



Universidade de Brasília - UnB
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

SARA SOCORRO FARIA

**EXPRESSÃO DOS MARCADORES DO INFLAMASSOMA EM
PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA TRIPLO-NEGATIVO E SUA
ASSOCIAÇÃO COM MUTAÇÃO NO GENE *BRCA1***

BRASÍLIA-DF

2022

SARA SOCORRO FARIA

**EXPRESSÃO DOS MARCADORES DO INFLAMASSOMA EM
PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA TRIPLO-NEGATIVO E SUA
ASSOCIAÇÃO COM MUTAÇÃO NO GENE *BRCA1***

Tese de doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Patologia Molecular, na área de concentração de Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientação: Kelly Grace Magalhaes

BRASÍLIA – DF

2022

Ficha catalográfica elaborada automaticamente, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Se Socorro Faria, Sara
EXPRESSÃO DOS MARCADORES DO INFLAMASSOMA EM PACIENTES
COM CÂNCER DE MAMA TRIPLO-NEGATIVO E SUA ASSOCIAÇÃO COM
MUTAÇÃO NO GENE BRCA1 / Sara Socorro Faria; orientador
Kelly Grace Magalhães. -- Brasília, 2022.
119 p.

Tese (Doutorado - Doutorado em Patologia Molecular) --
Universidade de Brasília, 2022.

1. Câncer de mama. 2. Inflamação. 3. Inflamassoma. 4.
Mutações no gene BRCA1. I. Magalhães, Kelly Grace, orient.
II. Título.

Este trabalho foi realizado em parceria com as seguintes instituições:

Hospital A.C. Camargo. Cancer Center – Fundação Antônio Prudente,
São Paulo, Brasil

Hospital do Câncer – Prevenção e Tratamento de Câncer
Barretos, São Paulo, Brasil

SARA SOCORRO FARIA

**EXPRESSÃO DOS MARCADORES DO INFLAMASSOMA EM PACIENTES
COM CÂNCER DE MAMA TRIPLO-NEGATIVO E SUA ASSOCIAÇÃO
COM MUTAÇÃO NO GENE *BRCA1***

Banca Examinadora

Prof. Dr^a. Kelly Grace Magalhães (Presidente)
Universidade de Brasília – UnB

Prof. Dra. Marcelo Brígido (Membro Titular)
Universidade de Brasília – UnB

Prof. Dr^a. Gabriela Nestal de Moraes (Membro Titular)
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

Prof. Dr^a. Letícia Rangel (Membro Titular)
Universidade Federal do Espírito Santo – UFES

Prof. Dr^a. Fabíola Cristina Ribeiro Zucchi (Membro Suplente)
Universidade de Brasília – UnB

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me guiado e guardado durante toda essa trajetória e por ter me dado forças para não desistir diante das dificuldades.

Aos meus pais, que me serviram de exemplo na busca pelo aperfeiçoamento.

À minha irmã, Patrícia, meu cunhado Gabriel, e, minha querida sobrinha Alice, pelo apoio e por se fazerem presentes mesmo quando distantes.

Aos meus familiares, em especial às primas Enilda, Larissa e Maria Elisa, que me apoiaram em um dos momentos mais difíceis deste doutorado me doando de forma generosa, força e apoio.

Ao Cristóvão Giovani Burgarelli pelo suporte “da palavra e escuta”.

Agradeço a todas as pessoas envolvidas direta ou indiretamente na execução desse trabalho, em especial:

À minha orientadora prof. Dra. Kelly Grace Magalhães, neste desafio para o aprendizado e evolução no conhecimento da biologia molecular do câncer de mama.

Ao Dr Vladimir Cordeiro de Lima, por ser incansável no seu esforço de ensinar e por ser um exemplo de dedicação e fidelidade às boas ideias.

Aos patologistas Dr. João Victor Alves Castro, Dr^a. Cynthia Bueno e Dr. Victor Piana de Andrade, pela disponibilidade, conhecimento e energia empregados em dias de leitura dos “*Tissue Micro Arrays*”, no departamento de Patologia do A.C. Camargo Cancer Center, qualidades indispensáveis para que este estudo fosse finalizado.

Aos técnicos do laboratório de Imuno-histoquímica do Hospital A.C. Camargo, pelo preparo técnico das amostras e apoio a este trabalho.

Aos colaboradores do Hospital do Amor – Barretos, Dr^a. Márcia Chiquitelli, Dr. Cristiano Pádua e Dr. Vinicius Duval.

À minha amiga Magdalena Orzechowska, pelo apoio e ensinamentos em bioinformática.

A todos aqueles de que forma direta ou indireta, colaboraram na elaboração desse trabalho.

Por fim, agradeço ao CNPq pelo fomento financeiro para o desenvolvimento desse trabalho.

RESUMO

O câncer de mama é uma doença heterogênea, podendo ser dividida em subtipos de acordo com o perfil imunofenotípico e de expressão gênica. Em relação ao perfil imunofenotípico, o câncer de mama triplo-negativo (CMTN) é caracterizado pela ausência dos receptores hormonais de estrogênio (ER) e de progesterona (PR) além de não apresentar super-expressão/amplificação da proteína/gene do receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2). O CMTN é caracterizado por marcante pleomorfismo e alta relação núcleo-citoplasmática, necrose tumoral e bordas digitiformes acompanhadas de infiltrado linfocítico intenso. Estes tumores são associados com mutações nos genes *BRCA1* e *TP53*. A resposta inflamatória está envolvida em muitos aspectos da biologia do câncer. O inflamassoma é um complexo multiprotéico intracelular compostos por três elementos: um receptor de reconhecimento de padrões moleculares (PRRs), a proteína ASC (proteína *speck-like* associada à apoptose com domínio de recrutamento de caspase) e o zimogênio pró-caspase-1. O papel dos inflamassomas no câncer de mama ainda é mal definido, devido às suas funções contrastantes na oncogênese a depender do tipo de tecido e do estágio em que são ativados. Diante disso, este estudo teve como objetivo analisar e comparar a expressão dos componentes do inflamassoma, incluindo NLRP3, PYCARD, caspase-1 e IL-18 em pacientes com CMTN com e sem mutação no gene *BRCA1*. Para isso, a expressão dos componentes do inflamassoma foi avaliada através da técnica de imuno-histoquímica em biópsias tumorais com e sem mutação no gene *BRCA1* de 88 pacientes com CMTN. Adicionalmente foram analisadas as diferenças entre o perfil de expressão dos genes de interesse utilizando dados de RNA-seq provenientes do banco de dados *The Cancer Genome Atlas* (TCGA). Em ambas as populações, os dados de expressão foram correlacionados com dados clínico-patológicos das pacientes. Foram avaliadas amostras tumorais de 88 pacientes com câncer de mama TN, das quais 4 apresentaram uma Variante de Significado Incerto, 14 apresentaram mutação patogênica no gene *BRCA1*, 58 foram classificadas como selvagens, e 12 tinham hipermetilação na região promotora do gene *BRCA1*. Foi constatada associação significativa entre a expressão de caspase-1 e tamanho tumoral ($p=0,005$). O comprometimento linfonodal foi associado à maior expressão de NLRP3 ($p=0,003$). Não houve associação entre a expressão dos componentes do inflamassoma e da mutação no gene *BRCA1*. Pacientes com maior expressão de NLRP3 tiveram maior sobrevida livre de doença (HR: 0,3; IC 95%: 0,13-0,72; $p=0,007$) e sobrevida global (HR: 0,44; IC 95%: 0,10-0,99; $p=0,049$), indicando um possível efeito protetor no prognóstico da doença. A maior expressão da IL-18 conferiu 4,6 vezes maior risco para óbito (HR: 4,6; IC 95%: 1,21-17,4; $p=0,025$). Esses dados são relevantes e podem ajudar a entender melhor o papel do inflamassoma em tumores TN com mutação no gene *BRCA1*.

Palavras-chave: câncer de mama triplo-negativo, inflamassoma, infiltrado imune, mutação, piroptose.

ABSTRACT

Breast cancer is a heterogeneous disease and can be divided into subtypes according to immunophenotype and gene expression. Regarding the immunophenotype, the triple-negative breast cancer (TNBC) is characterized by the absence of estrogen (ER) and progesterone (PR) hormone receptors, in addition to not showing overexpression/amplification of growth factor receptor 2 human epidermal (HER2) protein/gene. TNBC is characterized by marked pleomorphism and high nucleus-cytoplasmic ratio, tumor necrosis and digitiform borders accompanied by intense lymphocytic infiltrate. These tumors are associated with mutations in the *BRCA1* and *TP53* genes. The inflammatory response is involved in many aspects of cancer biology. The inflammasome is an intracellular multiprotein complex composed of three elements: a molecular pattern recognition receptor (PRR), ASC protein (apoptosis-associated speck-like protein with caspase recruitment domain) and the zymogen pro-caspase-1. The role of inflammasomes in breast cancer is still poorly defined, due to their contrasting roles in oncogenesis depending on the tissue type and stage at which they are activated. Therefore, this study aimed to analyze and compare the expression of inflammasome components, including NLRP3, PYCARD, caspase-1 and IL-18 in TNBC patients with and without *BRCA1* gene mutation. For this, the expression of the inflammasome components was evaluated using the immunohistochemical technique in tumor biopsies with and without mutation in the *BRCA1* gene from 88 patients with TNBC. Additionally, differences between the expression profile of the genes of interest were analyzed using RNA-seq data from The Cancer Genome Atlas (TCGA) database. In both populations, expression data were correlated with clinicopathological data from the patients. Tumor samples from 88 TNBC patients were evaluated, of which 4 had a Variant of Uncertain Significance (VUS), 14 had a pathogenic mutation in the *BRCA1* gene, 58 were classified as wild-type, and 12 had hypermethylation in the promoter region of the *BRCA1* gene. A significant association was found between caspase-1 expression and tumor size ($p=0.005$). Lymph node involvement was associated with higher NLRP3 expression ($p=0.003$). There was no association between the expression of the inflammasome components and the mutation in the *BRCA1* gene. Patients with higher NLRP3 expression had longer disease-free survival (HR: 0.3; 95% CI: 0.13-0.72; $p=0.007$) and overall survival (HR: 0.44; 95% CI: 0.10-0.99; $p=0.049$), indicating a possible protective effect on the prognosis of the disease. The higher expression of IL-18 conferred a 4.6-fold greater risk of death (HR: 4.6; 95% CI: 1.21-17.4; $p=0.025$). These data are relevant and may help to better understand the role of the inflammasome in mutated TNBC.

Keywords: triple-negative breast cancer, inflammasome, immune infiltrate, mutation, pyroptosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Domínios estruturais dos NLRs, AIM2 e da proteína adaptadora ASC.....	28
Figura 2. Ativação do inflamassoma NLRP3.....	29
Figura 3. Esquema representativo da morte celular por piroptose mediada por GSDMD.....	30
Figura 4. Mecanismos de ativação do inflamassoma e microambiente tumoral mamário	31
Figura 5. Esquema representativo da construção dos <i>Tissue microarrays</i> (TMAs). .	41
Figura 6. Padrões de imunomarcção no câncer de mama triplo-negativo com e sem mutação BRCA-1, por imuno-histoquímica.	44
Figura 7. Padrões de imunomarcção no câncer de mama triplo-negativo com e sem mutação BRCA-1, por imuno-histoquímica.	45
Figura 8. Expressão dos genes <i>NLRP3</i> e <i>PYCARD/ASC</i> entre tecido tumoral e tecido normal adjacente	51
Figura 9. Expressão dos genes <i>GSDMB</i> e <i>GSDME</i> entre tecido tumoral e tecido normal adjacente.....	52
Figura 10. Expressão dos genes <i>GSDMA</i> e <i>GSDMD</i> entre tecido tumoral e tecido normal adjacente.....	52
Figura 11. Expressão dos genes <i>CASP1</i> , <i>CASP4</i> e <i>CASP5</i> entre tecido tumoral e tecido normal adjacente.....	53
Figura 12. Expressão dos genes <i>IL-18</i> e <i>IL-1B</i> entre tecido tumoral e tecido normal adjacente.....	54
Figura 13. Análise de correlação entre as estimativas da quantidade relativa de células do infiltrado imune da plataforma CIBERSORT e a expressão dos genes do inflamassoma e da piroptose nos subtipos luminais..	60
Figura 14. Análise de correlação entre as estimativas da quantidade relativa de células do infiltrado imune da plataforma CIBERSORT e a expressão dos genes do inflamassoma e da piroptose no subtipo triplo-negativo.....	61
Figura 15. Análise de correlação entre as estimativas da quantidade relativa de células do infiltrado imune da plataforma CIBERSORT e a expressão dos genes do inflamassoma e da piroptose no subtipo HER2+..	62
Figura 16. Análise de imunomarcção de NLRP3.....	66

Figura 17. Análise de imunomarcção de PYCARD.	66
Figura 18. Análise de imunomarcção da caspase-1.....	67
Figura 19. Análise de imunomarcção da IL-18.....	67
Figura 20. Sobrevida global em função da expressão de NLRP3 de 88 pacientes com tumores triplo-negativos.	72
Figura 21. Sobrevida global, em função da expressão da caspase-1 de 88 pacientes com tumores triplo-negativos.	73
Figura 22. Sobrevida global em função da expressão da IL-18 de 88 pacientes com tumores triplo-negativos.	74
Figura 23. Sobrevida global em função da expressão de PYCARD de 88 pacientes com tumores triplo-negativos.	75
Figura 24. Forest-Plot demonstrando as HRs para sobrevida global associadas com as variáveis avaliadas no modelo multivariado de Cox com seus respectivos intervalos de confiança de 95% em 88 pacientes com CMTN.	78
Figura 25. Correlação entre a expressão dos marcadores do inflamassoma com o infiltrado imune.	79
Figura 26. Expressão da CASP1 no tecido adiposo demonstrando marcação intensa nas células inflamatórias (controle positivo).	81
Figura 27. Expressão de NLRP3 demonstrando marcação em macrófagos do centro germinativo e ausência de marcação nos linfócitos.	82
Figura 28. Marcação positiva de CD68 demonstrando CLS.	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição dos anticorpos	43
Tabela 2. Análise diferencial de genes entre tecidos tumoral e normal adjacente tumoral	54
Tabela 3. Características clínico-patológicas das pacientes com câncer de mama..	55
Tabela 4. Expressão diferencial dos genes do inflamassoma e da piroptose em pacientes com câncer de mama.....	58
Tabela 5. Caracterização clínico-demográfica das pacientes com CMTN de acordo com a presença de alteração (mutação ou hipermetilação) no gene <i>BRCA1</i>	64
Tabela 6. Associação entre a expressão dos marcadores do inflamassoma e as características clínico-patológicas.....	68
Tabela 7. Correlação entre os marcadores do inflamassoma dos pacientes com e sem mutação <i>BRCA1</i>	70
Tabela 8. Correlação entre a presença de mutação no gene <i>BRCA1</i> em pacientes com CMTN e marcadores do inflamassoma e piroptose.....	70
Tabela 9. Correlação entre a presença de mutação/hipermetilação no gene <i>BRCA1</i> e fatores de risco selecionados em pacientes com CMTN.....	71
Tabela 10. Análise univariada das variáveis clínico-patológicas e das proteínas do inflamassoma e da piroptose.....	76
Tabela 11. Características clínico-patológicas de pacientes com CMTN, estratificadas pelo IMC.....	80
Tabela 12. Características clínico-patológicas de pacientes com câncer de mama, estratificadas pela obesidade.....	83

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AIM2:	<i>Absent in Melanoma 2</i>
ASC:	Proteína <i>Speck-like</i> associada à apoptose com domínio de recrutamento de caspase
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATP:	Adenosina trifosfato
BL1:	Basal like 1
BL2:	Basal like 2
BRCA:	<i>Breast Cancer Associated Gene 1</i>
CDs:	Células dendríticas
CLR:	C-type lectin receptors
CLS:	<i>Crown-like structures</i>
CK5:	Citoqueratina 5
CK6:	Citoqueratina 6
CMTN:	Câncer de mama triplo-negativo
CARD:	Domínio de recrutamento associado à caspase
CSF1:	Fator estimulador de colônia
CASP1:	Caspase – 1
CASP4:	Caspase – 4
CASP5:	Caspase – 5
DAMPs:	Padrão Molecular Associado ao Perigo
DFNA5:	<i>Deafness autosomal dominant 5</i>
EGFR:	Fator de crescimento epidérmico
EROs:	Espécies reativas de oxigênio
GEO:	<i>Gene Expression Omnibus</i>
GSDMA:	Gasdermina – A
GSDMB:	Gasdermina – B
GSDMD:	Gasdermina – D
GSDME:	Gasdermina – E
HR:	Razão de chances
HBOC:	Câncer de Mama e Ovário Hereditário
HER2:	Receptor do fator de crescimento epidérmico 2

IHQ: Imunohistoquímica

IL-18: Interleucina-18

IL-1 β : Interleucina 1 beta

INF - γ : Interferon gamma

INCA: Instituto Nacional do Câncer

LAR: Receptor de androgênio luminal

LPS: Lipossacarídeo

MAT: Microambiente tumoral

MDC1: Mediator of DNA damage checkpoint protein1

MHC: Complexo de histocompatibilidade

NF- κ B: NF- κ B Nuclear transcription Factor Kappa B (Fator Nuclar Kappa B)

NK: Células *natural-killer*

NCCN: *National Comprehensive Cancer Network*

NLR: Receptor do tipo NOD

NLRC: Receptores de ligação a Nucleotídeos contendo domínio com sequências repetidas de Resíduos do aminoácido leucina

NLRP (1-14): *NLR family containing a PYD domain*

NOD: *Nucleotide Binding and Oligomerization Domain*

PAM50: Painel de 50 genes

PAMPs: Padrão Molecular Associado a Patógeno

PARP: Poli Adp Ribose Polimerase

PRRs: Receptores de reconhecimento de padrões moleculares

PYD: *N-terminal pyrin*

PYCARD: Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD

RE: Receptor de estrogênio

RP: Receptor de progesterona

RIG- I: *Retinoic Acid- inducible Gene-I*

SG: Sobrevida global

SLD: Sobrevida livre de doença

TAMs: Macrófagos associados ao tumor

TCGA: *The Cancer Genome Atlas*

TILs: Linfócitos infiltrados no tumor

TLR: Receptores do tipo Toll

TMA: *Tissue microarray* (Microarranjos de tecidos)

TN: Triplo-negativo
TNM: Tumor – nódulo – metástase
TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa
TPM: Transcritos por milhão
TP53: Tumor Protein P53 (Gene Supressor de Tumor)
Tregs: Células T regulatórias
TXNP: Thioredoxin- interacting protein
VUS: Variante de significado incerto

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Classificação molecular do câncer de mama	18
2.2 Caracterização dos subtipos moleculares do câncer de mama.....	21
2.3 Caracterização genética dos tumores triplo-negativos.....	22
2.4 Mutações germinativas no gene BRCA1	22
2.5 Inflamassoma e piroptose	24
2.6 Microambiente tumoral, inflamação e inflamassoma.....	30
2.7 Obesidade, câncer de mama e inflamassoma	34
3. JUSTIFICATIVA	34
4. OBJETIVOS	36
4.1 Objetivo Geral	36
4.2 Objetivos específicos	36
5. MÉTODOS	37
5.1 Pacientes e espécimes tumorais.....	37
5.1.1 Departamento de Patologia do Hospital AC. Camargo Center.....	37
5.1.2 Departamento de Patologia do Hospital de Câncer de Barretos.....	38
5.2 Critérios de inclusão.....	38
5.3 Critérios de exclusão	39
5.4 Coleta de dados	39
5.4.1 Variáveis clínico-patológicas	39
5.5 Construção dos tissue microarrays (TMAS)	40
5.5.6 Análises histológicas	41
5.5.7 Coloração Hematoxilina & Eosina (H&E)	41
5.5.8 Reações de imunohistoquímica (IHQ).....	42
5.5.9 Avaliação da imunomarcção para os marcadores do inflamassoma.....	43
6.0 Quantificação do infiltrado inflamatório	45
6.1 Avaliação das estruturas em coroa (CLS).....	45
7. ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA	47
7.1 Obtenção de dados	47
7.2 Análise da expressão diferencial de genes	47

7.3 Avaliação do infiltrado inflamatório.....	48
8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
9. ASPECTOS ÉTICOS	50
10 RESULTADOS.....	51
10.1 Expressão dos genes do inflamassoma e piroptose em amostras tumorais vs tecido normal adjacente	51
10.2 Análise do perfil de expressão gênica de pacientes com câncer de mama	55
10.3 Expressão diferencial dos genes do inflamassoma e da piroptose em pacientes com câncer de mama.....	57
10.4. Expressão diferencial dos genes do inflamassoma e da piroptose de acordo com os receptores hormonais e HER2.....	58
10.5 Correlação entre a expressão dos genes do inflamassoma e da piroptose com o infiltrado inflamatório	59
11 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E HISTOPATOLÓGICAS DA COORTE DE PACIENTES COM CMTN COM E SEM MUTAÇÃO DO GENE BRCA1.....	63
11.1 Avaliação imuno-histoquímica das proteínas NLRP3, PYCARD (ASC), IL-18 e caspase-1 em tumores triplo-negativos com e sem mutação do gene BRCA-1.....	65
11.2 Associação entre a expressão dos marcadores e as características clínico-patológicas	68
11.3 Correlação entre os marcadores do inflamassoma e da piroptose	69
11.4 Correlação entre a presença de mutação/hipermetilação no gene BRCA1 e características clínicas	71
11.5 Análise de sobrevida em função da expressão de marcadores do inflamassoma	71
11.5 Expressão dos marcadores do inflamassoma e prognóstico	76
11.6 Correlação entre a expressão dos marcadores do inflamassoma e da piroptose com o infiltrado imune	79
12. ASSOCIAÇÃO ENTRE CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS E IMC DE PACIENTES COM CMTN	80
12.1 Avaliação histológica dos marcadores NLRP3, caspase-1 e estruturas em coroa (CLS) em tumores triplo-negativos.....	81
12.2 Expressão dos genes do inflamassoma em pacientes com câncer de mama e obesidade.....	83
13. DISCUSSÃO	85

13.1 Expressão dos genes do inflamassoma em tecido tumoral vs tecido normal adjacente.....	88
13.2 Expressão dos componentes do inflamassoma no CMTN com mutação no gene <i>BRCA1</i>	88
13.3 Correlação entre o infiltrado inflamatório e os marcadores do inflamassoma ..	91
13.4 Associação entre os genes do inflamassoma em pacientes com obesidade e câncer de mama.....	92
14 CONCLUSÃO	94
15 PERSPECTIVAS.....	95
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
Anexo 1. Expressão diferencial dos genes do inflamassoma e da piroptose em pacientes com câncer de mama.....	
Anexo 2. Expressão diferencial dos genes do inflamassoma e da piroptose nos subtipos luminais.....	
Anexo 3. Expressão diferencial dos genes do inflamassoma e da piroptose no subtipo triplo-negativo	
Anexo 4. Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – Hospital AC Camargo Cancer Center	
Anexo 5. Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – Hospital do Câncer de Barretos.....	
PUBLICAÇÕES	

1. INTRODUÇÃO

No ano de 2020 foram diagnosticados 2,26 milhões de novos casos e aproximadamente 685 mil mortes relacionadas ao câncer de mama em todo o mundo (FERLAY et al., 2021). No Brasil, excluídos os tumores de pele não melanoma, o câncer de mama é responsável pela maior taxa de incidência entre a população feminina de todas as regiões do país, representando 66,28 casos por 100.000, no triênio 2020-2022 (INCA, 2020).

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama incluem idade, histórico familiar da doença, tabagismo e obesidade (SUN et al., 2017), sendo que cerca de 5-10% dos casos são de origem hereditária, principalmente com mutações dos genes BRCA1-2 (NEIL-SZTRAMKO et al., 2017; TUNG et al., 2016). Mulheres jovens com faixa etária inferior a 50 anos, que apresentam altas taxas de mutação gênica nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, podem desenvolver características clínicas mais agressivas (RODRÍGUEZ-BALADA et al., 2020).

O câncer de mama é comumente classificado de acordo com critérios morfológicos (ductal, lobular, invasivo ou in situ); o perfil de expressão proteica de receptores (receptor de estrógeno (ER), receptor de progesterona (PR), receptor do fator de crescimento epidermal 2 (HER2), que determinam os subtipos intrínsecos (superexpressão de HER2, luminal A, luminal B e triplo negativo) (DAI et al., 2015; PEROU et al., 2000).

Dentre os subtipos moleculares do câncer de mama, os tumores triplo-negativos (TN) são caracterizados por distinção molecular, histológica e parâmetros clínicos, com prognóstico desfavorável (MARRA et al., 2020). Estes tumores representam 10 a 24% e ocorre mais comumente em mulheres negras e hispânicas, jovens, pré-menopausadas e em condições de obesidade (HARBORG et al., 2021; PINGILI et al., 2021). Além destas características, mais de 75% das mulheres que apresentam mutação do gene *BRCA1* tem câncer de mama com fenótipo TN (DESANTIS et al., 2016; GLODZIK et al., 2020; MA et al., 2021).

Um elemento importante no que concerne às neoplasias é o estado inflamatório do microambiente tumoral (MAT), que é caracterizado pelo infiltrado de populações de leucócitos. Além disso, tumores sólidos apresentam inúmeros

componentes do sistema imune, resultando na formação ou não de um ambiente favorável ao câncer de mama (QUAIL; JOYCE, 2013).

A resposta inflamatória está envolvida em muitos aspectos da biologia tumoral, como a iniciação, progressão, metástase e tratamento do tumor (CRUSZ; BALKWILL, 2015). Estudos epidemiológicos demonstraram que a inflamação crônica é um fator predisponente para o desenvolvimento de vários tipos de câncer, estimando-se que infecções e processos inflamatórios crônicos estejam ligadas a 15-20% de todas as mortes por câncer (HAGERLING; CASBON; WERB, 2015).

Entretanto, a associação entre resposta inflamatória e câncer segue controversa e a inflamação associada a uma neoplasia pode representar, tanto um fator que inibe o desenvolvimento do tumor, quanto um promotor associado a um curso mais agressivo da doença (FRIDMAN et al., 2013).

Mediadores da resposta inflamatória, como citocinas, radicais livres, prostaglandinas e fatores de crescimento, podem induzir alterações genéticas e epigenéticas, incluindo mutações pontuais em genes supressores tumorais, metilação do DNA, causando alterações nas vias críticas responsáveis por manter a homeostase celular, levando ao desenvolvimento e progressão do câncer (KAWANISHI et al., 2017).

Um intrincado sistema de sinalização composto por sensores, processadores e transdutores de sinais, além de efetores como espécies reativas de oxigênio (EROs) são utilizados nas vias de sinalização inflamatória (KARKI; MAN; KANNEGANTI, 2017). Os principais sensores celulares das células fagocitárias são os receptores dos tipos NOD e Toll, além dos receptores da interleucina-1 (IL1R) (AFONINA et al., 2017). Os receptores do tipo NOD (ou NLR) são mediadores intracelulares da via de inflamassoma, uma via inflamatória com crescente importância em quadros inflamatórios e em algumas doenças não infecciosas, como doenças neurodegenerativas, metabólicas e neoplasias (KANTONO; GUO, 2017).

A inflamação sistêmica e local exerce um papel crucial no estabelecimento de tumores, tornando-se uma chave no tratamento e combate de diversos tipos de neoplasias. Portanto, a modulação da resposta imune e da inflamação tem sido alvo importante para elaboração de novos tratamentos para o câncer (ZITVOGEL et al., 2012).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Classificação molecular do câncer de mama

Os tumores de mama são classificados, de acordo com o perfil de expressão imuno-histoquímica de marcadores moleculares e de expressão gênica. A classificação segundo o perfil imuno-histoquímico é baseada na avaliação dos receptores de estrogênio, progesterona, da superexpressão da proteína HER2 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*) ou da amplificação do gene que a codifica, e do índice de proliferação celular avaliado pela expressão de Ki67 (anticorpo monoclonal que detecta um antígeno nuclear expresso em células que entram no ciclo celular e que mede a fração de crescimento celular) (COLOZZA et al., 2005; VODUC et al., 2010).

Análises moleculares com metodologia de estudo genético em larga escala definiram cinco subgrupos distintos denominados: luminal A, luminal B, basal-like, HER2+ e *normal-like* (PEROU et al., 2000), que se correlacionam com parâmetros clínicos, como as diferenças significativas em termos de incidência, fatores de risco, fatores prognósticos, tempo de sobrevida, tempo livre de doença e sensibilidade ao tratamento o prognóstico (MAKKI, 2015; PRAT et al., 2015). Além disso, foi identificado o subtipo “*claudin-low*”, que estruturalmente se assemelha aos tumores “*normal-like*” (PRAT & PEROU, 2011).

Em 2011, o “St Gallen International Expert Consensus” confirmou o valor e a aplicabilidade da imuno-histoquímica e das classificações moleculares, a serem utilizadas em conjunto com as informações tradicionais de prognóstico e indicadores de proliferação celular, sobretudo do índice Ki-67. A detecção desse marcador em mais de 14% das células, passou a diferenciar os tumores luminais em “A” e “B” (GOLDHIRSCH et al., 2011b).

Os carcinomas do subtipo molecular luminal são bem diferenciados e menos de 20% apresentam mutações no gene TP53 (SORLIE et al., 2003). O subtipo luminal A tem uma expressão maior de genes associados aos receptores de estrogênio e uma expressão menor de genes proliferativos (SORLIE et al., 2003). Pacientes com carcinomas luminais A têm melhor sobrevida global em comparação às pacientes com carcinomas luminal B (CHANG et al., 2004).

Objetivando identificar em tempo real, a expressão dos muitos genes envolvidos no surgimento do câncer mamário, foram propostos muitos ensaios a serem utilizados na prática diária dos ambulatórios de oncologia, tais como: “Mammaprint Testing”, “Oncotype DX” and Prosigna.

O “Mammaprint” identifica 70 genes diretamente envolvidos com o câncer de mama e, 1800 genes normativos, indiretamente ligados à doença. É recomendado para mulheres de até 61 anos, com tumores receptor-negativos ou positivos. O “Oncotype DX” é indicado em tumores com receptor estrogênio dependentes, estágio I e II, e axila negativa.

O PAM-50 Breast Cancer Intrinsic Classifier assay (NanoString, ARUP Laboratories, Salt Lake City, UT) analisa um painel de 50 genes, inerentes aos subtipos moleculares, através de RT-PCR e classifica o tumor individualmente no subtipo molecular que é mais similar (KITANEH; MONTERO; GLÜCK, 2013).

2.2 Caracterização dos subtipos moleculares de câncer de mama

O subtipo luminal A representa 50-60% dos casos de câncer de mama e apresenta positividade para os RE e RP e negatividade para HER2, além de baixa expressão de genes de proliferação celular e $Ki-67 < 14\%$ (EROLES et al., 2012; IGNATIADIS; SOTIRIOU, 2013). Este subtipo apresenta bom prognóstico e baixa taxa de recidiva (MAKKI, 2015).

Os tumores luminais B apresentam expressão de RE, mas ou são negativos para RP, ou expressam HER2; $Ki67 \geq 14\%$ (GOLDHIRSCH et al., 2011a). Este subtipo apresenta um fenótipo mais agressivo, com alta taxa proliferativa e alto grau histológico, principalmente pela expressão de genes envolvidos com regulação de proliferação celular, como ciclina B1 e receptores de fator de crescimento epidérmico (EGFR), além de mutação nos genes *TP53* e *PIK3CA* (EROLES et al., 2012). Compreendem 15-20% dos tumores de mama, apresentam maior risco de recorrência e menor sobrevida livre de doença específica (WOLFF et al., 2007).

Dez a quinze por cento de todos os cânceres de mama são do subtipo HER2 enriquecido, que é caracterizado por amplificação do oncogene *ERBB2* (PEROU et al., 2000). A superexpressão de HER2 está associada a uma maior agressividade tumoral, taxas de recorrência mais altas e maior mortalidade. A proteína HER2,

quando ativada estimula a proliferação tumoral, a angiogênese e a capacidade de metastatização (GOETZ et al., 2015).

O subtipo *normal-like* é caracterizado por apresentar um enriquecimento de células sadias não epiteliais, como macrófagos, células adiposas, fibroblastos e linfócitos, as quais estão distribuídas entre as células malignas, constituindo uma mistura de tecidos normal e neoplásico em uma mesma amostra (PRAT et al., 2015). Existem poucos estudos sobre este subtipo e seu significado clínico permanece indeterminado (BARROS; LEITE, 2016).

Tumores “*basal-like*” têm como característica fundamental o elevado índice mitótico, com altas taxas de divisão celular. Há marcante pleomorfismo e alta relação núcleo-citoplasmática, necrose na porção central do tumor e bordas digitiformes, que se estendem sobre os tecidos circunjacentes, acompanhadas de infiltrado linfocítico intenso. Do ponto de vista molecular e genético, há a ausência ou baixa expressão dos receptores hormonais, baixa expressão de HER2 e super expressão de genes usualmente encontrados no estrato basal do epitélio (BANERJEE et al., 2006; OCANA; PANDIELLA, 2017).

Os tumores basais associam-se com a disfunção da via de BRCA1, proteína codificada por um gene supressor tumoral envolvida no reparo do DNA, ativação do ciclo celular e manutenção da estabilidade cromossômica, que pode ser causada por metilação da região promotora do gene *BRCA1*, inativação durante a transcrição ou por ambos os mecanismos. Esses achados estão em consonância com o fato de praticamente todos os tumores com mutação de *BRCA1*, esporádicos ou germinativos, serem do subtipo basal (SOTIRIOU e PUSZTAI 2009).

Os tumores TN são aqueles que, somados a uma macro e micromorfologia características são negativos para RE, RP e da proteína HER-2 (SCHETTINI et al., 2016). Os tumores basal-like e TN apresentam muitas semelhanças. Os dois Com elevada frequência em pacientes mais jovens e resultados clínicos reservados, estes tumores exibem maior chance de recidiva e morte dentro de 3-5 anos após o diagnóstico (CAREY et al., 2010).

Os TN podem ser classificados, de acordo com seu perfil genético. LEHMANN et al. estabeleceram assinaturas gênicas e identificaram seis distintos subtipos moleculares: dois subtipos *basal-like* (*BL1* e *BL2*), um imunomodulador (IM), um mesenquimal (M), um mesenquimal *stem-like* (MSL) e um luminal receptor de andrógeno (LRA) (LEHMANN et al., 2011).

Tumores mamários do subtipo BL1 apresentam alta expressão de genes envolvidos no ciclo celular, divisão celular e resposta a dano no DNA, como *MYC*, *RAS* e *RAD51*. O subtipo BL2 apresenta alterações na expressão de genes de vias de sinalização de fatores de crescimento (EGF, Wnt/ β -catenina, entre outros), glicólise e glicogenólise, além de terem alta expressão de citoqueratinas basais (LEHMANN et al., 2011).

O subtipo IM foi caracterizado pelo enriquecimento de processos biológicos da resposta imune celular, tais como via de sinalização das células do sistema imune, vias de sinalização de citocinas e processamento e apresentação de antígenos. Já os subtipos M e MSL compartilham elevada expressão de genes envolvidos com motilidade e diferenciação celular e vias de sinalização ativadas por fatores de crescimento. Além disso, alta expressão de genes envolvidos com a angiogênese e de marcadores de células-tronco também foram observadas apenas no subtipo MSL (LEHMANN et al., 2011).

O subtipo LRA exibe um padrão aumentado de expressão de genes luminais. Apesar de serem tumores RE negativos, apresentam enriquecimento de vias de sinalização reguladas por hormônios, incluindo síntese de esteróides, metabolismo de porfirina e de andrógeno/estrógeno, através do receptor de andrógeno (LEHMANN et al., 2011).

2.3 Caracterização genética dos tumores triplo-negativos

Os genes mais mutados somaticamente no câncer de mama, *PI3K* e *TP53*, são também predominantemente mutados no CMTN. Mutações nos genes *NRAS*, *EGFR*, *USH2A*, *MYO3A*, *MLL2*, *BRCA1*, *RB1*, *PTEN* também têm sido reportadas (KOBOLDT et al., 2012; WEISMAN et al., 2016). Eventos de perda de função em outros genes envolvidos com a maquinaria de reparo do DNA, como em *RB1* e *BRCA1*, são comuns em CMTN (GLODZIK et al., 2020).

