Fernanda Pereira Fernandes

**Avaliação da ativação do Inflamassoma no contexto da infecção por HPV e do
Câncer Cervical associado ao HPV**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2020

Fernanda Pereira Fernandes

**Avaliação da ativação do Inflamassoma no contexto da infecção por HPV e do
Câncer Cervical associado ao HPV**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências.

Programa de Dermatologia

Orientadora: Dra. Alessandra Pontillo

São Paulo

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Fernandes, Fernanda Pereira

Avaliação da ativação do inflamassoma no contexto da infecção por HPV e do câncer cervical associado ao HPV / Fernanda Pereira Fernandes. -- São Paulo, 2020.

Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Dermatologia.

Orientadora: Alessandra Pontillo.

Descritores: 1.Inflamassoma 2.Neoplasias do colo do útero 3.Interleucina-1beta 4.NLRP3 5.Imunidade 6.Monócitos

USP/FM/DBD-223/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Fernandes, F. P. **Avaliação da ativação do Inflamassoma no contexto da infecção por HPV e do Câncer Cervical associado ao HPV** [Dissertação]. São Paulo, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

Avaliado em:

Banca Examinadora:

Prof. Dr:.....

Instituição:.....

Julgamento:.....

Prof. Dr:.....

Instituição:.....

Julgamento:.....

Prof. Dr:.....

Instituição:.....

Julgamento:.....

Cidade Universitária "Armando de Sales Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508-000
Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 14 de fevereiro de 2019.

PARECER 1429/CEPSH

CAAE nº 06378818.9.0000.5467

Protocolo CEPSH-ICB nº 1477/19

O Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do ICB, nesta data, **APROVOU** o projeto intitulado: "**Análise do inflamassoma no contexto da infecção por HPV e do câncer cervical associado ao HPV**", das pesquisadoras Profa. Dra. **Alessandra Pontillo** e aluna **Fernanda Pereira Fernandes**.

Caberá às pesquisadoras, em conformidade com a Resolução CNS nº 466/2012: 1) elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais e final) conforme modelo constante no site: www2.icb.usp.br/icb/cepsh; 2) desenvolver o projeto conforme metodologia apresentada; 3) manter em arquivo sob sua guarda (impresso ou digital), por até 5 anos após conclusão da pesquisa, toda documentação relacionada a pesquisa; 4) encaminhar os resultados para publicação; 5) justificar ao CEP, via Plataforma Brasil, interrupção do projeto ou a não publicação de resultados; 6) finalizar o processo junto à Plataforma Brasil quando do encerramento deste projeto. O primeiro relatório deverá ser enviado, via Plataforma Brasil, até **14/02/2020**.

Atenciosamente,

Profa. Dra. **CAMILA SQUARZONI DALE**
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Dedicatória

Dedico este trabalho a todos aqueles que de alguma forma já sofreram em consequência do câncer. Em especial a minha avó que foi e sempre será minha inspiração de mulher! Vó, não conseguimos chegar até esta etapa juntas mas saiba que meu amor por você é infinito!

Agradecimentos

Através de palavras tentarei manifestar a minha gratidão a todos que de alguma forma estiveram presente em minha trajetória acadêmica, tanto de forma profissional como pessoal!

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro e fundamental pelo número de processo 2018/04361-1.

À Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e ao programa de Pós graduação em Dermatologia!

Ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, em especial ao departamento de Imunologia, que foram essências em minha trajetória acadêmica desde a graduação!

À minha orientadora Alessandra Pontillo, que abriu as portas do seu laboratório para uma aluna de graduação inexperiente e me orientou durante 4 anos, nas duas etapas mais importantes da minha vida profissional. Você me ensinou muito mais do que ciência!

Aos meus colegas do laboratório de Imunogenética (Edione, Jaíne, Raylane, Vinícius e Dhêmerson), pela cumplicidade, paciência, alegrias e tristezas, sem vocês minha caminhada seria mais árdua! A todos os outros alunos que brevemente passaram pelo laboratório, também deixo registrado meu agradecimento (Pamela, Elaine, Iohanã, Mariana, Tércio, Alexandre, Mariela).

Edi, saiba que você foi a melhor "irmã" mais velha que eu poderia ter! Você sempre esteve disposta a ajudar com a sua paciência e disposição. Vou guardar com carinho nossas conversas, risadas, desesperos e acima de tudo nossa cumplicidade!

Jaíne, "irmã" você sabe o quanto te admiro não só profissionalmente, mas como pessoa. Olhar para trás e ver nossa evolução me deixa orgulhosa de ter você ao meu lado! Você me ensinou muito, não só na âmbito profissional mas na vida, me fez muitas vezes enxergar o mundo com outros olhos!

Ray, nossa convivência foi mais curta do que eu desejava, mas mesmo nesse período, você me ajudou de diversas maneiras, não só na parte experimental mas mental também! Sua caminhada no laboratório está apenas iniciando mas tenho certeza que será uma cientista brilhante!

Vi, você sabe o quanto foi importante para mim nesses anos, sua amizade me surpreendeu de todas as formas, você foi um companheiro incrível de bancada, me ensinou muito do que sei hoje e também um ótimo parceiro de conversas e risadas!

Dhêmerson, suas "personalidades" fizeram os dias de trabalho mais leves, seu esforço e dedicação me inspiraram muito!

À equipe técnica do departamento de Imunologia, em especial as técnicas Áurea e Sandra pelos incontáveis auxílios. Ao pessoal da portaria e as meninas da limpeza, em especial a Neide e Salete pelas nossas risadas!

Aos professores da Universidade de São Paulo, por todo o conhecimento transmitido, desde minha graduação até o momento! Em especial à professora Ana Paula Lepique, por colocar à disposição reagentes, orientar em experimentos e conhecimento!

Aos professores do departamento de Imunologia, em especial ao professor Anderson e a professora Lourdes por cederem o uso de equipamentos essenciais para os meus experimentos.

Aos membros da banca de qualificação (Lara Termini, Louise De Brot Andrade, Ildefonso Alves da Silva Junior) e de defesa (Lara Termini, Maria Notomi Sato, Mariane Tami Amano) pela disponibilidade e contribuição no trabalho.

Aos meus pais, Simone e Fernando, por serem minha base, minhas inspirações, os maiores e melhores incentivadores que eu poderia ter! À vocês que batalharam anos para proporcionar a mim, uma educação de excelência e uma vida repleta de possibilidades. Saibam que todo o amor que foi transmitido, é e sempre será, as luzes que guiaram as minhas escolhas! E por mais clichê que seja, nenhuma palavra descreverá a gratidão e o amor incondicional que sinto por vocês!

À minha irmã Sofia, por tudo que aprendemos juntas e a nossa amizade que transcende o significado de irmãs. Com vocês sempre tive a certeza que não estaria sozinha em nenhum momento nessa caminhada.

Ao Lucas, que no decorrer dos últimos 11 anos foi o meu companheiro de vida, esteve ao meu lado em todos os momentos, sendo meu porto seguro, me ensinando que o amor pode ser construído diariamente!

Aos meus sogros, Magda e Pascoal, meus cunhados Joice e Thiago, e a toda família do Lucas, que além de me considerarem como parte da família, sempre me apoiaram e incentivaram em todos os âmbitos.

Aos meus familiares, que de alguma forma estiveram presentes em toda minha trajetória de vida! Em especial ao meu tio Eduardo, que sempre esteve ao meu lado!

Aos meus amigos, tanto do mundo acadêmico como da vida, pelas conversas, risadas, conselhos e dores compartilhadas. Em especial ao Guilherme por sempre se fazer presente em minha vida e ser meu irmão de outra mãe! E a Nadine por ser minha companheira nesses árduos anos de USP e de estar sempre disposta a me ouvir!

In memoriam as minhas avós Maria e Celestina, meus avôs Armando e Manoel, minha tia Sônia e a minha mãe de consideração Jaqueline que mesmo no céu, torcem pelo meu sucesso e guiam meus caminhos!

Enfim, a todos que fizeram parte da minha trajetória e que diretamente ou indiretamente me ajudaram, os meus mais sinceros agradecimentos!

"O essencial é invisível aos olhos"

Antoine de Saint-Exupéry (1900-1944).

Trabalho aprovado pela comissão de Pós Graduação em Dermatologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Realizado no laboratório de Imunogenética do Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, sob orientação da Professora Alessandra Pontillo. Projeto financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, com bolsa de mestrado FAPESP, nº 2018/04361-1.

RESUMO

Fernandes, F. P. **Avaliação da ativação do Inflamassoma no contexto da infecção por HPV e do Câncer Cervical associado ao HPV** [Dissertação]. São Paulo, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

Introdução: A contribuição do inflamassoma e das suas citocinas (IL-1 β , IL-18) na infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) e no Câncer Cervical(CC) associado ao HPV (HPV-CC) não está ainda totalmente esclarecida. A infecção *in vitro* do HPV leva a inibição da produção de IL-1 β em queratinócitos primários. Por outro lado, estudos de associação genética e da produção de IL-1 β e/ou IL-18 mostram uma correlação positiva com a progressão do CC. A partir dos dados obtidos em um estudo de associação genética em uma coorte de mulheres com HPV-CC que apontava para IL-1 β como fator de risco para o desenvolvimento do CC, propomos aqui aprofundar este achado. **Objetivo:** Investigar a contribuição do inflamassoma no microambiente tumoral do HPV-CC. **Materiais e métodos:** Um estudo de associação genética para as variantes do inflamassoma foi replicado em uma nova coorte de 107 mulheres com HPV-CC utilizando sondas alelo-específicas e qPCR. Uma análise de expressão gênica foi realizada utilizando dados de tecido de cérvix uterino tumoral e normal procedentes de bancos públicos (TCGA, GTEX). Linhagens celulares de tumor cervical (C33-A, SiHa e HeLa) e monócitos derivados de sangue periférico de 39 doadores saudáveis foram cultivados isoladamente e em conjunto (ensaio de co-cultivo). A ativação do inflamassoma foi avaliada de modo indireto através da produção de IL-1 β e IL-18 medida no sobrenadante de cultura por ELISA. Inibidores específicos do inflamassoma foram utilizados em alguns ensaios. **Resultados:** A análise genética demonstrou mais uma vez a associação entre a variante rs16944 (que leva a aumento de IL-1 β) assim como uma maior expressão do gene *IL1B* e um maior risco de desenvolver HPV-CC e de um pior prognóstico, respectivamente. Os dados obtidos nos ensaios de co-cultivo revelaram que, apenas no modelo de cultivo das linhagens celulares de CC em esferoides (não em monocamada), as células tumorais não produzem IL-1 β , mas induzem a ativação do inflamassoma e a liberação de IL-1 β em monócitos. Esta ativação é pelo menos parcialmente dependente do receptor do inflamassoma NLRP3. **Conclusão:** Pela primeira vez, ao nosso conhecimento, demonstramos que o aumento de IL-1 β observado na progressão do CC, é possivelmente devido a indução da ativação do NLRP3 inflamassoma das células tumorais nos monócitos do microambiente. Portanto, tanto NLRP3 quanto IL-1 β podem ser considerados como possíveis alvos para novas abordagens terapêuticas.

Palavras-chave: Câncer Cervical, Inflamassoma, IL-1B, NLRP3.

ABSTRACT

Fernandes, F. P. Evaluation of Inflammasome activation in the context of HPV infection and HPV-associated Cervical Cancer [Dissertation]. São Paulo, Faculty of Medicine, University of São Paulo; 2020.

Introduction: The contribution of inflammasoma and its cytokines (IL-1 β , IL-18) to Human Papillomavirus (HPV) infection and HPV-associated cervical cancer (CC) (HPV-CC) is not yet fully understood. In vitro HPV infection leads to inhibition of IL-1 β production in primary keratinocytes. On the other hand, studies of genetic association and the production of IL-1 β and / or IL-18 show a positive correlation with the progression of CC. Based on the data obtained in a study of genetic association in a cohort of women with HPV-CC that pointed to IL-1 β as a risk factor for the development of CC, we propose to deepen this finding here. **Objective:** To investigate the contribution of inflammasome in the tumor microenvironment of HPV-CC. **Materials and methods:** A genetic association study for inflammasome variants was replicated in a new cohort of 107 women with HPV-CC using allele-specific probes and qPCR. A gene expression analysis was performed using tumor and normal uterine cervix tissue data from public databases (TCGA, GTEX). Cervical tumor cell lines (C33-A, SiHa and HeLa) and monocytes derived from peripheral blood from 39 healthy donors were cultured alone and together (co-culture assay). The activation of the inflammasome was evaluated indirectly through the production of IL-1 β and IL-18 measured in the culture supernatant by ELISA. Specific inflammasome inhibitors have been used in some trials. **Results:** Genetic analysis demonstrated once again the association between the rs16944 variant (which leads to an increase in IL-1 β) as well as a greater expression of the IL1B gene and a greater risk of developing HPV-CC and a worse prognosis, respectively. The data obtained in the co-culture assays revealed that, only in the spheroid CC cell culture model (not in monolayer), tumor cells do not produce IL-1 β , but induce the activation of the inflammasome and the release of IL -1 β in monocytes. This activation is at least partially dependent on the NLRP3 inflammasome receptor. **Conclusion:** For the first time, to our knowledge, we demonstrated that the increase in IL-1 β observed in the progression of CC is possibly due to the induction of NLRP3 activation of inflammasome tumor cells in the monocytes of the microenvironment. Therefore, both NLRP3 and IL-1 β can be considered as possible targets for new therapeutic approaches.

Keywords: Cervical Cancer, Inflammasome, IL-1B, NLRP3.

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

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Sistema Integrado de Bibliotecas da USP.
Diretrizes para a apresentações de dissertações e teses da USP: parte I (ABNT). 3. ed. rev. ampl. mod. São Paulo: SIBiUSP, 2016. 102p.

Disponível em:

<http://www.livrosabertos.sibi.usp.br/portaldelivrosUSP/catalog/view/111/95/491-2>

Acesso em 01/09/2020

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação esquemática da ativação do complexo inflamassoma.....	31
Figura 2. Análise morfológica de monócitos.....	48
Figura 3. Análise morfológica das linhagens celulares de Câncer Cervical.....	49
Figura 4. Padronização da produção de IL-1 β a partir a ativação do inflamassoma NLRP3 por monócitos de indivíduos saudáveis na presença da combinação de LPS+ATP.....	52
Figura 5. Padronização do co-cultivo em monocamada das linhagens celulares (C33-A, SiHa e HeLa) em duas concentrações, frente ao estímulo clássico de ativação do inflamassoma (LPS).....	53
Figura 6. Análise morfológica dos esferoides isolados e em co-cultivo com monócitos.....	54
Figura 7. Comparação da expressão dos genes do inflamassoma em amostras de tecido do cérvix uterino tumoral e normal	65
Figura 8. Curvas de sobrevida global de pacientes com Câncer Cervical, agrupadas com base na expressão dos genes do inflamassoma no tecido tumoral.....	67
Figura 9. Análise da expressão de genes do inflamassoma e produção de IL-1 β em células de linhagem de Câncer Cervical (SiHa) e monócitos derivado de indivíduos saudáveis.....	71
Figura 10. Produção de IL-1 β no co-cultivo de monócitos e células de linhagens de Câncer Cervical cultivadas em modelo bidimensional.....	72
Figura 11. Produção de IL-1 β e TNF- α no co-cultivo de monócitos com linhagens celulares de Câncer Cervical cultivadas em modelo tridimensional..	74
Figura 12. Avaliação do crescimento do esferoide na presença de IL-1 β recombinante.....	76
Figura 13. Produção de IL-1 β e TNF- α no co-cultivo de monócitos com linhagens celulares de Câncer Cervical cultivadas em modelo tridimensional na presença do inibidor do inflamassoma.....	78
Figura 14. Produção de IL-1 β no co-cultivo de monócitos com linhagens celulares de Câncer Cervical cultivadas em modelo tridimensional na presença do inibidor NLRP3.....	80

Figura 15. Produção de IL-1β por monócitos de indivíduos saudáveis na presença de MC das linhagens celulares de Câncer Cervical.....	82
Figura 16. Liberação de LDH no co-cultivo de monócitos e esferoides de SiHa.....	83
Figura 17. Liberação de IL-1α no co-cultivo de monócitos e esferoides de linhagens celulares de Câncer Cervical.....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. PAMPs e DAMPs reconhecidos pelos principais receptores de inflamassoma.....	30
Tabela 2. Papel dos inflamassomas em diferentes tipos de câncer.....	36
Tabela 3. Sondas de expressão gênica utilizadas para análise de monócitos e linhagem celular de Câncer Cervical.....	50
Tabela 4. Características clínicas da coorte de pacientes com neoplasias intraepiteliais cervicais e Câncer Cervical.....	57
Tabela 5. Dados dos polimorfismos escolhidos para o estudo de associação genética.....	58
Tabela 6. Resultados da análise para a associação dos SNPs do inflamassoma com variáveis clínicas de pacientes com neoplasias intraepiteliais cervicais e Câncer Cervical.....	63

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	microlitro
μM	micromolar
2D	Bidimensional
3'UTR	do inglês, <i>Untranslated Region</i>
3D	Tridimensional
AD	Adenocarcinoma
AIM2	do inglês, <i>Absent In Melanoma 2</i>
ASC	do inglês, <i>PYD and CARD domain-containing protein</i> ou <i>Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD</i>
ATCC	do inglês, <i>American Type Culture Collection</i>
ATP	do inglês, <i>Adenosine Triphosphate</i>
BD	BD Bioscience®
C33-A	do inglês,, <i>Squamous Cell Carcinoma HPV-</i>
CARD	do inglês, <i>Caspase Recruitment Domain</i>
CARD8	do inglês, <i>Caspase Recruitment Domain-Containing Protein 8</i>
CASP1	do inglês, <i>Caspase-1</i>
CASP4	do inglês, <i>Caspase-4</i>
CASP5	do inglês, <i>Caspase-5</i>
CASP8	do inglês, <i>Caspase-8</i>
CC	Câncer Cervical
CCU	Câncer de Colo Uterino
cDNA	do inglês, <i>Complementary DNA</i>
CEPSH	Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos
CESC	do inglês, <i>Cervical squamous cell carcinoma and endocervical adenocarcinoma</i>
CO2	Dióxido de carbono
Ct	do inglês, <i>Cycle threshold</i>
DAMP	do inglês, <i>Damage Associated Molecular Patterns</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo
DNA	do inglês, <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DPP9	do inglês, <i>Dipeptidyl peptidase 9</i>

dsDNA	do inglês, <i>double - stranded DNA</i>
EDTA	Acido etilenodiamino tetra-acético
EGFR	do inglês, <i>Epidermal growth factor receptor</i>
FBS	do inglês, <i>Fetal bovine serum</i>
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
g	grama
GAPDH	do inglês, <i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GEPIA	do inglês, <i>The Gene Expression Profile Interactive Analysis</i>
GSDMD	do inglês, <i>Gasdermin D</i>
GTEX	do inglês, <i>Genotype-Tissue Expression</i>
HAMP	do inglês, <i>Homeostasis-associated molecular patterns</i>
HeLa	do inglês, <i>Squamous Cell Carcinoma, contain human papilloma vírus type 18</i>
HGSIL	do inglês, <i>High grade cervical squamous intraepithelial lesions</i>
HMGB1	do inglês, <i>High mobility group box 1</i>
HPV	Papilomavírus Humano
IC	Intervalo de confiança
ID	Identificação
IFI16	do inglês, <i>Interferon Inducible Protein 16</i>
IFN	do inglês, <i>Interferon</i>
IL	do inglês, <i>Interleukin</i>
IL-10	do inglês, <i>Interleukin 10</i>
IL-17	do inglês, <i>Interleukin 17</i>
IL-18	do inglês, <i>Interleukin 18</i>
IL-1 β	do inglês, <i>Interleukin-1 beta</i>
IL-23	do inglês, <i>Interleukin 23</i>
IL-6	do inglês, <i>Interleukin 6</i>
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IRF	do inglês, <i>Interferon Regulatory Factors</i>
K ⁺	Potássio
kDa	quilodáton
LDH	Lactato desidrogenase
LPS	do inglês, <i>Lipopolysaccharide</i>
LRR	do inglês, <i>Leucine Rich Repeat Protein</i>

LRS	Concentrados de leucócitos após plaquetaferese
LSIL	do inglês, <i>Low-grade squamous intraepithelial lesions</i>
LT	Linfócitos T
MALT1	do inglês, <i>Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1</i>
MC	Meio Condicionado
MCC-950	Inibidor de NLRP3
MEFV	do inglês, <i>Mediterranean fever gene</i>
miRNA	micro-RNA
mL	mililitro
mM	milimolar
Mo	Monócito
mRNA	RNA mensageiro
MS	Ministério da Saúde
NACHT	do inglês, <i>Nucleotide-Binding and Oligomerization Domain</i>
NAIP	do inglês, <i>NLR Family of apoptosis inhibitory proteins</i>
NE	Não estimulado
NF-κB	do inglês, <i>Factor Nuclear Kappa B</i>
ng/mL	nanograma por mililitro
NIC	Neoplasia intra-epitelial cervical
NLR	do inglês, <i>Nucleotide-binding oligomerization domain_Leucine rich repeats Receptors</i>)
NLRC4	do inglês, <i>NLR Family CARD Domain Containing 4</i>
NLRP	do inglês, <i>LRR and PYD Domains-Containing Protein</i>
NLRP1	do inglês, <i>NLR Family Pyrin Domain Containing 1</i>
NLRP3	do inglês, <i>NLR Family, Pyrin Domain Containing 3</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	do inglês, <i>Odds Ratio</i>
P2X7	do inglês, <i>Purinergic Type 2 Receptor Family (P2)</i>
PAMP	do inglês, <i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i>
PBMC	do inglês, <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	do inglês, <i>Polymerase Chain Reaction</i>
pg/mL	picograma por mililitro

PRR	do inglês, <i>Pattern Recognition Receptors</i>
PTD	Parthenolide
PYD	do inglês, <i>Pyrin domain</i>
qPCR	do inglês, <i>Polymerase chain reaction quantitative real time</i>
rhIL1 β	IL-1 β recombinante
RNA	Ácido ribonucleico
SiHa	do inglês, <i>Squamous Cell Carcinoma - cells contain human papilloma virus type 16</i>
SNP	Polimorfismos de base única
SYK	do inglês, <i>Tyrosine-protein kinase SYK</i>
TCD4	Linfócitos T CD4
TCD8	Linfócito T CD8
TCGA	do inglês, <i>The Cancer Genome Atlas</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGFB	do inglês, <i>Transforming Growth Factor Beta</i>
TH1	do inglês, <i>lymphocytes T helper 1</i>
Th17	do inglês, <i>lymphocytes T helper 17</i>
TH2	do inglês, <i>lymphocytes T helper 1</i>
TLR	do inglês, <i>Toll-like receptor</i>
TME	do inglês, <i>The Tumor Microenvironment</i>
TNF	do inglês, <i>Tumor Necrosis Factor</i>
TNF- α	do inglês, <i>Tumor Necrosis Factor α.</i>
UFG	Universidade Federal de Goiás
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	24
1.1. Inflamação e Câncer.....	25
1.2. O Complexo Inflamassoma.....	27
1.3. Inflamassoma e Câncer.....	34
1.4. Câncer Cervical.....	38
1.5. Inflamassoma e Câncer Cervical.....	42
2. OBJETIVOS.....	44
2.1. Geral.....	45
2.2. Específicos.....	45
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
3.1. Amostras biológicas de doadores de sangue.....	47
3.2. Isolamento e cultura de monócitos.....	47
3.3. Cultura de linhagens celulares de Câncer Cervical.....	48
3.4. Isolamento de RNA e análise da expressão gênica relativa através de sondas fluorescentes gene específicas e qPCR.....	49
3.5. Análise <i>in silico</i> da expressão gênica do inflamassoma em Câncer Cervical...50	
3.6. Avaliação da ativação e inibição do inflamassoma	51
3.7. Avaliação do efeito do Meio Condicionado (MC) na ativação do inflamassoma em monócitos.....	52
3.8. Análise da ativação do inflamassoma no co-cultivo de monócitos com linhagens celulares de Câncer Cervical em monocamada (2D)	52
3.9. Análise da ativação do inflamassoma no co-cultivo de monócitos com linhagens celulares de Câncer Cervical em esferoide (3D).....	54
3.10. Tratamento dos esferoides com IL-1 β recombinante humana.....	55
3.11. Detecção de citocinas por ELISA.....	55
3.12. Avaliação da liberação de LDH.....	56
3.13. Casuística para o estudo de genotipagem.....	56
3.14. Seleção dos polimorfismos de base única (SNPs) nos genes do inflamassoma e genotipagem.....	57
3.15. Análise estatística.....	58

4. RESULTADOS.....	60
4.1. Variantes polimórficas nos genes <i>NLRP3</i> e <i>IL1B</i> estão associados ao desenvolvimento de Câncer Cervical.....	61
4.2. A análise <i>in sílico</i> do perfil de expressão dos componentes do inflamassoma indica um aumento do gene <i>IL1B</i> no Câncer Cervicalque afeta a sobrevida das pacientes.....	64
4.3. Células de linhagens celulares de Câncer Cervicalsão capazes de expressar e produzir IL-1 β	69
4.4. No ensaio de co-cultivo de células de linhagens celulares de Câncer Cervical em monocamada com monócitos não é observado a produção de IL-1 β	72
4.5. O co-cultivo de monócitos e esferoides de células de linhagens celulares de Câncer Cervicalinduz a produção de IL-1 β	73
4.6. O co-cultivo induz a produção de IL-1 β nos monócitos e não nas células de linhagens celulares de Câncer Cervical.....	77
4.7. O NLRP3 contribui para a liberação de IL-1 β induzida nos monócitos em co-cultivo com as células de linhagens celulares de Câncer Cervical.....	79
5. DISCUSSÃO.....	85
6. CONCLUSÃO.....	95
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97
8. APÊNDICES.....	119

1. INTRODUÇÃO

1.1 Inflamação e Câncer

Segundo a definição da Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer constitui um conjunto de mais de 100 doenças, que possuem em comum a característica de crescimento e divisão desordenada de células. Por decorrência da quebra de mecanismos reguladores celulares, responsáveis pela proliferação, diferenciação e sobrevivência das células normais.

O processo de formação do câncer é denominado como carcinogênese ou oncogênese. E se inicia, a partir de mutações genéticas, anomalias citogenéticas, alterações epigenéticas ou ainda fenotípicas que podem causar dano ao DNA celular (Hanahan D., 2011; Hausman DM., 2019). Em geral, esse processo acontece de forma lenta, podendo durar vários anos até que uma célula transformada, ou cancerosa, prolifere e dê origem a um tumor visível. Efeitos cumulativos de diferentes agentes carcinógenos ou cancerígenos são essenciais no processo de iniciação, promoção e progressão tumoral (Schetter AJ., 2009; Greten FR., 2019).

O câncer apresenta uma estrutura complexa, sendo composto não somente por células transformadas, mas sim por um microambiente tumoral (TME, do inglês, "*The Tumor Microenvironment*"), que pode compreender também células do tecido de origem e componentes estruturais da matriz extracelular, fibroblastos, células que formam novos vasos sanguíneos (neo-angiogênese), células do sistema imune (residentes e infiltrantes), assim como fatores solúveis (fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas) (Wang M., 2017; Balkwil F., 2001).

A correlação entre a ativação do sistema imune no contexto tumoral é considerado atualmente como um dos principais alvos de interesse tanto acadêmico como clínico, isso porque, em diversos tipos tumorais, os tumores se desenvolvem em locais de inflamação crônica. A primeira correlação entre inflamação e câncer se deu a partir da observação de que células imunes também estavam presentes em biópsias tumorais por Rudolf Virchow no século XIX (Candido J., 2013).

O conhecimento acerca das características imunes correlacionadas aos tumores evoluiu significativamente nos últimos anos. A atuação do sistema imune é tão relevante que características como iniciação da inflamação, evasão do sistema imune, distribuição dos subtipos celulares, entre outros, são considerados atualmente por diversos pesquisadores como marcadores emergentes de câncer ("Emerging Hallmarks of Cancer") (Hanahan D., 2011).

Desta forma, é de suma importância compreender todos os aspectos envolvidos no ambiente tumoral.

A inflamação entretanto, possui um duplo papel na oncogênese, dependendo tanto do tipo tumoral, como também do momento de desenvolvimento celular dos tumores. Para alguns tipos de câncer a inflamação crônica representa um dos fatores de risco para o desenvolvimento tumoral, como no câncer gástrico onde a infecção por *H. pylori* desencadeia uma resposta inflamatória resultando em gastrite crônica, podendo evoluir para uma metaplasia intestinal e assim ao câncer (Busuttil RA., 2014).

Diferentes leucócitos, tais como monócitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, linfócitos, podem estar presentes no microambiente tumoral e são capazes de manter a comunicação com as células neoplásicas por meio principalmente da produção e liberação de citocinas. Alguns tipos tumorais estão associados a específicos componentes imunes no infiltrado inflamatório (Linfócitos T regulatórios, células citotóxicas, macrófagos ou neutrófilos), enfatizando que o microambiente tumoral pode determinar o perfil da resposta imune (Gajewski TF., 2013; Lei X., 2020).

Atualmente, sabemos que situações de inflamação crônica favorecem a transformação neoplásica, e que mediadores inflamatórios e fatores de crescimento secretados, tais como: interleucina 6 (IL-6), fator de crescimento tumoral (TGF)- β , fator de crescimento epitelial (EGF) ou fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) podem promover o crescimento tumoral (Bui JD., 2007; Grivennikov SI., 2010; Schreiber RD., 2011; Karan, 2018).

No microambiente tumoral também estão presentes padrões moleculares associados a dano (DAMPs; do inglês "*Pathogen Associated Molecular Patterns*"), como produtos do metabolismo celular alterado (como o ácido láctico pelo efeito *Warburg*), moléculas derivadas de células mortas (exemplos: IL-1 α , HMGB1, lactato desidrogenase (LDH)) ou da degradação da matriz extracelular.

Esses DAMPs são responsáveis pela ativação de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs, do inglês "*Pattern Recognition Receptors*") expressos tanto por leucócitos mas também por células não estritamente imunes (tais como células epiteliais, endoteliais e fibroblastos), que desencadeiam diferentes vias de sinalização intracelulares, levando a produção de mediadores pró-inflamatórios.

Entre os mediadores pró-inflamatórios reportados em elevadas concentrações em diferentes tipos tumorais estão as interleucinas IL-1 β e IL-18 (Mantovani A., 2018; Bent R., 2018; Esmailbeig M., 2017; Palma G., 2013).

Elevados níveis de IL-1 β foram observados em numerosos tumores, incluindo melanoma, câncer de cólon, cancer de mama, câncer gástrico, câncer cervical, bem como em neoplasias hematológicas (Apte RN., 2006; de Mooij CEM., 2017; Tu S., 2008; Qian N., 2010). Enquanto que a maioria dos pacientes com tumores produtores de IL-1 β geralmente apresenta um pior prognóstico (Mantovani A., 2018; Apte RN., 2006; Maker AV., 2011), no carcinoma nasofaríngeo, uma alta secreção de IL-1 β é associada a um quadro clínico menos grave (Chen LC., 2012), enfatizando mais uma vez que o papel da resposta inflamatória é contraditório e dependente do tipo tumoral.

As células cancerígenas podem produzir diretamente IL-1 β devido a alterações intrínsecas nos padrões de expressão gênica durante a transformação neoplásica ou em outros casos as células estromais e/ou os leucócitos infiltrantes foram apontados como fonte dessa citocina (Apte RN., 2006; Voronov E., 2017).

Assim como a IL-1 β , a IL-18 também possui um duplo papel na resposta imune tumoral. A IL-18 pode levar à progressão tumoral, promoção da angiogêneses e desenvolvimento de metástases, promovendo assim um ambiente pró-tumoral, como já relatado no câncer de esôfago, de mama e pâncreas (Vidal-Vanaclocha F., 2000; Carbone A., 2009; Tsuboi K., 2004; Günel N., 2002). Entretanto, em outros tipos tumorais como câncer gástrico e colorretal essa citocina foi associada como um papel protetor no desenvolvimento tumoral (Deswaerte et al., 2018; Salcedo R., 2010).

Diferentemente de outras citocinas, a IL-1 β e a IL-18 não são secretadas pela via convencional (complexo de Golgi e vesículas de exocitose) mas são sintetizadas como pró-formas biologicamente inativas (pró-IL-1 β e pró-IL-18) e se localizam no citosol da célula, onde são clivadas e liberadas no meio extracelular pela ativação do complexo protéico inflamassoma (Martinon F., 2002; Christgen S., 2020)

1.2 O Complexo Inflamassoma

O inflamassoma é um complexo multiprotéico citosólico, de alto peso molecular, responsável por recrutar e ativar caspases inflamatórias (nomeadamente caspase-1, -4 e -5) em resposta a padrões moleculares associados a patógenos e/ou danos (PAMPs e DAMPs, respectivamente) ou a desregulação de vias moleculares

alteradas (HAMPs, do inglês, “*homeostasis-associated molecular patterns*”) (Liston A., 2017) levando à produção das formas ativas das citocinas IL-1 β e IL-18 (Martinon F., 2002).

As caspases inflamatórias atuam também em outros substratos celulares tais como a gasdermina D (GSDMD), uma proteína que, uma vez clivada, se insere na membrana plasmática formando poros que permitem a liberação das citocinas IL-1 β e IL-18, e em casos extremos medeia a morte celular litica e inflamatória denominada de piroptose (Shi J., 2015; Vande Walle L., 2016).

Diversos PRRs foram descritos até o momento como capazes de ativar o inflamassoma, estes pertencem à família de proteínas que contêm um domínio NACHT e sequências repetidas de leucinas (NLRs, do inglês “*NACHT domain and LRR containing receptors*”), tais como, NLRP1, NLRP3, NAIP, NLRC4, ou receptores que contêm um domínio PYD, como a pirina (MEFV), e os receptores de DNA do tipo PYHIN (do inglês, “*PYD and HIN domain-containing protein*”) AIM2 (do inglês, “*Absent In Melanoma 2*”) e IFI16 (do inglês, “*Interferon Inducible Protein 16*”) (Christgen S., 2019).

Alguns receptores detectam um padrão molecular específico, como o NAIP que reconhece a flagelina bacteriana (Kofoed EM., 2011; Lightfield KL., 2011; Zhao Y., 2015), AIM2 e IFI16 que reconhecem DNA de dupla fita no citosol e no núcleo respectivamente (Fernandes-Alnemri T., 2009; Unterholzner L., 2010; Ma Z., 2018; Briard B., 2020). Enquanto outros são indiretamente ativados, como NLRC4, que liga o complexo NAIP/flagelina (Franchi L., 2006; Mariathasan S., 2004; Miao EA., 2006) ou NLRP1 e pirina, que são ativados na ausência de seu inibidor fisiológico, a dipeptidase DPP9 e a proteína 14-3-3, respectivamente (Zhong FL., 2018; Masters SL., 2016).

A ativação do NLRP3, ainda não está totalmente estabelecida, porém um amplo número de estímulos já foram descritos como capaz de ativar esse receptor além de ser ativado por modificações citoplasmáticas induzidas por PAMPs (de origem tanto bacteriana quanto viral) e DAMPs, ao invés de apenas pela interação direta com eles (Lamkanfi M., 2014; Schroder K., 2010).

Entre os mecanismos mais conhecidos por ativar o NLRP3 ressaltos: (a) o efluxo de K⁺, mediado por toxinas microbianas que criam poros na membrana plasmática (exemplo.: nigericina; viroporina) ou pela ativação do receptor purinérgico P2X7R após aumento de ATP no meio extracelular, geralmente em consequência a dano

tecidual e necrose (Muñoz-Planillo R., 2013; Pétrilli V., 2007); (b) o dano/estresse nas mitocôndrias com consequente liberação de espécies reativas de oxigênio ou outros componentes da organela (ex: DNA mitocondrial, cardiolipina) (Shimada K., 2012; Zhou R., 2011); (c) a destabilização lisossomal com a consequente liberação dos seus componentes, tais como a catepsina B (Haneklaus M., 2013; Hornung V., 2008) em consequência de mecanismos de escape de bactérias fagocitadas/endocitadas ou de dano a membrana lisossomal mediado por toxinas. O estresse do retículo endoplasmático e mudanças nos níveis de Ca^{2+} citosólico também foram apontados como possíveis mecanismos de ativação do NLRP3 (Haneklaus M., 2013; Murakami T., 2012).

A aparente redundância nos sensores de inflamassoma é parcialmente explicada levando em consideração a especificidade no reconhecimento do patógeno ou dano, além da diferente ativação em células ou tecidos distintos (Broz P., 2016; Christgen S., 2020).

Na **Tabela 1** reportamos os receptores do inflamassoma e alguns exemplos de PAMPs e DAMPs que levam a ativação do complexo.

Tabela 1. PAMPs e DAMPs reconhecidos pelos principais receptores de inflamassoma.

Receptores	PAMPs	DAMPs	Mecanismos de ativação
NLRP1	Desconhecido	Desconhecido	Inibição da dipeptidase (DPP)-9 e auto-clivagem no domínio FIIND
NLRP3	Lipopolisacarídeo bacteriano (LPS); proteínas e carboidratos da superfície de protozoários, bactéria, vírus ou fungos; RNA bacteriano ou viral; toxinas formadoras de poros ou com ação enzimática.	Agregados/precipitados de moléculas orgânicas (ex: ácido úrico, colesterol) ou inorgânicas (ex: sílica, asbestos, alum); elevadas concentrações de moléculas endógenas no meio extracelular (ATP, LDH, alarminas; glucose).	Efluxo de potássio; dano mitocondrial com liberação de mtDNA e proteínas; dano lisossomal com liberação de catepsinas; estresse de retículo endoplasmático
NLRP6	Ácido lipoteicoico (LTA) de <i>Listeria monocytogenes</i>	Metabólitos de baixo peso molecular produzidos pela microbiota (ex. taurina)	Possível interação direta
NLRP4	Flagelina (e sistema de secreção do tipo III) de bactérias	Catepsinas	Interação com NAIP; dano lisossomal
Pirina (MEFV)	Toxinas bacterianas (ex: <i>Clostridium difficile</i> ; <i>C botulino</i> ; <i>Vibrio parahaemolyticus</i>)	Alterações do metabolismo celular (ex: redução de geranyl-geranyl pirofosfato)	Defosforilação devida à inibição da família de proteínas Rho (<i>small GTPases</i>) ou das quinases PKN1 e PKN2
AIM2	dsDNA de vírus (ex: HPV, CMV) ou de bactérias (ex: <i>L. monocytogenes</i>)	dsDNA endógeno	Interação direta do dsDNA com o domínio HIN-200
IFI16	dsDNA de vírus (ex: Herpes, HIV)	dsDNA endógeno	Interação direta do dsDNA com o domínio HIN-200

Os receptores, uma vez ativados, tornam-se capazes de recrutar, diretamente a caspase-1, como no caso do receptor NLRP1 ou NLRC4, pois possuem um domínio de recrutamento de caspase (CARD, do inglês “*Caspase activation and recruitment domain*”), e/ou através da interação com a proteína adaptadora ASC (do inglês, “*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*”), constituída por dois domínios, um domínio PYD e um domínio CARD. A proteína ASC interage através do PYD com os receptores que contêm o mesmo domínio (NLRP1, NLRP3, NLRP6, AIM2, IFI16 e pirina) e com a caspase-1 através do domínio CARD (Christgen S., 2020).

