

Vinícius Nunes Cordeiro Leal

**Caracterização genética e funcional do NLRP3 em linfócitos e monócitos
de indivíduos cronicamente infectados por HIV-1**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências.

São Paulo

2021

Vinícius Nunes Cordeiro Leal

**Caracterização genética e funcional do NLRP3 em linfócitos e monócitos
de indivíduos cronicamente infectados por HIV-1**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Alessandra Pontillo

São Paulo

2021

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

LEAL, VINÍCIUS NUNES CORDEIRO

Caracterização genética e funcional do NLRP3 em linfócitos e monócitos de indivíduos cronicamente infectados por HIV-1 / VINÍCIUS NUNES CORDEIRO LEAL; orientadora: Alessandra Pontillo.– São Paulo, 2021.

252 p.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. HIV. 2. Monócitos. 3. Linfócitos. 4. Inflamassoma. I. Pontillo, Alessandra, orientadora. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a):

Título da Dissertação/Tese:

Orientador:

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



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

São Paulo, 19 de abril de 2016.

PARECER 1280/CEPSH

CAAE nº 54993516.3.0000.5467

A Comissão de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do ICB, nesta data, **APROVOU** o projeto intitulado: "**Caracterização genética e funcional do NLRP-3 em linfócitos e monócitos de indivíduos cronicamente infectados por HIV-1**" dos pesquisadores Profa. Dra. **Alessandra Pontillo** e do aluno **Vinícius Nunes Cordeiro Leal**.

Cabe aos pesquisadores elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais e final) de acordo com a Resolução nº 466/12, item II, II.19 e II.20, do Conselho Nacional de Saúde, conforme modelo constante no site: www.icb.usp.br, como também finalizar o processo junto à Plataforma Brasil quando do encerramento deste projeto.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **19/04/2017**, bem como anexado uma cópia à Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

Prof. Dr. **PAULO MARINHO ANDRADE ZANOTTO**
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Dedico este trabalho a todos que de alguma forma fizeram parte dessa jornada. Aos participantes da pesquisa, amigos e familiares. Aos que me deram força com um abraço, um gesto, um sorriso. Aos que sempre estiveram ao meu lado mesmo estando distante. Aos que me ensinaram, me inspiraram e me fizeram amar a ciência e a vida.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro fundamental no desenvolvimento da pesquisa, pelos números de processo: 2015/24981-6 (mestrado), 2017/10824-1 (conversão para doutorado direto).

À minha orientadora Alessandra Pontillo, que me acolheu desde a iniciação científica, me ensinou o pensamento crítico, me incentivou a crescer cada vez mais, me apoiou em todas as etapas da minha pós-graduação. Acalmou meu coração com um café quentinho, risadas e um maravilhoso risoto. Mais do que uma chefe, se tornou uma amiga. A você deixo meus sinceros agradecimentos!

Ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, com todo o suporte estrutural e tecnológico de fundamental importância no desenvolvimento desse projeto.

À toda a equipe do SEAP, em especial ao Dr. Aluísio Augusto Cotrim Segurado, por viabilizar a pesquisa nesse local, a Dra. Amanda Nazareth por contribuir diretamente com a coorte de pacientes no estudo de resposta a vacina anti-HBV, e aos nossos colaboradores que nos ajudaram diretamente com os agendamentos, coletas e prontuários, em especial Camila, Marisa, Ana, Magali, Sandra, Nicole, Valéria, Creuza e Washington.

À família imunogenética, dos antigos (Edione, Dhêmerson, Fernanda, Jaíne, Iohanã) aos novos integrantes (Raylane, Mariela, Suemy, Mônica, Letícia).

Edi, saiba que você foi fundamental no meu crescimento durante esse período. Você me ensinou não somente técnicas como citometria de fluxo e isolamento de células, mas também como tomar café sem açúcar ou não desistir da vida *fitness* (ou pelo menos tentar). Parceira de coleta, de experimentos, de sorrisos e lamentos. Saiba que o *team* HIV será eterno! A sua amizade é um privilégio.

Dhêmerson, é tanta história que daria para escrever uma outra tese. Um irmão que encontrei para toda a vida. Com você dividi a bancada, o apartamento, meus prantos e meus sorrisos. A sua companhia me fez superar o desafio de sair de casa e morar sozinho pela primeira vez em uma cidade imensa, sem

conhecidos e familiares por perto. Obrigado por tudo! E que venham mais histórias para contar.

Fe, foram 5 anos de amizade que parecem uma vida inteira. Sempre estive ao meu lado não somente nos experimentos, mas na vida! Não tenho palavras que possam expressar a gratidão por tudo que vivemos. Saiba que você foi uma parte essencial nessa história.

Jai, você tem o dom de tornar tudo mais leve por onde passa. Foram tantas histórias, e sempre com muitas risadas. Obrigado por ter contribuído para que essa jornada fosse mais prazerosa. Sua amizade é muito preciosa para mim.

Ray e Mariela, espero que a nossa caminhada juntos esteja só começando. Mas desde já eu agradeço por toda a ajuda de vocês nessa reta final do meu doutorado. Vocês contribuíram não somente na parte científica, mas também pelo companheirismo, sorrisos e conversas.

Aos demais alunos que passaram pelo laboratório e marcaram positivamente minha trajetória (Elaine, Pamela, Tarcio, Mariana, Alexandre).

Aos professores do departamento de imunologia, em especial a professora Bruna Alencar e ao professor Anderson Nunes por contribuírem tanto com reagentes e equipamentos, quanto com discussões científicas fundamentais no desenvolvimento deste projeto.

À equipe técnica e secretários (Eni e João) do departamento de imunologia pelos inúmeros auxílios, e aos funcionários da limpeza, em especial a Neide e Salete que tantos nos fizeram rir.

Aos demais colegas da pós, Taís Matozo e Letícia Kogachi.

Aos membros da banca de qualificação do mestrado (Daniela Santoro, Bruna Alencar, Jean Pierre) e do doutorado direto (Eduardo Silveira, Vivian Avelino, Anderson Nunes) por sua importante contribuição científica com sugestões importantes quanto ao desenvolvimento desse estudo.

À toda minha família, em especial a minha mãe Cláudia, minha companheira da vida, que sempre me incentivou a seguir os meus sonhos, me forneceu todas as condições necessárias para que eu conseguisse chegar onde eu quisesse, e sempre estive ao meu lado em todos os momentos.

À minha avó e madrinha Adelma, que sempre me incentivou nos estudos, moldou meu caráter e zelou por mim com muito amor onde quer que eu

estivesse. A senhora sempre foi uma inspiração para todos ao seu redor. Deixo registrado o meu amor e minha imensa gratidão.

Ao meu pai Sérgio, que além de pai é um amigo e companheiro, desde o “primeiro rabisco até o bê-a-bá”. Obrigado por sempre me incentivar, ouvir meus lamentos e me fazer sorrir! Sou seu fã número um!

À minha irmã Vanessa e meu cunhado Sérgio Mota, que sempre me apoiaram com muita admiração, amor e companheirismo.

Aos meus amigos de longa data (Matheus Libarino, Thaís, Thiago, Matheus Damasceno, Rafael Ferraz e Likem). Sem vocês a vida não teria a mesma graça. Cada um de vocês contribuiu de alguma maneira para que eu conseguisse chegar ao final dessa trajetória. Deixo registrado a minha imensa gratidão pelos incentivos, abraços, conversas, carinho e risadas. Mais do que amigos, vocês são a minha família!

À minha amiga e companheira Yara que me fez sorrir e ajudou a concluir essa fase marcante da minha vida com muito amor, carinho e paciência.

Aos pequenos (Lulu, Lia, Ícaro, Ju, Sophie, Catarina e Arthur) que fazem parte de minha vida, enchendo de alegria e inspirando a nunca desistir dos meus sonhos.

In memoriam ao meu padrinho e avôs Janilton, Francino e Elias, que sempre torceram por mim e tenho certeza que estão aplaudindo essa conquista lá do céu.

Enfim, a todos que fizeram parte dessa história, deixo registrado o meu profundo agradecimento!

Trabalho realizado no laboratório de Imunogenética do Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, sob orientação da professora Dr^a Alessandra Pontillo. Projeto financiado pela CAPES e FAPESP e realizado com bolsa de mestrado (nº2015/24981-6) e doutorado direto (nº2017/10824-1) FAPESP.

RESUMO

LEAL, V.N.C. **Caracterização genética e funcional do NLRP3 em linfócitos e monócitos de indivíduos cronicamente infectados por HIV-1.**

Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2021.

O HIV-1 ativa o NLRP3 inflamassoma em monócitos, macrófagos e células dendríticas, induzindo produção de IL-1 β e/ou IL-18, citocinas importantes na ação antiviral. Em acordo, variantes genéticas que levam a aumento da ativação do NLRP3 inflamassoma, foram associadas à proteção contra a infecção pelo HIV-1, ressaltando a importância do *background* genético dos indivíduos na resposta ao vírus. Com a introdução da terapia antirretroviral (ART), a morbidade relacionada a infecção crônica por HIV-1 hoje é principalmente relacionada ao estado de inflamação crônica dos pacientes. Levando em conta a elevada produção das citocinas IL-1 β e IL-18, foi postulada a participação do inflamassoma na patogênese da infecção crônica pelo HIV. A ativação constitutiva do inflamassoma foi já reportada em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes. Contudo, ainda não está elucidado em quais células o inflamassoma estaria constitutivamente ativado, sobretudo levando em conta que além dos monócitos, recentemente foi demonstrada a ativação do NLRP3 inflamassoma em linfócitos T e B. Além disso, existe uma lacuna em estudos de associação genética em coortes de pacientes HIV em ART. Portanto, levantamos a hipótese que a ativação do inflamassoma possa ocorrer tanto em monócitos quanto em linfócitos T e B de pacientes HIV, podendo contribuir para o estado de inflamação crônica desses pacientes e/ou afetando a biologia dos leucócitos. Focamos o estudo no receptor NLRP3 levando em conta a sua expressão nas diversas PBMC. Considerando que variantes em genes de susceptibilidade ao HIV resultaram também associadas ao prognóstico da doença, propomos realizar adicionalmente um estudo de associação em uma coorte de pacientes HIV em ART, analisando polimorfismos de base única (SNPs) do NLRP3 inflamassoma. O NLRP3 inflamassoma resultou constitutivamente ativado em monócitos, linfócitos T CD4⁺ e B, porém a resposta do inflamassoma a estímulos resultou escassa apenas em monócitos. Tanto os linfócitos T CD4⁺ que linfócitos B, responderam com uma hiperativação do complexo, sugerindo que existe uma desregulação do NLRP3 inflamassoma nos PBMC dos pacientes HIV de forma célula específica. Esses dados podem em parte explicar os resultados obtidos no estudo genético, onde SNPs que levam ao aumento de ativação do NLRP3 e IL-1 β foram associados com um melhor e pior estado clínico dos pacientes HIV, respectivamente. Em conjunto os dados obtidos descrevem pela primeira vez, em detalhes, que a desregulação do NLRP3 inflamassoma em pacientes HIV em ART está relacionada tanto com o perfil genético, quanto com o estado pró-inflamatório do indivíduo, afetando de modo célula-específica a biologia de distintos leucócitos.

Palavras Chave: HIV, NLRP3, Inflamassoma.

ABSTRACT

LEAL, V.N.C. **Genetic and functional characterization of NLRP3 in lymphocytes and monocytes of chronically HIV-1 infected individuals**

Thesis (Doctorate in Immunology) - Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, 2021.

HIV-1 activates the NLRP3 inflammasome in monocytes, macrophages and dendritic cells, inducing the release of IL-1 β and/or IL-18, important cytokines in the antiviral response. Accordingly, genetic variants that lead to increased activation of the NLRP3 inflammasome were associated to protection against HIV-1 infection, emphasizing the importance of the genetic background of the host in responding to the virus. With the introduction of antiretroviral therapy (ART), the morbidity related to HIV-1 chronic infection is nowadays mainly related to the state of chronic inflammation of the patients. Taking into account the high production of the cytokines IL-1 β and IL-18, the participation of inflammasome in the pathogenesis of chronic HIV infection has been postulated. Constitutive activation of the inflammasome has been reported in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients. However, it is still unclear in which cells the inflammasome would be constitutively activated, especially considering that in addition to monocytes, NLRP3 inflammasome activation has recently been demonstrated in T and B lymphocytes. Furthermore, we observe a gap in genetic association studies in cohorts of HIV patients on ART. Therefore, we hypothesized that the activation of the inflammasome may occur both in monocytes and in T and B lymphocytes of HIV patients, and it may contribute to the chronic inflammation status of these patients and/or affecting the biology of the leukocytes. We decided to focus the study on the NLRP3 receptor taking into account its expression in the different PBMCs. Considering that variants in HIV susceptibility genes were also associated with the prognosis of the disease, we also propose to conduct an association study in a cohort of HIV patients on ART, analyzing single nucleotide polymorphisms (SNPs) in NLRP3 inflammasome. The NLRP3 inflammasome resulted constitutively activated in monocytes, CD4+ T and CD19+ B lymphocytes, but the inflammasome's response to stimuli was scarce only in monocytes. Both CD4+ T and B lymphocytes responded with hyper activation of the complex, suggesting that there is a dysregulation of the NLRP3 inflammasome in the PBMC of HIV patients, but with different consequences depending on the cell. These data may partly explain the results obtained from the genetic study where SNPs that lead to increased activation of NLRP3 and IL-1 β are associated with better and worse clinical status of HIV patients, respectively. Taken together, the data obtained describe for the first time in detail the deregulation of NLRP3 inflammasome in HIV patients on ART, which is related both to the individual genetic background and to its pro-inflammatory state, and affects in a cell-specific way the biology of different leukocytes.

Keywords: HIV, NLRP3, Inflammasome.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Ciclo de Replicação do HIV-1.....	30
Figura 2. Etapas da infecção natural por HIV-1.....	33
Figura 3. Principais componentes do inflamassoma.....	41
Figura 4. Principais receptores do inflamassoma e seus ativadores.....	43
Figura 5. Principais mecanismos envolvidos na ativação e regulação do NLRP3 inflamassoma.....	47
Figura 6. O HIV-1 ativa o inflamassoma através do NLRP3 e IFI16.....	53
Figura 7. Representação esquemática do trabalho.....	61
Figura 8. Curvas de amplificação de genotipagem.....	70
Figura 9. Avaliação da pureza de uma população de monócitos CD14+ isolada por seleção positiva a partir de células mononucleares de sangue periférico (PBMC).....	73
Figura 10. Avaliação da pureza de uma população de linfócitos T CD4+ isolado por seleção negativa a partir de células mononucleares de sangue periférico (PBMC).....	74
Figura 11. Avaliação da pureza de uma população de linfócitos B CD19+ isolada por seleção negativa a partir de células mononucleares de sangue periférico (PBMC).....	75
Figura 12. Avaliação da pureza de uma população de linfócitos T CD8+ isolado por seleção negativa a partir de células mononucleares de sangue periférico (PBMC).....	76
Figura 13. Resultados da análise de associação dos SNPs selecionados no NLRP3 inflamassoma com as variáveis laboratoriais dos pacientes HIV em ART.....	91
Figura 14. A variante IL1B rs16944 C>T é associada a menores contagens de linfócitos T CD4+ em pacientes HIV em ART.....	92
Figura 15. A combinação entre os SNPs de NLRP3 ou de NLRP3 e CARD8 afeta positivamente a contagem de linfócitos T CD4+ de pacientes HIV em ART.....	94
Figura 16. O SNP rs10754558 no gene NLRP3 é associado com a resposta a imunização para HBV dos pacientes HIV em ART.....	96
Figura 17. Ativação constitutiva do inflamassoma é aumentada nos PBMC de pacientes HIV tratados.....	100
Figura 18. A estimulação com LPS induz uma aumentada ativação do inflamassoma nos PBMC de pacientes HIV tratados.....	101

Figura 19. Resposta diferencial ao ATP de PBMC de pacientes HIV tratados.....	103
Figura 20. Expressão constitutiva de genes do inflamassoma em monócitos, linfócitos T CD4+, T CD8+ e B (CD19+) de controles saudáveis (CS) e pacientes infectados pelo HIV (HIV).....	105
Figura 21. Expressão basal dos principais componentes do NLRP3 inflamassoma em monócitos, de controles saudáveis (CS) e pacientes infectados pelo HIV (HIV).....	106
Figura 22. Expressão basal dos principais componentes do NLRP3 inflamassoma em linfócitos T CD4+ de controles saudáveis (CS) e pacientes infectados pelo HIV (HIV).....	106
Figura 23. Expressão basal dos principais componentes do NLRP3 inflamassoma em linfócitos CD19+ de controles saudáveis (CS) e pacientes infectados pelo HIV (HIV).....	107
Figura 24. Ativação constitutiva aumentada do inflamassoma nos monócitos de pacientes HIV tratados.....	108
Figura 25. Formação espontânea de <i>specks</i> de ASC ou NLRP3 em monócitos de pacientes HIV tratados.....	110
Figura 26. Ativação constitutiva aumentada do inflamassoma nos linfócitos T CD4+ de pacientes HIV tratados.....	111
Figura 27. Formação espontânea de <i>specks</i> de ASC ou NLRP3 em linfócitos T CD4+ de pacientes HIV tratados.....	113
Figura 28. Ativação constitutiva aumentada do inflamassoma nos linfócitos B CD19+ de pacientes HIV tratados.....	114
Figura 29. Formação espontânea de <i>specks</i> de ASC ou NLRP3 em linfócitos B CD19+ de pacientes HIV tratados.....	116
Figura 30. Genes do NLRP3 inflamassoma são diferencialmente expressos em monócitos de pacientes HIV em resposta a LPS ou β -GL.....	118
Figura 31. LPS+ATP induz uma menor responsividade quanto a ativação do NLRP3 inflamassoma nos monócitos de pacientes HIV.....	119
Figura 32. LPS e β -glucana induzem a produção de TNF- α e IL-6 em pacientes HIV e controles.....	120
Figura 33. Ativação diferencial da caspase-1 em resposta ao ATP em monócitos de pacientes HIV tratados.....	122
Figura 34. Formação desregulada de <i>specks</i> de NLRP3 e ASC em monócitos estimulados de HIV.....	124
Figura 35. Ação dos inibidores do inflamassoma nos monócitos humanos.....	126
Figura 36. Inibição diferencial da ativação do NLRP3 inflamassoma em monócitos de pacientes HIV.....	127

Figura 37. Indução da expressão dos genes do NLRP3 inflamassoma em linfócitos T CD4+ ativados com anti-CD3 e anti-CD28.....	129
Figura 38. Hiperativação do inflamassoma nos linfócitos T CD4+ ativados de pacientes HIV tratados.....	130
Figura 39. Aumento da formação de <i>specks</i> de ASC em linfócitos T CD4+ de pacientes HIV em resposta a ativação.....	132
Figura 40. Ação dos inibidores do inflamassoma nos linfócitos T CD4+ humanos.....	133
Figura 41. Inibição da ativação do NLRP3 inflamassoma em linfócitos T CD4+ de pacientes e controles.....	134
Figura 42. Expressão dos genes envolvidos na polarização Th2 é similar em linfócitos T CD4+, de controles saudáveis (CS) e pacientes infectados pelo HIV (HIV).....	135
Figura 43. Produção constitutiva aumentada de IFN- γ em linfócitos T CD4+ de pacientes HIV.....	136
Figura 44. Ativação com anti-CD3 e anti-CD28 induz maior produção de IFN- γ em linfócitos T CD4+ de pacientes HIV.....	137
Figura 45. O NLRP3 é localizado no citoplasma dos linfócitos T CD4+ de pacientes HIV e controles.....	138
Figura 46. Indução da expressão dos genes do NLRP3 inflamassoma em linfócitos B de pacientes HIV ativados com LPS ou β -glucana.....	139
Figura 47. Maior indução de IL-1 β por linfócitos B de pacientes HIV estimulados.....	141
Figura 48. Aumentada indução da clivagem da caspase-1 nos linfócitos B ativados de pacientes cronicamente infectados pelo HIV.....	142
Figura 49. Aumentada formação de <i>specks</i> de NLRP3/ASC em linfócitos B de pacientes HIV estimulados com LPS e β -glucana.....	143
Figura 50. Ação dos inibidores do inflamassoma nos linfócitos B CD19+ humanos.....	144
Figura 51. Inibidores reduzem a produção de IL-1 β em linfócitos B ativados.....	145
Figura 52. Inibidores reduzem a produção de IgM em linfócitos B ativados.....	146
Figura 53. A produção de IL-1 β e IgM está correlacionada em linfócitos B ativados.....	147
Figura 54. Efeito dos SNPs rs10754558 e rs16944 na produção de IL-1 β por monócitos CD14+ de pacientes HIV.....	149
Figura 55. Efeito dos SNPs rs16944 e rs10754558 na produção de IL-1 β por linfócitos T CD4+ de pacientes HIV.....	151

Figura 56. Efeito dos SNPs rs10754558 e rs16944 na produção de IL-1 β por linfócitos B CD19+ de pacientes HIV.....152

Figura 57. Efeito dos SNPs rs10754558 e rs16944 na concentração de IL-18 plasmática de pacientes HIV.....153

LISTA DE TABELAS

Tabela I: Marcadores de ativação imunológica durante a infecção crônica pelo HIV-1.....	40
Tabela II. Dados demográficos, comportamentais e clínicos dos pacientes cronicamente infectados pelo HIV.....	63
Tabela III. Dados demográficos dos indivíduos recrutados para isolamento de leucócitos e ensaios in vitro.....	65
Tabela IV. Polimorfismos de base única (SNPs) selecionados para o estudo.....	67
Tabela V. Sondas utilizadas para ensaio de genotipagem.....	69
Tabela VI. Lista dos ensaios gene-específicos Taqman.....	78
Tabela VII. Frequência alélica e genotípica dos SNPs avaliados em <i>NLRP3</i> , <i>IL1B</i> , <i>IL18</i> , <i>CARD8</i> , <i>P2X7R</i> , <i>IRF4</i> , <i>KPNA2</i>	87
Tabela VIII. Resultados da análise de associação do SNP <i>IL1B</i> rs16944 C>T com as variáveis laboratoriais dos pacientes HIV em ART.....	92
Tabela IX. Efeito epistático significativo entre os SNPs do gene <i>NLRP3</i> e o SNP do <i>CARD8</i> com o nível sanguíneo de linfócitos T CD4+ em pacientes HIV em ART.....	93
Tabela X. O SNP em <i>NLRP3</i> (rs10754558 C>G) é associado com melhor resposta a imunização para HBV em pacientes HIV em ART.....	97

LISTA DE ABREVIATURAS

µL:	Microlitro
mL	Mililitro
ADCC	Citotoxicidade dependente de Anticorpo (do inglês: <i>Antibody dependent Cytotoxicity</i>)
Aids	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (do inglês: <i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>)
AIM2	Proteína Induzida por Interferon (do inglês: <i>Interferon Inducible Protein</i> ou <i>Absent in Melanoma 2</i>)
APOBEC3	Apolipoproteína B (do inglês: <i>Apolipoprotein B mRNA Editing Enzyme Catalytic-like 3</i>)
ART	Terapia Antirretroviral (do inglês: <i>Antirretroviral Therapy</i>)
ASC	Proteína contendo domínio PYD e CARD (do inglês: <i>PYD and CARD domain-containing protein</i> ou <i>Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD</i>)
ATP	Adenosina Trifosfato (do inglês: <i>Adenosine Triphosphate</i>)
BAFF	Fator Ativador de Células B (do inglês: <i>B Cell-Activating Fator</i>)
BTK	Tirosinoquinase de Bruton (do inglês: <i>Bruton's Tyrosin Kinase</i>)
Ca²⁺	Cálcio
cAMP	Monofosfato Cíclico de Adenosina (do inglês: <i>Cyclic Adenosine Monophosphate</i>)
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPS	Do inglês: <i>Cryopyrin-Associated Autoinflammatory Syndromes</i>
CARD	Domínio de recrutamento de Caspases (do inglês: <i>Caspase Recruitment Domain</i>)
cART	Terapia Antirretroviral Combinada (do inglês: <i>Combined Antirretroviral Therapy</i>)

CASP	Caspase
CCL	Do inglês: <i>Chemokine (C-C motif) ligand</i>
CCR	Do inglês: <i>C-C Chemokine Receptor</i>
CD	Grupamento de Diferenciação (do inglês: <i>Cluster of Differentiation</i>)
cDNA	DNA complementar (do inglês: <i>Complementary DNA</i>)
CEPSH	Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos
CT	Limiar do Ciclo (do inglês: <i>Cycle Threshold</i>)
CTL	Células T Citotóxicas (do inglês: <i>Cytotoxic T Cell</i>)
CTLA-4	Antígeno 4 Associado a Linfócitos T Citotóxicos (do inglês: <i>Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Antigen 4</i>)
CVP	Carga Viral Plasmática
CXCL	C-X-X ligante (do inglês: <i>C-X-C Motif Ligand</i>)
CXCR	C-X-C Receptor de Quimiocina (do inglês: <i>C-X-C Chemokine Receptor</i>)
DAMP	Padrões Moleculares Associados ao Perigo (do inglês: <i>Danger Associated Molecular Patterns</i>)
DC	Células Dendríticas (do inglês: <i>Dendritic Cells</i>)
DC-SIGN	Molécula Não Integrina Captadora da Molécula de Adesão Intercelular 3 e Específica das Células Dendríticas (do inglês: <i>Dendritic Cell-Specific Intercellular Adhesion Molecule-3-Grabbing Non-integrin</i>)
DNA	Ácido Desoxirribonucléico (do inglês: <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxirribonucleotídeo Trifosfatos (do inglês: <i>Desoxyribonucleoside Triphosphates</i>)
DP	Desvio Padrão
DPP9	Do inglês: <i>Dipeptidyl Peptidase 9</i>
EC	Controladores de Elite (do inglês: <i>Elite Controllers</i>)
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético (do inglês: <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>)

FBS	Soro Fetal Bovino (do inglês: <i>Fetal Bovine Serum</i>)
FC	Do inglês: <i>Fold change</i>
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FSC	Do inglês: <i>Forward Scatter</i>
GALT	Tecido Linfoide Associado ao Intestino (do inglês: <i>Gut Associated Lymphoid Tissue</i>)
GAPDH	Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase (do inglês: <i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i>)
GLM	Modelo Geral Linear (do inglês: <i>General Linear Model</i>)
Gp	Glicoproteína (do inglês: <i>Glicoprotein</i>)
GSDMD	Gasdermina D (do inglês: <i>Gasdermin D</i>)
HAT	Do inglês: <i>Histone Acetyltransferase</i>
HBV	Vírus da Hepatite B (do inglês: <i>Hepatitis B Virus</i>)
HC	Hospital das Clínicas
HCL	Ácido Clorídrico (do inglês: <i>Hydrogen Chloride</i>)
HCV	Vírus da Hepatite C (do inglês: <i>Hepatitis C Virus</i>)
HIDS	Síndrome da Hiper IgD (do inglês: <i>Hyper IgD syndrome</i>)
HIV-1	Vírus da Imunodeficiência Humana (do inglês: <i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
HLA	Antígeno Leucocitário Humano (do inglês: <i>Human Leukocyte Antigen</i>)
HSP	Proteína de Choque Térmico (do inglês: <i>Heat Shock Protein</i>)
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
IFI16	Proteína 16 Induzível por Interferon (do inglês: <i>Interferon Inducible Protein 16</i>)
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina (do inglês: <i>Immunoglobulins</i>)
IL	Interleucina (do inglês: <i>Interleukin</i>)

IL-18BP	Do inglês: IL-18 <i>Binding Protein</i>
IL-1Ra	Do inglês: IL-1 <i>Receptor Antagonist</i>
INR	Não Respondedores Imunológicos (do inglês: <i>Immunologic Non-Responders</i>)
IP-10	Proteína Induzida por Interferon (do inglês: <i>Interferon Inducible Protein</i>)
IR	Respondedores Imunológicos (do inglês: <i>Immunologic Responders</i>)
IRF	Fatores Regulatórios de Interferon (do inglês: <i>Interferon Regulatory Factors</i>)
ISG	Genes Estimulados por Interferon (do inglês: <i>Interferon Stimulated Genes</i>)
K+	Potássio
kDa	Quilodalton (do inglês: <i>Kilodalton</i>)
KPNA2	Carioferina subunidade Alfa 2 (do inglês: <i>Karyopherin subunit Alpha-2</i>)
LC	Células de Langerhans (do inglês: <i>Langerhans Cells</i>)
LDH	Lactato Desidrogenase (do inglês: <i>Lactate Dehydrogenase</i>)
LncRNA	RNA longo não codificador (do inglês: <i>Long Non-Coding RNA</i>)
LNTF	Não Progressores a Longo Prazo (do inglês: <i>Long Term Non Progressors</i>)
LPS	Lipopolissacarídeo (do inglês: <i>Lipopolysaccharide</i>)
LRR	Repetições Ricas em Leucina (do inglês: <i>Leucine Rich Repeat</i>)
MBL2	Lectina Ligadora de Manose 2 (do inglês: <i>Mannose Binding Lectin 2</i>)
MEFV	Febre Familiar Mediterrânea (do inglês: <i>Familial Mediterranean Fever</i>)
MIP	Proteína Inflamatória de Macrófagos (do inglês: <i>Macrophage Inflammatory Protein</i>)
miR	MicroRNA
mRNA	RNA mensageiro (do inglês: <i>Messenger RNA</i>)

mtDNA	DNA mitocondrial (do inglês: <i>Mitochondrial DNA</i>)
mTOR	Do inglês: <i>Serine/ Threonine-Protein Kinase</i>
MX2	Do inglês: <i>Human Myxovirus resistance 2</i>
MYD88	Do inglês: <i>Myeloid Differentiation Primary Response 88</i>
NACHT	Domínio de Oligomerização e Ligação de Nucleotídeos (do inglês: <i>Nucleotide-Binding and Oligomerization Domain</i>)
NaCl	Cloreto de Sódio (do inglês: <i>Sodium Chloride</i>)
NAIP	Do inglês: <i>NLR Family Apoptosis Inhibitory Protein</i>
NC	Não Controladores (do inglês: <i>Non Controllers</i>)
NE	Não Estimulado
NFAT	Fator Nuclear de Células T Ativadas (do inglês: <i>Nuclear Factor of Activated T Celss</i>)
NFκB	Fator Nuclear Kappa B (do inglês: <i>Factor Nuclear Kappa B</i>)
NK	Célula Matadora Natural (do inglês: <i>Natural Killer</i>)
NLR	Receptor do Tipo NOD (do inglês: <i>NOD-Like Receptor</i>)
NLRC	Do inglês: <i>NLR family CARD domain-containing Protein</i>
NLRP	Do inglês: <i>LRR and PYD domains-containing Protein</i>
NOD	Do inglês: <i>Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing Protein</i>
OMIM	Do inglês: <i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
OR	Do inglês: <i>Odds Ratio</i>
P2X7R	Receptor Purinérgico P2X7 (do inglês: <i>Purinergic Receptor P2X7</i>)
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos (do inglês: <i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i>)
PBMC	Células Mononucleares de Sangue Periférico (do inglês: <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>)
PBS	Tampão Fosfato Salina (do inglês: <i>Phosphate-Buffered Saline</i>)
PCR	Proteína C Reativa
PD1	Proteína 1 de Morte celular programada (do inglês: <i>Programmed Cell Death Protein 1</i>)

PRM	Moléculas de Reconhecimento de Padrões (do inglês: <i>Pattern Recognition Molecules</i>)
PRR	Receptores de Reconhecimento de Padrões (do inglês: <i>Pattern Recognition Receptors</i>)
PYD	Domínio Pirínico (do inglês: <i>Pyrin domain</i>)
PYHIN	Do inglês: <i>Pyrin and HIN domain-containing protein</i>
RANTES	Do inglês: <i>Regulated on Activation Normal T cell Expressed and Secreted</i>
RIG-I	Gene Induzível ao Ácido Retinóico I (do inglês: <i>Retinoic Acid-Inducible Gene I</i>)
RNA	Ácido Ribonucleico (do inglês: <i>Ribonucleic Acid</i>)
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio (do inglês: <i>Reactive Oxygen Species</i>)
RP	Progressores Rápidos (do inglês: <i>Rapid Progressors</i>)
SAMDH1	Proteína 1 contendo domínio SAM e HD (do inglês: <i>SAM domain and HD Domain-containing protein 1</i>)
sCD14	CD14 solúvel
sCD163	CD163 solúvel
SEAP	Serviço de Extensão ao Atendimento de Pessoas que vivem com HIV/Aids
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único (do inglês: <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
snRNA	RNA pequeno nuclear (do inglês: <i>Small nuclear RNA</i>)
SOCS	Sinalização Supressora de Citocinas (do inglês: <i>Suppressor of Cytokine Signaling</i>)
SSC	Do inglês: <i>Side Scatter</i>
STAT	Do inglês: <i>Signal Transducer and Transcription Activator</i>
SYK	Proteína Tirosina Quinase do Baço (do inglês: <i>Spleen Tyrosine Kinase protein</i>)
T3SS	Sistema de Secreção do Tipo 3 (do inglês: <i>Type 3 Secretion System</i>)

TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;
TGF	Fator de Transformação do Crescimento (do inglês: <i>Transforming Growth Factor</i>)
Th	T Auxiliar (do inglês: <i>T Helper</i>)
TLR	Receptores do Tipo Toll (do inglês: <i>Toll Like Receptor</i>)
TNF	Fator de Necrose Tumoral (do inglês: <i>Tumor Necrosis Factor</i>)
TRIM5	Do inglês: <i>Tripartite Motif-containing Protein 5-α</i>
USP	Universidade de São Paulo
UTR	Região não traduzível (do inglês: <i>Untranslated Region</i>)
Vif	Fator de Infectividade Viral (do inglês: <i>Viral Infectivity Factor</i>)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	28
1.1 Visão geral da infecção pelo HIV-1.....	29
1.2 Resposta imune ao HIV-1.....	35
1.3 Inflamação e exaustão imune decorrente da infecção crônica por HIV em pacientes tratados.....	39
1.4 O inflamassoma.....	41
1.5 O NLRP3 inflamassoma.....	45
1.6 O inflamassoma na saúde e na doença.....	49
1.7 Inflamassoma e HIV.....	51
2. HIPÓTESE DE TRABALHO	55
3. OBJETIVOS	58
3.1 Objetivo Geral.....	59
3.1 Objetivo Específico.....	59
4. MATERIAIS E MÉTODOS	60
4.1 Aprovação do estudo pelos Comitês de Ética em Pesquisa (CEPs).....	62
4.2 Pacientes cronicamente infectados pelo HIV-1 (Pessoas que vivem com HIV/AIDS).....	62
4.3 Grupo controle: indivíduos não infectados pelo HIV-1.....	65
4.4 Amostras biológicas.....	65
4.5 Separação de plasma.....	66
4.6 Isolamento de DNA genômico.....	66
4.7 Seleção de polimorfismos de base única (SNPs).....	66
4.8 Genotipagem de SNPs por ensaio alelo-específico de tipo Taqman.....	68
4.9 Isolamento de leucócitos mononucleares.....	70
4.10 Separação de monócitos e linfócitos a partir dos PBMC.....	71
4.11 Avaliação da pureza de leucócitos isolados por citometria de fluxo.....	72
4.12 Isolamento de RNA total e análise da expressão gênica relativa.....	76
4.13 Isolamento de RNA total compreendendo sncRNAs e análise da expressão do miR-223.....	78
4.14 Estimulação do NLRP3 inflamassoma em PBMC e leucócitos purificados.....	79

4.15	Avaliação da ativação do NLRP3 inflamassoma.....	81
4.15.1	Detecção da ativação de caspase-1.....	81
4.15.2	Avaliação da formação do complexo NLRP3/ASC por imunofluorescência.....	82
4.15.3	Dosagem de citocinas e IgM por ELISA.....	82
4.15.4	Dosagem de LDH por ensaio colorimétrico.....	83
4.16	Avaliação da ativação dos linfócitos e polarização Th1/Th2 por citometria de fluxo.....	83
4.17	Análise estatística.....	84
5.	RESULTADOS	85
5.1	Contribuição de polimorfismos de base única (SNPs) nos genes do NLRP3 inflamassoma na heterogeneidade clínica de indivíduos cronicamente infectados pelo HIV em tratamento antirretroviral.....	86
5.2	Ativação constitutiva aumentada do inflamassoma nas células mononucleares de sangue periférico em pacientes HIV tratados.....	98
5.3	Expressão e ativação constitutiva aumentada do NLRP3 inflamassoma nas subpopulações presentes no PBMC de pacientes infectados pelo HIV.....	104
5.4	Desregulação do NLRP3 inflamassoma em monócitos de pacientes HIV.....	117
5.5	Hiperativação do inflamassoma em linfócitos T CD4+ de pacientes HIV tratados.....	128
5.6	Hiperativação do NLRP3 inflamassoma em linfócitos B de pacientes HIV tratados.....	138
5.7	Efeito do background genético do inflamassoma na ativação do complexo nos leucócitos de pacientes HIV.....	148
6.	DISCUSSÃO	154
7.	CONCLUSÃO	172
	REFERÊNCIAS	175
	APÊNDICE A- Termo de Consentimento Livre Esclarecido- Pacientes HIV	192
	APÊNDICE B- Titulação dos anticorpos monoclonais utilizados em citometria de fluxo no presente estudo	193

APÊNDICE C- Curva de concentração de estímulos- monócitos.....	195
APÊNDICE D- Curva de concentração de estímulos- linfócitos B.....	198
APÊNDICE E- Curva de concentração estímulos- linfócitos T CD4+.....	200
APÊNDICE F- Curva de concentração inibidores- monócitos.....	202
APÊNDICE G- Curva de concentração inibidores- linfócitos B.....	204
APÊNDICE H- Resultado completo do estudo de associação.....	206
APÊNDICE I- Artigo publicado: “Antagonistic role of IL-1β and NLRP3/IL-18 genetics in chronic HIV-1 infection”	208
APÊNDICE J- Artigo publicado: “Common pathogen-associated molecular patternss induce the hyper-activation of NLRP3 inflammasome in circulating B lymphocytes of HIV-infected individuals”	209
APÊNDICE K- Concentração plasmática de IL-18 aumentada em pacientes cronicamente infectados pelo HIV tratados.....	210
APÊNDICE L - Artigo publicado: “Inflammasome in HIV infection: Lights and shadowss”	211
Atividades Acadêmicas Extracurriculares.....	212
ANEXOS	

1. INTRODUÇÃO

1.1 Visão geral da infecção pelo HIV

O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV, do inglês: *Human Immunodeficiency Virus*) é um retrovírus, pertencente ao gênero *lentivirus*, e classificado em dois tipos: HIV -1 e -2, sendo o HIV-1 o mais amplamente disseminado e associado a uma maior patogenicidade (Nyamweya et al., 2013). Estima-se que em 2020 cerca de 38 milhões de pessoas viviam infectadas pelo vírus em todo o mundo, com o número de novas infecções no mesmo ano em torno de 1,7 milhão (WHO, 2021).

Desde a sua descrição em 1983, a infecção pelo HIV representa um grande desafio para a medicina devido ao elevado número de casos, a ausência de tratamentos esterilizantes e a patogênese em muitos aspectos ainda desconhecida.

Sabe-se que a transmissão ocorre através do contato de fluidos biológicos infectados (ex. sangue ou secreções genitais) com tecido de mucosa, sangue ou abrasões na pele, sendo que a forma de exposição mais comum ocorre através do contato sexual (Deeks et al., 2015).

As etapas principais do ciclo viral são resumidas na **Figura 1**. A infecção ocorre através da interação entre glicoproteínas do envelope viral (gp120 e gp41) com o receptor (CD4) e correceptores (CCR5 ou CXCR4) presentes na superfície das células alvo (linfócitos T CD4+, monócitos/macrófagos ou células dendríticas). Após a interação inicial e a fusão entre o HIV-1 e a célula alvo, ocorre a descapsidação e liberação das duas fitas de RNA e proteínas virais (ex. Transcriptase Reversa Viral) no citoplasma celular, transcrição reversa do genoma viral (RNA-cDNA) e integração do DNA viral ao genoma do hospedeiro. A transcrição do RNA viral é seguida da tradução das proteínas virais, montagem e brotamento com lise celular (ciclo lítico). Durante a infecção por HIV-1, com a integração do DNA viral ao genoma do hospedeiro, pode ocorrer o estabelecimento de latência, manutenção de reservatórios virais com proliferação celular homeostática, e eventual reativação do ciclo lítico em até décadas após a infecção inicial (Deeks et al., 2015; Sierra et al., 2005).

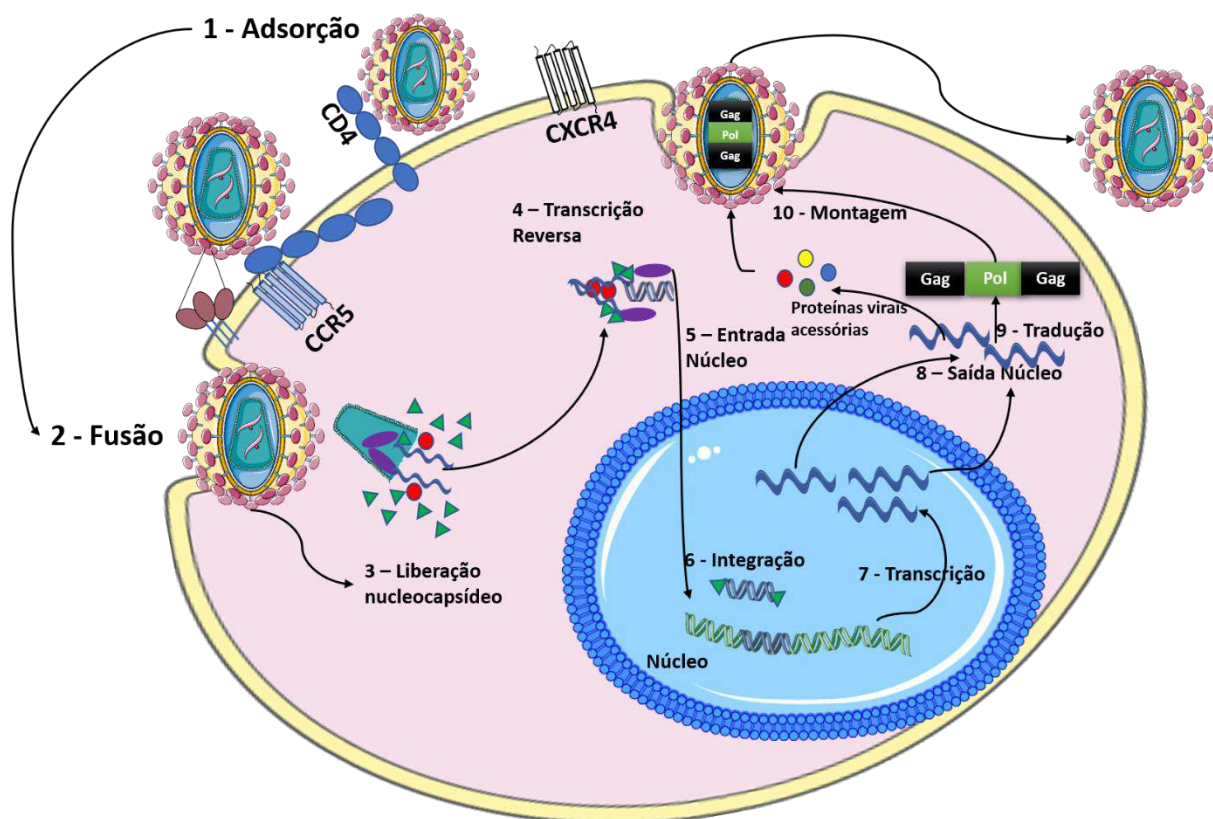


Figura 1. Ciclo de Replicação do HIV-1.

A infecção é iniciada quando glicoproteínas de membrana do envelope ligam-se ao CD4 e ao CCR5 (ou CXCR4) (etapa 1), favorecendo a fusão da membrana do vírus com a membrana da célula hospedeira (etapa 2) e posterior liberação do nucleocapsídeo viral no interior da célula (etapa 3). Uma vez no citoplasma, ocorre o desnudamento do material genético e a transcrição reversa do RNA viral (etapa 4), seguido da entrada do DNA proviral no núcleo (etapa 5), onde o material genético do vírus é integrado ao DNA da célula formando o provírus (etapa 6). A transcrição proviral (etapa 7) mediada pela RNA polimerase II do hospedeiro, gera novos mRNAs que ao saírem do núcleo da célula (etapa 8) são utilizados como fitas molde para a produção de proteínas virais (etapa 9). Com os componentes virais prontos, ocorre a montagem do vírus (etapa 10) seguido do brotamento e liberação de partículas virais imaturas, as quais sofrem o processo de maturação por protease específica quando fora da célula, deste modo, gerando a partícula viral infecciosa.

(Fonte: Próprio autor (**Leal VNC, 2020**), imagens disponíveis em *Smart Servier*-<https://smart.servier.com>. Acessado em fevereiro de 2020).

Quando o HIV-1 consegue ultrapassar as barreiras de mucosa (barreiras químico-físicas), pode infectar as células CD4+ residentes no epitélio, tais como linfócitos T, macrófagos, células dendríticas (DC, do inglês: *Dendritic Cells*) e células de Langerhans (LC, do inglês: *Langerhans Cells*) (Deeks et al., 2015). Macrófagos, DC e LC são mais resistentes à infecção, mas podem “carregar” o vírus na superfície celular e promover a infecção de células vizinhas (fenômeno conhecido como “trans-infecção”) (McDonald, 2010).

Diferentes fatores relacionados tanto ao indivíduo transmissor do vírus (como a carga viral plasmática (CVP) no momento da transmissão), quanto ao indivíduo exposto ao vírus, tais como a integridade das barreiras de mucosa, a presença de moléculas antimicrobianas (ex. β -defensinas; mucinas) e a capacidade do sistema imune inato em eliminar o vírus (ex. produção de interferon de tipo I e indução de fatores de restrição viral; ação das células NK (Do inglês, *Natural Killer*)), exercem fundamental influência no estabelecimento (ou não) da infecção (Deeks et al., 2015; Maartens et al., 2014).

Se a primeira linha de defesa do indivíduo exposto (barreiras anatômicas, moléculas antimicrobianas, resposta inata antiviral) não consegue eliminar o vírus, é ativada também a resposta imune adaptativa. As DC migram do local da infecção para os linfonodos mais próximos (linfonodos drenantes) e apresentam peptídeos virais aos linfócitos T CD4+ para ativar uma resposta antiviral célula-mediada (ativação dos linfócitos T CD8+ citotóxicos) e uma resposta humoral (ativação de linfócitos B para produção de anticorpos) (Deeks et al., 2015; Maartens et al., 2014).

Entretanto, nesse processo ocorre também a migração das células infectadas (ou que carregam o vírus na superfície) e partículas virais até os linfonodos, onde encontram e infectam um grande número de células CD4+, principalmente linfócitos T CD4+ (cuja maioria reside nos órgãos linfóides secundários), alvo preferencial do HIV-1 (Izquierdo et al., 2010). A replicação do vírus nos linfócitos e a liberação das partículas virais induz a morte dos linfócitos infectados (ciclo lítico), bem como a disseminação do HIV-1 para os linfonodos e tecidos periféricos com propagação da infecção. O ciclo lítico do vírus corresponde a depleção de linfócitos T CD4+ e linfopenia na fase aguda da doença. Na maioria das infecções, o genoma viral se integra no DNA da célula infectada e estabelece um estado de latência (ciclo latente), que pode perdurar meses ou anos até ser “reativado” para novos ciclos líticos. Na “janela” de latência o vírus está “escondido” nas células infectadas que constituem os assim chamados “reservatórios virais” (Deeks et al., 2015; Maartens et al., 2014).

