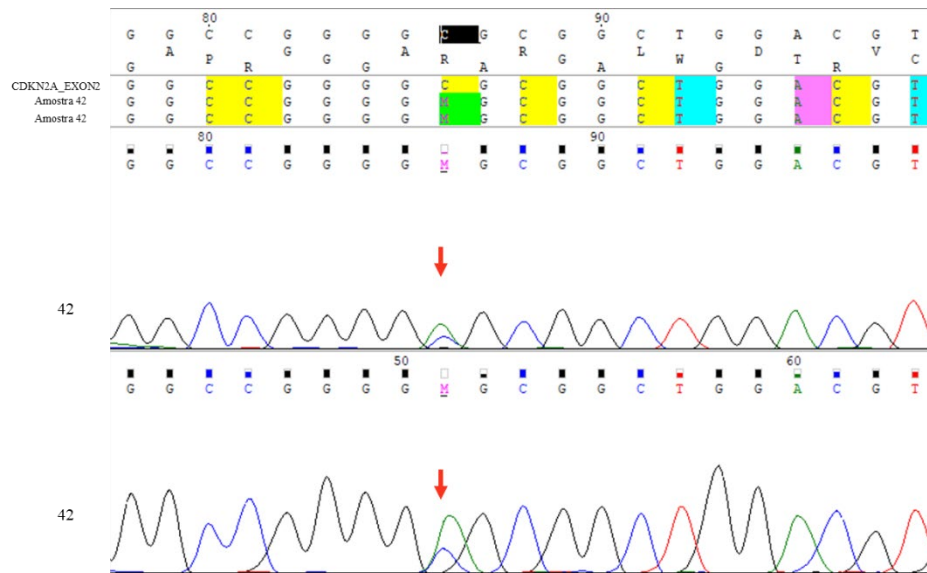


Figura 4.2. Eletroferograma do éxon 2 do gene *CDKN2A*. As setas em vermelho indicam a variante *missense* c.305C>A (p.A102E) caracterizada pela substituição C→A. As duas replicatas da amostra 42 estão representadas.

A variante rs199888003 (p.A121T/p14 e p.V106/p16) localizada no éxon 2 foi encontrada em paciente com história de três melanomas primários, diagnosticados na faixa etária de 41-60 anos, sem história familiar de melanoma ou de neoplasias internas (Figura 4.3).

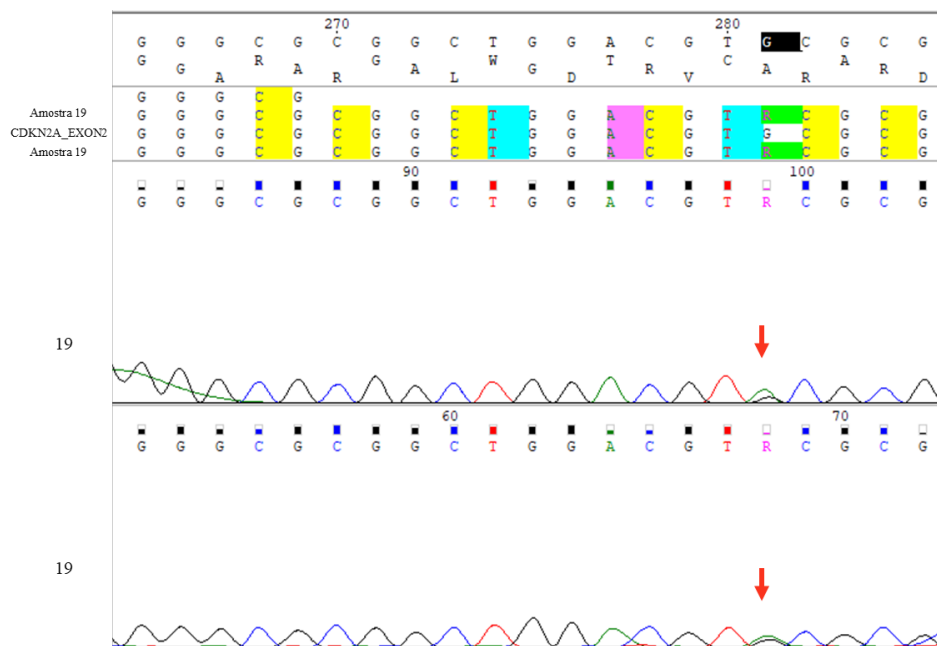


Figura 4.3. Eletroferograma do éxon 2 do gene *CDKN2A*. As setas em vermelho indicam a variante *missense* c.361G>A e (p.A121T/p14) e a variante sinônima c.318G>A (p.V106/p16). As duas replicatas da amostra 19 estão representadas.

A variante p.A148T foi encontrada em cinco pacientes (7,1%). Nenhum deles relatou história familiar de melanoma. Um caso apresentou dois melanomas antes dos 20 anos de idade. Três casos apresentaram uma notável quantidade de melanomas múltiplos (3, 4 e 8 melanomas, respectivamente) diagnosticados principalmente entre 41-60 anos (Figura 4.4).

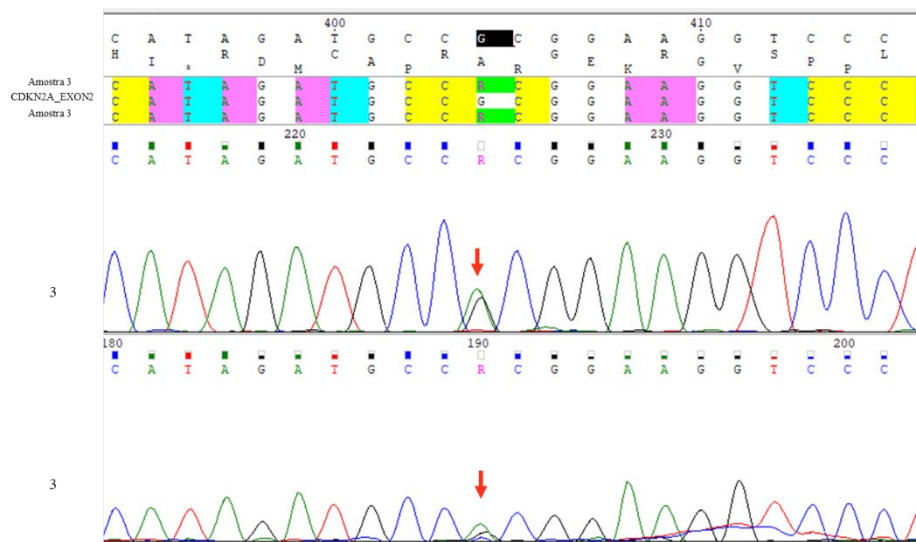


Figura 4.4. Eletroferograma do éxon 2 do gene *CDKN2A*. As setas em vermelho indicam a variante c.442G>A (p.A148T). As duas replicatas da amostra 3 estão representadas.

Foram encontradas duas variantes na região 5'UTR do gene *CDKN2A*, c.-33G>C e c.-25C>T, em quatro pacientes. Entre eles, duas pacientes eram parentes de primeiro grau (filha e mãe), porém cada uma apresentou uma variante diferente na região 5'UTR: uma apresentou a variante c.-33G>C e a outra apresentou c.-25C>T (Figura 4.5 e Figura 4.6). Além da história de três familiares afetados pelo melanoma nesta família (filha, mãe e avó), também houve um caso de câncer de mama (avó). Não foram identificadas outras variantes nas duas pacientes (filha e mãe) dessa família. A terceira familiar afetada (avó) não foi incluída nesta pesquisa.

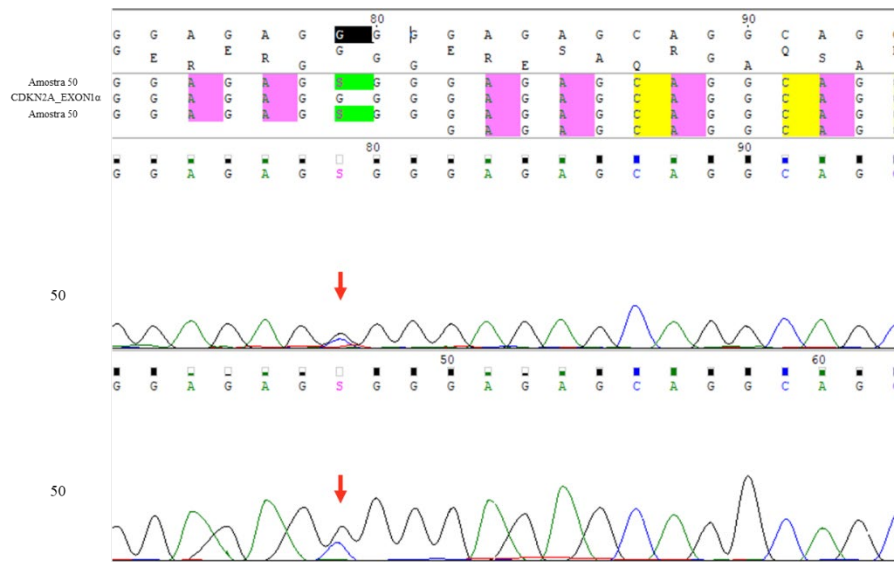


Figura 4.5. Eletroferograma da região 5'UTR do gene *CDKN2A*. As setas em vermelho indicam a variante c.-33G>C. As duas replicatas da amostra 50 estão representadas.

