

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS**  
**FUNDAÇÃO HOSPITALAR DE HEMATOLOGIA E**  
**HEMOTERAPIA DO AMAZONAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS**  
**À HEMATOLOGIA**

**FREQUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS NOS GENES *NLRP1*, *NLRP3*, *P2X7*,  
*IL1 $\beta$*  E *IL18* EM PACIENTES COM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA E  
SUA A INFLUÊNCIA NO PROGNÓSTICO CLÍNICO**

**FABÍOLA SILVA ALVES**

**MANAUS – AM**

**2020**

**FABÍOLA SILVA ALVES**

**FREQUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS NOS GENES *NLRP1*, *NLRP3*, *P2X7*,  
*IL1 $\beta$*  E *IL18* EM PACIENTES COM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA E  
SUA A INFLUÊNCIA NO PROGNÓSTICO CLÍNICO**

Projeto de defesa apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas a Hematologia da Universidade do Estado do Amazonas, em convênio com a Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, para obtenção do grau de *Mestre em Ciências Aplicadas a Hematologia*.

**Orientador:** Prof<sup>o</sup>. Dr. Allyson Guimarães da Costa

**Coorientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dra. Adriana Malheiro Alle Marie

**MANAUS – AM**

**2020**

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.**

a474f      Alves, Fabíola Silva  
FREQÜÊNCIA DOS POLIMORFISMOS NOS GENES  
NLRP1, NLRP3, P2X7, IL1B E IL18 EM PACIENTES COM  
LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA E SUA A  
INFLUÊNCIA NO  
PROGNÓSTICO CLÍNICO / Fabíola Silva Alves.  
Manaus: [s.n], 2020.  
143 f.: il.; 3 cm.

Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Aplicadas à Hematologia - Universidade do Estado do  
Amazonas, Manaus, 2020. Inclui bibliografia  
Orientador: Costa, Allyson Guimarães  
da Coorientador: Marie, Adriana  
Malheiro Alle

1. Leucemia Linfoblástica Aguda. 2. Imunidade Inata. 3.  
Receptores do tipo NOD. I. Costa, Allyson Guimarães da  
(Orient.). II. Marie, Adriana Malheiro Alle (Coorient.). III.  
Universidade do Estado do Amazonas. IV. FREQÜÊNCIA DOS  
POLIMORFISMOS NOS GENES NLRP1, NLRP3, P2X7, IL1B  
E IL18 EM PACIENTES COM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA  
AGUDA E SUA A INFLUÊNCIA NO PROGNÓSTICO CLÍNICO

**Elaborado por Jeane Macelino Galves - CRB-11/463**

## FOLHA DE JULGAMENTO



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
APLICADAS À HEMATOLOGIA – UEA/HEMOAM**



### ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº 05/2020

1  
2  
3 Ao vigésimo sexto dia do mês de junho do ano de 2020, às 9h00, realizou-se no auditório da  
4 Fundação Hemoam, Bloco A, 2º andar da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do  
5 Amazonas – HEMOAM, sito Av. Constantino Nery, 4397 – Chapada, a Defesa de Dissertação de  
6 Mestrado da discente **Fabiola Silva Alves** sob o título “**Frequência dos Polimorfismos nos Genes**  
7 **NLRP1, NLRP3, P2X7, IL1 $\beta$  e IL18 em Pacientes com Leucemia Linfoblástica Aguda e sua**  
8 **Influência no prognóstico Clínico**”, tendo como orientador o Prof. Dr. **Allyson Guimarães da**  
9 **Costa** e Coorientadora: Profª. **Dra. Adriana Malheiro Alle Marie**, segundo encaminhamento do  
10 Prof. Dr. Nelson Abrahim Fraiji, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências  
11 Aplicadas a Hematologia e de acordo com os registros constantes na Secretaria Geral da  
12 Universidade do Estado do Amazonas, a Banca julgadora foi composta pelos seguintes  
13 componentes, que deram o parecer final sobre a Defesa, tendo sido atribuído ao aluno o conceito  
14 discriminado no parecer da referida Comissão.

Membros	Parecer	Assinatura
Prof. Dr. Nelson Abrahim Fraiji - Presidente	Aprovado(a) ( ) Reprovado(a) ( )	Assinatura: CPF: 022561852-48
Profa. Dra. Jerusa Araújo Quintão Arantes Faria - UFAM	Aprovado(a) (X) Reprovado(a) ( )	Assinatura: CPF: 068507680-21
Prof. Dr. Gemilson Soares Pontes - INPA	Aprovado(a) ( ) Reprovado(a) ( )	Assinatura: CPF: 698128132-15

16  
17 O parecer final da Defesa de Dissertação foi :

18  
19  Aprovado

20  Não Aprovado

21  
22  
23  
24  
25  
  
\_\_\_\_\_  
Presidente da Banca Examinadora

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais por terem me ajudado a chegar até aqui,  
Edmilson e Rosangela.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre pensar em mim com carinho em tudo, pela oportunidade de viver tantos momentos bons e por colocar tantas pessoas de luz na minha vida. Obrigada, Pai!

Aos meus pais, Rosangela e Edmilson, vocês são a essência e o porquê de tudo que me tornei e o que almejo.

Ao meu noivo, Rafael, por todo carinho, paciência, compreensão e companheirismo durante essa jornada.

Aos meus irmãos, Thaís e Leandro, pela ajuda e apoio em todos os momentos de precisei de vocês.

Ao meu orientador, Allyson Guimarães, por acreditar em mim e me ensinar a ter amor pela pesquisa e nos incentivar a fazer sempre o nosso melhor. Por toda paciência, ensinamentos e amizade durante todos esses anos. Você é um espelho para todos nós, tenho orgulho de fazer parte da sua equipe! Obrigada!

À minha coorientadora, Dra. Adriana Malheiro, pelo apoio e colaboração para que esse projeto pudesse ser realizado e por sempre zelar por todos os integrantes do grupo de pesquisa.

À minha amiga, Lilyane Xabregas, em memória a todos momentos de alegria, tristeza e desespero que passamos juntas durante o mestrado (e não foram poucos). No final sempre dava tudo certo e nós ríamos. Obrigada por tornar a caminhada mais leve.

Ao meu amigo, Hiochelson Najibe, que sempre esteve pronto à ajudar e faz isso com toda dedicação. E mais que tudo, é um grande pesquisador e exemplo para todos os que iniciam nessa jornada.

À Gláucia Lima, Letícia Kiong e Daniele Sá, que tive a honra de auxiliar nos seus trabalhos. Vocês contribuíram muito para minha formação como pessoa e pesquisadora.

Aos demais colegas de pesquisa e membros da Trupe por compartilhar os bons e maus momentos e por partilhar momentos de alegria e seriedade.

À Dra. Mirian Santiago, por colaborar para a realização desse projeto por meio da disponibilização das amostras.

Aos colaboradores do Laboratório Genômica, em especial à Dra. Andréa e Dra. Nadja por todo o apoio oferecido para que os projetos sejam realizados com excelência.

À equipe do laboratório de marcadores celulares da Fundação HEMOAM, em especial, Dr. João Paulo, Dr. Lívio e Dra. Tatiana que desde a iniciação científica sempre me ajudaram com a obtenção de amostras dos pacientes.

À Dra. Aya Sadahiro, pela disponibilidade e dedicação em me instruir durante o estágio docência. Foram momentos de muito aprendizado no âmbito da docência. Além disso, agradeço a imensa contribuição científica durante o desenvolvimento do meu projeto de mestrado.

Ao Laboratório de Micobacteriologia do Instituto Nacional de Pesquisas na Amazônia (INPA), sob coordenação do Dr. Maurício, que me receberam com muita hospitalidade. Agradeço à Tânia e Maísa por todo suporte técnico.

Aos colaboradores do SAME e Rosa Blaya, por nos ajudarem com a logística de busca em prontuários, em especial dona Socorro, que sempre nos recebeu e prestou todo o apoio para que fossem coletadas todas as informações necessárias.

À Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), a qual considero minha segunda casa. Obrigada por fazer parte dessa família.

À Universidade do Estado do Amazonas (UEA) pela oportunidade de fazer parte do programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia e contribuir para a divulgação de pesquisa nessa área que muito há a ser explorada.

À Fundação de Amparo à Pesquisa no Amazonas (FAPEAM) pelo concedimento da bolsa e apoio financeiro para realização deste trabalho.

À todos os demais que contribuíram para a realização desse projeto. Muito obrigada!



## **DECLARAÇÃO DAS AGÊNCIAS FINANCIADORAS**

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por financiar indiretamente esta pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), responsável pelo pagamento da bolsa que colaborou para a realização deste estudo.

## EPÍGRAFE

*“Se você prefere a vida acadêmica como um retiro da realidade, não escolha a biologia. Essa área é pra um homem ou mulher que deseja ir ainda mais perto da vida”*

**Herman Muller**

## RESUMO

A desregulação da ativação do complexo inflamassoma pela presença de Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNP's) é apontada como um dos fatores promotores da atividade neoplásica na célula-tronco hematopoiética. Embora os SNPs envolvendo esses complexos estejam associados com a manifestação de doenças infecciosas e não infecciosas, a relação com a suscetibilidade ou prognóstico em pacientes com leucemia na Amazônia brasileira ainda é desconhecida. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi descrever a frequência dos polimorfismos nos genes *NLRP1* (rs12150220 e rs35865013), *NLRP3* (rs10750558 e rs10802502), *P2X7* (rs2230911 e rs3751143), *IL1 $\beta$*  (rs16944) e *IL18* (rs187238) em pacientes com leucemia linfoblástica aguda e sua influência no prognóstico clínico. Foi realizado um estudo caso-controle com 158 pacientes com LLA e 192 indivíduos controles oriundos de uma região da Amazônia Brasileira, o Estado do Amazonas. Os polimorfismos genéticos nos genes *IL1 $\beta$*  e *IL18* foram genotipados a partir da análise de reação em cadeia da polimerase-polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (PCR-RFLP). Enquanto os polimorfismos nos genes *NLRP1*, *NLRP3* e *P2X7* foram genotipados por meio de PCR Quantitativa em Tempo real (qPCR). O genótipo *IL1 $\beta$*  C/T rs16944 foi associado com o risco de desenvolvimento de LLA (C/C vs. C/T + T/T OR: 2.48 [IC 95%: 1,26 – 4,88,  $p=0,006$ ]; C.C vs C/T OR: 2.74 [IC 95%: 1.37-5.51,  $p=0,003$ ]). Os genótipos *P2X7* A/C rs3751143 (OR: 2.30 [IC 95%: 1.05-5.03,  $p=0,036$ ]) e *NLRP3* G/G rs10754558 (OR: 7.44 [IC 95%: 1.44 – 38.26,  $p=0,016$ ]) foram associados com o risco de comorbidades infecciosas enquanto que, *NLRP1* A/T rs12150220 (OR: 0.37 [IC 95%: 0.16 – 0.87,  $p=0,023$ ]) foi associado com a proteção contra comorbidades. Além disso, foi descrita a associação do genótipo *NLRP1* A/G rs35865013 (OR: 2.72 [IC 95%: 1.07 – 6.90,  $p=0,034$ ]) com o risco de recaída após o tratamento em pacientes com LLA. A variante *IL1 $\beta$*  rs16944 parece predispor os indivíduos da região da Amazônia brasileira a LLA. Além disso, SNPs do inflamassoma estão associados com a presença de comorbidades infecciosas e episódios de recaída ao longo do tratamento em indivíduos com leucemia linfoblástica aguda.

**Palavras-chave:** leucemia linfoblástica aguda, imunidade inata, receptores do tipo NOD

## **ABSTRACT**

The dysregulation of the activation of the inflammasome complex by the presence of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) is pointed out as one of the factors that promote neoplastic activity in the hematopoietic stem cell. Although the SNPs involving these complexes are associated with the manifestation of infectious and non-infectious diseases, the relationship with susceptibility or prognosis in leukemia patients in the Brazilian Amazon is still unknown. Thus, the aim of this study was to describe the frequency of polymorphisms in the NLRP1 (rs12150220 and rs35865013), NLRP3 (rs10750558 and rs10802502) genes, P2X7 (rs2230911 and rs3751143), IL1 $\beta$  (rs16944) and IL18 (rs187238) and its influence on clinical prognosis. A case-control study was carried out with 158 patients with ALL and 192 control individuals from a region of the Brazilian Amazon, the State of Amazonas. The genetic polymorphisms in the IL1 $\beta$  and IL18 genes were genotyped from the restriction fragment length polymerase-polymorphism chain reaction (PCR-RFLP). While the polymorphisms in the NLRP1, NLRP3 and P2X7 genes were genotyped using Real Time Quantitative PCR (qPCR). The IL1 $\beta$  C/T rs16944 genotype was associated with the risk of ALL development (C/C vs. C/T + T/T OR: 2.48 [95% CI: 1.26 - 4.88, p = 0.006]; CC vs C/T OR: 2.74 [95% CI: 1.37-5.51, p = 0.003]). The genotypes P2X7 A/C rs3751143 (OR: 2.30 [95% CI: 1.05-5.03, p= 0.036]) and NLRP3 G/G rs10754558 (OR: 7.44 [95% CI: 1.44 - 38.26, p = 0.016]) were associated with the risk of infectious comorbidities whereas, NLRP1 A/T rs12150220 (OR: 0.37 [95% CI: 0.16 - 0.87, p = 0.023]) was associated with protection against comorbidities. In addition, the association of the genotype NLRP1 A/G rs35865013 (OR: 2.72 [95% CI: 1.07 - 6.90, p = 0.034]) with the risk of relapse after treatment in ALL patients has been described. The variant IL1 $\beta$  rs16944 seems to predispose individuals from the Brazilian Amazon region to ALL. In addition, inflammasome SNPs are

associated with the presence of infectious comorbidities and relapse episodes throughout treatment in individuals with acute lymphoblastic leukemia.

**Keywords:** acute lymphoblastic leukemia, innate immune, NOD-like receptors

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Aspecto microscópico do sangue visto por John Hughes Bennet. ...	19
<b>Figura 2.</b> Taxa nacionais estimadas da incidência de casos para leucemia para ambos os sexos. ....	22
<b>Figura 3.</b> Comparação das hipóteses de Kinlen e Greaves.....	27
<b>Figura 4.</b> Modelo de seleção de células pré-leucêmicas por estresse proliferativo a partir de uma infecção. ....	28
<b>Figura 5.</b> Localização celular dos receptores de reconhecimento padrão do sistema imune inato. ....	30
<b>Figura 6.</b> Representação dos componentes dos inflamassomas, demonstrando a organização estrutural dos seus domínios. ....	32
<b>Figura 7.</b> Estrutura dos domínios proteicos das diferentes isoformas de NLRP1. ....	34
<b>Figura 8.</b> Mecanismos de ativação do inflamassoma NLRP3 canônico e não-canônico.....	36
<b>Figura 9.</b> Representação esquemática da sinalização purinérgica e vias extracelulares de metabolização de nucleotídeos.....	38
<b>Figura 10.</b> Fluxograma de trabalho.....	44
<b>Figura 11.</b> Eletroforese em gel de agarose para o polimorfismo no gene <i>IL1<math>\beta</math></i> rs16944 (T/T - 304 bp), (C/C -190pb), (C/T- 304/190/114 bp).....	107
<b>Figura 12.</b> Eletroforese em gel de agarose para o polimorfismo no gene <i>IL18</i> rs187238 (C/C: -155 pb), (G/G: -116 pb) e (G/C: -155/116/39).....	108

**Figura 13.** Curva de amplificação gerada para o polimorfismo no gene *P2X7* rs2230911. **A** – Curvas de amplificação de 96 amostras. **B** - Homozigoto selvagem (CC). **C** – Homozigoto polimórfico (GG). **D** – Heterozigoto (CG)... 108

**Figura 14.** Curva de amplificação gerada para o polimorfismo no gene *P2X7* rs3751143. **A** – Curvas de amplificação de 96 amostras. **B** - Homozigoto selvagem (AA). **C** – Homozigoto polimórfico (CC). **D** – Heterozigoto (AC). ... 109

**Figura 15.** Curva de amplificação gerada para o polimorfismo no gene *NLRP1* rs12150220. **A** – Curvas de amplificação de 96 amostras. **B** - Homozigoto selvagem (AA). **C** – Homozigoto polimórfico (TT). **D** – Heterozigoto (AT). .... 109

**Figura 16.** Curva de amplificação gerada para o polimorfismo no gene *NLRP1* rs35865013. **A** – Curvas de amplificação de 96 amostras. **B** - Homozigoto selvagem (AA). **C** – Heterozigoto (AG). ..... 110

**Figura 17.** Curva de amplificação gerada para o polimorfismo no gene *NLRP3* rs10754558. **A** – Curvas de amplificação de 96 amostras. **B** - Homozigoto selvagem (CC). **C** – Homozigoto polimórfico (GG). **D** - Heterozigoto (CG).... 110

**Figura 18.** Curva de amplificação gerada para o polimorfismo no gene *NLRP3* rs10805502. **A** – Curvas de amplificação de 96 amostras. **B** - Homozigoto selvagem (CC). **C** – Homozigoto polimórfico (TT). **D** - Heterozigoto (CT)..... 111

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Classificação da leucemia linfoblástica aguda de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS).....	21
<b>Tabela 2.</b> Variantes dos genes <i>NLRP1</i> , <i>NLRP3</i> , <i>P2X7</i> , <i>IL18</i> e <i>IL1<math>\beta</math></i> em estudo associadas a doenças em humanos. ....	40
<b>Tabela 3.</b> Descrição dos polimorfismos, localização do genoma, temperaturas de hibridação, enzimas de restrição e fragmentos gerados durante os ensaios. ....	48
<b>Tabela 4.</b> Tamanho dos fragmentos e concentração dos géis de agarose dos polimorfismos em estudo.....	48
<b>Tabela 5.</b> Descrição dos genes, referência dos SNPs, localização e kit de ensaio para genotipagem. ....	50



## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA

AIM2	Proteína AIM2 induzida por interferon
ASC	Proteína do tipo speck contendo CARD associada à apoptose
ATP	Adenosina trifosfato
BCR-ABL1	Transcrito gênico formado pela fusão dos genes <i>bcr</i> e <i>abl</i>
CARD	Domínio de recrutamento e ativação de Caspase
CARD8	Domínio de recrutamento da caspase membro da família 8
CARDINAL	Ligante ativado pelo inibidor CARD de NF- $\kappa$ B
cDNA	DNA complementar
CLR	Família lectina do tipo C
DAMPs	Padrões moleculares associados ao dano
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Deoxinucleotídeo trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ETV6-RUNX1	Transcrito gênico formado pela fusão dos genes <i>etv6</i> e <i>runx1</i>
FIIND	<i>Function-to-find domain</i>
HEMOAM	Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas
HIN200	Antígeno nuclear com 200 repetições de aminoácidos induzido por interferon hematopoiético
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA	Antígeno leucocitário humano
iAMP21	Amplificação intracromossomial do cromossomo 21
IC	Intervalo de Confiança
IFN	Interferon
IFN- $\gamma$	Interferon-gama
IL	Interleucina
IL3-IGH	Transcrito gênico formado pela fusão dos genes <i>il3</i> e <i>igh</i>
IRAK1	Quinase associada ao receptor de interleucina-1
IKAK2	Quinase associada ao receptor de interleucina-2
Kb	Kilo Base
kDa	Kilodalton
KMT2A	Gene que codifica metiltransferase lisina 2A
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
LLC	Leucemia linfoblástica crônica
LMA	Leucemia mielóide aguda
LMC	Leucemia mielóide crônica
LPS	Lipopolissacarídeo
MDP	Muramil-dipeptídeo
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
MO	Medula óssea
NACHT	Domínio inibitório de apoptose neural
NF- $\kappa$ B	Fator nuclear kappa B
NK	Células assassinas naturais
NLR	Receptor do tipo NOD

NLRC4	Domínio CARD da família NLR contendo a proteína do tipo 4
NLRP1	Receptores do tipo NOD, domínio pirina contendo a proteína 1
NLRP3	Receptores do tipo NOD, domínio pirina contendo a proteína 3
NOD	Domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeos
OR	Oddis Ratio
PAMPs	Padrões Moleculares Associados aos Patógenos
Pb	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PYD	Domínio pirina
PYHIN	Domínio contendo as proteínas Pirina e HIN
PRRs	Receptores de Reconhecimento Padrão
RFLP	Reação de polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição
RIG	Receptores do tipo RIG
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SNC	Sistema nervosa central
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
SP	Sangue periférico
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCF3-PBX1	Transcrito gênico formado pela fusão dos genes <i>tcf3</i> e <i>pbx1</i>
Th1	Células T <i>helper</i> (CD4 <sup>+</sup> ) polarizadas para o perfil 1
Th2	Células T <i>helper</i> (CD4 <sup>+</sup> ) polarizadas para o perfil 2
TLR	Receptor do Tipo Toll
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral-alfa
TRIF	Adaptador contendo TIR induzindo IFN- $\beta$
TP53	Proteína tumoral 53
TUCAN	Anatagonista da caspase 9 contendo CARD regulado pelo tumor
WHO	Organização Mundial da Saúde
$\mu$ L	Microlitro

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>18</b>
1.1 História da leucemia.....	18
1.2 Leucemias.....	19
1.2.1 Leucemia linfóide aguda (LLA) .....	20
1.2.2 Classificação.....	21
1.2.3 Epidemiologia .....	22
1.2.4 Etiologia.....	23
1.2.5 Tratamento .....	24
1.3 Fisiopatogenia da leucemia.....	25
1.4 O sistema imunológico e o desenvolvimento da leucemia .....	25
1.4.1 Imunidade inata .....	29
1.4.2 Inflamassomas.....	31
1.4.3 Inflamassoma NLRP1 .....	33
1.4.4 Inflamassoma NLRP3.....	35
1.4.5 P2X7 .....	37
1.4.6 Citocinas IL-1 $\beta$ e IL-18.....	38
1.5 Papel dos inflamassomas no câncer.....	39
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>42</b>
2.1 Objetivo geral .....	42
2.2 Objetivos específicos .....	42
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>43</b>
3.1 Aspectos éticos .....	43
3.2 Modelo de estudo.....	43
3.3 Fluxograma de trabalho .....	44
3.4 População do estudo.....	44
3.5 Coleta das amostras .....	45
3.6 Critérios de elegibilidade .....	45
3.6.1 Critérios de inclusão .....	45
3.6.2 Critérios de não inclusão .....	46
3.6.3 Critérios de exclusão .....	46

3.7	Extração e quantificação do DNA .....	46
3.8	Genotipagem dos Polimorfismos dos Genes das citocinas IL-1 $\beta$ e IL-18 através de PCR-RFLP .....	47
3.9	Eletroforese .....	48
3.10	Genotipagem por PCR Quantitativa em Tempo Real (qPCR) – Ensaio Taqman.....	49
3.11	Obtenção de dados sociodemográficos, laboratoriais e clínicos .....	50
3.12	Análise estatística .....	51
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>52</b>
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>78</b>
<b>6.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>78</b>
<b>7.</b>	<b>APÊNDICE .....</b>	<b>92</b>
7.1	Apêndice 01. Equipe do projeto .....	92
7.2	Apêndice 02. Financiamento do projeto .....	93
7.3	Apêndice 03. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa - CEP-HEMOAM.....	94
7.3.1	Amostras Grupo Controle (CAAE:49652815.8.0000.0009) e (CAAE:0024.0.112.000-10).....	94
7.3.2	Amostras Grupo Caso (CAAE: 12615918.9.0000.0009) .....	99
7.4	Apêndice 04. Protocolos PCR-RFLP.....	103
7.4.1	IL-1 $\beta$ .....	103
7.4.2	IL-18 .....	104
7.4.3	Gel de agarose para <i>IL1<math>\beta</math></i> e <i>IL18</i> .....	105
7.5	Apêndice 05. Protocolos qPCR.....	106
7.5.1	P2X7, NLRP1 e NLRP3.....	106
7.6	Apêndice 06: Géis de eletroforese para os polimorfismos envolvendo <i>IL1<math>\beta</math></i> e <i>IL18</i> .....	107
7.7	Apêndice 07: Gráficos de discriminação alélica dos polimorfismos nos genes <i>P2X7</i> , <i>NLRP1</i> e <i>NLRP3</i> . .....	108
<b>8.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>111</b>
8.1	Resumos publicados em anais de eventos 2018-2020.....	111
8.2	Artigos completos publicados em periódicos 2018-2020 .....	114
8.3	Manuscrito submetido como Primeiro Autor.....	114

## 1. INTRODUÇÃO

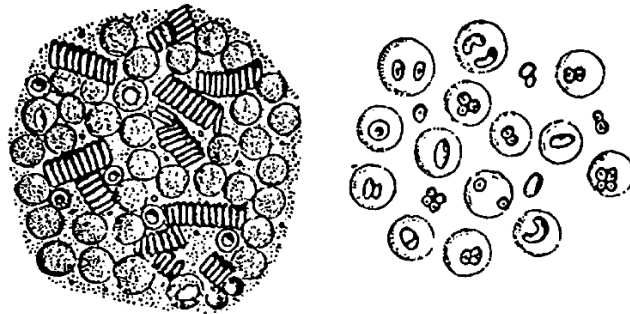
### 1.1 História da leucemia

No início do século XIX, na Europa, foram observadas alterações incomuns no sangue de diversos pacientes que evoluíam com rapidez ao óbito. O médico francês Alfred Velpeau, em 1827, descreveu o caso de uma senhora de 63 anos, que desenvolveu uma condição patológica caracterizada pelo aumento do volume do fígado e baço, além de fraqueza. Na autópsia, Velpeau descreveu o aspecto do sangue como “grosso como um mingau, de modo que não poderia se perguntar se não era um pus louvável do quê sangue”<sup>(1)</sup>. Em 1839, Alfred Donné, em Paris, ao analisar uma amostra de sangue de um paciente sob a mesma condição, notou que o excesso de glóbulos brancos se assemelhava a material purulento ou pus associado na época à inflamação local<sup>(2,3)</sup>.

Posteriormente, Donné relatou muito mais sobre a leucemia: “Existem condições em que as células brancas parecem estar em excesso no sangue. Eu encontrei este fato tantas vezes, é tão evidente em certos pacientes, que eu não posso conceber a menor dúvida a este respeito [...] O sangue desse paciente mostrou um número tão grande de células brancas que eu pensei que seu sangue estava misturado com pus”. Desta forma, até meados do século XIX, a ideia de pus e inflamação perdurou sem compreensão científica<sup>(3)</sup>.

Em 1845, o médico patologista, John Hughes Bennet, na Escócia, a partir do uso da microscopia clínica, observou que a alteração do sangue era independente da inflamação e que a transformação ocorria em todo o sistema sanguíneo, descrevendo assim pela primeira vez a leucemia como uma doença relacionada ao sangue de forma completa e científica. Na análise, ele observou grande quantidade de glóbulos brancos e diversidade morfológica (Figura 1), sendo as primeiras imagens de células do sangue de um paciente com leucemia<sup>(4,5)</sup>.

**Figura 1.** Aspecto microscópico do sangue visto por John Hughes Bennet.



(left) Fresh blood x 250 diameters  
(right) The same after addition of acetic acid

Fonte: Piller (2001)

Após seis semanas, o médico patologista Rudolf Virchow, em Berlim, ao analisar uma amostra de sangue no microscópio, observou baixa quantidade de glóbulos vermelhos em relação aos brancos, especificando outra vez, que o excesso de células não se tratava de secreção purulenta mas originária do sangue <sup>(6)</sup>.

Em 1847, Virchow publicou um segundo caso e pela primeira vez usou o termo “*leukemia*” do grego “*leukos*” =branco e “*heima*” = sangue que significa “sangue branco” referindo-se ao aumento de glóbulos brancos no sangue <sup>(7)</sup>. Em 1872, Ernst Neumann ao realizar a autópsia de um paciente que morreu com leucemia, observou que a cor vermelha de aspecto normal da medula óssea transformara-se em “verde-amarelo sujo”, apontando assim que algo anormal na medula óssea era responsável pela doença<sup>(8)</sup>. No ano de 1850, o médico Henry Fuller, em Londres, descreveu o primeiro caso de leucemia infantil <sup>(5)</sup>.

## 1.2 Leucemias

As leucemias são um grupo heterogêneo de neoplasias caracterizadas pelo comprometimento funcional de uma célula-tronco hematopoiética, distinguindo-se pela linhagem celular acometida, aspectos clínicos, prognóstico

e resposta a terapia, sendo assim classificadas em: leucemia mielóide aguda (LMA), leucemia mielóide crônica (LMC), leucemia linfoblástica aguda (LLA) e leucemia linfoblástica crônica (LLC)<sup>(9,10)</sup>.

No mundo todo, as leucemias representam a décima causa de morte por câncer, sendo a LLA o tipo de câncer mais comum na infância com 80% dos casos.<sup>(11,12)</sup>

### **1.2.1 Leucemia linfóide aguda (LLA)**

Leucemia linfoblástica aguda (LLA) é uma neoplasia que acomete a célula-tronco hematopoiética sendo caracterizada pela proliferação clonal de linfoblastos na medula óssea. Desta forma, o acúmulo de progenitores linfóides imaturos é responsável pelo comprometimento da produção de outras linhagens celulares, além de envolver o sangue periférico (SP) e órgãos como fígado e baço<sup>(13)</sup>.

A LLA é considerada o tipo de câncer mais comum em crianças e adolescentes, correspondendo a 1 de cada 3 casos <sup>(14)</sup>. Embora, afete todos os grupos etários, apresenta maior incidência em crianças entre 2 e 3 anos de idade de cor branca. No geral, mais de 80% dos casos ocorrem antes dos 15 anos, sendo predominante no sexo masculino, principalmente após o primeiro ano de vida<sup>(15,16)</sup>.

As manifestações clínicas da LLA derivam do acúmulo de clones leucêmicos na medula óssea e em outros órgãos que comprometem a produção de hemácias, leucócitos e plaquetas caracterizando assim, os primeiros sintomas da doença, descritos como fraqueza, anemia, infecções e hemorragias <sup>(13)</sup>.

## 1.2.2 Classificação

A LLA pode ser classificada de acordo com a linhagem celular envolvida (B ou T) e proliferação/maturação celular (aguda ou crônica), além de alterações genéticas e/ou moleculares. Em 1976, foi realizada a primeira classificação da LLA baseada em critérios morfológicos (tamanho celular, citoplasma, nucléolos, vacuolização e basofilia) pelo grupo Britânico-Americano-Francês (FAB) em L1, L2 ou L3<sup>(17)</sup>.

Ao longo dos anos, a Organização Mundial da Saúde (OMS) tem aperfeiçoado essa classificação inserindo o perfil citogenético dos blastos leucêmicos em 1997<sup>(18)</sup> e anormalidades genéticas recorrentes em 2008<sup>(19)</sup>.

De acordo com a última atualização da OMS de 2016, a LLA recebeu duas novas entidades à lista de anormalidades genéticas recorrentes e o termo “hipodiploide” foi classificado como hipodiploide baixo ou hipodiploide com mutações *TP53*, conforme observado na Tabela 1<sup>(20)</sup>.

**Tabela 1.** Classificação da leucemia linfoblástica aguda de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS).

<b>Classificação da OMS para leucemia linfoblástica aguda</b>
<b>Linfoma/Leucemia linfoblástica-B</b>
Linfoma/Leucemia linfoblástica-B, não especificado
Linfoma/Leucemia linfoblástica-B com anormalidades genéticas recorrentes
Linfoma/Leucemia linfoblástica-B com t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i>
Linfoma/Leucemia linfoblástica-B com t(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> rearranjado
Linfoma/Leucemia linfoblástica-B com t(12;21)(p13.2;q22.1); <i>ETV6-RUNX1</i>
Linfoma/Leucemia linfoblástica-B com hiperdiploidia
Linfoma/Leucemia linfoblástica-B com hipodiploidia
Linfoma/Leucemia linfoblástica-B com t(5;14)(q31.1;q32.3) <i>IL3-IGH</i>
Linfoma/Leucemia linfoblástica-B com t(1;19)(q23;p13.3); <i>TCF3-PBX1</i>
<i>Entidade provisória: Linfoma/Leucemia linfoblástica-B, BCR-ABL1-like</i>
<i>Entidade provisória: Linfoma/Leucemia linfoblástica-B com iAMP21</i>
<b>Linfoma/Leucemia linfoblástica-T</b>
<i>Entidade provisória: Leucemia linfoblástica precursor de células T</i>
<i>Entidade provisória: Linfoma/Leucemia linfoblástica de células NK</i>

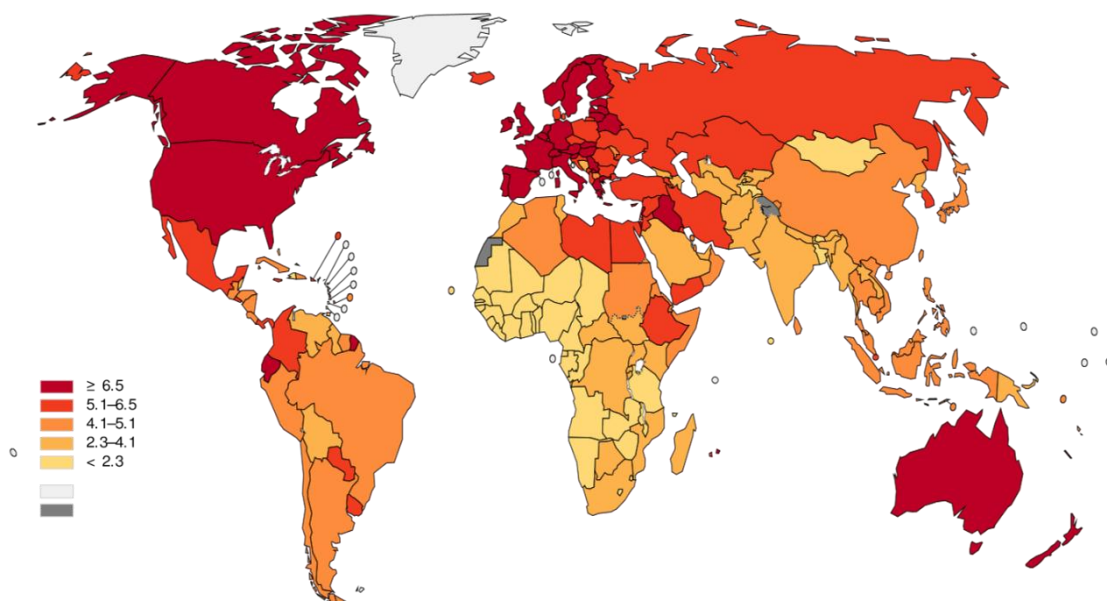
Fonte: Adaptado de Arber (2016)



### 1.2.3 Epidemiologia

No contexto mundial, a LLA é a neoplasia com mais ocorrência de casos em crianças ocupando a 10ª posição entre os tipos de câncer mais incidentes, seguida dos tumores no sistema nervoso central (SNC) e linfomas<sup>(21-24)</sup>. Entre 2005 a 2015, foi observado um aumento de 31,6% na taxa de mortalidade mundial da leucemia <sup>(25)</sup>. Atualmente, os países desenvolvidos da Oceania, América do Norte e Europa apresentam a maior taxa de incidência de LLA (40-50 casos/milhão de habitantes)<sup>(11,26)</sup>. Todavia, o alvo da maioria dos estudos são os países em desenvolvimento devido à existência de elevada taxa de subnotificação e erros no diagnóstico (1-40 casos/milhão de habitantes) (Figura 2)<sup>(26-28)</sup>.

**Figura 2.** Taxa nacionais estimadas da incidência de casos para leucemia para ambos os sexos.



Fonte: Miranda-Filho et al., (2018)

No Brasil, o número de casos de leucemia entre regiões do país é variável e está aumentando, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA) <sup>(27,29,30)</sup>. Para cada ano do triênio 2020-2022, são estimados 5.920 casos

novos de leucemia em homens e 4.890 em mulheres. Isto equivale a um risco estimado de 5,67 casos novos/100 mil homens e 4,56 casos novos/100 mil mulheres <sup>(31)</sup>.

Além disso, sem considerar os tumores de pele não melanoma, a leucemia em homens é a quinta mais frequente na Região Norte (4,45/100 mil) e em mulheres ocupa a sexta posição (3,29/100 mil)<sup>(31)</sup>. Em estudos anteriores, observou-se um aumento de 2% a 3% ao ano da taxa de mortalidade por leucemia em crianças das regiões Norte e Nordeste entre o período de 1979 a 2008 <sup>(28,32)</sup>. Manaus apresentou um dos maiores índices de ocorrência de LLA do país, de acordo com os registros de câncer de base populacional (RCBP) no ano de 2008 <sup>(33)</sup>. Já no ano de 2011, Manaus, foi identificada novamente como uma das capitais brasileiras com maior incidência de casos, como uma taxa de 76,8 casos por milhão de habitantes (34), havendo em 2016 um aumento para 87,1 casos <sup>(35)</sup>. A falta de vigilância epidemiológica e o acesso ao diagnóstico são os principais problemas enfrentados pelo Estado do Amazonas e contribuem para a subnotificação de casos <sup>(36)</sup>.

Em um estudo realizado por Silva-Júnior et al., (2019) no Estado do Amazonas entre os anos de 2005-2015 demonstrou que a maioria dos pacientes com LLA atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM) eram do sexo masculino e pertenciam à faixa etária <10 anos de idade. Pacientes na faixa etária 11-20 anos apresentaram duas vezes mais chance de ir à óbito, enquanto que aqueles entre 41-50 anos observou-se um risco de trinta e uma vezes mais. Além disso, ao avaliar o número de casos por município, as cidades de Tefé e Maués destacaram-se nesse estudo (11 e 10 casos por ano, respectivamente) <sup>(37)</sup>.

#### **1.2.4 Etiologia**

A LLA é uma doença multifatorial desencadeada pela interação de fatores genéticos e ambientais. Entretanto, menos de 10% dos casos são

atribuídos à hereditariedade <sup>(38,39)</sup>. No geral, estima-se que fatores ambientais, dietéticos, infecções e alergias exerçam influência na etiologia da doença <sup>(40,41)</sup>.

De acordo com um estudo realizado na China, crianças concebidas por tratamento de fertilidade tem um risco maior de desenvolver leucemia e tumores hepáticos <sup>(42)</sup>. Além disso, o uso de pesticidas no lar <sup>(41)</sup>, alto peso ao nascer <sup>(43)</sup>, poluição ambiental <sup>(44)</sup>, exposição materna à tinta caseira e fumo durante a gravidez <sup>(45-47)</sup>, síndrome de Down e histórico familiar de leucemia e tumores no cérebro são fatores associados ao risco de desenvolvimento da LLA <sup>(48)</sup>.

Atualmente, a hipótese de que a presença de clones pré-leucêmicos com alterações genéticas antes do nascimento (Ex: *MLL/AFFI*, *MLLT3* e *ETV-RUNX*) seguida da aquisição de novas mutações influencie na manifestação da LLA, é considerada a hipótese mais aceita na comunidade científica <sup>(49-52)</sup>. Estudos relatam ainda que mutações pré-existentes no gene *PAX5* (presente em 30-35% dos casos de LLA) seguido de infecções por patógenos comuns podem desencadear a LLA na infância <sup>(53,54)</sup>.

### 1.2.5 Tratamento

A principal fase do tratamento da LLA, denominada indução à remissão, tem como objetivo a obtenção do estado de remissão completa (RC) determinado por <5% de blastos e >25% de celularidade na medula óssea. Todavia, embora 90% dos pacientes alcancem a RC, 1/5 recaem devido a presença de células residuais também conhecidas como doença residual mínima (DRM), não detectadas por exames convencionais <sup>(55)</sup>. Dessa forma, é realizado o monitoramento da DRM como fator prognóstico, visto que, dependendo da quantidade encontrada é possível estratificar pacientes com alto e baixo risco de recaída pós-indução e melhorar a sobrevida <sup>(56)</sup>.

Além disso, à intensidade do uso de quimioterápicos utilizados nessa fase produz supressão do sistema imunológico, principalmente da série neutrofílica, tornando o paciente suscetível a infecções e comprometendo o

tratamento contínuo, favorecendo assim o risco de recaída. No geral, as infecções caracterizam uma maior gravidade da doença, tempo de hospitalização e mortalidade nos pacientes com LLA <sup>(57)</sup>.

### 1.3 Fisiopatogenia da leucemia

Muitos tumores expressam genes cujos produtos são necessários para a transformação e manutenção do fenótipo maligno produzidos por meio de mutações pontuais, deleções, translocações cromossômicas (Ex: *MLL-AF4*, *PAX5*, *TEL-AML1*) ou inserções de genes virais. Os produtos dos genes mutados na maioria das vezes são fatores de transcrição e possuem a capacidade de interagir com o DNA e outras proteínas nos processos maturativos celulares, regulando a expressão de proto-oncogenes e genes supressores de tumores de forma positiva ou negativa <sup>(58,59)</sup>.