Considerando o papel central das células T CD4+ em orquestrar a resposta imune, a infecção e depleção desses linfócitos representa o evento central na patogênese da infecção pelo HIV-1. No que tange a história natural da infecção, os indivíduos infectados por HIV-1 (pacientes HIV) apresentam uma

gradual queda dos níveis de células T CD4+, que está diretamente associada com o aumento da CVP e a progressão da infecção. A imunodeficiência secundária à infecção (Síndrome da imunodeficiência adquirida; Aids, do inglês: *Acquired Immunodeficiency Syndrome*), que deriva da intensa linfopenia, predispõe os pacientes a infecções oportunistas (como candidíase, criptococose, citomegalovirose) e/ou complicações oncológicas (como câncer cervical e sarcoma de Kaposi). A Aids é um termo que se aplica para os estágios mais avançados da infecção por HIV, sendo definida pela ocorrência de infecções oportunistas e/ou complicações oncológicas, e contagem de linfócitos T CD4+ abaixo de 200 células/mm³ de sangue, sendo a maior causa de morte relacionada ao HIV-1 em pacientes não tratados (Mindel, Tenant, 2001).

Atualmente não existe cura para infecção pelo HIV, porém existe tratamento. Diversos fármacos antirretrovirais foram desenvolvidos nas últimas décadas com alvos em distintas etapas do ciclo viral (ex. inibidores da retrotranscrição, da montagem de novas partículas virais, da entrada do vírus na célula alvo ou da integração do genoma viral ao genoma humano), e utilizados em combinações (terapia antirretroviral combinada, cART, do inglês: *Combined Antiretroviral Therapy*) podendo inibir (mas não eliminar completamente) a replicação do vírus. Como consequência, se reduz a CVP, prevenindo a propagação da infecção e a depleção de linfócitos T CD4+, e minimizando a possibilidade de desenvolvimento de Aids e de transmissão do vírus (Chen et al., 2007; Younai, 2013).

Apesar da eficácia da cART na inibição da replicação do HIV, o tratamento possui efeito limitado nos sítios de latência. O processo de estabelecimento de latência ocorre principalmente nos linfócitos T CD4+, monócitos e macrófagos, em tecidos periféricos (linfonodos periféricos, trato gastrointestinal e sistema nervoso central), que por serem considerados muitas vezes sítios imunologicamente privilegiados, e/ou por possuírem uma limitada penetração da droga antirretroviral, constituem um dos principais desafios na eliminação do vírus (Finzi et al., 1997; Wong et al., 1997; Chomont et al., 2009).

Clinicamente, a infecção natural pelo HIV-1 é caracterizada por 4 etapas principais, e pode ser acompanhada pela medição da CVP e contagem de linfócitos T CD4+ sanguínea (**Figura 2**) (Pantaleo et al., 1993). Se o vírus não é eliminado nos primeiros momentos da infecção, observa-se uma diminuição de

células T CD4+ (decorrente da infecção e lise dos linfócitos), acompanhada de um aumento da CVP cerca de 6 semanas pós-infecção (fase aguda). Em geral, o sistema imunológico controla a replicação viral através da ação das células T citotóxicas (CTL, do inglês: *Cytotoxic T Cells*) e também células NK (Alter, Altfeld, 2009), e a infecção entra na sua fase crônica (com vírus latente na maioria das células infectadas, com baixa ou nula replicação viral).

Se, em consequência de outra infecção ou ativação estéril do sistema imune, o HIV-1 é reativado nas células com vírus integrado no genoma, observa-se um aumento da CVP e uma diminuição progressiva dos linfócitos T CD4+ que pode levar o indivíduo não tratado com ART a progredir para Aids (**Figura 2**).

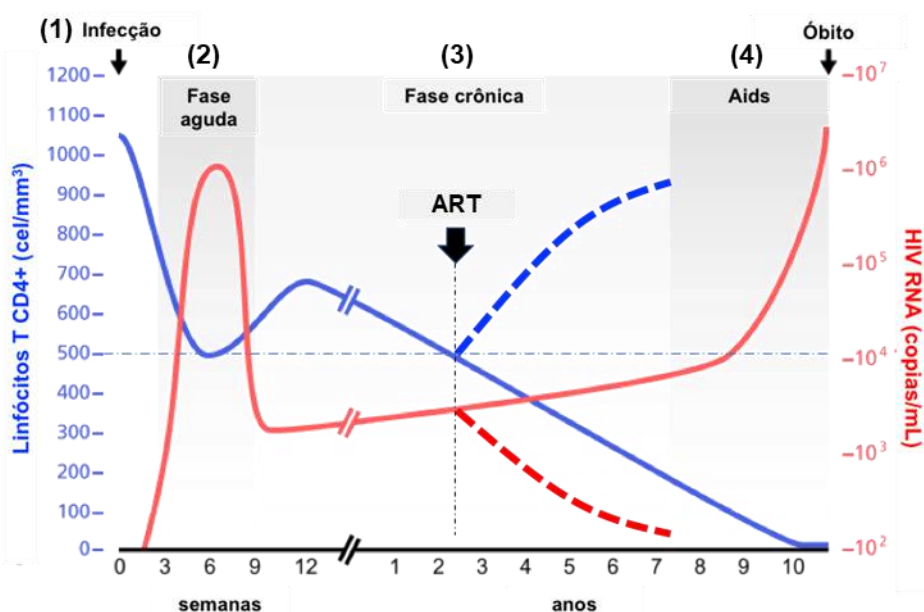


Figura 2. Etapas da infecção natural por HIV-1.

(1) Fase de Eclipse: Infecção inicial sem alterações significativas na contagem de linfócitos T CD4+ e Carga Viral Plasmática (CVP) e ausência de detecção viral sorológica; (2) Fase Aguda: Caracterizada por um aumento de CVP e queda de células T CD4+ com importante resposta de CTL e soroconversão; (3) Fase crônica: Latência Clínica com progressiva perda de linfócitos T CD4+ e aumento de CVP; (4) Desenvolvimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Aids) caracterizada pela redução de linfócitos T CD4+ abaixo de 200 células/mm³ de sangue, elevada CVP e surgimento de infecções oportunistas e complicações oncológicas.

Fonte: Modificada de Pantaleo, 1993.

Vale destacar que existe uma grande variabilidade interindividual de resposta, e que esse padrão não se aplica a todos os pacientes infectados. Baseado no perfil de resposta (na ausência de ART) os pacientes podem ser classificados em: (1) não progressores a longo prazo (LTNP, do inglês: *Long Term Non Progressors*), indivíduos assintomáticos com contagens de linfócitos

T CD4+ \geq 500 células/mm³ de sangue por um período prolongado (> 10 anos) e baixa viremia; (2) controladores de elite (EC, do inglês: *Elite Controllers*), que mantêm a contagem de linfócitos T CD4+ estável (contagem \geq 500 células/mm³ de sangue) e apresentam viremia indetectável; (3) progressores rápidos (RP, do inglês: *Rapid Progressors*), que apresentam contagem de linfócitos T CD4+ menor que 300 células/mm³ de sangue no período de 3 anos após o primeiro teste sorológico positivo; e (4) não controladores (NC, do inglês: *Non-Controllers*): mantêm a carga viral plasmática acima de 10000 cópias/mm³ (Gurdasani et al., 2014).

A introdução da ART representa uma importante e efetiva estratégia terapêutica no controle da replicação viral e recuperação dos níveis de linfócitos T CD4+ no sangue periférico, reduzindo a morbidade e elevando consideravelmente a expectativa de vida dos indivíduos infectados (Lundgren et al., 2016). Entretanto, mesmo com a eficácia na supressão da replicação viral, a recuperação imunológica dos pacientes tratados também é considerada heterogênea. Alguns indivíduos apresentam recuperação insuficiente na contagem de linfócitos T CD4+ e são classificados como não respondedores imunológicos (INR, do inglês: *Immunologic Non-Responders*), já os que apresentam uma robusta recuperação dos níveis de linfócitos T CD4+ são classificados como respondedores imunológicos (IR, do inglês: *Immunologic Responders*) (Yang et al., 2020).

Além dessa heterogeneidade em termos de resposta à terapia, vale destacar que, diferentemente do observado no sangue periférico, a ART não é capaz de levar a uma restauração completa dos níveis de linfócitos T CD4+ residentes em tecidos periféricos, como no tecido linfoide associado ao intestino (GALT, do inglês: *Gut-Associated Lymphoid Tissue*) (Guadalupe et al., 2003). Essa depleção de células T CD4+ (principalmente células T regulatórias) na mucosa intestinal, é relacionada a uma importante enteropatia, caracterizada pelo aumento da permeabilidade intestinal e consequente passagem da microbiota, ou de moléculas derivadas dos seus microrganismos, do lúmen intestinal para o tecido submucoso e circulação sanguínea e/ou linfática (fenômeno conhecido como translocação microbiana), com indução de inflamação local e eventualmente sistêmica (Brenchley et al., 2006).

Outra causa de inflamação nos pacientes tratados é a citotoxicidade induzida pelos próprios fármacos, que leva a liberação de alarminas e outras moléculas derivadas da lise celular, induzindo a produção de mediadores inflamatórios pelo sistema imune (Deeks, et al. 2013; Maartens et al., 2014).

Desta forma, a infecção crônica por HIV-1, mesmo se tratada com sucesso, traz outras problemáticas relacionadas com a inflamação crônica e a exaustão imune em alguns pacientes, resultando em uma maior susceptibilidade a algumas infecções e/ou baixa responsividade a vacinas profiláticas (ex. vacina para Hepatite B (Lara et al., 2017)).

Além disso, em alguns pacientes a inflamação crônica pode representar um fator de risco para o desenvolvimento de comorbidades e aumento de mortalidade por patologias não-Aids, tais como: doenças cardiovasculares (ex. aterosclerose), doença renal, problemas neurocognitivos e maior susceptibilidade a alguns tipos de câncer (Hsu, Sereti, 2016).

Levando tudo isso em consideração, a infecção por HIV tratada passou a ser considerada uma doença inflamatória crônica (Deeks et al., 2013), e como tal, um traço multifatorial. Fatores do vírus e do hospedeiro, tais como perfil genético da resposta imune, repertório de linfócitos (T, NK), hábitos sociais e ambiente (ex. Presença de outras infecções), moldam o prognóstico e a qualidade de vida do paciente.

1.2 Resposta imune ao HIV-1

A primeira resposta do sistema imune ao HIV-1 baseia-se na presença de barreiras físicas (ex. integridade do epitélio da mucosa) e químicas presentes nas mucosas (moléculas e peptídeos antimicrobianos, tais como β -defensinas e mucinas), no reconhecimento do vírus pelas células residentes na mucosa (Espíndola et al., 2016), e também por moléculas solúveis de reconhecimento de padrões (PRMs, do inglês: *Pattern Recognition Molecules*), tais como a Lectina Ligadora de Manose 2 (MBL2, do inglês *Mannose Binding Lectin 2*), que pode atuar neutralizando o vírus, ou como opsonina auxiliando a fagocitose do vírus, ou ainda como iniciadora do sistema complemento (Haurum et al., 1993; Saifuddin et al., 2000).

Receptores de reconhecimento de padrões (PRRs, do inglês: *Pattern Recognition Receptors*) expressos nas células CD4⁺ residentes no tecido (como os macrófagos, DC e LC) e em células não imunes, tais como as células epiteliais, são responsáveis pela detecção precoce do HIV-1 (Espíndola et al., 2016)

Os receptores do tipo Toll (TLR, do inglês: *Toll Like Receptors*) 2 e 4, e o receptor de lectina DC-SIGN (Do inglês: *Dendritic Cell-Specific Intercellular Adhesion Molecule-3-Grabbing Non-Integrin*) que estão presentes na superfície celular, reconhecem a glicoproteína do envelope viral gp120 (Nazli et al., 2013; Geijtenbeek et al., 2000); Os TLR-7 e 8, reconhecem o RNA viral no compartimento endossômico (Heil et al., 2004); os receptores citoplasmáticos de RNA, como o RIG-I (Do inglês: *Retinoic Acid-Inducible Gene 1*), e de DNA, como o IFI16 (Do inglês: *Interferon Inducible Protein 16*), reconhecem o RNA viral e o genoma viral após retrotranscrição (cDNA), respectivamente (Berg et al., 2012; Jakobsen et al., 2013).

O reconhecimento do vírus através desses PRRs inicia uma sinalização intracelular que culmina na ativação de fatores de transcrição, tais como o fator nuclear kappa B (NF- κ B, do inglês: *Factor Nuclear Kappa B*) e/ou fatores regulatórios de Interferon (IRFs, do inglês: *Interferon Regulatory Factors*) (Bergantz et al., 2019).

O NF- κ B é responsável pela transcrição de genes de diversas citocinas pro-inflamatórias, tais como a interleucina (IL, do inglês: *Interleukin*) -1 β , IL-6, IL-8, o fator de necrose tumoral (TNF, do inglês: *Tumor Necrosis Factor*), e também das quimiocinas MIP (Do inglês: *Macrophage Inflammatory Protein*) -1a/CCL2, MIP-1b/CCL3, RANTES/CCL5 (Do inglês: *Regulated on Activation Normal T Cell Expressed and Secreted*) ou IP-10/CXCL10 (do inglês: *Interferon Inducible Protein*) (Bergantz et al., 2019).

Os IRFs, por outro lado, ativam a transcrição de genes envolvidos na restrição do vírus, tais como interferons de tipo I: IFN (*Interferon*) - α e - β , que, por sua vez, induzem de forma autócrina (na mesma célula) ou parácrina (nas células vizinhas) a assim chamada imunidade antiviral intrínseca, que é mediada por genes e fatores de restrição viral (genes estimulados por interferon/ISG, do inglês: *Interferon-Stimulated Genes*). Entre os fatores de restrição viral importantes na infecção pelo HIV destacam-se: a deoxinucleosídeo-trifosfato

hidrolase SAMHD1 (do inglês: *SAM Domain and HD Domain-Containing Protein 1*) que inibe a replicação viral degradando os deoxinucleotídeo trifosfatos (dNTP, do inglês: *Deoxynucleotide Triphosphates*); a citidina deaminase APOBEC3G (Do inglês: *Apolipoprotein B mRNA Editing Enzyme Catalytic-like 3 G*), que afeta a replicação viral, substituindo uma citidina por uma uracila; e o MX2 (Do inglês: *Human Myxovirus Resistance 2*) que interage com proteínas do nucleocapsídeo ou outras proteínas virais impedindo a montagem do vírion (Bergantz et al., 2019; Soper et al., 2017).

Este primeiro reconhecimento do vírus pelo sistema imune inato leva, por um lado, a inibição da replicação viral na célula infectada e nas células adjacentes, e por outro, ativa uma resposta inflamatória com recrutamento de leucócitos circulantes, tais como células NK e monócitos (que se diferenciam em macrófago no tecido), que desempenham uma importante função antiviral induzindo apoptose das células infectadas e/ou eliminando o vírus e as células apoptóticas (McMichael et al., 2010).

Quando a imunidade inata não consegue eliminar o vírus, é induzida a resposta adaptativa, o qual linfócitos T e plasmócitos ativados nos órgãos linfóides secundários são recrutados no local da infecção. O esperado para uma resposta antiviral é que seja induzida uma resposta adaptativa célula-mediada (de tipo *T helper 1*, Th1), que resulta em produção de elevados níveis de IFN- γ , ativação de CTL, e resposta humoral com produção de anticorpos de classe IgG e IgA, que possam neutralizar o vírus, auxiliar a remoção do vírus por fagócitos, e auxiliar a atividade citotóxica das NK (ADCC, do inglês: "*Antibody-dependent Enhancement*") (Migueles, Connors, 2015).

Entretanto, nos pacientes com infecção crônica por HIV, a resposta imune não resulta eficaz para eliminação do vírus. Na maioria dos pacientes os anticorpos produzidos não são neutralizantes (Mayr et al., 2017) e alterações na resposta adaptativa célula-mediada (como o desbalanço Th1/Th2) estão associadas com pior prognóstico da infecção e progressão para Aids (Becker, 2004). Vale ressaltar que as células com infecção latente não são reconhecidas pelo sistema imune, ou podem residir em tecidos/órgãos imunologicamente privilegiados, representando um importante reservatório viral "silencioso" (Dufour, et al., 2020).

A fase crônica da doença é caracterizada por uma contínua ativação do sistema imune decorrente da: (1) replicação do vírus e consequente depleção de linfócitos T CD4+ que contribui para (2) destruição da mucosa intestinal com consequente translocação de produtos da microbiota ao nível sistêmico (ex. LPS) (Brenchley et al., 2006) e (3) susceptibilidade a coinfeções por outros patógenos, tais como Herpesvírus ou Citomegalovírus (Deeks et al., 2013b).

Como consequência, se estabelece um estado pró-inflamatório e um círculo vicioso, onde o vírus ativa o sistema imune e a ativação do sistema imune, por sua vez, promove a replicação viral. A contínua ativação do sistema imunológico não leva apenas a uma perda de células T, mas também a um declínio da capacidade regenerativa do sistema imune (imunossenescência), e mudança no perfil de resposta de diferentes células imunes (como o aumento de células T e B ativadas, hipergamaglobulinemia de células B e incapacidade das DC de orquestrar uma adequada ativação dos linfócitos) (Deeks et al., 2013).

Entretanto, ainda não está elucidado porque entre os indivíduos que entram em contato com o vírus, alguns não são infectados ou conseguem montar uma resposta antiviral eficaz, enquanto outros são mais susceptíveis à infecção com diferentes perfis de controle da replicação viral e progressão da doença, conforme mencionado anteriormente (seção 1.1).

Diversos fatores contribuem para essa heterogeneidade de resposta ao HIV-1, tanto nas primeiras fases da infecção, quanto na infecção crônica. Dentre eles, destacam-se alguns aspectos relacionados ao vírus, como a presença de proteínas do HIV-1 que antagonizam os fatores de restrição viral (ex. Fator de infectividade viral/Vif que inibe o Mx2; (Soper et al., 2017)) e a elevada taxa de mutagênese do HIV-1 que interfere com o reconhecimento específico dos receptores linfocitários e, conseqüentemente, com a resposta adaptativa (tanto citotóxica quanto mediada por anticorpos) (Deeks et al., 2015).

Além disso, o perfil genético do paciente também pode afetar o prognóstico da infecção. Um exemplo bem conhecido é a deleção de 32 pares de bases ($\Delta 32$) do receptor da quimiocina RANTES/CCL5, o CCR5, um dos co-receptores do HIV. A deleção causa a impossibilidade do CCR5 ser expresso na superfície da célula. Quando o alelo CCR5 $\Delta 32$ é presente em homozigose, a maior parte dos indivíduos resultam resistentes a infecção pelo HIV-1. Em heterozigose, o alelo CCR5 $\Delta 32$, está associado a um melhor controle da

infecção e a um melhor prognóstico (Dean et al., 1996; Zimmerman et al., 1997). Por outro lado, variantes que levam a perda de função de fatores de restrição viral, tais APOBEC3, TRIM5 α , Mx2, favorecem a suscetibilidade do indivíduo à infecção e aceleram a progressão da doença (Gourraud et al., 2011; An et al., 2016; Kömürlü et al., 2019).

Alelos de HLA também foram associados tanto com a susceptibilidade ao vírus, quanto ao prognóstico. HLA de classe I, que estão envolvidos com a apresentação de antígenos virais e a ativação de linfócitos T CD8+, são os que mais resultaram associados com a infecção, tais como os alelos de proteção HLA-B27, HLA-B57, ou os alelos de risco HLA-B35, HLA-A23 (Kaslow et al., 1996; Piacentini et al., 2009; An, Winkler, 2010).

Ademais, variantes polimórficas nos genes de receptores do sistema imune inato (TLR3, DC-SIGN, MBL), de moléculas antimicrobianas (defensinas, LL37), de quimiocinas (Ex: CCL5), e citocinas (Ex: IL-10, IFN- γ), podem afetar tanto a susceptibilidade individual ao vírus, quanto o quadro clínico do paciente infectado e o prognóstico da doença (An, Winkler, 2010).

É interessante destacar que os mesmos fatores genéticos podem estar também associados a resposta a intervenções terapêuticas, a exemplo da imunização com vacina de DCs autólogas (Segat et al., 2010; Reis et al., 2018).

1.3 Inflamação e exaustão imune decorrente da infecção crônica por HIV em pacientes tratados

Aumentados níveis séricos de mediadores inflamatórios (como IL-6, IL-1 β e IL-18), de moléculas microbianas derivadas da translocação intestinal (como o LPS) ou seus ligantes (como o CD14 solúvel), são frequentemente encontrados em pacientes HIV em tratamento, assim como elevada contagem de leucócitos circulantes ativados e/ou “exaustos”, ou seja, com uma reduzida capacidade de responder a novos estímulos. Marcadores de ativação encontram-se aumentados em monócitos (CD16), células dendríticas (HLA-II, CD83, CD86) (Stiksrud et al., 2019) e linfócitos T (CD38, HLADR) (Paiardini, Müller, 2013). No caso dos linfócitos T, a exaustão se manifesta como reduzida capacidade de proliferação quando ativados, e, fenotipicamente, com um aumento de expressão de moléculas inibitórias (ex. PD-1 e CTLA-4) (Fenwick et al., 2019).

A infecção por HIV induz diversas perturbações também nos linfócitos B. Enquanto que na fase de replicação viral é observada uma ativação policlonal das células B, na fase crônica existe um desbalanço nos níveis de células de memória e *naive*. As células B de memória (CD27+) resultam fenotipicamente ativadas (com uma baixa expressão de CD21; CD27+ CD21 *Low*), enquanto que se observa uma redução das células B de memória em repouso (CD27+CD21+) (Moir, Fauci, 2009).

Na tabela a seguir são resumidos alguns dos principais marcadores de ativação do sistema imunológico aumentados durante a fase crônica da infecção, e diretamente associados a progressão da doença (**Tabela I**).

Tabela I: Marcadores de ativação imunológica durante a infecção crônica pelo HIV-1.

Compartimento	Marcador	Referência
Mediadores solúveis	IFN- α	Stacey et al., 2010
	IL-6	
	IL-8	
	TNF	Okay et al., 2020
	TGF	Dickinson et al., 2020
	sCD14	Kelesidis et al., 2012
	sCD163	Burdo et al., 2011
	MIP-1 α	Keating et al., 2011
	MIP-1 β	
	RANTES	
	IP-10	Stacey et al., 2010
	PCR*	Vishwanath et al., 2016
	IL-18	Stacey et al., 2010
	IL-1 β	Okay et al., 2020
Linfócitos T CD4+	CD38, HLA-DR	Paiardini, Müller, 2013
Linfócitos T CD8+	CD38, HLA-DR	
Linfócitos B	CD27+ CD21 <i>low</i>	Moir, Fauci, 2009
NK	CD56dimCD16+	Kuri-Cervantes et al., 2014
Monócitos	ASC, CD14+CD16+	Ahmad et al., 2018
		Stiksrud et al., 2019
Células Dendríticas	HLA-II, CD83, CD86	Stiksrud et al., 2019

*Proteína C reativa.

1.4 O inflamassoma

O termo inflamassoma foi cunhado pelo grupo de Tschopp (2002), e refere-se a um complexo citosólico de alto peso molecular que medeia a clivagem das formas inativas das citocinas IL-1 β e IL-18 (pro-IL-1 β e pro-IL 18, respectivamente) pela ativação de proteases baseadas em cisteína e ácido aspártico, as caspases (Do inglês: *Cysteine-Aspartic-Acid-Proteases*) inflamatórias (caspase-1, -4, -5), com a contribuição eventual da proteína adaptadora ASC (Do inglês: *Apoptosis-Associated Speck-Like Protein Containing a CARD*) (Martinon et al., 2002).

Mais recentemente foi descoberto que a ativação das caspases inflamatórias leva também a clivagem da gasdermina D (GSDMD), cujo fragmento amino (N)-terminal de 30 kDa se insere na membrana plasmática formando poros e levando a liberação da IL-1 β e IL-18 e/ou, eventualmente, a morte celular altamente inflamatória conhecida como piroptose (Shi et al., 2015).

Na **Figura 3** é apresentado uma representação esquemática dos principais componentes envolvidos na ativação do complexo.

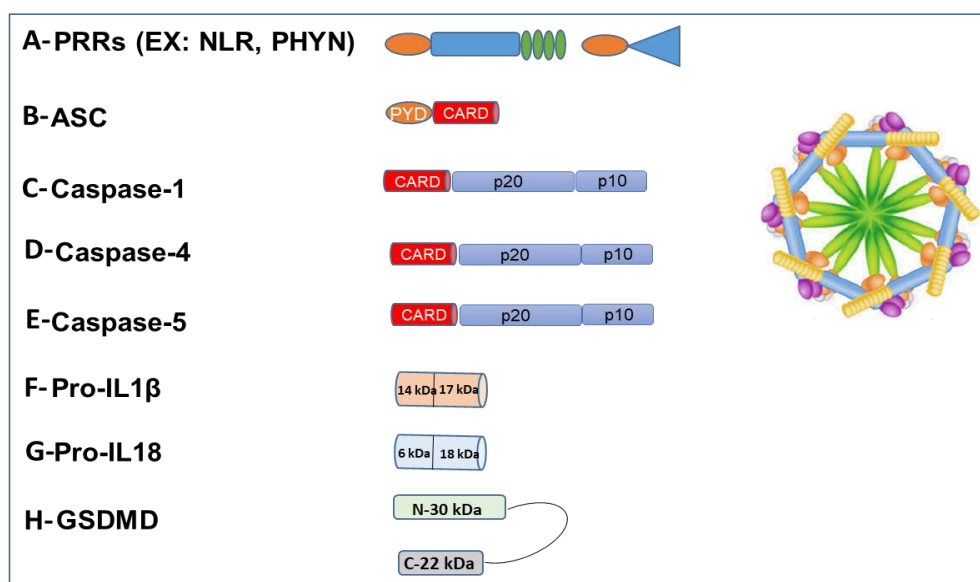


Figura 3. Principais componentes do inflamassoma.

Na figura são representadas as principais proteínas envolvidas na ativação do complexo inflamassoma e os respectivos domínios e/ou peso molecular dos fragmentos. **(A)** PRRs (ex. NLR, PHYN); **(B)** Proteína adaptadora ASC; Enzimas efetoras **(C)** Caspase-1, **(D)** -4, **(E)** -5; Citocinas inflamatórias na forma inativa **(F)** Pro-IL-1 β e **(G)** Pro-IL18; Proteína formadora de poro na membrana, **(H)** gasdermina D.

PYD: Domínio N-terminal de tipo pirínico (Do inglês: *Pyrin Domain*); CARD: domínio N-terminal de tipo CARD (Do inglês: *Caspase Recruitment Domain*).

Fonte: Próprio autor (Leal VNC, 2020).

O inflamassoma é formado em resposta ao reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, do inglês: *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) ou a dano (DAMPs, do inglês: *Damage-Associated Molecular Patterns*) por receptores citosólicos de padrões moleculares, PRRs. Existem vários PRRs que podem ativar o complexo inflamassoma, como o NLRP1, NLRP3, NAIP e NLRC4 da família NLR (receptores contendo um domínio central NACHT e um domínio C-terminal de tipo LRR), ou os receptores de DNA: AIM2 e IFI16, ou a Pirina/MEFV (Christgen, Kanneganti, 2020).

O reconhecimento pelos receptores do inflamassoma pode ser direto, como no caso do NAIP que é ativado pela flagelina bacteriana ou pelo sistema de secreção do tipo 3 (T3SS, do inglês: *Type III Secretion System*) (Zhao, Shao, 2015) ou do AIM2 e IFI16 que reconhecem DNA de dupla fita de origem viral, bacteriana ou endógeno presentes no citosol (Fernandes-Alnemri et al., 2009; Unterholzner et al., 2010; Ma et al., 2018). O reconhecimento pode também ser indireto, como no caso do NLRC4 que interage com o complexo NAIP-flagelina ou NAIP-T3SS (Franchi et al., 2006; Mariathasan et al., 2004).

Outros receptores, como a pirina e o NLRP1, são ativados por ausência/inibição dos próprios inibidores fisiológicos por patógenos ou estresse celular. Toxinas bacterianas (como da *Yersinia spp.* ou do *Clostridium spp.*) ou a inibição da atividade de *small GTPases* ativam a pirina ao inibir a sua fosforilação, permitindo a interação com a chaperonina 14-3-3 (Masters et al., 2016). Já em relação ao NLRP1, a degradação proteolítica do seu inibidor, a Dipeptidil Peptidase 9 (DPP9), por proteases celulares ou virais, leva a ativação desse receptor (Zhong et al., 2018)

O NLRP3, por sua vez, é ativado por uma ampla gama de PAMPs e DAMPs que não interagem diretamente com o receptor, mas induzem alterações citoplasmáticas, como amplamente detalhado a seguir.

Os principais receptores do inflamassoma e seus mecanismos de ativação são resumidos na **Figura 4**.

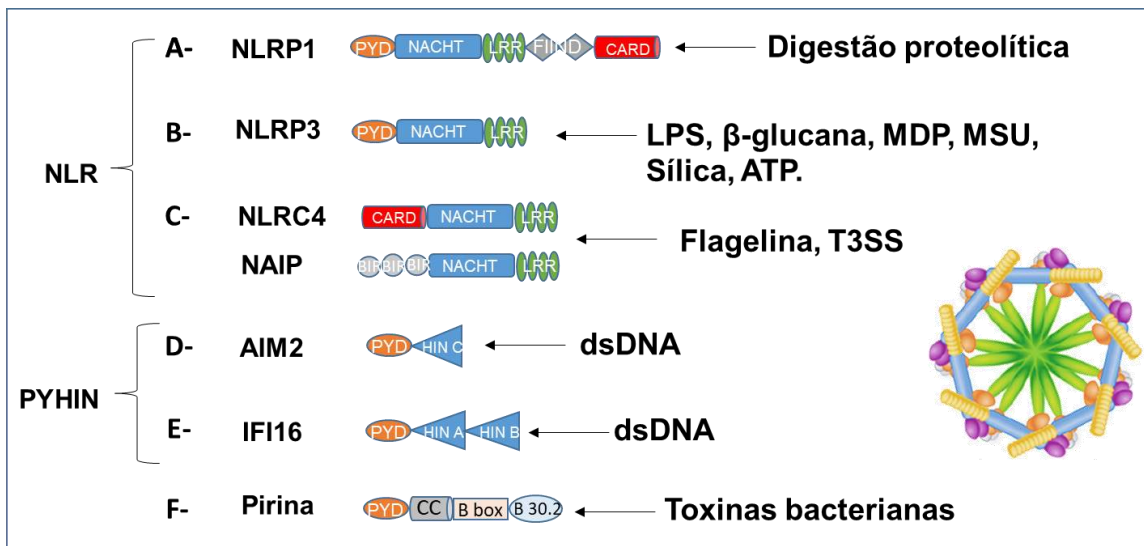


Figura 4. Principais receptores do inflamassoma e seus ativadores.

Receptores da família do tipo NOD (NLR)- (A) NLRP1 - contém o domínio N-terminal de tipo pirínico/PYD, domínio NACHT de oligomerização, região de repetições ricas em leucina (LRR), domínio FIIND1 e CARD C-terminal, ativado por autoclivagem com participação de enzimas proteolíticas; (B) NLRP3 – contém o domínio N-terminal de tipo pirínico/PYD, domínio NACHT de oligomerização, região de repetições ricas em leucina (LRR) ativado após alterações na homeostasia celular induzida por PAMPs e DAMPs como LPS e β -glucana; (C) NLRC4 - contém o domínio N-terminal de tipo CARD, domínio NACHT de oligomerização, região de repetições ricas em leucina (LRR), é ativado ao interagir com NAIP que contém o domínio N-terminal de tipo BIR, domínio NACHT de oligomerização, região de repetições ricas em leucina (LRR) responsável pelo reconhecimento de PAMPs como a flagelina bacteriana e T3SS.

Receptores da família do tipo PYHIN – (D) AIM2 e (E) IFI16 - contém o domínio N-terminal de tipo pirínico/PYD e domínio HIN-200, ativados através do reconhecimento de DNA microbiano ou endógeno.

Pirina – (F) Ativado por toxinas bacterianas, como as decorrentes da *Yersinia spp.*

Fonte: Próprio autor (Leal VNC, 2020).

A liberação das citocinas decorrentes da ativação do complexo está diretamente relacionada ao processo inflamatório. Em relação a IL-1 β , há uma importante atuação tanto em leucócitos, quanto em células não imunes (Ex: Epitélio, endotélio), induzindo, através do receptor IL1R, a ativação do fator de transcrição NF-kB (via Myd88), levando a expressão dos componentes do inflamassoma (*feedback* positivo) e de mediadores inflamatórios, como as citocinas IL-6, TNF- α , e quimiocinas, e de moléculas de adesão para migração leucocitária (Parikh et al., 1997; Rosenwasser, 1998; Yazdi et al., 2016; Mantovani et al., 2018). Além disso, a nível sistêmico, a IL-1 β é capaz de induzir a produção de proteínas de fase aguda (proteína C reativa, proteínas do sistema complemento) pelos hepatócitos, a hematopoiese na medula óssea e o aumento da temperatura corpórea no hipotálamo. Ademais, a ação conjunta da IL-1 β e IL-6 possui um importante papel na polarização dos linfócitos T CD4+ em Th17,

uma sub-população envolvida no recrutamento e ativação de neutrófilos (Yazdi et al., 2016; Acosta-Rodriguez et al., 2007).

Já a IL-18 é uma citocina com importante papel na promoção de secreção de IFN- γ e da atividade citotóxica dos linfócitos NK e T CD8+. Diferentemente da IL-1 β , a IL-18 é induzida tanto por mediadores inflamatórios (via NF- κ B) quanto por IFN-I (via IFRs), atuando através de um receptor da mesma família do IL1R, o IL18R (via MyD88/NF- κ B). Em conjunto com a IL-12, a IL-18 influencia a polarização de linfócitos T CD4+ para um perfil de células produtoras de IFN- γ (Th1), importantes na ativação de macrófagos, linfócitos T CD8+ e ativação de linfócitos B para produção de anticorpos de tipo IgG (Novick et al., 2013; Yasuda et al., 2019). Além disso, a IL-18, diferentemente da IL-1 β , desempenha um importante papel na manutenção da homeostasia dos epitélios, induzindo de forma constitutiva a produção de fatores de defesa (como peptídeos antimicrobianos), de muco e regulação das junções comunicantes (Do inglês: *Gap-Junctions*), preservando, dessa maneira, a integridade da barreira anatômica (Garlanda, et al., 2013; Nowarski et al, 2015; Mantovani et al, 2019).

A ativação do inflamassoma é fortemente regulada em distintos níveis (transcricional e pós-transcricional) (Latz et al., 2013), e de modo célula- ou tecido-específico (Yin et al., 2009). Tanto células do sistema imune inato, como monócitos e DC, quanto células não leucocitárias, como células epiteliais, endoteliais, ou neurônios, expressam os componentes do inflamassoma. Essa expressão pode ser constitutiva (como no caso de células de rápida ativação, a exemplo dos monócitos) ou induzida através da ativação de PRRs (ex. TLRs) ou receptores para citocinas (como IL-1R, TNFR, etc.) com a participação de fatores de transcrição como o NF- κ B (levando a expressão de *NLRP3*, *AIM2*, *PYCARD/ASC*, *CASP1*, *IL1B*) ou IRFs (induzindo a expressão de *NLRC4*, *IFI16*, *IL18*) desta forma amplificando a resposta inata e inflamatória (Latz et al., 2013).

Entre os mecanismos de regulação pós-transcricionais, mencionamos alguns micro-RNAs, como o miR-223 que inibe a tradução do mRNA do NLRP3 (Bauernfeind et al., 2012); a ubiquitinação dos receptores, de ASC e da caspase-1 (Kattah et al., 2017; Lopez et al., 2020); e a interação dos componentes do complexo com proteínas inibitórias, como proteínas que também contém os domínios CARD ou PYD (Ito et al., 2014). Em conjunto, esses mecanismos influenciam no limiar de ativação do complexo.

Após a ativação do inflamassoma e a liberação das citocinas, mecanismos de regulação negativa (*feedback* negativo) também contribuem para a inibição do complexo, tais como ubiquitinação induzida pelos receptores de citocinas (ex. TNFR), ou nitrosilação induzida pelos receptores acoplados a AMP cíclico (cAMP), como os IFNRs (Guarda et al., 2009, 2011; Mishra et al., 2013); e inibição da resposta pelo antagonista receptorial da IL-1 (IL1Ra, do inglês: *Interleukin 1 receptor antagonist*) e a proteína ligante a IL-18 (IL18BP, do inglês: *Interleukin 18 binding protein*) (Mantovani et al., 2018).

Esses mecanismos de regulação encontram-se alterados em patologias inflamatórias crônicas (como na gota, artrite reumatóide, aterosclerose e obesidade), assim como na presença de mutações genéticas que levam a ativação constitutiva do inflamassoma (síndromes autoinflamatórias hereditárias), enfatizando a sua importância na manutenção do limiar de ativação do complexo (Mangan et al., 2018).

1.5 O NLRP3 inflamassoma

Como o foco do presente estudo é o receptor NLRP3, a seguir são resumidos os principais mecanismos envolvidos na ativação canônica e regulação do NLRP3 inflamassoma.

O NLRP3 é ativado por alterações citoplasmáticas induzidas por PAMPs e/ou DAMPs, como fluxos iônicos e dano mitocondrial ou lisossomal. Entre os mecanismos de ativação propostos, alguns são amplamente aceitos e são reportados a seguir.

O efluxo de potássio (K⁺) gerado por abertura de canais catiônicos ou poros na membrana plasmática é determinado pela maior concentração do cátion no ambiente intracelular que extracelular. Toxinas virais ou bacterianas que perfuram a membrana celular ou o aumento de concentração extracelular de ATP (relacionada, em geral, com a morte lítica das células do local) que, por sua vez, ativa o receptor purinérgico P2X7R com abertura do canal catiônico, podem induzir o efluxo de K⁺ e ativação do NLRP3 (Muñoz-Planillo et al., 2013; Pétrilli et al., 2007). A movimentação de cálcio (Ca²⁺) também foi descrita como capaz de ativar o receptor (Murakami et al., 2012), mas devido a variedade de

mecanismos de sinalização intracelular ativados pelo Ca^{2+} , permanece difícil distinguir uma causa/efeito estritamente relacionada a ativação do NLRP3.

Toxinas microbianas ou estresse metabólico podem atuar a nível mitocondrial levando ao dano da organela com liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês: *Reactive Oxygen Species*), DNA mitocondrial (mtDNA) ou proteínas mitocondriais (ex. Cardiolipina) (Zhou et al., 2011; Shimada et al., 2012). O dano lisossomal gerado por mecanismos de escape de patógenos fagocitados/endocitados, ou de fagocitose/endocitose de partículas não digeríveis, como alguns cristais, também levam a liberação do conteúdo da organela (ex. catepsinas) no citosol (Hornung et al., 2008). Enquanto que existem muitas evidências sobre a relação entre dano a estas organelas e ativação do NLRP3, não se sabe ao certo como a liberação do conteúdo mitocondrial e lisossomal pode ativar esse receptor.

Foram posteriormente descritas outras vias de ativação do NLRP3, a exemplo da via “não canônica” (diferenciando da via “canônica” descrita acima) e vias alternativas (que incluem a participação de PRRs de membrana). A via não canônica de ativação do NLRP3 é secundária a ativação das caspases-4 e -5 pela interação direta de LPS presente no citosol. As caspases clivam a GSDMD levando a formação de poros na membrana e fluxos iônicos, que, por sua vez, ativam o NLRP3 (Latz et al., 2013).

PRRs como o TLR4 ou a Dectina-1 foram também descritos como envolvidos na ativação do NLRP3 através de vias alternativas de sinalização, com a participação de quinases como a Syk (Do inglês: *Spleen Tyrosine Kinase*) e Btk (Do inglês: *Bruton's tyrosine kinase*) (Lee et al., 2012; (Kankkunen et al., 2010). Além disso, os receptores que levam a ativação da caspase-8 também podem ativar o NLRP3, em vias alternativas, ou eventualmente a caspase-1 diretamente, pelo menos em modelo murino (Gurung et al., 2014)

Os principais mecanismos de ativação canônica e regulação do NLRP3 são reportados a seguir na **Figura 5**.

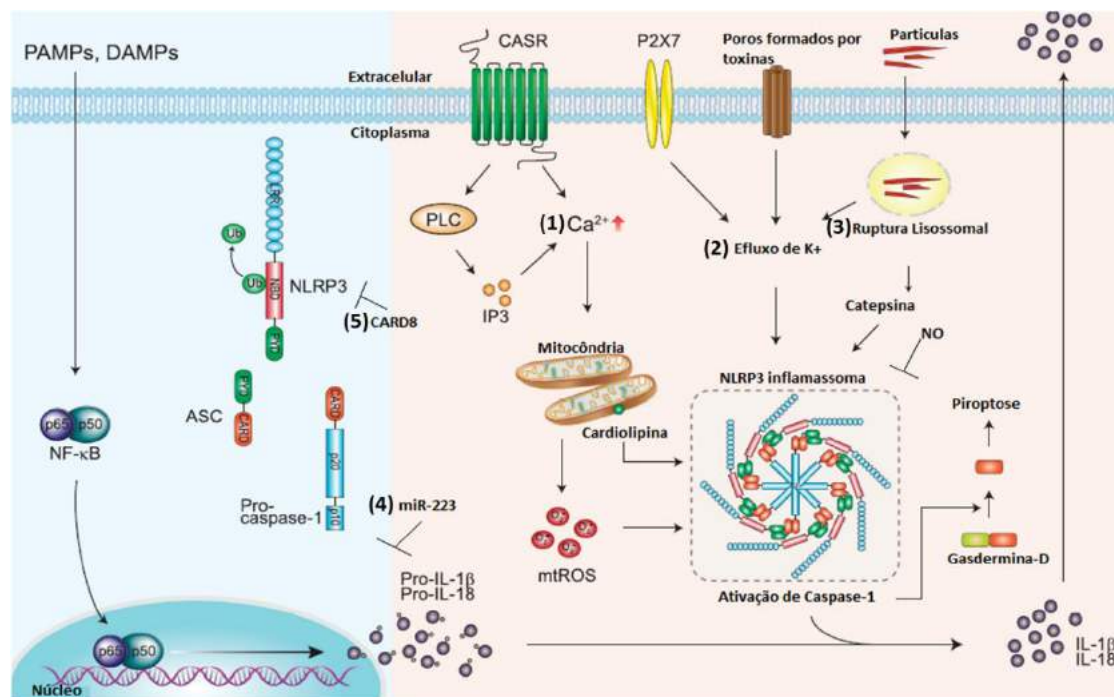


Figura 5: Principais mecanismos envolvidos na ativação e regulação do NLRP3 inflamassoma.

A presença de diferentes PAMPs e DAMPs induz a ativação do fator de transcrição NF- κ B que por sua vez leva a transcrição e subsequente tradução dos diferentes componentes do NLRP3 inflamassoma. Modificações citosólicas como o (1) aumento de Cálcio intracelular e estresse mitocondrial com geração de ROS e liberação de proteínas mitocondriais; (2) O efluxo de potássio decorrente da ativação do receptor purinérgico P2X7R, ou da formação de poros na membrana citoplasmática induzidos por toxinas; (3) liberação citoplasmática de catepsinas lisossomais; levam a formação do complexo com subsequente ativação da Caspase-1 e clivagem de diferentes substratos intracelulares, como as formas inativas da Pro-IL1 β e Pro-IL18 nas formas ativas das citocinas inflamatórias IL1 β e IL18, além da clivagem da Gasdermina-D, importante no processo de morte celular altamente inflamatório denominado piroptose.

Dentre os mecanismos de regulação envolvidos na ativação do complexo, destacam-se (4) o regulador pós-transcricional do NLRP3 (miR-223) que impede a sua tradução levando a degradação do mRNA do NLRP3, (5) o CARD8 que inibe diretamente a proteína NLRP3, ou a Nitrosilação do NLRP3, dentre outros. **Fonte:** Modificado de: Kim, et al., (2017).

A maior parte dos estudos sobre o NLRP3 inflamassoma, são relacionados a células mieloides (granulócitos, monócitos, macrófagos e DC), porém a presença e função do NLRP3 nos linfócitos e em outras células não estritamente imunes (como células epiteliais, endoteliais e neuronais) vêm sendo debatida desde 2007 por Kummer e colaboradores (Kummer et al., 2007).

Nos monócitos humanos, a ativação do NLRP3 inflamassoma é considerada rápida, devido ao fato dessas células apresentarem uma expressão constitutiva dos componentes da via, como do próprio NLRP3, caspase-1, Pro-IL-18 e GSDMD (Viganò et al., 2015; Gritsenko et al., 2020). Na estimulação com PAMPs como o LPS, além da ativação clássica do NLRP3, já foi previamente

descrita a ativação tanto pela indução da via alternativa (TLR4-RIPK1-FADD-CASP8) (Gaidt et al., 2016), quanto pela ativação das enzimas não canônicas (caspase-4 e -5) após internalização do LPS (com participação de TLR4-CD14) e de forma dependente da ativação da quinase *Syk* (Viganó et al., 2015). Essa ágil ativação presente nos monócitos humanos, independente da via, representa uma importante característica no papel dessas células como detentoras de uma rápida resposta a processos infecciosos.

Em linfócitos T CD4+, foram demonstrados diferentes papéis do NLRP3. Arbore, et al., (2016) demonstraram que as células T CD4+ estimuladas com os anticorpos anti-CD3, anti-CD28 e anti-CD46, *in vitro*, produzem IL-1 β através da ativação do NLRP3 inflamassoma, possivelmente pela geração de espécies reativas de oxigênio. Entretanto, os mecanismos envolvidos na ativação do complexo nos T CD4+ ainda não estão totalmente elucidados. Por outro lado, em linfócitos T CD4+ murinos, o NLRP3 pode atuar como um cofator de transcrição de IRF4, promovendo a transcrição do gene *IL4* e cooperando para uma polarização Th2 do linfócito, de maneira inflamassoma independente (Bruchard et al., 2015).

Em linfócitos T CD8+, foi previamente demonstrado a expressão e ativação de componentes do inflamassoma, como a enzima efetora caspase-1 (Arbore et al., 2018). Porém, até o momento, não foi reportada uma ativação específica do receptor NLRP3 diretamente nessa população celular. Entretanto, vale destacar que a ativação do NLRP3 em outras células influencia diretamente na função citotóxica das células T CD8+ (Arbore et al., 2018).