A interação com a caspase-1 e o recrutamento no complexo inflamassoma leva a auto-clivagem e ativação do enzima, que por sua vez cliva os seus substratos principais a pró-IL-1 β e/ou a pró-IL-18 e/ou a gasdermina D dependendo da suas disponibilidades citosólica (Christgen S., 2020).

As formas biologicamente ativas das citocinas IL-1 β e IL-18 são então liberadas pelas células através de uma via ainda não totalmente elucidada que possivelmente é mediada por poros formados pela parte ativa de gasdermina D, molécula chave no processo de piroptose, cujo fragmento de 30 kDa se insere na membrana plasmática formando poros e desencadeando um processo de morte celular altamente inflamatória conhecida como piroptose (He WT., 2015; Shi J., 2015).

Contudo, nem sempre a clivagem da gasdermina-D leva a este processo. Isso aparentemente depende do tipo celular, do receptor envolvido e da intensidade do sinal ativador do inflamassoma (Kuriakose T., 2018; Boucher D., 2018).

Além disso foram descritas outras vias de ativação do inflamassoma que não se iniciam com a ativação dos receptores citados acima. Na assim chamada “via não canônica” o lipopolisacarídeo (LPS) bacteriano no citosol, ativa diretamente as caspases inflamatórias -4 e -5, que podem clivar a gasdermina D ou ativar NLRP3 e/ou a caspase-1. A sinalização mediada por PRRs de membrana também foi associada a ativação do complexo. Por exemplo a dectina-1 induz a ativação de NLRP3 através da ativação das quinase Syk e BTK (“via alternativa” de ativação do NLRP3) (Lee HM., 2011; Kankkunen P., 2010).

Um esquema representativo da ativação do inflamassoma é reportado na **Figura 1**.

Figura 1. Representação esquemática da ativação do complexo inflamassoma. Os componentes do inflamassoma podem ser constitutivos ou induzidos pela ativação dos receptores de tipo PRRs ou de citocinas (CKRs) que leva a transcrição mediada pelos fatores NF-κB e/ou IRFs dependendo do tipo celular: (1) Na via “canônica” de ativação do inflamassoma os receptores ativados recrutam a proteína adaptadora ASC, e a caspase inflamatória, caspase-1 levando a clivagem e consequente ativação da pró-IL-1β e/ou pró-IL-18 e/ou gasdermina-D (GSDM). (2) O LPS citosólico ativa diretamente as caspases inflamatórias -4 e -5 que podem clivar a gasdermina D ou ativar NLRP3 e/ou a caspase-1 (via “não canônica” de ativação do inflamassoma). (3) A via “alternativa” de ativação do complexo prevê a contribuição da sinalização mediada por PRRs (tais como, TLRs e dectin-1) que induz a ativação de caspase-8 podendo ativar NLRP3 e/ou NLRC4 e/ou a caspase-1 diretamente.

Os componentes do inflamassoma foram descritos em diversos tipos de celulares e tecidos, tanto imunes (células mielóides; linfócitos) quanto não-imunes (epitélio, endotélio), incluindo células altamente especializadas, como neurônios.

A expressão dos componentes pode ser constitutiva ou induzida, dependendo do órgão/tecido ou do contexto (condição homeostática ou patológica) (Man SM., 2017; Mathur A., 2018; Yin Y., 2009). A ativação de PRRs (como os TLRs) ou de receptores para citocinas (tais como IL-1R, TNFR, IFNR1 e IFNR2) levam a transcrição gênica mediada pelo fator de transcrição NF-κB (*NLRP3*, *AIM2*, *PYCARD/ASC*, *CASP1*, *IL1B*, *MEFV*) ou pelos fatores induzidos por interferon (IFN), os IRFs (*NLRC4*, *IFI16*, *IL18*).

Além da regulação a nível transcricional outros mecanismos podem regular positivamente a ativação do inflamassoma, tais como a fosforilação e a ubiquitinação dos receptores (NLRP3, NLRC4) e dos outros componentes do complexo (Gong T., 2018; Kattah MG, 2017; Lopez-Casejon G., 2020).

Por outro lado, existem diversos mecanismos de regulação negativa como a expressão do microRNA (miR)-223 que inibe a tradução do mRNA do *NLRP3* (Bauernfeind F., 2012); a ubiquitinação dos receptores, de ASC e das caspases limitando assim a meia vida dessas proteínas (Kattah MG, 2017; Lopez-Casejon G., 2020); a fosforilação da pirina que a mantém em um estado inativo (Park YH., 2016) a nitrosilação de NLRP3 mediada pelo IFNs (Guarda G., 2009; Mishra BB., 2013; Guarda G., 2011). Proteínas endógenas também controlam a montagem e ativação do complexo, interagindo com os seus componentes, tais como a proteína CARD8 (Ito S., 2014).

Devido ao seu efeito pró-inflamatório a liberação de IL-1 β e IL-18 devem ser estritamente reguladas. Cada célula/tecido é caracterizada por seu próprio limiar de ativação (determinado pelos mecanismos regulatórios citados anteriormente) e, conseqüentemente, por um inflamassoma mais ou menos propenso a ser ativado.

Essas citocinas desempenham um papel importante na modulação da resposta imune inata e adaptativa.

A IL-1 β atua tanto em leucócitos, que em células não imunes presentes no local da inflamação, tais como epitélio, endotélio, ativando vias de sinalização que levam a produção de outros mediadores inflamatórios, como IL-6 e TNF, moléculas de adesão para migração de leucócitos, e fatores de crescimento, como o VEGF (Parikh AA., 1996; Rosenwasser LJ., 1998; Yazdi AS., 2016; Mantovani A., 2018).

Essa citocina atua também em nível sistêmico ativando a produção de moléculas de fase aguda pelos hepatócitos, induzindo a hematopoiese na medula óssea, o aumento da temperatura corpórea no hipotálamo e o incremento do catabolismo de proteínas. A combinação de IL-1 β e IL-6 leva a polarização do linfócitos T helper (Th) em Th17, uma sub-população de linfócitos T CD4+ responsável pelo recrutamento e ativação de neutrófilos (Yazdi AS., 2016; Acosta-Rodriguez EV., 2007).

Durante a resposta inflamatória, a IL-18 estimula e ativa os linfócitos (NK, do inglês, "*Natural Killer*") tanto na ação citotóxica que na produção de IFN- γ , além dos outros leucócitos residentes. Em conjunto com a IL-12, a IL-18 determina a

polarização dos linfócitos Th em Th1, uma sub-população de linfócitos T CD4+ responsável pela ativação de macrófagos, de linfócitos T CD8+ citotóxicos (Tc) e pela indução da produção de anticorpos de classe IgG pelos linfócitos B (Novick D., 2013; Yasuda K., 2019). A IL-18 desempenha também um papel importante na manutenção da homeostasia dos epitélios. Neste tecido a IL-18 é construtivamente produzida e induz a produção de fatores de defesa (tais como peptídeos antimicrobianos), de muco e regula as “gap-junctions”, desta forma preservando a continuidade da barreira anatômica (Garlanda C., 2013; Nowarski R., 2015; Mantovani A., 2019).

Dentro da resposta imune, o inflamassoma desempenha um papel chave na interação patógeno/hospedeiro, representando uma importante conexão entre resposta inflamatória e resposta adaptativa. Uma eficiente ativação do complexo é considerada protetora contra diversas infecções tanto bacterianas quanto virais, como demonstrado tanto em modelos experimentais e também por estudos de associação genética na população humana (Hayward JA., 2018; Fernandes FP., 2020).

Os mesmos mecanismos envolvidos na inflamação e na proteção do hospedeiro, no entanto, também podem causar (ou contribuir para) doenças caracterizadas por inflamação desregulada (aguda ou crônica).

Devido a capacidade em responder a DAMPs, o inflamassoma e as suas citocinas são apontados como principais contribuidores de inflamação em doenças crônicas, tais como obesidade e doenças metabólicas, doenças cardiovasculares, autoimunes, neurodegenerativas, e também no câncer (Mangan MSJ., 2018; Liu D., 2017; Karki R., 2017; Patel MN., 2017).

1.3 Inflamassoma e Câncer

No câncer, a atuação do inflamassoma ainda não é totalmente esclarecida e para alguns tipos oncológicos são reportados papéis controversos. No geral, a desregulação da inflamação é considerada uma característica importante na carcinogênese e diversas evidências sugerem que a ativação do inflamassoma possa atuar nas diferentes etapas da carcinogênese em alguns tipos de câncer (Karan D., 2018; Karki R., 2019).

O papel do inflamassoma no câncer está principalmente relacionado ao efeito pró-inflamatório das citocinas relacionadas a ativação do complexo, as interleucinas IL-1 β e IL-18 cujos níveis são encontrados frequentemente desregulados no

microambiente tumoral, como mencionado na (seção 1.1). Todavia, o inflamassoma, tanto suas citocinas como seus receptores, podem exercer um duplo papel em relação à carcinogênese, dependendo da célula envolvida na ativação, do tipo tumoral e ainda o estágio de tumorigênese que ele está sendo ativado.

Em relação a ação protetiva desencadeada pela ativação do inflamassoma, diversos estudos associam que a participação dos receptores NLRP3, NLRC4 e NLRP6 em modelos experimentais de carcinogênese de câncer colorretal, indica um papel protetor desses receptores, possivelmente mediado por IL-18 em relação a manutenção de uma homeostasia no epitélio intestinal (Allen IC., 2010; Hu B., 2010; Zaki MH., 2010; Normand S., 2011; Zaki MH., 2011). De acordo com outro estudo, as deficiências de ASC e caspase-1 podem ser responsáveis pelo desenvolvimento do câncer colorretal relacionado à colite, sugerindo que ASC e caspase-1 também apresentam funções protetoras no modelo inflamatório de câncer colorretal (Allen IC., 2010; Hirota SA., 2011).

Embora existam alguns trabalhos que mostram as funções de proteção dos inflamassomas contra alguns tipos tumorais, a maioria dos estudos na literatura apontam para um papel tumorigênico em relação a ativação do complexo (Wang Z., 2018; Karki R., 2017; Janowski AM., 2013).

Um exemplo do papel tumorigênico do inflamassoma é em relação a sua ativação no melanoma metastático, este é caracterizado por elevados níveis de IL-1 β . Essa citocina, inicialmente seria produzida pelos leucócitos infiltrantes, e em seguida liberada pelos próprios melanócitos transformados, onde a ativação do NLRP3 inflamassoma é constitutiva nos estágios avançados do tumor (Okamoto M., 2010). Além disso, foi demonstrada a importância do NLRP1 na progressão do melanoma, mas neste caso, o papel desse receptor não estaria relacionado à produção de citocinas, mas com a supressão de apoptose, (Zhai Z., 2017).

Além de estar envolvida na carcinogênese do melanoma a ação da IL-1 β , também, está associada em outros tipos tumorais como o câncer gástrico (Huang FY., 2016; Tu S., 2008) e de mama (Tulotta C., 2019; Eyre R., 2019).

Como recentemente revisado pelo nosso grupo de pesquisa, variantes genéticas nos receptores, nas moléculas efetoras e nas citocinas foram já associadas com a proteção ou risco em relação a diferentes tipos tumorais (Fernandes FP., 2020) (**Tabela 2**).

Na **Tabela 2** reportamos alguns exemplos dos dados da literatura sobre o envolvimento de alguns dos receptores do inflamassoma em diferentes tipos de câncer.

Tabela 2. Papel dos inflamassomas em diferentes tipos de câncer.

Receptores	Tipo de câncer	Efeito	Mecanismo Molecular Proposto
NLRP1	Melanoma (FeniniG.,2018; ZhaiZ.,2017; Verma D., 2012)	Promove a migração, processamento de IL-1 β , evasão de apoptose e hiperplasia. SNP em NLRP1 confere risco em relação ao melanoma	Processamento de IL-1 β , clivagem da Caspase-1, inibição das atividades da caspase-2, -3/7 e -9.
	Mama (Wei Y., 2017)	Alta expressão em biópsia de pacientes. Relacionado ao aumento de migração e invasão tecidual.	Não elucidado.
	Próstata (Kashyap M., 2015)	Aumento da expressão em modelo experimental de inflamação por injeção de formalina <i>in situ</i> .	Aumento nas expressões de IL-1 β , IL-18 e caspase-1.
	Cervical (PontilloA., 2016)	SNP em NLRP1 associado a uma menor oncogênese relacionada à infecção pelo HPV	Não elucidado.
	Colorretal (Cambui RAG., 2020)	SNP em NLRP1 confere risco em relação ao câncer colorretal	Não elucidado.
NLRP3	Cervical (He A., 2017; Pontillo A., 2016)	SNP associado a menor oncogênese relacionada à infecção pelo HPV. IL-1 β altamente expressa em um contexto inflamatório no tratamento com LPS.	Não elucidado.

	Colorretal (Du Q., 2016)	Ativação de NLRP3 promove invasão, migração de macrófagos infiltrantes em modelo experimental.	Clivagem da caspase-1, expressão e processamento de IL-1 β
	Gástrico (Li S., 2018;	NLRP3 melhora a proliferação de células epiteliais e a tumorigênese. Infecção por H. pylori suprime a expressão de miR-22 (regulador de NLRP3) SNPs em NLRP3 confere risco em relação ao câncer gástrico	Regulação de miR-22
	Melanoma (Lee HE., 2019; Okamoto M., 2010)	Potencial metastático do NLRP3, podendo regular tanto a migração tumoral como a invasão.	Liberação de IL-1 β , clivagem de Caspase-1, via NFK β .
NLRP6	Colorretal (Normand S., 2011)	Ausência de NLRP6 acelera a colite associada ao crescimento tumoral em modelo experimental.	Não elucidado
NLRC4	Colorretal (Hu B., 2010)	Possivelmente medeia a proliferação tumoral em camundongos com deficiência de caspase-1 e NLRC4	Não elucidado.
	Mama (Kolb R., 2016)	Aumento angiogênese, do fator de crescimento endotelial vascular em pacientes com câncer de mama associado a obesidade	O NLRC4 é ativado nas células mieloides infiltrantes de tumor aumentando IL-1 β .

O complicado e dimérico papel dos componentes do inflamassoma, tanto em relação aos diferentes modelos de estudo, quanto em resultados controversos e a falta de dados na literatura para alguns tipos tumorais, ressaltam a necessidade de mais estudos que visam desvendar a influência da modulação do inflamassoma no câncer.

Notavelmente, a disponibilidade de uma série de fármacos capazes de atuar no inflamassoma e nas suas citocinas, são atualmente alvos em diferentes estudos clínicos oncológicos em andamento, como por exemplo o uso do fármaco canakinumab, um anticorpo monoclonal específico para IL-1 β , em fase de testes clínicos para, câncer de pulmão de células não pequenas, câncer colorretal e câncer de mama (Litmanovich A., 2018).

1.4 Câncer Cervical

O Câncer Cervical (CC), também denominado como Câncer do Colo do Útero (CCU), compreende uma patologia, que se origina no colo do útero (cérvix), a qual se inicia a partir da desregulação do ciclo celular dos queratinócitos transformados da camada basal do epitélio uterino. Com a desregulação há um crescimento celular desordenado que pode levar ao aparecimento de lesões precursoras, as quais são denominadas histologicamente em neoplasias intraepiteliais cervicais, que varia de baixo até alto grau dependendo do comprometimento tecidual. Existem dois tipos principais de câncer cervical, o carcinoma de células escamosas, que representam entre 80% e 90% dos casos, e o adenocarcinoma, entre 10% a 20% dos casos (Doorbar J., 2005).

Segundo estimativas mundiais, o CC acomete milhares de mulheres anualmente, sendo o quarto tipo de câncer mais incidente em mulheres, atingindo cerca de 570 mil novos casos no ano de 2020. Neste mesmo ano foi classificado também como o quarto com maior mortalidade entre as mulheres, com cerca de 311 mil mortes (GLOBOCAN 2020; Bray F., 2018; Ferlay J., 2019) .

No Brasil foram registrados 16.710 novos casos de CC (7,5% de todos os casos de câncer em mulheres), sendo o terceiro tipo oncológico de maior incidência no ano de 2020. Levando a uma taxa de mortalidade de 6,1% entre todos os óbitos derivados de neoplasias em mulheres em 2020 (MS/INCA/Estimativa de Câncer no Brasil, 2020).

O principal fator etiológico associado ao CC é a infecção persistente do Papilomavírus Humano (HPV, do inglês, "*human papiloma vírus*"), um vírus cuja a principal via de transmissão é a sexual, e que é capaz de predispor os queratinócitos infectados a transformação neoplásica, sendo detectado em cerca de 99% dos casos dos câncer de colo do útero (Muller M., 1992; Wright TC., 1994; Walboomers JMI., 1999; zur Hausen H., 2002).

O HPV é um vírus de DNA circular de 8.000 pb, dupla-fita não envelopado com capsídeo icosaédrico, de 52-55nm de diâmetro, que infecta os queratinócitos da pele ou de mucosas, como a cervical ou oral (Baker TS., 1991; Fehrmann F., 2003). Pertencem à família *Papillomaviridae*, até o momento foram descritos mais de 200 tipos, e estes são agrupados nos gêneros Alpha-, Beta-, Nu-/Mu- e Gamma-papilovírus, de acordo com a sequência viral e o tropismo por diferentes tecidos epiteliais.

Destes, cerca de 30 tipos são capazes de infectar o epitélio cervical, podendo desenvolver lesões benignas tais como condilomas (vírus de baixo risco oncogênico), enquanto alguns, tais como os HPV-16 e HPV-18, denominados de vírus de alto risco oncogênico ou simplesmente oncogênicos, são frequentemente encontrados em lesões malignas como no CC (Doorbar J., 2006; Fehrmann F., 2003).

A história natural do CC inicia quando o HPV entra em contato com as camadas basais do tecido epitelial da cérvix uterina, através de micro lesões presentes durante o intercursos sexual (Frazer IH., 2004; McMurray HR., 2001).

De forma simplificada, após a infecção viral na camada basal do epitélio, ocorre a amplificação do seu genoma de forma independente do ciclo celular, dando origem a um número limitado de cópias, as quais são mantidas inicialmente de forma episomial (extra cromossômica), nesta etapa não há a presença de replicação da partícula viral (Doorbar J., 2012). Somente após a migração dos queratinócitos infectados para a camada de diferenciação epitelial que ocorre a replicação e expressão do genoma viral de forma intensa, desencadeando também a montagem de partículas virais e sua liberação, podendo infectar novas células, incluindo de tecidos subjacentes (Woodman CB., 2007).

O ciclo viral do HPV é dependente da diferenciação celular, dado que sua capacidade de infecção está diretamente ligada a reprogramação celular dos queratinócitos, utilizando a maquinaria de replicação celular para sintetizar seu próprio DNA (Fehrmann F., 2003; Hebner CM., 2006) e para expressar suas proteínas.

O ciclo viral produtivo inicia após a expressão das proteínas E1 e E2, essa última é capaz de se ligar a origem de replicação celular recrutando a helicase E1, gerando assim o complexo de replicação. A proteína E2 também atua como um fator de transcrição regulando a expressão de outras proteínas virais como E6 e E7 (Doorbar J., 2012; McMurray HR., 2001; Munger K., 1989). Em lesões benignas a replicação do genoma viral se mantém extra cromossômica, devido à expressão E2,

que regula negativamente a transcrição de E6 e E7 (Doorbar J., 2012; Frazer IH., 2004; Yoshinouchi MI., 1999).

Os HPVs oncogênicos codificam duas proteínas, E6 e E7, que são fundamentais na indução da transformação maligna das células infectadas, basicamente estimulando a divisão celular e evitando a apoptose das células infectadas, e portanto são classificadas como oncoproteínas (Boccardo E., 2010; Fehrmann F., 2003; Doorbar J., 2012).

A oncoproteína E6 derivadas de HPVs de alto risco, medeiam a degradação da proteína supressora de tumor p53, essa inativação impede a supressão do ciclo celular, comprometendo a resposta a dano do DNA e aumentando o risco de acúmulo de mutações no genoma do hospedeiro. A oncoproteína E7 por sua vez, se liga a proteína pRb, a qual deixa de regular negativamente o ciclo celular promovendo o aumento da replicação celular (Fehrmann F., 2003; Hebner CM., 2006; McBride AA., 2017).

A persistência viral e o acúmulo de alterações celulares permitem o desenvolvimento de lesões de alto grau e a progressão dos tumores. Antes do estabelecimento do CC, existe o desenvolvimento de lesões precursoras, denominadas de Neoplasias Intra-epiteliais Cervicais (NIC), que foram classificadas a partir do perfil histológico em três categorias, por Richart em 1967. Essa classificação leva em consideração o grau de comprometimento das alterações neoplásica epitelial. Se alterações celulares são observadas no terço inferior do epitélio a displasia é leve e considerada de baixo grau (NIC I); com o acometimento do terço médio do epitélio a lesão intra-epitelial é classificada como displasia moderada (NIC II) e se houver uma displasia acentuada que envolve todo o epitélio a lesão é considerada de alto grau (NIC III). Sendo que de 70% a 90% das neoplasias intra-epiteliais cervicais de baixo grau regridem espontaneamente (Clifford GM., 2005; Wright TC., 1990; Schiffman MI., 2016).

O exame mais usual para o rastreamento do CC é o “Papanicolau”, um exame citopatológico cérvico-vaginal convencional. Atualmente, se baseia no sistema de classificação citológica, sistema Bethesda, atualizado em 2001. Este reclassifica, a nomenclatura histológica esboçada por Richart, em novas categorias, as chamadas Neoplasias Intra-epiteliais Cervicais de grau I (NIC I) passaram a ser chamadas de Lesões Intraepiteliais Escamosas de Baixo Grau (do inglês, “Low Grade Intraepithelial Lesion” - LSIL), que respondem pela grande maioria das lesões. As NIC II e NIC III

foram agrupadas no grupo das Lesões Intraepiteliais Escamosas de Alto Grau (HGSIL) (do inglês, “High Grade Intraepithelial Lesion” HGSIL) (Clifford GM., 2005; Wright TC., 1990; zur Hausen H., 2002).

Em países onde são disponíveis medidas de rastreio e prevenção, como o exame de Papanicolau, como na América do Norte e Europa a taxa de mortalidade associada a CC está sendo drasticamente reduzida, atingindo uma taxa de incidência inferior de 9 a cada 100 mil habitantes (Vaccarella S., 2017). Por outro lado, nos países considerados de baixa renda, onde tem escassez de programas de rastreio e tratamento adequado, o CC é uma das causas mais comum de morte por câncer entre a população feminina.

Contudo, mesmo que a infecção persistente por HPV seja o principal fator etiológico associado ao CC, essa infecção é considerada como um fator necessário mas não suficiente para o desenvolvimento de tumores de colo uterino, dado que apenas em uma reduzida parcela de mulheres infectadas por HPV é observado o desenvolvimento do câncer, o que indica a participação de outros fatores, como comportamentais (tabagismo, múltiplos parceiros, início precoce da atividade sexual, condições sócio/econômica, utilização prolongada de contraceptivos orais), imunológicos e genéticos, possam contribuir no desenvolvimento patológico do CC (Chelimo C., 2013; Franco EL., 1999; Rodriguez AC., 2008; Tota JE., 2011; Walboomers JM., 1999; zur Hausen H., 2002).

O sistema imunológico desempenha um papel central na determinação do desfecho da infecção por HPV e seus componentes são importantes tanto na depuração viral quanto na carcinogênese.

A ativação imune, desenvolve uma função importante na eliminação dos queratinócitos infectados por HPV, através da detecção pelos PRRs citosólicos e ativação da resposta imune antiviral (principalmente, produção de IFN-I, ativação de células NK), mas em alguns casos essa resposta não é suficiente para a contenção viral (Sasagawa T., 2012; Feller L., 2012; Hopcraft SE., 2017).

O HPV apresenta diversos mecanismos de evasão do sistema imune, principalmente através da ação das oncoproteínas E6 e E7, que são capazes de modular a produção de citocinas e quimiocinas (através da inibição de NF-kB) (Stone SC., 2014; Frazer IH., 2009), alterar a apresentação de antígenos e inibir a sinalização dos receptores da imunidade inata e de IFN-I. Desta forma, a resposta antiviral e de imunovigilância antitumoral mediada pelas células da imunidade inata, células NK e

da imunidade adaptativa (resposta Th1) é reduzida, contribuindo para a consequente falha na eliminação viral (Boccardo E., 2010; Hasan UA., 2013).

1.5 Inflamassoma e Câncer Cervical

Devido ao seu papel anti-viral (Mathur A., 2018), a sua expressão nos queratinócitos (Hasegawa T., 2016; Reinholz M., 2013) e nas células imunes associadas a mucosa (macrófagos residentes, células de Langherans, células dendríticas, mastócitos), além do papel descrito na carcinogênese de outros tumores (Wang Z., 2018; Karki R., 2017), o inflamassoma foi apontado como um dos mecanismos envolvidos na carcinogênese de CC.

Quanto ao papel desenvolvido pelo inflamassoma na infecção por HPV, Niebler e colegas em 2013 demonstraram que a oncoproteína E6 do HPV regula negativamente a produção de IL-1 β através da aumento da ubiquitinação dessa citocina e degradação via proteassoma em queratinócitos humanos primários imortalizados por HPV-16 (Niebler M., 2013). Um mecanismo semelhante também foi descrito recentemente em relação a ubiquitinação do receptor IFI16, mas neste caso via oncoproteína E7 do HPV-18, desencadeando a inibição da piroptose (Song Y., 2020)

Em contrapartida, também, foi postulado que a própria oncoproteína E6 seria capaz de induzir a transcrição do gene *IL1B*, levando a um aumento de liberação da IL-1 β na sua forma ativa (Ainouze M., 2018).

O receptor de DNA citoplasmático AIM2 foi apontado como responsável pela detecção do HPV-16 em queratinócitos desencadeando um aumento da liberação de IL-1 β (Reinholz M., 2013).

Recentemente, o nosso grupo de pesquisa do Laboratório de Imunogenética da USP, demonstrou a associação significativa entre variantes genéticas nos genes dos receptores *NLRP1* e *NLRP3* (que levam a aumento de ativação do inflamassoma) com um aumento de resistência a infecção pelo HPV (Pontillo A., 2016), sugerindo a ideia que uma boa ativação do complexo contribui para a eliminação viral.

Com relação ao CC em si, inicialmente os estudos associaram a presença polimorfismos de base única (SNPs) relacionados a uma maior expressão de IL-1 β com o risco de desenvolver o câncer (Qian N., 2010; Al-Tahhan MA., 2011; Dutta S., 2015; Wang L., 2019), mas também a uma maior capacidade de eliminar HPV de alto

risco oncogênico (HPV-16, e HPV-18) reduzindo então um dos fatores de risco para CC (Pontillo A., 2016). O aumento significativo de IL-1 β no plasma também já foi correlacionado tanto em mulheres com CC como e mulheres com idade avançada com persistência viral do HPV16/HPV18 (Qian N., 2010; Al-Tahhan MA., 2011; Kemp TJ., 2010).

Por outro lado, a reduzida expressão gênica de *IL1B* e *IL18* em biópsias foi associada ao maior risco de desenvolver o CC (Matamoros JA., 2019). De acordo com esse dado, SNPs que correlacionam com um baixo nível plasmático da IL-18 são mais frequentes em pacientes com CC em relação ao grupo controle (Qi T., 2008).

Esses dados aparentemente contrastantes podem ser explicados considerando o momento da carcinogênese analisada, uma resposta imune eficaz é crucial contra a infecção viral, mas pode ser deletéria no processo de desenvolvimento do CC.

Quanto ao papel discordante das duas citocinas do inflamassoma, elevados níveis de IL-1 β estão frequentemente associados com inflamação crônica, enquanto que a IL-18 pode desempenhar um papel importante na resposta anti-tumoral, mas também homeostático, como demonstrado em epitélios (Fabbi M., 2015; Wang Z., 2018).

Ainda assim, inúmeros pontos permanecem obscuros, como por exemplo, quais células do microambiente tumoral estariam produzindo as duas citocinas e quais receptores desencadeariam essa ativação do inflamassoma na carcinogênese de CC.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Investigar a contribuição do inflamassoma no microambiente tumoral do Câncer Cervical associado ao HPV.

2.2 Específicos

1. Avaliar a distribuição genética de polimorfismos de base única (SNPs) nos genes do complexo inflamassoma em pacientes e relacioná-los com risco ou proteção ao desenvolvimento de Câncer Cervical;
2. Avaliar a ativação do inflamassoma em linhagens celulares de Câncer Cervical e monócitos humanos em ensaios de co-cultivo *in vitro* (modelo de microambiente tumoral);
3. Identificar um possível mecanismo de ativação do inflamassoma no microambiente tumoral.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostras biológicas de doadores de sangue

Concentrados de leucócitos após plaquetaferese (câmaras LRS) de 39 voluntários saudáveis (23 homens/ 16 mulheres; $48,64 \pm 9,27$ anos) foram obtidos no Instituto de Hemoterapia do Hospital Alemão Oswaldo Cruz de São Paulo (SP, Brasil). Os voluntários preenchiem os requisitos básicos para a doação de sangue estabelecidos pelo Ministério da Saúde e assinaram antes da doação de sangue/plasma, o TCLE (Termo de Consentimento Livre Esclarecido) aprovado pela própria instituição, onde estes, aceitaram doar o excedente do material biológico coletado para fins de pesquisas.

Os dados obtidos destes indivíduos foram compilados e mantidos em um banco de dados disponibilizado no laboratório de Imunogenética do Instituto de Ciências Biomédicas/USP, seguindo as normas de bioética em pesquisa envolvendo seres humanos, como confidencialidade das informações obtidas.

3.2 Isolamento e cultura de monócitos

A partir das amostras das câmaras LRS (cerca de 5 mL de concentrados de leucócitos), foram obtidas as células mononucleares de sangue periférico (PBMC, do inglês, "*Peripheral Blood Mononuclear Cells*") por meio do gradiente de densidade Ficoll-Paque de acordo as instruções do fabricante (GE Healthcare, Biosciences AB, Durhman, NC, EUA), seguido por centrifugação de 800xg durante 20 minutos. As PBMC assim obtidas, foram resuspendidas em tampão fosfato-salino (PBS, do inglês, "*phosphate buffered saline*"), (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e centrifugadas a 250xg por 10 minutos para lavagem das células.

A avaliação da viabilidade celular foi averiguada através da coloração de uma alíquota de cada amostra com Azul de Trypan (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e a posterior observação em câmara de Neubauer por microscopia óptica (Nikon, 50/60 Hz, Japan). Das 39 camaras LRS utilizadas obtivemos uma média de 6×10^8 PBMC por indivíduo, com perda de viabilidade inferior a 10%.

Foram distribuídas 4×10^6 PBMC/mL em placas de cultura (Corning, MA-EUA) de 24 poços (1 mL/poço) ou em placa de 96 poços (0,2 mL/poço). Os monócitos foram então separados das demais células, por meio de adesão em superfície plástica. Após

duas horas em estufa a 37°C com 5% CO₂, as células não aderidas foram eliminadas através de três lavagens com PBS 1X e mantidas em temperatura ambiente.

As células aderidas (principalmente monócitos) foram mantidas em cultura em meio RPMI-1640 contendo 10% de soro fetal bovino (FBS do inglês, "*Fetal Bovine Serum*"), (RPMI-10% FBS), (Gibco, Thermofisher Scientific) durante 16-18 horas antes dos ensaios descritos a seguir.

Para os ensaios de co-cultivo, os monócitos foram retirados da placa de cultura adicionando uma solução de PBS1X contendo 0,5 mM de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), durante 15 minutos em estufa a 37°C com 5% CO₂, com subsequente lavagem com PBS1X e centrifugação a 250xg por 10 minutos.

Figura 2. Análise morfológica de monócitos. Microscopia ótica de monócitos isolados de sangue periférico de indivíduo saudável. É mostrado em um aumento de 100X.

3.3 Cultura de linhagens celulares de Câncer Cervical

Três linhagens celulares imortalizadas de CC foram utilizadas neste trabalho, sendo elas, HeLa (ATCC-CCL-2) originária de um adenocarcinoma cervical, contendo o genoma de HPV18, SiHa (ATCC-HTB-35) originária de um carcinoma escamoso cervical, contendo o genoma de HPV16 e a C33-A (ATCC-HTB-31) originária de um carcinoma escamoso cervical, negativo para HPV, mas com mutação no gene de *p53*.

As linhagens celulares foram cedidas pelo do Laboratório de Imunomodulação/ICB/USP e mantidas em cultura, em meio de cultura RPMI-10% FBS em estufa a 37°C, com 5% de CO₂.

As células foram utilizadas na quarta passagem de cultura, após atingir uma sub-confluência de 70-80% (da área de cultura de uma garrafa de 25 mL).

Figura 3. Análise morfológica das linhagens celulares de Câncer Cervical. Microscopia ótica de **(A)** SiHa (ATCC-HTB-35) originária de um carcinoma escamoso cervical, contendo o genoma de HPV16; **(B)** HeLa (ATCC-CCL-2) originária de um adenocarcinoma cervical, contendo o genoma de HPV18; e **(C)** C33-A (ATCC-HTB-31) originária de um carcinoma escamoso cervical. É mostrado em um aumento de 10X.

3.4 Isolamento de RNA e análise da expressão gênica relativa através de sondas fluorescentes gene específicas e qPCR

O RNA total foi isolado de 2×10^5 monócitos e células da linhagem celular de CC, SiHa, usando o kit RNAqueous-Micro (Ambion, Thermo Fisher Scientific), de acordo com as instruções do fabricante e quantificado usando Nanodrop N-2000 (Agilent). A concentração de $0,5 \mu\text{g}$ de RNA total foi convertido em cDNA usando o kit Superscript III RT (Applied Biosystems, CA-USA). Os genes *IL1B*, *IL18*, *NLRP1*, *NLRP3* e *GAPDH* foram amplificados usando sondas fluorogênicas gene-específicas de tipo TaqMan® (Applied Biosystems) (**Tabela 3**) e qPCR no dispositivo QuantStudio 3.0 Real-time PCR (Applied Biosystems). O gene GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) foi utilizado como controle endógeno de amplificação e para normalização da quantidade de mRNA por reação.

O software QuantStudio 3.0 foi utilizado para obter os valores de Cycle Threshold (CT). Os dados brutos de (CT) foram normalizados a partir da expressão do gene endógeno GAPDH (ΔCT). Os genes foram utilizados para avaliação da expressão basal.

Tabela 3. Sondas de expressão gênica utilizadas para análise de monócitos e linhagem celular de Câncer Cervical. Os genes, os números de identificação das sondas utilizadas no ensaio de expressão e as localizações cromossômicas dos genes.

Gene	ID sonda de expressão	Localização no cromossomo
<i>GAPDH</i>	hs02758991	Chr.12: 6534405 – 6538375
<i>IL1B</i>	hs01555410	Chr.2: 112829758 – 112836842
<i>IL18</i>	hs01038788	Chr.11: 112143251 – 112164117
<i>NLRP1</i>	hs00248187	Chr.17: 5501399 – 5584512
<i>NLRP3</i>	hs00366465	Chr.1: 247416156 – 247449108

3.5 Análise *in silico* da expressão gênica do inflamassoma em Câncer Cervical

O software GEPIA (do inglês, “*The Gene Expression Profile Interactive Analysis*”, (<http://gepia.cancer-pku.cn/>) foi utilizado nas análises *in silico*, ele consiste em uma ferramenta baseada na web para fornecer recursos rápidos e customizáveis para análise de dados de expressão gênica contidos em bancos de dados públicos de tecidos tumorais (“*The Cancer Genome Atlas*”-TCGA) e de tecidos de indivíduos saudáveis (“*Genotype-Tissue Expression*”-GTEx).

O GEPIA foi utilizado tanto para análise da expressão diferencial dos genes do inflamassoma (*IL1B*, *IL18*, *NLRP1*, *NLRP3*, *NLRP4*, *NAIP*, *AIM2*, *CARD8*, *MEFV*, *CASP1*, *CASP4*, *CASP5* e *GSDMD*), entre amostras de tecido do cérvix uterino tumoral de CC, incluído amostras de carcinoma de células escamosas cervicais e adenocarcinoma endocervical (CESC) (n=306) e tecido do colo do útero “normal” (n=13), quanto para analisar a sobrevida global de pacientes com CESC/CC agrupados de acordo com o grau de expressão (baixa ou alta) dos genes do inflamassoma selecionados (n=292).

O teste t de Student foi usado para realizar a análise de expressão diferencial e o teste Log-rank, também conhecido como teste de Mantel-Cox, foi usado para realizar a análise de sobrevida. A proporção de risco cox proporcional (HR) e as informações do intervalo de confiança de 95% estão incluídas no gráfico de sobrevida. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo para ambas as análises.

3.6 Avaliação da ativação e inibição do inflamassoma

Com o intuito de avaliar a modulação do inflamassoma nos monócitos e nas linhagens de Câncer Cervical utilizadas nesse trabalho, foram dosadas as concentrações das citocinas IL-1 β e IL-18 nos sobrenadantes de cultura. A produção dessas citocinas é dependente da ativação do inflamassoma e portanto representam uma medida indireta da ativação do complexo.

Os dois tipos celulares foram também estimulados com 1 μ g/mL de lipopolisacarídeo bacteriano (LPS, *Escherichia coli* cepa 0111:B4; Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) por 24 horas eventualmente seguido por 15 minutos de 1 mM adenosina trifosfato (ATP; Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) como controle positivo de ativação do receptor do inflamassoma, NLRP3 (Gattorno M., 2007). O tempo de 24 horas foi definido após padronização (**Figura 4**).

A produção de TNF- α , uma citocina independente da montagem do complexo inflamassoma, foi também mensurada no sobrenadante de cultura como controle de ativação celular pró-inflamatória.

Alguns ensaios foram executados na presença de um inibidor amplo do inflamassoma, o Parthenolide (PTD; Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) que atua tanto a nível transcricional, inibindo o NF- κ B, que pós-transcricional, afetando a montagem do complexo, através da inibição de caspase-1 (Juliana C., 2010); ou de um inibidor específico para NLRP3, o MCC-950 (InvivoGen) (Coll RC., 2015). As padronizações das inibições em monócitos estão apresentadas nos **apêndices A e B** respectivamente.

As células foram tratadas com 10 μ M PTD por 15 minutos ou 10 μ M MCC-950 por 1 hora, ambos foram adicionados antes dos ensaios de co-cultivo.