Evidências emergentes indicam que a inflamação desempenha um papel importante em todos os estágios do desenvolvimento do câncer, incluindo iniciação, crescimento, invasão e metástase. Como parte do sistema de vigilância imunológica, várias vias imunes inatas interagem com componentes celulares liberados por células tumorais mortas devido à hipóxia, quimioterapia, dentre outros <sup>(60)</sup>.

As células imunes inatas ativadas por essas oncoproteínas podem induzir imunidade antitumoral por meio do recrutamento de células efetoras ou promover o desenvolvimento neoplásico através da interação com redes transcricionais que regulam a hematopoese, proporcionando um ambiente pró-inflamatório suscetível à transformação maligna. <sup>(60,61)</sup>.

### 1.4 O sistema imunológico e o desenvolvimento da leucemia

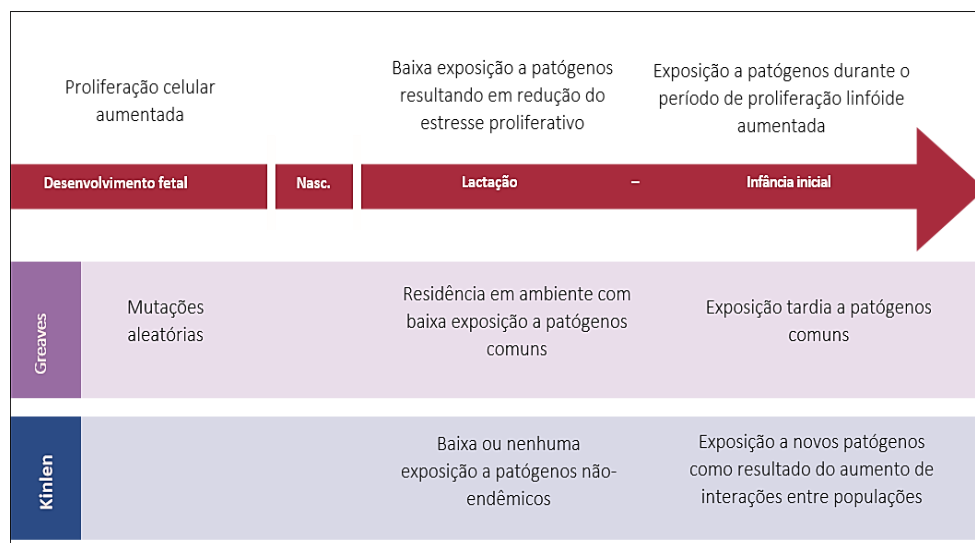
O sistema imunológico é constituído por uma complexa rede de células e moléculas responsáveis por reconhecer determinadas estruturas moleculares e desenvolver uma resposta efetora provocando destruição e inativação de

microrganismos ou danos. A desregulação do sistema imunológico pode estar associada ao desenvolvimento ou agravamento de doenças não infecciosas como, por exemplo, a leucemia. Neste caso, a resposta anormal frente a infecções comuns é um fatores que explicam a manifestação da doença <sup>(62)</sup>.

A ideia de que a exposição a infecções e o desenvolvimento do sistema imunológico pode influenciar na etiologia da LLA originou-se em 1988, a partir das hipóteses de Leo Kinlen e Mel Greaves. Kinlen descreve que a interação entre populações era responsável pelo aumento da taxa de leucemia em crianças após o influxo de imigrantes para uma área rural, sugerindo assim, uma epidemia localizada de uma infecção a partir do contato com pessoas infectadas <sup>(63,64)</sup>. Isto sugere um papel patológico direto de uma infecção específica, supostamente viral, no desenvolvimento da LLA. Vários estudos demonstraram evidências apoiando a hipótese, todavia, atualmente há evidências moleculares limitadas indicando uma infecção específica <sup>(65-69)</sup>.

Em contrapartida, a hipótese de Greaves sugere um modelo baseado no tempo de exposição e na estimulação do sistema imunológico da criança <sup>(70,71)</sup>. Uma mutação genética produzida no útero, originaria um clone pré-leucêmico e a partir da baixa estimulação do sistema imunológico ao nascer frente a infecções, produziria uma segunda infecção tardia, que seria responsável pelo estresse nesse sistema e aumentando as chances de desenvolver LLA. Atualmente, a literatura descreve que a falta de estimulação imunológica na primeira infância, seguida de resposta exacerbada a patógenos comuns pode influenciar no desenvolvimento de LLA em crianças que possuem clones pré-leucêmicos, como mutações nos genes *PAX5* e *ETV-RUNX* (Figura 3) <sup>(62,72)</sup>.

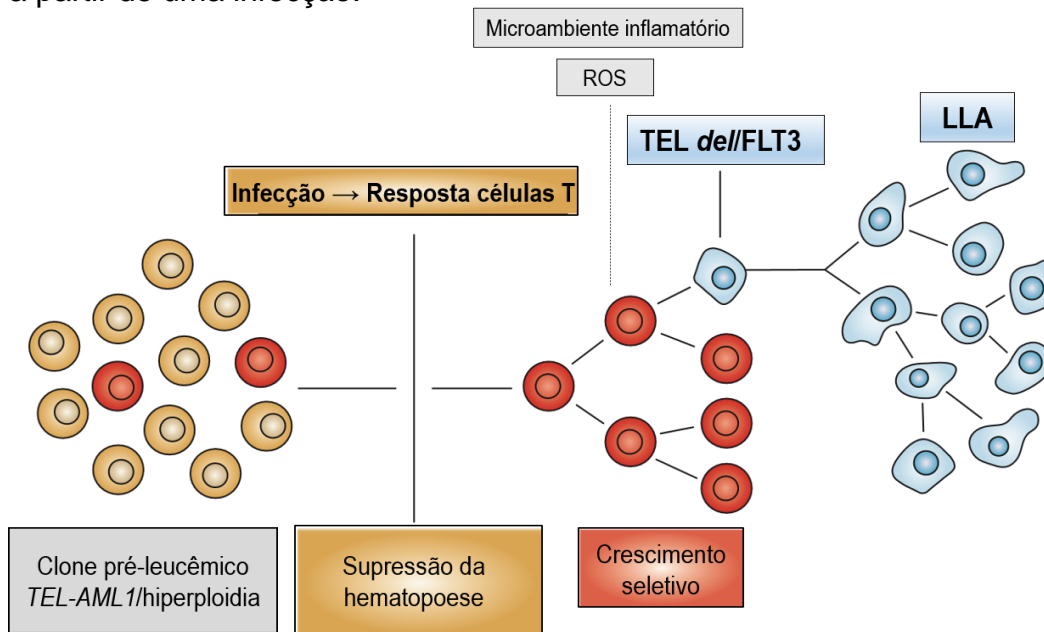
**Figura 3.** Comparação das hipóteses de Kinlen e Greaves.



Fonte: Adaptado de Pui et al., (2008)

Desta forma, as hipóteses apontam que a LLA se origina a partir da resposta à uma ou mais infecções ganha mais evidência ao acrescentar mecanismos celulares e bioquímicos. Um exemplo seria a resposta de células T desregulada numa infecção que resultaria numa potente resposta inflamatória, com liberação de quimiocinas e citocinas que, pelo menos transitoriamente, suprime a hematopoiese e/ou induz a apoptose. Neste contexto, o clone pré-leucêmico teria uma vantagem distinta de sobrevivência e/ou proliferativa. Posteriormente, a expansão dessas células resultaria em mutações secundárias espontaneamente ou através da influência de um meio inflamatório e pela ação de radicais livres (ROS) que facilitariam o surgimento de células leucêmicas evidentes, como mostrado na Figura 4 <sup>(71)</sup>. O processo inflamatório pode ser desencadeado por diversos mecanismos imunológicos, dentre eles, a ativação da via interferon, dos *Toll like-receptors* (TLRs) e a formação de inflamassomas a partir da ativação de receptores do tipo NOD da imunidade inata <sup>(73)</sup>.

**Figura 4.** Modelo de seleção de células pré-leucêmicas por estresse proliferativo a partir de uma infecção.



Fonte: Adaptado de Greaves et al., (2006)

Além disso, outro fator que deve ser levado em consideração no desenvolvimento da leucemia é o comprometimento da vigilância imunológica. Os *checkpoints* imunes desempenham um papel importante equilibrando de maneira ideal os sinais estimuladores e inibitórios que medeiam a resposta de células T. Sob condições fisiológicas normais, os *checkpoints* imunes regulam a auto tolerância a fim de proteger os tecidos contra danos e limitam a resposta do sistema imunológico à infecção <sup>(74)</sup>.

O equilíbrio da resposta imunológica é regulado pela ação de moléculas inibitórias e seus ligantes, no entanto, diversos tipos de cânceres conseguem escapar dessa vigilância. As duas principais vias de bloqueio de *checkpoints* imune são o antígeno linfocitário T citotóxico (CTLA-4) e via de morte celular programada. A via de morte celular programada é composta pela proteína PD-1 e seus ligantes PD-L1 e PD-L2. Embora a maioria estudos clínicos de bloqueio de PD-1 e CTLA-4 com anticorpos monoclonais sejam direcionados a tumores e linfomas, PD-1 e CTLA-4 também desempenham um papel importante na leucemia <sup>(75)</sup>.

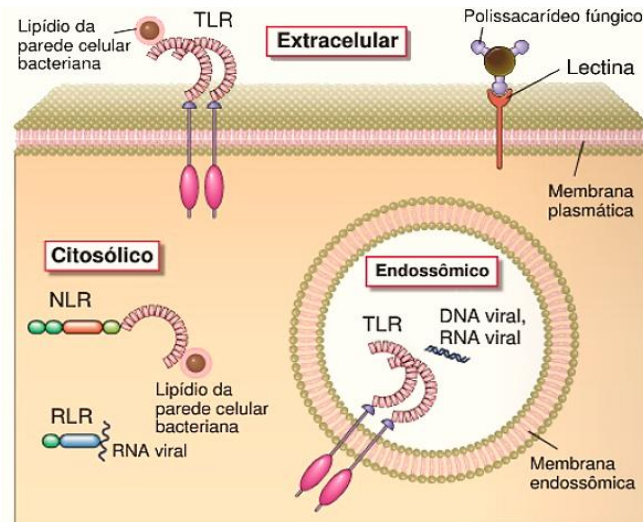
O bloqueio de *checkpoint* imune pode influenciar na ocorrência de neoplasias hematológicas, uma vez que, em contraste com os tumores sólidos as células leucêmicas expressam vários inibidores de *checkpoints* bem como ligantes. Isso acontece porque o tumor muitas vezes compromete a resposta imunológica do hospedeiro. Devido à alta carga tumoral e proliferação acelerada na leucemia aguda, a doença pode se desenvolver antes dos anticorpos de *checkpoints*. Portanto, quando há a presença de doença residual mínima em um sistema imunológico competente, a aplicação de inibidores de *checkpoints* pode alcançar resultados mais eficazes. Atualmente, diversos estudos clínicos estão em andamento a fim de utilizarem anticorpos de *checkpoints* em combinação com esquemas quimioterápicos para tratar pacientes com leucemia recém diagnosticados e recorrentes <sup>(75)</sup>.

#### **1.4.1 Imunidade inata**

A imunidade inata é o primeiro mecanismo de defesa do hospedeiro humano, caracterizada pela ativação de receptores de reconhecimento padrão (PRRs) capazes de reconhecer vários tipos de microrganismos a partir dos seus padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs). Esses receptores são encontrados na membrana plasmática e no citoplasma e promovem ações antimicrobianas e pró-inflamatórias (Figura 5). Os receptores citosólicos, semelhantes ao TLRs, ligam-se a vias de transdução de sinais que são responsáveis por promover o processo inflamatório ou a produção de Interferon Tipo I <sup>(76,77)</sup>.



**Figura 5.** Localização celular dos receptores de reconhecimento padrão do sistema imune inato.



Fonte: Abbas et al., (2015)

A detecção de infecções no citosol é importante devido ao ciclo de vida de alguns microrganismos ocorrerem no citoplasma, por exemplo, a montagem de partícula viral. Além disso, algumas bactérias e parasitas possuem mecanismos de escape de vesículas fagocíticas no citosol e alteram a concentração de íons responsáveis por indicar sinal de infecção através da formação de poros na membrana por meio da ação de toxinas <sup>(76)</sup>.

A família de receptores do tipo NLRs possui mais de 22 proteínas citosólicas solúveis diferentes que reconhecem PAMPs e DAMPs e são responsáveis pelo recrutamento de proteínas para formação de complexos de sinalização que promovem a inflamação. Os NLRs mais estudados são encontrados em células imunes (macrófagos e linfócitos B) e em barreiras de células epiteliais (epitélio intestinal e fibroblastos). A subfamília de proteínas NLR dos receptores tipo *NOD* respondem à estímulos através da formação de complexos de sinalização denominados inflamassomas, ativando a produção de citocinas inflamatórias IL-1 $\beta$  e IL-18 <sup>(76)</sup>.

### 1.4.2 Inflamassomas

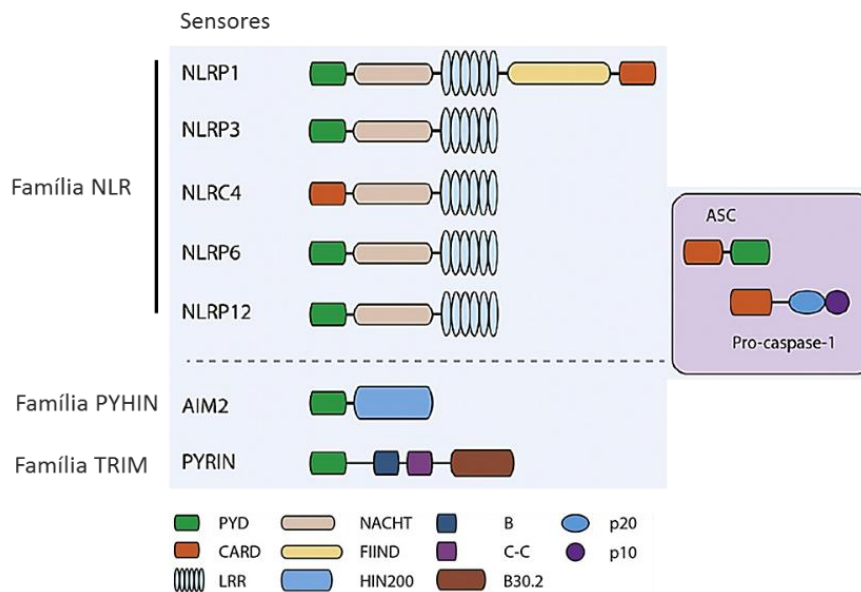
Os inflamassomas são complexos moleculares de alto peso molecular, formados no citoplasma em resposta a estímulos endógenos e exógenos que promovem a ativação de caspases inflamatórias, bem como, o processamento e ativação das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e IL-18 <sup>(78)</sup>.

Os inflamassomas canônicos são responsáveis por ativar caspase-1 e os não-canônicos promovem a ativação da caspase-11. As caspases são proteases com resíduos de cisteína em seus locais ativos que clivam substratos proteicos nos resíduos de aspartato, envolvidas nos processos de morte celular e inflamação <sup>(79,80)</sup>. A estrutura oligomérica do complexo inflamassoma é formado pelas proteínas citosólicas NLRs (responsáveis pelo reconhecimento de um ligante), proteína adaptadora ASC, que se liga e recruta a pró-caspase-1 e a caspase-1 <sup>(78)</sup>.

As proteínas que atuam como sensores citosólicos NLRP1, NLRP2, NLRP3 (ou NALP3), NLRP6 e NLRC4 (ou IPAF) pertencem à família dos receptores NLRs (*NOD-like receptor*). Já AIM2 (*Absent in Melanoma 2*) e IFI16 (*Interferon Gamma Inducible Protein 16*) pertencem a família PYHIN (*PYD-like and HIN domain-containing proteins*), enquanto a proteína sensora PYRIN faz parte da família TRIM (*Tripartite motif proteins*)<sup>(81–85)</sup>.

Os sensores NLRPs (exceto NLRP1) possuem um domínio C-terminal rico em repetições de leucina (LRR), que são responsáveis pelo reconhecimento de um ligante, similar ao domínio rico em leucina dos TLRs. Além disso, possuem um domínio central de ligação a nucleotídeos (NACHT ou NBD), responsável pela oligomerização do receptor após sua ativação e um domínio efetor PYD na porção N-terminal o qual desencadeia a função efetora do receptor recrutando proteínas para formar complexos de sinalização (Figura 6).

**Figura 6.** Representação dos componentes dos inflamassomas, demonstrando a organização estrutural dos seus domínios.



Fonte: Adaptado de Yu et al., (2018)

O NLRP1 (*NOD-like receptors, pyrin-domain-containing proteins 1*) é formado por um domínio interno FIIND (*function-to-find domain*) e um domínio CARD na região C-terminal. O NLRC4 (*NLR family CARD domain-containing protein 4-like*) possui um domínio CARD na porção N-terminal<sup>(82,86)</sup>, enquanto, os sensores AIM2 e IFI16 possuem um domínio efetor PYD N-terminal e um domínio HIN200 (*hematopoietic interferoninducible nuclear antigen with 200 amino-acid repeat*) C-terminal, responsável por reconhecer o ligante<sup>(87,88)</sup>.

A proteína adaptadora ASC é constituída pelos domínios PYD e CARD, atuando no recrutamento da pró-caspase-1 através de interações homotípicas dos domínios CARD-CARD. A interação entre as pró-caspases resulta na formação do complexo que induz sua ativação por autoproteólise<sup>(89-93)</sup>.

Quando ativada, a caspase-1 (subunidades p20/p10) cliva as formas precursoras inativas pró-IL-1 $\beta$  e pró-IL-18, levando a maturação das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-18. Além disso, a ativação de caspase-1 pelo inflamassoma também pode causar morte celular denominada de piroptose, por meio da ativação da proteína gasdermina-D. Esse processo é caracterizado pelo inchaço das células,

perda da integridade da membrana plasmática e liberação de mediadores inflamatórios devido a formação de poros na membrana <sup>(94,95)</sup>.

A ativação dos inflamassomas pode ser induzida por uma variedade de estímulos citoplasmáticos que frequentemente são associados a infecções e estresse celular, incluindo produtos microbianos, cristais endógenos e exógenos (Ex: Cristais de urato monossódico e ácido úrico) e redução nas concentrações citosólicas de íon potássio (K<sup>+</sup>) <sup>(76)</sup>. Em contrapartida, a proteína CARD8, conhecida como CARDINAL (*CARD inhibitor of NF-κB-activating ligands*) ou TUCAN (*Tumor-up-regulated CARD-containing antagonist of caspase nine*), regula de forma negativa a atividade dos inflamassomas, inibindo a ativação do fator de transcrição NF-κB e regulando a ativação de caspases inflamatórias <sup>(96,97)</sup>.

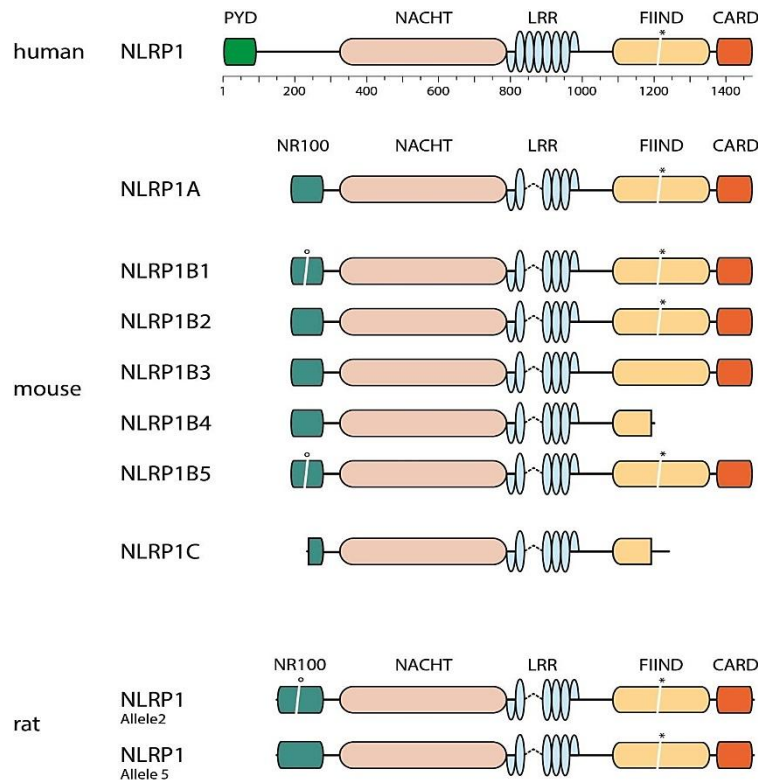
Embora os inflamassomas façam parte integral da defesa do hospedeiro contra patógenos, é possível observar danos no tecido do hospedeiro e disfunção orgânica, principalmente quando há desregulação da ativação e respostas inflamatórias prolongadas ou crônicas. Dessa forma, a ativação anormal de inflamassomas tem sido associada a diversas doenças incluindo aterosclerose <sup>(98)</sup>, câncer <sup>(73,99)</sup>, doenças autoimunes <sup>(100)</sup>, metabólicas <sup>(101)</sup> e distúrbios neurodegenerativos devido à liberação exacerbada de citocinas inflamatórias e pelo processo de morte celular <sup>(102)</sup>.

#### **1.4.3 Inflamassoma NLRP1**

O inflamassoma NLRP1 foi o primeiro complexo descoberto e possui o maior comprimento com 1.473 resíduos de aminoácidos e peso molecular de 165,9 kDa. Há sete isoformas de NLRP1 humanas produzidas por *splicing* alternativo, sendo distinguidos da sequência canônica através de deleções que levam a alterações na sequência proteica da região C-terminal. O NLRP1 contém um domínio LRR, NACTH e um domínio terminal PYD. O domínio LRR é seguido por um fragmento denominado domínio “*function-to-find*” ou FIIND e a região C-terminal possui um segundo domínio efetor de morte, o domínio CARD. A

presença dos domínios FIIND e CARD na região C-terminal e a ligação estendida entre os domínios PYD e NACHT faz com que o NLRP1 se destaque de todas os outros NLRs no genoma humano (77,78). Na Figura 7, é possível observar a diferença do NLRP1 entre o genoma humano, de camundongos e ratos.

**Figura 7.** Estrutura dos domínios proteicos das diferentes isoformas de NLRP1.



Fonte: Adaptado de Yu et al., (2018)

O sensor NLRP1 está presente em células dendríticas, macrófagos e barreiras epiteliais, podendo ser ativado especificamente através do dipeptídeo-muramilo (MDP), um fragmento de peptidoglicano de bactérias gram positivas e negativas e pela toxina letal do *Bacillus anthracis* (76,103). A toxina letal *anthrax* consiste em uma metaloproteinase de zinco que ganha acesso ao citosol de células hospedeiras infectadas capazes de levar a morte. O NLRP1 liga-se diretamente ao MDP, o qual induz mudança no sensor e permite ligação de ATP. A hidrólise de ATP induz a oligomerização de NLRP1 e fornece uma plataforma para recrutar e ativar a caspase-1 (103).

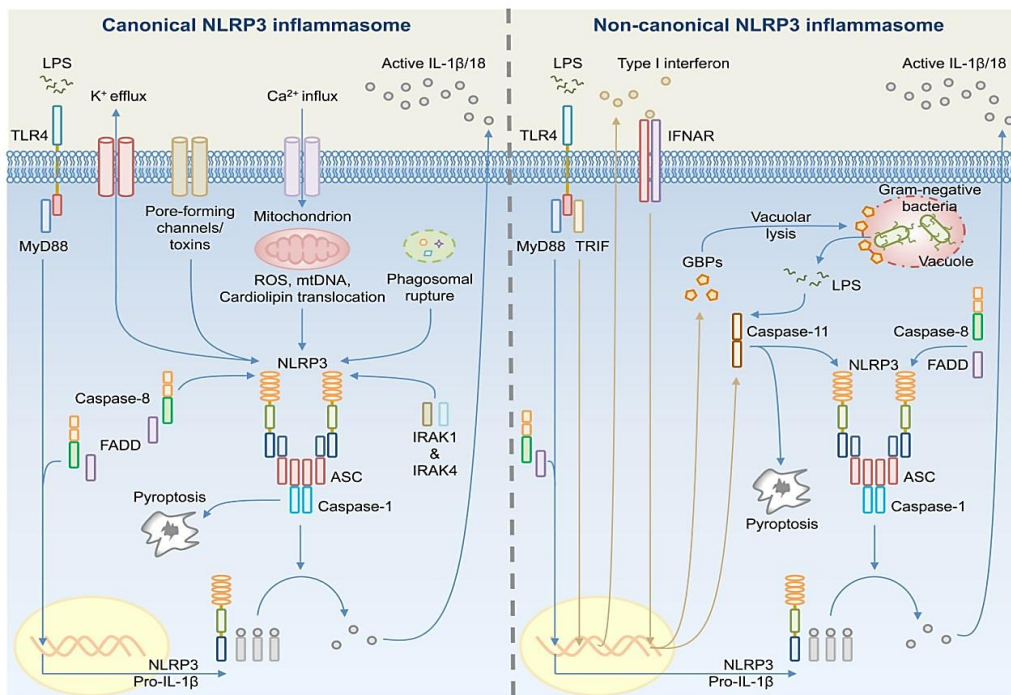
#### 1.4.4 Inflamassoma NLRP3

O inflamassoma canônico NLRP3 (*NOD-like receptors, pyrin-domain-containing proteins 3*) está presente em macrófagos, fibroblastos e linfócitos B. Possui capacidade de reconhecer RNA mensageiro e material genético bacteriano, viral e fúngico, MDP, ATP extracelular, cristais de ácido úrico, hidróxido de alumínio, asbesto, veneno de abelha, dentre outros <sup>(77)</sup>.

A ativação de NLRP3 em macrófagos é iniciada por dois sinais. O primeiro é denominado preparação ou “*priming*”, o qual inicia-se por meio dos receptores TLRs, NOD2, TNFR1 e TFNR2 promovendo a expressão de NLRP3 mediada por NF- $\kappa$ B, que o regula positivamente. O segundo sinal é proporcionado por um PAMP ou DAMP que ativa NLRP3 para desencadear a montagem do inflamassoma com liberação de IL-1 $\beta$  e IL-18 <sup>(104,105)</sup>.

Os sinais de iniciação induzem a deubiquitinação do sensor NLRP3 causando mudança conformacional que expõe o seu domínio NACHT, promovendo a oligomerização <sup>(106,107)</sup>. Posteriormente, o adaptador ASC é recrutado por interações homotípicas PYD-PYD. Assim, o domínio CARD do adaptador ASC interage com o CARD da pró-caspase-1, recrutando-a para o formação do complexo inflamassoma (Figura 8) <sup>(93,108)</sup>.

**Figura 8.** Mecanismos de ativação do inflamassoma NLRP3 canônico e não-canônico.



Fonte: Man; Kanneganti (2016)

A grande variedade de PAMPs e DAMPs que NLRP3 reconhece nos leva a pensar que um evento celular comum liberado por esses estímulos induz a mudança conformacional de NLRP3 tornando-o ativo, como por exemplo, disfunção associada a mitocôndria <sup>(109)</sup>, DNA mitocondrial oxidado <sup>(110)</sup>, efluxo de potássio <sup>(111)</sup>, ações de formação de poros impulsionadas pelo hospedeiro ou bactérias, dentre outros <sup>(112)</sup>. Um evento comum observado por estimuladores de NLRP3 canônicos é a redução da concentração de potássio intracelular <sup>(105,111)</sup>.

Os inflamassomas NLRP3 não-canônicos são ativados pela maioria das bactérias gram-negativas como *Escherichia coli* e *Vibrio cholerae*, que ativam uma via alternativa caracterizada pela dependência de caspase-11 e requer IRAK1 e IRK4. O LPS extracelular induz a expressão de pró-IL-1 $\beta$  e NLRP3 por meio da via dependente de TLR4-Myd88 e interferon tipo I dependente de TLR4-TRIF. O interferon tipo I ativa o receptor interferon tipo I (IFNAR) que atuam na expressão de caspase-11. Por sua vez, as bactérias gram negativas liberam LPS no citosol a partir do espaço do vacúolo ou através da ruptura vacuolar. Dessa

forma, a caspase-11 ao ligar-se ao LPS aciona a piroptose a partir da ativação do inflamassoma NLRP3 não-canônico <sup>(105)</sup>.

#### **1.4.5 P2X7**

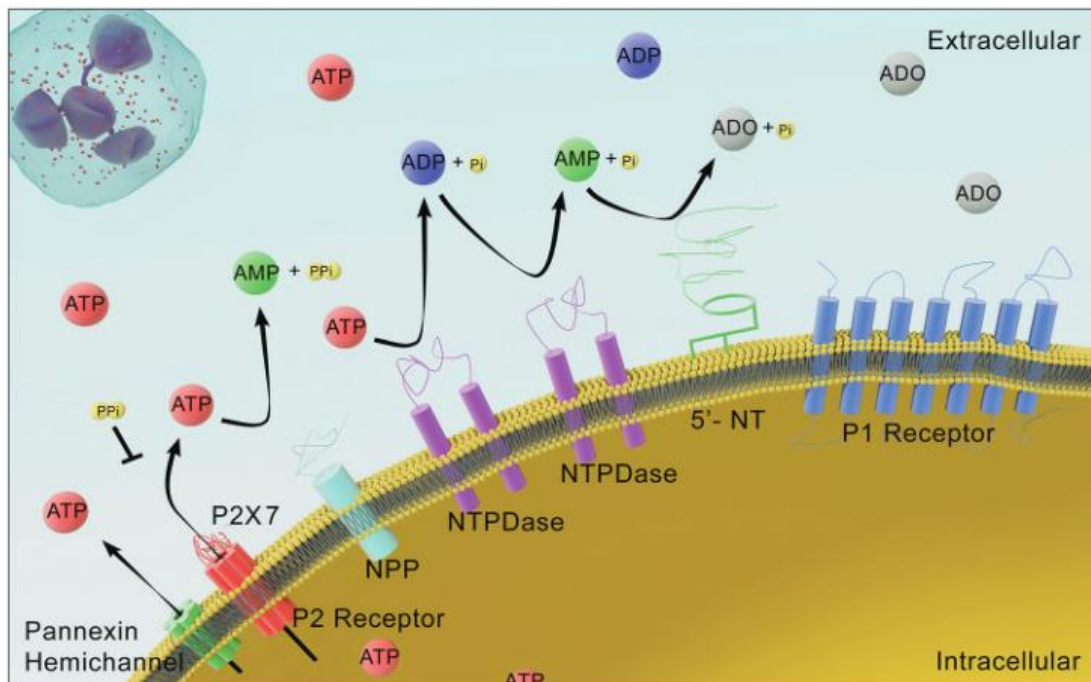
O receptor P2X7 é um canal catiônico que se abre em resposta à ligação do ATP e leva à despolarização celular permitindo a entrada e saída de íons na célula, sendo considerado um purinoreceptor. Os receptores purinérgicos são classificados em P1 e P2. Enquanto os do tipo P1 reconhecem adenosina, os do tipo P2 são subdivididos em P2X (sete subtipos de receptores) e P2Y (oito subtipos de receptores), e ambos possuem a capacidade de se ligar ao ATP extracelular, onde P2X7 possui a capacidade de ativar sua função de canal de íon na presença de concentrações micromolares de ATP <sup>(113)</sup>.

A expressão de receptor P2X7 ocorre praticamente em todas as células dos mamíferos, sendo elas: células-tronco hematopoiéticas, células do sistema nervoso central e periférico, macrófagos, neutrófilos, células musculares, dentre outras. Sua principal função é mediar a apoptose, proliferação celular e liberação de citocinas inflamatórias através da ligação com o adenosina-trifosfato (ATP) <sup>(114)</sup>.

A ativação do receptor P2X7 pode desencadear a ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B levando à produção de citocinas e quimiocinas. Estudos relatam a interação do receptor P2X7 com várias proteínas envolvidas na síntese, produção e liberação das citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$  e IL-18 a partir da ativação do inflamassoma NLRP3. O efluxo de potássio (K<sup>+</sup>), resultante da abertura do canal do receptor P2X7 após ligação ao ATP extracelular, leva, por um mecanismo ainda desconhecido à ativação do inflamassoma NLRP3, culminando na ativação da caspase-1 e subsequente clivagem das formas imaturas pró-IL-1 $\beta$  e pró-IL-18 nas citocinas IL-1 $\beta$  e IL-18 ativadas que serão secretadas pelas células <sup>(113)</sup>.



**Figura 9.** Representação esquemática da sinalização purinérgica e vias extracelulares de metabolização de nucleotídeos.



Fonte: Morandini et al, 2013

Além disso, estudos demonstram que na leucemia linfóide crônica, a regulação negativa de NLRP3 estimula a expressão de P2X7 e promove o crescimento celular, enquanto a super expressão de NLRP3 inibe a proliferação celular e promove a apoptose. Esses achados sugerem que NLRP3 é um regulador negativo do crescimento celular e apontam para uma relação NLRP3/P2X7 na leucemia linfóide crônica <sup>(115)</sup>. Por outro lado, algumas doenças podem estar associadas a polimorfismos nesses genes como, por exemplo, em doenças inflamatórias intestinais e cardiovasculares <sup>(116,117)</sup>.

#### 1.4.6 Citocinas IL-1 $\beta$ e IL-18

As proteínas da família das IL-1 são citocinas responsáveis por ampliar a cascata inflamatória através da ativação de células T (Th1 e Th2), regulando a expressão de moléculas de adesão e induzindo a produção de outras citocinas pró-inflamatórias. São produzidas por células do sistema imune inato e adquirido no local da inflamação. O gene da IL-1 está localizado no braço longo do

cromossomo 2 (2q12-q13), com três loci que codificam as moléculas IL-1 $\alpha$  (gene *IL1A*), IL-1 $\beta$  (gene *IL1B*) e IL-1Ra (gene *IL1RN*) <sup>(76)</sup>.

A IL-1 $\beta$  foi inicialmente descrita como um importante fator hematopoiético que induzia a expressão de fatores estimuladores de colônia em células progenitoras. Além disso, a citocina IL-1 $\beta$  promove a diferenciação de células imunes e está envolvida em vários mecanismos que compõe a inflamação <sup>(118)</sup>.

A IL-18 faz parte da família da IL-1, no entanto o locus da produção desta proteína está localizado no cromossomo 11 (11q22.2-q22.3). Essa citocina exerce atividade tanto na resposta imune inata como adaptativa, e tem ação pleiotrópica induzindo a expressão de quimiocinas e citocinas, além de IL-8 e TNF- $\alpha$ . Além disso, a citocina IL-18 desempenha um papel importante na resposta imune, sendo responsável pelo processo de diferenciação e ativação de células T helper (Th) em subgrupos, de acordo com o perfil de citocinas <sup>(76)</sup>.

IL-1 $\beta$  e IL-18 compartilham homologia estrutural e local de produção, além do processamento dos seus precursores por meio da enzima caspase-1, produzida pelo complexo inflamassoma. Estudos sobre a variabilidade genética na região promotora dos genes que codificam essas citocinas, principalmente SNPs, demonstram que podem afetar a expressão genética e estarem envolvidos na suscetibilidade de doenças inflamatórias, autoimunes e infecciosas <sup>(76)</sup>.

## 1.5 Papel dos inflamassomas no câncer

Estudos indicam que os inflamassomas desempenham um papel importante nas infecções por patógenos e doenças autoimunes. No entanto, seu papel na progressão do tumor ainda é pouco caracterizado em relação a via dos receptores do tipo *Toll* (TLRs) ou vias de interferon (IFN) <sup>(60)</sup>. O câncer de cólon é utilizado em vários estudos a fim de investigar o papel dos inflamassomas no câncer, visto que, os componentes do inflamassoma fornecem proteção contra

a tumorigênese associado à colite. No entanto, estudos recentes demonstram que polimorfismos nos inflamassomas podem promover o desenvolvimento de tumores, doenças inflamatórias e autoimunes, como pode ser observado na Tabela 2 <sup>(60,119)</sup>.

**Tabela 2.** Variantes dos genes *NLRP1*, *NLRP3*, *P2X7*, *IL18* e *IL1 $\beta$*  em estudo associadas a doenças em humanos.

<b>Variante</b>	<b>Doença</b>	<b>Influência</b>	<b>Ref.</b>
<b><i>NLRP1</i></b>			
rs12150220	Vitiligo	Risco	(100,120–122)
	Lúpus eritematoso sistêmico	Suscetibilidade	
	Doença de Addison	Suscetibilidade	
	Pré-eclâmpsia	Risco	
	Leucemia linfoblástica aguda	Resistência a glicocorticoides	
rs35865013	Não encontrado		
<b><i>NLRP3</i></b>			
rs10754558	Leucemia mielóide crônica	Suscetibilidade	(123–125)
rs10805502	Melanoma		
	Câncer de colo retal		
rs10805502	Tuberculose	Risco	(126)
<b><i>P2X7</i></b>			
rs2230911	Depressão		(127–129)
	Osteoporose	Suscetibilidade	
rs3751143	Tuberculose		(130)
	Doença de Parkinson	Suscetibilidade	
<b><i>IL18</i></b>			
rs187238	Leucemia mielóide aguda	Risco	(131)
<b><i>IL1<math>\beta</math></i></b>			
rs16944	Leucemia mielóide aguda		(131–135)
	Câncer de próstata		
	Câncer de mama metastático	Risco	
	Melanoma		
	Câncer gástrico		

Estudos envolvendo células leucêmicas demonstram acumulação de mutações somáticas em genes inflamatórios (Ex: *NF $\kappa$ B*, *TLR4*, Fatores associados aos receptores TNF) hiperproliferativos e resistentes a apoptose,

além disso, essas anormalidades derivadas da inflamação podem ocorrer em ambos as células e no nicho de células hematopoiéticas <sup>(136,137)</sup>.

O processo infeccioso é apontado como um dos fatores de risco, visto que, o reconhecimento de PAMPs e DAMPs pelos PRRs expressos em células-tronco progenitoras hematopoiéticas (HSPCs) induz a diferenciação da mielopoese. Ao mesmo tempo, as HSPCs são induzidas a secretar citocinas pró-inflamatórias que modulam a diferenciação e função da célula imune. Dessa forma, estudos que apontam a leucomogênese a partir da origem inflamatória demonstram que pacientes com neoplasias hematológicas decorrentes de alterações em HSPCs ou em progenitores mielóide são associados na literatura com histórico de infecções ou autoimunidade e alto risco de incidência de doenças hematológicas sustentando assim, a hipótese de Greaves <sup>(62,138,139)</sup>.

A disfunção do nicho da medula óssea também afeta a homeostase sanguínea e em alguns casos por meio de eventos raros contribui para a iniciação de neoplasias hematológicas <sup>(140)</sup>. A inflamação promove o acúmulo de alterações genéticas, inibe a apoptose de HSPCs alterada e contribui para a transformação maligna. Entretanto, o processo de como a inflamação crônica sustentada promove a aquisição de eventos genéticos em clones pré-leucêmicos e contribui para o desenvolvimento de neoplasias hematológicas, permanece sendo determinada a nível celular e molecular <sup>(136)</sup>.

A piroptose induzida por NLRP1a em células progenitoras hematopoiéticas podem impedir sua proliferação e diferenciação em células maduras, uma vez que a piroptose desenfreada em células estaminais e progenitoras hematopoiéticas conduz a leucopenia em estado estacionário, anemia e leucopenia durante períodos de estresse hematopoiético induzido por quimioterapia ou infecção. Ou seja, a atividade de NLRP1a em progenitores hematopoiéticos pode restringir sua proliferação ou promover autodestruição de células infectadas a fim de limitar a disseminação de infecção, promovendo assim um ambiente tumoral <sup>(141)</sup>.

Além disso, um novo mecanismo de resistência a glicocorticoides para a LLA foi descoberto, onde em células leucêmicas linfóides resistentes à

glicocorticoides, há diminuição da metilação do promotor da caspase-1 (CASP1) e da família NLRs contendo o domínio de pirina 3 (NLRP3) que resulta em transcrição aumentada, ativação constitutiva de NALP3 e clivagem do receptor de glicocorticoide mediada por caspase-1. Além disso, NLRP1 tem sido associado ao desenvolvimento de LLA através da apoptose de células estaminais hematopoiéticas e em outras doenças do sangue <sup>(142–144)</sup>.