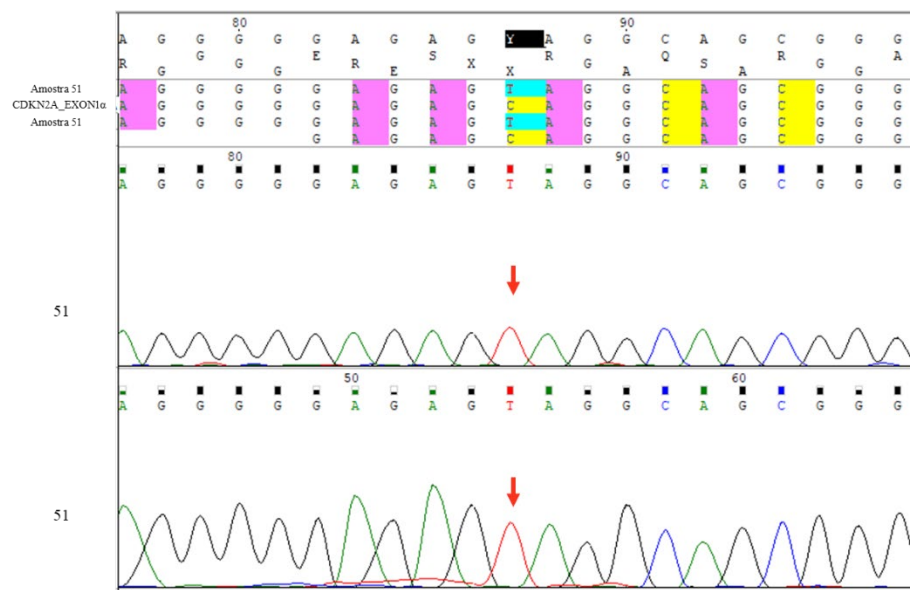


Figura 4.6. Eletroferograma da região 5'UTR do gene *CDKN2A*. As setas em vermelho indicam a variante c.-25C>T. As duas replicatas da amostra 51 estão representadas.

A região 3'UTR foi a região mais acometida por variantes: 25 pacientes apresentaram alterações (32,8%), entre os quais apenas três apresentavam história familiar de melanoma. Dezesesseis pacientes apresentaram c.*29C>G e nove pacientes apresentaram a variante c.*69C>T. Um paciente, com história de dois

melanomas diagnosticados antes de 20 anos de idade, apresentou ambas as variantes.

Não houve significância estatística entre as principais características clínicas/histopatológicas e a presença das variantes p.A148T, c.*29C>G c.*69C>T (Tabela 4.4).

Tabela 4.4: Associação entre características clínicas/histopatológicas e as variantes p.A148T, c.*29C>G c.*69C>T.

		c.*29C>G			c.*69C>T			p.A148T		
		C/C	G/C	p	C/C	T/C	p	G/G	A/G	p
Sexo	Feminino	31	8	0,577	32	7	0,281	37	2	0,646
	Masculino	22	8		28	2		27	3	
Idade do diagnóstico do(s) melanoma(s)	0-20	6	1	0,580	5	2	0,422	6	1	0,626
	21-40	19	4		21	2		22	1	
	>40	28	11		34	5		36	3	
Fototipo	I	8	1	0,724	8	1	0,497	9	0	0,742
	II	22	9		28	3		29	2	
	III	18	4		19	3		19	3	
	IV/V	5	5		5	2		7	0	
Densidade de efélides nos ombros e membros superiores	Ausência de efélides (0)	9	4	0,454	11	2	1	12	1	0,493
	Baixa densidade (20/40)	18	7		22	3		22	3	
	Alta densidade (60/80/100)	26	5		27	4		30	1	
Presença da síndrome do nevo atípico	Sim	39	11	0,754	42	8	0,427	46	4	1
	Não	14	5		13	1		18	1	
História de queimadura solar na infância, adolescência ou vida adulta	Sim	40	13	0,746	45	8	0,674	49	4	1
	Não	13	3		15	1		15	1	
Localização do melanoma	Cabeça e Pescoço	13	2	0,866	14	1	0,645	15	0	0,053
	Tronco	88	33		105	16		103	18	
	Membros superiores	25	9		28	6		33	1	
	Membros Inferiores	17	5		17	5		22	0	

	Outra / Desconhecida	6	2		7	1		8	0	
Subtipo histológico do melanoma	Nodular	4	1		4	1		5	0	
	Extensivo superficial	39	6	0,067	37	8	0,625	41	4	
	Lentigo maligno	5	0		5	0		5	0	1
	Outro / Desconhecido	101	44		125	20		130	15	
Breslow	≤ 1mm	126	43		143	26		152	17	
	> 1mm	21	5	0,166	24	2	0,411	25	1	0,314
	Desconhecido	2	3		4	1		4	1	

Nenhuma variante de *CDK4* foi encontrada nos pacientes analisados. Como controle positivo foi utilizado a linhagem de melanoma SKMEL-28 que apresentou a variante p.R24C no éxon 2 na região *hotspot* deste gene (Figura 4.7).

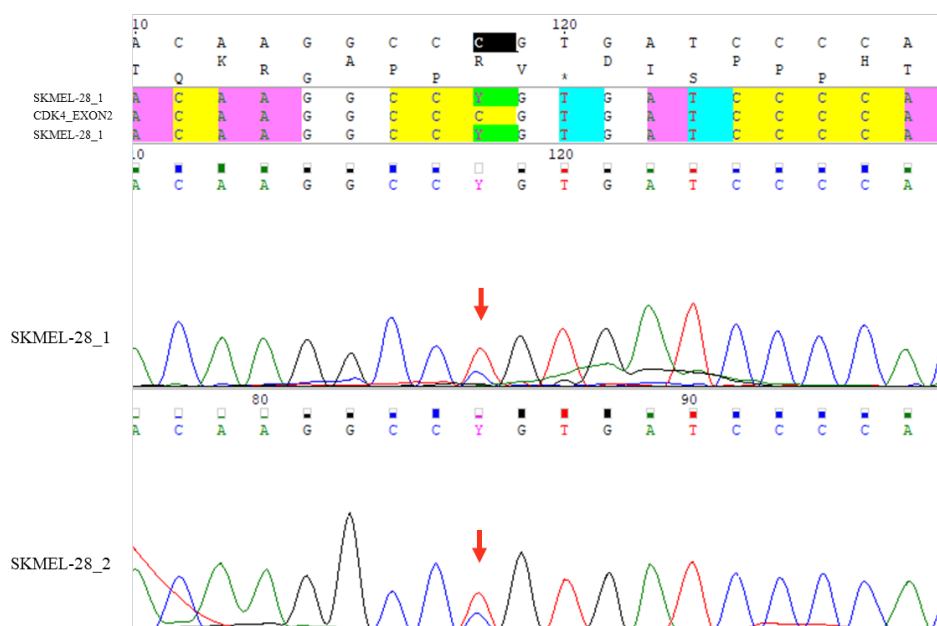


Figura 4.7. Eletroferograma do éxon 2 do gene *CDK4* na linhagem de melanoma SKMEL-28. As setas em vermelho indicam a variante *missense* c.70C>T (p.R24C) caracterizada por uma substituição de C→T. As duas replicatas da amostra SKMEL-28 estão representadas.

5.Discussão

Este é o primeiro estudo sobre melanoma hereditário (MH) realizado no INCA e no Rio de Janeiro/RJ. Quando comparado aos estudos publicados no Brasil, é a maior coorte unicêntrica de pacientes com critérios clínicos para MH submetida à pesquisa de variantes nos genes *CDKN2A* e *CDK4*.

No presente estudo, a idade média do primeiro diagnóstico foi de 44,8 anos (DP±17,83), aproximadamente 12 anos antes daquela identificada pelo maior estudo epidemiológico brasileiro com diagnóstico de melanoma cutâneo (DE MELO et al., 2018). Esse achado está de acordo com os dados publicados mundialmente, uma vez que a idade precoce do surgimento de tumores é uma importante característica das síndromes hereditárias de predisposição ao câncer. Pacientes de MH costumam apresentar o primeiro diagnóstico entre 30-40 anos

(com mutação de *CDKN2A*) ou entre 40-50 anos (sem mutação de *CDKN2A*) (GOLDSTEIN et al., 2006; LEACHMAN et al., 2009).

Em relação às características fenotípicas observadas, cabe destacar que a nossa população apresentou uma proporção superior de pacientes com múltiplos nevos melanocíticos e síndrome do nevo atípico, quando comparada a outras coortes de MH da América Latina (PUIG et al., 2016; SÁ et al., 2018).

Quanto à localização anatômica, é reportado na literatura que os melanomas nos homens são mais comuns no tronco. Já nas mulheres, são mais frequentes nos membros inferiores (CHO; ROSNER; COLDITZ, 2005). Contudo, observamos que, tanto entre homens como entre mulheres, o local mais comum foi o tronco, seguido pelos membros superiores. Nossos dados diferem, parcialmente, dos achados descritos em outras coortes de melanoma e de MH, nas quais o local mais comum é o tronco, seguido pelos membros inferiores (DE MELO et al., 2018; GIRONI et al., 2018; SÁ et al., 2018). Já os achados histopatológicos foram concordantes com outros estudos com pacientes de MH - o subtipo histológico extensivo superficial foi o mais encontrado e a maioria dos casos apresentava índice de Breslow menor ou igual a 1mm (VAN DER RHEE et al., 2011; GIRONI et al., 2018; SÁ et al., 2018; TOUSSI et al., 2020).