Figura 4. Padronização da produção de IL-1 β a partir a ativação do inflamassoma NLRP3 por monócitos de indivíduos saudáveis na presença da combinação de LPS+ATP. São reportados os resultados (individuais) da dosagem de IL-1 β nos sobrenadantes de cultura de monócitos isolados de 9 indivíduos saudáveis com a estimulação com 1 μ g/ml LPS + 1mM ATP por 0, 3, 8 e 24 horas. O teste 2-way Anova foi aplicado para analisar as diferenças de produção de IL-1 β entre as condições.

3.7 Avaliação do efeito do Meio Condicionado (MC) na ativação do inflamassoma em monócitos

Para obtenção do meio condicionado (MC), foi utilizado o sobrenadante de cultura das linhagens celulares em monocamada (quarta passagem na fase de sub-confluência de aproximadamente 70%). Foi constituído um “pool” do sobrenadantes (correspondente a um total de 20 mL) para cada linhagem, e alíquotas foram armazenadas em -80°C.

Foram cultivados $6,5 \times 10^4$ monócitos de 9 indivíduos saudáveis por 1, 3, 8, e 24 horas em RPMI-10% SFB, na presença de porcentagens crescentes de MC (0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100%) obtido das linhagens SiHa, HeLa e C33-A. A concentração de IL-1 β foi avaliada nos sobrenadantes de cultura após os tempos específicos dos estímulos por ELISA.

3.8 Análise da ativação do inflamassoma no co-cultivo de monócitos com linhagens celulares de Câncer Cervicalem monocamada (2D)

As três linhagens celulares de CC, (SiHa, HeLa e C33-A), em sub-confluência de até 70% foram desaderidas adicionado a solução de 0,25% Trypsin-EDTA (1X) (Gibco, Thermofisher Scientific, CA, EUA) a 37°C em 5% de CO₂ durante 5 minutos.

Posteriormente foi realizada uma contagem em câmara de Neubauer, e as células foram distribuídas na concentração de $1,25 \times 10^5$ células/poço, como padronizado a seguir, em placas de cultura de 96 poços. Após 24 horas de cultivo em RPMI-10%FBS, foram adicionados os monócitos.

Os monócitos foram desaderidos da placa de cultura por meio da adição de uma solução de PBS com 0,5 mM EDTA (RINSE) por 15 minutos a 37°C em 5% de CO₂. Em seguida os monócitos foram contados na câmara de Neubauer, e $6,5 \times 10^4$ células/poço foram distribuídas na placa de cultura de 96 poços contendo as linhagens celulares em monocamada. A concentração de IL-1 β foi avaliada nos sobrenadantes de cultura após 24 horas por ELISA.

Para determinar a concentração celular ideal para os seguintes ensaios, foi realizado um experimento de padronização em duas concentrações celulares diferentes ($1,25 \times 10^5$ e $2,5 \times 10^5$ células/poço), os quais não apresentaram diferença estatística em nenhum dos parâmetros analisados.

A partir destes achados decidimos selecionar a concentração celular de $1,25 \times 10^5$ células/poço para os seguintes ensaios. Estes dados são reportados na **Figura 5**.

Figura 5. Padronização do co-cultivo em monocamada das linhagens celulares (C33-A, SiHa e HeLa) em duas concentrações, frente ao estímulo clássico de ativação do inflamassoma (LPS). São reportados os resultados da dosagem de IL-1 β nos sobrenadantes de cultura das linhagens de Câncer Cervical(C33-A, SiHa e HeLa) em duas concentrações celulares ($1,25 \times 10^5$ e $2,5 \times 10^5$ células por poço) não estimuladas (NE) ou com estimulação de 1 μ g/ml LPS por 24 horas. O teste 2-way Anova foi aplicado para analisar as diferenças de produção de IL-1 β entre as condições.

3.9 Análise da ativação do inflamassoma no co-cultivo de monócitos com linhagens celulares de Câncer Cervical em esferoide (3D)

As células das três linhagens de CC, em sub-confluência de até 70% foram desaderidas adicionado à solução de 0,25% Trypsin-EDTA (1X) (Gibco, Thermofisher Scientific, CA, EUA) a 37°C em 5% de CO₂ durante 5 minutos. Posteriormente foi realizado uma contagem em câmara de Neubauer, e as células foram distribuídas em placas de 96 poços fundo “U” (Kasvi-TPP, Suíça) com 50µL de Agarose 1% já previamente adicionada em cada poço. Em duas concentrações diferentes, segundo o protocolo já previamente padronizado no Laboratório de Imunomodulação/ICB/USP. Sendo, 5x10³/poço de SiHa e HeLa e 1,5 x10⁴/poço de C33-A. Devido a diferenças biológicas entre as linhagens celulares (morfologia celular e taxa de crescimento), foi realizado o ajuste no número de células usadas para a formação dos esferoides, a fim de, gerar culturas com condições semelhantes.

Para auxiliar na formação dos esferoides, as placas de cultura foram submetidas a um processo de centrifugação em 250xg durante 5 minutos. Posteriormente mantidas em cultura a 37°C em 5% de CO₂ durante 4 dias (**Figura 6A**).

Após os 4 dias, 6,5x10⁴ monócitos obtidos de indivíduos saudáveis foram distribuídos em poços de placa de cultura de 96 poços fundo “U” contendo as três linhagens celulares de CC, (SiHa, HeLa e C33-A), já previamente cultivadas em modelo tridimensional (**Figura 6B**).

A concentração de IL-1β foi avaliada nos sobrenadantes de cultura após 24 horas por ELISA.

Figura 6. Análise morfológica dos esferoides isolados e em co-cultivo com monócitos. Microscopia ótica de **(A)** do esferoide da linhagem SiHa (ATCC-HTB-35) originária de um carcinoma escamoso cervical, contendo o genoma de HPV16. **(B)** do esferoide da linhagem SiHa na presença de monócitos derivado de um indivíduo saudável. Em aumento de 4X.

3.10 Tratamento dos eferoides com IL-1 β recombinante humana

Os eferoides da linhagem celular SiHa foram tratados com 150 e 300 pg/mL de IL-1 β recombinante humana (rh) (Peprotech) por 24, 48 ou 72 horas. Tais concentrações foram utilizadas com base nos resultados prévios obtidos, demonstrados nesta dissertação em relação a produção de IL-1 β nos ensaios de co-cultivo.

O crescimento do esferoide da linhagem SiHa (crescimento tumoral) foi avaliado por análise de imagem (Chen W., 2014; Costa EC., 2014). As culturas foram fotografadas com o microscópio Eclipse Ti e a câmera embutida (Nikon). O software AxioVision Rel 4.8 (Zeiss) foi usado para medir a área esferoide. Os dados são apresentados em Pixel².

3.11 Detecção de citocinas por ELISA

As concentrações das citocinas IL-1 β , IL-18, TNF- α e da alarmina IL-1 α foram avaliadas no sobrenadante de cultura com auxílio de ensaios imunoenzimáticos (ELISA) comerciais de acordo com o protocolo dos fabricantes.

Para avaliação da ativação do inflamassoma foram dosadas a IL-1 β (Human IL-1 β ELISA MAXTM Deluxe; Biolegend) e a IL-18 (Human IL-18 DuoSet da R&D Deluxe). Para avaliação da ativação pró-inflamatória não relacionada ao inflamassoma foi dosado o fator de necrose tumoral TNF- α (Human TNF ELISA eBioscience/Thermo Fischer Scientific). Como exemplo de DAMP foi dosada a alarmina IL-1 α (Human IL-1 α ELISA kit; R&D systems).

Os resultados dos ELISAs foram obtidos por meio de leitura do valor de absorbância no comprimento de onda de 450nm através de um espectofotômetro de microplacas (SpectraMax, Molecular Device, CA-USA). As concentrações das citocinas foram inferidas a partir de uma curva de absorvância executada com 6 diluições seriadas a partir de 250 pg/mL de citocina (para ELISA de IL-1 β), 750 pg/mL (para ELISA de IL-18) ou 500 pg/mL (para ELISA de TNF, IL-1 α). A leitura do valor de absorbância no comprimento de onda de 570 nm foi utilizado para normalizar os dados.

3.12 Avaliação da liberação de LDH

A liberação de lactato desidrogenase (LDH) no sobrenadante de cultura foi utilizada como um indicativo de perda de integridade da membrana plasmática e morte celular. O Pierce™ LDH Citotoxicidade Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) foi utilizado para medir o LDH, de acordo com o protocolo do fabricante.

O resultado foi obtido por meio de leitura do valor de absorbância no comprimento de onda de 490 nm através de um espectofotômetro de microplacas (SpectraMax, Molecular Device, CA-USA). A leitura do valor de absorbância no comprimento de onda de 680 nm foi utilizado para normalizar os dados .

A quantidade de LDH liberado pelas células completamente lisadas (por adição do Lysis Buffer em dotação ao kit) representa o 100% de liberação em cada ensaio, e os demais dados foram calculados como porcentagem de liberação de LDH comparada ao 100%.

A padronização da liberação de LDH em monócitos, com ou sem a presença de ativadores clássicos tanto do inflamassoma como de NLRP3 está disponível no **Apêndice C**.

3.13 Casuística para estudo de genotipagem

Amostras de DNA genômico de 107 mulheres diagnosticadas com Câncer Cervical (CC) ou neoplasias intra-epiteliais cervicais (NIC) da área geográfica metropolitana de Campinas/São Paulo (sudeste do Brasil) e Goiás (centro-oeste do Brasil) foram recrutadas de acordo com o Comitê de Ética Institucional. Destas, 51 mulheres apresentavam neoplasias intra-epiteliais cervicais de moderada e severa (NIC2 e NIC3, respectivamente) e 56 pacientes com Câncer Cervical (carcinoma de células escamosas/CEC e adenocarcinomas/AD). Estas amostras foram gentilmente doadas pela Professora Dra. Silvia Helena Rabelo Dos Santos (Universidade Federal de Goiás, Brasil - UFG) e pela Professora Dra. Lara Termini (Universidade de São Paulo, Brasil - USP). Uma descrição resumida da coorte está reportada na **Tabela 4**

Tabela 4. Características clínicas da coorte de pacientes com neoplasias intraepiteliais cervicais e Câncer Cervical. São reportados os dados de positividade a infecção pelo HPV (HPV+), diagnóstico de CC ou neoplasia intraepitelial cervical (NIC). As sub-classificações de CC em lesões cervicais escamosas (CEC) e adenocarcinomas (AD), e das NIC em nível 2 e 3 são também indicadas.

Característica	Pacientes
Número total	107
HPV +	107
CC	56
CEC	15
AD	41
Lesões precursoras	51
NIC 2	22
NIC 3	29

3.14 Seleção dos polimorfismos de base única (SNPs) nos genes do inflamassoma e genotipagem

Foram analisados 7 polimorfismos de base única (SNP) em 6 genes (*NLRP1*, *NLRP3*, *AIM2*, *CARD8*, *IL1B*, *IL18*) do complexo inflamassoma, de acordo com os dados previamente publicados pelo nosso grupo de pesquisa (Pontillo A., 2016) e outros grupos (Qian N., 2010; Dutta S., 2015; Wang L., 2019; Al-Tahhan MA., 2011) em relação a infecção por HPV e/ou a progressão ao CC (**Tabela 5**).

A genotipagem dos SNPs foi efetuada com ensaios alelo-específicos do tipo TaqMan® e qPCR no equipamento de PCR em tempo real QuantStudio 3.0 (Applied Biosystems, Termo Fisher Scientific), de acordo com as instruções do fabricante. O software do equipamento foi utilizado para a discriminação alélica.

Tabela 5. Dados dos polimorfismos escolhidos para o estudo de associação genética. Número de identificação de polimorfismo (ID), posição cromossômica (baseado no sequenciamento GRCh38.p12), a variação de nucleotídeo correspondente no nível genômico (g.) nível de transcrito (c.) nível de aminoácidos, o efeito funcional quando conhecido e associação prévia com a infecção por HPV ou em relação ao CC, são relatados para todos os polimorfismos. Para cada gene são indicados o nome atual, o locus cromossômico, o gene Refseq e/ou transcrito Refseq e/ou proteína. Os dados sobre o efeito funcional do polimorfismo foram obtidos na literatura.

Gene e SNP ID	Variação	Efeito	Associação com HPV	Associação com CC
<i>NLRP3</i> rs10754558	g.247448734 G>C c.*230 G>C	Maior estabilidade do RNA do NLRP3 (Hitomi Y., 2009); Menor ligação do miR-223 e miR-4273 (Shen C, 2019)	Proteção (Pontillo A., 2016)	Não
<i>CARD8</i> rs2043211	g.48234449 A>T c.30 T>A p.(Cys32ter)	Aumentada liberação de IL-1 β (Roberts RL., 2011)	Não	Não
<i>AIM2</i> rs703154	g.1590703406 C>A c.94 G>T p.(Glu32Ter)	Sem efeito descrito	Não	Não
<i>IL1B</i> rs16944	g.112837290 A>G c.-511 T>C	Aumentada produção de IL-1 β (Hall SK., 2004)	Não	Risco Qian N., 2010; Dutta S., 2015; Wang L., 2019 Al-Tahhan MA., 2011
<i>IL18</i> rs5744256	g. 112152125 A>G c.91+1467 T>C	Menor nível plasmático de IL-18 (Martinez-Hervas S., 2015; Frayling TML., 2007)	Não	Não

3.15 Análise estatística

Os dados obtidos foram coletados e analisados em pelo menos três experimentos independentes. O teste de normalidade foi aplicado aos dados e a análise não paramétrica foi utilizada. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparar 2 grupos de dados, o teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar três ou mais grupos, seguido de pós-teste de múltiplas comparações. O teste t múltiplo foi usado para experimentos de curso de tempo. O valor de $p < 0,05$ foi considerado

estatisticamente significativo. Os cálculos foram realizados no software GraphPad Prism 7.0.

A distribuição de frequência dos SNPs de genotipagem foi efetuada por meio de análise multi-variada e modelo geral linear (GLM, do inglês "*General Linear Model*") com auxílio do programa R-project (versão 3.2.2) e do pacote SNPAssoc (versão 1.5-2). O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4. RESULTADOS

4.1 Variantes polimórficas nos genes *NLRP3* e *IL1B* estão associadas ao desenvolvimento de Câncer Cervical

Levando em consideração que a genética do indivíduo pode afetar o nível de ativação do inflamassoma e que variantes genéticas nos componentes do inflamassoma foram encontradas em associação com o Câncer Cervical ou com a infecção pelo HPV, um dos maiores fatores de risco para o desenvolvimento de CC (Wang L., 2019; Dutta S., 2015; Qian N., 2010; Al-Tahhan MA., 2011 Zhang X., 2014; Pontillo A., 2016) (**Tabela 2**). Inicialmente foi executada uma réplica do estudo de associação anterior efetuado pelo nosso grupo de pesquisa, em uma coorte de mulheres (n=107) procedentes das regiões sudeste e centro-oeste do Brasil com diagnóstico de CC ou neoplasia intra-epitelial cervical (NIC-2 ou NIC-3) (**Tabela 4**).

Foi efetuada a genotipagem através de PCR em tempo real e sondas alelo-específicas. A discriminação alélica permitiu a determinação da distribuição dos genótipos dos 7 polimorfismos selecionados entre os grupos de mulheres com CC (n=56) e com lesões precursoras (NIC-2 ou NIC-3) (n=51).

Dentre os SNPs analisados, foi encontrado uma associação significativa ($p \leq 0,05$) entre os polimorfismos *IL1B* rs16944 G>A e o *NLRP3* rs10754558 C>G e o desenvolvimento do CC ($p = 0,043$ e $0,018$, respectivamente).

A frequência do rs16944 resultou maior no grupo de CC comparado ao grupo de lesões precursoras (NIC). As mulheres que carregavam o SNP rs16944 em homozigose (A/A) apresentaram um risco aumentado de desenvolver o CC de quase 3 vezes (O.R. = 2,84) em comparação com as mulheres sem o polimorfismo (G/G) ou heterozigotas pelo alelo A (G/A).

Ao contrário, a frequência do SNP rs10754558 C>G resultou menor no grupo CC em relação ao grupo de mulheres com lesões precursoras (NIC). As mulheres que carregavam o SNP em homozigose para o alelo polimórfico (G/G) apresentaram um risco reduzido de desenvolver o CC (O.R. = 0,26) comparado com as mulheres sem o polimorfismo (C/C) ou heterozigotas para o alelo G (C/G).

A comparação da distribuição de outros SNPs nos demais receptores e também na citocina IL-18, não apresentou resultados significativos em nossa coorte.

Devido ao número limitado de amostras de DNA, decidimos não comparar a distribuição dos SNPs entre as formas histológicas de CC (CEC e AD) nem entre as

neoplasias intra-epiteliais cervicais (NIC-2 e NIC-3). Todos os resultado das análises multi-variadas são reportados na **Tabela 6**.

Considerando que entre os SNPs selecionados, alguns estão em desequilíbrio de ligação (Fernandes FP., 2020), executamos a análise de associação também com os haplótipos dos SNPs de *NLRP1* (rs12150220 e rs2670660), porém não resultou em nenhum dado significativo.

Em seguida, realizamos uma análise de interação entre os SNPs em genes diferentes e observamos a associação significativa para a interação entre os SNPs rs10754558 e rs16944 ($p = 0,042$) e rs10754558 e rs12150220 ($p = 0,042$) de acordo com o modelo “co-dominante” de herança. Entretanto, quando foi comparada a combinações de genótipos, não foi detectada diferença estatisticamente significativa. Tanto a combinação dos genótipos em homozigose para o alelo polimórfico de rs10754558 (G/G) e rs16944 (A/A) que a dos rs10754558 (G/G) e rs12150220 (T/T) resultou em um valor de Z de 0,99. Esses resultados são reportados em detalhes no **Apêndice D**.

Tabela 6. Resultados da análise para a associação dos SNPs do inflamassoma com variáveis clínicas de pacientes com neoplasias intraepiteliais cervicais e Câncer Cervical. A análise multivariada foi realizada para 7 SNPs do inflamassoma. Gene ID, polimorfismo de nucleotídeo único (SNP), distribuição de genótipos e haplótipos (frequência), valor p, Odds Ratio (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC) de acordo com um modelo de herança recessiva para o alelo são relatados em menor quantidade.

Gene ID	SNP ID	Genótipo	NIC (número absoluto) (frequência)	CC (número absoluto) (frequência)	p-valor	OR (95% IC)
NLRP1	rs12150220	A/A - A/T	40 (0.87)	36 (0.80)	0.37	1.67
		T/T	6 (0.13)	9 (0.20)		(0.54-5.14)
	rs2670660	A/A - A/G	40 (0.83)	34 (0.74)	0.263	1.76
		G/G	8 (0.17)	12 (0.26)		(0.65-4.82)
NLRP3	rs10754558	C/C - C/G	37 (0.75)	48 (0.92)	0.018	0.26
		G/G	12 (0.25)	4 (0.08)		(0.08-0.86)
AIM2	rs703154	C/C - C/T	37 (0.79)	37 (0.80)	0.837	0.90
		T/T	10 (0.21)	9 (0.20)		(0.33-2.47)
CARD8	rs2043211	A/A - A/T	24 (0.83)	22 (0.85)	0.852	0.87
		T/T	5 (0.17)	4 (0.15)		(0.21-3.67)
IL1B	rs16944	G/G / G/A	45 (0.88)	37 (0.73)	0.043	2.84
		A/A	6 (0.12)	14 (0.27)		(0.99-8.11)
IL18	rs5744256	A/A - A/G	50 (0.98)	50 (0.93)	0.174	4.00
		G/G	1 (0.02)	4 (0.07)		(0.43-37.5)

Apesar do limitado número de amostras analisadas, esses dados estão de acordo com dados publicados anteriormente, tanto pelo nosso grupo de pesquisa (Pontillo A., 2016) em relação ao SNP de NLRP3, quanto ao risco associado com o SNP rs16944 em IL1B (Wang L., 2019; Dutta S., 2015; Qian N., 2010; Al-Tahhan MA., 2011), enfatizando o papel contraditório das citocinas e dos receptores do inflamassoma no desenvolvimento do CC.

Ambos os SNPs associados levam a uma maior produção de IL-1 β (Hall SK., 2004), sendo que o rs10754558 também pode afetar positivamente a produção de IL-18 e/ou as funções “alternativas” do NLRP3 (Bruchard M., 2015; Christgen S., 2020).

4.2 A análise *in silico* do perfil de expressão dos componentes do inflamassoma indica um aumento do gene *IL1B* no Câncer Cervical que afeta a sobrevida das pacientes

Em seguida, realizamos uma análise comparativa de expressão gênica entre amostras de CC, sendo derivadas de carcinoma de células escamosas cervicais e de adenocarcinoma endocervical (CESC), comparando com a expressão do cérvix uterino normal, com auxílio de bancos de dados públicos “*The Cancer Genome Atlas*” (TCGA) e “*Genotype-Tissue Expression*” (GTEx) e o software “*Gene Expression Profile Interactive Analysis*” (GEPIA).

A expressão relativa dos genes *NLRP1*, *NLRP3*, *NLRP4*, *NAIP*, *AIM2*, *CARD8*, *MEFV*, *CASP1*, *CASP4*, *CASP5*, *IL1B*, *IL18*, *GSDMD* em biópsias de CC de 306 pacientes foi comparada com a expressão em tecido de cervix uterino de mulheres saudáveis (n = 13).

Como pode ser observado, na **Figura 7** existe uma diferença significativa ($p < 0,05$) de expressão dos genes *IL1B* (A), *IL18* (B), *CASP1* (C), *AIM2* (G) *NLRP1* (C) e *NAIP* (F) entre o CC e o cérvix uterino normal. O CC apresenta uma aumentada expressão tanto das citocinas *IL1B*, *IL18*, quando do receptor de DNA, o *AIM2* e da caspase inflamatória *CASP1*. E uma menor expressão dos receptores *NLRP1* e *NAIP*

Figura 7. Comparação da expressão dos genes do inflamassoma em amostras de tecido do cérvix uterino tumoral e normal. A expressão relativa dos genes (A) *IL1B*; (B) *IL18*; (C) *NLRP1*; (D) *NLRP3*; (E) *NLRC4*; (F) *NAIP*; (G) *AIM2*; (H) *CARD8*; (I) *MEFV*; (J) *CASP1*; (K) *CASP4*; (L) *CASP5* e (M) *GSDMD* foi obtida no banco de dados públicos TGCA para 306 amostras de pacientes com CC (CESC) e no banco de dados públicos GTEX para 13 amostras de tecido do cérvix uterino normal. A expressão relativa está expressa como transcritos por milhão de células (TPM). O teste t de Student foi usado para comparar o nível de expressão nos dois grupos. Diferencias com valor de $p < 0,05$ foram considerado estatisticamente significativas.

Por outro lado, avaliando as curvas de sobrevida global para mulheres com CC agrupadas com base na maior ou menor expressão dos genes do inflamassoma, geradas com o auxílio do GEPIA (**Figura 8 A-M**), constatamos que existe uma diferença estatisticamente significativa apenas no caso do gene da *IL1B*. Mulheres com CC com alta expressão de *IL1B* tendem a apresentar uma menor sobrevida (**Figura 8A**).

Figura 8. Curvas de sobrevivência global de pacientes com Câncer Cervical, agrupadas com base na expressão dos genes do inflamassoma no tecido tumoral. As mulheres com CC (n=292) foram agrupadas com base na elevada ou baixa expressão dos genes **(A)** *IL1B*; **(B)** *IL18*; **(C)** *NLRP1*; **(D)** *NLRP3*; **(E)** *NLRC4*; **(F)** *NAIP*; **(G)** *AIM2*; **(H)** *CARD8*; **(I)** *MEFV*; **(J)** *CASP1*; **(K)** *CASP4*; **(L)** *CASP5*; e **(M)** *GSDMD* no próprio tumor. A sobrevivência global foi calculada em meses após a cirurgia. O teste do Log-rank (ou de Mantel - Cox) foi aplicado para comparar as curvas de sobrevivência entre os 2 grupos. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Tanto a geração das curvas de sobrevivência que a análise estatística foram obtidas pelo software GEPIA. Para cada gráfico são indicados o p-valor (p-value), a proporção de risco proporcional (Hazard Ratio, HR) e o respectivo intervalo de confiança (CI) de 95%.

4.3 Células de linhagem de Câncer Cervical são capazes de expressar e produzir IL-1 β

Os resultados obtidos com análise de associação genética (seção 4.1) e do perfil de expressão tumoral (seção 4.2) indicam uma contribuição importante do inflamassoma ou de algum componente específico, como NLRP3 e IL-1 β , no desenvolvimento tumoral, porém esses dados não permitem nenhuma inferência sobre a(s) célula(s) onde a ativação do inflamassoma estaria acontecendo.

Como apresentado na (seção 1.2), os componentes do inflamassoma estão expressos tanto em células imunes ou não, portanto o efeito dos SNPs pode se manifestar em diferentes tipos celulares. Do mesmo jeito, os dados de expressão utilizados para análise *in silico* se referem ao tecido tumoral ou normal como um todo, incluindo portanto as células transformadas e as outras células que compõem o microambiente de CC.

Não tendo acesso a bancos de dados públicos de análise de “single cells” para CC, nem a oportunidade de trabalhar com biópsias frescas e o consequente

isolamento dos diferentes componentes do tumor, resolvemos utilizar um modelo *in vitro* que tentasse mimetizar de modo simplificado o microambiente tumoral. Portanto realizamos ensaios de co-cultivo com linhagens celulares de CC (SiHa, HeLa ou C33-A) com monócitos isolados de sangue periférico de doadores saudáveis.

Frente as diferentes células do sistema imune, escolhemos trabalhar com os monócitos entre os possíveis leucócitos que compõem o microambiente tumoral do CC, devido aos dados já presentes na literatura que demonstram uma elevada concentração de monócitos e macrófagos neste tipo de tumor (Lee YY., 2012; Gouveia-Fernandes S., 2020), e também, considerando que o inflamassoma é altamente expresso em monócitos, que representam uma das principais fontes de IL-1 β (Netea MG., 2009).

Levando em consideração que na literatura os dados sobre a ativação do inflamassoma nas linhagem de CC é limitado e controverso (He A., 2017; So D., 2018; Ainouze M., 2018), inicialmente avaliamos a expressão gênica de componentes do inflamassoma e a produção de IL-1 β e IL-18 nas células das linhagens C33-A, SiHa e HeLa. Selecionamos os genes das duas citocinas (*IL1B* e *IL18*) e dos *NLRP1* e *NLRP3*, já reportados como principais receptores nos queratinócitos e possivelmente envolvidos no CC (He A., 2017; Pontillo A., 2016; Yu S., 2020).

Os monócitos foram utilizados como controle positivo da expressão destes genes (Yin Y., 2009; Mangan MSJ., 2018).

O cálculo da expressão gênica relativa foi realizado, subtraindo ao valor obtido para cada gene alvo com a PCR em tempo real o valor de expressão do gene endógeno *GAPDH*.

Na **Figura 9** são reportados os resultados da análise de expressão em uma das linhagens celulares utilizadas, SiHa, como representativa das outras (HeLa e C33-A), considerando que os valores foram similares. Todos os quatro genes apresentam um certo nível de expressão (**Figura 9A**), apesar de níveis menores quando comparado com os monócitos (**Figura 9C**), sobretudo para o gene da *IL1B* ($p < 0,05$).

Quanto a produção de IL-1 β , não detectamos produção constitutiva da citocina nem nas células de origem tumoral, nem nos monócitos (**Figuras 9B e 9D**). Quando adicionamos nas células um clássico indutor de citocinas pró-inflamatórias, o lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano observamos uma significativa produção de IL-1 β .

Curiosamente, e em contraste com a presença do transcrito (**Figuras 9A e 9C**) a produção de IL-18 não foi detectada tanto de forma constitutiva nem na condição ativada com LPS. (**Apêndice E**).

Figura 9. Análise da expressão de genes do inflamassoma e produção de IL-1 β em células de linhagem de Câncer Cervical (SiHa) e monócitos derivado de indivíduos saudáveis. (A,C) O RNA total de 2×10^5 células da linhagem celular SiHa e monócitos derivados de 3 indivíduos saudáveis foram isolados, retrotranscritos e amplificados com sondas gene-específica para *IL1B*, *IL18*, *NLRP1* e *NLRP3* e qPCR. O gene *GAPDH* foi usado como gene endógeno para a normalização dos dados brutos (Δ CT). Os dados de expressão são reportados como Δ Ct. **(B, D)** 2×10^5 células da linhagem celular SiHa e monócitos de 3 indivíduos saudáveis foram estimulados com 1 μ g/ml LPS por 24 horas e o sobrenadante de cultura foi utilizado para dosar a produção de citocina por meio de ELISA. A concentração de IL-1 β nas células não estimuladas (NE) e tratadas com LPS (LPS) é reportada em pg/mL. O teste t de Student pareado foi usado para comparar a concentração de IL-1 β nas condições NE e LPS. Diferenças com valor de $p < 0,05$ foram consideradas significativas (*).

Após este teste preliminar e considerando que tanto as células da linhagem celular quanto os monócitos resultaram aptos a ativar o inflamassoma e a produção de IL-1 β , iniciamos os ensaios de co-cultivo dos monócitos com as linhagens celulares de CC para identificar em quais condições haveria uma indução da ativação do complexo, como sugerido pelos dados *in silico* (seção 4.2) e na literatura (Qian N., 2010; Al-Tahhan MA., 2011) e em qual célula poderia ser encontrada essa ativação.

Como os dados genéticos não apontavam para um papel importante da IL-18 na progressão do CC e não detectamos essa citocina neste teste, continuamos os demais experimentos analisando a produção apenas de IL-1 β .

4.4 No ensaio de co-cultivo de células de linhagens celulares de Câncer Cervicalem monocamada com monócitos não é observado a produção de IL-1 β

Inicialmente as linhagens celulares foram cultivadas em modelo de monocamada, ou bidimensional (2D) na concentração de $1,25 \times 10^5$ células/poço, como estabelecido na padronização (seção 3.10 e **Figura 5**) na presença de $6,5 \times 10^4$ monócitos/poço isolados de 9 doadores saudáveis.

Como já observado na seção anterior (**Figura 9**), nenhuma liberação de IL-1 β foi detectada em monócitos (Mo) ou nas linhagens celulares (2D C33-A, 2D SiHa, 2D HeLa) cultivados isoladamente. No co-cultivo de monócitos com as células de linhagens (Mo + 2D) também não foi observado um aumento da produção dessa citocina.

O controle positivo de ativação do inflamassoma, a adição do LPS ao co-cultivo, induziu uma significativa produção de IL-1 β , como esperado. Os resultados são similares entre as três linhagens celulares (**Figura 10A-C**).

Figura 10. Produção de IL-1 β no co-cultivo de monócitos e células de linhagens de Câncer Cervical cultivadas em modelo bidimensional. A contração de $6,5 \times 10^4$ monócitos isolados de 9 doadores saudáveis, sendo 3 para o co-cultivo de cada linhagem, foram adicionados à $1,25 \times 10^5$ células das linhagens celulares de CC imortalizadas **(A)** C33-A; **(B)** SiHa e **(C)** HeLa cultivadas no modelo bidimensional (2D). Após 24 horas de co-cultivo os sobrenadantes de cultura foram coletados para dosagem de IL-1 β com ELISA. A adição de 1 μ g/ml LPS ao co-cultivo foi utilizada como controle positivo da produção da citocina. O teste 1-way Anova seguido pelo post-test de Bonferroni para comparações múltiplas foi aplicado para avaliar as diferenças de produção de IL-1 β entre as condições experimentais. Diferenças com valor de $p < 0,05$ foram consideradas significativas (*).

Estes resultados negativos em relação a indução de IL-1 β no co-cultivo levantaram questionamentos sobre o modelo *in vitro* que escolhemos. Dados de literatura mostram que existem diferenças significativas entre o cultivo bidimensional e tridimensional de linhagens tumorais, e recentemente foi apontado que o cultivo de linhagens celulares em formato de esferoides são capazes de mimetizar um modelo mais parecido ao observado em tumor *in vivo* (Leek et al., 2016; Rodrigues T., 2017; Weiswald LB., 2015). Portanto decidimos testar o co-cultivo de monócitos com as linhagens cultivadas em esferoides.

4.5 O co-cultivo de monócitos e esferoides de células de linhagens celulares de Câncer Cervical induz a produção de IL-1 β

As linhagens celulares de CC foram cultivadas em modelo tridimensional (3D)/esferoides na concentração de $1,5 \times 10^4$ (C33-A) ou 5×10^3 (SiHa e HeLa) células/poço. Após 4 dias de cultivo foram adicionados $6,5 \times 10^4$ monócitos/poço isolados de doadores saudáveis por 24 horas. Ao término da incubação, o sobrenadante de cultura foi coletado para dosagem da IL-1 β e de TNF- α , uma citocina não dependente do inflamassoma, por ELISA. No total foram utilizados os monócitos de 18 doadores saudáveis.

Nenhuma liberação de IL-1 β foi detectada em monócitos (Mo) ou nos esferoides das linhagens celulares (3D C33-A, 3D SiHa, 3D HeLa) cultivados isoladamente. No co-cultivo (Mo + 3D) foi observado um aumento significativo ($p < 0,05$) da produção de IL-1 β , similar ao controle positivo (adição de LPS). A comparação entre as condições: co-cultivo e LPS não resultou significativa ($p > 0,05$). Os resultados são similares entre as três linhagens celulares (**Figura 11 A-C**).

A produção de TNF- α também resultou aumentada no co-cultivo de esferoides com monócitos, em relação à produção constitutiva dos esferoides (3D) das linhagens. Na **Figura 11D** são reportados os resultados para a linhagem SiHa como representativa das outras.

Figura 11. Produção de IL-1 β e TNF- α no co-cultivo de monócitos com linhagens celulares de Câncer Cervical cultivadas em modelo tridimensional. As linhagens foram cultivadas em esferoides na concentração de $1,5 \times 10^4$ (C33-A) ou 5×10^3 (SiHa e HeLa) células/poço por 4 dias. Foram então adicionados $6,5 \times 10^4$ monócitos/poço isolados de 18 doadores saudáveis, sendo 6 para o co-cultivo de cada linhagem. Após 24 horas os sobrenadantes de cultura foram coletados para dosagem de IL-1 β (A-C) e de TNF- α (D) foi feita por ELISA. A adição de 1 μ g/ml LPS foi utilizada como controle positivo da produção de IL-1 β , em alguns experimentos. O teste 1-way Anova seguido pelo post-test de Bonferroni para comparações múltiplas foi aplicado para avaliar as diferenças de produção de IL-1 β entre as condições experimentais. Diferenças com valor de $p < 0,05$ foram consideradas significativas (*).

Esses dados sugerem que as células tumorais não apresentam um perfil pró-inflamatório em si, dado que não observado uma elevada produção de IL-1 β ou TNF- α nos esferoides isolados (3D), mas que a interação dos monócitos com os esferoides induz a ativação inflamatória e em particular a produção de IL-1 β de um ou ambos os tipos celulares.

Uma vez observado que no modelo de cultivo tridimensional, o ensaio de co-cultivo entre as células de CC e os monócitos induziu a uma produção significativa de IL-1 β , sugerindo uma ativação do complexo inflamassoma, escolhemos este modelo para os demais experimentos.

Tentando entender se o aumento da IL-1 β observado no co-cultivo poderia afetar o crescimento tumoral, adicionamos 150 ou 300 pg/mL de IL-1 β humana recombinante (rh- IL-1 β) aos esferoides das linhagens celulares de CC por até 72 horas. Testamos essas duas concentrações por serem similares as quantidades de citocina dosada nos sobrenadantes de cultura (Figura 11A-C).

Foi mensurado o tamanho (área em pixel²) dos esferoides após 24, 48 e 72 horas a partir da adição de rh-IL1 β .

Na **Figura 12** são reportadas as fotografias dos esferoides de SiHa **(A)** como representativas das outras linhagens e as médias das áreas dos esferoides para as duas concentrações **(B-D)**.

Como pode ser observado, a adição da citocina exógena não afetou significativamente o tamanho (área em pixel²) dos esferoides nos tempos estipulados de estimulação e nas doses testadas.

Figura 12. Avaliação do crescimento do esferoide na presença de IL-1 β recombinante. (A) Foto representativa dos esferoides da linhagem celular SiHa na presença ou não de IL-1 β humana recombinante (rh-IL-1 β) em 0-24-48-72 horas. (B-D) Gráfico de barras para as três condições experimentais, (B) controle, ou seja, sem a presença de IL-1 β humana recombinante (rh-IL-1 β), ou com (C) 150 pg/mL ou (D) 300 pg/mL de IL-1 β humana recombinante (rh-IL-1 β).

Apesar do resultado negativo, não podemos excluir que a IL-1 β desempenhe um papel importante na progressão tumoral do CC, como demonstrado pelos dados de literatura (Qian N., 2010; Al-Tahhan MA., 2011; Kemp TJ., 2010) e pela curva de sobrevida reportada na (seção 4.2), (Figura 8A).

Em seguida tentamos aprofundar alguns aspectos da ativação do inflamassoma: Quais células estariam produzindo a IL-1 β ? Qual o mecanismo de ativação do inflamassoma seria responsável por esse aumento de IL-1 β ?

4.6 O co-cultivo induz a produção de IL-1 β nos monócitos e não nas células de linhagens celulares de Câncer Cervical

Como primeira etapa, avaliamos em quais dos dois tipos celulares (monócitos e/ou linhagens celulares de CC) estariam induzindo a produção de IL-1 β em nosso modelo de microambiente tumoral.

Portanto, foram realizados ensaios de co-cultivo, onde o inflamassoma foi inibido de modo célula-específica. As linhagens celulares e/ou monócitos foram pré-incubados com 10 μ M Parthenolide (PTD), um inibidor que atua em diversos níveis da ativação do inflamassoma (Juliana C., 2010), durante 15 minutos antes de serem colocadas em cultura para o ensaio de co-cultivo. Após 24 horas de co-cultivo foi avaliado a produção de IL-1 β e de TNF- α nos sobrenadantes de cultura. Os resultados são apresentados na Figura 13.

O PTD não afetou significativamente a produção de IL-1 β quando adicionado as células de linhagens celulares de CC em esferoides, enquanto uma inibição significativa na produção da citocina foi observada quando o inibidor foi adicionado aos monócitos antes da co-cultivo (43% para C33, 60% para SiHa e 62% para HeLa) (**Figura 13 A-C**).

Por outro lado, o PTD inibe significativamente a produção de TNF- α , tanto quando adicionado aos monócitos que nas células tumorais (de modo semelhante entre as três linhagens). Na **figura 13D** são reportados os resultados obtidos com a linhagem SiHa como representativa das outras.