O CMTN é altamente instável genomicamente, devido a diversos fatores, tais como: inativação precoce de p53; aberrante expressão de c-myc; mutação ou expressão aberrante de genes: do *checkpoint* do ciclo celular (*RB1*), da divisão celular (amplificação de ciclinas) e pela manutenção do genoma (reparo do DNA por RH; perda de *PTEN*), os quais podem contribuir significativamente para esse cenário (WU et al., 2015). Além disso, funções como ciclo celular, RH e motilidade celular

estão supostamente desreguladas nesses tumores, devido à expressão monoalélica associada à perda de heterozigidade e alteração em número de cópia (HA et al., 2012).

Os genes mais frequentemente mutados nos tumores TN são o TP53 (82%), BRCA1 e PIK3CA (10%) (Cancer Genome Atlas Network 2012). Dentre estes, o gene *BRCA1* tem uma posição de destaque por apresentar um papel importante na manutenção da estabilidade genômica (BUYS et al., 2017; COUCH et al., 2015; GONZALEZ-ANGULO et al., 2011). Dados mostram que 70% das pacientes com mutação germinativa em *BRCA1* desenvolvem preferencialmente, CMTN, e, 10 a 20% daquelas com fenótipo TN carregam mutação germinativa em *BRCA1* (CARRARO et al., 2013; PELLEGRINO et al., 2016).

Análises recentes mostram que tumores TN esporádicos podem exibir características moleculares semelhantes aos hereditários, sugerindo que mecanismos diversos podem estar envolvidos com o processo tumorigênico desse fenótipo (SHAH et al. 2012; LIPS et al. 2013). Além disso, foi demonstrado que o CMTN diagnosticado em mulheres jovens é fator de risco para presença de mutação germinativa em *BRCA1* (BRIANESE et al., 2018), sendo este percentual aumentado, significativamente, naquelas diagnosticadas antes dos 35 anos de idade (CARRARO et al., 2013).

2.4 Mutações germinativas no gene *BRCA1*

A identificação de mutações patogênicas em famílias com critérios clínicos para HBOC é fundamental, pois permite o diagnóstico pré-sintomático e a definição de condutas da clínica (DOMCHEK; WEBER, 2008). Até o momento mais de 3400 mutações patogênicas já foram descritas ao longo da sequência codificante dos genes *BRCA1* e *BRCA2*.

É estimado que aproximadamente 10-20% das mutações germinativas presentes nos genes *BRCA1* e *BRCA2* são variantes de significado clínico desconhecido (VUS). As VUS incluem as mutações *missense* (alteram um aminoácido originando a substituição por um aminoácido diferente), mutações silenciosas (ocorre a troca de um nucleotídeo, mas não alteram o aminoácido codificado pelo códon afetado, exceto se localizadas em região de *splicing*), mutações intrônicas, mutações nas regiões de *splicing*, e ainda, inserções ou

deleções *in frame*, para as quais não se sabe ao certo o impacto biológico que acarretam

A herança genética é o principal fator de risco não modificável para o câncer de mama, sendo reportada em 5 a 10% dos tumores mamários (WALKER; HO, 2012). Estima-se que 10% dos cânceres de mama são causados por alterações genéticas germinativas, transmitidas na família, ou seja, atribuídos a síndromes hereditárias (PHAROAH et al., 2002). A síndrome hereditária mais comum no câncer de mama é a síndrome de Câncer de Mama e Ovário Hereditário (HBOC, do inglês, *Hereditary Breast and Ovarian Cancer*), que apresenta herança autossômica dominante com alta penetrância (DOMCHEK; WEBER, 2008).

Mutações em genes de alta penetrância conferem um risco estimado de desenvolvimento da doença de 72% para mulheres com mutação *BRCA1* e 69% para aquelas com mutação no gene *BRCA2* (KUCHENBAECKER et al., 2017). As mutações somáticas são mais frequentes e constituem 90% dos casos dos tumores mamários e surgem como resultado de lesões provocadas pela interação de agentes físicos, químicos e biológicos (POLAK et al., 2017).

A mutação mais observada na população brasileira é a *BRCA1* 5382insC, também conhecida como c.5266dupC (THOMPSON et al., 2002), apresentando uma frequência de 1,24-5% em mulheres em situação de risco para câncer de mama hereditário da região Sudeste do Brasil (EWALD et al., 2011).

Os genes *BRCA1* e *BRCA2* desempenham funções relacionadas a diferentes processos celulares, incluindo ativação e regulação transcricional, reparo de lesões no DNA, controle do ciclo celular, proliferação e diferenciação celular (FRIEDBERG, 2010; GREENMAN et al., 2007).

O gene *BRCA1* (Breast Cancer 1) localiza-se no braço longo do cromossomo 17 na posição 21, possui 24 éxons, que correspondem a aproximadamente 81 kb, sendo os éxons 1 e 4 não codantes. É um gene supressor de tumor cujo produto de sua expressão é uma proteína com 1863 aminoácidos, cuja estrutura pode ser dividida em três regiões: domínio RING (*Really Interesting New Gene*), uma parte central com uma grande região codificada a partir do exon 11, seguida por um domínio do tipo “*coiled-coil*” e finalizada por uma região de repetições de domínios BRCT (*BRCA1 C-terminal*) (VENKITARAMAN, 2014).

O gene *BRCA1* é responsável por 25 a 28% de todos os casos de câncer de mama hereditário (APTE; VORONOV, 2017), sendo os tipos mais comuns de

mutações patogênicas associados a pequenas inserções, deleções, mutações do tipo *missense* e em sítios de *splicing* (KARAMI; MEHDIPOUR, 2013). Além disso, uma pequena porcentagem dos tumores de mama está relacionada a mutações somáticas dos genes *BRCA1* e *BRCA2*, que podem ser detectadas através da análise direta do tecido tumoral ou do DNA livre circulante (TUNG; GARBER, 2018).

O gene *BRCA1* forma complexos com diversas proteínas, participando de múltiplas funções celulares, tais como transcrição, regulação, ativação dos pontos de checagem do ciclo celular e na via de reparo de DNA por Recombinação Homóloga (RH) (LORD; ASHWORTH, 2012). As células com perda de função neste gene são incapazes de reparar os erros no DNA, dependendo da capacidade que as poli-ADP-ribose polimerases (PARPs) têm em detectar esses danos e em ativar vias de reparação alternativas (ROULEAU et al., 2010).

As PARPs constituem uma superfamília de proteínas que desempenham um papel crucial como reguladores do processo de identificação e reparação dos danos de cadeia simples (SSB) da molécula de DNA através da via de reparo de excisão de base (RAY CHAUDHURI; NUSSENZWEIG, 2017; ROULEAU et al., 2010).

Embora, a perda funcional de um dos genes (*BRCA* ou *PARP*) seja tolerada, a inibição da função das *PARP*, em células com mutações nos genes *BRCA*, torna-as incapazes de reparar os danos no DNA, causando o acúmulo de erros, e, em última instância, a morte celular (letalidade sintética) (LORD; ASHWORTH, 2013, 2017). Nesse sentido, quimioterapia à base de platina ou inibidores da *PARP* podem beneficiar pacientes com tumores TN e com mutação em *BRCA1*, cuja deficiência na RH leva a um padrão mutacional específico (FOULKES, 2008; FOULKES; SMITH; REIS-FILHO, 2010).

2.5 Inflamassoma e piroptose

A resposta inflamatória é um mecanismo de caráter protetor contra infecções ou danos celulares. Este processo é complexo e envolve a ativação das células do sistema imune, recrutamento de leucócitos para o tecido atingido, eliminação das células danificadas e reparação dos tecidos afetados (DINH et al., 2014). Estudos clínicos e epidemiológicos evidenciam a ampla capacidade do sistema imunológico em interferir com a progressão tumoral, através da resposta imune adaptativa (DE VISSER; EICHTEN; COUSSENS, 2006; VARN et al., 2017).

A resposta do hospedeiro a estímulos agressores envolve processos complexos relacionados ao sistema imunológico e engloba a ativação de células envolvidas com a imunidade inata, através de receptores de reconhecimento padrão (PRRs) (BRUBAKER et al., 2015). O reconhecimento dos *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) por meio dos PRRs desencadeia a ativação de cascatas de sinalização vinculadas à resposta imune e ao processo inflamatório, objetivando o controle e eliminação do agente infeccioso (CUI et al., 2014).

Os PRRs incluem os receptores Toll-*like* (TLRs) e lectinas do tipo C (CLRs), os quais monitoram o espaço extracelular e os compartimentos endossômicos (O'NEILL; BOWIE, 2007). A atividade de reconhecimento de PAMPs e DAMPs extracelulares exercida pelos TLRs ativa NF- κ B e INF, induzem respostas relacionadas à inflamação, por meio da produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (NAPETSCHNIG; WU, 2013).

Os PRRs intracelulares são as helicases RIG-I-*like*, que reconhecem RNA dupla-fita, os sensores de DNA (AIM2) e os receptores NOD-*like* (NLRs) (BRUBAKER et al., 2015). Os receptores NOD ou NLRs (receptores de ligação a nucleotídeo contendo domínios NBD e LRR) são sensores citosólicos, que reconhecem PAMPs e DAMPs, e monitoram os compartimentos intra- e extracelulares para sinais de infecção ou injúria tecidual (MARTINON; MAYOR; TSCHOPP, 2009; SCHRODER; TSCHOPP, 2010).

Em humanos, a família NLRs compreende 22 sensores caracterizados pela presença de dois domínios funcionais: o domínio central NACHT de oligomerização. ATP ou GTP-dependente, e o domínio C-terminal, com repetições ricas em leucina (LRRs, do inglês *Leucine-Rich Repeats*) (BROZ; DIXIT, 2016). O domínio N-terminal é variável, sendo utilizado para classificar os NLRs em diferentes subfamílias: NLRPs (com domínio pirínico, PYD), NLRCs ou NODs (domínio de recrutamento da caspase, CARD); NAIPs (domínio BIR), NLRA (domínio ácido de transativação, CIITA) e NLRX (domínio com função ainda desconhecida). Após a ativação, os NLRs participam da resposta imune induzindo inflamação, autofagia ou morte celular (GUO; CALLAWAY; TING, 2015).

A subfamília NLRC contém 5 membros (NOD1, NOD2, NOD3/NLRC3, NLRC4, NOD4/NLRC5); NOD1 e NOD2 estão envolvidos na regulação do fator nuclear- κ B (NF- κ B), fator de transcrição para genes que codificam mediadores pró-

inflamatórios e outros componentes antimicrobianos (TATTOLI et al., 2007; BARBÉ; DOUGLAS; SALEH, 2014).

Os NLRPs contêm 14 membros (NLRP1 a NLRP14) e alguns deles, como NLRP1, NLRP3 e NLRP12 estão envolvidos na ativação do inflamassoma (SHARMA; KANNEGANTI, 2016). O inflamassoma consiste de uma plataforma de múltiplas proteínas, capaz de ativar proteases inflamatórias como as caspases -1, -4 e -5 (MAN; KANNEGANTI, 2015) (**Figura 1**).

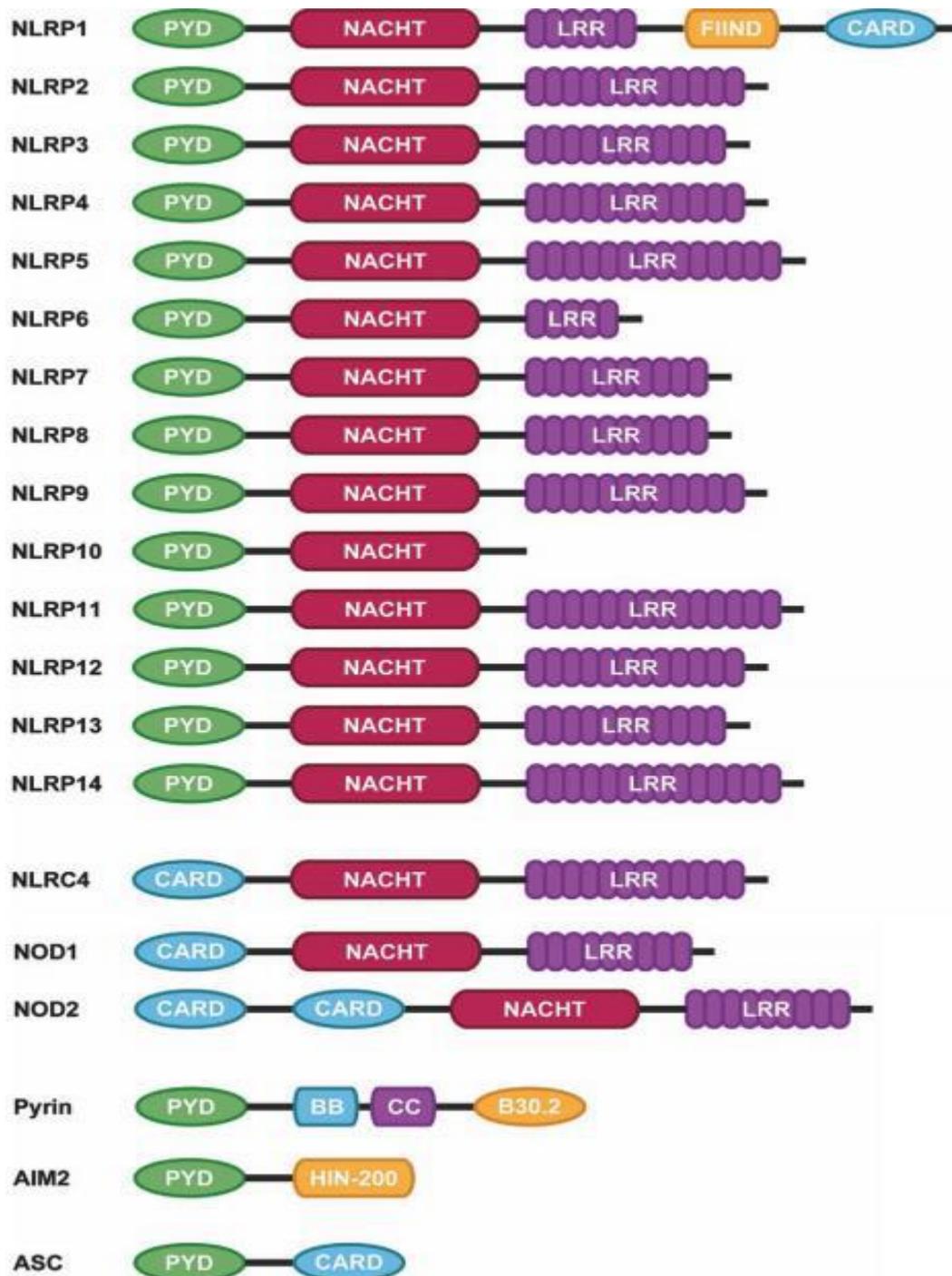


Figura 1. Domínios estruturais dos NLRs, AIM2 e da proteína adaptadora ASC. O esquema codificado por cores detalha os domínios estruturais dos 14 membros da família NLRP, NLRC4, NOD1 e 2, Pysin, AIM2, e a proteína adaptadora do inflamassoma ASC. Fonte: (PLATNICH; MURUVE, 2019).

O NLRP3 é expresso no citosol de monócitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, linfócitos, células epiteliais e osteoblastos (OZAKI; CAMPBELL; DOYLE, 2015). O NLRP3 possui um domínio N-terminal do tipo PYD, portanto não consegue ativar diretamente a caspase-1, sendo necessário recrutar a molécula adaptadora ASC, via seu domínio PYD. ASC contém um domínio CARD que se liga e recruta a pró-caspase-1, via interações CARD-CARD (MARTINON, 2008). O complexo atua como um ativador *upstream* da sinalização NF- κ B, responsável pela ativação das interleucinas IL-18 e IL-1 β , e desempenha um papel importante na regulação da inflamação, da resposta imune e da apoptose (CIRACI et al., 2012; LEEMANS; CASSEL; SUTTERWALA, 2011).

Trabalhos demonstram que a ASC facilita a nucleação dos inflamassomas, sendo essencial para a formação de “specks” (PROELL et al., 2013). A aproximação das moléculas de caspase-1 nas estruturas dos *specks* possibilita o autoprocessamento dessas proteínas, e, posteriormente a secreção de citocinas pró-inflamatórias (BOUCHER et al., 2018). Este estudo sugere que a formação dos inflamassomas ocorre em duas etapas. A primeira sem a presença da ASC, onde ocorre a ativação das caspases e indução de piroptose. Na segunda etapa, ocorre o recrutamento da ASC e formação dos *specks*, gerando a clivagem e secreção da IL-1 β e IL-18 (BROZ et al., 2010).

Dentre os NLRs existentes, o inflamassoma NLRP3 é o membro mais estudado. O NLRP3 é expresso no citosol de monócitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, linfócitos, células epiteliais e osteoblastos (OZAKI; CAMPBELL; DOYLE, 2015). O NLRP3 apresenta um mecanismo de ativação abrangente, com a participação de um número amplo de PAMPs e DAMPs (GUO, 2015).

A ativação do inflamassoma NLRP3 se dá em duas etapas, “*priming*” e pela oligomerização do complexo NLRP3/ASC/caspase-1. O “*priming*” é caracterizado pela ação dos receptores TLRs, P2X7 e NOD, ou a partir de receptores de citocinas pró-inflamatórias, resultando na ativação de NF κ B e posterior expressão de NLRP3 e produção das citocinas pró-IL-1 β e IL-18. No segundo sinal, ocorre a

oligomerização do sensor, recrutamento da ASC e da pró-caspase 1 (BROZ; DIXIT, 2016; OZAKI; CAMPBELL; DOYLE, 2015).

A ativação do NLRP3 promove o efluxo de potássio, e o influxo de cálcio pelo receptor P2X7 (DI VIRGILIO et al., 2017), e pela formação de poros na membrana plasmática provocada por ionóforos (KARMAKAR et al., 2016) (**Figura 2**).

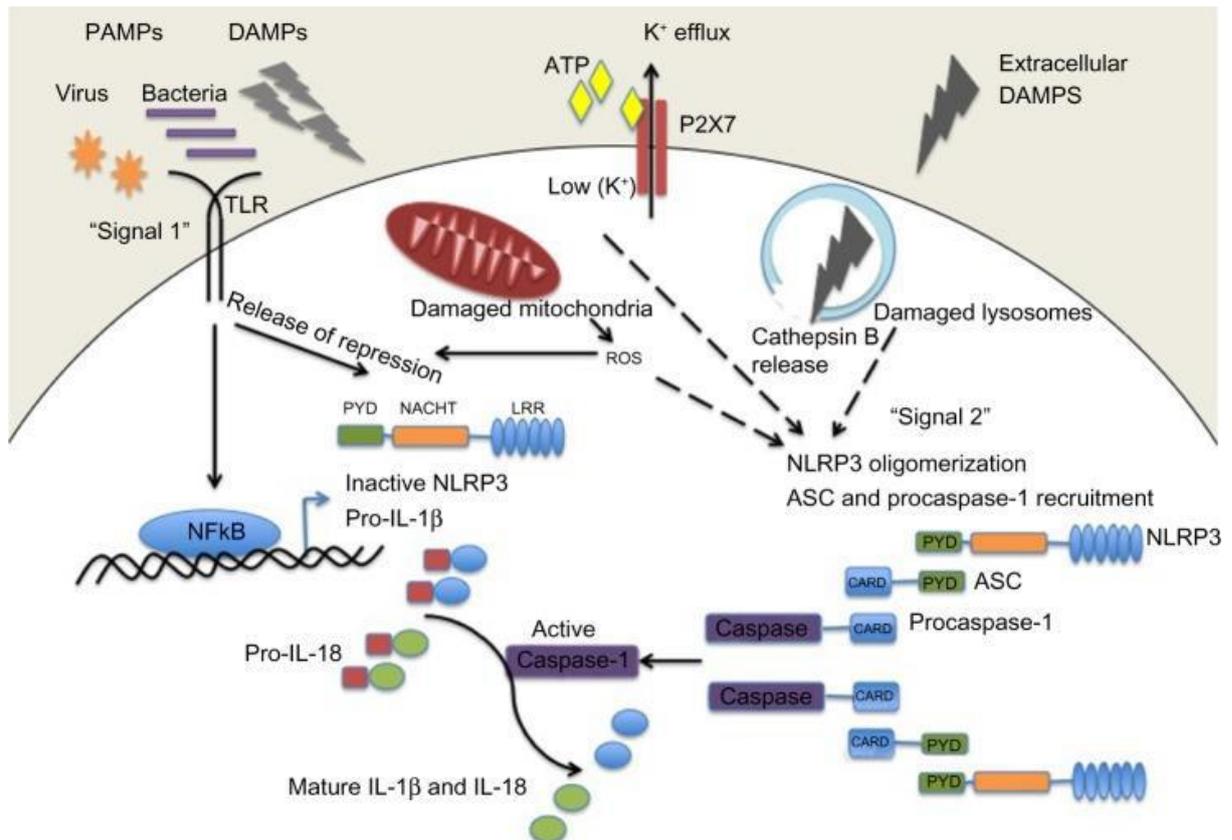


Figura 2. Ativação do inflamassoma NLRP3. PAMPs virais ou bacterianos ou DAMPs ativam a via do inflamassoma pela ativação do TLR induzindo a ativação do NFκB e expressão do NLRP3 e da pró-IL-1β (sinal 1). NLRP3 oligomeriza e recruta proteína adaptadora de caspase (ASC) e a pró-caspase-1 em resposta a um sinal de ativação (sinal 2). NLRP3 pode ser ativado em resposta a um efluxo de potássio por meio do receptor P2X7 ligado ao ATP, em resposta às espécies reativas de oxigênio liberadas pelo dano mitocondrial ou em resposta à catepsina B liberada pelo dano de lisossomos. Uma vez ativado, o NLRP3 produz a ativação da caspase 1 que cliva as proformas precursoras de IL-1β e IL-18 em suas formas maduras. Fonte: (OZAKI; CAMPBELL; DOYLE, 2015).

O inflamassoma também desencadeia a piroptose, morte celular inflamatória caracterizada pela rápida destruição e integridade da membrana celular, bem como danos no DNA e lise celular (AWAD et al., 2018; JORGENSEN; MIAO, 2015). A morte celular por piroptose é caracterizada pela formação inicial de poros na membrana, por onde ocorre o influxo e efluxo de íons, gerando lise osmótica da célula com liberação do seu conteúdo no meio extracelular, juntamente com

produção de citocinas pró-inflamatórias (KOVACS; MIAO, 2017). A gasdermina D (GSDMD) é a proteína responsável pela formação dos poros na membrana. O fragmento N-terminal da GSDMD migra para a membrana plasmática onde se oligomeriza e se liga à lipídios específicos, formando a estrutura do poro e desencadeando assim a piroptose (EVAVOLD et al., 2018), conforme demonstrado na figura 3.

Recentemente, foi demonstrado que a secreção da IL-1 β e da IL-18 pode ocorrer pelos poros formados pela GSDMD (SBORGI et al., 2016). Além do papel de GSDMD na indução de piroptose, outros membros da família das gasderminas, como a GSDME, também conhecida como Dfna5 (*Deafness Autosomal Dominant 5*), também podem desencadear morte celular após sua clivagem por caspase-3 (ROGERS et al., 2017; SHEN et al., 2021).

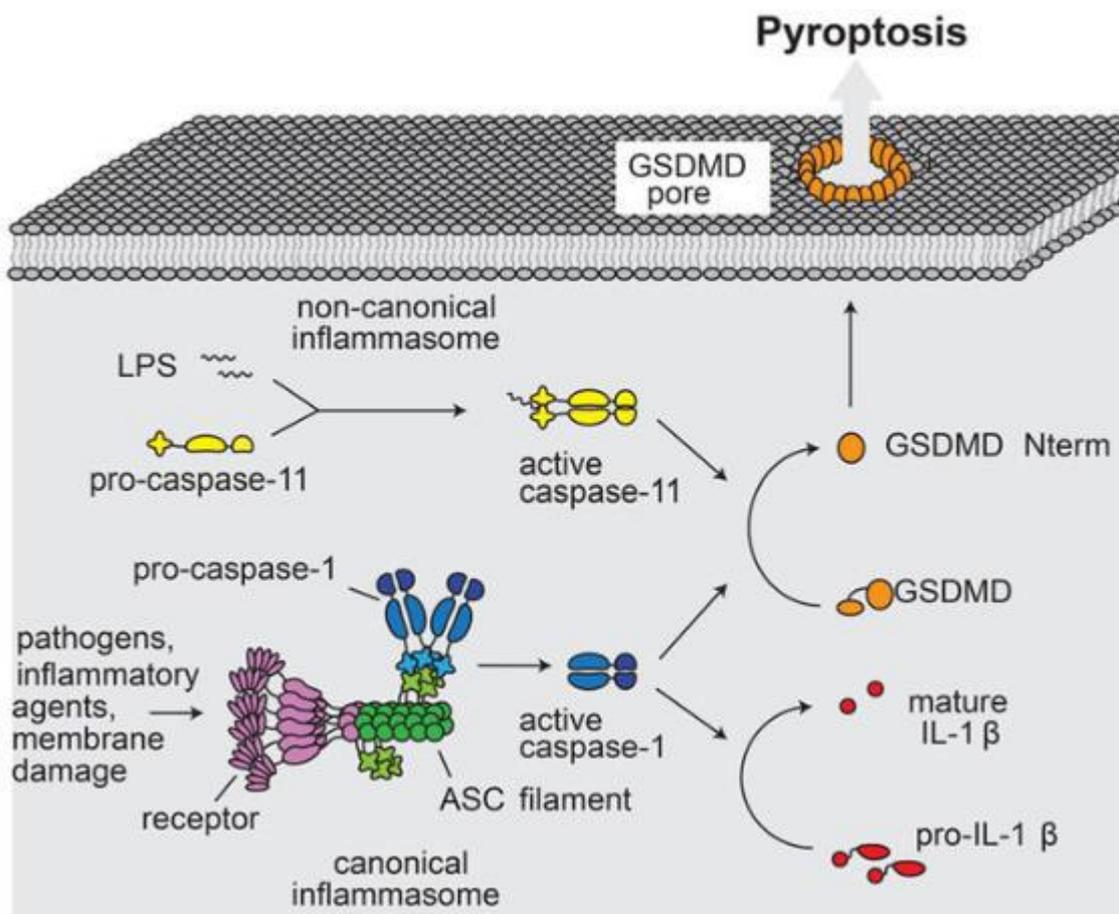


Figura 3. Esquema representativo da morte celular por piroptose mediada por GSDMD. Na via canônica, os inflamassomas atuam como sensores para uma variedade de patógenos e insultos celulares. A montagem desses tipos de inflamassomas envolve a multimerização do receptor (púrpura), ASC (verde) e caspase 1 (azul). Na via não canônica, o LPS é diretamente ligado à caspase 11 (amarela), resultando em sua ativação. A caspase 1 processa IL-1 β (vermelha). As caspases 1 e 11 processam a GSDMD (laranja), o que resulta na liberação de fragmentos de GSDMD

Nterm (provenientes da região N-terminal clivada). Estes fragmentos formam um grande poro na membrana plasmática. A formação desses poros resulta em rápida perda da integridade da membrana plasmática, dissipação do gradiente eletroquímico e, na morte celular. Fonte: (SBORGI et al., 2016).

O inflamassoma desempenha um papel chave na interação patógeno/hospedeiro, representando uma importante conexão entre resposta inflamatória (produção de IL-1 β e IL-18) e resposta adaptativa (polarização de linfócitos T CD4+ para um perfil Th1 ou Th17 ou Th2) (LAMKANFI, 2011; SWANSON; DENG; TING, 2019). Uma eficiente ativação do complexo é considerada protetora contra diversas infecções, tanto bacterianas quanto virais (BROZ e DIXIT, 2016). Por outro lado, o inflamassoma também pode contribuir na patogênese de doenças autoimunes, cardiovasculares, neurodegenerativas e câncer (BROZ; DIXIT, 2016; KARKI; MAN; KANNEGANTI, 2017).

No câncer, o inflamassoma NLRP3 tem apresentado um efeito dual, promovendo ou inibindo a progressão tumoral dependendo do contexto (HOU; HSU; HUNG, 2021; ZITVOGEL et al., 2012). Dados da literatura apontam que a secreção da IL-1 β mediada pelo inflamassoma promove angiogênese e resistência à quimioterapia e aumenta a quimiotaxia dos macrófagos (MANTOVANI; BARAJON; GARLANDA, 2018).

2.5 Microambiente tumoral, inflamação e inflamassoma

A coexistência de inflamação e câncer pode ser observada em vários tumores. A inflamação participa das etapas de iniciação, promoção, angiogênese e metástase (BAUMGARTEN; FRASOR, 2012).

As células do sistema imune são especialistas em reconhecer patógenos e eliminar rapidamente células infectadas. Porém, são também essenciais para promover a ativação do sistema de adaptação do reparo tecidual e de remodelagem (SZE BENI et al., 2017). Essas células se acumulam em tumores sólidos, como os da mama, produzindo substâncias promotoras do crescimento celular, fatores angiogênicos e moléculas imunossupressoras, que assumem fenótipos diferentes, dependendo das substâncias a que são expostas (BRADY; CHUNTOVA; SCHWERTFEGER, 2016).

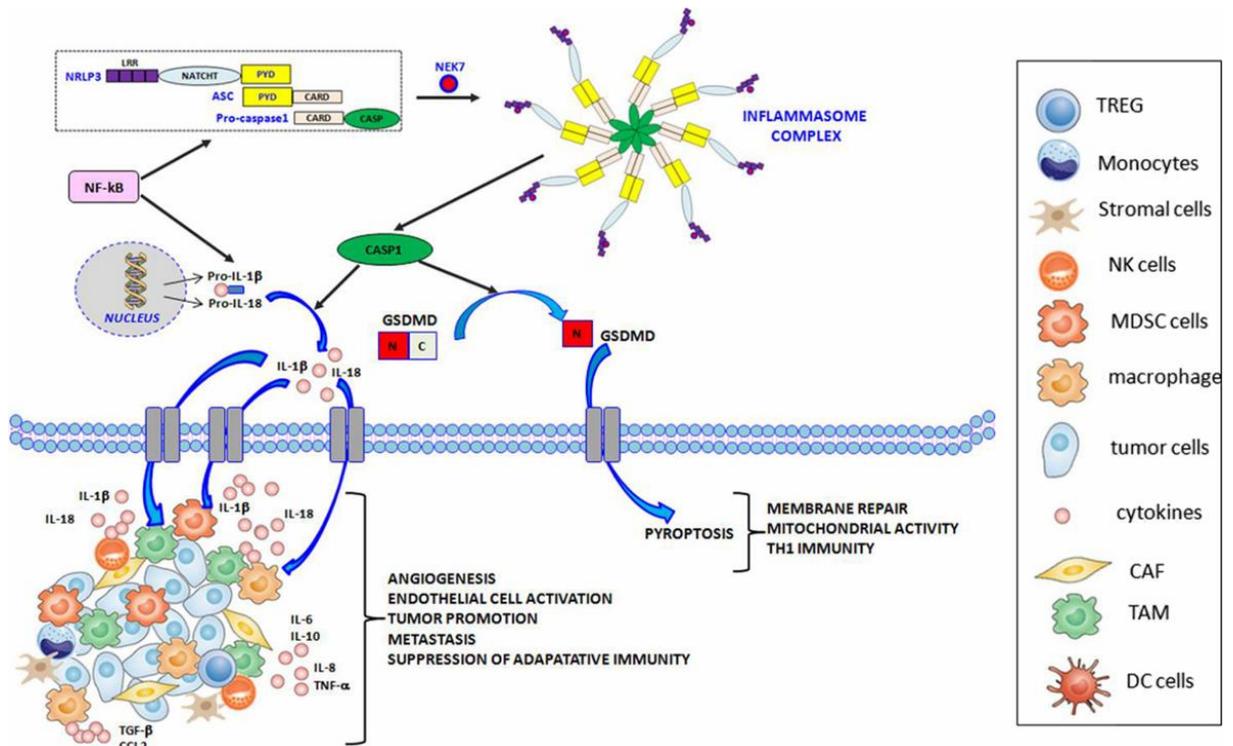


Figura 4. Mecanismos de ativação do inflamassoma e microambiente tumoral mamário

Fonte: Faria et al., J Biomed Sci, Apr 12., 2021

Após detectar estímulos específicos, através de NEK7, por exemplo, um membro da família de quinases relacionadas à NIMA (proteínas NEK), o domínio com sequências repetidas de resíduos do aminoácido leucina (NLRP3) se reúne com o adaptador de proteína semelhante à ASC e o efetor pró-caspase-1, por meio de interações homotípicas entre o domínio N-terminal de pirina (PYD) de NLRP3 e o domínio PYD de ASC, bem como entre os respectivos domínios de recrutamento de caspase (CARD). A montagem do inflamassoma NLRP3 leva à ativação da caspase-1 que então cliva as pró-formas da interleucina-1beta (IL-1 β) e IL-18 (IL-18), resultando na secreção de citocinas biologicamente ativas, bem como de gasdermina D (GSDMD), resultando em piroptose através da formação de poros na membrana plasmática. Os inflamassomas são ativados por diferentes mecanismos e liberam IL-1 β e IL-18 para iniciar a inflamação. Na figura, mostramos células T reguladoras (TREG), monócitos, células do estroma, células *natural killers* (NK), células supressoras derivadas da medula (MDSC), macrófagos, fibroblastos associados ao câncer, macrófagos associados a tumores (TAMS) e células dendríticas (DC), capazes de liberar citocinas e quimiocinas como IL-6 (interleucina 6), IL-8 (interleucina 8), IL-10 (interleucina 10), fator de crescimento transformador beta (TGF-b), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e ligante 2 de quimiocina com motivo CC (CCL2). Em detalhes, as células tumorais e do estroma podem liberar quimiocinas e levar à infiltração de neutrófilos. Os neutrófilos, por sua vez, secretam mais citocinas pró-inflamatórias, incluindo interleucinas e interferons. Células B e anticorpos também são observados como parte do microambiente. TREG, TAMs e MDSCs trabalham juntos para aumentar a imunossupressão.

Dentre as células do sistema imune, os macrófagos representam o principal componente do infiltrado imunológico do estroma de tumores mamários (SZE BENI et al., 2017). Os macrófagos são células fagocíticas heterogêneas, com ampla diversidade fenotípica, morfológica e funcional em resposta a sinais do microambiente onde estão localizados (MURRAY et al., 2014).

Sob estímulos de IFN- γ e lipossacarídeos, os macrófagos são polarizados para um perfil M1, que por meio da ativação da via NF- κ B produzem citocinas inflamatórias, que participam na apresentação de antígenos (BISWAS; MANTOVANI, 2010). Os macrófagos polarizados para um perfil M2 promovem o remodelamento tecidual e atenuam a inflamação aguda, por ativação da via STAT6 (LAWRENCE; NATOLI, 2011).

Os macrófagos recrutados, diferenciados e localizados no tecido tumoral denominam-se macrófagos associados ao tumor (TAMs). Estes dão suporte ao crescimento e invasão celular, por meio da produção e liberação de citocinas e fatores de crescimento pró-tumorais (CONDEELIS; POLLARD, 2006).

Na prática clínica, a presença de TAMs está geralmente associada a um pior prognóstico, enquanto a presença de linfócitos T parece ser indicativa de melhor resposta terapêutica (GWAK et al., 2015; PELEKANOU et al., 2018). Durante a progressão tumoral, os macrófagos liberam mediadores pró-inflamatórios no tumor (IL-1 β , IL-18, interferon-gama (IFN- γ), dentre outras) e ativam a CASP1 (DINARELLO, 2009), contribuindo no processo neoplásico.

Dentre os componentes do MAT, a IL-1 β e a IL-18, secretadas pelo inflamassoma, têm se destacado pela participação na progressão maligna, através de programas pró-angiogênicos, remodelamento tecidual e imunossupressão (KARKI; KANNEGANTI, 2019; LIN; ZHANG, 2017).

A IL-1 β é um dos mais potentes mediadores solúveis da inflamação (SNIPES et al., 2018), cuja produção em excesso pode causar danos aos tecidos hospedeiros e exacerbar patologias com componentes inflamatórios (NETEA et al., 2014). A ativação do NLRP3 em células dendríticas culmina com a produção de IL-1 β , estimulando a produção de IFN- γ e, deste modo, mediando a atividade anti-tumoral de linfócitos T (GHIRINGHELLI et al., 2009). A IL-18, por sua vez, atua sinergisticamente com a IL-12 para estimular células NK e T citotóxicas a produzir INF- γ (DINARELLO et al., 2013).