A classificação das variantes pelos critérios da ACMG é feita em 5 grupos: patogênica (VP), provavelmente patogênica (VPP), variante de significado incerto (VSI), provavelmente benigna (VPB) e benigna (VB) (RICHARDS et al., 2015). A categorização se baseia na combinação de múltiplos critérios, como: frequência da variante em bancos de dados populacionais; resultados de estudos funcionais e/ou de análise de segregação; localização da variante em *hot spot* mutacional, domínio funcional crítico ou sítio altamente conservado; evidências provenientes de algoritmos computacionais *in silico* (ACis) preditores de benignidade ou patogenicidade; história pessoal e familiar sugestivas, com fenótipo clássico e compatível; fontes confiáveis de classificação de variantes; entre outros.

Cabe destacar que a frequência das variantes em bancos de dados populacionais (BDP) pode fornecer fortes evidências de benignidade quando é altamente prevalente na população (>5%). Por outro lado, a baixa frequência nos BDP pode revelar que a variante é suficientemente rara para ser candidata a variante causadora de doença. Em relação aos ACis, a maioria costuma ter acurácia de 65-

80% para identificar variantes patogênicas já conhecidas e os mais utilizados pelos laboratórios são SIFT e PolyPhen (RICHARDS et al., 2015).

Os critérios da ACMG identificados e a classificação para as variantes observadas neste estudo estão resumidos na Tabela 5.1.

Tabela 5.1: Classificação das variantes pelos critérios da ACMG

Identificação	Nucleotídeo	Proteína	Critérios ACMG	Classificação ACMG	Clinvar	gnomAD	Ensaio funcional	REVEL
rs137854598	c.305C>A	p.A102E	PM1, PM2, PP3, PP4	VPP	VSI	-	-	0.688 VPP
rs145445140	c.26T>A	p.M9K	PM2, BP4	VSI	VSI	<0,001	-	0.217 VPB
rs199888003	c.361G>A(p14)	p.A121T	PM1, PM2, BP4	VSI	VSI/VPB	<0,001	-	0.374 VPB
rs3731249	c.442G>A	p.A148T	BS3, BP4, BP6	VPB	VB	0,02	Função preservada	0.271 VPB
rs144481587	c.-25C>T	-	BS3, BP6	VPB	VB/VPB	0,012	Função preservada	-
rs531597737	c.-33G>C	-	BS3, BP6	VPB	VB/VPB	0,0013	Função preservada	-
rs11515	c.*29C>G	-	BA1, BP4, BP6	VB	VB	0,86	-	-
rs3088440	c.*69C>T	-	BA1, BP4, BP6	VB	VB	0,12	-	-

Legenda: Variante patogênica (VP), variante provavelmente patogênica (VPP), variante de significado incerto (VSI), variante provavelmente benigna (VPB) e variante benigna (VB). Critérios patogênicos moderados (PM1 e PM2), critérios patogênicos de apoio (PP3 e PP4). Critério de benignidade autônomo (BA1), critério de benignidade forte (BS3), critérios de benignidade de apoio (BP4 e BP6).

A variante *missense* rs137854598 (p.A102E) está localizada no éxon 2 e corresponde à troca de alanina por um glutamato (p.A102E) no códon 102 em p16^{INK4A} e no códon 116 em p14^{ARF} resultando em uma variante sinônima (G116=). Essa substituição ocorre em região altamente conservada da proteína e foi identificada em uma paciente com história pessoal de dois melanomas (antes dos 40 anos de idade) e histórico familiar de melanoma (1º grau). Ainda não há frequência descrita para A102E nos BDP como ExAC, gnomAD, 1000 *Genomes* e ABraOM. Além disso, ACis como SIFT, PolyPhen e REVEL indicam o possível efeito patogênico dessa variante (“Ensembl genome browser 105”, [s.d.]). Nesse sentido, considerando os critérios da ACMG, a variante *missense* A102E pode ser classificada como variante provavelmente patogênica (VPP) (Tabela 8) (RICHARDS et al., 2015). Em nível clínico, os pacientes carreadores de VPP devem ser conduzidos da mesma forma que aqueles que apresentam variantes patogênicas (VP). Isso porque, com os avanços no conhecimento científico ao longo do tempo, as VPP têm probabilidade maior do que 90% de serem classificadas como VP (RICHARDS et al., 2015). Na literatura, ainda não foi reportada a presença de A102E em indivíduos com doenças relacionadas ao gene *CDKN2A*. De acordo com a revisão realizada, este é o primeiro estudo que identifica a variante A102E em pacientes com critérios clínicos para melanoma hereditário (“ClinVar”, [s.d.]; “Ensembl genome browser 105”, [s.d.]).

A variante *missense* rs145445140 (p.M9K), localizada no éxon 1α, é resultado da substituição de uma metionina por uma lisina no códon 9 em p16^{INK4a}. Essa variante foi identificada em paciente com história de três melanomas, porém sem história familiar do tumor. O resíduo de metionina é fracamente conservado e a diferença físico-química entre metionina e lisina é considerada moderada, mas ainda não foram realizados estudo funcionais para avaliar o impacto dessa variante. Apesar de ACis como SIFT, PolyPhen-2, CADD e REVEL sugerirem que seja benigna, a frequência dessa variante nos bancos de dados populacionais, como gnomAD e 1000 *Genomes*, é extremamente baixa. Dessa forma, os dados disponíveis ainda são limitados. De acordo com os critérios da ACMG, M9K deve ser classificada como variante de significado incerto (VSI). O acompanhamento clínico e a vigilância oncológica de pacientes carreadores de VSI deve ser individualizado e realizado de acordo com o histórico pessoal e familiar. A presença de VSI não justifica seguimento clínico como se houvesse VP.

A variante rs199888003 (p.A121T/p14 e p.Val106/p16) está localizada na região codificante de p16^{INK4A} e p14^{ARF}, resultando em uma mudança de alanina para treonina em p14^{ARF} (p.A121T) e em um resultado sinônimo em p16^{INK4A} (p.V106). Essa variante foi identificada em um paciente com três melanomas, mas sem história familiar do tumor. A substituição pelo aminoácido treonina em p14^{ARF} adiciona um possível sítio de glicosilação e fosforilação e introduz um domínio *forkhead-associated* (FHA) de ligação de fosfopeptídeos que tem influência em diversas vias intracelulares, como as vias de resposta ao dano de DNA e ciclo celular (DUROCHER et al., 1999; XU et al., 2015). Entretanto, essa região é fracamente conservada na proteína e ACis como SIFT, CADD e REVEL sugerem que essa variante seja benigna. Cabe destacar, contudo, que a frequência dessa variante nos bancos de dados como gnomAD e exAC é extremamente baixa. Portanto, de acordo com os critérios da ACMG, A121T ainda deve ser classificada como VSI.

A variante p.A148T foi a segunda variante mais frequentemente encontrada neste estudo. Foi identificada em cinco pacientes, todos sem histórico familiar de melanoma. Essa variante converte uma alanina (GCG) em um resíduo de treonina (ACG) no códon 148, localizado no quarto domínio de repetição “*ankyrin*” e não possui efeito na função de p16^{INK4A} (RANADE et al., 1995; LILISCHKIS et al., 1996). O papel do alelo A148T tem sido investigado em vários estudos com resultados discordantes em diferentes séries de pacientes com melanoma (AITKEN et al., 1999; GHIORZO et al., 1999; KUMAR et al., 2001; BERTRAM et al., 2002; DEBNIK et al., 2005; PUIG et al., 2005; SPICA et al., 2006; ORLOW et al., 2007; BAKOS et al., 2011; TOVAR-PARRA et al., 2020). Entretanto, essa variante está presente em diversos bancos de dados populacionais, como gnomAD, 1000 Genomes e ABraOM, com frequência maior do que a esperada para VP. Além disso, ensaio funcional e ACis (Polyphen, CADD e REVEL) sugerem que essa variante não seja deletéria (BIAN et al., 2014; “Ensembl genome browser 105”, [s.d.]). Nesse sentido, considerando os critérios da ACMG, a variante A148T deve ser classificada como provavelmente benigna.

As regiões UTR (*untranslated region*) são áreas não codificantes localizadas no início (5’UTR) e no final (3’UTR) da região codificadora. Apesar de não serem traduzidas em proteína, são importantes porque podem estar envolvidas na regulação da expressão gênica, controlando a exportação nuclear, a

poliadenilação, a tradução e a degradação de RNA mensageiro (ORLOW et al., 2007). A associação dessas áreas com o risco de melanoma tem sido estudada, porém permanece controversa (MACCIONI et al., 2013).

Na região 5'UTR, identificamos a variante c.-25C>T em dois pacientes. Um deles apresentava história familiar de melanoma (1º grau). Esse parente também participou do estudo, em quem encontramos a variante c.-33G>C (discutida a seguir). Diante desses dados, o critério de história familiar sugestiva do ACMG não foi considerado para a classificação. É importante salientar que a posição -25 é uma ilha CpG de 289pb contendo numerosos sítios de ligação para os fatores de transcrição MZF1 e SP1 (ELIASON et al., 2006). Contudo, estudo funcional (ANDREOTTI et al., 2016) reportou efeito neutro dessa variante na função de *CDKN2A*. Além disso, essa variante está presente em diversos bancos de dados populacionais, como gnomAD, 1000 *Genomes*, exAC e TOPmed, com frequência maior do que a esperada para VP. Portanto, pelos critérios da ACMG, a varia c.-25>T é considerada provavelmente benigna.