Figura 13. Produção de IL-1 β e TNF- α no co-cultivo de monócitos com linhagens celulares de Câncer Cervical cultivadas em modelo tridimensional na presença do inibidor do inflamassoma. A concentração de $1,5 \times 10^4$ células das linhagens celulares de CC imortalizadas de **(A)** C33-A e 5×10^3 células das linhagens celulares de CC imortalizadas **(B e D)** SiHa e **(C)** HeLa no modelo tridimensional (3D) foram cultivadas na presença de $6,5 \times 10^4$ monócitos isolados de 18 doadores saudáveis, sendo 6 para o co-cultivo de cada linhagem, por 24 horas na presença ou não do pré tratamento com 10 μ M de parthenolide (PTD), durante 15 minutos. A liberação de IL-1 β **(A-C)** e TNF- α **(D)** foi mensurada em sobrenadantes de cultura. O teste 2-way Anova foi aplicado para avaliar as diferenças de produção de IL-1 β entre as condições experimentais. Diferenças com valor de $p < 0,05$ foram consideradas significativas (*).

Estes dados indicam que, nessas condições experimentais, a ativação do inflamassoma e a liberação de IL-1 β acontecem nos monócitos quando cultivados na presença dos esferoides de células de linhagens de CC. O co-cultivo aparenta induzir uma ativação pró-inflamatória em geral, como sugerido pela produção de TNF- α , que aparentemente é secretado tanto pelas células tumorais como nos monócitos, devido sua inibição em ambos na presença do PTD.

4.7 O NLRP3 contribui para a liberação de IL-1 β induzida nos monócitos em co-cultivo com as células de linhagens celulares de Câncer Cervical

Levando em consideração que nos monócitos o NLRP3 desempenha um papel central na ativação do inflamassoma e na produção de IL-1 β (Netea MG., 2009), além de que em nosso estudo genético esse receptor foi considerado importante na progressão para o CC e também a possibilidade de utilização de um inibidor específico para este receptor, o MCC-950 (Coll RC., 2015), decidimos investigar o papel dele no contexto de ativação do inflamassoma em nosso modelo.

Desta forma, os ensaios de co-cultivo foram executados na presença de um inibidor para o receptor NLRP3 (MCC-950).

De modo semelhante ao ensaio de inibição com PTD, tanto os monócitos, como os esferoides das linhagens celulares foram pré-tratados com o inibidor antes de ser postos em cultura juntos. Após 24 horas de co-cultivo, os sobrenadantes foram coletados para dosagem de IL-1 β .

Como esperado, foi vista uma redução significativa da produção de IL-1 β no co-cultivo com as três linhagens celulares de CC quando os monócitos foram pré-tratados com MCC-950 (**Figura 14A-C**). De acordo com os resultados anteriores, as células das linhagens de CC não produziram IL-1 β no co-cultivo (**Figura 13A-C**), o MCC-950 também não surtiu efeito de inibição, quando utilizado no pré-tratamento das linhagens celulares. Os dados em relação a inibição dos esferoides antes do co-cultivo estão disponíveis no (**Apêndice F**).

Figura 14. Produção de IL-1 β no co-cultivo de monócitos com linhagens celulares de Câncer Cervical cultivadas em modelo tridimensional na presença do inibidor NLRP3. A concentração de $1,5 \times 10^4$ células das linhagens celulares de CC imortalizadas **(A)** C33-A e 5×10^3 células das linhagens celulares de CC imortalizadas **(B)** SiHa e **(C)** HeLa no modelo tridimensional (3D) foram cultivadas na presença de $6,5 \times 10^4$ monócitos isolados de 9 doadores saudáveis por 24 horas na presença ou não do pré tratamento com $10 \mu\text{M}$ de (MCC-950) nos monócitos, durante 1 hora. A liberação de IL-1 β foi mensurada em sobrenadantes de cultura. O teste 1-way Anova foi aplicado para avaliar as diferenças de produção de IL-1 β entre as condições experimentais. Diferenças com valor de $p < 0,05$ foram consideradas significativas (*).

Esses resultados claramente indicam a participação do NLRP3 na ativação do inflamassoma observada nos monócitos em co-cultivo com os esferoides de CC, porém não excluem que outros mecanismos possam estar sendo ativados concomitantemente.

Apesar da redução da produção de IL-1 β resultar estatisticamente significativa, podemos observar que a porcentagem de inibição mediada pelo MCC-950 é apenas parcial, sendo aproximadamente de um terço do total (SiHa: 37,4%; HeLa: 27,1%; C33-A: 27,7%). Uma inibição inferior quando comparado com o inibidor amplo do inflamassoma, PTD, onde a inibição se aproximava dos 50% da liberação da citocina.

Demonstrando que o NLRP3 é parcialmente ativado nos monócitos neste modelo simplificado de microambiente tumoral *in vitro*, era necessário entender qual mecanismo poderia levar a ativação deste receptor.

Uma primeira hipótese era que o NLRP3 poderia ser ativado em resposta ao TNF- α secretado pelo tumor, dado que a ativação do NLRP3 através do TNF/TNFR1 foi descrita em outros trabalhos (Furuoka M., 2016; McGeough MD., 2017; Bauernfeind F., 2016; Liu Y., 2019). Um aumento da produção dessa citocina também

foi observada em nosso modelo de co-cultivo (**Figuras 11D e 13D**), o que poderia indicar um possível mecanismo de ativação. Entretanto, maiores investigações seriam necessárias.

Outra possibilidade seria que o NLRP3 poderia estar sendo ativado por meio da liberação de DAMPs de origem tumoral. O NLRP3 é conhecido como sensor comum de DAMPs (Lamkanfi M., 2014; Schroder K., 2010); e os tumores podem liberar diferentes tipos de DAMPs, tanto por efeito da alteração metabólica das células transformadas (efeito Warburg) ou pela formação de áreas de necrose em consequência de crescimento exacerbado e falta de oxigenação e nutrientes.

Curiosamente, quando adicionamos ao meio de cultura de monócitos concentrações crescentes de meio condicionado (MC), ou seja, o meio produzido por essas células em cultura (0 – 6,25 – 12,5 - 25 - 50 - 100 %) das 3 linhagens celulares de CC, não foi observada uma liberação significativa de IL-1 β , em nenhuma das concentrações utilizadas e em nenhum dos tempos analisados (1, 3, 8, 24 horas) (**Figura 15**).

Figura 15. Produção de IL-1 β por monócitos de indivíduos saudáveis na presença de MC das linhagens celulares de Câncer Cervical. A concentração de $6,5 \times 10^6$ monócitos isolados de 3 indivíduos saudáveis foram cultivados na presença de concentrações crescentes (0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100%) de meio condicionado (MC) da linhagem celular C33-A **(A)** SiHa **(B)** e HeLa **(C)** por 1, 3, 8 e 24 horas. A concentração de IL-1 β foi medida no sobrenadante de cultura por ELISA. O teste de Bonferroni per comparações múltiplas foi aplicado para analisar as diferenças de produção de IL-1 β entre as condições de MC.

Levando em consideração que o MC possa ter perdido a integridade dos seus componentes devido ao congelamento, avaliamos uma abordagem diferente para a identificar a possibilidade de algum DAMP ser capaz de ativar o NLRP3.

Mensuramos portanto no nosso modelo de co-cultivo a liberação de LDH e de IL-1 α , como exemplos conhecidos de DAMPs. A liberação de LDH, indica a perda de integridade da membrana plasmática e é utilizada como medida indireta de morte celular lítica (necrose, piroptose).

A detecção de IL-1 α poderia confirmar tanto a presença de uma morte lítica ou indicar a formação de poros na membrana plasmática por causa da ativação da gasdermina-D pelo inflamassoma (Fang Y., 2019; Kuriakose T., 2019).

Observamos um aumento da liberação de LDH nos esferoides de CC comparado com os monócitos cultivados isoladamente. No co-cultivo não houve diferença significativa quando comparado aos esferoides. Na **figura 16** é reportado o resultado para a linhagem SiHa como representativa das outras. O ensaio foi executado em triplicata. Os dados são apresentados como porcentagem de citotoxicidade comparados com o controle positivo (CP) de células 100% lisadas.

Figura 16. Liberação de LDH no co-cultivo de monócitos e esferoides de SiHa. A concentração de 5×10^3 células das linhagens celulares de CC imortalizadas SiHa no modelo tridimensional (3D) foram cultivadas na presença de $6,5 \times 10^4$ monócitos isolados de 3 doadores saudáveis por 24 horas. A liberação de LDH (lactato desidrogenase) foi mensurada através do kit comercial Pierce™ LDH Citotoxicidade Assay Kit, no sobrenadante de cultura. O teste 1-way Anova foi aplicado para avaliar as diferenças entre as condições experimentais. Diferenças com valor de $p < 0,05$ foram consideradas significativas (*).

A produção de IL-1 α foi mensurada no ensaio de co-cultivo e nos dois tipos celulares de forma isolada. Apesar das diferenças observadas nas concentrações da alarmina entre os co-cultivos dos monócitos com as três linhagens celulares de CC

(Figuras 17 A-C), os resultados demonstram que a IL-1 α é produzida apenas no co-cultivo e não nas células tumorais em si.

Figura 17. Liberação de IL-1 α no co-cultivo de monócitos e esferoides de linhagens celulares de Câncer Cervical. A concentração de $1,5 \times 10^4$ células das linhagens celulares de CC imortalizadas (A) C33-A e 5×10^3 células das linhagens celulares de CC imortalizadas (B/D) SiHa e (C) HeLa no modelo tridimensional (3D) foram cultivadas na presença de $6,5 \times 10^4$ monócitos isolados de 9 doadores saudáveis, sendo 3 por linhagem, por 24 horas. A liberação de IL-1 α foi mensurada, no sobrenadante de cultura. O teste 1-way Anova foi aplicado para avaliar as diferenças de produção entre as condições experimentais. Diferenças com $p < 0,05$ foram consideradas significativas (*).

Estes achados não definem claramente o que está ocorrendo no co-cultivo de monócitos e esferoides para induzir a ativação do NLRP3 inflamassoma e a consequente produção de IL-1 β . Porém existe uma aparente morte celular nos esferoides como demonstrado pela liberação de LDH que poderia explicar a presença de DAMPs no meio de cultura capazes de ativar o NLRP3 nos monócitos.

Diferentemente do relatado na literatura (Adefuye AO., 2014) não conseguimos detectar IL-1 α nas linhagens celulares de CC, mas apenas no co-cultivo com os monócitos, sugerindo que a liberação da alarmina possa ser subsequente a ativação do inflamassoma e da formação dos poros via GSDMD.

5. DISCUSSÃO

Levando em consideração a importância da participação do sistema imunológico no contexto tumoral, a presença do complexo inflamassoma se destaca como um possível mediador de inflamação nesse microambiente. Dado que ele, está relacionado a uma indução de uma resposta inflamatória tanto local, quanto sistêmica, devido sua liberação de citocinas pró-inflamatórias, as interleucinas IL-1 β e IL-18, além de desencadear uma morte celular pró-inflamatória denominada piroptose, a partir da formação de poros na membrana plasmática celular (Karki R., 2017; Wang Z., 2018; Cao X., 2019).

Os componentes do complexo estão presentes em diversos tipos celulares tanto imunes (monócitos, macrófagos e linfócitos) como não imunes (células epiteliais, endoteliais e neurônios), (Man SM., 2017; Yin Y., 2009) e tumorais (melanoma, câncer gástrico e câncer de mama), (Okamoto M., 2010; Tu S., 2008; Kolb R., 2016).

A atuação do inflamassoma no Câncer Cervical ainda não está totalmente esclarecida. Devido a sua expressão nos queratinócitos e também da sua capacidade de reconhecimento viral (Lamkanfi M., 2011; Hasegawa T., 2016; Hayward JA., 2018) o inflamassoma foi apontado como um dos mecanismos envolvidos no reconhecimento e eliminação do HPV assim como no desenvolvimento do Câncer Cervical.

A inexistência de uma uniformidade nos estudos de associação genética, e há ausência de evidências em relação a qual seria o efeito funcional dessas variantes associadas ao CC. E considerando que, estudos de réplica para confirmar os dados de associação genética são de suma importância, sobretudo em uma população miscigenada como a brasileira.

Executamos uma réplica do estudo de associação genética realizado anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa em uma coorte procedente de Recife (nordeste do Brasil) (Pontillo A., 2016), neste novo estudo, foi analisada a distribuição genética dos polimorfismos em uma coorte de mulheres com CC ou neoplasias intra-epiteliais cervicais, procedentes de regiões brasileiras diferentes (sudeste e centro-oeste). Confirmando os dados anteriores, tanto o SNP rs16944 que o rs10754558 resultaram significativamente associados ao desenvolvimento de CC (**Tabela 6**).

A variante rs16944, localizada no promotor do gene *IL1B* e que leva a um aumento de expressão e de produção da citocina (Hall SK., 2004), resultou associada ao aumento de risco para o desenvolvimento do CC, o que está de acordo com outros estudos desenvolvidos em populações diferentes (Qian N., 2010; Al-Tahhan MA.,

2011; Dutta S., 2015; Wang L., 2019), ratificando a ideia que maiores níveis desta citocina podem ser considerados com um fator de risco para o desenvolvimento de CC.

De forma menos óbvia, houve uma associação entre o polimorfismo rs10754558 no gene *NLRP3*, que é relacionado a uma maior estabilidade do mRNA do *NLRP3* e consequentemente uma maior disponibilidade deste receptor (Hitomi Y., 2009), com um menor risco de desenvolver CC.

No trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa, o mesmo SNP resultou associado a capacidade da mulher de eliminar HPVs de alto risco oncológico (Pontillo A., 2016), sugerindo que o efeito de proteção do SNP rs10754558 em relação ao desenvolvimento do CC possa estar relacionado a eliminação do seu maior fator de risco.

Ainda assim, esse dado parece contrastante, quando é considerado que uma variante que proporciona um aumento na ativação do inflamassoma (rs10754558), possa estar associada de maneira oposta à um SNP (rs16944) que leva a um aumento na produção do produto final do mesmo complexo (IL-1 β). Uma explicação possível poderia ser em relação a importância do polimorfismo nas diferentes fases do desenvolvimento do CC, visto que previamente a iniciação tumoral, ocorre a etapa de infecção pelo HPV.

O NLRP3 já foi descrito como um importante receptor inato em reconhecimento viral (Kuriakose T., 2017). Esse reconhecimento, poderia desencadear um microambiente protetor, devido a eliminação viral eficaz nos primeiros momentos de infecção, diminuindo assim a possibilidade de latência do patógeno e de transformação do queratinócito. Além de que o papel protetor do receptor NLRP3 já foi descrito para outros tipos oncológicos como no câncer colorretal em relação a indução de IL-18, mas não de IL-1 β (Zaki MH., 2010; Allen IC., 2010).

Já em relação ao polimorfismo que afeta os níveis de IL-1 β (rs16944), por estar mais presente em pacientes com CC, sua relevância poderia estar associada ao seu papel na manutenção de um microambiente inflamatório crônico. Visto que os principais mecanismos pelos quais IL-1 β promove o desenvolvimento tumoral são a indução de inflamação crônica (Mantovani A., 2018), ativação de células endoteliais (Steel JL., 2018), angiogênese tumoral (Apte RN., 2006) e indução de células imunossupressoras. Juntos, esses mecanismos são responsáveis pela supressão da imunidade adaptativa, promoção de tumor e metástase (Mantovani A., 2018).

É importante ressaltar que os componentes do inflamassoma são expressos em níveis diferentes, e as vezes de modo células/tecidos específicos, desta forma é difícil entender em qual local a variante polimórfica possa estar mediando o próprio efeito de modulação do complexo. Além de que, diferentemente dos modelos experimentais, não existem (ou ainda não foram relatados) indivíduos com a ausência de receptores do inflamassoma, no entanto, o estudo de variantes genéticas que podem indicar um maior ou menor nível de ativação do complexo é importante para o melhor entendimento da influência do inflamassoma em diferentes doenças.

Dado o limitado número de trabalhos em relação ao papel do inflamassoma no Câncer Cervical e a dificuldade de interpretação dos resultados genéticos, buscamos desvendar como estava a expressão gênica dos componentes do inflamassoma no CC.

Devido a indisponibilidade de amostras de pacientes, realizamos uma análise de expressão gênica utilizando um banco de dados público de dados procedentes da análise de tecidos oncológicos (TCGA) e outro de tecidos normais (GTEx). Nesta etapa *in silico* observamos, como esperado, um aumento significativo da expressão do gene *IL1B* e da *CASP1* nas biópsias de CC quando comparado com as amostras de tecido de cérvix uterino normal (**Figura 7**). Resultado esse que está de acordo tanto com o dado de associação genética, para o SNP de *IL1B* que com os dados de literatura que reportam elevados níveis plasmáticos dessa citocina (Qian N., 2010; Al-Tahhan MA., 2011).

Outros genes se mostraram diferentemente expressos nas biópsias de CC e de tecido do cérvix uterino normal, tais como o da *IL18* que resultou aumentado no tumor (**Figura 7B**). Este resultado não era esperado, dado que, a IL-18 desempenha uma ação anti-tumoral importante em alguns tipos tumorais, visto que em combinação com IL-12 é capaz de induzir a polarização de linfócitos T citotóxicos e células NK, induzindo a produção de $INF\gamma$, desencadeando tanto uma ação anti-viral como induzindo a resposta imune tumoral (Wigginton JM., 2002; Yasuda K., 2019; Esmailbeig M., 2017), por outro lado, uma indução da transcrição desse gene poderia indicar um mecanismo de compensação negativa do sistema, a fim de sustentar a resposta imune anti-tumoral. Desta forma estaria de acordo com os níveis aumentados da molécula responsável pela sua ativação, a caspase-1, e com o gene da *IL1B*.

O gene do receptor de dupla fita de DNA, *AIM2*, também resultou mais expresso no tecido tumoral (**Figura 7G**), de acordo com o papel já descrito do *AIM2* no reconhecimento do HPV em queratinócitos (Reinholz M., 2013).

Já os receptores *NLRP1* e *NAIP* possuem uma maior expressão no cérvix uterino normal, comparado com o tumoral (**Figuras 7C, 7F**). O *NLRP1* é um receptor normalmente expresso em queratinócitos normais, onde desempenha um papel importante no sistema de defesa dessas células (Burian M., 2018), o nosso grupo de pesquisa já relatou a associação de um polimorfismo de base única no receptor *NLRP1* como tendo um papel protetor na persistência e/ou oncogênese desencadeada pelo HPV (Pontillo A., 2016).

O gene *NAIP* não é expresso em queratinócitos mas está presente em células imunes presentes nas mucosas, tais como células dendríticas e macrófagos. Não há relatos na literatura sobre sua atuação tanto no reconhecimento viral do HPV, quanto no desenvolvimento de CC (Hayward JA., 2018) .

Apesar de mais de um gene do inflamassoma resultar desregulado no CC, quando analisamos o impacto desta desregulação na sobrevida global das pacientes com CC, apenas o gene da *IL1B* resultou associado ao desfecho clínico (**Figura 8A**). Foi observado que pacientes com alto grau de expressão de *IL1B*, ou seja, com uma expressão maior do que a média da coorte, apresentavam uma sobrevida menor em relação às pacientes com baixa expressão. Este resultado enfatiza mais uma vez que um maior nível de IL-1 β representaria um fator de risco para o prognóstico do CC.

Contudo, na literatura a sua importância no câncer cervical ainda é contraditória, estudos apontam para um papel de risco no desenvolvimento de CC, dado que já foi relatado um alto nível de IL-1 β no plasma de pacientes, comparado com controles (Qian N., 2010; Al-Tahhan MA., 2011; Kemp TJ., 2010), além de associações genéticas entre polimorfismos de base única (SNPs) de ganho de função de IL-1 β correlacionando com o risco de desenvolvimento de CC (Qian N., 2010; Al-Tahhan MA., 2011; Dutta S., 2015; Wang L., 2019; Kang S., 2007). Por outro lado, recentemente foi visto uma diminuição da expressão desta mesma citocina em biópsias de CC (Matamoros JA., 2019).

Não tendo dados disponíveis na literatura sobre a fonte da produção da citocina no microambiente tumoral de CC, podendo ser o próprio tumor ou alguma outra célula presente no microambiente, nós propusemos investigar a origem da produção de IL-1 β no CC.

Utilizamos um modelo *in vitro* de linhagens celulares imortalizadas de CC cultivadas na presença de monócitos, a fim de, mimetizar um microambiente tumoral. Uma abordagem semelhante foi anteriormente utilizada para descrever como tumores sólidos, incluindo CC, modulam a atividade de leucócitos infiltrantes (Kobayashi A., 2008; Stone SC., 2019).

As linhagens celulares de CC escolhidas para o estudo (C33-A, SiHa e HeLa) expressam os genes das citocinas *IL1B* e *IL18*, e também dos receptores *NLRP1* e *NLRP3*, e produzem IL-1 β (mas não IL-18) quando estimuladas com LPS, representando assim, um modelo adequado para estudo do inflamassoma.

As linhagens tumorais não foram capazes de produzir constitutivamente IL-1 β . (**Figura 9**) o que está de acordo com outros trabalhos da literatura, onde é demonstrado que apenas queratinócitos primários são capazes de produzir IL-1 β de forma constitutiva (Burian M., 2018; Feldmeyer L., 2007; Stone SC., 2014).

No modelo de microambiente tumoral *in vitro*, escolhemos trabalhar com os monócitos, dado que entre as células comumente presentes no microambiente de CC, os monócitos/macrófagos são os mais estudados (Lee YY., 2012; Gouveia-Fernandes S., 2020), e representam também uma das principais fontes de IL-1 β (Netea MG., 2009).

O primeiro resultado interessante obtido com este modelo foi que elevados níveis de IL-1 β foram detectados nos sobrenadantes das culturas dos co-cultivos de linhagens celulares de CC em esferoides (modelo tridimensional/3D) e monócitos (**Figura 11**), mas não no co-cultivo em monocamada (modelo bidimensional/2D) (**Figura 10**). Estes dados indicam que o modelo em esferoides representa melhor o tumor natural, que também é caracterizado por um aumento dos níveis da citocina IL-1 β (Qian N., 2010; Al-Tahhan MA., 2011; Kemp TJ., 2010).

O motivo desta diferença entre modelo 2D e 3D não foi investigado neste trabalho, mas poderia estar relacionado tanto a produção de DAMPs no modelo de esferoides devido a área necrótica presente nos modelos de cultura tridimensional (Cohen I., 2010 ; Willingham SB., 2008; Li H., 2009; Leek R., 2016), quanto a um perfil diferencial de moléculas de superfície das células nos dois modelos de crescimento, o qual afetaria a interação com as demais células, incluindo os monócitos e/ou a sinalização intracelular e a produção de alguma molécula solúvel.

Posteriormente, investigamos qual tipo celular estaria envolvido na liberação de IL-1 β no modelo de co-cultivo tridimensional, por meio de uma abordagem de

inibição química do inflamassoma nas células de CC e nos monócitos com o auxílio do inibidor Parthenolide/PTD (Juliana C., 2010) (**Figura 13**). Os resultados obtidos sugerem que a principal fonte de IL-1 β nas co-culturas são os monócitos e não os esferoides derivados das linhagens tumorais.

Assim, ao contrário de outros tipos tumorais, como o melanoma, onde o próprio melanócito transformado é capaz de produzir IL-1 β (Ahmad I., 2013), os nossos dados sugerem que o CC não seria a fonte produtora de IL-1 β .

É necessário ressaltar que diferentemente do observado em nossos ensaios de padronização (**Apêndice A**), a porcentagem de inibição do PTD na produção de IL-1 β não foi total, podendo indicar que a dose de inibidor utilizada para os ensaios (10 μ M para 6,5 x10⁴ monócitos e 0,5x10⁴/1,5x10⁴ células das linhagens celulares) e anteriormente padronizada para um número de células diferente (1x10⁵) fosse inadequada, ou ainda que, a participação de outros receptores na ativação dos monócitos poderia estar ocorrendo, visto que, a inibição do inflamassoma por PTD foi demonstrada somente para os receptores NLRP1, NLRP3 e NLRC4 (Juliana C., 2010; Coll RC., 2013). Apesar desta possível limitação técnica, os resultados apontam para ativação do inflamassoma nos monócitos e não nas linhagens celulares de origem tumoral.

Com intuito de conferir a participação do receptor NLRP3 como possível ativador do complexo, utilizamos uma abordagem semelhante, onde pré-tratamos os monócitos e as células das linhagens de CC com um inibidor específico de NLRP3, MCC-950 (Coll RC., 2015). Os dados demonstram uma contribuição parcial deste receptor na liberação de IL-1 β induzida por CC em monócitos (**Figura 14**). Estes resultados estão de acordo com o proposto papel do receptor NLRP3 na oncogênese em diferentes tipos oncológicos (Moossavi M., 2018).

Assim como observado com a inibição com o PTD, a inibição por MCC-950 também foi parcial, o que nos faz considerar que a concentração do MCC-950 não fosse suficiente neste modelo *in vitro* de co-cultivo, ou que outros receptores do inflamassoma podem estar atuando junto com o NLRP3 (Reinholz M., 2013).

A participação do NLRP3 na ativação do inflamassoma nos monócitos em contato com CC estão de acordo também com dados anteriores sobre a diminuição do micro-RNA (miR) -223 em biópsias de CC (Tang Y., 2015). Dado que, o miR- 223 é um repressor conhecido da expressão de NLRP3 (Bauernfeind F., 2012) e foi relatado que inibe a metástase celular *in vitro*. Esses dados porém, não esclarecem

se o aumento de ativação do NLRP3 aconteceria nos leucócitos, como observado no nosso modelo.

Como o CC pode ativar o NLRP3 nos monócitos, ainda não está claro, porém alguns mecanismos de ativação desse receptor são hoje universalmente aceitos, os quais, em sua grande maioria são através de uma ativação em meio citoplasmático, como por efluxo de K⁺ ou pela ativação do receptor purinérgico P2X7 após aumento de ATP no meio extracelular, geralmente por consequência de dano tecidual (Munoz-Planillo., 2013).

Uma hipótese, poderia ser que os próprios DAMPs liberados pelo tumor ativem o NLRP3, entretanto, os experimentos de cultivo dos monócitos com meio condicionado sugeriram que aparentemente nenhum fator secretado pelas linhagens tumorais seriam capazes de ativar o complexo nos monócitos (**Figura 15**).

A produção de outras citocinas pelo próprio tumor, tais como o TNF- α , poderia também estar relacionado com a ativação do inflamassoma e do receptor NLRP3 (Furuoka M., 2016; McGeough MD., 2017; Bauernfeind F., 2016; Liu Y., 2019). Um aumento da produção dessa citocina também foi observada em nosso modelo de co-cultivo (**Figuras 11D e 13D**), o que poderia indicar um possível mecanismo de ativação. Entretanto, maiores investigações são necessárias.

Levando em consideração que os tumores são capazes de ativar o inflamassoma em leucócitos infiltrantes por meio da liberação de DAMPs (ou seja: ATP, HMGB1, IL-1 α , lactato, fatores associados à hipoxia) durante o estresse ou a necrose das células tumorais (Cohen I., 2010; Willingham SB., 2008; Li H., 2009), e que áreas necróticas foram descritas nos modelos de cultivo em esferoides (Leek R., 2016), hipotetizamos que a liberação de DAMPs pelos esferoides de CC poderiam induzir a liberação de IL-1 β , explicando ao mesmo tempo porque as linhagens celulares de CC em cultivo bidimensional não ativariam o complexo.

Foi mensurado, a porcentagem de citotoxicidade celular, através da liberação de LDH, como ensaio de controle de morte celular e também a liberação de IL-1 α , como exemplo de DAMP, nos ensaios de co-cultura.

Similarmente, à liberação de IL-1 β , a IL-1 α também foi detectada apenas na co-cultivo dos monócitos com os esferoides (3D) de CC e não estes separadamente (**Figura 17**). De forma interessante, em relação a morte celular (**Figura 16**) houve um aumento da citotoxicidade tanto nos esferoides isolados (3D) como também no co-cultivo, não obtendo diferença significativa entre eles. Esses resultados sugerem, que

existe um aumento da liberação de IL-1 α somente no co-cultivo, mas que esta possivelmente não estaria sendo liberada por um possível processo de morte celular, visto que, a liberação de LDH ocorreu também somente nos esferoides.

É importante ressaltar que a medição tanto de IL-1 α como do LDH foi realizada seguindo os tempos previamente determinados de co-cultivo, o que poderia ser considerado como um limitante experimental, dado que o processo necrótico em modelos tridimensionais inicia tardiamente (Leek R., 2016; Däster S., 2017).

Até o momento, a literatura apresentou exemplos limitados de receptores de superfície capazes de mediar a ativação do inflamassoma, entre eles destaco o receptor de carboidratos de parede celular de fungos, “Dectin” (Chang TH., 2017; Lee HM., 2012), o qual está envolvido na via de ativação alternativa do inflamassoma.

Recentemente um estudo reportou uma possível modulação negativa da via Dectin-1 em tumores ginecológicos, incluindo o carcinoma de colo uterino, visto que em relação ao grupo controle, a expressão de Dectin-1, SyK e MALT1 era significativamente menor em tumores vaginais (Yeo SG., 2018). Essas proteínas estão envolvidas na ativação da via alternativa do inflamassoma (Latz, E., 2013).

Evidências experimentais coletadas nas últimas décadas, revelam que a transformação maligna, tanto em câncer de mama, de ovário e hepático estão associadas a uma variedade de células com padrões de glicosilação alterados, de modo que o seu perfil de carboidratos se torna diferente do que era apresentado antes da transformação neoplásica (Chandrasekaran EV., 2006; Reddi AL., 2000). Já foi reportado também que células tumorais apresentam uma expressão de N-glicanos que podem desencadear uma sinalização via Dectin-1 (Chiba S., 2014).

Buscando demonstrar em nosso modelo *in vitro* uma possível ação pró-tumoral da IL-1 β , confirmando assim os dados *in silico*, de associação genética e de correlação de pior prognóstico, adicionamos a IL-1 β de forma exógena aos esferoides, mas neste caso sem a presença dos monócitos, para que fosse considerado somente a influência da citocina nas células de origem tumoral. Em seguida foi mensurado o crescimento tumoral através de imagens capturadas por microscopia (**Figuras 12 A-D**).

Os nossos ensaios não permitiram definir o efeito da adição da citocina, em relação ao tamanho do esferoide, visto que, não houve uma diferença significativa da área destes em nenhum intervalo de tempo analisado.

Contudo, é necessário considerar que aparentemente houve uma tendência no aumento da área do esferoide, quando estes eram estimulados com 300pg/mL de IL-1 β por 72 horas, em relação aos outros intervalos de tempo (**Figura 12D**).

A atuação da IL-1 β em relação ao crescimento tumoral já foi associada em estudos prévios, como em Carcinoma de células escamosas oral, onde foi demonstrado que a adição desta citocina de forma exógena é capaz de aumentar a proliferação celular e desregular diferentes vias de sinalização, principalmente em relação a regulação de IL-6 (Lee CH., 2015).

A correlação da IL-1 β como um possível mediador pró-tumoral, tem sido observada em diversos estudos (Mantovani A., 2018; Bent R., 2018), e sua relevância clínica é cada vez mais considerada, visto há um aumento no número de estudos clínicos, que buscam comprovar a sua inibição, como um possível alvo terapêutico oncológico (Litmanovich A., 2018).

Por fim, é necessário ressaltar que a avaliação do microambiente tumoral não pode ser restrita e que diferentes componentes e suas interações precisam ser consideradas para o melhor entendimento do assunto. Este estudo teve como objetivo agregar conhecimento à um incipiente campo de investigação do inflamassoma no Câncer Cervical.

Somente com estudos colaborativos seremos capazes de proporcionar uma ciência de excelência e qualidade de vida para todas as pacientes.

6. CONCLUSÕES

De forma geral, este trabalho contribuiu para um melhor esclarecimento sobre o papel do complexo inflamassoma no contexto do desenvolvimento do Câncer Cervical. É importante ressaltar, que os dados obtidos na literatura até o momento são extremamente controversos, tanto em relação a ativação do complexo, e consequente liberação de suas citocinas, como sobre a influência genética dos componentes do inflamassoma como fatores de risco ou proteção para o desenvolvimento do Câncer do colo do útero.

Aqui demonstramos que:

- Uma associação significativa entre o SNP rs16944 que leva a aumento de expressão do gene *IL1B* e a progressão para o CC; e entre o SNP rs10754558 que afeta a estabilidade do mRNA do *NLRP3* e um menor risco de progressão para CC;
- A alta expressão de *IL1B* no tecido tumoral confere um aumento no risco para um pior prognóstico e uma menor sobrevida;
- A origem da IL-1 β no nosso modelo de CC são os monócitos e não as células de origem tumoral;
- A ativação do inflamassoma nos monócitos cultivados na presença de células de CC é dependente, pelo menos em partes, do receptor NLRP3.

Esses achados suportam novas abordagens terapêuticas para o CC com alvo na IL-1 β e no NLRP3.

Por outro lado, permanecem ainda desconhecidos os fatores que ativariam o inflamassoma e/ou NLRP3 nos monócitos, sendo possível tanto uma ativação por DAMPs ou citocinas originados pelo tumor ou eventualmente uma ativação alternativa do complexo por exemplo através da contribuição de receptores de carboidratos, tais como a Dectin-1.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbott M, Ustoyev Y. Cancer and the Immune System: The History and Background of Immunotherapy. *Semin Oncol Nurs*. 2019;35(5):150923. doi:10.1016/j.soncn. 2019.08.002

Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F. Interleukins 1 β and 6 but not transforming growth factor- β are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol*. 2007 Sep;8(9):942-9. doi: 10.1038/ni1496. Epub 2007 Aug 5. PMID: 17676045.

Adefuye AO, Sales KJ, Katz AA. Seminal plasma induces the expression of IL-1 α in normal and neoplastic cervical cells via EP2/EGFR/PI3K/AKT pathway. *J Mol Signal*. 2014 Aug 8;9:8. doi: 10.1186/1750-2187-9-8. PMID: 25237386; PMCID: PMC4166412.

Ahmad I, Muneer KM, Tamimi IA, Chang ME, Ata MO, Yusuf N. Thymoquinone suppresses metastasis of melanoma cells by inhibition of NLRP3 inflammasome. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2013;270(1):70-76. doi:10.1016/j.taap.2013.03.027

Ainouze M, Rochefort P, Parroche P, Roblot G, Tout I, Briat F, Zannetti C, Marotel M, Goutagny N, Auron P, Traverse-Glehen A, Lunel-Potencier A, Golfier F, Masson M, Robitaille A, Tommasino M, Carreira C, Walzer T, Henry T, Zanier K, Trave G, Hasan UA. Human papillomavirus type 16 antagonizes IRF6 regulation of IL-1 β . *PLoS Pathog*. 2018 Aug 8;14(8):e1007158. doi: 10.1371/journal.ppat.1007158. PMID: 30089163; PMCID: PMC6124776.

Allen IC, TeKippe EM, Woodford RM, Uronis JM, Holl EK, Rogers AB, Herfarth HH, Jobin C, Ting JP. The NLRP3 inflammasome functions as a negative regulator of tumorigenesis during colitis-associated cancer. *J Exp Med*. 2010 May 10;207(5):1045-56. doi: 10.1084/jem.20100050. Epub 2010 Apr 12. PMID: 20385749; PMCID: PMC2867287.

Al-Tahhan MA, Etewa RL, El Behery MM. Association between circulating interleukin-1 β (IL-1 β) levels and IL-1 β C-511T polymorphism with cervical cancer risk in Egyptian women. *Mol Cell Biochem*. 2011;353(1-2):159-165. doi:10.1007/s11010-011-0782-9

Apte RN, Dotan S, Elkabets M, White MR, Reich E, Carmi Y, Song X, Dvozkin T, Krelin Y, Voronov E. The involvement of IL-1 in tumorigenesis, tumor invasiveness, metastasis and tumor-host interactions. *Cancer Metastasis Rev*. 2006 Sep;25(3):387-408. doi: 10.1007/s10555-006-9004-4. PMID: 17043764.

Apte RN, Krelin Y, Song X, Dotan S, Recih E, Elkabets M, Carmi Y, Dvorkin T, White RM, Gayvoronsky L, Segal S, Voronov E. Effects of micro-environment- and malignant cell-derived interleukin-1 in carcinogenesis, tumour invasiveness and tumour-host interactions. *Eur J Cancer*. 2006

Apte RN, Voronov E. Is interleukin-1 a good or bad 'guy' in tumor immunobiology and immunotherapy? *Immunol Rev*. 2008 Apr;222:222-41. doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00615.x. PMID: 18364005.

Arneth B. Tumor Microenvironment. *Medicina (Kaunas)*. 2019;56(1):15. Published 2019 Dec 30. doi:10.3390/medicina56010015

Baker TS, Newcomb WW, Olson NH, Cowser LM, Olson C, Brown JC. Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophys J*. 1991 Dec;60(6):1445-56. doi: 10.1016/S0006-3495(91)82181-6. PMID: 1663794; PMCID: PMC1260204.

Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow?. *Lancet*. 2001;357(9255):539-545. doi:10.1016/S0140-6736(00)04046-0

Bauernfeind F, Niepmann S, Knolle PA, Hornung V. Aging-Associated TNF Production Primes Inflammasome Activation and NLRP3-Related Metabolic Disturbances. *J Immunol.* 2016;197(7):2900-2908. doi:10.4049/jimmunol.1501336

Bauernfeind F, Rieger A, Schildberg FA, Knolle PA, Schmid-Burgk JL, Hornung V. NLRP3 inflammasome activity is negatively controlled by miR-223. *J Immunol.* 2012;189(8):4175-4181. doi:10.4049/jimmunol.1201516

Bent R, Moll L, Grabbe S, Bros M. Interleukin-1 Beta-A Friend or Foe in Malignancies? *Int J Mol Sci.* 2018 Jul 24;19(8):2155. doi: 10.3390/ijms19082155. PMID: 30042333; PMCID: PMC6121377

Binnewies M, Roberts EW, Kersten K, et al. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nat Med.* 2018;24(5):541-550. doi:10.1038/s41591-018-0014-x

Boccardo E, Lepique AP, Villa LL. The role of inflammation in HPV carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 2010 Nov;31(11):1905-12. doi: 10.1093/carcin/bgq176. Epub 2010 Sep 5. PMID: 20819779.

Bortoluci KR, Medzhitov R. Control of infection by pyroptosis and autophagy: role of TLR and NLR. *Cell Mol Life Sci.* 2010 May;67(10):1643-51. doi: 10.1007/s00018-010-0335-5. Epub 2010 Mar 13. PMID: 20229126.

BRASIL. Ministério da Saúde. Avanços para a municipalização plena da saúde: o que cabe ao município. Brasília: [Ministério da Saúde], 1994.

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

Briard B, Place DE, Kanneganti TD. DNA Sensing in the Innate Immune Response. *Physiology (Bethesda).* 2020 Mar 1;35(2):112-124. doi: 10.1152/physiol.00022.2019. PMID: 32027562; PMCID: PMC7276919.

Broz P, Dixit VM. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat Rev Immunol.* 2016;16(7):407-420. doi:10.1038/nri.2016.58

Boucher D, Monteleone M, Coll RC, Chen KW, Ross CM, Teo JL, Gomez GA, Holley CL, Bierschenk D, Stacey KJ, Yap AS, Bezbradica JS, Schroder K. Caspase-1 self-cleavage is an intrinsic mechanism to terminate inflammasome activity. *J Exp Med.* 2018 Mar 5;215(3):827-840. doi: 10.1084/jem.20172222. Epub 2018 Feb 6. PMID: 29432122; PMCID: PMC5839769.