Em linfócitos B, por sua vez, foi demonstrada a ativação do NLRP3 inflamassoma pela via de Dectina-1/*Syk*/*Btk*, após o reconhecimento de β -glucana fúngica (curdlan), levando a produção de IL-1 β (Kumar et al., 2009; Ali et al., 2017). Além disso, foi reportado que a resposta a oligonucleotídeos como a molécula de CpG via TLR9, levava a indução de secreção de anticorpos de tipo IgM, de forma dependente da ativação do NLRP3 e com a participação da proteína mTOR (Ali et al., 2017).

Como mencionado na seção anterior, a ativação do NLRP3 inflamassoma possui distintos mecanismos de regulação, tanto a nível transcricional, sendo a expressão do gene induzida pelo fator de transcrição NF- κ B, e inibida pela sinalização dos receptores de IFNs (Guarda et al., 2011), quanto mecanismos

pós-transcricionais. Quanto a regulação pós-transcricional, mencionamos o miR-223, a ubiquitinação e sumoilação do NLRP3, e a interação com proteínas inibitórias endógenas, como a chaperonina HSP-70 (Martine et al., 2019) e o CARD8 (Latz et al., 2013; Ito et al., 2014). Em conjunto, a adequada regulação da ativação do complexo é de fundamental importância no contexto de diferentes doenças inflamatórias.

1.6 O inflamassoma na saúde e na doença

O inflamassoma desempenha um papel central na interação patógeno/hospedeiro. Uma eficiente ativação do complexo é considerada protetora contra diversas infecções (bactérias, vírus, fungos e protozoários) como amplamente investigado tanto em modelos experimentais, quanto em estudos de associação genética na população humana (Hayward et al., 2018; Fernandes et al., 2020).

Além de desempenhar um papel crucial na imunidade inata, o inflamassoma e suas citocinas representam uma importante conexão entre resposta inata e adaptativa, contribuindo para a polarização dos linfócitos T CD4+ e afetando direta e indiretamente a ativação dos linfócitos, como mencionado anteriormente. Além disso, o inflamassoma ou seus receptores, também podem ser ativados diretamente nos linfócitos T e B, com papéis ainda não totalmente esclarecidos.

Além da função na resposta imune, a ativação do inflamassoma está associada com a manutenção da homeostasia em alguns tecidos, a exemplo do epitélio, onde os receptores NLRP3, NLRC4 e a citocina IL-18 atuam como fatores de proteção da integridade do epitélio e de interação com a microbiota (Hirota et al., 2011; Nordlander et al., 2014; Hausmann et al., 2020).

Os mesmos mecanismos envolvidos na inflamação e na proteção do hospedeiro, no entanto, também podem causar (ou contribuir para) doenças inflamatórias crônicas, estéreis ou infecciosas, monogênicas ou multifatoriais.

Mutações nos genes que codificam para os receptores NLRP1, NLRP3, NLRC4 e pirina foram descritas em pacientes com doenças monogênicas raras, chamadas de síndromes autoinflamatórias, caracterizadas por episódios

recorrentes de febre e inflamação multissistêmica. As mutações encontradas, levam a uma ativação constitutiva dos receptores e, como consequência, do inflamassoma, induzindo um intenso aumento da liberação de IL-1 β e/ou IL-18 e/ou de piroptose, dependendo do receptor envolvido. Vale destacar que o compartimento adaptativo destes pacientes eventualmente encontra-se alterado. Pacientes com mutação ganho-de-função em NLRP3, por exemplo, além de apresentarem elevados níveis de IL-1 β , também apresentam uma maior frequência de células com o perfil Th17 e produção de IL-17 (Alehashemi et al., 2020).

Devido ao seu papel de responder a DAMPs e de amplificar a resposta imune, o inflamassoma e as suas citocinas também são apontados como principais contribuidores na patogênese de doenças inflamatórias multifatoriais comuns na população geral, como doenças inflamatórias crônicas (ex. gota), autoimunes (ex. artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico), cardiovasculares (ex. aterosclerose, isquemia), neurodegenerativas (ex. esclerose múltipla, doença de Alzheimer, doença de Parkinson), obesidade e doenças metabólicas, assim como em alguns tipos de câncer (ex. melanoma, câncer de mama, câncer cervical). (Mangan et al., 2018; Liu et al., 2017; Karki et al., 2017; Patel et al., 2017; Fernandes et al., 2020).

Em alguns casos existe uma ativação direta do inflamassoma, como na ativação pelo ácido úrico na gota (Martinon et al., 2006), por cristais de colesterol na aterosclerose (Düwell et al., 2010), por asbesto no mesotelioma (Kadariya et al., 2016), pela sílica na fibrose pulmonar (Dostert et al., 2008), ou ainda por fibrilas insolúveis (ex. β -amiloide) como no caso da doença de Alzheimer (Halle et al., 2008). O próprio DNA e anticorpos anti-dsDNA podem levar também a ativação direta, como no caso do Lupus (Shin et al., 2013; Zhang et al., 2016). A liberação de metabólitos em excesso pode ativar o complexo em doenças metabólicas ou tumores (Li et al., 2014).

Infecções crônicas também podem resultar na ativação constitutiva do inflamassoma, tanto pelos PAMPs que pelos DAMPs eventualmente gerados de dano tecidual, como reportado na tuberculose (Souza De Lima et al., 2020), na hepatite C (Burdette et al., 2012; Negash et al., 2019) e na própria infecção pelo HIV (Leal et al., 2020)

A identificação e caracterização do perfil de ativação do inflamassoma no contexto das distintas doenças, infecciosas ou não, abre um leque de possibilidades quanto a utilização de inibidores que atuam em pontos específicos da via do inflamassoma. Alguns fármacos já são amplamente utilizados na clínica, possuindo um enfoque na inibição da IL-1 β , a exemplo do Anakinra, (uma versão recombinante não glicosilada do antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra)) utilizado no tratamento de doenças inflamatórias como artrite reumatóide ou CAPS (Do inglês: *Cryopyrin-associated Periodic Syndrome*), e Canakinumab, (anticorpo monoclonal contra a IL-1 β) utilizado na CAPS ou FMF (Do inglês: *Familial Mediterranean Fever.*) (Chauhan et al., 2020).

Ademais, alguns inibidores específicos para os receptores do inflamassoma, a exemplo de antagonistas do NLRP3 (análogos ao MCC950, inibidor específico do NLRP3 amplamente utilizado em laboratório) estão atualmente sendo utilizados em diversos ensaios clínicos para doenças distintas, como CAPS, gota ou aterosclerose (El-Sharkawy et al., 2020; Klück et al., 2020).

1.7 Inflamassoma e HIV

Recentes descobertas apontaram para um papel importante do inflamassoma na patogênese do HIV-1. O nosso grupo e outros pesquisadores demonstraram que o HIV-1 é capaz de induzir a ativação do NLRP3 inflamassoma e a produção de IL-1 β em DC humanas (Pontillo et al., 2012) e em monócitos/macrófagos humanos (Guo et al., 2014). O RNA viral é reconhecido por TLR8 que induz a ativação do NLRP3 através da via alternativa que inclui a caspase-8 (Campbell et al., 2021).

Portanto, a ativação do NLRP3 inflamassoma aconteceria nos primeiros momentos da interação vírus/hospedeiro e contribuiria para resposta antiviral precoce. Nesse sentido, já é conhecida a função antiviral tanto da IL-1 β quanto da IL-18 neste contexto (Wang et al., 2016).

Em acordo, o nosso grupo demonstrou que indivíduos que carregam um polimorfismo genético de base única (SNP, do inglês: *Single Nucleotide Polymorphism*) localizado na região 3'UTR do gene *NLRP3* (rs10754558), que aumenta a estabilidade do receptor (Hitomi et al., 2009) e o nível de ativação do

inflamassoma, ou que carregam variantes associadas a maior produção de IL-1 β , resultam menos susceptíveis a infecção por HIV-1 (Pontillo et al., 2012b).

Quanto aos outros receptores do inflamassoma, até o momento, existem somente evidências sobre uma contribuição do IFI16 na infecção pelo HIV-1. Foi demonstrado que o IFI16 é capaz de reconhecer o genoma do HIV-1 e ativar o inflamassoma em resposta ao vírus. A acumulação de transcritos reversos incompletos durante a replicação do HIV-1 ("infecção abortiva") em linfócitos T CD4+ nos linfonodos, é detectada pelo IFI16 que ativaria a caspase-1, de modo ASC dependente, levando a piroptose (e não a produção de citocinas) do linfócito, contribuindo, portanto, para a depleção dessas células nos órgãos linfoides secundários (Monroe et al., 2014; Nissen et al., 2014; Doitsh et al., 2014; Muñoz-Arias et al., 2015). Além disso, Booiman, Kootstra (2014) demonstraram que a presença de um polimorfismo no gene *IFI16* afeta a contagem periférica de linfócitos T CD4+ durante as fases iniciais da infecção, enfatizando a importância desse receptor na depleção dessas células.

O que se sabe sobre a contribuição dos dois receptores, NLRP3 e IFI16, na interação HIV-1/hospedeiro é resumido na **Figura 6**.

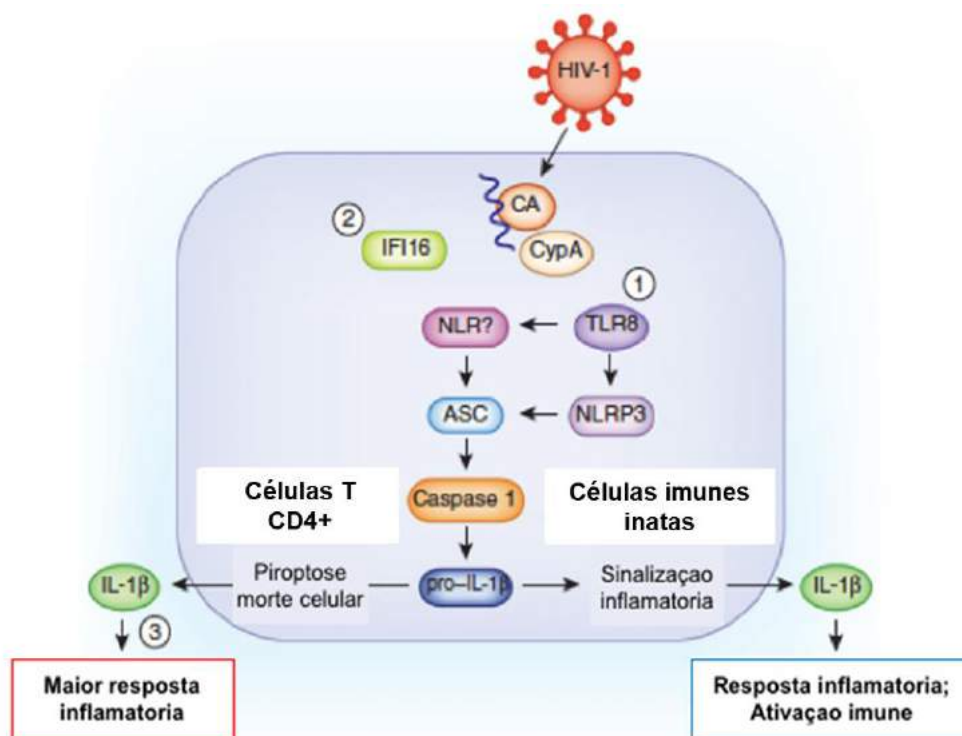


Figura 6. O HIV-1 ativa o inflamassoma através do NLRP3 e IFI16.

(1) Nas células da imunidade inata permissivas ao HIV-1, a sinalização via TLR8 leva a ativação do NLRP3 inflamassoma com produção de IL-1 β . (2) Em linfócitos T CD4+ não permissivos ao HIV-1 (infecção abortiva), transcritos reversos incompletos do HIV-1 são reconhecido pelo IFI16 que ativa o inflamassoma via ASC ou através de um NOD-like receptor (NLR) ainda desconhecido, resultando na piroptose dos T CD4+, e eventualmente na liberação de IL-1 β (3), que por sua vez ativa as células da imunidade inata, como células dendríticas, macrófagos e células NK, e atrai células imunes ao local da infecção.

Fonte: Modificada de Altfeld, Gale (2015).

Por outro lado, ainda são escassos os dados sobre o papel do inflamassoma na fase crônica da infecção por HIV-1, onde, além do vírus, tanto PAMPs (ex: LPS ou outras moléculas provenientes da translocação microbiana) quanto DAMPs originados pela citotoxicidade da ART e/ou pela enterite derivada do dano ao epitélio intestinal (componentes citosólicos liberados por morte celular) poderiam estar atuando na ativação do complexo.

Sabe-se que indivíduos cronicamente infectados pelo HIV apresentam tanto uma elevada expressão de genes dos componentes do NLRP3 inflamassoma em células mononucleares de sangue periférico (PBMC, do inglês: *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) (Bandera et al., 2018), quanto níveis séricos elevados de IL-18, (Stylianou et al., 2003; Wiercinska-Drapalo et al., 2004; Song et al., 2006) sendo positivamente correlacionados com uma maior CVP (Feria et al., 2018), o que sugere que exista uma ativação constitutiva e

sistêmica do inflamassoma nesse grupo de pacientes, afetando inclusive no prognóstico da doença.

Entretanto, ainda não está claro o perfil de ativação de modo célula específica, assim como a contribuição relativa de cada população celular para a inflamação crônica e o desenvolvimento das condições não Aids associadas ao HIV-1.

Além disso, levando em consideração que variantes polimórficas nos genes do inflamassoma estão associadas a diferentes níveis de ativação constitutiva do complexo, acredita-se que o *background* genético do indivíduo possa contribuir para a evolução e heterogeneidade de manifestações clínicas dos pacientes cronicamente infectados, assim como já foi reportado previamente quanto a susceptibilidade à infecção pelo HIV-1 e a progressão à Aids por outros fatores (como HLA-I, CCR5 Δ 32, APOBEC3G, etc.).

2. HIPÓTESE DE TRABALHO

Indivíduos infectados pelo HIV-1 apresentam uma ampla heterogeneidade clínica, que, antes da introdução da ART, resultava em um leque de prognósticos distintos, desde uma latência prolongada sem sintomas ou sinais de doença (LNTP), até a bem conhecida síndrome da imunodeficiência adquirida (Aids), associada a uma elevada taxa de mortalidade, sugerindo a contribuição de outros fatores além do próprio vírus na evolução da infecção.

Estudos genéticos demonstraram que alelos de HLA-I, APOBEC3G, MX2, dentre outros, contribuem para proteção/risco quanto à susceptibilidade à infecção e, na maioria dos casos, progressão para Aids (Dean et al., 1996; Zimmerman et al., 1997; Gourraud et al., 2011; An et al., 2016; Kömürlü et al., 2019). Estudos do nosso grupo detectaram o papel protetor de alelos ganho-de-função de genes do NLRP3 inflamassoma contra a infecção (Pontillo et al., 2010; Pontillo et al., 2012; Pontillo et al., 2013), enfatizando como o complexo, em particular o receptor NLRP3, também estão envolvidos na resposta individual ao HIV.

Mesmo após o advento da ART, a infecção crônica pelo HIV continua sendo uma doença heterogênea. Os indivíduos que vivem com HIV apresentam níveis diferentes de linfócitos T CD4+, carga viral indetectável ou detectável, além de eventualmente desenvolverem uma série de comorbidades relacionadas com a inflamação crônica característica destes pacientes, como amplamente apresentado na introdução.

Nesse sentido, acreditamos que um reduzido limiar de ativação do inflamassoma (em consequência do *background* genético do indivíduo ou de uma ativação crônica secundária a infecção) poderia influenciar no estado clínico do paciente, na capacidade de resposta a estímulos microbianos (decorrentes de patógenos ou imunizações) e no desenvolvimento de comorbidades não Aids associadas a infecção pelo HIV.

Durante o desenvolvimento do projeto, além do conhecido aumento de IL-18 plasmática em pacientes HIV (Stylianou et al., 2003; Wiercinska-Drapalo et al., 2004; Song et al., 2006), e da relação entre ativação de IFI16 e piroptose nos linfócitos T CD4+ (Monroe et al., 2014; Nissen et al., 2014; Muñoz-Arias et al., 2015), existia um estudo reportando a ativação constitutiva do inflamassoma nos PBMC de pacientes cronicamente infectados (Bandera et al., 2018), além do

trabalho do nosso grupo sobre a ativação crônica do NLRP3 inflamassoma em DC de pacientes HIV (Pontillo et al., 2012).

Contudo, não existia uma descrição mais detalhada acerca da contribuição relativa da ativação do complexo nas diferentes populações de leucócitos presentes nos PBMC circulantes em pacientes HIV, sendo considerado que a ativação do complexo acontecesse em geral nos monócitos.

Levando em consideração os estudos que apontavam para uma desregulação do NLRP3 inflamassoma nas células dendríticas derivadas de monócitos de pacientes HIV (Pontillo et al., 2012, Reis et al., 2019), e trabalhos subsequentes que apontaram para uma função do inflamassoma, em particular do NLRP3, em linfócitos T (Arbore et al., 2016; Arbore et al., 2018) e B (Kumar et al., 2009; Ali et al., 2017) humanos, levantamos a hipótese que pudesse existir uma desregulação do NLRP3 inflamassoma, nos monócitos e/ou nos linfócitos T e B circulantes, contribuindo para a inflamação crônica dos pacientes.

Além da eventual contribuição para a produção de citocinas IL-1 β e IL-18 na inflamação, ou na possível depleção de leucócitos por piroptose, uma desregulação do NLRP3 poderia estar relacionada também a uma disfunção da imunidade adaptativa, interferindo com a função dos linfócitos T e B na resposta célula-mediada e humoral.

Ressaltamos que uma maior polarização para resposta de tipo Th2 já foi descrita em pacientes com Aids, e um papel de NLRP3 na indução de uma resposta Th2 foi proposta por Bruchard et al., (2015), tornando interessante a investigação dessa função alternativa do NLRP3 no contexto da infecção pelo HIV. Além disso, uma limitada resposta humoral também caracteriza alguns pacientes HIV (Levesque et al., 2009), podendo estar relacionada tanto a desregulações no linfócito B quanto a defeitos nas células auxiliares, T CD4+ e/ou DC.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar o nível de ativação e a função do inflamassoma, em particular do receptor NLRP3, nos monócitos e linfócitos T e B circulantes de pacientes cronicamente infectados pelo HIV-1 em tratamento antirretroviral, e relacioná-lo com o estado clínico do paciente.

3.2 Objetivos Específicos

1. Analisar o efeito de polimorfismos de base única (SNPs) nos genes envolvidos na função clássica e alternativa do NLRP3 sobre o estado clínico dos pacientes HIV, relacionando com as específicas populações celulares presentes no PBMC;
2. Determinar a presença dos componentes do NLRP3-inflamassoma e o perfil de ativação do complexo em monócitos, linfócitos T e B isolados de PBMC de pacientes HIV;
3. Investigar a função alternativa do NLRP3, nos linfócitos T CD4+ isolados de pacientes HIV, como co-fator de transcrição para IL-4 e a polarização Th2;
4. Investigar um possível efeito do NLRP3 sobre a produção de IgM nos linfócitos B isolados de PBMC de pacientes HIV;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Na **Figura 7** uma representação esquemática reporta as principais etapas do projeto, desde a coleta das amostras biológicas (coorte de estudo), o isolamento do DNA genômico e a genotipagem (estudo de associação genética) até o isolamento de leucócitos e caracterização funcional do NLRP3 inflamassoma (ensaios celulares) e separação do plasma para dosagem de citocinas.

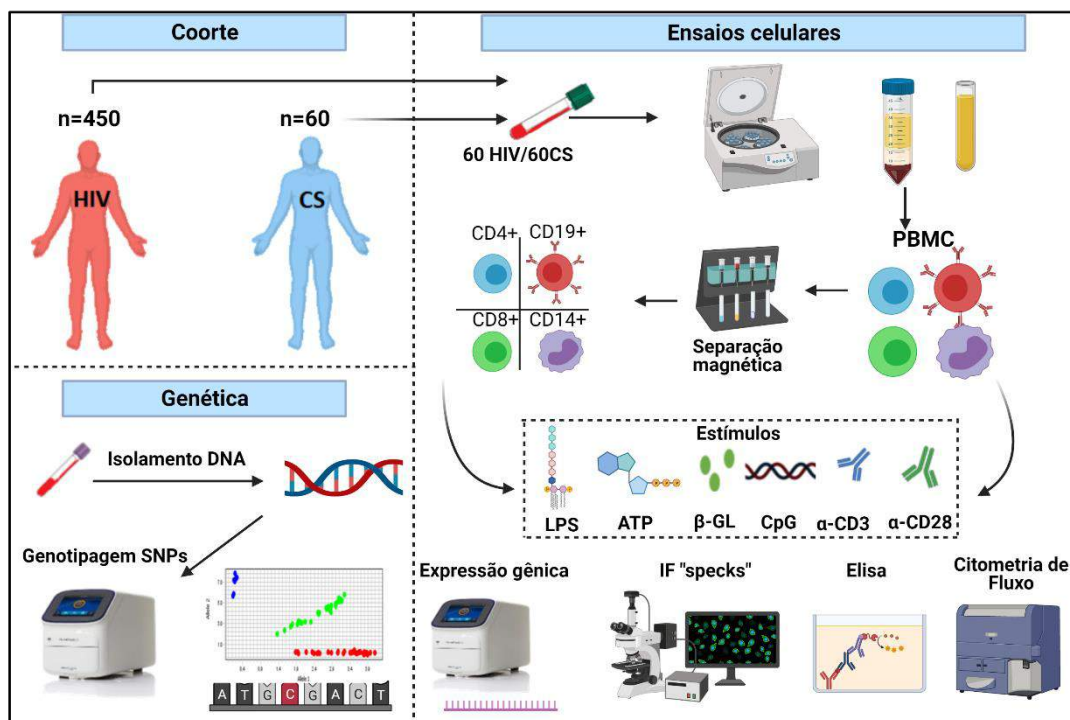


Figura 7. Representação esquemática do trabalho.

Na figura estão representados os controles saudáveis (CS) e pacientes infectados pelo HIV (HIV). De 450 pacientes e 60 CS, foram isolados o DNA genômico para o ensaio de genotipagem e estudo de associação dos polimorfismos de base única (SNPs). Dentre os 450 pacientes, 60 foram incluídos para os ensaios celulares em conjunto com os 60 CS. Ensaio celular: Células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram isoladas por meio de um gradiente de densidade e submetidas a separação magnética para isolamento de monócitos, linfócitos T CD4+, T CD8+ e linfócitos B. Os PBMCs totais e as células purificadas foram cultivadas na presença ou não de estímulos específicos por tempos distintos, conforme descrito na seção 4.14 em materiais e métodos. Essas células foram utilizadas para avaliação do perfil fenotípico por citometria de fluxo, avaliação da clivagem da caspase-1 através da marcação com o kit *FAM-FLICA* e detecção por citometria, imunofluorescência para visualização dos receptores do inflamassoma, ou lisadas para extração de RNA e ensaio de expressão gênica. Os sobrenadantes dos ensaios celulares e as amostras de plasma foram utilizados para dosagem de citocinas por Elisa.

Fonte: Próprio autor (Leal VNC, 2021). Imagens obtidas no banco de imagens disponível em: [BioRender](https://www.biorender.com/)

4.1 Aprovação do estudo pelos Comitês de Ética em Pesquisa (CEPs)

O estudo desenvolvido nesta tese foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FMUSP/HC (CAPPesq) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da USP (parecer 1263/CEPSH; parecer 1280/CEPSH, **ANEXO I**), e pelo CEP do Hospital Alemão Oswaldo Cruz (**ANEXO II**). Foi também cadastrado um biorrepositório para armazenamento do DNA genômico dos pacientes (parecer 4.156.490; **ANEXO III**).

4.2 Pacientes cronicamente infectados pelo HIV-1 (Pessoas que vivem com HIV/AIDS)

Entre abril de 2016 e fevereiro de 2021, 450 indivíduos adultos (idade \geq 18 anos), procedentes da área metropolitana da região de São Paulo (SP, Brasil), cronicamente infectados pelo HIV-1, foram recrutados no Serviço de Extensão ao Atendimento de Pessoas que vivem com HIV/AIDS (SEAP ou “Casa da AIDS”) da Faculdade de Medicina e Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (FMUSP/HC). Após o convite e aceite em participar da pesquisa, foi coletada a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) aprovado pelos CEPs da HC-FMUSP e ICB/USP (**APÊNDICE A**).

Os critérios gerais de inclusão dos voluntários foram: indivíduos de ambos os gêneros, soropositivos para o HIV-1 a pelo menos 1 ano, e em tratamento antirretroviral (ART). Para os voluntários que doaram sangue tanto para o estudo genético que celular, determinamos como critérios de exclusão: a contagem de linfócitos T CD4+ abaixo de 500 células/mm³ de sangue, a presença de sinais clínicos de Aids ou de doenças inflamatórias crônicas (autoimunidade, cardiovascular, renal, obesidade e câncer), ou gravidez. Além disso, foram excluídos dos ensaios celulares pacientes que faziam uso do fármaco Abacavir, (inibidor nucleosídeo da transcriptase reversa) por ter demonstrado ser capaz de levar a uma ativação do NLRP3 inflamassoma (Toksoy et al., 2017).

A partir dos prontuários físicos dos pacientes e exames presentes no sistema HCMED, dados sociodemográficos (idade, sexo, etnia),

comportamentais (consumo de álcool, fumo, utilização de drogas ilícitas e via de transmissão) e clínicos (contagem de linfócitos T CD4+, T CD8+ e CVP antes (**t0**) e após (**t1**) introdução da terapia antirretroviral; presença de coinfeções, como: HTLV, Hepatite C, Hepatite B, Herpes, Citomegalovírus e Sífilis; presença de comorbidades: Doença autoimune, cardiovascular, renal, hepática, obesidade, osteoporose e câncer; ocorrência de falha terapêutica e resposta a imunoprofilaxia contra hepatite B) foram coletados (quando disponíveis) e incluídos (**a**) em uma planilha de Excel, e (**b**) em um banco de dados criado no *software* Epi Info 7.0 do *Centers for Disease Control and Prevention*; obedecendo às normas de bioética em pesquisa, como confidencialidade das informações obtidas dos indivíduos incluídos no estudo.

Na **tabela II** são reportados os dados demográficos, comportamentais e clínicos coletados dos pacientes cronicamente infectados pelo HIV incluídos no estudo. Vale enfatizar que de todos os 450 pacientes, tivemos acesso aos dados de CVP e T CD4+, porém outros dados não estão completos para a coorte inteira.

Tabela II. Dados demográficos, comportamentais e clínicos dos pacientes cronicamente infectados pelo HIV. As características são reportadas como média e desvio padrão (DP), exceto onde está especificado diferentemente. Onde os dados não estão disponíveis para todos os indivíduos, indicamos o número amostral entre parênteses.

Característica	Valor
Sociodemográfico	
Idade (anos), média ± DP	52,6 ± 10,7
Gênero (Homem/Mulher), número	245/205
Etnia declarada, n (%)	
Branco	182 (40)
Pardo	101 (22)
Negro	34 (7,5)
Indígena	2 (0,5)
Não declarado	131 (30)
Dados clínicos - gerais	
Tempo de infecção total (anos), média ± DP	19,5 ± 5,7
Tempo de tratamento com ART (anos), média ± DP	17,7 ± 5,6
Dados laboratoriais - pré-ART	
CVP (CVP ₀ , Log cópias/mL), média ± DP	4,5 ± 1,1
Menor contagem de T CD4+ (Nadir ₀ , células/mm ³), média ± DP	184,7 ± 148

Linfócitos T CD4+ (CD4 ₀ , células/mm ³), média ± DP	320 ± 274
Linfócitos T CD8+ (CD8 ₀ , células/mm ³) (n = 157), média ± DP	902 ± 784
Razão CD4/CD8 (n = 100), média ± DP	0,44 ± 0,45
Razão CD4/CD8 (>1 / <1), (n = 100), %	7/93
Dados laboratoriais - pós-ART	
CVP (CVP, Log cópias/mL) (n = 126; 28%), média ± DP	3,45 ± 1,05
Proporção de indivíduos com CVP indetectável nos últimos 10 anos (%)	72%
Menor contagem de T CD4 (Nadir ₁ , células/mm ³), média ± DP	411 ± 225
Linfócitos T CD4+ (CD4 ₁ , células/mm ³), média ± DP	660 ± 296
Linfócitos T CD8+ (CD8 ₁ , células/mm ³), média ± DP	915 ± 389
Razão CD4/CD8, média ± DP	0,82 ± 0,44
Razão CD4/CD8 (>1 / <1), %	30/70
Dados clínicos – comorbidades	
Doença autoimune (n = 251), Sim/Não.	42/209
Doença cardiovascular (n = 232), Sim/Não.	31/201
Diabetes tipo 2 (n = 242), Sim/Não.	41/201
Doença renal (n = 230), Sim/Não.	33/197
Doença hepática (n = 246), Sim/Não.	40/206
Osteoporose (n = 251), Sim/Não.	47/204
Dados clínicos - resposta à imunização para HBV (n = 117)	
Resposta (AntiHBs > 10 mIU/mL), Sim/Não, n (%)	61/56 (52%)
Persistência anticorpos após 10 anos (Anti-HBS > 10 mIU/mL), Sim/Não, n (%)	43/74 (36%)
Dados Comportamentais	
Álcool (n = 195), Sim/Não.	74/121
Fumo (n = 210), Sim/Não.	70/140
Drogas ilícitas (n = 178), Sim/Não.	39/139
Via de transmissão	
Sexual	290
Vertical	10
Transfusional	4
Não declarado	146

DP: Desvio Padrão; ART: Terapia Antirretroviral; CVP₀: Carga Viral Plasmática antes da ART; CD4₀: Contagem de linfócitos T CD4+ antes da ART; CD4₁: Contagem de linfócitos T CD4+ após ART; T CD8₀: Contagem de linfócitos T CD8+ antes da ART; T CD8₁: Contagem de linfócitos T CD8+ após ART.

4.3 Grupo controle: indivíduos não infectados pelo HIV-1

Foram recrutados 60 adultos, de ambos os sexos, doadores de sangue no Instituto de Hemoterapia do Hospital Alemão Oswaldo Cruz para compor o grupo controle após assinatura do TCLE aprovado pelo hospital. Os voluntários, soronegativos para HIV-1, são procedentes da mesma área metropolitana dos pacientes, e com idade e gênero similares ao grupo HIV incluídos nos mesmos ensaios (**Tabela III**).

Tabela III. Dados demográficos dos indivíduos recrutados para isolamento de leucócitos e ensaios *in vitro*. São reportados o número de indivíduos, o gênero e a idade média (e DP) para os dois grupos, pacientes cronicamente infectados pelo HIV (HIV) e controles saudáveis (CS). O teste de *Fisher* foi utilizado para comparar a distribuição de gênero, e o teste *t* para comparar a média de idade entre os dois grupos.

Característica	HIV (n = 60*)	CS (n = 60)	Test p-value
Gênero (Homem/Mulher), n	27 / 33	28 / 32	0,92
Idade (anos), média + DP	52,32 ± 10,21	48,49 ± 13,44	0,08

DP: Desvio Padrão; * 60 indivíduos dentre os 450 totais incluídos no estudo.

4.4 Amostras biológicas

Amostras de sangue periférico dos pacientes HIV foram coletadas por conveniência em dias e períodos variados, uma vez por semana, a depender da disponibilidade de consultório para realização da pesquisa.

Foram coletados de todos os 450 voluntários, 4 mL de sangue periférico em tubos contendo o anticoagulante EDTA para posterior isolamento de DNA genômico e plasma. De 60 voluntários, foram coletados 20 mL de sangue periférico em tubos contendo o anticoagulante heparina para isolamento de leucócitos e realização dos ensaios celulares (grupo HIV).

Concentrados de leucócitos obtidos após plasmáfereze ou plaquetofereze (câmaras LRS; cerca de 2 mL) de 60 doadores de sangue foram utilizados para separação de leucócitos para os ensaios celulares (grupo controle).

4.5 Separação de plasma

Alíquotas com 1 mL de sangue em EDTA foram centrifugadas (por 10 minutos a 1000 xg; centrífuga *Eppendorf* 5804R), e a fração contendo o plasma foi separada e congelada a - 80°C para posterior dosagem de citocinas.

4.6 Isolamento de DNA genômico

Alíquotas com 1 mL de sangue em EDTA foram centrifugadas (10 minutos a 1000 xg; centrífuga *Eppendorf* 5804R), e a fração de leucócitos, entre o plasma e as hemácias, foi separada e congelada a -20°C em tubo de 1,5 mL (*Eppendorf*) para posterior isolamento do DNA genômico através do método de *Salting Out* (Miller et al., 1988). Resumidamente, uma alíquota de leucócitos foi tratada com solução de Tris/HCl/EDTA em água contendo proteinase K (*Sigma Aldrich*), a 55°C por 30 minutos. Os ácidos nucleicos foram separados das proteínas através da adição de NaCl (*Sigma Aldrich*), centrifugação a 13000 xg por 6 minutos, adição de etanol PA (*Sigma Aldrich*), seguidos de centrifugação a 13000 xg por 3 minutos. O *pellet* contendo o DNA genômico foi lavado em etanol 70% (*Sigma Aldrich*), para facilitar a re-hidratação, e por fim ressuspendido em 100 µL de água livre de DNAase (*ThermoFisher Scientific*).

A concentração (ng/µL) e pureza (relação 260/280 nm) do DNA isolado foram determinadas por meio de leitura espectrofotométrica com o *Nanodrop 2000* (*Thermo Fisher Scientific*). Amostras com relação 260/280 > 1,7 nm, foram utilizados para genotipagem. A concentração das amostras foi padronizada a 50 ng/µL para os ensaios de amplificação, e o DNA genômico foi conservado a - 20°C até o momento de uso.

4.7 Seleção de polimorfismos de base única (SNPs)

Com base nos resultados obtidos anteriormente pelo nosso grupo em estudos de associação com a infecção por HIV-1 (Pontillo et al., 2010; Pontillo et al., 2012; Pontillo et al., 2013) selecionamos 8 polimorfismos de base única (SNPs) nos genes do NLRP3, dos seus reguladores endógenos CARD8 e P2X7, e nas duas citocinas IL-1β e IL-18. Além disso, acrescentamos duas variantes

nos genes do fator de transcrição IRF4 e da importina KPNA2, no intuito de avaliar o efeito na função “alternativa” do NLRP3 como co-fator de transcrição para IL-4 (Bruchard et al., 2015). Os detalhes de cada SNP estão reportados na **tabela IV**.

Tabela IV. Polimorfismos de base única (SNPs) selecionados para o estudo. Variação, posição, frequência e efeito funcional são reportados para os polimorfismos nos genes do inflamassoma selecionados para o presente estudo

ID	Posição	Variação	Efeito	EUR	AFR
<i>NLRP3</i>; NC_000001.11; NG_007509.2; NM_004895.4; NP_004886.3					
rs10754558	247448734	g.247448734 G>C c.*230 G>C	Maior estabilidade do RNA do NLRP3 (Hitomi et al., 2009); Menor ligação do miR-223 e miR-4273 (Shen et al., 2019)	0,46	0,25
rs35829419	247425556	g.247425556 C>A c. 2113 C>A p.(Gln705Lys)	Aumentada produção de IL-1 β /IL-18 (Verma et al., 2012)	0,05	0,01
<i>IL1B</i>; NC_000002.12; NG_008851.1; NM_000576.2; NP_000567.1					
rs16944	112837290	g.112837290 A > G c.-598 T > C	Aumentada produção de IL-1 β (Hall et al., 2004)	0,35	0,57
<i>IL18</i>; NC_000011.10; NG_028143.1; NM_001562.4; NP_001553.1					
rs1834481	112153104	g.112153104 C>G c.91+488 G>C	Menor nível plasmático de IL-18 (Martinez-Hervas et al., 2015; Frayling et al., 2007)	0,20	0
rs5744256	112152125	g.112152125 A>G c.91+1467T>C	Menor nível plasmático de IL-18 (Martinez-Hervas et al., 2015; Frayling et al., 2007)	0	0,22
<i>P2X7R</i>; NC_000012.12; NG_011471.2; NM_002562.6; NP_002553.3					
rs2230911	121177328	g.121177328C> G c.1070C>G	Perda de função: Redução da formação do canal (Gu et al., 2001)	0,08	0,16
rs3751143	121184501	g.121184501A>C c.1487A>C	Perda de função: Redução da formação do canal (Shemon et al., 2006)	0,20	0,08

CARD8; NC_000019.10; NG_029574.2; NM_001351784.2; NP_001338713.1					
rs2043211	48234449	g.48234449 A>T c.30 T>A p.(Cys32ter)	Aumentada liberação de IL-1 β (Roberts et al., 2011) Maior expressão de CARD8#	0,33	0,18
IRF4; NC_000006.12; NG_027728.1; NM_002460.4; NP_002451.2					
rs12203592	396321	g.396321C>T c.492+386C>T	Aumentada expressão de <i>IRF4</i> (Do et al., 2010; #)	0,12	0,01
KPNA2; NC_000017.11; NM_001320611.1; NP_002257.1					
rs8078543	68041135	g.68041135G>T c.302+369G>C	Menor expressão de <i>KPNA2</i> #	0,73	0,34

Número de identificação do polimorfismo (**ID**), posição cromossômica (**Posição**; do sequenciamento GRCh38.p12), a correspondente variação nucleotídica a nível genômico (**g.**) e transcricional (**c.**) e/ou variação de aminoácido (**n.**) (**Varição**), o efeito funcional quando conhecido (**Efeito**) com as respectivas referências, assim como a frequência do alelo menor (MAF: do inglês, *Minor Allele Frequency*) nas principais populações (**EUR**, do inglês: *European-Ancestral*; **AFR**, do inglês: *African-Ancestral*; obtidos no *1000Genome project*) são reportados para todos os polimorfismos.

Para cada gene é indicado o nome atual, a localização cromossômica, a sequência de referência (*Refseq*) do gene, do transcrito e da proteína.

Os dados sobre os efeitos funcionais dos polimorfismos foram obtidos da literatura e/ou de bancos de dados públicos de expressão de genes/proteínas (<https://www.GTEX.org>; e/ou <https://www.proteinatlas.org>) (“#”).

4.8 Genotipagem de SNPs por ensaio alelo-específico de tipo Taqman®

A distribuição dos 10 SNPs na coorte de indivíduos cronicamente infectados por HIV foi avaliada por meio de ensaio alelo-específico de tipo Taqman® (*Applied Biosystems, Thermofisher scientific*) (**Tabela V**) e PCR em tempo real na plataforma *QuantStudioR 3 Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems, Thermofisher scientific*).

Tabela V. Sondas utilizadas para ensaio de genotipagem. Gene, identificação do SNP (SNP ID), Identificação do ensaio Taqman (*Taqman® Assay ID*) e Alelos e fluorocromos correspondentes (VIC/FAM).

Gene	SNP ID	Taqman® Assay ID	Alelo/Fluorocromo
NLRP3	rs10754558	C__26052028_10	[C/G] VIC/FAM
	rs35829419	C__25648615_10	[A/C] VIC/FAM
IL1B	rs16944	C__1839943_10	[G/A] VIC/FAM
IL18	rs1834481	C__2898467_30	[C/G] VIC/FAM
	rs5744256	C__2898468_10	[A/G] VIC/FAM
P2X7	rs2230911	C__15853705_20	[C/G] VIC/FAM
	rs3751143	C__27495274_10	[A/C] VIC/FAM
CARD8	rs2043211	C__11708080_1_	[A/T] VIC/FAM
IRF4	rs12203592	C__31918199_10	[C/T] VIC/FAM
KPNA2	rs8078543	C__60551872_10	[G/T] VIC/FAM

Foram amplificados 50 ng/ μ L de DNA genômico com o ensaio alelo-específico (diluição 1:40) e a solução *Genotyping Master Mix* (diluição 1:2) no volume total de reação de 10 μ L, de acordo com o programa de ciclagem estabelecido pelo fabricante (desnaturação do DNA: 5' a 95°C; 40 ciclos de 30" a 95°C, seguidos por 60" a 60°C).

A cada ciclo de amplificação o equipamento detecta a intensidade de fluorescência do(s) fluorocromo(s) alelo-específicos de cada amostra de DNA, originando uma (ou duas) curva(s) de amplificação. No final da reação a discriminação alélica do SNP para cada amostra de DNA é obtida pela observação da(s) curva(s). A presença de uma única curva de amplificação indica homozigose para o alelo detectado pelo fluorocromo, enquanto que duas curvas indicam a presença de ambos alelos (heterozigose) (**Figura 8**).

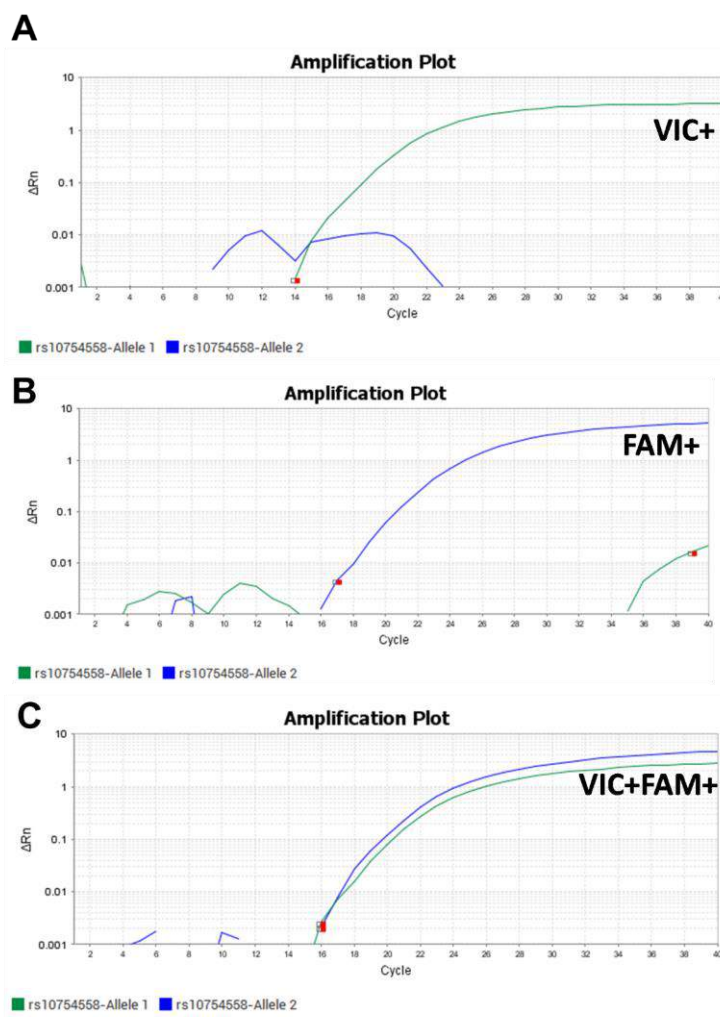


Figura 8. Curvas de amplificação de genotipagem.

Curvas de amplificação para o genótipo (A) de alelo selvagem em homozigose (1 curva VIC+), (B) do alelo polimórfico em homozigose (1 curva FAM+) ou (C) do alelo selvagem marcado em conjunto com o alelo polimórfico (1 curva VIC+ e 1 curva FAM+; heterozigoto).

Fonte: Imagem ilustrativa de um experimento realizado no presente projeto.

4.9 Isolamento de leucócitos mononucleares

As amostras de sangue periférico em heparina ou concentrados de leucócitos (câmaras LRS) foram diluídas em solução tamponada de fosfato (PBS; *Sigma-Aldrich*), estratificadas com 10 mL de *Ficoll-Paque* (*GE healthcare, Biosciences*) (3 volumes : 1 volume de *Ficoll-Paque*) e centrifugadas por 20 minutos a 800 xg para separação dos leucócitos mononucleares (monócitos e linfócitos) das demais células sanguíneas, por gradiente de densidade, de acordo com as instruções do fabricante. Após a centrifugação, os leucócitos mononucleares (presentes na fração entre o plasma e o *Ficoll-Paque*) foram coletados e transferidos para outro tubo para realização de lavagens com PBS

(centrifugações por 10 minutos a 250xg). O *pellet* de células foi ressuspenso em 1 mL de meio de cultura RPMI-1640 contendo 10% de soro fetal bovino (FBS, do inglês: *Fetal Bovine Serum*) (*Gibco, Thermo fisher*), (RPMI-10%FBS).

Foram adicionados 10 μL de células em suspensão a 90 μL de solução de Azul de Tripán (*Sigma Aldrich*) para contagem das células vivas em câmara de Neubauer (*Kasvi*) por microscopia óptica (Microscópio binocular *Carl Zeiss*). Amostras com viabilidade $\geq 95\%$ foram utilizadas para os ensaios. Em média, obtivemos 10×10^6 de células mononucleares por mL de sangue periférico e 100×10^6 de células mononucleares por mL de concentrados de leucócitos (câmaras LRS).

Os leucócitos mononucleares (PBMC totais) foram utilizados para os experimentos na concentração de 1×10^6 células por mL por poço de placa de cultura de 24 poços (*Corning Costar*), ou utilizados para separação de populações de células específicas como descrito a seguir.

4.10 Separação de monócitos e linfócitos a partir dos PBMC

Para separação de monócitos foi utilizada a seleção positiva. Resumidamente, 30×10^6 PBMC totais foram incubadas com anticorpos anti-CD14 conjugados a esferas magnéticas (*MicroBeads; Miltenyi Biotec*) (na proporção de 15 μL de anticorpo para cada 10×10^6 células) por 15 minutos a 4°C. Em seguida, a suspensão de células marcadas foi adicionada a uma coluna de esferas ferromagnéticas (Colunas LS; *Miltenyi Biotec*) posicionada no suporte magnético (*MACS Separator, Miltenyi Biotec*). Após descartar a solução que passou pela coluna (células CD14 negativas), foi coletada a suspensão celular CD14 positiva. As células foram lavadas em PBS 1X e ressuspenso em 1 mL de RPMI-10% FBS. Em seguida, foram utilizados 10 μL de suspensão celular para contagem dos monócitos purificados na câmara de Neubauer, como descrito na seção anterior. O rendimento de monócitos foi em média de 10 a 20% do PBMC ($3 - 6 \times 10^6$).

Para separação de linfócitos T CD4+, T CD8+ e B (CD19+), foi utilizada a seleção negativa. 50×10^6 de PBMC foram incubadas com uma solução contendo um *pool* de anticorpos específicos para moléculas distintas, com exceção de CD4, CD8 ou CD19 (na proporção de 10 μL de anticorpos para cada 10×10^6

células), e incubados por 5 minutos a 4°C. Em seguida, foi adicionado uma solução contendo as esferas magnéticas (*MicroBeads; Miltenyi Biotec*) (na proporção de 20 µL de *MicroBeads* para cada 10×10^6 células) por 10 minutos a 4°C, e passado na coluna de esferas ferromagnéticas (Colunas LS; *Miltenyi Biotec*) posicionada no suporte magnético (*MACS Separator, Miltenyi Biotec*). A suspensão eluída na coluna foi coletada contendo os linfócitos purificados (linfócitos T CD4+, T CD8+ ou B (CD19+)). Foram utilizados 10 µL de suspensão celular para contagem dos linfócitos purificados na câmara de Neubauer. Em média, o rendimento do protocolo de separação foi de 30-40 % para linfócitos T CD4+, 10-20 % para linfócitos T CD8+ e 5-10 % para linfócitos B, com viabilidade $\geq 90\%$.

