WANESSA CARDOSO DA SILVA

**Contribuição da genética do inflamassoma na predisposição a desenvolver
melanoma maligno esporádico**

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

Programa: Dermatologia

Orientadora: Dra. Telma Miyuki Oshiro

Coorientadora: Profa. Dra. Alessandra Pontillo

SÃO PAULO

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada à fonte.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Wanessa Cardoso da

Contribuição da genética do inflamassoma na predisposição a desenvolver melanoma maligno esporádico / Wanessa Cardoso da Silva. -- São Paulo, 2017.

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

Programa de Dermatologia.

Orientadora: Telma Miyuki Oshiro Sumida.

Coorientadora: Alessandra Pontillo.

Descritores: 1. Melanoma 2.Inflamação 3.Polimorfismo genético
4.Polimorfismo de núcleo único 5.Interleucina-1

USP/FM/DBD-069/17

**Dedico este trabalho aos pacientes que
buscam qualidade de vida e uma medicina
de respeito e amor. E aos indivíduos
saudáveis que almejam a prevenção ao
desenvolvimento do melanoma.**

AGRADECIMENTO

Agradeço a DEUS, pois me enviou a este mundo com o dom do amor, o que me fez seguir para a área da saúde com o intuito de ajudar ao próximo.

Agradeço a meus pais, Elisabet e Wagner que me deram os primeiros ensinamentos, a base do que sou e do que eu acredito; o apoio e o amor para uma filha primogênita e prematura, o que seria de mim sem eles?!

À minha irmã, Wivian, que é minha primeira melhor amiga na vida. Que nos deu um pequeno fofinho para amar, meu sobrinho Rafael.

Ao Alexander... Que entrou em minha vida para me ensinar o que é amar e ser amado.

À Renata e a Tatiana, minhas irmãs de coração, que me ajudam a entender as crises da vida, rindo ou chorando, mas juntas!!

À Dra. Telma Oshiro que me aceito como técnica, primeiramente, e depois me orientou com sabedoria e com o carinho de uma mãe.

À Profa. Dra. Alessandra Pontillo que me ensinou análises e mais análises, mas que me deu o carinho de uma tia.

À Laís que aceitou minha ajuda como técnica, que me ensinou muitas coisas... E que se tornou uma irmã em nossa família do laboratório.

À Bruna, Denise, Nathalia, Marcela, Sadia, Liã que são minhas outras irmãs... E nossa família é enorme, pois temos os primos Ana Paula, Alana, Edione, Jaíne, Elaine, Pamela, Fernanda, Dhermeson, Vinícius e Alexandre a quem também agradeço... Levarei a todos em meu coração.

Às meninas da citometria de fluxo, Noêmia, Rosângela e Patrícia, que me ensinaram técnicas modernas e inovadoras, além da amizade.

À turma da carga viral... Em especial ao Eduardo... Meu primeiro irmão de coração!!

Aos demais funcionários e alunos do Lim56.

Ao Prof. Dr. Cyro Festa Neto que me autorizou a realização das coletas de seus pacientes e a permanência nas dependências do ambulatório de dermatologia da Faculdade de Medicina da USP.

Aos Dr. Daniel Coelho de Sá e Dra. Dileléia Franco que me auxiliaram na obtenção de amostras, e que entraram para minha grande coleção de amigos.

À turma do ambulatório de Dermatologia, onde passei um bom tempo durante meu trabalho...
Principalmente ao Ricardo que me acolheu em seu laboratório, me cedeu um cantinho e que me ensinou muito sobre a micologia.

Ao Prof. Dr. Alberto Duarte que autorizou a utilizar as dependências do Lim56 para a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de doutorado direto e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

INTRODUÇÃO.....	01
1. Melanoma.....	02
1.1 Subtipos Histológicos.....	03
1.2 Profundidade das células tumorais no tecido.....	05
1.3 Outros fatores avaliados.....	05
2. Inflamassomas.....	06
2.1 Constituintes do Inflamassoma.....	06
2.2 Ativação canônica do Inflamassoma.....	09
2.3 Ativação não canônica do Inflamassoma.....	11
2.4 Regulação do Inflamassoma.....	11
3. Melanoma, inflamação e inflamassomas.....	13
JUSTIFICATIVA.....	16
OBJETIVOS.....	16
METODOLOGIA.....	17
1. Casuística.....	18
2. Criação do banco de DNA para o estudo de associação caso/controle.....	18
2.1. Isolamento do DNA do sangue periférico.....	18
2.2 Bancos de dados.....	19
3. Estudo de associação caso/controle.....	20
3.1. Seleção dos polimorfismos de base única (SNPs) em genes do inflamassoma.....	20
3.2. Genotipagem através da tecnologia TaqMan.....	20
4. Estudo de expressão gênica em biópsia.....	22
4.1. Extração do RNA total de biópsia.....	22
4.2 Retrotranscrição do RNA e análise dos genes do inflamassoma.....	22
RESULTADOS.....	25
1. Composição da casuística.....	25

2. Análise da associação dos SNPs selecionados nos genes NLRP1, NLRP3, CARD8, IL1 β , IL18 e a susceptibilidade a desenvolver melanoma maligno esporádico.....	26
3. Análise da associação dos SNPs selecionados nos genes NLRP1, NLRP3, CARD8, IL1 β , IL18 sobre subtipos histológicos do melanoma.....	35
4. Análise da associação dos SNPs selecionados nos genes NLRP1, NLRP3, CARD8, IL1 β , IL18 sobre a invasividade do melanoma.....	39
5. Análise da associação dos SNPs selecionados nos genes NLRP1, NLRP3, CARD8, IL1 β , IL18 sobre a predisposição a desenvolver melanoma em indivíduos classificados com base no tipo de pele.....	41
6. Avaliação da expressão relativa de genes selecionados do Inflamassoma em biópsias de melanoma e nevos benignos.....	44
DISCUSSÃO.....	48
CONCLUSÕES.....	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
APÊNDICES.....	63
A. Lista completa dos resultados individuais de genotipagem dos pacientes.....	64
B. Lista completa dos resultados individuais de genotipagem dos indivíduos saudáveis.....	71
C. Participação em congressos.....	77
ANEXOS.....	78
A. Produções Literárias.....	79
B. Aceite do comitê de ética.....	80
C. Termos de consentimento.....	82

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AD -	Discriminação Alélica, do inglês: <i>Allelic Discrimination</i> .
AIM2 -	<i>Absent in Melanoma 2</i>
ALM -	Melanoma Lentiginoso Acral, do inglês: <i>Acral Lentiginous Melanoma</i> .
AP1 -	Proteína ativadora 1
AQ –	Quantificação absoluta, do inglês: <i>Absolute Quantification</i> .
ASC -	Proteína <i>Speck-like</i> associada à Apoptose com domínio de recrutamento de Caspase, do inglês: <i>Apoptosis-associated Speck-like protein containing a Caspase recruitment domain</i> .
ATP–	Trifosfato de Adenosina, do inglês: <i>Adenosine triphosphate</i> .
bFGF -	Fator de crescimento basal de fibroblastos, do inglês: <i>basic Fibroblast Growth Factor</i> .
CARD -	Domínio de recrutamento associado à caspase, do inglês: <i>Caspase-Associated Recruitment Domain</i> .
CASP1–	Caspase 1
cAMP	<i>Adenosina monofosfato cíclica</i>
CCL2 (MCP-1) –	<i>Chemokine (C-C motif) ligand2</i> também é conhecida como <i>Monocyte chemotactic protein 1 (MCP1)</i>
CCL5 (RANTES) -	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 5</i> , também conhecida como <i>Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted (RANTES)</i> .
CTL -	Lectina tipo C
CXCL1-3 (MGSA-Groa-c)-	<i>C-X-C motif chemokine 1-3</i> também conhecido como <i>Melanocyte Growth Stimulatory Activity or Growth Regulated Proteins</i>
DAMPs -	Padrão Molecular Associado ao Perigo, do inglês: <i>Damage-Associated Molecular Patterns</i> .
DC -	Célula Dendrítica, do inglês <i>Dendritic Cell</i>
FC -	<i>Fold Change</i>
FDA -	<i>Food and Drug Administration</i>
GLM -	Conjunto de Modelos Globais, do inglês: <i>General Linear Model</i> .
HCFMUSP -	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HMGB1 -	<i>High-mobility Group protein B1</i>
IC –	Intervalo de Confiança
IFN -	Interferon
IL-	Interleucina
IL-1R –	Receptor de IL-1
IRFs	Fator regulador de interferon, do inglês: <i>Interferon regulatory factor</i>
LD -	Desequilíbrio de ligação, do inglês: <i>Linkage disequilibrium</i> .

LPS –	Lipopolissacarídeos, do inglês: <i>Lipopolysaccharide</i> .
MDP -	Muramil-dipeptídeo
MDSCs -	Do inglês: <i>Myeloid-derived suppressor cells</i>
MML -	Melanoma Lentigo Maligno, do inglês: <i>Lentigo Malign or Lentigo Malign Melanoma</i> .
MMP1 –	<i>Matrix metalloproteinase-1</i>
MSU -	Urato monossódico
NF-κB -	Fator Nuclear-κB, do inglês: <i>Nuclear Factor –κB</i> .
NLR -	Receptores de ligação a Nucleotídeos contendo domínio com sequências repetidas de Resíduos do aminoácido leucina, do inglês: <i>nucleotide-binding domain leucine-rich repeat containing</i>
NLRC -	<i>NLR family containing a CARD domain</i>
NLRP -	<i>NLR family containing a PYD domain</i>
NM -	Melanoma Nodular, do inglês: <i>Nodular Melanoma</i> .
NOD –	<i>Nucleotide Binding and Oligomerization Domain</i>
OR –	<i>Odds Ratio</i>
PAMPs -	Padrão Molecular Associado ao Patógeno, do inglês: <i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i> .
PRR -	Receptor de Reconhecimento Padrão, do inglês: <i>Pattern Recognition Receptors</i> .
ROS -	Espécies Reativas de Oxigênio, do inglês: <i>Reactive Oxygen Species</i> .
SIRS -	Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica, do inglês: <i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i> .
SNP -	Polimorfismos de base única, do inglês: <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> .
SSM -	Melanoma Expansivo Superficial, do inglês: <i>Superficial Spreading Melanoma</i> .
STAT1 -	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
TGF-β -	<i>Transforming growth factor beta</i>
Th -	Célula T auxiliadora, do inglês: <i>lymphocytes t helper</i>
TLR -	Receptores do tipo Toll, do inglês: <i>Toll Like Receptor</i> .
TNF-α -	Fator de necrose tumoral α, do inglês: <i>Tumour Necrosis Factor-alpha</i> .
TUCAN –	Tumour-Up regulated Card-containing Antagonist of Caspase-9
VEGF -	Fator de crescimento endotelial vascular, do inglês: <i>Vascular endothelial growth factor</i> .

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Subtipo histológico do melanoma – SSM.....	03
Figura 2 - Subtipo histológico do melanoma – NM.....	04
Figura 3 - Subtipo histológico do melanoma – ALM.....	04
Figura 4 - Subtipo histológico do melanoma – LMM.....	05
Figura 5 - Esquema de estrutura, ativação e funcionamento do Inflamassoma em uma célula.....	10
Figura 6 - Exemplo de resultados obtidos após PCR em tempo real.....	21
Figura 7 - Diagrama de LD dos resultados das análises dos SNPs na coorte estudada.....	32
Figura 8 - Análise de expressão relativa de genes do inflamassoma em melanoma maligno esporádico.....	45
Figura 9 - Análise de expressão relativa de genes do inflamassoma em melanoma maligno esporádico, agrupados em metastáticos e não.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Polimorfismos selecionados.....	20
Tabela 2 - Características dos pacientes com melanoma maligno esporádico e dos controles.....	25
Tabela 3 – Frequência dos SNPs na população geral estudada.....	27
Tabela 4 – Frequência dos SNPs na coorte casos/controles estudada.....	28
Tabela 5 – Resultados da análise de associação entre SNPs nos genes do inflamassoma e a susceptibilidade ao melanoma maligno esporádico.....	29
Tabela 6 – Resultados da associação do polimorfismo rs6509365 em <i>CARD8</i> na coorte de casos/controles de melanoma maligno esporádico.....	31
Tabela 7 - Resultados da associação dos polimorfismos rs2043211 e rs6509365 em <i>CARD8</i> na coorte casos/controles de melanoma maligno esporádico.....	33
Tabela 8 – Resultados da associação dos polimorfismos rs5744256 e rs1834481 em <i>IL18</i> na coorte casos/controles de melanoma maligno esporádico.....	34
Tabela 9 - Resultados das análises de associação entre SNPs dos genes do inflamassoma na população brasileira casos de melanoma e controles.....	36
Tabela10 – Reanálise dos resultados de associação entre SNPs dos genes do inflamassoma na população brasileira casos de melanoma e controles.....	37
Tabela 11 - Resultados significativos de associação para Melanoma Expansivo Superficial (SSM) versus Melanoma Nodular (NM).....	38
Tabela 12 – Resultados da associação para polimorfismos do inflamassoma em pacientes com melanoma de acordo com invasividade.....	39
Tabela 13 – Resultados de associação do SNP rs1143643 em <i>IL1β</i> com invasividade.....	40
Tabela 14 – Resultados da associação para polimorfismos do inflamassoma em pacientes de acordo com tipo de pele.....	42
Tabela 15 – Resultados da associação de IL18 em pacientes com melanoma classificados de acordo com tipo de pele.....	43

RESUMO

SILVAWC. Contribuição da genética do inflamassoma na predisposição a desenvolver melanoma maligno esporádico [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, 2017.

Melanoma, a forma mais agressiva de câncer de pele, é um tumor maligno dos melanócitos. Além dos riscos ambientais tais como a radiação UV e fenótipo de pele do indivíduo, a genética também tem sido descrita como um fator de risco para o desenvolvimento de melanoma. Recentemente foi relatado que a malignidade do melanoma está diretamente relacionada com a secreção constitutiva da citocina inflamatória IL-1 β em melanócitos transformados, sugerindo o envolvimento do inflamassoma na progressão tumoral. Com a finalidade de avaliar se a genética do inflamassoma poderia contribuir para a susceptibilidade ao desenvolvimento do melanoma maligno esporádico no presente trabalho analisamos 10 polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) em cinco genes do inflamassoma (*NLRP1*, *NLRP3*, *CARD8*, *IL1B*, *IL18*) numa coorte brasileira caso/controle de melanoma. Além disso, a expressão de genes do inflamassoma foi avaliada em biópsias de tumores de melanomas e nevos benignos. Para tanto recrutamos 198 pacientes de melanoma e 142 doadores saudáveis. As biópsias de tumores/nevos foram obtidas de 15 dos 198 pacientes de melanoma e de cinco dos 142 controles saudáveis, respectivamente. Utilizamos a técnica de PCR em tempo real com alelo e sondas específicas em ensaios com *TaqMan*[®] para os ensaios de genotipagem de amostras de DNA dos casos/controles de melanoma e para estudos de expressão de genes específicos do inflamassoma, em amostras de biópsias de tumores e nevos, respectivamente. Verificamos que o SNP rs6509365 em *CARD8* foi significativamente mais comum em controles saudáveis do que em pacientes de melanoma, sugerindo um efeito protetivo da variante para o desenvolvimento de melanoma. Corroborando com este achado, a expressão de *CARD8* foi encontrada aumentada em biópsias de melanoma em comparação com a expressão em nevo. Além disso, a estratificação dos dados mostrou que a variante rs11651270 em *NLRP1* associada com melanoma nodular; rs1143643 em *IL1B*, amplificado em níveis baixos, foi associado com invasividade (índice de Breslow) e rs5744256 em *IL18* foi associado com desenvolvimento de melanoma em pessoas sensíveis ao sol. A análise em biópsias dos tumores ainda mostrou que a expressão de IL-1 β foi regulada positivamente, especialmente em amostras de indivíduos que apresentaram metástases, enquanto que IL-18

foi negativamente regulada comparada com a expressão em nevos. Em conjunto nossos resultados demonstram, pela primeira vez, a contribuição dos genes do inflamassoma *CARD8*, *IL1B* e *IL18* ao melanoma.

Descritores: 1. Melanoma 2. Inflamação 3. Polimorfismo genético 4. Polimorfismo de núcleo único 5. Interleucina-1 β

ABSTRACT

SILVA WC. Contribution of inflammasome genetics in the predisposition to develop sporadic malignant melanoma [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, 2017.

Melanoma, the most aggressive form of skin cancer, is a malignant melanocyte tumor. In addition to environmental risks such as UV radiations, individual's skin phenotype and genetics has also been described as potential risk factors for the development of melanoma. It has recently been reported that malignant melanoma is directly related to the constitutive secretion of the inflammatory cytokine, IL-1 β , in transformed melanocytes suggesting the involvement of the inflammasome in tumor progression. In order to evaluate if the genetics of the inflammasome could contribute to the susceptibility to the development of malignant melanoma, we analyzed 10 single nucleotide polymorphisms (SNPs) in five inflammation related genes (*NLRP1*, *NLRP3*, *CARD8*, *IL1B*, *IL18*) in a case/control Brazilian cohort of melanoma. In addition, the expression of inflammatory genes was evaluated in biopsies of melanoma and nevus tumors. We recruited 198 melanoma patients and 142 healthy donors. Tumor/nevus biopsies were obtained from 15 of 198 melanoma patients and five of 142 healthy controls, respectively. We used the real-time PCR technique for specific allele with specific probes using TaqMan ® assays for genotyping of DNA samples from melanoma cases/controls and for studies of expression of specific genes of inflammasome from RNA samples of tumor biopsy and nevus, respectively. We have found that SNP rs6509365 in *CARD8* was significantly more common in healthy controls than in melanoma patients, suggesting a protective effect of this variant for the development of melanoma. Corroborating this finding, *CARD8* expression was found to be increased in melanoma biopsies compared to nevus expression. In addition, stratification of the data showed that variant rs11651270 in *NLRP1* was associated with nodular melanoma; rs1143643 in *IL1B* at low levels was associated with invasiveness (Breslow score) and rs5744256 in *IL18* was associated with melanoma development in sun sensitive individuals. Biopsy analysis of tumors further showed that IL-1 β expression was up-regulated, especially in samples from individuals who had metastases, whereas IL-18 was down-regulated compared to expression in nevus. Together our results demonstrated for the first time the contribution of the inflammation related genes *CARD8*, *IL1B* and *IL18* to melanoma.

Descriptors: 1.Melanoma 2.Inflammation 3.Ppolymorphism, genetic 4.Polymorphism, single nucleotide 5.Interleukin-1

INTRODUÇÃO

1. MELANOMA

O melanoma é uma das formas mais agressivas de câncer de pele, com projeção estimada de mais de 76.000 novos casos e mais de 10.000 mortes relacionadas nos EUA em 2016 ¹. No Brasil o INCA estimava 5.670 novos casos neste mesmo período (INCA, 2016), vale lembrar que apesar de sua incidência ser baixa sua letalidade é alta.

Características fenotípicas, como cabelos vermelhos ou loiros, olhos azuis ou verdes, pele clara com baixa capacidade de bronzeamento, sardas e presença de nevos melanocíticos múltiplos (100 ou mais) ou cinco ou mais nevos atípicos estão associados a um risco aumentado de desenvolver melanoma ². Além disso, o tempo e horário de exposição ao sol e a quantidade de queimaduras solares no decorrer da vida podem ser tão importantes quanto a quantidade total de radiação ultravioleta que atinge a pele.

O componente ultravioleta da luz solar (UVR) tem sido amplamente demonstrado estar implicado na geração de nevos e melanoma ³ uma vez que promove danos no DNA através da formação de dímeros de pirimidina (foto produto), mutações gênicas, estresse oxidativo, inflamação e imunossupressão, favorecendo o processo carcinogênico ⁴. O uso do protetor solar pode impedir parte dos efeitos da UVR em nevos ⁵. De fato, um estudo de seguimento de 10 anos mostrou que o uso diário de filtro solar reduz a taxa de detecção de melanoma, sugerindo que seu uso regular pode prevenir o desenvolvimento deste tumor ⁶.

Componentes genéticos também estão associados ao desenvolvimento do melanoma. Tem sido observado que a história pessoal de melanoma aumenta em 5-8% o risco de desenvolver um segundo melanoma ⁷. A susceptibilidade que algumas famílias apresentam pode se dever à presença de mutações em um dentre os genes de alto risco conhecidos para a predisposição ao melanoma: *CDKN2A*, *CDK4*, *BAP1*, *POT1*, *ACD*, *TERF2IP* e *TERT* ⁸. Além da presença de mutações raras em poucos genes, hipotetiza-se que o risco individual de desenvolver melanoma seja também devido a componente poligênico, influenciado por múltiplos alelos de baixo risco e modificadores de genes ⁸.

Também nos casos de melanoma esporádico, estudos de associação gênica, assim como estudos com genes candidatos, revelaram alguns *loci* comuns de susceptibilidade à doença, como os genes *PARP1*, *CASP8*, *OCA2* e *MX2* ⁹. Alguns genes do sistema imune também têm sido associados ao desenvolvimento de melanoma: *IL10* ¹⁰, *TGF-β* ¹¹ e também nos genes do inflamassoma ¹².

O melanoma origina-se da proliferação anormal de melanócitos, células derivadas da crista neural que migram para a epiderme onde residem na camada basal, constituindo a

unidade de melanina epidérmica. A proliferação anormal destas células pode originar o nevo benigno, o nevo displásico e o melanoma ¹³.

A letalidade deste tumor se deve ao grande potencial do melanoma em desenvolver metástase. A maior parte dos melanomas primários pode ser removida com sucesso através de excisão cirúrgica, porém a possibilidade de cura diminui à medida que as células anormais invadem os tecidos circundantes, de modo que quanto mais rápido o diagnóstico, maior a chance de se obter a cura ².

Os parâmetros que auxiliam na avaliação da diagnose, estadiamento, planejamento terapêutico e prognóstico do tumor são dados principalmente pela histologia. Para tanto são analisados:

1.1 Subtipos histológicos

Melanoma expansivo superficial (SSM) - é o subtipo mais frequente, constituindo 70% dos casos. Em geral acomete tronco e membros inferiores e apresenta várias colorações, como castanho, preto, róseo, violeta; hipopigmentação central e expansão periférica. A evolução é crônica e depois de meses a anos podem surgir nódulos elevados e sangramento, o que já caracteriza o estágio mais avançado, de crescimento vertical ^{14, 15}.

Figura 1 - Subtipo histológico do melanoma – Melanoma expansivo superficial (SSM)

Fonte: Online Medical Doctor - <http://mddk.com/superficial-spreading-melanoma.html> - acessado em 19/01/2017

Melanoma nodular (NM) - é o segundo mais comum, constituindo de 15 a 30% dos casos, sendo predominante no sexo masculino, na proporção de 2:1. Apresenta-se como lesão papulosa, elevada, de cor castanha, negra ou azulada. São frequentes a ulceração e o sangramento. As lesões inicialmente são nodulares, isto é, sem fase prévia de crescimento radial ^{14, 15}.