Bruchard M, Rebé C, Derangère V, Togbé D, Ryffel B, Boidot R, Humblin E, Hamman A, Chalmin F, Berger H, Chevriaux A, Limagne E, Apetoh L, Végran F, Ghiringhelli F. The receptor NLRP3 is a transcriptional regulator of TH2 differentiation. *Nat Immunol.* 2015 Aug;16(8):859-70. doi: 10.1038/ni.3202. Epub 2015 Jun 22. Erratum in: *Nat Immunol.* 2015 Dec;16(12):1292. PMID: 26098997.

Bui JD, Schreiber RD. Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent processes? *Curr Opin Immunol.* 2007 Apr;19(2):203-8. doi: 10.1016/j.coi.2007.02.001. Epub 2007 Feb 9. PMID: 17292599.

Burian M, Yazdi AS. NLRP1 Is the Key Inflammasome in Primary Human Keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2018 Dec;138(12):2507-2510. doi: 10.1016/j.jid.2018.08.004. PMID: 30466537.

Busuttil RA, Zapparoli GV, Haupt S, Fennell C, Wong SQ, Pang JM, Takeno EA, Mitchell C, Di Costanzo N, Fox S, Haupt Y, Dobrovic A, Boussioutas A. Role of p53 in the progression of gastric cancer. *Oncotarget*. 2014 Dec 15;5(23):12016-26. doi: 10.18632/oncotarget.2434. PMID: 25427447; PMCID: PMC4322971.

Cambui RAG, do Espírito Santo GF, Fernandes FP, Leal VNC, Galera BB, Fávaro EGP, Rizzo LA, Elias RM, Pontillo A. Double-edged sword of inflammasome genetics in colorectal cancer prognosis. *Clin Immunol*. 2020 Apr;213:108373. doi: 10.1016/j.clim.2020.108373. Epub 2020 Mar 2. PMID: 32135277.

Candeias SM, Gaip US. The Immune System in Cancer Prevention, Development and Therapy. *Anticancer Agents Med Chem*. 2016;16(1):101-107. doi:10.2174/1871520615666150824153523

Candido J, Hagemann T. Cancer-related inflammation. *J Clin Immunol*. 2013 Jan;33 Suppl 1:S79-84. doi: 10.1007/s10875-012-9847-0. Epub 2012 Dec 9. PMID: 23225204.

Cao X, Xu J. Insights into inflammasome and its research advances in cancer. *Tumori*. 2019 Dec;105(6):456-464. doi: 10.1177/0300891619868007. Epub 2019 Aug 13. PMID: 31407634.

Carbone A, Vizio B, Novarino A, Mauri FA, Geuna M, Robino C, Brondino G, Prati A, Giacobino A, Campa D, Chiarle R, Fronda GR, Ciuffreda L, Bellone G. IL-18 paradox in pancreatic carcinoma: elevated serum levels of free IL-18 are correlated with poor survival. *J Immunother*. 2009 Nov-Dec;32(9):920-31. doi: 10.1097/CJI.0b013e3181b29168. PMID: 19816189.

Castaño-Rodríguez N, Kaakoush NO, Mitchell HM. Pattern-recognition receptors and gastric cancer. *Front Immunol*. 2014 Jul 22;5:336. doi: 10.3389/fimmu.2014.00336. PMID: 25101079; PMCID: PMC4105827.

Chandrasekaran EV, Xue J, Neelamegham S, Matta KL. The pattern of glycosyl- and sulfotransferase activities in cancer cell lines: a predictor of individual cancer-associated distinct carbohydrate structures for the structural identification of signature glycans. *Carbohydr Res*. 2006;341(8):983-994. doi:10.1016/j.carres.2006.02.017

Chang TH, Huang JH, Lin HC, et al. Dectin-2 is a primary receptor for NLRP3 inflammasome activation in dendritic cell response to *Histoplasma capsulatum*. *PLoS Pathog*. 2017;13(7):e1006485. Published 2017 Jul 3. doi:10.1371/journal.ppat.1006485

Chelimo C, Wouldes TA, Cameron LD, Elwood JM. Risk factors for and prevention of human papillomaviruses (HPV), genital warts and cervical cancer. *J Infect*. 2013 Mar;66(3):207-17. doi: 10.1016/j.jinf.2012.10.024. Epub 2012 Oct 26. PMID: 23103285.

Chen IF, Ou-Yang F, Hung JY, et al. AIM2 suppresses human breast cancer cell proliferation in vitro and mammary tumor growth in a mouse model. *Mol Cancer Ther*. 2006;5(1):1-7. doi:10.1158/1535-7163.MCT-05-0310

Chen LC, Wang LJ, Tsang NM, et al. Tumour inflammasome-derived IL-1 β recruits neutrophils and improves local recurrence-free survival in EBV-induced nasopharyngeal carcinoma. *EMBO Mol Med*. 2012;4(12):1276-1293. doi:10.1002/emmm.201201569

Chen W, Wong C, Vosburgh E, Levine AJ, Foran DJ, Xu EY. High-throughput image analysis of tumor spheroids: a user-friendly software application to measure the size of spheroids automatically and accurately. *J Vis Exp*. 2014;(89):51639. Published 2014 Jul 8. doi:10.3791/51639

Chiba S, Ikushima H, Ueki H, et al. Recognition of tumor cells by Dectin-1 orchestrates innate immune cells for anti-tumor responses. *Elife*. 2014;3:e04177. Published 2014 Aug 22. doi:10.7554/eLife.04177

Cho D, Song H, Kim YM, et al. Endogenous interleukin-18 modulates immune escape of murine melanoma cells by regulating the expression of Fas ligand and reactive oxygen intermediates. *Cancer Res*. 2000;60(10):2703-2709.

Christgen S, Kanneganti TD. Inflammasomes and the fine line between defense and disease. *Curr Opin Immunol*. 2020 Feb;62:39-44. doi: 10.1016/j.coi.2019.11.007. Epub 2019 Dec 25. PMID: 31837596; PMCID: PMC7067632.

Clifford GM, Gallus S, Herrero R, Muñoz N, Snijders PJ, Vaccarella S, Anh PT, Ferreccio C, Hieu NT, Matos E, Molano M, Rajkumar R, Ronco G, de Sanjosé S, Shin HR, Sukvirach S, Thomas JO, Tunsakul S, Meijer CJ, Franceschi S; IARC HPV Prevalence Surveys Study Group. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *Lancet*. 2005 Sep 17-23;366(9490):991-8. doi: 10.1016/S0140-6736(05)67069-9. PMID: 16168781.

Cohen I, Rider P, Carmi Y, et al. Differential release of chromatin-bound IL-1 α discriminates between necrotic and apoptotic cell death by the ability to induce sterile inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(6):2574-2579. doi:10.1073/pnas.0915018107

Coll RC, Robertson A, Butler M, Cooper M, O'Neill LA. The cytokine release inhibitory drug CRID3 targets ASC oligomerisation in the NLRP3 and AIM2 inflammasomes. *PLoS One*. 2011;6(12):e29539. doi: 10.1371/journal.pone.0029539. Epub 2011 Dec 22. Erratum in: *PLoS One*. 2013;8(2). doi:10.1371/annotation/9f221489-155d-4978-a36d-30c51853e438. Erratum in: *PLoS One*. 2013;8(7). doi:10.1371/annotation/78d328b9-2c8c-4978-84b1-7e6a0b12ada1. Robertson, Avril [added]; Butler, Mark [added]; Cooper, Matthew [added]. PMID: 22216309; PMCID: PMC3245271.

Coll RC, Robertson AA, Chae JJ, et al. A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. *Nat Med*. 2015;21(3):248-255. doi:10.1038/nm.3806

Cookson BT, Brennan MA. Pro-inflammatory programmed cell death. *Trends Microbiol*. 2001 Mar;9(3):113-4. doi: 10.1016/s0966-842x(00)01936-3. PMID: 11303500.

Costa EC, Gaspar VM, Coutinho P, Correia IJ. Optimization of liquid overlay technique to formulate heterogenic 3D co-cultures models. *Biotechnol Bioeng*. 2014;111(8):1672-1685. doi:10.1002/bit.25210

da Silva WC, Oshiro TM, de Sá DC, Franco DD, Festa Neto C, Pontillo A. Genotyping and differential expression analysis of inflammasome genes in sporadic malignant melanoma reveal novel contribution of CARD8, IL1B and IL18 in melanoma susceptibility and progression. *Cancer Genet*. 2016 Oct;209(10):474-480. doi: 10.1016/j.cancergen.2016.09.004. Epub 2016 Sep 16. PMID: 27810076.

Däster S, Amatruda N, Calabrese D, Ivanek R, Turrini E, Drieser RA, Zajac P, Fimognari C, Spagnoli GC, Iezzi G, Mele V, Muraro MG. Induction of hypoxia and necrosis in multicellular tumor spheroids is associated with resistance to chemotherapy treatment. *Oncotarget*. 2017 Jan 3;8(1):1725-1736. doi: 10.18632/oncotarget.13857. PMID: 27965457; PMCID: PMC5352092.

de Mooij CEM, Netea MG, van der Velden WJFM, Blijlevens NMA. Targeting the interleukin-1 pathway in patients with hematological disorders. *Blood*. 2017 Jun 15;129(24):3155-3164. doi: 10.1182/blood-2016-12-754994. Epub 2017 May 8. PMID: 28483765.

Deswaerte V, Nguyen P, West A, Browning AF, Yu L, Ruwanpura SM, Balic J, Livis T, Girard C, Preaudet A, Oshima H, Fung KY, Tye H, Najdovska M, Ernst M, Oshima M, Gabay C, Putoczki T, Jenkins BJ. Inflammasome Adaptor ASC Suppresses Apoptosis of Gastric Cancer Cells by an IL18-Mediated Inflammation-Independent Mechanism. *Cancer Res*. 2018 Mar 1;78(5):1293-1307. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-1887. Epub 2017 Dec 27. PMID: 29282220.

Dong LM, Brennan P, Karami S, Hung RJ, Menashe I, Berndt SI, Yeager M, Chanock S, Zaridze D, Matveev V, Janout V, Kollarova H, Bencko V, Schwartz K, Davis F, Navratilova M, Szeszenia-Dabrowska N, Mates D, Colt JS, Holcatova I, Boffetta P, Rothman N, Chow WH, Rosenberg PS, Moore LE. An analysis of growth, differentiation and apoptosis genes with risk of renal cancer. *PLoS One*. 2009 Mar 24;4(3):e4895. doi: 10.1371/journal.pone.0004895. PMID: 19603096; PMCID: PMC2656573.

Doorbar J, Cubie H. Molecular basis for advances in cervical screening. *Mol Diagn*. 2005;9(3):129-42. doi: 10.1007/BF03260081. PMID: 16271014.

Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, Stanley MA. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*. 2012 Nov 20;30 Suppl 5:F55-70. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.06.083. PMID: 23199966

Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)*. 2006 May;110(5):525-41. doi: 10.1042/CS20050369. PMID: 16597322.

Dougan M, Dougan SK. Targeting Immunotherapy to the Tumor Microenvironment. *J Cell Biochem*. 2017;118(10):3049-3054. doi:10.1002/jcb.26005

Drexler SK, Bonsignore L, Masin M, Tardivel A, Jackstadt R, Hermeking H, Schneider P, Gross O, Tschopp J, Yazdi AS. Tissue-specific opposing functions of the inflammasome adaptor ASC in the regulation of epithelial skin carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Nov 6;109(45):18384-9. doi: 10.1073/pnas.1209171109. Epub 2012 Oct 22. PMID: 23090995; PMCID: PMC3494892.

Du Q, Wang Q, Fan H, Wang J, Liu X, Wang H, Wang Y, Hu R. Dietary cholesterol promotes AOM-induced colorectal cancer through activating the NLRP3 inflammasome. *Biochem Pharmacol*. 2016 Apr 1;105:42-54. doi: 10.1016/j.bcp.2016.02.017. Epub 2016 Feb 24. PMID: 26921636.

Dupaul-Chicoine J, Yeretssian G, Doiron K, Bergstrom KS, McIntire CR, LeBlanc PM, Meunier C, Turbide C, Gros P, Beauchemin N, Vallance BA, Saleh M. Control of intestinal homeostasis, colitis, and colitis-associated colorectal cancer by the inflammatory caspases. *Immunity*. 2010 Mar 26;32(3):367-78. doi: 10.1016/j.immuni.2010.02.012. Epub 2010 Mar 11. PMID: 20226691

Eo WK, Kwon BS, Kim KH, et al. Monocytosis as a prognostic factor for survival in stage IB and IIA cervical cancer. *J Cancer*. 2018;9(1):64-70. Published 2018 Jan 1. doi:10.7150/jca.22234

Esmailbeig M, Ghaderi A. Interleukin-18: a regulator of cancer and autoimmune diseases. *Eur Cytokine Netw*. 2017 Nov 1;28(4):127-140. doi: 10.1684/ecn.2018.0401. PMID: 29478963

- Eyre R, Alfrez DG, Santiago-Gmez A, Spence K, McConnell JC, Hart C, Simes BM, Lefley D, Tulotta C, Storer J, Gurney A, Clarke N, Brown M, Howell SJ, Sims AH, Farnie G, Ottewell PD, Clarke RB. Microenvironmental IL1 promotes breast cancer metastatic colonisation in the bone via activation of Wnt signalling. *Nat Commun*. 2019 Nov 1;10(1):5016. doi: 10.1038/s41467-019-12807-0. PMID: 31676788; PMCID: PMC6825219.
- Fabbi M, Carbotti G, Ferrini S. Context-dependent role of IL-18 in cancer biology and counter-regulation by IL-18BP. *J Leukoc Biol*. 2015;97(4):665-675. doi:10.1189/jlb.5RU0714-360RR
- Fang Y, Tian S, Pan Y, Li W, Wang Q, Tang Y, Yu T, Wu X, Shi Y, Ma P, Shu Y. Pyroptosis: A new frontier in cancer. *Biomed Pharmacother*. 2020 Jan;121:109595. doi: 10.1016/j.biopha.2019.109595. Epub 2019 Nov 9. PMID: 31710896.
- Fehrmann F, Laimins LA. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene*. 2003 Aug 11;22(33):5201-7. doi: 10.1038/sj.onc.1206554. PMID: 12910257.
- Feldmeyer L, Keller M, Niklaus G, Hohl D, Werner S, Beer HD. The inflammasome mediates UVB-induced activation and secretion of interleukin-1beta by keratinocytes. *Curr Biol*. 2007 Jul 3;17(13):1140-5. doi: 10.1016/j.cub.2007.05.074. PMID: 17600714.
- Feller L, Wood NH, Khammissa RA, Chikte UM, Meyerov R, Lemmer J. HPV modulation of host immune responses. *SADJ*. 2010 Jul;65(6):266-8. PMID: 20879650.
- Fenini G, Grossi S, Contassot E, Biedermann T, Reichmann E, French LE, Beer HD. Genome Editing of Human Primary Keratinocytes by CRISPR/Cas9 Reveals an Essential Role of the NLRP1 Inflammasome in UVB Sensing. *J Invest Dermatol*. 2018 Dec;138(12):2644-2652. doi: 10.1016/j.jid.2018.07.016. Epub 2018 Aug 7. PMID: 30096351.
- Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Pieros M, Znaor A, Bray F. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer*. 2019 Apr 15;144(8):1941-1953. doi: 10.1002/ijc.31937. Epub 2018 Dec 6. PMID: 30350310.
- Fernandes-Alnemri T, Yu JW, Datta P, Wu J, Alnemri ES. AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature*. 2009 Mar 26;458(7237):509-13. doi: 10.1038/nature07710. Epub 2009 Jan 21. PMID: 19158676; PMCID: PMC2862225.
- Fernandes FP, Leal VNC, Souza de Lima D, Reis EC, Pontillo A. Inflammasome genetics and complex diseases: a comprehensive review. *Eur J Hum Genet*. 2020 Oct;28(10):1307-1321. doi: 10.1038/s41431-020-0631-y. Epub 2020 Jun 4. PMID: 32499599.
- Franchi L, Amer A, Body-Malapel M, Kanneganti TD, Ozren N, Jagirdar R, Inohara N, Vandenabeele P, Bertin J, Coyle A, Grant EP, Nez G. Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in salmonella-infected macrophages. *Nat Immunol*. 2006 Jun;7(6):576-82. doi: 10.1038/ni1346. Epub 2006 Apr 30. PMID: 16648852.
- Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP, Prado JM, Rousseau MC, Dsy M, Rohan TE. Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J Infect Dis*. 1999 Nov;180(5):1415-23. doi: 10.1086/315086. PMID: 10515798.
- Frankel T, Lanfranca MP, Zou W. The Role of Tumor Microenvironment in Cancer Immunotherapy. *Adv Exp Med Biol*. 2017;1036:51-64. doi:10.1007/978-3-319-67577-0_4

Frayling TM, Rafiq S, Murray A, Hurst AJ, Weedon MN, Henley W, Bandinelli S, Corsi AM, Ferrucci L, Guralnik JM, Wallace RB, Melzer D. An interleukin-18 polymorphism is associated with reduced serum concentrations and better physical functioning in older people. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2007 Jan;62(1):73-8. doi: 10.1093/gerona/62.1.73. PMID: 17301041; PMCID: PMC2669299.

Frazer IH. Interaction of human papillomaviruses with the host immune system: a well evolved relationship. *Virology*. 2009 Feb 20;384(2):410-4. doi: 10.1016/j.virol.2008.10.004. Epub 2008 Nov 4. PMID: 18986661.

Frazer IH. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nat Rev Immunol*. 2004 Jan;4(1):46-54. doi: 10.1038/nri1260. PMID: 14704767.

Furuoka M, Ozaki K, Sadatomi D, et al. TNF- α Induces Caspase-1 Activation Independently of Simultaneously Induced NLRP3 in 3T3-L1 Cells. *J Cell Physiol*. 2016;231(12):2761-2767. doi:10.1002/jcp.25385

Gaidt MM, Ebert TS, Chauhan D, et al. Human Monocytes Engage an Alternative Inflammasome Pathway. *Immunity*. 2016;44(4):833-846. doi:10.1016/j.immuni.2016.01.012

Gajewski TF, Schreiber H, Fu YX. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Immunol*. 2013 Oct;14(10):1014-22. doi: 10.1038/ni.2703. PMID: 24048123; PMCID: PMC4118725.

Garcia-Arias A, Cetina L, Candelaria M, Robles E, Dueñas-González A. The prognostic significance of leukocytosis in cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2007;17(2):465-470. doi:10.1111/j.1525-1438.2007.00816.x

Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity*. 2013 Dec 12;39(6):1003-18. doi: 10.1016/j.immuni.2013.11.010. PMID: 24332029; PMCID: PMC3933951.

Gattorno M, Tassi S, Carta S, et al. Pattern of interleukin-1 β secretion in response to lipopolysaccharide and ATP before and after interleukin-1 blockade in patients with CIAS1 mutations. *Arthritis Rheum*. 2007;56(9):3138-3148. doi:10.1002/art.228

Ghiringhelli F, Apetoh L, Tesniere A, Aymeric L, Ma Y, Ortiz C, Vermaelen K, Panaretakis T, Mignot G, Ullrich E, Perfettini JL, Schlemmer F, Tasdemir E, Uhl M, Génin P, Civas A, Ryffel B, Kanellopoulos J, Tschopp J, André F, Lidereau R, McLaughlin NM, Haynes NM, Smyth MJ, Kroemer G, Zitvogel L. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1 β -dependent adaptive immunity against tumors. *Nat Med*. 2009 Oct;15(10):1170-8. doi: 10.1038/nm.2028. Epub 2009 Sep 20. PMID: 19767732.

Gong T, Jiang W, Zhou R. Control of Inflammasome Activation by Phosphorylation. *Trends Biochem Sci*. 2018 Sep;43(9):685-699. doi: 10.1016/j.tibs.2018.06.008. Epub 2018 Jul 23. PMID: 30049633.

Gouveia-Fernandes S. Monocytes and Macrophages in Cancer: Unsuspected Roles. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1219:161-185. doi:10.1007/978-3-030-34025-4_9

Greten FR, Grivennikov SI. Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences. *Immunity*. 2019 Jul 16;51(1):27-41. doi: 10.1016/j.immuni.2019.06.025. PMID: 31315034; PMCID: PMC6831096.

Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010 Mar 19;140(6):883-99. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.025. PMID: 20303878; PMCID: PMC2866629.

Guarda G, Braun M, Staehli F, Tardivel A, Mattmann C, Förster I, Farlik M, Decker T, Du Pasquier RA, Romero P, Tschopp J. Type I interferon inhibits interleukin-1 production and inflammasome activation. *Immunity*. 2011 Feb 25;34(2):213-23. doi: 10.1016/j.immuni.2011.02.006. PMID: 21349431.

Guarda G, Dostert C, Staehli F, Cabalzar K, Castillo R, Tardivel A, Schneider P, Tschopp J. T cells dampen innate immune responses through inhibition of NLRP1 and NLRP3 inflammasomes. *Nature*. 2009 Jul 9;460(7252):269-73. doi: 10.1038/nature08100. Epub 2009 Jun 3. PMID: 19494813.

Günel N, Coşkun U, Sancak B, Günel U, Hasdemir O, Bozkurt S. Clinical importance of serum interleukin-18 and nitric oxide activities in breast carcinoma patients. *Cancer*. 2002 Aug 1;95(3):663-7. doi: 10.1002/cncr.10705. PMID: 12209760.

Gurung P, Anand PK, Malireddi RK, et al. FADD and caspase-8 mediate priming and activation of the canonical and noncanonical Nlrp3 inflammasomes. *J Immunol*. 2014;192(4):1835-1846. doi:10.4049/jimmunol.1302839

Hall SK, Perregaux DG, Gabel CA, Woodworth T, Durham LK, Huizinga TW, Breedveld FC, Seymour AB. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein. *Arthritis Rheum*. 2004 Jun;50(6):1976-83. doi: 10.1002/art.20310. PMID: 15188375.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013. PMID: 21376230.

Haneklaus M, O'Neill LA, Coll RC. Modulatory mechanisms controlling the NLRP3 inflammasome in inflammation: recent developments. *Curr Opin Immunol*. 2013 Feb;25(1):40-5. doi: 10.1016/j.coi.2012.12.004. Epub 2013 Jan 7. PMID: 23305783.

Hasan UA, Zannetti C, Parroche P, Goutagny N, Malfroy M, Roblot G, Carreira C, Hussain I, Müller M, Taylor-Papadimitriou J, Picard D, Sylla BS, Trinchieri G, Medzhitov R, Tommasino M. The human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein induces a transcriptional repressor complex on the Toll-like receptor 9 promoter. *J Exp Med*. 2013 Jul 1;210(7):1369-87. doi: 10.1084/jem.20122394. Epub 2013 Jun 10. PMID: 23752229; PMCID: PMC3698525.

Hasegawa T, Nakashima M, Suzuki Y. Nuclear DNA damage-triggered NLRP3 inflammasome activation promotes UVB-induced inflammatory responses in human keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 Aug 26;477(3):329-35. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.06.106. Epub 2016 Jun 23. PMID: 27343554.

Hausman DM. What Is Cancer? *Perspect Biol Med*. 2019;62(4):778-784. doi: 10.1353/pbm.2019.0046. PMID: 31761807.

Hayward JA, Mathur A, Ngo C, Man SM. Cytosolic Recognition of Microbes and Pathogens: Inflammasomes in Action. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2018 Sep 12;82(4):e00015-18. doi: 10.1128/MMBR.00015-18. PMID: 30209070; PMCID: PMC6298609.

He A, Shao J, Zhang Y, Lu H, Wu Z, Xu Y. CD200Fc reduces LPS-induced IL-1 β activation in human cervical cancer cells by modulating TLR4-NF- κ B and NLRP3 inflammasome pathway. *Oncotarget*. 2017;8(20):33214-33224. doi:10.18632/oncotarget.16596

He Q, Fu Y, Tian D, Yan W. The contrasting roles of inflammasomes in cancer. *Am J Cancer Res*. 2018;8(4):566-583. Published 2018 Apr 1.

He WT, Wan H, Hu L, Chen P, Wang X, Huang Z, Yang ZH, Zhong CQ, Han J. Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1 β secretion. *Cell Res*. 2015 Dec;25(12):1285-98. doi: 10.1038/cr.2015.139. Epub 2015 Nov 27. PMID: 26611636; PMCID: PMC4670995.

Hebner CM, Laimins LA. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev Med Virol*. 2006 Mar-Apr;16(2):83-97. doi: 10.1002/rmv.488. PMID: 16287204.

Hirota SA, Ng J, Lueng A, Khajah M, Parhar K, Li Y, Lam V, Potentier MS, Ng K, Bawa M, McCafferty DM, Rioux KP, Ghosh S, Xavier RJ, Colgan SP, Tschopp J, Muruve D, MacDonald JA, Beck PL. NLRP3 inflammasome plays a key role in the regulation of intestinal homeostasis. *Inflamm Bowel Dis*. 2011 Jun;17(6):1359-72. doi: 10.1002/ibd.21478. Epub 2010 Sep 24. PMID: 20872834; PMCID: PMC3026862.

Hitomi Y, Ebisawa M, Tomikawa M, Imai T, Komata T, Hirota T, Harada M, Sakashita M, Suzuki Y, Shimojo N, Kohno Y, Fujita K, Miyatake A, Doi S, Enomoto T, Taniguchi M, Higashi N, Nakamura Y, Tamari M. Associations of functional NLRP3 polymorphisms with susceptibility to food-induced anaphylaxis and aspirin-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 Oct;124(4):779-85.e6. doi: 10.1016/j.jaci.2009.07.044. Epub 2009 Sep 19. PMID: 19767079.

Hopcraft SE, Damania B. Tumour viruses and innate immunity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2017 Oct 19;372(1732):20160267. doi: 10.1098/rstb.2016.0267. PMID: 28893934; PMCID: PMC5597734.

Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, Fitzgerald KA, Latz E. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol*. 2008 Aug;9(8):847-56. doi: 10.1038/ni.1631. Epub 2008 Jul 11. PMID: 18604214; PMCID: PMC2834784.

Hu B, Elinav E, Huber S, Booth CJ, Strowig T, Jin C, Eisenbarth SC, Flavell RA. Inflammation-induced tumorigenesis in the colon is regulated by caspase-1 and NLRC4. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Dec 14;107(50):21635-40. doi: 10.1073/pnas.1016814108. Epub 2010 Nov 30. PMID: 21118981; PMCID: PMC3003083.

Huang FY, Chan AO, Rashid A, Wong DK, Seto WK, Cho CH, Lai CL, Yuen MF. Interleukin-1 β increases the risk of gastric cancer through induction of aberrant DNA methylation in a mouse model. *Oncol Lett*. 2016 Apr;11(4):2919-2924. doi: 10.3892/ol.2016.4296. Epub 2016 Mar 1. PMID: 27073577; PMCID: PMC4812546.

Huber NL, Bailey SR, Schuster R, Ogle CK, Lentsch AB, Pritts TA. Prior thermal injury accelerates endotoxin-induced inflammatory cytokine production and intestinal nuclear factor- κ B activation in mice. *J Burn Care Res*. 2012 Mar-Apr;33(2):279-85. doi: 10.1097/BCR.0b013e3182331d75. PMID: 22079902; PMCID: PMC4623598.

INCA. Estimativa de Câncer no Brasil, 2020, [www.https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer](https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer) (2020, acesso 10 setembro 2020)

Ito S, Hara Y, Kubota T. CARD8 is a negative regulator for NLRP3 inflammasome, but mutant NLRP3 in cryopyrin-associated periodic syndromes escapes the restriction. *Arthritis Res Ther*. 2014 Feb 12;16(1):R52. doi: 10.1186/ar4483. PMID: 24517500; PMCID: PMC4060228.

Janowski AM, Kolb R, Zhang W, Sutterwala FS. Beneficial and Detrimental Roles of NLRs in Carcinogenesis. *Front Immunol*. 2013 Nov 12;4:370. doi: 10.3389/fimmu.2013.00370. PMID: 24273542; PMCID: PMC3824244.

Janssen LME, Ramsay EE, Logsdon CD, Overwijk WW. The immune system in cancer metastasis: friend or foe?. *J Immunother Cancer*. 2017;5(1):79. Published 2017 Oct 17. doi:10.1186/s40425-017-0283-9

Juliana C, Fernandes-Alnemri T, Wu J, et al. Anti-inflammatory compounds parthenolide and Bay 11-7082 are direct inhibitors of the inflammasome. *J Biol Chem*. 2010;285(13):9792-9802. doi:10.1074/jbc.M109.082305

Kang S, Kim JW, Park NH, Song YS, Park SY, Kang SB, Lee HP. Interleukin-1 beta-511 polymorphism and risk of cervical cancer. *J Korean Med Sci*. 2007 Feb;22(1):110-3. doi: 10.3346/jkms.2007.22.1.110. PMID: 17297261; PMCID: PMC2693544.

Kankkunen P, Teirilä L, Rintahaka J, Alenius H, Wolff H, Matikainen S. (1,3)-beta-glucans activate both dectin-1 and NLRP3 inflammasome in human macrophages. *J Immunol*. 2010 Jun 1;184(11):6335-42. doi: 10.4049/jimmunol.0903019. Epub 2010 Apr 26. PMID: 20421639.

Kantono M, Guo B. Inflammasomes and Cancer: The Dynamic Role of the Inflammasome in Tumor Development. *Front Immunol*. 2017;8:1132. Published 2017 Sep 12. doi:10.3389/fimmu.2017.01132

Karan D. Inflammasomes: Emerging Central Players in Cancer Immunology and Immunotherapy. *Front Immunol*. 2018;9:3028. Published 2018 Dec 20. doi:10.3389/fimmu.2018.03028

Karki R, Kanneganti TD. Diverging inflammasome signals in tumorigenesis and potential targeting. *Nat Rev Cancer*. 2019 Apr;19(4):197-214. doi: 10.1038/s41568-019-0123-y. PMID: 30842595; PMCID: PMC6953422.

Karki R, Man SM, Kanneganti TD. Inflammasomes and Cancer. *Cancer Immunol Res*. 2017;5(2):94-99. doi:10.1158/2326-6066.CIR-16-0269

Kashyap M, Pore S, Wang Z, Gingrich J, Yoshimura N, Tyagi P. Inflammasomes are important mediators of prostatic inflammation associated with BPH. *J Inflamm (Lond)*. 2015 May 17;12:37. doi: 10.1186/s12950-015-0082-3. PMID: 25991911; PMCID: PMC4436794.

Kattah MG, Malynn BA, Ma A. Ubiquitin-Modifying Enzymes and Regulation of the Inflammasome. *J Mol Biol*. 2017 Nov 10;429(22):3471-3485. doi: 10.1016/j.jmb.2017.10.001. Epub 2017 Oct 13. PMID: 29031697; PMCID: PMC5675782.

Kemp TJ, Hildesheim A, García-Piñeres A, et al. Elevated systemic levels of inflammatory cytokines in older women with persistent cervical human papillomavirus infection. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010;19(8):1954-1959. doi:10.1158/1055-9965.EPI-10-0184

Kobayashi A, Weinberg V, Darragh T, Smith-McCune K. Evolving immunosuppressive microenvironment during human cervical carcinogenesis. *Mucosal Immunol*. 2008 Sep;1(5):412-20. doi: 10.1038/mi.2008.33. Epub 2008 Jul 2. PMID: 19079205.

Kofoed EM, Vance RE. Innate immune recognition of bacterial ligands by NAIPs determines inflammasome specificity. *Nature*. 2011 Aug 28;477(7366):592-5. doi: 10.1038/nature10394. PMID: 21874021; PMCID: PMC3184209.

Kolb R, Phan L, Borchering N, et al. Obesity-associated NLRC4 inflammasome activation drives breast cancer progression. *Nat Commun*. 2016;7:13007. Published 2016 Oct 6. doi:10.1038/ncomms13007

- Kopalli SR, Kang TB, Lee KH, Koppula S. NLRP3 Inflammasome Activation Inhibitors in Inflammation-Associated Cancer Immunotherapy: An Update on the Recent Patents. *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* 2018;13(1):106-117. doi:10.2174/157489281266617102712627
- Kumar S, Dhiman M. Inflammasome activation and regulation during *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Microb Pathog.* 2018;125:468-474. doi:10.1016/j.micpath.2018.10.012
- Kuriakose T, Kanneganti TD. Gasdermin D Flashes an Exit Signal for IL-1. *Immunity.* 2018 Jan 16;48(1):1-3. doi: 10.1016/j.immuni.2018.01.003. PMID: 29343431.
- Kuriakose T, Kanneganti TD. Pyroptosis in Antiviral Immunity. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2019 Dec 25;10.1007/82_2019_189. doi: 10.1007/82_2019_189. Epub ahead of print. PMID: 31875268; PMCID: PMC7314647.
- Lage SL, Longo C, Branco LM, da Costa TB, Buzzo Cde L, Bortoluci KR. Emerging Concepts about NAIP/NLRC4 Inflammasomes. *Front Immunol.* 2014 Jul 2;5:309. doi: 10.3389/fimmu.2014.00309. PMID: 25071770; PMCID: PMC4078251.
- Lamkanfi M, Dixit VM. Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell.* 2014 May 22;157(5):1013-22. doi: 10.1016/j.cell.2014.04.007. PMID: 24855941.
- Lamkanfi M, Dixit VM. Modulation of inflammasome pathways by bacterial and viral pathogens. *J Immunol.* 2011;187(2):597-602. doi:10.4049/jimmunol.1100229
- Latz E, Xiao TS, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat Rev Immunol.* 2013 Jun;13(6):397-411. doi: 10.1038/nri3452. PMID: 23702978; PMCID: PMC3807999.
- Lee CH, Chang JS, Syu SH, Wong TS, Chan JY, Tang YC, Yang ZP, Yang WC, Chen CT, Lu SC, Tang PH, Yang TC, Chu PY, Hsiao JR, Liu KJ. IL-1 β promotes malignant transformation and tumor aggressiveness in oral cancer. *J Cell Physiol.* 2015 Apr;230(4):875-84. doi: 10.1002/jcp.24816. PMID: 25204733.
- Lee HE, Lee JY, Yang G, Kang HC, Cho YY, Lee HS, Lee JY. Inhibition of NLRP3 inflammasome in tumor microenvironment leads to suppression of metastatic potential of cancer cells. *Sci Rep.* 2019 Aug 22;9(1):12277. doi: 10.1038/s41598-019-48794-x. PMID: 31439870; PMCID: PMC6706417.
- Lee HM, Yuk JM, Kim KH, Jang J, Kang G, Park JB, Son JW, Jo EK. *Mycobacterium abscessus* activates the NLRP3 inflammasome via Dectin-1-Syk and p62/SQSTM1. *Immunol Cell Biol.* 2012 Jul;90(6):601-10. doi: 10.1038/icb.2011.72. Epub 2011 Aug 30. PMID: 21876553; PMCID: PMC3389799.
- Lee YY, Choi CH, Sung CO, et al. Prognostic value of pre-treatment circulating monocyte count in patients with cervical cancer: comparison with SCC-Ag level. *Gynecol Oncol.* 2012;124(1):92-97. doi:10.1016/j.ygyno.2011.09.034
- Leek R, Grimes DR, Harris AL, McIntyre A. Methods: Using Three-Dimensional Culture (Spheroids) as an In Vitro Model of Tumour Hypoxia. *Adv Exp Med Biol.* 2016;899:167-196. doi:10.1007/978-3-319-26666-4_10
- Lei X, Lei Y, Li JK, Du WX, Li RG, Yang J, Li J, Li F, Tan HB. Immune cells within the tumor microenvironment: Biological functions and roles in cancer immunotherapy. *Cancer Lett.* 2020 Feb 1;470:126-133. doi: 10.1016/j.canlet.2019.11.009. Epub 2019 Nov 12. PMID: 31730903.
- Levandowski CB, Mailloux CM, Ferrara TM, Gowan K, Ben S, Jin Y, McFann KK, Holland PJ, Fain PR, Dinarello CA, Spritz RA. NLRP1 haplotypes associated with vitiligo and autoimmunity

increase interleukin-1 β processing via the NLRP1 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Feb 19;110(8):2952-6. doi: 10.1073/pnas.1222808110. Epub 2013 Feb 4. PMID: 23382179; PMCID: PMC3581876.

Li H, Ambade A, Re F. Cutting edge: Necrosis activates the NLRP3 inflammasome. *J Immunol*. 2009;183(3):1528-1532. doi:10.4049/jimmunol.0901080

Li S, Liang X, Ma L, Shen L, Li T, Zheng L, Sun A, Shang W, Chen C, Zhao W, Jia J. MiR-22 sustains NLRP3 expression and attenuates *H. pylori*-induced gastric carcinogenesis. *Oncogene*. 2018 Feb 15;37(7):884-896. doi: 10.1038/onc.2017.381. Epub 2017 Oct 23. PMID: 29059152.

Lightfield KL, Persson J, Trinidad NJ, Brubaker SW, Kofoed EM, Sauer JD, Dunipace EA, Warren SE, Miao EA, Vance RE. Differential requirements for NAIP5 in activation of the NLRC4 inflammasome. *Infect Immun*. 2011 Apr;79(4):1606-14. doi: 10.1128/IAI.01187-10. Epub 2011 Jan 31. PMID: 21282416; PMCID: PMC3067536.

Lin YC, Huang DY, Wang JS, et al. Syk is involved in NLRP3 inflammasome-mediated caspase-1 activation through adaptor ASC phosphorylation and enhanced oligomerization. *J Leukoc Biol*. 2015;97(5):825-835. doi:10.1189/jlb.3HI0814-371RR

Liston A, Masters SL. Homeostasis-altering molecular processes as mechanisms of inflammasome activation. *Nat Rev Immunol*. 2017 Mar;17(3):208-214. doi: 10.1038/nri.2016.151. Epub 2017 Feb 6. PMID: 28163301.

Litmanovich A, Khazim K, Cohen I. The Role of Interleukin-1 in the Pathogenesis of Cancer and its Potential as a Therapeutic Target in Clinical Practice. *Oncol Ther*. 2018 Dec;6(2):109-127. doi: 10.1007/s40487-018-0089-z. Epub 2018 Nov 28. PMID: 32700032; PMCID: PMC7359982.

Liu D, Zeng X, Li X, Mehta JL, Wang X. Role of NLRP3 inflammasome in the pathogenesis of cardiovascular diseases. *Basic Res Cardiol*. 2017 Dec 9;113(1):5. doi: 10.1007/s00395-017-0663-9. PMID: 29224086.

Liu SG, Wu XX, Hua T, Xin XY, Feng DL, Chi SQ, Wang XX, Wang HB. NLRP3 inflammasome activation by estrogen promotes the progression of human endometrial cancer. *Onco Targets Ther*. 2019 Aug 27;12:6927-6936. doi: 10.2147/OTT.S218240. PMID: 31695408; PMCID: PMC6717726.