Após isolamento, $0,2 \times 10^6$ células foram utilizadas para avaliação da pureza através de citometria de fluxo, como descrito a seguir (**seção 4.11**).

Em alguns experimentos, 2×10^6 células purificadas foram utilizadas para isolamento de RNA e ensaios de expressão gênica. Nos demais experimentos foram utilizadas 1×10^6 células por mL por poço de placa de cultura de 24 (1 mL/poço) (*Corning Costar*) ou 96 poços (200 µL/poço) (*Corning Costar*) ou lâminas de tipo *chamber slide* (100 µL/poço) para ensaio de imunofluorescência (*Thermo Fisher Scientific*).

4.11 Avaliação da pureza de leucócitos isolados por citometria de fluxo

Para avaliar a pureza da suspensão de leucócitos isoladas a partir de PBMC através do protocolo de separação magnética, $0,2 \times 10^6$ células foram incubadas com anticorpos monoclonais fluorescentes contra moléculas de superfície características de monócitos (Anti-CD14; diluído 1 : 4; *BD Bioscience*), linfócitos T (CD3+ e CD4+ ou CD8+; Anti-CD3 diluído 1 : 2, Anti-CD4 diluído 1 : 4 e Anti-CD8 diluído 1 : 2, *BD Bioscience*) ou linfócitos B (CD19+; Anti-CD19 diluído 1 : 8, *BD Bioscience*), por 20 min a 4°C, lavadas duas vezes com PBS e fixadas em PBS contendo 1% Formaldeído (*Sigma-Aldrich*). O marcador de viabilidade *LIVE/DEAD FIXABLE CELL STAIN KIT* (*ThermoFisher Scientific*) foi utilizado de acordo com as instruções do fabricante. As concentrações dos anticorpos sugeridas pelo fabricante assim como a titulada para uso, os

respectivos clones e fluorocromos conjugados encontram-se na tabela em **APÊNDICE B**.

Após a marcação, as células foram analisadas no citômetro de fluxo LSR Fortessa (*BD Biosciences*). A aquisição foi realizada com um mínimo de 10.000 eventos determinados dentro do *gate* característico de tamanho e granulosidade de linfócitos TCD4+, T CD8+, B CD19+ e monócitos CD14+, com o auxílio do *software* DIVA (*BD Biosciences*). Os dados brutos obtidos do equipamento foram analisados com o auxílio do *software* FlowJo X 10.0.7r2 (*Tree Star*). Os dados analisados foram apresentados como porcentagem de células positivas (%). As amostras com menos de 92 % de pureza foram excluídas das análises posteriores.

A seguir são apresentadas figuras de experimentos representativos contendo a estratégia de *gate* utilizada para análise de pureza dos diferentes leucócitos purificados (**Figura 9-12**).

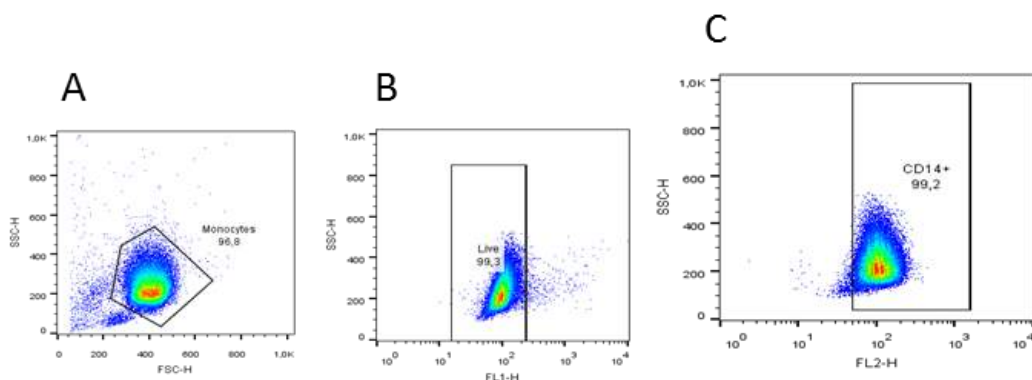


Figura 9. Avaliação da pureza de uma população de monócitos CD14+ isolada por seleção positiva a partir de células mononucleares de sangue periférico (PBMC).

Estratégia de seleção de populações celulares (*gate*) para análise de pureza de monócitos CD14+ em gráfico de pontos (*pseudocolor*). (A) Etapa 1: Seleção da população de monócitos através das medidas *Forward-Scatter*: FSC-A (tamanho das células) por *Side-Scatter*: SSC-A (Granulosidade/complexidade das células); (B) Etapa 2: Seleção de células vivas através da marcação com *LIVE/DEAD*: FITC; (C) Etapa 3: Contagem dos monócitos marcados por CD14 Qdot dentro da população de células vivas selecionada anteriormente.

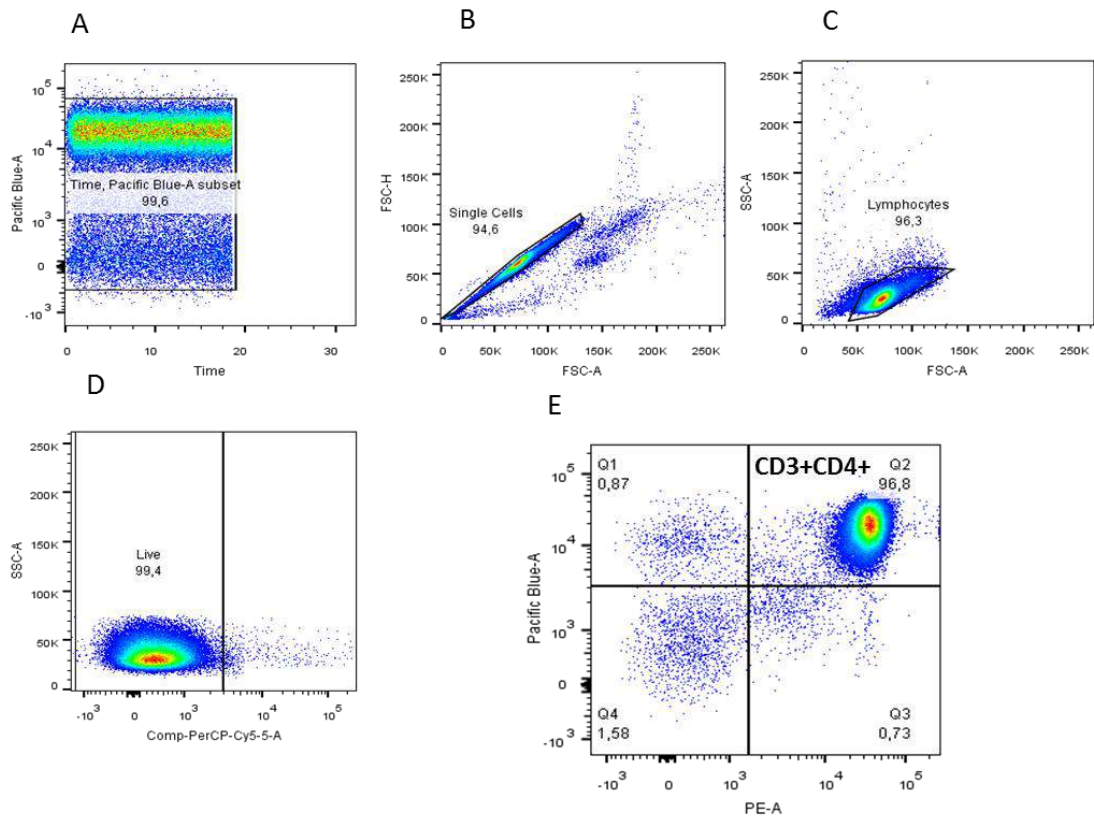


Figura 10. Avaliação da pureza de uma população de linfócitos T CD4+ isolado por seleção negativa a partir de células mononucleares de sangue periférico (PBMC).

Estratégia de seleção de populações celulares (*gate*) para análise de pureza de linfócitos T CD4+ em gráfico de pontos (*pseudocolor*). **(A)** Etapa 1: Eliminação de instabilidade do laser através do cruzamento de tempo (*Time*) pelo marcador *Pacific Blue*; **(B)** Etapa 2: Seleção de eventos únicos (*singlets*) através da medida *Forward Scatter* (FSC)-A (A: área por FSC-H (H: altura)); **(C)** Etapa 3: Seleção da população de linfócitos através das medidas FSC-A (tamanho das células) por *Side Scatter* (SSC-A) (Granulosidade/complexidade das células); **(D)** Etapa 4: Seleção de células vivas através da marcação com *LIVE/DEAD*; **(E)** Etapa 5: Contagem dos linfócitos marcados por CD3-*Pacific Blue* e CD4-PE dentro da população de células vivas selecionada anteriormente.

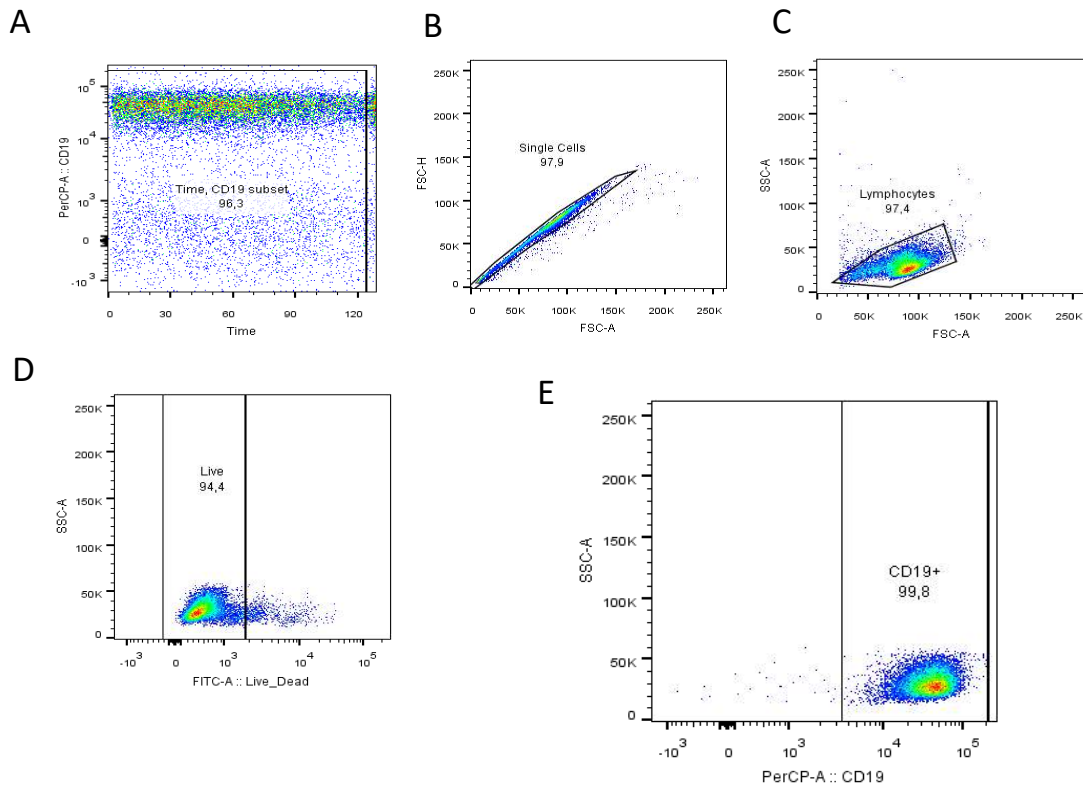


Figura 11 Avaliação da pureza de uma população de linfócitos B CD19+ isolada por seleção negativa a partir de células mononucleares de sangue periférico (PBMC). Estratégia de seleção de populações celulares (*gate*) para análise de pureza de linfócitos B CD19+ em gráfico de pontos (*pseudocolor*). **(A)** Etapa 1: Eliminação de instabilidade do laser através do cruzamento de tempo (Time) pelo marcador PerCP; **(B)** Etapa 2: Seleção de eventos únicos (*singlets*) através da medida *Forward Scatter* (FSC)-A (A: área) por FSC-H (H: altura); **(C)** Etapa 3: Seleção da população de linfócitos através das medidas FSC-A (tamanho das células) por *Side-Scatter* (SSC-A) (Granulosidade/complexidade das células); **(D)** Etapa 4: Seleção de células vivas através da marcação com *LIVE/DEAD*: FITC; **(E)** Etapa 5: Contagem dos linfócitos marcados por CD19-PerCP dentro da população de células vivas selecionada anteriormente.

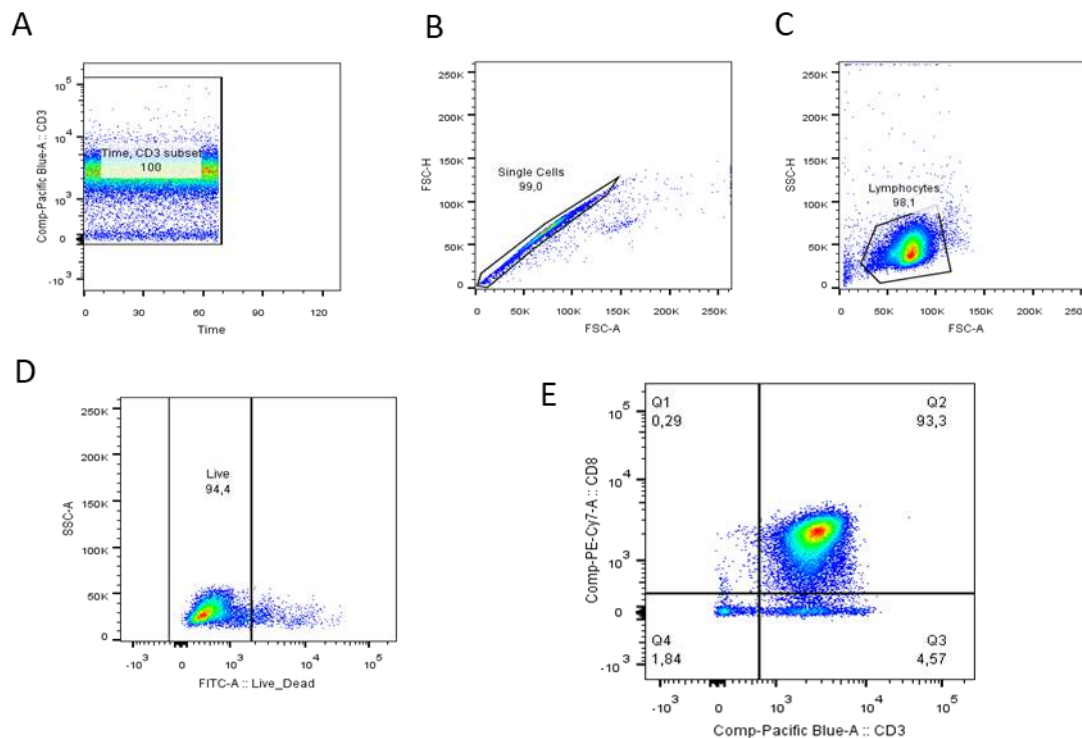


Figura 12. Avaliação da pureza de uma população de linfócitos T CD8+ isolado por seleção negativa a partir de células mononucleares de sangue periférico (PBMC).

Estratégia de seleção de populações celulares (*gate*) para análise de pureza de linfócitos T CD8+ em gráfico de pontos (*pseudocolor*). **(A)** Etapa 1: Eliminação de instabilidade do laser através do cruzamento de tempo (*Time*) pelo marcador *Pacific Blue*; **(B)** Etapa 2: Seleção de eventos únicos (*singlets*) através da medida *Forward Scatter* (FSC)-A (A: área) por FSC-H (H: altura); **(C)** Etapa 3: Seleção da população de linfócitos através das medidas FSC-A (tamanho das células) por *Side Scatter* (SSC-A) (Granulosidade/complexidade das células); **(D)** Etapa 4: Seleção de células vivas através da marcação com *LIVE/DEAD*; **(E)** Etapa 5: Contagem dos linfócitos marcados por *CD3-Pacific Blue* e *CD8-PECy7* dentro da população de células vivas selecionada anteriormente.

4.12 Isolamento de RNA total e análise da expressão gênica relativa

O RNA total foi isolado a partir de 2×10^6 células com o kit *RNeasy Mini Kit* (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. O RNA isolado foi ressuspensionado em 30 μ L de água *RNAase free* (Invitrogen, ThermoFisher Scientific). Em seguida, foram avaliadas a concentração (ng/ μ L) e pureza (280/260 nm) do RNA isolado por meio de leitura espectrofotométrica no Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Amostras com razão 280/260 > 1,9 nm foram utilizados para os experimentos.

Foram retrotranscritos 300 ng de RNA total utilizando o *kit SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen, ThermoFisher Scientific)* e *Random primers (Invitrogen)*, de acordo com as instruções do fabricante.

Foi amplificado 1 µl de cDNA com o ensaio gene-específico (diluído 1:20) de tipo Taqman® (*Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific*) (**Tabela VI**). e a solução *Universal Master Mix* (diluída 1:2) no volume total de reação de 10 µL, de acordo com o programa de ciclagem estabelecido pelo fabricante (desnaturação do DNA: 5' a 95°C; 40 ciclos de 30" a 95°C seguidos por 60" a 60°C). Para amplificação foi utilizada a plataforma *QuantStudioR 3 Real Time PCR System (Applied Biosystems)*.

O *software QuantStudio 3.0* foi utilizado para obter os valores de *Cycle Threshold* (Ct) para análise de expressão gênica relativa de acordo com o método de *Fold Change* (FC) (Schmittgen, Livak, 2008). Os dados brutos (Ct) foram normalizados com a expressão do gene endógeno *GAPDH* (Do inglês: *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*) (ΔCt). Os dados de expressão gênica relativa foram expressos como $2^{-\Delta Ct}$ para avaliação do perfil de expressão basal e o FC foi calculado comparando as condições estimulado e não estimulado (NE) ($FC=2^{-\Delta\Delta Ct}$; $\Delta\Delta Ct=\Delta Ct$ estimulado- ΔCt NE).

Para alguns genes foram utilizados *primers* específicos (na concentração de 10 µM) (**Tabela VI**) e a solução *Sybr Mix* (diluída 1:2) no volume total de reação de 10 µL de acordo com o programa de ciclagem estabelecido pelo fabricante (desnaturação do DNA: 5' 95°C; 40 ciclos de 30" a 95°C seguidos por 60" a 60°C).

Foi realizada a análise de expressão de genes relacionados ao NLRP3 inflamassoma (*NLRP3, CASP1, CARD8, P2X7R*), e das citocinas (*IL1B, IL18*). Os genes de outros receptores do inflamassoma, como *NLRP1, NLRC4, AIM2* e *IFI16*, e de citocinas e fatores de transcrição envolvidos na polarização dos linfócitos T CD4+ (*IL4, TBET, GATA3*), foram analisados em alguns experimentos específicos. A lista dos ensaios Taqman® utilizados é apresentada na **Tabela VI**.

Tabela VI. Lista dos ensaios gene-específicos Taqman

Gene	ID sonda de expressão	Localização Cromossômica
<i>GAPDH</i>	hs02758991	Chr.12: 6534405 – 6538375
<i>NLRP3</i>	hs00366465	Chr.1: 247416156 – 247449108
<i>CASP1</i>	hs00354836	Chr.11: 105025508 – 105035591
<i>IL1B</i>	hs01555410	Chr.2: 112829758 – 112836842
<i>IL18</i>	hs01038788	Chr.11: 112143251 – 112164117
<i>P2X7R</i>	hs00175721	Chr.12: 121132819 – 121189478
<i>CARD8</i>	hs01088221	Chr.19: 48203148 – 48256269
<i>NLRP1</i>	hs00248187	Chr.17: 5501399 – 5584512
<i>NLRC4</i>	hs00368367	Chr.2: 32224449 – 32265743
<i>IFI16</i>	hs00194261	Chr.1: 158999968 – 159055155
<i>AIM2</i>	hs00175457	Chr.1: 159059226 – 159132351
<i>IL4</i>	hs00174122	Chr.5: 132673986 – 132682678
<i>GATA3*</i>	-	F: AGATGGCACGGGACACTACCT R: TAATTCGGGTTTCGCTTCCG
<i>TBET*</i>	-	F: AACACAGGAGCGCACTGGAT R: TAACACGAGGTCAGGGAGGT

*Expressão gênica avaliada através de *primers* específicos e *SYBR Green*. F: Foward; R: Reverse.

4.13 Isolamento de RNA total compreendendo sncRNAs e análise da expressão do miR-223

Para avaliação da expressão do miR-223, o RNA total foi isolado a partir de 2×10^6 células através de outra técnica, permitindo a conservação dos *small non coding RNAs* (sncRNAs). Para tal, as células foram tratadas com 750 μ L de Trizol (*Invitrogen*), e o RNA isolado por adição de clorofórmio (1 volume de clorofórmio para 5 de trizol; *Invitrogen*), seguidos de centrifugações e precipitação em isopropanol (*Invitrogen*), de acordo com as instruções do fabricante. O RNA foi lavado em etanol 70% (*Sigma Aldrich*) e ressuspendido em 100 μ L de água *RNase free* (*Invitrogen*). A concentração e pureza obtida foi

avaliada por meio de leitura espectrofotométrica no Nanodrop 2000 (*Thermo Scientific*). Amostras com razão 280/260 nm > 1,9 nm foram utilizados para os experimentos.

Foram retrotranscritos 10 ng de microRNA utilizando o kit *TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit* (*Applied Biosystems*) de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, 1 µl de cDNA foi amplificado com o ensaio gene-específico (diluído 1:20) de tipo Taqman® (hsa-miR-223-3p; ChrX :66018870-66018979) (*Applied Biosystems*) e a solução *Universal Master Mix* (diluída 1:2) no volume total de reação de 10 µL, de acordo com o programa de ciclagem estabelecido pelo fabricante (desnaturação do DNA: 5' a 95°C; 40 ciclos de 30" a 95°C seguidos por 60" a 60°C). Para amplificação foi utilizada a plataforma *QuantStudioR 3 Real Time PCR System* (*Applied Biosystems*).

O software *QuantStudio™ Design & Analysis* (*Thermo Fisher Scientific*) foi utilizado para obtenção dos dados brutos (Ct). O *U6 snRNA* (*Small Nuclear RNA*) foi utilizado como controle endógeno para normalização dos dados brutos (ΔCt). Os dados obtidos foram expressos como $2^{-\Delta Ct}$.

4.14 Estimulação do NLRP3 inflamassoma em PBMC e leucócitos purificados

Para determinar o grau de ativação do NLRP3 inflamassoma nos leucócitos de pacientes HIV e compará-lo com o do grupo controle, tanto os PBMC totais quanto os leucócitos purificados foram estimulados com conhecidos ativadores do complexo.

PBMC

Foram mantidas 1×10^6 de PBMC em meio RPMI-10% FBS, e tratados com 1 µg/mL de lipopolissacarídeo bacteriano por 3 e 24 horas (LPS de *Escherichia coli* cepa 0111:B4; *Sigma-Aldrich*), a 37 °C e 5 % de CO₂. Ao término de cada incubação, 1 mM de ATP (*Sigma-Aldrich*) foi adicionado às culturas por 15 minutos, de acordo com o protocolo de ativação do NLRP3 inflamassoma em monócitos humanos estimulados com LPS (Gattorno et al., 2007).

Monócitos (células CD14+)

Foram mantidas $0,4 \times 10^6$ de células CD14+ em meio RPMI-10% FBS e estimuladas com 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS ou 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de β -glucana fúngica (de acordo com Kankkunen et al., (2010), e curva de concentração presente no **APÊNDICE C**) por 3 e 24 horas a 37 °C e 5 % de CO₂. Ao término de cada incubação 1 mM de ATP foi adicionado às culturas por 15 minutos.

Linfócitos B (células CD19+)

Foram mantidos $0,4 \times 10^6$ de linfócitos B CD19+ em meio RPMI-10% FBS e estimulados com 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS ou 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de β -glucana fúngica ou 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CpG (ODN2395; *Invivogen*) (Concentrações definidas de acordo com Kumar et al., (2009) e Ali et al., (2017) e curva de concentração presente no **APÊNDICE D**) por 24 ou 72 horas, a 37 °C e 5 % de CO₂, para detecção da liberação das citocinas ou para secreção de IgM respectivamente. Somente na padronização, ao término de cada incubação, 1 mM de ATP foi adicionado às culturas por 15 minutos, porém, como não foram observadas diferenças significativas na produção de IL-1 β ou IgM na presença do ATP (**APÊNDICE D**), para os demais experimentos a utilização do ATP foi descartada.

Linfócitos T (células CD4+)

Foram mantidos 1×10^6 linfócitos T CD4+ em meio RPMI-10% FBS e estimulados com os anticorpos monoclonais anti-CD3 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Clone: UCHT1; *Biolegend*) e anti-CD28 (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Clone: CD28.2; *Biolegend*), ativadores clássicos de célula T, por 72 horas de acordo com o protocolo padronizado presente no **APÊNDICE E**.

Em alguns experimentos, antes da ativação, as células foram pré-tratadas com o inibidor específico de NLRP3, o MCC950 (*InvivoGen*); ou o inibidor amplo de ativação do inflamassoma, o Partenolide (*Sigma-Aldrich*); ou o inibidor da BTK, o CGI1746 (*Selleckchem*). A concentração e o tempo de tratamento dos inibidores foram determinados após cinética baseada na produção de IL-1 β e viabilidade celular com dosagem de LDH (**APÊNDICE F, G**). Para o MCC950 foram definidos 10 μM por 1 hora, para o Partenolide 10 μM por 15 minutos e para o CGI1746 10 μM por 15 minutos.

4.15 Avaliação da ativação do NLRP3 inflamassoma

A ativação do inflamassoma foi analisada através da liberação das citocinas IL-1 β e IL-18, da ativação da caspase-1 e da formação de *specks* de ASC, por meio de diferentes técnicas:

- Dosagem de citocinas por ELISA comercial: *Human IL-1 β ELISA MAXTM Deluxe, Biolegend*; e *Human Total IL-18 DuoSet ELISA, R&D*;
- Avaliação das células positivas para caspase-1 ativada com utilização de ensaio comercial: *FAM-FLICA[®] Caspase-1 (YVAD) Assay Kit (Immunochemistry Technologies)* e citometria de fluxo;
- Ensaio de imunofluorescência para detecção de células positivas para agregados (*specks*) de ASC.

Em alguns experimentos de imunofluorescência, utilizamos o anticorpo anti-NLRP3 em conjunto ou não com o anti-ASC para detectar a ativação deste receptor em específico.

Os detalhes das técnicas são descritos a seguir.

4.15.1 Detecção da ativação de caspase-1

Foram marcadas $0,2 \times 10^6$ células com o kit *FAM-FLICA[®] Caspase-1 (YVAD) Assay Kit (Immunochemistry Technologies)*, de acordo com as instruções do fabricante, por 1 hora a 37 °C, 5% CO₂. A clivagem (ativação) da caspase-1 por célula foi medida no citômetro LSRFortessaTM X-20 (*BD Biosciences*). O marcador de viabilidade *LIVE/DEAD Fixable Dead Cell Stains (ThermoFisher)* e os anticorpos monoclonais para marcadores característicos dos leucócitos isolados (CD14, CD3, CD4, CD8, CD19) foram adicionados para avaliar a ativação da caspase-1 nas diferentes populações de leucócitos vivos. A aquisição foi realizada com um mínimo de 10.000 eventos determinados dentro do *gate* característico de tamanho e granulosidade de linfócitos ou monócitos, com o software DIVA (*BD Biosciences*). Os dados brutos obtidos foram analisados com o auxílio do software *FlowJo (Tree Star, Ashland, OR)*. Os dados analisados foram apresentados como porcentagem de células positivas para o marcador específico de leucócitos e para a caspase-1 clivada (%).

4.15.2 Avaliação da formação do complexo NLRP3/ASC por imunofluorescência

Cerca de $0,1 \times 10^6$ monócitos, linfócitos T CD4+ ou linfócitos B foram mantidos em cultura em lâminas *chamber slide* (Thermo Fisher Scientific) e ativados conforme descrito no item 4.14. Após os estímulos, as células foram fixadas com *Fixation Buffer* (Biolegend) por 30 minutos a 37° C, lavadas e permeabilizadas com *Permeabilization Wash Buffer* (Biolegend) por 30 minutos a 37 °C. Em seguida, as células foram incubadas com os anticorpos para detecção do NLRP3 (*Goat anti-human NLRP3; Polyclonal; Abcam*) e/ou do ASC (*Mouse Anti-ASC; Clone: 2E1-7; Merck Millipore*) diluídos 1/200, e mantidas a 4°C *overnight*. Após lavagens, 1 µg/mL do anticorpo secundário para marcação do NLRP3 (*Donkey F(ab)2 Anti-Goat IgG HL Alexa Fluor 488; Thermo Fisher Scientific*) e/ou do ASC (*Donkey F(ab)2 Anti-Mouse IgG HL Alexa Fluor 568; Thermo Fisher Scientific*) e o DAPI (corante de regiões ricas em AT no DNA) na diluição de 1/1000 (*Biolegend*) foram adicionados por 1 hora à temperatura ambiente. Após lavagens, a presença de *specks* citosólicos foi observada no microscópio de imunofluorescência Nikon I300 (*Nikon*) e no microscópio confocal Zeiss LSM 780-NLO (*Carl Zeiss*) do serviço multiusuário do Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa (CEFAP-USP). Com auxílio do *software ImageJ* (v1.51, NIH), os *specks* foram contados manualmente em 5 campos/imagens de acordo com Stutz et al., 2013.

4.15.3 Dosagem de citocinas e IgM por ELISA

A concentração das citocinas do inflamassoma (IL-1 β e IL-18) e de citocinas independentes da montagem do complexo (TNF- α , IL-6 e IL-10) nos sobrenadantes das culturas celulares foi determinada por ELISA com os kits: *Human IL-1 β ELISA MAX™ Deluxe* (Biolegend), *Human Total IL-18 DuoSet ELISA* (R&D), *ELISA MAX™ Deluxe Set Human TNF- α* , *ELISA MAX™ Deluxe Set Human IL-6* (Biolegend) e *Human IL10 ELISA KIT II™* (BD Bioscience), de acordo com as instruções dos fabricantes. Para dosagem de IgM no sobrenadante de cultura das células CD19+, foi utilizado o *IgM Human ELISA Kit*

(*Thermo Fisher Scientific*). Os dados foram apresentados como pg/mL (para as citocinas) e ng/mL (para IgM).

4.15.4 Dosagem de LDH por ensaio colorimétrico

A liberação de lactato desidrogenase (LDH) nos sobrenadantes de cultura foi medida com auxílio do kit “*CyQUANT™ LDH Cytotoxicity Assay*” (*Thermo Fisher Scientific*), de acordo com as recomendações do fabricante. Os dados são reportados como porcentagem de LDH liberado em relação ao LDH total presente nas células, determinado após lise das células com o detergente Triton. Vale destacar que este ensaio foi utilizado para avaliar a integridade da membrana celular, e como medida indireta de viabilidade celular e ativação de piroptose.

4.16 Avaliação da ativação dos linfócitos e polarização Th1/Th2 por citometria de fluxo

No intuito de avaliar o grau de ativação dos linfócitos e o perfil de polarização Th1/Th2, em alguns experimentos, $0,2 \times 10^6$ linfócitos foram marcados com anticorpos anti-CD38 (diluído 1:4; *Biolegend*), anti-CD69 (diluído 1:2; *Biolegend*) para os linfócitos T e o anti-CD27 e anti-CD21 para os linfócitos B (diluídos 1:4; *BD Bioscience*) por 20 minutos a 4 °C, lavadas duas vezes com PBS e fixadas em PBS contendo 1% de Formaldeído (*Sigma-Aldrich*).

Para marcação de proteínas intracelulares (IFN- γ e IL-4), 20 μ g/mL de brefeldina A (*Sigma-Aldrich*) foi adicionada 6 horas antes do término do ensaio de estimulação. As células foram marcadas com os anticorpos de superfície, e em seguida permeabilizadas com o *Fixation Buffer* (*Biolegend*) e *Permeabilization Wash Buffer* (*Biolegend*), e marcadas intracelularmente para IFN- γ e IL-4 (diluídos 1:4; *BD Bioscience*) por 30 minutos a 4° C. O marcador de viabilidade *LIVE/DEAD Fixable Cell Stain Kit* (*ThermoFisher Scientific*) foi utilizado de acordo com as instruções do fabricante.

Após a marcação, as células foram analisadas no citômetro de fluxo LSR Fortessa (*BD Biosciences®*), conforme descrito anteriormente. Os dados analisados foram apresentados como porcentagem de células positivas (%).

4.17 Análise estatística

Para análise dos dados demográficos e clínicos dos voluntários recrutados pelo estudo, assim como para os resultados de expressão gênica, de citocinas e LDH, de citometria e de imagem de imunofluorescência, utilizamos o teste de tipo Qui quadrado (teste de *Fisher*) (matriz 2x2) ou Teste “t” não paramétrico para comparar dois grupos de dados não pareados (teste de *Mann-Whitney*) ou mais grupos (teste de *Kruskal-Wallis*), ou para analisar dados pareados (teste de *Friedman*). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. O teste de *Spearman* foi utilizado para análise de correlação entre variáveis não paramétricas. As correlações foram consideradas significativas quando $r \leq 1$ e $p < 0,05$. Os testes foram realizados com auxílio do programa *GraphPad Prism* (versão 8.0).

Para análise dos dados de distribuição dos SNPs e haplótipos no grupo de pacientes HIV de acordo com as principais variáveis clínicas (CVP, contagem de linfócitos T CD4+ e T CD8+), a presença de alguma comodidade (autoimunidade, diabetes, doença cardiovascular, hepática ou renal ou osteoporose) ou a resposta a imunização (vacina para HBV), utilizamos uma análise multivariada de acordo com o modelo linear geral (GLM), com auxílio do pacote *SNPassoc* (versão 1.5-2) na plataforma *R-project* (*R version 4.0.2*). Levando em conta a correção por comparações múltiplas independentes (correção de Bonferroni), as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,01$ ($p = 0,05/5$ loci independentes). O programa *Haploview* (versão 4.2) (Barret et al., 2005) foi utilizado para calcular o desequilíbrio de associação (LD, do inglês: *Linkage Disequilibrium*) entre SNPs no mesmo gene e derivar os haplótipos.

5. RESULTADOS

5.1 Contribuição de polimorfismos de base única (SNPs) nos genes do NLRP3 inflamassoma na heterogeneidade clínica de indivíduos cronicamente infectados pelo HIV em tratamento antirretroviral

Com intuito de avaliar a contribuição da genética do inflamassoma na heterogeneidade clínica dos pacientes cronicamente infectados pelo HIV, e averiguar se os mesmos alelos associados a susceptibilidade à infecção também poderiam estar afetando a história da infecção nos indivíduos tratados, realizamos um estudo de associação com uma coorte de pacientes com apresentação clínica heterogênea (**Tabela II** na seção Materiais e métodos) e polimorfismos de base única (SNPs) em genes do NLRP3 inflamassoma com conhecido efeito funcional (**Tabela IV** na seção Materiais e métodos).

Além dos genes relacionados com a ativação “clássica” do NLRP3 inflamassoma (*NLRP3*, *IL1B*, *IL18*, *P2X7*, *CARD8*), levamos em conta a possibilidade de uma ativação do NLRP3 de forma inflamassoma independente, e mais relacionada com o papel proposto para o NLRP3 como cofator do *IRF4* (Bruchard et al., 2015), incluindo dois outros SNPs com intuito de “marcar” o gene *IRF4* e o gene da importina nuclear *KPNA2*. (**Tabela IV** na seção Materiais e métodos).

Os 450 indivíduos da coorte HIV foram genotipados para os 10 SNPs selecionados. As frequências genótípicas dos polimorfismos resultaram distribuídas de acordo com o equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, com exceção dos SNPs em *IRF4* e *KPNA2* ($p < 0,05$) (**Tabela VII**).

Para os polimorfismos com distribuição genotípica diferente daquela esperada, o ensaio de genotipagem e discriminação alélica foi refeito, confirmando o resultado. Como não encontramos dados relativos à frequência dos SNPs rs12203592 (*IRF4*) e rs8078543 (*KPNA2*) na população brasileira, e a frequência alélica reportada nos bancos de dados públicos para a população caucasiana é semelhante (**Tabela IV**), e levando em conta que possa se tratar de uma característica intrínseca da população de estudo (Chen et al., 2017), optamos por não excluir os 2 SNPs da nossa análise.

A análise do desequilíbrio de ligação (LD: *Linkage Disequilibrium*) mostrou uma forte correlação entre os SNPs do gene *P2X7* e do *IL18* ($D'/r^2 > 90$) e uma média correlação entre os SNPs do *NLRP3* ($D'/r^2 = 70$) como reportado também

na **Tabela VII**. Com isso, além de analisar a distribuição genotípica dos SNPs na coorte, conferimos a distribuição dos haplótipos mais frequentes (frequência > 5%) dos genes *NLRP3*, *P2X7* e *IL18*.

Tabela VII. Frequência alélica e genotípica dos SNPs avaliados em *NLRP3*, *IL1B*, *IL18*, *CARD8*, *P2X7R*, *IRF4*, *KPNA2*.

Gene	SNP ID	Frequência	p _{H-W}	LD
<i>NLRP3</i>	rs10754558 (G)	C (0,68)		70
		G (0,32)		
		C/C (0,47)	0,56	
		C/G (0,42)		
		G/G (0,11)		
	rs35829419 (C)	A (0,03)		
		C (0,97)		
		C/C (0,95)	0,66	
A/C (0,05)				
<i>IL1B</i>	rs16944 (T)	C (0,62)		-
		T (0,38)		
		C/C (0,38)	0,40	
		C/T (0,49)		
		T/T (0,13)		
<i>IL18</i>	rs1834481 (G)	C (0,84)		95
		G (0,16)		
		C/C (0,71)	0,66	
		C/G (0,27)		
		G/G (0,02)		
	rs5744256 (G)	A (0,84)		
		G (0,16)		
		A/A (0,71)	0,96	
		A/G (0,27)		
		G/G (0,03)		

CARD8	rs2043211 (T)	A (0,70)		-
		T (0,30)		
		A/A (0,49)	0,74	
		A/T (0,43)		
		T/T (0,08)		
P2X7R	rs2230911 (G)	C (0,90)		92
		G (0,10)		
		C/C (0,81)	1,00	
		C/G (0,18)		
		G/G (0,01)		
	rs3751143 (C)	A (0,79)		
		C (0,21)		
		A/A (0,65)	0,85	
		A/C (0,31)		
		C/C (0,04)		
IRF4	rs12203592 (T)	C (0,85)		-
		T (0,15)		
		C/C (0,79)	0,000	
		C/T (0,14)		
		T/T (0,07)		
KPNA2	rs8078543 (G)	T (0,62)		-
		G (0,38)		
		T/T (0,20)	0,001	
		T/G (0,39)		
		G/G (0,41)		

p_{H-W}: Valor de "p" do equilíbrio de Hardy-Weinberg; LD: Linkage Disequilibrium

A coorte de pacientes HIV apresenta variabilidade sobretudo quanto aos níveis de linfócitos T CD4+, enquanto que, como esperado, a ART mantém a carga viral plasmática indetectável na maioria dos pacientes (72%) nos últimos 10 anos (**Tabela II**).

Para cada indivíduo, levamos em conta tanto os valores médios de células T CD4⁺ calculados através da média da contagem de linfócitos T CD4⁺ no decorrer de 10 anos de introdução da ART, quanto a média da contagem de linfócitos T CD4⁺ a cada ano, individualmente, além do nadir (menor contagem de linfócitos T CD4⁺), que, de acordo com a literatura, é um importante índice preditivo para uma maior severidade (Negredo et al., 2010) e morbi-mortalidade (Bray et al., 2012).

Apesar de não termos os dados para todos os indivíduos genotipados, consideramos também a contagem de linfócitos T CD8⁺ (média de 10 anos e média anual) e a razão CD4/CD8 que, quando baixa ou invertida, é um fenótipo de risco para uma alterada função imune, sendo associado a imunossenescência, e a inflamação crônica (McBride, Striker 2017). Além disso, achamos relevante o dado de resposta à imunização para HBV presente em um grupo de pacientes (n = 117) anteriormente estudados especificamente por conta da baixa responsividade a vacina (Lara et al., 2017). Neste caso levamos em conta duas variáveis: a responsividade a imunização e a persistência dos títulos de anticorpos após 10 anos de acompanhamento.

O teste de normalidade foi aplicado às variáveis, sendo observado uma distribuição normal para a maioria. Aquelas cuja distribuição não foi normal, os valores foram convertidos para logaritmo.

Com relação às comorbidades, levamos em conta as mais frequentes na coorte em estudo: autoimunidade (n = 42), doença cardiovascular (n = 31), diabetes (n = 41), doença renal (n = 33), doença hepática (n = 40) e osteoporose (n = 47) (**Tabela II** na seção Materiais e métodos).

A distribuição dos genótipos e haplótipos em relação às variáveis clínicas principais foi analisada de acordo com uma abordagem multivariada e o modelo linear geral (*General Linear Model*), incluindo como variáveis de confusão o gênero, a idade o tempo de doença e o tempo de tratamento.

A associação dos polimorfismos com as variáveis selecionadas foi testada nos modelos de herança codominante, dominante e recessivo pelo alelo menor, e o modelo mais plausível foi escolhido de acordo com o critério de *Akaike* (1974). E, levando em consideração que os SNPs estão localizados em genes

cujos produtos atuam em conjunto, foram analisados o efeito epistático e combinatório dos SNPs sobre as variáveis principais.

Diferenças na distribuição dos SNPs foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,01$ de acordo com a correção por múltiplas comparações de Bonferroni para marcadores (SNPs) independentes.

Os resultados da análise multivariada são descritos a seguir. Para cada variável principal considerada, são reportados um gráfico que resume os valores de “p” ajustado pelas variáveis de correção (p_{corr}) para cada SNP, e uma tabela com os dados detalhados apenas do(s) SNP(s) que obtiveram $p_{\text{corr}} < 0,01$. O resultado completo do estudo de associação encontra-se na tabela presente no **APÊNDICE H**.

Como pode ser observado pelos gráficos da **Figura 13**, o único polimorfismo que resultou associado significativamente ($p_{\text{corr}} < 0,01$) com a contagem média de linfócitos T CD4+ (**Figura 13 A**), nadir (**Figura 13 B**) e contagem média de linfócitos T CD8+ (**Figura 13 C**) foi o rs16944 no gene da *IL1B*. Quanto a razão da contagem de linfócitos T CD4+/CD8+, não foi possível observar uma associação significativa entre nenhum dos SNPs avaliados (**Figura 13 D**), $p > 0,01$.

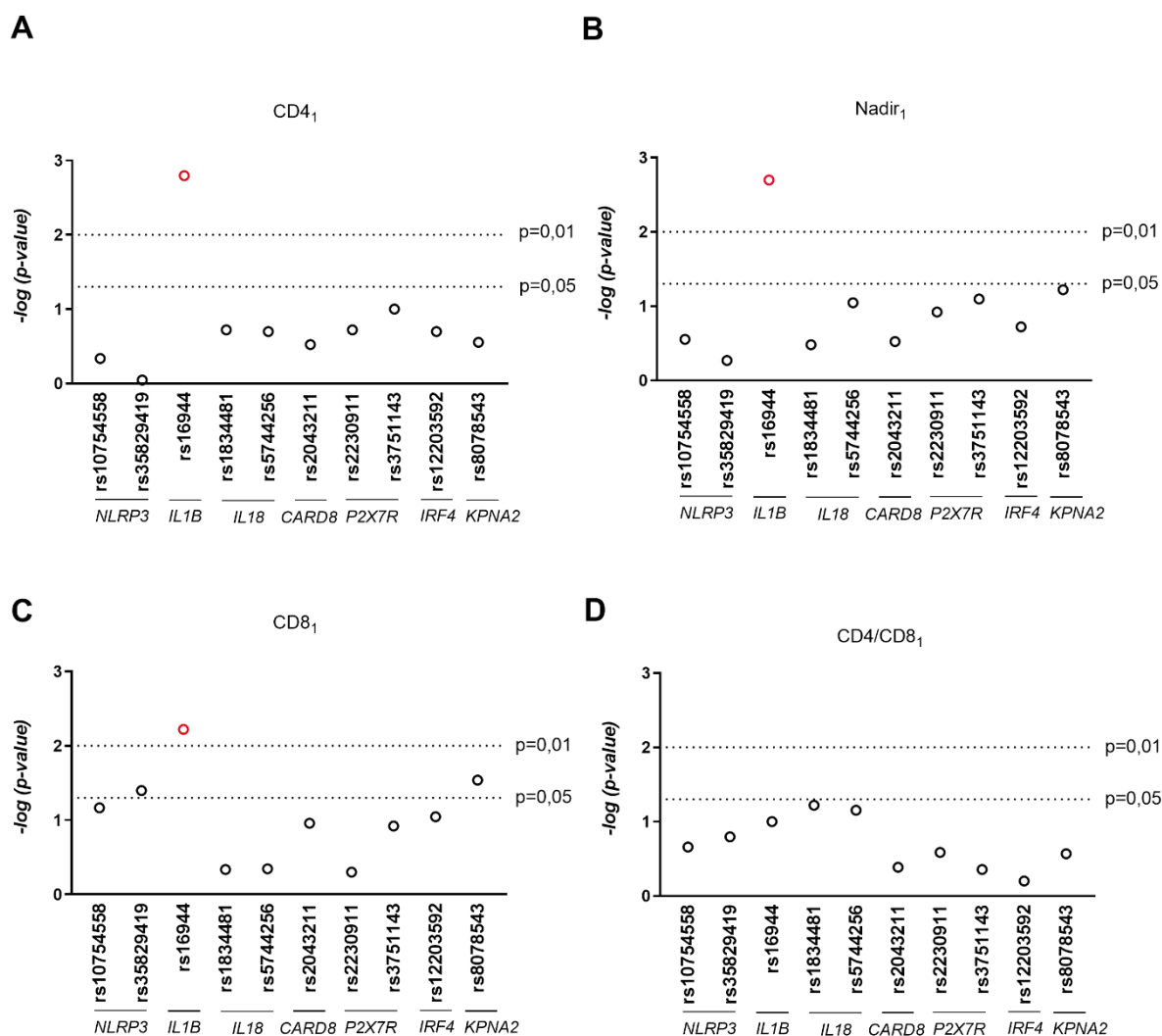


Figura 13. Resultados da análise de associação dos SNPs selecionados no NLRP3 inflamassoma com as variáveis laboratoriais dos pacientes HIV em ART.

São reportados os valores de p_{corr} (-log) resultantes da análise multivariada para cada SNP analisado em relação a contagem de linfócitos T CD4+ e TCD8+ (células/mm³ de sangue), nadir de T CD4+ (células/mm³ de sangue), e razão CD4/CD8. A análise foi realizada considerando (A) a média das contagens de linfócitos T CD4+ de cada paciente no decorrer de 10 anos de acompanhamento após introdução da ART; e (B) o nadir de cada paciente no decorrer de 10 anos de acompanhamento após introdução da ART; (C) a média das contagens de linfócitos T CD8+ de cada paciente no decorrer de 10 anos de acompanhamento após introdução da ART; (D) A razão da média das contagens de linfócitos T CD4+ e T CD8+ de cada paciente no decorrer de 10 anos de acompanhamento após introdução da ART.