Outra variante da região 5'UTR encontrada foi c.-33G>C. Identificamos essa alteração em dois pacientes – apenas um com história familiar, com as particularidades descritas acima. Essa variante foi inicialmente reportada em estudo francês com pacientes de melanoma hereditário (SOUFIR et al., 1998). Outros estudos também já identificaram essa variante em pacientes com múltiplos melanomas (AUROY et al., 2001; ASHTON-PROLLA et al., 2008). Nos bancos de dados populacionais, c.-33G>C apresenta baixa frequência alélica. Entretanto, não foi observada a segregação dessa variante com o melanoma, assim como ensaio funcional reportou ausência de impacto negativo na função de *CDKN2A* (SOUFIR et al., 1998). Nesse sentido, pode ser considerada como variante provavelmente benigna pelos critérios da ACMG.

No presente estudo, a região 3'UTR foi a região mais acometida por variantes: 16 pacientes apresentaram c.*29C>G (entre eles, apenas dois com história familiar de melanoma) e nove pacientes apresentaram a variante c.*69C>T (apenas um com história familiar de melanoma). Esses achados são concordantes com outros estudos publicados, uma vez que costumam ser considerados como polimorfismos comuns na literatura (HUBER; RAMOS, 2006; ORLOW et al., 2007). Entretanto, a associação dessas variantes com o risco de melanoma tem sido investigada em diversos estudos com resultados discordantes (AITKEN et al., 1999;

KUMAR et al., 2001; DEBNIK et al., 2005; ORLOW et al., 2007; MACCIONI et al., 2013). Mas cabe destacar que ambas se situam em localizações pouco conservadas e apresentam altas frequências populacionais (>5%) nos bancos de dados populacionais como gnomAD, 1000 Genomes e ABraOM – o que é compatível com as frequências encontradas nos polimorfismos. Considerando os critérios da ACMG, essas variantes são classificadas como benignas.

Identificamos, portanto, apenas um paciente com uma variante de *CDKN2A* provavelmente patogênica. A baixa prevalência reportada em nossa população de estudo (1,4%) é compatível com os dados brasileiros publicados. Grazziotin *et al.*, em estudo com 33 pacientes no Sul, não identificaram nenhuma variante deletéria em *CDKN2A* (GRAZZIOTIN et al., 2013). Os demais estudos também revelaram uma baixa prevalência de variantes patogênicas (4,5%– 15,3%) (HUBER; RAMOS, 2006; ASHTON-PROLLA et al., 2008; DE ÁVILA et al., 2014; PUIG et al., 2016).

Nossa população foi composta majoritariamente por pacientes de pele clara (fototipos I e II), portadores de síndrome do nevo atípico, com alta densidade de efélides e com importante história pessoal de queimadura solar. É possível que a predisposição ao melanoma na população do estudo seja proveniente da interação entre os fatores ambientais e as características fenotípicas de risco. Além disso, existem outros genes de alto risco associados à predisposição ao melanoma (revisados no Anexo I) que não foram avaliados na nossa pesquisa. Assim como também existe a possibilidade de o aumento do risco ser devido à herança poligênica de múltiplos genes de baixa e média penetrância, também não estudados neste projeto.

Outra limitação pode ter sido a técnica utilizada para a pesquisa das variantes, uma vez que não contempla todas as possibilidades de alterações. O sequenciamento direto é capaz de identificar variantes do tipo *missense*, *nonsense*, *frameshift* e silenciosa/sinônima. Para mutações envolvendo grandes segmentos gênicos, a técnica de MLPA é a mais adequada, a qual não foi realizada neste projeto. No presente estudo, a técnica de MLPA seria especialmente interessante para analisar os pacientes nos quais, apesar do histórico familiar altamente sugestivo, não foram detectadas variantes patogênicas. Como, por exemplo, na família em que houve três familiares afetados por melanoma e um familiar afetado

por câncer de mama. Nesta família, foram identificadas apenas variantes benignas na região 5'UTR, portanto a técnica de MLPA poderia ser esclarecedora.

Ainda nesse contexto, importante considerar que diversos fenômenos epigenéticos podem influenciar a expressão gênica. Esses mecanismos não foram avaliados pelo nosso estudo.

Além disso, a maioria dos pacientes apresentou histórico de múltiplos melanomas, sem história familiar do tumor ou de câncer de pâncreas. Em grupos com esse perfil, é esperado uma baixa prevalência de mutações nos genes avaliados (DE ÁVILA et al., 2014). A taxa de detecção de variantes patogênicas é maior quando, além do histórico pessoal de múltiplos melanomas, também há histórico familiar.

A baixa prevalência de mutações patogênicas na nossa população também é compatível com a notável variabilidade na frequência e na penetrância do gene *CDKN2A* descritas em diferentes populações mundiais (GOLDSTEIN et al., 2006; DI LORENZO et al., 2016).

Em relação ao gene *CDK4*, nenhuma variante de foi encontrada na população em estudo. Para afastar possíveis resultados falso negativos e validar a qualidade dos processos metodológicos, a linhagem SKMEL-28 foi utilizada como controle positivo. Nosso achado é compatível com diversos outros estudos (PUIG et al., 2005; ASHTON-PROLLA et al., 2008; GRAZZIOTIN et al., 2013; DE ÁVILA et al., 2014), uma vez que as mutações em *CDK4* foram observadas em poucas famílias no mundo até os dias atuais (ZUO et al., 1996; SOUFIR et al., 1998; MOLVEN et al., 2005; AOUDE et al., 2015b). Ainda que raras, é importante a análise de variantes de *CDK4* em pacientes com critérios para pesquisa de mutações em *CDKN2A*. Isso porque o fenótipo dos dois genes é indistinguível. Além disso, há poucos estudos (ASHTON-PROLLA et al., 2008; GRAZZIOTIN et al., 2013; DE ÁVILA et al., 2014) que avaliaram a presença de variantes patogênicas em *CDK4* no Brasil, sendo que nenhum deles foi realizado com pacientes do Rio de Janeiro.

6. Perspectivas

Para a melhor caracterização da variante provavelmente patogênica identificada (p.A102E), podem ser elaborados ensaios funcionais, assim como a realização de análise de segregação dessa família. Esses dados seriam de grande

auxílio na classificação da variante. Se demonstrada a perda de função da proteína ou a segregação da variante com o melanoma, p.A102E poderá ser classificada como patogênica pelos critérios da ACMG.

No futuro, pode ser interessante submeter a população do estudo a um painel genético ampliado. Diante dos recentes avanços e da disponibilidade comercial dos testes, a avaliação de outros genes de suscetibilidade além do *CDKN2A* e *CDK4* em famílias de risco pode trazer importantes descobertas. Além disso, incluir os familiares (também com diagnóstico de melanoma) poderia aumentar a detecção de variantes patogênicas.

Em relação à assistência médica aos pacientes do INCA com critérios clínicos para melanoma hereditário, o grupo de pesquisa sugere que, por enquanto, o acompanhamento regular, no molde já previamente realizado pela seção de Dermatologia, deve ser mantido. Estabelecer um novo ambulatório multidisciplinar para o aconselhamento genético pode não justificar o impacto econômico institucional, já que os recursos financeiros são limitados e a frequência de VP na nossa população foi extremamente baixa.

7. Conclusões

1. A prevalência de mutações no gene *CDKN2A* foi de 1,4% na população de pacientes do INCA que preenchem os critérios clínicos para melanoma hereditário. Não foi identificada nenhuma mutação no gene *CDK4*.

2. As principais características fenotípicas da população em estudo foram pele clara (fototipos II e III), olhos e cabelos castanhos/pretos, presença de múltiplos nevos melanocíticos e de síndrome do nevo atípico, alta densidade de efélides, múltiplos melanomas primários e localização preferencial do melanoma no tronco.

3. As características histopatológicas principais dos melanomas da população em estudo foram subtipo extensivo superficial predominante e a maioria apresentou índice de Breslow ≤ 1 mm.

4. Por ter havido apenas um paciente com variante provavelmente patogênica, não foi possível correlacionar a presença de mutações com os dados fenotípicos e histopatológicos.

Referências

AITKEN, J. et al. CDKN2A variants in a population-based sample of Queensland families with melanoma. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 91, n. 5, p. 446–452, 3 mar. 1999.

AMANCIO, C. T.; NASCIMENTO, L. F. C. Cutaneous melanoma in the State of São Paulo: a spatial approach. **Anais Brasileiros De Dermatologia**, v. 89, n. 3, p. 442–446, jun. 2014.

ANDREOTTI, V. et al. The CDKN2A/p16(INK) (4a) 5'UTR sequence and translational regulation: impact of novel variants predisposing to melanoma. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 29, n. 2, p. 210–221, mar. 2016.

AOUDE, L. G. et al. Nonsense mutations in the shelterin complex genes ACD and TERF2IP in familial melanoma. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 107, n. 2, fev. 2015a.

AOUDE, L. G. et al. Genetics of familial melanoma: 20 years after CDKN2A. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 28, n. 2, p. 148–160, mar. 2015b.

ASHTON-PROLLA, P. et al. Clinical and molecular characterization of patients at risk for hereditary melanoma in southern Brazil. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 128, n. 2, p. 421–425, fev. 2008.

ASPINWALL, L. G. et al. Melanoma genetic counseling and test reporting improve screening adherence among unaffected carriers 2 years later. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 22, n. 10, p. 1687–1697, out. 2013.

AUROY, S. et al. Sporadic multiple primary melanoma cases: CDKN2A germline mutations with a founder effect. **Genes, Chromosomes & Cancer**, v. 32, n. 3, p. 195–202, nov. 2001.