Figura 2 - Subtipo histológico do melanoma – Melanoma nodular (NM)

Fonte: PortalesMedicos - <http://www.revista-portalesmedicos.com/revista-medica/presentacion-caso-clinico-melanoma/> - acessado em 19/01/2017

Melanoma lentiginoso acral (ALM) - Acomete em geral as regiões palmo-plantares, extremidades digitais, mucosas e semi-mucosas, sendo mais frequente em indivíduos de origem não europeia (35 a 60%). Nas extremidades digitais pode-se apresentar como lesão tumoral acastanhada subungueal ^{14, 15}.

Figura 3 - Subtipo histológico do melanoma – Melanoma lentiginoso Acral (ALM)

Fonte: Medicentro Electrónica vol.18 no.4 Santa Clara oct. - dic. 2014 - http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30432014000400010 - acessado 19/01/2017

Melanoma lentigo maligno (LMM) - Acomete em geral a face (90%) e mãos e membros inferiores (10%). É um subtipo pouco frequente, com 5% dos casos. Surge em área de lentigo solar que se apresenta como mácula acastanhada ou enegrecida, de limites nítidos e irregulares, alcançando vários centímetros de diâmetro. Após longo período de crescimento radial, ocorre a invasão perpendicular à superfície (verticalização), caracterizada clinicamente pela presença de nódulo elevado, em meio a diversos tons de pigmentação, como castanho-escuro, negro e azulado. Nessa fase, podem ocorrer ulcerações, sangramento e formação de crostas ^{14, 15}.

Figura 4 - Subtipo histológico do melanoma – Melanoma lentigo maligno (LMM)

Fonte: Câncer de pele. net.br - <http://www.cancerdepele.net.br/fotos/image/32-lentigo-maligno-melanoma-em-face> - acessado em 08/03/2017

1.2 Profundidade das células tumorais no tecido

Índice de Breslow – fator prognóstico mais importante que avalia a dimensão vertical máxima da infiltração tumoral (espessura) a partir do topo da camada granular da epiderme (ou base da úlcera) até à célula tumoral mais profunda^{16, 17}.

A *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) determina os seguintes valores para avaliar a espessura tumoral: < 1 mm (melanoma fino), 1–2 mm, > 2 mm, e > 4 mm (melanoma espesso)^{15, 17}.

A espessura média do tumor pelo índice de Breslow é de 1,96 mm e 1,53 mm nos homens e mulheres, respectivamente. Índice de Breslow > 4 mm está presente em 10,5% dos casos¹⁷.

1.3 Outros fatores avaliados

Situação das margens de segurança; número de mitoses; fase de crescimento (radial – com baixo potencial metastático e/ou vertical – onde o tumor adquire um potencial aumento de metástases)^{18, 19}; presença ou não de ulceração; neurotropismo; invasão angiolinfática; presença do infiltrado linfocitário^{2, 14, 15, 17}.

2. INFLAMASSOMAS

O inflamassoma é um complexo multiprotéico citoplasmático capaz de deflagrar a cascata inflamatória induzida por estímulos microbianos ou não, endógenos ou ambientais, através da ativação da caspase-1, enzima responsável pela produção das citocinas pró-inflamatórias interleucina-1 β (IL-1 β) e interleucina-18 (IL-18) ²⁰.

Este complexo é expresso por células do sistema imune (monócitos, macrófagos, células dendríticas, células de Langherans, linfócitos), células de epitélios (queratinócitos) e mucosas, células endoteliais, assim como nos tecidos imunologicamente restritos (placenta, cérebro, testículos) ²¹.

Os constituintes fundamentais do inflamassoma são: um receptor intracelular de reconhecimento de padrões moleculares (PRR), uma proteína adaptadora (ASC) e uma protease (caspase-1) ^{20, 22}.

2.1 Constituintes do Inflamassoma

Existem diversos receptores PRR capazes de formar o inflamassoma, entre eles as proteínas da família NLR: NLRP1, NLRP3, NLRC4/NAIP, NLRP6, NLRP7 e NLRP12; e a família de sensores HIN, constituída pelos receptores de DNA citoplasmático AIM2 e IFI16 ²⁰. NLRP1, NLRP3, NLRC4/NAIP, AIM2 são os receptores mais conhecidos, responsáveis por ativar a via canônica do inflamassoma, ou seja, a via dependente de caspase-1 ^{23, 24}.

NLRP1-inflamassoma foi o primeiro inflamassoma a ser descrito ²⁵, cuja função foi associada à imunidade contra a toxina letal de *Bacillus anthracis* – antraz ²⁶. No entanto, NLRP1 também pode ser ativado pelo muramil-dipeptídeo (MDP), um fragmento de peptidoglicano de bactérias gram positivas e negativas ^{27, 28}. Não se sabe como NLRP1 detecta antraz ou MDP e nenhuma ligação direta desses fatores ao NLRP1 já foi demonstrada. Deste modo propõe-se que o mecanismo de ativação seja indireto, possivelmente envolvendo efluxo de K⁺ ou liberação de catepsina B no citoplasma ²⁸.

NLRP3-inflamassoma é o subtipo de inflamassoma mais versátil preparado para reagir a uma multiplicidade de agentes biológicos e químicos potencialmente nocivos e até agora é o mecanismo molecular melhor caracterizado para maturação e liberação de IL-1 β e IL-18 ²⁸. A ativação de NLRP3-inflamassoma pode ser devida a mecanismos de alteração da homeostasia celular (efluxo de K⁺, liberação de catepsina G lisossomal, produção de espécies reativas do

oxigênio (ROS), efluxo de cálcio, estresse mitocondrial e do retículo endoplasmático); resposta a inúmeros padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs–bacterianos (LPS), virais, fúngicos e protozoários) e também a padrões moleculares associados a dano (DAMPs) como raios ultravioletas (UV), ATP e HMGB1 (*High-mobility group protein B1*), partículas exógenas como urato monossódico (MSU), alumínio e sílica^{20, 25}.

A capacidade de NLRP3 ser ativado por uma grande variedade de ligantes ressaltou a provável presença de um sinal de ativação comum fornecido por estes diferentes agentes. A busca por um desses agentes foi facilitada por estudos anteriores mostrando que o ATP extracelular que atua no P2X7R é um estímulo poderoso para a ativação da caspase-1 e a maturação e liberação de IL-1 β e IL-18^{29, 30}. P2X7R é um receptor/canal de membrana plasmática bastante heterodoxo dotado de capacidade de formar um poro não seletivo permeável a solutos aquosos de baixo peso molecular^{31, 32} que leva a um rápido efluxo de K⁺. Tal evento provoca alterações locais na força iônica citoplasmática, suficiente para desencadear as alterações conformacionais em NLRP3 que conduzem a ativação do inflamassoma²⁸.

O NLRC4-inflamassoma é ativado em resposta a muitos patógenos bacterianos diferentes, incluindo *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* e *Shigella flexneri*³³. NLRC4 detecta a flagelina bacteriana ou componente estruturais do sistema de secreção bacteriana do tipo III (T3SS) que são transladas para a célula hospedeira³⁴. Os NAIPs interagem com NLRC4 e desencadeiam a formação do complexo de NLRC4-inflamassoma, resultando na ativação da caspase-1, liberação de citocinas inflamatórias e a piroptose³⁴.

O NLRP6-inflamassoma tem sido relacionado à preservação da homeostase da microbiota do hospedeiro no trato digestivo³⁵. A proteína NLRP6 parece participar da ativação do inflamassoma via NF- κ B³⁶. Alguns estudos mostram que NLRP6 pode suprimir tumorigênese provavelmente através da secreção de IL-18 a partir de células hematopoiéticas³⁷.

NLRP7 regula a ativação do inflamassoma em resposta a lipopeptídeos, levando à maturação e liberação de IL-1 β e IL-18 por macrófagos humanos³⁸.

NLRP12- inflamassoma participa especificamente no reconhecimento de *Yersinia pestis* e promove a liberação e secreção de IL-1 β e IL-18 por linfócitos ativados. A proteína

NLRP12 foi previamente associada a uma regulação negativa da inflamação através da inibição de NF- κ B³⁹; ela parece interagir com ASC⁴⁰, e mutações nesta molécula estão associadas a doenças inflamatórias febris hereditárias⁴¹

O AIM2-inflamassoma é composto por AIM2, ASC e caspase-1 e é ativado por dsDNA citosólico de vírus, bactérias ou o próprio hospedeiro⁴². IFI16 ativa NF- κ B, um fator de transcrição que regula a atividade de citocinas pró-inflamatórias⁴³. Estudos mostram que IFI16 pode regular a atividade do AIM2-inflamassoma através da ligação à proteína AIM2 e a regulação negativa da expressão desta proteína e de outras proteínas constituintes do inflamassoma⁴⁴.

A proteína adaptadora ASC (anteriormente conhecida como CARD5, PYCARD ou TMS-1) tem um papel central na ativação de todos os subtipos de inflamassoma até agora caracterizados²⁵. A formação de agregados contendo ASC é necessária para a ativação de IL-1 β . Embora o mecanismo de redistribuição de ASC e o significado fisiológico disto não sejam totalmente compreendidos, é provável que o deslocamento núcleo-citosol efetuado por esta proteína represente um ponto de verificação adicional para a ativação da inflamação²⁸. Foram descritos papéis adicionais para ASC, além de sua função para o recrutamento e ativação de caspase-1, tais como a participação na ativação de NF- κ B, em apoptose dependente de caspase-8 e na apresentação de antígenos e motilidade de linfócitos⁴⁵.

A caspase-1 é uma protease de cisteína, isto é, uma enzima caracterizada por possuir uma cisteína no sítio ativo, pertencente à subfamília de caspases inflamatórias. A pro-caspase-1 é recrutada no interior do complexo do inflamassoma por interação com o domínio CARD das proteínas do suporte (por exemplo, NLRP1) ou através do fator adaptador ASC; dentro do inflamassoma sofre auto proteólise, liberando sua forma ativa – caspase-1²⁸.

A IL-1 β participa em quase todos os eventos envolvidos na ativação e na regulação da inflamação, por exemplo, estimula a secreção de outras citocinas tais como IL-6, TNF- α e IL-1 α , bem como outros fatores responsáveis pelo crescimento e diferenciação de células imunes^{28, 46}. Além disso, a IL-1 β promove a liberação de células polimorfonucleares no sangue (neutrofilia), secreção de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e, importante para a progressão da inflamação, a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais vasculares. Atua também na indução

de uma resposta específica ativando as células dendríticas (DC) e os linfócitos, induzindo a polarização de linfócitos T *naive* em Th17, além de promover resposta humoral ^{23, 28, 47}.

A IL-18 é conhecida como fator indutor de IFN- γ , sendo constitutivamente expressa por células da barreira natural ou mucosa, em particular células epiteliais do intestino e do pulmão e queratinócitos na pele. É também produzida por monócitos, macrófagos e DCs e sua expressão pode aumentar através de estímulos tais como LPS ⁴⁸. Além disso, tem a capacidade de aumentar a expressão de moléculas de adesão celular, síntese de óxido nítrico e a produção de quimiocinas. IL-18 é importante para expressão de IL-17 pelas células Th17 e pode polarizar células Th para perfis Th1 ou Th2 em combinação com outras citocinas, também, parece desenvolver um papel importante na defesa antitumoral ⁴⁷.

Ao contrário da maioria das citocinas, IL-1 β e IL-18 não são secretadas através da via clássica de retículo endoplasmático-Golgi, mas são produzidas como proteínas precursoras biologicamente inativas que são clivadas antes da sua secreção como citocinas bioativas ⁴⁹. Pro-IL-18 é expressa constitutivamente em macrófagos, enquanto que a expressão de pro-IL-1 β é regulada por transcrição mediada por NF- κ B ²³.

2.2 Ativação canônica do Inflamassoma

O sistema imune inato envolve um conjunto de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), que são expressos por células do sistema imune inato em resposta à infecção, incluindo macrófagos, monócitos, células dendríticas, neutrófilos e células epiteliais. Os PRRs incluem os receptores do tipo Toll (TLRs) ligados à membrana e as lectinas de tipo C (CTL), que monitoram o meio extracelular e os compartimentos endossômicos em busca de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e/ou padrões moleculares associados a dano (DAMPs) ²⁵. Muitos PRRs, ao encontrarem PAMPs e DAMPs, desencadeiam cascatas de sinalização (primeiro sinal) que promovem a transcrição de genes pelo fator nuclear κ B (NF- κ B), proteína ativadora 1 (AP1) ou fatores reguladores de interferon (IRFs). Os genes alvo codificam citocinas, interferons e outras proteínas pró-inflamatórias ou microbicidas ⁵⁰.

Num segundo momento, os receptores do tipo NOD (NLRs) no citoplasma celular reconhecem os PAMPs/DAMPs (segundo sinal) ²⁵. Uma vez que qualquer destes receptores é estimulado, ocorre sua oligomerização que leva ao recrutamento da proteína adaptadora ASC (Proteína *Speck-like* associada à Apoptose com domínio de recrutamento de Caspase) e da pró-caspase-1, que ativa a caspase-1 - a molécula efetora do complexo. Finalmente, a caspase-

1 cliva as pró-IL-1 β e pró-IL-18 em suas formas ativas, as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18^{51, 52} (figura 5). A ativação da caspase-1 é associada também a uma forma particular de morte celular inflamatória conhecida como piroptose⁵¹. Por ativar a caspase-1, este processo é denominado via canônica de ativação do inflamassoma²³.

Figura 5 - Esquema de estrutura, ativação e funcionamento do Inflamassoma em uma célula.

Neste esquema evidenciamos que algumas células necessitam de dois sinais para a ativação do inflamassoma. O primeiro sinal, geralmente, ocorre após a ativação de um receptor de membrana do tipo Toll (TLR). Essa ativação se deve à presença de algum padrão molecular associado ao patógeno (PAMP) ou algum padrão molecular associado ao dano (DAMP). Este receptor quando ativado, ativa a via NF- κ B, o que leva à ativação de genes necessários para a formação das proteínas do inflamassoma (pró-IL1 β , pró-IL18, pró-Caspase1). O segundo sinal ativa um receptor citoplasmático do tipo NOD (NLR), que leva ao recrutamento da proteína adaptadora ASC e pró-caspase1, levando a formação do inflamassoma. Por sua vez, o inflamassoma formado ativa caspase1, enzima que converterá pró-IL1 β e pró-IL18 em IL1 β e IL18, respectivamente, que serão liberadas pela célula. A formação do inflamassoma também pode levar a morte celular gerada pela inflamação, denominada piroptose^{20, 25}.

Fonte: Modificada do site: <http://www.adipogen.com/inflammasomes/> acessado em 28/02/2017

2.3 Ativação não canônica do Inflamassoma

A ativação do inflamassoma pode também ser desencadeada por mecanismos “não canônicos” tais como a ligação do LPS citosólico de bactérias gram-negativas através da caspase-11 em murinos ²⁴. A caspase-11 medeia a ativação da caspase-1 dependente de NLRP3 (ativação não canônica do NLRP3-inflamassoma), mas também induz uma permeabilização da membrana independente da caspase-1 que leva à piroptose e liberação de citocinas inflamatórias, incluindo a IL-1 α ⁵³. Ambas as caspases 1 e 11 induzem a piroptose, mas apenas a caspase-1 processa os precursores de IL-1 β e IL-18 ²³. Os genes ortólogos humanos, correspondentes à caspase-11 dos murinos, são as caspases-4 e -5, com base na sequência de aminoácidos ⁵⁴. Entende-se genes ortólogos como genes que possivelmente possuem uma ancestralidade comum, que mantém estruturas e funções ao longo da diferenciação dos organismos que os contêm em seu genoma ^{55, 56}.

Por sua vez, a caspase-8 também está envolvida na promoção da morte celular induzida por β -glicano e da maturação da IL-1 β dependente de NLRP3-inflamassoma durante a infecção por *Candida albicans* em células dendríticas de murinos ⁵⁷. Chen e colaboradores verificaram que em células dendríticas deficientes de caspase-1, *Cryptococcus neoformans* induziu a secreção de IL-1 β bem como a morte celular, processo que foi mediado pela ativação não canônica de inflamassoma de NLRP3-ASC-caspase-8. Vale ressaltar que a ativação da caspase-8 estava fortemente elevada na ausência de caspase-1 ⁵⁸. A caspase-8, por outro lado, pode também contribuir para produção de IL-1 β , quando ativada por via de sinalização de receptores de lectina (Dectin/Syk) ⁵⁷.

2.4 Regulação do Inflamassoma

Cada processo homeostático rigorosamente regulado inclui mecanismos de feedback usados para prevenir a ativação desnecessária ou para amortecer uma resposta exagerada. O inflamassoma é altamente regulado tanto por proteínas endógenas como CARD8, *Pyrin-only protein* (POPs), *CARD-only proteins* (COPs), entre outras, quanto por mecanismos transcricionais e pós-transcricionais ⁵⁹.

A proteína CARD8 (também conhecida como TUCAN, CARDINAL ou NDDP1) é codificada pelo gene *CARD8* formado por 13 éxons no cromossomo 19q13. O papel de CARD8 na biologia do inflamassoma não está completamente caracterizado. Foi demonstrado que CARD8 interage fisicamente com caspase-1 através de interação homofílica CARD-

CARD e deste modo regula negativamente a caspase-1 ⁶⁰. Posteriormente foi demonstrado que CARD8 é capaz de se ligar a NLRP3, regulando negativamente este receptor ⁶¹. Sabe-se que a variante *non-sense* C10X em *CARD8* (rs2043211) em combinação com a variante Q705K em *NLRP3* (rs35829419) contribui para uma desregulação autoinflamatória, conferindo ganho de função em termos do aumento espontâneo da produção de IL-1 β em linhagem de monócitos humanos ⁶². Além de participar da regulação do inflamassoma, CARD8 está envolvido na via de ativação do NF- κ B e também regula a apoptose celular ^{60, 63}.

As proteínas constituídas por um domínio solitário de Pirina (*Pyrin-only* / POPs) ou CARD (*CARD-only* / COPs) possuem uma capacidade potencial para atuar como inibidores competitivos de complexos NLR. De fato, tanto as proteínas de POPs como as proteínas COPs foram descritas como moduladores negativos que impactam e provavelmente regulam a produção de IL-1 β dependente de caspase-1 ⁵⁹. As proteínas COPs parecem interferir tanto com na interação da molécula adaptadora do inflamassoma como com o recrutamento da caspase-1. Além disso, POPs e COPs, como outras proteínas contendo PYD e CARD, podem influenciar a ativação de NF- κ B ⁵⁹.

Em adição, ubiquitinação e nitrosilação do NLRP3 inibem a ativação do inflamassoma, assim como a produção de adenosina monofosfato cíclica (cAMP) ⁶⁴. MicroRNAs foram também reportados como parte dos mecanismos de regulação especialmente da produção do *NLRP3* (i.e.: mi-223). Eventos de fosforilação (*NLR4*, *ASC*) também foram descritos como importantes na ativação do complexo ⁶⁴.

3. MELANOMA, INFLAMAÇÃO E INFLAMASSOMAS

A correlação entre câncer e inflamação foi estabelecida pela primeira vez no século XIX, com base em observações de que os tumores muitas vezes surgiam em locais de inflamação crônica e que células inflamatórias estavam presentes em amostras de tumores biopsiados. De fato, posteriormente, diversas linhas de evidência com base em uma série de estudos epidemiológicos de pacientes e também de estudos moleculares em camundongos geneticamente modificados, mostraram a relação entre inflamação e câncer ⁶⁵.

Em alguns cânceres, as condições inflamatórias precedem o desenvolvimento de malignidade, em outros são as alterações oncogênicas que promovem um ambiente inflamatório. Seja qual for a sua origem, esta proliferação celular leva à inflamação e sobrevivência de células malignas, angiogênese e metástase ⁶⁶.

Células de melanoma humano produzem uma série de citocinas que são conhecidas por estarem associadas com invasão e agressividade, tais como IL-6, IL-8, CXCL1-3 (MGSa-Groa-c), CCL5 (RANTES) e CCL2 (MCP-1) ⁶⁷. Todas essas citocinas e quimiocinas podem ser reguladas pela forma ativa de IL-1 β ⁴⁷, o que sugere que a IL-1 β desempenha um papel crítico na patogênese do melanoma.

IL-1 β derivada de melanoma é biologicamente ativa como fator autócrino e parácrino, aumentando significativamente a síntese de IL-1 β por outras células de melanoma e mediando o recrutamento de macrófagos e a angiogênese *in vitro* ⁶⁸, o que promove o crescimento e manutenção do tumor.

Foi também observado em modelo murino que a IL-1 β pode ser derivada tanto das células normais quanto das células tumorais, enfatizando mais uma vez a contribuição das células transformadas e do microambiente na progressão do melanoma ²².

Estudos de associação genética em melanoma demonstraram que polimorfismos em genes da IL-6, TNF- α , IFN, IL-10 e TGF- β podem aumentar o risco de desenvolver melanoma e/ou escape da vigilância imunológica. Além disso, o polimorfismo IL-1 β -511C/T está associado a risco aumentado de melanoma invasivo ²².

Assim, considerando que a IL-1 β desempenha um papel essencial na patogênese do câncer ²² e levando em conta o papel do inflamassoma na produção e secreção de IL-1 β , o estudo do papel do inflamassoma na patogênese do câncer torna-se um importante foco de investigação.

Foi demonstrado que o *NLRP3*- inflamassoma é expresso constitutivamente e ativado em células de linhagem de melanoma humano, resultando em ativação e clivagem de caspase-

1 e IL-1 β . No mesmo estudo foi relatado que as células de melanoma em estágio inicial requerem um sinal IL-1R e um co-estimulador, como muramil-dipeptídeo, para a secreção de IL-1 β enquanto células de melanoma em estágio intermediário requerem apenas a sinalização através de IL-1R. Por sua vez, na fase final da doença, células de melanoma metastático apresentam síntese e secreção autônoma de IL-1 β . Além disso, a secreção de IL-1 induz uma sinalização parácrina aumentando a síntese de IL-1 β dependente de NF- κ B, resultando em um *feedback* positivo para IL-1 β em células de melanoma metastático ⁶⁸.

Por outro lado foi demonstrado que outros NLRs têm impacto negativo na tumorigênese. Em modelos murinos de câncer de cólon foi mostrado que NLRC4 suprime a tumorigênese ⁶⁹, NLRP6 preserva a integridade de barreiras epiteliais e suprime a carcinogênese induzidas por lesões ⁷⁰ e *NOD1* também confere proteção contra a inflamação induzida por tumorigênese ⁷¹. Além disso, a expressão de AIM2 inibe a proliferação de células de câncer de mama e tumorigênese ⁷².