As linhas tracejadas representam os valores de corte de significância antes ($p_{corr} = 0,05$) e após ($p_{corr} = 0,01$) correção de Bonferroni. Os círculos evidenciados em vermelho identificam os valores de associação significativos após a correção de Bonferroni.

Indivíduos que carregam o SNP rs16944 (-511 C>T) no gene *IL1B* apresentam uma média (e um nadir) de contagem de linfócitos T CD4+ e de T CD8+ menor que os que apresentam o genótipo selvagem (**Tabela VIII**).

Tabela VIII. Resultados da análise de associação do SNP *IL1B* rs16944 C>T com as variáveis laboratoriais dos pacientes HIV em ART.

Variável	Genótipos	Frequência	Média ± SE	p _{corr}
CD4+ (células/mm ³), média 10 anos	C/C+C/T	0,85	679,2 ± 21,3	0,001
	T/T	0,15	503,6 ± 37,6	
CD4+ (células/mm ³), nadir 10 anos	C/C+C/T	0,84	416,7 ± 15,2	0,002
	T/T	0,16	304,0 ± 23,6	
CD8+ (células/mm ³), média 10 anos	C/C	0,32	1009,0 ± 50,9	0,006
	C/T+T/T	0,68	869,4 ± 27,4	

SE: Erro Padrão (Do inglês: *Standard Error*); p_{corr} “p” corrigido por gênero, idade, tempo de doença e tempo de ART.

A mesma diferença significativa foi observada quando comparamos (através do múltiplo teste “t” com correção de Bonferroni) os níveis de linfócitos T CD4+ anuais (valores de médias anuais individuais ao longo de 10 anos) entre indivíduos agrupados pelo genótipo do SNP rs16944 (T/T versus C/C+C/T) (Figura 14).

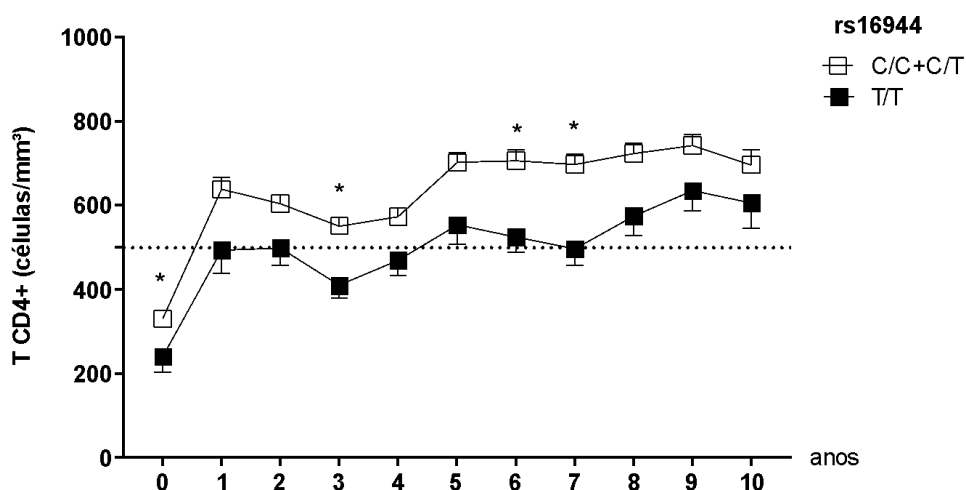


Figura 14. A variante *IL1B* rs16944 C>T é associada a menores contagens de linfócitos T CD4+ em pacientes HIV em ART.

São reportados os dados da contagem plasmática dos linfócitos T CD4+ como média anual de 450 indivíduos HIV em ART, agrupados de acordo com o genótipo polimórfico T/T ou selvagem (C/C+C/T) (modelo recessivo) do SNP rs16944 C>T no decorrer de 10 anos após introdução da terapia. O teste “t” múltiplo seguido pelo pós-teste de Bonferroni foi aplicado para comparar o nível de linfócitos a cada ano entre os dois grupos.

A linha tracejada indica o valor da contagem de linfócitos T CD4+ de 500 células/mm³ de sangue.

*: p < 0,01.

Quando analisamos a distribuição dos haplótipos dos SNPs nos genes *NLRP3*, *IL18* e *P2XR7*, não foi possível observar uma associação significativa com as variáveis principais descritas acima ($p > 0,01$).

Como mencionado previamente, no intuito de avaliar a possível interação entre os SNPs em genes do mesmo complexo, foi realizada uma análise de interação epistática e combinatória entre os SNPs em genes diferentes, utilizando a mesma abordagem multivariada GLM. Os resultados obtidos pela análise de associação com o nível sanguíneo de linfócitos T CD4+ são resumidos na **Tabela IX**. Para as outras variáveis laboratoriais testadas, não observamos resultados significativos.

Tabela IX. Efeito epistático significativo entre os SNPs do gene *NLRP3* e o SNP do *CARD8* com o nível sanguíneo de linfócitos T CD4+ em pacientes HIV em ART. São reportados os resultados da análise epistática entre os SNPs nos genes do *NLRP3* inflamassoma com relação a contagem sanguínea dos linfócitos T CD4+, como média de 10 anos, de 450 indivíduos HIV em ART. Não são indicados os SNPs individualmente, mas apenas o gene.

	<i>NLRP3</i>	<i>IL1B</i>	<i>IL18</i>	<i>P2XR7</i>	<i>CARD8</i>	<i>IRF4</i>	<i>KPNA2</i>
<i>NLRP3</i>	*	ns	ns	Ns	*	ns	ns
<i>IL1B</i>		-	ns	Ns	ns	ns	ns
<i>IL18</i>			ns	Ns	ns	ns	ns
<i>P2XR7</i>				Ns	ns	ns	ns
<i>CARD8</i>					-	ns	ns
<i>IRF4</i>						-	ns
<i>KPNA2</i>							-

* : $p_{\text{corr}} < 0,01$; ns: $p_{\text{corr}} > 0,01$; -: não testado.

Quando a combinação de SNPs com efeito epistático significativo foi testada na análise da média de linfócitos T CD4+ ao longo dos 10 anos após a introdução da ART, observamos que tanto a combinação entre os dois SNPs de *NLRP3* (rs10754558 C>G e rs35829419 C>A), quanto entre o *NLRP3* rs35829419 C>A e *CARD8* rs2043211 C>T, resultou significativamente associada ao nível médio anual de linfócitos T CD4+. Como pode ser apreciado nas **Figuras 15 A e B**, indivíduos que carregam alelos polimórficos do

rs10754558 e rs35829419 do *NLRP3* (A) ou do *NLRP3* rs35829419 e de *CARD8* rs2043211 (B) tendem a apresentar um maior nível periférico de linfócitos T CD4+ ($p < 0,01$).

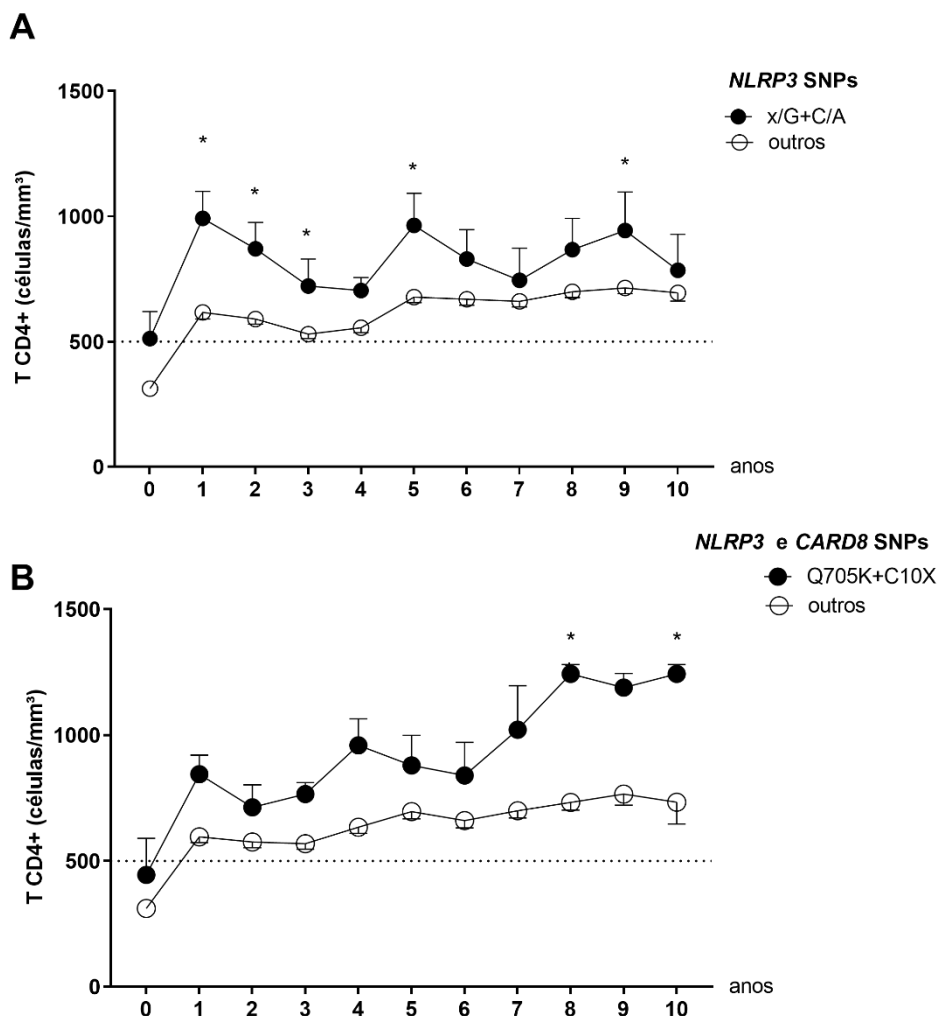


Figura 15. A combinação entre os SNPs de *NLRP3* ou de *NLRP3* e *CARD8* afeta positivamente a contagem de linfócitos T CD4+ de pacientes HIV em ART.

São reportados os dados da contagem sanguínea dos linfócitos T CD4+ como média anual de 450 indivíduos HIV em ART, agrupados de acordo com a combinação de genótipos dos SNPs rs10754558 C>G e rs35829419 C>A do *NLRP3* (A) ou rs35829419 C>A e rs2043211 C>T do *CARD8* (B) no decorrer de 10 anos após introdução da terapia. O teste “t” múltiplo seguido pelo pós-teste de Bonferroni foi aplicado para comparar o nível de linfócitos a cada ano entre os dois grupos.

A linha tracejada indica o valor da contagem de linfócitos T CD4+ de 500 células/mm³ de sangue.

* : $p < 0,01$.

Em seguida avaliamos a distribuição dos SNPs em pacientes HIV com e sem as comorbidades selecionadas. Apenas a variante *IL1B* rs16944 C>T resultou associada às comorbidades analisadas. Indivíduos que carregam o

alelo polimórfico T são mais susceptíveis a desenvolverem doenças autoimunes (n= 42; OR: 2,29 (1,01 – 5,19); p_{corr}= 0,01), doenças hepáticas (n= 40; OR: 2,72 (1,15 - 6,42); p_{corr}= 0,01) ou doenças cardiovasculares (n= 31; OR: 2,72 (1,15 – 6,42); p_{corr}= 0,006).

A análise de haplótipos e epistática não resultou em nenhuma associação significativa em relação a presença de comorbidades.

Por fim, a distribuição dos SNPs foi analisada com relação às duas variáveis de resposta à imunização para HBV (resposta e persistência dos títulos de anticorpos). Os resultados da análise multivariada são reportados a seguir em um gráfico que resume os valores de “p” ajustado pelas variáveis de correção (p_{corr}) para cada SNP, e uma tabela com os dados detalhados apenas do(s) SNP(s) que obtiveram p_{corr} < 0,01. O resultado completo do estudo de associação também se encontra na tabela presente no **APÊNDICE H**.

Como pode ser observado pelos gráficos das **Figura 16 A, B**, o único polimorfismo que resultou associado significativamente (p_{corr} < 0,01) com a resposta a imunização em termos de produção de Anti-HBsAg foi o rs10754558 no gene *NLRP3*.

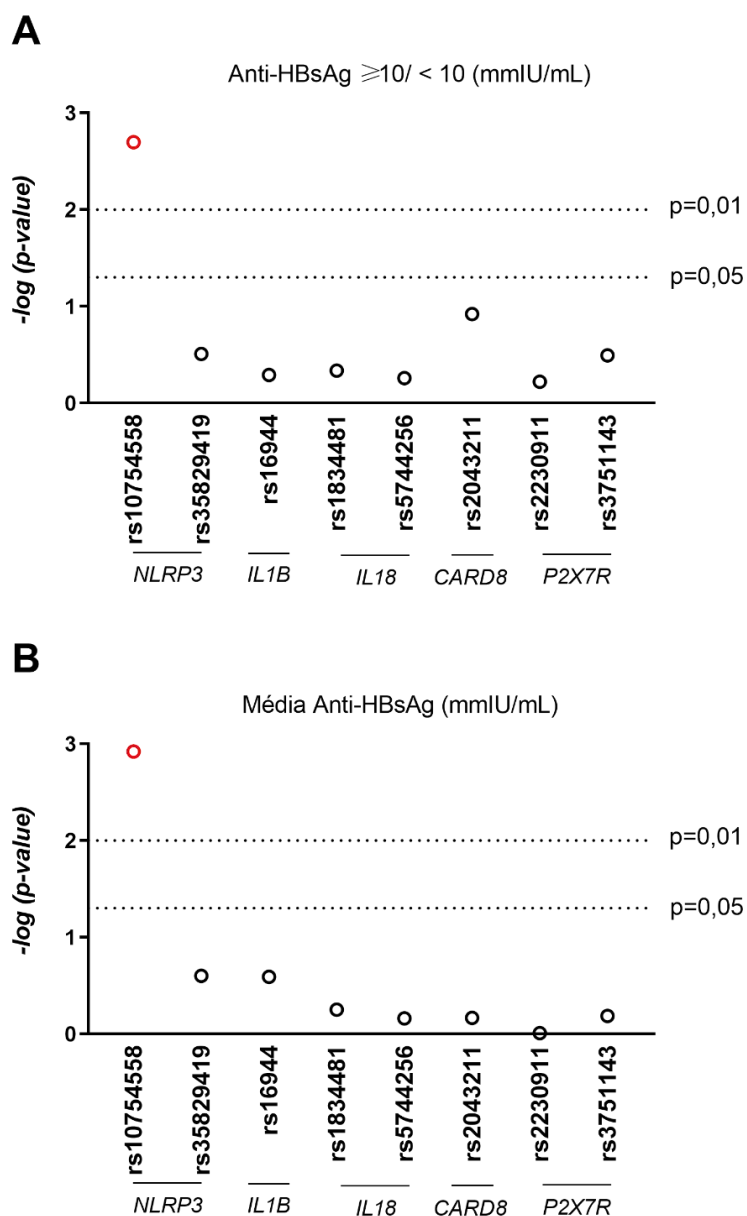


Figura 16. O SNP rs10754558 no gene NLRP3 é associado com a resposta à imunização para HBV dos pacientes HIV em ART.

São reportados os valores de p_{corr} (-log) resultantes da análise multivariada para cada SNP analisado em relação aos níveis de Anti-HBsAg após imunização com vacina contra Hepatite B. A análise foi realizada considerando (A) a responsividade quanto aos níveis de Anti-HBsAg após vacinação (Respondedores (≥ 10 mIU/mL) versus não respondedores (< 10 mIU/mL); e (B) Os níveis médios de Anti-HBsAg considerados de forma contínua após 10 anos da imunização. As linhas tracejadas representam os valores de corte de significância antes ($p_{\text{corr}} = 0,05$) e após ($p_{\text{corr}} = 0,01$) correção de Bonferroni. Os círculos evidenciados em vermelho identificam os valores de associação significativos após a correção de Bonferroni.

A análise resultou na associação significativa entre o SNP rs10754558 no gene *NLRP3* e a resposta a imunização, tanto considerando a comparação entre

respondedores (n = 44) e não respondedores (n = 73), quanto considerando o título médio de anticorpos Anti-HBsAg (**Tabela X**).

Tabela X. O SNP em *NLRP3* (rs10754558 C>G) é associado com melhor resposta à imunização para HBV em pacientes HIV em ART.

Variável	Genótipos	Frequência		p_{corr}
			OR (95% IC)	
Resposta à imunização (sim versus não)	C/C	0,44	Ref	
	C/G	0,41	0,22 (0,08-0,56)	0,002
	G/G	0,15	1,09 (0,35-3,39)	
			Média ± EP	
Título de Anti-HBsAg (mIU/mL)	C/C	0,44	126 ± 34	< 0,001
	C/G	0,41	186 ± 40	
	G/G	0,15	162 ± 79	

EP: Erro padrão; p_{corr} : p value corrigido por sexo, idade e tempo de doença.

A distribuição de haplótipos e análise epistática novamente não resultou em dados significativos com relação à imunização.

Em conjunto, esses achados (que fazem parte dos artigos publicados presente no **APÊNDICE I, J**) mostram uma associação significativa tanto do gene *IL1B* quanto o *NLRP3* com o estado clínico do paciente cronicamente infectado pelo HIV, assim como foi demonstrado anteriormente na associação quanto a susceptibilidade ao vírus (Pontillo et al., 2010).

Porém, levando em conta o efeito funcional das variantes polimórficas estudadas (aumento de produção de IL-1 β ; maior atividade do NLRP3 (Hall et al., 2004; Hitomi et al., 2009)) e a interação causa/efeito que liga as duas moléculas no contexto do inflamassoma, o sentido da associação aparenta ser conflitante (maior nível de IL-1 β em indivíduos com pior estado clínico; maior atividade de NLRP3 em indivíduos com melhor estado clínico). Essa aparente incongruência pode ser explicada levando em conta um efeito célula específico de cada variante e/ou funções inflamassoma independentes do receptor NLRP3.

Ambas hipóteses foram abordadas na presente tese e descritas nas próximas seções.

5.2 Ativação constitutiva aumentada do inflamassoma nas células mononucleares de sangue periférico em pacientes HIV tratados

Os dados obtidos no estudo genético reforçam a hipótese de um papel da ativação do NLRP3 inflamassoma não somente quanto à susceptibilidade à infecção, mas também como fator de contribuição na heterogeneidade clínica dos pacientes cronicamente infectados pelo HIV-1. Entretanto, não está claro como o receptor NLRP3 e a IL-1 β atuariam de forma oposta na modulação da inflamação crônica do paciente.

A literatura reporta que as células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de indivíduos que vivem com HIV/Aids apresentam ativação constitutiva do inflamassoma, medida através da formação de agregados fibrilares citosólicos contendo a proteína ASC (Ahmad et al., 2018). Contudo, não é claro sobre qual subpopulação de leucócito(s) estaria(m) sendo constitutivamente ativado(s), e se esta ativação do inflamassoma estaria resultando em liberação constitutiva de IL-1 β e/ou IL-18. Vale lembrar que já foi reportado que pacientes HIV apresentam níveis séricos elevados de IL-18 (Stylianou et al., 2003; Wiercinska-Drapalo et al., 2004; Song et al., 2006).

Buscando responder a essas perguntas, inicialmente avaliamos a ativação constitutiva do inflamassoma nos PBMC de pacientes cronicamente infectados pelo HIV, medindo tanto a ativação da caspase-1 quanto a liberação das citocinas IL-1 β e IL-18. Portanto, os PBMC foram isolados de 5 pacientes HIV e a ativação do inflamassoma comparada com os PBMC de um grupo de 10 doadores saudáveis (HIV negativos).

A dosagem de IL-1 β presente no sobrenadante de cultura dos PBMC foi maior no grupo de pacientes em comparação aos controles (HIV: $33,70 \pm 11,10$ pg/mL; CS: $4,62 \pm 2,55$ pg/mL; $p < 0,001$) (**Figura 17 A**). Em relação aos níveis de IL-18 presente no sobrenadante dos PBMC, não foi possível observar uma produção significativa dessa citocina e sem diferença entre os grupos, $p > 0,05$ (**Figura 17 A**). Já para a caspase-1 ativa, assim como observado para a IL-1 β ,

o grupo de pacientes HIV apresentou uma maior clivagem da caspase-1 comparado ao grupo controle (HIV: $7,04 \pm 2,77$ %; CS: $2,33 \pm 0,59$ %; $p = 0,04$) (**Figura 17 B, C**).

Levando em conta que a ativação do inflamassoma pode induzir também a piroptose, e que este tipo de morte foi observado em linfócitos T CD4+ infectados pelo HIV (Monroe et al., 2014; Nissen et al., 2014; Muñoz-Arias et al., 2015), buscamos avaliar os níveis de morte celular nos PBMC dos pacientes HIV. Na **Figura 17 D** são reportados os resultados da análise por citometria de fluxo do marcador fluorescente de células mortas (*LIVE/DEAD™ Viability/Cytotoxicity Kit*) e na **Figura 17 E** do ensaio de citotoxicidade (liberação de LDH), para os PBMC de pacientes HIV e grupo controle (CS).

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas quanto a viabilidade celular entre os grupos de pacientes e controles (LDH HIV: $22,42 \pm 8,22$ %, CS: $22,33 \pm 2,74$ %; *LIVE/DEAD* HIV: $15,33 \pm 3,05$ %, CS: $12,0 \pm 2,0$ %), sugerindo que a constitutiva ativação do inflamassoma observada nos PBMC dos pacientes não está aparentemente relacionada a uma maior indução de morte celular.

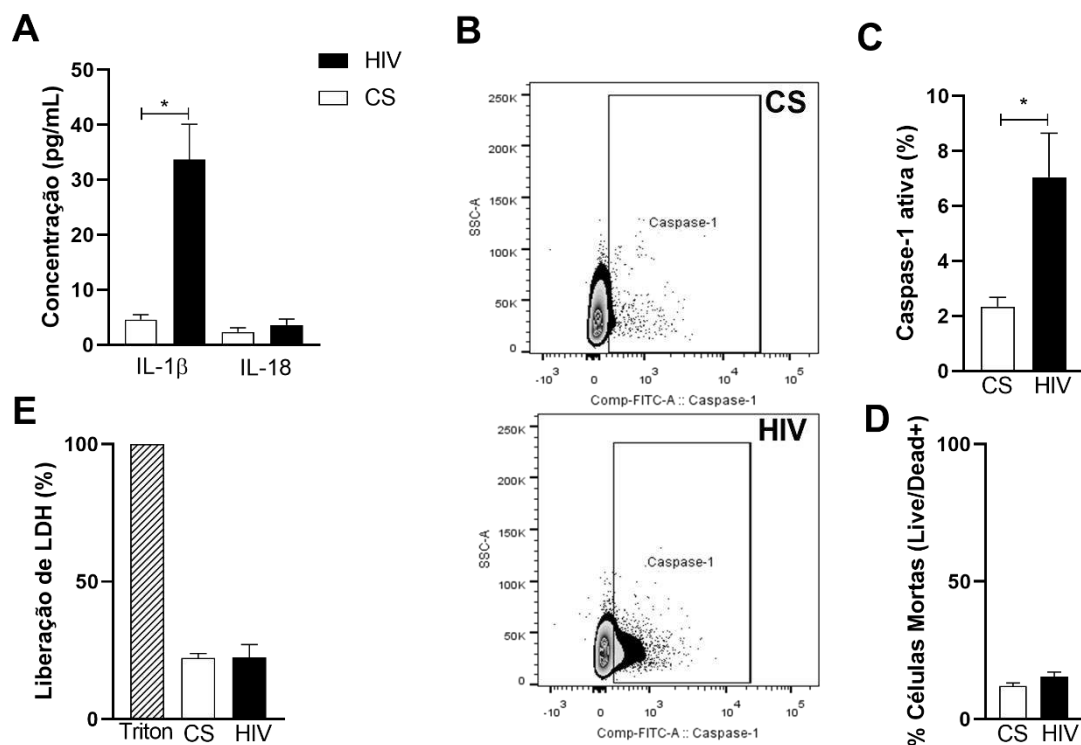


Figura 17. Ativação constitutiva do inflamassoma é aumentada nos PBMC de pacientes HIV tratados.

Células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram isoladas por gradiente de densidade de controles saudáveis (CS = 10) e pacientes cronicamente infectados pelo HIV em ART (HIV = 5) e cultivadas em RPMI-10% SFB por 24 horas. Foi analisada a liberação espontânea das citocinas IL-1 β e IL-18 por ELISA (**A**); a ativação constitutiva da caspase-1 nos PBMC de CS (n=3) e HIV (n=3) por marcação com o kit FAM-FLICA e detecção por citometria de fluxo, sendo apresentado tanto um experimento exemplificativo da análise por citometria de uma amostra de CS e HIV, representando os dados como porcentagem de PBMC FAM-FLICA+ dentro do *gate* de células vivas (*LIVE/DEAD low*) na forma de zebra plot (**B**) quanto a média dos 3 experimentos independentes em gráfico de barras (**C**); A viabilidade celular foi avaliada tanto com a marcação com o kit *LIVE/DEAD*, detecção por citometria de fluxo e representação como porcentagem de células mortas (*LIVE/DEAD high*) (**D**) quanto pela liberação de lactato desidrogenase (LDH) no sobrenadante de cultura de CS (n=3) e HIV (n=3) com representação em porcentagem em relação ao controle positivo (Triton, 100% de lise celular) (**E**);

Todos os dados são representados como média \pm desvio padrão (DP). O teste de *Mann-Whitney* foi aplicado para comparar os grupos HIV e CS em **C**, **D** e **E**, o teste de *Kruskal-Wallis* em **A**. Diferenças $p < 0,05$ foram estatisticamente significativas (*).

Uma vez demonstrado que a ativação constitutiva do inflamassoma nos PBMC de pacientes HIV leva principalmente à produção constitutiva de IL-1 β , consideramos a hipótese que essa condição poderia influenciar no perfil de responsividade do paciente à PAMPs/DAMPs e, conseqüentemente, no nível de ativação do inflamassoma.

Portanto, PBMC de 5 pacientes HIV foram tratados com LPS bacteriano ou β -glucana fúngica por 3 e 24 horas e a liberação de citocinas foi comparada com PBMC de controles saudáveis (n = 10).

A produção de IL-1 β nos PBMC do grupo HIV resultou significativamente maior que nos PBMC dos controles, tanto após 3 horas ($p = 0,04$) quanto após 24 horas ($p = 0,002$) de estimulação com LPS (**Figura 18 A**). Já a resposta a β -glucana, não aparenta ser diferente nos dois grupos ($p = 0,60$) (**Figura 18 A**). Em relação aos níveis de IL-18, não foi possível observar uma indução significativa dessa citocina em nenhuma das condições de estimulação ($p > 0,05$) (**Figura 18 B**). Já a presença de LPS levou a uma indução significativa da produção de TNF- α a 3 horas ($p = 0,013$) e ainda maior a 24 horas ($p < 0,001$), assim como na presença da β -glucana ($p < 0,010$), porém sem diferenças significativas entre pacientes e controles ($p > 0,05$) (**Figura 18 C**).

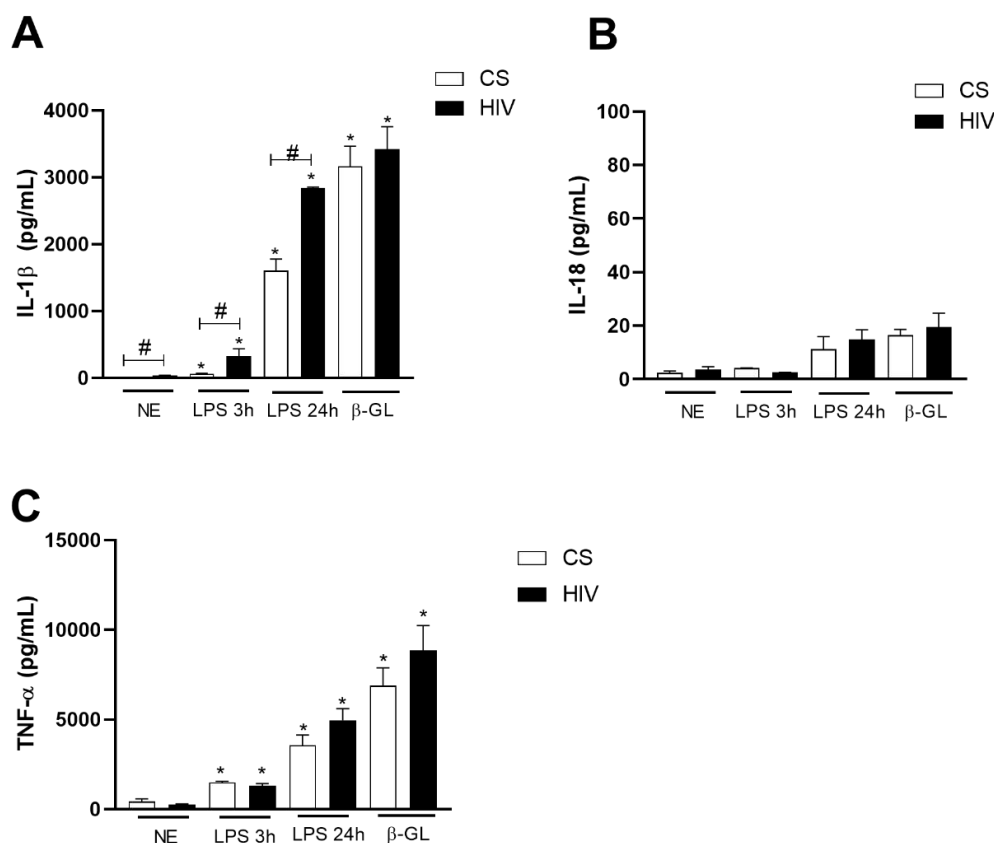


Figura 18. A estimulação com LPS induz uma aumentada ativação do inflamassoma nos PBMC de pacientes HIV tratados.

Células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram isoladas por gradiente de densidade de controles saudáveis (CS = 10) e pacientes infectados pelo HIV (HIV = 5) e estimuladas com 1 μ g/mL de lipopolissacarídeo (LPS) por 3 ou 24 horas ou estimulados com 50 μ g/mL de β -glucana por 24 horas.

Foi analisada a liberação das citocinas IL-1 β (**A**), IL-18 (**B**) e TNF- α (**C**) por ELISA no sobrenadante de cultura. Todos os dados são representados como média \pm desvio padrão (DP). O teste de *Friedman* foi aplicado para comparar as condições NE, LPS 3h, LPS 24h e β -glucana; o teste de *Mann-Whitney* para comparar as condições entre os grupos HIV e CS.

* $p < 0,05$ para comparações entre NE, LPS e β -glucana. # $p < 0,05$ para comparações entre CS e HIV. NE: Não Estimulado.

Levando em conta que o LPS pode ativar o inflamassoma através do receptor NLRP3, sobretudo na presença de DAMPs, como o ATP, replicamos o ensaio adicionando ao final do tratamento com LPS, 1 mM de ATP por mais 15 minutos, de acordo com (Gattorno et al., 2007). Os resultados da dosagem das citocinas IL-1 β , IL-18 e TNF- α são reportados na **Figura 19**.

A adição de ATP induziu um aumento significativo de liberação de IL-1 β nos PBMC estimulados com LPS por 3 horas somente no grupo de CS ($p < 0,001$; razão LPS + ATP/LPS > 2) e não no grupo HIV ($p = 0,51$; razão LPS+ATP/LPS < 2) (**Figura 19 A**). Já em PBMC estimulados com LPS por 24 horas, a adição de ATP resulta em aumento significativo de liberação da citocina em ambos os grupos ($p < 0,05$) (**Figura 19 A**). Em relação a IL-18, foram observados níveis baixos e sem diferenças significativas em nenhuma das condições de estímulo em ambos os grupos ($p > 0,05$) (**Figura 19 B**).

Quanto aos níveis da citocina independente da montagem do complexo, TNF- α , foi possível observar que a adição do ATP não levou a uma maior produção na estimulação com LPS a 3h e 24h ($p > 0,05$) e novamente sem diferenças significativas em ambos os grupos, pacientes e controles ($p > 0,05$) (**Figura 19 C**).

Vale destacar que não observamos diferenças na produção das citocinas nos PBMC estimulados apenas com ATP, comparados com os não estimulados (dados não apresentados), $p > 0,05$.

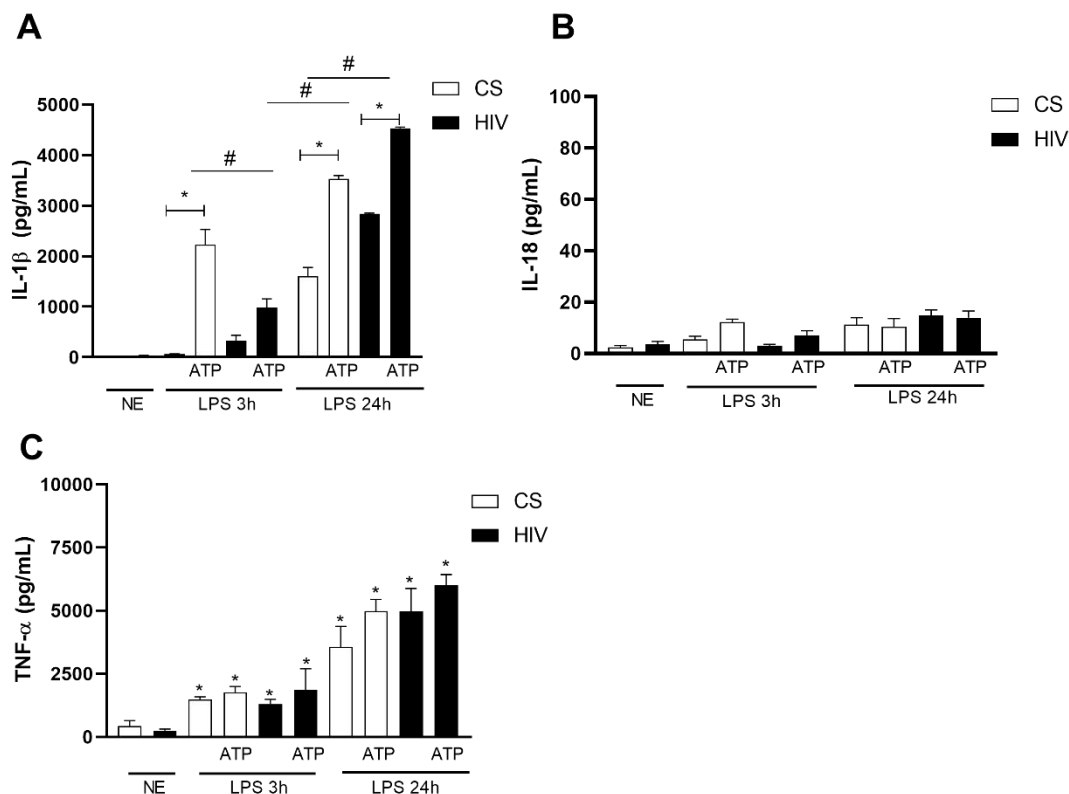


Figura 19. Resposta diferencial ao ATP de PBMC de pacientes HIV tratados.

Células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram isoladas por gradiente de densidade de controles saudáveis (CS = 10) e pacientes infectados pelo HIV (HIV = 5) e estimuladas com 1 µg/mL de lipopolissacarídeo (LPS) por 3 ou 24 horas seguidos da adição de 1 mM de ATP por 15 minutos. Foi analisada a liberação das citocinas IL-1β (A), IL-18 (B) e TNF-α (C) por ELISA no sobrenadante de cultura.

Todos os dados são representados como média ± desvio padrão (DP). O teste de *Friedman* foi aplicado para comparar as condições NE, LPS e LPS+ATP; o teste de *Mann-Whitney* para comparar as condições entre os grupos HIV e CS.

* $p < 0,05$ para comparações entre NE, LPS e LPS+ATP. # $p < 0,05$ para comparações entre CS e HIV. NE: Não Estimulado.

A análise da ativação do inflamassoma nos PBMC dos pacientes HIV, confirma a ativação constitutiva do complexo nessas células, como previamente sugerido a nível transcricional por Bandera et al., (2018). Nossos dados demonstram que o resultado da ativação é uma maior liberação de IL-1β e que os PBMC de pacientes HIV respondem diferentemente dos controles ao LPS, e sobretudo ao estímulo com LPS e ATP, sugerindo fortemente uma desregulação do receptor NLRP3.

O passo seguinte foi investigar em qual(is) leucócito(s) era possível detectar a desregulação do inflamassoma e em particular do NLRP3 inflamassoma.

5.3 Expressão e ativação constitutiva aumentada do NLRP3 inflamassoma nas subpopulações presentes no PBMC de pacientes infectados pelo HIV

Com objetivo de caracterizar o estado de ativação constitutiva do inflamassoma nas subpopulações de PBMC, realizamos a análise tanto do nível de expressão gênica dos componentes do NLRP3 inflamassoma, quanto da produção basal das citocinas e ativação da caspase-1 nos leucócitos purificados (monócitos, linfócitos T CD4+, T CD8+ e B CD19+) a partir de PBMC de pacientes HIV e controle.

Para análise do perfil transcricional das células, foi avaliada a expressão dos genes *NLRP3*, *CASP1*, *IL1B*, *IL18*, além dos genes *CARD8* e *P2X7R* (que codificam para conhecidos reguladores do NLRP3 (Ito et al., 2014; Muñoz-Planillo et al., 2013). Além disso, levando em conta uma possível alteração de mecanismos regulatórios da ativação do NLRP3 em pacientes HIV, foi analisada também a expressão do miR-223, um microRNA envolvido na regulação dos níveis de mRNA do NLRP3 (Bauernfeind et al., 2012).

Os resultados da análise são apresentados de forma resumida como gráfico *heatmap* na **Figura 20**, e em forma detalhada como gráficos de barras para cada subpopulação de leucócito estudado nas **Figuras 21-23**.

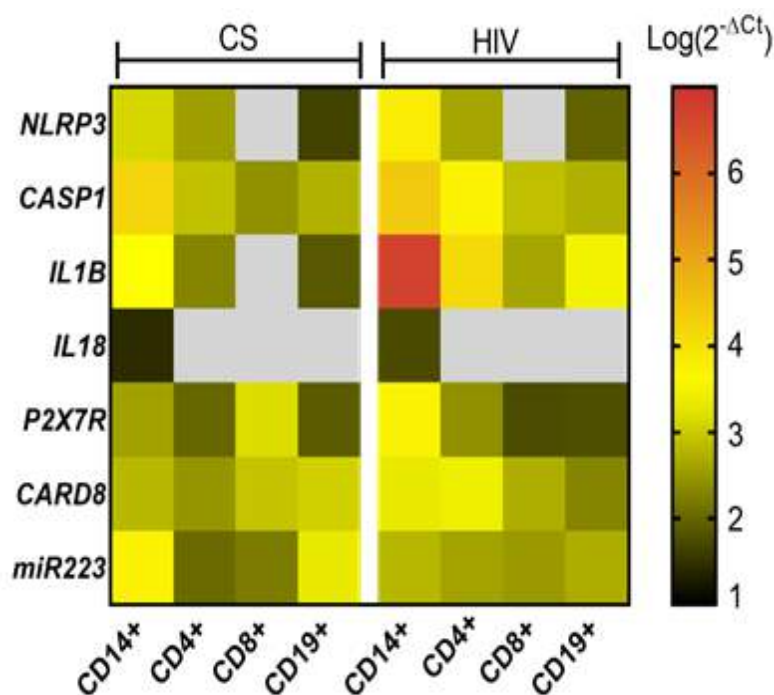


Figura 20. Expressão constitutiva de genes do inflamassoma em monócitos, linfócitos T CD4+, T CD8+ e B (CD19+) de controles saudáveis (CS) e pacientes infectados pelo HIV (HIV).

Expressão gênica de *NLRP3*, *CASP1*, *IL1B*, *IL18*, *P2X7R*, *CARD8* e *miR-223* em células CD14+ (monócitos), linfócitos T CD4+, T CD8+ e B CD19+ de controles saudáveis (CS; n = 15) e pacientes HIV tratados (HIV; n = 10) normalizada por *GAPDH* para os mRNAs e *U6* para o miR-223 (ΔC_t) e representada por unidades arbitrárias (UA) calculado a partir do $\log(2^{-\Delta C_t})$ em um gráfico *heatmap*. Células cinza: Sem amplificação.

Os genes *CASP1* e *IL1B* resultaram significativamente mais expressos tanto nos monócitos (**Figura 21**) quanto nos linfócitos T CD4+ (**Figura 22**) de pacientes HIV comparados com os controles ($p < 0,05$). Já a expressão do gene *IL18* foi detectada apenas em monócitos (**Figura 21**).

Um aumento significativo de expressão de *NLRP3* foi observado nos monócitos (CD14+) dos pacientes comparados aos controles ($p = 0,034$) (**Figura 21**). Por sua vez, menores níveis de *NLRP3* foram encontrados nos linfócitos B (CD19+) (**Figura 23**) e indetectáveis nos linfócitos T CD8+ (**Figura 20**).

Já a expressão de *P2X7*, resultou em média diferente dependendo da célula considerada, sendo o *P2X7* aumentado em monócitos de paciente HIV, mas diminuído nos linfócitos (**Figura 20-23**). Vale ressaltar que os níveis de miR-223 são opostos aos do *NLRP3*, sendo, nos monócitos HIV, significativamente menores que nos controles ($p = 0,049$) (**Figura 21**).

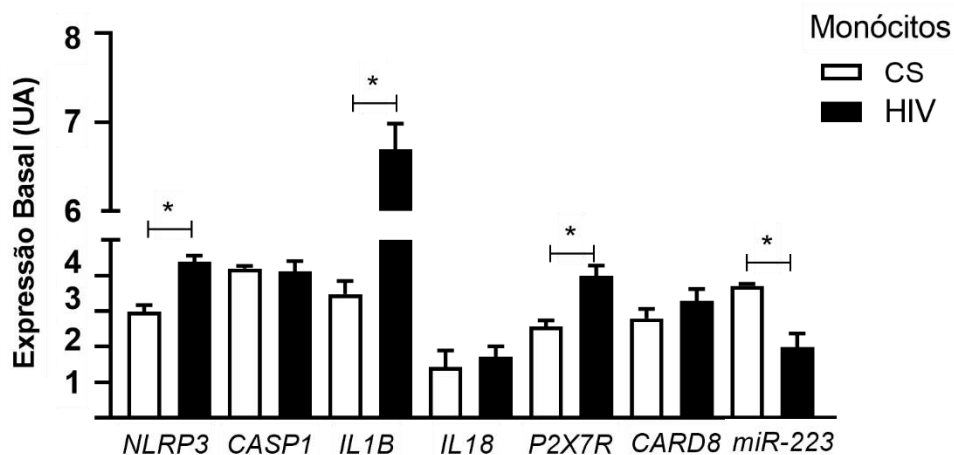


Figura 21. Expressão basal dos principais componentes do NLRP3 inflamassoma em monócitos, de controles saudáveis (CS) e pacientes infectados pelo HIV (HIV).

Expressão gênica basal de *NLRP3*, *CASP1*, *IL1B*, *IL18*, *P2X7R*, *CARD8* e *miR-223* em monócitos de CS (n= 8) e HIV (n= 6) normalizada por *GAPDH* (para os mRNAs) e *U6* (para o miR-223) (ΔCt) e representada por unidades arbitrárias (UA) calculado a partir do $\log(2^{-\Delta Ct})$. As diferenças foram avaliadas por Múltiplo teste "t". *: p < 0,05.

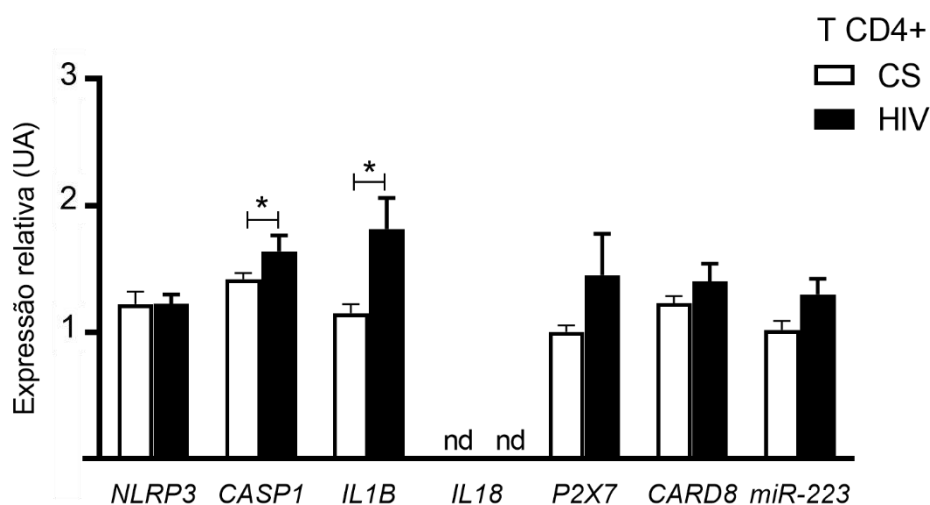


Figura 22. Expressão basal dos principais componentes do NLRP3 inflamassoma em linfócitos T CD4+ de controles saudáveis (CS) e pacientes infectados pelo HIV (HIV).

Expressão gênica basal de *NLRP3*, *CASP1*, *IL1B*, *IL18*, *P2X7R*, *CARD8* e *miR-223* em monócitos de CS (n= 15) e HIV (n= 7) normalizada por *GAPDH* (para os mRNAs) e *U6* (para o miR-223) (ΔCt) e representada por unidades arbitrárias (UA) calculado a partir do $\log(2^{-\Delta Ct})$. As diferenças foram avaliadas por Múltiplo teste "t". *: p < 0,05. nd: não detectado.

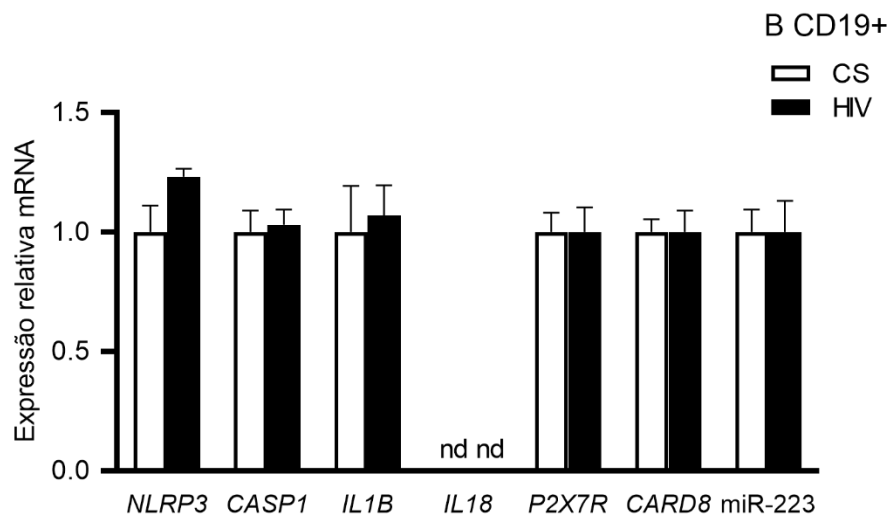


Figura 23. Expressão basal dos principais componentes do NLRP3 inflamassoma em linfócitos CD19+ de controles saudáveis (CS) e pacientes infectados pelo HIV (HIV). Expressão gênica basal de *NLRP3*, *CASP1*, *IL1B*, *IL18*, *P2X7R*, *CARD8* e *miR-223* em monócitos de CS (n= 7) e HIV (n= 8) normalizada por *GAPDH* (para os mRNAs) e *U6* (para o miR-223) (ΔCt) e representada por unidades arbitrárias (UA) calculado a partir do $\log(2^{-\Delta Ct})$. As diferenças foram avaliadas por Múltiplo teste “t”. *: $p < 0,05$. nd: não detectado.