Apesar dos inflamassomas serem associados com vários tipos de doenças, incluindo o câncer, há poucos estudos que demonstrem a relação entre os SNPs dos genes *NLRP1*, *NLRP3*, *P2X7*, *IL1 $\beta$*  e *IL18* com a suscetibilidade ou influência no prognóstico dos pacientes com LLA. Uma vez que o Estado do Amazonas se destaca com a maior ocorrência de casos do país e carece de estudos epidemiológicos e genéticos sobre a população, torna-se necessário o estudo desses SNPs a fim de fornecer dados científicos e contribuir para um melhor entendimento da patogênese na região.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

- Descrever a frequência dos polimorfismos nos genes *NLRP1*, *NLRP3*, *P2X7*, *IL1 $\beta$*  e *IL18* em pacientes com leucemia linfoblástica aguda e sua influência no prognóstico clínico;

### 2.2 Objetivos específicos

- Estimar a frequência dos polimorfismos nos genes *NLRP1*, *NLRP3*, *P2X7*, *IL1 $\beta$*  e *IL18* em pacientes com leucemia linfoblástica aguda;
- Associar os polimorfismos dos genes *NLRP1*, *NLRP3*, *P2X7*, *IL1 $\beta$*  e *IL18* com a presença de comorbidades, episódios de recaída e óbito em pacientes com leucemia linfoblástica aguda;

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Aspectos éticos

As amostras do grupo caso são provenientes de um projeto maior intitulado “*Estudo dos polimorfismos no genes de receptores e citocinas da imunidade inata em pacientes diagnosticados com leucemia linfóide aguda (LLA)*” coordenado pelo Dr. Allyson Guimarães da Costa e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (CEP-HEMOAM), sob o número de parecer 3.335.123 em 20/05/2019.

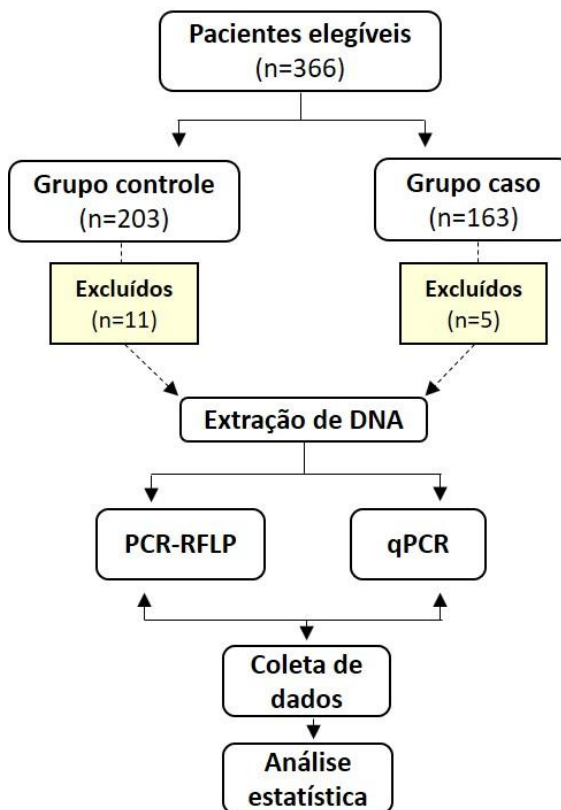
As amostras do grupo controle foram oriundas de dois projetos maiores: “*Identificação e seleção de peptídeos miméticos e reativos aos soros de pacientes HCV+ e sua influência no desenvolvimento da fibrose hepática in vitro*” coordenado pela Dra. Andréa Monteiro Tarragô sob o número de parecer 1.406.965 em 12/02/2016 e “*Avaliação do perfil celular, humoral e molecular em doadores de sangue com sorologia reativa ao vírus da hepatite B (HBV) na cidade de Manaus*” coordenado pela Dra. Laura Patrícia Viana Maia sob o número de CAAE: 0024.0.112.000-10 em 26/10/2010, ambos, aprovados pelo CEP-HEMOAM.

#### 3.2 Modelo de estudo

Foi realizado um estudo do tipo caso-controle a fim de avaliar a influência do SNPs envolvendo os genes do inflamassoma em pacientes diagnosticados com LLA. A primeira abordagem foi realizada a fim de avaliar a associação dos SNPs com LLA (Pacientes com LLA vs. Indivíduos saudáveis). Na segunda abordagem, avaliou-se a associação dos SNPs com comorbidades infecciosas, recaída e óbito (Pacientes com LLA que possuem a variável vs. Pacientes com LLA que não possuem a variável).

### 3.3 Fluxograma de trabalho

Figura 10. Fluxograma de trabalho



### 3.4 População do estudo

O grupo caso foi composto por amostras de DNA de medula óssea e sangue periférico de 158 pacientes diagnosticados com leucemia linfoblástica aguda de acordo com os critérios de classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) <sup>(9)</sup>. Foram incluídos pacientes com LLA que possuíam amostras de DNA criopreservadas no laboratório de tipagem de antígeno leucocitário humano (HLA) da Fundação HEMOAM, < 18 anos, de ambos os gêneros e aparentados. As amostras foram coletadas durante o período de 2010 a 2017 pela equipe multidisciplinar da Fundação HEMOAM de pacientes com indicação para o transplante de medula óssea. Amostras de DNA insuficientes ou com

baixa concentração e pacientes com histórico de transplante de medula óssea foram excluídos do estudo.

Os indivíduos saudáveis (grupo controle) consistiram em 192 amostras de doadores de sangue de ambos os sexos, que doaram no HEMOAM entre o período de janeiro e dezembro de 2015 e concordaram em participar da pesquisa. A fim de serem considerados saudáveis, todos os candidatos foram testados sorologicamente para HIV, HCV, HBV, HTLV-1/2, Sífilis e Doença de Chagas e para HIV, HBV, HCV usando o kit NAT HIV/HCV/HBV. Além disso, foi realizada uma triagem a partir de entrevista a fim de identificar outras doenças e fatores de risco, de acordo com as normas técnicas do Ministério da Saúde do Brasil. Amostras de DNA insuficientes ou com baixa concentração e candidatos aparentados foram excluídos.

### **3.5 Coleta das amostras**

As amostras de DNA foram obtidas da DNAteca do laboratório de tipagem de HLA da Fundação HEMOAM coletadas no período de 2010 a 2017. A coleta foi realizada por punção venosa de aproximadamente 4mL de amostra de sangue em tubos com sistema a vácuo contendo EDTA (*BD Vacutainer* EDTA K2®). Em relação ao grupo controle, foram coletados aproximadamente 12mL de sangue periférico por punção venosa em tubos com sistema a vácuo contendo EDTA, Citrato de Sódio (*BD Vacutainer* de Citrato de Sódio Tamponado) e com Gel Separador (*Gel BD SST® II Advance*) para a realização de hemograma, testes bioquímicos e sorologia, respectivamente.

### **3.6 Critérios de elegibilidade**

#### **3.6.1 Critérios de inclusão**



Para o grupo caso foram incluídos pacientes diagnosticados com LLA através da técnica de imunofenotipagem e que possuíam amostras criopreservadas na DNAteca do laboratório de tipagem de HLA da Fundação HEMOAM, < 18 anos, ambos os sexos e não aparentados. Em relação ao grupo controle, foram incluídos candidatos à doação de sangue na Fundação HEMOAM que não apresentassem diagnóstico de neoplasias hematológicas e/ou testes sorológicos e moleculares positivos para a triagem padrão dos bancos de sangue conforme as Normas Técnicas do Ministério da Saúde.

### **3.6.2 Critérios de não inclusão**

Foram cessados do estudo portadores de qualquer outra doença hematológica e que não se enquadrassem aos nossos critérios de inclusão.

### **3.6.3 Critérios de exclusão**

Foram excluídas amostras de DNA insuficientes ou com baixa concentração e pacientes com histórico de transplante de medula óssea.

## **3.7 Extração e quantificação do DNA**

A extração do DNA Genômico das amostras de sangue (grupo caso) foi realizada com o kit *illustra triplePrep Kit® GenomicPrep DNA Extraction* (GE Healthcare Life Sciences) e *BIOPUR Kit mini spin plus extraction®* (Mobius Life Sciences) seguindo as recomendações descritas pelo fabricante. Quanto as amostras do grupo controle, utilizou-se o Kit *QIAmp DNA* (QIAGEN, Chatsworth, CA, USA), seguindo as orientações do fabricante. Após a extração e congelamento das amostras, o DNA foi avaliado por leituras a 260 nm com o espectrofotômetro NanoDrop™ 2000/2000c (*Thermo Scientific*™). Foi considerado uma unidade de Densidade Ótica (DO) como equivalente a 50 ng/μL.

de DNA. As faixas de absorvância de 260/280 (faixa de absorção de proteínas) e 260/230 (faixa de absorção de compostos orgânicos, açúcares, ureia e sais) foram utilizadas para avaliar a pureza do DNA (~1,8 – 2,2).

### **3.8 Genotipagem dos Polimorfismos dos Genes das citocinas IL-1 $\beta$ e IL-18 através de PCR-RFLP**

Os polimorfismos nos genes das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-18 foram analisados através da amplificação da região de interesse pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida pela reação de polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP).

As reações de PCR foram realizadas de acordo com o protocolo descrito por Bhat e colaboradores (2014) e Folwaczny e colaboradores (2005) (145,146). O mix foi composto por 17,3 $\mu$ L de H<sub>2</sub>O MiliQ, 2,5 $\mu$ L de tampão 10x, 2,0 $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub>, 1,0 $\mu$ L de dNTPs, 0,5 $\mu$ L de cada primer, 0,2 $\mu$ L de Taq DNA polimerase e 2,0 $\mu$ L de DNA genômico. A ciclagem foi realizada no termociclador da *Applied Biosystems (Veriti® 96 Well Thermal Cycler, Carlsbad, USA)*, de acordo com programa de ciclagem descrito na Tabela 3. Os produtos da PCR foram submetidos à reação de RFLP com 7,8 $\mu$ L de H<sub>2</sub>O MiiQ, 2,0 $\mu$ L de tampão Buffer4, 0,2 $\mu$ L da enzima de restrição específica para cada polimorfismo (10U/ $\mu$ L, *Promega, Madison WI, USA*) e 15,0 $\mu$ L do produto da reação de PCR, com posterior incubação em termobloco à 37°C *overnight*.

**Tabela 3.** Descrição dos polimorfismos, localização do genoma, temperaturas de hibridação, enzimas de restrição e fragmentos gerados durante os ensaios.

Polimorfismo	Localização no genoma	Primers	Ciclagem (°C)	Enzimas de Restrição
<b><i>IL1<math>\beta</math></i></b> <b>(rs16944)</b>	-511C/T (Região promotora)	<i>Forward:</i> 5'TGGCATTG ATCTGGTTC ATC-3' <i>Reverse:</i> 5'GTTTAGGA ATCTTCCCA CTT-3'	1 ciclo à 95°C por 4 min 35 ciclos de 95°C por 30s 56°C por 30s 72°C por 30s 72°C por 10 minutos	<i>AvaI</i>
<b><i>IL18</i></b> <b>(rs187238)</b>	-137G/C (Região promotora)	<i>Foward:</i> 5'CACAGAGC CCCAACTTT TTACGGCAG AGAA-3' <i>Reverse:</i> 5'GACTGCTG TCGGCACTC CTTGG-3'	1 ciclo à 95°C por 10 min 35 ciclos de 95°C por 30s 60°C por 30s 72°C por 30s 72°C por 10 min	<i>MbolI</i>

### 3.9 Eletroforese

Os produtos da reação de RFLP foram visualizados em gel de agarose corado com brometo de etídio (Apêndice 06) de acordo com concentrações descritas na Tabela 4.

**Tabela 4.** Tamanho dos fragmentos e concentração dos géis de agarose dos polimorfismos em estudo.

Polimorfismos	Sítio de clivagem da enzima*	Fragmentos	Agarose %
<i>IL1<math>\beta</math></i> -511C/T (rs16944)	5'...C•Y C G R G...3' 3'...G R G C Y • C...5'	C: 304 T: 190+104	2,5%
<i>IL18</i> -137G/C (rs187238)	5'...G A A G A (N) <sub>8</sub> •...3' 3'...C T T C T (N) <sub>7</sub> •...5'	C: 155 G: 116+39	3%

\*New England BioLabs (<https://international.neb.com/>)

### 3.10 Genotipagem por PCR Quantitativa em Tempo Real (qPCR) – Ensaio Taqman

A genotipagem dos polimorfismos foi realizada através da técnica de PCR em tempo real, utilizando sondas fluorescentes TaqMan alelo-específicas que permitem a discriminação dos SNPs em estudo.

As reações de PCR em Tempo Real foram realizadas em microplacas de 96 poços com 2,25µL de água ultrapura, 2,5µL do *genotyping Master Mix* (1x), 0,25µL de ensaio TaqMan® (20x), contendo 36µM de cada primer e 8µM de cada sonda *TaqMan*®, 2µL de DNA genômico, com volume final de 7µL. O termociclador *Applied Biosystems QuantStudio™ 3 da Thermofisher Scientific* foi utilizado para amplificação dos fragmentos de interesse e interpretação dos resultados, com os seguintes parâmetros de ciclagem: 95°C por 10 minutos para ativação, 40 ciclos à 92 °C por 15 segundos para desnaturação e 40 ciclos à 60°C por 90 segundos para anelamento e extensão. As sondas utilizadas estão descritas na Tabela 5.

**Tabela 5.** Descrição dos genes, referência dos SNPs, localização e kit de ensaio para genotipagem.

Gene	Referência do SNP (rs)	Localização	VIC/FAM	Kit de Genotipagem de Ensaio TaqMan
<b>NLRP1</b>	rs12150220	Chr.17: 5582047	GGAGCTTGGAA GAGCTTGGTAGA GG[ <b>A/T</b> ]GTGAGG CAGAGATTTCTG GGGGGAA	C_1600653_10
	rs35865013	Chr17: 5512596	GGTAAAGGAGAT GGGTGGGTGGG GC[ <b>A/G</b> ]TGAAGG ACCCGAAAGACA AGGCCAG	C___1274533_10
<b>NLRP3</b>	rs10754558	Chr1: 247448734	GACAATGACAGC ATCGGGTGTGT T[ <b>C/G</b> ]TCATCACA GCGCCTCAGTTA GAGGA	C__26052028_10
	rs10805502	Chr1: 247448993	ATTTATTTATTTA AATTTTTTGTAA[ <b>C/T</b> ]AGTTTTGTTT TCTAATAAGAAA AAT	C__26052026_10
<b>P2X7</b>	rs3751143	Chr12: 121184501	CCTGAGAGCCA CAGGTGCCTGG AGG[ <b>A/C</b> ]GCTGT GCTGCCGAAA AAGCCGGGG	C__27495274_10
	rs2230911	Chr12: 121177328	GTGTTTCATCGAC TTCCTCATCGAC A[ <b>C/G</b> ]TTACTCCA GTAAGTGTGCTGTC GCTCC	C__15853705_20

### 3.11 Obtenção de dados sociodemográficos, laboratoriais e clínicos

Foram coletados dados demográficos (idade, gênero), laboratoriais (hemograma, imunofenótipo) e clínicos (comorbidades, recaída, óbito) ao

diagnóstico a partir de busca em prontuários no sistema de atendimento médico e estatístico (SAME), sistema iDoctor e no setor de estatística da Fundação HEMOAM.

Foi considerado como comorbidade infecciosa, os pacientes que apresentaram teste sorológico IgG+ ou IgM+ e outras doenças descritas no prontuário. Além disso, para avaliação da recaída, levou-se em consideração o paciente que após o final da terapia da indução (D35) conforme o protocolo utilizado obteve falha no tratamento. O óbito foi analisado em pelo menos 5 anos após o diagnóstico.

### **3.12 Análise estatística**

A análise estatística e descritiva foi realizada com o software *GraphPad Prism v.5* (San Diego, CA, EUA) e *STATA v.13* (StataCorp, 2013, College Station, Texas, USA), com níveis de significância de 5%. A comparação entre os grupos foi realizada com o teste exato de *fisher*, com intervalo de confiança de 95% (IC 95%). Um modelo de análise de regressão logística foi utilizado a fim de investigar a associação dos genótipos com a presença de comorbidades infecciosas, recaída e óbito. O equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (EHW) foi determinado pela comparação das frequências observadas e esperadas dos genótipos e alelos estudados, sendo aplicada em ambos os grupos, através do site <https://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

**MANUSCRITO – Polimorfismos genéticos em genes inflamassomas associados com a leucemia linfoblástica aguda e prognóstico clínico na Amazônia Brasileira** *Plos One (Submetido)*

Fabíola Silva Alves<sup>1,2</sup>

[fabiolasilva@hotmail.com](mailto:fabiolasilva@hotmail.com)

Lilyane Amorim Xabregas<sup>1,2</sup>

[lilyanex@gmail.com](mailto:lilyanex@gmail.com)

Marlon Wendell Athaydes Kerr

[marllonkerr@gmail.com](mailto:marllonkerr@gmail.com)

Gláucia Lima Souza<sup>1,2</sup>

[glau.lima.souza@gmail.com](mailto:glau.lima.souza@gmail.com)

Daniele Sá Pereira<sup>1</sup>

[danieledesapereira@gmail.com](mailto:danieledesapereira@gmail.com)

Fábio Magalhães Gama<sup>3</sup>

[magalhaes.gama.f7@gmail.com](mailto:magalhaes.gama.f7@gmail.com)

Mirian Rodrigues Ribeiro Santiago<sup>1</sup>

[ribeiro.mirian@bol.com.br](mailto:ribeiro.mirian@bol.com.br)

Nadja Pinto Garcia<sup>1</sup>

[garcia.nadja@gmail.com](mailto:garcia.nadja@gmail.com)

Andréa Monteiro Tarragô<sup>1,2</sup>

[andrea\\_s\\_monteiro@hotmail.com](mailto:andrea_s_monteiro@hotmail.com)

Maurício Morishi Ogusku<sup>4</sup>

[mmogusku@inpa.gov.br](mailto:mmogusku@inpa.gov.br)

Aya Sadahiro<sup>3</sup>

[aya.sadahiro@gmail.com](mailto:aya.sadahiro@gmail.com)

Adriana Malheiro<sup>1,2,3,5</sup>

[malheiroadriana@yahoo.com.br](mailto:malheiroadriana@yahoo.com.br)

Allyson Guimarães Costa<sup>1,2,3,5,6\*</sup>

[allyson.gui.costa@gmail.com](mailto:allyson.gui.costa@gmail.com)

1. Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, AM, Brazil;
2. Diretoria de Ensino e Pesquisa, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Manaus, AM, Brazil;
3. Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brazil;
4. Laboratório de Micobacteriologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, AM, Brazil;
5. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, AM, Brazil;
6. Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema, Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), Manaus, AM, Brazil;

**\*Autor correspondente:** Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Av. Constantino Nery, 4397, Chapada, Manaus, AM, CEP 69050-001, Brasil. Telefone: +55 (92) 98153-5233. E-mail: allyson.gui.costa@gmail.com.

## **RESUMO**

### **Introdução**

A leucemia linfoblástica aguda (LLA) é o câncer que mais acomete crianças no mundo. A formação de complexos inflamassomas a partir da ativação de receptores do tipo-NOD da imunidade inata é apontada como um dos fatores promotores da atividade neoplásica na célula-tronco hematopoiética, onde a intensa resposta inflamatória gerada seria responsável pela desregulação do sistema imunológico. Polimorfismos genéticos envolvendo os inflamassomas



estão envolvidos na patogênese de diversos tipos de câncer. Todavia, a relação com a suscetibilidade ou prognóstico dos pacientes com a LLA na Amazônia brasileira é desconhecida, tornando necessário estudos que investiguem sua influência na doença, a fim de poderem ser utilizados como fatores de prognóstico durante o tratamento.

### **Metodologia/Principais achados**

Um estudo caso-controle foi realizado com 158 pacientes com LLA e 192 indivíduos controles. Os polimorfismos genéticos *IL1 $\beta$*  e *IL18* foram genotipados a partir da análise de reação em cadeia da polimerase-polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (PCR-RFLP). Enquanto, os polimorfismos nos genes *NLRP1*, *NLRP3* e *P2X7* foram genotipados por meio de qPCR. O genótipo *IL1 $\beta$*  C/T rs19644 foi associado com o risco de desenvolvimento de LLA (C/C vs. C/T + T/T OR: 2.48 [IC 95%: 1,26 – 4,88,  $p=0,006$ ]; C.C vs C/T OR: 2.74 [IC 95%: 1.37-5.51,  $p=0,003$ ]). Os genótipos *P2X7* A/C rs3751143 (OR: 2.30 [IC 95%: 1.05-5.03,  $p=0,036$ ]) e *NLRP3* G/G rs10754558 (OR: 7.44 [IC 95%: 1.44 – 38.26,  $p=0,016$ ]) foram associados com a presença de comorbidades infecciosas ao diagnóstico enquanto que, *NLRP1* A/T rs12150220 (OR: 0.37 [IC 95%: 0.16 – 0.87,  $p=0,023$ ]) foi associado com a proteção contra comorbidades. Além disso, foi descrita a associação do genótipo *NLRP1* A/G rs35865013 (OR: 2.72 [IC 95%: 1.07 – 6.90,  $p=0,034$ ]) com o risco de recaída após o tratamento em pacientes com LLA.

### **Conclusões**

A variante *IL1 $\beta$*  rs16944 parece predispor os indivíduos da região da Amazônia brasileira a LLA. Além disso, SNPs do inflamassoma estão associados com a presença de comorbidades infecciosas e episódios de recaída ao longo do tratamento em indivíduos com leucemia linfoblástica aguda.

## **INTRODUÇÃO**

As desordens hematológicas são um grupo de neoplasias que afetam a célula-tronco hematopoiética e representam a 11<sup>o</sup> causa mais frequente de

ocorrência de câncer e a 10<sup>o</sup> causa de morte no mundo, respectivamente A leucemia linfoblástica aguda (LLA) é uma neoplasia hematopoiética caracterizada pela proliferação exacerbada de blastos na medula óssea, afetando principalmente crianças na faixa etária de 2 a 15 anos de idade. No Brasil, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), no ano de 2017, ocorreram 4.795 óbitos por leucemia em homens e 4.401 em mulheres. Além disso, para cada ano do triênio 2020-2022, são estimados 5.920 casos novos de leucemia em homens e 4.860 em mulheres, correspondendo a um risco estimado de 5,67 casos novos a cada 100 mil homens e 4,56 para cada 100 mil mulheres (11,31).

De etiologia desconhecida, estudos associam a manifestação de LLA com a interação de fatores genéticos e ambientais, entretanto, menos de 10% dos casos são atribuídos à hereditariedade (38,39). Novas evidências indicam que a inflamação desempenha um papel importante em todos os estágios de desenvolvimento do câncer. Uma vez que a inflamação promove o acúmulo de alterações genéticas que podem inibir as vias de controle de morte celular de células-tronco progenitoras hematopoiéticas (HSPCs) contribuindo para geração de clones pré-leucêmicos. Mel Greaves descreve que uma baixa estimulação do sistema imunológico na primeira infância seguida de uma segunda resposta à infecções, seria responsável pela desregulação do sistema imunológico e aumentaria as chances de desenvolver LLA (147). Entretanto, este processo para o desenvolvimento LLA, permanece ainda desconhecido (136). O complexo inflamassoma é um componente da imunidade inata envolvido em processos inflamatórios e tem sido associados com o desenvolvimento de doenças autoimunes, inflamatórias e diversos tipos de cânceres (73,78). Na leucemia linfoblástica aguda, a piroptose induzida por NLRP1a em células progenitoras hematopoiéticas podem impedir a proliferação e diferenciação de células contribuindo para a proliferação de blastos alterados que irão desencadear a doença. A desregulação do complexo inflamassoma também pode influenciar no prognóstico de pacientes, uma vez que estudos relatam que a ativação constitutiva de NLRP3 parece clivar o receptor de glicocorticoide levando à

resistência, sendo esta a primeira linha de tratamento da LLA, aumentando assim o número de recaídas (141,142).

Apesar dos inflamassomas serem associados com vários tipos de doenças, incluindo o câncer, há poucos estudos que demonstrem a relação entre os SNPs dos genes NLRP1, NLRP3, P2X7, IL1 $\beta$  e IL18 com a suscetibilidade ou influência no prognóstico dos pacientes com LLA. Nesse estudo, nós descrevemos a associação das variantes dos inflamassomas com o risco de desenvolvimento de LLA e prognóstico clínico nesses pacientes.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Pacientes e amostragem**

Foram genotipadas amostras de DNA criopreservadas de 158 pacientes do laboratório de tipagem de antígeno leucocitário humano (HLA) da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM) diagnosticados com leucemia linfoblástica aguda. O diagnóstico foi realizado de acordo com os critérios de classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS)(20). O grupo controle foi composto por 192 amostras de candidatos a doação de sangue que compareceram ao HEMOAM entre janeiro a dezembro de 2015.

### **Aspectos éticos**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação HEMOAM sob número de parecer 3.335.123/2019, CAAE 12615918.9.0000.0009, seguindo as orientações da Declaração de Helsinque e a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde para pesquisa envolvendo seres humanos.

## Coleta de amostras biológicas e dados

Foram coletados aproximadamente 4mL de amostra de sangue periférico de pacientes com LLA por punção venosa em tubos com sistema a vácuo contendo EDTA (*BD Vacutainer EDTA K2®*). Em relação ao grupo controle, foram coletados aproximadamente 12mL de sangue periférico por punção venosa em tubos com sistema a vácuo contendo EDTA, Citrato de Sódio (*BD Vacutainer de Citrato de Sódio Tamponado*) e com Gel Separador (*Gel BD SST® II Advance*) para a realização de hemograma, testes bioquímicos e sorologia, respectivamente. Além disso, foram obtidos dados demográficos (idade, gênero), laboratoriais (hemograma, imunofenótipo) e clínicos (comorbidades [Doenças infecciosas, aplasia e outros], recaída e óbito) a partir de busca em prontuários no sistema de atendimento médico e estatístico (SAME), sistema iDoctor e setor de estatística da Fundação HEMOAM.

## Extração de DNA genômico

A extração do DNA Genômico das amostras de sangue (grupo caso) foi realizada com o kit *illustra triplePrep Kit® GenomicPrep DNA Extraction* (GE Healthcare Life Sciences) e *BIOPUR Kit mini spin plus extraction®* (Mobius Life Sciences) seguindo as recomendações descritas pelo fabricante. Quanto as amostras do grupo controle, utilizou-se o Kit *QIAmp DNA* (QIAGEN, Chatsworth, CA, USA). Após a extração, o DNA foi avaliado por leituras a 260 nm com o espectrofotômetro NanoDrop™ 2000/2000c (*Thermo Scientific™*). Foi considerado uma unidade de Densidade Ótica (DO) como equivalente a 50 ng/μL de DNA. A absorvância de 260/280 (faixa de absorção de proteínas) e 260/230 (faixa de absorção de compostos orgânicos, açúcares, uréia e sais) foram utilizadas para avaliar a pureza do DNA.

## Genotipagem por PCR-RFLP

As reações de PCR foram realizadas de acordo com o protocolo descrito por Bhat e colaboradores (2014) e Folwaczny e colaboradores (2005) (145,146). Para IL1 $\beta$  rs16944 foram utilizadas as sequências: *Foward*: 5'TGGCATTGATCTGGTTCATC-3' *Reverse*: 5'GTTTAGGAATCTTCCCACTT-3' e IL18 rs187238: *Foward*, 5'CACAGAGCCCCAACTTTTTACGGCAGAGAA-3' *Reverse*: 5'GACTGCTGTCTGGCACTCCTTGG-3'. O mix foi composto por 17,3 $\mu$ L de H<sub>2</sub>O MiliQ, 2,5 $\mu$ L de tampão 10x, 2,0 $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub>, 1,0 $\mu$ L de dNTPs, 0,5 $\mu$ L de cada primer, 0,2 $\mu$ L de Taq DNA polimerase e 2,0 $\mu$ L de DNA genômico. A ciclagem foi realizada no termociclador da *Applied Biosystems (Veriti® 96 Well Thermal Cycler, Carlsbad, USA)* utilizando os seguintes programas: 1 ciclo à 95°C por 4 min, 35 ciclos de 95°C por 30s, 56°C por 30 s, 72°C por 30s e 72°C por 10 min (IL1 $\beta$ ) e 1 ciclo à 95°C por 10min, 35 ciclos de à 95°C por 30s, 60°C por 30s, 72°C por 30s e 72°C por 10min (IL18). O produto da PCR foi submetido à reação de RFLP com 7,8 $\mu$ L de H<sub>2</sub>O MiiQ, 2,0 $\mu$ L de tampão Buffer4, 0,2 $\mu$ L da enzima de restrição IL1 $\beta$  rs16944 (*AvaI*) e IL18 rs187238 (*MboII*) (10U/ $\mu$ L, *Promega, Madison WI, USA*) e 15,0 $\mu$ L do produto da reação de PCR, com posterior incubação em termobloco à 37°C *overnight* (~16 horas). A digestão dos produtos foi observada em gel de agarose à 3% e a genotipagem foi caracterizada por IL1 $\beta$  (T/T- 304 bp), (C/C -190pb), (C/T- 304/190/114 bp) e IL-18 (C/C: -155 pb), (G/G: -116 pb) e (G/C: -155/116/39).

## Genotipagem por PCR Quantitativa em Tempo Real (qPCR)

A genotipagem dos polimorfismos de NLRP1, NLRP3 e P2X7 foi realizada através da técnica de Real-Time Quantitative PCR (qPCR), utilizando sondas fluorescentes TaqMan alelo-específicas que permitem a discriminação dos SNPs estudados. As reações de qPCR foram realizadas em microplacas de 96 poços com 2,25 $\mu$ L de água ultrapura, 2,5 $\mu$ L do *Genotyping Master Mix* (1x), 0,25 $\mu$ L de ensaio TaqMan® (20x), contendo 36 $\mu$ M de cada primer e 8 $\mu$ M de cada sonda TaqMan® (*NLRP1 rs12150220 Cat#1600653\_10*, *NLRP1 rs35865013 Cat#127453310*, *NLRP3 rs10754558 Cat#2605202810*, *NLRP3 rs10805502*

Cat#2605202610, P2X7 rs3751143 Cat# 2746527410 e P2X7 rs2230911 Cat# 1585370520, Thermo Fisher Scientific, USA), 2 $\mu$ L de DNA genômico, com volume final de 7 $\mu$ L. O termociclador *QuantiStudio™ Design&Analysis Applied Biosystems* foi utilizado para amplificação das sequências de interesse e para discriminação alélica sob a seguinte condição: 95°C por 10 minutos para ativação, 40 ciclos à 92 °C por 15 segundos para desnaturação e 40 ciclos à 60°C por 90 segundos para anelamento e extensão.

### **Análise de dados e estatística**

A análise estatística e descritiva foi realizada com o software *GraphPad Prism v.5* (San Diego, CA, EUA) e *STATA v.13* (StataCorp, 2013, College Station, Texas, USA), com níveis de significância de 5%. A comparação entre os grupos foi realizada com o teste exato de *fisher*, com intervalo de confiança de 95% (IC 95%). Um modelo de análise de regressão logística foi utilizado a fim de investigar a associação dos genótipos com a presença de comorbidades infecciosas, recaída e óbito. O equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (EHW) foi determinado pela comparação das frequências observadas e esperadas dos genótipos e alelos estudados, sendo aplicada em ambos os grupos, através do site <http://ihg.gsf.de/cgibin/hw/hwa1.pl>.

## **RESULTADOS**

### ***Características epidemiológicas e clínicas dos pacientes***

A média de idade entre os indivíduos do grupo controle e pacientes com LLA foi de 38 e 12, respectivamente. Além disso, o gênero masculino foi predominante em ambos os grupos do estudo (66% e 63%). Em relação à presença de comorbidades, 45% apresentaram algum tipo de comorbidade ao diagnóstico, sendo a mais frequente doenças infecciosas (86%) (ex. Citomegalovírus, toxoplasmose, rubéola, varicela, doenças parasitárias, dentre outros), seguida de outras comorbidades (14%) (ex. Aplasia e linfoma de Burkitt). A maioria dos pacientes recaíram durante o tratamento (66%) e

aproximadamente, 41% dos pacientes com LLA foram à óbito durante o decorrer do tratamento. A média de Hemoglobina foi de 8,65 g/dL, Hematócrito 25,4 g/dL, Leucócitos 4,720/mm<sup>3</sup> e Plaquetas 39,000/mm<sup>3</sup>. Os dados demográficos, clínicos e laboratoriais estão descritos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Características clínicas e demográficas obtidas ao diagnóstico da população em estudo.

<b>Variáveis</b>	<b>Grupo controle (n = 192)</b>	<b>Pacientes com LLA (n = 158)</b>
<b>Idade</b> (anos, mediana [IQR])	38 [26-52]	12 [4-17]
<b>Gênero</b>		
Masculino, n (%)	127 (66%)	100 (63%)
Feminino, n (%)	65 (34%)	58 (37%)
<b>Comorbidades</b>	-	
Sim, n (%)	-	72 (45%)
Doenças infecciosas, n (%)	-	62 (86%)
Outras, n (%)	-	10 (14%)
Não, n (%)	-	86 (55%)
<b>Recaída</b>	-	
Sim, n (%)	-	105 (66%)
Não, n (%)	-	53 (44%)
<b>Óbito</b>	-	
Sim, n (%)	-	66 (41%)
Não, n (%)	-	92 (59%)
<b>Hemoglobina</b> (g/dL, mediana [IQR])	-	8,65 [6,5-10,3]
<b>Hematócrito</b> (g/dL, mediana [IQR])	-	25,4 [20,6-30,8]
<b>Leucócitos</b> (g/dL, mediana [IQR])	-	4,720 [2,110-39,200]
<b>Plaquetas</b> (g/dL, mediana [IQR])	-	39,000 [16,225-126,500]

### **Associação dos genótipos e alelos dos polimorfismos em estudo com leucemia linfoblástica aguda**

As frequências genotípicas e alélicas de todos os SNPs em estudo estão descritas na Tabela 2. Entre todos os SNPs estudados, *IL-1 $\beta$  rs19644* ( $p \leq 0,001$ ) e *P2X7 rs2230911* ( $p = 0,03$ ) se desviaram do Equilíbrio de Hardy-Weinberg no

grupo de pacientes com LLA. O genótipo *IL-1 $\beta$  C/T rs19644* parece ser fator de risco para o desenvolvimento de LLA na população em estudo (C/C vs. C/T + T/T OR: 2.48 [IC 95%: 1,26 – 4,88,  $p=0,006$ ]; C/C vs. C/T OR: 2.74 [IC 95%: 1,37 – 5,51,  $p=0,003$ ]. Todavia, quando observado os alelos individualmente para o SNP, não foi observada associação com o alelo T (OR: 0,84 [IC 95%: 0,62 – 1,14,  $p=0,279$ ]).

**Table 2.** Frequência dos alelos e genótipos dos polimorfismos nos genes *NLRP1*, *NLRP3*, *P2X7*, *IL1 $\beta$*  e *IL18* em pacientes com leucemia linfoblástica aguda e indivíduos controles.

Polimorfismo, genótipo ou alelo	Grupo controle (n=192)	Pacientes com LLA (n= 158)	OR (CI 95%)	Valor de p	
<b><i>IL-1<math>\beta</math> rs16944 C/T</i></b>					
C/C	35 (18%)	13 (8%)	2,48 (1,26-4,88)	<b>0,006</b>	C/C vs C/T+T/T
C/T	95 (49%)	97 (61%)	2,74 (1,37-5,51)	<b>0,003</b>	C/C vs C/T
T/T	62 (33%)	48 (31%)	2,08 (0,99-4,36)	<b>0,049</b>	C/C vs T/T
C	165 (42%)	123 (38%)	0,84	0,279	
T	219 (58%)	193 (62%)	(0,62-1,14)		
<b><i>IL-18 rs187238 G/C</i></b>					
G/G	82 (43%)	67 (42%)	0,98 (0,64-1,51)	0,954	G/G vs G/C+C/C
G/C	90 (47%)	77 (48%)	0,95 (0,61-1,48)	0,838	G/G vs G/C
C/C	20 (10%)	14 (10%)	1,16 (0,54-2,58)	0,688	G/G vs C/C
G	254 (66%)	211 (66%)	1,02	0,861	
C	130 (34%)	105 (44%)	(0,75-1,41)		
<b><i>P2X7 rs2230911 C/G</i></b>					
C/C	128 (66%)	97 (61%)	0,79 (0,51-1,23)	0,305	C/C vs C/G+G/G
C/G	57 (30%)	59 (37%)	0,73 (0,46-1,14)	0,173	C/C vs C/G
G/G	7 (4%)	2 (2%)	2,65 (0,53-13,06)	0,213	C/C vs G/G
C	313 (81%)	253 (80%)	0,91	0,628	
G	71 (19%)	63 (20%)	(0,62-1,32)		
<b><i>P2X7 rs3751143 A/C</i></b>					

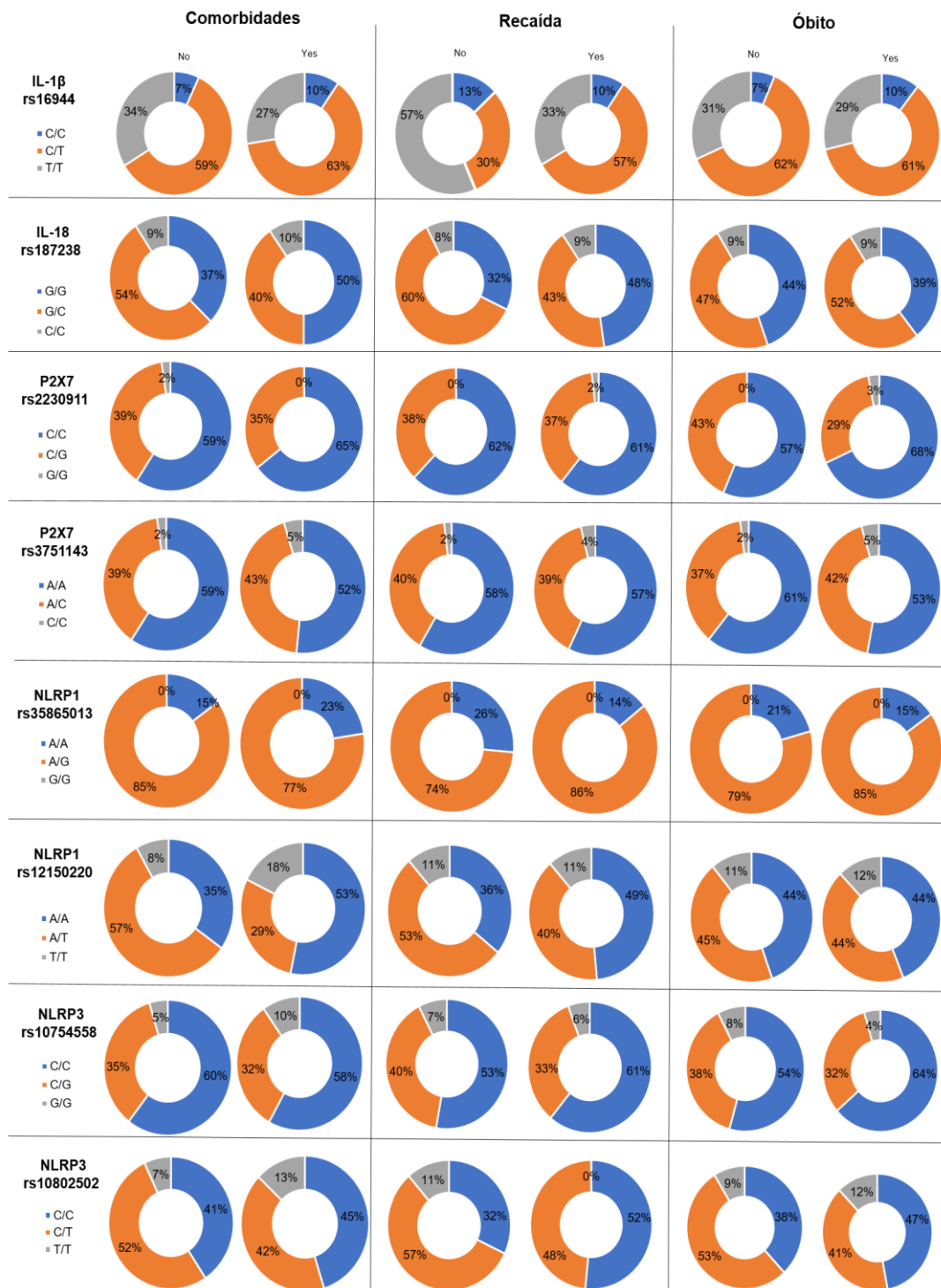


A/A	127 (66%)	91 (57%)	0,69 (0,45-1,07)	0,100	A/A vs A/C+C/C
A/C	59 (31%)	62 (39%)	0,98 (0,43-1,06)	0,092	A/A vs A/C
C/C	6 (3%)	5 (4%)	0,85 (0,25-2,90)	0,807	A/A vs C/C
A	313 (81%)	244 (77%)	0,76	0,160	
C	71 (19%)	72 (33%)	(0,53-1,11)		
<b>NLRP1 rs35865013 A/G</b>					
A/A	28 (14%)	29 (18%)	1,31 (0,74-2,32)	0,341	A/A vs A/G+G/G
A/G	161 (84%)	129 (82%)	1,29 (0,73-2,28)	0,375	A/A vs A/G
G/G	3 (2%)	0	7,24 (0,35-146,7)	0,085	A/A vs G/G
A	217 (56%)	187 (59%)	1,11	0,477	
G	167 (44%)	129 (41%)	(0,82-1,50)		
<b>NLRP1 rs12150220 A/T</b>					
A/A	80 (42%)	70 (44%)	1,11 (0,72-1,70)	0,619	A/A vs A/T+T/T
A/T	90 (46%)	70 (44%)	1,12 (0,71-1,76)	0,606	A/A vs A/T
T/T	22 (12%)	18 (12%)	1,06 (0,53-2,15)	0,851	A/A vs T/T
A	250 (65%)	210 (66%)	1,06	0,707	
T	134 (35%)	106 (44%)	(0,77-1,45)		
<b>NLRP3 rs10754558 C/G</b>					
C/C	116 (60%)	92 (58%)	0,91 (0,59-1,40)	0,678	C/C vs C/G+G/G
C/G	65 (34%)	56 (35%)	0,92 (0,58 – 1,44)	0,718	C/C vs C/G
G/G	11 (6%)	10 (7%)	0,87 (0,35 – 2,14)	0,765	C/C vs G/G
C	297 (77%)	240 (75%)	0,92	0,664	
G	87 (33%)	76 (25%)	(0,65 – 1,31)		
<b>NLRP3 rs10805502 C/T</b>					
C/C	73 (38%)	66 (42%)	1,16 (0,76-1,79)	0,475	C/C vs C/T+T/T
C/T	95 (49%)	76 (48%)	1,13 (0,72-1,77)	0,593	C/C vs C/T
T/T	24 (13%)	16 (10%)	1,35 (0,66-2,77)	0,402	C/C vs T/T
C	241 (63%)	208 (65%)	1,14	0,400	
T	143 (37%)	108 (35%)	(0,83-1,56)		