Liu W, Luo Y, Dunn JH, Norris DA, Dinarello CA, Fujita M. Dual role of apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC) in tumorigenesis of human melanoma. *J Invest Dermatol*. 2013 Feb;133(2):518-27. doi: 10.1038/jid.2012.317. Epub 2012 Aug 30. PMID: 22931929; PMCID: PMC3511638.

Lopez-Castejon G. Control of the inflammasome by the ubiquitin system. *FEBS J*. 2020 Jan;287(1):11-26. doi: 10.1111/febs.15118. Epub 2019 Nov 20. PMID: 31679183; PMCID: PMC7138099.

Ma Z, Ni G, Damania B. Innate Sensing of DNA Virus Genomes. *Annu Rev Virol*. 2018 Sep 29;5(1):341-362. doi: 10.1146/annurev-virology-092917-043244. PMID: 30265633; PMCID: PMC6443256.

Mabuchi S, Matsumoto Y, Kawano M, et al. Uterine cervical cancer displaying tumor-related leukocytosis: a distinct clinical entity with radioresistant feature. *J Natl Cancer Inst*. 2014;106(7):dju147. Published 2014 Jun 19. doi:10.1093/jnci/dju147

Maker AV, Katabi N, Qin LX, Klimstra DS, Schattner M, Brennan MF, Jarnagin WR, Allen PJ. Cyst fluid interleukin-1beta (IL1beta) levels predict the risk of carcinoma in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Clin Cancer Res*. 2011 Mar 15;17(6):1502-8. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-1561. Epub 2011 Jan 25. PMID: 21266527; PMCID: PMC3065716.

Malik A, Kanneganti TD. Inflammasome activation and assembly at a glance. *J Cell Sci*. 2017;130(23):3955-3963. doi:10.1242/jcs.207365

Man SM, Karki R, Kanneganti TD. Molecular mechanisms and functions of pyroptosis, inflammatory caspases and inflammasomes in infectious diseases. *Immunol Rev*. 2017 May;277(1):61-75. doi: 10.1111/imr.12534. PMID: 28462526; PMCID: PMC5416822.

Mangan MSJ, Olhava EJ, Roush WR, Seidel HM, Glick GD, Latz E. Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2018 Aug;17(8):588-606. doi: 10.1038/nrd.2018.97. Epub 2018 Jul 20. Erratum in: *Nat Rev Drug Discov*. 2018 Sep;17(9):688. PMID: 30026524.

Mantovani A, Barajon I, Garlanda C. IL-1 and IL-1 regulatory pathways in cancer progression and therapy. *Immunol Rev*. 2018 Jan;281(1):57-61. doi: 10.1111/imr.12614. PMID: 29247996; PMCID: PMC5922413.

Mariathasan S, Newton K, Monack DM, Vucic D, French DM, Lee WP, Roose-Girma M, Erickson S, Dixit VM. Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature*. 2004 Jul 8;430(6996):213-8. doi: 10.1038/nature02664. Epub 2004 Jun 9. PMID: 15190255.

Martinez-Hervas S, Martínez-Barquero V, Nuñez Savall E, Lendínez V, Olivares L, Benito E, Real JT, Chaves FJ, Ascaso JF. Los niveles plasmáticos de IL-18 se relacionan con la insulinemia y están modulados por polimorfismos del gen de IL-18 [Plasma IL-18 levels are related to insulin and are modulated by IL-18 gene polymorphisms]. *Clin Investig Arterioscler*. 2015 Nov-Dec;27(6):265-71. Spanish. doi: 10.1016/j.arteri.2015.04.004. Epub 2015 Jul 20. PMID: 26205090.

Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell*. 2002;10(2):417-426. doi:10.1016/s1097-2765(02)00599-3

Masters SL, Lagou V, Jéru I, Baker PJ, Van Eyck L, Parry DA, Lawless D, De Nardo D, Garcia-Perez JE, Dagley LF, Holley CL, Dooley J, Moghaddas F, Pasciuto E, Jeandel PY, Sciort R, Lyras D, Webb AI, Nicholson SE, De Somer L, van Nieuwenhove E, Ruuth-Praz J, Copin B, Cochet E, Medlej-Hashim M, Megarbane A, Schroder K, Savic S, Goris A, Amselem S, Wouters C, Liston A. Familial autoinflammation with neutrophilic dermatosis reveals a regulatory mechanism of pyrin activation. *Sci Transl Med*. 2016 Mar 30;8(332):332ra45. doi: 10.1126/scitranslmed.aaf1471. PMID: 27030597.

Matamoros JA, da Silva MIF, de Moura PMMF, Leitão MDCG, Coimbra EC. Reduced Expression of IL-1 β and IL-18 Proinflammatory Interleukins Increases the Risk of Developing Cervical Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2019;20(9):2715-2721. Published 2019 Sep 1.

Mathur A, Hayward JA, Man SM. Molecular mechanisms of inflammasome signaling. *J Leukoc Biol*. 2018 Feb;103(2):233-257. doi: 10.1189/jlb.3MR0617-250R. Epub 2017 Dec 29. PMID: 28855232.

McBride AA. Mechanisms and strategies of papillomavirus replication. *Biol Chem*. 2017 Jul 26;398(8):919-927. doi: 10.1515/hsz-2017-0113. PMID: 28315855.

- McGeough MD, Wree A, Inzaugarat ME, et al. TNF regulates transcription of NLRP3 inflammasome components and inflammatory molecules in cryopyrinopathies. *J Clin Invest*. 2017;127(12):4488-4497. doi:10.1172/JCI90699
- McMurray HR, Nguyen D, Westbrook TF, McAnce DJ. Biology of human papillomaviruses. *Int J Exp Pathol*. 2001 Feb;82(1):15-33. doi: 10.1046/j.1365-2613.2001.00177.x. PMID: 11422538; PMCID: PMC2517699.
- Miao EA, Alpuche-Aranda CM, Dors M, Clark AE, Bader MW, Miller SI, Aderem A. Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via Ipaf. *Nat Immunol*. 2006 Jun;7(6):569-75. doi: 10.1038/ni1344. Epub 2006 Apr 30. PMID: 16648853.
- Mishra BB, Rathinam VA, Martens GW, Martinot AJ, Kornfeld H, Fitzgerald KA, Sasseti CM. Nitric oxide controls the immunopathology of tuberculosis by inhibiting NLRP3 inflammasome-dependent processing of IL-1 β . *Nat Immunol*. 2013 Jan;14(1):52-60. doi: 10.1038/ni.2474. Epub 2012 Nov 18. PMID: 23160153; PMCID: PMC3721324.
- Moossavi M, Parsamanesh N, Bahrami A, Atkin SL, Sahebkar A. Role of the NLRP3 inflammasome in cancer. *Mol Cancer*. 2018;17(1):158. Published 2018 Nov 17. doi:10.1186/s12943-018-0900-3
- Müller M, Viscidi RP, Sun Y, Guerrero E, Hill PM, Shah F, Bosch FX, Muñoz N, Gissmann L, Shah KV. Antibodies to HPV-16 E6 and E7 proteins as markers for HPV-16-associated invasive cervical cancer. *Virology*. 1992 Apr;187(2):508-14. doi: 10.1016/0042-6822(92)90453-v. PMID: 1312268.
- Münger K, Werness BA, Dyson N, Phelps WC, Harlow E, Howley PM. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J*. 1989 Dec 20;8(13):4099-105. PMID: 2556261; PMCID: PMC401588.
- Muñoz-Planillo R, Kuffa P, Martínez-Colón G, Smith BL, Rajendiran TM, Núñez G. K⁺ efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. *Immunity*. 2013 Jun 27;38(6):1142-53. doi: 10.1016/j.immuni.2013.05.016. PMID: 23809161; PMCID: PMC3730833.
- Murakami T, Ockinger J, Yu J, Byles V, McColl A, Hofer AM, Horng T. Critical role for calcium mobilization in activation of the NLRP3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Jul 10;109(28):11282-7. doi: 10.1073/pnas.1117765109. Epub 2012 Jun 25. PMID: 22733741; PMCID: PMC3396518.
- Netea MG, Nold-Petry CA, Nold MF, et al. Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1beta in monocytes and macrophages. *Blood*. 2009;113(10):2324-2335. doi:10.1182/blood-2008-03-146720
- Niebler M, Qian X, Höfler D, et al. Post-translational control of IL-1 β via the human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein: a novel mechanism of innate immune escape mediated by the E3-ubiquitin ligase E6-AP and p53. *PLoS Pathog*. 2013;9(8):e1003536. doi:10.1371/journal.ppat.1003536
- Normand S, Delanoye-Crespin A, Bressenot A, Huot L, Grandjean T, Peyrin-Biroulet L, Lemoine Y, Hot D, Chamaillard M. Nod-like receptor pyrin domain-containing protein 6 (NLRP6) controls epithelial self-renewal and colorectal carcinogenesis upon injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Jun 7;108(23):9601-6. doi: 10.1073/pnas.1100981108. Epub 2011 May 18. PMID: 21593405; PMCID: PMC3111299.

Novick D, Kim S, Kaplanski G, Dinarello CA. Interleukin-18, more than a Th1 cytokine. *Semin Immunol.* 2013 Dec 15;25(6):439-48. doi: 10.1016/j.smim.2013.10.014. Epub 2013 Nov 22. PMID: 24275602.

Nowarski R, Jackson R, Gagliani N, de Zoete MR, Palm NW, Bailis W, Low JS, Harman CC, Graham M, Elinav E, Flavell RA. Epithelial IL-18 Equilibrium Controls Barrier Function in Colitis. *Cell.* 2015 Dec 3;163(6):1444-56. doi: 10.1016/j.cell.2015.10.072. PMID: 26638073; PMCID: PMC4943028.

Okamoto M, Liu W, Luo Y, Tanaka A, Cai X, Norris DA, Dinarello CA, Fujita M. Constitutively active inflammasome in human melanoma cells mediating autoinflammation via caspase-1 processing and secretion of interleukin-1beta. *J Biol Chem.* 2010 Feb 26;285(9):6477-88. doi: 10.1074/jbc.M109.064907. Epub 2009 Dec 28. PMID: 20038581; PMCID: PMC2825443.

Palma G, Barbieri A, Bimonte S, Palla M, Zappavigna S, Caraglia M, Ascierto PA, Ciliberto G, Arra C. Interleukin 18: friend or foe in cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2013 Dec;1836(2):296-303. doi: 10.1016/j.bbcan.2013.09.001. Epub 2013 Oct 8. PMID: 24120852.

Parikh AA, Salzman AL, Kane CD, Fischer JE, Hasselgren PO. IL-6 production in human intestinal epithelial cells following stimulation with IL-1 beta is associated with activation of the transcription factor NF-kappa B. *J Surg Res.* 1997 Apr;69(1):139-44. doi: 10.1006/jsre.1997.5061. PMID: 9202660.

Park YH, Wood G, Kastner DL, Chae JJ. Pyrin inflammasome activation and RhoA signaling in the autoinflammatory diseases FMF and HIDS. *Nat Immunol.* 2016 Aug;17(8):914-21. doi: 10.1038/ni.3457. Epub 2016 Jun 6. PMID: 27270401; PMCID: PMC4955684.

Patel MN, Carroll RG, Galván-Peña S, Mills EL, Olden R, Triantafilou M, Wolf AI, Bryant CE, Triantafilou K, Masters SL. Inflammasome Priming in Sterile Inflammatory Disease. *Trends Mol Med.* 2017 Feb;23(2):165-180. doi: 10.1016/j.molmed.2016.12.007. Epub 2017 Jan 18. PMID: 28109721.

Petitprez F, Vano YA, Becht E, et al. Transcriptomic analysis of the tumor microenvironment to guide prognosis and immunotherapies. *Cancer Immunol Immunother.* 2018;67(6):981-988. doi:10.1007/s00262-017-2058-z

Pétrilli V, Dostert C, Muruve DA, Tschopp J. The inflammasome: a danger sensing complex triggering innate immunity. *Curr Opin Immunol.* 2007 Dec;19(6):615-22. doi: 10.1016/j.coi.2007.09.002. Epub 2007 Oct 30. PMID: 17977705.

Pontillo A, Bricher P, Leal VN, Lima S, Souza PR, Crovella S. Role of inflammasome genetics in susceptibility to HPV infection and cervical cancer development. *J Med Virol.* 2016;88(9):1646-1651. doi:10.1002/jmv.24514

Qi T, Wang Q, Zheng L, Yang HL, Bao J. [Correlation of serum IL-18 level and IL-18 gene promoter polymorphisms to the risk of cervical cancer]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2008 May;28(5):754-7. Chinese. PMID: 18504197.

Qian N, Chen X, Han S, et al. Circulating IL-1beta levels, polymorphisms of IL-1B, and risk of cervical cancer in Chinese women. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2010;136(5):709-716. doi:10.1007/s00432-009-0710-5

Reddi AL, Sankaranarayanan K, Arulraj HS, Devaraj N, Devaraj H. Enzyme-linked PNA lectin-binding assay of serum T-antigen in patients with SCC of the uterine cervix. *Cancer Lett.* 2000;149(1-2):207-211. doi:10.1016/s0304-3835(99)00363-8

Reinholz M, Kawakami Y, Salzer S, et al. HPV16 activates the AIM2 inflammasome in keratinocytes. *Arch Dermatol Res*. 2013;305(8):723-732. doi:10.1007/s00403-013-1375-0

Roberts RL, Van Rij AM, Phillips LV, Young S, McCormick SP, Merriman TR, Jones GT. Interaction of the inflammasome genes CARD8 and NLRP3 in abdominal aortic aneurysms. *Atherosclerosis*. 2011 Sep;218(1):123-6. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2011.04.043. Epub 2011 May 10. PMID: 21621776.

Robertson MJ, Mier JW, Logan T, et al. Clinical and biological effects of recombinant human interleukin-18 administered by intravenous infusion to patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res*. 2006;12(14 Pt 1):4265-4273. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0121

Rodrigues T, Kundu B, Silva-Correia J, Kundu SC, Oliveira JM, Reis RL, Correlo VM. Emerging tumor spheroids technologies for 3D in vitro cancer modeling. *Pharmacol Ther*. 2018 Apr;184:201-211. doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.10.018. Epub 2017 Oct 31. PMID: 29097309.

Rodríguez AC, Schiffman M, Herrero R, Wacholder S, Hildesheim A, Castle PE, Solomon D, Burk R; Proyecto Epidemiológico Guanacaste Group. Rapid clearance of human papillomavirus and implications for clinical focus on persistent infections. *J Natl Cancer Inst*. 2008 Apr 2;100(7):513-7. doi: 10.1093/jnci/djn044. Epub 2008 Mar 25. PMID: 18364507; PMCID: PMC3705579.

Rosenwasser LJ. Biologic activities of IL-1 and its role in human disease. *J Allergy Clin Immunol*. 1998 Sep;102(3):344-50. doi: 10.1016/s0091-6749(98)70118-6. PMID: 9768571.

Salcedo R, Worschech A, Cardone M, Jones Y, Gyulai Z, Dai RM, Wang E, Ma W, Haines D, O'hUigin C, Marincola FM, Trinchieri G. MyD88-mediated signaling prevents development of adenocarcinomas of the colon: role of interleukin 18. *J Exp Med*. 2010 Aug 2;207(8):1625-36. doi: 10.1084/jem.20100199. Epub 2010 Jul 12. PMID: 20624890; PMCID: PMC2916129.

Sasagawa T, Takagi H, Makinoda S. Immune responses against human papillomavirus (HPV) infection and evasion of host defense in cervical cancer. *J Infect Chemother*. 2012 Dec;18(6):807-15. doi: 10.1007/s10156-012-0485-5. Epub 2012 Nov 3. PMID: 23117294.

Schetter AJ, Heegaard NH, Harris CC. Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways. *Carcinogenesis*. 2010 Jan;31(1):37-49. doi: 10.1093/carcin/bgp272. Epub 2009 Dec 2. PMID: 19955394; PMCID: PMC2802675.

Schiffman M, Doorbar J, Wentzensen N, de Sanjosé S, Fakhry C, Monk BJ, Stanley MA, Franceschi S. Carcinogenic human papillomavirus infection. *Nat Rev Dis Primers*. 2016 Dec 1;2:16086. doi: 10.1038/nrdp.2016.86. PMID: 27905473.

Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 2011 Mar 25;331(6024):1565-70. doi: 10.1126/science.1203486. PMID: 21436444.

Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell*. 2010 Mar 19;140(6):821-32. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.040. PMID: 20303873.

Shen C, Wang QZ, Shen ZY, Yuan HY, Yu WJ, Chen XD, Xu H. Genetic association between the NLRP3 gene and acne vulgaris in a Chinese population. *Clin Exp Dermatol*. 2019 Mar;44(2):184-189. doi: 10.1111/ced.13657. Epub 2018 Jun 11. PMID: 29888470.

Shi J, Zhao Y, Wang K, Shi X, Wang Y, Huang H, Zhuang Y, Cai T, Wang F, Shao F. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature*. 2015 Oct 29;526(7575):660-5. doi: 10.1038/nature15514. Epub 2015 Sep 16. PMID: 26375003.

Shimada K, Crother TR, Karlin J, Dagvadorj J, Chiba N, Chen S, Ramanujan VK, Wolf AJ, Vergnes L, Ojcius DM, Rentsendorj A, Vargas M, Guerrero C, Wang Y, Fitzgerald KA, Underhill DM, Town T, Arditi M. Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis. *Immunity*. 2012 Mar 23;36(3):401-14. doi: 10.1016/j.immuni.2012.01.009. Epub 2012 Feb 16. PMID: 22342844; PMCID: PMC3312986.

Song Y, Wu X, Xu Y, Zhu J, Li J, Zou Z, Chen L, Zhang B, Hua C, Rui H, Zheng Q, Zhou Q, Wang Q, Cheng H. HPV E7 inhibits cell pyroptosis by promoting TRIM21-mediated degradation and ubiquitination of the IFI16 inflammasome. *Int J Biol Sci*. 2020 Sep 13;16(15):2924-2937. doi: 10.7150/ijbs.50074. PMID: 33061806; PMCID: PMC7545706.

Soria G, Ofri-Shahak M, Haas I, et al. Inflammatory mediators in breast cancer: coordinated expression of TNF α & IL-1 β with CCL2 & CCL5 and effects on epithelial-to-mesenchymal transition. *BMC Cancer*. 2011;11:130. Published 2011 Apr 12. doi:10.1186/1471-2407-11-130

Steel JL, Terhorst L, Collins KP, Geller DA, Vodovotz Y, Kim J, Krane A, Antoni M, Marsh JW, Burke LE, Butterfield LH, Penedo FJ, Buysse DJ, Tsung A. Prospective Analyses of Cytokine Mediation of Sleep and Survival in the Context of Advanced Cancer. *Psychosom Med*. 2018 Jun;80(5):483-491. doi: 10.1097/PSY.0000000000000579. PMID: 29621045; PMCID: PMC5976532.

Stone SC, Rossetti RA, Lima AM, Lepique AP. HPV associated tumor cells control tumor microenvironment and leukocytosis in experimental models. *Immun Inflamm Dis*. 2014 Aug;2(2):63-75. doi: 10.1002/iid3.21. Epub 2014 May 18. PMID: 25400927; PMCID: PMC4217549.

Stone SC, Rossetti RAM, Alvarez KLF, Carvalho JP, Margarido PFR, Baracat EC, Tacla M, Boccardo E, Yokochi K, Lorenzi NP, Lepique AP. Lactate secreted by cervical cancer cells modulates macrophage phenotype. *J Leukoc Biol*. 2019 May;105(5):1041-1054. doi: 10.1002/JLB.3A0718-274RR. Epub 2019 Feb 27. PMID: 30811636.

Su Q, Li L, Sun Y, Yang H, Ye Z, Zhao J. Effects of the TLR4/Myd88/NF- κ B Signaling Pathway on NLRP3 Inflammasome in Coronary Microembolization-Induced Myocardial Injury. *Cell Physiol Biochem*. 2018;47(4):1497-1508. doi:10.1159/000490866

Tang Y, Wang Y, Chen Q, Qiu N, Zhao Y, You X. MiR-223 inhibited cell metastasis of human cervical cancer by modulating epithelial-mesenchymal transition. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(9):11224-11229. Published 2015 Sep 1.

Taube JM, Galon J, Sholl LM, et al. Implications of the tumor immune microenvironment for staging and therapeutics. *Mod Pathol*. 2018;31(2):214-234. doi:10.1038/modpathol.2017.156

Tian H, Shi G, Yang G, et al. Correction to: Cellular immunotherapy using irradiated lung cancer cell vaccine co-expressing GM-CSF and IL-18 can induce significant antitumor effects. *BMC Cancer*. 2020;20(1):42. Published 2020 Jan 17. doi:10.1186/s12885-020-6544-x

Torii Y, Kawada JI, Murata T, Yoshiyama H, Kimura H, Ito Y. Epstein-Barr virus infection-induced inflammasome activation in human monocytes. *PLoS One*. 2017;12(4):e0175053. Published 2017 Apr 3. doi:10.1371/journal.pone.0175053

Tota JE, Chevarie-Davis M, Richardson LA, Devries M, Franco EL. Epidemiology and burden of HPV infection and related diseases: implications for prevention strategies. *Prev Med.* 2011 Oct;53 Suppl 1:S12-21. doi: 10.1016/j.ypmed.2011.08.017. PMID: 21962466.

Tsuboi K, Miyazaki T, Nakajima M, Fukai Y, Masuda N, Manda R, Fukuchi M, Kato H, Kuwano H. Serum interleukin-12 and interleukin-18 levels as a tumor marker in patients with esophageal carcinoma. *Cancer Lett.* 2004 Mar 18;205(2):207-14. doi: 10.1016/j.canlet.2003.10.010. PMID: 15036653.

Tu S, Bhagat G, Cui G, Takaishi S, Kurt-Jones EA, Rickman B, Betz KS, Penz-Oesterreicher M, Bjorkdahl O, Fox JG, Wang TC. Overexpression of interleukin-1beta induces gastric inflammation and cancer and mobilizes myeloid-derived suppressor cells in mice. *Cancer Cell.* 2008 Nov 4;14(5):408-19. doi: 10.1016/j.ccr.2008.10.011. Erratum in: *Cancer Cell.* 2008 Dec 9;14(6):494. Erratum in: *Cancer Cell.* 2011 Jan 18;19(1):154. PMID: 18977329; PMCID: PMC2586894.

Tulotta C, Lefley DV, Freeman K, Gregory WM, Hanby AM, Heath PR, Nutter F, Wilkinson JM, Spicer-Hadlington AR, Liu X, Bradbury SMJ, Hambley L, Cookson V, Allocca G, Kruithof de Julio M, Coleman RE, Brown JE, Holen I, Ottewill PD. Endogenous Production of IL1B by Breast Cancer Cells Drives Metastasis and Colonization of the Bone Microenvironment. *Clin Cancer Res.* 2019 May 1;25(9):2769-2782. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-2202. Epub 2019 Jan 22. PMID: 30670488.

Unterholzner L, Keating SE, Baran M, Horan KA, Jensen SB, Sharma S, Sirois CM, Jin T, Latz E, Xiao TS, Fitzgerald KA, Paludan SR, Bowie AG. IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. *Nat Immunol.* 2010 Nov;11(11):997-1004. doi: 10.1038/ni.1932. Epub 2010 Oct 3. PMID: 20890285; PMCID: PMC3142795.

Vaccarella S, Laversanne M, Ferlay J, Bray F. Cervical cancer in Africa, Latin America and the Caribbean and Asia: Regional inequalities and changing trends. *Int J Cancer.* 2017 Nov 15;141(10):1997-2001. doi: 10.1002/ijc.30901. Epub 2017 Aug 10. PMID: 28734013.

van Deventer HW, Burgents JE, Wu QP, Woodford RM, Brickey WJ, Allen IC, McElvania-Tekippe E, Serody JS, Ting JP. The inflammasome component NLRP3 impairs antitumor vaccine by enhancing the accumulation of tumor-associated myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res.* 2010 Dec 15;70(24):10161-9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1921. PMID: 21159638; PMCID: PMC3059219.

Vande Walle L, Lamkanfi M. Pyroptosis. *Curr Biol.* 2016 Jul 11;26(13):R568-R572. doi: 10.1016/j.cub.2016.02.019. PMID: 27404251.

Verma D, Bivik C, Farahani E, Synnerstad I, Fredrikson M, Enerbäck C, Rosdahl I, Söderkvist P. Inflammasome polymorphisms confer susceptibility to sporadic malignant melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2012 Jul;25(4):506-13. doi: 10.1111/j.1755-148X.2012.01008.x. Epub 2012 Jun 1. PMID: 22524199.

Vidal-Vanaclocha F, Fantuzzi G, Mendoza L, Fuentes AM, Anasagasti MJ, Martín J, Carrascal T, Walsh P, Reznikov LL, Kim SH, Novick D, Rubinstein M, Dinarello CA. IL-18 regulates IL-1beta-dependent hepatic melanoma metastasis via vascular cell adhesion molecule-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Jan 18;97(2):734-9. doi: 10.1073/pnas.97.2.734. PMID: 10639148; PMCID: PMC15399.

Voronov E, Apte RN. Targeting the Tumor Microenvironment by Intervention in Interleukin-1 Biology. *Curr Pharm Des.* 2017;23(32):4893-4905. doi: 10.2174/1381612823666170613080919. PMID: 28606052.

Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999 Sep;189(1):12-9. doi: 10.1002/(SICI)1096-9896(199909)189:1<12::AID-PATH431>3.0.CO;2-F. PMID: 10451482.

Wang L, Zhao W, Hong J, Niu F, Li J, Zhang S, Jin T. Association between IL1B gene and cervical cancer susceptibility in Chinese Uygur Population: A Case-Control study. *Mol Genet Genomic Med.* 2019 Aug;7(8):e779. doi: 10.1002/mgg3.779. Epub 2019 Jun 20. PMID: 31222982; PMCID: PMC6687630.

Wang M, Zhao J, Zhang L, et al. Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *J Cancer.* 2017;8(5):761-773. Published 2017 Feb 25. doi:10.7150/jca.17648

Wang Q, Wang C, Chen J. NLRP6, decreased in gastric cancer, suppresses tumorigenicity of gastric cancer cells. *Cancer Manag Res.* 2018 Nov 27;10:6431-6444. doi: 10.2147/CMAR.S182980. PMID: 30568504; PMCID: PMC6267737.

Wang Z, Wang N, Zheng Y, Wang S. Inflammasome and Cancer. *Exp Suppl.* 2018;108:281-302. doi: 10.1007/978-3-319-89390-7_12. PMID: 30536176.

Wei Y, Huang H, Qiu Z, Li H, Tan J, Ren G, Wang X. NLRP1 Overexpression Is Correlated with the Tumorigenesis and Proliferation of Human Breast Tumor. *Biomed Res Int.* 2017;2017:4938473. doi: 10.1155/2017/4938473. Epub 2017 Oct 29. PMID: 29214170; PMCID: PMC5682047.

Weiswald LB, Bellet D, Dangles-Marie V. Spherical cancer models in tumor biology. *Neoplasia.* 2015 Jan;17(1):1-15. doi: 10.1016/j.neo.2014.12.004. PMID: 25622895; PMCID: PMC4309685.

Wigginton JM, Lee JK, Wilttrout TA, Alvord WG, Hixon JA, Subleski J, Back TC, Wilttrout RH. Synergistic engagement of an ineffective endogenous anti-tumor immune response and induction of IFN-gamma and Fas-ligand-dependent tumor eradication by combined administration of IL-18 and IL-2. *J Immunol.* 2002 Oct 15;169(8):4467-74. doi: 10.4049/jimmunol.169.8.4467. PMID: 12370382.

Willingham SB, Allen IC, Bergstralh DT, et al. NLRP3 (NALP3, Cryopyrin) facilitates in vivo caspase-1 activation, necrosis, and HMGB1 release via inflammasome-dependent and - independent pathways. *J Immunol.* 2009;183(3):2008-2015. doi:10.4049/jimmunol.0900138

Woodman CB, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer.* 2007 Jan;7(1):11-22. doi: 10.1038/nrc2050. PMID: 17186016.

Wright TC Jr, Ellerbrock TV, Chiasson MA, Van Devanter N, Sun XW. Cervical intraepithelial neoplasia in women infected with human immunodeficiency virus: prevalence, risk factors, and validity of Papanicolaou smears. New York Cervical Disease Study. *Obstet Gynecol.* 1994 Oct;84(4):591-7. PMID: 8090399.

Yang HL, Pin BH, Wang Q, Zheng L, Tang W, Qi T, Bao J. [Association of interleukin-18 gene rs1946519 and rs360718 single nucleotide polymorphism with cervical cancer]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2007 Jul;27(7):1006-8. Chinese. PMID: 17666338.

Yang YC, Chang TY, Chen TC, Chang SC, Lin WS, Lee YJ. Genetic variants in interleukin-18 gene and risk for cervical squamous cell carcinoma. *Hum Immunol.* 2013;74(7):882-887. doi:10.1016/j.humimm.2013.04.001

Yasuda K, Nakanishi K, Tsutsui H. Interleukin-18 in Health and Disease. *Int J Mol Sci*. 2019 Feb 2;20(3):649. doi: 10.3390/ijms20030649. PMID: 30717382; PMCID: PMC6387150.

Yazdi AS, Ghoreschi K. The Interleukin-1 Family. *Adv Exp Med Biol*. 2016;941:21-29. doi: 10.1007/978-94-024-0921-5_2. PMID: 27734407.

Yeo SG, Won YS, Kim SH, Park DC. Differences in C-type lectin receptors and their adaptor molecules in the peritoneal fluid of patients with endometriosis and gynecologic cancers. *Int J Med Sci*. 2018 Feb 12;15(4):411-416. doi: 10.7150/ijms.23360. PMID: 29511377; PMCID: PMC5835712.

Yin Y, Yan Y, Jiang X, Mai J, Chen NC, Wang H, Yang XF. Inflammasomes are differentially expressed in cardiovascular and other tissues. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2009 Apr-Jun;22(2):311-22. doi: 10.1177/039463200902200208. PMID: 19505385; PMCID: PMC2847797.

Yoshinouchi M, Hongo A, Nakamura K, Kodama J, Itoh S, Sakai H, Kudo T. Analysis by multiplex PCR of the physical status of human papillomavirus type 16 DNA in cervical cancers. *J Clin Microbiol*. 1999 Nov;37(11):3514-7. doi: 10.1128/JCM.37.11.3514-3517.1999. PMID: 10523544; PMCID: PMC85682.

Yu S, Zhao N, He M, Zhang K, Bi X. MiRNA-214 promotes the pyroptosis and inhibits the proliferation of cervical cancer cells via regulating the expression of NLRP3. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2020 Sep 30;66(6):59-64. PMID: 33040786.

Zaki MH, Lamkanfi M, Kanneganti TD. Inflammasomes and Intestinal Tumorigenesis. *Drug Discov Today Dis Mech*. 2011;8(3-4):e71-e78. doi:10.1016/j.ddmec.2011.11.003

Zaki MH, Vogel P, Body-Malapel M, Lamkanfi M, Kanneganti TD. IL-18 production downstream of the Nlrp3 inflammasome confers protection against colorectal tumor formation. *J Immunol*. 2010;185(8):4912-4920. doi:10.4049/jimmunol.1002046

Zhai Z, Liu W, Kaur M, Luo Y, Domenico J, Samson JM, Shellman YG, Norris DA, Dinarello CA, Spritz RA, Fujita M. NLRP1 promotes tumor growth by enhancing inflammasome activation and suppressing apoptosis in metastatic melanoma. *Oncogene*. 2017 Jul 6;36(27):3820-3830. doi: 10.1038/onc.2017.26. Epub 2017 Mar 6. PMID: 28263976; PMCID: PMC5501746.

Zhang X, Zhang L, Tian C, Yang L, Wang Z. Genetic variants and risk of cervical cancer: epidemiological evidence, meta-analysis and research review. *BJOG*. 2014 May;121(6):664-74. doi: 10.1111/1471-0528.12638. Epub 2014 Feb 19. PMID: 24548744.

Zhao Y, Shao F. The NAIP-NLRC4 inflammasome in innate immune detection of bacterial flagellin and type III secretion apparatus. *Immunol Rev*. 2015 May;265(1):85-102. doi: 10.1111/imr.12293. PMID: 25879286.

Zhong FL, Mamaï O, Sborgi L, Boussofara L, Hopkins R, Robinson K, Szeverényi I, Takeichi T, Balaji R, Lau A, Tye H, Roy K, Bonnard C, Ahl PJ, Jones LA, Baker PJ, Lacina L, Otsuka A, Fournie PR, Malecaze F, Lane EB, Akiyama M, Kabashima K, Connolly JE, Masters SL, Soler VJ, Omar SS, McGrath JA, Nedelcu R, Gribaa M, Denguezli M, Saad A, Hiller S, Reversade B. Germline NLRP1 Mutations Cause Skin Inflammatory and Cancer Susceptibility Syndromes via Inflammasome Activation. *Cell*. 2016 Sep 22;167(1):187-202.e17. doi: 10.1016/j.cell.2016.09.001. PMID: 27662089.

Zhong FL, Robinson K, Teo DET, Tan KY, Lim C, Harapas CR, Yu CH, Xie WH, Sobota RM, Au VB, Hopkins R, D'Ousualdo A, Reed JC, Connolly JE, Masters SL, Reversade B. Human

DPP9 represses NLRP1 inflammasome and protects against autoinflammatory diseases via both peptidase activity and FIIND domain binding. *J Biol Chem*. 2018 Dec 7;293(49):18864-18878. doi: 10.1074/jbc.RA118.004350. Epub 2018 Oct 5. PMID: 30291141; PMCID: PMC6295727.

Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature*. 2011 Jan 13;469(7329):221-5. doi: 10.1038/nature09663. Epub 2010 Dec 1. Erratum in: *Nature*. 2011 Jul 7;475(7354):122. PMID: 21124315.

zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(5):342-350. doi:10.1038/nrc798

8. APÊNDICES

APÊNDICE A – Padronização da produção de IL-1 β à partir da inibição do inflamassoma por Parthenolide em monócitos derivados de indivíduos saudáveis.

Para padronizar o efeito de inibição do inflamassoma por PTD em monócitos foi dosado a concentração da citocina IL-1 β no sobrenadante de cultura. As células foram estimuladas com 1 μ g/mL de lipopolisacarídeo bacteriano (LPS, *Escherichia coli* cepa 0111:B4; Sigma-Aldrich) por 24 horas, seguido por 15 minutos de 1 mM adenosina trifosfato (ATP; Sigma Aldrich) como controle positivo de ativação do receptor do inflamassoma, NLRP3 (Gattorno et al 2007). Os tempos de 3 e 24 horas foram definidos após padronização (**Figura 4**).

Os ensaios foram executados na presença ou não de um inibidor abragente de inflamassoma, o Parthenolide (PTD; Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) que atua tanto a nível transcricional, inibindo o NF- κ B, que pós-transcricional, afetando a montagem do complexo (Juliana et al., 2010). As células foram tratadas com 10 μ M PTD por 15 minutos antes dos ensaios de co-cultivo.

Aproximadamente 1×10^5 monócitos, isolados de 6 indivíduos saudáveis foram estimulados com 1 μ g/ml LPS + 1mM ATP por 3 e 24 horas na presença ou não de 10 μ M PTD por 15 minutos. Foi realizada a dosagem de IL-1 β nos sobrenadantes de cultura.

APÊNDICE B – Padronização da produção de IL-1 β à partir da inibição do inflamassoma NLRP3 por MCC-950 em monócitos derivados de indivíduos saudáveis.

Para padronizar o efeito de inibição do NLRP3 por MCC-950 em monócitos foi dosado a concentração da citocina IL-1 β no sobrenadante de cultura. As células foram estimuladas com 1 μ g/mL de lipopolisacarídeo bacteriano (LPS, *Escherichia coli* cepa 0111:B4; Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) por 24 horas, seguido por 15 minutos de 1 mM adenosina trifosfato (ATP; Sigma Aldrich, St Louis, EUA) como controle positivo de ativação do receptor do inflamassoma, NLRP3 (Gattorno et al 2007). Os tempos de 3 e 24 horas foram definidos após padronização (**Figura 4**).

Os ensaios foram executados na presença ou não de um inibidor específico para NLRP3, o MCC-950 (InvivoGen), (Coll et al., 2015). As células foram tratadas com 10 μ M MCC por 1 hora antes dos ensaios de co-cultivo.

Aproximadamente 1×10^5 monócitos, isolados de 6 indivíduos saudáveis foram estimulados com 1 μ g/ml LPS + 1mM ATP por 3 e 24 horas na presença ou não de 10 μ M MCC por 1 hora. Foi realizada a dosagem de IL-1 β nos sobrenadantes de cultura.

APÊNDICE C – Ensaio de citotoxicidade em monócitos com ou sem estímulo para o inflamassoma NLRP3

Para quantificar a porcentagem de citotoxicidade, ou morte celular, dos monócitos estimulados ou não com 1 µg/mL de lipopolisacarídeo bacteriano (LPS, *Escherichia coli* cepa 0111:B4; Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) por 24 horas, seguido por 15 minutos de 1 mM adenosina trifosfato (ATP; Sigma Aldrich, St Louis, EUA) como controle positivo de ativação do receptor do inflamassoma, NLRP3 (Gattorno et al 2007).

Foi dosado a porcentagem de liberação de lactato desidrogenase (LDH), como um indicativo de perda de integridade da membrana plasmática, no sobrenadante de cultura dos ensaios.

A concentração de $6,5 \times 10^4$ monócitos isolados de 3 doadores saudáveis foram cultivados com ou sem a estimulação clássica do receptor NLRP3 (1 µg/ml LPS + 1mM ATP) por 24 horas. A liberação de LDH (lactato desidrogenase) foi mensurada através do kit comercial Pierce™ LDH Citotoxicidade Assay Kit, no sobrenadante de cultura.

APÊNDICE D – Análise de interação de SNPs do inflamassoma na coorte de pacientes com neoplasias intra-epiteliais cervicais e Câncer Cervical.

A análise de interação entre os SNPs em genes diferentes e observamos a associação significativa para a interação entre os SNPs rs10754558 e rs16944 ($p = 0,025$) e rs10754558 e rs12150220 ($p = 0,028$) de acordo com o modelo “co-dominante” de herança. Entretanto, quando foi comparada a combinações de genótipos, não foi detectada diferença estatisticamente significativa. Tanto a combinação dos genótipos em homozigose para o alelo polimórfico de rs10754558 (G/G) e rs16944 (A/A) que a dos rs10754558 (G/G) e rs12150220 (T/T) resultou em um valor de Z de 0,99 (dado não mostrado).