Como observado, a análise do perfil transcricional do inflamassoma nos PBMC dos pacientes HIV demonstra um nível de expressão basal aumentado de *IL1B* e *CASP1* nos monócitos e linfócitos T CD4+ estudados, compatível com a ativação constitutiva do complexo apresentada na seção anterior, e sugerindo a contribuição do receptor NLRP3 pelo menos em monócitos e linfócitos T CD4+.

Levando em conta que os monócitos estão entre as células que mais expressam os componentes do inflamassoma e NLRP3, e, assim como reportado previamente na literatura (Nasi et al., 2019), no grupo de pacientes foi possível observar uma desregulação a nível transcricional (**Figura 21**), a primeira célula que analisamos como responsável da desregulação do inflamassoma nos PBMC de pacientes HIV foi o monócito.

Como esperado, apesar do baixo nível de produção, os monócitos de pacientes HIV (n = 21) liberam mais IL-1 β ($13,0 \pm 15,39$ pg/mL) em comparação aos controles (n = 23; $2,69 \pm 3,05$ pg/mL, $p < 0,003$) (**Figura 24 A**). Os níveis de IL-18 resultaram baixos e não foi possível observar uma diferença significativa entre os grupos (HIV: $9,97 \pm 4,34$ pg/mL; CS: $5,66 \pm 2,18$ pg/mL; $p > 0,05$) (**Figura 24 A**). A produção de citocinas inflamatórias não decorrentes da ativação do inflamassoma, TNF- α e IL-6, também resultou baixa e semelhante nos dois grupos ($p > 0,05$) (**Figura 24 A**).

De maneira similar ao padrão observado para a IL-1 β , o nível de caspase-1 ativa nos monócitos (células CD14+) de pacientes HIV ($13,65 \pm 6,96$ % células FAM-FLICA positivas), foi maior que no grupo controle ($1,88 \pm 0,54$ % células FAM-FLICA positivas; $p = 0,015$) (**Figura 24 B, C**), e sem uma alteração significativa na viabilidade celular avaliada tanto pela marcação com *LIVE/DEAD* (**Figura 24 D**) quanto pela liberação de LDH (**Figura 24 E**).

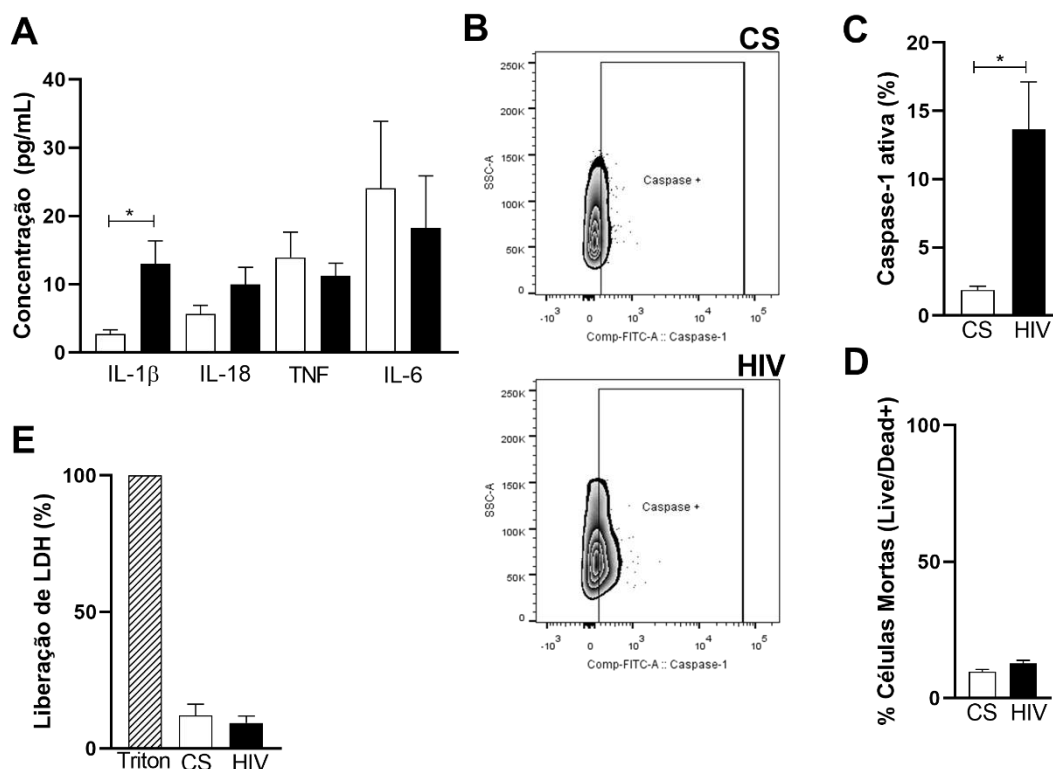


Figura 24. Ativação constitutiva aumentada do inflamassoma nos monócitos de pacientes HIV tratados.

Monócitos (células CD14+) foram purificados de PBMC de controles saudáveis (CS; $n = 23$) e pacientes infectados pelo HIV em ART (HIV; $n = 21$) e cultivados em RPMI-10% SFB por 24 horas.

A liberação das citocinas IL-1 β , IL-18, TNF- α e IL-6 foi analisada no sobrenadante de cultura por ELISA (**A**). Foi avaliada a ativação constitutiva da caspase-1 nos monócitos de CS ($n = 3$) e HIV ($n = 3$) por marcação com o kit FAM-FLICA e detecção por citometria de fluxo, sendo apresentado tanto um experimento exemplificativo da análise por citometria de uma amostra de CS e HIV, representando os dados como porcentagem de células CD14+ FAM-FLICA+ dentro do *gate* de células vivas (*LIVE/DEAD low*) na forma de zebra plot (**B**), quanto a média dos 3 experimentos independentes em gráfico de barras (**C**); A viabilidade celular foi avaliada com a marcação com o kit *LIVE/DEAD*, detecção por citometria de fluxo e representação como porcentagem de células mortas (*Live/Dead high*) (**D**), e a liberação de lactato desidrogenase (LDH) no sobrenadante de cultura de CS ($n = 3$) e HIV ($n = 3$) com representação em porcentagem em relação ao controle positivo (Triton, 100% de lise celular) (**E**). Todos os dados são representados como média \pm desvio padrão (DP).

O teste de *Mann-Whitney* foi aplicado para comparar os grupos HIV e CS em **C**, **D** e **E**, o teste de *Kruskal-Wallis* em **A**. Diferenças $p < 0,05$ foram estatisticamente significativas (*).

A aumentada ativação constitutiva do inflamassoma nos monócitos de pacientes HIV foi demonstrada também através de ensaio de imunofluorescência para visualização e contagem dos *specks* de ASC realizado em 3 amostras do grupo HIV e 3 de CS. Como é possível observar nas imagens da **Figura 25**, relativas a um experimento representativo, células CD14+ de pacientes HIV apresentam uma maior formação de agregados citosólicos positivos pela marcação de ASC (fluorescência vermelha) que os controles ($p = 0,033$) (**Figura 25**).

Com o intuito de confirmar se essa aumentada ativação constitutiva do inflamassoma em termos de produção de IL-1 β e clivagem da caspase-1 é de fato decorrente da ativação do receptor NLRP3, no mesmo ensaio de imunofluorescência, realizamos a marcação das células para o NLRP3 (fluorescência verde), demonstrando que os monócitos de pacientes HIV apresentam também uma maior formação de *specks* positivos para esse receptor comparados ao grupo CS ($p = 0,035$). (**Figura 25**).

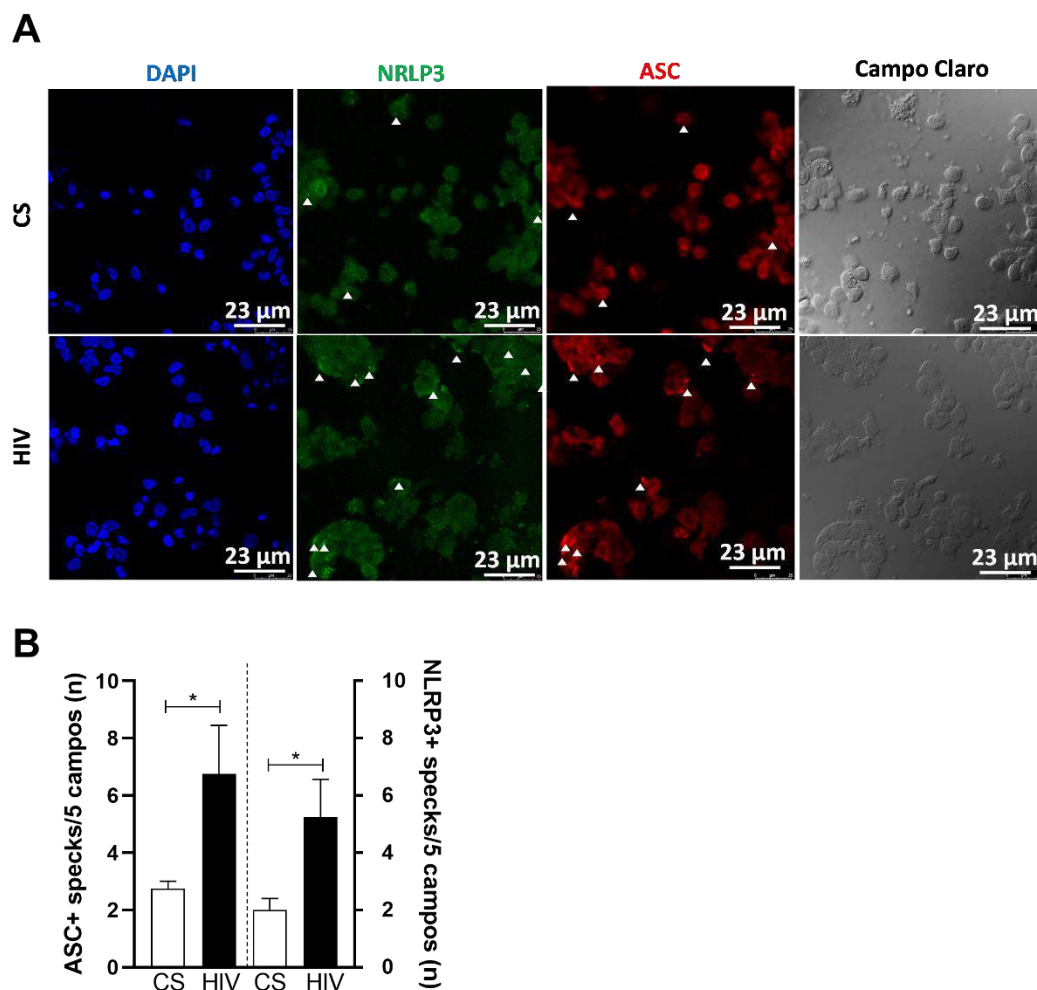


Figura 25. Formação espontânea de specks de ASC ou NLRP3 em monócitos de pacientes HIV tratados.

Foram isoladas $0,2 \times 10^6$ células CD14+ de controles saudáveis (CS; $n = 3$) e pacientes HIV tratados (HIV; $n = 3$) e cultivadas por 24 horas em lâminas *chamber slide*. Em seguida, as células foram permeabilizadas e marcadas para ASC ou NLRP3 para detectar a formação de *specks*.

Em (A) é reportado o resultado de um ensaio representativo dos três experimentos independentes. O painel de imagens obtidas por um microscópio confocal com um aumento de 40x, mostrando a formação de agregados de ASC (vermelho, Alexa-568) ou NLRP3 (verde, Alexa-488) no citosol. O corante DAPI (Azul) foi usado como marcador de núcleo. As setas brancas apontam os *specks*. Em (B) as contagens manuais dos *specks* de ASC ou NLRP3 em 5 campos/imagem são reportadas em gráfico de barras como média + DP. O teste de *Mann-Whitney* foi aplicado para comparar os grupos HIV e CS. Diferenças $p < 0,05$ foram estatisticamente significativas (*).

Assim como observado nos monócitos, também os linfócitos T CD4+ de pacientes HIV apresentam uma maior produção constitutiva da IL-1 β ($14,11 \pm 3,96$ pg/mL) comparados com os controles ($3,61 \pm 2,04$ pg/mL; $p < 0,001$). A produção de IL-18, por sua vez, é escassa em ambos os grupos. Já a dosagem de TNF- α resultou maior nos pacientes HIV que nos controles, porém, devido a

heterogeneidade dos dados, a diferença entre os dois grupos não resultou significativa (**Figura 26 A**).

Uma baixa percentagem de linfócitos T CD4+ resultou positiva para caspase-1 ativa, ainda assim, uma maior clivagem da caspase-1 foi observada no grupo HIV ($1,15 \pm 0,36$ % células CD3+CD4+FAM-FLICA positivas) comparado com o CS ($0,22 \pm 0,10$ % células CD3+CD4+FAM-FLICA positivas; $p = 0,014$) (**Figura 26 B, C**). Já a taxa de morte celular por marcação com *LIVE/DEAD* (**Figura 26 D**) assim como a liberação de LDH, (**Figura 26 E**) é baixa e semelhante nos dois grupos ($p > 0,05$).

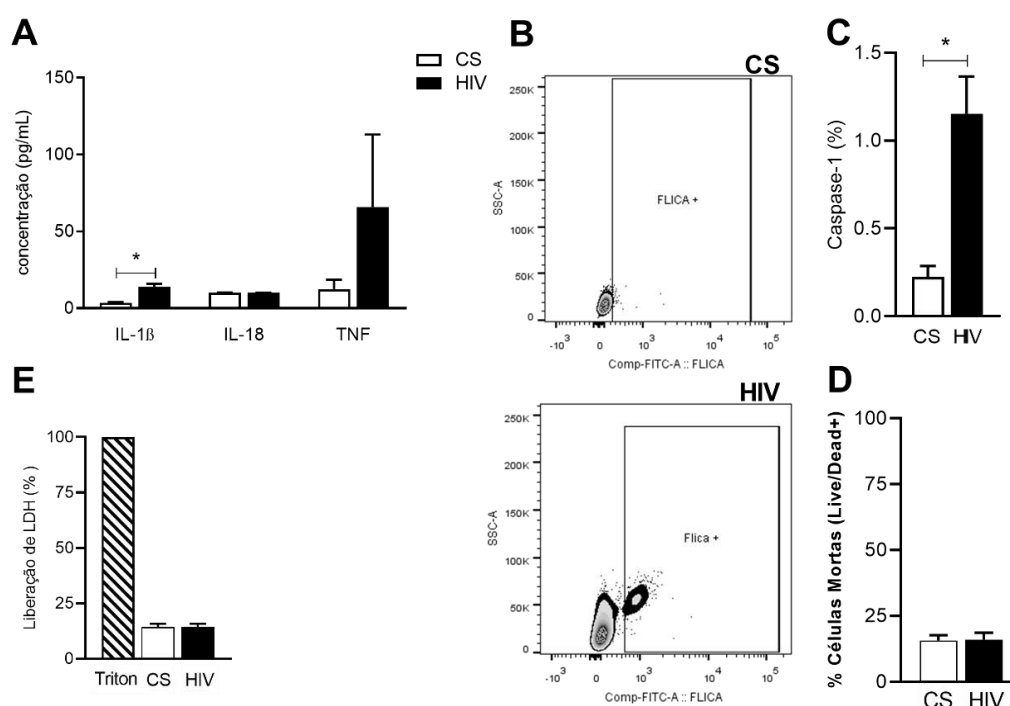


Figura 26. Ativação constitutiva aumentada do inflamassoma nos linfócitos T CD4+ de pacientes HIV tratados.

Linfócitos (células T CD4+) foram purificados de PBMC de controles saudáveis (CS; $n = 17$) e pacientes infectados pelo HIV em ART (HIV; $n = 12$) e cultivados em RPMI-10% SFB por 72 horas.

A liberação das citocinas IL-1 β , IL-18, TNF- α e IL-6 foi analisada no sobrenadante de cultura por ELISA (**A**). Foi avaliada a ativação constitutiva da caspase-1 nos linfócitos T CD4+ de CS ($n = 3$) e HIV ($n = 3$) por marcação com o kit FAM-FLICA e detecção por citometria de fluxo sendo apresentado tanto um experimento exemplificativo da análise por citometria de uma amostra de CS e HIV, representando os dados como percentagem de células CD3+CD4+FAM-FLICA+ dentro do *gate* de células vivas (*LIVE/DEAD low*) na forma de zebra plot (**B**), quanto a média dos 3 experimentos independentes em gráfico de barras (**C**); A viabilidade celular foi avaliada com a marcação com o kit *LIVE/DEAD*, detecção por citometria de fluxo e representação como percentagem de células mortas (*LIVE/DEAD high*) (**D**), e a liberação de lactato desidrogenase (LDH) no sobrenadante de cultura de CS ($n = 3$) e HIV ($n = 3$) com representação em percentagem em relação ao controle positivo (Triton, 100% de lise celular) (**E**). Todos os dados são representados como média \pm desvio padrão (DP).

O teste de *Mann-Whitney* foi aplicado para comparar os grupos HIV e CS em **C**, **D** e **E**, o teste de *Kruskal-Wallis* em **A**. Diferenças $p < 0,05$ foram estatisticamente significativas (*).

Realizamos também para os linfócitos T CD4+ a marcação dos agregados *specks* tanto para ASC, quanto para NLRP3. Em comparação aos monócitos, foi observada uma menor formação espontânea de *specks* nessas células (**Figura 27 A-C**).

Quando comparado ambos os grupos, foi possível observar um maior número de *specks* ASC+ nos pacientes HIV (4 ± 1 *specks*/ 5 campos) em comparação aos controles ($2,2 \pm 0,4$ *specks*/ 5 campos), $p = 0,045$, sugerindo que, assim como observado nos monócitos, existe uma maior ativação constitutiva do complexo no grupo de pacientes (mesmo que em menor nível em comparação aos monócitos) (**Figura 27 B**).

Entretanto, quando avaliamos o número de *specks* NLRP3+, não foi possível observar uma diferença significativa entre os grupos (HIV: $1,8 \pm 0,4$ *specks*/5 campos; CS: $1,4 \pm 0,5$ *specks*/5 campos; $p = 0,69$) (**Figura 27 B**). Assim como na co-localização de ambas proteínas (NLRP3+ASC+), ($p = 0,99$) (**Figura 27 C**).

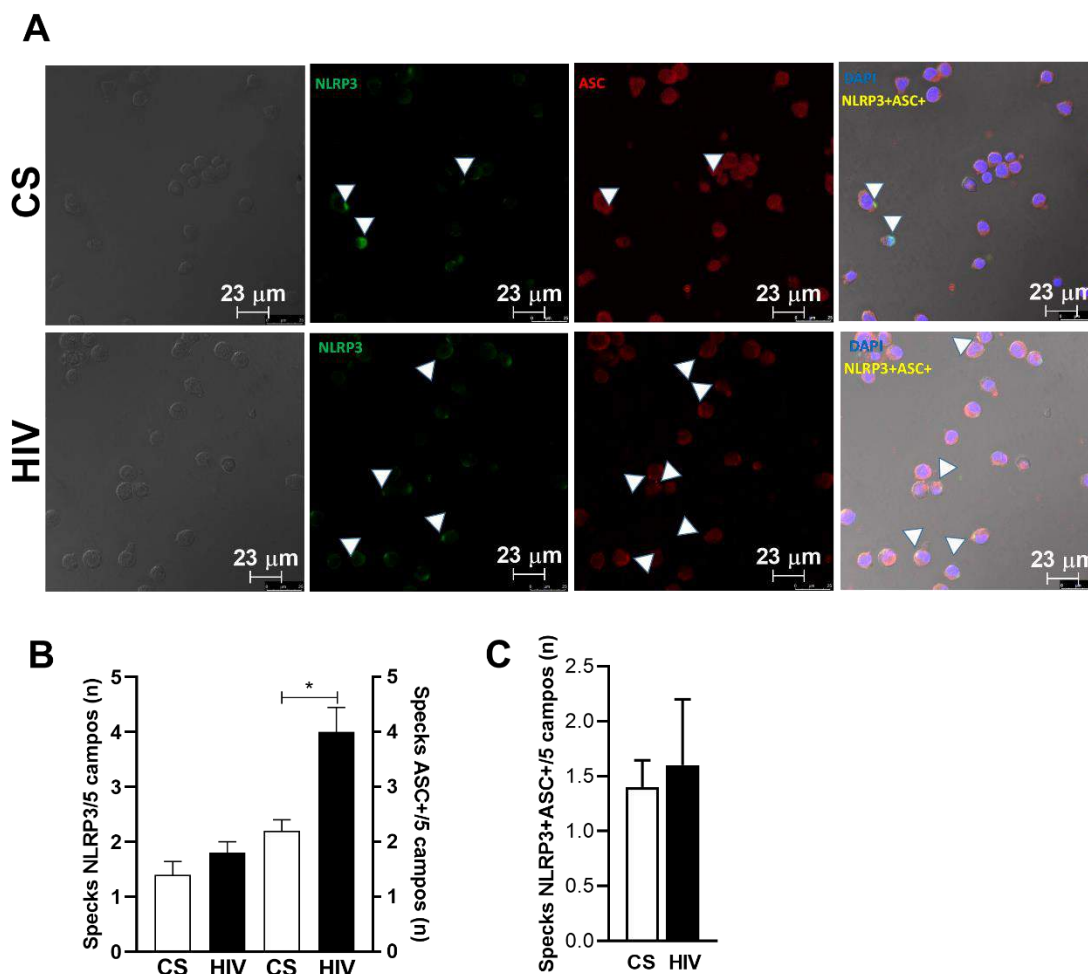


Figura 27. Formação espontânea de specks de ASC ou NLRP3 em linfócitos T CD4+ de pacientes HIV tratados.

Foram isoladas $0,2 \times 10^6$ células CD14+ de controles saudáveis (CS; n = 3) e pacientes HIV tratados (HIV; n = 3) e cultivados por 72 horas em lâminas *chamber slide*. Em seguida, as células foram permeabilizadas e marcadas para ASC ou NLRP3 para detectar a formação de *specks*.

Em (A) é reportado o resultado de um ensaio representativo dos três experimentos independentes. O painel de imagens, foram obtidas por um microscópio confocal com um aumento de 40x, mostrando a formação de agregados de ASC (vermelho, Alexa-568) ou NLRP3 (verde, Alexa-488) no citosol. O corante DAPI (Azul) foi usado como marcador de núcleo. As setas brancas apontam os *specks*. Em (B) as contagens manuais dos *specks* de ASC ou NLRP3 em 5 campos/imagem são reportadas em gráfico de barras como média + DP. Em (C) a contagem de colocalização de *specks* de NLRP3+ASC+ em 5 campos/imagem é reportado em gráfico de barras como média + DP. O teste de *Mann-Whitney* foi aplicado para comparar os grupos HIV e CS. Diferenças $p < 0,05$ foram estatisticamente significativas (*).

Em seguida avaliamos o perfil de ativação espontânea do inflamassoma nos linfócitos B (células CD19+). No grupo dos pacientes HIV, mesmo que em baixos níveis, também foi possível observar uma maior produção constitutiva da IL-1 β ($5,12 \pm 4,48$ pg/mL) comparados com os controles ($0,55 \pm 0,68$ pg/mL; $p = 0,005$) (Figura 28 A). A produção de IL-18 por sua vez, é baixa ou indetectável em ambos os grupos. De forma semelhante a IL-18, a dosagem de TNF- α e IL-

6 não foi diferente entre os grupos de pacientes e controles ($p > 0,05$) (**Figura 28 A**).

Quanto aos níveis de caspase-1 ativa, uma maior clivagem da enzima foi observada no grupo HIV ($15,66 \pm 3,98$ % células CD19+FAM-FLICA+) comparado com o CS ($8,37 \pm 0,35$ % células CD19+FAM-FLICA+; $p = 0,034$) (**Figura 28 B, C**). Já o nível de morte celular é baixo e semelhante entre pacientes e controles ($p > 0,05$), avaliado tanto pela marcação com LIVE/DEAD (**Figura 28 D**), quanto na dosagem da liberação de LDH (**Figura 28 E**)

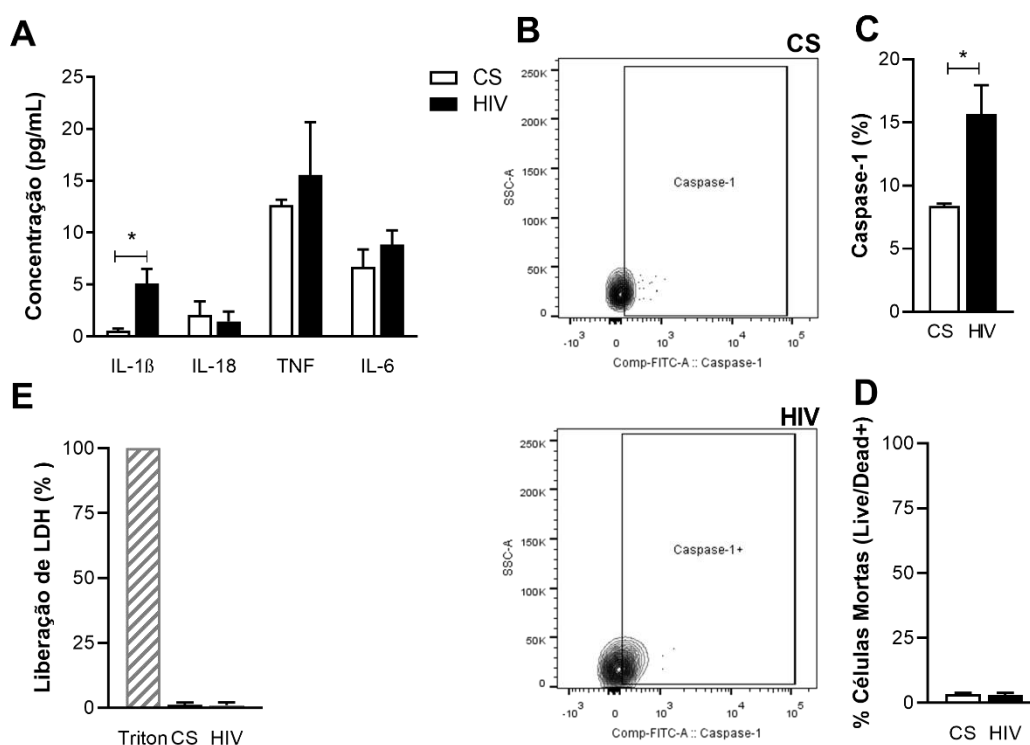


Figura 28. Ativação constitutiva aumentada do inflamassoma nos linfócitos B CD19+ de pacientes HIV tratados.

Linfócitos (células B CD19+) foram purificados de PBMC de controles saudáveis (CS; $n = 15$) e pacientes infectados pelo HIV em ART (HIV; $n = 12$) e cultivados em RPMI-10% SFB por 24 horas.

A liberação das citocinas IL-1 β , IL-18, TNF- α e IL-6 foi analisada no sobrenadante de cultura por ELISA (**A**). Foi avaliada a ativação constitutiva da caspase-1 nos linfócitos B CD19+ de CS ($n = 3$) e HIV ($n = 3$) por marcação com o kit FAM-FLICA e detecção por citometria de fluxo, sendo apresentado tanto um experimento exemplificativo da análise por citometria de uma amostra de CS e HIV, representando os dados como porcentagem de células CD19+FAM-FLICA+ dentro do *gate* de células vivas (*LIVE/DEAD low*) na forma de *zebra plot* (**B**), quanto a média dos 3 experimentos independentes em gráfico de barras (**C**); A viabilidade celular foi avaliada com a marcação com o kit *LIVE/DEAD*, detecção por citometria de fluxo e representação como porcentagem de células mortas (*LIVE/DEAD high*) (**D**), e com a dosagem da liberação de lactato desidrogenase (LDH) no sobrenadante de cultura de CS ($n = 3$) e HIV ($n = 3$), com representação em porcentagem em relação ao controle positivo (Triton, 100% de lise celular) (**E**). Todos os dados são representados como média \pm desvio padrão (DP).

O teste de *Mann-Whitney* foi aplicado para comparar os grupos HIV e CS em **C**, **D** e **E**, o teste de *Kruskal-Wallis* em **A**. Diferenças $p < 0,05$ foram estatisticamente significativas (*).

Essa aumentada ativação constitutiva do inflamassoma nos linfócitos B de pacientes HIV, foi confirmada também através de ensaio de imunofluorescência. Como é possível observar na **Figura 29**, as células CD19+ de pacientes HIV apresentam uma maior formação de agregados citosólicos positivos pela marcação de ASC (fluorescência vermelha) (HIV: 6 ± 1 *specks*/5 campos; CS: 2 ± 1 *specks*/5 campos; $p < 0,001$) (**Figura 29 B**).

Assim como observado nos monócitos, essa maior ativação do complexo ocorre em paralelo com uma maior formação *specks* de receptor NLRP3 (fluorescência verde) em comparação aos controles (HIV: 5 ± 1 *specks*/5 campos; CS: 2 ± 1 *specks*/5 campos; $p = 0,009$) (**Figura 29 B**).

Também na contagem de *specks* colocalizados (NLRP3+ASC+), foi possível observar uma maior formação no grupo de pacientes HIV em comparação aos controles (HIV: 4 ± 1 *specks*/5 campos; CS: 2 ± 1 *specks*/5 campos; $p = 0,007$) (**Figura 29 C**).

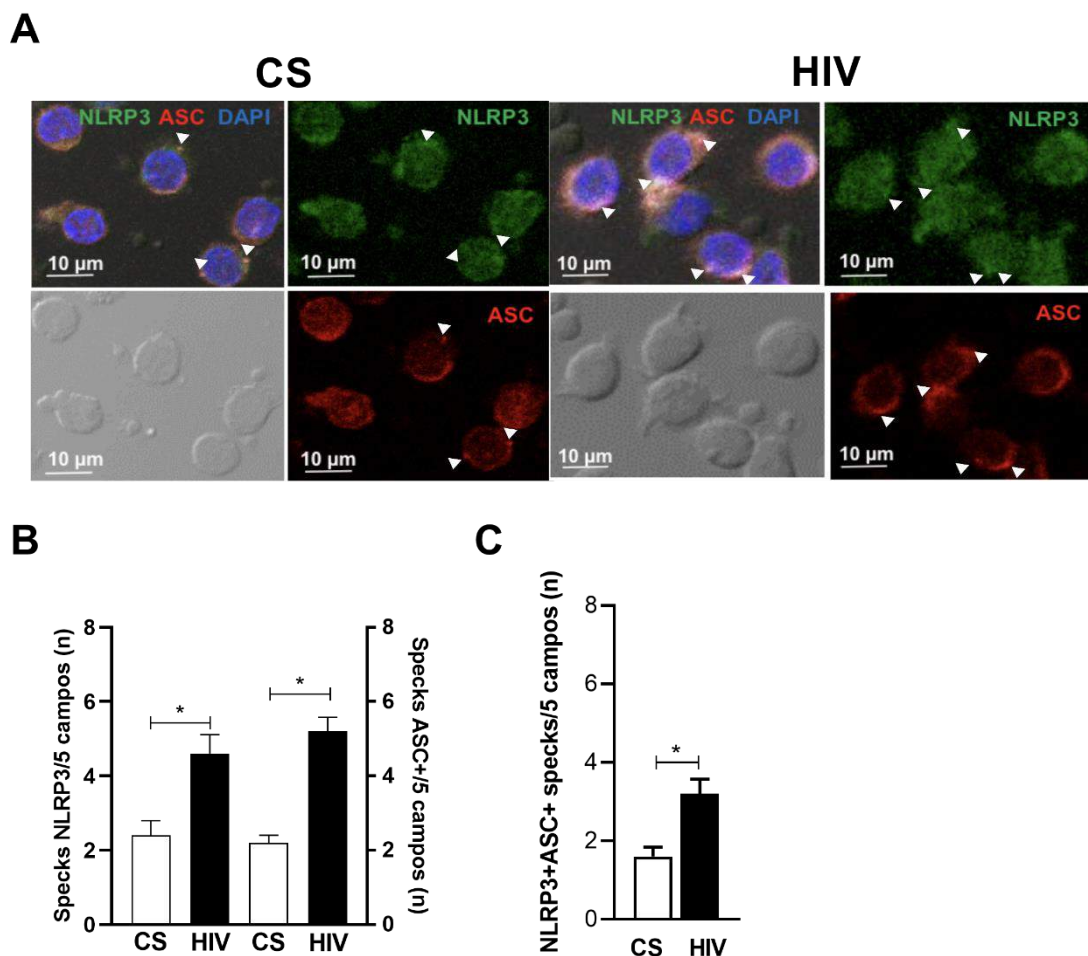


Figura 29. Formação espontânea de specks de ASC ou NLRP3 em linfócitos B CD19+ de pacientes HIV tratados.

Foram isoladas $0,2 \times 10^6$ células CD19+ de controles saudáveis (CS; n = 3) e pacientes HIV tratados (HIV; n = 3) e cultivados por 24 horas em lâminas *chamber slide*. Em seguida, as células foram permeabilizadas e marcadas para ASC ou NLRP3 para detectar a formação de *specks*. Em (A) é reportado o resultado de um ensaio representativo dos três experimentos independentes. O painel de imagens obtidas por um microscópio confocal com um aumento de 40x, mostrando a formação de agregados de ASC (vermelho, Alexa-568) ou NLRP3 (verde, Alexa-488) no citosol. O corante DAPI (Azul) foi usado como marcador de núcleo. As setas brancas apontam os *specks*. Em (B) as contagens manuais dos *specks* de ASC ou NLRP3 em 5 campos/imagem são reportadas em gráfico de barras como média + DP. Em (C) a contagem de colocalização de *specks* de NLRP3+ASC+ em 5 campos/imagem é reportado em gráfico de barras como média + DP. O teste de *Mann-Whitney* foi aplicado para comparar os grupos HIV e CS. Diferenças $p < 0,05$ foram estatisticamente significativas (*).

Em conjunto esses dados demonstraram que a ativação constitutiva do inflamassoma observada nos PBMC totais de pacientes HIV é consequência da contribuição de diferentes subpopulações de leucócitos. Os monócitos, como esperado, apresentam uma ativação constitutiva do NLRP3 inflamassoma que leva ao aumento de liberação basal de IL-1 β , mas não de IL-18.

Pela primeira vez demonstramos que também o compartimento linfoide está contribuindo para a ativação do inflamassoma nos PBMC de pacientes cronicamente infectados pelo HIV. Tanto nos linfócitos T CD4⁺ quanto nos linfócitos B, observamos um aumento de liberação de IL-1 β basal, mesmo se os níveis de produção não superem 40 pg/mL. Nestes linfócitos, porém, o papel do NLRP3 aparenta ser distinto. Enquanto que nas células CD19⁺ detectamos uma ativação basal aumentada específica do NLRP3, nos linfócitos T CD4⁺ a aumentada ativação do inflamassoma aparenta não ser estritamente relacionada ao receptor NLRP3.

A pergunta seguinte então, foi se essa aumentada ativação constitutiva do inflamassoma nos diferentes leucócitos do indivíduo cronicamente infectado pelo HIV pudesse afetar a resposta do complexo durante a ativação dos próprios leucócitos, e, de acordo com a nossa hipótese inicial, pudesse influenciar a capacidade de resposta do paciente a microrganismos e/ou imunizações.

5.4 Desregulação do NLRP3 inflamassoma em monócitos de pacientes HIV

Para avaliar o nível de ativação do inflamassoma em monócitos de paciente HIV em resposta a PAMPs/DAMPs, realizamos um ensaio de estimulação com LPS bacteriano ou β -glucana fúngica em células CD14⁺ isoladas de 22 pacientes HIV e 23 controles.

As células foram tratadas com 1 μ g/mL de LPS bacteriano por 3 e 24 horas, seguidos da adição de 1 mM de ATP por 15 minutos, conforme protocolo clássico de ativação do NLRP3 em monócitos humanos (Gattorno et al., 2007), ou com 50 μ g/mL da β -glucana por 24 horas (Kankkunen et al., (2010)). A concentração dos estímulos foi definida baseado na literatura e de acordo com a padronização realizada presente no **APÊNDICE C**. Em seguida, foi realizada a análise tanto da expressão gênica (após 3 horas) quanto da dosagem de citocinas (após 3 e 24 horas), e a medição das células positivas para caspase-1-ativa (após 3 e 24 horas).

Os monócitos tratados com ambos os estímulos levaram a uma indução da expressão da maioria dos genes avaliados comparado ao basal ($p < 0,05$), em ambos os grupos. Entretanto, nos monócitos de pacientes HIV observamos

uma significativa maior indução da expressão de *NLRP3* em resposta ao LPS ($p = 0,004$; **figura 30 A**), assim como da *IL1B* em resposta a β -glucana ($p = 0,003$; **figura 30 B**) em relação aos controles.

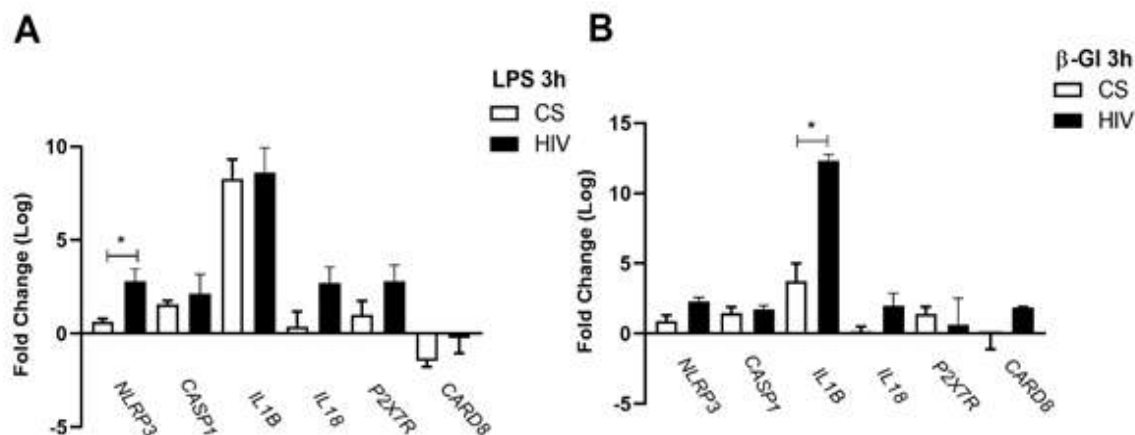


Figura 30. Genes do NLRP3 inflamassoma são diferencialmente expressos em monócitos de pacientes HIV em resposta a LPS ou β -GL.

Células CD14⁺ isoladas de pacientes infectados pelo HIV em ART (HIV; n = 6) ou controles saudáveis (CS; n = 7) foram estimuladas com 1 μ g/ml de LPS ou 50 μ g/ml por 3 horas. O RNA foi isolado de cada amostra e analisado para a expressão dos genes *NLRP3*, *CASP1*, *IL1B*, *IL18*, *P2X7R* e *CARD8* por qPCR. A modulação da expressão nos monócitos estimulados comparada com o basal foi expressa como *Fold-change* (FC). Os dados são representados como média dos valores de Log (FC) \pm erro padrão. O teste t múltiplo seguido pelo pós-teste de Bonferroni foi aplicado para comparar os valores entre os grupos CS e HIV.

Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (*).

Em relação aos níveis de citocinas, foi possível observar que, na presença dos estímulos, em todas as condições, houve uma indução significativa da produção de IL-1 β ($p < 0,05$), com diferenças entre os grupos em condições específicas.

Após 3 horas de estimulação com LPS, a adição de ATP por 15 minutos induziu uma maior produção de IL-1 β somente nos monócitos do grupo controle ($193 \pm 89,0$ pg/mL *versus* $38,92 \pm 17,54$ pg/mL; $p = 0,004$) e não no grupo HIV, ($148,1 \pm 34,32$ pg/mL *versus* $87,8 \pm 87,1$ pg/mL; $p = 0,940$) (**Figura 31 A**).

Quanto aos níveis de IL-1 β nos monócitos estimulados com LPS por 24 horas, a produção é significativamente aumentada comparada com o basal ($p < 0,05$), porém não foi possível observar diferenças significativas entre as condições LPS com e sem ATP no grupo de pacientes e de controles (**Figura 31 A**).

Já a estimulação com β -glucana por 24 horas resultou em aumento de produção de IL-1 β comparado com o basal ($p < 0,05$), porém, apesar da média no grupo de monócitos HIV ser maior que nos controles, essa diferença não resultou estatisticamente significativa ($398,9 \pm 273,7$ pg/mL versus $216,8 \pm 177,2$ $p = 0,11$) (**Figura 31 A**).

Em relação aos níveis de IL-18, não foi possível observar uma indução significativa dessa citocina em nenhuma das condições em ambos os grupos de pacientes e controles (**Figura 31 B**).

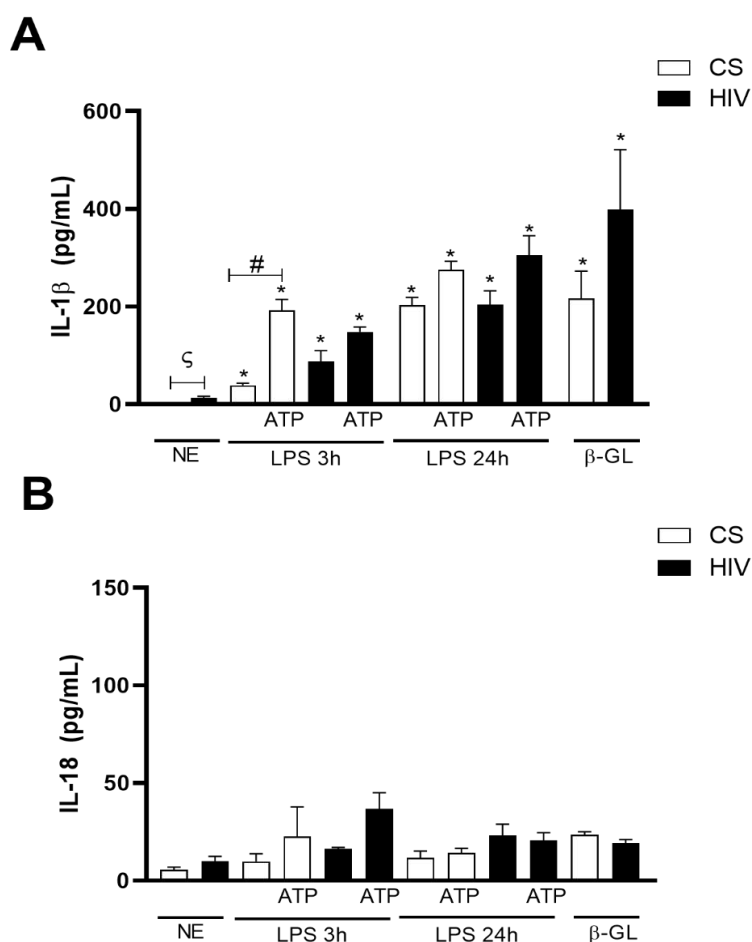


Figura 31. LPS+ATP induz uma menor responsividade quanto a ativação do NLRP3 inflamassoma nos monócitos de pacientes HIV.

Monócitos CD14+ foram purificados de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de controles saudáveis (CS = 23) e pacientes infectados pelo HIV (HIV = 22) e cultivados em RPMI-1640 com 10% de SFB, estimulados com 1 μ g/mL de lipopolissacarídeo (LPS) por 3h ou 24h, seguidos da adição de 1mM de ATP por 15 minutos ou estimulados com 50 μ g/mL de β -glucana por 24h. Foram coletados os sobrenadantes de cultura e dosado os níveis de (A) IL-1 β (n = 23 CS e 22 HIV) e (B) IL-18 (n = 6 CS e 6 HIV) por Elisa. Todos os dados são representados como média \pm desvio padrão (DP). O teste de *Friedman* foi aplicado para comparar as condições LPS, LPS+ATP ou β -glucana em relação ao NE; O teste de *Mann-Whitney* para comparar as condições LPS sem ATP versus LPS+ATP.

* $p < 0,05$ para comparações entre LPS, LPS+ATP ou β -glucana em relação ao NE; # $p < 0,05$ para comparações entre LPS sem ATP versus LPS+ATP; $\zeta p < 0,05$ para comparações entre NE HIV versus NE CS. NE: Não Estimulado.

Além da dosagem de IL-1 β e IL-18, foi realizado a dosagem de citocinas independentes da montagem do complexo, TNF- α e IL-6, sendo observado que tanto o LPS quanto a β -glucana levou a uma indução significativa da produção de TNF- α (**Figura 32 A**) e IL-6 (**Figura 32 B**) comparado com o basal em ambos os grupos ($p < 0,05$) e sem diferenças significativas entre pacientes e controles ($p > 0,05$).

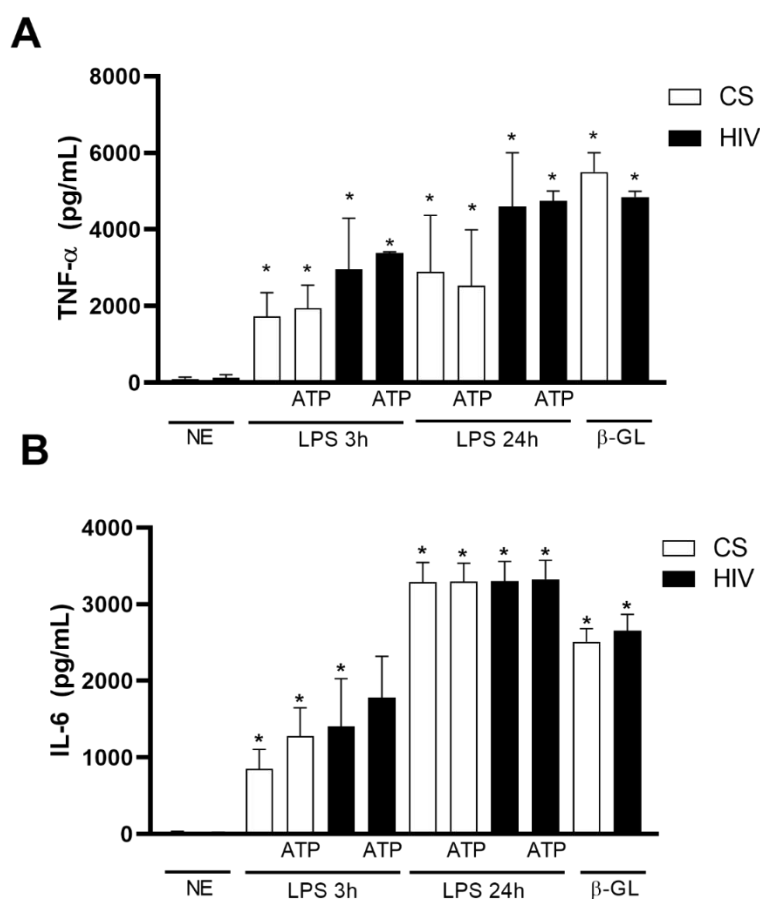


Figura 32. LPS e β -glucana induzem a produção de TNF- α e IL6 em pacientes HIV e controles.