- AVRIL, M.-F. et al. [Recommendations for genetic testing and management of individuals genetically at-risk of cutaneous melanoma]. **Annales De Dermatologie Et De Venereologie**, v. 142, n. 1, p. 26–36, jan. 2015.
- BADENAS, C. et al. Genetic counseling in melanoma. **Dermatologic Therapy**, v. 25, n. 5, p. 397–402, out. 2012.
- BAKOS, R. M. et al. The CDKN2A p.A148T variant is associated with cutaneous melanoma in Southern Brazil. **Experimental Dermatology**, v. 20, n. 11, p. 890–893, nov. 2011.
- BERTOLOTTO, C. et al. A SUMOylation-defective MITF germline mutation predisposes to melanoma and renal carcinoma. **Nature**, v. 480, n. 7375, p. 94–98, 19 out. 2011.
- BERTRAM, C. G. et al. An assessment of the CDKN2A variant Ala148Thr as a nevus/melanoma susceptibility allele. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 119, n. 4, p. 961–965, out. 2002.
- BIAN, Z. et al. Effect of tumor suppressor gene cyclin-dependent kinase inhibitor 2A wild-type and A148T mutant on the cell cycle of human ovarian cancer cells. **Oncology Letters**, v. 7, n. 4, p. 1229–1232, abr. 2014.
- BORG, A. et al. High frequency of multiple melanomas and breast and pancreas carcinomas in CDKN2A mutation-positive melanoma families. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 92, n. 15, p. 1260–1266, 2 ago. 2000.
- BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.
- BUBIEN, V. et al. High cumulative risks of cancer in patients with PTEN hamartoma tumour syndrome. **Journal of Medical Genetics**, v. 50, n. 4, p. 255–263, abr. 2013.
- CANNON-ALBRIGHT, L. A. et al. Assignment of a locus for familial melanoma, MLM, to chromosome 9p13-p22. **Science (New York, N.Y.)**, v. 258, n. 5085, p. 1148–1152, 13 nov. 1992.

CANTO, M. I. et al. International Cancer of the Pancreas Screening (CAPS) Consortium summit on the management of patients with increased risk for familial pancreatic cancer. **Gut**, v. 62, n. 3, p. 339–347, mar. 2013.

CARBONE, M. et al. BAP1 and Cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 13, n. 3, p. 153–159, mar. 2013.

CHO, E.; ROSNER, B. A.; COLDITZ, G. A. Risk factors for melanoma by body site. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 14, n. 5, p. 1241–1244, maio 2005.

CICCARESE, G. et al. Clinical, pathological and dermoscopic phenotype of MITF p.E318K carrier cutaneous melanoma patients. **Journal of Translational Medicine**, v. 18, 13 fev. 2020.

ClinVar. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>>. Acesso em: 14 dez. 2021.

DALY, M. B. et al. NCCN Guidelines Insights: Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast, Ovarian, and Pancreatic, Version 1.2020. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN**, v. 18, n. 4, p. 380–391, 2020.

DE ÁVILA, A. L. R. et al. Germline CDKN2A mutations in Brazilian patients of hereditary cutaneous melanoma. **Familial Cancer**, v. 13, n. 4, p. 645–649, dez. 2014.

DE MELO, A. C. et al. Melanoma signature in Brazil: epidemiology, incidence, mortality, and trend lessons from a continental mixed population country in the past 15 years. **Melanoma Research**, v. 28, n. 6, p. 629–636, 2018.

DEBNIAK, T. et al. CDKN2A common variants and their association with melanoma risk: a population-based study. **Cancer Research**, v. 65, n. 3, p. 835–839, 1 fev. 2005.

DI LORENZO, S. et al. Absence of germline CDKN2A mutation in Sicilian patients with familial malignant melanoma: Could it be a population-specific genetic signature? **Cancer Biology & Therapy**, v. 17, n. 1, p. 83–90, 2016.

DOMCHEK, S. M. et al. Multiplex genetic testing for cancer susceptibility: out on the high wire without a net? **Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 31, n. 10, p. 1267–1270, 1 abr. 2013.

DUROCHER, D. et al. The FHA domain is a modular phosphopeptide recognition motif. **Molecular Cell**, v. 4, n. 3, p. 387–394, set. 1999.

EASTON, D. F. et al. Gene-Panel Sequencing and the Prediction of Breast-Cancer Risk. **The New England journal of medicine**, v. 372, n. 23, p. 2243–2257, 4 jun. 2015.

ELIASON, M. J. et al. Population-based prevalence of CDKN2A mutations in Utah melanoma families. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 126, n. 3, p. 660–666, mar. 2006.

Ensembl genome browser 105. Disponível em: <<https://www.ensembl.org/index.html>>. Acesso em: 14 dez. 2021.

FARGNOLI, M. C. et al. MC1R variants increase melanoma risk in families with CDKN2A mutations: a meta-analysis. **European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)**, v. 46, n. 8, p. 1413–1420, maio 2010.

FITZPATRICK, T. B. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. **Archives of Dermatology**, v. 124, n. 6, p. 869–871, jun. 1988.

FLORELL, S. R. et al. Population-based analysis of prognostic factors and survival in familial melanoma. **Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 23, n. 28, p. 7168–7177, 1 out. 2005.

Genetic Counseling: An Indispensable Step in the Genetic Testing Process. **Journal of Oncology Practice**, v. 4, n. 2, p. 96–98, mar. 2008.

GHIORZO, P. et al. Characterization of ligurian melanoma families and risk of occurrence of other neoplasia. **International Journal of Cancer**, v. 83, n. 4, p. 441–448, 12 nov. 1999.

GHIORZO, P. et al. Prevalence of the E318K MITF germline mutation in Italian melanoma patients: associations with histological subtypes and family cancer history. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 26, n. 2, p. 259–262, mar. 2013.

GIACINTI, C.; GIORDANO, A. RB and cell cycle progression. **Oncogene**, v. 25, n. 38, p. 5220–5227, 28 ago. 2006.

GIRONI, L. C. et al. Melanoma-prone families: new evidence of distinctive clinical and histological features of melanomas in CDKN2A mutation carriers. **Archives of Dermatological Research**, v. 310, n. 10, p. 769–784, dez. 2018.

GOGGINS, M. et al. Management of patients with increased risk for familial pancreatic cancer: updated recommendations from the International Cancer of the Pancreas Screening (CAPS) Consortium. **Gut**, v. 69, n. 1, p. 7–17, 2020.

GOLDSTEIN, A. M. et al. Increased risk of pancreatic cancer in melanoma-prone kindreds with p16INK4 mutations. **The New England Journal of Medicine**, v. 333, n. 15, p. 970–974, 12 out. 1995.

GOLDSTEIN, A. M. et al. Association of MC1R variants and risk of melanoma in melanoma-prone families with CDKN2A mutations. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 14, n. 9, p. 2208–2212, set. 2005.

GOLDSTEIN, A. M. et al. High-risk melanoma susceptibility genes and pancreatic cancer, neural system tumors, and uveal melanoma across GenoMEL. **Cancer Research**, v. 66, n. 20, p. 9818–9828, 15 out. 2006.

GOLDSTEIN, A. M. et al. Features associated with germline CDKN2A mutations: a GenoMEL study of melanoma-prone families from three continents. **Journal of Medical Genetics**, v. 44, n. 2, p. 99–106, fev. 2007.

GOLDSTEIN, A. M.; TUCKER, M. A. Genetic epidemiology of familial melanoma. **Dermatologic Clinics**, v. 13, n. 3, p. 605–612, jul. 1995.

GOLDSTEIN, A. M.; TUCKER, M. A. Genetic epidemiology of cutaneous melanoma: a global perspective. **Archives of Dermatology**, v. 137, n. 11, p. 1493–1496, nov. 2001.

GRAZZIOTIN, T. C. et al. Genetic variations of patients with familial or multiple melanoma in Southern Brazil. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV**, v. 27, n. 2, p. e179-185, fev. 2013.

GUMASTE, P. V. et al. Skin cancer risk in BRCA1/2 mutation carriers. **The British journal of dermatology**, v. 172, n. 6, p. 1498–1506, jun. 2015.

HANSEN, C. B. et al. Clinical germline genetic testing for melanoma. **The Lancet. Oncology**, v. 5, n. 5, p. 314–319, maio 2004.

HARLAND, M. et al. Germline TERT promoter mutations are rare in familial melanoma. **Familial Cancer**, v. 15, n. 1, p. 139–144, jan. 2016.

HELGADOTTIR, H. et al. High risk of tobacco-related cancers in CDKN2A mutation-positive melanoma families. **Journal of Medical Genetics**, v. 51, n. 8, p. 545–552, ago. 2014.

HELGADOTTIR, H. et al. Germline CDKN2A Mutation Status and Survival in Familial Melanoma Cases. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 108, n. 11, 2016.

HELGADOTTIR, H. et al. Cancer risks and survival in patients with multiple primary melanomas: Association with family history of melanoma and germline CDKN2A mutation status. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 77, n. 5, p. 893–901, nov. 2017.

HELGADOTTIR, H. et al. Efficacy of novel immunotherapy regimens in patients with metastatic melanoma with germline CDKN2A mutations. **Journal of Medical Genetics**, v. 57, n. 5, p. 316–321, maio 2020.

HORNBUCKLE, J. et al. Patterns of metastases in familial and non-familial melanoma. **Melanoma Research**, v. 13, n. 1, p. 105–109, fev. 2003.

HUBER, J.; RAMOS, E. S. The P48T germline mutation and polymorphism in the CDKN2A gene of patients with melanoma. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Medicas E Biologicas**, v. 39, n. 2, p. 237–241, fev. 2006.

HUSSUSSIAN, C. J. et al. Germline p16 mutations in familial melanoma. **Nature Genetics**, v. 8, n. 1, p. 15–21, set. 1994.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil>>. Acesso em: 11 maio. 2020.