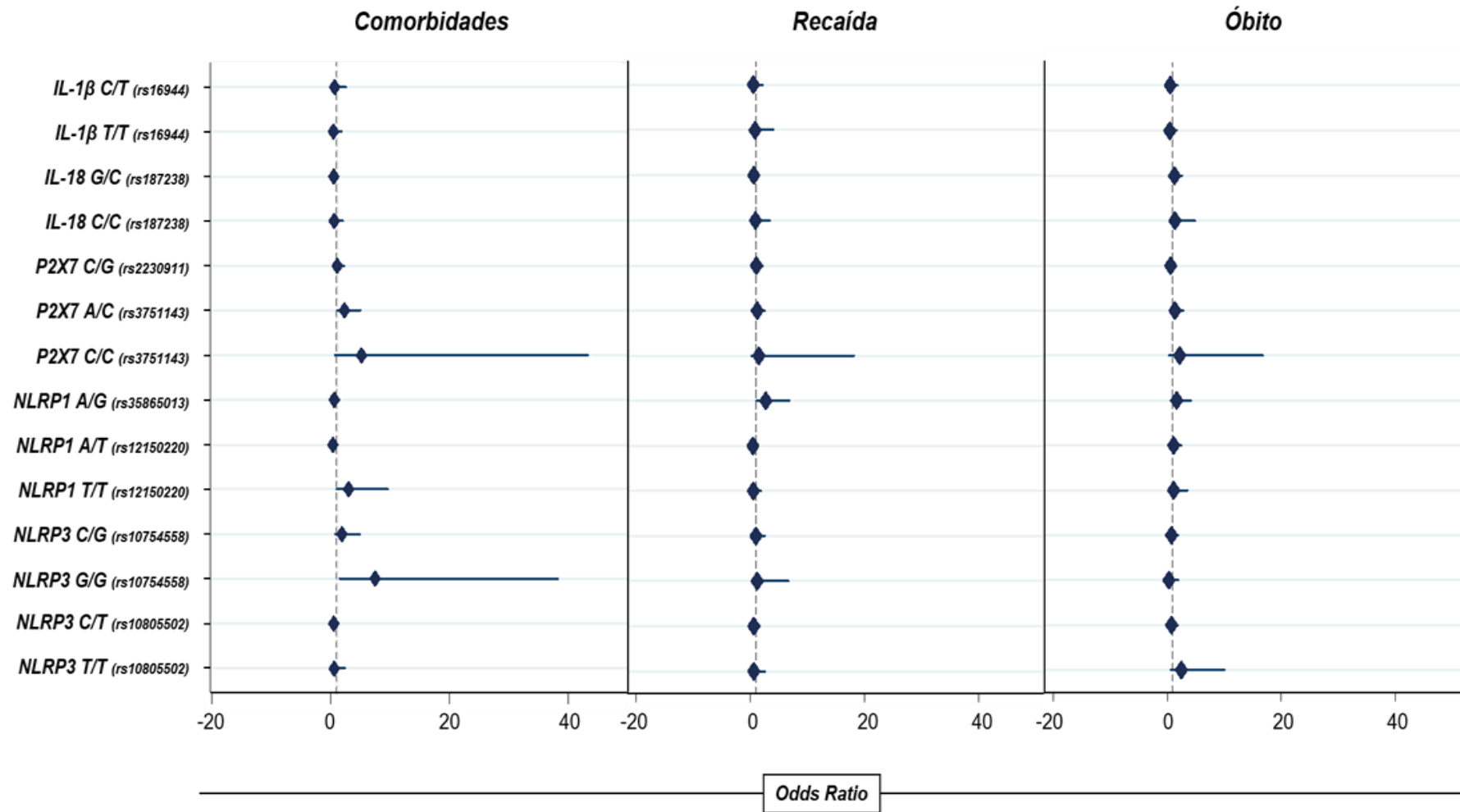
**Associação dos genótipos e alelos dos polimorfismos em estudo com comorbidades, recaída e óbito em pacientes com leucemia linfoblástica aguda**

Na Figura 1, é possível observar a frequência genotípica dos SNPs em estudo correspondente à comorbidades (doenças infecciosas), recaída e óbito. Foi realizada uma análise de regressão linear a fim de investigar a associação dos genótipos com as variáveis em estudo, demonstrado na Figura 2. Os genótipos *P2X7 A/C rs3751143* (OR: 2,30 [IC 95%: 1,05 – 5,03,  $p=0,036$ ]) e *NLRP3 G/G rs10754558* (OR: 7,44 [IC 95%: 1,44 – 38,26,  $p=0,016$ ]) foram associados com a presença de comorbidades infecciosas ao diagnóstico, enquanto que, *NLRP1 A/T rs12150220* (OR: 0,37 [IC 95%: 0,16 – 0,87,  $p=0,023$ ]) foi associado com a proteção contra comorbidades. O genótipo *NLRP1 A/G rs35865013* (OR: 2,72 [IC 95%: 1,07 – 6,90,  $p=0,034$ ]) foi associado com duas vezes mais chances de os pacientes recaírem após o tratamento. Não foi observada associação dos SNPs com o óbito nesse estudo. A frequência alélica dos polimorfismos *NLRP1*, *NLRP3*, *P2X7*, *IL1 $\beta$*  e *IL18* de acordo com comorbidades (doenças infecciosas), recaída e óbito estão descritas na Tabela S1.

**Figura 1.** Frequência genotípica dos polimorfismos NLRP1, NLRP3, P2X7, IL1 $\beta$  e IL18 em pacientes com leucemia linfoblástica aguda de acordo com comorbidades (doenças infecciosas), recaída e óbito.



**Figura 2.** Forest plot da associação entre os polimorfismos NLRP1, NLRP3, P2X7, IL1 $\beta$  and IL18 em pacientes com leucemia linfoblástica aguda de acordo com comorbidades (doenças infecciosas), recaída e óbito.



## DISCUSSÃO

A LLA é uma doença multifatorial desencadeada pela interação de fatores genéticos e ambientais que mais acomete crianças no mundo todo (11). Estudos apontam para uma relação entre a desregulação do sistema imunológico e o desenvolvimento da doença no qual o processo inflamatório seria um dos promotores do processo neoplásico (63,64,70,71). Sabe-se que a inflamação pode induzir uma resposta imune envolvendo macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, células natural killer (NK), células B e T (148). Dessa forma, estudos epidemiológicos e genéticos tem demonstrado o papel crucial da inflamação na iniciação, desenvolvimento, progressão, invasão e metástase em diversos tipos de câncer (149,150).

A família de receptores do tipo *NOD* possui 22 proteínas citosólicas solúveis diferentes que reconhecem PAMPs (Padrões Moleculares Associados a Patógenos) e DAMPs (Padrões Moleculares Associados ao Dano), sendo responsáveis pelo recrutamento de proteínas para formação de complexos de sinalização que promovem a inflamação, denominados inflamassomas (151). Os inflamassomas são complexos moleculares multiméricos, formados no citoplasma em resposta a estímulos endógenos e exógenos que promovem a ativação de caspases inflamatórias (152). Nos últimos anos, os inflamassomas tem sido associados à doenças autoimunes (100,120), inflamatórias (153) e diversos tipos de câncer (148), todavia, sua relação com a LLA ainda não foi descrita.

Em nosso estudo, o polimorfismo *IL 1 $\beta$  rs16944* foi associado com o risco de desenvolvimento de LLA. A IL-1 $\beta$  é um citocina pró-inflamatória mediadora da resposta imune contra infecções, inflamação e lesões teciduais liberada a partir da ação da caspase-1 e tem sido associada com a progressão tumoral de alguns canceres, como por exemplo, câncer gástrico e hepatocarcinoma (154,155). Em um estudo realizado por Yin e colaboradores (2016), demonstrou que indivíduos portadores do genótipo *IL 1 $\beta$  G/G rs16944* apresentam risco para o desenvolvimento de Síndrome Mielodisplásica (156). Além disso, polimorfismos envolvendo a citocina IL-1 $\beta$  foram associados com avaliação

citogenética de bom prognóstico em pacientes com leucemia mielóide aguda ( $p=0,043$ )(131).

O gene  $IL1\beta$  está localizado no cromossomo 2q14 e contém muitos polimorfismos de nucleotídeo único. Um deles é o  $IL\beta$  *rs16944* localizado na região promotora que afeta significativamente as interações de proteínas de DNA e interferem na produção de  $IL-1\beta$  (118,157). Na literatura, esse polimorfismo tem sido associado ao aumento da produção da citocina  $IL-\beta$ , na suscetibilidade ou mau prognóstico em indivíduos com doenças autoimunes e em vários tipos de cânceres (118,158).

Após a infecção ou injúria, a citocina  $IL-1-\beta$  é encontrada em altos níveis medulares produzida por monócitos e células endoteliais e promove diferenciação mielóide por meio da ativação da via  $NF-\kappa B$  que resulta na expansão de HSPCs (159). A exposição crônica à  $IL-1\beta$  prejudica significativamente a autorenovação e a habilidade das HSPCs em se diferenciar nas linhagens linfóide e eritróide (160). Portanto, a inflamação crônica sustentada pode desencadear o insult das células-tronco através da indução de um estado de estresse oxidativo crônico com níveis elevados de espécies reativas de oxigênio (ROS) na médula óssea, criando assim um microambiente de alto risco para indução de alterações genéticas devido ao dano persistente ao DNA de células hematopoéticas induzido por inflamação (161).

A estimulação imune crônica a partir de processos infecciosos é um desencadeador para LMA e SMD. O histórico de doenças infecciosas (Tuberculose, doenças intestinais, pneumonia, septicemia, pielonefrite, sinusite, nasofaringite, hepatite C, citomegalovírus e infecção do trato respiratório superior) foi associada com 1,3 mais chances de desenvolver LMA ou SMD, mesmo se a infecção ocorre 3 anos antes do início da doença (139). Dessa forma, a inflamação crônica pode ser identificada como um dos desencadeadores de neoplasias hematológicas.

A  $IL-18$  é uma importante citocina efetora do inflamassoma  $NLRP3$ , envolvida na resposta imune inata e adquirida. No mieloma múltiplo, o aumento sérico de  $IL-18$  está associado ao avanço da doença e pior sobrevida dos

pacientes (162). Nesse estudo, não foi encontrada associação do SNP do gene *IL18* com LLA. No entanto, no estudo realizado por Yalçın e colaboradores (2014), os genótipos G/C e C/C foram associados com o risco de desenvolvimento de leucemia mielóide crônica e o genótipo C/C associado com o risco de desenvolvimento de leucemia linfóide crônica na população turca, o que sugere uma relação desta citocina com o desenvolvimento de leucemias crônicas caracterizadas pela proliferação de células maduras, porém, com perda de funcionalidade (163).

O inflamassoma NLRP1 é expresso em células progenitoras hematopoiéticas e sua ativação resulta no processo de morte celular dependente de caspase 1 denominado piroptose. Alguns estudos, relatam que a citopenia prolongada induzida pela ativação de NLRP1 durante processos infecciosos garante uma vantagem proliferativa para o clone leucêmico, como sugerido pela hipótese de Mel Greaves sobre o desenvolvimento da LLA (144,164). Na leucemia mielóide crônica (LMC), a superexpressão de NLRP1 está associada com a promoção da proliferação e diminuição da apoptose em células LMC, além de induzir resistência à imatinib (165). Nesse estudo, foi encontrada associação entre o genótipo *NLRP1 A/G rs35865013* com o risco de recaída após o diagnóstico em pacientes com LLA, indicando assim, um possível marcador de prognóstico para a doença.

Paugh e colaboradores (2016) descrevem que a diminuição da metilação do promotor da Caspase-1 resulta em aumento da transcrição e ativação de NLRP3 o qual cliva os receptores de glicocorticóides utilizados no tratamento da LLA (142,143). Apesar dos avanços terapêuticos, muitos pacientes ainda recaem durante o tratamento. Uma vez que não foi encontrada associação de SNPs NLRP3 com LLA nesse estudo, sugere-se que mecanismos epigenéticos estejam envolvidos no processo de patogênese da doença bem como exerçam influência no prognóstico do paciente.

As infecções estão presentes em 49% dos pacientes com leucemia linfoblástica aguda ao diagnóstico (166). Nesse estudo, o genótipo *NLRP3 G/G rs10454558* foi associado com a presença de doenças infecciosas na população

em estudo enquanto que o genótipo *NLRP1 A/T rs12150220* com a proteção contra comorbidades. As proteínas NLRs são cruciais na defesa do hospedeiro contra patógenos intracelulares, como por exemplo, os inflamassomas NLRP1 e NLRP3 atuam como sensores no reconhecimento do *Toxoplasma gondii*, *Tripanossoma cruzi* e *Leishmania sp* limitando a carga e disseminação desses parasitas. Estudos relatam que a susceptibilidade à toxoplasmose congênita está significativamente associada com SNPs envolvendo o locus do gene *NLRP1* (167), o que fortalece a hipótese de Mel Greaves onde alterações genéticas no útero seguida da aquisição de infecções à patógenos comuns esteja envolvida no desenvolvimento da LLA (62,168).

O receptor P2X7 é responsável por tornar o NLRP3 sensível ao ATP, um dos principais DAMPs liberados durante a inflamação, sendo altamente expresso em células tumorais. Estudos descrevem a alta expressão de P2X7 em amostras de pacientes com LLA, principalmente que recaíram, bem como associação com desregulação da função de HSPCs, uma vez que afeta a capacidade de formação de colônias *in vitro*, prejudicando o processo de expansão clonal observado em HSPCs normais todavia, ainda é desconhecido o papel desse mecanismo no desenvolvimento de LLA (169).

O polimorfismo *P2X7 rs2230911* causa uma perda de função do receptor, principalmente em macrófagos, sendo responsável por uma redução parcial do canal e formação de poros na membrana. Os macrófagos são essenciais na resposta imune inata e a ausência de função do receptor P2X7 pode tornar o hospedeiro suscetível à infecções por parasitas intracelulares como *Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamydia trachomatis*, e *Toxoplasma gondii* (170). O polimorfismo *P2X7 rs3751143* também causa perda de função no receptor e afeta a formação de poro e na literatura está associado com a susceptibilidade de infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* na população asiática (129). Na leucemia linfóide crônica, esse polimorfismo parece influenciar na sobrevida de pacientes, sendo o genótipo A/C associado com uma maior sobrevida (104 meses) do que o genótipo A/A (72 meses) (115,171).



Nesse estudo, o genótipo *P2X7 A/C rs3751143* foi associado com a presença de doenças infecciosas ao diagnóstico. Uma das principais doenças encontradas foi a toxoplasmose, infecção causada pelo *Toxoplasma gondii*. O receptor P2X7 é um importante mediador do controle da infecção pelo *Toxoplasma gondii*, visto que, impede sua proliferação através da estimulação à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e facilita a acidificação de vacúolos parasitóforos em macrófagos infectados pelo parasita (172). A perda de função do receptor pode ser responsável pela suscetibilidade de infecção por *Toxoplasma gondii* em pacientes com leucemia linfoblástica aguda nesse estudo, todavia, estudos prospectivos são necessários a fim de confirmar esta relação.

Este estudo tem algumas limitações. Apesar da associação de SNPs inflamassoma LLA e dados clínicos, a população de estudo é pequena comparada a outros estudos envolvendo SNPs. Dessa forma, torna-se necessário estudos prospectivos com uma população maior a fim de confirmar a importância dos polimorfismos em estudo na LLA. O tamanho de amostra pequeno não permitiu a comparação dos genótipos e alelos estudados com os dados sociodemográficos e laboratoriais.

## **CONCLUSÃO**

Este foi o primeiro estudo que descreveu a frequência dos polimorfismos nos genes inflamassoma em pacientes com leucemia linfóide aguda na região amazônica. Os inflamassomas são complexos importantes na defesa do hospedeiro e contribuem para o desenvolvimento neoplásico. Assim, a variante *IL1 $\beta$  rs16944* foi associada com a suscetibilidade a LLA em indivíduos da região amazônica brasileira. Além disso, SNPs do inflamassoma estão associados com a presença de doenças infecciosas ao diagnóstico e recaída em indivíduos com leucemia linfoblástica aguda. Entretanto, estudos futuros devem ser realizados a fim de melhor elucidar a influência desses SNPs na patogênese da LLA.

## **INFORMAÇÃO SUPLEMENTAR**

**Tabela S1.** Frequências alélicas dos polimorfismos NLRP1, NLRP3, P2X7, IL1 $\beta$  e IL18 em pacientes com leucemia linfoblástica aguda e indivíduos controles de acordo com comorbidades, recaída e óbito.

COMORBIDADES	COMORBIDADES				RECAÍDA	RECAÍDA				ÓBITO	ÓBITO			
	Não n=86	Sim n=62	OR (IC 95%)	Valor de p		Não n=53	Sim n=105	OR (IC 95%)	Valor de p		Não n=92	Sim n=66	OR (IC 95%)	Valor de p
<b>IL-1<math>\beta</math> rs16944 C/T</b>														
C	63 (37%)	51 (41%)	1.20	0,468	43 (40%)	80 (38%)	0.90	0,670	69 (37%)	54 (40%)	1.15	0,539		
T	109 (63%)	73 (59%)	0.75 - 1.92)		63 (80%)	130 (62%)	0.55 - 1.45		115 (63%)	78 (60%)	0.73 - 1.82			
<b>IL-18 rs187238 G/C</b>														
G	110 (64%)	87 (70%)	1.32	0,317	66 (62%)	145 (69%)	1.35	0,226	125 (68%)	86 (65%)	0.88	0,604		
C	62 (36%)	37 (30%)	0.80 - 2.17		40 (38%)	65 (31%)	0.82 - 2.20		59 (32%)	46 (35%)	0.54 - 1.41			
<b>P2X7 rs2230911 C/G</b>														
C	135 (78%)	102 (82%)	1.27	0,463	86 (81%)	167 (80%)	0.90	0,735	144 (78%)	109 (82%)	1.31	0,343		
G	37 (22%)	22 (18%)	0.72 - 2.25		20 (19%)	43 (20%)	0.50 - 1.63		40 (22%)	23 (18%)	0.74 - 2.32			
<b>P2X7 rs3751143 A/C</b>														
A	135 (78%)	91 (73%)	0.75	0,333	83 (78%)	161 (77%)	0.91	0,743	146 (79%)	98 (74%)	0.75	0,285		
C	37 (22%)	33 (27%)	0.44 - 1.29		23 (22%)	49 (33%)	0.51 - 1.59		38 (21%)	34 (26%)	0.44 - 1.27			
<b>NLRP1 rs35865013 A/G</b>														
A	99 (58%)	76 (61%)	1.16	0,550	67 (63%)	120 (57%)	0.77	0,300	111 (60%)	76 (57%)	0.89	0,623		
G	73 (42%)	48 (39%)	0.73 - 1.86		39 (37%)	90 (86%)	0.48 - 1.25		73 (40%)	56 (43%)	0.56 - 1.40			
<b>NLRP1 rs12150220 A/T</b>														
A	109 (63%)	84 (68%)	1.21	0,460	66 (62%)	144 (68%)	1.32	0,262	123 (71%)	87 (61%)	0.80	0,372		
T	63 (37%)	40 (32%)	0.74 - 1.95		40 (38%)	66 (32%)	0.81 - 2.15		51 (29%)	45 (39%)	0.49 - 1.30			
<b>NLRP3 rs10754558 C/G</b>														
C	134 (78%)	92 (74%)	0.81	0,489	77 (72%)	163 (78%)	1.30	0,328	135 (73%)	105 (80%)	1.41	0,205		
G	38 (22%)	32 (26%)	0.48 - 1.40		29 (28%)	47 (22%)	0.76 - 2.23		49 (27%)	27 (20%)	0.82 - 2.40			
<b>NLRP3 rs10805502 C/T</b>														
C	115 (67%)	82 (66%)	0.96	0,901	64 (60%)	144 (68%)	1.43	0,147	119 (65%)	89 (67%)	1.13	0,611		
T	57 (33%)	42 (34%)	0.59 - 1.55		42 (40%)	66 (32%)	0.88 - 2.32		65 (35%)	43 (33%)	0.70 - 1.81			

## **CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES**

**Conceitualização:** Allyson Guimarães da Costa, Fabíola Silva Alves, Aya Sadahiro e Adriana Malheiro

**Gerenciamento de dados:** Fabíola Silva Alves, Lilyane Amorim Xabregas, Gláucia Lima Souza, Daniele Sá Pereira e Andréa Monteiro Tarragô

**Análise formal:** Fabíola Silva Alves, Fábio Magalhães Gama, Andréa Monteiro Tarragô, Allyson Guimarães Costa

**Aquisição de financiamento:** Aya Sadahiro, Adriana Malheiro e Allyson Guimarães

**Investigação:** Fabíola Silva Alves, Marlon Wendell Athaydes Kerr, Fábio Magalhães Gama, Mirian Rodrigues Ribeiro Santiago e Nadja Pinto Garcia

**Metodologia:** Fabíola Silva Alves, Lilyane Amorim Xabregas, Andréa Monteiro Tarragô e Maurício Morishi Ogusku, Aya Sadahiro

**Administração do projeto:** Adriana Malheiro e Allyson Guimarães Costa

**Escrita - revisão&edição:** Fabíola Silva Alves, Aya Sadahiro Adriana Malheiro e Allyson Guimarães Costa

## **APROVAÇÃO ÉTICA E CONSENTIMENTO EM PARTICIPAR**

Todos os protocolos e consentimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação HEMOAM (CEP/HEMOAM processo nº 3.335.123/2019). Os pacientes foram tratados de acordo com as recomendações do Ministério da Saúde Brasileiro.

## **CONFLITO DE INTERESSES**

Os autores declaram não haver associações comerciais ou outras que possam representar conflito de interesses.

## LISTA DE ABREVIÇÕES

FABÍOLA SILVA ALVES - FSA  
LILYANE AMORIM XABREGAS - LAX  
MARLON WENDELL ATHAYDES KERR - MWAK  
GLÁUCIA LIMA SOUZA - GLS  
DANIELE SÁ PEREIRA - DSP  
FÁBIO MAGALHÃES GAMA - FMG  
MIRIAN RODRIGUES RIBEIRO SANTIAGO - MRRS  
NADJA PINTO GARCIA - NPG  
ANDRÉA MONTEIRO TARRAGÔ – AMT  
MAURÍCIO MORISHI OGUSKU – MMO  
AYA SADAHIRO - AS  
ADRIANA MALHEIRO - AM  
ALLYSON GUIMARÃES COSTA - AGC

## FINANCIAMENTO

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Amazonas (FAPEAM) (Programa Pró-Estado - nº 002/2008 e Programa PAPAC - nº 005/2019), Rede Gênômica Vigilância em Saúde do Estado do Amazonas (REGESAM), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). FSA, LAX, MWAK GLS, FMG e DSP possuem bolsas de estudo da FAPEAM e CAPES (mestrando e iniciação científica). AM é pesquisador do CNPq Nível 2. Os financiadores não tiveram nenhum papel no desenho do estudo, coleta e análise dos dados, decisão de publicação ou preparação do manuscrito.

## REFERÊNCIAS

1. Miranda Filho A, Piñeros M, Ferlay J, Soerjomataram I, Monnereau A, Bray F. Epidemiological patterns of leukaemia in 184 countries: a population-based study. *Lancet Haematol* [Internet]. 2018;5(1):14–24. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S2352-3026\(17\)30232-6](http://dx.doi.org/10.1016/S2352-3026(17)30232-6)
2. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa de câncer no Brasil 2020. In: Ministério da Saúde. 2019. p. 122.
3. Wiemels J. Perspectives on the causes of childhood leukemia. *Chem Biol Interact* [Internet]. 2012;196(3):59–67. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2012.01.007>
4. Crump C, Sundquist J, Sieh W, Winkleby MA, Sundquist K. Perinatal and familial risk factors for acute lymphoblastic leukemia in a Swedish national cohort. *Cancer*. 2015;121(7):1040–7.

5. Greaves M. A causal mechanism for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2018;18(8):471–84.
6. Takizawa H, Manz MG. Impact of inflammation on early hematopoiesis and the microenvironment. *Int J Hematol*. 2017;106(1):27–33.
7. Broz P, Dixit VM. Inflammasomes: Mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2016;16(7):407–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri.2016.58>
8. Kantono M, Guo B. Inflammasomes and cancer: The dynamic role of the inflammasome in tumor development. *Front Immunol*. 2017;8(SEP):1–9.
9. Seth M, Motti G, Donald M, Simon P, Marc P, O'Donnell J, et al. NLRP1 inflammasome activation induces pyroptosis of hematopoietic progenitor cells. *Immunity*. 2012;37(6):82–91.
10. Paugh SW, Bonten EJ, Savic D, Ramsey LB, Thierfelder WE, Gurung P, et al. NALP3 inflammasome upregulation and CASP1 cleavage of the glucocorticoid receptor cause glucocorticoid resistance in leukemia cells. *Nat Genet*. 2015;
11. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Borowitz MJ, Beau MM, Bloomfield CD, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391–406.
12. Folwaczny M, Glas J, Török HP, Tonenchi L, Paschos E, Bauer B, et al. Polymorphisms of the interleukin-18 gene in periodontitis patients. *J Clin Periodontol*. 2005;32(5):530–4.
13. Bhat IA, Naykoo NA, Qasim I, Ganie FA, Yousuf Q, Bhat BA, et al. Association of interleukin 1 beta (IL-1 $\beta$ ) polymorphism with mRNA expression and risk of non small cell lung cancer. *Meta Gene* [Internet]. 2014;2(1):123–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mgene.2013.12.002>
14. Kinlen LJ. Evidence for an infective cause of childhood leukaemia: comparison of a Scottish new town with nuclear reprocessing sites in Britain. *Lancet*. 1988;332(8624):1323–7.
15. Kinlen LJ. An examination, with a meta-analysis, of studies of childhood leukaemia in relation to population mixing. *Br J Cancer* [Internet]. 2012;107(7):1163–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2012.402>
16. Greaves MF. Aetiology of acute leukaemia. *Lancet*. 1997;349(9048):344–9.
17. Greaves M. Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(3):193–203.
18. Karki R, Man SM, Kanneganti TD. Inflammasomes and cancer. *Cancer Immunol Res*. 2017;5(2):94–9.
19. He Q, Fu Y, Tian D, Yan W. The contrasting roles of inflammasomes in cancer. *Am J Cancer Res* [Internet]. 2018;8(4):566–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29736304> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5934549>
20. Moossavi M, Parsamanesh N, Bahrami A, Atkin SL, Sahebkar A. Role of the NLRP3 inflammasome in cancer. *Mol Cancer*. 2018;17(1):1–13.
21. Awad F, Assrawi E, Louvrier C, Jumeau C, Georjgin-Lavialle S, Grateau

- G, et al. Inflammasome biology, molecular pathology and therapeutic implications. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2018;187:133–49. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.02.011>
22. Platnich JM, Muruve DA. NOD-like receptors and inflammasomes: A review of their canonical and non-canonical signaling pathways. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 2019;670:4–14. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2019.02.008>
  23. Pontillo A, Girardelli M, Kamada AJ, Pancotto JAT, Donadi EA, Crovella S, et al. Polymorphisms in inflammasome genes are involved in the predisposition to systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity*. 2012;45(4):271–8.
  24. Grandemange S, Sanchez E, Louis-Plence P, Tran Mau-Them F, Bessis D, Coubes C, et al. A new autoinflammatory and autoimmune syndrome associated with NLRP1 mutations: NAIAD (NLRP1-associated autoinflammation with arthritis and dyskeratosis). *Ann Rheum Dis*. 2017;76(7):1191–8.
  25. Fan J, Xie K, Wang L, Zheng N, Yu X. Roles of Inflammasomes in Inflammatory Kidney Diseases. *Mediators Inflamm*. 2019;2019:2923072.
  26. Raza Y, Khan A, Khan AI, Khan S, Akhter S, Mubarak M, et al. Combination of Interleukin 1 Polymorphism and Helicobacter pylori Infection: an Increased Risk of Gastric Cancer in Pakistani Population. *Pathol Oncol Res* [Internet]. 2017;23(4):873–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s12253-017-0191-9>
  27. Tak KH, Yu GI, Lee MY, Shin DH. Association between polymorphisms of interleukin 1 family genes and hepatocellular carcinoma. *Med Sci Monit*. 2018; 24:34.88–95.
  28. Yin C, He N, Li P, Zhang C, Yu J, Hua M, et al. Polymorphisms of Interleukin-1 $\beta$  rs16944 confer susceptibility to myelodysplastic syndromes. *Life Sci*. 2016;165:109–12.
  29. Wang H, Hua M, Wang S, Yu J, Chen C, Zhao X, et al. Genetic polymorphisms of IL-18 rs1946518 and IL-1 $\beta$  rs16944 are associated with prognosis and survival of acute myeloid leukemia. *Inflamm Res*. 2017;66(3):249–58.
  30. Gore EA, Sanders JJ, Pandey JP, Palesch Y, Galbraith GMP. Interleukin-1 $\beta$ +3953 allele 2: Association with disease status in adult periodontitis. *J Clin Periodontol*. 1998;25(10):781–5.
  31. Bent R, Moll L, Grabbe S, Bros M. Interleukin-1 beta—A friend or foe in malignancies? *Int J Mol Sci*. 2018;19(8).
  32. Umare V, Pradhan V, Rajadhyaksha A, Ghosh K, Nadkarni A. Predisposition of IL-1 $\beta$  (-511 C/T) polymorphism to renal and hematologic disorders in Indian SLE patients. *Gene* [Internet]. 2018;641:41–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2017.10.039>
  33. Arranz L, Arriero M del M, Villatoro A. Interleukin-1 $\beta$  as emerging therapeutic target in hematological malignancies and potentially in their complications. *Blood Rev* [Internet]. 2017;31(5):306–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.blre.2017.05.001>
  34. Pietras EM, Mirantes-Barbeito C, Fong S, Loeffler D, Kovtonyuk L V., Zhang S, et al. Chronic interleukin-1 drives haematopoietic stem cells

- towards precocious myeloid differentiation at the expense of self-renewal. *Nat Cell Biol.* 2016;18(6):607–18.
35. Hasselbalch HC. Chronic inflammation as a promotor of mutagenesis in essential thrombocythemia, polycythemia vera and myelofibrosis. A human inflammation model for cancer development? *Leuk Res* [Internet]. 2013;37(2):214–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.leukres.2012.10.020>
  36. Kristinsson SY, Björkholm M, Hultcrantz M, Derolf ÅR, Landgren O, Goldin LR. Chronic immune stimulation might act as a trigger for the development of acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol.* 2011;29(21):2897–903.
  37. Nakamura K, Kassem S, Cleynen A, Chrétien ML, Guillerey C, Putz EM, et al. Dysregulated IL-18 Is a Key Driver of Immunosuppression and a Possible Therapeutic Target in the Multiple Myeloma Microenvironment. *Cancer Cell.* 2018;33(4):634-648.e5.
  38. Yalçın S, Mutlu P, Çetin T, Sarper M, Özgür G, Avcu F. The -137G/C Polymorphism in Interleukin-18 Gene Promoter Contributes to Chronic Lymphocytic and Chronic Myelogenous Leukemia Risk in Turkish Patients. *Turkish J Hematol.* 2015;32(4):311–6.
  39. Masters SL, Gerlic M, Metcalf D, Preston S, Pellegrini M, O'Donnell JA, et al. NLRP1 Inflammasome Activation Induces Pyroptosis of Hematopoietic Progenitor Cells. *Immunity* [Internet]. 2012;37(6):1009–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2012.08.027>
  40. Wu J y., Zeng LY. Role of NLRP1 in blood disorders. *Zhongguo Shi Yan Ye Xue Za Zhi.* 2014;5:1476–9.
  41. Xu Z, Wang H, Wei S, Wang Z, Ji G. Inhibition of ER stress-related IRE1 $\alpha$ /CREB/NLRP1 pathway promotes the apoptosis of human chronic myelogenous leukemia cell. *Mol Immunol* [Internet]. 2018;101(83):377–85. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.07.002>
  42. Paugh SW, Bonten EJ, Evans WE. Inflammasome-mediated glucocorticoid resistance: The receptor rheostat. *Mol Cell Oncol* [Internet]. 2016;3(1):1–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/23723556.2015.1065947>
  43. Clarke RT, Van Den Bruel A, Bankhead C, Mitchell CD, Phillips B, Thompson MJ. Clinical presentation of childhood leukaemia: A systematic review and meta-analysis. *Arch Dis Child.* 2016;101(10):894–901.
  44. Witola WH, Mui E, Hargrave A, Liu S, Hypolite M, Montpetit A, et al. NALP1 influences susceptibility to human congenital toxoplasmosis, proinflammatory cytokine response, and fate of *Toxoplasma gondii*-infected monocytic cells. *Infect Immun.* 2011;79(2):756–66.
  45. Clay GM, Wilson ME. NLR proteins and parasitic disease. *Immunol Res.* 2016;59:142–52.
  46. Greaves M. A causal mechanism for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2018;18(8):471–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41568-018-0015-6>
  47. Feng W, Yang F, Wang R, Yang X, Wang L, Chen C, et al. High Level P2X7-Mediated Signaling Impairs Function of Hematopoietic Stem/Progenitor Cells. *Stem Cell Rev Reports* [Internet]. 2016;12(3):305–

14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s12015-016-9651-y>
48. 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(4):2079–86.
49. Taheri M, Sarani H, Moazeni-Roodi A, Naderi M, Hashemi M. Association between P2X7 polymorphisms and susceptibility to tuberculosis: An updated meta-analysis of case-control studies. *Med*. 2019;55(6).
50. Thunberg U, Tobin G, Johnson A, Söderberg O, Padyukov L, Hultdin M, et al. Polymorphism in the P2X7 receptor gene and survival in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet*. 2002;360(9349):1935–9.
51. Salaro E, Rambaldi A, Falzoni S, Amoroso FS, Franceschini A, Sarti AC, et al. Involvement of the P2X7-NLRP3 axis in leukemic cell proliferation and death. *Sci Rep* [Internet]. 2016;6(1):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep26280>
52. Moreira-Souza ACA, Almeida-da-Silva CLC, Rangel TP, Rocha G da C, Bellio M, Zamboni DS, et al. The P2X7 receptor mediates *Toxoplasma gondii* Control in Macrophages through canonical NLRP3 inflammasome activation and reactive oxygen species production. *Front Immunol*. 2017;8(OCT).

## LEGENDA DAS FIGURAS

**Figura 1.** Frequência genotípica dos polimorfismos NLRP1, NLRP3, P2X7, IL1 $\beta$  e IL18 em pacientes com leucemia linfoblástica aguda de acordo com comorbidades (doenças infecciosas), recaída e óbito.

**Figura 2.** Forest plot da associação entre os polimorfismos NLRP1, NLRP3, P2X7, IL1 $\beta$  and IL18 em pacientes com leucemia linfoblástica aguda de acordo com comorbidades (doenças infecciosas), recaída e óbito.



## 5. CONCLUSÃO

Ao final desse estudo, podemos concluir que:

- O genótipo *IL1 $\beta$  C/T rs19644* foi associado com o risco de desenvolvimento de leucemia linfoblástica aguda;
- Os genótipos *P2X7 A/C rs3751143* e *NLRP3 G/G rs10754558* foram associados com o risco de comorbidades infecciosas ao diagnóstico enquanto que, *NLRP1 A/T rs12150220* foi associado com a proteção contra comorbidades;
- O genótipo *NLRP1 A/G rs35865013* foi associado com o risco de recaída em pacientes com leucemia linfoblástica aguda durante o tratamento;
- Este foi o primeiro estudo que descreveu a frequência de SNPs nos genes inflamassomas em pacientes com leucemia linfoblástica aguda na Amazônia Brasileira, todavia, devido ao pequeno número amostral, estudos prospectivos devem ser realizados a fim de melhor elucidar a influência desses SNPs na doença;

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Piller GJ. Leukaemia - A brief historical review from ancient times to 1950. *Br J Haematol.* 2001;112(2):282–92.
2. Dreyfus C. Alguns marcos na história da hematologia. *Grunne Strat.* 1957;54–6.
3. Donné A. Cours de microscopie complémentaire des études médicales. *Anat Microsc Physiol des fluides l'Economie.* 1844;135–6.
4. Bennet JH. Caso de hipertrofia do baço e fígado em que a morte ocorreu a partir da supuração do sangue. *Edinb Med Surg J.* 1845;64:413–23.
5. Bennet JH. Leucocythemia or White Cell Blood. Edimburgo. 1852;7–82.
6. Virchow R. Weisses blut. o notizen *Froriep.* 1845;36:151–6.

7. Virchow R. Zur pathologischen physiologie des blutes. II. Weisses blut. Arch Pathol Anat Phys. 1847;1:563–72.
8. Patlak BM. Targeting leukemia: From Bench to Bedside. Leukemia. 1998;12(1).
9. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Borowitz MJ, Beau MM, Bloomfield CD, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood. 2016;127(20):2391–406.
10. Bain BJ, Estcourt L. FAB Classification of Leukemia. In: Brenner's Encyclopedia of Genetics. Elsevier Inc.; 2013. p. 5–7.
11. Miranda Filho A, Piñeros M, Ferlay J, Soerjomataram I, Monnereau A, Bray F. Epidemiological patterns of leukaemia in 184 countries: a population-based study. Lancet Haematol [Internet]. 2018;5(1):14–24. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S2352-3026\(17\)30232-6](http://dx.doi.org/10.1016/S2352-3026(17)30232-6)
12. Terwilliger T, Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. Blood Cancer J. 2017;7(6):577.
13. Hoffbrand . A. Victor, Moss PAH, Renato Rego Failace. Fundamentos em Hematologia. 7°. Artmed, editor. Porto Alegre; 2017. 384 p.
14. Zhao Y, Wang Y, Ma S. Racial Differences in Four Leukemia Subtypes: Comprehensive Descriptive Epidemiology. Sci Rep [Internet]. 2018;8(1):1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-19081-4>
15. Vora A. Childhood leukaemia: An update. Paediatr Child Health (Oxford). 2016;26(2):51–6.
16. Ries L, Smith M, Gurney J, Linet M, Tamra T, Young J, et al. Cancer incidence and survival among children and adolescents: United States SEER Program 1975-1995 [Internet]. Bethesda; 1999. Available from: [https://www.tesla.com/nl\\_NL/blog/mission-tesla?redirect=no](https://www.tesla.com/nl_NL/blog/mission-tesla?redirect=no)
17. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, GH et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. Br J Haematol. 1976;33:451–8.
18. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Vardiman J, Lister TA, et al. Commentary The World Health Organization Classification of Neoplastic Diseases of the Hematopoietic and Lymphoid Tissues. Ann Oncol. 1999;10(12):1419–32.
19. Zerbini MCN, Soares FA, Velloso EDRP, Chauffaille MDLLF, Paes RP. Classificação da Organização Mundial da Saúde para os tumores dos tecidos hematopoético e linfóide, 4ª edição, 2008: principais modificações introduzidas em relação à 3ª edição, 2001. Rev Assoc Med Bras. 2011;57(1):6–73.

20. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Borowitz MJ, Beau MM, Bloomfield CD, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391–406.
21. Steliarova-Foucher E, Stiller C, Kaatsch P, Berrino F, Coebergh JW, Lacour B, et al. Geographical patterns and time trends of cancer incidence and survival among children and adolescents in Europe since the 1970s (the ACCISproject): an epidemiological study. *Lancet*. 2004;364(9451):2097–105.
22. Grimwade LF, Fuller KA, Erber WN. Applications of imaging flow cytometry in the diagnostic assessment of acute leukaemia. Vol. 112, *Methods*. Elsevier Inc.; 2017. p. 39–45.
23. WHO. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 11. 2012.
24. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Estimating the World Cancer Burden: Globocan 2000. *Int J Cancer*. 2001;94:153–6.
25. Forouzanfar MH, Afshin A, Alexander LT, Anderson HR, Bhutta ZA, Biryukov S, et al. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*. 2016;388:1659–724.
26. Abboud MR, Ghanem K, Muwakkit S. Acute lymphoblastic leukemia in low and middle- income countries : disease characteristics and treatment results. *Curr Opin Oncol*. 2014;26(6):650–5.
27. INCA. Instituto Nacional de Cancer José Alencar Gomes da Silva, Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil [Internet]. Ministério da Saúde Instituto Nacional de Cancer José Alencar Gomes da Silva. 2015. 124 p. Available from: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/sintese-de-resultados-comentarios.asp>
28. Ferman S, Santos M de O, Ferreira JM de O, Reis R de S, Oliveira JFP, Pombo-de-Oliveira MS, et al. Childhood cancer mortality trends in Brazil, 1979–2008. *Clinics*. 2013;68(2):219–24.
29. Brasil I. Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil. 2017. 128 p.
30. Facina T. Estimativa 2014 – Incidência de Câncer no Brasil. *Rev Bras Cancerol*. 2014;60(1):63–4.
31. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa de câncer no Brasil 2020. In: Ministério da Saúde. 2019. p. 122.
32. Balmant NV, Reis R de S, Santos M de O, Oliveira JP, Camargo B de. Trends in Cancer Mortality Among Adolescents and Young Adults in Brazil. *J Adolesc Young Adult Oncol*. 2016;0(0):1–7.

33. Instituto Nacional do Câncer. Câncer da criança e adolescente no Brasil: dados dos registros de base populacional e de mortalidade. Inca. 2008. 220 p.
34. Reis RDS, Camargo B De, Santos MDO, Moreira J, Oliveira D, Silva FA, et al. Childhood Leukemia Incidence in Brazil According to Different Geographical Regions. *Pediatr Blood Cancer*. 2011;56:58–64.
35. Reis RDS, Santos MDO, Camargo B De, Oliveira FP, Claudio L, Thuler S, et al. Early childhood leukemia incidence trends in Brazil Early childhood leukemia incidence trends in Brazil. *Pediatr Hematol Oncol*. 2016;18:12.
36. Junior LCB, Levy IE, Frances LTVM, Wanderley A V., Carneiro R de CM, Bentes AQ. Frequency of acute myeloid leukemia in children attended in Belém, Pará from August 2005 to May 2009. *J Bras Patol e Med Lab*. 2015;51(2):72–6.
37. Silva AL, Alves FS, Kerr MWA, Xabregas LA, Gama FM, Rodrigues MGA, et al. Acute lymphoid and myeloid leukemia in a Brazilian Amazon population: Epidemiology and predictors of comorbidity and deaths. *PLoS One*. 2019;14(8):1–16.
38. Wiemels J. Perspectives on the causes of childhood leukemia. *Chem Biol Interact [Internet]*. 2012;196(3):59–67. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2012.01.007>
39. Crump C, Sundquist J, Sieh W, Winkleby MA, Sundquist K. Perinatal and familial risk factors for acute lymphoblastic leukemia in a Swedish national cohort. *Cancer*. 2015;121(7):1040–7.
40. Lariou MS, Dikaloti SK, Dessypris N, Baka M, Polychronopoulou S, Athanasiadou-Piperopoulou F, et al. Allergy and risk of acute lymphoblastic leukemia among children: A nationwide case control study in Greece. *Cancer Epidemiol [Internet]*. 2013;37(2):146–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canep.2012.10.012>
41. Wang Y, Gao P, Liang G, Zhang N, Wang C, Wang Y, et al. Maternal prenatal exposure to environmental factors and risk of childhood acute lymphocytic leukemia: A hospital-based case-control study in China. *Cancer Epidemiol [Internet]*. 2019;58(September 2018):146–52. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.canep.2018.11.005>
42. Wang T, Chen L, Yang T, Wang L, Zhao L, Zhang S, et al. Cancer risk among children conceived by fertility treatment. *Int J cancer*. 2018;1–40.
43. Groves FD, Watkins BT, Roberts DJ, Tucker TC, Shen T, Flood TJ. Birth weight and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia in Arizona, Illinois and Kentucky. *South Medical J*. 2013;111(10):579–84.
44. Gao Y, Zhang Y, Kamijima M, Sakai K, Khalequzzaman M, Nakajima T, et al. Quantitative assessments of indoor air pollution and the risk of childhood acute leukemia in Shanghai. *Environ Pollut [Internet]*. 2014;187:81–9. Available from:

- <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2013.12.029>
45. Bailey HD, Metayer C, Milne E, Petridou ET, Infante-Rivard C, Spector LG, et al. Home paint exposures and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia: findings from the Childhood Leukemia International Consortium. *Cancer Causes Control*. 2015;26(9):1257–70.
  46. Whitehead TP, Adhatamsoontra P, Wang Y, Arcolin E, Sender L, Selvin S, et al. Home remodeling and risk of childhood leukemia. *Ann Epidemiol*. 2017;27(2):140–4.
  47. Ferreira J. Pregnancy, maternal tobacco smoking, and early age leukemia in Brazil. *Front Oncol* [Internet]. 2012;2(November):1–10. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2012.00151/abstract>
  48. Shahriari M, Jafari M, Khalafi M, Ramezani M, Maki M, Soleimani FH, et al. Pre- and Post- birth Causes of Acute Lymphoblastic Leukemia. *Int J Cancer Manag* [Internet]. 2018;11(6):1–5. Available from: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=ccm&AN=130455672&site=ehost-live>
  49. Greaves M, Hughes W. Cancer cell transmission via the placenta. *Evol Med Public Heal* [Internet]. 2018;2018(1):106–15. Available from: <https://academic.oup.com/emph/article/2018/1/106/4971514>
  50. Dekking E, Van Der Velden VHJ, Böttcher S, Brüggemann M, Sonneveld E, Koning-Goedheer A, et al. Detection of fusion genes at the protein level in leukemia patients via the flow cytometric immunobead assay. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2010;23(3):333–45.
  51. Moura SV, Andrade F, Magalhães IQ, Costa I, Silva DB, D'andrea ML, et al. Clinical and molecular epidemiology of neonatal leukemia in Brazil. *Leuk Lymphoma*. 2015;56(4):903–9.
  52. Ayton PM, Cleary ML. Molecular mechanisms of leukemogenesis mediated by MLL fusion proteins. *Oncogene*. 2001;20(40):5695–707.
  53. Hauer J, Martín-Lorenzo A, Sánchez-García I. Infection causes childhood leukemia. *Aging (Albany NY)*. 2015;7(9):607–8.
  54. Dockerty JD. Epidemiology of childhood leukemia in New Zealand: Studies of infectious hypotheses. *Blood Cells, Mol Dis* [Internet]. 2009;42(2):113–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcmd.2008.10.008>
  55. Maria J, Rocha C, Xavier SG, Eduardo M, Souza DL, Godoy J, et al. Current Strategies for the Detection of Minimal Residual Disease in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2016;8(1):e2016024.
  56. Brandalise SR, Régia V, Maria P, Lee LM, De L, Citologia R, et al. Protocolo de Tratamento da Leucemia Linfoblástica Aguda da Criança e do Adolescente GBTLI LLA 2009. GBTLI 2009. 2011;

57. Taicz M, Pérez MG, Reijtman V, Mastroianni A, Escarra F, García ME, et al. Epidemiología y factores de riesgo de internación prolongada en niños con leucemia y bacteriemia. Estudio de cohorte. *Rev Chil infectología* [Internet]. 2018;35(3):233–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30534901>[http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0716-10182018000300233&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182018000300233&lng=en&nrm=iso&tlng=en)
58. Look AT, Look AT. Oncogenic Transcription Factors in the Human Acute Leukemias. 2011;1059(1997).
59. A. Biondi GM. Molecular pathogenesis of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 1998;83:651–9.
60. Zhu H, Cao X. NLR members in inflammation-associated carcinogenesis. *Cell Mol Immunol*. 2017;14(5):403–5.
61. Look AT. Oncogenic Transcription Factors in the Human Acute Leukemias. *Science* (80- ). 2011;1059(1997).
62. Greaves M. A causal mechanism for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2018;18(8):471–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41568-018-0015-6>
63. Kinlen LJ. Evidence for an infective cause of childhood leukaemia: comparison of a scottish new town with nuclear reprocessing sites in britain. *Lancet*. 1988;332(8624):1323–7.
64. Kinlen LJ. An examination, with a meta-analysis, of studies of childhood leukaemia in relation to population mixing. *Br J Cancer* [Internet]. 2012;107(7):1163–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2012.402>
65. Kinlen LJ. Childhood leukaemia and ordnance factories in west Cumbria during the Second World War. *Br J Cancer*. 2006;95(1):102–6.
66. Alexander FE, Boyle P, Carli PM, Coebergh JW, Draper GJ, Ekbohm A, et al. Spatial clustering of childhood leukaemia: Summary results from the EUROCLUS project. *Br J Cancer*. 1998;77(5):818–24.
67. Kinlen LJ, Doll R. Population mixing and childhood leukaemia: Fallon and other US clusters. *Br J Cancer* [Internet]. 2004;91(1):1–3. Available from: <http://www.nature.com/articles/6601982>
68. Martín-Lorenzo A, Hauer J, Vicente-Dueñas C, Auer F, González-Herrero I, García-Ramírez I, et al. Infection exposure is a causal factor in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia as a result of Pax5-inherited susceptibility. *Cancer Discov*. 2015;5(12):1328–43.
69. da Conceição Nunes J, de Araujo GV, Viana MT, Sarinho ESC. Association of atopic diseases and parvovirus B19 with acute lymphoblastic leukemia in childhood and adolescence in the northeast of Brazil. *Int J Clin Oncol*. 2016;21(5):989–95.

70. Greaves MF. Aetiology of acute leukaemia. *Lancet*. 1997;349(9048):344–9.
71. Greaves M. Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(3):193–203.
72. Hwee J, Tait C, Sung L, Kwong JC, Sutradhar R, Pole JD. A systematic review and meta-analysis of the association between childhood infections and the risk of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Cancer* [Internet]. 2018;118(1):127–37. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2017.360>
73. Kantono M, Guo B. Inflammasomes and cancer: The dynamic role of the inflammasome in tumor development. *Front Immunol*. 2017;8(SEP):1–9.
74. Boddu P, Kantarjian H, Garcia-Manero G, Allison J, Sharma P, Daver N. The emerging role of immune checkpoint based approaches in AML and MDS. *Leuk Lymphoma* [Internet]. 2018;59(4):790–802. Available from: <https://doi.org/10.1080/10428194.2017.1344905>
75. Shang Y, Zhou F. Current Advances in Immunotherapy for Acute Leukemia: An Overview of Antibody, Chimeric Antigen Receptor, Immune Checkpoint, and Natural Killer. *Front Oncol*. 2019;9.
76. Abbas KA, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. Elsevier. Rio de Janeiro; 2015.
77. Yu CH, Moecking J, Geyer M, Masters SL. Mechanisms of NLRP1-Mediated Autoinflammatory Disease in Humans and Mice. *J Mol Biol* [Internet]. 2018;430(2):142–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2017.07.012>
78. Broz P, Dixit VM. Inflammasomes: Mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2016;16(7):407–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri.2016.58>
79. Lin XY, Choi MSK, Porter AG. Expression analysis of the human caspase-1 subfamily reveals specific regulation of the CASP5 gene by lipopolysaccharide and interferon- $\gamma$ . *J Biol Chem*. 2000;275(51):39920–6.
80. Man SM, Kanneganti TD. Converging roles of caspases in inflammasome activation, cell death and innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(1):7–21.
81. Kerur N, Veetil MV, Sharma-Walia N, Bottero V, Sadagopan S, Otageri P, et al. IFI16 acts as a nuclear pathogen sensor to induce the inflammasome in response to Kaposi Sarcoma-associated herpesvirus infection. *Cell Host Microbe*. 2011;9(5):363–75.
82. Yu C, Moecking J, Geyer M, Masters S. Mechanisms of NLRP1-Mediated Autoinflammatory Disease in Humans and Mice. *J Mol Biol*. 2018;430(2):142–52.
83. Lo C, De Andrea M, Borgogna C, Albertini S, Landini MM, Peretti A, et al.

- The Nuclear DNA Sensor IFI16 Acts as a Restriction Factor for Human Papillomavirus Replication through Epigenetic Modifications of the Viral Promoters. *J Virol.* 2015;89(15):7506–20.
84. Place DE, Kanneganti TD. Recent advances in inflammasome biology. *Curr Opin Immunol.* 2018;50:32–8.
  85. de Torre-Minguela C, del Castillo PM, Pelegrín P. The NLRP3 and pyrin inflammasomes: Implications in the pathophysiology of autoinflammatory diseases. *Front Immunol.* 2017;8(JAN).
  86. Strowig T, Henao-Mejia J, Elinav E, Flavell R. Inflammasomes in health and disease. Vol. 481, *Nature.* 2012. p. 278–86.
  87. Roberts TL, Idris A, Dunn JA, Kelly GM, Burnton CM, Hodgson S, et al. HIN-200 proteins regulate caspase activation in response to foreign cytoplasmic DNA. *Science (80- ).* 2009;323(5917):1057–60.
  88. Bürckstümmer T, Baumann C, Blüml S, Dixit E, Dürnberger G, Jahn H, et al. An orthogonal proteomic-genomic screen identifies AIM2 as a cytoplasmic DNA sensor for the inflammasome. *Nat Immunol.* 2009;10(3):266–72.
  89. Srinivasula SM, Poyet JL, Razmara M, Datta P, Zhang Z, Alnemri ES. The PYRIN-CARD protein ASC is an activating adaptor for caspase-1. *J Biol Chem.* 2002;277(24):21119–22.
  90. Proell M, Gerlic M, Mace PD, Reed JC, Riedl SJ. The CARD plays a critical role in ASC foci formation and inflammasome signalling. *Biochem J.* 2013;449(3):613–21.
  91. Gumucio DL, Diaz A, Schaner P, Richards N, Babcock C, Schaller M, et al. Fire and ICE: The role of pyrin domain-containing proteins in inflammation and apoptosis. *Clin Exp Rheumatol.* 2002;20(4 SUPPL. 26).
  92. Liepinsh E, Barbals R, Dahl E, Sharipo A, Staub E, Otting G. The death-domain fold of the ASC PYRIN domain, presenting a basis for PYRIN/PYRIN recognition. *J Mol Biol.* 2003;332(5):1155–63.
  93. Lu A, Magupalli VG, Ruan J, Yin Q, Atianand MK, Vos MR, et al. Unified polymerization mechanism for the assembly of ASC-dependent inflammasomes. *Cell.* 2014;156(6):1193–206.
  94. Liu X, Zhang Z, Ruan J, Pan Y, Magupalli VG, Wu H, et al. Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. *Nature.* 2016;535(7610):153–8.
  95. Labbé K, Saleh M. Cell death in the host response to infection. *Cell Death Differ.* 2008;15(9):1339–49.
  96. 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(1):1–11.



97. Jo E-K, Kim JK, Shin D-M, Sasakawa C. Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation. *Cell Mol Immunol*. 2016;13(2):148–59.
98. Duewell P, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Vladimer G, Bauernfeind FG, et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals that form early in disease. *Nature*. 2010;464(7293):1357–61.
99. Lin C, Zhang J. Inflammasomes in inflammation induced cancer. *Front Immunol*. 2017;8(MAR):1–22.
100. Pontillo A, Girardelli M, Kamada AJ, Pancotto JAT, Donadi EA, Crovella S, et al. Polymorphisms in inflammasome genes are involved in the predisposition to systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity*. 2012;45(4):271–8.
101. Vandanmagsar B, Youm Y-H, Ravussin A, Galgani J, Stadler K, Mynatt R, et al. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat Med*. 2010;17(2):181–8.
102. Albornoz EA, Woodruff TM, Gordon R. Inflammasomes: Clinical and Therapeutic Implications. 2018;108:41–60. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-89390-7>
103. Zoete MR De, Palm NW, Zhu S, Flavell RA. Inflammasomes. *Cold Spring Harbor Perspect Biol*. 2014;6:1–22.
104. Netea MG, Nold-Petry CA, Nold MF, Joosten LAB, Opitz B, Van Der Meer JHM, et al. Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1 $\beta$  in monocytes and macrophages. *Blood*. 2009;113(10):2324–35.
105. Man SM, Kanneganti T. Regulation of inflammasome activation. *Immunol Rev*. 2016;265(1):6–21.
106. Juliana C, Fernandes-Alnemri T, Kang S, Farias A, Qin F, Alnemri ES. Non-transcriptional priming and deubiquitination regulate NLRP3 inflammasome activation. *J Biol Chem*. 2012;287(43):36617–22.
107. Py BF, Kim MS, Vakifahmetoglu-Norberg H, Yuan J. Deubiquitination of NLRP3 by BRCC3 Critically Regulates Inflammasome Activity. *Mol Cell*. 2013;49(2):331–8.
108. Sborgi L, Ravotti F, Dandey VP, Dick MS, Mazur A, Reckel S, et al. Structure and assembly of the mouse ASC inflammasome by combined NMR spectroscopy and cryo-electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci*. 2015;112(43):13237–42.
109. Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature*. 2011;469:221–5.
110. Shimada K, Crother TR, Karlin J, Dagvadorj J, Chiba N, Chen S, et al. Oxidized Mitochondrial DNA Activates the NLRP3 Inflammasome during

- Apoptosis. *Immunity* [Internet]. 2012;36(3):401–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2012.01.009>
111. Muñoz-Planillo R, Kuffa P, Martínez-Colón G, Smith BL, Rajendiran TM, Núñez G. K<sup>+</sup> efflux is the Common Trigger of NLRP3 inflammasome Activation by bacterial toxins and particulate matter. *Immunity*. 2013;38(6):1142–53.
  112. Gurcel L, Abrami L, Girardin S, Tschopp J, van der Goot FG. Caspase-1 Activation of Lipid Metabolic Pathways in Response to Bacterial Pore-Forming Toxins Promotes Cell Survival. *Cell*. 2006;126(6):1135–45.
  113. Sluyter R. The P2X7 receptor. *Adv Exp Med Biol*. 2017;(1051):17–53.
  114. Kopp R, Krautloher A, Ramírez-Fernández A, Nicke A. P2X7 Interactions and Signaling – Making Head or Tail of It. *Front Mol Neurosci*. 2019;12(August):1–25.
  115. Salaro E, Rambaldi A, Falzoni S, Amoroso FS, Franceschini A, Sarti AC, et al. Involvement of the P2X7-NLRP3 axis in leukemic cell proliferation and death. *Sci Rep* [Internet]. 2016;6(1):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep26280>
  116. Liu Y, Liu X. Research progress of P2X7 receptor in inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* [Internet]. 2019;54(5):521–7. Available from: <https://doi.org/10.1080/00365521.2019.1609077>
  117. Guerra Martinez C. P2X7 receptor in cardiovascular disease: The heart side. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2019;46(6):513–26.
  118. Bent R, Moll L, Grabbe S, Bros M. Interleukin-1 beta—A friend or foe in malignancies? *Int J Mol Sci*. 2018;19(8).
  119. Saxena M, Yeretssian G. NOD-like receptors: Master regulators of inflammation and cancer. *Front Immunol*. 2014;5(JUL):1–16.
  120. Grandemange S, Sanchez E, Louis-Pence P, Tran Mau-Them F, Bessis D, Coubes C, et al. A new autoinflammatory and autoimmune syndrome associated with NLRP1 mutations: NAIAD (NLRP1- associated autoinflammation with arthritis and dyskeratosis). *Ann Rheum Dis*. 2017;76(7):1191–8.
  121. Zurawek M, Fichna M, Januszkiewicz-Lewandowska D, Gryczyńska M, Fichna P, Nowak J. A coding variant in NLRP1 is associated with autoimmune Addison's disease. *Hum Immunol*. 2010;71(5):530–4.
  122. Pontillo A, Reis EC, Bricher PN, Vianna P, Diniz S, Fernandes KS, et al. NLRP1 L155H polymorphism is a risk factor for preeclampsia development. *Am J Reprod Immunol*. 2015;73(6):577–81.
  123. Zhang A, Yu J, Yan S, Zhao X, Chen C, Zhou Y, et al. The genetic polymorphism and expression profiles of NLRP3 inflammasome in patients with chronic myeloid leukemia. *Hum Immunol*. 2018;79(1):57–62.

124. Verma D, Bivik C, Farahani E, Synnerstad I, Fredrikson M, Enerbäck C, et al. Inflammasome polymorphisms confer susceptibility to sporadic malignant melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2012;25(4):506–13.
125. Ungerbäck J, Belenki D, Jawad ul-hassan A, Fredrikson M, Fransén K, Elander N, et al. Genetic variation and alterations of genes involved in NF $\kappa$ B/TNFAIP3- and NLRP3-inflammasome signaling affect susceptibility and outcome of colorectal cancer. *Carcinogenesis.* 2012;33(11):2126–34.
126. Areeshi MY, Mandal RK, Panda AK, Haque S. Association of P2X7 A1513C (rs3751143) gene polymorphism with risk of tuberculosis: Evidence from a meta-analysis. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2013;17(9):662–8.
127. Vereczkei A, Abdul-Rahman O, Halmi Z, Nagy G, Szekely A, Somogyi A, et al. Association of purinergic receptor P2RX7 gene polymorphisms with depression symptoms. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry.* 2019;92(January):207–16.
128. Xiao W, Gong C, Liu X, Liu Y, Peng S, Luo D, et al. Association of P2X7R gene with serum lipid profiles in Chinese postmenopausal women with osteoporosis. *Climacteric.* 2019;22(5):498–506.
129. Taheri M, Sarani H, Moazeni-Roodi A, Naderi M, Hashemi M. Association between P2X7 polymorphisms and susceptibility to tuberculosis: An updated meta-analysis of case-control studies. *Med.* 2019;55(6).
130. Liu H, Han X, Li Y, Zou H, Xie A. Association of P2X7 receptor gene polymorphisms with sporadic Parkinson's disease in a Han Chinese population. *Neurosci Lett [Internet].* 2013;546:42–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2013.04.049>
131. Wang H, Hua M, Wang S, Yu J, Chen C, Zhao X, et al. Genetic polymorphisms of IL-18 rs1946518 and IL-1 $\beta$  rs16944 are associated with prognosis and survival of acute myeloid leukemia. *Inflamm Res.* 2017;66(3):249–58.
132. Xu H, Ding Q, Jiang HW. Genetic polymorphism of interleukin-1A (IL-1A), IL-1B, and IL-1 receptor antagonist (IL-1RN) and prostate cancer risk. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2014;15(20):8741–7.
133. Tulotta C, Lefley D V, Freeman K, Gregory WM, Hanby AM, Heath PR, et al. Endogenous production of IL-1B by breast cancer cells drives metastasis and colonisation of the bone microenvironment. *Clin Cancer Res [Internet].* 2019;2002–18. Available from: <http://clincancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1078-0432.CCR-18-2202>
134. Kolb R, Liu GH, Janowski AM, Sutterwala FS, Zhang W. Inflammasomes in cancer: A double-edged sword. *Protein Cell.* 2014;5(1):12–20.
135. Dunn JH, Ellis LZ, Fujita M. Inflammasomes as molecular mediators of inflammation and cancer: Potential role in melanoma. *Cancer Lett*

- [Internet]. 2012;314(1):24–33. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2011.10.001>
136. Takizawa H, Manz MG. Impact of inflammation on early hematopoiesis and the microenvironment. *Int J Hematol*. 2017;106(1):27–33.
  137. Hemmati S, Haque T, Gritsman K. Inflammatory Signaling Pathways in Preleukemic and Leukemic Stem Cells. *Front Oncol* [Internet]. 2017;7(November). Available from:  
<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2017.00265/full>
  138. Kristinsson SY, Landgren O, Samuelsson J, Björkholm M, Goldin LR. Autoimmunity and the risk of myeloproliferative neoplasms. *Haematologica*. 2010;95(7):1216–20.
  139. Kristinsson SY, Björkholm M, Hultcrantz M, Derolf ÅR, Landgren O, Goldin LR. Chronic immune stimulation might act as a trigger for the development of acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol*. 2011;29(21):2897–903.
  140. Raaijmakers MHGP. Niche contributions to oncogenesis: Emerging concepts and implications for the hematopoietic system. *Haematologica*. 2011;96(7):1041–8.
  141. Seth M, Motti G, Donald M, Simon P, Marc P, O'Donnell J, et al. NLRP1 inflammasome activation induces pyroptosis of hematopoietic progenitor cells. *Immunity*. 2012;37(6):82–91.
  142. Paugh SW, Bonten EJ, Savic D, Ramsey LB, Thierfelder WE, Gurung P, et al. NALP3 inflammasome upregulation and CASP1 cleavage of the glucocorticoid receptor cause glucocorticoid resistance in leukemia cells. *Nat Genet*. 2015;
  143. Paugh SW, Bonten EJ, Evans WE. Inflammasome-mediated glucocorticoid resistance: The receptor rheostat. *Mol Cell Oncol* [Internet]. 2016;3(1):1–3. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1080/23723556.2015.1065947>
  144. Wu J y., Zeng LY. Role of NLRP1 in blood disorders. *Zhongguo Shi Yan Ye Xue Za Zhi*. 2014;5:1476–9.
  145. Folwaczny M, Glas J, Török HP, Tonenchi L, Paschos E, Bauer B, et al. Polymorphisms of the interleukin-18 gene in periodontitis patients. *J Clin Periodontol*. 2005;32(5):530–4.
  146. Bhat IA, Naykoo NA, Qasim I, Ganie FA, Yousuf Q, Bhat BA, et al. Association of interleukin 1 beta (IL-1 $\beta$ ) polymorphism with mRNA expression and risk of non small cell lung cancer. *Meta Gene* [Internet]. 2014;2(1):123–33. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.mgene.2013.12.002>
  147. Greaves M. A causal mechanism for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2018;18(8):471–84.

148. Karki R, Man SM, Kanneganti TD. Inflammasomes and cancer. *Cancer Immunol Res*. 2017;5(2):94–9.
149. He Q, Fu Y, Tian D, Yan W. The contrasting roles of inflammasomes in cancer. *Am J Cancer Res* [Internet]. 2018;8(4):566–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29736304><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5934549>
150. Moossavi M, Parsamanesh N, Bahrami A, Atkin SL, Sahebkar A. Role of the NLRP3 inflammasome in cancer. *Mol Cancer*. 2018;17(1):1–13.
151. Awad F, Assrawi E, Louvrier C, Jumeau C, Georgin-Lavialle S, Grateau G, et al. Inflammasome biology, molecular pathology and therapeutic implications. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2018;187:133–49. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.02.011>
152. Platnich JM, Muruve DA. NOD-like receptors and inflammasomes: A review of their canonical and non-canonical signaling pathways. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 2019;670:4–14. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2019.02.008>
153. Fan J, Xie K, Wang L, Zheng N, Yu X. Roles of Inflammasomes in Inflammatory Kidney Diseases. *Mediators Inflamm*. 2019;2019:2923072.
154. Raza Y, Khan A, Khan AI, Khan S, Akhter S, Mubarak M, et al. Combination of Interleukin 1 Polymorphism and Helicobacter pylori Infection: an Increased Risk of Gastric Cancer in Pakistani Population. *Pathol Oncol Res* [Internet]. 2017;23(4):873–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s12253-017-0191-9>
155. Tak KH, Yu GI, Lee MY, Shin DH. Association between polymorphisms of interleukin 1 family genes and hepatocellular carcinoma. *Med Sci Monit*. 2018;24:3488–95.
156. Yin C, He N, Li P, Zhang C, Yu J, Hua M, et al. Polymorphisms of Interleukin-1 $\beta$  rs16944 confer susceptibility to myelodysplastic syndromes. *Life Sci*. 2016;165:109–12.
157. Gore EA, Sanders JJ, Pandey JP, Palesch Y, Galbraith GMP. Interleukin-1 $\beta$ +3953 allele 2: Association with disease status in adult periodontitis. *J Clin Periodontol*. 1998;25(10):781–5.
158. Umare V, Pradhan V, Rajadhyaksha A, Ghosh K, Nadkarni A. Predisposition of IL-1 $\beta$  (-511 C/T) polymorphism to renal and hematologic disorders in Indian SLE patients. *Gene* [Internet]. 2018;641:41–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2017.10.039>
159. Arranz L, Arriero M del M, Villatoro A. Interleukin-1 $\beta$  as emerging therapeutic target in hematological malignancies and potentially in their complications. *Blood Rev* [Internet]. 2017;31(5):306–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.blre.2017.05.001>
160. Pietras EM, Mirantes-Barbeito C, Fong S, Loeffler D, Kovtonyuk L V.,

- Zhang S, et al. Chronic interleukin-1 drives haematopoietic stem cells towards precocious myeloid differentiation at the expense of self-renewal. *Nat Cell Biol.* 2016;18(6):607–18.
161. Hasselbalch HC. Chronic inflammation as a promotor of mutagenesis in essential thrombocythemia, polycythemia vera and myelofibrosis. A human inflammation model for cancer development? *Leuk Res* [Internet]. 2013;37(2):214–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.leukres.2012.10.020>
  162. Nakamura K, Kassem S, Cleyne A, Chrétien ML, Guillerey C, Putz EM, et al. Dysregulated IL-18 Is a Key Driver of Immunosuppression and a Possible Therapeutic Target in the Multiple Myeloma Microenvironment. *Cancer Cell.* 2018;33(4):634-648.e5.
  163. Yalçın S, Mutlu P, Çetin T, Sarper M, Özgür G, Avcu F. The -137G/C Polymorphism in Interleukin-18 Gene Promoter Contributes to Chronic Lymphocytic and Chronic Myelogenous Leukemia Risk in Turkish Patients. *Turkish J Hematol.* 2015;32(4):311–6.
  164. Masters SL, Gerlic M, Metcalf D, Preston S, Pellegrini M, O'Donnell JA, et al. NLRP1 Inflammasome Activation Induces Pyroptosis of Hematopoietic Progenitor Cells. *Immunity* [Internet]. 2012;37(6):1009–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2012.08.027>
  165. Xu Z, Wang H, Wei S, Wang Z, Ji G. Inhibition of ER stress-related IRE1 $\alpha$ /CREB/NLRP1 pathway promotes the apoptosis of human chronic myelogenous leukemia cell. *Mol Immunol* [Internet]. 2018;101(83):377–85. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.07.002>
  166. Clarke RT, Van Den Bruel A, Bankhead C, Mitchell CD, Phillips B, Thompson MJ. Clinical presentation of childhood leukaemia: A systematic review and meta-analysis. *Arch Dis Child.* 2016;101(10):894–901.
  167. Witola WH, Mui E, Hargrave A, Liu S, Hypolite M, Montpetit A, et al. NALP1 influences susceptibility to human congenital toxoplasmosis, proinflammatory cytokine response, and fate of *Toxoplasma gondii*-infected monocytic cells. *Infect Immun.* 2011;79(2):756–66.
  168. Clay GM, Wilson ME. NLR proteins and parasitic disease. *Immunol Res.* 2016;59:142–52.
  169. Feng W, Yang F, Wang R, Yang X, Wang L, Chen C, et al. High Level P2X7-Mediated Signaling Impairs Function of Hematopoietic Stem/Progenitor Cells. *Stem Cell Rev Reports* [Internet]. 2016;12(3):305–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s12015-016-9651-y>
  170. 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(4):2079–86.

171. Thunberg U, Tobin G, Johnson A, Söderberg O, Padyukov L, Hultdin M, et al. Polymorphism in the P2X7 receptor gene and survival in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet*. 2002;360(9349):1935–9.
172. Moreira-Souza ACA, Almeida-da-Silva CLC, Rangel TP, Rocha G da C, Bellio M, Zamboni DS, et al. The P2X7 receptor mediates *Toxoplasma gondii* Control in Macrophages through canonical NLRP3 inflammasome activation and reactive oxygen species production. *Front Immunol*. 2017;8(OCT).

## 7. APÊNDICE

### 7.1 Apêndice 01. Equipe do projeto

Nome	Carga horária	Função	Atividade no projeto
Fabíola Silva Alves	40h	Biomédica	Mestranda
Allyson Guimarães da Costa	4h	Enfermeiro	Orientadora
Adriana Malheiro Alle Marie	4h	Bióloga	Coorientadora
Andréa Monteiro Tarragô	4h	Farmacêutica-Bioquímica	Colaboradora
Aya Sadahiro	4h	Farmacêutica-Bioquímica	Colaboradora
Daniele de Sá Pereira	4h	Graduanda em Biomedicina	Colaboradora
Fábio Magalhães da Gama	4h	Biomédico	Colaborador
Gláucia Lima de Souza	4h	Biomédica	Colaboradora
Lilyane de Amorim Xabregas	4h	Biomédica	Colaboradora
Marlon Wendell Athaydes Kerr	4h	Biomédico	Colaborador
Maurício Morishi Ogusku	4h	Farmacêutico-Bioquímico	Colaborador
Mirian Rodrigues Ribeiro Santiago	4h	Farmacêutica-Bioquímica	Colaboradora
Nadja Pinto Garcia	4h	Farmacêutica-Bioquímica	Colaboradora

## 7.2 Apêndice 02. Financiamento do projeto

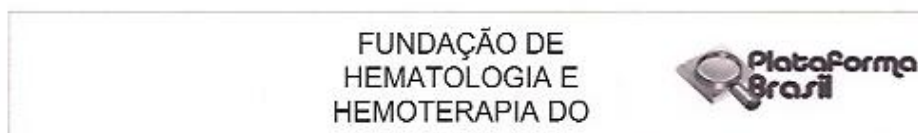
Descrição	Unidade	Valor Unitário	Subtotal
Ponteiras com filtro 10uL, 100 uL, 200uL, 1000 uL	30	R\$ 70,00	R\$ 2.100,00
Placas de qPCR	20	R\$ 430,00	R\$ 8.600,00
Ensaio TAQMAN NLRP1	2	R\$ 1.621,67	R\$ 3.243,24
Ensaio TAQMAN NLRP3	2	R\$ 1.621,67	R\$ 3.243,24
Agarose 500g	1	R\$ 2.367,53	R\$ 2.367,53
Brometo de etídio 5g	1	R\$ 351,40	R\$ 351,40
Taq DNA Polimerase	1	R\$ 425,00	R\$ 425,00
Enzimas de restrição	2	R\$ 1.000	R\$ 2.000
Luvas de procedimento	3	R\$ 70,00	R\$ 210,00
Tubo eppendorf 0,2 mL para PCR	2	R\$ 55,29	R\$ 110,58
Tubo eppendorf 1,5 mL	1	R\$ 19,04	R\$ 19,04
TaqMan™ Universal PCR Master Mix	2	R\$ 2.408,96	R\$ 4.817,92
<b>TOTAL</b>	-	-	<b>R\$ 27.477,95</b>

Este projeto será desenvolvido com recursos provenientes de Projeto de Pesquisa aprovado no Âmbito do Programa de Apoio à Consolidação das Instituições Estaduais de Ensino e/ou Pesquisa (PRÓ-ESTADO), Resolução N° 002/2008, da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM).



### 7.3 Apêndice 03. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa - CEP-HEMOAM

#### 7.3.1 Amostras Grupo Controle (CAAE:49652815.8.0000.0009) e (CAAE:0024.0.112.000-10)



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** IDENTIFICAÇÃO E SELEÇÃO DE PEPITÍDEOS MIMÉTICOS REATIVOS AOS SOROS DE PACIENTES HCV+ E SUA INFLUÊNCIA NO DESENVOLVIMENTO DA FIBROSE HEPÁTICA IN VITRO

**Pesquisador:** ANDRÉA MONTEIRO TARRAGÔ

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 49652815.8.0000.0009

**Instituição Proponente:** Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.406.965

##### Apresentação do Projeto:

**Projeto de Pesquisa:** IDENTIFICAÇÃO E SELEÇÃO DE PEPITÍDEOS MIMÉTICOS REATIVOS AOS SOROS DE PACIENTES HCV+ E SUA INFLUÊNCIA NO DESENVOLVIMENTO DA FIBROSE HEPÁTICA IN VITRO

Trata-se de um estudo descritivo, transversal constituindo subprojeto de um estudo maior da linha de pesquisa sobre Biotecnologia & Saúde

intitulado: "Desenvolvimento de tecnologias aplicadas ao diagnóstico e terapia de doenças infecciosas tropicais", que será desenvolvido pelos

grupos de Pesquisa "Virologia" da Universidade Federal do Pará – UFPA, em parceria com os grupos "Imunologia Básica e Aplicada" da

Universidade Federal do Amazonas e "Nanotecnologia" da Universidade Federal de Uberlândia- UFU. Ainda teremos apoio das Universidade da

Califórnia (UCDAVIS) e da Universidade de Miami(UM). Aprovado pelo Edital Pró-Amazônia n. 047/2012,

##### Objetivo da Pesquisa:

**Objetivo Primário:**

• Determinar a reatividade em soro de indivíduos HCV+ para peptídeos miméticos ao HCV identificados pela técnica phage display e caracterizar o

**Endereço:** Av. Constantino Nery 4397 BLD Dir Ens Pesq  
**Bairro:** Chapada **CEP:** 69.050-002  
**UF:** AM **Município:** MANAUS  
**Telefone:** (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cep@hemocem.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE  
HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 1.408.965

perfil de citocinas envolvidas no desenvolvimento de fibrose hepática em cultura de células

**Objetivo Secundário:**

- Selecionar e identificar peptídeos miméticos reativos a soros de pacientes HCV+ com fibrose hepática;
- Sequenciar os clones isolados e realizar análises de bioinformática;
- Descrever o perfil de citocinas envolvidos no desenvolvimento da fibrose em cultura de células mesenquimais e hepatócitos;
- Pré-validar os clones selecionados através de ensaios de Phage-ELISA utilizando proteínas totais de pacientes com fibrose hepática;

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:**

Risco de contaminação dos colaboradores da pesquisa com sangue contaminado com o vírus da Hepatite C

**Benefícios:** Conseguir desenvolver peptídeos que possam ser utilizados posteriormente em biossensores capazes de detectar proteínas presente em soro de

pacientes que possam prever e servir de biomarcadores para diagnóstico de fibrose.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pesquisa Relevante que busca detectar marcadores que auxiliem na detecção de peptídeos miméticos ao vírus da hepatite C capazes de prever fibrose utilizando tecnologias combinadas em engenharia genética, como Phage Display com o intuito de gerar estratégias direcionadas para a investigação do processo do desenvolvimento da fibrose.

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

Todos os termos foram apresentados

**Recomendações:**

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

Aprovado

**Considerações Finais a critério do CEP:**

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

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_P	09/09/2015	-	Aceito

Endereço: Av. Constantino Nery 4397 Bl.D Dir Ens Pesq  
Bairro: Chapada CEP: 69.050-002  
UF: AM Município: MANAUS  
Telefone: (92)3655-0114 Fax: (92)3655-0112 E-mail: cep@hemoam.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE  
HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 1.408.965

Básicas do Projeto	ETO_579290.pdf	15:35:04		Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	09/09/2015 15:32:42	ANDRÉA MONTEIRO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	09/09/2015 15:30:02	ANDRÉA MONTEIRO TARRAGÓ	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	09/09/2015 15:26:05	ANDRÉA MONTEIRO TARRAGÓ	Aceito
Declaração de Pesquisadores	anuencias.pdf	09/09/2015 15:21:14	ANDRÉA MONTEIRO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	anuencias.docx	09/09/2015 14:46:19	ANDRÉA MONTEIRO	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

MANAUS, 12 de Fevereiro de 2016

---

Assinado por:  
**Elisa Brosina de Leon**  
(Coordenador)

Endereço: Av. Constantino Nery 4397 BLD Dir Ens Pesq  
Bairro: Chapada CEP: 69.050-002  
UF: AM Município: MANAUS  
Telefone: (92)3655-0114 Fax: (92)3655-0112 E-mail: csp@hemoam.am.gov.br



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP**  
**CAAE- 0024.0.112.000-10 - VERSÃO 002/10**

<b>IDENTIFICAÇÃO</b>	
<b>Título:</b>	Avaliação do perfil celular, humoral e molecular em doadores de sangue com sorologia reativa ao vírus da hepatite B (HBV) na cidade de Manaus.
<b>Instituição:</b>	Fundação HEMOAM
<b>Pesquisador:</b>	Laura Patricia Viana Maia
<b>Data da Reapresentação:</b>	06.10.2010

<b>OBJETIVOS</b>	
<b>Geral:</b>	Avaliar o perfil celular, humoral e molecular em doadores de sangue com sorologia reativa ao vírus da hepatite B (HBV) na cidade de Manaus.
<b>Específico:</b>	Avaliar a soroprevalência de doadores de sangue com sorologia reativa ao vírus da hepatite B, através dos marcadores HBsAg e/ou anti-HBc; Analisar o perfil celular dos linfócitos T CD3+/CD4+ e CD3+/CD8+; Analisar a sub-população de leucócitos ativadas através do marcador CD69+ (linfócitos, eosinófilos, basófilos e monócitos); Analisar a sub-população linfócitos T reguladores através do marcador CD25+; Avaliar o perfil de citocinas TH1 (IL12 e IFN- $\gamma$ ); citocinas Th2 (IL-4); citocina supressora (IL-10) e citocinas inflamatórias (IL-6, IL-8 e TNF - $\alpha$ ); f - Caracterizar os genótipos virais na população de doadores e correlacionar com a resposta imune encontrada.