Monócitos CD14+ foram purificados de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de controles saudáveis (CS = 23) e pacientes infectados pelo HIV (HIV = 22) e cultivados em RPMI-1640 com 10% de SFB, estimulados com 1 μ g/mL de lipopolissacarídeo (LPS) por 3h ou 24h, seguidos da adição de 1mM de ATP por 15 minutos ou estimulados com 50 μ g/mL de β -glucana por 24h. Foram coletados os sobrenadantes de cultura e dosado os níveis de (A) TNF- α (n = 10 CS e 10 HIV) e (B) IL-6 (n = 5 CS e 5 HIV) por Elisa. Todos os dados são representados como média \pm desvio padrão (DP). O teste de *Friedman* foi aplicado para comparar as condições LPS, LPS+ATP ou β -glucana em relação ao NE; O teste de *Mann-Whitney* para comparar as condições LPS sem ATP versus LPS+ATP ou entre os grupos CS e HIV.

* $p < 0,05$ para comparações entre LPS, LPS+ATP ou β -glucana em relação ao NE. # $p < 0,05$ para comparações entre LPS sem ATP versus LPS+ATP; $\zeta p < 0,05$ para comparações entre NE HIV versus NE CS. NE: Não Estimulado.

Tanto o LPS quanto a β -glucana foram capazes de levar a uma indução da clivagem da caspase-1 nos monócitos de ambos os grupos, pacientes e controles, comparado com a condição basal ($p < 0,05$). Além disso, assim como observado para os níveis de IL-1 β , após 3 horas de estimulação com LPS, a adição de ATP por 15 minutos induziu uma maior clivagem da caspase-1 somente nos monócitos do grupo controle ($36,77 \pm 1,88$ % CD14+FAM-FLICA+ *versus* $23,83 \pm 1,23$ % CD14+FAM-FLICA+; $p = 0,012$) e não no grupo HIV ($15,77 \pm 8,11$ % CD14+FAM-FLICA+; *versus* $17,08 \pm 10,63$ % células CD14+FAM-FLICA+; $p = 0,97$) (**Figura 33 A, B**).

Após 24 horas de estímulo com LPS, a porcentagem de células positivas para caspase-1 ativa é maior que a 3 horas e significativamente maior em comparação as células não estimuladas ($p < 0,05$), sem diferença entre os grupos HIV ($38,47 \pm 4,95$ % CD14+FAM-FLICA+) e CS ($34,80 \pm 8,42$ % CD14+FAM-FLICA+) ($p > 0,05$). A adição de ATP não aumentou a liberação da IL-1 β , sem diferença entre os grupos HIV ($30,70 \pm 15,26$ % CD14+FAM-FLICA+) e CS ($37,0 \pm 7,02$ % CD14+FAM-FLICA+) ($p > 0,05$) (**Figura 33 A, B**).

De modo semelhante, a estimulação com β -glucana também não resultou em diferenças significativas nos níveis de caspase-1 ativa entre os grupos HIV ($39,4 \pm 1,44$ % CD14+FAM-FLICA+) e controle ($47,0 \pm 5,56$ % CD14+FAM-FLICA+) ($p > 0,05$) (**Figura 33 A**).

Além disso, nenhuma das condições levou a uma indução significativa de morte celular, avaliado pelos níveis de liberação de LDH, e sem diferenças significativas entre os grupos de pacientes e controles ($p > 0,05$) (**Figura 33 C**).

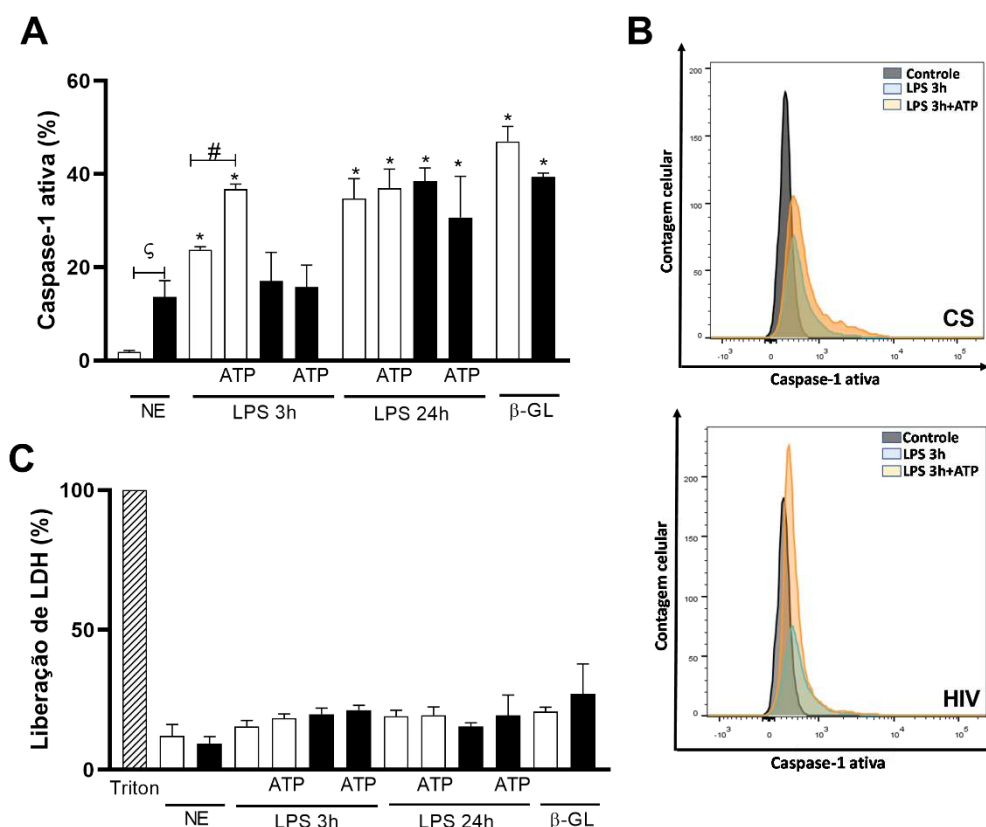


Figura 33. Ativação diferencial da caspase-1 em resposta ao ATP em monócitos de pacientes HIV tratados.

Monócitos CD14+ foram purificados de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de controles saudáveis (CS = 23) e pacientes infectados pelo HIV (HIV = 22) e cultivados em RPMI-1640 com 10% de SFB tratados com 1 µg/mL de LPS por 3 e 24h, seguidos da adição de 1mM de ATP por 15 minutos ou 50 µg/mL de β-glucana. (A) Foi medido os níveis de caspase-1 ativa (CS: n = 3 e HIV: n = 3) por marcação com o kit FAM-FLICA e detecção por citometria de fluxo. Os dados foram representados como porcentagem de monócitos CD14+FAM-FLICA+ dentro do *gate* de células CD14+ vivas (*LIVE/DEAD low*); (B) sobreposição de histogramas de caspase-1 ativa nos monócitos nas condições LPS 3h e LPS 3h+ATP, representativo de experimento de 1 CS e 1 HIV; (C) avaliado a taxa de morte celular através da dosagem da liberação de lactato desidrogenase (LDH) no sobrenadante de cultura de CS (n = 9) e HIV (n = 9) com representação em porcentagem em relação ao controle positivo (Triton, 100% de lise celular).

Todos os dados são representados como média ± desvio padrão (DP).

O teste de *Friedman* foi aplicado para comparar as condições LPS, LPS+ATP ou β-glucana em relação ao NE; O teste de *Mann-Whitney* para comparar as condições LPS sem ATP *versus* LPS+ATP ou entre os grupos CS e HIV.

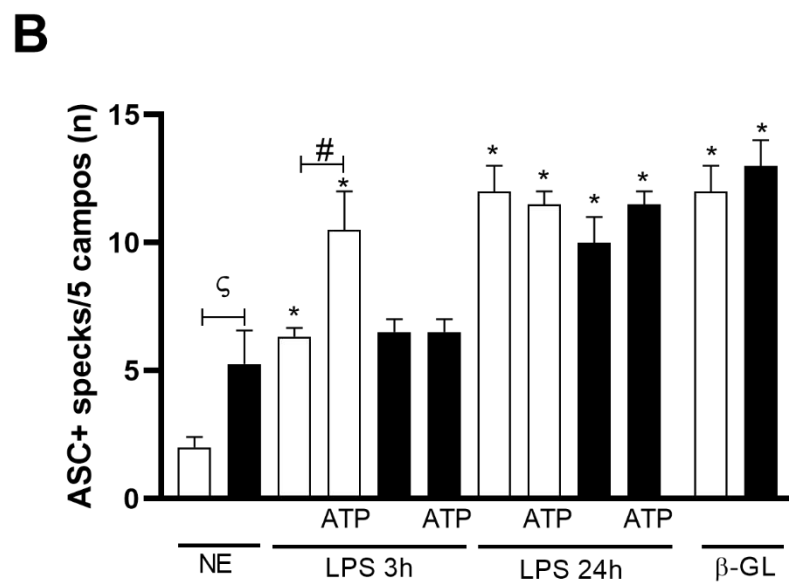
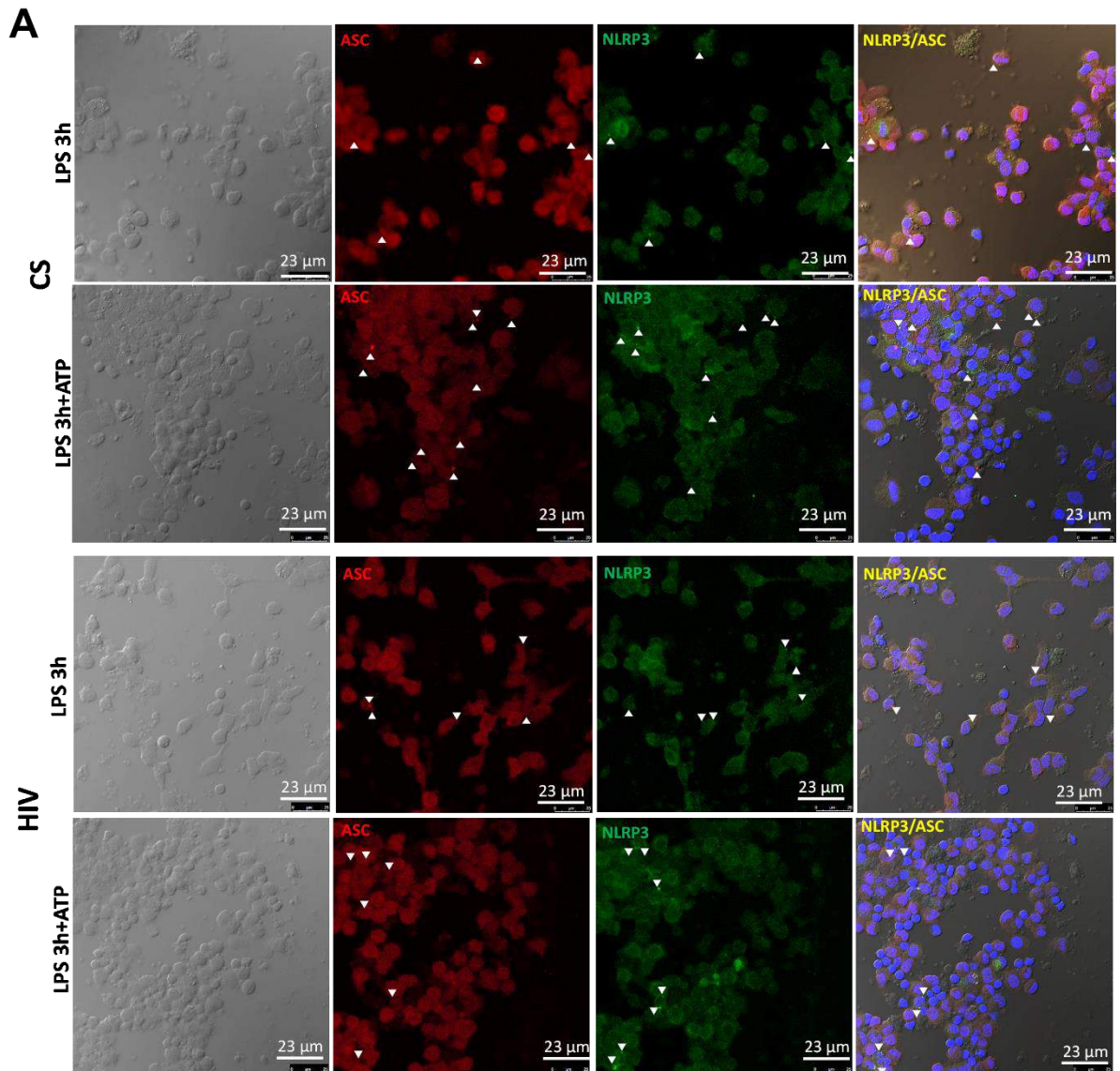
* p < 0,05 para comparações entre LPS, LPS+ATP ou β-glucana em relação ao NE. #p < 0,05 para comparações entre LPS sem ATP *versus* LPS+ATP; ζ p < 0,05 para comparações entre NE HIV *versus* NE CS. NE: Não Estimulado.

No intuito de evidenciar se essa alterada ativação do inflamassoma é de fato decorrente de uma desregulação específica da ativação do receptor NLRP3, foi realizado o ensaio de imunofluorescência para avaliação da ativação do complexo nos monócitos estimulados.

A estimulação com LPS por 3 horas na presença ou não de ATP levou a uma indução significativa da formação de *specks* de ASC somente no grupo controle ($p < 0,05$) e não no grupo de pacientes HIV ($p > 0,05$), quando comparada com a condição basal, sugerindo uma menor capacidade de ativação do complexo no grupo de pacientes, pelo menos nessa condição (**Figura 34 A, B**). Já a estimulação com LPS por 24h, com ou sem ATP, ou com β -Glucana, levou a uma indução significativa da formação de *specks* de ASC ($p < 0,05$) em ambos, comparando com a condição basal, e sem diferenças significativas entre os grupos ($p > 0,05$) (**Figura 34 B**).

A contagem de formação de *specks* de NLRP3 foi similar a de ASC, sendo observado uma maior agregação na estimulação com LPS a 3 horas somente no grupo controle ($p < 0,05$) e não nos pacientes HIV ($p > 0,05$) em comparação ao não estimulado (**Figura 34 A, C**), além de uma indução significativa em todas as condições a 24h ($p < 0,05$) e sem diferenças entre pacientes e controles ($p > 0,05$) (**Figura 34 C**).

Avaliamos também a co-localização de *specks* de NLRP3/ASC na presença de LPS, (a 3 e 24 horas) seguidos da adição de ATP, ou na presença de β -glucana (a 24 horas) comparado com a condição basal em ambos os grupos, HIV e CS. Assim como observado para os níveis de IL-1 β e caspase-1, houve um aumento significativo do número de *specks* com a adição de ATP nos monócitos estimulados com LPS por 3 horas apenas nos controles (LPS: 5 ± 1 versus LPS+ATP: 9 ± 1 *specks*/5 campos; $p = 0,007$) e não nos paciente HIV (LPS: $5 \pm 0,7$ versus 5 ± 1 *specks*/5 campos; $p = 0,999$) (**Figura 34 A, D**), confirmando uma menor capacidade de ativação do NLRP3 inflamassoma nessa condição. Já a 24h, também na contagem da colocalização de NLRP3 e ASC, foi possível observar uma indução significativa em todas as condições quando comparado ao basal ($p < 0,05$), e sem diferenças entre os grupos de pacientes e controles ($p > 0,05$) (**Figura 34 D**).



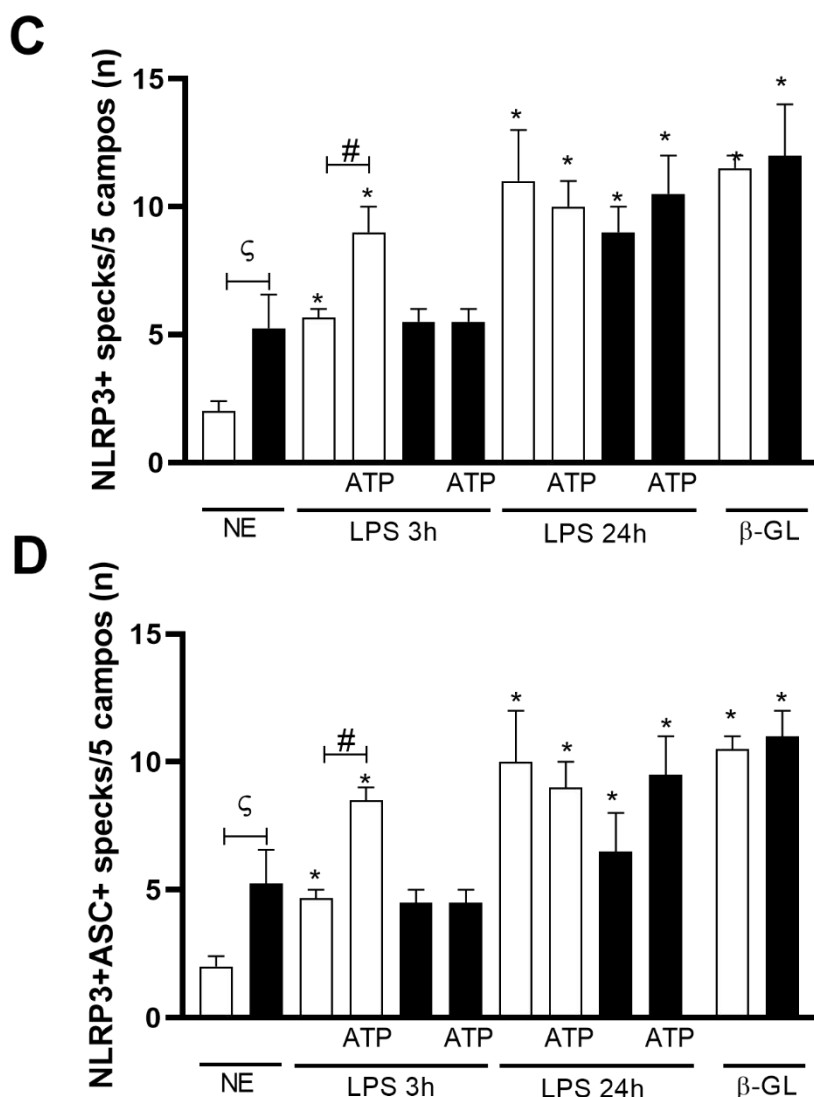


Figura 34. Formação desregulada de specks de NLRP3 e ASC em monócitos estimulados de HIV.

Foram cultivados 2×10^5 monócitos de controles saudáveis ($n=3$) e pacientes HIV ($n=3$) em lâminas *chamber slide* a 37°C e 5% de CO_2 e tratados com $1 \mu\text{g/mL}$ de LPS por 3 e 24h, e 1mM de ATP por 15 minutos, ou $50 \mu\text{g/mL}$ de β -glucana por 24h. Em seguida, as células foram permeabilizadas e marcadas para NLRP3 e/ou ASC para posterior análise por microscopia.

Em (A) é reportado o resultado de um ensaio representativo dos três experimentos independentes nas condições LPS e LPS+ATP por 3 horas de CS e HIV. O painel de imagens obtidas por um microscópio confocal com um aumento de 40x, mostrando a formação de agregados de ASC (vermelho, Alexa-568) ou NLRP3 (verde, Alexa-488) no citosol. O corante DAPI (Azul) foi usado como marcador de núcleo. As setas brancas apontam os specks. Em (B) as contagens manuais dos specks de ASC ou (C) NLRP3 em 5 campos/imagem são reportadas em gráfico de barras como média + DP. Em (D) a contagem de co-localização de specks de NLRP3+ASC+ em 5 campos/imagem é reportado em gráfico de barras como média + DP. O teste de *Friedman* foi aplicado para comparar as condições LPS, LPS+ATP ou β -glucana em relação ao NE; O teste de *Mann-Whitney* para comparar as condições LPS sem ATP versus LPS+ATP ou entre os grupos CS e HIV.

* $p < 0,05$ para comparações entre LPS, LPS+ATP ou β -glucana em relação ao NE. # $p < 0,05$ para comparações entre LPS sem ATP versus LPS+ATP; ζ $p < 0,05$ para comparações entre NE HIV versus NE CS. NE: Não Estimulado.

Para confirmar a participação do NLRP3 na desregulação do inflamassoma nos monócitos dos pacientes HIV, replicamos os ensaios de estimulação com LPS e β -glucana na presença de 10 μ M de MCC-950, um inibidor específico de NLRP3 (Coll et al., 2015). Além disso, 10 μ M do inibidor de amplo espectro do inflamassoma, partenolide/PTD, (Juliana et al., 2010) foi utilizado como controle de inibição. As concentrações dos inibidores foram definidas baseado na literatura e de acordo com padronização presente no **APÊNDICE F**.

A seguir é reportado uma figura ilustrativa da atuação dos inibidores nos monócitos humanos (**Figura 35**).

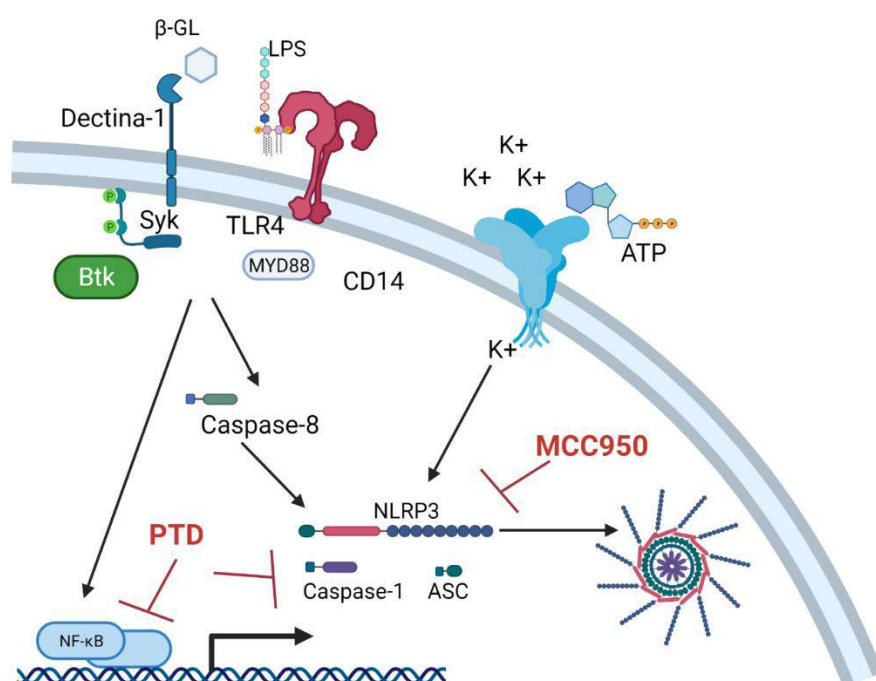


Figura 35. Ação dos inibidores do inflamassoma nos monócitos humanos.

Ilustração dos mecanismos de ativação clássica e alternativa do NLRP3 (Gattorno et al., 2007; Gurung et al., 2008), assim como a ação dos inibidores MCC950 e Partenolide nos monócitos humanos estimulados com LPS, ATP e β -glucana fúngica. A incubação prévia com MCC950 leva a inibição específica do NLRP3 através da ligação direta da molécula de MCC950 ao NLRP3, prevenindo a oligomerização do complexo (Coll et al., 2015). Já o partenolide atua inibindo a quinase I κ B e conseqüentemente o NF- κ B, além de promover uma inibição direta da caspase-1, através da alquilação de resíduos de cisteína da subunidade p20 da caspase (Juliana et al., 2010), em conjunto levando a uma ampla inibição da ativação do complexo.

Fonte: Próprio autor (Leal VNC, 2021).

O MCC-950 inibiu significativamente a produção de IL-1 β em monócitos de CS tratados com LPS mais ATP a 3 horas ($p < 0,05$) e a 24 horas ($p < 0,05$) (**Figura 36 A**) (57% e 45% de inibição, respectivamente), assim como as células

tratadas com β -glucana ($p < 0,05$) (**Figura 36 A**) (68% de inibição). No grupo HIV, o MCC-950 reduziu também de modo significativo ($p < 0,05$) a produção de IL-1 β em todas as condições com ATP e na estimulação com β -glucana (LPS 3h+ATP: 35%, LPS 24h+ATP: 25% e β -glucana: 70% de inibição (**Figura 36 B**)).

Como esperado o PTD, por sua vez, inibiu por volta de 90% da produção de IL-1 β em todas as condições, e sem diferenças significativas entre os grupos e pacientes e controles ($p > 0,05$) (**Figura 36 A, B**).

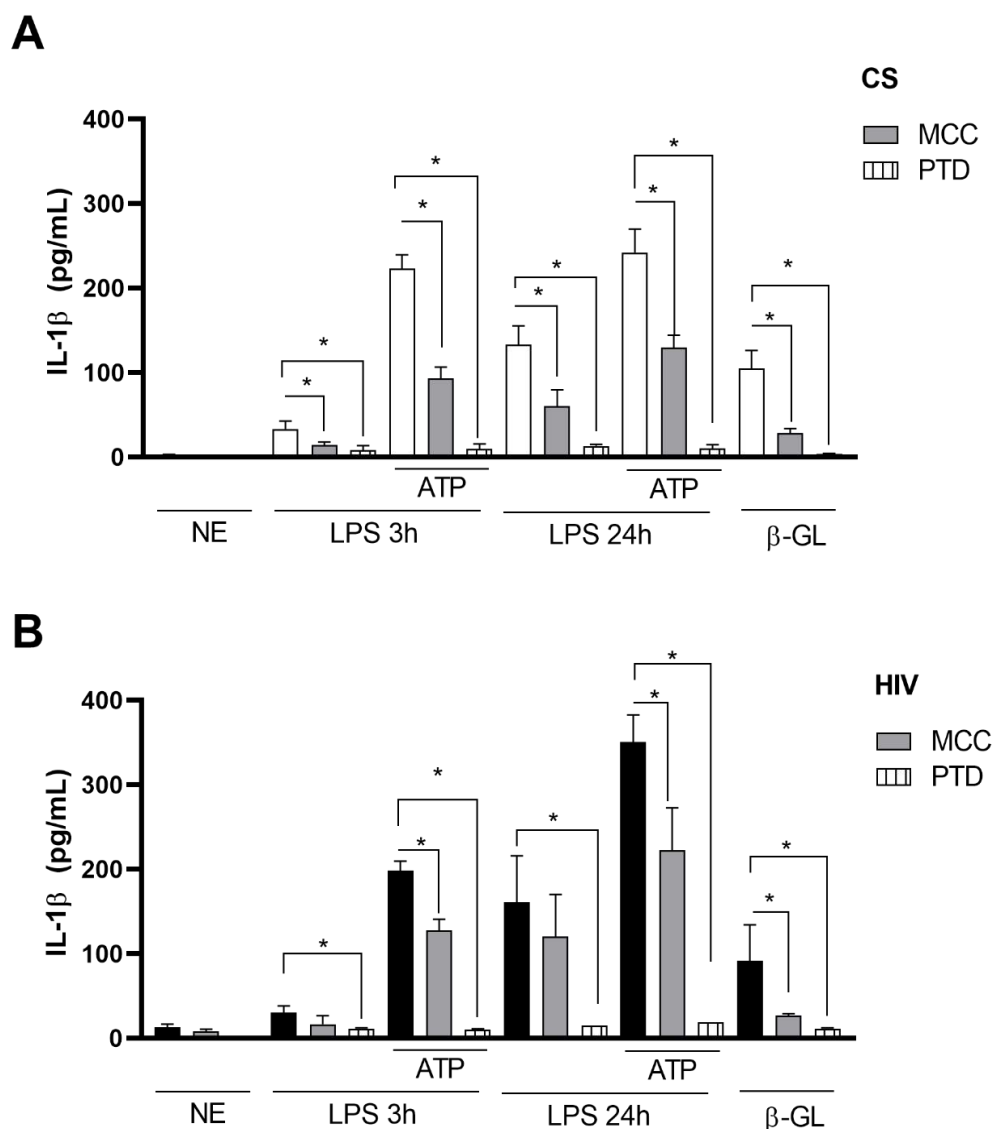


Figura 36. Inibição diferencial da ativação do NLRP3 inflamassoma em monócitos de pacientes HIV.

Monócitos de controles saudáveis (CS: $n = 10$) (**A**) ou pacientes infectados pelo HIV (HIV: $n = 5$) (**B**) foram pré-tratados com 10 μ M de MCC-950 (MCC) ou 10 μ M de partenolide (PTD), e então estimulados com 1 μ g/ml de LPS por 3 ou 24 horas e 1 mM de ATP por 15 minutos ou 50 μ g/ml de β -glucana por 24 h, e mantidos a 37°C e 5% CO₂. A concentração de IL-1 β foi mensurada nos sobrenadantes. O teste de *Friedman* foi aplicado para comparar as condições entre os grupos (* $p < 0,05$) ativado sem inibidor *versus* ativado com inibidor). NE: Não estimulado.

Em conjunto esses dados apontam para a uma ativação diferencial do NLRP3 inflamassoma frente a estimulação com LPS e LPS+ATP indicando que, assim como reportado por Reis et al., (2019) em células dendríticas, nos monócitos de pacientes cronicamente infectados pelo HIV-1, possa haver um defeito específico da ativação do NLRP3, podendo contribuir para a inflamação crônica e afetar o perfil de responsividade a diferentes patógenos e/ou imunização.

5.5 Hiperativação do inflamassoma em linfócitos T CD4+ de pacientes HIV tratados

Até a publicação do trabalho de Arbore et al., (2016), não existiam evidências de ativação do NLRP3 inflamassoma e liberação de IL-1 β pelos linfócitos T CD4+.

Em pacientes HIV, havia apenas sido reportado nos linfócitos T CD4+ a ativação da caspase-1 e indução da piroptose pelo receptor de DNA IFI16 (Monroe et al., 2014). Levando em consideração a evidência de uma ativação basal do inflamassoma nos linfócitos T CD4+ dos pacientes HIV (**Figura 26**), decidimos avaliar o comportamento do complexo nas células ativadas.

Portanto, linfócitos T CD4+ isolados de pacientes HIV e controles foram estimulados com 5 μ g/mL de anti-CD3 e 2 μ g/mL de anti-CD28 por 72 horas. Em seguida foram analisados a produção de citocinas, a clivagem de caspase-1 e a formação de *specks*. Além disso, foi avaliado, em paralelo, o perfil de expressão gênica a 3 horas de estimulação.

Foi possível observar que, a ativação com os anticorpos monoclonais, levou a uma indução significativa da expressão de *NLRP3* e *IL1B* comparado com o basal ($p < 0,05$), porém sem diferenças entre os grupos de pacientes e controles (**Figura 37**).

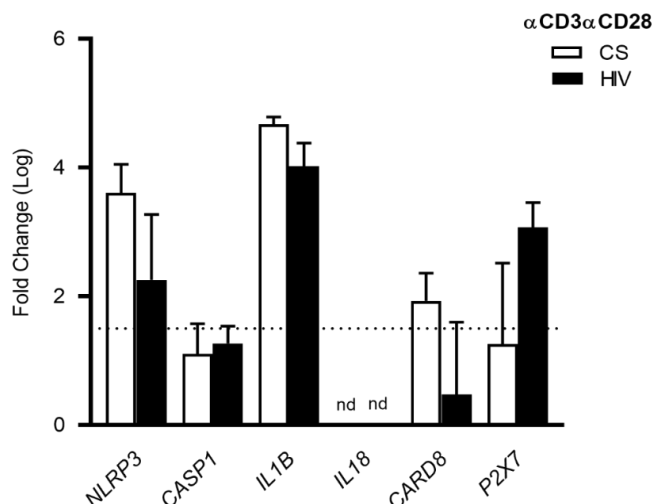


Figura 37. Indução da expressão dos genes do NLRP3 inflamassoma em linfócitos T CD4+ ativadas com anti-CD3 e anti-CD28.

Linfócitos T CD4+ isolados de pacientes infectados pelo HIV (n = 5) ou controles saudáveis (n = 6) foram estimuladas com 5 µg/ml de Anti-CD3 e 2 µg/ml de anti-CD28 por 3 horas. O RNA foi isolado de cada amostra e analisado para a expressão dos genes *NLRP3*, *CASP1*, *IL1B*, *IL18*, *P2X7* e *CARD8* por qPCR. A modulação da expressão nos linfócitos T CD4+ estimulados, foi reportada como *Fold-change* (FC). Os dados são representados como média dos valores de log (FC) ± erro padrão.

O teste "t" múltiplo foi aplicado para comparar os valores de FC entre os grupos CS e HIV (*: p < 0,05). nd: não detectado.

Os linfócitos T CD4+ responderam ao estímulo aumentando significativamente a produção de IL-1β em relação ao basal em ambos os grupos HIV (p = 0,01) e CS (p = 0,003) (**Figura 38 A**). Para a citocina IL-18, foram observados níveis baixos ou até mesmo indetectáveis em algumas amostras analisadas (**Figura 38 B**).

Quando comparamos os grupos de pacientes e controles, foi possível observar que os linfócitos de pacientes produziram mais IL-1β (82,45 ± 32,80 pg/mL) comparados aos controles (22,70 ± 12,88 pg/mL; p = 0,0002) (**Figura 38 A**), frente a estimulação. Além disso, a utilização dos anticorpos monoclonais (αCD3αCD28) ativou os linfócitos de forma geral, como pode ser observado pela indução da produção do TNF-α comparado ao basal em ambos os grupos (p < 0,001), sem diferenças significativas entre pacientes e controles (**Figura 38 C**).

A estimulação levou também a uma maior ativação de caspase-1 comparado com o basal em ambos os grupos (**Figura 38 E**). A porcentagem de linfócitos T CD4+ estimulados com a caspase-1 ativa resultou maior nos pacientes HIV (18,96 ± 8,36 % CD3+CD4+FAM-FLICA+) em comparação aos CS (4,83 ± 2,45% CD3+CD4+FAM-FLICA+; p = 0,048) (**Figura 38 D, E**).

Já em relação a viabilidade celular, a liberação de LDH foi aumentada frente a estimulação (HIV: $p < 0,001$; CS: $p=0,001$) e se manteve entre 30 e 40 % em relação ao controle positivo, porém sem diferença entre os dois grupos ($p > 0,05$). (Figura 38 F).

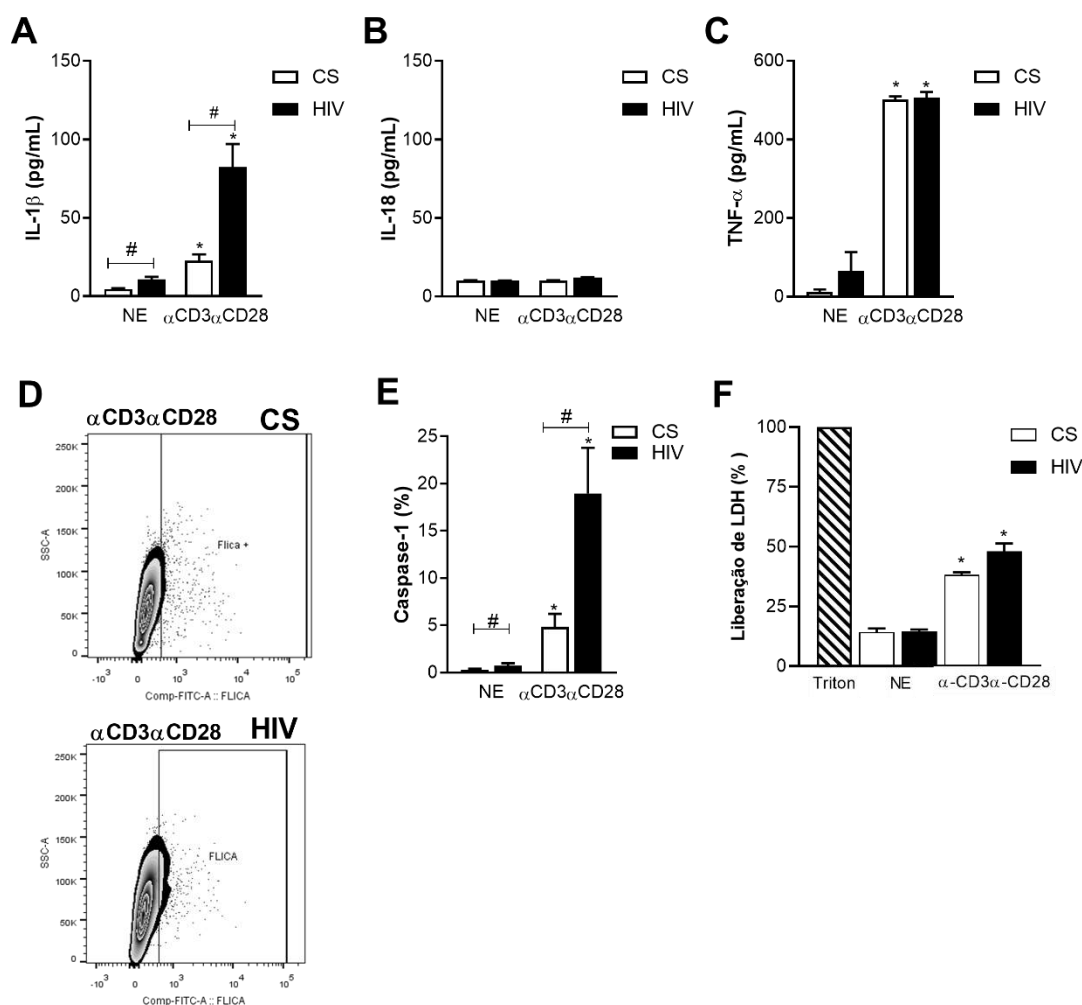


Figura 38. Hiperativação do inflamassoma nos linfócitos T CD4+ ativados de pacientes HIV tratados.

Linfócitos T CD4+ foram purificados de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de controles saudáveis e pacientes HIV e cultivadas em RPMI-1640 com 10% de SFB por 72 horas na presença de 5 μ g/mL de anti-CD3 e 2 μ g/mL de anti-CD28. Foram dosados (A) IL-1 β , (B) IL-18 e (C) TNF- α no sobrenadante de cultura de CS (n = 15) e HIV (n = 15) por ELISA; medido os níveis de caspase-1 ativa CS (n=4) e HIV (n=4) por marcação com o kit FAM-FLICA e detecção por citometria de fluxo, sendo apresentado (D) tanto um experimento exemplificativo da análise por citometria de uma amostra de CS e HIV ativada com α CD3 α CD28, representando os dados como porcentagem de células CD3+CD4+FAM-FLICA+ dentro do *gate* de células vivas (LIVE/DEAD low) na forma de zebra plot (E) quanto a média dos 4 experimentos independentes em gráfico de barras nas condições basal e ativada; (F) Foi avaliado a taxa de morte celular através da dosagem da liberação de lactato desidrogenase (LDH) no sobrenadante de cultura de CS (n=5) e HIV (n=5) com representação em porcentagem em relação ao controle positivo (Triton, 100% de lise celular). Teste de *Friedman* foi aplicado para comparar as condições não estimuladas e estimuladas; o teste de *Mann-Whitney* para comparar as condições entre os grupos HIV e CS. * $p < 0,05$ para comparações entre NE e α -CD3 + α -CD28; # $p < 0,05$ para comparações entre HIV e CS

Após marcação e ensaio de imunofluorescência, foi possível observar que, assim como observado para IL-1 β e caspase-1, a ativação induziu um maior número de *specks* de ASC (fluorescência vermelha) comparado com o basal tanto nos HIV que nos CS ($p < 0,05$). Além disso, o número de *specks* de ASC induzidos resultou significativamente maior no grupo de pacientes comparado com os controles ($p = 0,041$) (**Figura 39 A, B**). A ativação levou também a um aumento na contagem de *specks* de NLRP3 (fluorescência verde) em ambos os grupos (**Figura 39 A, B**), entretanto, não houve diferenças significativas no número de *specks* NLRP3+ entre os grupos de pacientes e controles. (**Figura 39 A, B**) ($p > 0,05$). De forma similar, quando avaliado a co-localização de NLRP3 e ASC, foi possível observar uma indução significativa dos *specks* NLRP3+ASC+ em ambos os grupos em relação a condição basal ($p < 0,05$), porém sem diferenças quando comparados pacientes e controles ($p > 0,05$) (**Figura 39 A, C**).

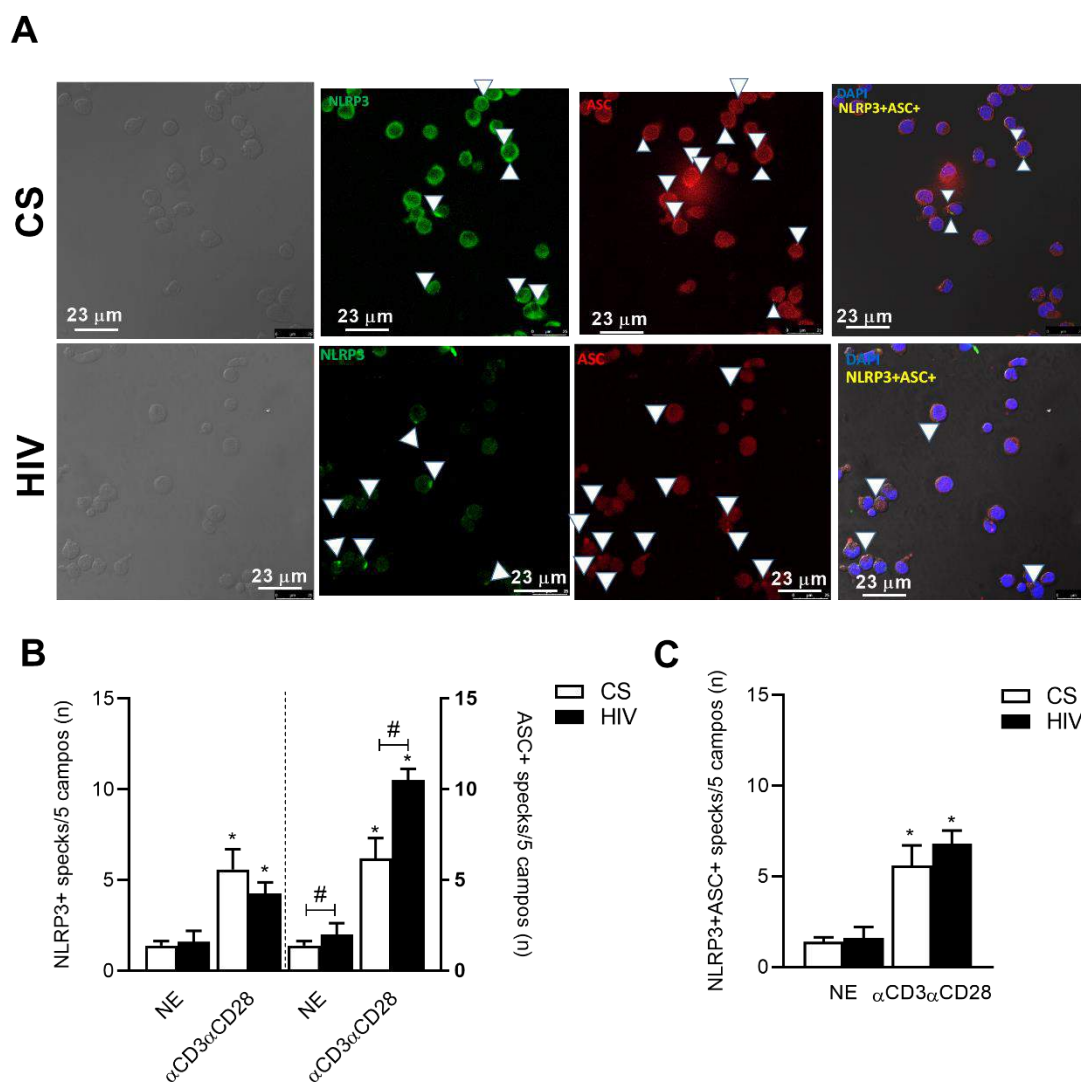


Figura 39. Aumento da formação de specks de ASC em linfócitos T CD4+ de pacientes HIV em resposta a ativação.

Foram cultivados 2×10^5 linfócitos T CD4+ isolados de controles saudáveis ($n = 3$) e pacientes HIV ($n = 3$) por 72 horas em lâminas *chamber slide*, a 37°C e 5% de CO_2 , na presença de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anti-CD3 e 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anti CD28. Em seguida, as células foram permeabilizadas e marcadas para NLRP3 e ASC para posterior análise por microscopia. Em (A) é reportado o resultado de um ensaio representativo dos três experimentos independentes nos linfócitos T CD4+ ativado com $\alpha\text{CD3}\alpha\text{CD28}$ por 72 horas de 1 CS e 1 HIV. O painel de imagens obtidas por um microscópio confocal com um aumento de 40x, mostrando a formação de agregados de ASC (vermelho, Alexa-568) ou NLRP3 (verde, Alexa-488) no citosol. O corante DAPI (Azul) foi usado como marcador de núcleo. As setas brancas apontam os specks. Em (B) as contagens manuais dos specks de NLRP3 ou ASC em 5 campos/imagem são reportadas em gráfico de barras como média + DP. Em (C) a contagem de co-localização de specks de NLRP3+ASC+ em 5 campos/imagem é reportado em gráfico de barras como média + DP. Teste de Friedman foi aplicado para comparar as condições não estimulados e estimulados; o teste de Mann-Whitney para comparar as condições entre os grupos HIV e CS

* $p < 0,05$ para comparações entre NE e $\alpha\text{-CD3} + \alpha\text{-CD28}$; # $p < 0,05$ para comparações entre HIV e CS

Buscando melhor investigar o envolvimento do NLRP3 na desregulação observada na ativação do inflamassoma nos linfócitos T CD4+ de pacientes HIV, replicamos o ensaio de ativação na presença de 10 μM de MCC-950. O partenolide/PTD também foi utilizado como controle positivo de inibição. As concentrações dos inibidores foram definidas baseado na literatura (Bruchard et al., 2015; Arbore et al., 2016).

A seguir é reportado uma figura ilustrativa da atuação dos inibidores nos linfócitos T CD4+ humanos (**Figura 40**).