O inflamassoma NLRP3 pode ativar o gene *BRCA1* e induzir a clivagem proteolítica da CASP1, com eficiente processamento da IL-1 β . Foi demonstrado que a dosagem da IL-1 β é maior no sobrenadante de cultura celular de mulheres com doença benigna do ovário e pacientes com histórico familiar de câncer de mama, comparado ao daquelas com doença ovariana benigna e sem histórico familiar de câncer. Além disso, a maior expressão de IL-1 β foi associada com a tumorigênese e

com o silenciamento do gene *BRCA1*, resultando no aumento da migração, invasão e progressão tumoral (WOOLERY et al., 2015).

Em tumores de mama com mutação, análises de transcriptoma demonstraram processos envolvidos na resposta imune, incluindo regulação da produção de citocinas e interleucinas (IL-18 e IL-1 β) e sinalização das vias dos receptores tipo NOD e RIG-I, ambos mediadores intracelulares do inflamassoma (LI et al., 2021). Em linhagens celulares com fenótipo TN e mutação no gene *BRCA1*, a terapia combinada de inibidores da PARP e de DNA metiltransferases induziu a sinalização da via do inflamassoma (MCLAUGHLIN et al., 2020).

2.6 Obesidade, câncer de mama e inflamassoma

O câncer de mama é capaz de induzir e manter ativa diversas vias inflamatórias e oxidativas que favorecem o processo de crescimento tumoral, sendo que a presença de outras doenças de base inflamatória e oxidativa podem agravar esse cenário, favorecendo a recidiva tumoral (BHARDWAJ et al., 2015; MARTINEZ-OUTSCHOORN; SOTGIA; LISANTI, 2014).

A obesidade é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de câncer de mama em mulheres na pós-menopausa, particularmente tumores que expressam receptores hormonais (HAMMARSTEDT; GRAHAM; KAHN, 2012). Esse risco tem sido atribuído a níveis aumentados de estradiol circulante relacionados, tanto ao aumento de tecido adiposo, quanto à expressão elevada de aromatase (BROWN, 2021).

A expansão do tecido adiposo envolve a liberação de vários mediadores do sistema imune (AGRESTI et al., 2016). O microambiente do tecido adiposo (*ATME, Adipose Tissue Microenvironment*) é vascularizado e rico em citocinas antiinflamatórias e células do sistema imunológico com perfil anti-inflamatório, tais como macrófagos M2, células linfoides inatas, células T helper e eosinófilos (OLSON; QUAIL; JOYCE, 2017).

A sobrecarga metabólica causada pelo excesso de nutrientes aumenta a circulação de ácidos graxos livres (FFA, *free fatty acids*), levando à hipertrofia, hiperplasia e remodelação do tecido adiposo, resultando em hipóxia do tecido e necrose celular (Usman e Volpi 2018). Estes fatores, por sua vez culminam na formação de adipócitos mortos em forma de estruturas semelhantes à coroa (CLS)

(CILDIR; AKINCILAR; TERGAONKAR, 2013). As CLS são consideradas focos inflamatórios (MULLOOLY et al., 2017), e correlacionam-se com os níveis de aromatase (IYENGAR et al., 2016; IYENGAR; HUDIS; DANNENBERG, 2013).

Além disso, o excesso de lipídeos circulantes afeta diretamente o metabolismo celular ao ativar principalmente o receptor de membrana TLR4, que leva à ativação de NF- κ B e da proteína ativadora 1 (AP1), através do recrutamento de um conjunto de proteínas adaptadoras com domínio TIR (Fator 88 de diferenciação mielóide (MyD88), TIRAP, TRAM e TRIF). Isto, por sua vez resulta na captação de glicose pela sinalização da insulina (GAO et al., 2004; DASU; JIALAL, 2010) e na expressão de genes relacionados ao interferon tipo 1 (KIM; SEARS, 2010), indutor do perfil pró-inflamatório dos macrófagos residentes (OTTOBELLI CHIELLE et al., 2016),

O NF- κ B representa um dos fatores transcricionais mais importantes para a indução da expressão de citocinas pró-inflamatórias (TNF, IL-18, IL-1 β) e o NLRP3 (WATANABE; NAGAI; TAKATSU, 2013), cuja ativação resulta na amplificação da resposta inflamatória com a mobilização de macrófagos e leucócitos para o tecido adiposo inflamado (SHARMA; KANNEGANTI, 2021).

Em modelo de carcinogênese mamária e obesidade, o inflamassoma NLRC4 ativado com macrófagos levou à secreção da IL-1 β no MAT, contribuindo para a progressão da doença. Além disso, foi demonstrado que mulheres com excesso de peso tinham maior expressão de NLRC4, em relação àquelas com peso normal (KOLB et al., 2016). Alterações na microbiota de indivíduos com obesidade e câncer podem ativar o inflamassoma e a via NF- κ B, bem como modular as células do MAT (MAN, 2018).

3 JUSTIFICATIVA

A diversidade de subtipos tumorais mamários se traduz pela sua variabilidade molecular, histológica e celular. Dentre estes, os tumores TN são caracterizados por instabilidade genômica, sendo que cerca de 10 a 30,8% de mulheres diagnosticadas com esse subtipo apresentam mutações nos genes BRCA1 ou BRCA2.

Os inflamassomas podem colaborar para a promoção do câncer de mama através da ativação de sinais pró-inflamatórios, anti-apoptóticos, proliferativos e pró-fibrinogênicos, tanto no microambiente, como das próprias células tumorais, bem como parece atuar na resposta imune anti-tumoral, promovendo regressão do câncer.

A expressão de alguns componentes do inflamassoma em diferentes tecidos foi analisada, entretanto a literatura ainda apresenta uma lacuna quanto à expressão de seus componentes naqueles portadores da mutação em *BRCA1*, tornando-se necessário elucidar melhor esse cenário intrincado em que as pacientes com câncer de mama estão inseridas.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Analisar a associação da expressão dos marcadores do inflamassoma NLRP3 com dados clínicos e patológicos de pacientes com câncer de mama triplo-negativo portadoras e não portadoras de mutação no gene *BRCA1*.

4.2 Objetivos específicos

- Comparar a expressão de genes do inflamassoma NLRP3 e da piroptose por análise de RNA-Seq provenientes do TCGA:
 - de amostras de tecido normal adjacente ao tumor e tecido tumoral de pacientes com câncer de mama;
 - nos diferentes subgrupos definidos por características clínicas e patológicas;
- Correlacionar a expressão dos genes do inflamassoma e da piroptose com estimativas do nível e proporção do infiltrado imune;
- Avaliar o impacto prognóstico dos marcadores do inflamassoma e da piroptose em pacientes com CMTN;
- Correlacionar a expressão da proteína NLRP3 e da caspase-1 com a presença de estruturas em coroa (CLS), em pacientes com CMTN e obesidade;
- Correlacionar a expressão dos genes *NLRP3* e *CASP1* por análise de microarranjo provenientes do repositório GEO de pacientes com câncer de mama, classificadas pelo IMC.

5. MÉTODOS

5.1 Pacientes e espécimes tumorais

5.1.1 Departamento de Patologia do Hospital AC. Camargo Center

Um subconjunto de 63 amostras de carcinomas mamários foram obtidas dos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo Cancer Center, a partir de um grupo de 131 casos de mulheres com câncer de mama subtipo molecular triplo-negativo, caracterizadas para o status de *BRCA1* - deficiente ou proficiente (BRIANESE et al., 2018). Esses tumores foram rastreados para mutação patogênica germinativa dos genes *BRCA1* e *BRCA2* através da metodologia de *Next Generation Sequencing* (NGS) e para alteração em número de cópias de *BRCA1* através da abordagem de *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA). O silenciamento somático de *BRCA1* também foi avaliado pela análise de metilação do promotor de *BRCA1* através do método de conversão por bissulfito de sódio do DNA tumoral.

Todos esses casos foram classificados em CMTN Hereditário e CMTN Esporádico como sendo tumores diagnosticados em pacientes portadoras de mutação patogênica germinativa em *BRCA1* e não portadoras de mutação germinativa, respectivamente. Os tumores TN Esporádicos foram ainda classificados em *BRCA1*-deficiente e *BRCA1*-proficiente, correspondendo, respectivamente, a tumores com o promotor de *BRCA1* hipermetilado e tumores com o promotor de *BRCA1* não hipermetilado (BRIANESE et al., 2018).

As amostras que não apresentaram variações na sequência de nucleotídeos do gene *BRCA1* em comparação com a sequência referência ou apresentaram variações sem substituição de aminoácidos foram classificadas como selvagens. As alterações de nucleotídeos do tipo *missense* foram categorizadas como VUS. Alterações do tipo inserção, em sítios de *splicing*, e as deleções ou substituições de nucleotídeo que resultaram em códon de terminação prematura antes do aminoácido 1.853 foram classificadas como patogênicas (BRIANESE et al., 2018).

5.1.2 Departamento de Patologia do Hospital de Câncer de Barretos

Adicionalmente foram incluídas 25 amostras de CMTN provenientes do Departamento de Oncogenética do HCB e testadas para a presença de mutação germinativa nos genes *BRCA1* junto ao Centro de Diagnóstico Molecular do HCB, com a seguinte subdivisão:

- Grupo BRCA1-patogênico: 08 mulheres com história pessoal e familiar de câncer de mama com mutação deletéria identificada no gene *BRCA1*;
- Grupo BRCA1-WT: 17 mulheres com história pessoal e familiar de câncer de mama sem mutação deletéria e VUS identificadas no gene *BRCA1*.

Os critérios de seleção das pacientes referenciadas para teste genético foram definidos pelo Departamento de Oncogenética do HCB e consistiram em: história pessoal de câncer de mama antes dos 40 anos de idade; história pessoal de câncer de ovário em qualquer idade, com história familiar positiva de câncer; critérios clínicos estabelecidos pela Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO); probabilidade de mutação nos genes *BRCA1/BRCA2* (estimada pelas Tabelas de prevalência de Myriad) superior a 20%.

5.2 Critérios de inclusão

1. Idade superior a 18 anos;
2. Ter realizado tratamento e seguimento nos Hospitais A.C. Camargo Center e Hospital do Câncer de Barretos;
3. Amostras para as quais os laudos indicavam ausência de marcação das células neoplásicas por imuno-histoquímica para os receptores hormonais (RE<1% e RP<1%) e HER2 (HER 0 ou 1+) ou ausência de amplificação do gene *ERBB2* (se HER 2+);
4. Ter realizado teste genético para mutações germinativas nos genes *BRCA1* e *BRCA2*.

5.3 Critérios de exclusão

1. Paciente com câncer de mama metastático ao diagnóstico;
2. Câncer de mama bilateral ou recorrente;
3. Pacientes portadoras de outras neoplasias malignas invasivas primárias;
4. Ausência de dados clínicos de interesse no prontuário.

5.4 Coleta de dados

5.4.1 Variáveis clínico-patológicas

Para compor o estudo, foram selecionadas as seguintes variáveis clínico-patológicas, com os respectivos critérios de avaliação:

- a) Idade:** determinada em anos, da data de nascimento à data da cirurgia;
- b) Índice de massa corporal (IMC):** avaliado numericamente pelo peso (Kg) e altura (cm), obtidos na consulta pré-operatória por meio da fórmula: $IMC (Kg/m^2) = peso/(altura)^2$;
- c) Tipo histológico:** classificado como carcinoma ductal invasivo, carcinoma lobular invasivo e outros;
- d) Tamanho do tumor:** determinado em centímetros, pela avaliação microscópica do componente invasivo;
- e) Grau de diferenciação histológica:** classificado como bem diferenciado, moderadamente diferenciado e pouco diferenciado, pelo critério da SBR modificado Elston & Ellis;
- f) Presença de metástase linfonodal:** qualitativamente determinada como presente ou ausente, independentemente do número de linfonodos acometidos;
- g) Histórico familiar para câncer:** ausente, presente

5.5. CONSTRUÇÃO DOS *TISSUES MICROARRAYS* (TMAS)

Foram construídos TMAs no setor de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center, em colaboração com o Dr. Victor P. Andrade e Dra. Cynthia Bueno de Toledo Osório. Para a construção dos *microarrays* de tecido mamário, uma nova secção foi obtida, a partir de um bloco doador representativo de parafina, corados com hematoxilina eosina (H&E) e examinados através de um microscópio óptico (Olympus CX 31). A área de interesse foi marcada na lâmina usando-se um marcador permanente. O bloco correspondente de parafina também foi marcado, e foram coletados cilindros de tecido correspondentes às áreas marcadas nas lâminas, usando-se um micro arranizador de tecido (*Tissue microarrayer–Beecher Instruments, Silver Spring, MD, EUA*), que foram transferidos para um bloco de parafina receptor.

Cada caso foi amostrado duas vezes. Um mapa com a identificação detalhada de cada *spot* foi elaborado em uma planilha Excel®, de modo que cada um dos casos fosse identificado com precisão. Os blocos foram armazenados a 4 °C. Posteriormente, secções de 4 µm dos blocos receptores foram obtidas com auxílio de micrótomo e transferidas para lâminas revestidas por uma fita adesiva para posterior reticulação UV (*Instrumedics Inc, Hackensack, NJ, EUA*) (Figura 2).

As lâminas obtidas foram recobertas com uma camada de parafina para evitar a oxidação e mantidas em freezer à -20 °C. Tecidos mamários saudáveis utilizados como controle negativo foram coletados e processados da mesma maneira descrita acima. As lâminas contendo os casos foram retiradas do freezer 24h antecedentes à realização das reações de imuno-histoquímica (IHQ).

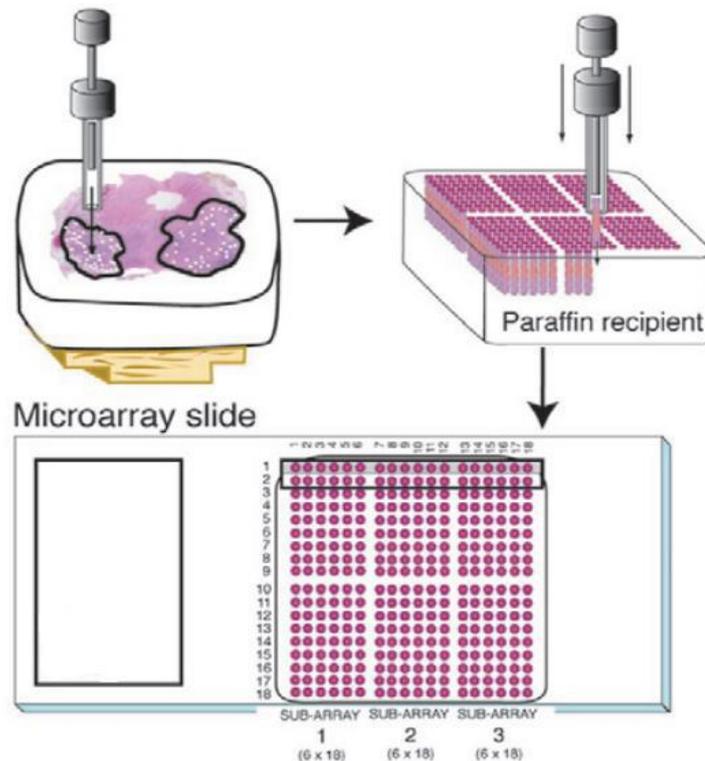


Figura 5. Esquema representativo da construção dos *Tissue microarrays* (TMAs).

Os TMAs foram construídos usando um perfurador de tecidos. Os cilindros contendo as amostras foram transferidos do bloco doador para o bloco receptor. Uma vez que o bloco de estudo tenha sido preparado, o bloco é seccionado e os cortes obtidos são colocados em lâminas histológicas. Cada cilindro corresponde a um *spot*. Os cortes obtidos são corados com H&E, para uso como lâmina de referência para confirmar a qualidade dos *spots*, ou com os anticorpos de interesse para avaliação dos potenciais biomarcadores. Adaptado de Manley et al., 2001.

5.5.1 Análises histológicas

5.5.2 Coloração Hematoxilina & Eosina (H&E)

Os blocos parafinizados foram resfriados a 10 °C, e cortados na espessura de 4 µm utilizando o micrótomo (Leika® - Jung RM 2025). Em seguida, as lâminas com tecido foram mantidas em uma estufa, por 5 minutos, na temperatura de 60 °C, para remover o excesso da parafina. Antes da coloração, foi necessário realizar uma nova diafanização, utilizando dois banhos de Xilol por cinco minutos, e um processo de hidratação do tecido, com sequência decrescente de concentração alcoólica, iniciando em álcool etílico a 100%, e dando sequência com álcool a 95%, 80%, 70% e 50%.

Após a hidratação com álcool, os cortes foram corados com hematoxilina, lavados em água corrente e corados com eosina seguidos de sucessivas lavagens.

Após a coloração, as lâminas passaram mais uma vez por um processo de desidratação com álcoois em sequência crescente, de 50% a 100%, e uma nova diafanização com Xilol, para remover outros resíduos, possibilitando a montagem das lâminas. As imagens das lâminas coradas foram analisadas por meio de microscopia óptica comum, em aumento de 400X.

5.5.2 Reações de imuno-histoquímica (IHQ)

Foram realizadas reações de IHQ para cada um dos seguintes marcadores PYCARD, NLRP3, IL-18 e caspase-1.

As lâminas foram incubadas com os anticorpos anti-NLPR3 (1:200, Novus Biologicals), anti-caspase-1 (1:100, Santa Cruz Biotechnology), anti-IL-18 (1:250, Santa Cruz Biotechnology) e anti-ASC (1:100, Abcam). Posteriormente, as lâminas foram submetidas ao protocolo dos kits de detecção Ultraview (cat. 760-500, Ventana Medical Systems) segundo recomendações do fabricante.

Cortes histológicos de 4 µm de espessura foram obtidos a partir de material embebido em parafina e colhidos em lâminas previamente preparadas com solução adesiva de 3 amino-propil-trietóxi-silano (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO/USA, cód. A3648) a 2%. A seguir, os cortes histológicos foram desparafinizados em dois banhos de xilol de 20 e 10 minutos, respectivamente, à temperatura ambiente. O bloqueio de peroxidase endógena foi feito em câmara escura com três incubações em água oxigenada a 3% por 10 minutos cada.

As reações com os kits Ultraview foram realizadas no sistema automatizado Ventana BenchMark XT (Ventana Medical Systems), seguindo as instruções do fabricante. As lâminas foram desparafinizadas utilizando a solução EZprep (cat. 950-102, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ, USA). As recuperações antigênicas foram feitas com o reagente *cell conditioning 2* (cat. 950-223, Ventana Medical Systems, Inc.) a 95 °C por 56 min. Em seguida, as lâminas foram incubadas com os anticorpos primários por 1 hora. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água corrente durante cinco minutos e submetidas a tratamento para exposição dos sítios antigênicos em calor úmido, em banho maria a 95 °C. As lâminas utilizadas para a identificação de NLRP3 e IL-18 foram colocadas na solução *Target Retrieval Solution* pH=9,0 por 20 minutos. As lâminas para Caspase-1 e PYCARD

foram imersas na solução *Target Retrieval Solution* pH=7,0 por 40 minutos. As lâminas foram lavadas em água corrente e água destilada por cinco minutos cada e submersas em solução salina tamponada (PBS) pH=7,2.

Tabela 1. Descrição dos anticorpos

Anticorpo	Descrição	Clone	Isotipo	Código	Marca	Diluição	Sistema
NLRP3	Monoclonal	nalpy3-b	IgG1	ab17267	Novus Biologicals	1:200	EnVision G2
Caspase-1	Policlonal	-	IgG	NB100-56565	Santa Cruz Biotechnology	1:100	EnVision G2
IL-18	Policlonal	-	IgG	ab71495	Santa Cruz Biotechnology	1:250	EnVision G2
PYCARD - ASC	Policlonal	-	IgG	ab111852	Abcam	1:100	EnVision G2

5.5.3 Avaliação da imunomarcção para os marcadores do inflamassoma

Todas as análises de imagens foram realizadas usando o software de patologia digital *QuPath*, v.3.0 (<https://qupath.github.io/>). A análise quantitativa da expressão citoplasmática de NLRP3, ASC (PYCARD) e caspase-1 e a expressão nuclear e citoplasmática da IL-18 foram avaliadas e pontuadas em células tumorais, sem o conhecimento prévio dos detalhes clínicos e do desfecho clínico das pacientes, conforme diretrizes da REMARK (WHITE et al., 2019).

Os núcleos de tecido foram detectados usando a ferramenta “*simple tissue detection*” de modo que todos os tecidos considerados insuficientes (<10% de células tumorais representativas no *spot*), com artefatos dominantes ou consistindo apenas de carcinoma ductal *in situ* foram removidos da análise. Além disso, os casos que foram considerados avaliáveis, mas que, apresentavam objetos confusos, marcação irregular e dobras de tecidos, foram excluídos manualmente nesta etapa.

As células foram segmentadas usando o algoritmo personalizado baseado em *deep learning* “*Stardist*”. Um classificador de células baseado em “*Random forests*” foi treinado separadamente para cada marcador avaliado, definindo classe celular de tumor, estroma e infiltrado inflamatório (SCHMIDT et al., 2018). O treinamento do

classificador foi realizado de forma iterativa, com um patologista selecionando manualmente áreas representativas de cada classe como *input* para o algoritmo de acordo com as orientações do desenvolvedor até a obtenção de uma classificação adequada na lâmina utilizada para treinamento. Após o treinamento inicial, o classificador foi aplicado a todas as lâminas de um mesmo marcador imunohistoquímico (Figura 6).

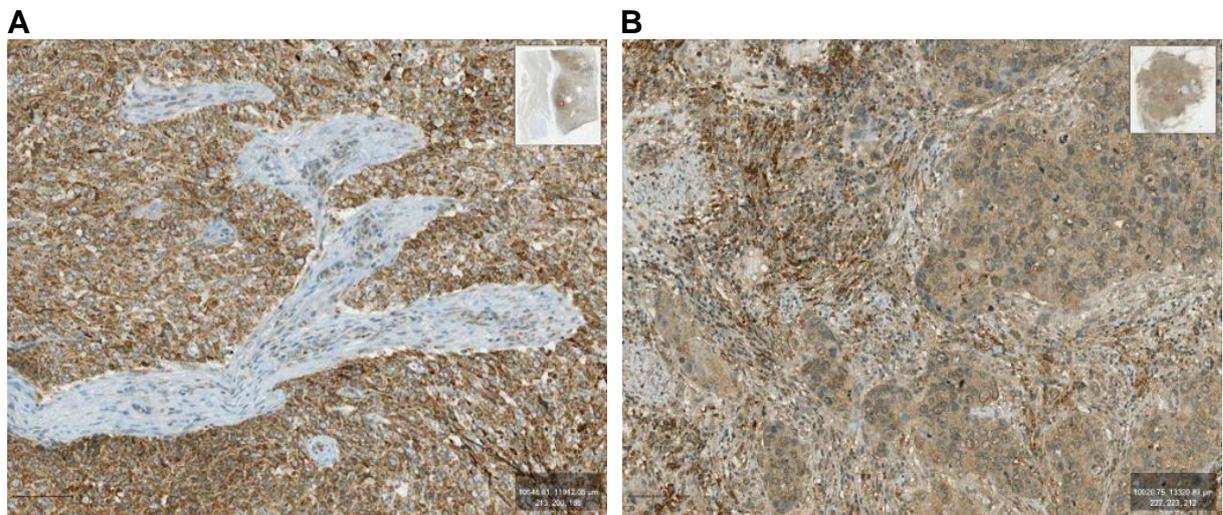


Figura 6. Padrões de imunomarcação no câncer de mama triplo-negativo com e sem mutação BRCA-1, por imuno-histoquímica.

A: expressão difusa de NLRP3, com positividade no citoplasma. **B** direita, expressão positiva de PYCARD no citoplasma.

A acurácia da classificação foi verificada manualmente em todas as lâminas, tanto de forma global por visualização panorâmica quanto em cinco campos aleatórios de aumento intermediário (estimado em 10x pelo *software*). As lâminas com classificações inadequadas segundo essa avaliação foram escolhidas para nova etapa de treinamento do classificador. Após novo treinamento, o algoritmo foi novamente aplicado a todas as lâminas, seguindo-se com novo processo de avaliação visual da acurácia descrito acima. As etapas de segmentação e classificação foram acompanhadas por dois patologistas treinados para uso do *software* (Dr João Victor Castro e Dr Victor Piana Andrade).

Para cada marcador, o sistema de classificação de células tumorais positivas foi otimizado com ajustes dos *thresholds* da média de densidade óptica visualmente inspecionada (Figura 7).

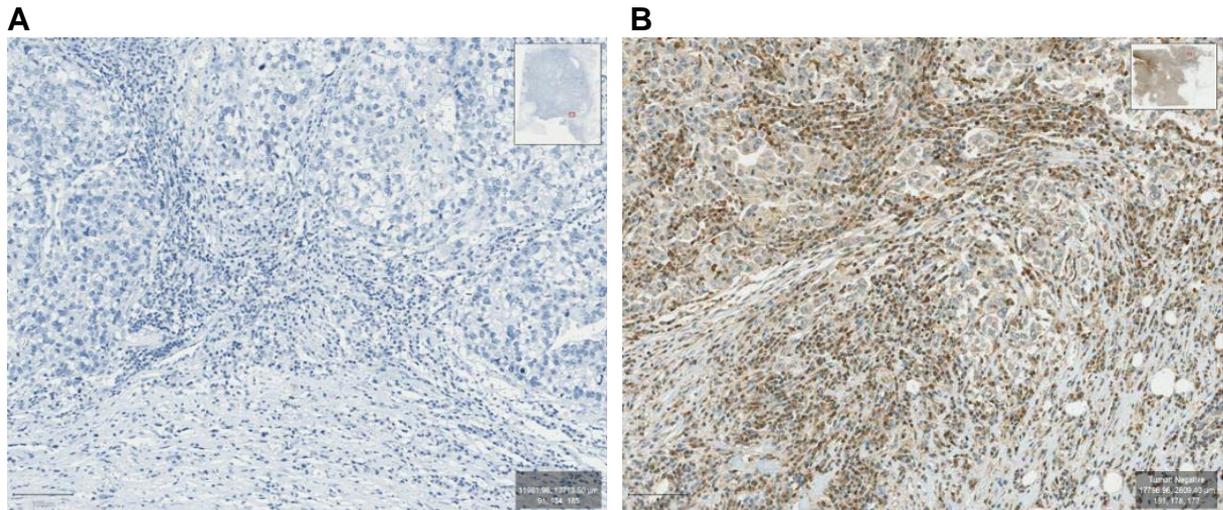


Figura 7. Padrões de imunomarcção no câncer de mama triplo-negativo com e sem mutação BRCA-1, por imuno-histoquímica.

A: expressão positiva da IL-18 no núcleo. **B:** expressão positiva de caspase-1 no citoplasma.

5.5.4 Quantificação do infiltrado inflamatrio

Para estudos com H&E, o infiltrado linfocítico tumoral (TIL) estromal tem se revelado um parâmetro superior e reprodu vel. O compartimento estromal tem uma clara vantagem em comparação ao intra tumoral, pois a densidade e o padrão de crescimento da célula tumoral não afetam a contagem do TIL neste espaço (SALGADO et al. 2015).

Sendo assim, após avaliação dos patologistas, o TIL estromal foi definido como a porcentagem do estroma tumoral ocupado por linfócitos, e categorizado como menos de 10%, de 10% a 50%, ou mais de 50% (SALGADO et al., 2015).

5.5.5 Avaliação das estruturas em coroa (CLS)

Os casos foram selecionados a partir de um banco de dados de pacientes com CMTN do Hospital A.C. Camargo Cancer Center. O banco de dados continha 54 amostras. Destas, 38 foram excluídas, pois em 20 amostras não havia o caso correspondente e em 18 encontrava-se sem tecido adiposo no TMA.

Foram realizados cortes dos blocos de TMA resfriados em micrótomo rotativo na espessura de 5 μ m. O material foi então colocado em banho maria em torno de 40 $^{\circ}$ C e aderido às lâminas. As lâminas foram levadas à estufa aquecida a 60 $^{\circ}$ C para remover o excesso de parafina e melhorar a fixação do corte   lâmina. Cortes

histológicos do TMA foram submetidos à imuno-histoquímica usando os anticorpos CD68 (pan-macrófago), NLRP3 e caspase-1.

As diluições e condições de reação padronizadas para os anticorpos NLRP3 e caspase-1 foram descritas acima. Para o anticorpo CD68, foi utilizado o protocolo sugerido pelo fabricante (VENTANA), que consistiu das seguintes etapas: desparafinização em solução de EZ Prep, aplicação do BenchMark Ultra LCS após lavagens e antes das aplicações dos reagentes subsequentes, recuperação antigênica por calor (95 °C) em solução recuperante BenchMark Ultra CC1 (pH=8,0) por 64 minutos, lavagem com Reaction Buffer, seguida da aplicação de CD68 por 32 minutos, detecção com UltraView Universal DAB Kit, lavagens com Reaction Buffer e na sequência aquecimento a 90 °C por 4 minutos para desnaturação.

Todas as reações de IHQ foram processadas em plataforma automatizada BenchMark ULTRA® (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, EUA), usando o kit de detecção Ultraview Universal DAB Detection Kit (Ventana Medical System/ Roche).

A presença de CLS foi definida como adipócitos mortos ou moribundos cercados por macrófagos (IYENGAR et al. 2016). A quantificação das CLS foi feita utilizando software digital de análise de imagens (*imagescope* – Aperio, Leica Biosystems®) e dada como número de CLS por mm².

6. ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA

6.1 Obtenção de dados

Os níveis de expressão (RNA-seq) e informações clínicas foram recuperados do consórcio *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), acesso em 10 de julho de 2018 (<https://tcga-data.nci.nih.gov/tcga>), a partir dos dados de tumores de 1053 pacientes com câncer de mama invasivo não metastático (as pacientes com doença metastática no momento do diagnóstico foram excluídas a fim de não contaminar a análise de sobrevida, uma vez que este é um subgrupo com sobrevida menor) e 105 amostras de tecido não neoplásico adjacente.

A definição do perfil imuno-histoquímico dos tumores foi baseada na avaliação dos receptores de estrogênio, progesterona e superexpressão de HER2. Os fenótipos foram classificados em luminais A e B (RE+ e/ou RP+ e HER2-), HER2+ (RE- e/ou RP- e HER2+) e triplo-negativos (RE- e/ou RP-, HER2-).

Os dados de expressão dos microarranjos de pacientes com câncer de mama, classificadas pelo IMC foram provenientes do banco de dados *Genome Expression Omnibus* (GEO), com número de acesso GSE78958.

6.2 Análise da expressão diferencial de genes

A contagem bruta dos *reads* para cada gene foi realizada por meio do software Htseq v0.6.1 (ANDERS; PYL; HUBER, 2015) e a análise de expressão diferencial foi executada usando o pacote de ferramentas estatísticas Edge R versão 3.3 (ROBINSON; MCCARTHY; SMYTH, 2009), disponível no repositório Bioconductor (BATES et al., 2004). Nas comparações entre as amostras tumorais e adjacentes ao tumor, foi utilizado as contagens dos transcritos associados aos componentes do inflamassoma (PYCARD, NLRP3, IL-18, IL-1 β e caspase-1) e da piroptose (caspases - 1, -4 e -5; gasderminas A, B, D e E-DFNA5). Genes com contagem menor que 10 *reads*, em pelo menos 20 amostras foram excluídos.

Foram considerados como diferencialmente expressos os genes com taxa de falsa descoberta (FDR-alta proporção de falsos positivos causados pelos múltiplos testes) menor que 0,01 e logaritmo de *fold change* (logFC) maior ou igual a 1,0 ou menor ou igual a -1,0. Foram consideradas significativas as sondas que

apresentavam *p valor* corrigido por Bonferroni $< 0,01$. O método de Bonferroni foi utilizado para ajustar os valores de *p* para múltiplas comparações.

6.3 Avaliação do infiltrado inflamatório

As estimativas do número e proporção dos componentes do infiltrado inflamatório foram obtidas por meio de abordagens computacionais. O CIBERSORT é uma ferramenta que quantifica o infiltrado baseado em métodos de deconvolução (NEWMAN et al., 2015). Este software permite obter uma quantificação relativa de 22 tipos de células hematopoiéticas humanas (sete subtipos de linfócitos T, linfócitos B naïve e de memória, células plasmáticas, linfócitos NK e diferentes subtipos de células dendríticas).

Os dados de expressão foram normalizados na forma de transcritos por milhão (TPM). Na análise com CIBERSORT foram utilizados os seguintes parâmetros: 1000 permutações, desabilitada a função de normalização por quartil e escala em modo absoluto.

7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os pontos de corte para a análise de expressão dos marcadores do inflamassoma foram calculados usando o pacote *Evaluate Cutpoint R* (OGŁUSZKA et al., 2019).

As associações entre os dados obtidos na análise de expressão e as variáveis demográficas, clínicas e anatomopatológicas foram calculados pelo teste Qui quadrado bi-caudal, corrigido pelo teste de Fisher quando necessário e apresentadas na forma de tabelas de contingência.

A sobrevida global (SG) foi definida como o intervalo de tempo entre a data do laudo histopatológico e a data do óbito (por qualquer motivo) ou do final do seguimento. Foram censuradas as mulheres que permaneceram vivas no final do seguimento na data do último contato. Para a sobrevida livre de doença (SLD), considerou-se o tempo decorrido entre a data do laudo histopatológico até a progressão, ou recaída, ou início de um tratamento não planejado, ou último seguimento em casos de uma resposta completa ao tratamento.

Os óbitos foram tratados como falhas. Para as estimativas de tempo de sobrevida e sua comparação em relação às variáveis estudadas, foram utilizados o método de Kaplan-Meier e o teste de *log-rank*, respectivamente. Para as amostras provenientes do TCGA Foram utilizados os pacotes *survival* e *survminer* disponíveis na linguagem R.

O modelo de regressão para riscos proporcionais de Cox foi utilizado na avaliação dos fatores prognósticos, computando-se a razão de risco (HR) e os correspondentes intervalos de confiança de 95% (IC95%). Foi considerado o nível de significância estatística de 5%.

8. ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo recebeu aprovação nos Comitês de Ética e Pesquisa do Hospital AC. Camargo Cancer Center (Anexo A), sob o parecer consubstanciado número 2.758.540 e do HCB, sob o parecer o número, 4.617.383, de 29 de março de 2021 (Anexo B), respectivamente.

Este estudo também está vinculado ao projeto temático aprovado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (nº 2013/23277-8), sob a responsabilidade da Dra. Dirce Maria Carraro.

9 RESULTADOS

9.1 Expressão dos genes do inflamassoma e da piroptose em tecido tumoral vs tecido normal adjacente provenientes do repositório TCGA

Os valores dos marcadores do inflamassoma e da piroptose foram mensurados em transcritos por milhão (TPM).

O gene *ASC* (*PYCARD*) mostrou-se mais expresso nos tumores comparado com amostras de tecido normal adjacente ($p < 0,001$) e o inverso foi observado para o gene *NLRP3* ($p = 0,001$) (Figura 5).

Em relação aos genes associados com a piroptose, *GSDMB* ($p = 0,025$) e *GSDME* ($p < 0,001$) foram mais expressos nos tecidos normais (Figura 6).