KAMB, A. et al. Analysis of the p16 gene (CDKN2) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus. **Nature Genetics**, v. 8, n. 1, p. 23–26, set. 1994.

KEFFORD, R. F. et al. Counseling and DNA testing for individuals perceived to be genetically predisposed to melanoma: A consensus statement of the Melanoma Genetics Consortium. **Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 17, n. 10, p. 3245–3251, out. 1999.

KO, A.; HAN, S. Y.; SONG, J. Regulatory Network of ARF in Cancer Development. **Molecules and Cells**, v. 41, n. 5, p. 381–389, 31 maio 2018.

KUMAR, R. et al. A single nucleotide polymorphism in the 3'untranslated region of the CDKN2A gene is common in sporadic primary melanomas but mutations in the CDKN2B, CDKN2C, CDK4 and p53 genes are rare. **International Journal of Cancer**, v. 95, n. 6, p. 388–393, 20 nov. 2001.

LEACHMAN, S. A. et al. Selection criteria for genetic assessment of patients with familial melanoma. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 61, n. 4, p. 677.e1–14, out. 2009.

LEACHMAN, S. A. et al. Identification, genetic testing, and management of hereditary melanoma. **Cancer Metastasis Reviews**, v. 36, n. 1, p. 77–90, 2017.

LEVIN, T.; MÆHLE, L. Uptake of genetic counseling, genetic testing and surveillance in hereditary malignant melanoma (CDKN2A) in Norway. **Familial Cancer**, v. 16, n. 2, p. 257–265, 2017.

LILISCHKIS, R. et al. Cancer-associated mis-sense and deletion mutations impair p16INK4 CDK inhibitory activity. **International Journal of Cancer**, v. 66, n. 2, p. 249–254, 10 abr. 1996.

MACCIONI, L. et al. Variants at the 9p21 locus and melanoma risk. **BMC cancer**, v. 13, p. 325, 2 jul. 2013.

MAI, P. L. et al. Risks of first and subsequent cancers among TP53 mutation carriers in the National Cancer Institute Li-Fraumeni syndrome cohort. **Cancer**, v. 122, n. 23, p. 3673–3681, 1 dez. 2016.

MOLVEN, A. et al. A large Norwegian family with inherited malignant melanoma, multiple atypical nevi, and CDK4 mutation. **Genes, Chromosomes & Cancer**, v. 44, n. 1, p. 10–18, set. 2005.

MUKHERJEE, B. et al. Risk of non-melanoma cancers in first-degree relatives of CDKN2A mutation carriers. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 104, n. 12, p. 953–956, 20 jun. 2012.

NCCN. **NCCN - Evidence-Based Cancer Guidelines, Oncology Drug Compendium, Oncology Continuing Medical Education**. Disponível em: <<https://www.nccn.org/>>. Acesso em: 14 jun. 2020.

NEWTON, J. A. et al. How common is the atypical mole syndrome phenotype in apparently sporadic melanoma? **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 29, n. 6, p. 989–996, dez. 1993.

ORLOW, I. et al. CDKN2A germline mutations in individuals with cutaneous malignant melanoma. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 5, p. 1234–1243, maio 2007.

PASQUALI, E. et al. MC1R variants increased the risk of sporadic cutaneous melanoma in darker-pigmented Caucasians: a pooled-analysis from the M-SKIP project. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 3, p. 618–631, 1 fev. 2015.

PASTORINO, L. et al. Insights into Genetic Susceptibility to Melanoma by Gene Panel Testing: Potential Pathogenic Variants in ACD, ATM, BAP1, and POT1. **Cancers**, v. 12, n. 4, 19 abr. 2020.

POTRONY, M. et al. Update in genetic susceptibility in melanoma. **Annals of Translational Medicine**, v. 3, n. 15, p. 210, set. 2015.

PUIG, S. et al. Role of the CDKN2A locus in patients with multiple primary melanomas. **Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 23, n. 13, p. 3043–3051, 1 maio 2005.

PUIG, S. et al. Characterization of individuals at high risk of developing melanoma in Latin America: bases for genetic counseling in melanoma. **Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics**, v. 18, n. 7, p. 727–736, 2016.

PUNTERVOLL, H. E. et al. Melanoma prone families with CDK4 germline mutation: phenotypic profile and associations with MC1R variants. **Journal of Medical Genetics**, v. 50, n. 4, p. 264–270, abr. 2013.

RANADE, K. et al. Mutations associated with familial melanoma impair p16INK4 function. **Nature Genetics**, v. 10, n. 1, p. 114–116, maio 1995.

READ, J.; WADT, K. A. W.; HAYWARD, N. K. Melanoma genetics. **Journal of Medical Genetics**, v. 53, n. 1, p. 1–14, jan. 2016.

RICHARDS, S. 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. **Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics**, v. 17, n. 5, p. 405–424, maio 2015.

ROBLES-ESPINOZA, C. D. et al. POT1 loss-of-function variants predispose to familial melanoma. **Nature Genetics**, v. 46, n. 5, p. 478–481, maio 2014.

ROSSI, M. et al. Familial Melanoma: Diagnostic and Management Implications. **Dermatology Practical & Conceptual**, v. 9, n. 1, p. 10–16, jan. 2019.

SÁ, B. C. S. DE et al. Hereditary melanoma: a five-year study of Brazilian patients in a cancer referral center - phenotypic characteristics of probands and pathological features of primary tumors. **Anais Brasileiros De Dermatologia**, v. 93, n. 3, p. 337–340, jun. 2018.

SERRANO, M.; HANNON, G. J.; BEACH, D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. **Nature**, v. 366, n. 6456, p. 704–707, 16 dez. 1993.

SOUFIR, N. et al. Prevalence of p16 and CDK4 germline mutations in 48 melanoma-prone families in France. The French Familial Melanoma Study Group. **Human Molecular Genetics**, v. 7, n. 2, p. 209–216, fev. 1998.

SOURA, E. et al. Hereditary melanoma: Update on syndromes and management: Genetics of familial atypical multiple mole melanoma syndrome. v. 74, n. 3, p. 395–407, mar. 2016a.

SOURA, E. et al. Hereditary melanoma: Update on syndromes and management: Emerging melanoma cancer complexes and genetic counseling. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 74, n. 3, p. 411–420; quiz 421–422, mar. 2016b.

SPICA, T. et al. The A148T variant of the CDKN2A gene is not associated with melanoma risk in the French and Italian populations. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 126, n. 7, p. 1657–1660, jul. 2006.

STURM, R. A. et al. Phenotypic characterization of nevus and tumor patterns in MITF E318K mutation carrier melanoma patients. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 134, n. 1, p. 141–149, jan. 2014.

SWETTER, S. M. et al. Guidelines of care for the management of primary cutaneous melanoma. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 80, n. 1, p. 208–250, 2019.

SYNGAL, S. et al. ACG clinical guideline: Genetic testing and management of hereditary gastrointestinal cancer syndromes. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 110, n. 2, p. 223–262; quiz 263, fev. 2015.

- TONOREZOS, E. S. et al. Recommendations for long-term follow-up of adults with heritable retinoblastoma. **Ophthalmology**, 15 maio 2020.
- TOUSSI, A. et al. Germline mutations predisposing to melanoma. **Journal of Cutaneous Pathology**, 6 abr. 2020.
- TOVAR-PARRA, J. D. et al. CDKN2A Polymorphism in Melanoma Patients in Colombian Population: A Case-Control Study. **BioMed Research International**, v. 2020, p. 7458917, 2020.
- U.S. Cancer Statistics Data Visualizations Tool | CDC**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/cancer/uscs/dataviz/index.htm>>. Acesso em: 11 maio. 2020.
- VAN DER RHEE, J. I. et al. Clinical and histologic characteristics of malignant melanoma in families with a germline mutation in CDKN2A. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 65, n. 2, p. 281–288, ago. 2011.
- VISSER, M.; VAN DER STOEP, N.; GRUIS, N. Progress report on the major clinical advances in patient-oriented research into familial melanoma (2013-2018). **Familial Cancer**, v. 18, n. 2, p. 267–271, 2019.
- WANG, A. et al. Gene of the month: BAP1. **Journal of Clinical Pathology**, v. 69, n. 9, p. 750–753, set. 2016.
- WILLIAMS, P. F. et al. Melanocortin 1 receptor and risk of cutaneous melanoma: a meta-analysis and estimates of population burden. **International Journal of Cancer**, v. 129, n. 7, p. 1730–1740, 1 out. 2011.
- XU, H. et al. Inherited coding variants at the CDKN2A locus influence susceptibility to acute lymphoblastic leukaemia in children. **Nature Communications**, v. 6, p. 7553, 24 jun. 2015.
- YOKOYAMA, S. et al. A novel recurrent mutation in MITF predisposes to familial and sporadic melanoma. **Nature**, v. 480, n. 7375, p. 99–103, 13 nov. 2011.
- ZHANG, A. J. et al. BRCA1-associated protein (BAP1)-inactivated melanocytic tumors. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 46, n. 12, p. 965–972, dez. 2019.

ZHANG, Y.; XIONG, Y.; YARBROUGH, W. G. ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. **Cell**, v. 92, n. 6, p. 725–734, 20 mar. 1998.

ZUO, L. et al. Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. **Nature Genetics**, v. 12, n. 1, p. 97–99, jan. 1996.