A molécula adaptadora ASC tem um duplo papel na tumorigênese: além de ASC estar diretamente envolvido na inibição de NF- κ B, também ativa a via de NF- κ B indiretamente por meio da ativação do inflamassoma. A interação persistente de ASC com NLRP3 em células de melanoma metastático pode reduzir a interação de ASC com outras proteínas para prevenir a piroptose e prejudicar a inibição da via NF- κ B. Interessantemente, ASC parece sofrer uma modificação funcional conforme o câncer progride para a fase tardia da doença, resultando na conversão de uma proteína com propriedades antitumorais no melanoma primário a um fator tumorigênico no melanoma metastático ⁷³.

A secreção de IL-1 β mediada por inflamassoma aumenta a quimiotaxia dos macrófagos, angiogênese e resistência à quimioterapia ⁶⁸. Além disso, foi relatado que a expressão do NLRP3 no microambiente tumoral do melanoma diminuiu a resposta antitumoral, facilitando a migração de células supressoras de origem mielóide (*myeloid-derived suppressor cells*, MDSCs) ao sítio do tumor, indicando um papel crítico do NLRP3 em suprimir a resposta contra o melanoma das células T ⁷⁴.

A neutralização da produção de IL-1 β inibe a angiogênese, desenvolvimento e invasividade do tumor em modelos experimentais ⁷⁵. Por sua vez, a secreção constitutiva de IL-1 β por células de melanoma humano resulta em uma auto inflamação que contribui para o desenvolvimento e progressão do melanoma ⁶⁸. As células de melanoma mais invasivas induzem a expressão de metaloprotease de matriz (MMP1) de maneira dependente de IL-1 β e do fator de crescimento basal de fibroblastos (*basic Fibroblast Growth Factor* - bFGF) e isso

é necessário para invasão e metástase ⁷⁶. Como a secreção de IL-1 β e bFGF são regulados por meio da ativação de caspase-1 ⁷⁷, isto é mais um indício de que o inflamassoma pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento do melanoma.

Considerando-se o papel pró-tumorigênico da IL-1 β , estes fatos sugerem que o controle das vias autoinflamatórias que regulam a atividade do inflamassoma e a secreção de IL-1 β podem ser uma opção terapêutica para o tratamento de câncer, tais como melanoma.

Interessantemente, o bloqueio da atividade de IL-18 reduz a expressão da molécula de adesão vascular-1, o que leva a redução de metástases em modelo experimental de melanoma ⁷⁸.

Por outro lado, experimentos utilizando camundongos deficientes em *NLRP3* têm mostrado um papel protetor do inflamassoma na tumorigênese colorretal através da IL-18 que induz IFN- γ e STAT1, considerados supressores de tumor ^{79, 80}. *NLRP3* expresso em DCs também parece ser necessário para o *priming* de células T CD8⁺ antitumorais produtoras de IFN- γ ⁷⁹.

Inibidores da caspase-1, do inflamassoma e/ou de seus produtos têm sido usados para modular a ocorrência, a progressão e a resposta terapêutica de uma gama de tumores experimentais. Tais estratégias podem ser utilizadas para evitar efeitos secundários relacionados com a terapia. Compostos pequenos que visam especificamente o inflamassoma (tais como parthenolide e Bay 11-7082) ou caspase-1 estão sendo testados. Atualmente, o desenvolvimento pré-clínico ou clínico de reagentes contra a IL-1 β é facilitado pela disponibilidade de inibidores específicos, incluindo anticorpos monoclonais e um derivado recombinante de IL-1RN (Anakinra), que neutralizam a IL-1 β . Notavelmente, inibidores específicos da IL-1 β são aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA - EUA) para o tratamento de várias doenças autoinflamatórias e também pode ser útil para a profilaxia ou tratamento de tumores relacionados com a inflamação ⁸¹.

Finalmente, queratinócitos produzem uma grande quantidade de IL-1 β em resposta a irradiação por UV através da ativação do *NLRP3*-inflamassoma ⁸². Esta descoberta ressaltou o papel do *NLRP3*-inflamassoma em células não macrofágicas e, além disso, enfatiza o papel do inflamassoma na imunidade da pele.

JUSTIFICATIVA

Estudos demonstram que a progressão do melanoma está intimamente relacionada a um microambiente inflamatório. Neste sentido a citocina IL-1 β constitui um importante mediador pró-inflamatório capaz de coordenar a expressão de outras citocinas e quimiocinas, além de mediar o recrutamento de células ao local de injúria. Por sua vez, tanto a maturação da IL-1 β quanto sua secreção é controlada pelo inflamassoma.

Deste modo, considerando as funções que o inflamassoma desempenha na ativação e produção de IL-1 β na imunidade da pele, tem sido proposto um papel central do inflamassoma nos eventos que levam ao desenvolvimento do melanoma e na sua progressão à metástase.

Neste contexto, este estudo teve como objetivo investigar a contribuição do inflamassoma na susceptibilidade individual a desenvolver o melanoma. Além disso, foi nossa proposta investigar a existência da associação entre polimorfismos nos genes do inflamassoma e o risco de desenvolver melanoma, através da genotipagem de pacientes. De fato, polimorfismos em genes que regulam a resposta imunitária e o crescimento celular podem constituir um mecanismo que leva a diferenças interindividuais nas respostas imunitárias antitumorais, resultando em susceptibilidade aumentada e/ou pior prognóstico em certos indivíduos⁸³.

OBJETIVOS

GERAL

Analisar a genética do inflamassoma em amostras de sangue de pacientes de melanoma e biópsias de tumor e estudar sua contribuição no desenvolvimento do melanoma.

ESPECÍFICOS

- Verificar polimorfismos já descritos nos genes do inflamassoma em pacientes com melanoma e proceder a análises estatísticas visando associar os genótipos/haplótipos à clínica dos pacientes;
- Estudar a expressão dos genes do inflamassoma em biópsias de pacientes de melanoma.

1. CASUÍSTICA

Os pacientes para os ensaios de genotipagem foram recrutados no Ambulatório de Oncologia Cutânea do Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) segundo os seguintes critérios: indivíduos maiores de 18 anos diagnosticados com melanoma, na ausência ou vigência de tumor, não relacionados a melanoma familiar.

Dentre estes selecionamos alguns pacientes segundo o critério de inclusão: presença de tumor espesso e como critérios de exclusão a não condição para a análise histopatológica da amostra (melanomas finos).

Para a criação do banco de DNA genômico usado no estudo de associação caso/controle recrutamos 185 pacientes com diagnóstico de melanoma e 137 indivíduos saudáveis, com idade mínima de 50 anos do complexo HCFMUSP.

15 pacientes diagnosticados com melanoma espesso cederam uma amostra de biópsia da lesão (totalizando 198 pacientes) e cinco indivíduos saudáveis cederam nevos benignos (totalizando 142 controles) que conservamos por congelamento em nitrogênio líquido, até seu processamento.

O projeto foi aprovado junto ao Comitê de Ética para Análise Pesquisas em Seres Humanos (CAPPesq) do HCFMUSP sob protocolo n. 66690 (anexo B). Todos os participantes (pacientes e indivíduos saudáveis) assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, de acordo com a resolução No. 466/12 do Ministério da Saúde, sobre pesquisa envolvendo seres humanos (anexo C).

2. CRIAÇÃO DO BANCO DE DNA PARA O ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO CASO/CONTROLE

2.1 Isolamento do DNA do sangue periférico

Isolamos o DNA genômico a partir de 1 ml de sangue periférico (buffy coat) com auxílio do kit de extração de DNA *QIAamp blood kit* (*Qiagen, USA*), segundo as recomendações do fabricante. Avaliamos a pureza do DNA por meio da relação 260 nm vs 280 nm e conservamos o DNA genômico a -20°C.

2.2 Bancos de dados

Compilamos os dados obtidos dos prontuários dos pacientes em uma planilha de Excel para fácil acesso, obedecendo às normas de bioética em pesquisa, como confidencialidade dos indivíduos. Os dados obtidos foram relacionados a:

- Características dos indivíduos – código de identificação, idade, sexo, etnia, município/estado, data de entrada na pesquisa;
- Dados referentes ao quadro clínico dos pacientes – subtipo histopatológico, profundidade do tumor através da espessura da lesão (índice de Breslow), idade do indivíduo quando diagnosticado, fototipo (sensibilidade ao sol) – dados fornecidos pela equipe médica do Ambulatório de Dermatologia;
- Dados sobre armazenamento das amostras – tipo de amostra, quantidade armazenada, local de armazenamento;
- Resultados dos ensaios;
- Observações.

3. ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO CASO/CONTROLE

3.1 Seleção dos polimorfismos de base única (SNPs) em genes do inflamassoma

Selecionamos os SNPs abaixo relacionados (tabela 1) nos genes *NLRP1*, *NLRP3*, *CARD8*, *IL1B* e *IL18*, a partir de dados de literatura⁸⁴⁻⁸⁸. Após a escolha, adquirimos os ensaios de genotipagem através da empresa *Applied Biosystems TaqMan Facility* (Life Technologies).

Tabela 1 - Polimorfismos selecionados. Estão reportados os nomes dos genes, o ID (rs) dos SNPs, o Assay ID, o cromossomo onde está localizado, o tipo de SNP e o aminoácido que está trocado.

Gene	SNP ID	Assay ID	Cromossomo	Tipo SNP	Troca aminoácido
<i>NLRP1</i>	rs12150220	C__1600653_10	17	Variação Missense	L155H
	rs2670660	C__1600689_10	17	Promotor	-
	rs11651270	C__31558200_10	17	Variação Missense	M1184V
<i>NLRP3</i>	rs35829419	C__25648615_10	01	Variação Missense	Q705K
	rs10754558	C__26052028_10	01	UTR 3	-
<i>CARD8</i>	rs2043211	C__11708080_1	19	Variação No-sense	C10X
	rs6509365	C__8164548_10	19	Intron	-
<i>IL1B</i>	rs1143643	C__1839949_10	02	Intron	-
<i>IL18</i>	rs5744256	C__2898468_10	11	Intron	-
	rs1834481	C__2898467_30	11	Intron	-

3.2 Genotipagem através da tecnologia *TaqMan*®

Realizamos a genotipagem dos polimorfismos selecionados por PCR em tempo real com ensaios alelo-específicos de tipo *TaqMan*® (*Applied Biosystems, Life Technologies*), utilizando plataforma de PCR em tempo real ABI 7500 HT *Sequence Detection System* (*Applied Biosystems*), segundo as instruções do fabricante. Executamos a genotipagem através das funções *Allelic Discrimination* (AD) e *Absolute Quantification* (AQ) do software SDS 7500 (*Applied Biosystems*). Realizamos a corrida *Pre-read* do estágio AD a 60°C por 2'. O programa de amplificação padrão (estágio AQ) prevê: 10' 95°C; 40 ciclos de 15" 92 °C – 1' 60°C, seguido da *Post-read* (AD) 2' 60°C. Finalizado o programa de discriminação alélica

(AD), seguiu-se a análise dos dados brutos sempre com o software SDS 7500. Os dados foram expressos como *scatter plot* do alelo X contra o alelo Y (figura 6).

Figura 6 - Exemplo de resultados obtidos após PCR em tempo real. Os alelos foram discriminados através de populações e identificados por cor. Grupo azul refere-se a homozigotos para um determinado alelo (Y); Grupo verde refere-se a heterozigotos; Grupo vermelho, homozigotos do outro alelo (X). Podemos, também, identificar populações que não amplificaram e valores indeterminados.

Fonte: Modificado do resultado exemplo obtido através de análise na plataforma de PCR em tempo real *ABI 7500 HT Sequence Detection System* (Applied Biosystems)

Avaliamos a distribuição dos polimorfismos nos grupos casos e controles por meio de teste de Fisher utilizando matrizes 2x2 para alelos e 3x2 para genótipos. Utilizamos o *software R* (www.r-project.org) para realizar análises multivariadas, usando *scripts* específicos, baseadas em um conjunto de modelos globais (GLM) ajustados pelas co-variáveis (expressão do inglês *confounder variables*) (sexo, idade, idade do indivíduo ao ser diagnosticado e origem étnica), modelagem de herança e análise de epistasia (para avaliar se a expressão de um gene depende da ação de outro gene que não um de seus alelos) (pacote "SNPassoc" versão 1.5-2)⁸⁹.

O *software Haploview*⁹⁰ foi usado para verificar o padrão de desequilíbrio de ligação (LD) e para derivar os haplótipos, verificando possíveis associações dos mesmos.

A correção de Bonferroni para o número de SNPs analisados foi utilizada para verificar um limiar significativo de $p < 0,005$ ($p = p_0 / n$, onde $p_0 = 0,05$ e $n = 10$ SNPs).

4. ESTUDO DE EXPRESSÃO GÊNICA EM BIÓPSIA DE TUMOR

4.1 Extração do RNA total de biopsia

Descongelamos o material biopsiado de melanoma e/ou de nevo (conservado por congelamento em nitrogênio líquido) (fragmentos de cerca de 30 mg de tecido) e maceramos com auxílio de *Tissue Ruptor* (Qiagen). Para a extração utilizamos os kits *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) e *RNase-Free DNase Set* (Qiagen) e seguimos as instruções do fabricante. Brevemente, após maceração e diversas lavagens e filtrações adicionamos uma solução de DNase I, para remoção de DNA. Após a adição de tampões específicos obtivemos o RNA puro e o quantificamos por meio da absorbância a 260 nm (*Nanodrop Spectrophotometer N-1000*). A pureza do RNA foi avaliada por meio da relação 260 nm versus 280 nm.

4.2 Retrotranscrição do RNA e análise dos genes do inflamassoma

Preparamos o cDNA a partir do RNA total utilizando o kit *Super Script™ III Reverse Transcriptase* (Invitrogen, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Procedemos à avaliação da expressão gênica relativa por meio de ensaios gene-específicos *Taqman* (*Applied Biosystems*) para os genes do inflamassoma *NLRP1*, *NLRP3*, *NLRC4*, *AIM2*, *CARD8*, *CASP1*, *IL1B*, *IL18*. Utilizamos o gene *housekeeping ACTB* para normalização dos dados brutos e utilizamos a plataforma de PCR em tempo real ABI 7500 HT *Sequence Detection System* (*Applied Biosystems USA*) para a amplificação. Utilizamos o software SDS 2.3 para obter os valores de limiar do ciclo (C_t - *threshold*) para cada gene. A expressão dos genes foi normalizada (ΔC_t) através da subtração do valor de C_t do gene de manutenção (*housekeeping*) β -actina (*ACTB*). Assim os valores de ΔC_t foram utilizados para calcular a expressão relativa de acordo com o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (FC – *FoldChange*)⁹¹. Convertemos este valor para Log 2FC, para melhor observação gráfica dos resultados. A expressão gênica foi avaliada comparando os resultados das biopsias de tumores *versus* os resultados dos nevos e através do teste *t de student*, sendo que valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS

1. COMPOSIÇÃO DA CASUÍSTICA

Incluímos 198 pacientes de melanoma maligno esporádico e 142 indivíduos sadios. As características dos indivíduos com relação à idade, sexo, etnia e forma clínica, obtidos através de dados de prontuários, estão descritas na tabela 2.

Em relação à idade, observamos que a faixa etária média dos pacientes é de 58 anos, enquanto o grupo controle apresenta uma idade média de 66 anos. Embora esta diferença não alcance significância estatística, cabe esclarecer que optamos por recrutar indivíduos com idade acima de 55 anos para a composição do grupo controle para reduzir a chance de incluir neste grupo indivíduos que poderiam vir a desenvolver o melanoma em período posterior à sua participação neste estudo, fato importante uma vez que se trata de análises de características genéticas dos indivíduos¹⁷.

Em nosso estudo participaram 125 mulheres e 73 homens diagnosticados com melanoma. Destes, 77 indivíduos (38%) apresentavam melanoma expansivo superficial (SSM), 30 (15%) melanoma nodular (NM), 21 (11%) melanoma lentigo maligno (LMM) e 10 (5%) melanoma acral lentiginosos (ALM).

Observamos que a maioria de nossos pacientes é de origem europeia, 171 indivíduos (87%), uma vez que são os mais propensos a desenvolver este tipo de câncer, devido a suas características fenotípicas².

Tabela2 - Características dos pacientes com melanoma maligno esporádico (características fenotípicas e do melanoma) e dos controles. Estão reportados os valores absolutos e as frequências para cada característica. Dados obtidos de prontuários cedidos pelos médicos.

Características	Casos n=198	Controles n=142
Sexo (M/F)	73/125	66/76
Idade ($\pm$ SD)	58 $\pm$ 13,4 ^a	66 $\pm$ 12,4 ^a
Etnia		
Origem Europeia	171 (0,85)	87 (0,61)
Origem Africana	13 (0,07)	40 (0,28)
Demais origens	01 (0,01)	10(0,07)
#	13 (0,07)	05(0,04)
Idade do diagnóstico:		
$\leq$ 50 anos	75 (0,38)	
>50 anos	106 (0,53)	
#	17(0,09)	
Tipo histopatológico:		
<i>in situ</i>	29 (0,15)	
SSM	77 (0,38)	
NM	30 (0,15)	
LMM	21 (0,11)	
ALM	10 (0,05)	
Outros	09 (0,05)	
#	22(0,11)	
Índice de Breslow ¹²		
<2 mm	133 (0,67)	
$\geq$ 2 mm	30 (0,15)	
#	35 (0,17)	
Metástase		
Sim	11 (5,6)	
Não	183 (92,4)	
#	4 (2,0)	
Sensibilidade ao sol:		
Sensível	94 (0,47)	
Pouco sensível	57 (0,29)	
#	47 (0,24)	

^a caso/controle teste de Fisher valor de $p>0.05$

Valores de frequência entre parênteses

– Dados não disponibilizados

2. ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO ENTRE SNPs SELECIONADOS NOS GENES *NLRP1*, *NLRP3*, *CARD8*, *IL1B*, *IL18* E A SUSCETIBILIDADE A DESENVOLVER MELANOMA MALIGNO ESPORÁDICO

Levando em consideração que um microambiente inflamatório representa um fator de risco para a transformação neoplásica, e especificamente que um processamento aumentado de IL-1 β e/ou IL-18 poderia contribuir para o desenvolvimento e/ou progressão do melanoma, consideramos a hipótese de que variantes nos genes do inflamassoma, que resultam em ganho de função na ativação do complexo, determinariam um *background* genético de risco na susceptibilidade ao melanoma e/ou na progressão do tumor.

Com esse objetivo, foram genotipados 10 polimorfismos de base única (SNPs) nos genes *NLRP1*, *NLRP3*, *CARD8*, *IL1B* e *IL18* em uma coorte de 185 pacientes com melanoma esporádico e 137 indivíduos sem histórico de melanoma com idade acima de 55 anos. Os efeitos dos SNPs sobre a susceptibilidade a desenvolver melanoma e sobre as características específicas do melanoma foram avaliados através de análise multivariada.

Todos os polimorfismos estudados estavam distribuídos de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg na coorte analisada e as frequências resultaram parecidas com outras casuísticas brasileiras ou com dados públicos (tabela 3 e 4).

Tabela 3 - Frequências dos SNPs na população geral estudada. As frequências de alelos menores (MAF) com respectivos *p-value* de *Hardy-Weinberg* (*HWp*) para SNPs estudados foram relatadas nos controles. *Hap map project MAF* (ou *1000 Genome MAF*, onde indicado com um *) para a população de origem europeia e origem africana estão incluídos. na = não avaliado. CEU = ancestralidade europeia (Utah, EUA). YRI = ancestralidade africana (Yoruba, Nigéria).

Gene	SNP ID	Alelo	Controles	HW p	CEU	YRI
<i>NLRP1</i>	rs12150220	T	0,46	0,079	0,46	0,02
	rs2670660	G	0,46	0,485	0,35*	0,32*
	rs11651270	C	0,41	0,216	0,47	0,50
<i>NLRP3</i>	rs35829419	A	0,04	1,0	0,06	na
	rs10754558	G	0,38	0,070	0,36	0,23
<i>CARD8</i>	rs2043211	T	0,38	0,855	0,27	0,16
	rs6509365	G	0,40	0,373	0,28	0,32
<i>IL1B</i>	rs1143643	T	0,37	0,804	0,39	0,15
<i>IL18</i>	rs5744256	G	0,20	0,177	0,22	na
	rs1834481	G	0,20	0,103	0,23	na

Tabela 4 - Frequências dos SNPs na coorte caso/controle estudada. As frequências de alelos menores (MAF) com respectivos *p-value* de *Hardy-Weinberg* (*HWp*) para SNPs estudados foram relatadas nos casos e nos controles. MAF para SNPs estudados por Verma *et al*, 2012¹² também estão incluídos com os respectivos *p-value* para fins de comparação com frequências de SNPs na coorte brasileira estudada.

Gene	SNP ID	Alelo	Casos	HW p	Controles	HW p	Casos (Verma <i>et al</i> , 2012)	Controles (Verma <i>et al</i> , 2012)
<i>NLRP1</i>	rs12150220	T	0,44	0,071	0,46	0,079	0,52 (0,020)	0,20 ($<2 \times 10^{-16}$)
	rs2670660	G	0,51	0,180	0,46	0,485		
	rs11651270	C	0,50	0,059	0,41	0,216		
<i>NLRP3</i>	rs35829419	A	0,04	1,0	0,04	1,0	0,08 ($4,2 \times 10^{-8}$)	0,06 ($1,0 \times 10^{-6}$)
	rs10754558	G	0,41	0,878	0,38	0,070		
<i>CARD8</i>	rs2043211	T	0,29	0,203	0,38	0,855	0,34 (0,524)	0,36 (0,026)
	rs6509365	G	0,25	0,157	0,40	0,373		
<i>IL1B</i>	rs1143643	T	0,40	1,0	0,37	0,804		
<i>IL18</i>	rs5744256	G	0,18	0,803	0,20	0,177		
	rs1834481	G	0,17	0,628	0,20	0,103		

Inicialmente foi avaliada a distribuição dos SNPs entre casos e controles. Sexo, idade e etnia foram incluídos na análise como variáveis de ajuste. Na tabela 5 estão reportados os resultados do estudo caso/controle em termos de frequência dos SNPs nos dois grupos, *p-value* (*p*) e *p-value* corrigidos (*p_{aj}*) com os respectivos *Odds Ratio* (OR). Valores significativos de associação foram considerados quando $p_{aj} \leq 0,005$ de acordo a correção de Bonferroni para múltiplos SNPs ($p = p_0/n$, onde $p_0 = 0,05$; $n = 10$ SNPs). Os dados individuais da genotipagem estão apresentados nos apêndices (apêndice A e apêndice B).