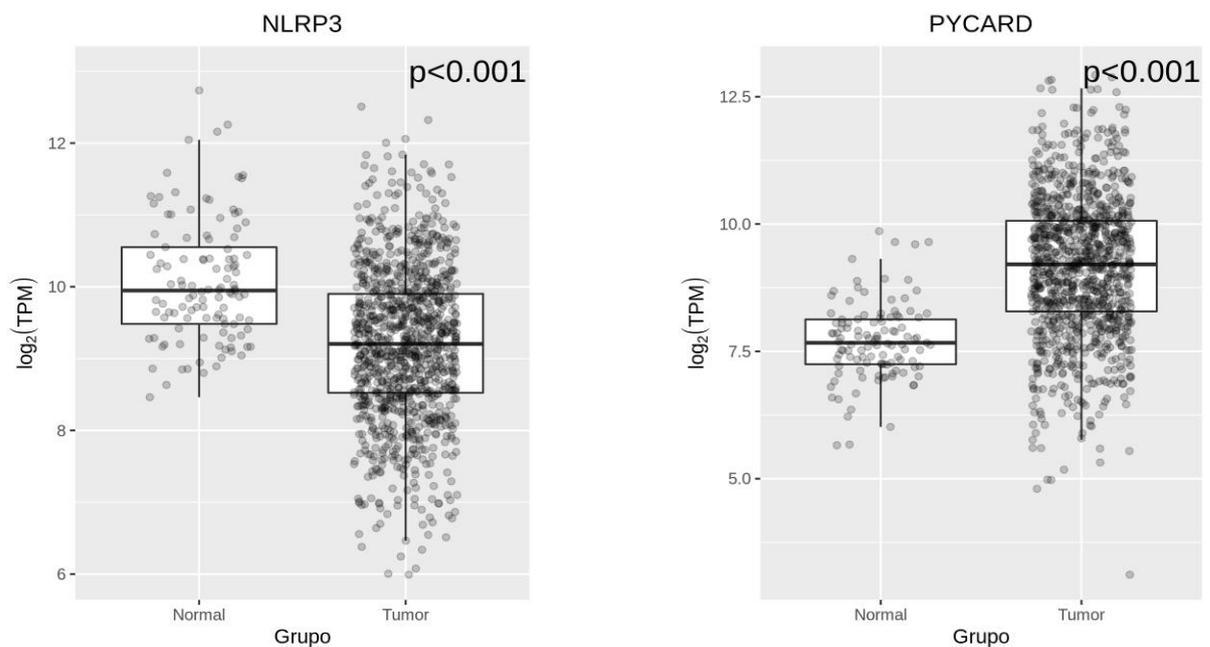


Figura 8. Expressão dos genes *NLRP3* e *PYCARD/ASC* entre tecido tumoral e tecido normal adjacente

À esquerda box-plot representando a expressão de *NLRP3* em 105 amostras de tecidos adjacentes normais e 1052 tumorais, cujas barras centrais indicam a mediana; limites inferior e superior da caixa indicam primeiro e terceiro quartis, respectivamente; linhas periféricas representam a densidade suavizada dos dados. Todos os pacientes estão individualmente representados como círculos. Os valores foram mensurados em TPM normalizado. À direita box-plot representando expressão de *PYCARD/ASC* em tecidos adjacentes normais e tumorais. p -valores originados de teste t de Student não pareado.

Em relação aos genes associados com a piroptose, *GSDMB* ($p = 0,025$) e *GSDME* ($p < 0,001$) foram mais expressos nos tecidos normais (Figura 6).

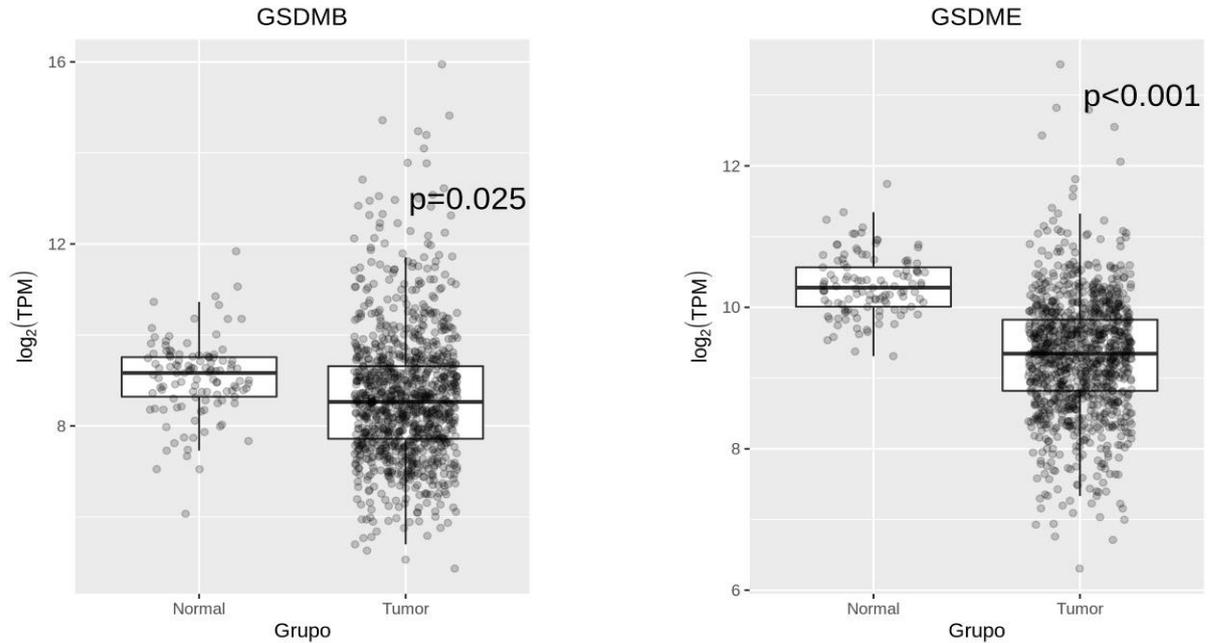


Figura 9. Expressão dos genes *GSDMB* e *GSDME* entre tecido tumoral e tecido normal adjacente.

À esquerda box-plot representando a expressão de *GSDMB* em 105 amostras de tecidos adjacentes normais e 1052 tumorais, cujas barras centrais indicam a mediana; limites inferior e superior da caixa indicam primeiro e terceiro quartis, respectivamente; linhas periféricas representam a densidade suavizada dos dados. Todos os pacientes estão individualmente representados como círculos. Os valores foram mensurados em TPM normalizado. À direita box-plot representando expressão de *GSDME* em tecidos adjacentes normais e tumorais. p-valores originados de teste t de Student não pareado.

Em contrapartida, o gene *GSDMD* foi mais expresso no tecido tumoral (Figura 7).

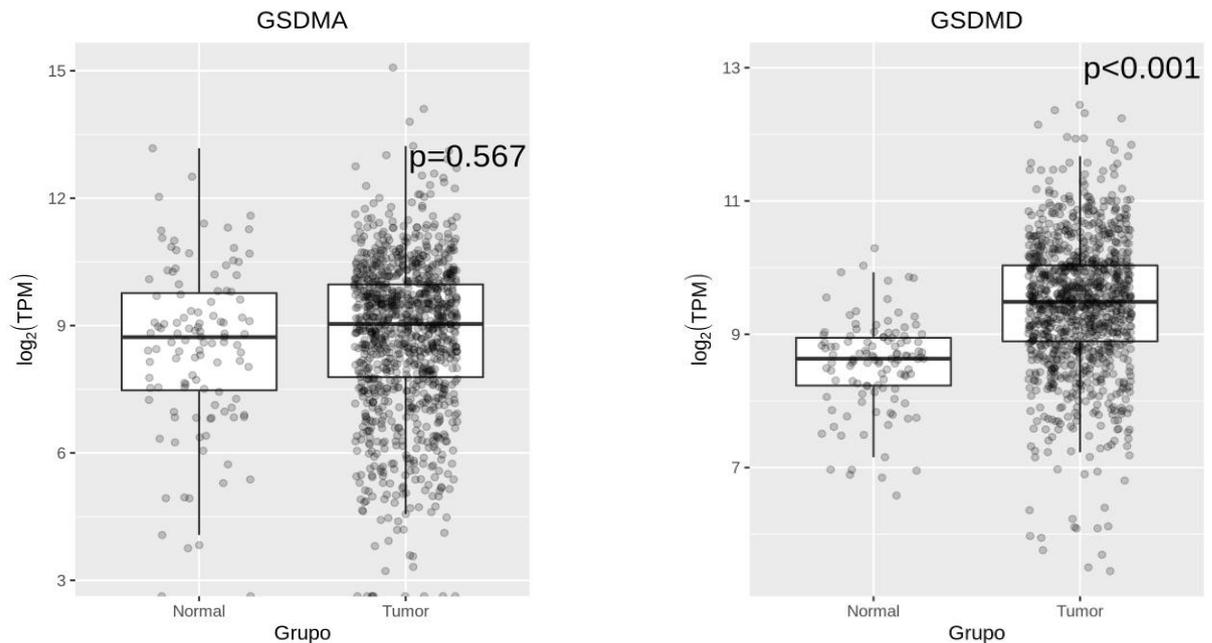


Figura 10. Expressão dos genes *GSDMA* e *GSDMD* entre tecido tumoral e tecido normal adjacente.

À esquerda box-plot representando a expressão de *GSDMA* em 105 amostras de tecidos adjacentes normais e 1052 tumorais, cujas barras centrais indicam a mediana; limites inferior e superior da caixa indicam primeiro e terceiro quartis, respectivamente; linhas periféricas representam a densidade suavizada dos dados. Todos os pacientes estão individualmente representados como círculos. Os valores foram mensurados em TPM normalizado. À direita box-plot representando expressão de *GSDMD* em tecidos adjacentes normais e tumorais. p-valores originados de teste t de Student não pareado.

Os genes *CASP1* e *CASP4* foram significativamente mais expressos em tecidos normais ($p < 0,001$). O gene *CASP5* esteve mais presente no tecido tumoral ($p < 0,001$).

Comparando a expressão entre tecidos tumorais e normais adjacentes dos genes das citocinas inflamatórias *IL-18* e *IL-1B*, verificou-se um aumento da expressão do gene de *IL-18* em tecidos tumorais e o contrário foi observado com o gene de *IL-1B* (Figura 8).

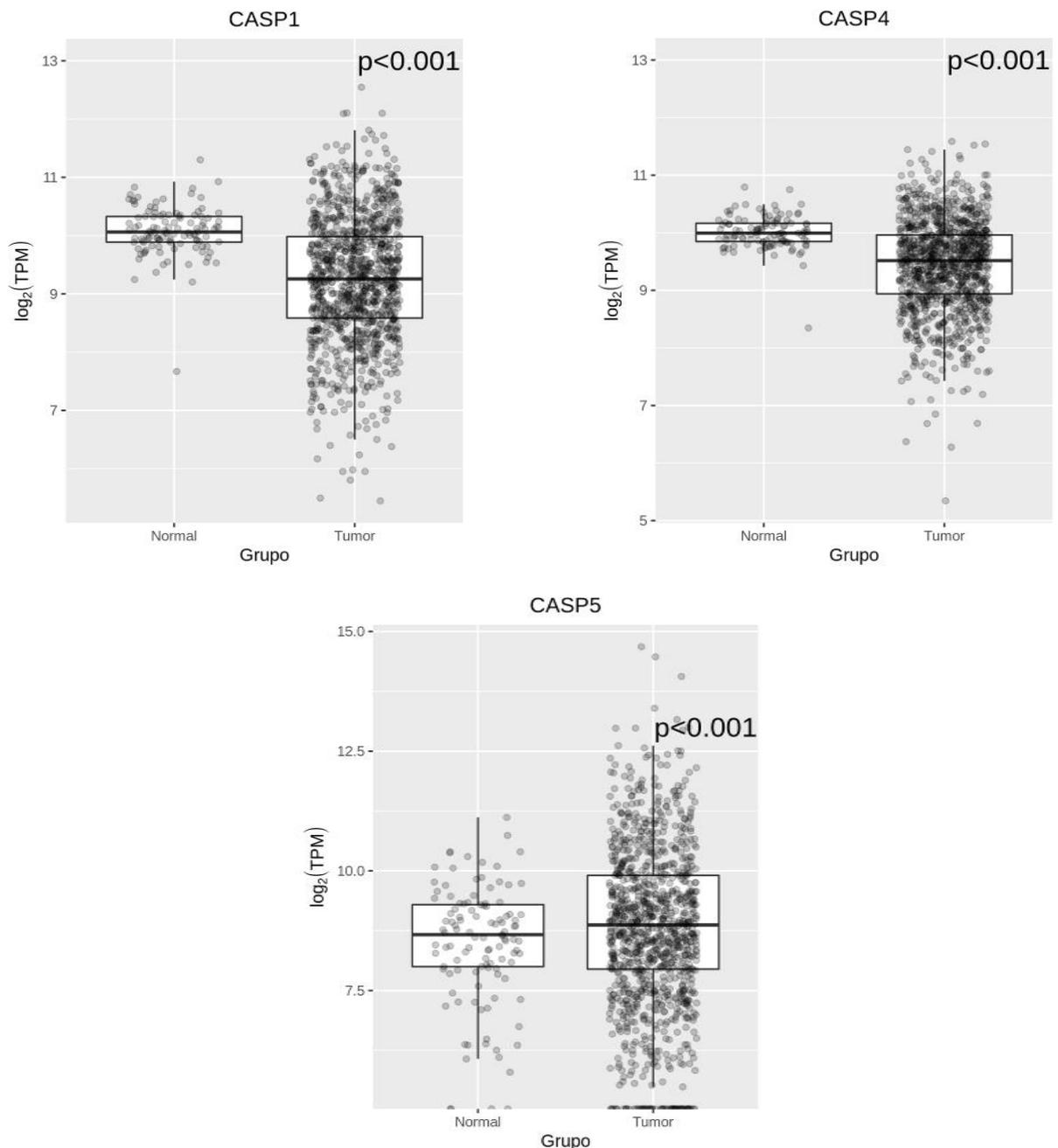


Figura 11. Expressão dos genes *CASP1*, *CASP4* e *CASP5* entre tecido tumoral e tecido normal adjacente.

À esquerda box-plot representando expressão de *CASP1* em 105 amostras tecidos adjacentes normais e 1052 tumorais, cujas barras centrais indicam a mediana; limites inferior e superior da caixa indicam primeiro e terceiro quartis, respectivamente; linhas periféricas representam a densidade suavizada dos dados; todos os pacientes estão individualmente representados como círculos. Os valores foram mensurados em TPM normalizado. Ao meio, box-plot representando expressão da *CASP4* em amostras de tecidos adjacentes normais e tumorais. À direita box-plot

representando expressão de *CASP5* em amostras de tecidos adjacentes normais e tumorais. p-valores originados de teste t de Student não pareado.

Comparando a expressão entre tecidos tumorais e normais adjacentes dos genes das citocinas inflamatórias *IL-18* e *IL-1B*, verificou-se um aumento da expressão do gene de *IL-18* em tecidos tumorais e o contrário foi observado com o gene de *IL-1B* (Figura 8).

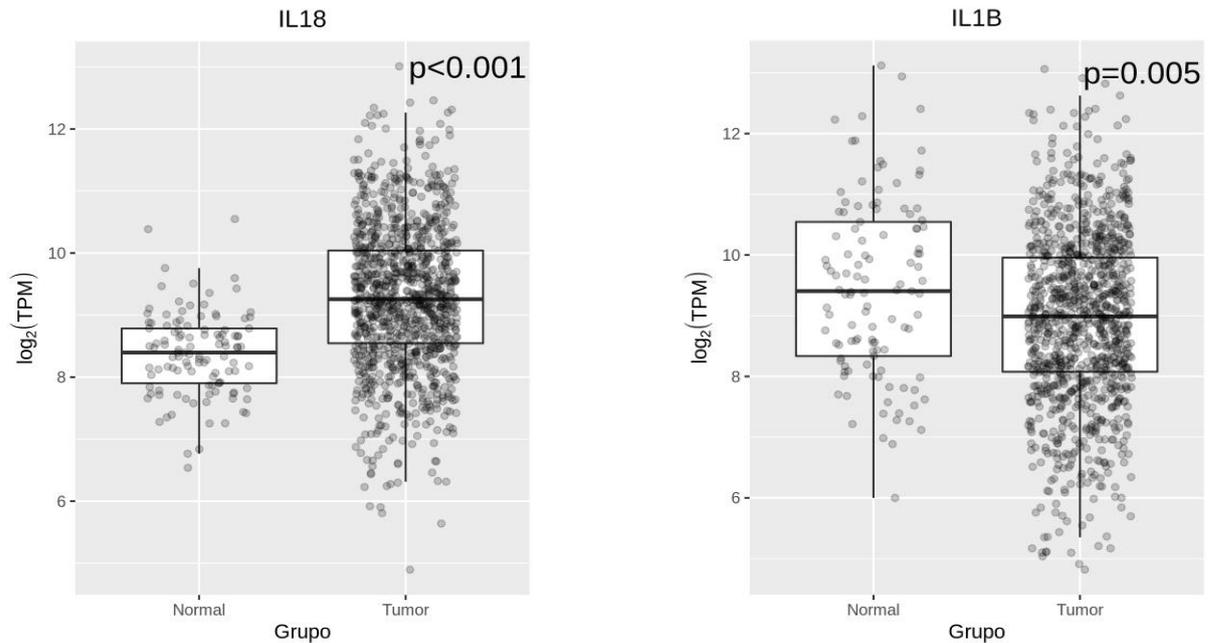


Figura 12. Expressão dos genes *IL-18* e *IL-1B* entre tecido tumoral e tecido normal adjacente.

À esquerda box-plot representando expressão de *IL-18* em 105 amostras de tecidos adjacentes normais e 1052 amostras tumorais, cujas barras centrais indicam a mediana; limites inferior e superior da caixa indicam primeiro e terceiro quartis, respectivamente; linhas periféricas representam a densidade suavizada dos dados; todos os pacientes estão individualmente representados como círculos. Os valores foram mensurados em TPM normalizado. À direita box-plot representando expressão de *IL-1B* em amostras de tecidos adjacentes normais e tumorais. p-valores originados de teste t de Student não pareado.

Posteriormente, foi realizada uma análise diferencial com os dados tratados por meio do programa Edge R (Tabela 2)

Tabela 2. Análise diferencial de genes entre tecidos tumoral e normal adjacente tumoral

Normal x Tumor			
	logFC	p-value	p-adjusted
<i>NLRP3</i>	-0,668	$4,67 \times 10^{-8}$	$9,33 \times 10^{-8}$
<i>ASC</i>	1,71	$8,2 \times 10^{-37}$	$8,2 \times 10^{-36}$
<i>CASP1</i>	0,385	0,0001	0,0002
<i>CASP4</i>	-0,27	$6,34 \times 10^{-5}$	0,0001
<i>GSDMB</i>	-0,273	0,079	0,088
<i>GSDMA</i>	0,164	0,428	0,428
<i>GSDME</i>	-0,592	$3,83 \times 10^{-12}$	$1,28 \times 10^{-11}$

GSDMD	0,709	$3,45 \times 10^{-11}$	$8,62 \times 10^{-11}$
IL18	1,2	$9,39 \times 10^{-24}$	$4,70 \times 10^{-23}$
IL1B	-0,57	0,0007	0,0009

A análise demonstrou que os genes *ASC* e *IL-18* são cerca de três vezes mais expressos em amostras tumorais comparados às amostras normais. Os outros genes foram significativamente mais abundantes em tecidos adjacentes tumorais. O gene *CASP5* não foi incluído, por apresentar contagem menor que dez *reads*.

9.2 Análise do perfil de expressão gênica de pacientes com câncer de mama

Obtivemos informações de expressão gênica de 542 tumores de mama não-metastáticos dos subtipos luminais A e B, 157 triplo-negativos e 161 HER2 enriquecidos registrados no TCGA.

A idade média ao diagnóstico foi de 58,4 anos (± 13 anos). Na amostra avaliada, o receptor de estrogênio (RE) estava expresso em 73,9% dos tumores, receptor de progesterona (RP) em 63,9%, e o HER2 estava superexpresso em 15,1% dos tumores (Tabela 3).

Os subtipos luminais A e B corresponderam a 63% dos casos. Neste grupo, foi observado maior percentual de mulheres brancas (70,6%), na pós-menopausa (65,8%), maior positividade para os receptores de estrogênio (77,8%) e progesterona (63,7%).

Os tumores TN foram mais prevalentes nas mulheres brancas (33,7%), na pós-menopausa (63,05%), sem comprometimento linfonodal (67,5%). A mutação do gene *BRCA1* foi reportada em 1,23% dos tumores TN.

Tabela 3. Características clínico-patológicas das pacientes com câncer de mama

Variáveis	Geral	Luminais	HER2+	TN
Estadiamento T				
T1+T2	890 (84,5%)	457 (84,3%)	138 (89,1%)	140 (89,17%)
T3+T4	163 (15,4%)	85 (15,6%)	22 (10,8%)	17 (10,83%)
NA	0	0	0	0
Estadiamento N				

Nx+N0	522 (49,5%)	280 (51,6%)	68 (67,5%)	106 (67,52%)
N1+N2	531 (50,4%)	262 (48,3%)	92 (32,4%)	51 (32,48%)
Receptor de estrogênio				
Positivo	777 (73,9%)	422 (77,8%)	121 (75,6%)	
Negativo	228 (21,6%)	120 (22,1%)	38 (23,7%)	
NA	47 (4,46%)	0	0	

Cont.

Variáveis	Geral	Luminais	HER2+	TN
Receptor de progesterona				
Positivo	673 (63,9%)	365 (67,3%)	102 (63,7%)	
Negativo	328 (31,1%)	173 (31,9%)	48 (30%)	
NA	48 (4,5%)	0	0	
HER2+				
Positivo	160 (15,1%)			
Negativo	542 (51,4%)			
NA	351 (33,1%)			
Mutação BRCA1/2				
Selvagem+VUS	136 (13%)	0	0	13 (1,23%)
Mutação patogênica	13 (1,23%)	0	0	136 (13%)
NA	904 (86%)	430 (47,5%)	157 (17,3%)	317 (35%)

DP: desvio padrão; Valores de frequência entre parênteses; NA: sem informação; TN: triplo-negativo.

Os tumores HER2+ foram mais frequentes em mulheres na pós-menopausa (63,06%), da raça branca (56,6%) e com comprometimento linfonodal (32,4%).

9.3 Expressão diferencial dos genes do inflamassoma e da piroptose em pacientes com câncer de mama

Após a realização da análise diferencial, pelo software Edge R, obteve-se como resposta quais genes estavam diferencialmente expressos nos subtipos moleculares do câncer de mama. Foram utilizados os valores de $\log_2\text{ratio} \geq 1.0$ ou ≤ -1.0 para considerar genes com aumento ou diminuição de expressão como relevantes, respectivamente (Tabela 4).

Os resultados da comparação entre as raças asiática e negra mostraram que o gene *GSDMD* é mais expresso na população asiática ($p=1,7 \times 10^{-5}$).

Pacientes com receptor de estrogênio positivo apresentaram maior expressão dos genes *GSDMD* e *PYCARD*, ao passo que os genes *CASP1*, *CASP4* e *IL-18* foram mais expressos naquelas com receptor de estrogênio negativo.

A expressão dos genes *GSDMD* e *PYCARD* foram mais expressas no grupo com receptor de progesterona positivo. A expressão do gene *GSDMB* foi significativamente maior em tumores com receptor HER2 positivo ($p=7,22 \times 10^{-14}$).

Tabela 4. Expressão diferencial dos genes do inflamassoma e da piroptose em pacientes com câncer de mama

Variáveis	Genes	FC	p	p-adj
Raça				
Asiática x negra	GSDMD	7,55	1,55x10 ⁻⁶	1,7 x10 ⁻⁵
ER+ x ER-				
	CASP1	-1,92	1,68x10 ⁻¹⁰	1,85x10 ⁻⁹
	CASP4	-1,34	4,86x10 ⁻¹¹	5,34x10 ⁻¹⁰
	GSDMD	4,24	9,77x10 ⁻⁸	1,07x10 ⁻⁶
	IL18	-1,08	0,0001	0,002
	PYCARD	12,9	2,2x-10 ⁻⁹	2,42x10 ⁻⁹
PR+ x PR-				
	CASP1	-1,01	0,0001	0,002
	GSDMB	-1,84	0,004	0,04
	GSDMD	3,13	1,05x10 ⁻⁵	0,0001
	PYCARD	10,03	4,23x10 ⁻⁸	4,66x10 ⁻⁷
HER2+ x HER2-				
	GSDMB	7,39	6,56x10 ⁻¹⁵	7,22x10 ⁻¹⁴

Abreviaturas: RE: receptor de estrogênio; RP: receptor de progesterona

9.4. Expressão diferencial dos genes do inflamassoma e da piroptose de acordo com os receptores hormonais e HER2

A expressão dos genes do inflamassoma e da piroptose não esteve associada com os parâmetros clínico-patológicos avaliados nos tumores luminais e HER2 ($\log FC \leq -1,0$ e/ou $\log FC \geq 1,0$) (Anexo 2).

Nos tumores TN, a expressão do gene *GSDME (DFNA5)* foi maior em mulheres com estadiamento T3 e T4 ($p=5,11 \times 10^{-6}$), em comparação aos grupos T1 e T2. Os dados de expressão dos genes do inflamassoma e da piroptose não foram associados com as demais variáveis clínico-patológicas (Anexo 3).

O teste de correlação entre a expressão dos componentes do inflamassoma e da piroptose e do gene *BRCA1* não mostrou significância entre a expressão destes genes. Entretanto, vale salientar, que apesar de não significativa ($\log FC=8$; $p=0,12$), o gene *ASC (PYCARD)* apresentou uma expressão maior nos grupos de tumores mutados em *BRCA1*, em comparação aos selvagens (Anexo 3).

9.5 Correlação entre a expressão dos genes do inflamassoma e da piroptose com o infiltrado inflamatório

O infiltrado de células imunes em tumores sólidos é composto de células do sistema imune inato e adaptativo, que incluem células dendríticas, mastócitos, células *natural killer* (NK), neutrófilos, eosinófilos, linfócitos T, linfócitos B e macrófagos, que podem estar localizados no centro do tumor, no *front* invasivo ou em estruturas linfóides terciárias (FRIDMAN et al., 2013; ZHU et al., 2017).

Outros componentes importantes da resposta imune tumoral são as células que promovem a inflamação crônica, em especial os TAMs, que liberam uma ampla variedade de citocinas [fator de necrose tumoral (TNF)- α e IL-1], quimiocinas (CCL2, CXCL8), fatores angiogênicos e radicais livres derivados de oxigênio e nitrogênio, que se acumulam no MAT (COLOTTA et al., 2009).

Desta forma, decidimos correlacionar a expressão por RNA-seq dos genes do inflamassoma e da piroptose com estimativas do nível e proporção do infiltrado imune, através da plataforma CIBERSORT nos subtipos moleculares do câncer de mama.

Foi observado que nos subtipos luminais, a expressão do gene *NLRP3* apresentou uma correlação positiva com macrófagos M2. Os genes da família das gasderminas, por sua vez, apresentaram índices de correlação menores que 0,5 com todas as células imunes (Figura 10).

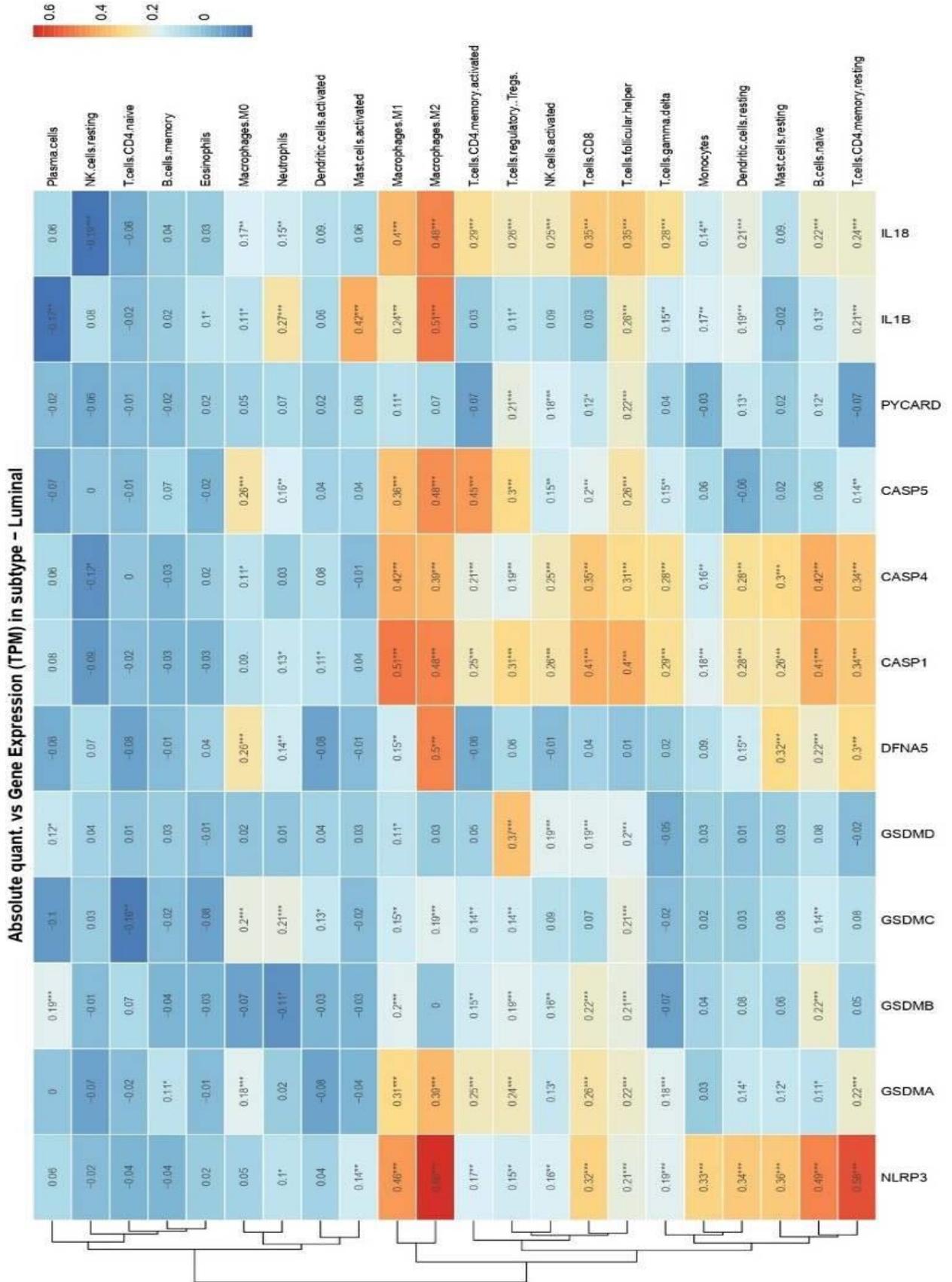


Figura 1. Análise de correlação entre as estimativas da quantidade relativa de células do infiltrado imune da plataforma CIBERSORT e a expressão dos genes do inflamassoma e da piroptose nos subtipos luminiais. A análise de correlação está apresentada em forma de *heatmap*, cujas cores quentes referem-se a correlações positivas e cores frias às correlações negativas.

Nos tumores TN, o gene *NLRP3* também correlacionou-se com macrófagos-M2. Além disso, observou-se também uma correlação do gene *IL-1β* com presença de mastócitos (Figura 14).

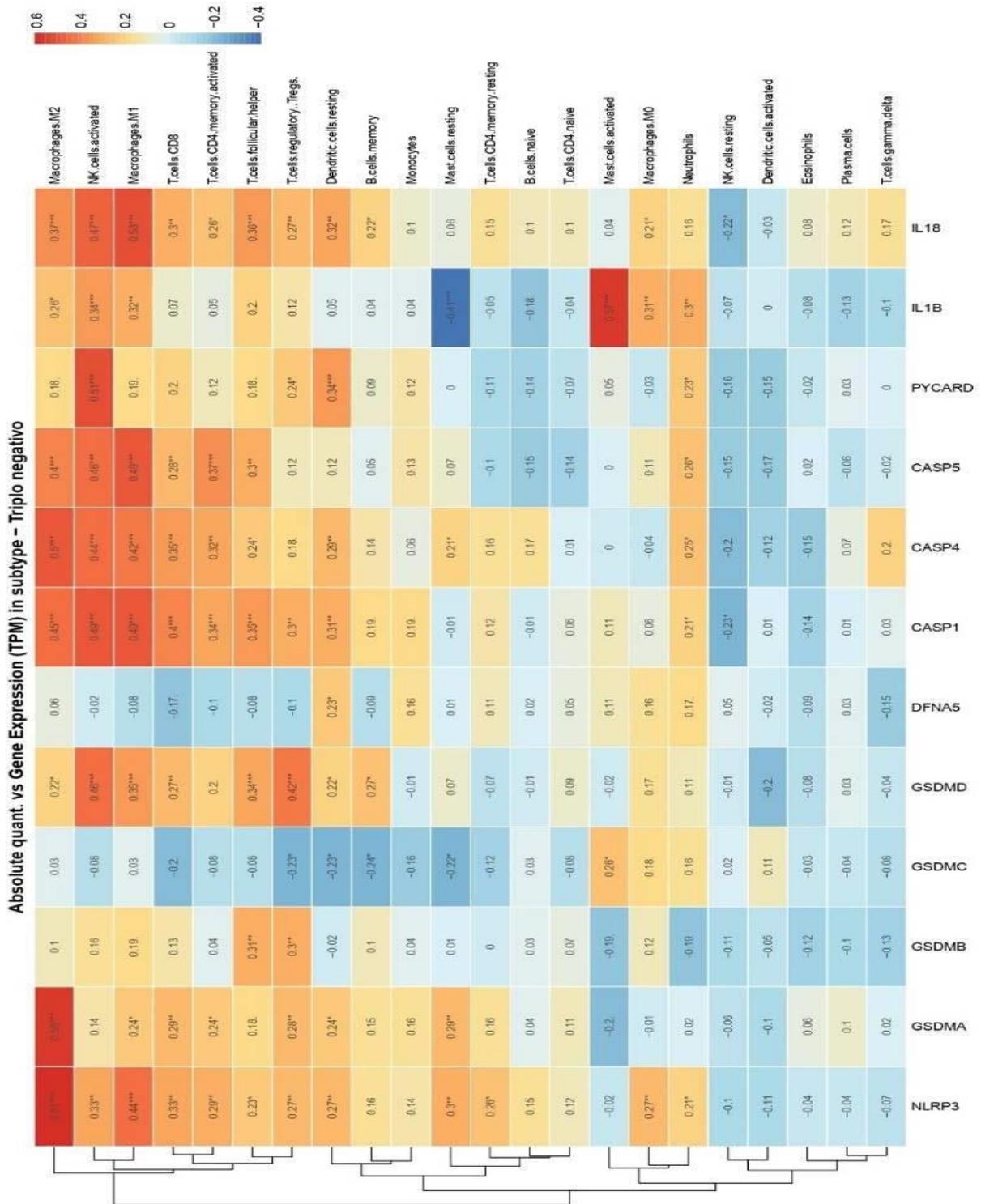


Figura 2. Análise de correlação entre as estimativas da quantidade relativa de células do infiltrado imune da plataforma CIBERSORT e a expressão dos genes do inflamassoma e da piroptose no subtipo triplo-negativo. A análise de correlação está apresentada em forma de *heatmap*, cujas cores quentes referem-se a correlações positivas e cores frias às correlações negativas.

Nos tumores HER2+, as análises mostraram que o gene *NLRP3* apresentou índices de correlação de 0,83 e 0,81 para macrófagos com fenótipos M2 e M1, respectivamente. A expressão dos genes *CASP1*, *CASP4* e *CASP5* correlacionou-se com enriquecimento por macrófagos – M1. Além disso, a expressão dos genes das *IL-1β* e *IL-18* foram relacionadas com a presença de macrófagos – M1 (Figura 15).