A

B

	rs10754558	rs35829419	rs16944	rs5744256	rs2072443	rs12150220	rs703154	rs2670660
rs10754558	6.872306e-02	2.677494e-01	2.504564e-02	1.988008e-01	3.991847e-01	2.809010e-02	6.992229e-01	7.087036e-01
rs35829419	8.175303e-01	6.179294e-01	4.718795e-01	2.912800e-01	6.554837e-01	3.293668e-01	9.999581e-01	3.670329e-01
rs16944	2.650829e-01	5.332948e-01	1.258399e-01	2.964381e-01	5.968904e-02	5.634633e-01	9.962124e-01	3.107280e-01
rs5744256	5.540992e-01	5.193913e-01	7.292152e-01	4.213786e-01	4.290370e-01	7.637072e-01	4.150317e-01	7.681303e-01
rs2072443	8.944612e-01	9.578606e-01	8.042229e-01	9.329052e-01	9.465799e-01	5.446142e-01	3.127323e-01	6.382267e-01
rs12150220	3.599357e-01	3.595340e-01	4.187893e-01	6.284474e-01	8.006941e-01	3.502015e-01	9.720561e-01	2.193445e-01
rs703154	6.084639e-01	1.487793e-01	3.274815e-01	6.453474e-01	6.586576e-01	1.692685e-01	1.089462e-13	3.427648e-01
rs2670660	4.404615e-01	4.941417e-01	6.696361e-01	7.108184e-01	9.830642e-01	9.038167e-01	2.662286e-01	5.437662e-01

(A)Representação gráfica da análise de interação no modelo co-dominante entre os polimorfismos de base única em diferentes genes do inflamassoma, previamente selecionados no estudo. (B) Tabela com os dados de p-valor para cada interação, em destaque em vermelho as interações significativas, ou seja, $p < 0,05$.

APÊNDICE E – Produção de IL-18 em células de linhagem de Câncer Cervical SiHa e monócitos derivado de indivíduos saudáveis.

Para melhor investigar a ativação do inflamassoma nos monócitos e nas linhagens celulares de CC, avaliamos a produção de IL-18 nestes dois tipos celulares. Adicionando à cultura um clássico indutor de citocinas pró-inflamatórias, o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS). A dosagem na linhagem celular SiHa foi utilizada como representativa das outras.

Não foi observado uma produção elevada de IL-18, tanto nos monócitos com na linhagem celular, mesmo na presença de LPS.

A concentração de 2×10^5 células da linhagem celular SiHa e monócitos de 3 indivíduos saudáveis foram estimulados com 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS por 24 horas e o sobrenadante de cultura foi utilizado para dosar a produção de citocina por meio de ELISA. A concentração de IL-18 nas células não estimuladas (NE) e tratadas com LPS (LPS) é reportada em pg/mL.

APÊNDICE F – Produção de IL-1 β no co-cultivo em modelo tridimensional na presença do pré-tratamento com o inibidor de NLRP3 nos esferoides.

Para melhor investigar o envolvimento do receptor NLRP3 no modelo de co-cultivo, avaliamos a produção de IL-1 β neste modelo utilizando um inibidor específico para NLRP3, MCC-950 (Coll RC., 2015).

Desta forma, tanto os monócitos, como os esferoides foram pré-tratados com o inibidor MCC-950. Como esperado, foi visto uma redução significativa da produção de IL-1 β somente quando os monócitos foram inibidos previamente ao co-cultivo(Figura 14 A-C).

Abaixo segue a concentração de IL-1 β nos ensaios onde os esferoides foram previamente inibidos antes do co-cultivo, não obtendo diferença significativa.

A concentração de $1,5 \times 10^4$ células das linhagens celulares de CC imortalizadas (A) C33-A e 5×10^3 células das linhagens celulares de CC imortalizadas (B) SiHa e (C) HeLa no modelo tridimensional (3D) foram cultivadas na presença de $6,5 \times 10^4$ monócitos isolados de 9 doadores saudáveis por 24 horas na presença ou não do pré tratamento com $10 \mu\text{M}$ de (MCC950) nos esferoides, durante 1 hora. A liberação de IL-1 β foi mensurada em sobrenadantes de cultura.

APÊNDICE G – Produção científica e participação em eventos da área

Artigos publicados

- **Fernandes FP**, Leal VNC, Souza de Lima D, Reis EC, Pontillo A. Inflammasome genetics and complex diseases: a comprehensive review. *Eur J Hum Genet.* 2020 Oct;28(10):1307-1321. doi: 10.1038/s41431-020-0631-y. Epub 2020 Jun 4. PMID: 32499599.
- Soares JLS, **Fernandes FP**, Patente TA, Monteiro MB, Parisi MC, Giannella-Neto D, Corrêa-Giannella ML, Pontillo A. Gain-of-function variants in NLRP1 protect against the development of diabetic kidney disease: NLRP1 inflammasome role in metabolic stress sensing? *Clin Immunol.* 2018 Feb;187:46-49. doi: 10.1016/j.clim.2017.10.003. Epub 2017 Oct 12. PMID: 29031829.
- Dos Reis EC, Leal VNC, Soares JLDS, **Fernandes FP**, Souza de Lima D, de Alencar BC, Pontillo A. Flagellin/NLRC4 Pathway Rescues NLRP3-Inflammasome Defect in Dendritic Cells From HIV-Infected Patients: Perspective for New Adjuvant in Immunocompromised Individuals. *Front Immunol.* 2019 Jun 11;10:1291. doi: 10.3389/fimmu.2019.01291. PMID: 31244842; PMCID: PMC6579915.
- Cambui RAG, do Espírito Santo GF, **Fernandes FP**, Leal VNC, Galera BB, Fávaro EGP, Rizzo LA, Elias RM, Pontillo A. Double-edged sword of inflammasome genetics in colorectal cancer prognosis. *Clin Immunol.* 2020 Apr;213:108373. doi: 10.1016/j.clim.2020.108373. Epub 2020 Mar 2. PMID: 32135277.

Artigos submetidos

- **Fernandes F.P**, Cambui R.A.G, Soares J.L, Leal V.N.C, Souza de Lima D, Reis E.C, Pontillo A. “Cervical cancer induces NLRP3 inflammasome activation in human peripheral blood monocytes.”
- Dhêmerson Souza de Lima, Caio CB Bomfim, Vinícius NC Leal, Edione C Reis, Jaíne LS Soares, **Fernanda P Fernandes**, Eduardo Amaral, Flavio V Loures, Mauricio M Ogusku, Maria R D’Império Lima, Aya Sadahiro and Alessandra Pontillo. “COMBINING HOST GENETICS AND FUNCTIONAL ANALYSIS TO DEPICT INFLAMMASOME CONTRIBUTION IN TUBERCULOSIS SUSCEPTIBILITY AND OUTCOME IN ENDEMIC AREAS.”

- Vinícius Nunes Cordeiro LEAL, Edione Cristina REIS, **Fernanda Pereira FERNANDES**, Jaíne Lima da Silva SOARES, Iohanã Gabriely Costa OLIVEIRA, Dhêmerson SOUZA DE LIMA, Amanda Nazareth LARA, Marta Heloísa LOPES, Alessandra PONTILLO “Common PAMPs induce the hyper activation of NLRP3 inflammasome in circulating B lymphocytes from HIV patients.”

Participação em congressos, encontros e simpósios

- Apresentou o poster intitulado: ““O cancer do colo do útero induz a ativação do inflamassoma NLRP3 nos monócitos derivados de sangue periférico humano” no I Simpósio de Câncer de São Paulo, São Paulo-Brasil em março de 2020.
- Apresentou o postêr intitulado: “EVALUATION OF THE CONTRIBUTION OF INFLAMMASSOMA IN THE IMMUNE RESPONSE TO CERVICAL CARCINOMA” no congresso internacional: “TOLL meeting, Editing Innate Immunity, Porto-Potugal” em junho de 2018.
- Participou do XX Encontro Nacional de Profissionais em Pesquisa Clínica (São Paulo, 2019)

Inflammasome genetics and complex diseases: a comprehensive review

Fernanda Pereira Fernandes¹ · Vinicius N. C. Leal¹ · Dhemerson Souza de Lima¹ · Edione C. Reis¹ · Alessandra Pontillo¹

Received: 16 May 2019 / Revised: 12 March 2020 / Accepted: 14 April 2020
© The Author(s), under exclusive licence to European Society of Human Genetics 2020

Abstract

The inflammasome is a cytoplasmic multiprotein complex responsible for the activation of inflammatory caspases (caspase-1, -4, and -5) in response to pathogen- and/or damage-associated molecular patterns or to homeostasis-altering molecular pathways, and for the consequent release of the pro-inflammatory cytokines interleukin (IL)-1 β and IL-18. Taking in account the complexity of inflammasome activation and that several regulatory steps are involved in maintaining its physiologic role in homeostasis and innate immune response, it does not surprise that several genetic variants in inflammasome components have been associated with common pathologies in the general population, such as autoimmune disorders, cardiovascular diseases, obesity and associated metabolic syndrome, neurodegenerative diseases, and cancer. Moreover, the susceptibility to infectious agents and/or to develop severe complications during infections also has been related to inflammasome genetics. In this work, we revised genetic association studies about polymorphisms of main inflammasome genes in sterile as well as infectious diseases, trying to depict the genetic contribution of inflammasome in disease pathogenesis.

Introduction

Perturbations in cellular homeostasis by microbial or endogenous danger signals are sensed by cytosolic innate pattern recognition receptors (PRRs) and trigger downstream signaling pathways leading to inflammatory response to protect the host and restore homeostasis. The same mechanisms involved in inflammation and host protection, however, can also cause (or contribute to) pathologies characterized by dysregulated (acute or chronic) inflammation. In the last decades, inflammation has been discovered to heavily contribute to the pathogenesis of the majority of complex diseases in the general population, as

autoimmune diseases, cancer, cardiovascular, metabolic, and neurodegenerative diseases.

The inflammasome is a cytoplasmic multiprotein complex responsible for the activation of inflammatory caspases (namely, caspase-1, -4, and -5) in response to pathogen- and/or damage-associated molecular patterns (PAMPs and DAMPs, respectively) [1] or to homeostasis-altering molecular pathways (HAMPs) [2], and for the consequent release of the pro-inflammatory cytokines interleukin (IL)-1 β and IL-18, and gasdermin-D, the effector molecule of the inflammatory cell death named pyroptosis [3] (Fig. 1).

Inflammasome sensors belong to PRRs and contain a pyrin domain (PYD) and/or a caspase-recruiting domain (CARD), by which, once activated, they become able to recruit, through the interaction with the adaptor protein ASC (a PYD and CARD containing protein), or directly (through homotypic interactions CARD–CARD) the inflammatory caspases and finally promote the auto-cleavage of the pro-caspases in biologically active caspases. In turn, active caspases cleave pro-IL-1 β , pro-IL-18, and/or gasdermin-D, depending on the cytosolic availability of the respective precursors.

Rare gain-of-function variants in inflammasome genes are implicated in hereditary inflammatory diseases (hereditary auto-inflammatory syndromes) characterized by

Supplementary information The online version of this article (<https://doi.org/10.1038/s41431-020-0631-y>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Alessandra Pontillo
alepontillo@usp.br

¹ Laboratório de Imunogenética, Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas/ICB, Universidade de São Paulo/USP, São Paulo, SP, Brazil

Fig. 1 Basic inflammasome composition and role in immune response. Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), damage-associated molecular patterns (DAMPs), and/or homeostasis-altering associated patterns (HAMPs) are sensed by a plethora of cytosolic receptors containing a central NACHT domain, a C-terminal LRRs domain and a N-terminal PYD or CARD domain (NLRs), or a N-terminal PYD domain together with other domains such as B box zinc finger (bz, BB), coiled coil (CC) and B30.2/SPRY as for pyrin, or HIN-200 motifs as for PYD and HIN containing receptors (PYHINs). Once activated by a molecular pattern, receptors recruit directly, through homotypic CARD–CARD domains interaction, or indirectly, through the recruitment of the adaptor molecule PYD–CARD or ASC, an inflammatory caspase (namely, caspase-1, -4, and -5) which, in turn, cleaves biologically inactive forms of IL-1 β , IL-18 (pro-IL-1 β , pro-IL-18, respectively) and gasdermin-D (GSDM-D). Inflammasome activation results in the release of pro-inflammatory cytokines IL-1 β and IL-18, and a cleaved form of GSDM-D which creates pores within cellular membrane and it is responsible for cytokines release and, in some cases, for pyroptosis. IL-1 β and IL-18 mediate inflammatory process and adaptive immunity response. Moreover, IL-18 is also important for epithelia and mucosal homeostasis.

uncontrolled production of IL-1 β and/or IL-18, the so-called inflammasomopathies (largely reviewed by Manthiram et al. [4]). These syndromes result from genetic-determined activation of specific cytosolic receptors (NLRP1, NLRP3, NLRC4, pyrin/MEFV) therefore leading to a diminished activation threshold of inflammasome complex.

Inflammasome receptors belong to distinct PRRs families: nucleotide-binding domain (NBD or NACHT) and leucine-rich repeats (LRRs) containing receptors (NLRs), such as NLRP1, NLRP3, NLRC4, NAIP; PYD and HIN domain-containing receptors (PYHIN), such as AIM2, IFI16; or PYD domain-containing proteins, such as pyrin/MEFV (Fig. 1). They are generally present in the cytosol as conformational inactive molecules by the biochemical interaction between distinct domains (close conformation), such as NACHT and LRRs domains in NLRP3 and NLRC4, and PYHIN domains, as for AIM2 and IFI16 receptors [5]; or by the interaction with own inhibitors, such as for NLRP1 [6] and pyrin [7]. Other mechanisms have been described to contribute for this “inactive” state of

inflammasome receptors, such as auto-cleavage (i.e., NLRP1 [8]) or phosphorylation (i.e., pyrin [7]). Moreover, regulatory proteins have been described to contribute for the inactive/“closed” conformation of some receptors, such as CARD8 [9] and NEK7 [10] for NLRP3 (NLRP3 inhibitor and activator, respectively).

The apparent redundancy in inflammasome sensors is partially explained taking in account their specific recognition of pathogen or damage. Some receptors detect a definite molecular pattern, such as NAIP and bacterial flagellin [11], AIM2 and IFI16, and cytosolic and/or nuclear double stranded DNA (dsDNA) [12]; while others are indirectly activated, like NLRC4, which bind the complex NAIP/flagellin [11], or NLRP1 and pyrin, which are activated in the absence of their physiologic inhibitor. Bacterial modification of small-GTP proteins, such as RhoA, affects the phosphorylation state of pyrin promoting inflammasome assembling [7]. The inhibition of the dipeptidase DPP9 leads to NLRP1 inflammasome mounting [6]. Among inflammasome receptors, NLRP3 is uniquely activated by a plethora of PAMPs and DAMPs through mechanisms not yet fully elucidated, including K⁺ efflux (mediated by pore-forming toxins, such as nigericin, or by the purinergic receptor P2X7 in response to increased extracellular ATP concentration); mitochondrial or phagosomal/lysosomal damage with the consequent release of organelle components (i.e., reactive oxygenous species, mtDNA, or cathepsins) [13]. According to recently introduced concept of HAMPs [2], NLRP1, NLRP3, and pyrin are activated by altered homeostasis.

Even if the final result of pathogenic variants in distinct receptors is the increased processing and liberation of pro-inflammatory cytokines IL-1 β and IL-18, patients affected by inflammasomopathies present a receptor-dependent clinical phenotype, suggesting a cell/tissue-specific expression of receptors genes (briefly summarized in Table 1).

Inflammasome components were described in several cell types and tissues, both immune (i.e., myeloid cells and lymphocytes) and nonimmune (i.e., epithelium and endothelium), including highly specialized cells, such as neurons [1, 3, 19]. Their expression can be constitutive or inducible depending on the organ/tissue and/or the context (homeostatic versus pathologic condition). Two main pathways lead to the transcription of inflammasome genes in inducible cells: (1) Myd88/NF- κ B or (2) TRIF/IRFs signaling. The first is induced by toll-like receptors (TLRs; i.e., TLR4 and TLR5) and cytokines receptors (i.e., IL1R and TNFR), and promotes the expression of several inflammasome components such as NLRP1, NLRP3, NLRC4, NAIP, pyrin, ASC as well as biological inactive pro-forms of IL-1 β (pro-IL-1 β) and caspases (pro-caspase-1, pro-caspase-4/5). The other is activated by TLRs (i.e., TLR3, TLR8, and TLR9) and IFNs receptors (IFN1 and IFN2), and induces the expression

Table 1 Inherited inflammasomopathies.

Mutated gene	Disease	Inheritance pattern and effect	Phenotype	Predominant effector cells
<i>NLRP1</i>	NLRP1-associated auto-inflammation with arthritis and dyskeratosis (NAIAD) [14]	Autosomal dominant GoF	Hyperkeratotic ulcerative skin lesions, fever, arthritis, ANA	Keratinocytes
<i>NLRP3</i>	Cryopyrin-associated periodic syndromes (CAPS) [15]	Autosomal dominant GoF	Spectrum from cold-induced urticaria and fever to CNS inflammation and bone overgrowth	Monocytes, granulocytes (neutrophils), chondrocytes
<i>NLRP4</i>	Auto-inflammatory infantile fever with enterocolitis (AIFEC) [16, 17]	Autosomal dominant GoF	Recurrent MAS, enterocolitis, cold-induced fever and urticaria, CNS inflammation	Monocytes/macrophages
<i>MEFV</i>	Familial Mediterranean fever (FMF) [18]	Autosomal recessive LoF or gene-dosage-dependent autosomal dominant GoF	Fever, serositis, rash, SAA amyloidosis	Neutrophils, monocytes, serosal and synovial fibroblasts

Mutated gene and respective syndrome name are reported for inflammasomopathies, as well as inheritance pattern and effect of mutations, clinical phenotype and predominant disease effector cells.

GoF gain-of-function, LoF loss-of-function, ANA anti-nuclear antibodies, CNS central nervous system, MAS macrophage activation syndrome, SAA serum amyloid A.

of the so-called IFN-inducible proteins such as AIM2, IFI16, pro-IL-18, and pro-caspase-4/-5 [1, 3, 19].

It is important to stress that inflammasome receptors, beyond pathogen recognition, exert a wide range of biologic functions, including the maintaining of homeostasis [20, 21].

Due to the dramatic pro-inflammatory effect of inflammasome-related cytokines and cell death, the complex activation has to be strictly regulated. Several mechanisms contribute to the physiologic “break”: (a) inducible transcription of the components; (b) maintenance of “closed” conformation of the sensors; and (c) presence of inhibitory proteins. Each cell/tissue is characterized by its own activation threshold, and consequently by an inflammasome more or less prone to be activated. In general, in cells or tissues constantly exposed to environment, such as mucosa and associated immune cells (i.e., resident macrophages or dendritic cells), the activation of inflammasome is slower, compared with blood monocytes or neurons, for example [19].

Taking in account the complexity of inflammasome activation and that several regulatory steps are involved in maintaining its physiologic role in homeostasis and innate immune response, it does not surprise that inflammasome dysregulation has been pointed out as a common pathogenic mechanism not only in auto-inflammatory syndromes, but also in autoimmune disorders, cardiovascular diseases (CVD), obesity and associated metabolic syndrome, neurodegenerative diseases, and cancer [22]. Moreover, an important role of inflammasome and its specific receptors have been revealed also in infectious diseases [23, 24].

As a result, genetic variants in auto-inflammatory genes and inflammasome components may affect the individual predisposition to develop diseases common in the general population (both sterile or infectious ones). In the last decade, several polymorphisms (variants with a minor allele frequency > 1%) have been described in inflammasome-related genes and associated with multifactorial human diseases, emphasizing the key role of the complex in the pathogenesis of the diseases, and leading to the description of novel pathogenic mechanisms and pharmaceutical targets. On the other side, little is known about the functional effect of such genetic variants on inflammasome structure and function.

In this review, we summarized published genetic association studies about polymorphisms in inflammasome genes, trying to depict the genetic contribution of inflammasome in the pathogenesis of both infectious and non-infectious sterile diseases. We limited the revision to main inflammasome components, including sensors (NLRP1, NLRP3, NLRC4, pyrin, AIM2, IFI16, NLRP6, and NLRP7) and effector enzymes (caspase-1, -4, and -5). Well-known NLRP3 regulators, CARD8 [9] and NEK7 [10], were also considered. Deletions in the flagellin receptor

NAIP were detected in some patients with the acute form of spinal muscular atrophy (MIM: 253300), a rare neuromuscular disorder, however, at the present no other genetic variants have been reported as significantly associated to human diseases. Genetics of *IL1B* and *IL18*, as well as of *P2X7*, has been recently revised elsewhere [25, 26] and therefore it is not included in this article.

Variability of inflammasome genes

Both inflammasome receptors and effector molecules caspases belong to multi-gene families, and they are widely distributed within the human genome and often grouped in loci, such as in the case of *AIM2* (Refseq: NM_004833.3) and *IFI16* (Refseq: NM_001206567.2) in 1q23.1-2, *CASP1* (Refseq: NM_033292.4), *CASP4* (Refseq: NM_001225.4), and *CASP5* (Refseq: NM_004347.5) in 11q22.3, indicating gene duplication events, even if apparently without redundancy in molecule function. The presence of polymorphisms and functional variants in inflammasome genes suggests that they have been selected by the environment as they give some advantage to the host.

With the advance of genomic sequencing technology, several genetic variants have been described in inflammasome genes, including single nucleotide polymorphisms (SNPs), small deletions, variable number of tandem repeats (VNTR), and also copy number variations. However, the majority of current literature exhibits association data with SNPs, both tagSNPs or functional SNPs, even if only for a limited number of variations the effect on gene/protein is known, allowing a correct and in-depth interpretation of association data.

In Supplementary File 1, we resumed information about localization and effect of inflammasome genes polymorphisms selected to have been significantly associated with human diseases.

It is noteworthy that exonic variants are localized closed to sites important for the maintenance of “close”/inactive receptor conformation, or for enzymatic function in the case of caspases. SNPs in regulatory regions, such as promoter, 5'UTR, or 3'UTR, are also present, affecting gene transcription or mRNA stability. Intriguingly genetic variability is a characteristic of inflammasome sensors rather than of effector caspases, or of the adaptor molecule ASC (*PYCARD*) which, differently from mice, is practically monomorphic in humans, possibly due to its central role in inflammasome assembling.

Vasseur et al. [27] have recently characterized sequence diversity in PRRs genes. Within NLR super-family, members with a PYD N-terminal domain (NLRPs genes) display similar or high level of genetic diversity (estimated by nucleotide diversity) that noncoding regions, whereas those

with a CARD N-terminal domain (NLRCs genes) tend to show a lower diversity than expected, suggesting that NLRPs (i.e., *NLRP1* and *NLRP3*) had evolved under strong selective pressure (purifying selection) and that their function is essential for host survival, and not redundant as supposed to be for NLRCs (i.e., *NLRC4*). Of note, in this analysis, authors identified a *NLRP1* (Refseq: NM_033004.4) haplotype containing seven missense variations (rs11651595: c.737 C>G, p.(Thr246Ser); rs52795654: c.2345 C>G, p.(Thr782Ser); rs11657747: c.2633 C>T, p.(Thr878Met); rs34733791: c.2894 C>T, p.(Thr995Ile); rs35596958: c.3355 A>G, p.(Met1119Val); rs11653832: c.3721 G>C, p.(Val1241Leu); rs2137722: c.4096 C>T, p.(Arg1366Cys)), which fixed in worldwide populations possibly as a consequence of selective advantage against some pathogen. Another *NLRP1* haplotype, including rs11651270 (c.3550 A>G; p.(Met1184Val)) and rs12150220 (c.464 T>A, p.(Leu155His)) SNPs, appeared to be more recently positively selected exclusively in Europe. Also for pyrin coding gene *MEFV* (Refseq: NM_000243.2), a pathogen-based selective pressure has been postulated [28]. As a consequence, several genetic variants with relative high allele frequency can be observed in the general population sometimes associated to auto-inflammatory syndrome Familial Mediterranean fever (FMF; MIM 249100).

Molecular and evolutionary analysis suggested that inflammasome genes present variants originated from past adaptation to pathogens. They are mainly gain-of-function (GoF) variations leading to increased inflammation and immune response, which nowadays could be responsible for immune disorders, such as hereditary auto-inflammatory syndromes (rare pathogenic variants in inflammasome genes), or could predispose to multifactorial diseases (common variants in inflammasome genes).

Polymorphisms resulting in increased activation of inflammasome (GoF variants) generally affect the close/inactive state or increase the expression level of the target genes. The *NLRP1* SNPs rs12150220 (c.464 T>A, p.(Leu155His)), localized in a link region between PYD and NACHT domains, and rs11651270 (c.3550 A>G, p.(Met1184Val)), localized close to auto-cleavage site in FIIND, increase IL-1 β processing in peripheral blood mononuclear cells especially when present in combined haplotype [29]. The missense variation rs35829419 (c. 2113 C>A, p.(Gln705Lys)) in *NLRP3* (Refseq:NM_004895.4) is localized within NACHT domain and it has been demonstrated to interfere with the molecule “close” conformation resulting in constitutive activate state of the receptor and consequent decrease inflammasome activation threshold (increase IL-1 β and IL-18 production) [30]. The 3'UTR variant rs10754558 (c.*230 G>C) has been described by Hitomi et al. [31] as responsible for the increasing *NLRP3*

Fig. 2 Main inflammasome genes structure and polymorphisms localization. Exon and domain structures are reported for *NLRP1*/*NLRP1* (a), *NLRP3*/*NLRP3* (b), *NLRC4*/*NLRC4* (c), *MEFV*/*pyrin* (d), *AIM2*/*AIM2* and *IFI16*/*IFI16* (e). Exons size is proportional within each coding region. Introns size is not proportional. Amino acid

number is indicated above main domains. PYD pyrin domain, NACHT nucleotide-binding domain and oligomerization domain, LRRs leucine-rich repeats, FIIND function-to-find domain, CARD caspase-recruitment domain, Bz zinc finger, BB B box, CC coiled coil, B30.2/SPRY SPRY domain, HIN-200 HIN-200 domain.

mRNA stability due to its localization within miR-223 binding region.

The nonsense variation rs2043211 (c.30 T>A, p. (Cys10Ter)) in the *NLRP3* inhibitor *CARD8* (Refseq: NM_001184900.3) results in a loss-of-function (LoF) of the inhibitor, in turn, leading to increase inflammasome activation [32].

Several *MEFV* variants have been previously described as pathogenic mutations in FMF patients when found in homozygosity or combined heterozygosity (recessive pattern of inheritance), but as they have been found in general population they have been then reconsidered as likely benign variations (<http://fmf.igh.cnrs.fr/ISSAID/infervers>).

On the other side, LoF variants referred to polymorphisms which impaired inflammasome components availability and/or function, or caspases activation and consequently IL-1 β and/or IL-18 processing and release. For example, rs479333 (c.-119+1498 G>A) and rs385076 (c.-163 C>T) intronic SNPs in *NLRC4* (Refseq: NM_021209.4) have been associated with diminished gene

expression and lower plasma level of IL-18 [33, 34]. The “silent” variant rs580253 (c.766 C>T, p.(Leu256=)) and the 5'UTR SNP rs554344 (g.15661 C>G) in *CASP1* (Refseq: NM_033292.4) gene have been reported to affect the enzyme processing capacity leading to diminishing IL-1 β production [35].

For a portion of SNPs, we have encountered some information in public database of tissues/cells expression (i.e., GTEx Portal: The Genotype-Tissue Expression Project, <https://www.GTEX.org>; The Human Protein Atlas, <https://www.proteinatlas.org>) or in ClinVar database (www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar) and included in Supplementary File 1 to help the interpretation of association data. For other SNPs, tagSNP, without any available functional and/or expression information, it could be possible to take some advantage from data about linkage disequilibrium with functional SNPs (Supplementary File 1).

In Fig. 2, we have represented the polymorphisms distribution within principal inflammasome genes (namely, *NLRP1*, *NLRP3*, *NLRC4*, *MEFV*, *AIM2*, and *IFI16*).

When the frequency of inflammasome polymorphisms is taken in account (Supplementary File 1), we can notice that specific functional variants are present only in distinct populations, suggesting an evolutive pressure or eventually a founder effect, such as, for example, the missense variant rs12150220 (c.464 T>A, p.(Leu155His)) (MAF: 0.03–0.44) in *NLRP1*, the silent variation rs3806268 (c.732 G>A, p.(Ala244=)) (MAF: 0.03–0.55) and the 42 bp-VNTR (rs74163773) in *NLRP3*, or the three SNPs in *CASP1* (rs568910, rs580253, and rs501192) (MAF: 0.01–0.25/0.26) (Supplementary File 1).

As abovementioned, inflammasome components play a main role in first line defense against infectious agents and pathogens exert a strong selection pressure on our immune system, it has been hypothesized that both acute epidemic events and/or endemic infections could be responsible for local shaping of genetic variants frequency, such as in the case of *MEFV* [28], or of *NLRP3* 42 bp-VNTR [36].

Infectious diseases

Association studies on genetic polymorphisms of inflammasome and infectious diseases are summarized in Table 2. Due to its role in first line defense and host/pathogen interaction [24], it is not surprising that variants which lead to heightened inflammasome activation rates and increased release of IL-1 β and/or IL-18 have been associated to protection against infections. Accordingly, these data commonly reflect the results obtained for inflammasome-related genes, such as *IL1B*, *IL-18*, or *P2X7*, which have been investigated also separately from inflammasome by some authors.

NLRP3 GoF variants confer protection against several viral (HCV, HIV-1, HPV, and HLTV), and bacterial (pulmonary tuberculosis, renal parenchymal infections) infections (Table 2). Accordingly, GoF of *CARD8* or LoF of *P2X7* [59], which result in reduced activation of *NLRP3* inflammasome, confer risk for pulmonary tuberculosis [60, 61]. Altogether these data emphasize that the activation of *NLRP3* inflammasome is a key event in the first line immune response. It is interesting to underline that, despite both pro-IL-1 β and pro-IL-18 are substrates for caspase-1, maybe depending on cell type, *NLRP3* activation generally is accompanied by a huge release of IL-1 β . Accordingly, genetic variants which lead to high amount of this cytokine also confer protection against pulmonary tuberculosis [62] and HIV-1 [63].

On the other hands, less clear is the contribution of the axis *NLRP3*/IL-18 in these diseases. Several variants were described within the *IL-18* promoter region, leading to reduced IL-18 plasma levels, and conferring augmented susceptibility to HIV-1 [64, 65] and tuberculosis [66], and protection against HPV infection [67].

Therefore we can deduce that while the *NLRP3*/IL-18 pathway is important for HIV-1 infection, the defense against other viruses, such as HPV, is benefitted by a *NLRP3*-dependent IL-18 production. For *M. tuberculosis*, *NLRP3* and both cytokines appear to be mandatory for bacterial control.

Less is known about genetic effect of other inflammasome receptors and the relative contribution in cytokines processing. GoF variants in *NLRP1* and *IFI16* confer protection to *M. leprae* [49], HPV [45], HIV-1 [44], and HSV-2 [46], respectively (Table 2).

When the progression and/or outcome of chronic infections is taken in account, results appeared to be more complex. In fact, once the pathogen has gained its entry within the host and infection has been established, inflammasome activation could be detrimental for the host due to the inflammation-mediated cells loss and tissue damage; or likely benign if we consider the homeostatic role of specific inflammasome pathways, such as the axis *NLRP3*/IL-18 in mucosal epithelium [3, 21, 22].

As a prototype of this hypothesis, the previously mentioned GoF variant in *NLRP3* (rs10754558), which confers protection against *M. tuberculosis*, has been associated with severe tuberculosis in infected patients [51], suggesting that the genetic effect could change depending on the phase of immune response.

Intriguingly, *NLRP1* SNPs, which were scarcely found in association with infection susceptibility, significantly affect clinical presentation and prognosis of infectious diseases such as vivax malaria [54], bacterial meningitis [56], and Chagas disease-associated cardiomyopathy [57] (Table 2).

Finally, it is interesting to remember that inflammasome SNPs have been recently investigated as modifier factors also in monogenic diseases, such as cystic fibrosis. LoF in *NLRP3* receptor contributes to an increased susceptibility to lungs infections in cystic fibrosis patients [48] (Table 2).

Sterile diseases

The first association study evaluating inflammasome SNPs referred to *NLRP1* and vitiligo-associated autoimmune diseases [68]. As in 2002, pathogenic variants in *NLRP3* have been described in rare dominant auto-inflammatory syndromes (CAPS; MIM 606416) [15], which share some characteristics with autoimmune diseases, speculations had suggested that inflammasome genes could also contribute to autoimmunity development. Inflammation dramatic contributes to the loss of central and/or peripheral tolerance, but also mediates tissue injury once auto-reactive lymphocytes have been activated. Increased levels of pro-inflammatory cytokines IL-1 β and/or IL-18 are found in autoimmune patients. IL-1 β drives Th17-mediated tissue damage in

Table 2 Genetic polymorphisms in inflammasome components and human infectious diseases.

Infectious agent/disease	Gene	Variant ID	Effect on inflammasome activation	Cohort (case/controls; <i>n</i>)	Association
<i>C. albicans</i> (recurrent vulvovaginal candidosis)	<i>NLRP3</i>	rs74163773	Increased	Europe (270/583) [37]; USA (143/182) [38]	Risk
<i>C. trachomatis</i>	<i>NLRP3</i>	rs12065526	Unknown	Germany (461/93) [39]	Risk
HCV	<i>NLRP3</i>	rs1539019; rs35829419	Unknown; Increased	Egypt (201/95) [40]	Protection
HIV-1	<i>NLRP3</i>	rs10754558	Increased	Brazil (children: 135/135; adults: 192/192) [41]; Italy (adults: 192/192) [41]; Brazil (150/158) [42]; Brazil (severity) (300) [43]	Protection
HPV	<i>IFI16</i>	rs1417806	Increased	The Netherlands (365) [44]	Protection
	<i>NLRP1</i>	rs11651270	Increased	Brazil (246/310) [45]	Protection
	<i>NLRP3</i>	rs10754558	Increased		Protection
HSV-2	<i>IFI16</i>	rs2276404	Increased	Sweden (227/232) [46]	Protection
HTLV	<i>NLRP3</i>	rs10754558	Increased	Brazil (84/155) [47]	Protection
Microbial infection in lungs	<i>NLRP3</i>	rs10754558	Increased	Italy (cystic fibrosis) (284) [48]	Risk
<i>M. leprae</i>	<i>NLRP1</i>	rs212704	Decreased	Brazil (380/467) [49]	Protection
	<i>NLRP1</i>	rs2670660, rs12150220, rs2137722	Increased (Haplotype)		
<i>M. tuberculosis</i>	<i>NLRP3</i>	rs10754558	Increased	Brazil (288/288) [50]	Protection
	<i>NLRP3</i>	rs10754558	Increased	Botswana (HIV patients; early death) (94) [51]	Risk
	<i>CARD8</i>	rs6509365	Unknown	Brazil (HIV patients) (96/192) [52]	Risk
	<i>NLRP3</i>	rs385076	Decreased	South Africa (HIV patients; severity) (102) [53]	Protection
<i>P. vivax</i>	<i>NLRP1</i>	rs12150220	Increased	Brazil (severity) (157) [54]	Risk
Renal parenchymal infections	<i>NLRP3</i>	rs4612666	Increased	China (severity) (48/96) [55]	Protection
<i>S. pneumoniae</i>	<i>NLRP1</i>	rs11651270	Increased	Germany (severity) (801) [56]	Risk
	<i>CARD8</i>	rs2043211	Increased		
<i>T. cruzi</i>	<i>NLRP1</i>	rs11691270	Increased	Bolivia (CAC) (38/24) [57]	Risk
	<i>CASP1</i>	rs501192	Unknown	Bolivia (CAC) (149/87) [58]	Risk

Inflammasome variants previously associated to infectious agents and/or diseases are briefly resumed from literature (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>). Significantly associated polymorphisms were grouped according to the infectious agent/disease. Infectious agent or disease (in alphabetical order), gene name (Gene), identification number of polymorphism (ID), resulting effect on inflammasome activation ("increased" or "decreased" or "unknown"), cohort origin (cohort) and eventually specifications (severity, etc.), sample size (*n*) and type (case/control or cases only), association result ("risk" or "protection"), and respective reference are reported.

HCV hepatitis C virus, HIV human immunodeficiency virus, HPV human papilloma virus, HSV herpes simplex virus, HTLV human T-lymphotropic virus, USA United States of America, CAC Chagas-associated cardiomyopathy.

organ-specific autoimmune diseases, such as systemic lupus erythematosus (SLE) and rheumatoid arthritis (RA), while IL-18 induces CD4⁺ T cells IFN- γ production in multiple sclerosis (MS) and RA joint inflammation and dysfunction of endothelial progenitor cells in SLE, impairing vascular repair. Therefore, it has been hypothesized that GoF polymorphisms in inflammasome genes, leading to constitutive augmented levels of IL-1 β and/or IL-18, could represent risk factors for the predisposition and/or for the prognosis of autoimmune disorders [69]. Intriguingly, as inflammasome receptors are redundant in immune cells but tissue specific in nonimmune compartments, studies showed that some receptors are preferentially associated to organ-specific diseases, such as *NLRP1* and autoimmune skin diseases (vitiligo and psoriasis) (Table 3), letting us hypothesizing a sensor-specific contribution in disease pathogenesis.

The majority of the studies reported a significant association for inflammasome polymorphisms and increased risk to develop autoimmune diseases (Table 3). GoF SNPs in *IL1B* and increased IL-1 β are considered a risk factor for vitiligo (Zurawek et al. Supplementary File 3; Additional References), autoimmune thyroiditis (Zhao et al. Supplementary File 3; Additional References), SLE (Polo et al. Supplementary File 3; Additional References), RA (Kastbom et al. Supplementary File 3; Additional References), MS (Alkhateeb et al. Supplementary File 3; Additional References), ankylosing spondylitis (as largely reviewed in (Schoultz et al. Supplementary File 3; Additional References)).

However, some results are discordant, such as from our group (i.e., *NLRP3* rs10754558 and type-1 diabetes (Cheng et al. Supplementary File 3; Additional References); *NLRP3* rs35829419 and celiac disease (Voet et al. Supplementary File 3; Additional References)) (Table 3). It could be an ethnicity-based effect, or it could be taken in account as a new aspect of inflammasome pathways in autoimmunity. It is interesting to emphasize that some autoimmune diseases have been associated to viral or bacterial infection in early infancy (Roberts et al. Supplementary File 3; Additional References), thus, considering the role of inflammasome in pathogen detection and response, we can speculate that a genetic background that better defend against infections could also decrease the risk of early infections, removing a contribution factor in autoimmune pathogenesis. Another hypothesis involved the homeostatic role of inflammasome receptors in mucosa and epithelium [21] and in detecting endogenous DNA inappropriately located outside cell nucleus (Roberts et al. Supplementary File 3; Additional References). Both mechanisms play key role in autoantigens exposition and heavily contribute to autoimmunity. Once again it appears that inflammasome pathways leading to preferential IL-18 production could exert a protective role also in autoimmunity. As it has been reported for *NLRP1*

variants and diabetes kidney disease in T1D patients (Ravimohan et al. Supplementary File 3; Additional References), or *NLRC4* and MS (Feitosa et al. Supplementary File 3; Additional References) (Table 3), and in accord to literature about LoF *IL-18* SNPs and risk for T1D (Hanaei et al. Supplementary File 3; Additional References, Zhang et al. Supplementary File 3; Additional References, Cummings et al. Supplementary File 3; Additional References,) and MS (Villani et al. Supplementary File 3; Additional References).