Contents lists available at ScienceDirect

Critical Reviews in Oncology / Hematology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/critrevonc

Molecular landscape of Hereditary Melanoma

Joyce Ribeiro Moura Brasil Arnaut^{a,*}, Isabella dos Santos Guimarães^a,
 Anna Cláudia Evangelista dos Santos^b, Flora de Moraes Lino da Silva^a,
 Jorge Ricardo Machado^c, Andreia Cristina de Melo^a

^a Division of Clinical Research and Technological Development, Brazilian National Cancer Institute (INCA), Rio de Janeiro, Brazil

^b Division of Experimental and Translational Research, Brazilian National Cancer Institute (INCA), Rio de Janeiro, Brazil

^c Division of Dermatology, Brazilian National Cancer Institute (INCA), Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Melanoma
 Hereditary melanoma
 Familial melanoma
 CDKN2A
 Melanoma genetics
 Genetic counselling
 Genetic testing

ABSTRACT

Melanoma is considered the most lethal skin cancer and its incidence has increased during the past decades. About 10 % of cases are classified as hereditary melanoma. Genetic predisposition usually manifests itself clinically as early onset and multiple cutaneous melanomas. Several genes have been identified as involved in melanoma susceptibility, some of them still with unknown clinical relevance. Beyond melanoma, the affected families are also more prone to develop other malignancies, such as pancreatic cancer. The identification of risk families and involved genes is of great importance, since different forms of oncological surveillance are recommended. However, well established guidelines to standardize both the selection of individuals and the genetic panel to be requested are still lacking. Given the importance of the genetic counselling and testing in the context of clinical suspicion of hereditary melanoma, this paper aims to review the literature regarding genetic panel indications worldwide.

1. Introduction

Melanoma is a malignant tumor that arises from uncontrolled proliferation of melanocytes. The overall incidence of melanoma has been increasing worldwide during the past decades, particularly in the United States and European countries. Australia's incidence is among the highest in the world (Bray et al., 2018). Although Brazil is a low incidence country of melanoma (Anon, 2019a), the median incidence rate almost doubled between 2000 and 2013 (de Melo et al., 2018). In developed countries melanoma represents the 6th most common cancer (Soura et al., 2016a; Anon, 2019b). Melanoma is considered the most lethal skin cancer, accounting for around 60,000 deaths worldwide per year according to the GLOBOCAN estimates for 2018 (Bray et al., 2018).

The etiology of melanoma has been attributed mainly to environmental factors (ultraviolet light exposure in those with phenotypic susceptibility) and less frequently to genetic predisposition (Potrony et al., 2015). Around 7–15% of cases occur in patients with a family history of melanoma, however, most of them are sporadic cases related to common sun exposures experiences in relatives sharing susceptible

phenotypic characteristics (Soura et al., 2016a). About 90 % of melanoma cases are considered sporadic and only 10 % are classified as hereditary melanoma. Genetic predisposition usually manifests itself clinically as early onset and multiple cutaneous melanomas.

In the recent decades, several genes have been identified as involved in melanoma susceptibility (Potrony et al., 2015; Aoude et al., 2015a; Read et al., 2016; Visser et al., 2019). *CDKN2A* and *GDK4*, compounds of the same pathway, were the first high-penetrance melanoma genes identified (Hussussian et al., 1994; Zuo et al., 1996). More recently, *BAP1* and genes required for telomere protection, as *POT1*, were found in families with melanoma cases (Wang et al., 2016; Robles-Espinoza et al., 2014). There are also genes of intermediate-risk, as *MC1R* and *MITF*, and multiple low-penetrance risk variants associated with melanomas (Williams et al., 2011; Yokoyama et al., 2011; Landi et al., 2020; Goldstein et al., 2017). In addition, other genes such as *TP53* (Mai et al., 2016), *RBI* (Tonorez et al., 2020), *BRCA2* (Gumaste et al., 2015), *PTEN* (Bubien et al., 2013) are related to other classic cancer familial syndromes with multiple other tumors, increasing also the risk of melanomas.

* Corresponding author at: Division of Clinical Research and Technological Development, Brazilian National Cancer Institute (INCA), 37 André Cavalcanti Street, Rio de Janeiro, RJ, 20231-050, Brazil.

E-mail addresses: contato@joycearnaut.com.br (J. Ribeiro Moura Brasil Arnaut), isabella.guimaraes@inca.gov.br (I. dos Santos Guimarães), acsantos@inca.gov.br (A.C. Evangelista dos Santos), floralino@gmail.com (F. de Moraes Lino da Silva), jmachado@inca.gov.br (J.R. Machado), andrea.melo@inca.gov.br (A.C. de Melo).

<https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2021.103425>

Received 2 July 2020; Received in revised form 20 May 2021; Accepted 4 July 2021

Available online 7 July 2021

1040-8428/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

Anexo II

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Prevalência das mutações em genes de predisposição ao melanoma familiar nos pacientes do INCA.

Pesquisador: Andréia Cristina de Melo

Área Temática: Genética Humana:

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

Versão: 2

CAAE: 05757119.8.0000.5274

Instituição Proponente: Coordenação de Pesquisa Clínica e Incorporação Tecnológica

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.144.624

Apresentação do Projeto:

- Conforme Parecer Consubstanciado do CEP-INCA de número 3.123.566, datado de 28 de Janeiro de 2019.

Objetivo da Pesquisa:

- Conforme Parecer Consubstanciado do CEP-INCA de número 3.123.566, datado de 28 de Janeiro de 2019.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

- Conforme Parecer Consubstanciado do CEP-INCA de número 3.123.566, datado de 28 de Janeiro de 2019.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

- Conforme Parecer Consubstanciado do CEP-INCA de número 3.123.566, datado de 28 de Janeiro de 2019.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- Conforme Parecer Consubstanciado do CEP-INCA de número 3.123.566, datado de 28 de Janeiro de 2019.

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

- Trata-se da análise das respostas às pendências apontadas no Parecer Consubstanciado do

CEP-INCA de número 3.123.566, datado de 28 de Janeiro de 2019:

1. Uma vez que o estudo prevê a realização de exame histopatológico no Serviço de Anatomia Patológica do INCA solicita-se incluir no Formulário para Submissão de Estudos no INCA a assinatura da chefia do DIPAT e do médico patologista responsável pelos exames, que também deverá ser incluído na Plataforma Brasil, como Pesquisador Colaborador.

Resposta (arquivo "INCA_RESPOSTA_A_PENDENCIA.pdf"): O Formulário CEP e o preenchimento da Plataforma Brasil foram ajustados conforme solicitado (arquivo "INCA_FORMULARIO_CEP_ATUALIZADO.pdf").

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer (CEP-INCA), de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS Nº 466/2012 e na Norma Operacional CNS Nº 001/2013, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Ressalto o(a) pesquisador(a) responsável deverá apresentar relatórios semestrais a respeito do seu estudo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS DO PROJETO 1256321.pdf	12/02/2019 16:10:03		Aceito
Declaração de Pesquisadores	INCA_FORMULARIO_CEP_ATUALIZADO.pdf	12/02/2019 16:09:34	ULLY BARBOSA DA COSTA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	INCA_RESPOSTA_A_PENDENCIA.pdf	12/02/2019 16:09:28	ULLY BARBOSA DA COSTA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	RESPOSTA_A_PENDENCIA.doc	12/02/2019 16:09:22	ULLY BARBOSA DA COSTA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investi	INCA_PROJETO_MESTRADO_MELANOMA_FAMILIAL.docx	11/01/2019 11:00:23	Priscila de Jesus doValle	Aceito

gador				
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	INCA_TCLE.doc	11/01/2019 11:00:18	Priscila de Jesus do Valle	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	INCA_Formulario_CEP.pdf	11/01/2019 11:00:09	Priscila de Jesus do Valle	Aceito
Declaração de Pesquisadores	INCA_Declaracao_Pesquisador.pdf	11/01/2019 10:59:52	Priscila de Jesus do Valle	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	INCA_Declaracao_Biorrepositorio.pdf	11/01/2019 10:59:40	Priscila de Jesus do Valle	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	INCA_Declaracao_Amostra.pdf	11/01/2019 10:59:33	Priscila de Jesus do Valle	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	INCA_Declaracao_Infraestrutura.pdf	11/01/2019 10:59:22	Priscila de Jesus do Valle	Aceito
Folha de Rosto	INCA_Folha_de_Rosto.pdf	11/01/2019 10:57:10	Priscila de Jesus do Valle	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 13 de Fevereiro de 2019

Assinado por:

Carlos Henrique Debenedito Silva(Coordenador(a))

Anexo III

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PREVALÊNCIA DAS MUTAÇÕES EM GENES DE PREDISPOSIÇÃO AO MELANOMA HEREDITÁRIO NOS PACIENTES DO INCA

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa porque foi atendido (a) ou está sendo atendido (a) nesta instituição e teve diagnóstico ou suspeita de um tipo de câncer chamado melanoma. Para que você possa decidir se quer participar ou não, precisa conhecer os benefícios, os riscos e as consequências pela sua participação.

Este documento é chamado de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e tem esse nome porque você só deve aceitar participar desta pesquisa depois de ter lido e entendido este documento. Leia as informações com atenção e converse com o pesquisador responsável e com a equipe da pesquisa sobre quaisquer dúvidas que você tenha. Caso haja alguma palavra ou frase que você não entenda, converse com a pessoa responsável por obter este consentimento, para maiores esclarecimentos. Converse com os seus familiares, amigos e com a equipe médica antes de tomar uma decisão. Se você tiver dúvidas depois de ler estas informações, entre em contato com o pesquisador responsável.

Após receber todas as informações, e todas as dúvidas forem esclarecidas, você poderá fornecer seu consentimento por escrito, caso queira participar.

PROPÓSITO DA PESQUISA

Identificar a presença de mutações em genes que podem aumentar o risco de melanoma. Analisar as características clínicas dos pacientes em estudo, assim como as características dos melanomas diagnosticados nesses pacientes.