A distribuição dos SNPs rs12150220, rs2670660, rs11651270, rs35829419, rs10754558, rs1143643, rs5744256 e rs1834481 não resultou estatisticamente diferente entre casos e controles ($p > 0,05$) (tabela 5). Por sua vez, ambos os polimorfismos rs2043211 (C10X) e rs6509365 (intron) no gene *CARD8* resultaram mais frequentes no grupo controle que nos pacientes.

Tabela 5 - Resultados da análise de associação entre SNPs nos genes do inflamassoma e a susceptibilidade ao melanoma maligno esporádico. Reportamos as frequências dos genótipos para cada SNP, assim como os *p-value* (*p*), e os *p-value* ajustados (*p_{aj}*) por idade, sexo e etnia, *Odds Ratio* (OR) e Intervalo de Confiança 95% (95% IC) de acordo com a análise multivariada. Em negrito evidenciamos os valores de $p < 0,005$ (Correção de Bonferroni). Os valores grifados referem-se a $p < 0,05$. Ref: valor de referência para o cálculo estatístico.

Genes	SNP ID	Genótipos	Casos (n=185)	Controles (n=137)	<i>p</i>	OR (95%IC)	<i>p_{aj}</i>	OR (95%IC)
<i>NLRP1</i>	rs12150220	T/T	0,23	0,25	0,887	0,87 (0,48-1,58)	0,618	0,78 (0,39-1,55)
		A/T	0,42	0,42		0,98 (0,58-1,64)		1,08 (0,59-1,97)
		A/A	0,35	0,33		Ref		Ref
	rs2670660	G/G	0,28	0,19	0,145	1,54 (0,81-2,93)	0,225	1,59 (0,76-3,35)
		A/G	0,45	0,53		0,87 (0,51-1,49)		0,90 (0,48-1,68)
		A/A	0,27	0,28		Ref		Ref
	rs11651270	C/C	0,28	0,19	0,155	1,84 (0,98-3,44)	0,173	1,90 (0,93-3,86)
		T/C	0,43	0,43		1,25 (0,73-2,12)		1,13 (0,62-2,06)
		T/T	0,29	0,37		Ref		Ref
<i>NLRP3</i>	rs35829419	A/A	0	0	0,911	-	0,873	-
		C/A	0,07	0,07		1,05 (0,44 -2,54)		1,08 (0,41-2,89)
		C/C	0,93	0,93		Ref		Ref
	rs10754558	G/G	0,17	0,18	0,310	1,14 (0,60-2,16)	0,620	1,15 (0,55-2,39)
		C/G	0,48	0,40		1,46 (0,89- 2,40)		1,32 (0,75-2,33)
		C/C	0,35	0,42		Ref		Ref
<i>CARD8</i>	rs2043211	T/T	0,06	0,13	<u>0,043</u>	0,37 (0,16-0,83)	<u>0,052</u>	0,35 (0,13-0,91)
		A/T	0,45	0,49		0,73 (0,46-1,18)		0,60 (0,35-1,06)
		A/A	0,49	0,38		Ref		Ref
	rs6509365	G/G	0,08	0,18	3,1 exp-4	0,28 (0,13-0,58)	5,7 exp-4	0,32 (0,14-0,76)
		A/G	0,33	0,44		0,48 (0,29-0,78)		0,37 (0,21-0,65)
		A/A	0,59	0,38		Ref		Ref
<i>IL1B</i>	rs1143643	T/T	0,16	0,12	0,700	1,45 (0,59-3,56)	0,572	1,76 (0,56-5,54)

<i>IL18</i>	rs5744256	C/T	0,48	0,49	0,589	1,06 (0,58-1,95)	0,165	1,01 (0,46-2,23)
		C/C	0,36	0,39		Ref		Ref
		G/G	0,03	0,06		0,58 (0,19-1,72)		0,36 (0,11-1,19)
		A/G	0,29	0,28		1,03 (0,62 -1,70)		0,72 (0,41-1,27)
		A/A	0,67	0,66		Ref		Ref
		G/G	0,05	0,07		0,64 (0,17 -2,36)		0,50 (0,16-1,52)
	rs1834481	C/G	0,23	0,25	0,755	0,87 (0,43-1,74)	0,450	0,85 (0,48-1,51)
		C/C	0,73	0,69		Ref		Ref

Os resultados detalhados para a análise do polimorfismo de *CARD8*, significativamente associado ao desenvolvimento de melanoma estão reportados na tabela 6.

O alelo menor G do rs6509365 resultou significativamente mais frequente nos controles do que nos pacientes de acordo com um modelo dominante de herança (A/G+G/G: 0,62 contra 0,41; $p=1,7e-04$; OR = 0,42). O dado continuou estatisticamente significativo também após correção por sexo, idade e etnia ($p_{aj}=1,2e-04$; OR=0,40). Esses resultados sugerem um efeito protetor deste SNP no desenvolvimento do melanoma.

Em seguida, decidimos analisar a associação na coorte estratificada por gênero, etnia e idade dos indivíduos quando da coleta das amostras. Verificamos que a associação do rs6509365 com o melanoma resultou mais significativo nas mulheres ($p_{aj}= 0,002$) em comparação com os homens ($p_{aj} = 0,030$) (tabela 6), sugerindo que as mulheres podem ser mais protegidas ao desenvolvimento do melanoma quando portadores deste polimorfismo. Não tivemos dados significativos em relação aos demais grupos.

Tabela 6 – Resultados da associação do polimorfismo rs6509365 em *CARD8* na coorte de casos/controles de melanoma maligno esporádico. As frequências dos genótipos, valores de *p-value* não ajustados (*p*) e ajustados (*p_{aj}*) por sexo, idade e etnia, valores de *Odds Ratio* (OR) e intervalo de confiança de 95% (95%IC) no polimorfismo rs6509365 foram reportados de acordo com o modelo de herança dominante nos casos e controles. Os dados também foram estratificados de acordo com o sexo (homens e mulheres). Em negrito evidenciamos os valores de $p < 0,005$ (Análise de Bonferroni).

Genótipos	Casos	Controles	<i>p</i>	OR (95%CI)	<i>p_{aj}</i>	OR (95%CI)
	n=185	n=137				
A/G-G/G	0,41	0,62	1,7 exp-4	0,42 (0,26- 0,66)	1,2 exp-4	0,40 (0,23-0,67)
A/A	0,59	0,38		Ref		Ref
Homens						
	n=68	n=64				
A/G-G/G	0,48	0,71	0,015	0,41 (0,20 - 0,85)	0,030	0,37 (0,15 - 0,93)
A/A	0,52	0,29		Ref		Ref
Mulheres						
	n=117	n=73				
A/G-G/G	0,37	0,57	0,010	0,45 (0,25 - 0,83)	0,002	0,35 (0,18 -0,69)
A/A	0,63	0,43		Ref		Ref

De modo interessante, o polimorfismo *non-sense* do *CARD8* C10X (rs2043211) também resultou menos frequente nos pacientes (0,51) que nos controles (0,62), porém de modo não estatisticamente significativo após a correção de Bonferroni ($p_{aj} = 0,03$; $OR_{aj} = 0,56$, no modelo dominante de herança).

O software *Haploview*⁹⁰ foi usado para verificar o padrão de desequilíbrio de ligação (LD) e para derivar os haplótipos, verificando possíveis associações dos mesmos. Através de uma plataforma Java, este software calcula vários pares de medidas de LD, que são usados para criar uma representação gráfica (diagrama). Para isto, cada par de SNP é calculado a partir de três medidas: *LOD score* (*log of the likelihood odds ratio*) e *D'* (coeficiente de desvio

padronizado) e a medida r^2 . No diagrama formado podemos verificar através de valores e cores se há LD e quão forte ele é. Nossos resultados foram baseados na relação D'/LOD (brancos para $D' < 1$ e $\text{LOD} < 2$; tons rosa para $D' < 1$ e $\text{LOD} \geq 2$; vermelho intenso para $D' = 1$ e $\text{LOD} \geq 2$); o software considera que $\text{LOD} > 2$ resulta em LD mais significativa (figura 7).

Assim, verificamos o desequilíbrio de ligação (LD) entre os SNPs de *CARD8* (Figura 7), porém na coorte estudada os dois polimorfismos não resultaram em LD ($D' = 0,54$; $\text{LOD} = 20,78$; $r^2 = 0,28$).

Figura 7 – Diagrama de desequilíbrio de ligação (LD) dos resultados das análises dos SNPs na coorte estudada. Estão indicados os IDs dos polimorfismos (números na vertical) e o bloco de haplótipos (Block1) resultante. O software Haploview elabora o diagrama para indicar os valores de LD (neste caso, em função *LOD score* (*log of the like hood odds ratio*) e do D' (coeficiente de desvio padronizado)) através dos losangos (brancos para $D' < 1$ e $\text{LOD} < 2$; tons rosa para $D' < 1$ e $\text{LOD} \geq 2$; vermelho intenso para $D' = 1$ e $\text{LOD} \geq 2$). O software considera que $\text{LOD} > 2$ resulta em LD mais significativa.

Fonte: Análise realizada através do software Haploview.

Embora os dois SNPs de *CARD8* não resultarem em LD, avaliamos o possível efeito combinatório dos SNPs na susceptibilidade a desenvolver melanoma.

Na tabela 7 reportamos as possíveis combinações alélicas dos polimorfismos rs2043211 e rs6509365 e suas respectivas distribuições nos casos e controles. A combinação rs2043211A e rs6509365G foi excluída da análise por ser rara na população estudada (frequência $< 0,05$). As combinações rs2043211T e rs6509365G, e rs2043211T e rs6509365A resultaram significativamente diferentes entre casos e controles, também após o ajuste por

sexo, idade e etnia. Mas apenas a combinação rs2043211T e rs6509365A se manteve significativa após correção de Bonferroni. Sugerindo que esta combinação alélica pode estar associada ao desenvolvimento do melanoma.

Tabela 7 - Resultados da associação dos polimorfismos rs2043211 e rs6509365 em *CARD8* na coorte de casos/controles de melanoma maligno esporádico. As combinações alélicas, suas frequências, *p-value* não ajustados (*p*) e valores ajustados de *p-value* (*p_{aj}*) por sexo, idade e etnia, e *Odds Ratio* (OR) e intervalo de confiança de 95% (95%IC) nos polimorfismos rs2043211 e rs6509365 estão reportados na tabela. Apenas haplótipos com frequência > 0,05 estão incluídos nesta análise. Em negrito evidenciamos os valores de $p < 0,005$ (Análise de Bonferroni). Ref: dado usado pelo software como referência para os cálculos.

Haplótipos rs2043211– rs6509365	Casos/Controles Frequências	<i>p</i>	OR (95% IC)	<i>p_{aj}</i>	OR _{aj} (95% IC)
A-A	0,66/0,47		ref		ref
T-A	0,09/0,13	0,0028	0,42 (0,24 – 0,75)	0,0046	0,39 (0,20-0,75)
T-G	0,19/0,25	0,0113	0,58 (0,38 – 0,88)	0,0223	0,56 (0,34 – 0,92)
A-G raro	0,05/0,16	<0,0001	0.20 (0.10 –0.40)	<0,0001	0,18 (0,08 – 0,39)

O LD foi também analisado para os outros SNPs (figura 7) e observamos que apenas rs5744256 e rs1834481 no gene *IL18* se encontraram em desequilíbrio de ligação ($D' = 0,95$; LOD= 73,76; $r^2=0,85$).

Foi então analisada a distribuição dos haplótipos resultantes na coorte de casos/controles. Dois de três haplótipos possíveis foram analisados, já que a combinação de haplótipos rs1834481G e rs5744256A foi excluída por ser rara em nossa casuística (frequência < 0.05). Porém nenhum dos haplótipos resultou estatisticamente associado a desenvolvimento do melanoma. (tabela 8).

Tabela 8 – Resultados da associação dos polimorfismos rs5744256 e rs1834481 em *IL18* na coorte de casos/controles de melanoma maligno esporádico. Os haplótipos, suas frequências, *p-value* não ajustados (*p*) e valores ajustados de *p-value* (*p_{aj}*) por sexo, idade e etnia, e os *Odds Ratio* (OR) e intervalo de confiança de 95% (95% IC) nos polimorfismos rs5744256 e rs1834481 em *IL18* estão reportados na tabela. Apenas haplótipos com frequência > 0,05 estão incluídos na análise. Ref: dado usado pelo software como referência para os cálculos.

Haplótipos rs5744256-rs1834481	Casos/Controles Frequências	<i>p</i>	OR (95% IC)	<i>p_{aj}</i>	OR _{aj} (95% IC)
A-C	0,79/0,80		Ref		Ref
G-G	0,17/0,19	0.553	0,89 (0,59-1,32)	0,068	0,66 (0,42 - 1.03)
A-G raro	0,027/0,005	0.052	4.39 (0.99 - 19.55)	0,148	3,04 (0,68 – 13,65)

3. ANÁLISE DO EFEITO DOS SNPs SELECIONADOS NOS GENES *NLRP1*, *NLRP3*, *CARD8*, *IL1B*, *IL18* SOBRE O SUBTIPO HISTOLÓGICO DO MELANOMA

Com o intuito de avaliar o efeito dos SNPs estudados nos pacientes com melanoma esporádico, analisamos a distribuição dos polimorfismos nos pacientes estratificados por subtipos histológicos mais frequentes (*in situ*, SSM, NM e LMM), grau de invasividade e tipo de pele em relação à sensibilidade ao sol (menos sensível *versus* mais sensível à exposição ao sol). Sexo, raça e idade de diagnóstico foram utilizados como variáveis de correção. Consideramos significativos os dados de associação com $p_{aj} \leq 0,005$ (correção de Bonferroni).

Em relação aos subtipos histológicos, encontramos dados de associação significativa apenas na comparação entre SSM e NM para *NLRP1* (rs11651270) e *CARD8* (rs2043211) (tabela 9).

O polimorfismo rs11651270 em *NLRP1* resultou menos frequente em SSM (0,40) do que em NM (0,76) ($p = 0,003$) de acordo com um modelo de herança dominante. O resultado continuou estatisticamente significativo também após a correção por idade, sexo e etnia ($p_{aj} = 0,003$) (tabela 9).

Tabela 9 – Resultados das análises de associação entre SNPs dos genes do inflamassoma na população brasileira caso/controle de melanoma. Estão reportados os genes, os números de identificação de cada polimorfismo (SNP ID), os *p-value* ajustados para sexo, idade e etnia para três comparações: melanoma expansivo superficial (SSM) *versus* melanoma nodular (NM); SSM *versus* melanoma lentigo maligno (LMM); e SSM *versus* melanoma *in situ*. Os valores estatisticamente significativos são indicados em negrito. Valor significativo considerado $p < 0,005$ (correção de Bonferroni). Nd: não determinado.

Gene	SNP ID	SSM (n=77)/ NM (n=30)	SSM (n=77)/ LMM (n=21)	SSM (n=77)/ <i>in situ</i> (n=29)
		Modelo de herança dominante	Modelo de herança recessivo	Modelo de herança recessivo
<i>NLRP1</i>	rs12150220	0,018	0,109	0,639
	rs2670660	0,229	0,475	0,820
	rs11651270	0,003	0,060	0,080
<i>NLRP3</i>	rs35829419	nd	Nd	nd
	rs10754558	0,303	0,017	0,952
<i>CARD8</i>	rs2043211	0,005	0,108	0,793
	rs6509365	0,040	0,983	0,600
<i>IL1B</i>	rs1143643	0,815	0,904	0,021
<i>IL18</i>	rs5744256	0,903	0,937	0,054
	rs1834481	0,176	0,946	0,033

Considerando que o aparecimento precoce do melanoma poderia estar mais relacionado a um *background* genético de predisposição/risco para desenvolver o melanoma, incluímos na análise multivariada a idade do indivíduo quando diagnosticado em substituição à idade do indivíduo, porém nenhum dos SNPs estudados resultou distribuído de modo estatisticamente diferente entre os grupos SSM, NM e LMM (tabela 10). *CARD8* rs2043211 resultou mais frequente em SSM do que em NM (0,80 *versus* 0,46, $p = 0,005$, OR=0,21) de acordo com um modelo de herança dominante. Sexo e etnia não afetaram o dado ($p_{aj}=0,005$, OR_{aj}= 0,18). Esse resultado sugere que essa variante estaria mais associada ao desenvolvimento do SSM que do NM.

Tabela 10 – Reanálise dos resultados de associação entre SNPs nos genes do inflamassoma na população brasileira caso/controle de melanoma. Estão reportados os genes, os números de identificação de cada polimorfismo (SNP ID), os *p-value* ajustados para sexo, idade de diagnóstico e etnia para três comparações: melanoma expansivo superficial (SSM) *versus* melanoma nodular (NM); SSM *versus* melanoma lentigo maligno (LMM); SSM *versus* melanoma *in situ*. Os valores estatisticamente significativos são indicados em negrito. Valor significativo considerado $p < 0,005$ (correção de Bonferroni). Nd: não determinado.

Gene	SNP ID	SSM (n=77)/ NM (n=30)	SSM (n=77)/ LMM (n=21)	SSM (n=77)/ <i>in situ</i> (n=29)
		Modelo de herança dominante	Modelo de herança recessivo	Modelo de herança recessivo
<i>NLRP1</i>	rs12150220	0,063	0,038	0,570
	rs2670660	0,384	0,300	0,539
	rs11651270	0,013	0,086	0,132
<i>NLRP3</i>	rs35829419	Nd	Nd	Nd
	rs10754558	0,232	0,050	0,877
<i>CARD8</i>	rs2043211	0,005	0,107	0,753
	rs6509365	0,071	0,987	0,565
<i>IL1B</i>	rs1143643	0,671	0,994	0,011
<i>IL18</i>	rs5744256	0,983	0,944	0,068
	rs1834481	0,402	0,915	0,048

O polimorfismo rs11651270 resultou menos frequente em SSM (0,40) do que em NM (0,76), mas a associação não alcançou valor significativo após correção de Bonferroni ($p_{aj} = 0,013$), porém sugere que a idade de diagnóstico poderia estar afetando o resultado (tabela 10).

Para tanto e de acordo com dados anteriormente publicados ¹², refizemos a análise classificando os pacientes com base na idade de diagnóstico, escolhendo como corte a idade de 50 anos quando diagnosticado, diferente da estratificação feita por Verma e colaboradores (<35, 35-60; >60 anos) que resultariam em grupos com um número amostral muito reduzido em nossa coorte. Nove polimorfismos dentre 10 não se mostraram diferentemente distribuídos nos melanomas classificados por subtipo histológico e agrupados por idade de diagnóstico

(dados não mostrados). Apenas o SNP rs11651270 em *NLRP1* foi encontrado significativamente mais frequente no grupo de NM comparados com o grupo SSM na faixa etária > 50 anos ($p=0,001$; OR=15,00), e o dado continuou estatisticamente significativo após a correção por sexo e etnia ($p_{aj} = 0,001$; OR_{aj} = 17,38). Esse resultado sugere que o rs11651270 confere um risco aumentado de desenvolver o NM e não o SSM, especialmente em indivíduos mais idosos (tabela 11).

Tabela 11 - Resultados significativos de associação para Melanoma Expansivo Superficial (SSM) versus Melanoma Nodular (NM). As frequências dos genótipos, p -value não ajustados (p), valores de p ajustados para sexo, etnia e idade do indivíduo (p_{aj}), com respectivas *Odds Ratio* (OR) e intervalos de confiança de 95% (IC 95%) estão relatados para SNPs significativamente associados ($p<0,005$, correção de Bonferroni), de acordo com um modelo de herança dominante. Os dados estratificados para a idade quando do diagnóstico estão relatados para *NLRP1* rs11651270. Ref: genótipo de referência.

Gene SNP ID	Genótipos	SSM (n=77)	NM (n=30)	<i>p</i>	OR (95% IC)	<i>p</i> _{aj}	OR _{aj} (95% IC)
<i>NLRP1</i> rs11651270	C/T-C/C	0,40	0,76	0,003	4,80 (1,65 – 13,94)	0,013	4,27 (1,34 – 13,64)
	T/T	0,60	0,24		Ref		Ref
<i>NLRP1</i> rs11651270 estratificado por “idade quando diagnosticado”							
<50 years	C/T-C/C	0,56	0,68	0,507	1,70 (0,36-8,09)	0,428	2,0 (0,36-11,14)
	T/T	0,44	0,32		Ref,		Ref
>50 years	C/T-C/C	0,25	0,83	0,001	15,00 (2,42-93,01)	0,001	17,38 (2,64-114,23)
	T/T	0,75	0,17		Ref		Ref

4. ANÁLISE DO EFEITO DOS SNPs SELECIONADOS NOS GENES *NLRP1*, *NLRP3*, *CARD8*, *IL1B*, *IL18* SOBRE A INVASIVIDADE DO MELANOMA (índice de Breslow)

A distribuição dos SNPs foi então avaliada de acordo com a invasividade (índice de Breslow) com análise multivariada, considerando antes o valor de Breslow como variável contínua ($0,55 \pm 2,43$) e em seguida agrupando os pacientes de acordo com o valor do índice de Breslow ($< 2\text{mm}$ versus $\geq 2\text{mm}$)^{12, 17}. Idade do indivíduo quando diagnosticado, sexo e etnia foram utilizadas como variáveis de correção (tabela 12).

Tabela 12 - Resultados da associação para polimorfismos do inflamassoma em pacientes com melanoma de acordo com invasividade. Genes, número de identificação do polimorfismo (SNP ID), invasividade (como variável contínua) e *p-value* ajustados da análise multivariada para sexo, idade no diagnóstico e etnia estão relatados. Analisamos os dados dos pacientes com melanoma maligno esporádico de acordo com a invasividade (índice de Breslow), como menos invasivo ($< 2\text{ mm}$) ou mais invasivo ($\geq 2\text{ mm}$)^{12, 17}. Os valores estatisticamente significativos são indicados em negrito ($p < 0,005$, correção de Bonferroni). Nd: não determinado.

Gene	SNP ID	Invasividade (índice de Breslow; Média 1,32 mm $\pm$ 2,44)	Invasividade ($\geq 2\text{ mm}$ (n=30)/ $< 2\text{ mm}$ (n=133))
<i>NLRP1</i>	rs12150220	0,461	0,618
	rs2670660	0,871	0,600
	rs11651270	0,744	0,612
<i>NLRP3</i>	rs35829419	nd	nd
	rs10754558	0,709	0,440
<i>CARD8</i>	rs2043211	0,329	0,215
	rs6509365	0,110	0,350
<i>IL1B</i>	rs1143643	0,036	0,004
<i>IL18</i>	rs5744256	0,768	0,913
	rs1834481	0,714	0,400

A maioria dos SNPs estudados não resultou associada com a invasividade. Apenas, o SNP *IL1B* rs1143643 resultou diferentemente distribuído de acordo com o índice de Breslow (T/T: $0,29 \pm 0,13\text{ mm}$ versus C/C+C/T: $1,42 \pm 0,21\text{ mm}$, de acordo com modelo recessivo),

contudo esta diferença não resultou estatisticamente significativa após correção por Bonferroni ($p_{aj}=0,036$) (tabela 12).