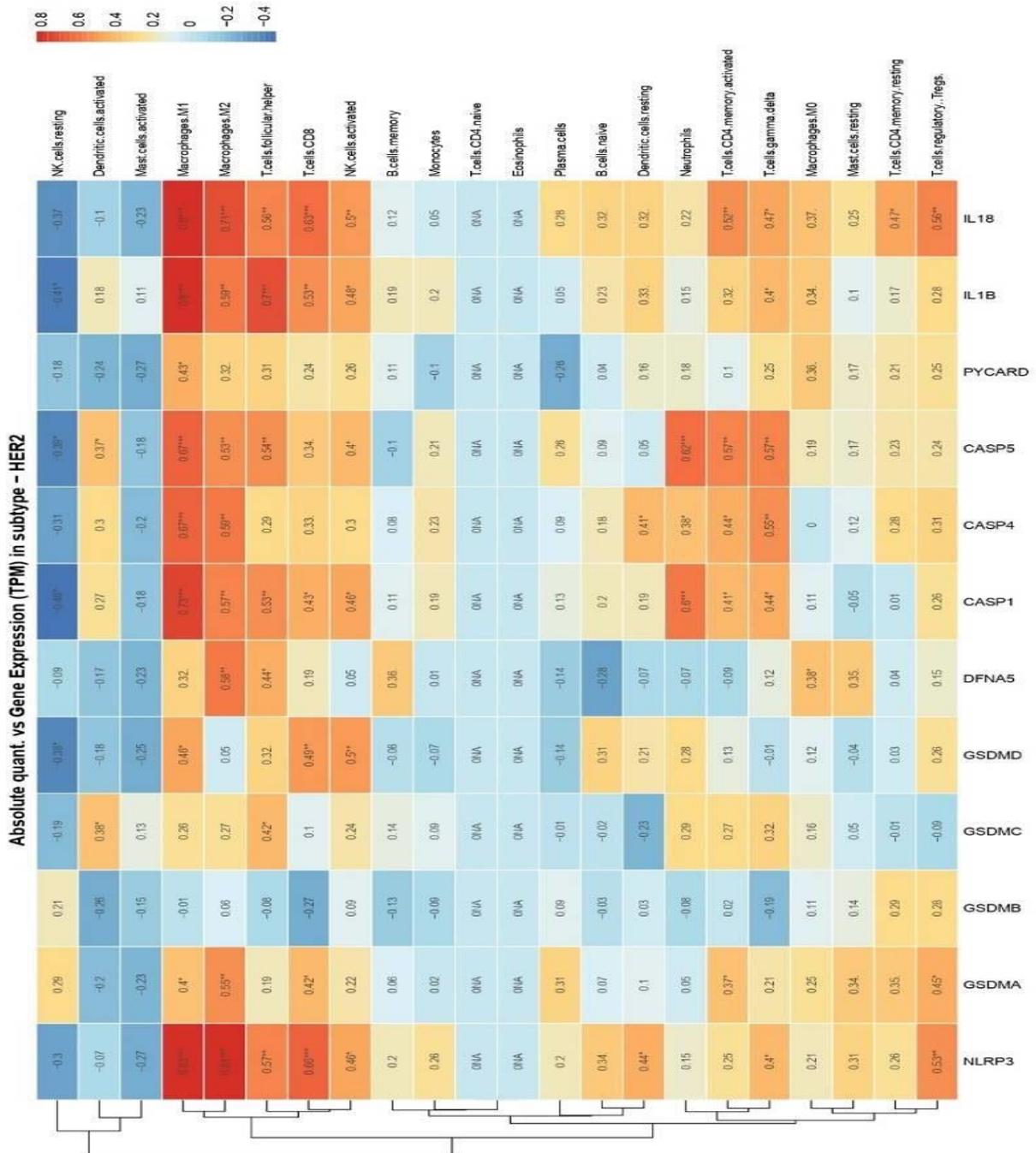


Figura 3. Análise de correlação entre as estimativas da quantidade relativa de células do infiltrado imune da plataforma CIBERSORT e a expressão dos genes do inflamassoma e da piroptose no subtipo HER2+. A análise de correlação está apresentada em forma de *heatmap*, cujas cores quentes referem-se a correlações positivas e cores frias às correlações negativas.

10 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E HISTOPATOLÓGICAS DA COORTE DE PACIENTES COM CMTN COM E SEM MUTAÇÃO DO GENE BRCA1

Foram incluídas na análise 88 pacientes com CMTN. A média de idade foi de 47,5 anos, sendo que a idade mínima foi de 29 anos e a máxima de 83 anos. O tipo histológico mais encontrado foi o carcinoma ductal invasivo (CDI) que ocorreu em 66 (75%) pacientes, seguido do carcinoma lobular invasivo (CLI) em quatro (4,5%) (Tabela 5).

Em relação ao IMC, 82,4% das mulheres apresentavam-se com índices normais (18,5-25 kg/m²), de acordo com a classificação da OMS. Considerada quando o IMC é igual ou superior a 30 kg/m², 15 (37,6%) pacientes encontravam-se em condições de obesidade.

Grande parte dos tumores testados para mutações no gene *BRCA1* foi classificada como selvagem (58 casos), 14 pacientes (15,9%) eram portadoras de tumores com mutações patogênicas, 12 com hipermetilação do promotor do gene, e, em apenas quatro (4,5%) foi constatada VUS.

A hipermetilação de *BRCA1* é um evento precoce no desenvolvimento tumoral e a progressão prossegue ao longo das vias comuns com casos de mutação na linha germinativa. Além disso, a hipermetilação do gene *BRCA1* confere um fenótipo tumoral praticamente idêntico à mutação germinativa (CATTEAU; MORRIS, 2002; KOBAYASHI et al., 2013). Sendo assim, dois grupos foram estabelecidos neste estudo: hipermetiladas e mutação *BRCA1*, VUS e selvagens.

Dentre as amostras com mutação patogênica ou hipermetiladas avaliadas, observou-se presença de comprometimento axilar em nove casos (34,6%). A maioria das pacientes apresentou tumores com grau histológico 3 (92,3%). Dentre as mulheres com história familiar informativa, 11 (42,3%) das amostras com hipermetilação ou com mutação no gene *BRCA1* declararam história familiar positiva para câncer de mama (p=0,001).

No que se refere a dados do tumor, 51 (82,3%) das pacientes sem mutação apresentavam grau histológico 3. No mesmo grupo, observou-se ausência de comprometimento axilar em 26 (41,9%) casos, resultando em diferença estatisticamente significativa (p=0,04). Quando analisado o tamanho tumoral, 58,1% tinham tumores entre 2 e 5 cm.

Quanto à expressão dos marcadores do inflamassoma, as proteínas NLRP3 e IL-18 apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos com hipermetilação ou mutação patogênica de *BRCA1* e selvagem. Não houve diferenças entre os grupos para PYCARD ($p=0,49$) e para caspase-1 ($p=0,98$).

Com relação à recorrência, 26 desenvolveram metástases, onde 19 (30,6%) pertenciam ao grupo selvagem e 07 (26,9%) ao grupo mutado ($p=0,73$).

Tabela 5. Caracterização clínico-demográfica das pacientes com CMTN de acordo com a presença de alteração (mutação ou hipermetilação) no gene *BRCA1*.

Variáveis	Selvagem+VUS n=62	Hipermetilada + Mutação n=26
Idade (anos)		
≤40	11 (17,7%)	09 (34,6%)
41 a 69	44 (71%)	15 (57,7%)
≥70	07 (11,3%)	02 (7,7%)
p		0,22
IMC		
18,5-25 Kg/m ²	32 (51,6%)	08 (30,8%)
25-30 Kg/m ²	21 (33,9%)	12 (46,2%)
>30 Kg/m ²	09 (14,5%)	06 (23,1%)
p		0,19
Tipo histológico		
CDI	45 (72,6%)	21 (80,8%)
CLI	03 (4,8%)	01 (3,8%)
Outros	14 (22,6%)	04 (15,4%)
p		0,82
GH		
1 + 2	11 (17,7%)	02 (7,7%)
3	51 (82,3%)	24 (92,3%)
p		0,33
Comprometimento linfonodal		
Negativo	26 (41,9%)	17 (65,4%)
Positivo	36 (58,1%)	09 (34,6%)
p		0,04
Tamanho tumoral		
≤2 cm	15 (24,2%)	08 (30,8%)
2-5 cm	36 (58,1%)	12 (46,2%)
>5 cm	11 (17,7%)	06 (23,1%)
p		0,59
História familiar		
Negativa	55 (88,7%)	15 (57,7%)
Positiva	07 (11,3%)	11 (42,3%)
p		0,001

Cont.

Variáveis	Selvagem+VUS n=62	Hipermetilada + Mutação n=26
Recorrência		
Negativa	43 (69,4%)	19 (73,1%)
Positiva	19 (30,6%)	07 (26,9%)
p		0,73
NLRP3 - expressão		
Menor	32 (52,5%)	07 (26,9%)
Maior	29 (47,5%)	19 (73,1%)
p		0,03
PYCARD – expressão		
Menor	21 (34,4%)	07 (26,9%)
Maior	40 (65,6%)	19 (73,1%)
p		0,49
IL-18 – expressão		
Menor	25 (41%)	05 (19,2%)
Maior	36 (59%)	21 (80,8%)
p		0,05
CASP1 – expressão		
Menor	26 (42,6%)	11 (42,3%)
Maior	35 (57,4%)	15 (57,7%)
p		0,98

Abreviaturas: CDI: carcinoma ductal invasor; CLI: carcinoma lobular invasivo; GH: grau histológico; IMC: índice de massa corporal;

10.1 Avaliação imuno-histoquímica das proteínas NLRP3, PYCARD (ASC), IL-18 e caspase-1 em tumores triplo-negativos com e sem mutação do gene BRCA-1

Cerca de 10 a 30,8% de mulheres diagnosticadas com CMTN apresentam mutações em *BRCA1* ou *BRCA2* (GREENUP et al., 2013; SHARMA et al., 2014). Desta forma, avaliamos por imuno-histoquímica a expressão dos marcadores NLRP3, caspase-1, PYCARD (ASC) e IL-18 em blocos de tumores TN de pacientes com e sem mutação patogênica no gene *BRCA1*.

Nas figuras a seguir estão as fotomicrografias das lâminas para cada proteína, expressas em tecido de CMTN.

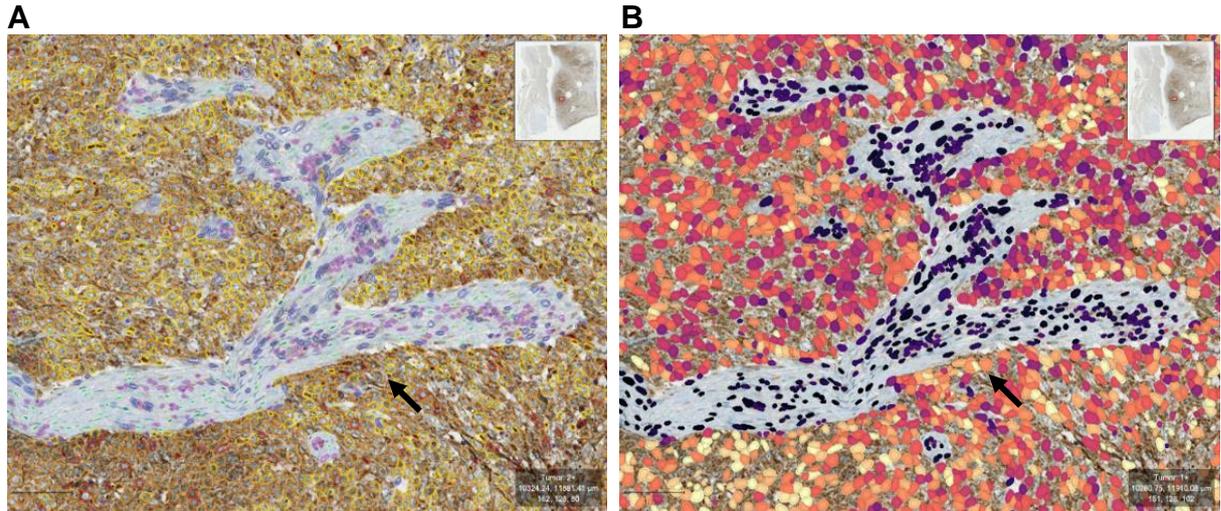


Figura 4. Análise de imunomarcção de NLRP3.

A: captura de tela de área tumoral e estroma intratumoral demonstrando marcação imunohistoquímica positiva para NLRP3 no tumor e negativa no estroma; discreto infiltrado imune. **B:** mapa de densidade de medidas demonstrando gradações maiores de intensidade de densidade óptica para marcação com DAB na área tumoral.

Células tumorais: demarcadas em amarelo; estroma intratumoral: demarcado em verde; linfócitos tumorais infiltrantes estromais: demarcados em violeta. Mapa de densidade: gradiente entre 0,0 (preto), 0,2 (violeta), 0,4 (laranja) e 0,6 (amarelo). Aumento aproximado: 10x. Coloração: H-DAB (DAB: 3,3'-diaminobenzidino, contracorado com hematoxilina).

O padrão de expressão imuno-histoquímico da proteína PYCARD (ASC) está representado na figura 17.

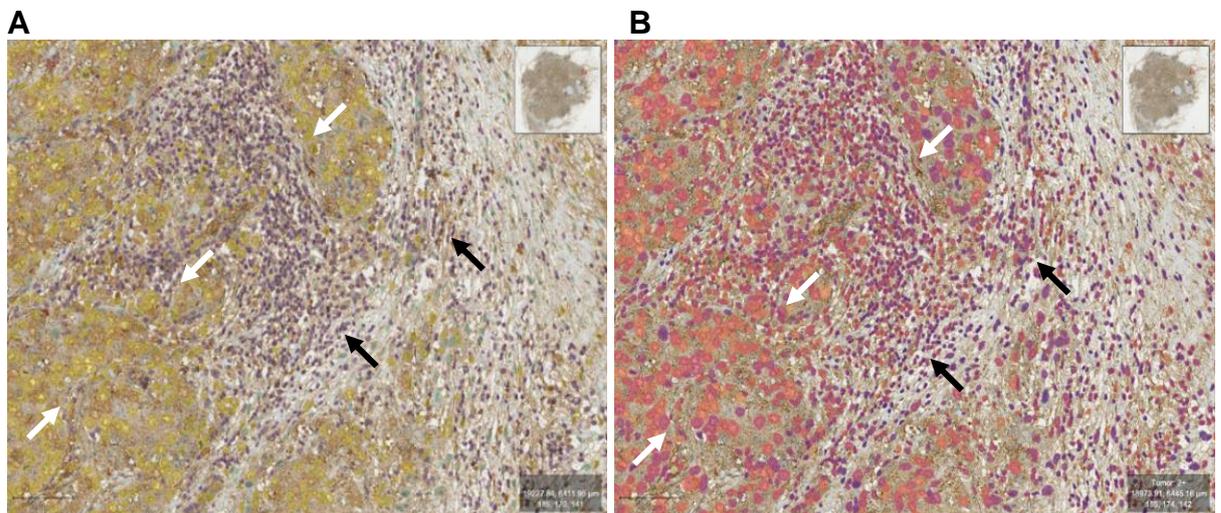


Figura 5. Análise de imunomarcção de PYCARD.

A: captura de tela de área tumoral e estroma intratumoral demonstrando marcação imunohistoquímica positiva para ASC/PYCARD, mais intensa no tumor e menos intensa no estroma, com infiltrado imune acentuado associado. **B:** mapa de densidade de medidas demonstrando gradações maiores de intensidade de densidade óptica para marcação com DAB na nas células tumorais e nos linfócitos tumorais infiltrantes.

Células tumorais: demarcadas em amarelo; estroma intratumoral: demarcado em verde; linfócitos tumorais infiltrantes estromais: demarcados em violeta. Mapa de densidade: gradiente entre 0,0 (preto), 0,2 (violeta), 0,4 (laranja) e 0,6 (amarelo). Aumento aproximado: 10x. Coloração: H-DAB (DAB: 3,3'-diaminobenzidino, contracorado com hematoxilina).

A figura 18 apresenta microfotografias representativas da expressão de caspase-1 no tumor, estroma e infiltrado inflamatório.

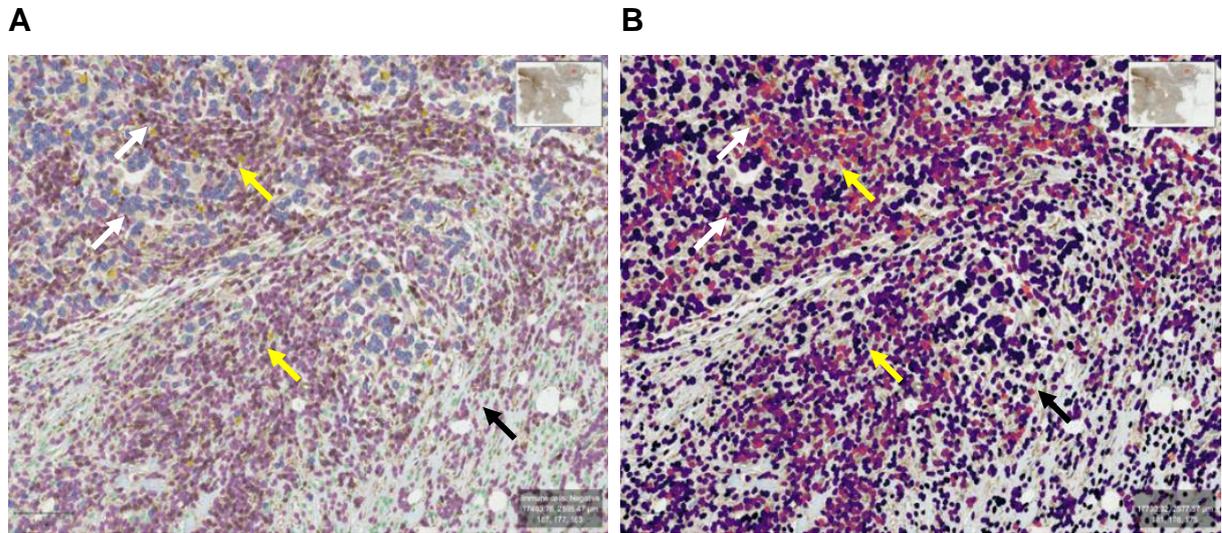


Figura 6. Análise de imunomarcção da caspase-1.

A: captura de tela de área tumoral e estroma intratumoral demonstrando marcação imuno-histoquímica positiva para caspase-1, mais intensa nas células imunes e menos intensa no tumor e no estroma, com infiltrado imune acentuado associado. **B:** mapa de densidade de medidas demonstrando gradações discretamente maiores de intensidade de densidade óptica para marcação com DAB na área de linfócitos tumorais infiltrantes estromais. Células tumorais: demarcadas em amarelo; estroma intratumoral: demarcado em verde; linfócitos tumorais infiltrantes estromais: demarcados em violeta. Mapa de densidade: gradiente entre 0,0 (preto), 0,2 (violeta), 0,4 (laranja) e 0,6 (amarelo). Aumento aproximado: 10x. Coloração: H-DAB (DAB: 3,3'-diaminobenzidino, contracorado com hematoxilina).

Não se observou expressão significativa de IL-18 em nenhum dos compartimentos avaliados como visto na figura 19.

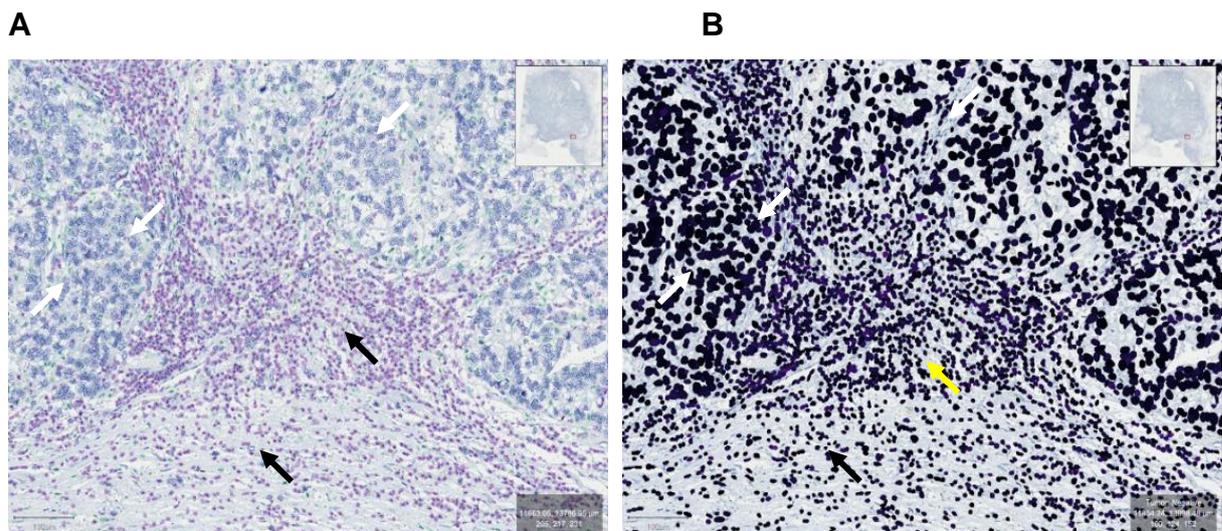


Figura 7. Análise de imunomarcção da IL-18.

A: captura de tela de área tumoral e estroma intratumoral demonstrando marcação imuno-histoquímica negativa para IL-18 em todas as classes de células analisadas. **B:** mapa de densidade de medidas demonstrando gradações de intensidade de densidade óptica para marcação com DAB na área tumoral abaixo do limiar considerado positivo.

Células tumorais: demarcadas em azul; estroma intratumoral: demarcado em verde; linfócitos tumorais infiltrantes estromais: demarcados em violeta. Mapa de densidade: gradiente entre 0,0 (preto), 0,2 (violeta), 0,4 (laranja) e 0,6 (amarelo). Aumento aproximado: 10x. Coloração: H-DAB (DAB: 3,3'-diaminobenzidino, contracorado com hematoxilina).

10.2 Associação entre a expressão dos marcadores e as características clínico-patológicas

Não houve associação significativa entre a expressão dos marcadores do inflamassoma (NLRP3, PYCARD) e as variáveis idade, IMC, tipo histológico, grau histológico e mutação/hipermetilação no gene *BRCA1* (Tabela 6).

Observou-se associação estatisticamente significativa entre menor expressão de caspase-1 e tamanho tumoral entre 2 e 5 cm ($p=0,005$).

Tabela 6. Associação entre a expressão dos marcadores do inflamassoma e as características clínico-patológicas

Variáveis	NLRP3 - expressão		CASP1- expressão		IL-18-expressão		PYCARD-expressão	
	Menor	Maior	Menor	Maior	Menor	Maior	Menor	Maior
Idade								
≤40	6	12	13	5	5	10	11	3
40 - 50	21	29	40	9	15	22	30	5
>50	3	6	6	1	3	5	6	1
<i>p</i>	0,78		0,66		0,93		0,86	
IMC								
18.5- 25	13	25	24	5	8	20	23	4
25 - 30	13	15	24	8	10	13	19	3
>30	4	7	11	2	5	4	5	2
<i>p</i>	0,62		0,74		0,3		0,69	
História familiar								
Ausente	25	38	46	14	19	30	40	5
Presente	5	9	13	1	4	7	7	4
<i>p</i>	0,78		0,27		1		0,06	
Tamanho tumoral								
≤2 cm	4	18	17	3	5	11	14	2
2-5 cm	20	22	34	4	14	20	26	5
>5 cm	6	7	8	8	4	6	7	2
<i>p</i>	0,06		0,005		0,82		0,78	
Tipo histológico								
CDI	24	32	42	14	16	27	35	6
CLI	1	3	3	1	0	2	2	0
Outros	0	6	5	0	2	3	2	1
<i>p</i>	0,09		0,68		0,83		0,58	

Cont.

Variáveis	NLRP3 - expressão		CASP1- expressão		IL-18-expressão		PYCARD-expressão	
	Menor	Maior	Menor	Maior	Menor	Maior	Menor	Maior
GH								
I e II	4	7	8	4	2	6	8	1
III	26	40	51	11	21	31	39	8
<i>p</i>	1		0,25		0,7		1	
Comprometimento linfonodal								
Negativo	8	29	31	6	10	19	21	5
Positivo	22	17	28	9	13	18	26	4
<i>p</i>	0,003		0,39		0,55		0,72	
Mutação BRCA1								
Ausente	28	39	48	14	20	33	43	6
Presente	2	8	11	1	3	4	4	3
<i>p</i>	0,3		0,44		1		0,07	

Abreviaturas: CDI: carcinoma ductal infiltrante; CLI: carcinoma lobular invasivo; GH: grau histológico; IMC: índice de massa corporal.

O comprometimento linfonodal foi associado à maior expressão de NLRP3 ($p=0,003$). Identificou-se uma associação limítrofe do ponto de vista estatístico, entre a expressão de NLRP3 e tumores com tamanho entre 2 e 5 cm ($p=0,06$).

Não houve associação estatisticamente significativa entre a expressão dos componentes do inflamassoma e a presença de mutação ou hipermetilação do gene *BRCA1*. Entretanto, apesar de não ser significativa, a proteína *PYCARD* apresentou uma discreta associação com tumores com mutação/hipermetilação no gene *BRCA1* ($p=0,07$) e com história familiar para câncer de mama ($p=0,06$). Não existem dados na literatura relacionando a expressão de *PYCARD* e mutação patogênica no gene *BRCA1* em CMTN até o momento.

10.3 Correlação entre os marcadores do inflamassoma e da piroptose

A fim de avaliar se havia uma correlação entre os anticorpos expressos nas pacientes, foi realizada regressão linear múltipla entre os marcadores, para o grupo mutado e não mutado (Tabela 7).

Foram construídos dois modelos de regressão em cada um dos grupos (com mutação e sem mutação). Para o grupo com mutação, o modelo com a variável “expressão de *PYCARD*” mostrou-se melhor ajustado, sendo que o valor do

coeficiente de determinação foi $R^2 = 0,8$ (quanto mais próximo de 1, o modelo está melhor ajustado).

Os coeficientes apontaram para uma correlação baixa entre PYCARD e IL-18, mas significativa ($p=0,02$) e entre caspase-1 e IL-18; assim como entre NLRP3 e PYCARD; caspase-1 e PYCARD; e entre caspase-1 e NLRP3.

No grupo com mutação, foi constatada uma correlação forte entre PYCARD e IL-18 ($r=0,8$; $p=0,05$).

Tabela 7. Correlação entre os marcadores do inflamassoma dos pacientes com e sem mutação BRCA1

Grupo		IL-18 $r(p)^1$	PYCARD $r(p)^1$	NLRP3 $r(p)^1$	Caspase-1 $r(p)^1$
Geral	PYCARD	-0,3 (0,02)	-	0,12 (0,69)	-0,03 (0,99)
	NLRP3	0,16 (0,89)	0,12 (0,69)	-	0,07 (0,63)
	Caspase 1	-0,11 (0,6)	-0,03 (0,99)	0,07 (0,63)	-
Mutação	PYCARD	-0,8 (0,05)	-	-0,2 (0,35)	0,8 (0,14)
	NLRP3	0,4 (0,95)	-0,2 (0,35)	-	-0,4 (0,49)
	Caspase 1	-1 (0,8)	0,8 (0,14)	-0,4 (0,49)	-
Sem mutação	PYCARD	-0,24 (0,11)	-	0,12 (0,49)	-0,04 (0,46)
	NLRP3	0,11 (0,82)	0,12 (0,49)	-	0,18 (0,7)
	Caspase 1	-0,01 (0,34)	-0,04 (0,46)	0,18 (0,7)	-

¹ Coeficiente de correlação de Spearman.

Adicionalmente, foram realizadas análises inferenciais, a fim de verificar a associação entre os marcadores avaliados e a presença de mutação/hipermetilação do gene *BRCA1* (Tabela 8).

Tabela 8. Correlação entre a presença de mutação no gene BRCA1 em pacientes com CMTN e marcadores do inflamassoma e piroptose.

Marcadores	Coeficiente	Erro padrão	OR	IC (95%)		p
				Menor	Maior	
NLRP3	0,98	0,08	-0,02	NA	1,08	0,84
CASP1	0,22	1,02	-1,53	0,016	0,83	0,13
IL-18	35,3	3,56	3,56	$5,86 \times 10^4$	$5,43 \times 10^6$	0,51
PYCARD	1,14	0,08	0,13	0,1	1,39	0,09

Não se constatou correlação entre a expressão das proteínas avaliadas e a presença de mutação/hipermetilação no gene *BRCA1*. Embora tenha-se observado uma tendência de correlação com a expressão de PYCARD, a mesma não foi estatisticamente significativa, em decorrência do pequeno tamanho da amostra.

10.4 Correlação entre a presença de mutação/hipermetilação no gene *BRCA1* e características clínicas

Em relação às características clínicas e patológicas, o IMC e a história familiar positiva para câncer de mama foram correlacionadas com a presença de mutação patogênica no gene *BRCA1* (Tabela 9).

Tabela 9. Correlação entre a presença de mutação/hipermetilação no gene *BRCA1* e fatores de risco selecionados em pacientes com CMTN.

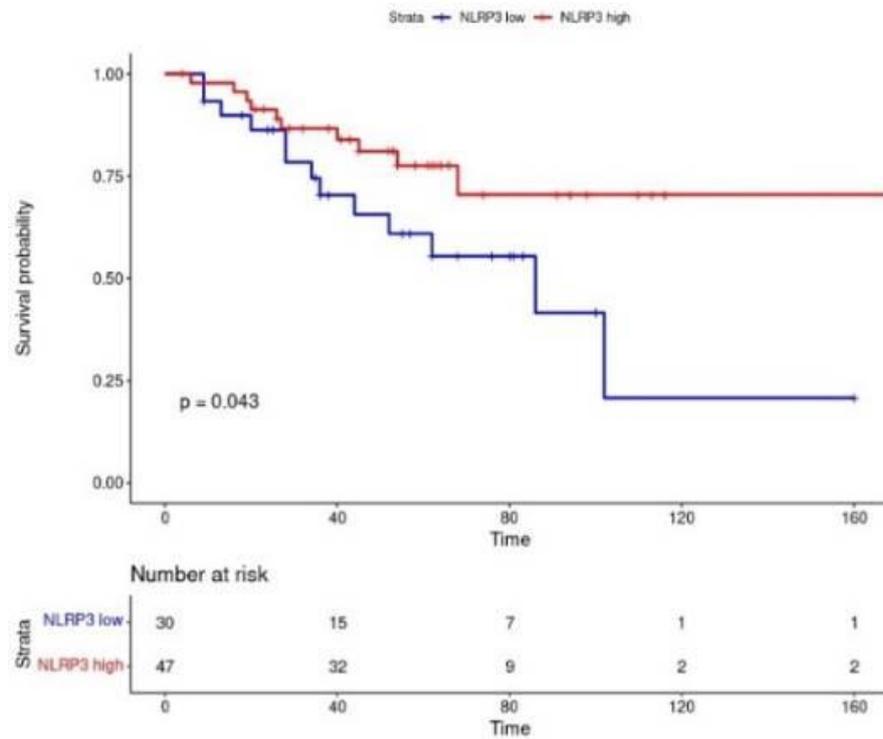
Variáveis	Coeficiente	Erro padrão	OR	CI (95%) OR		p
				Menor	Maior	
Idade						
≤40						
40-50	1,1	1,06	3,02	0,36	24,95	0,3
50>	-1,97	1,84	0,14	0,003	5,56	0,29
IMC (kg/m²)						
18,5-25						
25-30	2,05	1,01	7,74	1,03	58,1	0,04
≥30	1,93	1,17	6,86	0,66	71,15	0,01
Tipo histológico						
CDI						
CLI	-2,3	1,87	0,1	0,0024	4,21	0,22
Outros	-1,38	1,62	0,25	0,01	6,42	0,4
Grau histológico						
1+2						
3	-0,1	1,29	0,9	0,068	11,95	0,94
Tamanho tumoral (cm)						
≤2						
2-5	-0,41	0,94	0,66	0,1	4,34	0,66
5>	-0,84	1,13	0,43	0,05	4,09	0,45
Comprometimento linfonodal						
Ausente						
Presente	-0,98	0,83	0,37	0,07	1,98	0,24
História familiar						
Ausente						
Presente	3,49	0,92	32,64	5,22	204,04	0,0001

Abreviaturas: CDI: carcinoma ductal infiltrante; CLI: carcinoma lobular invasivo; GH: grau histológico; IMC: índice de massa corporal;

10.5 Análise de sobrevida em função da expressão de marcadores do inflamassoma

O seguimento médio foi de 132,9 meses. A maior expressão de NLRP3 na coorte de pacientes com CMTN foi associada à maior sobrevida global ($p=0,043$) e maior SLD ($p=0,0044$) conforme figura 20.

A



B

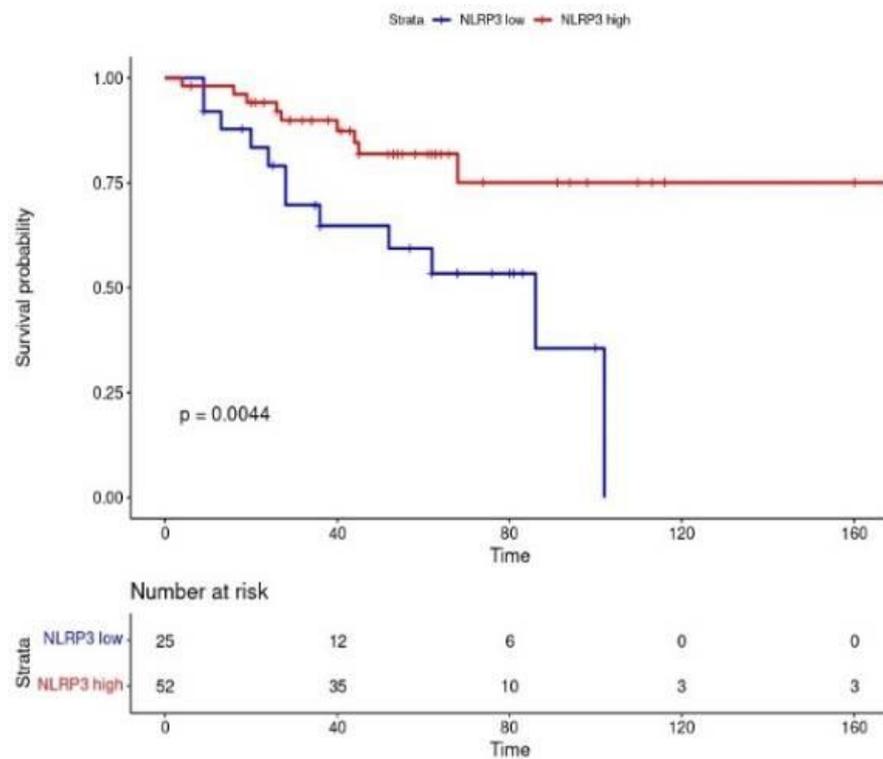
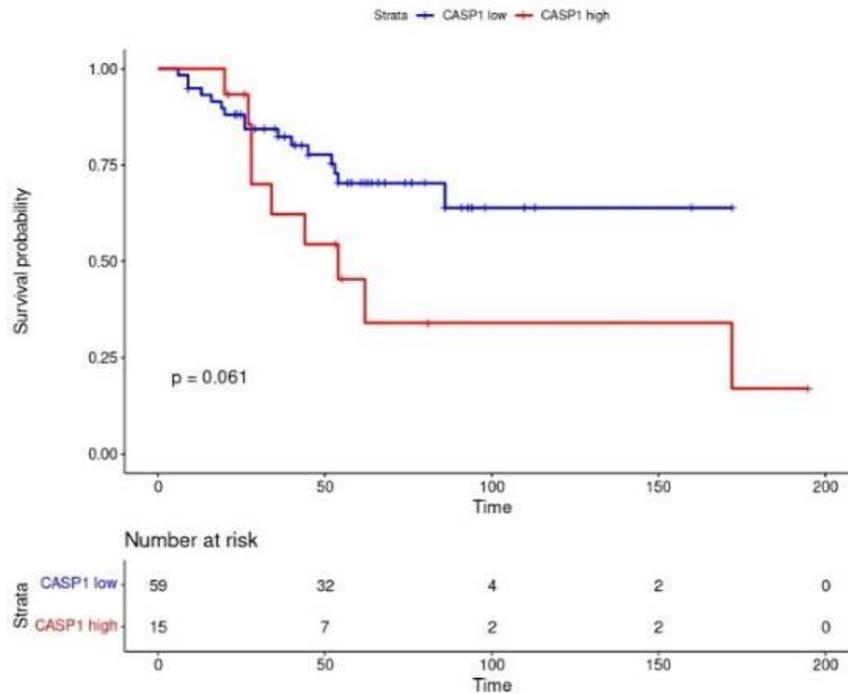


Figura 20. Sobrevida global em função da expressão de NLRP3 de 88 pacientes com tumores triplo-negativos.

A: Sobrevida global em função da expressão da CASP1. **B:** Sobrevida livre de doença em função da expressão da CASP1. As curvas foram construídas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste log-rank.

Níveis de expressão mais altos da caspase-1 foram associados com maior SLD ($p=0,016$). Para a SG não houve diferença estatisticamente significativa (Figura 21).