More recently several genetic variants in inflammasome components have been associated with common pathologies in the general population, such CVD, obesity and associated metabolic syndrome, neurodegenerative diseases, and cancer. Detailed literature revision is reported in Supplementary File 2. Association results for most studied genes (*NLRP1*, *NLRP3*, *CARD8*, *MEFV*, *CASP1*, and *CASP5*) are graphically represented in Fig. 3.

Tumorigenesis could be affected by inflammasome activation in several stages by regulating cell cycle (proliferation or death), innate and adaptive response and the consequent tumor micro-environment, as well as through the direct response to mucosal microbiota, cancer associated pathogens (i.e., HPV and HCV), or inorganic molecules (i.e., asbestos and nicotine). Depending on cancer type, the activation of inflammasome has been reported to promote tumor growth and/or metastasis (i.e., breast cancer and gastric carcinoma) (McGovern et al. Supplementary File 3; Additional References) or to protect against cancer development by the maintenance of tissue homeostasis and/or supporting NK activation status, principally through IL-18 production (Germain et al. Supplementary File 3; Additional References). Accordingly, individuals carrying variants in *NLRP1*, *NLRP3*, *CARD8*, or *CASP1* leading to increase inflammasome activation rate are more susceptible to cancer development and/or worse prognosis (Fig. 3; Supplementary File 2). On the other side, variants associated to a decrease noncanonical caspases activity represent generally a risk factor for several cancer types (Fig. 3; Supplementary File 2). Curiously, GoF variants in *NLRP1* protect against the malignant transformation of HPV+ lesions [45] (Fig. 3; Supplementary File 2). However, in that specific context we have to remind that *NLRP1* is the main inflammasome receptor in keratinocytes and its role is important in mucosal response against pathogens (Yang et al. Supplementary File 3; Additional References). Moreover, in keratinocytes the activation of *NLRP1* lead to IL-18 production, which as abovementioned is crucial for mucosal homeostasis and antitumoral activity [25].

Inflammation and inflammasome activation are involved in the pathogenesis of CVD, such as atherosclerosis, myocardial infarction and heart failure. After ischemia, the myocardial cells death lead to a huge release of DAMPs

Table 3 Genetic polymorphisms in inflammasome components and autoimmune and polygenic auto-inflammatory diseases.

Disease/condition	Gene	Variant ID	Effect on inflammasome activation	Cohort (case/controls; n)	Association
Addison disease	<i>NLRP1</i>	rs12150220	Increased	Norway (333/3273) [70]; Polish (101/254) (Patel et al. Supplementary File 3; Additional References)	Risk
Ankylosing spondylitis	<i>NLRP3</i>	rs4612666	Increased	China (200/200) (Takahashi. Supplementary File 3; Additional References)	Risk
	<i>MEFV</i>	rs224204	Unknown	Spain (456) (van Hout et al. Supplementary File 3; Additional References)	Risk
Autoimmune thyroiditis	<i>CARD8</i>	rs2043211	Increased	Sweden (492/793) (Artlett. Supplementary File 3; Additional References)	Protection
	<i>NLRP1</i>	rs12150220, rs2670660	Increased	Jordan (207/220) (Dehghan et al. Supplementary File 3; Additional References)	Risk
Beçhet disease	<i>AIM2</i>	rs855873	Unknown	Spain (371/854) (Padron-Morales et al. Supplementary File 3; Additional References)	Risk
	<i>IFI16</i>	rs6940	Decreased		
Celiac disease	<i>NLRP3</i>	rs35829419	Increased	Brazil (59/192) (Cheng et al. Supplementary File 3; Additional References); Italy (504/256) (Voet et al. Supplementary File 3; Additional References)	Protection; Risk
IBD: Crohn disease (CD) and ulcerative colitis (UC)	<i>NLRP3</i>	rs35829419	Increased	Sweden (CD) (498/742) (Pontillo et al. Supplementary File 3; Additional References)	Risk (men)
			Increased	New Zealand (CD) (507/517) (Tan et al. Supplementary File 3; Additional References)	Protection
		rs10754558	Increased	Iran (UC) (45/56) (Pozueta et al. Supplementary File 3; Additional References); China (UC) (56/274) (von Herrmann et al. Supplementary File 3; Additional References)	Risk
		rs10925019	Unknown	China (UC) (56/274) (von Herrmann et al. Supplementary File 3; Additional References); UK (CD) (547/465) (Lee et al. Supplementary File 3; Additional References)	Risk
		rs4925648	Unknown	UK (CD) (547/465) (Lee et al. Supplementary File 3; Additional References)	Risk
		rs4353135, rs55646866; rs4266924, rs6672995, rs10733113	Decreased; Unknown	Canada (CD) (239/107) (Pontillo et al. Supplementary File 3; Additional References)	Risk
	<i>MEFV</i>	rs182674, rs224217, rs224225, rs224224, rs224223, rs224222	Unknown	Belgium (IBD) (577 fam; 335/107), Canada (IBD) (347 fam), Scotland (UC) (495/370) (Pontillo et al. Supplementary File 3; Additional References)	Risk
	<i>CARD8</i>	rs2043211	Increased	UK (CD) (372/365) (Xu et al. Supplementary File 3; Additional References); France (CD surgical recruitment) (296) (Ortiz-Fernandez et al. Supplementary File 3; Additional References); Sweden (CD) (498/742) (Pontillo et al. Supplementary File 3; Additional References)	Risk
				New Zealand (CD) (507/517) (Tan et al. Supplementary File 3; Additional References)	Protection
HS purpura	<i>MEFV</i>	rs1972619	Unknown	Korea (CD, UC) (650/688) (Bruchard et al. Supplementary File 3; Additional References)	Risk
		rs3743930	Unknown	China (320/342) (Grandemange et al. Supplementary File 3; Additional References); China (78/189) (Canna et al. Supplementary File 3; Additional References)	Risk
Kawasaki disease	<i>NLRP1</i>	rs11651270, rs8079034, rs3744717, rs11078571, rs16954813, rs8079727	Increased (Haplotype)	Japan (356/215) (Romberg et al. Supplementary File 3; Additional References)	Risk
Multiple sclerosis	<i>NLRP3</i>	rs3806265, rs10754557	Unknown	Iran (150/100) (Aksejtijevich et al. Supplementary File 3; Additional References)	Risk
		rs35829419	Increased	Brazil (severity) (209) (Feitosa et al. Supplementary File 3; Additional References)	Risk
PFAPA	<i>NLRP4</i>	rs479333	Decreased		Protection
	<i>CARD8</i>	rs140826611	Unknown	Switzerland (82/100) (Ekman et al. Supplementary File 3; Additional References)	Risk
Psoriasis	<i>NLRP1</i>	rs8079034	Unknown	Swedish (1847/802) (Zhang et al. Supplementary File 3; Additional References)	Risk
	<i>NLRP3</i>	rs3806265, rs10754557	Unknown	China (540/612) (Jaeger et al. Supplementary File 3; Additional References)	Risk

Table 3 (continued)

Disease/condition	Gene	Variant ID	Effect on inflammasome activation	Cohort (case/controls; <i>n</i>)	Association
Psoriatic IJA	<i>CARD8</i>	rs10733113	Unknown	Swedish (Severity) (1988/1002; fam: 491) (Shen et al. Supplementary File 3; Additional References)	Risk
	<i>AIM2</i>	rs2043211	Increased	China (6369/13969) (Villani et al. Supplementary File 3; Additional References)	Risk
	<i>NLRP3</i>	rs2276405	Unknown	Taiwan (118) (Ahola-Olli et al. Supplementary File 3; Additional References)	Protection
Rheumatoid arthritis	<i>NLRP3</i>	rs4353135	Decreased	UK (950728) (Marchesan et al. Supplementary File 3; Additional References)	Risk
	<i>MEFV</i>	rs3806265	Unknown	China (190/190) (Castano-Rodriguez et al. Supplementary File 3; Additional References); China (500/500) (Gonzalez-Pacheco et al. Supplementary File 3; Additional References)	Risk
	<i>NLRP1</i>	rs224204	Unknown	Sweden (174/360) (Lev-Sagie et al. Supplementary File 3; Additional References); Slovenia (Severity) (128) (Wang et al. Supplementary File 3; Additional References)	Risk
	<i>NLRP3</i>	rs878329	Increased	Sweden (174/360) (Lev-Sagie et al. Supplementary File 3; Additional References); Slovenia (Severity) (128) (Wang et al. Supplementary File 3; Additional References)	Risk
	<i>NLRP3</i>	rs35829419	Increased	Brazil (218/307) (Estfanous et al. Supplementary File 3; Additional References)	Risk
SLE	<i>CARD8</i>	rs10754558	Unknown	UK (1278/283) (Pontillo et al. Supplementary File 3; Additional References)	Risk
	<i>CARD8</i>	rs10159239, rs4925648, rs4925659	Increased	Sweden (174/360) (Lev-Sagie et al. Supplementary File 3; Additional References); Slovenia (Severity) (128) (Wang et al. Supplementary File 3; Additional References); Brazil (218/307) (Estfanous et al. Supplementary File 3; Additional References); Sweden (Severity) (560) (Pontillo et al. Supplementary File 3; Additional References)	Risk
	<i>CASP5</i>	rs2043211	Increased	China (500/500) (Reis et al. Supplementary File 3; Additional References)	Risk
Systemic sclerosis	<i>NLRP1</i>	rs9651713	Unknown	Brazil (144/158) (Kamada et al. Supplementary File 3; Additional References); Brazil (90/144) (Souza de Lima et al. Supplementary File 3; Additional References)	Risk
	<i>NLRP1</i>	rs12150220, rs2670660	Increased	Germany (532), Italy (537) (Pontillo et al. Supplementary File 3; Additional References)	Risk
Type-1 diabetes	<i>NLRP1</i>	rs8182352	Unknown	Norway (1086/3273) [70]	Risk
	<i>NLRP1</i>	rs12150220	Increased	Brazil (DKD) (317) (Ravimohan et al. Supplementary File 3; Additional References)	Protection
Vitiligo	<i>NLRP3</i>	rs2670660, rs11651270	Increased	Brazil (196/192) (Cheng et al. Supplementary File 3; Additional References)	Protection
	<i>NLRP3</i>	rs10754558	Increased	USA/UK (333/323) ^a [68]	Risk
	<i>NLRP1</i>	rs12150220	Increased	Romania (66/93) (Cheng et al. Supplementary File 3; Additional References); India (537/645) (Fu et al. Supplementary File 3; Additional References); Jordan (26/61) (Magitta et al. Supplementary File 3; Additional References)	Risk
Vitiligo	<i>NLRP1</i>	rs2670660	Increased	Romania (66/93) (Cheng et al. Supplementary File 3; Additional References)	Risk
	<i>NLRP1</i>	rs8182352	Unknown	India (537/645) (Fu et al. Supplementary File 3; Additional References)	Risk
Vitiligo	<i>NLRP1</i>	rs6502867	Unknown	Jordan (26/61) (Magitta et al. Supplementary File 3; Additional References)	Risk
	<i>NLRP1</i>	rs1008588	Unknown		Risk

Inflammasome variants previously associated to autoimmune or polygenic multifactorial auto-inflammatory diseases are briefly resumed from literature (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), Disease or pathologic conditions (in alphabetical order), gene name (Gene), identification number of polymorphism (ID), resulting effect on inflammasome activation ("increased" or "decreased" or "unknown"), cohort origin (cohort), eventually specifications (severity, etc.), sample size (*n*), type (case/control or cases only), association result ("risk" or "protection"), and respective reference are reported.

HS Henoch–Schönlein, *IBD* intestinal bowel disease, *PFAPA* periodic fever with aphthous stomatitis, pharyngitis, and cervical adenitis, *JIA* juvenile idiopathic arthritis *SLE* systemic lupus erythematosus.

^aVitiligo-associated multiple autoimmune disease.

Fig. 3 Main disease-associated risk variants identified in non-infectious sterile diseases. Stacked bar plots showing disease-associated risk SNPs for each disease group: cancer, cardiovascular diseases (CVD), fibrosis, hypersensitivity and allergic diseases, metabolic diseases, neurologic diseases, pregnancy disorders, skin and mucosal diseases. Risk or protection effect of *NLRP1*, *NLRP3*, *CARD8*, *MEFV*, *CASP1*, and *CASP5* genes is represented as positive or negative bars, respectively.

(i.e., ATP, mtDNA, etc.) and the consequent activation of inflammation and leukocytes infiltration within the hearth. This response could result in an exaggerated inflammatory response, tissue damage, adverse cardiac tissue remodeling, and worse prognosis (Xiong et al. Supplementary File 3; Additional References). Moreover, a high fatty acid diet and the consequent increased levels of plasma oxidized low-density lipoproteins, as well as alterations in glycolytic pathways, are known pro-inflammatory factors and have been associated to atherosclerosis, obesity and insulin resistance, in part due to the activation of NLRP3 inflammasome (He et al. Supplementary File 3; Additional References).

In this scenario, it does not surprise that genetic variants that increased inflammasome activation have been described as possible risk factors for CVD or metabolic diseases. As could be appreciated in Fig. 3 (and detailed in Supplementary File 2), accordingly to its uniquely expression in cardiomyocytes, cardiac fibroblasts, and cardiac microvascular endothelial cells (Onoyama et al. Supplementary File 3; Additional References), it is mainly *NLRP3* genetics

that represents a predisposing factor for CVD. Recent evidence about the use of specific NLRP3 inhibitor MCC-950 in CVD treatment support the central role of the receptor in this group of diseases (Imani et al. Supplementary File 3; Additional References).

For what concerns studies about inflammasome genetics and metabolism, some GoF SNPs resulted associated to hyperlipidemia and/or hyper glicemia (Fig. 3; Supplementary File 2). However, these data have to be carefully interpreted as metabolic alteration could be sensed by NLRP3—or maybe other receptors—inducing a response trying to report the cell to homeostasis, therefore an excessive inflammatory response could cause metabolism-related pathologies, however, the contrary is far to be demonstrated.

Fibrotic response and collagen deposition have been showed to be guided by inflammasome activation (Cheung et al. Supplementary File 3; Additional References). Therefore researchers wondered whether inflammasome genetics could contribute to the predisposition observed in some individuals to develop fibrosis and fibrosis-related diseases. A half-dozen SNPs have been significantly associated to coal workers' pneumoconiosis, chronic renal disease and silicosis (Fig. 3; Supplementary File 2), however, no functional data are available for a deeper discussion. Of note individuals carrying the tagSNP rs1539019 present an increased level of fibrinogen (Yu et al. Supplementary File 3; Additional References), which can at least in part explain the association results.

As expected, hyper-sensitivity reactions have been associated with GoF variants in inflammasome genes (Fig. 3; Supplementary File 2) accordingly to those related to increased IL-1 β production (Carlstrom et al. Supplementary File 3; Additional References). IL-18 is considered homeostatic in airways and lung epithelium, as well as in skin, and concordantly *IL-18* GoF have been reported as protective factors against asthma (Zuo et al. Supplementary File 3; Additional References).

Besides, animal models suggest that both NLRP1 and NLRP3 are involved in inflammasome activation and in the pathogenesis of neurodegenerative diseases (Yang et al. Supplementary File 3; Additional References), from a genetic point of view data appear more complicated. Amyloid and misfolded proteins have been demonstrated to cause neuroinflammation, through the activation of NLRP3 (and maybe NLRP1) inflammasome both by ER stress or direct binding to some PRRs (i.e., scavenger receptors and TLRs) (Yang et al. Supplementary File 3; Additional References). However, a protective role of GoF SNPs in *NLRP1* and *NLRP3* toward the development of Alzheimer disease (AD) was reported (Fig. 3; Supplementary File 2) (Day et al. Supplementary File 3; Additional References, Sui et al. Supplementary File 3; Additional References).

Table 4 SNPs in inflammasome genes and response to treatment.

Disease	Gene	SNP ID	Effect on inflammasome activation	Cohort (case/controls; <i>n</i>)	Association
Crohn disease	<i>NLRP1</i>	rs12150220, rs2670660	Increased	Italy (154)	Unresponsiveness to glucocorticoids (Kastbom et al. Supplementary File 3; Additional References)
Chronic myeloid leukemia	<i>MEFV</i>	rs3743930	Increased	Japan (24)	Positive response to glucocorticoids (Rui et al. Supplementary File 3; Additional References)
Hepatitis C	<i>NLRP3</i>	rs35829419, rs1539019	Increased	Egypt (201/95)	Unresponsiveness [40]
	<i>CARD8</i>	rs2043211	Increased		
Multiple sclerosis	<i>NLRP3</i>	rs35829419	Increased	Spain (97)	Low response to IFN- β treatment (Pontillo et al. Supplementary File 3; Additional References)
Rheumatoid arthritis	<i>NLRP3</i>	rs10754558	Increased	Denmark (538)	Negative response to anti-TNF treatment (Pontillo et al. Supplementary File 3; Additional References)

Inflammasome variants previously associated to treatment response are briefly resumed from literature (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>). The disease, gene, SNP identification number (ID), effect on inflammasome activation, cohort and type of association are reported for response to treatment.

Accordingly another study showed that variants that decrease caspase-1 activity accelerate AD progression (Goh et al. Supplementary File 3; Additional References). How a constitutive increased activation of inflammasome could protect from neurodegeneration is still unclear.

On the other side, a synonymous variant which decreases NLRP3 stability represents a protective factor in Parkinson disease (PD) (Kastbom et al. Supplementary File 3; Additional References), suggesting a pathologic role of NLRP3 inflammasome activation in PD, as also confirmed by the positive association between GoF *IL1B* SNPs and PD development (Jenko et al. Supplementary File 3; Additional References). Intriguingly, genetic variants leading to increasing inflammasome activity (NLRP3, NLRC4, and IL-18) were associated to worse progression of MS (Feitosa et al. Supplementary File 3; Additional References), that, besides the distinct pathogenesis, is characterized by neuroinflammation and neurodegeneration.

Few studies have been performed investigating inflammasome genetics and pregnancy disorders, however, it is interesting to emphasize some results, for example, hypertension complication during pregnancy (preeclampsia) was more frequent in women carrying GoF polymorphisms in *NLRP1* (Addobbati et al. Supplementary File 3; Additional References) and *NLRP3* (Mathews et al. Supplementary File 3; Additional References) (Fig. 3; Supplementary File 2).

Finally, a low number of reports have been published about genetic variants in dsDNA receptors AIM2 and IFI16 and significant association with sterile diseases, including Beçhet disease, psoriasis, and periodontal diseases (Supplementary File 2). Of note, while GoF SNPs have been associated to periodontal disease, suggesting that they lead to increased inflammasome activation contributing to the periodontal pathologic inflammation, for autoimmune

conditions it seems that a decreased activity of these receptors could negatively affect the development of the autoreactivity (Padron-Morales et al. Supplementary File 3; Additional References).

Half a dozen studies reported the significant association between SNPs in inflammasome genes and response to treatment (Table 4). Curiously all but one showed that GoF variants in NLRP1 or NLRP3 inflammasome had a negative effect on treatment response, glucocorticoids, or IFN-based therapies.

Concluding remarks and perspectives

Pathogenic variants in inflammasome genes have been described as cause of rare inherited auto-inflammatory syndromes (<http://fmf.igh.cnrs.fr/ISSAID/infivers>), characterized by a constitutive activation of inflammasome and a dramatic production of IL-1 β and/or IL-18 [4].

Increasing evidence have demonstrated the genetic association between polymorphisms in inflammasome genes and multifactorial diseases, both infectious and sterile diseases. Data about the functional effect of these variants are available only for a limited number of disease-associated polymorphisms. In general, they affect inflammasome constitutive activation and/or its activation rate. It is interesting to underline that, as previously observed for rare syndromes [4], inflammasome components, especially the receptors, have a unique cell and/or tissue expression profile. Therefore the effect of polymorphisms in specific genes may alter the clinical phenotype and the systemic or organ-specific presentation, depending on the circumstances. It makes sense that, for example, variants in *NLRP1*, which is expressed in keratinocytes, brain, and kidney tubular cells (from <https://www.proteinatlas.org>),

Fig. 4 Interpretation of inflammasome genetic data. a

Main expression sites for inflammasome receptors are reported together with preferential cytokine processing (higher and bold characters). Alternative function of inflammasome receptors is eventually indicated. Expression data were obtained from public databases (<https://www.GTEX.org> and/or <https://www.proteinatlas.org>). **b** Schematic representation of the effect of inflammasome genetic variants on the constitutive inflammasome activation rate, and the consequent role in disease predisposition, taking in account that inflammasome genes have often distinct cell/tissue-specific expression.

have been associated to HPV infection (Table 2), vitiligo and psoriasis (Table 3), AD or renal impairment (Fig. 3; Supplementary File 2). Moreover, we would like to emphasize that, even if the exact mechanism is still unknown, genetic association studies point out a preferential receptor/cytokine axis in the contribution to multifactorial diseases etiology, which could be taken in account for therapeutic purposes.

Finally it is important to remember that beyond the key role in IL-1 β and IL-18 processing and release, inflammasome components are involved in pyroptosis and also in caspase-independent functions, such as the role of transcriptional co-factor for a Th2 polarization proposed for NLRP3 (Dieude et al. Supplementary File 3; Additional References) or the inhibitory role toward NF-kB of NLRP6, NLRP7 [20], so these alternative roles could be taken in account in the interpretation of genetic association results. All these consideration have been graphically resumed in Fig. 4.

Unfortunately, to our knowledge, no functional studies linking inflammasome polymorphisms and pyroptosis or alternative functions have been yet performed. The only indirect data originated from the work of Booiiman et al. [44], which reported the association between a *IFI16* SNP and the level of CD4⁺ T lymphocytes in HIV-infected patients, linking the polymorphism with the loss of this lymphocytes population, therefore assuming a increased IFI16-mediated pyroptosis.

Even if sometimes limited by the ethnic background or sample size, association studies involving inflammasome

genes and polymorphic variants are greatly contributing to our knowledge about the role of inflammasome in multifactorial diseases and about the selective pressure made by pathogens on inflammasome components and the possible heterozygote advantage that leads to increase variant frequency in the general population.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

References

1. Broz P, Dixit VM. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat Rev Immunol*. 2016;16:407.
2. Liston A, Masters SL. Homeostasis-altering molecular processes as mechanisms of inflammasome activation. *Nat Rev Immunol*. 2017;17:208–14.
3. Man SM, Karki R, Kanneganti TD. Molecular mechanisms and functions of pyroptosis, inflammatory caspases and inflammasomes in infectious diseases. *Immunol Rev*. 2017; 277:61–75.
4. Manthiram K, Zhou Q, Aksentijevich I, Kastner DL. The monogenic autoinflammatory diseases define new pathways in human innate immunity and inflammation. *Nat Immunol*. 2017;18:832–42.
5. Latz E, Xiao TS, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat Rev Immunol*. 2013;13:397–411.
6. Zhong FL, Robinson K, Teo DET, Tan KY, Lim C, Harapas CR, et al. Human DPP9 represses NLRP1 inflammasome and protects

- against autoinflammatory diseases via both peptidase activity and FIIND domain binding. *J Biol Chem.* 2018;293:18864–78.
7. Park YH, Wood G, Kastner DL, Chae JJ. Pyrin inflammasome activation and RhoA signaling in the autoinflammatory diseases FMF and HIDS. *Nat Immunol.* 2016;17:914–21.
 8. Finger JN, Lich JD, Dare LC, Cook MN, Brown KK, Duraiswami C, et al. Autolytic proteolysis within the function to find domain (FIIND) is required for NLRP1 inflammasome activity. *J Biol Chem.* 2012;287:25030–7.
 9. Ito S, Hara Y, Kubota T. CARD8 is a negative regulator for NLRP3 inflammasome, but mutant NLRP3 in cryopyrin-associated periodic syndromes escapes the restriction. *Arthritis Res Ther.* 2014;16:R52.
 10. He Y, Zeng MY, Yang D, Motro B, Nunez G. NEK7 is an essential mediator of NLRP3 activation downstream of potassium efflux. *Nature.* 2016;530:354–7.
 11. Vance RE. The NAIP/NLRC4 inflammasomes. *Curr Opin Immunol.* 2015;32:84–9.
 12. Ma Z, Ni G, Damania B. Innate Sensing of DNA Virus Genomes. *Annu Rev Virol.* 2018;5:341–62.
 13. Shao B-Z, Xu Z-Q, Han B-Z, Su D-F, Liu C. NLRP3 inflammasome and its inhibitors: a review. *Front Pharmacol.* 2015;6:262.
 14. Grandemange S, Sanchez E, Louis-Plence P, Tran Mau-Them F, Bessis D, Coubes C, et al. A new autoinflammatory and auto-immune syndrome associated with NLRP1 mutations: NAIAD (NLRP1-associated autoinflammation with arthritis and dyskeratosis). *Ann Rheum Dis.* 2017;76:1191–8.
 15. Hoffman HM, Mueller JL, Broide DH, Wanderer AA, Kolodner RD. Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome. *Nat Genet.* 2001;29:301–5.
 16. Canna SW, de Jesus AA, Gouni S, Brooks SR, Marrero B, Liu Y, et al. An activating NLRC4 inflammasome mutation causes autoinflammation with recurrent macrophage activation syndrome. *Nat Genet.* 2014;46:1140–6.
 17. Romberg N, Al Moussawi K, Nelson-Williams C, Stiegler AL, Loring E, Choi M, et al. Mutation of NLRC4 causes a syndrome of enterocolitis and autoinflammation. *Nat Genet.* 2014;46:1135–9.
 18. Aksentijevich I, Gruberg L, Pras E, Balow JE Jr, Kovo M, Gazit E, et al. Evidence for linkage of the gene causing familial Mediterranean fever to chromosome 17q in non-Ashkenazi Jewish families: second locus or type I error? *Hum Genet.* 1993;91:527–34.
 19. Yin Y, Yan Y, Jiang X, Mai J, Chen NC, Wang H, et al. Inflammasomes are differentially expressed in cardiovascular and other tissues. *Int J Immunopathol Pharm.* 2009;22:311–22.
 20. Kufer TA, Sansonetti PJ. NLR functions beyond pathogen recognition. *Nat Immunol.* 2011;12:121–8.
 21. Rathinam VAK, Chan FK. Inflammasome, Inflammation, and Tissue Homeostasis. *Trends Mol Med.* 2018;24:304–18.
 22. Awad F, Assrawi E, Louvrier C, Jumeau C, Georgin-Lavialle S, Grateau G, et al. Inflammasome biology, molecular pathology and therapeutic implications. *Pharmacol Ther.* 2018;187:133–49.
 23. Sharma D, Kanneganti T-D. The cell biology of inflammasomes: Mechanisms of inflammasome activation and regulation. *J Cell Biol.* 2016;213:617.
 24. Hayward JA, Mathur A, Ngo C, Man SM. Cytosolic Recognition of Microbes and Pathogens: Inflammasomes in Action. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2018;82:e00015–8.
 25. Yasuda K, Nakanishi K, Tsutsui H. Interleukin-18 in Health and Disease. *Int J Mol Sci.* 2019;20.
 26. Caseley EA, Muench SP, Roger S, Mao H-J, Baldwin SA, Jiang L-H. Non-synonymous single nucleotide polymorphisms in the P2X receptor genes: association with diseases, impact on receptor functions and potential use as diagnosis biomarkers. *Int J Mol Sci.* 2014;15:13344–71.
 27. Vasseur E, Boniotto M, Patin E, Laval G, Quach H, Manry J, et al. The evolutionary landscape of cytosolic microbial sensors in humans. *Am J Hum Genet.* 2012;91:27–37.
 28. Schaner P, Richards N, Wadhwa A, Aksentijevich I, Kastner D, Tucker P, et al. Episodic evolution of pyrin in primates: human recapitulate ancestral amino acid states. *Nat Genet.* 2001;27:318–21.
 29. Levandowski CB, Mailloux CM, Ferrara TM, Gowan K, Ben S, Jin J, et al. NLRP1 haplotypes associated with vitiligo and autoimmunity increase interleukin-1 β processing via the NLRP1 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013;110:2952–6.
 30. Verma D, Sarndahl E, Andersson H, Eriksson P, Fredrikson M, Jönsson JI, et al. The Q705K polymorphism in NLRP3 is a gain-of-function alteration leading to excessive interleukin-1 β and IL-18 production. *PLoS ONE.* 2012;7:e34977.
 31. Hitomi Y, Ebisawa M, Tomikawa M, Imai T, Komata T, Hirota T, et al. Associations of functional NLRP3 polymorphisms with susceptibility to food-induced anaphylaxis and aspirin-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;124:779–85. e776.
 32. Roberts RL, Van Rij AM, Phillips LV, Young S, McCormick SPA, Merriman TR, et al. Interaction of the inflammasome genes CARD8 and NLRP3 in abdominal aortic aneurysms. *Atherosclerosis.* 2011;218:123–6.
 33. Matteini AM, Li J, Lange EM, Lange LA, Tracy RP, Wang Y, et al. Novel gene variants predict serum levels of the cytokines IL-18 and IL-1ra in older adults. *Cytokine.* 2014;65:10–6.
 34. Zeller T, Haase T, Muller C, Riess H, Lau D, Zeller S, et al. Molecular Characterization of the NLRC4 Expression in Relation to Interleukin-18 Levels. *Circ Cardiovasc Genet.* 2015;8:717–26.
 35. Trompet S, de Craen AJ, Slagboom P, Shepherd J, Blauw GJ, Murphy MB, et al. Genetic variation in the interleukin-1 β -converting enzyme associates with cognitive function. The PROSPER study. *Brain.* 2008;131:1069–77.
 36. Omi T, Koda Y, Soejima M, Munkhtulga L, Iwamoto S. Distribution of 42-bp variable tandem repeat polymorphism of the cold-induced autoinflammatory syndrome 1 (CIAS1) gene in eight human populations. *Leg Med (Tokyo).* 2011;13:44–6.
 37. Jaeger M, Carvalho A, Cunha C, Plantinga TS, van de Veerdonk F, Puccetti M, et al. Association of a variable number tandem repeat in the NLRP3 gene in women with susceptibility to RVVC. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2016;35:797–801.
 38. Lev-Sagie A, Prus D, Linhares IM, Lavy Y, Ledger WJ, Witkin SS. Polymorphism in a gene coding for the inflammasome component NALP3 and recurrent vulvovaginal candidiasis in women with vulvar vestibulitis syndrome. *Am J Obstet Gynecol.* 2009;200:303. e1–6.
 39. Wang W, Stassen FR, Surcel HM, Ohman H, Tiitinen A, Paa-vonen J, et al. Analyses of polymorphisms in the inflammasome-associated NLRP3 and miRNA-146A genes in the susceptibility to and tubal pathology of Chlamydia trachomatis infection. *Drugs Today (Barc).* 2009;45 Suppl B:95–103.
 40. Estfanous SZK, Ali SA, Seif SM, Soror SHA, Abdelaziz DHA. Inflammasome Genes' Polymorphisms in Egyptian Chronic Hepatitis C Patients: Influence on Vulnerability to Infection and Response to Treatment. *Mediators Inflamm.* 2019;2019:327364.
 41. Pontillo A, Oshiro TM, Girardelli M, Kamada AJ, Crovella S, Duarte AJ. Polymorphisms in inflammasome' genes and susceptibility to HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2012;59:121–5.
 42. Crovella S, Brandao LA, Guimaraes RL, Segat L, Athanasakis E, Crovella S. A 3'UTR SNP in NLRP3 gene is associated with susceptibility to HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2010;54:236–40.

43. Reis EC, Leal VNC, da Silva LT, Dos Reis MML, Argañazet ER, et al. Antagonistic role of IL-18 and NLRP3/IL-18 genetics in chronic HIV-1 infection. *Clin Immunol.* 2019;209:108266.
44. Booiman T, Kootstra NA. Polymorphism in IFI16 affects CD4(+) T-cell counts in HIV-1 infection. *Int J Immunogenet.* 2014;41:518–20.
45. Pontillo A, Bricher P, Leal VN, Lima S, Souza PR, Crovella S. Role of inflammasome genetics in susceptibility to HPV infection and cervical cancer development. *J Med Virol.* 2016;88:1646–51.
46. Eriksson K, Svensson A, Hart AS, Schlüter K, Tunbäck P, Nordström I, et al. Cutting Edge: Genetic Association between IFI16 Single Nucleotide Polymorphisms and Resistance to Genital Herpes Correlates with IFI16 Expression Levels and HSV-2-Induced IFN-beta Expression. *J Immunol.* 2017;199:2613–7.
47. Kamada AJ, Pontillo A, Guimaraes RL, Loureiro P, Crovella S, Brandao LA. NLRP3 polymorphism is associated with protection against human T-lymphotropic virus 1 infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2014;109:960–3.
48. Iannitti RG, Napolioni V, Oikonomou V, De Luca A, Galosi C, Pariano M, et al. IL-1 receptor antagonist ameliorates inflammasome-dependent inflammation in murine and human cystic fibrosis. *Nat Commun.* 2016;7:10791.
49. Pontillo A, Laurentino W, Crovella S, Pereira AC. NLRP1 haplotypes associated with leprosy in Brazilian patients. *Infect Genet Evol.* 2013;19:274–9.
50. Souza de Lima D, Ogusku MM, Sadahiro A, Pontillo A. Inflammasome genetics contributes to the development and control of active pulmonary tuberculosis. *Infect Genet Evol.* 2016;41:240–4.
51. Ravimohan S, Nfanyana K, Tamuhla N, Tiemessen CT, Weissman D, Bisson GP. Common Variation in NLRP3 Is Associated With Early Death and Elevated Inflammasome Biomarkers Among Advanced HIV/TB Co-infected Patients in Botswana. *Open Forum Infect Dis.* 2018;5:ofy075.
52. Pontillo A, Carvalho MS, Kamada AJ, Moura R, Schindler HC, Duarte AJ, et al. Susceptibility to Mycobacterium tuberculosis infection in HIV-positive patients is associated with CARD8 genetic variant. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2013;63:147–51.
53. Ravimohan S, Maenetje P, Auld SC, Ncube I, Mlotshwa M, Chase W, et al. A Common NLRC4 Gene Variant Associates With Inflammation and Pulmonary Function in Human Immunodeficiency Virus and Tuberculosis Clin Infect Dis. 2019;22:ciz898.
54. Santos MLS, Reis EC, Bricher PN, Sousa TN, Brito CFA, Lacerda MVG, et al. Contribution of inflammasome genetics in Plasmodium vivax malaria. *Infect Genet Evol.* 2016;40:162–6.
55. Cheng CH, Lee YS, Chang CJ, Lin JC, Lin TY. Genetic Polymorphisms in Inflammasome-Dependent Innate Immunity among Pediatric Patients with Severe Renal Parenchymal Infections. *PLoS ONE.* 2015;10:e0140128.
56. Geldhoff M, Mook-Kanamori BB, Brouwer MC, Seron MV, Baas F, van der Ende A, et al. Genetic variation in inflammasome genes is associated with outcome in bacterial meningitis. *Immunogenetics.* 2013;65:9–16.
57. Clipman SJ, Henderson-Frost J, Fu KY, Bern C, Flores J, Gilman RH. Genetic association study of NLRP1, CARD, and CASP1 inflammasome genes with chronic Chagas cardiomyopathy among Trypanosoma cruzi seropositive patients in Bolivia. *PLoS ONE.* 2018;13:e0192378.
58. Fu KY, Zamudio R, Henderson-Frost J, Almuedo A, Steinberg H, Clipman SJ, et al. Association of caspase-1 polymorphisms with Chagas cardiomyopathy among individuals in Santa Cruz, Bolivia. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2017;50:516–23.
59. Shemon AN, Sluyter R, Fernando SL, Clarke AL, Dao-Ung LP, Skarratt KK, et al. A Thr357 to Ser polymorphism in homozygous and compound heterozygous subjects causes absent or reduced P2X7 function and impairs ATP-induced mycobacterial killing by macrophages. *J Biol Chem.* 2006;281:2079–86.
60. Fernando SL, Saunders BM, Sluyter R, Skarratt KK, Goldberg H, Marks GB, et al. A polymorphism in the P2X7 gene increases susceptibility to extrapulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;175:360–6.
61. Wu J, Lu L, Zhang L, Ding Y, Wu F, Zuo W, et al. Single Nucleotide Polymorphisms in P2X7 Gene Are Associated with Serum Immunoglobulin G Responses to Mycobacterium tuberculosis in Tuberculosis Patients. *Dis Markers.* 2015;2015:671272.
62. Hall NB, Igo RP Jr., Malone LL, Truitt B, Schnell A, Tao L, et al. Polymorphisms in TICAM2 and IL1B are associated with TB. *Genes Immun.* 2015;16:127–33.
63. Tsiara CG, Nikolopoulos GK, Dimou NL, Pantavou KG, Bagos PG, Mensah B, et al. Interleukin gene polymorphisms and susceptibility to HIV-1 infection: a meta-analysis. *J Genet.* 2018;97:235–51.
64. Sobti RC, Sharma VL, Abitew AM, Berhane N, Mahdi SA, Askari M, et al. The -137G/C polymorphism of interleukin 18 promoter and risk of HIV-1 infection and its progression to AIDS. *Acta Virol.* 2011;55:353–6.
65. Segat L, Bevilacqua D, Boniotto M, Arraes LC, Souza PR, de Lima Filho JL, et al. IL-18 gene promoter polymorphism is involved in HIV-1 infection in a Brazilian pediatric population. *Immunogenetics.* 2006;58:471–3.
66. Zhou C, Ouyang N, Li QH, Luo SX, He Q, Lei H, et al. The -137G/C single nucleotide polymorphism in IL-18 gene promoter contributes to tuberculosis susceptibility in Chinese Han population. *Infect Genet Evol.* 2015;36:376–80.
67. Tavares MC, de Lima Junior SF, Coelho AV, Marques TRNM, de Araújo DHT, Heráclio SA, et al. Tumor necrosis factor (TNF) alpha and interleukin (IL) 18 genes polymorphisms are correlated with susceptibility to HPV infection in patients with and without cervical intraepithelial lesion. *Ann Hum Biol.* 2016;43:261–8.
68. Jin Y, Mailloux CM, Gowan K, Riccardi SL, LaBerge G, Bennett DC, et al. NALP1 in vitiligo-associated multiple autoimmune disease. *N Engl J Med.* 2007;356:1216–25.
69. Lamkanfi M, Dixit VM. Inflammasomes and their roles in health and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2012;28:137–61.
70. Magitta NF, Boe Wolff AS, Johansson S, Skinningsrud B, Lie BA, Myhr KM, et al. A coding polymorphism in NALP1 confers risk for autoimmune Addison's disease and type 1 diabetes. *Genes Immun.* 2009;10:120–4.