Quando a análise foi efetuada nos pacientes classificados pelo índice de Breslow (<2 mm *versus* ≥ 2 mm) confirmamos a associação do polimorfismo rs1143643 com uma menor invasividade, sendo o alelo menor T mais frequente no grupo de pacientes com Breslow <2 mm (T/T: 0,20 *versus* C/C+C/T: 0,80; $p=0,026$; OR=0,16; de acordo com o modelo recessivo de herança). O resultado continuou significativo também após correção por sexo, etnia e idade de diagnóstico ($p_{aj}=0,004$; OR=0,16) (tabela 13). Esses dados sugerem que o rs1143643 está associado com uma menor invasividade do melanoma.

Tabela 13 – Resultados de associação do SNP rs1143643 em *IL1 β* com invasividade (índice de Breslow). Os resultados da associação foram relatados para o índice de Breslow (como variável contínua), bem como para os pacientes classificados de acordo com o índice de Breslow <2 mm e ≥ 2 mm. As distribuições de genótipos estão relatadas de acordo com um modelo recessivo de herança. *P-value* não ajustado (p) e *p-value* ajustado (p_{aj}) para sexo, etnia e idade do diagnóstico, com respectivas *Odds Ratio* (OR) e intervalos de confiança de 95% (IC 95%) estão relatados (considerado significativo: $p < 0,005$, correção de Bonferroni). n: número de indivíduos; Dif: difference; OR: Odds Ratio; IC: intervalos de confiança; Ref: genótipo de referência.

Genótipos	Índice de Breslow (mm)	n	p	Dif	p_{aj}	Dif
T/T	0,29 $\pm$ 0,13	18	0,702	-0,237	0,036	-1,09
C/C+C/T	1,42 $\pm$ 0,21	101				
Genótipos	<2 mm (n=133)	≥ 2 mm (n=30)	p	OR (95% IC)	p_{aj}	OR _{aj} (95% IC)
T/T	0,20	0,04	0,026	0,16 (0,02 – 1,25)	0,004	0,16 (0,02 – 1,25)
C/C+C/T	0,80	0,96		Ref		Ref

5. ANÁLISE DO EFEITO DOS SNPs SELECIONADOS NOS GENES *NLRP1*, *NLRP3*, *CARD8*, *IL1B*, *IL18* SOBRE A PREDISPOSIÇÃO A DESENVOLVER MELANOMA EM INDIVÍDUOS CLASSIFICADOS COM BASE NO TIPO DE PELE (SENSIBILIDADE AO SOL)

Considerando que a exposição ao sol representa um fator de risco para o desenvolvimento do melanoma e que indivíduos com fototipos diferentes apresentam susceptibilidade diferente para o surgimento do tumor^{12, 92}, a análise de distribuição dos SNPs foi realizada nos pacientes de melanoma classificados de acordo com o tipo de pele (mais sensível ao sol *versus* menos sensível ao sol). Os resultados foram reportados na tabela 14.

Tabela 14 - Resultados da associação para polimorfismos do inflamassoma em pacientes com melanoma de acordo com tipo de pele. Número de identificação de polimorfismo (SNP ID), análise multivariada *p-value* ajustados para sexo, idade no diagnóstico e etnia, com respectivas *Odds Ratio* (OR) e intervalos de confiança de 95% (IC 95%) estão relatados nos casos de acordo com tipos de pele menos sensíveis ao sol e mais sensíveis ao sol. As distribuições de genótipos estão relatadas de acordo com um modelo de herança dominante. Os valores estatisticamente significativos estão indicados em negrito (considerado significante: $p < 0,005$, correção de Bonferroni). Nd: não determinado.

Gene	SNP ID	Genótipos	Menos sensíveis (n=57)	Mais sensíveis (n=94)	p_{aj}	OR (95% IC)
<i>NLRP1</i>	rs12150220	A/A	0,30	0,31	ref	0,90
		A/T – T/T	0,70	0,69	0,800	(0,40 – 2,03)
	rs2670660	A/A	0,27	0,26	ref	1,02
		A/G – G/G	0,73	0,74	0,961	(0,44 – 2,36)
	rs11651270	T/T	0,29	0,29	ref	0,96
		C/T – C/C	0,71	0,71	0,923	(0,41 – 2,23)
<i>NLRP3</i>	rs35829419	-	-	-	nd	-
	rs10754558	C/C	0,35	0,33	ref	0,94
		C/G – G/G	0,65	0,67	0,887	(0,43 – 2,07)
<i>CARD8</i>	rs2043211	A/A	0,57	0,44	ref	1,47
		A/T – T/T	0,43	0,56	0,310	(0,70 – 3,11)
	rs6509365	A/A	0,59	0,61	ref	0,97
		A/G – G/G	0,41	0,39	0,932	(0,45 – 2,08)
<i>IL1B</i>	rs1143643	C/C	0,33	0,37	ref	0,72
		C/T – T/T	0,67	0,63	0,442	(0,30 – 1,69)
<i>IL18</i>	rs5744256	A/A	0,82	0,58	ref	3,66
		A/G – G/G	0,18	<u>0,42</u>	0,003	(1,47 – 9,10)
	rs1834481	C/C	0,78	0,56	ref	2,58
		C/G – G/G	0,22	<u>0,44</u>	0,030	(1,08 – 6,13)

Ambos rs5744256 e rs1834481 foram encontrados mais frequentes em pacientes mais sensíveis ao sol (0,42 e 0,44, respectivamente) do que nos indivíduos menos sensíveis ao sol

(0,18 e 0,22, respectivamente) ($p = 0,002$ e $p = 0,012$, respectivamente, de acordo com um modelo dominante de herança) (tabela 15). Essa diferença continua estatisticamente significativa após a correção por sexo, idade de diagnóstico e etnia, apenas para o rs5744256 ($p_{aj} = 0,003$). Esse dado sugere que o rs5744256 poderia representar um fator de risco maior (OR=3,66) para o desenvolvimento do melanoma em indivíduos mais sensíveis ao sol comparado com os menos sensíveis.

Vale ressaltar que esses dois SNPs resultaram em LD em nossa população, de modo que o efeito da combinação dos haplótipos rs5744256 e rs1834481 na sensibilidade ao sol pode ser um fator de risco para predisposição a melanoma.

Tabela15 - Resultados da associação de *IL18* em pacientes com melanoma classificados de acordo com o tipo de pele. Número de identificação de polimorfismo (SNP ID), as frequências dos genótipos para os polimorfismos rs5744256 e rs1834481 em *IL18*, p-value não ajustados (p) e p-value ajustados para sexo, idade do diagnóstico e etnia (p_{aj}) (considerado significativo: $p < 0,005$, correção de Bonferroni), com *Odds Ratio* (OR) e intervalos de confiança de 95% (IC95%) estão reportados para os pacientes classificados de acordo com o tipo de pele (sensível ao sol ou menos sensível ao sol). Os dados estão apresentados de acordo com um modelo de herança dominante. Ref: genótipo de referência.

SNP ID	Genótipos	Menos sensível (n=57)	Mais Sensível (n=94)	p	OR (95% IC)	p_{aj}	OR _{aj} (95% IC)
rs5744256	A/G-G/G	0,18	0,43	0,002	3,43 (1,48 – 7,93)	0,003	3,66 (1,47 – 9,10)
	A/A	0,82	0,57		Ref		Ref
rs1834481	C/G-G/G	0,22	0,44	0,012	2,69 (1,20 – 6,00)	0,030	2,58 (1,08 – 6,13)
	C/C	0,78	0,56		Ref		Ref

6. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO RELATIVA DE GENES SELECIONADOS DO INFLAMASSOMA EM BIÓPSIAS DE MELANOMA MALIGNO ESPORÁDICO E NEVOS BENIGNO

Com objetivo de avaliar a contribuição do inflamassoma no melanoma, investigamos a expressão de alguns genes do inflamassoma (*NLRP1*, *NLRP3*, *NLRC4*, *CASP1*, *IL1B*, *IL18*), selecionados com base na literatura^{85, 87, 88}, em biópsias de melanoma, através da análise de expressão gênica relativa⁹¹.

A proposta inicial desta análise era comparar a expressão de genes do inflamassoma em biópsias de melanoma com amostras-controle pareadas, constituídas por pele normal do próprio paciente, obtida da margem de segurança cirúrgica. Entretanto, num segundo momento, considerando a composição celular diferente entre pele normal (constituída predominantemente de queratinócitos) e melanoma (constituído predominantemente de melanócitos transformados), e lembrando que os queratinócitos são células capazes de expressar componentes do inflamassoma⁶⁸, optamos por fazer a comparação entre biópsias de melanoma e de nevos benignos.

Os nevos também são constituídos predominantemente por melanócitos, entretanto, na ausência de processo de transformação oncogênica. Vale salientar que diferentemente das amostras de pele normal procedentes do mesmo indivíduo doador da biópsia tumoral, as amostras de nevos foram obtidas de indivíduos saudáveis e, portanto distintos dos doadores das biópsias tumorais, impedindo assim a análise pareada dos dados.

Os resultados da análise da expressão relativa foram obtidos pelo método de *Fold Change* (FC) de acordo com⁹¹, comparando as biópsias tumorais de melanoma com as biópsias de nevos. Na figura 8 os resultados obtidos foram reportados como $\log_2$ do *Fold Change*, $\log_2$ (FC).

Não identificamos expressão do gene *NLRC4* (Ct>35) em nenhum dos indivíduos do nosso estudo, por isto esse gene não está reportado nos gráficos de resultados.

Figura 8 – Análise da expressão relativa de genes do inflamassoma em melanoma maligno esporádico. Expressão relativa dos genes do inflamassoma *NLRP1*, *NLRP3*, *CARD8*, *CASP1*, *IL1B* e *IL18* em biópsias de melanoma (n=15) comparadas com nevos não malignos (n=5). Estão reportados valores de $\log_2$ FC. Teste: One-Way Anova *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$.

Fonte: Análise realizada no software *Graph Pad Prism 5*

Com relação aos genes *NLRP1* e *NLRP3* observamos que tanto em biópsias de tumor quanto em nevos, houve expressão em poucas amostras (para *NLRP1*: expressão de 2/15 tumores, e de 2/5 nevos; e para *NLRP3*: 5/15 tumores e 1/5 nevos). Além disso, quando expressos, *NLRP1* e *NLRP3* apresentaram baixos níveis e foram pouco modulados ($FC=1,07$ e $FC=1,38$, respectivamente; $p > 0,05$).

Por sua vez, observamos que nas biópsias de tumor, os genes *CARD8* e *IL1B* foram positivamente modulados nos tumores comparados aos nevos. O gene *CARD8* resultou quase duas vezes mais expresso nos tumores comparados com os nevos ($FC=3,66$) e esta diferença resultou estatisticamente significativa ($p=0,043$). O gene *IL1B* também resultou muito mais expresso no melanoma com relação ao nevo ($FC=4,84$), mas neste caso essa diferença não resultou significativa ($p = 0,15$), possivelmente devido à elevada heterogeneidade nos valores de FC entre as amostras (figura 8).

Por outro lado, comparada aos nevos, a expressão dos genes *CASP1* e *IL18* em biópsias de tumor foi negativamente regulada. O gene *CASP1* foi quase duas vezes menos expresso nos tumores em comparação com o nevo, e de forma significativa ($FC=0,50$; $p =$

0,042). O gene *IL18*, por sua vez, foi quase quatro vezes menos expresso nos tumores comparado com o nevo (FC=0,16; $p = 0,004$).

Para verificar se haveria diferença entre melanomas metastáticos e não metastáticos, avaliamos a expressão relativa dos genes nas amostras de melanoma agrupados em melanoma metastáticos (n=5) e melanoma não metastático (n=8), sempre em comparação com os nevos (figura 9). Observamos que os genes *NLRP1* e *NLRP3* mantiveram a expressão em baixos níveis, tendo sido observada uma tendência à maior expressão de *NLRP3* por melanomas não metastáticos.

Com relação à *CARD8* não observamos diferenças estatisticamente significantes entre tumores metastáticos ou não, embora possamos observar valores de expressão ligeiramente maiores nas amostras metastáticas, em comparação com os nevos (FC = 5,71, $p = 0,08$ e FC = 3,16, $p = 0,07$, respectivamente).

O gene *CASP1* foi expresso de forma semelhante entre os tumores metastáticos (FC = 0,58; $p = 0,21$) e os não metastáticos (FC = 0,53; $p = 0,17$).

Por sua vez, embora não tenhamos alcançado relevância estatística ($p = 0,14$ e $p = 0,62$ para melanoma metastático e não metastático, respectivamente), a expressão de *IL1B* foi maior nas biópsias de melanoma metastático do que em não metastático (FC = 8,43 e FC = 1,33). (figura 9).

Quanto ao gene *IL18* observamos que sua expressão em amostra de melanoma não metastático resultou negativamente regulada quando comparado aos nevos (FC = 0,23; $p = 0,05$). Da mesma forma, resultou menos expresso em melanoma metastático comparado aos nevos, embora de forma não significativa (FC = 0,11; $p = 0,16$).

Figura 9 - Análise da expressão relativa dos genes do inflamassoma em melanoma maligno esporádico, agrupados em metastáticos ou não. Expressão relativa dos genes do inflamassoma *NLRP1*, *NLRP3*, *CARD8*, *CASP1*, *IL1B* e *IL18* em biópsias de melanoma metastático (n=5) e não metastáticos (n=8) comparados com nevos não malignos (n=5). Estão reportados valores de $\log_2FC$. Teste: Two-Way Anova *: $p < 0.05$.

Fonte: Análise realizada no software *Graph Pad Prism 5*

DISCUSSÃO

A correlação entre câncer e inflamação foi estabelecida, pela primeira vez, com base em observações de que os tumores muitas vezes surgiam em locais de inflamação crônica e que células inflamatórias estavam presentes em biópsias de tumores ⁶⁵. Em alguns cânceres, as condições inflamatórias precedem o desenvolvimento de malignidade, em outros são as alterações oncogênicas que promovem um ambiente inflamatório. Seja qual for a sua origem, esta proliferação celular leva à inflamação e sobrevivência de células malignas, angiogênese e metástase ⁶⁶. A ativação imune iniciada pela inflamação contribui para o controle do crescimento tumoral ^{65, 66}. Ainda existem exemplos nos quais a inflamação pode ser pro ou antitumoral dependendo do estágio da transformação neoplástica ^{69, 72}.

O objetivo do presente estudo foi avaliar se existe uma predisposição genética relacionada com os genes do inflamassoma para o desenvolvimento e/ou o prognóstico do melanoma, e por outro lado, se no melanoma pode ser evidenciado uma modulação na expressão gênica do inflamassoma.

A análise de associação dos SNPs nos genes *NLRP1*, *NLRP3*, *CARD8*, *IL1B* e *IL18*, na coorte caso/controle de melanoma maligno esporádico mostrou que ambos os polimorfismos rs2043211 (C10X) e rs6509365 (intron) no gene *CARD8* resultaram mais frequentes no grupo controle que nos pacientes, mas foi apenas o rs6509365 que resultou estatisticamente associado à proteção contra o desenvolvimento do tumor. Esses dados estão parcialmente de acordo com um estudo similar realizado numa coorte sueca, no qual foram avaliados também os polimorfismos rs12150220, rs35829419 e rs2043211 porém sem nenhuma associação significativa com a susceptibilidade ao melanoma ¹².

Essas discrepâncias nos resultados não aparentam estar relacionadas à origem étnica das duas populações analisadas, uma vez que as frequências dos SNPs analisados são semelhantes na população sueca e na brasileira (tabela 4). Uma possível explicação pode ser encontrada na diferença do número amostral entre os dois estudos, sendo que o trabalho do grupo de Verma ¹² analisou 258 amostras de pacientes e 792 amostras de controle, ao passo que em nosso trabalho analisamos 185 pacientes e 137 controles.

Com relação aos nossos resultados relacionados ao gene *CARD8*, sabe-se que o tag-SNP rs6509365 é uma variante intrônica e o seu efeito funcional ainda é desconhecido, porém ele está em desequilíbrio de ligação (LD) com outros SNPs o que diminui a expressão gênica de *CARD8* ^{93, 94}.

Foi demonstrado que *CARD8* regula negativamente tanto a caspase-1 ⁶⁰ quanto o *NLRP3* ⁶¹. Consequentemente uma diminuição de *CARD8* estaria relacionada com um aumento da atividade da caspase-1 e do inflamassoma, sugerindo que os carreadores do SNP

apresentariam uma maior propensão a ativar o NLRP3 inflamassoma e por consequência promoveriam uma maior inflamação, o que poderia contribuir para uma proteção contra a transformação neoplástica.

Por outro lado, devemos considerar que, além de participar da regulação do NLRP3 inflamassoma, CARD8 regula negativamente a ativação do NF- κ B e controla a sobrevivência celular inibindo a apoptose^{60, 95}. A associação observada no polimorfismo rs6509365 em *CARD8* poderia então ser explicada, também, considerando que uma menor expressão de *CARD8* levaria a uma maior chance de piroptose e consequente eliminação das células neoplásticas.

Tais hipóteses são corroboradas pelos resultados obtidos nos ensaios utilizando biópsias de melanomas, nas quais foi observado um aumento de expressão gênica de *CARD8* comparadas aos nevos (figura 8).

Quando analisamos a distribuição dos polimorfismos nos pacientes agrupados por subtipo histológico de melanoma esporádico (melanoma *in situ* - IS, melanoma expansivo superficial - SSM, melanoma nodular - NM e melanoma lentigo maligno - LM) encontramos uma maior frequência do polimorfismo rs11651270 em *NLRP1* em pacientes com NM e em indivíduos acima de 50 anos quando diagnosticados.

O melanoma nodular é o subtipo mais agressivo de melanoma, com taxa de crescimento rápido e maior potencial metastático, devido à maior verticalização das células tumorais^{18, 19}. Geralmente é diagnosticado quando já se encontra em um estágio avançado (espessura de Breslow entre 1.5 e 3 mm) e, portanto, está associado a um mau prognóstico⁹⁶. O polimorfismo rs11651270 leva à substituição de um aminoácido (M1184V) e foi correlacionado com um aumento no processamento de IL-1 β em PBMC quando encontrada em haplótipos do rs12150220 (L155H)⁹⁷.

Em nossa coorte esses dois SNPs (rs12150220 e rs11651270) não se encontraram em LD e apenas o rs11651270 foi associado com o NM, porém podemos hipotetizar que este polimorfismo induz a uma maior predisposição em ativar o inflamassoma com aumento de produção de IL-1 β e/ou IL-18. Dessa forma o dado em parte corrobora o trabalho de Okamoto que demonstrou um aumento de produção de IL-1 β nos melanomas mais graves (metastáticos)⁶⁸.

Neste mesmo trabalho, Okamoto mostra que a IL1 β é formada constitutivamente na fase tardia do melanoma⁶⁸, enfatizando que IL1 β medeia a inflamação e contribui para o desenvolvimento e progressão do melanoma maligno esporádico. Em nosso estudo, o polimorfismo rs1143643 em *IL1B* foi associado a menor invasividade (menor índice de

Breslow, $p_{aj} = 0,004$; OR = 6,25), e a expressão de IL1B resultou maior em biópsias metastáticas em comparação com as biopsias não metastáticas, apesar de não de forma significativa (Figura 9); estes resultados nos levaram a hipotetizar que o SNP rs1143643 afeta negativamente a expressão da citocina e conduz a uma resistência mais elevada para a progressão do melanoma.

Outro dado original desse trabalho foi a associação do SNPs rs5744256 no gene *IL18* com o fator de risco ao desenvolvimento do melanoma esporádico em indivíduos mais sensíveis ao sol com relação aos indivíduos menos sensíveis ao sol ($p = 0,003$; OR=3,66). O SNP rs5744256 foi previamente associado com baixos níveis de IL-18 no soro^{98, 99}. Baixos níveis séricos de IL-18 foram previamente descritos em pacientes com câncer gástrico¹⁰⁰, melanoma¹⁰¹ e câncer de mama¹⁰².

O grupo de Verma reportou a associação de outro polimorfismo, o rs12150220 em *NLRP1* (L155H), com o risco aumentado de desenvolver melanoma em indivíduos mais sensíveis ao sol¹². Este dado, juntamente com nossos resultados para o SNPs rs5744256 em *IL18*, pode sugerir que um aumento na produção de citocinas inflamassoma-dependentes atuaria como um agente pró-tumoral em indivíduos de pele clara. Vale lembrar que estes resultados devem ser avaliados de forma cautelosa, pois os dados de fototipo são bastante subjetivos e seu uso parece controverso em uma coorte brasileira devido à grande miscigenação.

A análise de expressão gênica demonstrou uma diminuição significativa de expressão do gene *IL18* nas biópsias de melanoma comparadas com as de nevos, especialmente em tumores metastáticos (figuras 8 e 9). Estudos relacionam IL-18 ao crescimento metastático em células de melanoma¹⁰³. Considerando IL-18 associada com a produção de IFN- γ e a resposta imune antitumoral, poderíamos entender que o menor nível de IL-18 poderia predispor a um maior risco para o desenvolvimento de melanoma em indivíduos com pele clara em comparação aos indivíduos com pele menos sensível ao sol.

Embora a IL-18 e IL-1 β sejam membros da mesma família, a síntese e processamento destas proteínas são diferentes¹⁰⁴, o que poderia explicar nossos resultados em relação às expressões de IL-1 β aumentada e de IL-18 diminuída em relação aos nevos.

Considerando o conjunto dos resultados é importante salientar que nosso estudo apresenta algumas limitações, quais sejam: o limitado número amostral, a análise de expressão gênica realizada na biópsia total sem a separação dos tipos celulares, e a falta de quantificação de IL-1 β e IL-18 produzidas nas biopsias.

O número amostral que conseguimos atingir entre 2013 e a finalização desse trabalho ficou limitado ao número de pacientes atendidos pelo serviço de Dermatologia do HCFMUSP.

A análise da expressão gênica dos componentes do inflamassoma foi efetuada a partir do homogenato de cada biópsia, e sendo a amostra muito pequena (cerca de 30 mg) não seria possível separar as células *ex vivo* para análise de expressão gênica. Os dados obtidos, portanto não permitem a extrapolação sobre qual tipo de célula expressaria de forma diferente *IL1B*, *IL18* e *CARD8*, uma vez que as biópsias utilizadas podem conter populações celulares diferentes e não apenas melanócitos (provavelmente infiltrado leucocitário também). Deste modo outros experimentos serão necessários para aprofundar esses achados e definir a contribuição do inflamassoma no desenvolvimento do melanoma.