A



B

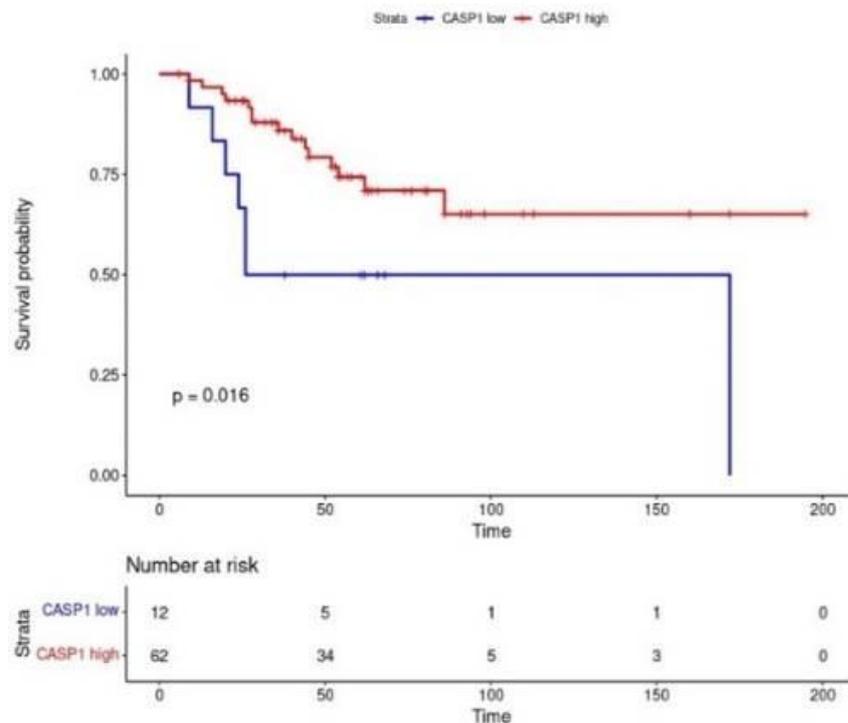


Figura 21. Sobrevida global, em função da expressão da caspase-1 de 88 pacientes com tumores triplo-negativos.

A: Sobrevida global em função da expressão da CASP1. **B:** Sobrevida livre de doença em função da expressão da CASP1. As curvas foram construídas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste log-rank.

A menor expressão de IL-18 foi associada à maior sobrevida global ($p=0,035$) (Figura 22).

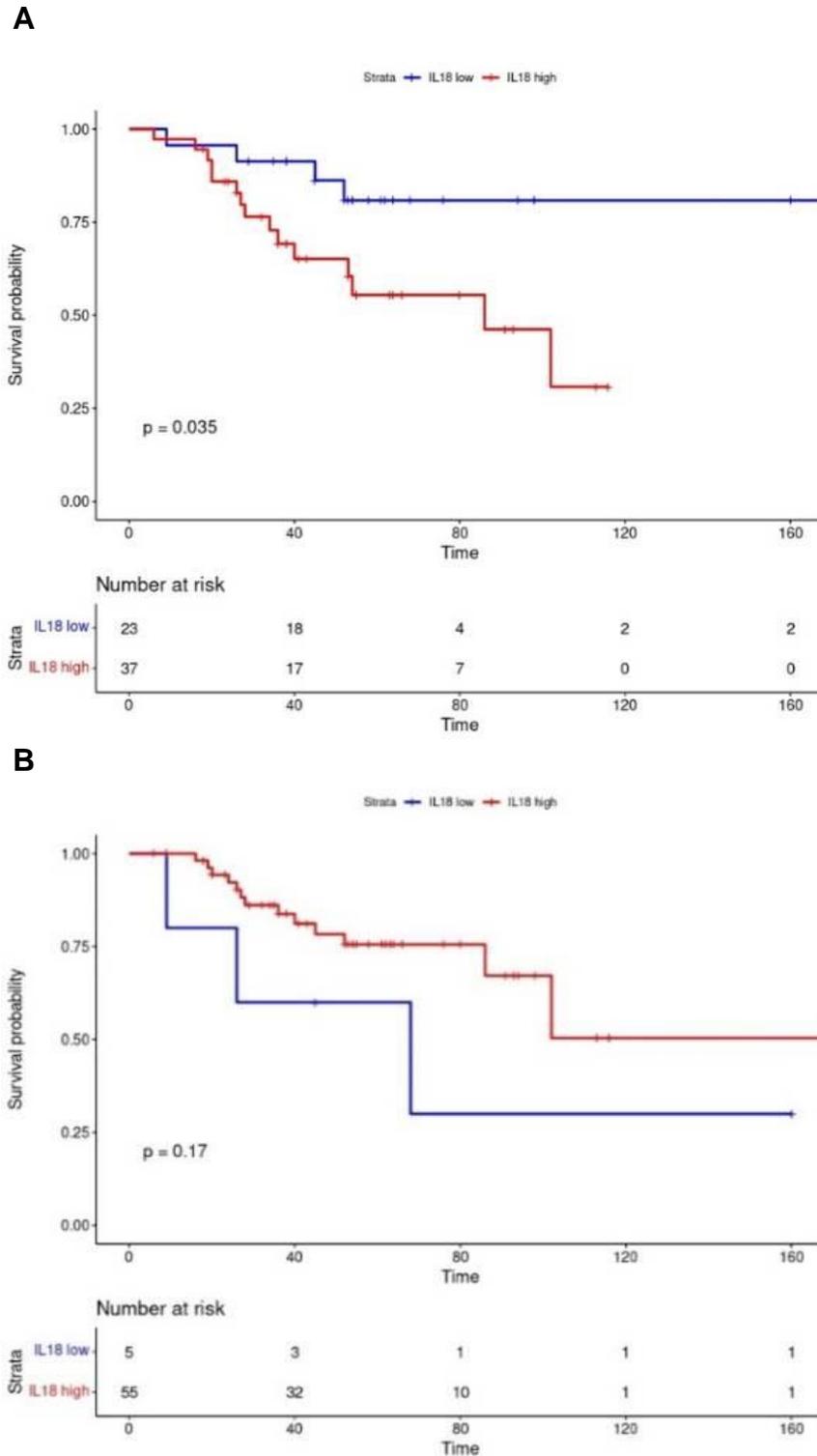


Figura 22. Sobrevida global em função da expressão da IL-18 de 88 pacientes com tumores triplo-negativos.

A: sobrevida global em função da expressão de IL-18. **B:** sobrevida livre de doença em função da expressão de IL-18. As curvas foram construídas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste log-rank.

Expressão de PYCARD não esteve associada com SLD ou SG ($p=0,14$; $p=0,12$, teste de log-rank) (Figura 23).

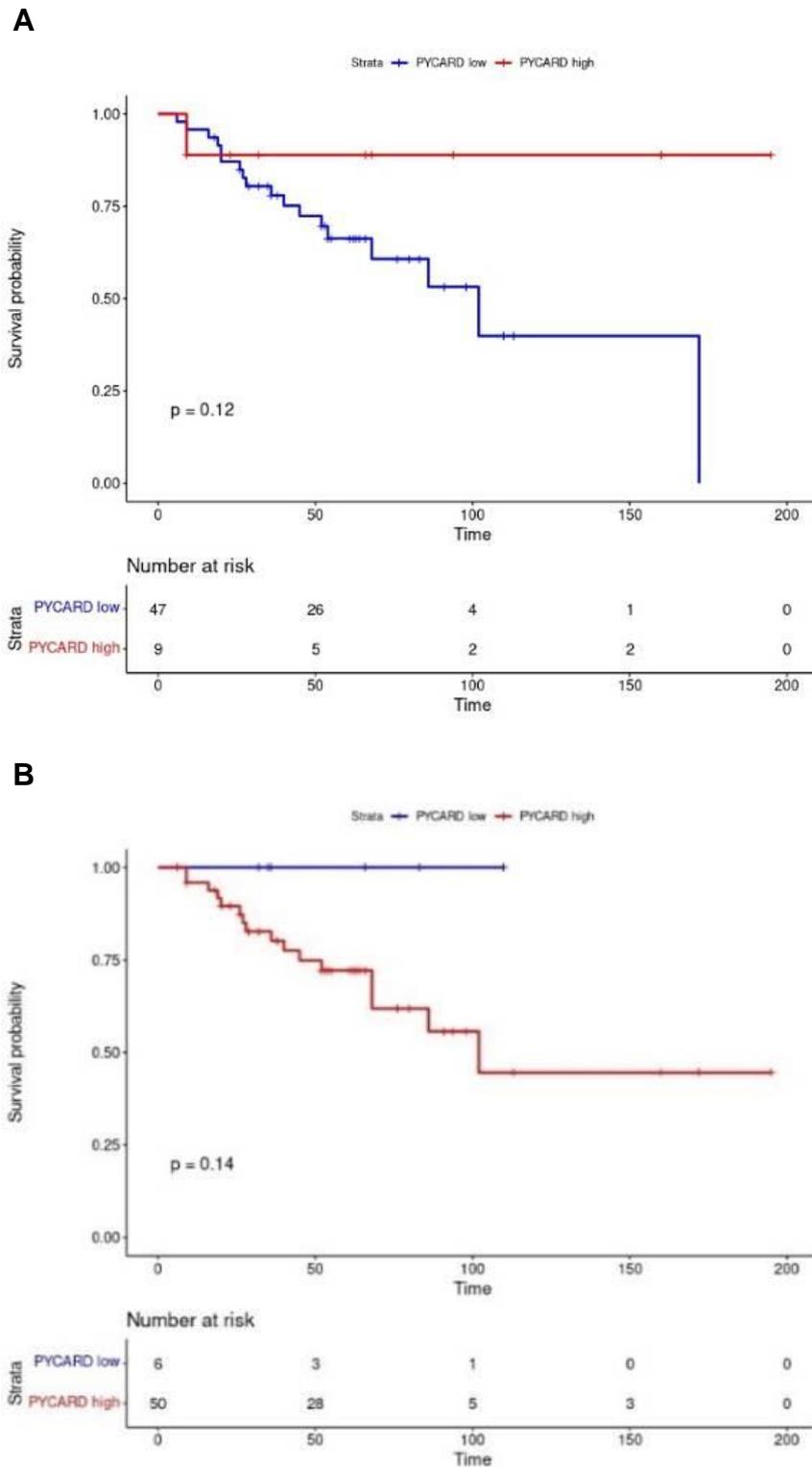


Figura 8. Sobrevida global em função da expressão de PYCARD de 88 pacientes com tumores triplo-negativos.

A: sobrevida global em função da expressão da proteína PYCARD. **B:** sobrevida livre de doença em função da expressão da proteína PYCARD. As curvas foram construídas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste log-rank.

10.5 Expressão dos marcadores do inflamassoma e prognóstico

No estudo dos fatores prognósticos relacionados à SG, as variáveis associadas à pior prognóstico na análise univariada foram: tamanho tumoral maior que 5,0cm (HR: 9,9; IC 95%: 3,16-30,9; $p < 0,001$), comprometimento linfonodal (HR: 2,7; IC95%: 1,2-6,1; $p = 0,018$) e IMC entre 25 e 30 kg/m^2 (HR: 2,6; IC 95%: 1,1-6; $p = 0,024$).

Foram observados maiores percentuais de óbito em pacientes com linfonodos comprometidos ($p = 0,009$) e tamanho tumoral maior que 5,0cm ($p = 0,002$).

Em relação aos marcadores do inflamassoma, pacientes com maior expressão de NLRP3 tiveram maior SLD (HR: 0,3; IC 95%: 0,13-0,72; $p = 0,007$) e SG (HR: 0,44; IC 95%: 0,10-0,99; $p = 0,049$), indicando um possível efeito protetor no prognóstico da doença. Em contrapartida, observou-se uma menor SLD em pacientes com alta expressão de caspase-1 (HR: 2,2; IC 95%: 0,95-5; $p = 0,06$) e menor SG para aquelas com maior expressão de IL-18 (HR: 3,1; IC 95%: 1-9,4; $p = 0,046$). Cabe destacar que a expressão de PYCARD (ASC) não se associou com o prognóstico (Tabela 10).

Tabela 10. Análise univariada das variáveis clínico-patológicas e das proteínas do inflamassoma e da piroptose

Características	SLD					SG				
	N. pts	N. eventos	Média SLD	HR (95% CI)	p	N. pts	N. eventos	Média SG	HR (95% CI)	p
Casuística	88	26	125,82	-	-	88	29	122,13	-	-
Idade										
≤40	20	6	109,18	ref	ref	20	7	104,32	ref	ref
40-50	59	18	128,55	0,83 (0,33-2,1)	0,7	59	19	127,41	0,75 (0,31-1,8)	0,524
>50	9	2	44,85	1,02 (0,2-5,2)	0,98	9	3	41,59	1,35 (0,34-5,3)	0,672
Tipo histológico										
CDI	66	22	123,15	ref	ref	66	25	117,76	ref	ref
CLI	4	1	56,67	0,79 (0,11-5,9)	0,82	4	1	56,67	0,65 (0,088-4,9)	0,677
Outros	7	2	69,57	1 (0,23-4,3)	0,99	7	1	80,5	0,43 (0,058-3,2)	0,411

Cont.

Características	SLD					SG				
	N. pts	N. eventos	Média SLD	HR (95% CI)	p	N. pts	N. eventos	Média SG	HR (95% CI)	p
Tamanho tumoral (cm)										
≤2	23	3	154,9	ref	ref	23	4	148,31	ref	ref
2-5	48	11	116,32	2.1 (0,57-7,4)	0,27	48	12	115,03	1,7 (0,55-5,3)	0,359
≥5	17	12	51,79	12 (3,31-43,3)	0,0002	17	13	47,13	9,9 (3,16-30,9)	<0,001
Comprometimento linfonodal										
Negativo	43	7	152,53	ref	ref	43	9	143,89	ref	ref
Positivo	45	19	92,25	3,4 (1,4-8,5)	0,009	45	20	91,37	2,7 (1,2-6,1)	0,018
IMC (kg/m²)										
18.5-25	40	9	128,92	Ref	ref	40	9	128,61	ref	ref
25-30	33	12	124,56	2.1 (0,87-5)	0,098	33	15	109,84	2,6 (1.1-6)	0,024
≥30	15	5	69,66	1,9 (0,62-5,7)	0,264	15	5	68,65	1,8 (0,6-5,5)	0,29
GH										
1+2	13	7	68,62	ref	ref	13	6	72,62	ref	ref
3	75	19	135,38	0,5 (0,21-1,2)	0,124	75	23	126,84	0,74 (0,3-1,8)	0,509
Mutação										
Ausente	74	22	108,78	ref	ref	74	26	103,93	ref	ref
Presente	14	4	146,77	0,57 (0,19-1,7)	0,321	14	3	159,62	0,36 (0,11-1,2)	0,105
NLRP3 – expressão										
Menor	25	12	65,72	ref	ref	30	13	81,13	ref	ref
Maior	52	10	139,1	0,3 (0,13-0,72)	0,007	47	11	132,9	0,44 (0,10-0,99)	0,049
CASP1- expressão										
Menor	12	7	96,08	ref	ref	59	16	124,53	ref	ref
Maior	62	15	142,76	0,34 (0,14-0,89)	0,021	15	9	88,23	2,2 (0,95-5)	0,066
IL18 – expressão										
Menor	5	3	75,4	ref	ref	23	5	145,66	ref	ref
Maior	55	13	118,77	0,42 (0,12-1,5)	0,182	37	15	73,59	3,1 (1-9,4)	0,046

Cont.

Características	SLD					SG				
	N. pts	N. eventos	Média SLD	HR (95% CI)	p	N. pts	N. eventos	Média SG	HR (95% CI)	p
PYCARD – expressão										
Menor	6	0	110	ref	ref	47	18	102,65	ref	ref
Maior	50	16	118,54	100> (0-inf)	1	9	1	174,33	0,22 (0,029-1,7)	0,15

Abreviaturas: CDI: carcinoma ductal invasivo; CLI: carcinoma lobular invasivo; GH: grau histológico; IMC: índice de massa corporal; SG: sobrevida global; SLD: sobrevida livre de doença

Na análise múltipla, tamanho tumoral maior que 5,0cm foi associado com pior SG (HR: 24,51; IC 95%: 3,82-157; $p < 0,001$). A maior expressão da IL-18 conferiu 4,6 vezes maior risco para óbito (HR: 4,6; IC 95%: 1,21-17,4; $p = 0,025$). Os demais marcadores não estiveram associados com prognóstico (Figura 24).

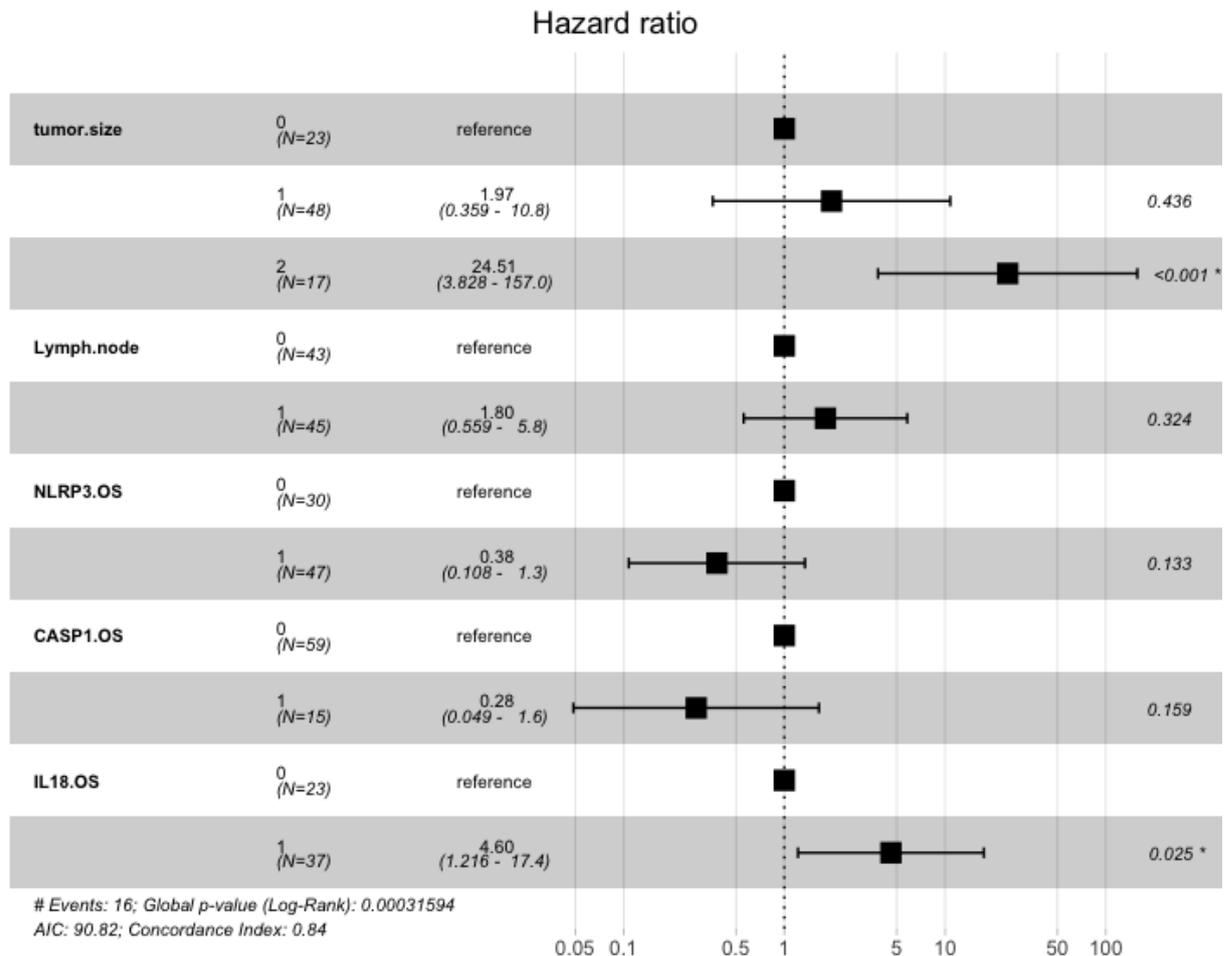


Figura 9. Forest-Plot demonstrando as HRs para sobrevida global associadas com as variáveis avaliadas no modelo multivariado de Cox com seus respectivos intervalos de confiança de 95% em 88 pacientes com CMTN.

10.6 Correlação entre a expressão dos marcadores do inflamassoma e da piroptose com o infiltrado imune

O infiltrado inflamatório linfocítico peritumoral foi caracterizado como leve/moderado na metade dos nossos casos. Já o infiltrado linfocítico intratumoral foi caracterizado como leve a moderado em 71,6% dos casos e em 10,4% como intenso.



Figura 10. Correlação entre a expressão dos marcadores do inflamassoma com o infiltrado imune.

Realizamos uma análise de correlação entre a média da densidade do TIL com a expressão dos marcadores do inflamassoma (Figura 25).

As análises demonstraram que a expressão de NLRP3 e PYCARD foram correlacionadas com uma intensa infiltração por linfócitos. Não houve correlação significativa entre os marcadores CASP1 e IL-18 com o TIL.

11. ASSOCIAÇÃO ENTRE CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS E IMC DE PACIENTES COM CMTN

Foram analisadas 16 mulheres submetidas a tratamento cirúrgico para câncer de mama no serviço de mastologia do Hospital AC Camargo Cancer Center. Nessas pacientes, foram verificados os dados clínicos e antropométricos, estratificadas em magras, cujo IMC é menor que 25 kg/m², sobrepeso e obesidade, classificado como IMC maior que 25 kg/m² (Tabela 11).

Quanto às características do tumor, no grupo com sobrepeso e obesidade, o tipo histológico mais frequente foi o CDI, e as pacientes apresentaram mais frequentemente tumores com grau histológico 3, estadiamento T2 e N0. A presença das CLS observada em cinco casos com obesidade.

Tabela 11. Características clínico-patológicas de pacientes com CMTN, estratificadas pelo IMC.

Características	Total	IMC	
		<25kg/m ²	>25 kg/m ²
Tipo histológico	16		
CDI	12	6	10
Outros	4	2	2
GH			
1+2	4	2	2
3	12	4	8
T			
1	10	4	6
2	6	2	4
3	0		
N			
0	13	3	10
1	1	1	
2	2	1	1
3	0		
Menopausa			
Sim	6	3	3
Não	10	4	6
Infiltrado inflamatório			
Sim	12	4	8
Não	4	2	2
Necrose			
Ausente	7	3	4
Presente	9	3	6
Inflamação			
Ausente	1	1	0
Presente	15	6	9
CLS (n/mm²)			
Ausente	11	11	0
Presente	5	0	5

Em decorrência do pequeno tamanho amostral, não se constatou associação entre a expressão dos marcadores NLRP3 e CASP1 com a obesidade e presença de CLS, bem como com características clínico-patológicas.

11.1 Avaliação histológica dos marcadores NLRP3, caspase-1 e estruturas em coroa (CLS) em tumores triplo-negativos

A presença de CLS no tecido adiposo reflete uma condição crônica de inflamação local, devido à liberação de diversos fatores pró-inflamatórios (SANTANDER et al., 2015). Esses fatores, por sua vez atuam na desregulação metabólica e inflamação crônica de baixo grau, contribuindo para o desenvolvimento de resistência à insulina, dislipidemia e estresse oxidativo (DENG et al., 2016). Essas condições podem estar associadas à progressão do câncer por meio da estimulação da proliferação celular, perda da integridade epitelial, angiogênese e migração celular (FARIA et al., 2020).

Foram elegíveis para esta análise 16 casos. Apenas seis casos apresentaram >25% das células imunomarcadas para CASP1 (Figura 26).

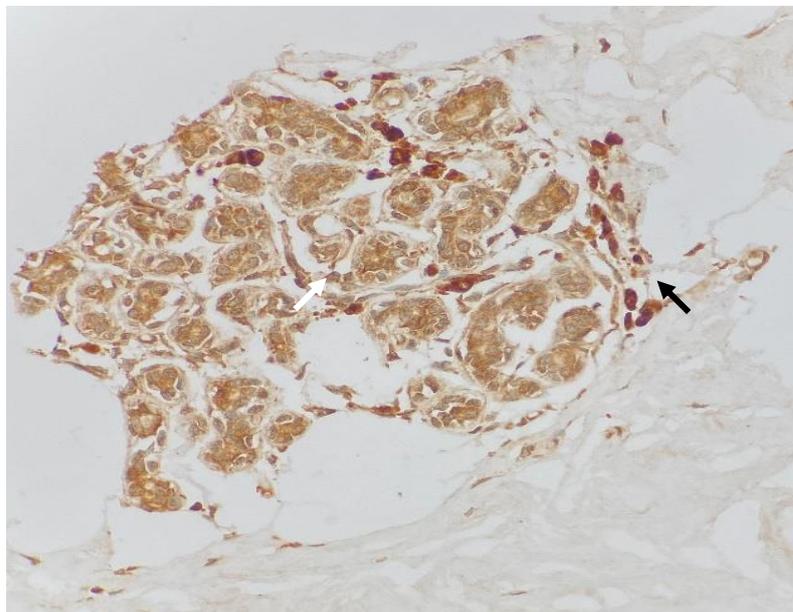


Figura 11. Expressão da CASP1 no tecido adiposo demonstrando marcação intensa nas células inflamatórias (controle positivo).

A imunoexpressão de NLRP3 foi observada em cinco casos. Onze casos caracterizaram-se por baixos níveis de expressão (<10% das células imunomarcadas) de NLRP3 (Figura 27).

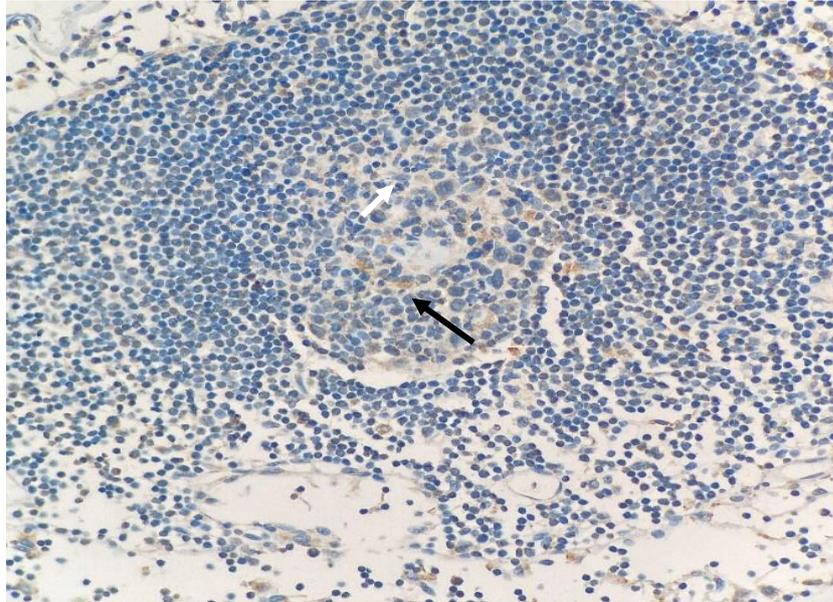


Figura 12. Expressão de NLRP3 demonstrando marcação em macrófagos e ausência de marcação nos linfócitos.

A presença de CLS foi quantificada pela expressão positiva de CD68 em cinco casos (Figura 28).

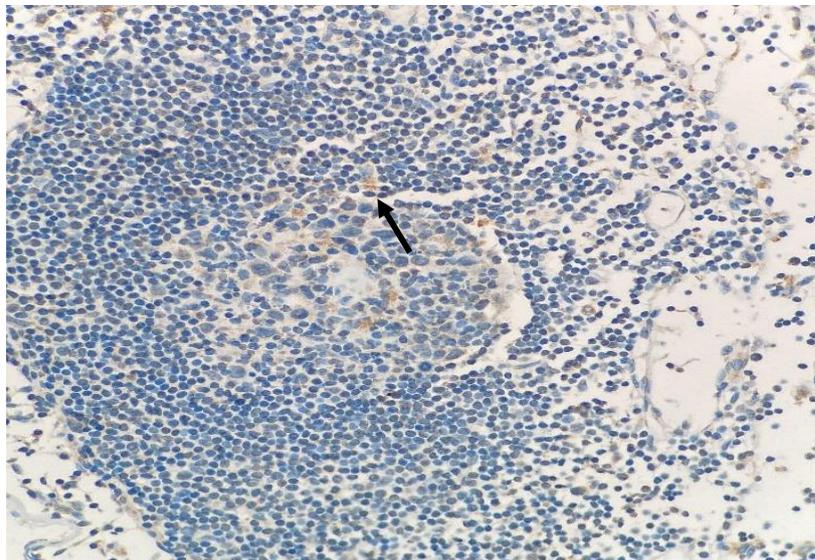


Figura 13. Marcação positiva de CD68 demonstrando CLS.

11.2 Expressão dos genes do inflamassoma em pacientes com câncer de mama e obesidade

A fim de verificar a associação entre a expressão dos marcadores do inflamassoma e pacientes com câncer de mama em condições de obesidade, expandimos nossas análises, utilizando dados de expressão gênica de 424 pacientes com câncer de mama depositados no repositório GEO, sob o código GSE46818 (Tabela 12).

Verificou-se que a maior parte das mulheres eram brancas e estavam com peso normal (32,5%). Mulheres da raça negra encontravam-se em condições de obesidade. A análise mostrou uma associação estatisticamente significativa entre raça negra e obesidade ($p=0,008$) (Tabela 12).

Não houve associação estatisticamente significativa entre subtipo molecular e IMC. Os subtipos luminais A e B corresponderam a 69,58% dos casos. No grupo luminal A, foi observado maior percentual de mulheres com obesidade (34%). No subtipo *basal-like*, 34 (34,3%) das pacientes foram classificadas com sobrepeso.

Tabela 12. Características clínico-patológicas de pacientes com câncer de mama, estratificadas pela obesidade

Variáveis	Total	Normal	Sobrepeso	Obesos	<i>p</i>
Raça	424	131	131	142	
Negra	96	22 (22,9%)	26 (27%)	46 (47,9%)	
Branca	304	99 (32,5%)	96 (31,5%)	93 (30,5%)	0,008
Outras	24	10 (41,6%)	9 (37,5%)	3 (12,5%)	
Estadiamento - T					
I+II	347	112 (32,2%)	107 (30,8%)	113(32,5%)	
III+IV	76	19 (25%)	24 (31,5%)	29 (38,1%)	0,435
Grau histológico					
1+2	244	83 (34%)	74 (30,3%)	72 (29,5%)	
3	178	4(26,4%)	57 (32%)	70(39,3)	0,09
Classificação PAM-50					
LUMA	226	68 (30,08%)	64 (28,07%)	77(34,07%)	
LUMB	43	17 (39,5%)	10 (23,2%)	12 (37,2%)	
HER2	50	15 (30%)	21 (42%)	12 (24%)	0,576
Basal-like	99	30 (30,3%)	34 (34,3%)	34 (34,4%)	
Normal-like	6	1 (16,6%)	2 (33,3%)	3 (50%)	
NLRP3-expressão					
Maior	106	32(30,1%)	33 (31,1%)	37(34,9%)	
Menor	106	36 (33,9%)	32 (30,1%)	35 (33,01%)	0,86

CASP1-expressão	212				
Maior	106	30 (28,3%)	28 (26,4%)	44 (41,5%)	
Menor	106	39 (36,7%)	33 (31,1%)	31 (29,2%)	0,147

Mulheres com obesidade apresentaram maior expressão do gene *CASP1*, enquanto o grupo com maior expressão de *NLRP3* tinha peso normal.

13. DISCUSSÃO

13.1 Expressão dos genes do inflamassoma em tecido tumoral vs tecido normal adjacente

A função dos componentes do inflamassoma no câncer e mais precisamente, nas patologias mamárias ainda não foi esclarecida, mas estudos apontam perfis diferenciais de expressão entre carcinomas mamários e áreas de tecido normal adjacente ao tumor.

Nossas análises revelaram que o gene *NLRP3* apresentou expressão relativa aumentada no tecido normal adjacente. Estes dados contrastam com a maioria dos estudos em que o gene *NLRP3* é mais expresso no tecido tumoral (ERSHAID et al., 2019; SAPONARO et al., 2021; XU et al., 2021). Coletivamente, estes resultados mostram que a expressão de *NLRP3* pode ser diferente com base em sua localização, sendo a nuclear ligada à transformação celular e câncer (HUANOSTA-MURILLO et al., 2021). A ação desta proteína também depende de qual resíduo proteico será fosforilado, já que sua atividade difere de acordo com a modificação conformacional, influenciando diretamente na função da proteína (MCKEE et al., 2021)

Constatamos que os genes *PYCARD (ASC)* e *IL-18* foram diferencialmente expressos nas amostras tumorais em relação aos seus respectivos controles. Foi demonstrado que a proteína ASC em conjunto com a IL-18 regula negativamente a ativação da via NF- κ B, independente da inflamação. Esse mecanismo, por sua vez aumenta a progressão tumoral (DESWAERTE et al., 2018). Vale ressaltar que há uma escassez de dados na literatura sobre o papel de *PYCARD (ASC)* em tecidos e células tumorais.

13.2 Expressão dos componentes do inflamassoma no CMTN com mutação no gene *BRCA1*

Mutações no gene *BRCA1* conferem um risco de 45 a 85% para câncer de mama com padrão imunohistoquímico triplo negativo (COUCH et al., 2015; CURTIS et al., 2012; MAVADDAT et al., 2013). O inflamassoma *NLRP3* desempenha um importante papel na carcinogênese, especialmente relacionada à regulação das

citocinas IL-1 β e IL-18, mas sua relação com a mutação no gene *BRCA1* ainda não foi estabelecida.

Neste estudo, os marcadores NLRP3 e IL-18 apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos com hipermetilação/mutação no gene *BRCA1* e selvagem/VUS. Em relação às características clínico-patológicas, a expressão de NLRP3 foi associada com comprometimento linfonodal. Saponaro et al., demonstraram em tumores TN correlação significativa entre a expressão de NLRP3 com tamanho tumoral, comprometimento linfonodal e grau histológico (SAPONARO et al., 2021).

Embora sem significância estatística, a proteína PYCARD apresentou uma discreta associação com mutação/hipermetilação no gene *BRCA1* e história familiar para câncer de mama. Ao promover a inflamação e a liberação da IL-1 β , a molécula adaptadora PYCARD (ASC) pode exercer atividades pró-tumorais, tais como angiogênese, invasão e metástase (MANTOVANI; BARAJON; GARLANDA, 2018).

A proteína PYCARD (ASC) atua tanto como uma plataforma molecular que suporta as interações proteína-proteína durante a montagem do inflamassoma (CAI et al., 2014; LU et al., 2014), quanto como uma ponte direta entre o sensor NLR e a molécula efetora da caspase-1. Estudos recentes revelaram, que a ASC pode ser encontrada no citoplasma, núcleo e mitocôndria (ZHOU; YAZDI; MENU, 2011). Para formar o inflamassoma, no retículo endoplasmático (RE), o transporte mediado por dineína altera a localização subcelular desses componentes, rearranjando-os espacialmente de forma a aproximar a mitocôndria do RE, para permitir a justaposição de ASC e NLRP3 (HONG et al., 2013).

Nesse contexto, foi demonstrado que o silenciamento de *BRCA1* ativa o inflamassoma NLRP3, produz EROS e altera a rede mitocondrial, promovendo a proliferação de células tumorais (CHEN et al., 2020). Juntos, estes resultados sugerem que esse mecanismo potencializa a inflamação, de forma a amplificar e perpetuar a magnitude da resposta do inflamassoma. Adicionalmente, estudos com uma coorte maior de pacientes, bem como a realização de mais experimentos são necessários para avaliar a relação entre a proteína PYCARD (ASC) com a mutação no gene *BRCA1*.

A história familiar para câncer de mama e IMC>25kg/m² estiveram associados com mutação/hipermetilação no gene *BRCA1*. Foi demonstrado que a obesidade na pré-menopausa é relacionada ao câncer de mama hereditário, principalmente em

portadores da mutação nos genes *BRCA1/BRCA2* (MANDERS et al., 2011; SCHOEMAKER et al., 2018).

No tecido mamário, o estrogênio local é primordial para que ocorra a fase de promoção na carcinogênese da neoplasia mamária (KHANDEKAR; COHEN; SPIEGELMAN, 2011; PICON-RUIZ et al., 2017). Estudos prévios reportam que o estrogênio e seus metabólitos podem causar quebras da fita dupla de DNA (DSBs) em células mamárias negativas para o receptor de estrogênio. Conseqüentemente, o gene *BRCA1* torna-se necessário para reparar esses DSBs e inibir a instabilidade genômica induzida por metabólitos (SAVAGE et al., 2014).

A biossíntese de estrogênio é catalisada no estroma mamário, através da conversão de androgênios suprarrenais em estrogênios pela aromatase (LIEDKE et al., 2014). Em pacientes pré-menopausadas com câncer de mama portadoras de mutação nos genes *BRCA1* ou *BRCA2*, a obesidade foi associada com níveis mais elevados de aromatase e inflamação, caracterizada pela presença de CLS no tecido adiposo (IYENGAR et al., 2021). Nesse contexto, mulheres na pré ou pós-menopausa com deficiências no reparo do DNA, devido a mutações patogênicas nos genes *BRCA1/2* podem ser mais suscetíveis aos efeitos proliferativos dos estrogênios livres, aumentando o risco de câncer de mama.