PROCEDIMENTOS DA PESQUISA

Para realizar o rastreamento das mutações genéticas, é necessária a coleta de uma pequena quantidade do seu sangue (o equivalente a dois tubos pequenos de 5 mililitros cada) para ser utilizada nesta pesquisa. Este procedimento só ocorrerá após a sua autorização. Os materiais não utilizados, ou aqueles que sobram dos exames, são descartados conforme a Legislação Sanitária.

Se você concordar, os pesquisadores responsáveis por esta pesquisa consultarão seus dados clínicos e laboratoriais que se encontram no seu prontuário. Os pesquisadores poderão utilizar também uma parte do seu sangue para realizar o teste genético. Serão pesquisadas mutações em genes que podem predispor ao desenvolvimento do melanoma. Você será acompanhado no ambulatório de aconselhamento genético do INCA para receber orientações adicionais sobre o teste genético e sobre o significado dos seus possíveis resultados. Se o teste genético revelar que você é portador de alguma mutação avaliada neste estudo, seus familiares também terão direito à avaliação no serviço de aconselhamento genético do INCA.

Todas as amostras biológicas coletadas durante esta pesquisa, conforme descrito acima, serão utilizadas apenas para os propósitos descritos neste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Ao final da pesquisa, se você autorizar, suas amostras poderão ser armazenadas por até 10 anos para ser utilizado em pesquisas futuras. No futuro, qualquer pesquisa que contemple o uso das suas amostras armazenadas deverá ser aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do INCA e você receberá um novo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para autorizar esses testes antecipadamente. É importante ressaltar que você poderá participar desta pesquisa mesmo que não autorize a armazenar o material que restou. Se você decidir mais tarde que não deseja ter este material armazenado para uso futuro, você poderá entrar em contato a qualquer momento com a equipe da pesquisa para que suas amostras sejam destruídas, sem ter que explicar as suas razões para fazê-lo.

BENEFÍCIOS

Você não será remunerado por sua participação e esta pesquisa poderá não poderá oferecer benefícios diretos a você. Se você concordar com o uso de suas informações e/ou do material do modo descrito acima, é necessário esclarecer que você não terá quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre eventuais resultados decorrentes desta pesquisa.

O benefício principal da sua participação é possibilitar que no futuro, com os resultados alcançados com esta pesquisa, o diagnóstico e o tratamento para esse tipo de câncer beneficiem outros pacientes.

RISCOS

O seu médico irá informá-lo em detalhes sobre os riscos associados aos procedimentos adicionais da coleta de sangue. De maneira geral, os riscos da coleta

de sangue podem incluir desmaio, dor e/ou hematoma (mancha roxa na pele). Raramente pode haver um pequeno coágulo sanguíneo ou infecção no local da picada da agulha.

CUSTOS

Se você concordar com o uso da parte de seu tumor e/ou sangue armazenados e/ou das informações do seu prontuário como descrito acima, você não terá quaisquer custos ou despesas (gastos) pela sua participação nessa pesquisa. Você não pagará por qualquer procedimento, medicação em estudo ou teste exigido como parte desta pesquisa.

Você e, eventualmente o/a seu/sua acompanhante serão adequadamente reembolsados pelas suas despesas com transporte e alimentação para cada dia de consulta da pesquisa, ou seja, todos os seus gastos para estar no centro de pesquisa e se alimentar nos dias das visitas relacionadas exclusivamente ao protocolo serão reembolsados por meio do médico responsável pelo seu cuidado.

CONFIDENCIALIDADE

Se você optar por participar desta pesquisa, as informações sobre a sua saúde e seus dados pessoais serão mantidas de maneira confidencial e sigilosa. Seus dados somente serão utilizados depois de anonimizados (ou seja, sem sua identificação). Apenas os pesquisadores autorizados terão acesso aos dados individuais, resultados de exames e testes bem como às informações do seu registro médico. Mesmo que estes dados sejam utilizados para propósitos de divulgação e/ou publicação científica, sua identidade permanecerá em segredo.

TRATAMENTO MÉDICO EM CASO DE DANOS

Todo e qualquer dano decorrente do desenvolvimento desta pesquisa, e que necessite de atendimento médico, ficará a cargo da instituição. Seu tratamento e acompanhamento médico independem de sua participação nesta pesquisa.

BASES DA PARTICIPAÇÃO

A sua participação é voluntária e a recusa em autorizar a sua participação não acarretará quaisquer penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito, ou mudança no seu tratamento e acompanhamento médico nesta instituição. Você poderá retirar seu consentimento a qualquer momento sem qualquer prejuízo. Em caso de você decidir interromper sua participação na pesquisa, a equipe de pesquisadores deve ser comunicada e a coleta de amostras (ou o uso das amostras) para os exames relativos à pesquisa será imediatamente interrompida.

ACESSO AO RESULTADOS DE EXAMES

Você pode ter acesso a qualquer resultado relacionado à esta pesquisa. Estes resultados serão enviados ao seu médico e ele os discutirá com você. Se você tiver interesse, você poderá receber uma cópia dos mesmos.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS

A pessoa responsável pela obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido lhe explicou claramente o conteúdo destas informações e se colocou à disposição para responder às suas perguntas sempre que tiver novas dúvidas. Você terá garantia de acesso, em qualquer etapa da pesquisa, sobre qualquer esclarecimento de eventuais dúvidas e inclusive para tomar conhecimento dos resultados desta pesquisa. Neste caso, por favor, ligue para Joyce Ribeiro Moura Brasil Arnaut no telefone (21) 98653.0203 de 8hs às 17hs. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do INCA, que está formado por profissionais de diferentes áreas, que revisam os projetos de pesquisa que envolvem seres humanos, para garantir os direitos, a segurança e o bem-estar de todos as pessoas que se voluntariam a participar destes. Se tiver perguntas sobre seus direitos como participante de pesquisa, você pode entrar em contato com o CEP do INCA na Rua do Resende N°128, Sala 203, de segunda a sexta de 9:00 a 17:00 hs, nos telefones (21) 3207-4550 ou 3207-4556, ou também pelo e-mail: cep@inca.gov.br. Este termo está sendo elaborado em duas vias, sendo que uma via ficará com você e outra será arquivada com os pesquisadores responsáveis.

CONSENTIMENTO

Li as informações acima e entendi o propósito da solicitação de permissão para o uso das informações contidas no meu registro médico e de parte de meu tumor e/ou meu sangue obtidos durante o atendimento nesse hospital. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas foram respondidas

Ficaram claros para mim quais são procedimentos a serem realizados, riscos e a garantia de esclarecimentos permanentes.

Ficou claro também que a minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso aos dados e de esclarecer minhas dúvidas a qualquer tempo.

Entendo que meu nome não será publicado e toda tentativa será feita para assegurar o meu anonimato.

Concordo voluntariamente em participar desta pesquisa e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidade ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

() Eu concordo em participar desta pesquisa e **CONCORDO** em ter minhas amostras armazenadas e utilizadas para uso em pesquisas futuras aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa do INCA e para isto deverei assinar no futuro, um novo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, se eu concordar.

ou

() Eu concordo em participar desta pesquisa, mas **NÃO CONCORDO** em ter minhas amostras armazenadas para uso em pesquisas futuras.

Eu, por intermédio deste, dou livremente meu consentimento para participar nesta pesquisa.

_____ Nome e Assinatura do participante	_____ / / Data
_____ Nome e Assinatura do Responsável Legal/Testemunha Imparcial (quando pertinente)	_____ / / Data

Eu, abaixo assinado, expliquei completamente os detalhes relevantes desta pesquisa ao paciente indicado acima e/ou pessoa autorizada para consentir pelo mesmo. Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente para a participação desta pesquisa.

_____ Nome e Assinatura do Responsável pela obtenção do Termo	_____ / / Data
---	----------------------

Anexo IV

FICHA DE COLETA DE DADOS

Informações pessoais

1. Sexo: (1) masculino (2) feminino
2. Data de nascimento

Dados clínicos e histopatológicos

1. Cor de olhos: (1) azul (2) verde (3) castanho/preto
2. Cor dos cabelos: (1) ruivo (2) loiro (3) castanho/preto
3. Fototipo: I a VI
4. Densidade de efélides nos ombros e membros superiores (variação de 0-100 em intervalos de 20)
 - (1) 0 = ausência de efélides
 - (2) 20/40 = baixa densidade
 - (3) 60/80/100 = alta densidade
5. Idade do primeiro diagnóstico de melanoma
6. Número de melanomas primários
7. Localização do melanoma
 - (1) Cabeça e pescoço (2) Tronco (3) Membros superiores
 - (4) Membros inferiores (5) Outras
8. Estadiamento do melanoma:
9. Subtipo histológico do melanoma:
 - (1) Extensivo superficial (2) Nodular (3) Lentigo maligno (4) Acral (5) Outros
10. Breslow:
 - (1) Menor ou igual a 1 mm (2) Maior que 1 mm
11. Número de nevos melanocíticos: (1) 0 (2) 1-49 (3) >50
12. Presença de nevo atípico clínico: (1) Sim (2) Não
13. Presença da síndrome do nevo atípico: (1) Sim (2) Não
14. História de queimadura solar na infância, adolescência e/ou vida adulta
15. História de bronzeamento artificial
16. História de câncer de pele não-melanoma:
17. História de câncer em órgão interno não-melanoma:
18. Número de melanomas nos familiares de 1º ou 2º grau
17. História de outras neoplasias em familiares de 1º ou 2º grau