Por fim, com relação a dosagem das citocinas nas biópsias, este ensaio não foi programado no desenho experimental inicial, o que tornou impossível a execução da dosagem após a manipulação das biópsias para extração do RNA.

Em resumo nossos resultados demonstraram a contribuição da variante rs6509365 em *CARD8* no desenvolvimento do melanoma, o que possivelmente pode estar associado a uma diminuição na expressão deste gene (corroborado pelos ensaios de expressão gênica) sugerindo uma consequente desregulação da ativação inflamassoma e/ou inibição da via apoptótica. Além disso, mostramos que rs11651270 em *NLRP1* está associado com uma susceptibilidade maior a desenvolver NM, um tipo de melanoma mais grave e com pior prognóstico, mas não SSM. O SNP rs1143643 em *IL1β* está associado com menor invasividade das células tumorais. Por sua vez, rs5744256 em *IL-18* resultou mais frequente em pacientes com melanoma e pele clara em comparação com indivíduos com pele mais resistente ao sol. Finalmente, nenhum dos SNPs investigados no gene *IL18* foi associado com maior risco de desenvolver melanoma esporádico, entretanto foi possível evidenciar uma significativa diminuição na expressão deste gene em biópsias de melanoma, comparada aos nevos, sendo que esta diferença torna-se ainda mais acentuada quando consideramos apenas melanomas metastáticos.

CONCLUSÕES

- O SNP rs6509365 em *CARD8* parece estar envolvido na proteção ao desenvolvimento de melanoma;
- O SNP rs11651270 em *NLRP1* parece conferir risco ao desenvolvimento de melanoma nodular, especialmente em indivíduos mais idosos;
- O SNP rs1143643 em *IL1 β* parece estar associado com uma menor invasividade das células tumorais;
- Os SNPs rs5744256 em *IL18* resultou associados à suscetibilidade ao melanoma em indivíduos sensíveis ao sol;
- Nas biópsias de tumor os genes *CARD8* e *IL1B* foram positivamente modulados, em relação aos nevos;
- A expressão dos genes *CASP1* e *IL18*, em biópsias de tumor, resultaram negativamente moduladas em relação ao nevo benigno.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Siegel RL, Miller KD and Jemal A. Cancer Statistics, 2016. *Ca-a Cancer Journal for Clinicians* 2016; 66: 7-30. DOI: 10.3322/caac.21332.
2. Corrie P, Hategan M, Fife K, et al. Management of melanoma. *British Medical Bulletin* 2014; 111: 149-162. DOI: 10.1093/bmb/ldu019.
3. Hofmann-Wellenhof R, Soyer HP, Wolf IH, et al. Ultraviolet radiation of melanocytic nevi - A dermoscopic study. *Archives of Dermatology* 1998; 134: 845-850. DOI: 10.1001/archderm.134.7.845.
4. Vink AA and Roza L. Biological consequences of cyclobutane pyrimidine dimers. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology* 2001; 65: 101-104. DOI: 10.1016/s1011-1344(01)00245-7.
5. Carrera C, Puig-Butille JA, Aguilera P, et al. Impact of Sunscreens on Preventing UVR-Induced Effects in Nevi In Vivo Study Comparing Protection Using a Physical Barrier vs Sunscreen. *Jama Dermatology* 2013; 149: 803-813. DOI: 10.1001/jamadermatol.2013.398.
6. Green AC, Williams GM, Logan V, et al. Reduced Melanoma After Regular Sunscreen Use: Randomized Trial Follow-Up. *Journal of Clinical Oncology* 2011; 29: 257-263. DOI: 10.1200/jco.2010.28.7078.
7. Levi F, Randimbison L, Te VC, et al. High constant incidence rates of second cutaneous melanomas. *International Journal of Cancer* 2005; 117: 877-879. DOI: 10.1002/ijc.21262.
8. Read J, Wadt KAW and Hayward NK. Melanoma genetics. *Journal of Medical Genetics* 2016; 53: 1-14. DOI: 10.1136/jmedgenet-2015-103150.
9. Law MH, Bishop DT, Lee JE, et al. Genome-wide meta-analysis identifies five new susceptibility loci for cutaneous malignant melanoma. *Nature Genetics* 2015; 47: 987-+. DOI: 10.1038/ng.3373.
10. Wang J, Ding Q, Shi Y, et al. The interleukin-10-1082 promoter polymorphism and cancer risk: a meta-analysis. *Mutagenesis* 2012; 27: 305-312. DOI: 10.1093/mutage/ger078.
11. Ward SV, Cadby G, Heyworth JS, et al. Association of TGF beta 1 and clinical factors with scar outcome following melanoma excision. *Archives of Dermatological Research* 2012; 304: 343-351. DOI: 10.1007/s00403-012-1240-6.
12. Verma D, Bivik C, Farahani E, et al. Inflammasome polymorphisms confer susceptibility to sporadic malignant melanoma. *Pigment Cell & Melanoma Research* 2012; 25: 506-513. DOI: 10.1111/j.1755-148X.2012.01008.x.
13. El Marsafy S, Bagot M, Bensussan A, et al. Dendritic cells in the skin - potential use for melanoma treatment. *Pigment Cell & Melanoma Research* 2009; 22: 30-41. DOI: 10.1111/j.1755-148X.2008.00532.x.
14. Fernandes NC, Calmon R, Maceira JP, et al. Melanoma cutâneo: estudo prospectivo de 65 casos. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 2005; 80: 25-34. DOI: 10.1590/s0365-05962005000100004.
15. da Costa NF, Fernandes NC and Borges M. Study of the histopathological types of cutaneous melanoma in Palmas-TO from 2001 to 2011. *Anais Brasileiros De Dermatologia* 2015; 90: 638-645. DOI: 10.1590/abd1806-4841.20153528.
16. Breslow A. THICKNESS, CROSS-SECTIONAL AREAS AND DEPTH OF INVASION IN PROGNOSIS OF CUTANEOUS MELANOMA. *Annals of Surgery* 1970; 172: 902-&. DOI: 10.1097/00000658-197011000-00017.
17. Berrocal A, Cabanas L, Espinosa E, et al. Melanoma: Diagnosis, Staging, and Treatment. Consensus group recommendations. *Advances in Therapy* 2014; 31: 945-960. DOI: 10.1007/s12325-014-0148-2.

18. Guerry D, Synnestvedt M, Elder DE, et al. LESSONS FROM TUMOR PROGRESSION - THE INVASIVE RADIAL GROWTH-PHASE OF MELANOMA IS COMMON, INCAPABLE OF METASTASIS, AND INDOLENT. *Journal of Investigative Dermatology* 1993; 100: S342-S345. DOI: 10.1038/jid.1993.60.
19. Urso C. Are growth phases exclusive to cutaneous melanoma? *Journal of Clinical Pathology* 2004; 57: 560-560. DOI: 10.1136/jcp.2003.014852.
20. Gross O, Thomas CJ, Guarda G, et al. The inflammasome: an integrated view. *Immunological Reviews* 2011; 243: 136-151. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2011.01046.x.
21. Kummer JA, Broekhuizen R, Everett H, et al. Inflammasome components NALP 1 and 3 show distinct but separate expression profiles in human tissues suggesting a site-specific role in the inflammatory response. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2007; 55: 443-452. DOI: 10.1369/jhc.6A7101.2006.
22. Dunn JH, Ellis LZ and Fujita M. Inflammasomes as molecular mediators of inflammation and cancer: Potential role in melanoma. *Cancer Letters* 2012; 314: 24-33. DOI: 10.1016/j.canlet.2011.10.001.
23. Lamkanfi M and Dixit VM. Mechanisms and Functions of Inflammasomes. *Cell* 2014; 157: 1013-1022. DOI: 10.1016/j.cell.2014.04.007.
24. Fernandez DJ and Lamkanfi M. Inflammatory caspases: key regulators of inflammation and cell death. *Biological Chemistry* 2015; 396: 193-203. DOI: 10.1515/hsz-2014-0253.
25. Schroder K and Tschopp J. The Inflammasomes. *Cell* 2010; 140: 821-832. DOI: 10.1016/j.cell.2010.01.040.
26. Boyden ED and Dietrich WF. Nalp1b controls mouse macrophage susceptibility to anthrax lethal toxin. *Nature Genetics* 2006; 38: 240-244. DOI: 10.1038/ng1724.
27. Faustin B, Lartigue L, Bruey JM, et al. Reconstituted NALP1 inflammasome reveals two-step mechanism of caspase-1 activation. *Molecular Cell* 2007; 25: 713-724. DOI: 10.1016/j.molcel.2007.01.032.
28. Di Virgilio F. The Therapeutic Potential of Modifying Inflammasomes and NOD-Like Receptors. *Pharmacological Reviews* 2013; 65: 872-905. DOI: 10.1124/pr.112.006171.
29. Perregaux D and Gabel CA. INTERLEUKIN-1-BETA MATURATION AND RELEASE IN RESPONSE TO ATP AND NIGERICIN - EVIDENCE THAT POTASSIUM-DEPLETION MEDIATED BY THESE AGENTS IS A NECESSARY AND COMMON FEATURE OF THEIR ACTIVITY. *Journal of Biological Chemistry* 1994; 269: 15195-15203.
30. Perregaux DG, McNiff P, Laliberte R, et al. ATP acts as an agonist to promote stimulus-induced secretion of IL-1 beta and IL-18 in human blood. *Journal of Immunology* 2000; 165: 4615-4623.
31. North RA. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiological Reviews* 2002; 82: 1013-1067. DOI: 10.1152/physrev.00015.2002.
32. Khakh BS. Molecular physiology of P2X receptors and ATP signalling at synapses. *Nature Reviews Neuroscience* 2001; 2: 165-174. DOI: 10.1038/35058521.
33. Miao EA, Ernst RK, Dors M, et al. *Pseudomonas aeruginosa* activates caspase 1 through Ipaf. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008; 105: 2562-2567. DOI: 10.1073/pnas.0712183105.
34. Miao EA, Mao DP, Yudkovsky N, et al. Innate immune detection of the type III secretion apparatus through the NLRC4 inflammasome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010; 107: 3076-3080. DOI: 10.1073/pnas.0913087107.

35. Kempster SL, Belteki G, Forhead AJ, et al. Developmental control of the Nlrp6 inflammasome and a substrate, IL-18, in mammalian intestine. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 2011; 300: G253-G263. DOI: 10.1152/ajpgi.00397.2010.
36. Grenier JM, Wang L, Manji GA, et al. Functional screening of five PYPAF family members identifies PYPAF5 as a novel regulator of NF-kappa B and caspase-1. *Febs Letters* 2002; 530: 73-78. DOI: 10.1016/s0014-5793(02)03416-6.
37. Chen GY, Liu M, Wang F, et al. A Functional Role for Nlrp6 in Intestinal Inflammation and Tumorigenesis. *Journal of Immunology* 2011; 186: 7187-7194. DOI: 10.4049/jimmunol.1100412.
38. Khare S, Dorfleutner A, Bryan NB, et al. An NLRP7-Containing Inflammasome Mediates Recognition of Microbial Lipopeptides in Human Macrophages. *Immunity* 2012; 36: 464-476. DOI: 10.1016/j.immuni.2012.02.001.
39. Zaki MH, Vogel P, Malireddi RKS, et al. The NOD-Like Receptor NLRP12 Attenuates Colon Inflammation and Tumorigenesis. *Cancer Cell* 2011; 20: 649-660. DOI: 10.1016/j.ccr.2011.10.022.
40. Wang L, Manji GA, Grenier JM, et al. PYPAF7, a novel PYRIN-containing Apaf1-like protein that regulates activation of NF-kappa B and caspase-1-dependent cytokine processing. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277: 29874-29880. DOI: 10.1074/jbc.M203915200.
41. Savic S, Dickie LJ, Battellino M, et al. Familial Mediterranean fever and related periodic fever syndromes/autoinflammatory diseases. *Current Opinion in Rheumatology* 2012; 24: 103-112. DOI: 10.1097/BOR.0b013e32834dd2d5.
42. Hornung V, Ablasser A, Charrel-Dennis M, et al. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature* 2009; 458: 514-518. DOI: 10.1038/nature07725.
43. Mondini M, Costa S, Sponza S, et al. The interferon-inducible HIN-200 gene family in apoptosis and inflammation: Implication for autoimmunity. *Autoimmunity* 2010; 43: 226-231. DOI: 10.3109/08916930903510922.
44. Duan X, Ponomareva L, Veeranki S, et al. Differential Roles for the Interferon-Inducible IFI16 and AIM2 Innate Immune Sensors for Cytosolic DNA in Cellular Senescence of Human Fibroblasts. *Molecular Cancer Research* 2011; 9: 589-602. DOI: 10.1158/1541-7786.mcr-10-0565.
45. Masumoto J, Taniguchi S, Ayukawa K, et al. ASC, a novel 22-kDa protein, aggregates during apoptosis of human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Journal of Biological Chemistry* 1999; 274: 33835-33838. DOI: 10.1074/jbc.274.48.33835.
46. Dinarello CA. A clinical perspective of IL-1 beta as the gatekeeper of inflammation. *European Journal of Immunology* 2011; 41: 1203-1217. DOI: 10.1002/eji.201141550.
47. Dinarello CA. Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. *Annual Review of Immunology* 2009; 27: 519-550. DOI: 10.1146/annurev.immunol.021908.132612.
48. Smith DE. The biological paths of IL-1 family members IL-18 and IL-33. *Journal of Leukocyte Biology* 2011; 89: 383-392. DOI: 10.1189/jlb.0810470.
49. Lamkanfi M. Emerging inflammasome effector mechanisms. *Nature Reviews Immunology* 2011; 11: 213-220. DOI: 10.1038/nri2936.
50. Takeuchi O and Akira S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* 2010; 140: 805-820. DOI: 10.1016/j.cell.2010.01.022.

51. Fernandes-Alnemri T, Wu J, Yu JW, et al. The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. *Cell Death and Differentiation* 2007; 14: 1590-1604. DOI: 10.1038/sj.cdd.4402194.
52. Sutterwala FS, Ogura Y and Flavell RA. The inflammasome in pathogen recognition and inflammation. *Journal of Leukocyte Biology* 2007; 82: 259-264. DOI: 10.1189/jlb.1206755.
53. Cunha LD, Ribeiro JM, Fernandes TD, et al. Inhibition of inflammasome activation by *Coxiella burnetii* type IV secretion system effector IcaA. *Nature Communications* 2015; 6. DOI: 10.1038/ncomms10205.
54. Vigano E and Mortellaro A. Caspase-11: The driving factor for noncanonical inflammasomes. *European Journal of Immunology* 2013; 43: 2240-2245. DOI: 10.1002/eji.201343800.
55. Lijavetzky D, Carbonero P and Vicente-Carbajosa J. Genome-wide comparative phylogenetic analysis of the rice and Arabidopsis Dof gene families. *Bmc Evolutionary Biology* 2003; 3. DOI: 10.1186/1471-2148-3-17.
56. Gabaldon T and Koonin EV. Functional and evolutionary implications of gene orthology. *Nature Reviews Genetics* 2013; 14: 360-366. DOI: 10.1038/nrg3456.
57. Ganesan S, Rathinam VAK, Bossaller L, et al. Caspase-8 Modulates Dectin-1 and Complement Receptor 3-Driven IL-1 beta Production in Response to beta-Glucans and the Fungal Pathogen, *Candida albicans*. *Journal of Immunology* 2014; 193: 2519-2530. DOI: 10.4049/jimmunol.1400276.
58. Chen MK, Xing Y, Lu AL, et al. Internalized *Cryptococcus neoformans* Activates the Canonical Caspase-1 and the Noncanonical Caspase-8 Inflammasomes. *Journal of Immunology* 2015; 195: 4962-4972. DOI: 10.4049/jimmunol.1500865.
59. Le HT and Harton JA. Pyrin- and CARD-only proteins as regulators of NLR functions. *Frontiers in Immunology* 2013; 4. DOI: 10.3389/fimmu.2013.00275.
60. Razmara M, Srinivasula SM, Wang L, et al. CARD-8 protein, a new CARD family member that regulates caspase-1 activation and apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277: 13952-13958. DOI: 10.1074/jbc.M107811200.
61. Ito S, Hara Y and Kubota T. CARD8 is a negative regulator for NLRP3 inflammasome, but mutant NLRP3 in cryopyrin-associated periodic syndromes escapes the restriction. *Arthritis Research & Therapy* 2014; 16. DOI: 10.1186/ar4483.
62. Verma D, Sarndahl E, Andersson H, et al. The Q705K Polymorphism in NLRP3 Is a Gain-of-Function Alteration Leading to Excessive Interleukin-1 beta and IL-18 Production. *Plos One* 2012; 7. DOI: 10.1371/journal.pone.0034977.
63. Srinivasula SM, Poyet JL, Razmara M, et al. The PYRIN-CARD protein ASC is an activating adaptor for caspase-1. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277: 21119-21122. DOI: 10.1074/jbc.C200179200.
64. Man SM and Kanneganti T-D. Regulation of inflammasome activation. *Immunological Reviews* 2015; 265: 6-21. DOI: 10.1111/imr.12296.
65. Mantovani A, Allavena P, Sica A, et al. Cancer-related inflammation. *Nature* 2008; 454: 436-444. DOI: 10.1038/nature07205.
66. Candido J and Hagemann T. Cancer-Related Inflammation. *Journal of Clinical Immunology* 2013; 33: S79-S84. DOI: 10.1007/s10875-012-9847-0.

67. Raman D, Baugher PJ, Thu YM, et al. Role of chemokines in tumor growth. *Cancer Letters* 2007; 256: 137-165. DOI: 10.1016/j.canlet.2007.05.013.
68. Okamoto M, Liu W, Luo Y, et al. Constitutively active inflammasome in human melanoma cells mediating autoinflammation via caspase-1 processing and secretion of interleukin-1beta. *J Biol Chem* 2010; 285: 6477-6488. DOI: 10.1074/jbc.M109.064907.
69. Hu B, Elinav E and Flavell RA. Inflammasome-mediated suppression of inflammation-induced colorectal cancer progression is mediated by direct regulation of epithelial cell proliferation. *Cell Cycle* 2011; 10: 1936-1939. DOI: 10.4161/cc.10.12.16008.
70. Normand S, Delanoye-Crespin A, Bressenot A, et al. Nod-like receptor pyrin domain-containing protein 6 (NLRP6) controls epithelial self-renewal and colorectal carcinogenesis upon injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011; 108: 9601-9606. DOI: 10.1073/pnas.1100981108.
71. Chen GY, Shaw MH, Redondo G, et al. The Innate Immune Receptor Nod1 Protects the Intestine from Inflammation-induced Tumorigenesis. *Cancer Research* 2008; 68: 10060-10067. DOI: 10.1158/0008-5472.can-08-2061.
72. Chen IF, Fu OY, Hung JY, et al. AIM2 suppresses human breast cancer cell proliferation in vitro and mammary tumor growth in a mouse model. *Molecular Cancer Therapeutics* 2006; 5: 1-7. DOI: 10.1158/1535-7163.mct-05-0310.
73. McConnell BB and Vertino PM. TMS1/ASC: The cancer connection. *Apoptosis* 2004; 9: 5-18. DOI: 10.1023/B:APPT.0000012117.32430.0c.
74. van Deventer HW, Burgents JE, Wu QP, et al. The Inflammasome Component Nlrp3 Impairs Antitumor Vaccine by Enhancing the Accumulation of Tumor-Associated Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Research* 2010; 70: 10161-10169. DOI: 10.1158/0008-5472.can-10-1921.
75. Apte RN, Krelm Y, Song XP, et al. Effects of micro-environment- and malignant cell-derived interleukin-1 in carcinogenesis, tumour invasiveness and tumour-host interactions. *European Journal of Cancer* 2006; 42: 751-759. DOI: 10.1016/j.ejca.2006.01.010.
76. Loffek S, Zigrino P, Angel P, et al. High invasive melanoma cells induce matrix metalloproteinase-1 synthesis in fibroblasts by interleukin-1 alpha and basic fibroblast growth factor-mediated mechanisms. *Journal of Investigative Dermatology* 2005; 124: 638-643. DOI: 10.1111/j.0022-202X.2005.23629.x.
77. Keller M, Rueegg A, Werner S, et al. Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell* 2008; 132: 818-831. DOI: 10.1016/j.cell.2007.12.040.
78. Vidal-Vanaclocha F, Fantuzzi G, Mendoza L, et al. IL-18 regulates IL-1 beta-dependent hepatic melanoma metastasis via vascular cell adhesion molecule-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000; 97: 734-739. DOI: 10.1073/pnas.97.2.734.
79. Ghiringhelli F, Apetoh L, Tesniere A, et al. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1 beta-dependent adaptive immunity against tumors. *Nature Medicine* 2009; 15: 1170-U1199. DOI: 10.1038/nm.2028.
80. Zaki MH, Boyd KL, Vogel P, et al. The NLRP3 Inflammasome Protects against Loss of Epithelial Integrity and Mortality during Experimental Colitis. *Immunity* 2010; 32: 379-391. DOI: 10.1016/j.immuni.2010.03.003.