Ao analisarmos a sobrevida para a coorte total de pacientes com CMTN, em função das proteínas de interesse, constatamos que a maior expressão de NLRP3 foi associada à maiores SG e SLD. Corroborando com estes dados, Saponaro et al., demonstraram que a maior expressão desta proteína foi associada com pior SLD (SAPONARO et al., 2021). Estes achados evidenciam o complexo papel desempenhado pelo inflamassoma, cuja ativação pode exercer papel dual ao inibir ou maximizar a progressão tumoral.

Na nossa casuística, observamos maiores percentuais de óbitos em pacientes com linfonodos comprometidos e tamanho tumoral maior que 5 cm. Existe uma correlação direta entre tamanho tumoral, acometimento axilar e taxa de recorrência da doença. Nossos resultados estão de acordo com levantamento realizado por He et al, que evidenciaram prognóstico desfavorável em mulheres com comprometimento linfonodal e tumores estádios T3 e T4 (HE et al., 2017).

O valor prognóstico da caspase-1 nos tumores sólidos é controverso. Nossos dados mostraram maior SLD em pacientes com alta expressão desta cisteína. Embora não tenhamos avaliado a relação entre a expressão da caspase-1 e a

resposta ao tratamento, estudos mostraram que a ativação do inflamassoma NLRP3 e da CASP1 potencializa a morte celular imunogênica mediada por agentes quimioterápicos (HUANG et al., 2020), indicando que a funcionalidade desta via pode influenciar a resposta terapêutica.

A IL-18 é uma citocina pró-inflamatória indutora de IFN- γ pelas células T, que favorece a geração e manutenção de um microambiente inflamatório com propriedades anti-tumorais (DINARELLO; FANTUZZI, 2003). Além disso, estimula células NK e colabora com as células T e dendríticas para ampliar e modular a resposta imune no MAT (DUPAUL-CHICOINE et al., 2015). Identificamos por meio de análise multivariada que a maior expressão da IL-18 é fator preditivo independente para piores taxas de SG. Estas observações permitem inferir que no CMTN, a secreção da IL-18 pelo inflamassoma NLRP3 pode promover a proliferação de células tumorais e favorecer o desenvolvimento de características imunossupressoras (PARK et al., 2017).

Considerando os achados do presente trabalho e os possíveis mecanismos envolvidos, análises proteicas e funcionais deverão ser realizados para verificar detalhadamente a relação entre os marcadores do inflamassoma e mutação patogênica no gene *BRCA1*.

13.3 Correlação entre o infiltrado inflamatório e os marcadores do inflamassoma

O MAT é uma rede dinâmica que inclui células tumorais, tecido estromal (células imunes, fibroblastos, citocinas e tecido vascular) e matriz extracelular (BALKWILL; CAPASSO; HAGEMANN, 2012). O TIL corresponde a um aglomerado de células imunes mononucleares, presentes dentro e ao redor dos tumores (DENKERT et al., 2010). No CMTN, a presença de um infiltrado imune rico em células imunes têm sido associado com melhor sobrevida e resposta terapêutica (SAVAS et al., 2016).

A ativação do inflamassoma é capaz de modular a composição do MAT de diferentes tumores, incluindo o de mama (GUO et al., 2016; HUANG et al., 2020; VOIGT et al., 2017). Verificamos correlação significativa da densidade do TIL com a expressão dos marcadores NLRP3 e PYCARD. Achados similares foram evidenciados em modelos animais de câncer de mama, cuja ativação de NLRP3

levou ao recrutamento de células TCD4⁺ e TCD8⁺ via IL-1 β (GHIRINGHELLI et al., 2009), conferindo um microambiente imunossupressor (DAS et al., 2020).

Utilizando o CIBERSORT, identificamos nos tumores TN que a expressão do gene *NLRP3* se correlacionou com a presença de macrófagos – M2. Embora esses fenótipos representem um espectro contínuo de perfis de ativação, o MAT tende a diferenciar macrófagos semelhantes ao M2, os quais são relacionados com pior prognóstico. Além disso, a ativação do inflamassoma NLRP3 pode modular a polarização de macrófagos, devido à maciça secreção de citocinas pró-inflamatórias (LI et al., 2020; ZITVOGEL et al., 2012).

No subtipo HER2+, os genes *CASP1*, *IL-1B* e *IL-18* foram correlacionados com macrófagos-M1. A caspase-1 é responsável tanto pela maturação da IL-1 β e da IL-18, quanto pela indução da piroptose. Sendo assim, esta correlação sugere que a secreção das citocinas e mediadores inflamatórios através dos poros da GSDMD promove o recrutamento de diferentes células imunes, incluindo os macrófagos. Ademais, os macrófagos – M1 auxiliariam no controle da progressão tumoral.

A expressão do gene *NLRP3* também foi significativamente associada com macrófagos – M2 no subtipo HER2+. Neste subtipo, a ativação do inflamassoma NLRP3 em células estromais induziu a polarização de macrófagos para um fenótipo M2, cuja expressão foi associada com comprometimento linfonodal e metástase (WEICHAND et al., 2017).

Dessa forma, abordagens multiparamétricas tornam-se necessárias para elucidar a heterogeneidade e superposição de fenótipos dos macrófagos intratumorais nos diferentes subtipos moleculares do câncer de mama e sua relação mais precisa com o MAT.

13.4 Associação entre os genes do inflamassoma em pacientes com obesidade e câncer de mama

Em decorrência do pequeno tamanho da amostra, não foi possível constatar nenhuma associação entre as variáveis analisadas e a expressão dos marcadores NLRP3 e caspase-1, bem como a presença das CLS no tecido adiposo de pacientes com CMTN e obesidade. Frente ao exposto, utilizamos ferramentas *in silico* e bases de dados públicos para correlacionar a expressão dos genes de interesse em uma coorte de mulheres com câncer de mama, estratificadas pelo IMC.

Embora sem significância estatística, identificamos que o grupo com obesidade tinha maior expressão do gene *NLRP3*. Em mulheres com excesso de peso foi verificada expressão aumentada deste gene e de seus componentes (IL-1 β , IL-18 e CASP1), em relação às aquelas com IMC < 25kg/m² (ESSER et al., 2013). Uma dinâmica interação entre os componentes do inflamassoma e os adipócitos circulantes contribui para a secreção de elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias e adipocinas (BING, 2015), que comprometem a atividade serina/treonina no receptor de insulina (HAN et al., 2014).

Consonante com nossos achados, estudos prévios evidenciaram maior expressão da CASP1, em mulheres com câncer de mama e excesso de peso (KOLB et al., 2016). Um dos mecanismos que explicam essa associação consiste no papel da caspase-1 em direcionar os adipócitos a um fenótipo mais resistente à insulina (STIENSTRA et al., 2010; WEN; TING; O'NEILL, 2012). Esse aspecto reforça a interface entre o processo inflamatório crônico decorrente da obesidade e a carcinogênese mamária desencadeada pela ativação dos componentes do inflamassoma NLRP3.

14 CONCLUSÕES

As análises de expressão gênica do presente estudo demonstraram:

- Maior expressão dos genes *CASP1*, *CASP4*, *GSDMD*, *IL-18* e *PYCARD* em mulheres com receptor de estrogênio positivo;
- Maior expressão dos genes *GSDMD* e *PYCARD* em mulheres com receptor de progesterona positivo;
- Mulheres com tumores triplo-negativos e estadiamentos T3 e T4 apresentaram maior expressão do gene *GSDME*;
- Os subtipos luminais A e B e com superexpressão de HER2 não detiveram diferença significativa de expressão diferencial dos genes do inflamassoma e da piroptose quanto aos parâmetros clínico-patológicos avaliados;
- O gene *NLRP3* foi significativamente correlacionado com a presença de macrófagos M2 nos tumores triplo-negativos e HER2+;

Através da técnica de imuno-histoquímica, identificamos que:

- A expressão das proteínas NLRP3 e CASP1 foi associada com tamanho tumoral e comprometimento linfonodal, respectivamente;
- A proteína *PYCARD* apresentou uma discreta associação no grupo de tumores com mutação no gene *BRCA1* e naquelas com história familiar para câncer de mama;
- Sobrepeso e obesidade foram significativamente correlacionados com a presença de mutação em *BRCA1*;
- Tamanho tumoral maior que 5 cm e maior expressão da IL-18 foram associados a um prognóstico desfavorável quando avaliados para SG;
- A expressão dos marcadores NLRP3 e *PYCARD* foi correlacionada com a densidade do TIL;

A análise dos dados de microarranjo mostrou que a expressão dos genes *CASP1* e *NLRP3* não foi estatisticamente associada com obesidade em mulheres com câncer de mama.

15 Perspectivas

Dada a relevância clínica do presente estudo, nosso grupo pretende prosseguir com as investigações do papel do inflamassoma em CMTN com mutação no gene *BRCA1*, conforme descrito a seguir:

- Comparar a expressão dos marcadores do inflamassoma entre amostras de tecido normal adjacente ao tumor e tecido tumoral em pacientes com CMTN;
- Analisar a expressão proteica dos marcadores NLRP3, IL-1 β , IL-18, PYCARD, caspase-1 em células HEK293T;
- Caracterizar o estado de polarização (tipo M1 ou M2) dos TAMs, em tumores TN com mutação patogênica no gene *BRCA1* e correlacionar com a expressão dos marcadores do inflamassoma;
- Correlacionar a expressão dos marcadores do inflamassoma (NLRP3, PYCARD) com a expressão das células CD8, CD4, no infiltrado inflamatório tumoral;
- Avaliar a expressão dos componentes do inflamassoma em tecido adiposo de CMTN;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFONINA, I. S. et al. Limiting inflammation - The negative regulation of NF- κ B and the NLRP3 inflammasome. **Nature Immunology**, v. 18, n. 8, p. 861–869, 2017.

AGRESTI, R. et al. Association of adiposity, dysmetabolisms, and inflammation with aggressive breast cancer subtypes: a cross-sectional study. **Breast cancer research and treatment**, v. 157, n. 1, p. 179–189, maio 2016.

APTE, R. N.; VORONOV, E. Immunotherapeutic approaches of IL-1 neutralization in the tumor microenvironment. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 102, n. 2, p. 293–306, 2017.

AWAD, F. et al. Inflammasome biology, molecular pathology and therapeutic implications. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 187, p. 133–149, 2018.

BALKWILL, F. R.; CAPASSO, M.; HAGEMANN, T. The tumor microenvironment at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 125, n. 23, p. 5591–5596, 2012.

BANERJEE, S. et al. Basal-like breast carcinomas: Clinical outcome and response to chemotherapy. **Journal of Clinical Pathology**, v. 59, n. 7, p. 729–735, 2006.

BARBÉ, F.; DOUGLAS, T.; SALEH, M. Advances in Nod-like receptors (NLR) biology. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 25, n. 6, p. 681–697, 2014.

BARROS, A. C. S. D. DE; LEITE, K. R. M. Classificação molecular dos carcinomas de mama: uma visão contemporânea. **Revista Brasileira de Mastologia**, v. 25, n. 4, p. 146–155, 2016.

BATES, D. M. et al. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. **Genome Biology**, v. 5, n. 10, p. R80, 2004.

BAUMGARTEN, S. C.; FRASOR, J. Minireview: Inflammation: An Instigator of More Aggressive Estrogen Receptor (ER) Positive Breast Cancers. **Molecular Endocrinology**, v. 26, n. 3, p. 360–371, 2012.

BHARDWAJ, P. et al. Estrogen Protects against Obesity-Induced Mammary Gland Inflammation in Mice. **Cancer Prevention Research**, v. 8, n. 8, p. 751–759, ago. 2015.

BING, C. Is interleukin-1 β a culprit in macrophage-adipocyte crosstalk in obesity? **Adipocyte**, v. 4, n. 2, p. 149–152, 2015.

BISWAS, S. K.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: Cancer as a paradigm. **Nature Immunology**, v. 11, n. 10, p. 889–896, 2010.

BOUCHER, D. et al. Caspase-1 self-cleavage is an intrinsic mechanism to terminate inflammasome activity. **The Journal of experimental medicine**, v. 215, n. 3, p. 827–840, mar. 2018.

BRADY, N. J.; CHUNTOVA, P.; SCHWERTFEGER, K. L. Macrophages: Regulators of the Inflammatory Microenvironment during Mammary Gland Development and Breast Cancer. **Mediators of Inflammation**, v. 2016, p. 1–13, 2016.

BRIANESE, R. C. et al. BRCA1 deficiency is a recurrent event in early-onset triple-negative breast cancer: A comprehensive analysis of germline mutations and somatic promoter methylation. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 167, n. 3, p. 803–814, 2018.

BROWN, K. A. Metabolic pathways in obesity-related breast cancer. **Nature reviews. Endocrinology**, v. 17, n. 6, p. 350–363, jun. 2021.

BROZ, P. et al. Differential requirement for Caspase-1 autoproteolysis in pathogen-induced cell death and cytokine processing. **Cell host & microbe**, v. 8, n. 6, p. 471–483, dez. 2010.

BROZ, P.; DIXIT, V. M. Inflammasomes: Mechanism of assembly, regulation and signalling. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 7, p. 407–420, 2016.

BRUBAKER, S. W. et al. **Innate Immune Pattern Recognition: A Cell Biological Perspective**. [s.l.: s.n.]. v. 33

BUYS, S. S. et al. A study of over 35,000 women with breast cancer tested with a 25-gene panel of hereditary cancer genes. **Cancer**, v. 123, n. 10, p. 1721–1730, maio 2017.

CAREY, L. et al. Triple-negative breast cancer: Disease entity or title of convenience? **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 7, n. 12, p. 683–692, 2010.

CARRARO, D. M. et al. Comprehensive analysis of BRCA1, BRCA2 and TP53 germline mutation and tumor characterization: a portrait of early-onset breast cancer in Brazil. **PloS one**, v. 8, n. 3, p. e57581, 2013.

CATTEAU, A.; MORRIS, J. R. BRCA1 methylation: a significant role in tumour development? **Seminars in cancer biology**, v. 12, n. 5, p. 359–371, out. 2002.

CHEN, Q. et al. BRCA1 Deficiency Impairs Mitophagy and Promotes Inflammasome Activation and Mammary Tumor Metastasis. **Advanced Science**, 2020.

CILDIR, G.; AKINCILAR, S. C.; TERGAONKAR, V. Chronic adipose tissue inflammation: All immune cells on the stage. **Trends in Molecular Medicine**, v. 19, n. 8, p. 487–500, 2013.

CIRACI, C. et al. Control of innate and adaptive immunity by the inflammasome. **Microbes and Infection**, v. 14, n. 14, p. 1263–1270, 2012.

COLOTTA, F. et al. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. v. 30, n. 7, p. 1073–1081, 2009.

COLOZZA, M. et al. Proliferative markers as prognostic and predictive tools in early breast cancer: Where are we now? **Annals of Oncology**, v. 16, n. 11, p. 1723–1739, 2005.

CONDEELIS, J.; POLLARD, J. W. Macrophages: Obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. **Cell**, v. 124, n. 2, p. 263–266, 2006.

COUCH, F. J. et al. Inherited mutations in 17 breast cancer susceptibility genes among a large triple-negative breast cancer cohort unselected for family history of breast cancer. **Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 33, n. 4, p. 304–311, fev. 2015.

CRUSZ, S. M.; BALKWILL, F. R. Inflammation and cancer: Advances and new agents. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 12, n. 10, p. 584–596, 2015.

CUI, J. et al. Mechanisms and pathways of innate immune activation and regulation in health and cancer. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 10, n. 11, p. 3270–3285, 2014.

CURTIS, C. et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. **Nature**, v. 486, n. 7403, p. 346–352, 2012.

DAI, X. et al. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. **American journal of cancer research**, v. 5, n. 10, p. 2929–2943, 2015.

DAS, S. et al. Tumor Cell-Derived IL1 β Promotes Desmoplasia and Immune Suppression in Pancreatic Cancer. **Cancer research**, v. 80, n. 5, p. 1088–1101, mar. 2020.

DE VISSER, K. E.; EICHTEN, A.; COUSSENS, L. M. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 1, p.

24–37, 2006.

DENG, T. et al. Obesity, Inflammation, and Cancer. **Annual review of pathology**, v. 11, p. 421–449, maio 2016.

DENKERT, C. et al. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. **Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 28, n. 1, p. 105–113, jan. 2010.

DESANTIS, C. E. et al. Cancer statistics for African Americans, 2016: Progress and opportunities in reducing racial disparities. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 66, n. 4, p. 290–308, jul. 2016.

DESWAERTE, V. et al. Inflammasome Adaptor ASC Suppresses Apoptosis of Gastric Cancer Cells by an IL18-Mediated Inflammation-Independent Mechanism. **Cancer research**, v. 78, n. 5, p. 1293–1307, mar. 2018.

DI VIRGILIO, F. et al. The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation. **Immunity**, v. 47, n. 1, p. 15–31, jul. 2017.

DINARELLO, C. A. Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. **Annual Review of Immunology**, v. 27, n. 1, p. 519–550, 2009.

DINARELLO, C. A. et al. Interleukin-18 and IL-18 binding protein. **Frontiers in Immunology**, v. 4, n. OCT, p. 1–10, 2013.

DINARELLO, C. A.; FANTUZZI, G. Interleukin-18 and host defense against infection. **The Journal of infectious diseases**, v. 187 Suppl, p. S370-84, jun. 2003.

DINH, Q. N. et al. Roles of inflammation, oxidative stress, and vascular dysfunction in hypertension. **BioMed research international**, v. 2014, p. 406960, 2014.

DOMCHEK, S.; WEBER, B. L. Genetic variants of uncertain significance: Flies in the ointment. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 1, p. 16–17, 2008.

DUPAUL-CHICOINE, J. et al. The Nlrp3 Inflammasome Suppresses Colorectal Cancer Metastatic Growth in the Liver by Promoting Natural Killer Cell Tumoricidal Activity. **Immunity**, v. 43, n. 4, p. 751–763, out. 2015.

EROLE, P. et al. Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. **Cancer Treatment Reviews**, v. 38, n. 6, p. 698–707, 2012.

ERSHAID, N. et al. NLRP3 inflammasome in fibroblasts links tissue damage with inflammation in breast cancer progression and metastasis. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 4375, 26 dez. 2019.

ESSER, N. et al. Obesity phenotype is related to NLRP3 inflammasome activity and immunological profile of visceral adipose tissue. **Diabetologia**, v. 56, n. 11, p. 2487–2497, nov. 2013.

EVAVOLD, C. L. et al. The Pore-Forming Protein Gasdermin D Regulates Interleukin-1 Secretion from Living Macrophages. **Immunity**, v. 48, n. 1, p. 35- 44.e6, 16 jan. 2018.

EWALD, I. P. et al. Prevalence of the BRCA1 founder mutation c.5266dupin Brazilian individuals at-risk for the hereditary breast and ovarian cancer syndrome. **Hereditary cancer in clinical practice**, v. 9, n. 1, p. 12, dez. 2011.

FARIA, S. S. et al. Obesity and breast cancer: The role of crown-like structures in breast adipose tissue in tumor progression, prognosis, and therapy. **Journal of Breast Cancer**, v. 23, n. 3, p. 233–245, 2020.

FERLAY, J. et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview. **International journal of cancer**, abr. 2021.

FOULKES, W. D. BRCA1 - Sowing the seeds crooked in the furrow. **Nature Genetics**, v. 40, n. 1, p. 8–9, 2008.

FOULKES, W. D.; SMITH, I. E.; REIS-FILHO, J. S. Triple-negative breast

cancer. **The New England journal of medicine**, v. 363, n. 20, p. 1938–1948, nov. 2010.

FRIDMAN, W. et al. The Immune Microenvironment of Human Tumors: General Significance and Clinical Impact. p. 117–122, 2013.

FRIEDBERG, E. C. A comprehensive catalogue of somatic mutations in cancer genomes. **DNA Repair**, v. 9, n. 4, p. 468–469, 2010.

GHIRINGHELLI, F. et al. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1B-dependent adaptive immunity against tumors. **Nature Medicine**, v. 15, n. 10, p. 1170–1178, 2009.

GLODZIK, D. et al. Comprehensive molecular comparison of BRCA1 hypermethylated and BRCA1 mutated triple negative breast cancers. **Nature communications**, v. 11, n. 1, p. 3747, jul. 2020.

GOETZ, M. P. et al. Loss of heterozygosity at the CYP2D6 locus in breast cancer: Implications for germline pharmacogenetic studies. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 107, n. 2, p. 2–9, 2015.

GOLDHIRSCH, A. et al. Strategies for subtypes-dealing with the diversity of breast cancer: Highlights of the St Gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2011. **Annals of Oncology**, v. 22, n. 8, p. 1736–1747, 2011a.

GOLDHIRSCH, A. et al. **Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011.** **Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology**, ago. 2011b.

GONZALEZ-ANGULO, A. M. et al. Incidence and outcome of BRCA mutations in unselected patients with triple receptor-negative breast cancer. **Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 17, n. 5, p. 1082–1089, mar. 2011.

GREENMAN, C. et al. Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. **Nature**, v. 446, n. 7132, p. 153–158, 2007.

GUO, B. et al. Targeting inflammasome/IL-1 pathways for cancer immunotherapy. **Scientific Reports**, v. 6, 27 out. 2016.

GUO, H.; CALLAWAY, J. B.; TING, J. P. Y. Inflammasomes: Mechanism of action, role in disease, and therapeutics. **Nature Medicine**, v. 21, n. 7, p. 677–687, 2015.

GWAK, J. M. et al. Prognostic value of tumor-associated macrophages according to histologic locations and hormone receptor status in breast cancer. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, p. 1–14, 2015.

HA, G. et al. Integrative analysis of genome-wide loss of heterozygosity and monoallelic expression at nucleotide resolution reveals disrupted pathways in triple-negative breast cancer. **Genome Research**, v. 22, n. 10, p. 1995–2007, 2012.

HAGERLING, C.; CASBON, A. J.; WERB, Z. Balancing the innate immune system in tumor development. **Trends in Cell Biology**, v. 25, n. 4, p. 214–220, 2015.

HAMMARSTEDT, A.; GRAHAM, T. E.; KAHN, B. B. Adipose tissue dysregulation and reduced insulin sensitivity in non-obese individuals with enlarged abdominal adipose cells. **Diabetology & metabolic syndrome**, v. 4, n. 1, p. 42, set. 2012.

HAN, J. M. et al. Insulin inhibits IL-10-mediated regulatory T cell function: implications for obesity. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 192, n. 2, p. 623–629, jan. 2014.

HARBORG, S. et al. Overweight and prognosis in triple-negative breast cancer patients: a systematic review and meta-analysis. **NPJ breast cancer**, v. 7, n.

1, p. 119, set. 2021.

HE, M. et al. The lymph node ratio as an independent prognostic factor for node-positive triple-negative breast cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 27, p. 44870–44880, jul. 2017.

HONG, S. et al. Restoration of ASC expression sensitizes colorectal cancer cells to genotoxic stress-induced caspase-independent cell death. **Cancer letters**, v. 331, n. 2, p. 183–191, maio 2013.

HOU, J.; HSU, J.-M.; HUNG, M.-C. Molecular mechanisms and functions of pyroptosis in inflammation and antitumor immunity. **Molecular cell**, v. 81, n. 22, p. 4579–4590, nov. 2021.

HUANG, Y. et al. Myeloid PTEN promotes chemotherapy-induced NLRP3-inflammasome activation and antitumour immunity. **Nature cell biology**, 2020.

HUANOSTA-MURILLO, E. et al. NLRP3 Regulates IL-4 Expression in TOX(+) CD4(+) T Cells of Cutaneous T Cell Lymphoma to Potentially Promote Disease Progression. **Frontiers in immunology**, v. 12, p. 668369, 2021.

IGNATIADIS, M.; SOTIRIOU, C. Luminal breast cancer: From biology to treatment. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 10, n. 9, p. 494–506, 2013.

IYENGAR, N. M. et al. Obesity and Cancer Mechanisms: Tumor Microenvironment and Inflammation. **Journal of Clinical Oncology**, v. 34, n. 35, p. 4270–4276, dez. 2016.

IYENGAR, N. M. et al. Effects of obesity on breast aromatase expression and systemic metabo-inflammation in women with BRCA1 or BRCA2 mutations. **NPJ breast cancer**, v. 7, n. 1, p. 18, mar. 2021.

IYENGAR, N. M.; HUDIS, C. A.; DANNENBERG, A. J. Obesity and Inflammation: New Insights into Breast Cancer Development and Progression. **American Society of Clinical Oncology Educational Book**, v. 33, n. C, p. 46–51, 2013.

JAAFAR MAKKI. Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance. **Clinical Medicine Insights: Pathology**, n. 8, p. 23–31, 2015.

JORGENSEN, I.; MIAO, E. A. Pyroptotic cell death defends against intracellular pathogens. **Immunological Reviews**, v. 265, n. 1, p. 130–142, 2015.

KANTONO, M.; GUO, B. Inflammasomes and cancer: The dynamic role of the inflammasome in tumor development. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. SEP, p. 1–9, 2017.

KARAMI, F.; MEHDIPOUR, P. A Comprehensive Focus on Global Spectrum of BRCA1 and BRCA2 Mutations in Breast Cancer. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–21, 2013.

KARKI, R.; KANNEGANTI, T. D. Diverging inflammasome signals in tumorigenesis and potential targeting. **Nature Reviews Cancer**, v. 19, n. 4, p. 197–214, 2019.

KARKI, R.; MAN, S. M.; KANNEGANTI, T.-D. Inflammasomes and Cancer. **Cancer Immunology Research**, v. 5, n. 2, p. 94–99, 2017.

KARMAKAR, M. et al. Neutrophil P2X7 receptors mediate NLRP3 inflammasome-dependent IL-1 β secretion in response to ATP. **Nature communications**, v. 7, p. 10555, fev. 2016.

KAWANISHI, S. et al. Crosstalk between DNA damage and inflammation in the multiple steps of carcinogenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 8, 2017.

KHANDEKAR, M. J.; COHEN, P.; SPIEGELMAN, B. M. Molecular mechanisms of cancer development in obesity. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 12, p. 886–895, 2011.

KITTANEH, M.; MONTERO, A. J.; GLÜCK, S. Molecular Profiling for Breast Cancer: A Comprehensive Review. **Biomarkers in Cancer**, v. 5, p. BIC.S9455, 2013.

KOBAYASHI, H. et al. Hereditary breast and ovarian cancer susceptibility genes (review). **Oncology reports**, v. 30, n. 3, p. 1019–1029, set. 2013.

KOBOLDT, D. C. et al. VarScan 2: somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. **Genome research**, v. 22, n. 3, p. 568–576, mar. 2012.

KOLB, R. et al. Obesity-associated NLRC4 inflammasome activation drives breast cancer progression. **Nature Communications**, v. 7, p. 1–12, 2016.

KOVACS, S. B.; MIAO, E. A. Gasdermins: Effectors of Pyroptosis. **Trends in Cell Biology**, v. 27, n. 9, p. 673–684, 2017.

KUCHENBAECKER, K. B. et al. Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. **JAMA**, v. 317, n. 23, p. 2402–2416, jun. 2017.

LAMKANFI, M. Emerging inflammasome effector mechanisms. **Nature reviews. Immunology**, v. 11, n. 3, p. 213–220, mar. 2011.

LAWRENCE, T.; NATOLI, G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. **Nature reviews. Immunology**, v. 11, n. 11, p. 750–761, out. 2011.

LEEMANS, J. C.; CASSEL, S. L.; SUTTERWALA, F. S. Sensing damage by the NLRP3 inflammasome. **Immunological Reviews**, v. 243, n. 1, p. 152–162, 2011.

LEHMANN, B. D. et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. **Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 7, p. 2750–2767, 2011.

LI, Y. et al. TFEB is a master regulator of tumor-associated macrophages in breast cancer. **Journal for immunotherapy of cancer**, v. 8, n. 1, p. 1–14, 2020.

LI, Y. et al. Comprehensive Analysis of Regulatory Factors and Immune-Associated Patterns to Decipher Common and BRCA1/2 Mutation-Type-Specific Critical Regulation in Breast Cancer. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 9, p. 750897, 2021.

LIEDKE, P. E. R. et al. Outcomes of breast cancer in Brazil related to health care coverage: a retrospective cohort study. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 23, n. 1, p. 126–133, jan. 2014.

LIN, C.; ZHANG, J. Inflammasomes in inflammation-induced cancer. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. MAR, p. 1–22, 2017.

LORD, C. J.; ASHWORTH, A. The DNA damage response and cancer therapy. **Nature**, v. 481, n. 7381, p. 287–294, jan. 2012.

LORD, C. J.; ASHWORTH, A. Mechanisms of resistance to therapies targeting BRCA-mutant cancers. **Nature medicine**, v. 19, n. 11, p. 1381–1388, nov. 2013.

LORD, C. J.; ASHWORTH, A. PARP inhibitors: Synthetic lethality in the clinic. **Science (New York, N.Y.)**, v. 355, n. 6330, p. 1152–1158, mar. 2017.

LUKENS, J. R.; DIXIT, V. D.; KANNEGANTI, T.-D. Inflammasome activation in obesity-related inflammatory diseases and autoimmunity. **Discovery medicine**, v. 12, n. 62, p. 65–74, jul. 2011.

MA, D. et al. Molecular Features and Functional Implications of Germline Variants in Triple-Negative Breast Cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 113, n. 7, p. 884–892, jul. 2021.

MAN, S. M. Inflammasomes in the gastrointestinal tract: infection, cancer and

gut microbiota homeostasis. **Nature reviews. Gastroenterology & hepatology**, v. 15, n. 12, p. 721–737, dez. 2018.

MAN, S. M.; KANNEGANTI, T. D. Regulation of inflammasome activation. **Immunological Reviews**, v. 265, n. 1, p. 6–21, 2015.

MANDERS, P. et al. Body weight and risk of breast cancer in BRCA1/2 mutation carriers. **Breast cancer research and treatment**, v. 126, n. 1, p. 193–202, fev. 2011.

MANTOVANI, A.; BARAJON, I.; GARLANDA, C. IL-1 and IL-1 regulatory pathways in cancer progression and therapy. **Immunological Reviews**, v. 281, n. 1, p. 57–61, 2018.

MARRA, A. et al. Practical classification of triple-negative breast cancer: intratumoral heterogeneity, mechanisms of drug resistance, and novel therapies. **NPJ breast cancer**, v. 6, p. 54, 2020.

MARTINEZ-OUTSCHOORN, U.; SOTGIA, F.; LISANTI, M. P. Tumor microenvironment and metabolic synergy in breast cancers: critical importance of mitochondrial fuels and function. **Seminars in oncology**, v. 41, n. 2, p. 195–216, abr. 2014.

MARTINON, F. Detection of immune danger signals by NALP3. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 83, n. 3, p. 507–511, 2008.

MARTINON, F.; MAYOR, A.; TSCHOPP, J. The inflammasomes: guardians of the body. **Annual review of immunology**, v. 27, p. 229–65, 2009.

MAVADDAT, N. et al. Cancer risks for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: Results from prospective analysis of EMBRACE. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 105, n. 11, p. 812–822, 2013.

MCKEE, C. M. et al. PHOrming the inflammasome: phosphorylation is a critical switch in inflammasome signalling. **Biochemical Society transactions**, v. 49, n. 6, p. 2495–2507, dez. 2021.

MCLAUGHLIN, L. J. et al. Pharmacologic induction of innate immune signaling directly drives homologous recombination deficiency. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 117, n. 30, p. 17785–17795, jul. 2020.

MURRAY, P. J. et al. Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. **Immunity**, v. 41, n. 1, p. 14–20, 2014.

NAPETSCHNIG, J.; WU, H. Molecular basis of NF- κ B signaling. **Annual review of biophysics**, v. 42, p. 443–468, 2013.

NEIL-SZTRAMKO, S. E. et al. Does obesity modify the relationship between physical activity and breast cancer risk? **Breast cancer research and treatment**, v. 166, n. 2, p. 367–381, nov. 2017.

NETEA, M. G. et al. Inflammasome-Independent Regulation of IL-1-Family Cytokines. **Annual Review of Immunology**, v. 33, n. 1, p. 49–77, 2014.

NEWMAN, A. M. et al. Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles. **Nature Methods**, v. 12, n. 5, p. 453–457, 2015.

O'NEILL, L. A. J.; BOWIE, A. G. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 5, p. 353–364, 2007.

OCANA, A.; PANDIELLA, A. Targeting oncogenic vulnerabilities in triple negative breast cancer: Biological bases and ongoing clinical studies. **Oncotarget**, v. 8, n. 13, p. 22218–22234, 2017.

OGŁUSZKA, M. et al. Evaluate Cutpoints: Adaptable continuous data distribution system for determining survival in Kaplan-Meier estimator. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, v. 177, p. 133–139, 2019.

OLSON, O. C.; QUAIL, D. F.; JOYCE, J. A. Obesity and the tumor microenvironment. **Science (New York, N.Y.)**, v. 358, n. 6367, p. 1130–1131, dez. 2017.

OTTOBELLI CHIELLE, E. et al. Adipocytokines, inflammatory and oxidative stress markers of clinical relevance altered in young overweight/obese subjects. **Clinical biochemistry**, v. 49, n. 7–8, p. 548–553, maio 2016.

OZAKI, E.; CAMPBELL, M.; DOYLE, S. L. Targeting the NLRP3 inflammasome in chronic inflammatory diseases: current perspectives. **Journal of inflammation research**, v. 8, p. 15–27, 2015.

PALOMER, X. et al. Palmitic and Oleic Acid: The Yin and Yang of Fatty Acids in Type 2 Diabetes Mellitus. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 29, n. 3, p. 178–190, mar. 2018.

PARK, I. H. et al. Tumor-derived IL-18 induces PD-1 expression on immunosuppressive NK cells in triple-negative breast cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 20, p. 32722–32730, 2017.

PELEKANOU, V. et al. Tumor-Infiltrating Lymphocytes and PD-L1 Expression in Pre- and Posttreatment Breast Cancers in the SWOG S0800 Phase II Neoadjuvant Chemotherapy Trial. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 17, n. 6, p. 1324–1331, 2018.

PELLEGRINO, B. et al. Triple negative status and BRCA mutations in contralateral breast cancer: a population-based study. **Acta bio-medica: Atenei Parmensis**, v. 87, n. 1, p. 54–63, maio 2016.

PEROU, C. M. et al. <Molecular-Portraits-Breast-Cancer_Perou-Botstein_Nature-p747_2000_REF_5.pdf>. v. 533, n. May, p. 747–752, 2000.

PHAROAH, P. D. P. et al. Polygenic susceptibility to breast cancer and implications for prevention. **Nature Genetics**, v. 31, n. 1, p. 33–36, 2002.

PICON-RUIZ, M. et al. Obesity and adverse breast cancer risk and outcome: Mechanistic insights and strategies for intervention. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 67, n. 5, p. 378–397, 2017.

PINGILI, A. K. et al. Immune checkpoint blockade reprograms systemic immune landscape and tumor microenvironment in obesity-associated breast cancer. **Cell reports**, v. 35, n. 12, p. 109285, jun. 2021.

PLATNICH, J. M.; MURUVE, D. A. NOD-like receptors and inflammasomes: A review of their canonical and non-canonical signaling pathways. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 670, p. 4–14, jul. 2019.

POLAK, P. et al. A mutational signature reveals alterations underlying deficient homologous recombination repair in breast cancer. **Nature genetics**, v. 49, n. 10, p. 1476–1486, out. 2017.

PRAT, A. et al. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. **Breast**, v. 24, p. S26–S35, 2015.

PROELL, M. et al. The CARD plays a critical role in ASC foci formation and inflammasome signalling. **The Biochemical journal**, v. 449, n. 3, p. 613–621, fev. 2013.

QUAIL, D. F.; JOYCE, J. A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. **Nature Medicine**, v. 19, n. 11, p. 1423–1437, 2013.

RAY CHAUDHURI, A.; NUSSENZWEIG, A. The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 18, n. 10, p. 610–621, out. 2017.

RODRÍGUEZ-BALADA, M. et al. Identification of germline pathogenic variants in DNA damage repair genes by a next-generation sequencing multigene panel in BRCAX patients. **Clinical biochemistry**, v. 76, p. 17–23, fev. 2020.

ROGERS, C. et al. Cleavage of DFNA5 by caspase-3 during apoptosis mediates progression to secondary necrotic/pyroptotic cell death. **Nature Communications**, v. 8, p. 1–14, 2017.