<b>SUMÁRIO DO PROJETO</b>	
<b>Metodologia:</b>	Trata-se de um estudo observacional descritivo do tipo não-probabilístico que será realizado com doadores de sangue com sorologia positiva para HBsAg e/ou anti-HBc no período de novembro de 2010 a abril de 2011, com uma amostra de 123 doações reativas.
<b>Caracterização da Amostra:</b>	Trata-se de um estudo observacional descritivo do tipo não-probabilística que será realizado com todos os doadores de sangue com sorologia positiva para HBsAg e/ou anti-HBc do vírus da hepatite B no período de setembro de 2010 a setembro de 2011, totalizando 1.396 doadores (valor estimado).
<b>Crítérios de Inclusão</b>	Doadores de sangue com sorologia positiva para HBsAg e/ou anti-HBc, de ambos os sexos, com idade entre 18 e 65 anos e os que apresentarem

FUNDAÇÃO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO AMAZONAS – HEMOAM  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
AV. CONSTANTINO NERY, 4397 – CHAPADA – CEP 69050-002 – MANAUS/AMAZONAS  
FONE (92) 3655-0113 FAX (92) 3655-0112  
E-mail: cep\_hemoam@hotmail.com



	co-infecção (sífilis, doença de chagas, HCV, HIV e HTLV).
<b>Critérios de Exclusão</b>	Doadores que apresentarem resultados negativos para ambos os marcadores da hepatite B na segunda amostra de sangue.

**COMENTÁRIOS DO CEP FRENTE À RESOLUÇÃO CNS 196/96 E RESOLUÇÕES COMPLEMENTARES**

Na análise do protocolo observou-se que os autores responderam aos questionamentos descritos no parecer anterior.

**PARECER DO CEP**

**Projeto Aprovado.** Conforme determinado pela resolução CNS 196/96 os pesquisadores deverão apresentar a este CEP relatórios parcial e/ou final, ficando determinado desde então, o prazo para apresentação de relatório: 27/04/2011. Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem se apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. O termo de Consentimento deverá ser aplicado em duas vias sendo que uma delas ficará com o sujeito da pesquisa.

<b>SITUAÇÃO</b>	<b>DATA DO PARECER</b>
APROVADO	26.10.2010



### 7.3.2 Amostras Grupo Caso (CAAE: 12615918.9.0000.0009)

FUNDAÇÃO DE  
HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA DO



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Estudo dos polimorfismos nos genes dos receptores e citocinas da imunidade inata em pacientes diagnosticados com leucemia linfóide aguda **Pesquisador:** Fabiola Silva Alves **Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 12615918.9.0000.0009

**Instituição Proponente:**FUNDAÇÃO DE APOIO AO HEMOAM SANGUE NATIVO

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.393.207

##### Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo longitudinal, analítico e descritivo, para avaliar a influência dos polimorfismos nos genes dos receptores TLRs, NLRPs e citocinas inflamatórias IL-1 e IL-18 em pacientes diagnosticados com Leucemia Linfóide Aguda (LLA). A amostragem será composta por aproximadamente 200 indivíduos diagnosticados com LLA no período de 2010 a 2017. As amostras de DNA serão obtidas da DNAteca do Laboratório de Tipagem de HLA da Fundação HEMOAM. Os dados clínicos e laboratoriais dos pacientes incluídos no estudo serão obtidos no Sistema de Atendimento Médico e Estatístico (SAME), Sistema iDoctor e Setor de Estatística da Fundação HEMOAM. Serão incluídos pacientes diagnosticados com Leucemia Linfóide Aguda, de faixa etária geral e que possuem amostras criopreservadas no laboratório de tipagem de HLA da Fundação HEMOAM.

##### Objetivo da Pesquisa:

Os objetivos são exequíveis e estão coerentes com a proposta:

**Objetivo Primário:** Avaliar a influência dos polimorfismos nos genes dos receptores TLRs, NLRPs e citocinas inflamatórias IL-1 e IL-18 em pacientes diagnosticados com Leucemia Linfóide Aguda (LLA).

**Objetivo Secundário:**

**Endereço:** Av. Constantino Nery, 4397, Bl. A, Sala do CEP-HEMOAM

**Bairro:** Chapada **CEP:** 69.050-002

**UF:** AM **Município:** MANAUS

**Telefone:** (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cephemoam@gmail.com

FUNDAÇÃO DE  
HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA DO



Página 01 de

1. Estimar a frequência dos polimorfismos nos genes dos receptores Toll-like TLR1, TLR4, TLR5, TLR6, TLR9, CD14 e nos genes NLRP1, NLRP3, IL1 e IL18 em indivíduos diagnosticados com LLA; 2. Associar os polimorfismos dos genes Toll-like TLR1, TLR4, TLR5, TLR6, TLR9, CD14 e nos genes NLRP1, NLRP3, IL1 e IL18 com as manifestações clínicas e laboratoriais em indivíduos diagnosticados com LLA; 3. Investigar a associação dos polimorfismos nos genes dos receptores Toll-like TLR1, TLR4, TLR5, TLR6, TLR9, CD14 e nos genes NLRP1, NLRP3, IL1 e IL18 com grupos de risco, doença residual mínima e óbito em indivíduos diagnosticados com LLA; 4. Relacionar os polimorfismos nos genes dos receptores Toll-like TLR1, TLR4, TLR5, TLR6, TLR9, CD14 e nos genes NLRP1, NLRP3, IL1 e IL18 com a evolução clínica dos pacientes com LLA.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

No parecer anterior foi solicitado que o proponente da pesquisa fizesse a adequação na descrição dos riscos e benefícios. As alterações foram realizadas conforme segue descrito:

Os riscos da pesquisa caracterizam-se por perda de amostras, de informações dos pacientes e quebra de sigilo. A fim de evita-los, as amostras serão identificadas e armazenadas corretamente tornando-se viáveis para estudos futuros. Os dados pessoais dos participantes da pesquisa serão armazenados em planilha do software Microsoft Excel, acessível somente aos pesquisadores do estudo em estado de sigilo e garantindo a não utilização das informações em prejuízo das pessoas e/ou das comunidades.

Benefícios: Esse estudo contribuirá para um melhor entendimento dos mecanismos imunogenéticos da Leucemia Linfóide Aguda, proporcionando dados básicos para pesquisas futuras que proporcionarão melhorias nas condutas terapêuticas aplicadas.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Foi solicitada a dispensa do TCLE, pois, trata-se de pesquisa retrospectiva com utilização de amostras de DNA do laboratório de HLA da Fundação HEMOAM coletadas entre 2010 A 2017.

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

Os termos de apresentação obrigatória que foram anexados atendem a legislação vigente. Foram apresentados:

1. Cartas de anuência da Instituição Participante e do Setor envolvido.
2. Projeto Detalhado
3. Carta de Encaminhamento ao CEP
4. Solicitação de dispensa do TCLE
5. Orçamento

**Endereço:** Av. Constantino Nery, 4397, Bl. A, Sala do CEP-HEMOAM  
**Bairro:** Chapada **CEP:** 69.050-002  
**UF:** AM **Município:** MANAUS  
**Telefone:** (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cephemoam@gmail.com

FUNDAÇÃO DE  
HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA DO



Página 02 de

- 6. Declaração dos Pesquisadores
- 7. Cronograma
- 8. Folha de Rosto

Em parecer anterior foi solicitado que o proponente apresentasse a carta de anuência do Laboratório de Tipagem de HLA da Fundação HEMOAM. A adequação foi atendida e o documento encontra-se anexado na Plataforma Brasil.

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

Após análise ética do protocolo apresentado, foi constatado que as pendências ou inadequações da proposta anterior (Descrição adequada dos riscos da pesquisa e a apresentação da carta de anuência do setor em que as amostras de DNA encontram-se armazenadas) foram todas sanadas. Sendo assim, este colegiado foi favorável à aprovação da proposta.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

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

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_1240837.pdf	02/06/2019 13:00:35		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_detalhado.pdf	02/06/2019 12:59:35	Fabiola Silva Alves	Aceito
Outros	Carta_anuencia_HLA.pdf	02/06/2019 12:58:19	Fabiola Silva Alves	Aceito
Outros	carta_de_encaminhamento_ao_cep.pdf	26/11/2018 11:58:00	Fabiola Silva Alves	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	dispensa_TCLE.pdf	26/11/2018 11:57:18	Fabiola Silva Alves	Aceito
Orçamento	Orçamento.pdf	26/11/2018 11:56:25	Fabiola Silva Alves	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracao_de_pesquisadores.pdf	26/11/2018 11:55:44	Fabiola Silva Alves	Aceito

Página 04 de

**Endereço:** Av. Constantino Nery, 4397, Bl. A, Sala do CEP-HEMOAM  
**Bairro:** Chapada **CEP:** 69.050-002  
**UF:** AM **Município:** MANAUS  
**Telefone:** (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cephemoam@gmail.com

04



FUNDAÇÃO DE  
HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA DO



Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	declaracao_de_manuseio_de_amstras_biologicas.pdf	26/11/2018 11:54:06	Fabiola Silva Alves	Aceito
---	--	------------------------	---------------------	--------

Página 03 de

Declaração de Instituição e Infraestrutura	termo_de_anuencia.pdf	26/11/2018 11:53:45	Fabiola Silva Alves	Aceito
Cronograma	cronograma.pdf	26/11/2018 11:53:23	Fabiola Silva Alves	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	26/11/2018 10:44:12	Fabiola Silva Alves	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

MANAUS, 14 de Junho de 2019

---

**Assinado por:**  
**Adriana Malheiro**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** Av. Constantino Nery, 4397, Bl. A, Sala do CEP-HEMOAM**Bairro:** Chapada **CEP:** 69.050-002**UF:** AM **Município:** MANAUS**Telefone:** (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cephemoam@gmail.com

## 7.4 Apêndice 04. Protocolos PCR-RFLP

### 7.4.1 IL-1 $\beta$

#### POP1 – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para *rs16944 IL-1 $\beta$*

##### 1. CONSIDERAÇÕES NECESSÁRIAS PARA EXECUÇÃO DO PROCEDIMENTO:

- 1.1. A reação de PCR se faz por meio de protocolo adaptado da metodologia descrita pelo Bhat e colaboradores (2014);
- 1.2. Reservar os equipamentos necessários (Fluxo laminar e termociclador).
- 1.3. Antes de iniciar, o executor deverá estar usando os EPIs adequados para área de pré-PCR: jaleco, sapato fechado, pró-pé, touca, máscara e luvas.

##### 2. PROCEDIMENTO:

- 2.1. Inicialmente, realizar a limpeza do fluxo laminar, ligar a UV por 15min.
- 2.2. Separar os reagentes para a PCR e esperar descongelar.
- 2.3. Identificar os microtubos de 0,2 mL para cada amostra de DNA a ser sintetizada;
- 2.4. Preparar mix de PCR conforme a tabela abaixo:

Reagentes	Concentração	1 Reação Volume (μL)	Mix _____ Reações Volume (μL)
H <sub>2</sub> O	-	17,4 μL	
Buffer 10X PCR	1x	2,5 μL	
dNTPs	200 μM	1,0 μL	
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM	1,0 μL	
Taq DNA	0,1 μM	0,1 μL	
Primer <i>IL-1<math>\beta</math></i> F	1,5 mM	0,5 μL	
Primer <i>IL-1<math>\beta</math></i> F	0,1 μM	0,5 μL	

- 2.5. Adicionar 23 μL do mix de PCR nos microtubos pré-identificados.
- 2.6. Acrescentar 2,0 μL de DNA da amostra e homogeneizar bem.  
*Nota:* Realizar essa etapa de forma rápida a fim de conservar o potencial da Taq DNA Polimerase.
- 2.7. Levar os tubos ao termociclador na sala Pós-PCR e utilizar o programa de ciclagem descrito abaixo:

Temperatura	Tempo	Ciclo
95°C	4':00"	1
95°C	0:30"	35
56°C	0:30"	
72°C	0:30"	
72°C	10':00"	1
4°C	∞	1

- 2.8. Após a reação de PCR, realizar a reação de restrição descrita no POP2.

#### POP2 – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR-RFLP) para *rs16944 IL-1 $\beta$*

##### 1. CONSIDERAÇÕES NECESSÁRIAS PARA EXECUÇÃO DO PROCEDIMENTO:

- 1.1. A reação de PCR-RFLP se faz por meio de protocolo adaptado da metodologia descrita pelo Bhat e colaboradores (2014);
- 1.2. Reservar os equipamentos necessários (Fluxo laminar e termobloco).
- 1.3. Antes de iniciar, o executor deverá estar usando os EPIs adequados para área de Pós-PCR: jaleco, sapato fechado e luvas.

##### 2. PROCEDIMENTO:

- 2.1. Inicialmente, realizar a limpeza do fluxo laminar, ligar a UV por 15min.
- 2.2. Identificar e distribuir os microtubos de 0,2 mL em rack específica.
- 2.3. Preparar mix da reação de restrição conforme a tabela abaixo:

Reagentes	Concentração	1 Reação Vol (μL)	Mix _____ Reações Vol (μL)
H <sub>2</sub> O	-	7,8 μL	
Buffer 4 10X	1x	2,0 μL	
Enzima <i>AvaI</i>	2 U	0,2 μL	

- 2.4. Adicionar 15,0μL de Produto de PCR de cada amostra nos tubos previamente identificados;
- 2.5. Adicionar 10 μL da Mix da Reação de Restrição nos tubos e homogeneizar;  
*Nota:* Realizar essa etapa de forma rápida a fim de conservar o potencial da enzima;
- 2.6. Levar os microtubos ao termobloco e deixar por *overnight* ou 16 horas a 37°C.

## 7.4.2 IL-18

### POP3 – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para *rs187238 IL-18*

#### 1. CONSIDERAÇÕES NECESSÁRIAS PARA EXECUÇÃO DO PROCEDIMENTO:

- 1.1. A reação de PCR se faz por meio de protocolo descrito por Folwaczny e colaboradores (2005) modificado por Kumar e colaboradores (2014).
- 1.2. Reservar os equipamentos necessários (Fluxo laminar e termociclador).
- 1.3. Antes de iniciar, o executor deverá estar usando os EPIs adequados para área de pré-PCR: jaleco, sapato fechado, pró-pé, touca, máscara e luvas.

#### 2. PROCEDIMENTO:

- 2.1. Inicialmente, realizar a limpeza do fluxo laminar, ligar a UV por 15min.
- 2.2. Separar os reagentes para a PCR e esperar descongelar.
- 2.3. Identificar os microtubos de 0,2 mL para cada amostra de DNA a ser sintetizada;
- 2.4. Preparar mix de PCR conforme a tabela abaixo:

Reagentes	Concentração	1 Reação Volume (µL)	Mix _____ Reações Volume (µL)
H <sub>2</sub> O	-	17,4 µL	
Buffer 10X PCR	1x	2,5 µL	
dNTPs	200 µM	1,0 µL	
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM	1,0 µL	
Taq DNA	0,1 µM	0,1 µL	
Primer <i>IL-18F</i>	1,5 mM	0,5 µL	
Primer <i>IL-18F</i>	0,1 µM	0,5 µL	

- 2.5. Adicionar 23 µL do mix de PCR nos microtubos pré-identificados.
- 2.6. Acrescentar 2,0 µL de DNA da amostra e homogeneizar bem.  
*Nota:* Realizar essa etapa de forma rápida a fim de conservar o potencial da Taq DNA Polimerase.
- 2.7. Levar os tubos ao termociclador na sala Pós-PCR e utilizar o programa de ciclagem descrito abaixo:

Temperatura	Tempo	Ciclo
95°C	15':00"	1
94°C	0:30"	35
60°C	0:30"	
72°C	1:30"	
72°C	10':00"	1
4°C	∞	1

- 2.8. Após a reação de PCR, realizar a reação de restrição descrita no POP4.

### POP4 – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR-RFLP) para *rs187238 IL-18*

#### 1. CONSIDERAÇÕES NECESSÁRIAS PARA EXECUÇÃO DO PROCEDIMENTO:

- 1.1. A reação de PCR-RFLP se faz por meio de protocolo descrito por Folwaczny e colaboradores (2005) e modificado por Kumar e colaboradores (2014).
- 1.2. Reservar os equipamentos necessários (Fluxo laminar e termobloco).
- 1.3. Antes de iniciar, o executor deverá estar usando os EPIs adequados para área de Pós-PCR: jaleco, sapato fechado e luvas.

#### 2. PROCEDIMENTO:

- 2.1. Inicialmente, realizar a limpeza do fluxo laminar, ligar a UV por 15min.
- 2.2. Identificar e distribuir os microtubos de 0,2 mL em rack específica.
- 2.3. Preparar mix da reação de restrição conforme a tabela abaixo:

Reagentes	Concentração	1 Reação Vol (µL)	Mix _____ Reações Vol (µL)
H <sub>2</sub> O	-	7,8 µL	
Buffer 4 10X	1x	2,0 µL	
Enzima <i>MboII</i>	2 U	0,2 µL	

- 2.4. Adicionar 15,0µL de Produto de PCR de cada amostra nos tubos previamente identificados;
- 2.5. Adicionar 10 µL da Mix da Reação de Restrição nos tubos e homogeneizar;  
*Nota:* Realizar essa etapa de forma rápida a fim de conservar o potencial da enzima;
- 2.6. Levar os microtubos ao termobloco e deixar por *overnight* ou 16 horas a 37°C.

### 7.4.3 Gel de agarose para *IL1β* e *IL18*

**POP5 – Gel de agarose para *rs16944 IL-1β* e *rs187238 IL-18***

#### **1. CONSIDERAÇÕES NECESSÁRIAS PARA EXECUÇÃO DO PROCEDIMENTO:**

- 1.1. Reservar os equipamentos necessários (Fluxo laminar e termobloco).
- 1.2. Antes de iniciar, o executor deverá estar usando os EPIs adequados para área de Pós-PCR: jaleco, sapato fechado e luvas.

#### **2. PROCEDIMENTO**

- 2.1 Diluir o TBE 10X em TBE 1X. Com uma proveta separar 100ml de TBE 1X;
- 2.2 Pesar 3g agarose (*rs16944 IL-1β*) ou 2,5g (*rs187238 IL-18*)
- 2.3 Limpar a cuba horizontal que será utilizada e separar os pentes;
- 2.4 Dissolver a agarose em 100ml de TBE 1X em um Erlenmeyer de 250ml;
- 2.5 Aquecer a solução em micro-ondas até a solubilização completa da agarose;
- 2.6 Adicionar 2,0 µL de brometo de etídio a solução e homogeneizar;
- 2.7 Despejar a solução na cuba e colocar cuidadosamente os pentes;
- 2.8 Esperar solidificar;
  - Durante o processo de solidificação da agarose, preparar as amostras para aplicação no gel.
- 2.9 Colocar 2,0 µL de Blue Juice em uma placa de Terasaki;
- 2.10 Após, colocar 8 µL do produto da restrição;
- 2.11 Homogeneizar e aplicar os 10 µL do conteúdo no gel de agarose;
- 2.12 O Ladder de 100pb deve ser aplicado ao final, no primeiro poço, no volume de 2,5µL (quando for diluído no volume de 5/10 µL de Ladder original / Blue Juice). Ajustar a fonte (Volts= 100; Amperes= 100 e Tempo= 1h) e deixar o gel em corrida por 60 minutos.

## 7.5 Apêndice 05. Protocolos qPCR

### 7.5.1 P2X7, NLRP1 e NLRP3

POP6 – PCR em Tempo Real (qPCR) para *P2X7* (rs2230911 e 3751143), *NLRP1* (rs12150220 e rs35865013) e *NLRP3* (rs10754558 e rs10805502)

#### 1. CONSIDERAÇÕES NECESSÁRIAS PARA EXECUÇÃO DO PROCEDIMENTO:

- 1.1. Reservar os equipamentos e materiais necessários: pipetas e ponteiros (1000 µl, 100 µl, 20 µl, 10 µl), descarte, placa para qPCR, suporte para placa, selos, suporte para selar a placa, caixa de isopor com gelo, pincel para tubo, microtubos de 1,5 mL e 0,6 mL, H<sub>2</sub>O MilliQ filtrada em membrana millipore e autoclavada, tampão TE (TBE) e pinça.
- 1.2. Antes de iniciar, o executor deverá estar usando os EPIs adequados para área de Pré-PCR: jaleco, máscaras, sapato fechado e luvas.

#### 2. PROCEDIMENTO:

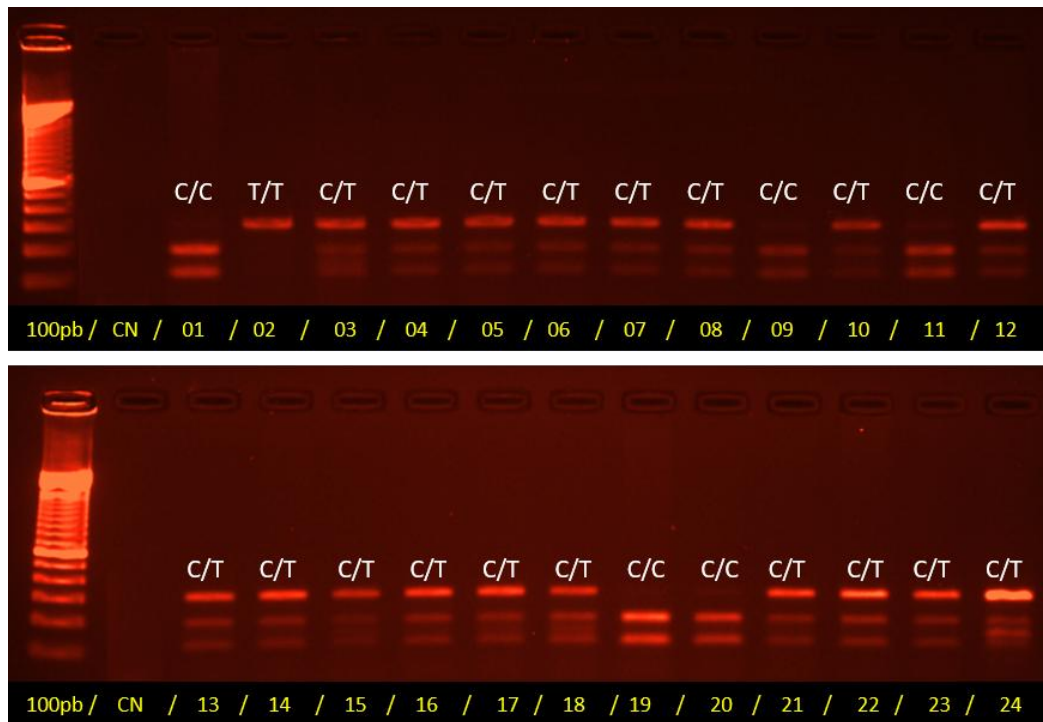
- 2.1. Inicialmente, realizar a limpeza do fluxo laminar com álcool a 70% e colocar os materiais previamente separados, ligar a UV por 15min.
- 2.2. Identificar a placa com pincel para microtubo.
- 2.3. Preparar mix da reação contendo H<sub>2</sub>O, Master mix e sonda em um tubo eppendorf, conforme a tabela abaixo:

Reagentes	Concentração	1 Reação Vol (µL)	Mix ____ Reações Vol (µL)
H <sub>2</sub> O	1x	2,25 µL	
Master Mix	2x	2,5 µL	
Sonda	20x	0,25 µL	
DNA		2 µL	
<b>Volume final</b>		7 µL	

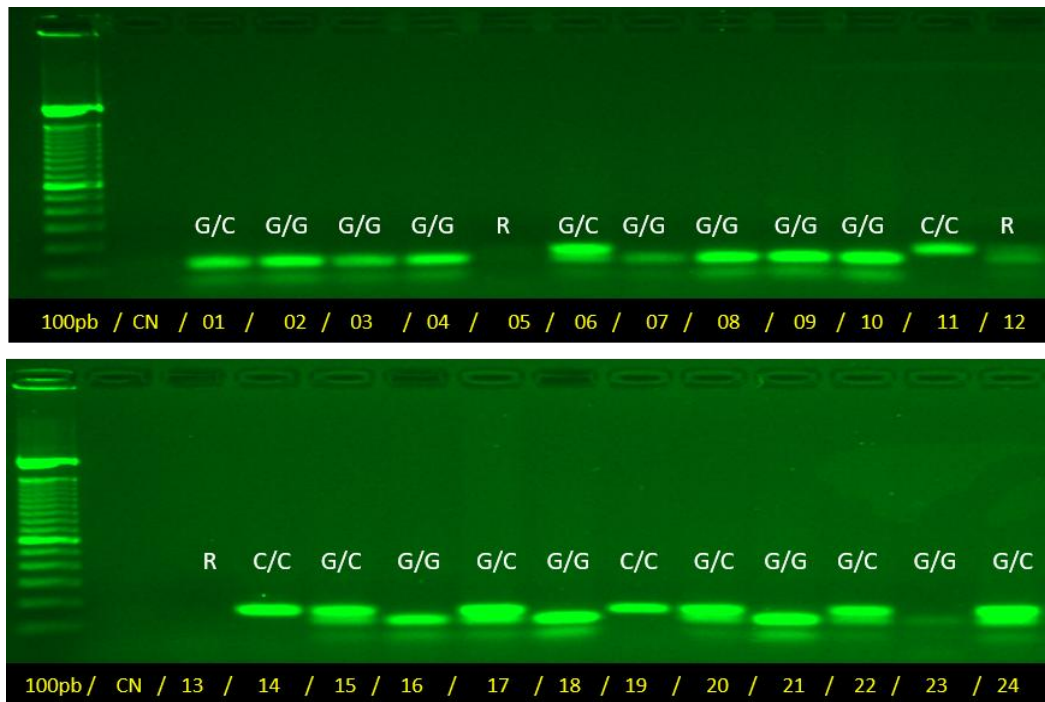
- 2.4. Aplicar 5 µL do mix em cada poço da placa.
- 2.5. Adicionar 2 µL de cada amostra em seu respectivo poço. Obs.: 1° poço corresponde ao Controle Negativo (7 µL do mix).
- 2.6. Aplicar o selo na placa com atenção evitando a formação de bolhas.
- 2.7. Levar a placa à centrífuga para um spin de 10 segundos.
- 2.8. Levar a placa ao termociclador *QuantiStudio™ Design&Analysis Applied Biosystems* e configurar para o ensaio escolhido “genotipagem” e demais informações referentes ao estudo.

## 7.6 Apêndice 06: Géis de eletroforese para os polimorfismos envolvendo *IL1 $\beta$* e *IL18*

**Figura 11.** Eletroforese em gel de agarose para o polimorfismo no gene *IL1 $\beta$*  rs16944 (T/T - 304 bp), (C/C -190pb), (C/T- 304/190/114 bp).

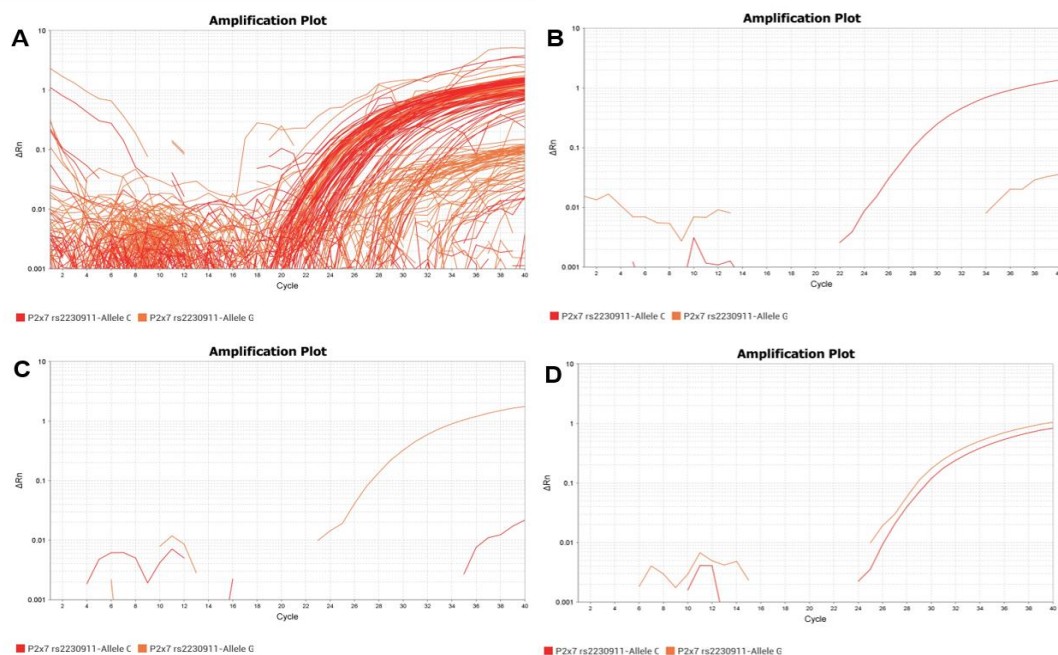


**Figura 12.** Eletroforese em gel de agarose para o polimorfismo no gene *IL18* rs187238 (C/C: -155 pb), (G/G: -116 pb) e (G/C: -155/116/39).



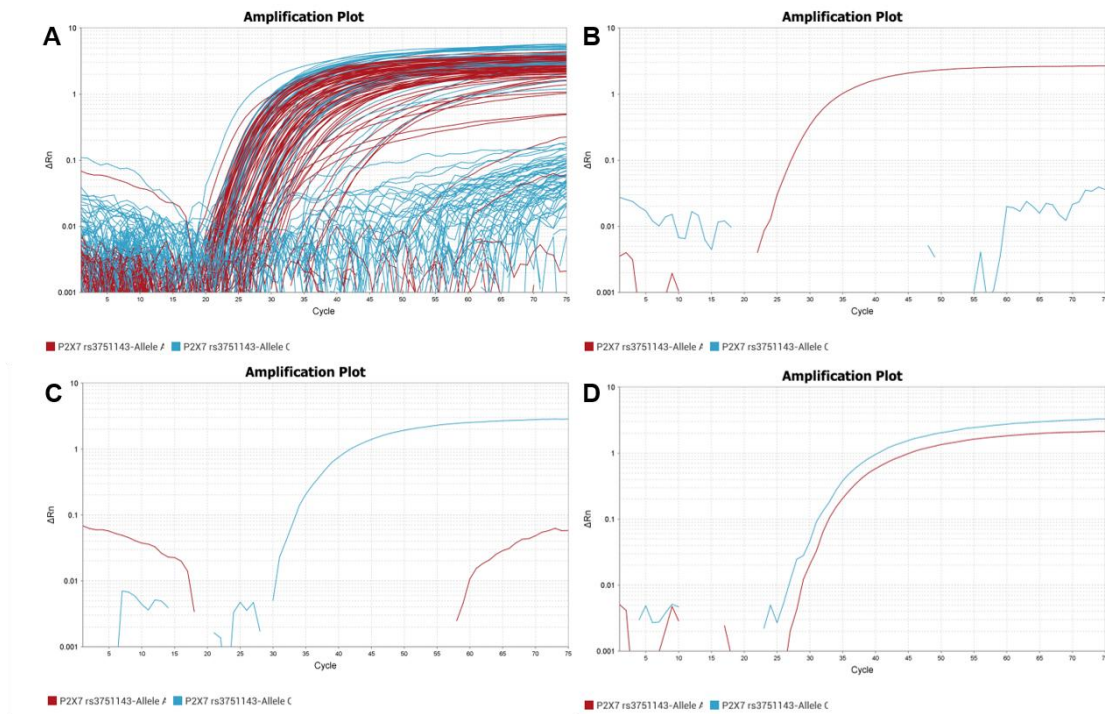
### 7.7 Apêndice 07: Gráficos de discriminação alélica dos polimorfismos nos genes *P2X7*, *NLRP1* e *NLRP3*.

**Figura 13.** Curva de amplificação gerada para o polimorfismo no gene *P2X7* rs2230911. **A** – Curvas de amplificação de 96 amostras. **B** - Homozigoto selvagem (CC). **C** – Homozigoto polimórfico (GG). **D** – Heterozigoto (CG).

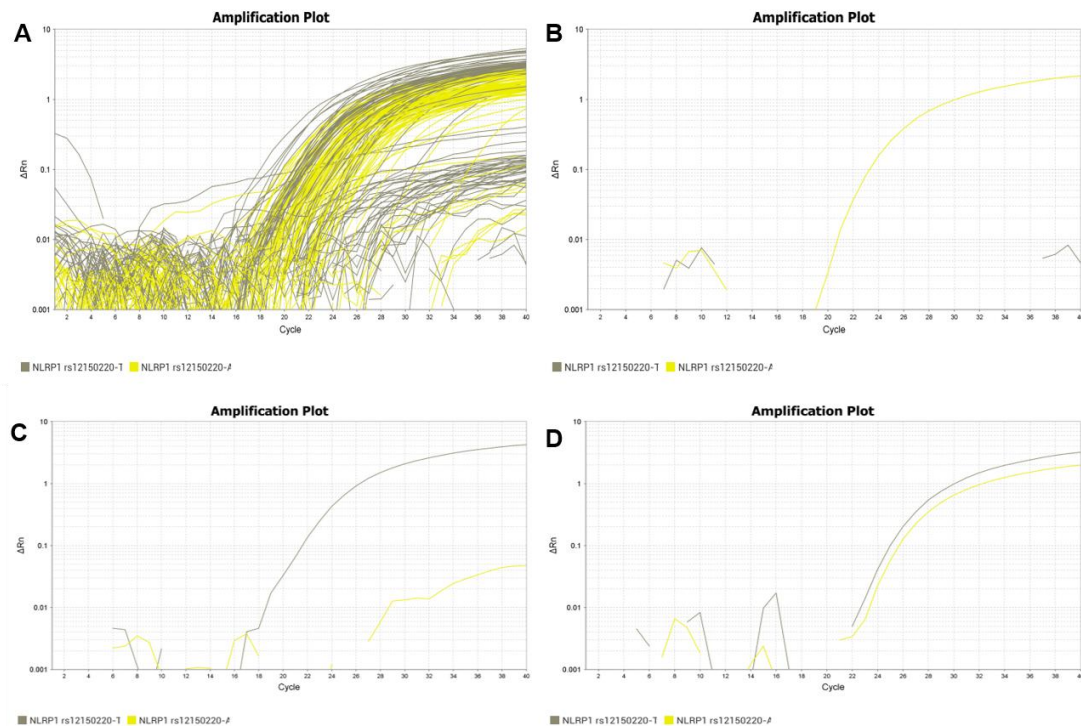




**Figura 14.** Curva de amplificação gerada para o polimorfismo no gene *P2X7* rs3751143. **A** – Curvas de amplificação de 96 amostras. **B** - Homozigoto selvagem (AA). **C** – Homozigoto polimórfico (CC). **D** – Heterozigoto (AC).

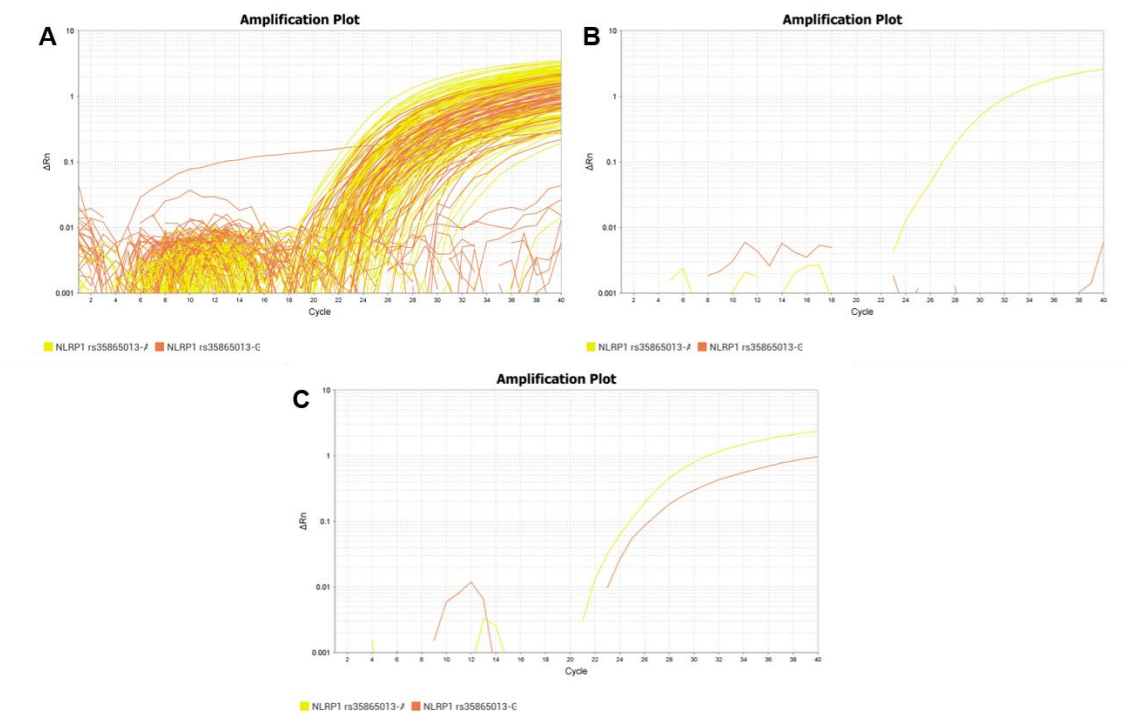


**Figura 15.** Curva de amplificação gerada para o polimorfismo no gene *NLRP1* rs12150220. **A** – Curvas de amplificação de 96 amostras. **B** - Homozigoto selvagem (AA). **C** – Homozigoto polimórfico (TT). **D** – Heterozigoto (AT).