81. Zitvogel L, Kepp O, Galluzzi L, et al. Inflammasomes in carcinogenesis and anticancer immune responses. *Nature Immunology* 2012; 13: 343-351. DOI: 10.1038/ni.2224.
82. Feldmeyer L, Keller M, Niklaus G, et al. The inflammasome mediates UVB-Induced activation and secretion of interleukin-1 beta by keratinocytes. *Current Biology* 2007; 17: 1140-1145. DOI: 10.1016/j.cub.2007.05.074.
83. Howell WM, Turner SJ, Theaker JM, et al. Cytokine gene single nucleotide polymorphisms and susceptibility to and prognosis in cutaneous malignant melanoma. *European Journal of Immunogenetics* 2003; 30: 409-414. DOI: 10.1111/j.1365-2370.2003.00425.x.
84. Pontillo A, Laurentino W, Crovella S, et al. NLRP1 haplotypes associated with leprosy in Brazilian patients. *Infection Genetics and Evolution* 2013; 19: 274-279. DOI: 10.1016/j.meegid.2013.06.006.
85. Pontillo A, Girardelli M, Kamada AJ, et al. Polimorphisms in Inflammasome Genes Are Involved in the Predisposition to Systemic Lupus Erythematosus. *Autoimmunity* 2012; 45: 271-278. DOI: 10.3109/08916934.2011.637532.
86. Pontillo A, Oshiro TM, Girardelli M, et al. Polymorphisms in Inflammasome' Genes and Susceptibility to HIV-1 Infection. *J AIDS-Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 2012; 59: 121-125. DOI: 10.1097/QAI.0b013e3182392ebe.
87. Jin Y, Mailloux CM, Gowan K, et al. NALP1 in vitiligo-associated multiple autoimmune disease. *New England Journal of Medicine* 2007; 356: 1216-1225. DOI: 10.1056/NEJMoa061592.
88. Ungerback J, Belenki D, ul-Hassan AJ, et al. Genetic variation and alterations of genes involved in NF kappa B/TNFAIP3-and NLRP3-inflammasome signaling affect susceptibility and outcome of colorectal cancer. *Carcinogenesis* 2012; 33: 2126-2134. DOI: 10.1093/carcin/bgs256.
89. Gonzalez JR, Armengol L, Sole X, et al. SNPAssoc: an R package to perform whole genome association studies. *Bioinformatics* 2007; 23: 644-645. DOI: 10.1093/bioinformatics/btm025.
90. Barrett JC, Fry B, Maller J, et al. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 2005; 21: 263-265. DOI: 10.1093/bioinformatics/bth457.
91. Schmittgen TD and Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C-T method. *Nature Protocols* 2008; 3: 1101-1108. DOI: 10.1038/nprot.2008.73.
92. Fitzpatrick TB. THE VALIDITY AND PRACTICALITY OF SUN-REACTIVE SKIN TYPE-I THROUGH TYPE-VI. *Archives of Dermatology* 1988; 124: 869-871. DOI: 10.1001/archderm.124.6.869.
93. Ko DC, Shukla KP, Fong C, et al. A Genome-wide In Vitro Bacterial-Infection Screen Reveals Human Variation in the Host Response Associated with Inflammatory Disease. *American Journal of Human Genetics* 2009; 85: 214-227. DOI: 10.1016/j.ajhg.2009.07.012.
94. Paramel GV, Folkersen L, Strawbridge RJ, et al. CARD8 gene encoding a protein of innate immunity is expressed in human atherosclerosis and associated with markers of inflammation. *Clinical Science* 2013; 125: 401-407. DOI: 10.1042/cs20120572.
95. Pathan N, Marusawa H, Krajewska M, et al. TUCAN, an antiapoptotic caspase-associated recruitment domain family protein overexpressed in cancer. *Journal of Biological Chemistry* 2001; 276: 32220-32229. DOI: 10.1074/jbc.M100433200.
96. Swetter SM, Geller AC and Kirkwood JM. Melanoma in the older person. *Oncology-New York* 2004; 18: 1187-1196.

97. Levandowski CB, Mailloux CM, Ferrara TM, et al. NLRP1 haplotypes associated with vitiligo and autoimmunity increase interleukin-1 beta processing via the NLRP1 inflammasome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2013; 110: 2952-2956. DOI: 10.1073/pnas.1222808110.
98. Frayling TM, Rafiq S, Murray A, et al. An interleukin-18 polymorphism is associated with reduced serum concentrations and better physical functioning in older people. *Journals of Gerontology Series a-Biological Sciences and Medical Sciences* 2007; 62: 73-78.
99. He M, Cornelis MC, Kraft P, et al. Genome-Wide Association Study Identifies Variants at the IL18-BCO2 Locus Associated With Interleukin-18 Levels. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2010; 30: 885-U640. DOI: 10.1161/atvbaha.109.199422.
100. Tas F, Yasasever CT, Karabulut S, et al. Clinical significance of serum interleukin-18 (IL-18) levels in patients with gastric cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2015; 70: 19-23. DOI: 10.1016/j.biopha.2014.12.040.
101. Jung MK, Song HK, Kim K-E, et al. IL-18 enhances the migration ability of murine melanoma cells through the generation of ROI and the MAPK pathway. *Immunology Letters* 2006; 107: 125-130. DOI: 10.1016/j.imlet.2006.08.004.
102. Yang Y, Cheon S, Jung MK, et al. Interleukin-18 enhances breast cancer cell migration via down-regulation of claudin-12 and induction of the p38 MAPK pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2015; 459: 379-386. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.02.108.
103. Valcarcell M, Carrascal T, Crende O, et al. IL-18 Regulates Melanoma VLA-4 Integrin Activation through a Hierarchized Sequence of Inflammatory Factors. *Journal of Investigative Dermatology* 2014; 134: 470-480. DOI: 10.1038/jid.2013.342.
104. Puren AJ, Fantuzzi G and Dinarello CA. Gene expression, synthesis, and secretion of interleukin 18 and interleukin 1 beta are differentially regulated in human blood mononuclear cells and mouse spleen cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999; 96: 2256-2261. DOI: 10.1073/pnas.96.5.2256.

APÊNDICES

Apêndice A. Lista completa dos resultados individuais de genotipagem dos pacientes.

Espaços em branco: ou não tinha amostra ou acabou a sonda

ID	rs12150220	rs2670660	rs11651270	rs35829419	rs10754558	rs2043211	rs6509365	rs1143643	rs5744256	rs183448
M1	AT	AG	CT	CC	CG	AT	AA	CT	AA	CC
M2	AT	AG	TT	CC	CG	AT	AG	CT	AA	CC
M3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M4	AT	AG	CT	CC	CC	AT	AA	CT	AA	CC
M5	AT	AG	CT	CC	CC	TT	GG	CC	AA	CC
M6	TT	GG	CT	CC	CC	AT	AG	CT	AG	CG
M7	AT	AG	CC	CC	CC	AA	AA	CC	AA	CC
M8	AT	GG	CC	CC	CG	AA	GG	CC	-	CC
M9	AT	AG	CC	CC	GG	AT	AA	CT	AA	CC
M10	AA	AG	TT	CC	CC	AT	AG	CC	AA	CC
M11	AT	AG	CT	CC	CG	AA	AA	CT	AA	CC
M12	AT	AG	CT	CC	GG	AT	AA	CC	AG	CG
M13	AT	AG	CT	CC	CG	TT	GG	CT	AG	CG
M14	AA	AG	CT	CC	CG	AA	AA	CT	AA	CC
M15	TT	GG	CC	CC	CG	AA	AG	CT	GG	GG
M16	TT	GG	CC	CC	CC	AT	AA	CC	AA	CC
M17	TT	GG	CC	CC	CG	TT	AA	TT	AA	CC
M18	AT	GG	CC	CC	CG	AT	AA	CT	AA	CC
M19	AT	AG	CT	CC	CG	AT	AG	CT	AA	CC
M20	AT	AG	TT	CC	CG	AA	AA	TT	AG	CG
M21	AT	AG	CT	CC	CC	AA	AA	CT	AA	CC
M22	TT	GG	CC	CC	CC	AT	AG	CT	AG	GG
M23	AT	AG	CT	CC	CG	AT	AG	CC	AA	CC

M24	TT	AG	CC	CC	CG	AT	AA	CT	-	CC
M25	AA	AA	TT	CC	CC	AA	AA	CT	AA	CC
M26	AA	GG	CC	CC	GG	TT	GG	CC	AA	CG
M27	TT	GG	CC	CC	CC	AA	AA	CT	AA	CC
M28	AT	AA	TT	CC	CC	AA	AG	CT	AA	CC
M29	AA	GG	CC	CC	CG	AA	AA	TT	AA	-
M30	TT	GG	CC	CC	CG	TT	GG	CT	AG	CG
M31	TT	GG	-	CC	CG	AT	AG	CT	-	-
M32	AT	AG	CC	AC	CC	AT	AA	CC	AA	CC
M33	AT	AA	TT	CC	GG	AT	GG	CC	AA	CC
M34	TT	GG	CC	CC	CC	AA	AA	TT	AG	CC
M35	AT	AG	CT	CC	GG	AT	AA	CC	AG	CC
M36	TT	AG	TT	CC	CG	AT	AA	CT	-	-
M37	AA	AA	CT	CC	CG	AA	AA	TT	AA	CC
M38	AA	AG	TT	CC	CG	AT	AA	CC	AA	CC
M39	TT	GG	CT	CC	GG	AA	AA	CC	AA	-
M40	AA	AA	CC	CC	CG	AA	AA	CT	AA	CC
M41	TT	AG	CT	CC	CC	TT	GG	CT	AA	CC
M42	AA	AG	-	CC	CC	AA	AA	CC	AA	CC
M43	AT	GG	CC	CC	CC	AT	AG	CC	AA	CC
M44	AA	AA	TT	CC	CC	AT	AG	TT	AA	CC
M45	AT	AG	CT	CC	CG	AT	AA	CC	AA	CC
M46	AT	AG	CC	CC	CG	AA	AA	CT	AA	-
M47	AT	AG	TT	CC	CG	AA	AA	CT	AA	CC
M48	AT	GG	CT	CC	CG	AA	AA	-	AA	CC
M49	TT	AG	CT	CC	CG	AA	AA	CC	AA	CC
M50	AT	AG	CC	CC	CG	AA	AG	CC	AA	CC
M51	AA	AG	TT	CC	CC	AT	GG	TT	-	CG

M52	TT	GG	CC	CC	GG	AT	AA	CT	AA	CC
M53	AA	AA	TT	CC	GG	AA	AG	CT	AA	CC
M54	AA	AA	-	CC	CC	AA	-	TT	-	-
M55	AA	AA	TT	CC	GG	TT	AA	CC	AA	GG
M56	TT	GG	CC	CC	GG	AA	AG	CT	AA	CC
M57	TT	AG	CT	AC	CC	AA	AA	CT	AA	CC
M58	AT	GG	CT	CC	CC	AT	AA	CT	AA	CC
M59	TT	GG	CC	CC	CC	AT	AG	CT	AA	CC
M60	AA	AG	CT	CC	CG	AA	AA	CT	AA	CC
M61	AT	AG	CT	CC	CG	AA	AA	CT	AA	CC
M62	TT	GG	TT	CC	CG	AA	AA	CT	AA	CC
M63	AA	AA	TT	CC	CG	AT	AA	CC	AG	CG
M64	AA	AA	TT	CC	CC	AT	AG	CT	AG	CG
M65	TT	GG	CC	CC	CG	AA	AA	CT	AA	CC
M66	AT	AG	CT	AC	CG	AT	AG	TT	AG	CG
M67	TT	GG	CC	AC	GG	AT	AG	CT	AA	CC
M68	AA	AA	CT	CC	CG	AA	AA	CC	AA	CC
M69	AT	AG	CT	CC	GG	AT	AG	CC	AA	CC
M70	TT	GG	CC	CC	CG	AT	GG	CC	AG	CG
M71	AA	AA	CT	CC	CG	AT	AG	CT	AA	CC
M72	AA	AA	TT	CC	CG	AA	AA	CC	AG	CG
M73	AA	AA	TT	CC	CG	AA	AA	TT	AA	CG
M74	AA	AA	TT	CC	CC	AA	AA	CC	AA	CC
M75	TT	GG	CT	CC	GG	AT	AG	CC	AG	CG
M76	AT	AG	CT	CC	CG	AT	AG	CT	AA	CC
M77	AA	AG	TT	CC	CC	AT	AG	TT	AG	CG
M78	AT	AG	CT	CC	CC	AT	AG	CC	AA	CC
M79	AT	AG	CC	AC	CG	AA	AA	CC	AG	CG

M80	AA	AA	TT	CC	GG	AT	AG	CT	AA	CC
M81	TT	AA	CT	CC	CG	AA	AA	CT	AA	CC
M82	TT	GG	CC	CC	CC	AA	AA	CT	AA	CC
M83	TT	GG	CT	CC	CG	AA	AA	TT	GG	GG
M84	AT	GG	CT	AC	GG	AA	AA	CC	AG	CG
M85	AT	AG	CT	CC	CC	AA	AA	CT	AA	CC
M86	AT	AA	CT	CC	CG	AT	AG	TT	AA	CC
M87	TT	AG	CT	CC	CG	AA	AA	TT	AA	CC
M88	AT	AG	CT	CC	GG	AT	AG	CC	AA	CC
M89	TT	GG	CC	CC	GG	AT	AG	CC	AA	CC
M90	AT	AG	CT	CC	CG	AT	AG	CC	AG	CG
M91	AT	GG	CC	CC	CC	AA	AA	CC	AA	CC
M92	AT	AG	TT	CC	CG	AA	AA	TT	AA	CC
M93	AT	AG	CT	CC	GG	AT	AG	CC	AA	CC
M94	TT	GG	TT	CC	GG	AT	AG	CC	AG	CG
M95	AA	AA	TT	CC	CC	AA	AA	CT	AA	CC
M96	TT	GG	CC	CC	CG	AT	AA	CC	AA	CG
M97	AT	AG	TT	CC	CC	AT	AA	CC	AA	CC
M98	AA	AA	TT	CC	CC	AA	AA	CC	AA	CC
M99	AA	AA	TT	CC	CC	AT	AG	CT	AG	CG
M100	AA	AG	CC	CC	CG	AT	AA	-	AA	-
M101	AT	AG	CC	CC	CG	AA	AA	CT	-	CG
M102	AA	AA	CC	CC	CG	AA	AA	CC	AA	CC
M103	AT	AG	TT	CC	CG	AT	AG	TT	AA	CC
M104	AT	AG	CC	CC	GG	AT	AG	CT	AA	-
M105	AT	AG	CT	CC	CC	TT	GG	CT	AA	CG
M106	TT	AG	CC	CC	CG	AT	AG	CC	AA	CG
M107	AT	AG	-	AC	CG	AT	AG	-	-	-

M108	AA	AG	TT	CC	GG	AT	AA	TT	AG	CG
M109	TT	GG	-	CC	CC	AA	AG	-	-	-
M110	AT	AG	TT	CC	CC	AT	AA	CT	AA	CC
M111	AA	GG	-	CC	CG	AA	AA	-	GG	-
M112	AA	AA	-	CC	-	-	-	-	AA	-
M113	AA	AA	-	CC	-	AT	-	CT	AA	CC
M114	AT	GG	CC	CC	-		AA	-	AA	-
M115	TT	GG	CT	AC	CG	AT	AG	TT	AG	CG
M116	-	-	-	-	CG	-	AG	-	AA	CC
M117	AT	AG	-	CC	CG	AT	AA	TT	AA	CC
M118	AA	AA	-	CC	GG	AA	AA	-	-	-
M119	AA	AA	-	CC	CC	AA	AA	CC	AG	CG
M120	AT	AG	-	CC	CC	AA	AA	CT	AG	CG
M121	AA	AA	TT	CC	CC	AT	AA	CC	AG	CG
M122	AT	AG		AC	CG	AT	AA	CT	AA	CC
M123	AA	AA	TT	CC	GG	AA	AA	CT	AA	CC
M124	AA	-	TT	CC	CC	-	GG	TT	AA	CC
M125	AT	AA	-	CC	-	-	-	-	AA	CC
M126	TT	GG	CT	CC	CG	AT	AG	CT	AA	CC
M127	AT	AG	CT	CC	GG	TT	GG	CT	AG	CG
M128	AT	AG	CT	CC	CG	AA	AA	CC	AG	CG
M129	TT	GG	CC	CC	GG	AA	AA	TT	AA	CC
M130	AA	AA	TT	CC	CC	AA	AA	CC	AA	CC
M131	AA	AA	TT	AC	CC	AA	AA	CT	GG	GG
M132	AA	AA	TT	CC	CG	AT	AG	CC	AG	CG
M133	AA	AG	CC	CC	CG	AA	AA	CC	AA	CC
M134	AA	AA	-	CC	GG	TT	GG	CT	AA	-
M135	TT	AG	CC	CC	CG	AA	AA	CT	AG	CG

M136	-	-	-	CC	CG	AT	AA	-	AG	CG
M137	TT	GG	-	CC	CG	AA	AG	-	AA	CC
M138	AT	GG	-	-	CG	AT	-	-	AG	GG
M139	AA	AA	-	CC	GG	AA	-	-	AA	CC
M140	AT	GG	TT	CC	CG	AA	AA	CT	AG	CG
M141	AT	AG	CT	CC	CG	AT	AG	CT	AG	CG
M142	AA	AG	-	CC	CC	AA	-	-	AA	CC
M143	AT	AG	CT	AC	CG	AA	AA	CT	AG	CG
M144	AA	AA	-	CC	-	AT	-	-	AA	CC
M145	AA	AG	CT	CC	CG	AA	-	CC	AA	CC
M146	AT	AG	TT	CC	CG	AA	AA	CT	GG	GG
M147	-	AA	-	CC	CG	AA	AA	CT	AG	CG
M148	TT	GG	CC	CC	CC	AT	AG	-	AA	CC
M149	AA	AA	-	CC	CG	AA	AA	CT	AG	-
M150	AA	AA	CC	CC	CC	AT	AG	TT	AG	CG
M151	AA	AA	TT	CC	CC	AT	AG	-	AA	CC
M152	TT	GG	CT	CC	CG	AT	AG	CT	-	-
M153	AT	AG	CC	CC	CG	AA	AA	CT	AA	CC
M154	AT	AG	CT	CC	CG	AA	AA	CT	AA	CC
M155	AT	AG	TT	CC	GG	AA	AA	CC	AG	CG
M156	AA	AA	CT	CC	CC	AA	AA	CC	GG	GG
M157	AA	AA	CT	CC	CC	AA	AA	CC	AG	CG
M158	AT	GG	CT	CC	CG	AT	AG	CT	AG	CG
M159	AA	AA	CT	CC	CG	AT	AG	TT	AA	CC
M160	AT	AG	TT	CC	CC	AT	AA	CC	AA	CC
M161	AT	GG	CT	CC	CC	AT	AG	-	AA	CC
M162	AT	AG	CC	AC	GG	AA	AA	-	AG	-
M163	AA	AA	TT	CC	CG	AT	AG	-	AA	CC

M164	AT	AG	CT	CC	CG	AT	AG	-	AG	CG
M165	AA	AA	CT	CC	CC	AT	AG	-	AA	CC
M166	AT	AG	TT	CC	CG	AA	AA	-	AA	CC
M167	AA	AG	CT	CC	CC	AT	AG	-	AG	CG
M168	AT	AG	CT	CC	CC	AA	AA	-	AA	CC
M169	AT	AG	CT	AC	GG	AA	AA	-	AA	CC
M170	AT	AG	TT	CC	CG	AA	AA	-	AA	CC
M171	AA	AA	TT	CC	CC	AA	AA	-	AA	CC
M172	AT	AG	CT	CC	CG	AA	AA	-	AA	CC
M173	AT	AG	CT	CC	CG	AA	AA	-	AA	CC
M174	AT	AG	CT	CC	GG	AA	AA	-	AG	CG
M175	AA	AA	TT	CC	CC	AT	AG	-	AA	CC
M176	TT	GG	TT	CC	CC	AA	AA	-	AA	CC
M177	AA	AA	CT	CC	CC	TT	GG	-	AG	CG
M178	AA	AG	CT	CC	CC	AA	AA	-	AG	CG
M179	AA	AG	CT	CC	CC	AT	AG	-	AA	CC
M180	AT	GG	CT	CC	CC	AA	AA	-	AG	CG
M181	AA	AA	CT	CC	CG	AT	AG	-	AA	CC
M182	AT	GG	CT	CC	CG	AT	AG	-	AG	CG
M183	TT	GG	CC	CC	CG	AA	AA	-	AG	CC
M184	AA	GG	CT	CC	CC	AA	AA	-	AG	CG
M185	AT	GG	CC	CC	CC	AA	AA	-	AG	CG

Apêndice B. Lista completa dos resultados individuais de genotipagem dos controles.

Espaços em branco: ou não tinha amostra ou acabou a sonda

ID	rs12150220	rs2670660	rs11651270	rs35829419	rs10754558	rs2043211	rs6509365	rs1143643	rs5744256	rs1834481
MC1	AA	AA	-	CC	CG	AT	AG	CC	AA	-
MC2	AA	AA	CT	CC	CG	TT	AG	CT	AG	CG
MC3	TT	GG	-	CC	CG	AT	GG	CT	AA	CC
MC4	AT	AA	CC	CC	CG	AT	AG	CC	AA	CC
MC5	AT	AG	TT	CC	CG	AA	AG	CC	AA	CC
MC6	AT	AG	TT	CC	GG	AT	AA	CT	AA	CC
MC7	AA	AG	CC	CC	CC	TT	AG	CT	AA	CC
MC8	TT	GG	CT	CC	CG	AT	GG	CT	AA	CC
MC9	AT	AG	CC	CC	CC	TT	AA	TT	AA	CC
MC10	AT	AG	TT	CC	GG	TT	GG	CT	AA	CC
MC11	AT	AA	TT	AC	GG	AT	GG	TT	AA	CC
MC12	AA	AG	TT	CC	CC	AA	AG	CT	AA	CC
MC13	AT	AA	CT	CC	CC	TT	AA	-	AA	CC
MC14	AT	AG	CC	CC	CG	AA	GG	CT	AA	CC
MC15	AT	AG	CC	CC	CG	AA	AG	TT	AA	CC
MC16	AT	AG	CC	CC	CC	AT	AA	CT	AA	CC
MC17	AA	AG	CT	CC	CG	AA	AG	TT	AG	CG
MC18	AT	AG	TT	CC	CG	TT	AA	CT	AA	CC
MC19	AA	AG	TT	CC	CC	AA	GG	CC	GG	GG
MC20	AA	AA	TT	CC	CG	AA	AA	CT	AA	CC
MC21	AT	AG	TT	CC	CG	AT	AA	CT	AA	CC
MC22	TT	GG	CT	CC	CC	AT	AG	CT	AA	CC
MC23	AT	AA	CC	CC	CC	TT	AG	CC	AA	CC

MC24	AT	AG	TT	CC	CG	AT	GG	CC	AA	CC
MC25	AT	AA	TT	CC	CC	AT	AG	CT	AG	CG
MC26	TT	GG	TT	CC	CC	AT	AG	CT	AA	CC
MC27	AA	AA	CC	CC	CG	AT	AG	CT	AA	CC
MC28	AT	AG	TT	CC	CC	AT	AG	TT	AG	CG
MC29	TT	AG	CT	CC	GG	AA	AG	CT	AA	CC
MC30	TT	GG	CT	CC	CG	AA	AA	CT	AG	CG
MC31	AT	GG	CC	CC	CC	AT	AA	CT	AG	CG
MC32	AT	AG	TT	CC	CC	AT	GG	CC	AA	CC
MC33	AA	AA	TT	CC	GG	AT	AG	CT	AG	CG
MC34	AA	AG	TT	CC	CC	AT	AG	CT	GG	CG
MC35	TT	GG	CT	CC	CC	AT	AG	CT	AA	CC
MC36	AT	AG	CC	CC	CG	TT	AG	CC	GG	GG
MC37	AT	GG	TT	CC	GG	TT	GG	CC	AA	CC
MC38	AT	AG	TT	CC	CC	AT	GG	CC	AA	CC
MC39	AT	AG	CC	CC	CC	AT	AG	CC	AA	CC
MC40	AT	AG	CT	CC	CC	AT	AG	CC	AG	CG
MC41	AA	AA	TT	CC	CG	AT	AG	CC	AA	CC
MC42	AT	AG	CT	CC	CC	TT	AG	CT	GG	GG
MC43	AA	AA	CT	CC	CG	TT	GG	CC	AA	CC
MC44	AA	AG	CC	CC	CC	AT	AG	CC	AG	CG
MC45	AT	GG	CT	CC	CG	AA	AG	CT	AA	CC
MC46	TT	AG	TT	CC	CG	AT	AA	CC	AG	-
MC47	AT	AG	CC	CC	GG	AT	AG	CT	AG	CG
MC48	TT	AG	CC	CC	CC	AA	AG	CC	AA	CC
MC49	TT	AG	CT	CC	CC	AT	AA	TT	AA	CC
MC50	AA	AA	CT	CC	CC	AA	AG	CC	AA	CC
MC51	TT	GG	TT	AC	CG	AA	AA	CC	AG	CG