ROULEAU, M. et al. PARP inhibition: PARP1 and beyond. **Nature reviews. Cancer**, v. 10, n. 4, p. 293–301, abr. 2010.

SALGADO, R. et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. **Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology**, v. 26, n. 2, p. 259–271, fev. 2015.

SANTANDER, A. M. et al. **Paracrine interactions between adipocytes and tumor cells recruit and modify macrophages to the mammary tumor microenvironment: the role of obesity and inflammation in breast adipose tissue.** [s.l: s.n.]. v. 7

SAPONARO, C. et al. Prognostic Value of NLRP3 Inflammasome and TLR4 Expression in Breast Cancer Patients. **Frontiers in oncology**, v. 11, p. 705331, 2021.

SAVAGE, K. I. et al. BRCA1 deficiency exacerbates estrogen-induced DNA damage and genomic instability. **Cancer research**, v. 74, n. 10, p. 2773–2784, maio 2014.

SAVAS, P. et al. Clinical relevance of host immunity in breast cancer: from TILs to the clinic. **Nature reviews. Clinical oncology**, v. 13, n. 4, p. 228–241, abr. 2016.

SBORGI, L. et al. GSDMD membrane pore formation constitutes the mechanism of pyroptotic cell death. **The EMBO Journal**, v. 35, n. 16, p. 1766–1778, 2016.

SCHETTINI, F. et al. Nab-paclitaxel for the treatment of triple-negative breast cancer: Rationale, clinical data and future perspectives. **Cancer Treatment Reviews**, v. 50, p. 129–141, 2016.

SCHMIDT, U. et al. **Cell detection with star-convex polygons.** [s.l.] Springer International Publishing, 2018. v. 11071 LNCS

SCHOEMAKER, M. J. et al. Association of Body Mass Index and Age With Subsequent Breast Cancer Risk in Premenopausal Women. **JAMA oncology**, v. 4, n. 11, p. e181771, nov. 2018.

SCHRODER, K.; TSCHOPP, J. The Inflammasomes. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 821–832, 2010.

SHARMA, B. R.; KANNEGANTI, T.-D. NLRP3 inflammasome in cancer and metabolic diseases. **Nature immunology**, v. 22, n. 5, p. 550–559, maio 2021.

SHARMA, D.; KANNEGANTI, T. D. The cell biology of inflammasomes: Mechanisms of inflammasome activation and regulation. **Journal of Cell Biology**, v. 213, n. 6, p. 617–629, 2016.

SHEN, X. et al. Caspase 3/GSDME-dependent pyroptosis contributes to chemotherapy drug-induced nephrotoxicity. **Cell Death and Disease**, v. 12, n. 2, 2021.

SNIPES, G. J. et al. IL1 Receptor Antagonist Controls Transcriptional Signature of Inflammation in Patients with Metastatic Breast Cancer. **Cancer Research**, v. 78, n. 18, p. 5243–5258, 2018.

STIENSTRA, R. et al. The inflammasome-mediated caspase-1 activation controls adipocyte differentiation and insulin sensitivity. **Cell metabolism**, v. 12, n. 6, p. 593–605, dez. 2010.

SWANSON, K. V.; DENG, M.; TING, J. P. Y. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. **Nature Reviews Immunology**,

v. 33, 2019.

SZEBENI, G. J. et al. Inflammation and Cancer: Extra- and Intracellular Determinants of Tumor-Associated Macrophages as Tumor Promoters. **Mediators of Inflammation**, v. 2017, p. 1–13, 2017.

TATTOLI, I. et al. The nodosome: Nod1 and Nod2 control bacterial infections and inflammation. **Seminars in Immunopathology**, v. 29, n. 3, p. 289–301, 2007.

THOMPSON, D. et al. Evaluation of linkage of breast cancer to the putative BRCA3 locus on chromosome 13q21 in 128 multiple case families from the Breast Cancer Linkage Consortium. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 2, p. 827–831, jan. 2002.

TUNG, N. et al. Counselling framework for moderate-penetrance cancer-susceptibility mutations. **Nature reviews. Clinical oncology**, v. 13, n. 9, p. 581–588, set. 2016.

VARN, F. S. et al. Adaptive immunity programmes in breast cancer. **Immunology**, v. 150, n. 1, p. 25–34, 2017.

VENKITARAMAN, A. R. Cancer suppression by the chromosome custodians, BRCA1 and BRCA2. **Science (New York, N.Y.)**, v. 343, n. 6178, p. 1470–1475, mar. 2014.

VODUC, K. D. et al. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 10, p. 1684–1691, 2010.

VOIGT, C. et al. Cancer cells induce interleukin-22 production from memory CD4 + T cells via interleukin-1 to promote tumor growth. **PNAS**, p. 1–6, 2017.

WALKER, C. L.; HO, S. Developmental reprogramming of cancer susceptibility. **Nature reviews. Cancer**, v. 12, n. 7, p. 479–486, jun. 2012.

WATANABE, Y.; NAGAI, Y.; TAKATSU, K. Activation and regulation of the pattern recognition receptors in obesity-induced adipose tissue inflammation and insulin resistance. **Nutrients**, v. 5, n. 9, p. 3757–3778, set. 2013.

WEICHAND, B. et al. S1PR1 on tumor-associated macrophages promotes lymphangiogenesis and metastasis via NLRP3/IL-1 β . **The Journal of Experimental Medicine**, v. 214, n. 9, p. 2695–2713, 2017.

WEISMAN, P. S. et al. Genetic alterations of triple negative breast cancer by targeted next-generation sequencing and correlation with tumor morphology. **Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc**, v. 29, n. 5, p. 476–488, maio 2016.

WEN, H.; TING, J. P.-Y.; O'NEILL, L. A. J. A role for the NLRP3 inflammasome in metabolic diseases--did Warburg miss inflammation? **Nature immunology**, v. 13, n. 4, p. 352–357, mar. 2012.

WHITE, I. R. et al. Meta-analysis of non-linear exposure-outcome relationships using individual participant data: A comparison of two methods. **Statistics in medicine**, v. 38, n. 3, p. 326–338, fev. 2019.

WOOLERY, K. T. et al. BRCA1 185delAG Mutation Enhances Interleukin-1 β Expression in Ovarian Surface Epithelial Cells . **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–11, 2015.

WU, T. et al. Identification of Personalized Chemoresistance Genes in Subtypes of Basal-Like Breast Cancer Based on Functional Differences Using Pathway Analysis. **PloS one**, v. 10, n. 6, p. e0131183, 2015.

XU, Z. et al. NLRP3 inflammasome promoted the malignant progression of prostate cancer via the activation of caspase-1. **Cell death discovery**, v. 7, n. 1, p. 399, dez. 2021.

ZHOU, R.; YAZDI, A. S.; MENU, P. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. **Nature**, p. 2–7, 2011.

ZHU, G. et al. Tumor-associated tertiary lymphoid structures: Gene-expression profiling and their bioengineering. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. JUN, p. 1–5, 2017.

ZITVOGEL, L. et al. Inflammasomes in carcinogenesis and anticancer immune responses. **Nature Immunology**, v. 13, n. 4, p. 343–351, 2012.

ANEXOS

Anexo 1. Expressão diferencial dos genes do inflamassoma e da piroptose em pacientes com câncer de mama

Pré-menopausa x Pós-menopausa			
	FC	p	p-adj
NLRP3	0,007	0,881	1
PYCARD	-5,12	0,006	0,06
CASP1	-0,238	0,414	1
CASP4	0,146	0,45	1
CASP5	-0,04	0,025	0,281
GSDMA	0,045	0,460	1
GSDMB	-0,649	0,339	1
GSDMD	-1,629	0,02	0,328
DFNA5	-0,009	0,871	1
IL-18	-0,07	0,793	1
IL1-B	-0,277	0,036	0,404

Asiática x negra				
Raça		p	FC	p-adj
CASP1		0,584	0,336	1
CASP4		0,147	-0,591	1
CASP5		0,626	0,018	1
DFNA5		0,534	0,073	1
GSDMA		0,026	-0,284	0,289
GSDMB		0,639	-0,652	1
GSDMD		1,55x10⁻⁶	7,556	1,70x10⁻⁵
IL18		0,303	0,615	1
IL1B		0,521	-0,181	1
NLRP3		0,048	0,220	0,530
PYCARD		0,342	3,863	1

Asiática x branca				
Raça	FC	p		p-adj
CASP1	-0,079	0,885		1
CASP4	-0,542	0,138		1
CASP5	-0,048	0,160		1
DFNA5	0,153	0,147		1
GSDMA	-0,370	0,001		0,013
GSDMB	-3,075	0,013		0,150
GSDMD	0,833	0,551		1
IL-18	-0,314	0,556		1
IL-1B	-0,115	0,648		1
NLRP3	0,305	0,002		0,025
PYCARD	-0,971	0,789		1

Estadiamento - T			
T1+T2 x T3+T4	FC	p	p-adj
CASP1	-0,176	0,611	1
CASP4	-0,179	0,443	1
CASP5	-0,014	0,493	1
DFNA5	0,126	0,058	0,639
GSDMA	-0,044	0,535	1
GSDMB	-0,546	0,490	1
GSDMD	2,317	0,010	0,118
IL18	-0,693	0,040	0,441
IL1B	-0,347	0,028	0,309
NLRP3	0,005	0,927	1
PYCARD	0,096	0,966	1

Estadiamento - N			
N+ x N-	FC	p	p-adj
CASP1	0,140	0,576	1
CASP4	0,108	0,522	1
CASP5	0,025	0,097	1
DFNA5	-0,05	0,289	1
GSDMA	-0,02	0,623	1
GSDMB	0,159	0,781	1
GSDMD	-0,918	0,163	1
IL18	0,332	0,174	1
IL1B	0,248	0,029	0,329
NLRP3	0,041	0,357	1
PYCARD	0,255	0,878	1

Receptor de estrogênio			
ER+ x ER-	FC	p	p-adj
CASP1	-1,928	1,68x10 ⁻¹⁰	1,85x10 ⁻⁹
CASP4	-1,347	4,86x10 ⁻¹¹	5,34x10 ⁻¹⁰
CASP5	-0,164	4,87x10 ⁻¹⁸	5,36x10 ⁻¹⁷
DFNA5	-0,366	8,45x10 ⁻¹⁰	9,29x10 ⁻⁹
GSDMA	-0,181	0,004	0,054
GSDMB	-1,391	0,053	0,584
GSDMD	4,246	9,77x10 ⁻⁸	1,07x10 ⁻⁶
IL18	-1,08	0,0001	0,002
IL1B	-0,582	3,49x10 ⁻⁵	0,0003
NLRP3	0,006	0,913	1
PYCARD	12,988	2,20x10 ⁻¹⁰	2,42x10 ⁻⁹

Receptor de progesterona			
PR+ x PR-	FC	p	p-adj
CASP1	-1,010	0,0001	0,002
CASP4	-0,826	6,89x10 ⁻⁶	7,57x10 ⁻⁵
CASP5	-0,111	6,97x10 ⁻¹¹	7,67x10 ⁻¹⁰
DFNA5	-0,213	6,81x10 ⁻⁵	0,0007
GSDMA	-0,110	0,056	0,617
GSDMB	-1,844	0,004	0,044
GSDMD	3,137	1,05x10 ⁻⁵	0,0001
IL18	-0,795	0,0021	0,024
IL1B	-0,186	0,138	1
NLRP3	0,076	0,125	1
PYCARD	10,031	4,23x10 ⁻⁸	4,66x10 ⁻⁷

HER2			
HER2+ x HER-	FC	p	p-adj
CASP1	-0,98	0,007	0,082
CASP4	0,005	0,982	1
CASP5	-0,019	0,44	1
DFNA5	-0,136	0,08	0,903
GSDMA	0,319	0,0002	0,003
GSDMB	7,39	6,56x10 ⁻¹⁵	7,22x10 ⁻¹⁴
GSDMD	-0,794	0,386	1
IL-18	-0,609	0,065	0,725
IL-1B	-0,478	0,006	0,072
NLRP3	-0,271	3,20x10 ⁻⁵	0,0003
PYCARD	0,192	0,937	1

BRCA1-2 X VUS+Esporádicos	FC	p	p-adj
CASP1	1,89	0,17	1
CASP4	1,08	0,31	1
CASP5	0,081	0,57	1
DFNA5	0,376	0,40	1
GSDMA	0,196	0,28	1
GSDMB	0,602	0,22	1
GSDMD	2,203	0,44	1
IL18	-0,307	0,80	1
IL1B	-0,475	0,49	1
NLRP3	0,093	0,67	1
PYCARD	8,004	0,12	1

Anexo 2. Expressão diferencial dos genes do inflamassoma e da piroptose nos subtipos luminais

Pós menopausa x pré-menopausa			
Status menopausal	FC	p	p-adj
CASP1	-0,439	0,357	1
CASP4	0,251	0,357	1
CASP5	-0,041	0,044	0,494
DFNA5	0,069	0,296	1
GSDMA	0,039	0,528	1
GSDMB	-0,219	0,115	1
GSDMD	-0,695	0,544	1
IL18	-0,132	0,766	1
IL1B	-0,380	0,05	0,568
NLRP3	0,06	0,429	1
PYCARD	-6,38	0,03	0,331

Asiática x negra			
Raça	FC	p	p-adj
CASP1	-0,228	0,837	
CASP4	-0,473	0,450	
CASP5	-0,021	0,654	
DFNA5	0,027	0,860	
GSDMA	0,442	0,002	
GSDMB	0,329	0,31	
GSDMD	9,03	0,001	
IL18	1,12	0,29	
IL1B	-0,157	0,746	
NLRP3	0,15	0,469	
PYCARD	6,44	0,393	

Asiática x branca			
Raça	FC	p	p-adj
CASP1	-0,24	0,793	
CASP4	-0,16	0,758	
CASP5	-0,016	0,693	
DFNA5	0,237	0,07	
GSDMA	0,062	0,606	
GSDMB	-0,165	0,54	
GSDMD	-0,24	0,916	
IL18	-0,317	0,719	
IL1B	-0,063	0,875	
NLRP3	0,386	0,026	
PYCARD	-3,145	0,617	

T1+T2 x T3+T4			
Estadiamento - T	FC	p	p-adj
CASP1	-0,22	0,682	1
CASP4	-0,182	0,557	1
CASP5	-0,03	0,188	1
DFNA5	-0,045	0,547	1
GSDMA	-0,047	0,505	1
GSDMB	0,188	0,233	1
GSDMD	2,97	0,027	0,301
IL18	-1,101	0,029	0,324
IL1B	-0,488	0,031	0,351
NLRP3	0,036	0,712	1
PYCARD	-4,84	0,182	1

N positivo X N negativo			
Estadiamento - N	FC	p	p-adj
CASP1	0,046	0,907	1
CASP4	0,22	0,343	1
CASP5	0,040	0,018	0,206
DFNA5	-0,009	0,861	1
GSDMA	-0,03	0,562	1
GSDMB	0,012	0,918	1
GSDMD	-1,25	0,211	1
IL18	-0,061	0,871	1
IL1B	0,338	0,046	0,514
NLRP3	0,099	0,174	1
PYCARD	1,31	0,628	1

Receptor de estrogênio			
RE+ x RE-	FC	p	p-adj
CASP1	-3,92	0,008	0,089
CASP4	-2,51	0,003	0,036
CASP5	-0,465	$8,88 \times 10^{-14}$	$9,77 \times 10^{-13}$
DFNA5	-1,048	$2,94 \times 10^{-7}$	$3,24 \times 10^{-6}$
GSDMA	0,02	0,9	1
GSDMB	0,262	0,549	1
GSDMD	3,636	0,329	1
IL18	-3,066	0,028	0,311
IL1B	-1,53	0,014	0,157
NLRP3	-0,627	0,02	0,228
PYCARD	11,74	0,242	1

Receptor de progesterona			
RP+ x RP-	FC	p	p-adj
CASP1	-0,01	0,983	1
CASP4	0,018	0,955	1
CASP5	-0,04	0,066	0,728
DFNA5	-0,06	0,415	1
GSDMA	-0,13	0,071	0,79
GSDMB	-0,21	0,191	1
GSDMD	1,1	0,441	1
IL18	-0,682	0,203	1
IL1B	0,133	0,578	1
NLRP3	0,05	0,587	1
PYCARD	5,58	0,146	1

Anexo 3. Expressão diferencial dos genes do inflamassoma e da piroptose no subtipo triplo-negativo

Asiática x branca				
Raça	FC	p	p-adj	
CASP1	0,623	0,724	1	
CASP4	-0,807	0,553	1	
CASP5	-0,062	0,739	1	
DFNA5	0,58	0,317	1	
GSDMA	-0,09	0,7	1	
GSDMB	0,414	0,496	1	
GSDMD	1,637	0,636	1	
IL18	-0,507	0,753	1	
IL1B	-0,164	0,865	1	
NLRP3	0,357	0,233	1	
PYCARD	-2,43	0,716	1	

Asiática x negra				
Raça	FC	p	p-adj	
CASP1	0,538	0,767	1	
CASP4	-1,434	0,306	1	
CASP5	0,04	0,836	1	
DFNA5	0,523	0,379	1	
GSDMA	-0,207	0,391	1	
GSDMB	0,647	0,301	1	
GSDMD	8,056	0,024	0,269	
IL18	0,165	0,92	1	
IL1B	-0,666	0,501	1	
NLRP3	0,29	0,345	1	
PYCARD	1,102	0,873	1	

Status menopausal				
Pré-menopausa X Pós menopausa	FC	p	p-adj-	
CASP1	-0,410	0,628	1	
CASP4	-1,151	0,080	0,876	
CASP5	-0,159	0,074	0,812	
DFNA5	-0,277	0,322	1	
GSDMA	0,097	0,395	1	
GSDMB	-0,446	0,140	1	
GSDMD	-1,155	0,503	1	
IL-18	0,061	0,937	1	
IL-1B	-0,604	0,201	1	
NLRP3	0,009	0,950	1	
PYCARD	-0,926	0,768	1	

Estadiamento - T			
T3+T4 x T1+T2	FC	p	p-adj
CASP1	0,904	0,454	1
CASP4	1,072	0,254	1
CASP5	0,143	0,26	1
DFNA5	1,911	0,0001	0,0001
GSDMA	0,367	0,022	0,240
GSDMB	-0,005	0,99	1
GSDMD	4,962	0,046	0,506
IL18	1,045	0,341	1
IL1B	0,004	0,995	1
NLRP3	0,121	0,555	1
PYCARD	11,026	0,015	0,167

Estadiamento - N			
N+ x N-	FC	p	p-adj
CASP1	-0,546	0,495	1
CASP4	0,463	0,457	1
CASP5	-0,012	0,891	1
DFNA5	-0,567	0,029	0,321
GSDMA	-0,096	0,371	1
GSDMB	0,073	0,799	1
GSDMD	-0,997	0,548	1
IL18	-0,043	0,953	1
IL1B	-0,09	0,838	1
NLRP3	-0,002	0,989	1
PYCARD	0,542	0,859	1

Expressão diferencial dos genes e do inflamassoma no subtipo HER2

Status menopausal			
Pré-menopausa x pós-menopausa	FC	p	p-adj
CASP1	-0,183	0,765	1
CASP4	0,525	0,285	1
CASP5	0,008	0,827	1
DFNA5	0,101	0,321	1
GSDMA	0,373	0,293	1
GSDMB	0,790	0,856	1
GSDMD	-4,279	0,027	0,296
IL18	-0,434	0,412	1
IL1B	0,076	0,819	1
NLRP3	0,039	0,668	1
PYCARD	-3,776	0,495	1

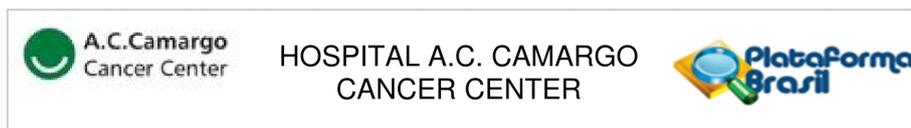
Asiática x Negra			
Raça	FC	p	p-adj
CASP1	-0,21489	0,859	1
CASP4	-0,05841	0,949	1
CASP5	-0,02462	0,715	1
DFNA5	-0,06168	0,709	1
GSDMA	-1,40014	0,044	0,483
GSDMB	11,84374	0,149	1
GSDMD	7,998382	0,030	0,329
IL18	1,302564	0,180	1
IL1B	1,258339	0,055	0,606
NLRP3	0,325683	0,099	1
PYCARD	5,788788	0,594	1

Asiática x branca			
Raça	FC	p	p-adj
CASP1	0,212	0,811	1
CASP4	-0,300	0,657	1
CASP5	-0,035	0,474	1
DFNA5	0,035	0,775	1
GSDMA	-1,373	0,008	0,083
GSDMB	-7,258	0,228	1
GSDMD	2,457	0,360	1
IL18	0,049	0,945	1
IL1B	0,237	0,621	1
NLRP3	0,227	0,118	1
PYCARD	2,101	0,792	1

Estadiamento - T			
T3+T4 x T1+T2	FC	p	p-adj
CASP1	-0,691	0,343	1
CASP4	-0,638	0,273	1
CASP5	-0,039	0,366	1
DFNA5	-0,214	0,069	0,756
GSDMA	-0,331	0,416	1
GSDMB	-2,858	0,564	1
GSDMD	1,504	0,509	1
IL18	-0,590	0,333	1
IL1B	-0,568	0,136	1
NLRP3	-0,177	0,150	1
PYCARD	4,997	0,434	1

Estadamiento - N			
N+ x N0	FC	p	p-adj
CASP1	-0,404	0,426	1
CASP4	-0,507	0,211	1
CASP5	-0,017	0,572	1
DFNA5	-0,053	0,523	1
GSDMA	0,199	0,481	1
GSDMB	3,759	0,276	1
GSDMD	0,346	0,827	1
IL18	-0,418	0,324	1
IL1B	0,050	0,852	1
NLRP3	0,025	0,775	1
PYCARD	3,083	0,488	1

Anexo 4. Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – Hospital AC Camargo Cancer Center



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação dos padrões de expressão de componentes do inflamassoma NLRP3 e polarização de macrófagos no microambiente tumoral de pacientes com câncer de mama portadoras e não portadoras da mutação BRCA1

Pesquisador: Kelly Grace Magalhães

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 84019618.8.3001.5432

Instituição Proponente: FUNDACAO ANTONIO PRUDENTE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio
FUNDACAO DE APOIO A PESQUISA DO DISTRITO FEDERAL FAPDF

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.758.540

Apresentação do Projeto:

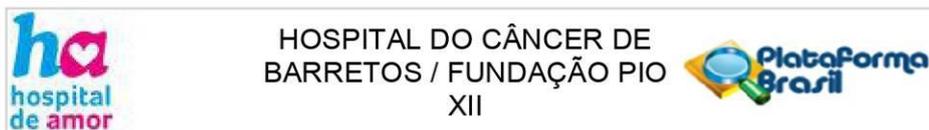
O carcinoma mamário é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo, com 1,7 milhão de novos casos, correspondendo a 11,9% de todos os casos de câncer em 2016. Em modelos experimentais, a inflamação crônica foi descrita como indutora, porém alguns dados não são reproduzidos na clínica. Os inflamassomas, complexos multiprotéicos de sinalização intracelular atuantes na imunidade inata e adaptativa, vem sendo associados a funções celulares contrastantes dependendo do tipo de célula cancerígena analisada, o que também é verdade para os receptores do tipo Toll. Porém, a relação do inflamassoma NLRP3 e o câncer de mama é pouco conhecida. Considerando a presença dos receptores NLRs e TLRs nas células não hematopoiéticas e, logo, a possibilidade de modulação do microambiente inflamatório pela própria célula tumoral, propôs-se analisar a presença e função do receptor NLRP3 e seu inflamassoma em pacientes com câncer de mama portadoras e não portadoras da mutação BRCA1.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar os padrões de expressão de componentes do inflamassoma NLRP3 e da polarização de macrófagos no microambiente tumoral de pacientes com câncer de mama portadoras e não portadoras da mutação BRCA1.

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211
Bairro: Liberdade **CEP:** 01.509-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2189-5020 **Fax:** (11)2189-5020 **E-mail:** cep_hcancer@accamargo.org.br

Anexo 5. Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – Hospital do Câncer de Barretos



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação dos padrões de expressão de componentes do inflamassoma NLRP3 e polarização de macrófagos no microambiente tumoral de pacientes com câncer de mama portadoras e não portadoras da mutação BRCA1

Pesquisador: Kelly Grace Magalhães

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 84019618.8.3002.5437

Instituição Proponente: Fundação Pio XII

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio
FUNDAÇÃO DE APOIO A PESQUISA DO DISTRITO FEDERAL FAPDF

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.617.383

Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos denominados "apresentação do projeto", "objetivos" e "avaliação dos riscos e benefícios" foram retiradas do documento intitulado "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1673078.pdf" (submetido na Plataforma Brasil em 25/02/2021).

Resumo:

O carcinoma mamário é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo, com 1,7 milhão de novos casos, correspondendo a 11,9% de todos os casos de câncer em 2016. Em modelos experimentais, a inflamação crônica foi descrita como indutora, porém alguns dados não são reproduzidos na clínica. Os inflamassomas, complexos multiprotéticos de sinalização intracelular atuantes na imunidade inata e adaptativa, vem sendo associados a funções celulares contrastantes dependendo do tipo de célula cancerígena analisada, o que também é verdade para os receptores do tipo Toll. Porém, a relação do inflamassoma NLRP3 e o câncer de mama é pouco conhecida. Considerando a presença dos receptores NLRs e TLRs nas células não hematopoiéticas e, logo, a possibilidade de modulação do microambiente inflamatório pela própria célula tumoral, propôs-se analisar a presença e função do receptor NLRP3 e seu inflamassoma em pacientes com câncer de

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331
Bairro: Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400
UF: SP **Município:** BARRETOS
Telefone: (17)3321-0347 **Fax:** (17)3321-6600 **E-mail:** cep@hccancerbarretos.com.br

PUBLICAÇÕES

Faria et al. *J Biomed Sci* (2021) 28:26
<https://doi.org/10.1186/s12929-021-00724-8>



Journal of Biomedical Science

REVIEW

Open Access

NLRP3 inflammasome-mediated cytokine production and pyroptosis cell death in breast cancer



Sara Socorro Faria¹, Susan Costantini², Vladimir Cláudio Cordeiro de Lima³, Victor Pianna de Andrade⁴, Mickaël Rialland^{6,7}, Rebe Cedric^{5,6}, Alfredo Budillon² and Kelly Grace Magalhães^{1*} 

Abstract

Breast cancer is the most diagnosed malignancy in women. Increasing evidence has highlighted the importance of chronic inflammation at the local and/or systemic level in breast cancer pathobiology, influencing its progression, metastatic potential and therapeutic outcome by altering the tumor immune microenvironment. These processes are mediated by a variety of cytokines, chemokines and growth factors that exert their biological functions either locally or distantly. Inflammasomes are protein signaling complexes that form in response to damage- and pathogen-associated molecular patterns (DAMPs and PAMPs), triggering the release of pro-inflammatory cytokines. The dysregulation of inflammasome activation can lead to the development of inflammatory diseases, neurodegeneration, and cancer. A crucial signaling pathway leading to acute and chronic inflammation occurs through the activation of NLRP3 inflammasome followed by caspase 1-dependent release of IL-1 β and IL-18 pro-inflammatory cytokines, as well as, by gasdermin D-mediated pyroptotic cell death. In this review we focus on the role of NLRP3 inflammasome and its components in breast cancer signaling, highlighting that a more detailed understanding of the clinical relevance of these pathways could significantly contribute to the development of novel therapeutic strategies for breast cancer.

Keywords: Breast cancer, Gasdermins, IL-1 β , NLRP3 inflammasome

Review Article



Obesity and Breast Cancer: The Role of Crown-Like Structures in Breast Adipose Tissue in Tumor Progression, Prognosis, and Therapy

Sara Socorro Faria , Luís Henrique Corrêa , Gabriella Simões Heyn ,
Lívia Pimentel de Sant'Ana , Raquel das Neves Almeida ,
Kelly Grace Magalhães

Laboratory of Immunology and Inflammation, Department of Cell Biology, University of Brasília, Brasília, Brazil



ABSTRACT

Obesity is associated with increased risk and aggressiveness of many types of cancer. Women with obesity and breast cancer are more likely to be diagnosed with larger and higher-grade tumors and have higher incidence of metastases than lean individuals. Increasing evidence indicates that obesity includes systemic, chronic low-grade inflammation, and that adipose tissue can act as an important endocrine site, secreting a variety of substances that may regulate inflammation, immune response, and cancer predisposition. Obesity-associated inflammation appears to be initially mediated by macrophage infiltration into adipose tissue. Macrophages can surround damaged or necrotic adipocytes, forming “crown-like” structures (CLS). CLS are increased in breast adipose tissue from breast cancer patients and are more abundant in patients with obesity conditions. Moreover, the CLS index-ratio from individuals with obesity seems to influence breast cancer recurrence rates and survival. In this review, we discuss the most recent cellular and molecular mechanisms involved in CLS establishment in the white adipose tissue of women with obesity and their implications for breast cancer biology. We also explain how CLS influence the tumor microenvironment and affect breast cancer behavior. Targeting breast adipose tissue CLS can be a crucial therapeutic tool in cancer treatment, especially in patients with obesity.



Multi-Approach Bioinformatics Analysis of Curated Omics Data Provides a Gene Expression Panorama for Multiple Cancer Types

Bruno César Feltes^{1*}, Joice de Faria Poloni^{1†}, Itamar José Guimarães Nunes², Sara Socorro Faria³ and Marcio Dorn^{1,2,4*}

¹Laboratory of Structural Bioinformatics and Computational Biology, Institute of Informatics, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, ²Center of Biotechnology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil,

³Laboratory of Immunology and Inflammation, Department of Cell Biology, University of Brasília, Brasília, Brazil, ⁴National Institute of Science and Technology - Forensic Science, Porto Alegre, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Osbaldo Resendis-Antonia,
National Autonomous University of
Mexico, Mexico

Reviewed by:

Sara Albar,
VIB & KU Leuven Center for Brain &
Disease Research, Belgium
Abhinav Achreja,
University of Michigan, United States

*Correspondence:

Studies describing the expression patterns and biomarkers for the tumoral process increase in number every year. The availability of new datasets, although essential, also creates a confusing landscape where common or critical mechanisms are obscured amidst the divergent and heterogeneous nature of such results. In this work, we manually curated the Gene Expression Omnibus using rigorous filtering criteria to select the most homogeneous and highest quality microarray and RNA-seq datasets from multiple types of cancer. By applying systems biology approaches, combined with machine learning analysis, we investigated possible frequently deregulated molecular mechanisms underlying the tumoral process. Our multi-approach analysis of 99 curated datasets, composed of 5,406 samples, revealed 47 differentially expressed genes in



The Use of the Anticoagulant Heparin and Corticosteroid Dexamethasone as Prominent Treatments for COVID-19

FRANZ ALBERTO,
University of São Paulo, Brazil

Reviewed by:

Frank M. P. Van Haren,
Australian National University, Australia
Naveen Kumar Devanga Ragupathi,
The University of Sheffield,
United Kingdom
Oliver P. Page,
King's College London,
United Kingdom

***Correspondence:**

Kelly Grace Magalhães
kellymagalhaes@unb.br
orcid.org/0000-0002-7435-5272

Specialty section:

This article was submitted to
Infectious Diseases - Surveillance,
Prevention and Treatment,
a section of the journal
Frontiers in Medicine

Received: 08 October 2020

Accepted: 26 March 2021

Published: 23 April 2021

Citation:

Braz-de-Melo HA, Faria SS,
Pasquarelli-do-Nascimento G,
Santos ID, Kobinger GP and
Magalhães KG (2021) The Use of the
Anticoagulant Heparin and
Corticosteroid Dexamethasone as
Prominent Treatments for COVID-19.
Front. Med. 8:615333.
doi: 10.3389/fmed.2021.615333

COVID-19 is spreading worldwide at disturbing rates, overwhelming global healthcare. Mounting death cases due to disease complications highlight the necessity of describing efficient drug therapy strategies for severe patients. COVID-19 severity associates with hypercoagulation and exacerbated inflammation, both influenced by ACE2 downregulation and cytokine storm occurrence. In this review, we discuss the applicability of the anticoagulant heparin and the anti-inflammatory corticosteroid dexamethasone for managing severe COVID-19 patients. The upregulated inflammation and blood clotting may be mitigated by administering heparin and its derivatives. Heparin enhances the anticoagulant property of anti-thrombin (AT) and may be useful in conjunction with fibrinolytic drugs for severe COVID-19 patients. Besides, heparin can also modulate immune responses, alleviating TNF- α -mediated inflammation, impairing IL-6 production and secretion, and binding to complement proteins and leukotriene B₄ (LTB₄). Moreover, heparin may present anti-SARS-CoV-2 potential once it can impact viral infectivity and alter SARS-CoV-2 Spike protein architecture. Another feasible approach is the administration of the glucocorticoid dexamethasone. Although glucocorticoid's administration for viral infection managing is controversial, there is increasing evidence demonstrating that dexamethasone treatment is capable of drastically diminishing the death rate of patients presenting with Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) that required invasive mechanical ventilation. Importantly, dexamethasone may be detrimental by impairing viral clearance and inducing hyperglycemia and sodium retention, hence possibly being deleterious for diabetics and hypertensive patients, two major COVID-19 risk groups. Therefore, while heparin's multitarget capacity shows to be strongly beneficial for severe COVID-19 patients, dexamethasone should be carefully administered taking into consideration underlying medical conditions and COVID-19 disease severity. Therefore, we suggest that the multitarget impact of heparin as an anti-viral, antithrombotic and anti-inflammatory drug



Hypercoagulopathy and Adipose Tissue Exacerbated Inflammation May Explain Higher Mortality in COVID-19 Patients With Obesity

Gabriel Pasquarelli-do-Nascimento¹, Heloisa Antoniella Braz-de-Melo¹, Sara Socorro Faria¹, Igor de Oliveira Santos¹, Gary P. Kobinger^{2,3} and Kelly Grace Magalhães^{1*}

¹ Laboratory of Immunology and Inflammation, Department of Cell Biology, University of Brasilia, Brasilia, Brazil,

COVID-19, caused by SARS-CoV-2, is characterized by pneumonia, lymphopenia, exhausted lymphocytes and a cytokine storm. Several reports from around the world have identified obesity and severe obesity as one of the strongest risk factors for COVID-19 hospitalization and mechanical ventilation. Moreover, countries with greater obesity prevalence have a higher morbidity and mortality risk of developing serious outcomes from COVID-19. The understanding of how this increased susceptibility of the people with obesity to develop severe forms of the SARS-CoV-2 infection occurs is crucial for implementing appropriate public health and therapeutic strategies to avoid COVID-19 severe symptoms and complications in people living with obesity. We hypothesize here that increased ACE2 expression in adipose tissue displayed by people with obesity may increase SARS-CoV-2 infection and accessibility to this tissue. Individuals with obesity have increased white adipose tissue, which may act as a reservoir for a more extensive viral spread with increased shedding, immune activation and pro-inflammatory cytokine amplification. Here we discuss how obesity is related to a pro-inflammatory and metabolic dysregulation, increased SARS-CoV-2 host cell entry in adipose tissue and induction of hypercoagulopathy, leading people with obesity to develop severe forms of COVID-19 and also death. Taken together, it may be crucial to better explore the role of visceral adipose tissue in the inflammatory response to SARS-CoV-2 infection and investigate the potential therapeutic effect of using specific target anti-inflammatories (canakinumab or anakinra for IL-1 β inhibition; anti-IL-6 antibodies for IL-6 inhibition), anticoagulant or anti-diabetic drugs in COVID-19 treatment of people with obesity. Defining the immunopathological changes in COVID-19 patients with obesity can provide prominent targets for drug discovery and clinical management improvement.

Keywords: adipose tissue, COVID-19, Obesity, SARS-CoV-2, hypercoagulopathy, ACE-2

OPEN ACCESS

Edited by:

Jeff M. P. Holly,
University of Bristol, United Kingdom

Reviewed by:

Luca Spiszia,
University of Padova, Italy
Erik Albert Karlsson,
Institut Pasteur du
Cambodge, Cambodia

*Correspondence:

Kelly Grace Magalhães
kellymagalhaes@unb.br

Specialty section:

This article was submitted to
Obesity,
a section of the journal
Frontiers in Endocrinology

Received: 03 June 2020

Accepted: 30 June 2020

Published: 28 July 2020

Citation:

Pasquarelli-do-Nascimento G,
Braz-de-Melo HA, Faria SS,
Santos IO, Kobinger GP and