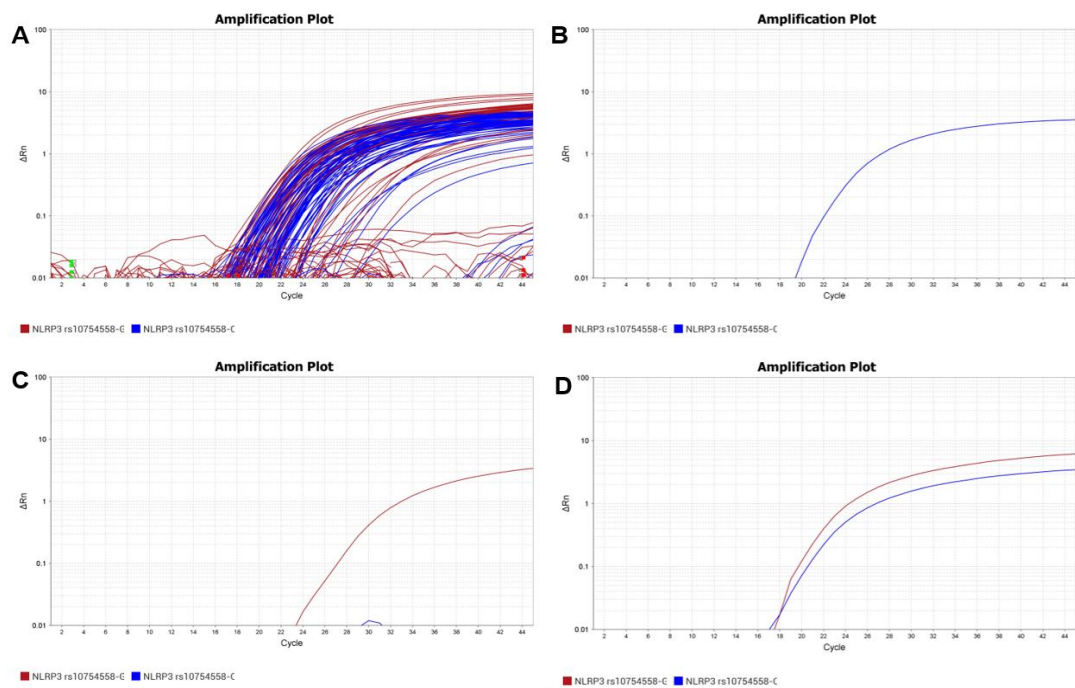




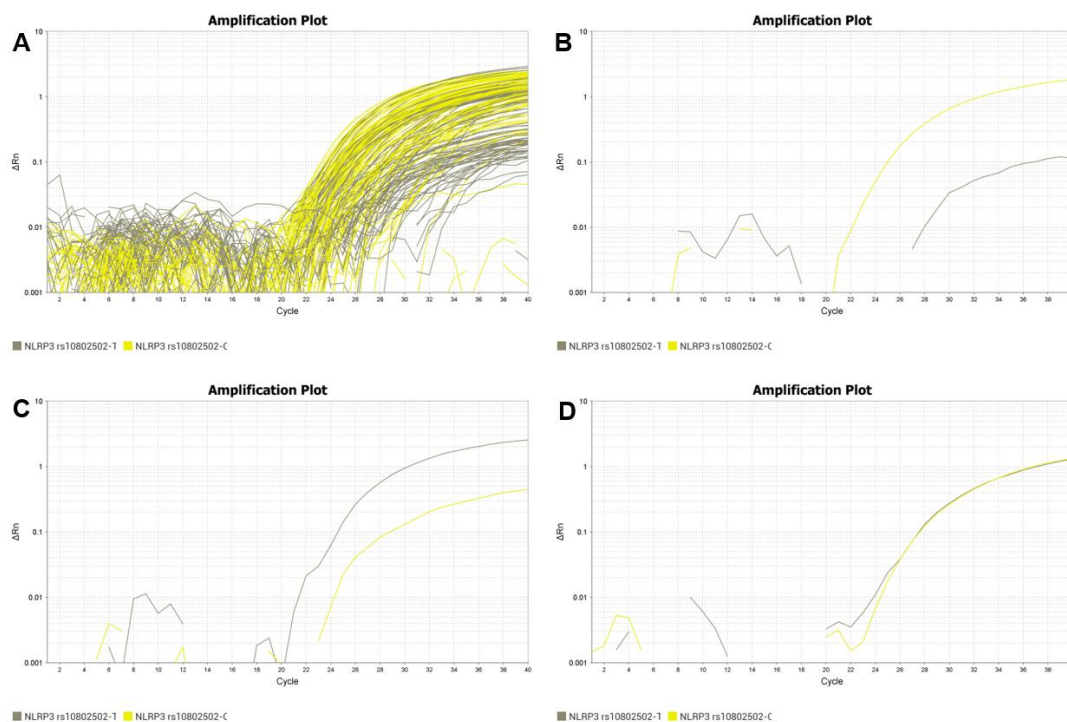
**Figura 16.** Curva de amplificação gerada para o polimorfismo no gene *NLRP1* rs35865013. **A** – Curvas de amplificação de 96 amostras. **B** - Homozigoto selvagem (AA). **C** – Heterozigoto (AG).



**Figura 17.** Curva de amplificação gerada para o polimorfismo no gene *NLRP3* rs10754558. **A** – Curvas de amplificação de 96 amostras. **B** - Homozigoto selvagem (CC). **C** – Homozigoto polimórfico (GG). **D** - Heterozigoto (CG).



**Figura 18.** Curva de amplificação gerada para o polimorfismo no gene NLRP3 rs10805502. A – Curvas de amplificação de 96 amostras. B - Homozigoto selvagem (CC). C – Homozigoto polimórfico (TT). D - Heterozigoto (CT).



## 8. ANEXOS

### 8.1 Resumos publicados em anais de eventos 2018-2020

1. KERR, M. W. A.; GAMA, F. M.; **ALVES, FS**; XABREGAS, L. A.; ALVES, E. B.; TARRAGO, A. M.; CARVALHO, M. P. S. S.; COSTA, A. G.; MALHEIRO, A. Moléculas imunológicas solúveis como possíveis biomarcadores preditores de óbito na leucemia linfóide aguda B comum (LLA-B) In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia e Terapia Celular, 2018, São Paulo. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**. Barcelona: Elsevier, 2018. v.40. p.807 – 808.
2. KERR, M. W. A.; GAMA, F. M.; **ALVES, FS**; XABREGAS, L. A.; ALVES, E. B.; TARRAGO, A. M.; CARVALHO, M. P. S. S.; COSTA, A. G.; MALHEIRO, A. Immunologicals biomarkers predictors of change in risk group (CIRG) in patients with B acute lymphoblastic leukemia treated by

- the GBTLI-2009 protocol In: The 6th International Symposium on Immunology, 2018, Manaus. **The 6th International Symposium on Immunology.**, 2018.
3. RODRIGUES, M. G. A.; **ALVES, FS**; XABREGAS, L. A.; MALHEIRO, A.; COSTA, A. G. Estudos dos polimorfismos nos genes do receptor TLR4 em pacientes com leucemia linfóide aguda(LLA) no Amazonas In: I Simpósio do Programa de Pós-Graduação em Hematologia, 2018, Manaus.
  4. GAMA, F. M.; KERR, M. W. A.; **ALVES, FS**; XABREGAS, L. A.; ALVES, E. B.; TARRAGO, A. M.; PIMENTEL, J. P. D.; CARVALHO, M. P. S. S.; MALHEIRO, A.; COSTA, A. G. Chemokines profile in the medullary microenvironment of pediatric patients with Acute Lymphoblastic Leukemia (B-ALL) from protocol GBTLI-2009 induction therapy In: 6th International Symposium on Immunology, 2018, Manaus.
  5. GAMA, F. M.; KERR, M. W. A.; **ALVES, FS**; XABREGAS, L. A.; ALVES, E. B.; TARRAGO, A. M.; CARVALHO, M. P. S. S.; MARIE, A. M. A.; COSTA, A. G. Biomarcadores imunológicos preditores de doença residual mínima (DRM) em pacientes com leucemia linfóide aguda (LLA-B) tratados pelo protocolo GBTLI-2009 In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia e Terapia Celular, 2018, São Paulo. **Hematology, Transfusion and Cell Theraphy**. Barcelona: Elsiever, 2018. v.40. p.211 – 211
  6. GAMA, F. M.; ALVES, F. S.; KERR, M. W. A.; CARVALHO, M. P. S. S.; MARIE, A. M. A.; COSTA, A. G.; **ALVES, FS**. Avaliação dos aspectos clínicos e epidemiológicos de pacientes pediátricos com leucemia linfóide aguda B (LLA-B) tratados pelo protocolo GBTLI-2009 In: II Congresso de Biomedicina da Região Norte e VII Encontro de Biomedicina do Amazonas, 2018, Manaus.
  7. KIONG, L. A.; **ALVES, FS**; SOUZA, G. L.; XABREGAS, L. A.; MALHEIRO, A.; COSTA, A. G.; PASSOS, L. N. M. Perfil clínico e epidemiológico de pacientes oncohematológicos submetidos ao trasplante de médula óssea

- da Fundação HEMOAM In: 5º Congresso PanAmazônico de Oncologia, 2019, Manaus.
8. SOUZA, G. L.; **ALVES, FS**; KIONG, L. A.; XABREGAS, L. A.; TARRAGO, A. M.; MALHEIRO, A.; COSTA, A. G. Identificação da translocação cromossômica MLL-AF4 t(4;11) (q21; q23) em pacientes pediátricos com leucemia linfóide aguda atendidos na Fundação HEMOAM In: 5º Congresso PanAmazônico de Oncologia, 2019, Manaus.
  9. **ALVES, FS**; XABREGAS, L. A.; KERR, MARLON WENDELL ATHAYDES; TARRAGO, A. M.; PIMENTEL, J. P. D.; CARVALHO, M. P. S. S.; MALHEIRO, A.; COSTA, A. G. Frequência dos rearranjos gênicos de imunoglobulinas e receptores de células T em pacientes com leucemia linfóide aguda na região amazônica In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular – HEMO 2019, 2019, Rio de Janeiro. **HEMATOLOGY, HEMOTHERAPY AND CELL THERAPY**. Barcelona: Elsevier, 2019. v.41.
  10. **ALVES, FS**; XABREGAS, L. A.; KERR, M. W. A.; TARRAGO, A. M.; PIMENTEL, J. P. D.; MALHEIRO, A.; COSTA, A. G. Association of IL-1 $\beta$  -511 C/T and IL-18 -137 G/C polymorphisms with risk of acute lymphoid leukemia development in the Amazon region of Brazil In: XLIV Congresso da Sociedade Brasileira de Imunologia, 2019, Florianópolis.  
**XLIV Congresso da Sociedade Brasileira de Imunologia**, 2019.
  11. **ALVES, FS**; XABREGAS, L. A.; SOUZA, G. L.; KERR, M. W. A.; TARRAGO, A. M.; SANTIAGO, M. R. R.; CARVALHO, M. P. S. S.; MALHEIRO, A.; COSTA, A. G. Associação dos polimorfismos IL-1B -511 C/T e IL-18 -137 G/C com leucemia linfóide aguda em pacientes da Amazônia brasileira In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular – HEMO 2019, 2019, Rio de Janeiro. **HEMATOLOGY, HEMOTHERAPY AND CELL THERAPY**. Barcelona: Elsevier, 2019. v.41
  12. **ALVES, FS**; XABREGAS, L. A.; SOUZA, G. L.; TARRAGO, A. M.; CARVALHO, M. P. S. S.; MALHEIRO, A.; COSTA, A. G.

Associação do polimorfismo -511C/T IL1-B com ocorrência de leucemia linfóide aguda em pacientes da Amazônia Brasileira In: 5° Congresso PanAmazônico de Oncologia, 2019, Manaus.

## 8.2 Artigos completos publicados em periódicos 2018-2020

1. SILVA-JUNIOR, ALEXANDER LEONARDO; **ALVES, FABIOLA SILVA**; KERR, MARLON WENDELL ATHAYDES; XABREGAS, LILYANE AMORIM; GAMA, FÁBIO MAGALHÃES; RODRIGUES, MARIA GABRIELA ALMEIDA; TORRES, ALEXANDRE SANTOS; TARRAGÔ, ANDRÉA MONTEIRO; SAMPAIO, VANDERSON SOUZA; CARVALHO, MARIA PERPÉTUO SOCORRO SAMPAIO; FRAIJI, NELSON ABRAHIM; MALHEIRO, ADRIANA; COSTA, ALLYSON GUIMARÃES. Acute lymphoid and myeloid leukemia in a Brazilian Amazon population: Epidemiology and predictors of comorbidity and deaths. PLoS One, v.14, p.e0221518 -, 2019.

## 8.3 Manuscrito submetido como Primeiro Autor

### PLOS ONE

#### Genetic polymorphisms of inflammasome genes associated with acute lymphoblastic leukemia and clinical prognosis in the Brazilian Amazon

--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	
<b>Article Type:</b>	Research Article
<b>Full Title:</b>	Genetic polymorphisms of inflammasome genes associated with acute lymphoblastic leukemia and clinical prognosis in the Brazilian Amazon
<b>Short Title:</b>	Inflammasome polymorphisms and acute lymphoblastic leukemia
<b>Corresponding Author:</b>	Allyson Guimarães Costa, Ph.D Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas Manaus, Amazonas BRAZIL
<b>Keywords:</b>	

<b>Abstract:</b>	<p><b>Background</b> Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the form of cancer which most affects children around the world. The formation of inflammasome complexes from the activation of NOD-like receptors of innate immunity highlighted as one of the factors that promotes neoplastic activity in the hematopoietic stem cell, where the intense inflammatory response would be responsible for the dysregulation of the immune system. Genetic polymorphisms involving inflammasomes are involved in the pathogenesis of several types of cancer. However, the relationship with the susceptibility to ALL, or prognosis of patients with ALL, in the Brazilian Amazon is unknown. This therefore creates a need to investigate the relationship and its influence on the disease, in order to ascertain whether it can be used as a prognostic factor during treatment.</p> <p><b>Methodology/Principal findings</b> A case-control study was carried out with 158 patients with ALL and 192 healthy individuals (control group). The genetic polymorphisms IL1 <math>\beta</math> and IL18 were genotyped from the restriction fragment length polymerase-polymorphism chain reaction (PCR-RFLP) analysis. In addition, NLRP1, NLRP3 and P2X7 polymorphisms were genotyped using qPCR. The IL1 <math>\beta</math> C/T rs19644 genotype was associated with the risk of developing ALL (C/C vs. C/T + T/T OR: 2.48 [95% CI: 1.26 - 4.88, p=0.006]; C/C vs C/T OR: 2.74 [95% CI: 1.37-5.51, p=0.003]). The P2X7 A/C rs3751143 (OR: 2.30 [95% CI: 1.05-5.03, p=0.036]) and NLRP3 G/Grs10754558 genotypes (OR: 7.44 [95% CI: 1.44 - 38.26, p=0.016]) were associated with the presence of infectious comorbidities on diagnosis. Whereas, NLRP1 A/T rs12150220 (OR: 0.37 [95% CI: 0.16 - 0.87, p=0.023]) was associated with protection against comorbidities. In addition, the association of the genotype NLRP1 A/G rs35865013 (OR: 2.72 [95% CI: 1.07 - 6.90, p=0.034]) with the risk of relapse after treatment in ALL patients has been described.</p> <p><b>Conclusions</b> The variant IL1 <math>\beta</math> rs16944 seems to predispose individuals from the Brazilian Amazon region to ALL. In addition, inflammasome SNPs are associated with the presence of infectious comorbidities and episodes of relapse throughout treatment in individuals with acute lymphoblastic leukemia.</p>
<b>Order of Authors:</b>	<p>Fabíola Silva Alves</p> <p>Lilyane Amorim Xabregas</p> <p>Marlon Wendell Athaydes Kerr</p> <p>Gláucia Lima Souza</p> <p>Daniele Sá Pereira</p> <p>Fábio Magalhães Gama</p> <p>Mirian Rodrigues Ribeiro Santiago</p> <p>Nadja Pinto Garcia</p>
	<p>Andréa Monteiro Tarragô</p> <p>Maurício Morishi Ogusku</p> <p>Aya Sadahiro</p> <p>Adriana Malheiro</p> <p>Allyson Guimarães Costa, Ph.D</p>

<b>Opposed Reviewers:</b>	
<b>Additional Information:</b>	
<b>Question</b>	<b>Response</b>
<p><b>Financial Disclosure</b></p> <p>Enter a financial disclosure statement that describes the sources of funding for the work included in this submission. Review the <a href="#">submission guidelines</a> for detailed requirements. View published research articles from <a href="#">PLOS ONE</a> for specific examples.</p> <p>This statement is required for submission and <b>will appear in the published article</b> if the submission is accepted. Please make sure it is accurate.</p> <p><b>Unfunded studies</b> Enter: <i>The author(s) received no specific funding for this work.</i></p> <p><b>Funded studies</b> Enter a statement with the following details:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Initials of the authors who received each award</li> <li>• Grant numbers awarded to each author</li> <li>• The full name of each funder</li> <li>• URL of each funder website</li> <li>• Did the sponsors or funders play any role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript?</li> <li>• <b>NO</b> - Include this sentence at the end of your statement: <i>The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.</i></li> <li>• <b>YES</b> - Specify the role(s) played.</li> </ul> <p>* typeset</p>	<p>This work was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) (Pró-Estado Program - #002/2008 and PAPAC Program - #005/2019), Rede Genômica Vigilância em Saúde do Estado do Amazonas (REGESAM), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). FSA, LAX, MWAK GLS, FMG and DSP have fellowships from FAPEAM and CAPES (Master's and SI student). AM is a level 2 research fellow from CNPq. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.</p>

<p><b>Ethic statement</b></p> <p>Use the instruction to below to enter a competing interest statement for this submission. On behalf of all authors, disclose any <a href="#">competing interests</a> that could be perceived to bias this work—acknowledging all financial support and any other relevant financial or non- financial competing interests.</p> <p>This statement <b>will appear in the published article</b> if the submission is accepted. Please make sure it is accurate. View published research articles from <a href="#">PLOS ONE</a> for specific examples.</p>	<p>The authors declare no commercial associations or other types of associations that might pose conflict of interests.</p>
<p><b>NO authors have competing interests</b></p> <p>Enter: <i>The authors have declared that no competing interests exist.</i></p> <p><b>Authors with competing interests</b></p> <p>Enter competing interest details beginning with this statement:</p> <p><i>I have read the journal's policy and the authors of this manuscript have the following competing interests: [insert competing interests here]</i></p>	



<p><b>Ethics Statement</b></p> <p>Enter an ethics statement for this submission. This statement is required if the study involved:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Human participants</li> <li>• Human specimens or tissue</li> <li>• Vertebrate animals or cephalopods</li> <li>• Vertebrate embryos or tissues</li> <li>• Field research</li> </ul> <p>Write "N/A" if the submission does not require an ethics statement.</p> <p>General guidance is provided below. Consult the <a href="#">submission guidelines</a> for detailed instructions. <b>Make sure that all information entered here is included in the</b></p>	<p>All protocols and consent forms were approved by the Research Ethics Committee at the HEMOAM Foundation (CEP/HEMOAM process #3.335.123/2019). Patients were treated according to the recommendations of the Brazilian Health Ministry.</p>
<p><b>Methods sections of the manuscript</b></p> <p><b>Format for specific study types</b></p> <p><b>Human Subject Research (involving human participants and/or tissue)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Give the name of the institutional review board or ethics committee that approved the study</li> <li>• Include the approval number and/or a statement indicating approval of this research</li> <li>• Indicate the form of consent obtained (written/oral) or the reason that consent was not obtained (e.g. the data were analyzed anonymously)</li> </ul> <p><b>Animal Research (involving vertebrate animals, embryos or tissues)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Provide the name of the</li> </ul>	

<p>Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) or other relevant ethics board that reviewed the study protocol, and indicate whether they approved this research or granted a formal waiver of ethical approval</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Include an approval number if one was obtained</li> <li>• If the study involved <i>non-human primates</i>, add <i>additional details</i> about animal welfare and steps taken to ameliorate suffering</li> <li>• If anesthesia, euthanasia, or any kind of animal sacrifice is part of the study, include briefly which substances and/or methods were applied</li> </ul> <p><b>Field Research</b></p> <p>Include the following details if this study involves the collection of plant, animal, or other materials from a natural setting:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Field permit number</li> </ul> <p>Name of the institution or relevant body that granted permission</p>	
<p><b>Data Availability</b></p> <p>Authors are required to make all data underlying the findings described fully available, without restriction, and from the time of publication. PLOS allows rare exceptions to address legal and ethical concerns. See the <a href="#">PLOS Data Policy</a> and <a href="#">FAQ</a> for detailed information.</p>	<p>No - some restrictions will apply</p>

<p>A Data Availability Statement describing where the data can be found is required at submission. Your answers to this question constitute the Data Availability Statement and <b>will be published in the article</b>, if accepted.</p>	
<p><b>Important:</b> Stating 'data available on request from the author' is not sufficient. If your data are only available upon request, select 'No' for the first question and explain your exceptional situation in the text box.</p>	
<p>Do the authors confirm that all data underlying the findings described in their manuscript are fully available without restriction?</p>	
<p><b>Describe where the data may be found in full sentences. If you are copying our sample text, replace any instances of <b>XXX</b> with the appropriate details.</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• If the data are <b>held or will be held in a public repository</b>, include URLs, accession numbers or DOIs. If this information will only be available after acceptance, indicate this by ticking the box below. For example: <i>All <b>XXX</b> files are available from the <b>XXX</b> database (accession number(s) <b>XXX</b>, <b>XXX</b>).</i></li> <li>• If the data are all contained <b>within the manuscript and/or Supporting Information files</b>, enter the following: <i>All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files.</i></li> <li>• If neither of these applies but</li> </ul>	<p>Due to ethical restrictions regarding patient privacy, data are available upon request. Data are available upon request from the Ethics Committee of Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (CEP-HEMOAM - cephemoam@gmail.com), for researchers who meet the criteria for access to confidential data. Additional requests for the data may be sent to the corresponding author or coauthors Allyson G. Costa (allyson.gui.costa@gmail.com) and Adriana Malheiro (malheiroadriana@yahoo.com.br)</p>



you are able to provide **details of access elsewhere**, with or without limitations, please do so. For example:

*Data cannot be shared publicly because of [XXX]. Data are available from the XXX Institutional Data Access / Ethics Committee (contact via XXX) for researchers who meet the criteria for access to confidential data.*

*The data underlying the results presented in the study are available from (include the name of the third party and contact information or URL).*

- This text is appropriate if the data are owned by a third party and authors do not have permission to share the data.

\* typeset

Additional data availability information:

Tick here if the URLs/accession numbers/DOIs will be available only after acceptance of the manuscript for publication so that we can ensure their inclusion before publication.

## Cover Letter

Manaus, AM, Brazil, April 20<sup>th</sup>, 2020

Academic Editor

Plos One

Dear Editor,

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the 11<sup>th</sup> most frequently occurring cancer in the world and mainly affects children. Of unknown etiology, the formation of inflammasome complexes from the activation of NOD-like receptors of innate immunity is indicated as being one of the stimulation factors of neoplastic activity in the hematopoietic stem cell, where the intense inflammatory response is responsible for the dysregulation of the immune system.

Genetic polymorphisms involving inflammasome complexes are involved in the pathogenesis of various types of cancer. However, the relationship with susceptibility to ALL, is unknown. This creates a need for studies that investigate the influence of these complexes on the disease, in order that they may be used as prognostic factors during treatment.

Here we present the manuscript entitled "***Genetic polymorphisms of inflammasome genes associated with acute lymphoblastic leukemia and clinical prognosis in the Brazilian Amazon***" by Alves et al., as a submission to Plos One for possible publication.

A case-control study was conducted involving 158 patients with ALL and 192 healthy control individuals. Genotyping of IL1 $\beta$  and IL18 genetic polymorphisms was performed using PCR-RFLP analysis. Meanwhile, polymorphisms in the NLRP1, NLRP3 and P2X7 genes were genotyped by qPCR. Statistical analysis was performed using Graphpad Prism v.5 and STATA v.13 software. A logistic regression analysis was performed in order to investigate the association of genotypes with the presence of infectious comorbidities, relapse and death.

Our results showed that the genotype IL-1 $\beta$  C/T rs19644 seems to be a risk factor for the development of ALL in the study population (C/C vs. C/T + T/T OR: 2.48 [95% CI: 1.26 – 4.88, p=0.006]; C/C vs. C/T OR: 2.74 [95% CI: 1.37 – 5.51, p=0.003]. In addition, genotypes P2X7 A/C rs3751143 (OR: 2.30 [95% CI: 1.05 – 5.03, p=0.036]) and NLRP3 G/G rs10754558 (OR: 7.44 [95% CI: 1.44 – 38.26, p=0.016]) were associated with the presence of infectious comorbidities at the time of diagnosis, while NLRP1 A/T rs12150220 (OR: 0.37 [95% CI: 0.16 – 0.87, p=0.023]) was associated with some kind of protection factor. The genotype NLRP1 A/G rs35865013 (OR: 2.72 [95% CI: 1.07 – 6.90, p=0.034]) was associated as a risk factor for relapse after treatment. There was no association between polymorphisms and death in this study. Our study highlights the influence of polymorphisms on the inflammasome genes regarding the prognosis of patients with acute lymphoblastic leukemia.

We declare that the proposed manuscript describes original research and has not been previously published or is currently under consideration by any other scientific journal. The data/results of the manuscript are not plagiarized. We declare acknowledgment that the manuscript, after submission, may not

have the order or the number of authors altered without providing any justification and/or information to this journal. Finally, we declare that if the manuscript is accepted for publication, all copyrights will be transferred to Plos One.

As this topic is probably of interest to Plos One, we hope this manuscript will be considered for publication and look forward to hearing your opinion on this matter.

Best regards,

Allyson Guimarães da Costa (on behalf of all the authors)

## Genetic polymorphisms of inflammasome genes associated with acute lymphoblastic leukemia and clinical prognosis in the Brazilian Amazon

Fabíola Silva Alves<sup>1,2</sup>

[fabiolasilva@hotmail.com](mailto:fabiolasilva@hotmail.com)

Lilyane Amorim Xabregas<sup>1,2</sup>

[lilyanex@gmail.com](mailto:lilyanex@gmail.com)

Marlon Wendell Athaydes Kerr<sup>1,2</sup>

[marllonkerr@gmail.com](mailto:marllonkerr@gmail.com)

Gláucia Lima Souza<sup>1,2</sup>

[glau.lima.souza@gmail.com](mailto:glau.lima.souza@gmail.com)

Daniele Sá Pereira<sup>2</sup>

[danieledesapereira@gmail.com](mailto:danieledesapereira@gmail.com)

Fábio Magalhães Gama<sup>3</sup>

[magalhaes.gama.f7@gmail.com](mailto:magalhaes.gama.f7@gmail.com)

Mirian Rodrigues Ribeiro Santiago<sup>1,2</sup>

[ribeiro.mirian@bol.com.br](mailto:ribeiro.mirian@bol.com.br)

Nadja Pinto Garcia<sup>2</sup>

[garcia.nadja@gmail.com](mailto:garcia.nadja@gmail.com)

Andréa Monteiro Tarragô<sup>1,2</sup>

[andrea\\_s\\_monteiro@hotmail.com](mailto:andrea_s_monteiro@hotmail.com)

Maurício Morishi Ogusku<sup>4</sup>

[mmogusku@inpa.gov.br](mailto:mmogusku@inpa.gov.br)

Aya Sadahiro<sup>3</sup>

[aya.sadahiro@gmail.com](mailto:aya.sadahiro@gmail.com)

Adriana Malheiro<sup>1,2,3,5</sup>

[malheiroadriana@yahoo.com.br](mailto:malheiroadriana@yahoo.com.br)

Allyson Guimarães Costa<sup>1,2,3,5,6\*</sup>

[allyson.gui.costa@gmail.com](mailto:allyson.gui.costa@gmail.com)

1. Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, AM, Brazil;

2. Diretoria de Ensino e Pesquisa, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Manaus, AM, Brazil;

3. Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brazil;
4. Laboratório de Micobacteriologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, AM, Brazil;
5. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, AM, Brazil;
6. Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema, Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), Manaus, AM, Brazil;

**\*Corresponding author:** Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Av. Constantino Nery, 4397, Chapada, Manaus, AM, CEP 69050-001, Brazil. Phone: +55 (92) 98153-5233. E-mail: allyson.gui.costa@gmail.com.

## ABSTRACT

### Background

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the form of cancer which most affects children around the world. The formation of inflammasome complexes from the activation of NOD-like receptors of innate immunity highlighted as one of the factors that promotes neoplastic activity in the hematopoietic stem cell, where the intense inflammatory response would be responsible for the dysregulation of the immune system. Genetic polymorphisms involving inflammasomes are involved in the pathogenesis of several types of cancer. However, the relationship with the susceptibility to ALL, or prognosis of patients with ALL, in the Brazilian Amazon is unknown. This therefore creates a need to investigate the relationship and its influence on the disease, in order to ascertain whether it can be used as a prognostic factor during treatment.

### Methodology/Principal findings

A case-control study was carried out with 158 patients with ALL and 192 healthy individuals (control group). The genetic polymorphisms *IL1 $\beta$*  and *IL18* were genotyped from the restriction fragment length polymorphism chain reaction (PCR-RFLP) analysis. In addition, *NLRP1*, *NLRP3* and *P2X7* polymorphisms were genotyped using qPCR. The *IL1 $\beta$*  C/T rs19644 genotype was associated with the risk of developing ALL (C/C vs. C/T + T/T OR: 2.48 [95% CI: 1.26 - 4.88,  $p=0.006$ ]; C/C vs C/T OR: 2.74 [95% CI: 1.37-5.51,  $p=0.003$ ]). The *P2X7* A/C rs3751143 (OR: 2.30 [95% CI: 1.05-5.03,  $p=0.036$ ]) and *NLRP3* G/G rs10754558 genotypes (OR: 7.44 [95% CI: 1.44 - 38.26,  $p=0.016$ ]) were associated with the presence of infectious comorbidities on diagnosis. Whereas, *NLRP1* A/T rs12150220 (OR: 0.37 [95% CI: 0.16 - 0.87,  $p=0.023$ ]) was associated with protection against comorbidities. In addition, the association of the genotype *NLRP1* A/G rs35865013 (OR: 2.72 [95% CI: 1.07 - 6.90,  $p=0.034$ ]) with the risk of relapse after treatment in ALL patients has been described.



## Conclusions

The variant *IL1 $\beta$  rs16944* seems to predispose individuals from the Brazilian Amazon region to ALL. In addition, inflammasome SNPs are associated with the presence of infectious comorbidities and episodes of relapse throughout treatment in individuals with acute lymphoblastic leukemia.

## INTRODUCTION

Hematological disorders are a group of neoplasms that affect the hematopoietic stem cell and represent the 11<sup>th</sup> most frequent cause of cancer and the 10<sup>th</sup> most frequent cause of death in the world, respectively. Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a hematopoietic neoplasm characterized by the exacerbated proliferation of blasts in bone marrow and affects mainly children aged 2 to 15 years old. In Brazil, according to the National Cancer Institute (INCA), in 2017, there were 4.795 deaths from leukemia in men and 4.401 in women. In addition, it is estimated that for each year of the 2020-2022 triennium, there will be 5,920 new cases of leukemia in men and 4,860 in women in Brazil, which corresponds to an estimated risk of 5.67 new cases per 100 thousand men and 4.56 for each 100 thousand women (11,31).

Due to its unknown etiology, studies associate the manifestation of ALL with the interaction of genetic and environmental factors, however, less than 10% of cases are attributed to heredity (38,39). New evidence indicates that inflammation plays an important role in all stages of cancer development. Since inflammation promotes the accumulation of genetic alterations that can inhibit the cell death control pathways of hematopoietic progenitor stem cells (HSPCs) and contribute to the generation of pre-leukemic clones. Mel Greaves observed that a low stimulation of the immune system in early childhood followed by a second response to infections, could be responsible for the dysregulation of the immune system and increase the chances of developing ALL (147). However, the process for the development of ALL remains unknown. (136) The inflammasome complex constitutes components of innate immunity involved in inflammatory processes and has been associated with the development of autoimmune inflammatory diseases and several types of cancers (73,78). In acute lymphoblastic leukemia, NLRP1a-induced pyroptosis in hematopoietic progenitor cells can prevent cell proliferation and differentiation, contributing to the proliferation of altered blasts that will trigger the disease. The dysregulation of the inflammasome complex can also influence the prognosis of patients, since studies report that the constitutive activation of NLRP3 seems to cleave the glucocorticoid receptor, this being the first line of treatment for ALL, and thus increase the number of relapses (141,142).

Although inflammasomes are associated with several types of diseases, including cancer, there are few studies that demonstrate the relationship between the SNPs of the *IL1 $\beta$* , *IL18*, *NLRP1*, *NLRP3* and *P2X7*, genes with the susceptibility or influence on the prognosis of patients with ALL. In this study, we describe that variants of inflammasome were associated with the risk of developing ALL and clinical prognosis in these patients.

## MATERIALS AND METHODS

### *Patients and Sampling*

Cryopreserved DNA samples from 158 patients from the human leukocyte antigen (HLA) typing laboratory of the Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM) diagnosed with acute lymphoblastic leukemia were genotyped. The diagnosis was made according to the classification criteria of the World Health Organization (WHO) (20). The healthy individuals (control group) control group consisted of 192 samples from blood donation candidates who attended HEMOAM between January and December 2015.

### *Ethical Issues*

This study was approved by the Research Ethics Committee of the HEMOAM Foundation under protocol number 3.335.123/2019, CAAE 12615918.9.0000.0009, in accordance with the guidelines of the Declaration of Helsinki and Resolution 466/12 of the Brazilian National Health Council for research involving human beings.

### **Biological Sample Collection and Data**

Approximately 4 mL of peripheral blood was obtained from patients with ALL by venipuncture in tubes with a vacuum system containing EDTA (BD Vacutainer EDTA K2®). From the control group, approximately 12 mL of peripheral blood were collected by venipuncture in tubes with a vacuum system containing EDTA, Sodium Citrate (BD Vacutainer Citrate Tube®) and with Separator Gel (Gel BD SST® II Advance) for complete blood count, biochemical tests and serology, respectively. In addition, demographic (age, gender), laboratory (blood count, immunophenotype) and clinical (comorbidities [infectious diseases, aplasia and others], relapse and death), data were obtained from searches of medical records in the medical and statistical care system (SAME), iDoctor system and statistics sector of the HEMOAM Foundation.

### **Genomic DNA Extraction**

Genomic DNA extraction from blood samples (case group) was performed with the triplePrep Kit® GenomicPrep DNA Extraction kit (GE Healthcare Life Sciences) and BIOPUR Kit mini spin plus extraction® (Mobius Life Sciences) following the recommendations described by the manufacturer. For the samples of the control group, the QIAmp DNA Kit (QIAGEN, Chatsworth, CA, USA) was used. After extraction, the DNA was evaluated by readings at 260 nm with the NanoDrop™ 2000/2000c spectrophotometer (Thermo Scientific™). An Optical Density (OD) unit was considered equivalent to 50 ng/μL of DNA. The absorbance of 260/280 (protein absorption range) and 260/230 (absorption range for organic compounds, sugars, urea and salts) were used to assess DNA purity.

### **Genotyping by PCR-RFLP**

The PCR reactions were performed according to the protocol described by Bhat et al. (2014) and Folwaczny et al. (2005) (145,146). For *IL1β rs16944* the following sequences were used: Forward: 5'TGGCATTGATCTGGTTCATC-3' Reverse: 5'GTTTAGGAATCTTCCCACTT-3' and *IL18 rs187238*:

Foward, 5'CACAGAGCCCCAACTTTTTACGGGTAGA-3. The mix was composed of 17.3 µL of H<sub>2</sub>O MiliQ, 2.5 µL of 10x buffer, 2.0 µL of MgCl<sub>2</sub>, 1.0 µL of dNTPs, 0.5 µL of each primer, 0.2 µL of Taq DNA polymerase and 2.0 µL of Genomic DNA. Clicking was performed on the Applied Biosystems thermocycler (Veriti® 96 Well Thermal Cycler, Carlsbad, USA) using the following programs: 1 cycle at 95 °C for 4 min, 35 cycles at 95 °C for 30 s, 56 °C for 30 s, 72 °C for 30 s and 72 °C for 10 min (*IL1β*) and 1 cycle at 95 °C for 10 min, 35 cycles at 95 °C for 30 s, 60 °C for 30 s, 72 °C for 30 s and 72 °C for 10 min (*IL18*). The PCR product was subjected to the RFLP reaction with 7.8 µL of H<sub>2</sub>O MiliQ, 2.0 µL of Buffer 4, 0.2 µL of the restriction enzyme *IL1β rs16944 (AvaI)* and *IL18 rs187238 (MboII)* (10 U/µL, Promega, Madison WI, USA) and 15.0 µL of the PCR reaction product, with subsequent incubation in a thermoblock at 37 °C overnight (~16 hours). The digestion of the products was observed in a 3% agarose gel, and the genotyping was characterized by *IL1β* (T/T-304 bp), (C/C -190 pb), (C/T-304/190/114 bp) and *IL18* (C/C: 155 bp), (G/G: 116 bp) and (G/C: 155/116/39).

### Genotyping by Real-Time Quantitative PCR (qPCR)

The genotyping of the *NLRP1*, *NLRP3* and *P2X7* polymorphisms was performed using the Real-Time Quantitative PCR (qPCR) technique, using allele specific TaqMan fluorescent probes that allow the discrimination of the studied SNPs. The qPCR reactions were performed in 96-well microplates with 2.25 µL of ultrapure water, 2.5 µL of the Genotyping Master Mix (1x), 0.25 µL of TaqMan® assay (20x), containing 36 µM of each primer and 8 µM of each TaqMan® probe (*NLRP1 rs12150220* Cat # 1600653\_10, *NLRP1 rs35865013* Cat # 127453310, *NLRP3 rs10754558* Cat # 2605202810, *NLRP3 rs10805502* Cat # 2605202610, *P2X7 rs3751143* Cat # 2746527410 e *P2X7 rs2230911* Cat# 1585370520, Thermo Fisher Scientific, USA), with a final volume of 7 µL. The QuantiStudio™ Design & Analysis Applied Biosystems thermal cycler was used to amplify the sequences of interest and allelic discrimination under the following condition: 95 °C for 10 minutes for activation, 40 cycles at 92 °C for 15 s for denaturation and 40 cycles at 60 °C for 90 s for annealing and extension.

### Statistical and data analysis

The statistical and descriptive analysis was performed with the software GraphPad Prism v.5 (San Diego, CA, USA) and STATA v.13 (StataCorp, 2013, College Station, Texas, USA), with significance levels of 5%. The comparison between groups was carried out using the exact fisher test, with a 95% confidence interval (95% CI). A logistic regression analysis was performed in order to investigate the association of genotypes with the presence of infectious comorbidities, relapse and death. The Hardy-Weinberg (EHW) balance was determined by comparing the observed and expected frequencies of the studied genotypes and alleles, being applied in both groups, via the website <http://ihg.gsf.de/cgibin/hw/hwa1.pl>.

## RESULTS

### Clinical and Epidemiological Baseline of the Patients

The mean age among individuals in the control group and patients with ALL was 38 and 12, respectively. In addition, the male gender was predominant in both groups (66% and 63%). Regarding the

presence of comorbidities, 45% had some type of comorbidity on diagnosis, the most frequent being infectious diseases (86%) (e.g., cytomegalovirus, toxoplasmosis, rubella, varicella, parasitic diseases, among others), followed by other comorbidities (14%) (e.g., Aplasia and Burkitt's lymphoma). Most patients relapsed during treatment (66%) and approximately 41% of ALL patients died during treatment. The hemoglobin average was 8.65 g/dL, hematocrit 25.4 g/dL, leukocytes 4.720/mm<sup>3</sup> and platelets 39,000/mm<sup>3</sup>. Demographic, clinical and laboratory data are described in Table 1.

**Table 1. Demographic and clinical characteristics of the study population.**

<b>Variables</b>	<b>Healthy Individuals (n = 192)</b>	<b>ALL Cases (n = 158)</b>
<b>Age</b> (years, median [IQR])	38 [26-52]	12 [4-17]
<b>Gender</b>		
Male, n (%)	127 (66%)	100 (63%)
Female, n (%)	65 (34%)	58 (37%)
<b>Comorbidities</b>		
Yes, n (%)	-	72 (45%)
Infectious diseases, n (%)	-	62 (86%)
Others, n (%)	-	10 (14%)
No, n (%)	-	86 (55%)
<b>Relapse</b>		
Yes, n (%)	-	105 (66%)
No, n (%)	-	53 (44%)
<b>Death</b>		
Yes, n (%)	-	66 (41%)
No, n (%)	-	92 (59%)
<b>Hemoglobin</b> (g/dL, median [IQR])	-	8.65 [6.5-10.3]
<b>Hematocrit</b> (g/dL, median [IQR])	-	25.4 [20.6-30.8]
<b>Leukocyte</b> (g/dL, median [IQR])	-	4.720 [2.110-39.200]
<b>Platelets</b> (g/dL, median [IQR])	-	39.000 [16.225-126.500]

***Association of genotypes and alleles of polymorphisms under study with acute lymphoblastic leukemia***

The genotypic and allele frequencies of all the SNPs under study are described in Table 2. Among all the SNPs studied, *IL-1 $\beta$  rs19644* ( $p = \leq 0.001$ ) and *P2X7 rs2230911* ( $p = 0.03$ ) deviated from the Hardy-Weinberg balance in the ALL patients. The *IL-1 $\beta$  C/T rs19644* genotype appears to be a risk factor for the development of ALL in the case group (C/C vs. C/T + T/T OR: 2.48 [95% CI: 1.26 - 4.88,  $p = 0.006$ ]; C/C vs. C/T OR: 2.74 [95% CI: 1.37 - 5.51,  $p = 0.003$ ]). However, when observing the alleles individually for the SNP, association with the T allele (OR: 0.84 [95% CI: 0.62 - 1.14,  $p = 0.279$ ]) was not observed.

**Table 2.** Genotype and allele frequencies of the IL-1 $\beta$ , IL-18, NLRP1, NLRP3 and P2X7 polymorphisms in patients with acute lymphoblastic leukemia and in healthy individuals (control group).