MC52	TT	GG	CC	CC	GG	AA	GG	CT	AG	CG
MC53	AT	AA	CT	AC	GG	AT	AA	CT	AA	CC
MC54	AA	AA	CT	AC	GG	AT	AG	CC	AA	CC
MC55	AT	AG	TT	CC	GG	AA	AA	-	AG	CG
MC56	TT	GG	CT	CC	CC	AA	AA	TT	GG	GG
MC57	AA	AA	CT	CC	CG	AT	GG	CC	AA	CC
MC58	AT	AG	TT	CC	CC	AA	AA	CC	AA	CC
MC59	TT	GG	CT	CC	CC	AT	AA	TT	AA	CC
MC60	AA	AA	CC	CC	CC	AT	AG	CT	AG	CG
MC61	AT	AG	TT	CC	GG	AA	GG	CC	AG	-
MC62	AT	AG	CT	CC	CG	AA	AA	CC	-	CC
MC63	AA	AA	CT	CC	CG	AT	AA	CT	AG	CG
MC64	AA	AA	TT	CC	CC	AT	AG	CT	AG	CG
MC65	TT	AG	TT	CC	CG	AA	GG	CT	AA	CC
MC66	TT	AG	CC	CC	CG	AT	AA	CT	AA	CC
MC67	AA	AA	CT	CC	CC	AT	AG	CT	AA	CC
MC68	AA	AG	TT	CC	CC	AA	AG	TT	AA	-
MC69	AA	AA	CC	CC	CC	AA	AA	CC	AA	-
MC70	AT	AG	TT	CC	CG	AA	AA	CT	AA	CC
MC71	AT	AG	CT	AC	GG	AA	AA	CC	AG	CG
MC72	AA	AG	CT	CC	CG	AA	AA	CC	AA	CC
MC73	AT	AG	CT	CC	CG	TT	AA	CT	AA	CC
MC74	TT	GG	CT	CC	GG	AA	GG	CC	AA	CC
MC75	TT	AG	CC	CC	CG	AT	AA	CT	AG	-
MC76	TT	GG	CT	CC	CC	AT	AG	-	AA	CC
MC77	AA	AA	CT	CC	GG	AA	AG	-	GG	GG
MC78	TT	AA	TT	CC	GG	AA	AA	-	AA	CC
MC79	TT	AG	CC	CC	CG	AA	AG	-	AA	CC

MC108	AA	AA	CT	AC	CG	AA	AA	-	AG	CG
MC109	AA	AG	CT	CC	CG	AT	AG	-	AG	CG
MC110	AA	AA	TT	CC	CC	AT	AG	-	AG	CG
MC111	AT	GG	CT	CC	GG	AA	AA	-	AA	CC
MC112	AT	AG	CT	CC	GG	AT	GG	-	AA	CC
MC113	AA	AA	TT	CC	GG	AT	AG	-	AG	CG
MC114	AT	AG	TT	CC	CC	AT	AG	-	AA	CC
MC115	AT	GG	CT	CC	CG	AT	GG	-	AG	CG
MC116	AA	AG	CT	CC	CC	AT	AG	-	AG	CG
MC117	AA	AG	TT	CC	CC	AA	AA	-	AG	CG
MC118	AT	GG	CT	CC	CC	TT	GG	-	AA	CC
MC119	TT	GG	CC	CC	CC	AA	AG	-	AA	CC
MC120	AT	AG	CT	CC	CC	AT	AG	-	AA	CC
MC121	AT	AG	CT	CC	CG	AT	AG	-	AA	CC
MC122	AT	AG	CT	CC	CG	AA	AA	-	AA	CC
MC123	AT	AG	TT	CC	CG	TT	GG	-	AG	CG
MC124	AA	AG	TT	CC	CC	AT	AA	-	AA	CC
MC125	AT	AG	CT	CC	GG	AA	AA	-	AA	CC
MC126	AA	AG	CT	CC	GG	AA	AA	-	AG	CG
MC127	AA	AG	CC	CC	CG	AA	AA	-	AA	CC
MC128	AT	AG	CT	CC	CG	AT	AG	-	AA	CC
MC129	AA	AA	TT	CC	CC	AT	AG	-	AG	CG
MC130	TT	GG	TT	CC	CC	AT	AG	-	AG	GG
MC131	AT	GG	TT	CC	CC	TT	AG	-	AA	-
MC132	AT	AG	CT	CC	CG	TT	GG	-	AA	CC
MC133	AA	AA	TT	CC	GG	AT	AG	-	AG	CG
MC134	AA	AA	TT	CC	CC	AA	AA	-	AA	CC
MC135	AA	AG	CT	CC	CC	AA	AA	-	AA	CC

MC136	AT	AG	CT	CC	CC	AA	AA	-	AA	CC
MC137	AA	AA	TT	CC	GG	AA	AA	-	AA	CC

APÊNDICE C. PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSOS.

- Pôster apresentado no *XXXIX Congress of Brazilian Society of Immunology* - outubro 2014 – Intitulado: *Immunophenotypic and functional characterization of INF-DC derived from HIV-infected subject.*
- Participação e apresentação de pôster no *61º Congresso Brasileiro de Genética* – setembro 2015 – Intitulado: *CARD8 and IL18 genes are associated to sporadic melanoma development in brazilian cohort.*
- Participação e apresentação de pôster *XL Congress of the Brazilian Society of Immunology* - outubro 2015 – Intitulado: *CARD8 and IL-18 are associated to sporadic malignant melanoma susceptibility.*
- Participação e apresentação de pôster *XLI Congress of the Brazilian Society of Immunology* - novembro 2016 – Intitulado: *Genotyping and differential expression analysis of inflammasome genes in sporadic malignant melanoma reveal novel contribution of CARD8, IL1B and IL18 in melanoma susceptibility and progression.*

ANEXO A. Produções Literárias.

[Purchase](#)

[Export](#)

[Advanced search](#)

Cancer Genetics

Volume 209, Issue 10, October 2016, Pages 474–480

Original Article

Genotyping and differential expression analysis of inflammasome genes in sporadic malignant melanoma reveal novel contribution of *CARD8*, *IL1B* and *IL18* in melanoma susceptibility and progression

Wanessa Cardoso da Silva^a, , Telma Miyuki Oshiro^a, Daniel Coelho de Sá^b, Dilcilea D.G.S. Franco^b,
Cyro Festa Neto^b, Alessandra Pontillo^c

[Show more](#)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cancergen.2016.09.004> [Get rights and content](#)

Referred to by Wanessa Cardoso da Silva, Telma M. Oshiro, Daniel Coelho de Sá, Dilcilea D.G.S. Franco, Cyro Festa Neto, Alessandra Pontillo
Data on inflammasome gene polymorphisms of patients with sporadic malignant melanoma in a Brazilian cohort
Data in Brief, Volume 10, February 2017, Pages 33–37
PDF (267 K) | [Supplementary content](#)

[Download PDF](#)

[Export](#)

[Advanced search](#)

Data in Brief

Volume 10, February 2017, Pages 33–37

[Open Access](#)

Data Article

Data on inflammasome gene polymorphisms of patients with sporadic malignant melanoma in a Brazilian cohort

Wanessa Cardoso da Silva^a, , Telma M. Oshiro^a, Daniel Coelho de Sá^b, Dilcilea D.G.S. Franco^b,
Cyro Festa Neto^b, Alessandra Pontillo^c

[Show more](#)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.dib.2016.11.053> [Get rights and content](#)

Under a Creative Commons license

Refers To Wanessa Cardoso da Silva, Telma Miyuki Oshiro, Daniel Coelho de Sá, Dilcilea D.G.S. Franco, Cyro Festa Neto, Alessandra Pontillo
Genotyping and differential expression analysis of inflammasome genes in sporadic malignant melanoma reveal novel contribution of *CARD8*, *IL1B* and *IL18* in melanoma susceptibility and progression
Cancer Genetics, Volume 209, Issue 10, October 2016, Pages 474–480

ANEXO B. Aceite do Comitê de Ética.

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

PROJETO DE PESQUISA

Título: ANALISE DO INFLAMASSOMA EM MELANOMA: CORRELAÇÃO ENTRE CÉLULAS TUMORAIS E RESPOSTA IMUNE MEDIADA POR CÉLULAS DENDRÍTICAS

Pesquisador Responsável: Telma Miyuki Oshiro Sumida **Versão:** 2

Pesquisador Executante: Wanessa Cardoso da Silva **CAAE:** 02515612.9.0000.0068

Co-autores: Wanessa Cardoso da Silva, Cyro Festa Neto, Alessandra Pontillo

Finalidade Acadêmica: Doutorado

Instituição: HCFMUSP

Departamento: DERMATOLOGIA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número On Line-CAPPesq: 9308

Número do Parecer: 66690

Data da Relatoria: 08/08/2012

Apresentação do Projeto: O projeto apresentado é de relevância clínica e está fundamentado em dados científicos já publicados. O estudo constará da análise de material de biópsia e sangue periférico de pacientes com melanoma provenientes do Ambulatório de Oncologia Cutânea do Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP).

Objetivo da Pesquisa: O projeto tem como objetivo investigar se há correlação entre os níveis de expressão do inflamassoma e a sua ativação (em termos de secreção de IL-1 β) em células tumorais (biópsias) e em células dendríticas derivadas de monócitos (sangue periférico) de pacientes com melanoma. Para isso, serão estudados a expressão dos genes, a ativação do inflamassoma e a secreção de IL-1 β por células dendríticas derivadas de monócitos (MoDCs) de pacientes com melanoma; o perfil de citocinas produzidos por linfócitos T CD4+ e CD8+ estimulados por MoDCs de pacientes de melanoma e a expressão dos genes e a ativação das proteínas NLRs e do inflamassoma em biópsias de pacientes de melanoma. Para avaliar a contribuição do inflamassoma na susceptibilidade individual a desenvolver o melanoma e na progressão da doença pretende-se investigar também a existência da associação entre polimorfismos nos genes do inflamassoma e melanoma, através da genotipagem de pacientes em diferentes graus de estadiamento.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Não há benefício direto aos pacientes participantes, mas o resultado poderá auxiliar na melhor compreensão dos mecanismos de evolução do melanoma. O projeto apresenta riscos apenas inerentes à coleta de sangue periférico.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: O projeto está apresentado de maneira clara e os objetivos são justificáveis para melhor entendimento da etiologia da doença. Os dados clínicos serão retirados dos prontuários dos pacientes.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: A pesquisadora respondeu à todas as questões formuladas anteriormente, realizando as modificações sugeridas.

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Encaminhou nova versão do projeto, assim como novas versões de TCLE corrigidas e TCLE para o grupo de indivíduos controle.

Recomendações: Não há mais nenhuma pendência.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: A pesquisadora respondeu à todos os questionamentos anteriores e realizou as modificações solicitadas

Situação do Parecer: APROVADO

São Paulo, 08 de Agosto de 2012

Prof. Dr. Luiz Eugênio Garcez Leme
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa-CAPPesq

ANEXO C. Termos de Consentimento.

1. Termo de consentimento para coleta de sangue periférico para pacientes.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: *ANÁLISE DO INFLAMASSOMA EM MELANOMA: CORRELAÇÃO ENTRE CÉLULAS TUMORAIS E RESPOSTA IMUNE MEDIADA POR CÉLULAS DENDRÍTICAS*

PESQUISADOR : Telma Miyuki Oshiro Sumida

CARGO/FUNÇÃO:. Pesquisadora Científica .
CONSELHO REGIONAL Nº 39439

INSCRIÇÃO

UNIDADE DO HCFMUSP: LIM 56 Departamento de Dermatologia.

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	x	RISCO MÉDIO	☐
RISCO BAIXO	☐	RISCO MAIOR	☐

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : 24 meses.....

O Sr(a). está convidado(a) para participar como voluntário desta pesquisa sobre “ANÁLISE DO INFLAMASSOMA EM MELANOMA: CORRELAÇÃO ENTRE CÉLULAS TUMORAIS E RESPOSTA IMUNE MEDIADA POR CÉLULAS DENDRÍTICAS”.

Se decidir participar, é importante que leia atentamente as informações contidas neste termo a fim de melhor compreender a sua participação na pesquisa.

1 – Desenho do estudo e objetivo(s): o(a) Sr(a) foi convidado(a) para participar desta pesquisa por ser portador de um câncer da pele chamado melanoma. Este tumor, embora não sendo o tipo de câncer da pele mais frequente, teve o seu aparecimento aumentado nos últimos anos. Alguns trabalhos estrangeiros estão sendo feitos na busca de compreender o que faz a inflamação no tumor, se é uma coisa boa ou não. Infelizmente, isso foi muito pouco estudado no nosso país. O Departamento/Divisão de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade São Paulo, juntamente com o Laboratório de Investigação Médica (LIM-56), estão desenvolvendo uma pesquisa para tentar compreender melhor a influência da inflamação no comportamento da doença assim como se a genética da pessoa influencia nisso.

Os resultados obtidos deste estudo podem ajudar futuramente no tratamento deste tumor.

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados:

Caso concorde em participar desta pesquisa, o(a) Sr (a). será submetido(a) a uma coleta de 4 mL de sangue.

Caso haja a necessidade excepcional de uma nova coleta, ela será dentro das visitas de rotina. É importante salientar que a pesquisa não mudará em nada a forma de seu tratamento.

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados: coleta de sangue por punção periférica da veia do antebraço.

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3: O maior desconforto será no momento da coleta do sangue, porém este procedimento não trará nenhum risco à saúde do paciente. Todos os materiais utilizados serão descartáveis.

5 – Benefícios para o participante: O voluntário não terá nenhum benefício adicional por participar deste protocolo.

6 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar; Não haverá procedimentos alternativos

7 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra Telma Miyuki Oshiro Sumida que pode ser encontrada no endereço AvDrEneas de Carvalho Aguiar, 470 – prédio IMT-2 – 3º andar Telefone(s) 3061-7499. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20 – e-mail: cappesq@hcnet.usp.br

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

09 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;

10 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

11 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

12 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo ***ANÁLISE DO INFLAMASSOMA EM MELANOMA: CORRELAÇÃO ENTRE CÉLULAS TUMORAIS E RESPOSTA IMUNE MEDIADA POR CÉLULAS DENDRÍTICAS.***

Eu discuti com a Dra. ***Telma Miyuki Oshiro Sumida*** sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha Data ____ / ____ / ____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____/____/____

2. Termo de consentimento para coleta de sangue periférico para indivíduos saudáveis.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: *ANÁLISE DO INFLAMASSOMA EM MELANOMA: CORRELAÇÃO ENTRE CÉLULAS TUMORAIS E RESPOSTA IMUNE MEDIADA POR CÉLULAS DENDRÍTICAS*

PESQUISADOR : Telma Miyuki Oshiro Sumida

CARGO/FUNÇÃO: Pesquisadora Científica .
CONSELHO REGIONAL Nº 39439

INSCRIÇÃO

UNIDADE DO HCFMUSP: LIM 56 Departamento de Dermatologia.

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	☒	RISCO MÉDIO	☐
RISCO BAIXO	☐	RISCO MAIOR	☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 24 meses.....

O Sr(a). está convidado(a) para participar como voluntário desta pesquisa sobre “ANÁLISE DO INFLAMASSOMA EM MELANOMA: CORRELAÇÃO ENTRE CÉLULAS TUMORAIS E RESPOSTA IMUNE MEDIADA POR CÉLULAS DENDRÍTICAS”.

Se decidir participar, é importante que leia atentamente as informações contidas neste termo a fim de melhor compreender a sua participação na pesquisa.

1 – Desenho do estudo e objetivo(s): devido à necessidade de comparação de amostras dos pacientes afetados pelo melanoma com amostras de indivíduos sadios o(a) Sr(a) foi convidado(a) para participar desta pesquisa para compor o grupo de indivíduos não afetados pela doença, que chamamos de grupo controle.

O melanoma, embora não sendo o tipo de câncer da pele mais frequente, teve o seu aparecimento aumentado nos últimos anos. Alguns trabalhos estrangeiros estão sendo feitos na busca de compreender o que faz a inflamação no tumor, se é uma coisa boa ou não. Infelizmente, isso foi muito pouco estudado no nosso país. O Departamento/Divisão de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade São Paulo, juntamente com o Laboratório de Investigação Médica (LIM-56), estão desenvolvendo uma pesquisa para tentar compreender melhor a influência da inflamação no comportamento da doença assim como se a genética da pessoa influencia nisso.

Os resultados obtidos deste estudo podem ajudar futuramente no tratamento deste tumor.

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados:

Caso concorde em participar desta pesquisa, o(a) Sr (a). será submetido(a) a um procedimento médico que será explicado agora. Para o estudo dos fatores genéticos serão coletados de 4 mL de sangue.

Para alguns indivíduos, será feita também uma coleta de 70ml (sete colheres de sopa) de sangue para realizar exames comparativos aos dos indivíduos afetados pelo melanoma.

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados: coleta de sangue por punção periférica da veia do antebraço.

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3: O maior desconforto será no momento da coleta do sangue, porém este procedimento não trará nenhum risco à saúde do paciente. Todos os materiais utilizados serão descartáveis.

5 – Benefícios para o participante: O voluntário não terá nenhum benefício adicional por participar deste protocolo.

6 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar; Não haverá procedimentos alternativos

7 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra. Telma Miyuki Oshiro Sumida que pode ser encontrada no endereço Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470 – prédio IMT-2 – 3º andar Telefone(s) 3061-7499. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20 – e-mail: cappesq@hcnet.usp.br

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

09 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;

10 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

11 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

12 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo ***ANÁLISE DO INFLAMASSOMA EM MELANOMA: CORRELAÇÃO ENTRE CÉLULAS TUMORAIS E RESPOSTA IMUNE MEDIADA POR CÉLULAS DENDRÍTICAS***

Eu discuti com a Dra. ***Telma Miyuki Oshiro Sumida*** sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha Data ____ / ____ / ____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____/____/____

3. Termo de consentimento para coleta de sangue periférico e amostras de tecido (biopsias).

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: *ANÁLISE DO INFLAMASSOMA EM MELANOMA: CORRELAÇÃO ENTRE CÉLULAS TUMORAIS E RESPOSTA IMUNE MEDIADA POR CÉLULAS DENDRÍTICAS*

PESQUISADOR : Telma Miyuki Oshiro Sumida

CARGO/FUNÇÃO:. Pesquisadora Científica .

INSCRIÇÃO

CONSELHO REGIONAL Nº 39439

UNIDADE DO HCFMUSP: LIM 56 Departamento de Dermatologia.

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	☒	RISCO MÉDIO	☐
RISCO BAIXO	☐	RISCO MAIOR	☐

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : 24 meses.....

O Sr(a). está convidado(a) para participar como voluntário desta pesquisa sobre “ANÁLISE DO INFLAMASSOMA EM MELANOMA: CORRELAÇÃO ENTRE CÉLULAS TUMORAIS E RESPOSTA IMUNE MEDIADA POR CÉLULAS DENDRÍTICAS”.

Se decidir participar, é importante que leia atentamente as informações contidas neste termo a fim de melhor compreender a sua participação na pesquisa.

1 – Desenho do estudo e objetivo(s): o(a) Sr(a) foi convidado(a) para participar desta pesquisa por ser portador de um câncer da pele chamado melanoma. Este tumor, embora não sendo o tipo de câncer da pele mais frequente, teve o seu aparecimento aumentado nos últimos anos. Alguns trabalhos estrangeiros estão sendo feitos na busca de compreender o que faz a inflamação no tumor, se é uma coisa boa ou não. Infelizmente, isso foi muito pouco estudado no nosso país. O Departamento/Divisão de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade São Paulo, juntamente com o Laboratório de Investigação Médica (LIM-56), estão desenvolvendo uma pesquisa para tentar compreender melhor a influência da inflamação no comportamento da doença assim como se a genética da pessoa influencia nisso.

Os resultados obtidos deste estudo podem ajudar futuramente no tratamento deste tumor.

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados:

Caso concorde em participar desta pesquisa, o(a) Sr (a). será submetido(a) a um procedimento médico que será explicado agora.

Vamos coletar um fragmento de seu tumor (após ele ser retirado) e um fragmento de pele normal ao redor do seu tumor que também foi retirada, como é feito de rotina. Este procedimento não muda nada em relação ao que foi feito ou que vai ser feito com você agora

em diante. Estas amostras serão enviadas ao laboratório para serem analisadas. O restante do tumor será submetido aos exames de rotina.

Além disso, será feita uma coleta de 74 mL (sete colheres de sopa) de sangue para realizar exames que irão estudar qual o papel da inflamação no seu tumor e também aspectos genéticos do melanoma.

Caso haja a necessidade excepcional de uma nova coleta, ela será dentro das visitas de rotina. É importante salientar que a pesquisa não mudará em nada a forma de seu tratamento.

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados: coleta de sangue por punção periférica da veia do antebraço e coleta de amostras de biópsias da lesão extraídas no ato cirúrgico para remoção do tumor.

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3: O maior desconforto será no momento da coleta do sangue, porém este procedimento não trará nenhum risco à saúde do paciente. Todos os materiais utilizados serão descartáveis.

5 – Benefícios para o participante: O voluntário não terá nenhum benefício adicional por participar deste protocolo.

6 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar; Não haverá procedimentos alternativos.

7 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra Telma Miyuki Oshiro Sumida que pode ser encontrada no endereço Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470 – prédio IMT-2 – 3º andar Telefone(s) 3061-7499. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20 – e-mail: cappesq@hcnet.usp.br

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

09 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;

10 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

11 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

12 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo ***ANÁLISE DO INFLAMASSOMA EM MELANOMA: CORRELAÇÃO ENTRE CÉLULAS TUMORAIS E RESPOSTA IMUNE MEDIADA POR CÉLULAS DENDRÍTICAS.***

Eu discuti com a Dra. ***Telma Miyuki Oshiro Sumida*** sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha Data ____ / ____ / ____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____ / ____ / ____