Polymorphism. Genotype or Allele	Healthy Individuals (n=192)	ALL Cases (n= 158)	OR (CI 95%)	p-value	
<b>IL-1<math>\beta</math> rs16944 C/T</b>					
C/C	35 (18%)	13 (8%)	2.48(1.26-4.88)	<b>0.006</b>	C/C vs C/T+T/T
C/T	95 (49%)	97 (61%)	2.74(1.37-5.51)	<b>0.003</b>	C/C vs C/T
T/T	62 (33%)	48 (31%)	2.08 (0.99-4.36)	<b>0.049</b>	C/C vs T/T
C	165 (42%)	123 (38%)			
T	219 (58%)	193 (62%)	0.84 (0.62-1.14)	0.279	
<b>IL-18 rs187238 G/C</b>					
G/G	82 (43%)	67 (42%)	0.98 (0.64-1.51)	0.954	G/G vs G/C+C/C
G/C	90 (47%)	77 (48%)	0.95 (0.61-1.48)	0.838	G/G vs G/C
C/C	20 (10%)	14 (10%)	1.16 (0.54-2.58)	0.688	G/G vs C/C
G	254 (66%)	211 (66%)			
C	130 (34%)	105 (44%)	1.02 (0.75-1.41)	0.861	
<b>P2X7 rs2230911 C/G</b>					
C/C	128 (66%)	97 (61%)	0.79 (0.51-1.23)	0.305	C/C vs C/G+G/G
C/G	57 (30%)	59 (37%)	0.73 (0.46-1.14)	0.173	C/C vs C/G
G/G	7 (4%)	2 (2%)	2.65 (0.53-13.06)	0.213	C/C vs G/G
C	313 (81%)	253 (80%)			
G	71 (19%)	63 (20%)	0.91 (0.62-1.32)	0.628	
<b>P2X7 rs3751143 A/C</b>					
A/A	127 (66%)	91 (57%)	0.69 (0.45-1.07)	0.100	A/A vs A/C+C/C
A/C	59 (31%)	62 (39%)	0.98 (0.43-1.06)	0.092	A/A vs A/C
C/C	6 (3%)	5 (4%)	0.85 (0.25-2.90)	0.807	A/A vs C/C
A	313 (81%)	244 (77%)			
C	71 (19%)	72 (33%)	0.76 (0.53-1.11)	0.160	
<b>NLRP1 rs35865013 A/G</b>					
A/A	28 (14%)	29 (18%)	1.31 (0.74-2.32)	0.341	A/A vs A/G+G/G
A/G	161 (84%)	129 (82%)	1.29 (0.73-2.28)	0.375	A/A vs A/G
G/G	3 (2%)	0	7.24 (0.35-146.7)	0.085	A/A vs G/G
A	217 (56%)	187 (59%)			
G	167 (44%)	129 (41%)	1.11 (0.82-1.50)	0.477	
<b>NLRP1 rs12150220 A/T</b>					
A/A	80 (42%)	70 (44%)	1.11 (0.72-1.70)	0.619	A/A vs A/T+T/T
A/T	90 (46%)	70 (44%)	1.12 (0.71-1.76)	0.606	A/A vs A/T
T/T	22 (12%)	18 (12%)	1.06 (0.53-2.15)	0.851	A/A vs T/T
A	250 (65%)	210 (66%)			
T	134 (35%)	106 (44%)	1.06 (0.77-1.45)	0.707	
<b>NLRP3 rs10754558 C/G</b>					
C/C	116 (60%)	92 (58%)	0.91 (0.59-1.40)	0.678	C/C vs C/G+G/G
C/G	65 (34%)	56 (35%)	0.92 (0.58 – 1.44)	0.718	C/C vs C/G
G/G	11 (6%)	10 (7%)	0.87 (0.35 – 2.14)	0.765	C/C vs G/G
C	297 (77%)	240 (75%)			
G	87 (33%)	76 (25%)	0.92 (0.65 – 1.31)	0.664	
<b>NLRP3 rs10805502 C/T</b>					
C/C	73 (38%)	66 (42%)	1.16 (0.76-1.79)	0.475	C/C vs C/T+T/T

C/T	95 (49%)	76 (48%)	1.13 (0.72-1.77)	0.593	C/C vs C/T
T/T	24 (13%)	16 (10%)	1.35 (0.66-2.77)	0.402	C/C vs T/T
C	241 (63%)	208 (65%)			
T	143 (37%)	108 (35%)	1.14 (0.83-1.56)	0.400	

**Association of genotypes and alleles of polymorphisms in a study with comorbidities, relapse and death in patients with acute lymphoblastic leukemia**

In Fig 1, it is possible to observe the genotype frequency of the SNPs under study corresponding to comorbidities (infectious diseases), relapse and death. Logistic regression analysis was performed in order to investigate the association of genotypes with the variables under study, shown in Fig 2. The *P2X7 A/C rs3751143* (OR: 2.30 [95% CI: 1.05 - 5.03,  $p=0.036$ ]), and *NLRP3 G/G rs10754558* genotypes (OR: 7.44 [95% CI: 1.44 - 38.26,  $p=0.016$ ]) were associated with the presence of infectious comorbidities at diagnosis, whereas, *NLRP1 A/T rs12150220* (OR: 0.37 [95% CI: 0.16 - 0.87,  $p=0.023$ ]) was associated with protection against comorbidities. The *NLRP1 A/G rs35865013* genotype (OR: 2.72 [95% CI: 1.07 - 6.90,  $p=0.034$ ]) was associated with twice the chance of patients relapsing after treatment. No association of SNPs with death was observed in this study. Furthermore, allelic frequency of the *NLRP1*, *NLRP3*, *P2X7*, *IL1 $\beta$*  and *IL18* polymorphisms in patients with acute lymphoblastic leukemia according to comorbidities (infectious diseases), relapse and death rate are shown in S1 Table.

**Fig 1.** Genotype frequency of the *IL-1 $\beta$* , *IL-18*, *NLRP1*, *NLRP3* and *P2X7*, polymorphisms patients with acute lymphoblastic leukemia according to comorbidities (infectious diseases), relapse and death.

**Fig 2.** Forest plot of the association between *IL-1 $\beta$* , *IL-18*, *NLRP1*, *NLRP3* and *P2X7* polymorphisms in patients with acute lymphoblastic leukemia according to comorbidities (infectious diseases), relapse and death.

## DISCUSSION

ALL is a multifactorial disease which is triggered by the interaction of genetic and environmental factors and one that most affects children worldwide (11). Studies demonstrate a relationship between the dysregulation of the immune system and the development of the disease, in which the inflammatory process could be one of the promoters of the neoplastic process (63,64,70,71). It is known that inflammation can induce an immune response involving macrophages, neutrophils, dendritic cells, natural killer cells (NK), B and T cells (148). Thus, epidemiological and genetic studies have demonstrated the crucial role of inflammation in the initiation, development, progression, invasion and metastasis in several types of cancers (149,150).

The family of NOD-like receptors has 22 different soluble cytosolic proteins that recognize PAMPs (Pathogen-associated molecular patterns) and DAMPs (Damage-associated molecular patterns), and are responsible for recruiting proteins to form signaling complexes that promote inflammation, called inflammasomes (151). Inflammasomes are multimeric molecular complexes, formed in the cytoplasm in response to endogenous and exogenous stimuli that promote the activation of inflammatory caspases (152). Over the years, inflammasomes have been linked to autoimmune (100,120) and inflammatory diseases

(153) as well as several types of cancer (148), however, their relationship with ALL has not yet been described.

In our study, the *IL1 $\beta$  rs16944* polymorphism was associated with the risk of developing ALL. IL-1 $\beta$  is a pro-inflammatory cytokine mediating the immune response against infections, inflammation and tissue damage released from the action of caspase-1 and has been associated with the tumor progression of some cancers, such as gastric cancer and hepatocarcinoma (154,155). In a study by Yin et al. (2016), it was shown that individuals with the *IL1 $\beta$  G/G rs16944* genotype are at risk for the development of Myelodysplastic Syndrome (MDS) (156). In addition, polymorphisms involving the cytokine IL-1 $\beta$  were associated with cytogenetic assessment of good prognosis in patients with acute myeloid leukemia (AML) ( $p=0.043$ ) (131).

The *IL1 $\beta$*  gene is located on chromosome 2q14 and contains many single nucleotide polymorphisms. One of them is *IL1 $\beta$  rs16944* located in the promoter region that significantly affects the interactions of DNA proteins and interferes with the production of IL-1 $\beta$  (118,157). In the literature, this polymorphism has been associated with increased production of the IL-1 $\beta$  cytokine, susceptibility or worse prognosis in individuals with autoimmune diseases and in several types of cancers (118,158).

After infection or injury, an IL-1 $\beta$  is found at high medullary levels by monocytes and endothelial cells, and promotes myeloid differentiation through activation of the NF- $\kappa$ B pathway that results in the expansion of HSPCs (159). Chronic exposure to IL-1 $\beta$  significantly impairs self-renewal and the ability of HSPCs to differentiate into lymphoid and erythroid lineage (160). Therefore, chronic sustained inflammation may elicit the stem cell insult by inducing a state of chronic oxidative stress with elevated levels of reactive oxygen species (ROS) in the bone marrow, thereby creating a high-risk microenvironment for induction of genetic alterations due to the persistent inflammation-induced oxidative damage to DNA in hematopoietic cells (161).

Chronic immune stimulation from infectious processes is a trigger for AML and MDS. The history of infectious diseases (tuberculosis, intestinal diseases, pneumonia, septicemia, pyelonephritis, sinusitis, nasopharyngitis, hepatitis C, cytomegalovirus infection and upper respiratory tract infection) was associated with 1.3 times more chances of developing AML or MDS, even if the infection occurred 3 years before the onset of the disease (139). Thus, chronic inflammation can be identified as one of the triggers of hematological neoplasms.

IL-18 is an important cytokine that effects the NLRP3 inflammasome, which is involved in the innate and acquired immune response. In multiple myeloma, the increase in serum IL-18 is associated with disease progression and lower chances of patient survival (162). In this study, no association was found between inflammatory SNPs and ALL. However, in the study by Yalçın et al. on the Turkish population (2014), the G/C and C/C genotypes were associated with the risk of developing chronic myeloid leukemia, and the C/C genotype was associated with the risk of developing chronic lymphoid leukemia, which suggests a relationship between this polymorphism and the development of chronic leukemias characterized by the proliferation of mature cells, however, with loss of functionality (163).

The NLRP1 inflammasome is expressed in hematopoietic progenitor cells and its activation results in a process of cell death dependent on caspase 1 called pyroptosis. Some studies report that the prolonged cytopenia, induced by the activation of NLRP1 during infectious processes, ensures a proliferative advantage for the leukemic clone, as suggested by the Mel Greaves hypothesis on the development of ALL

(144,164). In chronic myeloid leukemia (CML), overexpression of NLRP1 is associated with the promotion of proliferation and reduction of apoptosis in CML cells, in addition to inducing resistance to imatinib (165). In this study, an association was found between the *NLRP1* A/G rs35865013 genotype with the risk of relapse after diagnosis in patients with ALL, thus indicating a possible prognostic marker for the disease.

Paugh et al. (2016) report that decreased methylation of the Caspase-1 promoter results in increased transcription and activation of NLRP3, which cleaves the glucocorticoid receptors used in the treatment of ALL (142,143). Despite therapeutic advances, many patients still relapse during treatment. Since no association of *NLRP3* SNPs with ALL was found in this study, it is suggested that epigenetic mechanisms are involved in the pathogenesis process of the disease, as well as influencing the patient's prognosis.

Infections are present in 49% of patients with acute lymphoblastic leukemia on diagnosis (166). In this study, the *NLRP3* G/G rs10454558 genotype was associated with the presence of infectious diseases in the study population, while the *NLRP1* A/T rs12150220 genotype with protection against infectious diseases. NLRs (NOD-like receptors) proteins are crucial in the defense of the host against intracellular pathogens, such as, for example, the inflammasomes NLRP1 and NLRP3 act as sensors in the recognition of *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania sp* and limit the load and spread of these parasites. Studies report that susceptibility to congenital toxoplasmosis is significantly associated with SNPs, and involves the locus of the *NLRP1* gene (167), which strengthens the Mel Greaves hypothesis that genetic changes in the uterus followed by the acquisition of infections to common pathogens are involved in the development of ALL (62,168).

The P2X7 receptor is responsible for making NLRP3 sensitive to ATP, which is one of the main DAMPs released during inflammation and is highly expressed in tumor cells. Studies describe the high expression of P2X7 in samples from ALL patients, especially those who relapse, as well as an association with dysregulation of the HSPCs' normal functioning, since it affects the ability of colony formation in vitro, which impairs the clonal expansion process observed in the HSPCs. However, the role of this mechanism in the development of ALL is still unknown (169).

The *P2X7* rs2230911 polymorphism causes a loss of receptor function, mainly in macrophages, and is responsible for a partial reduction of the channel and formation of pores in the membrane. Macrophages are essential in the innate immune response and the lack of P2X7 receptor function can make the host susceptible to infections by intracellular parasites such as *Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamydia trachomatis* and *Toxoplasma gondii* (170). The *P2X7* rs3751143 polymorphism also causes loss of function in the receptor and affects the formation of pores and, in the literature, it is associated with the susceptibility to infection by *Mycobacterium tuberculosis* in the Asian population. (129). In chronic lymphoid leukemia, this polymorphism appears to influence patient survival, with the A/C genotype being associated with longer survival (104 months) than the A/A genotype (72 months) (115,171).

In this study, the genotype *P2X7* A/C rs3751143 was associated with the presence of infectious diseases on diagnosis. One of the main diseases found was toxoplasmosis, an infection caused by *Toxoplasma gondii*. The P2X7 receptor is an important mediator in the control of infection by *Toxoplasma gondii*, since it prevents its proliferation by stimulating the production of reactive oxygen species (ROS) and facilitates the acidification of parasitophorous vacuoles in macrophages infected by the parasite (172). Loss of receptor function may be responsible for the susceptibility to *Toxoplasma gondii* infection in patients with



acute lymphoblastic leukemia in this study, however, prospective studies are needed to confirm this relationship.

This study has some limitations. Despite the association of SNPs with ALL inflammasome and clinical data, the study population is small compared to other studies involving SNPs. Thus, prospective studies with a larger population are necessary in order to confirm the importance of the polymorphisms under study in ALL. The small sample size did not allow the comparison of the studied genotypes and alleles with the laboratory data.

## CONCLUSION

To our knowledge, this is the first study to describe the frequency of polymorphisms in the inflammasome genes in patients with acute lymphoblastic leukemia in the Amazon region. Inflammasomes are important complexes in the defense of the host and contribute to neoplastic development. Thus, the variant *IL1 $\beta$  rs16944* was associated with susceptibility to ALL in individuals from the Brazilian Amazon region. In addition, inflammasome SNPs are associated with the presence of infectious diseases on diagnosis and relapse in individuals with acute lymphoblastic leukemia. However, future studies should be carried out in order to better elucidate the influence of these SNPs on the pathogenesis of ALL.

## SUPPORTING INFORMATION

**S1 Table.** Allelic frequencies of the IL-1 $\beta$ , IL-18, NLRP1, NLRP3 and P2X7 polymorphisms in patients with acute lymphoblastic leukemia according to comorbidities (infectious diseases), relapse and death rate.

## AUTHORS' CONTRIBUTIONS

**Conceptualization:** Allyson Guimarães da Costa, Fabíola Silva Alves, Aya Sadahiro and Adriana Malheiro

**Data curation:** Fabíola Silva Alves, Lilyane Amorim Xabregas, Gláucia Lima Souza, Daniele Sá Pereira and Andréa Monteiro Tarragô

**Formal analysis:** Fabíola Silva Alves, Fábio Magalhães Gama, Andréa Monteiro Tarragô, Allyson Guimarães Costa

**Funding acquisition:** Aya Sadahiro, Adriana Malheiro and Allyson Guimarães Costa

**Investigation:** Fabíola Silva Alves, Marlon Wendell Athaydes Kerr, Fábio Magalhães Gama, Mirian Rodrigues Ribeiro Santiago and Nadja Pinto Garcia

**Methodology:** Fabíola Silva Alves, Lilyane Amorim Xabregas, Andréa Monteiro Tarragô, Maurício Morishi Ogusku, Aya Sadahiro

**Project administration:** Adriana Malheiro and Allyson Guimarães Costa

**Writing - review&editing:** Fabíola Silva Alves, Aya Sadahiro Adriana Malheiro and Allyson Guimarães Costa

## ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

All protocols and consent forms were approved by the Research Ethics Committee at the HEMOAM Foundation (CEP/HEMOAM process #3.335.123/2019). Patients were treated according to the recommendations of the Brazilian Health Ministry.

## CONFLICTING INTERESTS

The authors declare no commercial associations or other types of associations that might pose conflict of interests.

## LIST OF ABBREVIATIONS

FABÍOLA SILVA ALVES - FSA  
 LILYANE AMORIM XABREGAS - LAX  
 MARLON WENDELL ATHAYDES KERR - MWA  
 GLÁUCIA LIMA SOUZA - GLS  
 DANIELE SÁ PEREIRA - DSP  
 FÁBIO MAGALHÃES GAMA - FMG  
 MIRIAN RODRIGUES RIBEIRO SANTIAGO - MRRS  
 NADJA PINTO GARCIA - NPG  
 ANDRÉA MONTEIRO TARRAGÓ – AMT  
 MAURÍCIO MORISHI OGUSKU – MMO  
 AYA SADAHIRO - AS  
 ADRIANA MALHEIRO - AM  
 ALLYSON GUIMARÃES COSTA - AGC

## FUNDING

This work was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) (Pró-Estado Program - #002/2008 and PAPAC Program - #005/2019), Rede Genômica Vigilância em Saúde do Estado do Amazonas (REGESAM), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). FSA, LAX, MWA, GLS, FMG and DSP have fellowships from FAPEAM and CAPES (Master's and SI student). AM is a level 2 research fellow from CNPq. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## REFERENCES

1. Miranda Filho A, Piñeros M, Ferlay J, Soerjomataram I, Monnereau A, Bray F. Epidemiological patterns of leukaemia in 184 countries: a population-based study. *Lancet Haematol* [Internet]. 2018;5(1):14–24. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S2352-3026\(17\)30232-6](http://dx.doi.org/10.1016/S2352-3026(17)30232-6)
2. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa de câncer no Brasil 2020. In: Ministério da Saúde. 2019. p. 122.
3. Wiemels J. Perspectives on the causes of childhood leukemia. *Chem Biol Interact* [Internet]. 2012;196(3):59–67. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2012.01.007>
4. Crump C, Sundquist J, Sieh W, Winkleby MA, Sundquist K. Perinatal and familial risk factors for acute lymphoblastic leukemia in a Swedish national cohort. *Cancer*. 2015;121(7):1040–7.
5. Greaves M. A causal mechanism for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2018;18(8):471–84.

6. Takizawa H, Manz MG. Impact of inflammation on early hematopoiesis and the microenvironment. *Int J Hematol*. 2017;106(1):27–33.
7. Broz P, Dixit VM. Inflammasomes: Mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2016;16(7):407–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri.2016.58>
8. Kantono M, Guo B. Inflammasomes and cancer: The dynamic role of the inflammasome in tumor development. *Front Immunol*. 2017;8(SEP):1–9.
9. Seth M, Motti G, Donald M, Simon P, Marc P, O'Donnell J, et al. NLRP1 inflammasome activation induces pyroptosis of hematopoietic progenitor cells. *Immunity*. 2012;37(6):82–91.
10. Paugh SW, Bonten EJ, Savic D, Ramsey LB, Thierfelder WE, Gurung P, et al. NALP3 inflammasome upregulation and CASP1 cleavage of the glucocorticoid receptor cause glucocorticoid resistance in leukemia cells. *Nat Genet*. 2015;
11. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Borowitz MJ, Beau MM, Bloomfield CD, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391–406.
12. Folwaczny M, Glas J, Török HP, Tonenchi L, Paschos E, Bauer B, et al. Polymorphisms of the interleukin-18 gene in periodontitis patients. *J Clin Periodontol*. 2005;32(5):530–4.
13. Bhat IA, Naykoo NA, Qasim I, Ganie FA, Yousuf Q, Bhat BA, et al. Association of interleukin 1 beta (IL-1 $\beta$ ) polymorphism with mRNA expression and risk of non small cell lung cancer. *Meta Gene* [Internet]. 2014;2(1):123–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mgene.2013.12.002>
14. Kinlen LJ. Evidence for an infective cause of childhood leukaemia: comparison of a Scottish new town with nuclear reprocessing sites in Britain. *Lancet*. 1988;332(8624):1323–7.
15. Kinlen LJ. An examination, with a meta-analysis, of studies of childhood leukaemia in relation to population mixing. *Br J Cancer* [Internet]. 2012;107(7):1163–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2012.402>
16. Greaves MF. Aetiology of acute leukaemia. *Lancet*. 1997;349(9048):344–9.
17. Greaves M. Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(3):193–203.
18. Karki R, Man SM, Kanneganti TD. Inflammasomes and cancer. *Cancer Immunol Res*. 2017;5(2):94–9.
19. He Q, Fu Y, Tian D, Yan W. The contrasting roles of inflammasomes in cancer. *Am J Cancer Res* [Internet]. 2018;8(4):566–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29736304> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5934549>
20. Moossavi M, Parsamanesh N, Bahrami A, Atkin SL, Sahebkar A. Role of the NLRP3 inflammasome in cancer. *Mol Cancer*. 2018;17(1):1–13.
21. Awad F, Assrawi E, Louvrier C, Jumeau C, Georjina-Lavialle S, Grateau G, et al. Inflammasome biology, molecular pathology and therapeutic implications. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2018;187:133–49. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.02.011>
22. Platnich JM, Muruve DA. NOD-like receptors and inflammasomes: A review of their canonical and non-canonical signaling pathways. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 2019;670:4–14. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2019.02.008>
23. Pontillo A, Girardelli M, Kamada AJ, Pancotto JAT, Donadi EA, Crovella S, et al. Polymorphisms in inflammasome genes are involved in the predisposition to systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity*. 2012;45(4):271–8.
24. Grandemange S, Sanchez E, Louis-Plence P, Tran Mau-Them F, Bessis D, Coubes C, et al. A new autoinflammatory and autoimmune syndrome associated with NLRP1 mutations: NAIAD (NLRP1-associated autoinflammation with arthritis and dyskeratosis). *Ann Rheum Dis*. 2017;76(7):1191–8.
25. Fan J, Xie K, Wang L, Zheng N, Yu X. Roles of Inflammasomes in Inflammatory Kidney Diseases. *Mediators Inflamm*. 2019;2019:2923072.
26. Raza Y, Khan A, Khan AI, Khan S, Akhter S, Mubarak M, et al. Combination of Interleukin 1 Polymorphism and Helicobacter pylori Infection: an Increased Risk of Gastric Cancer in Pakistani Population. *Pathol Oncol Res* [Internet]. 2017;23(4):873–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s12253-017-0191-9>
27. Tak KH, Yu GI, Lee MY, Shin DH. Association between polymorphisms of interleukin 1 family genes and hepatocellular carcinoma. *Med Sci Monit*. 2018;24:3488–95.
28. Yin C, He N, Li P, Zhang C, Yu J, Hua M, et al. Polymorphisms of Interleukin-1 $\beta$  rs16944 confer susceptibility to myelodysplastic syndromes. *Life Sci*. 2016;165:109–12.
29. Wang H, Hua M, Wang S, Yu J, Chen C, Zhao X, et al. Genetic polymorphisms of IL-18 rs1946518 and IL-1 $\beta$  rs16944 are associated with prognosis and survival of acute myeloid leukemia. *Inflamm Res*. 2017;66(3):249–58.
30. Gore EA, Sanders JJ, Pandey JP, Palesch Y, Galbraith GMP. Interleukin-1 $\beta$ +3953 allele 2: Association with disease status in adult periodontitis. *J Clin Periodontol*. 1998;25(10):781–5.

31. Bent R, Moll L, Grabbe S, Bros M. Interleukin-1 beta—A friend or foe in malignancies? *Int J Mol Sci.* 2018;19(8).
32. Umare V, Pradhan V, Rajadhyaksha A, Ghosh K, Nadkarni A. Predisposition of IL-1 $\beta$  (-511 C/T) polymorphism to renal and hematologic disorders in Indian SLE patients. *Gene* [Internet]. 2018;641:41–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2017.10.039>
33. Arranz L, Arriero M del M, Villatoro A. Interleukin-1 $\beta$  as emerging therapeutic target in hematological malignancies and potentially in their complications. *Blood Rev* [Internet]. 2017;31(5):306–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.blre.2017.05.001>
34. Pietras EM, Mirantes-Barbeito C, Fong S, Loeffler D, Kovtonyuk L V., Zhang S, et al. Chronic interleukin-1 drives haematopoietic stem cells towards precocious myeloid differentiation at the expense of self-renewal. *Nat Cell Biol.* 2016;18(6):607–18.
35. Hasselbalch HC. Chronic inflammation as a promotor of mutagenesis in essential thrombocythemia, polycythemia vera and myelofibrosis. A human inflammation model for cancer development? *Leuk Res* [Internet]. 2013;37(2):214–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.leukres.2012.10.020>
36. Kristinsson SY, Björkholm M, Hultcrantz M, Derolf ÅR, Landgren O, Goldin LR. Chronic immune stimulation might act as a trigger for the development of acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol.* 2011;29(21):2897–903.
37. Nakamura K, Kassem S, Cleynen A, Chrétien ML, Guillerey C, Putz EM, et al. Dysregulated IL-18 Is a Key Driver of Immunosuppression and a Possible Therapeutic Target in the Multiple Myeloma Microenvironment. *Cancer Cell.* 2018;33(4):634–648.e5.
38. Yalçın S, Mutlu P, Çetin T, Sarper M, Özgür G, Avcu F. The -137G/C Polymorphism in Interleukin-18 Gene Promoter Contributes to Chronic Lymphocytic and Chronic Myelogenous Leukemia Risk in Turkish Patients. *Turkish J Hematol.* 2015;32(4):311–6.
39. Masters SL, Gerlic M, Metcalf D, Preston S, Pellegrini M, O'Donnell JA, et al. NLRP1 Inflammasome Activation Induces Pyroptosis of Hematopoietic Progenitor Cells. *Immunity* [Internet]. 2012;37(6):1009–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2012.08.027>
40. Wu J y., Zeng LY. Role of NLRP1 in blood disorders. *Zhongguo Shi Yan Ye Xue Za Zhi.* 2014;5:1476–9.
41. Xu Z, Wang H, Wei S, Wang Z, Ji G. Inhibition of ER stress-related IRE1 $\alpha$ /CREB/NLRP1 pathway promotes the apoptosis of human chronic myelogenous leukemia cell. *Mol Immunol* [Internet]. 2018;101(83):377–85. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.07.002>
42. Paugh SW, Bonten EJ, Evans WE. Inflammasome-mediated glucocorticoid resistance: The receptor rheostat. *Mol Cell Oncol* [Internet]. 2016;3(1):1–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/23723556.2015.1065947>
43. Clarke RT, Van Den Bruel A, Bankhead C, Mitchell CD, Phillips B, Thompson MJ. Clinical presentation of childhood leukaemia: A systematic review and meta-analysis. *Arch Dis Child.* 2016;101(10):894–901.
44. Witola WH, Mui E, Hargrave A, Liu S, Hypolite M, Montpetit A, et al. NALP1 influences susceptibility to human congenital toxoplasmosis, proinflammatory cytokine response, and fate of *Toxoplasma gondii*-infected monocytic cells. *Infect Immun.* 2011;79(2):756–66.
45. Clay GM, Wilson ME. NLR proteins and parasitic disease. *Immunol Res.* 2016;59:142–52.
46. Greaves M. A causal mechanism for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2018;18(8):471–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41568-018-0015-6>
47. Feng W, Yang F, Wang R, Yang X, Wang L, Chen C, et al. High Level P2X7-Mediated Signaling Impairs Function of Hematopoietic Stem/Progenitor Cells. *Stem Cell Rev Reports* [Internet]. 2016;12(3):305–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s12015-016-9651-y>
48. 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(4):2079–86.
49. Taheri M, Sarani H, Moazeni-Roodi A, Naderi M, Hashemi M. Association between P2X7 polymorphisms and susceptibility to tuberculosis: An updated meta-analysis of case-control studies. *Med.* 2019;55(6).
50. Thunberg U, Tobin G, Johnson A, Söderberg O, Padyukov L, Hultdin M, et al. Polymorphism in the P2X7 receptor gene and survival in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet.* 2002;360(9349):1935–9.
51. Salaro E, Rambaldi A, Falzoni S, Amoroso FS, Franceschini A, Sarti AC, et al. Involvement of the P2X7-NLRP3 axis in leukemic cell proliferation and death. *Sci Rep* [Internet]. 2016;6(1):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep26280>
52. Moreira-Souza ACA, Almeida-da-Silva CLC, Rangel TP, Rocha G da C, Bellio M, Zamboni DS, et al. The P2X7 receptor mediates *Toxoplasma gondii* Control in Macrophages through canonical NLRP3 inflammasome activation and reactive oxygen species production. *Front Immunol.* 2017;8(OCT).

**LEGEND FOR FIGURES**

**Fig 1.** Genotype frequency of the IL-1 $\beta$ , IL-18, NLRP1, NLRP3 and P2X7, polymorphisms patients with acute lymphoblastic leukemia according to comorbidities (infectious diseases), relapse and death.

**Fig 2.** Forest plot of the association between *IL-1 $\beta$* , *IL-18*, *NLRP1*, *NLRP3* and *P2X7* polymorphisms in patients with acute lymphoblastic leukemia according to comorbidities (infectious diseases), relapse and death.

Fig 1.

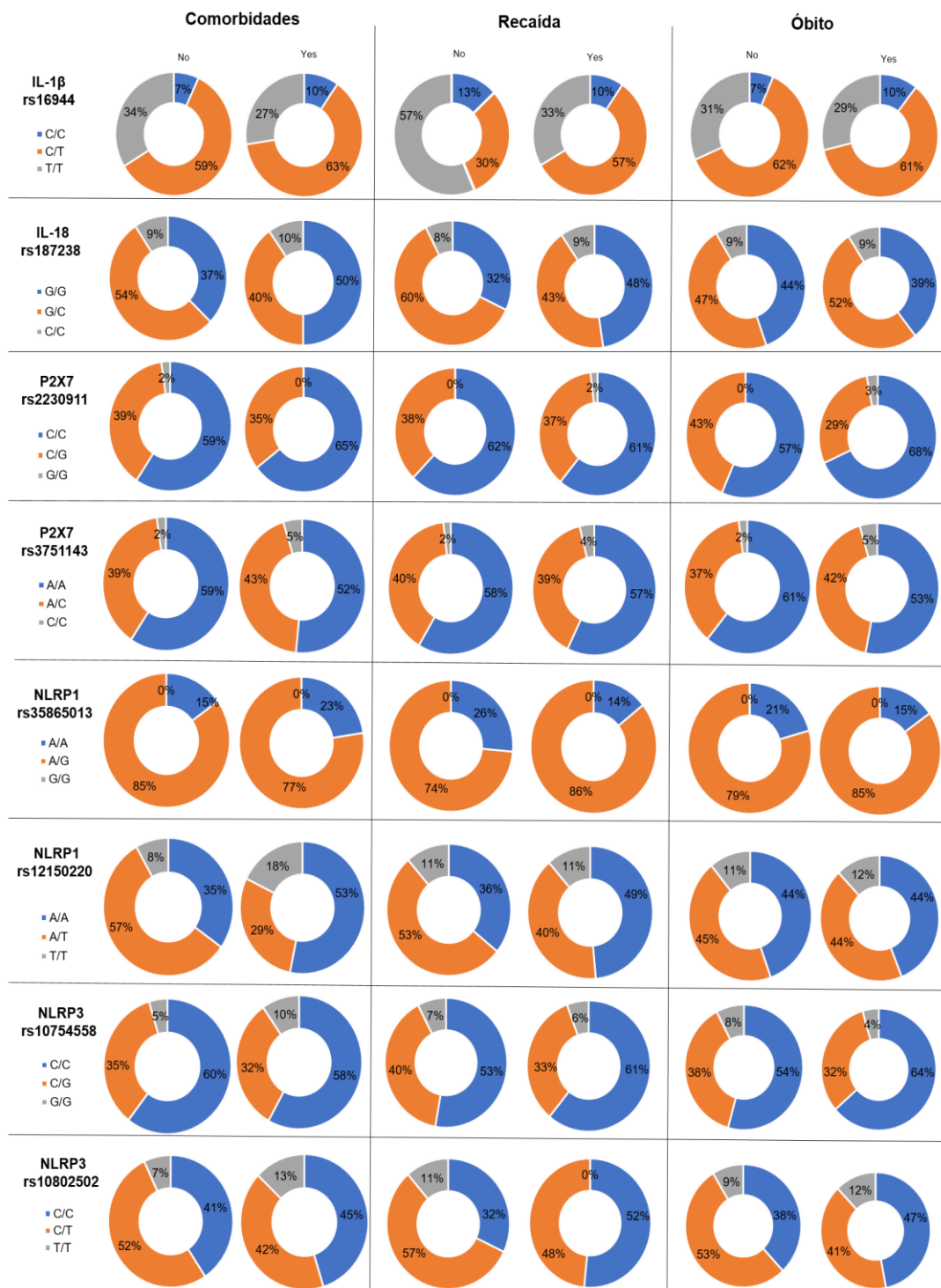
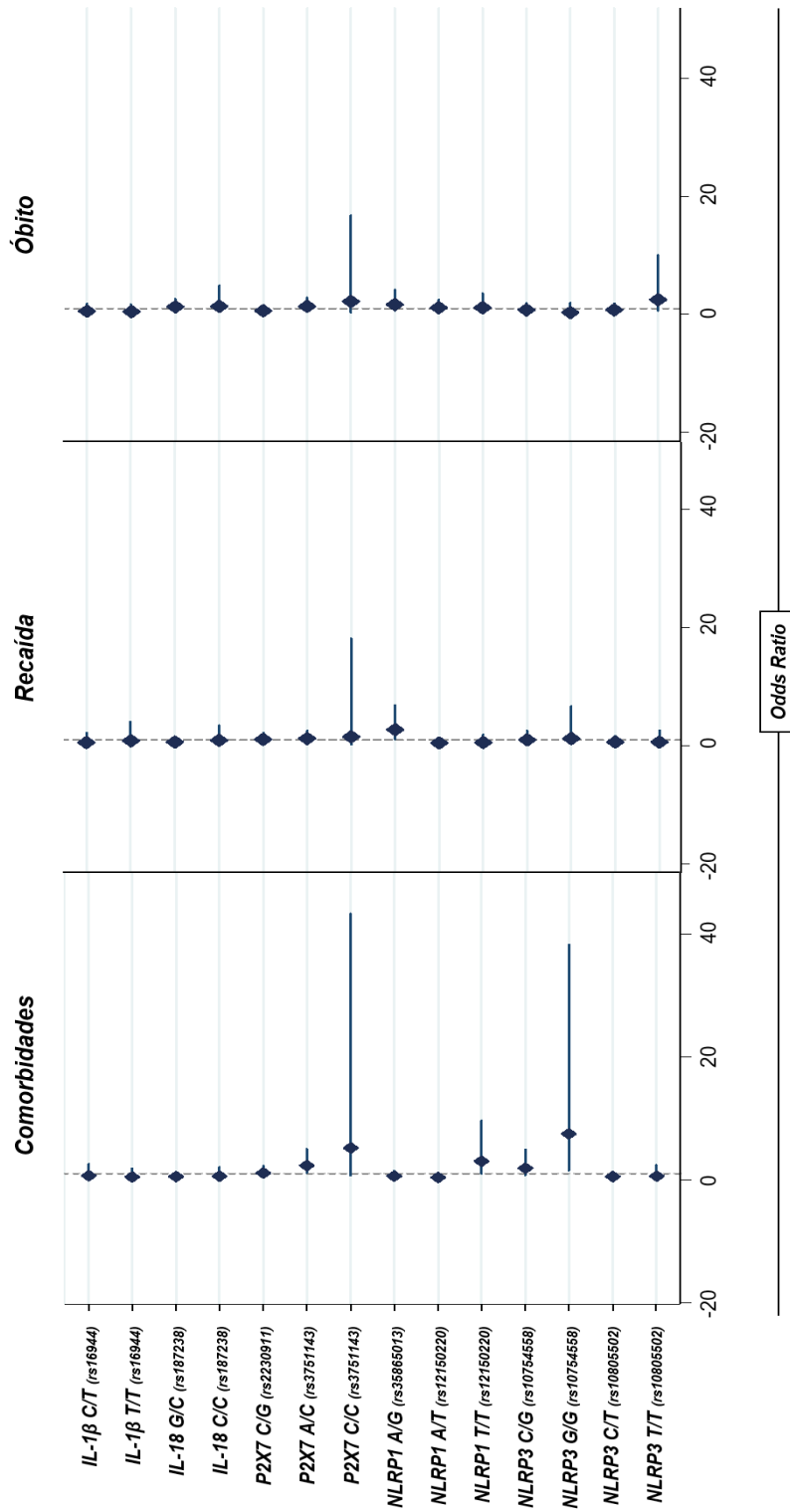


Fig 2.



**S1 Table.** Allelic frequencies of the IL-1 $\beta$ , IL-18, NLRP1, NLRP3 and P2X7 polymorphisms in patients with acute lymphoblastic leukemia according to comorbidities (infectious diseases), relapse and death rate.

COMORBIDITIES	No	Yes	OR (IC 95%)	p-value	RELAPSE	No	Yes	OR (IC 95%)	p-value	DEATH	No	Yes	OR (IC 95%)	p-value
	n = 86	n = 62				n = 53	n = 105				n = 92	n = 66		
<b>IL-1<math>\beta</math> rs16944 C/T</b>														
<b>C</b>	63	51	1.20	0,468		43	80	0.90	0,670		69	54	1.15	0,539
	(37%)	(41%)	0.75			(40%)	(38%)	0.55			(37%)	(40%)	0.73	
<b>T</b>	109	73	–	1.92		63	130	–	1.45		115	78	–	1.82
	(63%)	(59%)				(80%)	(62%)				(63%)	(60%)		
<b>IL-18 rs187238 G/C</b>														
<b>G</b>	110	87	1.32	0,317		66	145	1.35	0,226		125	86	0.88	0,604
	(64%)	(70%)	0.80			(62%)	(69%)	0.82			(68%)	(65%)	0.54	
<b>C</b>	62	37	–	2.17		40	65	–	2.20		59	46	–	1.41
	(36%)	(30%)				(38%)	(31%)				(32%)	(35%)		
<b>P2X7 rs2230911 C/G</b>														
<b>C</b>	135	102	1.27	0,463		86	167	0.90	0,735		144	109	1.31	0,343
	(78%)	(82%)	0.72			(81%)	(80%)	0.50			(78%)	(82%)	0.74	
<b>G</b>	37	22	–	2.25		20	43	–	1.63		40	23	–	2.32
	(22%)	(18%)				(19%)	(20%)				(22%)	(18%)		
<b>P2X7 rs3751143 A/C</b>														
<b>A</b>	135	91	0.75	0,333		83	161	0.91	0,743		146	98	0.75	0,285
	(78%)	(73%)	0.44			(78%)	(77%)				(79%)	(74%)		



<b>C</b>	37	33	–									
	(22%)	(27%)	1.29									
					23	49	0.51		38	34	0.44	
					(22%)	(33%)	–		(21%)	(26%)	–	
							1.59				1.27	
<b><i>NLRP1 rs35865013 A/G</i></b>												
<b>A</b>	99	76	1.16		67	120	0.77		111	76	0.89	
	(58%)	(61%)	0.73	0,550	(63%)	(57%)	0.48	0,300	(60%)	(57%)	0.56	0,623
<b>G</b>	73	48	–		39	90	–		73	56	–	
	(42%)	(39%)	1.86		(37%)	(86%)	1.25)		(40%)	(43%)	1.40	
<b><i>NLRP1 rs12150220 A/T</i></b>												
<b>A</b>	109	84	1.21		66	144	1.32		123	87	0.80	
	(63%)	(68%)	0.74	0,460	(62%)	(68%)	0.81	0,262	(71%)	(61%)	0.49	0,372
<b>T</b>	63	40	–		40	66	–		51	45	–	
	(37%)	(32%)	1.95)		(38%)	(32%)	2.15)		(29%)	(39%)	1.30)	
<b><i>NLRP3 rs10754558 C/G</i></b>												
<b>C</b>	134	92	0.81		77	163	1.30		135	105	1.41	
	(78%)	(74%)	0.48	0,489	(72%)	(78%)	0.76	0,328	(73%)	(80%)	0.82	0,205
<b>G</b>	38	32	–		29	47	–		49	27	–	
	(22%)	(26%)	1.40)		(28%)	(22%)	2.23		(27%)	(20%)	2.40	
<b><i>NLRP3 rs10805502 C/T</i></b>												
<b>C</b>	115	82	0.96		64	144	1.43		119	89	1.13	
	(67%)	(66%)	0.59	0,901	(60%)	(68%)	0.88	0,147	(65%)	(67%)	0.70	0,611
<b>T</b>	57	42	–		42	66	–		65	43	–	
	(33%)	(34%)	1.55		(40%)	(32%)	2.32		(35%)	(33%)	1.81)	