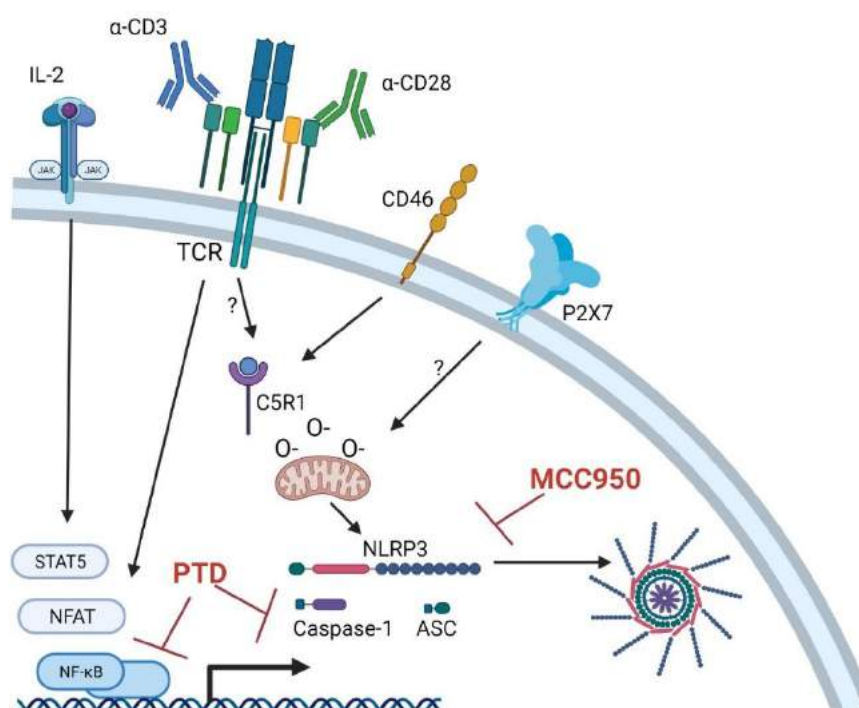


Figura 40. Ação dos inibidores do inflamassoma nos linfócitos T CD4+ humanos.

Ilustração sobre os mecanismos propostos para ativação do NLRP3 em linfócitos T CD4+ humanos ativados com anti-CD3 e anti-CD28 (Arbore et al., 2016; Bruchard et al., 2015), assim como a ação dos inibidores MCC950 e Partenolide. A incubação prévia com MCC950 leva a inibição específica do NLRP3 através da ligação direta da molécula de MCC950 ao NLRP3, prevenindo a oligomerização do complexo (Coll et al., 2015). Já o partenolide atua inibindo a quinase I κ B e conseqüentemente o NF- κ B, além de promover uma inibição direta da caspase-1, através da alquilação de resíduos de cisteína da subunidade p20 da caspase (Juliana et al., 2010), em conjunto levando a uma ampla inibição da ativação do complexo.

O MCC-950 inibiu significativamente a produção de IL-1 β nos linfócitos de pacientes (47 % de inibição) (**Figura 41 A**) e controles (38% de inibição) (**Figura 41 B**). Como esperado, o PTD praticamente zerou a produção da citocina (**Figura 41 A, B**).

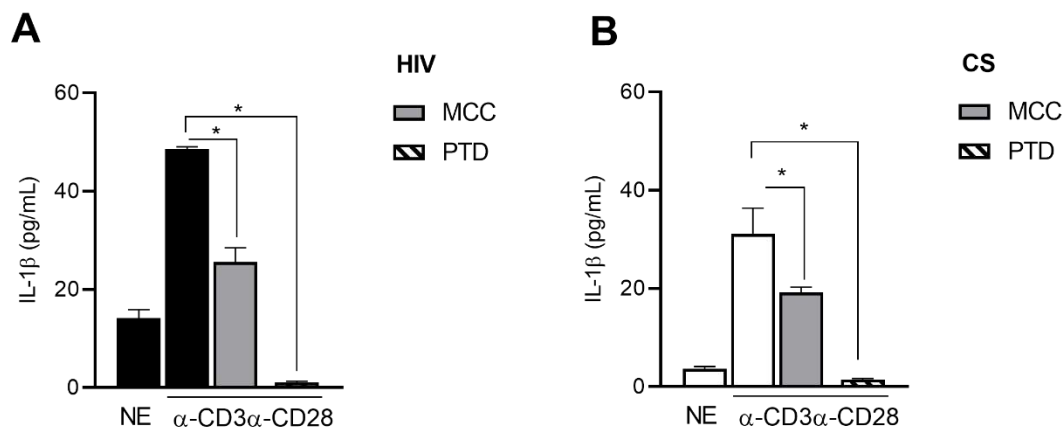


Figura 41. Inibição da ativação do NLRP3 inflamassoma em linfócitos T CD4+ de pacientes e controles.

Linfócitos T CD4+ de pacientes infectados pelo HIV (HIV n = 9) (A) e de controles saudáveis (CS: n = 7) (B), foram pré-tratados com 10 μ M de MCC-950 (MCC) por 1 hora ou 10 μ M de partenolide (PTD) por 15 minutos, e então ativados com 5 μ g/ml de anti-CD3 e 2 μ g/ml de anti-CD28 por 72 horas, a 37°C e 5% CO₂. A concentração de IL-1 β foi mensurada nos sobrenadantes por Elisa. O teste de *Friedman* foi aplicado para comparar as condições entre os grupos (*p<0,05: ativado sem inibidor *versus* ativado com inibidor). NE: Não estimulado.

Em conjunto, esses dados demonstram que os linfócitos T CD4+ de pacientes cronicamente infectados pelo HIV, apesar de apresentarem uma ativação constitutiva aumentada do inflamassoma comparado com os controles, quando ativados se comportam de maneira diferente dos monócitos, induzindo uma maior clivagem da caspase-1 e liberação de IL-1 β , que são em parte dependentes de NLRP3.

Durante a elaboração desse projeto, foi reportado também que o NLRP3 poderia atuar de forma inflamassoma independente como co-fator de transcrição em conjunto com a proteína IRF4 para indução de uma polarização de linfócitos T CD4+ para um perfil Th2 (Bruchard et al., 2015). Considerando que um desbalanço da polarização para um perfil Th2 foi associada com um pior prognóstico no contexto da infecção pelo HIV (Becker et al., 2004), buscamos também avaliar se o NLRP3 poderia estar desempenhando esse papel alternativo em linfócitos T CD4+ de pacientes cronicamente infectados pelo HIV.

Portanto, avaliamos o perfil de polarização dos linfócitos T CD4+ isolados de 9 pacientes e 9 controles, através da análise da expressão dos genes característicos do perfil Th1 (*TBET*) e Th2 (*GATA3*, *IL4*), e da produção das citocinas IFN- γ e IL-4.

A expressão dos genes avaliados não resultou diferente entre os grupos, tanto nas células não estimuladas (**Figura 42 A**), quanto nas estimuladas com anti-CD3 e anti-CD28 por 24 horas (**Figura 42 B**) ($p > 0,05$).

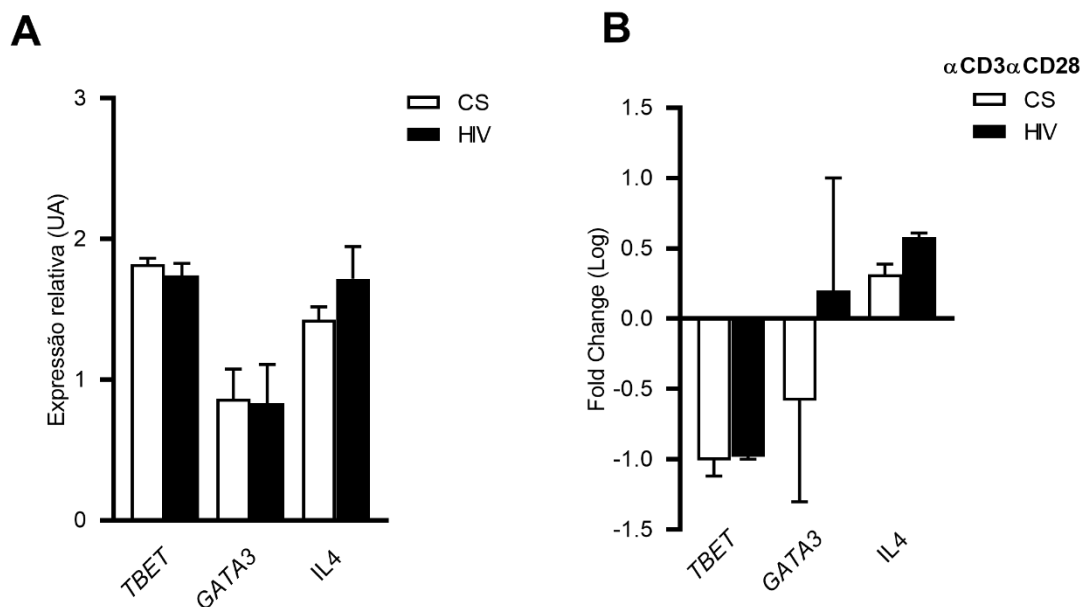


Figura 42. Expressão dos genes envolvidos na polarização Th2 é similar em linfócitos T CD4+, de controles saudáveis (CS) e pacientes infectados pelo HIV (HIV).

(A) Expressão gênica basal de *TBET*, *GATA3* e *IL4* em linfócitos T CD4+ de CS (n = 3) e HIV (n = 3) normalizada por *HPRT* (ΔCt). Os dados foram representados por unidades arbitrárias (UA) calculado a partir do $\log(2^{-\Delta Ct})$. As diferenças foram avaliadas por Múltiplo teste "t". *: $p < 0,05$. (B) Linfócitos T CD4+ isolados de pacientes infectados pelo HIV (n = 3) ou controles saudáveis (n = 3) foram ativados com 5 $\mu\text{g/ml}$ de anti-CD3 seguidos de 2 $\mu\text{g/ml}$ de anti-CD28. O RNA foi isolado de cada amostra após 24h de ativação e analisado para a expressão dos genes *TBET*, *GATA3*, *IL4* por qPCR. A modulação da expressão nos linfócitos T CD4+ ativados foi calculada como *Fold-change* (FC) e reportada no gráfico como $\log(FC)$. Valores de FC são comparados entre CS e HIV e os dados são representados como média (FC) \pm erro padrão. O teste "t" múltiplo seguido pelo-pós teste de Bonferroni foi aplicado para comparar a expressão relativa de cada gene entre os grupos (*: $p < 0,05$).

Em relação a dosagem de citocinas, a porcentagem de linfócitos T CD4+ produtoras de IFN- γ foi maior nos pacientes HIV ($5,40 \pm 2,93$ % de células T CD3+CD4+ IFN- γ +) que no grupo controle ($1,09 \pm 1,22$ % de células T CD3+CD4+ IFN- γ +, $p = 0,03$). Não foi possível observar diferenças significativas quanto aos níveis de IL-4 quando comparados os grupos de pacientes e controles (HIV: $0,15 \pm 0,17$ % de células T CD3+CD4+ IL-4+, CS: $0,23 \pm 0,21$ % de células T CD3+CD4+ IL-4+, $p = 0,58$) (**Figura 43**).

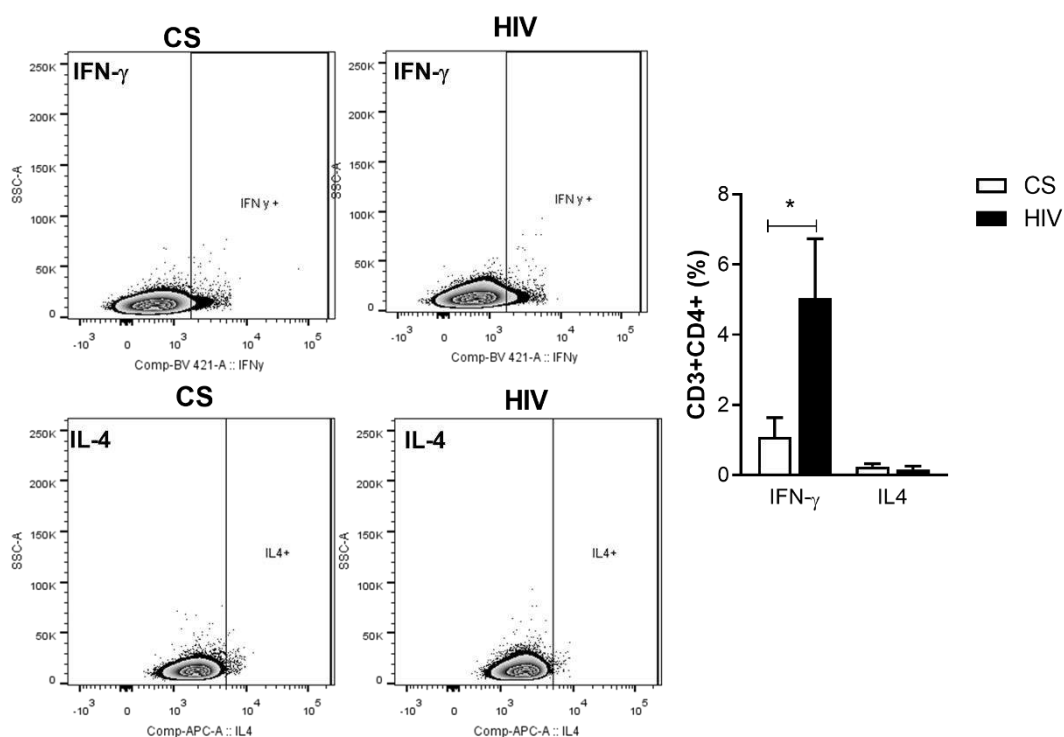


Figura 43. Produção constitutiva aumentada de IFN- γ em linfócitos T CD4+ de pacientes HIV.

1×10^6 linfócitos T CD4+ purificados de pacientes HIV ($n = 6$) e CS ($n = 9$) foram mantidos em cultura em meio RPMI, 10 % SFB, por 72h e em seguida as células foram coletadas para realização de marcação para moléculas de superfície (CD3/CD4) e marcação intracelular (LIVE/DEAD, IL-4 e IFN- γ) com anticorpos monoclonais específicos. Após marcação, as células foram avaliadas por citometria de fluxo com aquisição mínima de 10 mil eventos dentro dos *gates* característicos de células CD3+CD4+ Vivas (LIVE/DEAD *low*).

São apresentados os resultados de um experimento representativo de CS e HIV, reportando a % de células CD3+CD4+ IFN- γ + ou IL-4+ dentro do *gate* de células vivas na forma de *zebraplot*, ou em gráfico de barras como média \pm desvio padrão (DP) de todos os experimentos independentes. O teste estatístico *Mann-Whitney* foi aplicado para comparar os grupos HIV e CS. Diferenças $p < 0,05$ foram estatisticamente significativas (*).

Nos linfócitos estimulados, observamos uma indução significativa de IFN- γ , sendo maior no grupo de pacientes ($23,33 \pm 7,95$ % de células T CD3+CD4+ IFN- γ +) em comparação aos controles ($8,85 \pm 1,87$ % de células T CD3+CD4+ IFN- γ +/; $p = 0,03$). Não foi possível observar uma indução significativa da produção de IL-4 e, assim como nas células na condição basal, não houve diferenças entre os grupos de pacientes ($0,39 \pm 0,53$ % de células T CD3+CD4+ IL4+) e controles ($0,44 \pm 0,21$ % de células T CD3+CD4+IL4+; $p > 0,05$) (**Figura 44**).

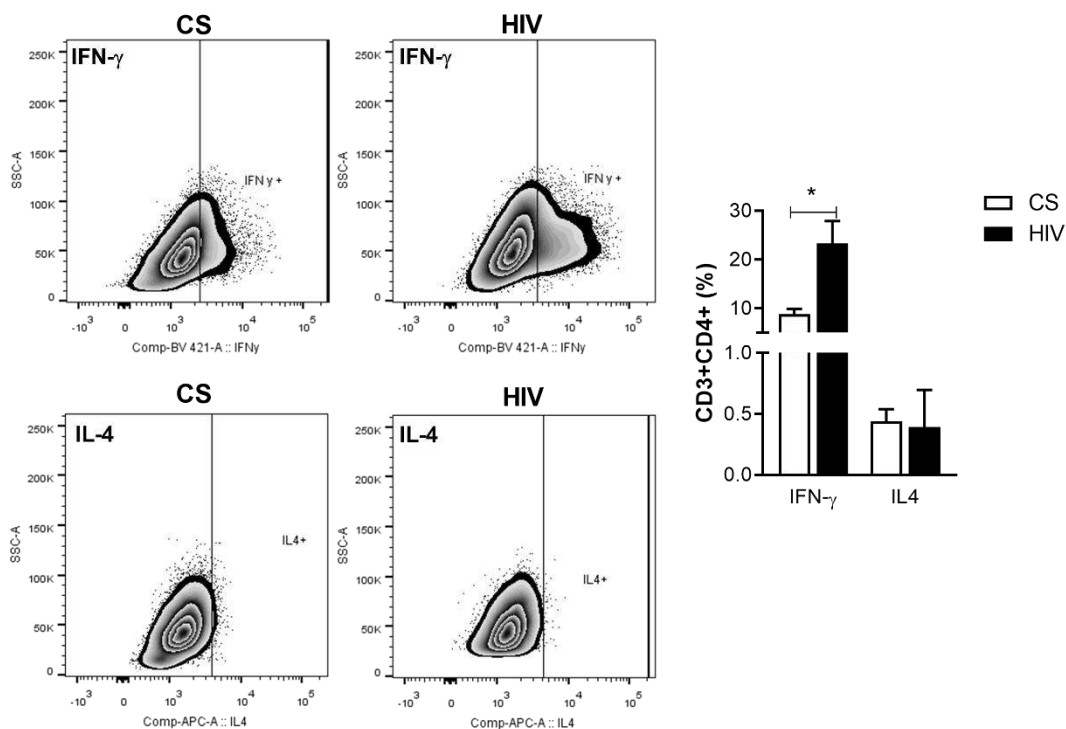


Figura 44. Ativação com anti-CD3 e anti-CD28 induz maior produção de IFN- γ em linfócitos T CD4+ de pacientes HIV. 1×10^6 linfócitos T CD4+ purificados de pacientes HIV (n = 6) e CS (n = 9) foram mantidos em cultura em meio RPMI, 10 %SFB, na presença de 5 μ g/mL de anti-CD3 e 2 μ g/mL de anti-CD28, por 72h e em seguida as células foram coletadas para realização de marcação para moléculas de superfície (CD3/CD4) e marcação intracelular (LIVE/DEAD, IL-4 e IFN- γ) com anticorpos monoclonais específicos. Após marcação, as células foram avaliadas por citometria de fluxo com aquisição mínima de 10 mil eventos dentro dos *gates* característicos de células CD3+CD4+ Vivas (Live/Dead *low*).

São apresentados os resultados de um experimento representativo de CS e HIV, reportando a % de células CD3+CD4+ IFN- γ + ou IL4+ dentro do *gate* de células vivas ativadas na forma de *zebraplot*, ou em gráfico de barras como média \pm desvio padrão (DP) de todos os experimentos independentes. O teste estatístico *Mann-Whitney* foi aplicado para comparar os grupos HIV e CS. Diferenças $p < 0,05$ foram estatisticamente significativas (*).

Em conjunto, esses resultados não suportam a hipótese de uma maior polarização Th2 nos linfócitos T CD4+ do grupo de pacientes infectados pelo HIV analisados. Desta forma, descartamos também a possibilidade que uma maior ativação do NLRP3 nos pacientes possa estar relacionada a função inflamassoma-independente sugerida por Bruchard e et al., (2015).

De fato, quando avaliamos a localização da proteína NLRP3 em relação ao núcleo ou citoplasma, através da marcação de NLRP3 e visualização por ensaio de imunofluorescência, não foi possível observar uma localização nuclear do NLRP3 tanto nas células não estimuladas (NE) quanto nas células ativadas (α -CD3/ α -CD28) em ambos os grupos (CS ou HIV) (**Figura 45**).

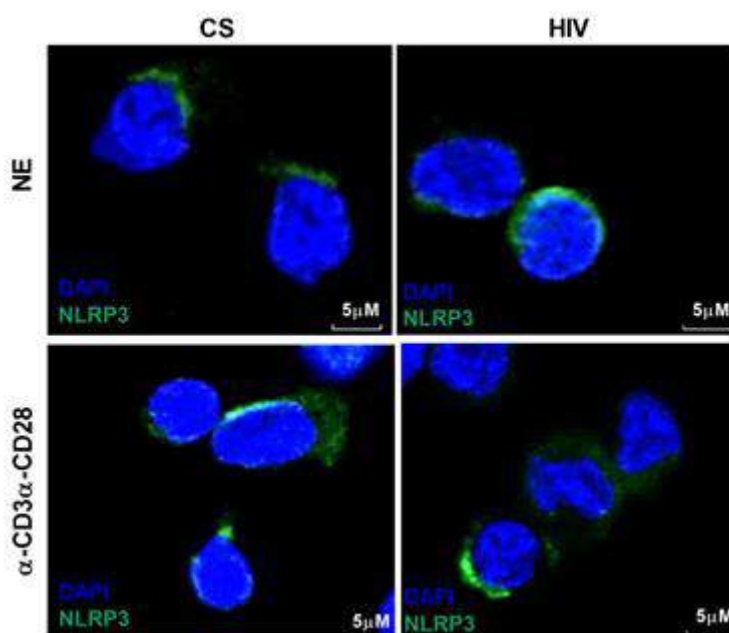


Figura 45. O NLRP3 é localizado no citoplasma dos linfócitos T CD4+ de pacientes HIV e controles.

Foram cultivados 2×10^5 linfócitos T CD4+ de controles saudáveis ($n = 3$) e pacientes HIV ($n = 3$) por 72 horas em lâminas *chamber slide* a 37°C e 5% de CO₂, na presença ou não de 5 μ g/mL de anti-CD3 e 2 μ g/mL de anti-CD28. Em seguida, as células foram permeabilizadas e marcadas para NLRP3 para posterior análise por microscopia. O painel de imagens obtidas por um microscópio confocal com um aumento de 63x, representativas de um experimento, mostrando a localização de NLRP3 no citoplasma (verde, Alexa-488). DAPI foi usado com marcador de núcleo (azul).

5.6 Hiperativação do NLRP3 inflamassoma em linfócitos B de pacientes HIV tratados

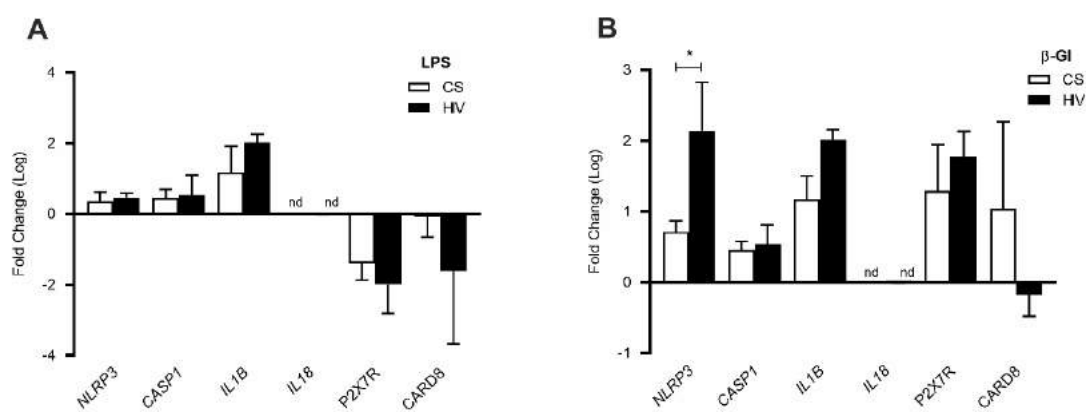
Os nossos dados apresentados nas seções anteriores, apontam para uma possível contribuição não somente dos monócitos, mas também dos linfócitos, na desregulação da ativação do inflamassoma observado nos PBMC dos pacientes HIV. Entretanto, os dados obtidos nos experimentos com os linfócitos T CD4+, não apontaram um papel direto do NLRP3 na desregulação da ativação do inflamassoma nessa subpopulação celular.

Considerando que já foi demonstrado previamente a ativação do complexo NLRP3 inflamassoma diretamente nos linfócitos B humanos (Ali et al., 2017), além dos nossos dados apresentados anteriormente na condição basal (**Figura 28, 29**), levantamos a hipótese que também nas células estimuladas poderia ocorrer uma ativação diferencial do NLRP3 nos linfócitos B no contexto da infecção pelo HIV.

Nesse sentido, linfócitos B isolados de pacientes HIV e controles foram estimulados com 1 µg/mL de LPS, 200 µg/mL de β-glucana ou 1 µg/mL de CpG por 24 horas. Em seguida foram avaliadas também a produção de citocinas, a clivagem de caspase-1 e a formação de *specks*. Além disso, foi analisado em paralelo o perfil de expressão gênica a 3 horas de estimulação.

Foi possível observar que, a ativação com LPS por 3 horas, levou a uma indução significativa da expressão de *IL1B* no grupo HIV comparada com o basal (**Figura 46 A**), porém sem diferença significativa entre os grupos de pacientes e controles. A estimulação com β-glucana levou a uma indução significativa da expressão de *NLRP3* e *IL1B* comparada com o basal somente no grupo HIV ($p < 0,05$) (**Figura 46 B**).

Considerando a expressão diferencial o *NLRP3* e *IL1B* nos linfócitos B de pacientes HIV frente a estimulação com a β-glucana, realizamos também uma análise de correlação da expressão de ambos os genes, sendo observado uma correlação positiva significativa ($r = 0,45$; $p = 0,035$) (**Figura 46 C**).



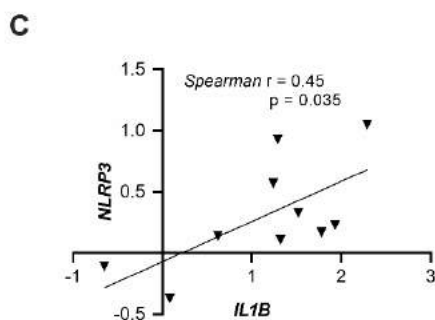


Figura 46. Indução da expressão dos genes do NLRP3 inflamassoma em linfócitos B de pacientes HIV ativadas com LPS ou β -glucana.

Linfócitos B CD19+ isolados de pacientes infectados pelo HIV ($n = 9$) ou controles saudáveis ($n = 6$) foram estimulados com 1 $\mu\text{g/ml}$ de LPS ou 200 $\mu\text{g/ml}$ de β -glucana por 3 horas. O RNA foi isolado de cada amostra e analisado para a expressão dos genes *NLRP3*, *CASP1*, *IL1B*, *IL18*, *P2X7R* e *CARD8* por qPCR. *GAPDH* foi usado como gene endógeno para a normalização dos dados brutos (ΔCt). A modulação da expressão nos linfócitos B estimulados com (A) LPS ou (B) β -glucana foi calculada como $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (*Fold-change*, FC). Valores de FC são comparados entre CS e HIV e os dados são representados como média (FC) \pm erro padrão. O teste “t” múltiplo foi aplicado para comparar a expressão relativa entre os grupos (*: $p < 0,05$). (C) Correlação de Spearman foi realizada para comparar a expressão de *NLRP3* e *IL1B* de linfócitos B do grupo HIV estimulados com β -glucana.

Os linfócitos B responderam aos estímulos aumentando significativamente a produção de IL-1 β , comparado com o basal, em ambos os grupos ($p < 0,05$) (Figura 47 A). Para a citocina IL-18, assim como nos linfócitos T CD4+, foram observados níveis baixos ou indetectáveis na maioria das amostras analisadas (Figura 47 B).

Os linfócitos CD19+ de pacientes HIV produziram mais IL-1 β frente a estimulação com LPS (221,3 \pm 61,92 pg/mL) que os controles (127,1 \pm 59,62 pg/mL; $p = 0,005$) e ainda mais em resposta a β -glucana (329,2 \pm 85,97 versus 211,2 \pm 97,0; $p = 0,007$) (Figura 47 A). Como esperado, a estimulação com CpG não levou a uma indução significativa de IL-1 β em nenhum dos grupos (Figura 47 A).

Os linfócitos B CD19+ responderam a LPS e β -glucana com produção significativa de TNF- α (Figura 47 C) e IL-6 (Figura 47 D). Entretanto, não observamos diferenças significativas entre os grupos de pacientes e controles ($p > 0,05$). O CpG foi o único estímulo capaz de levar a uma indução significativa de IL-10 comparado com a condição basal ($p < 0,05$), mas sem diferenças entre os grupos de pacientes e controles ($p > 0,05$) (Figura 47 E).

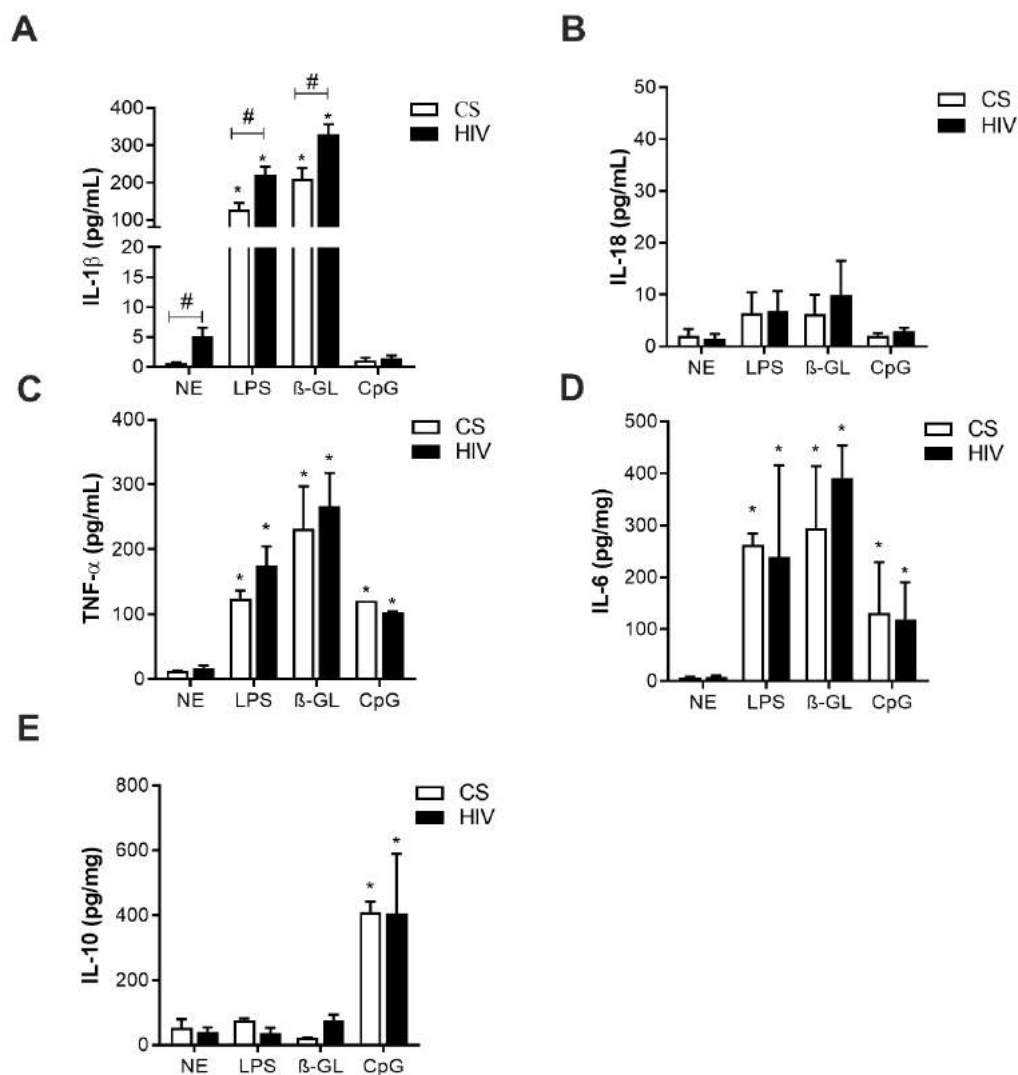


Figura 47. Maior indução de IL-1β por linfócitos B de pacientes HIV estimulados.

Linfócitos B foram purificados de controles saudáveis (CS = 19) e pacientes infectados pelo HIV (HIV = 21) e estimulados com 1 µg/mL de LPS ou 200 µg/mL de β-glucana ou 1 µg/mL de CpG por 24h. Foram coletados os sobrenadantes de cultura e dosado os níveis de (A) IL-1β (n = 19 CS e 21 HIV), (B) IL-18 (n = 5 CS e 5 HIV), (C) TNF-α (n = 3 CS e 3 HIV), (D) IL-6 (n = 3 CS e 3 HIV) e (E) IL-10 (n = 3 CS e 3 HIV) por Elisa. Todos os dados são representados como média ± desvio padrão (DP). Teste de *Friedman* foi aplicado para comparar as condições não estimulados e estimulados (* p < 0,05); o teste de *Mann-Whitney* para comparar as condições entre os grupos HIV e CS # p < 0,05. NE: Não Estimulado.

Em relação aos níveis de caspase-1 ativa, a estimulação com LPS, assim como a β-glucana, levaram a uma indução significativa da clivagem da caspase-1 em ambos os grupos (p < 0,05) e essa indução foi maior no grupo de pacientes HIV que nos controles estimulados tanto com LPS (24,18 ± 3,90 % de células CD19+ FAM-FLICA+ versus 13,44 ± 0,76 % de células CD19+ FAM-FLICA+; p = 0,035) quanto com β-glucana (28,27 ± 3,80 % células CD19+ FAM-FLICA+

versus $14,72 \pm 1,27$ % de células CD19+ FAM-FLICA+; $p = 0,004$) (**Figura 48 A**). A estimulação com CpG não foi capaz de induzir de forma significativa uma maior clivagem da caspase-1 em nenhum grupo (**Figura 48 A**).

A liberação de LDH foi significativamente induzida frente a estimulação com LPS ou β -glucana em ambos os grupos ($p < 0,001$ para ambos estímulos), porém se manteve em média abaixo de 30% e sem diferença entre os grupos de pacientes e controles. Além disso, a estimulação com CpG não foi capaz de levar a uma indução significativa de morte celular (**Figura 48 B**).

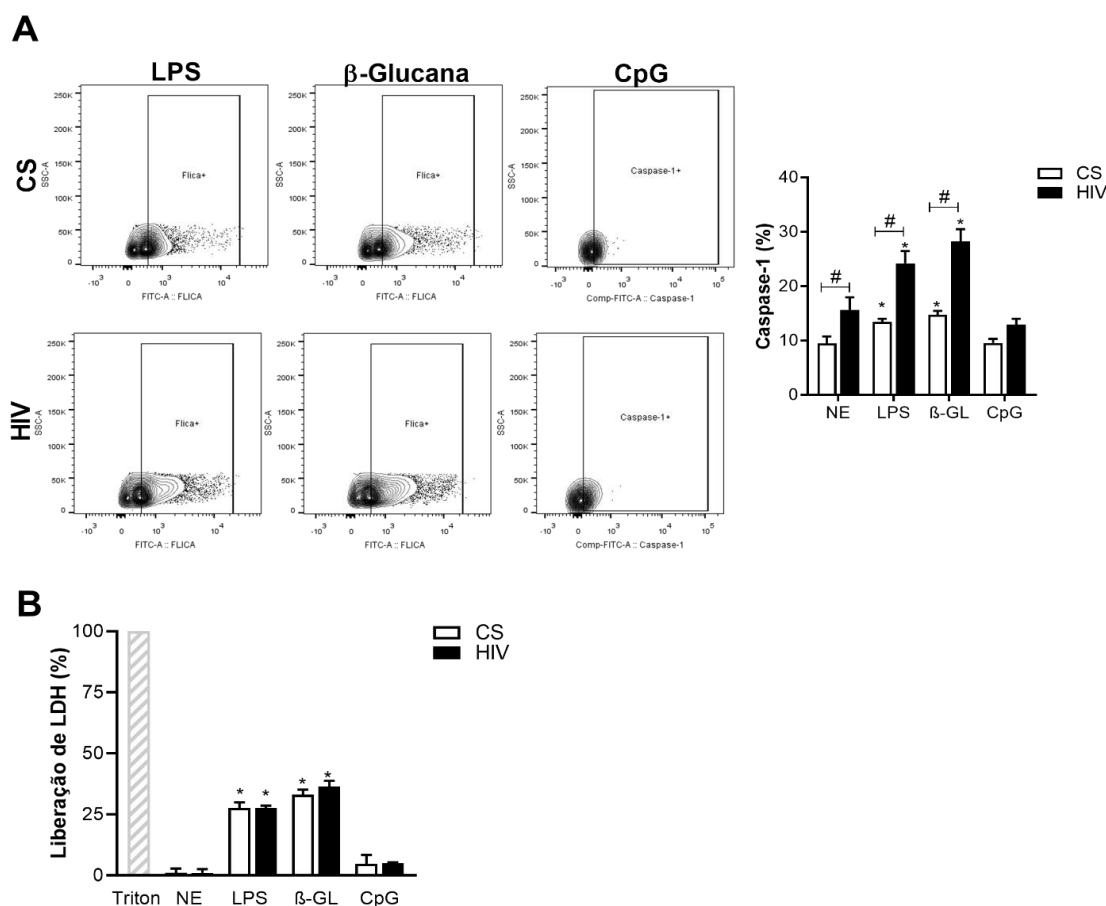


Figura 48. Aumentada indução da clivagem da caspase-1 nos linfócitos B ativado de pacientes cronicamente infectados pelo HIV.

Linfócitos B CD19+ foram purificados de controles saudáveis (CS = 6) e pacientes infectados pelo HIV (HIV = 6) foram estimulados com 1 μ g/mL de LPS, 200 μ g/mL de β -glucana ou 1 μ g/mL de CpG por 24h. (**A**) Foi medido os níveis de caspase-1 ativa CS ($n = 4$) e HIV ($n = 4$) por marcação com o kit FAM-FLICA e detecção por citometria de fluxo. Os dados foram representados como porcentagem de linfócitos B CD19+FAM-FLICA+ dentro do *gate* de células CD19+ vivas (*LIVE/DEAD low*) com um experimento representativo na forma de *zebraplot* e um gráfico de barras como média \pm desvio padrão (DP) de todos os experimentos; (**B**) avaliado a taxa de morte celular através da dosagem da liberação de LDH no sobrenadante de cultura de CS ($n=3$) e HIV ($n=3$) com representação em porcentagem em relação ao controle positivo (Triton, 100% de lise celular) em um gráfico de barras como média \pm desvio padrão (DP). Teste de *Friedman* foi aplicado para comparar as condições não estimulados e estimulados (* $p < 0,05$); o teste de *Mann-Whitney* para comparar as condições entre os grupos HIV e CS # $p < 0,05$.

Em acordo com os dados de IL-1 β e caspase-1, a estimulação com LPS ou β -glucana levou a um aumento na contagem de *specks* positivos para marcação com ASC e NLRP3 (colocalizados) nas células CD19 $^{+}$ em ambos os grupos, HIV e CS ($p < 0,05$) (**Figura 49 A, B**). Quando comparamos os grupos, observamos que a formação de *specks* foi maior nos linfócitos dos pacientes que nos controles, tanto na condição com LPS ($9,6 \pm 0,8$ versus $6,0 \pm 1,4$ *specks* NLRP3+ASC+/5 campos; $p < 0,001$), quanto com β -glucana ($12,2 \pm 1,3$ versus $7,2 \pm 1,8$ *specks* NLRP3+ASC+/5 campos; $p < 0,001$) (**Figura 49 A, B**).

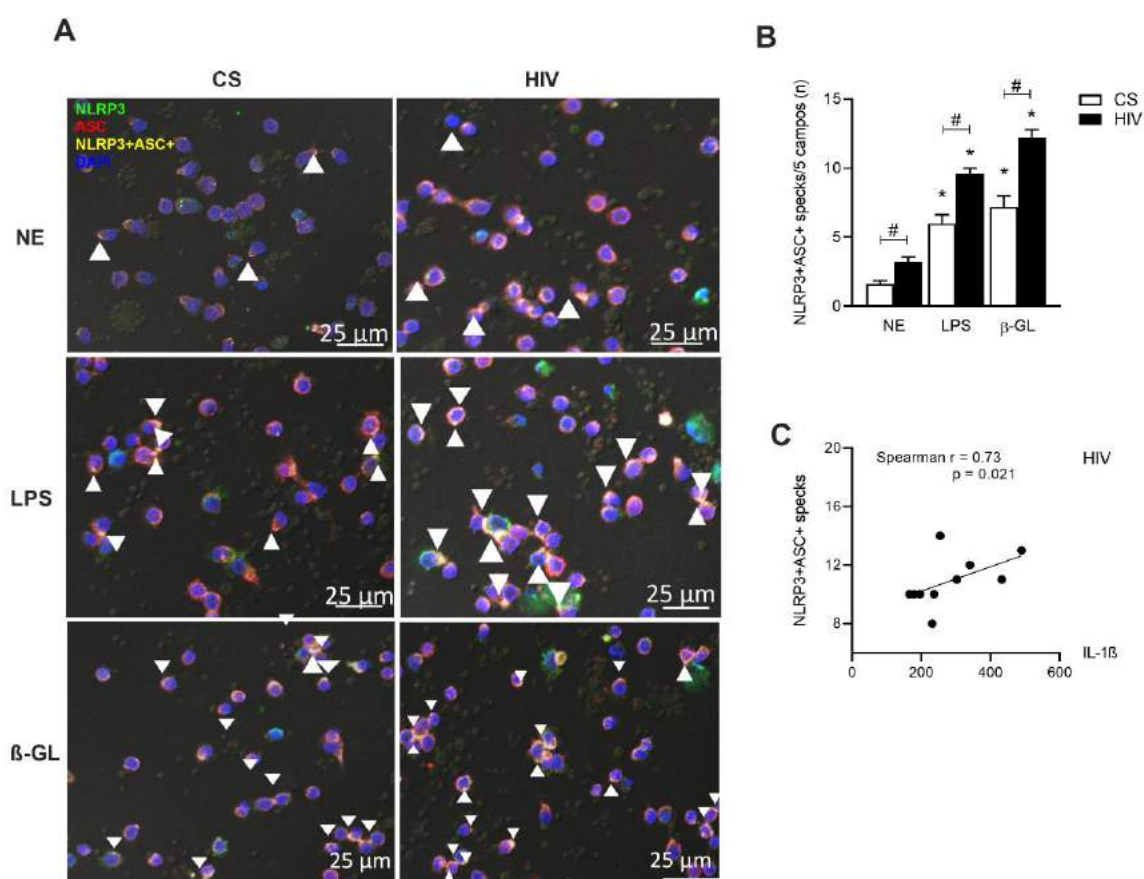


Figura 49. Aumentada formação de *specks* de NLRP3/ASC em linfócitos B de pacientes HIV estimulados com LPS e β -glucana.

Foram cultivados 2×10^5 linfócitos B de controles saudáveis ($n = 3$) e pacientes HIV ($n = 3$) em lâminas *chamber slide* a 37°C e 5% de CO_2 e tratados com $1 \mu\text{g/mL}$ de LPS por 24h ou $200 \mu\text{g/mL}$ de β -glucana por 24h. Em seguida, as células foram permeabilizadas e marcadas para NLRP3 e ASC para posterior análise por microscopia. **(A)** O painel de imagens obtidas por um microscópio confocal com um aumento de 40x, representativas de um experimento, mostrando a formação de agregados de NLRP3 e ASC no citoplasma. NLRP3 (verde, Alexa-488) e ASC (vermelho, Alexa-568), colocalização (amarelo, NLRP3+ASC+). DAPI foi usado com marcador de núcleo (azul). **(B)** A contagem de *specks* de NLRP3/ASC são representados como média \pm desvio padrão (DP). Teste de *Mann-Whitney* foi aplicado para comparar os grupos HIV e CS. Diferenças $p < 0,05$ foram estatisticamente significativas; * $p < 0,05$ para comparações entre NE e estímulos; # $p < 0,05$ para comparações entre HIV e CS. **(C)** A correlação de *Spearman* foi realizada entre a contagem de *specks* de NLRP3/ASC e a dosagem de IL-1 β em linfócitos B de pacientes HIV e controles. NE: Não estimulado.

Foi realizada também uma análise de correlação para confirmar se a formação dos agregados citosólicos estava relacionada à produção de IL-1 β . Devido ao limitado tamanho amostral dos grupos ($n = 3$), e considerando que em ambos os grupos a resposta aos estímulos leva a aumento da ativação do inflamassoma, executamos a análise reunindo os dados das células HIV e CS. Como pode ser observado na **Figura 49 C**, a contagem de *specks* de NLRP3/ASC resultou positivamente correlacionada com os níveis de IL-1 β ($r: 0,73$; $p = 0,021$), enfatizando que a montagem do complexo inflamassoma e a consequente liberação de IL-1 β inclui a ativação do receptor NLRP3.

Através da utilização do inibidor específico do NLRP3, MCC-950, foi avaliado o envolvimento direto do NLRP3 na ativação do inflamassoma nos linfócitos B. Além do MCC, foi utilizado o inibidor específico da tirosina quinase de Bruton (BTK), envolvida na via de sinalização do NLRP3 nos linfócitos B. As concentrações dos inibidores foram definidas baseado na literatura e de acordo com padronização presente no **APÊNDICE G**.

A seguir é reportado uma figura ilustrativa da atuação dos inibidores nos linfócitos B CD19+ humanos (**Figura 50**).

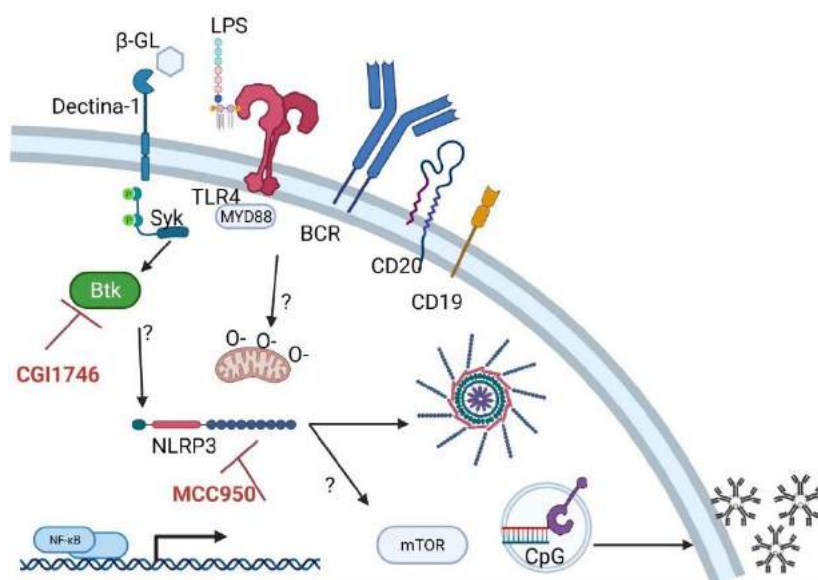


Figura 50. Ação dos inibidores do inflamassoma nos linfócitos B CD19+ humanos.

Ilustração sobre os mecanismos propostos para ativação do NLRP3 em linfócitos B CD19+ humanos ativados com LPS, β -glucana ou CpG (Kumar et al., 2009; Ali et al., 2017), assim como a ação dos inibidores MCC950 e CGI1746. A incubação prévia com MCC950 leva a inibição específica do NLRP3 através da ligação direta da molécula de MCC950 ao NLRP3, prevenindo a oligomerização do complexo (Coll et al., 2015). Já o CGI1746 atua inibindo a quinase Btk através de uma ligação direta a enzima impedindo a autofosforilação e transfosforilação necessária para a sua ativação (Di Paolo et al., 2011), e, conseqüentemente, afetando a sua atividade na indução da montagem do complexo (Liu et al., 2017).

O MCC-950 inibiu significativamente a produção de IL-1 β nos linfócitos B de pacientes (**Figura 51 A**) e controles (**Figura 51 B**) estimulados com LPS (72 % e 71 % de inibição, respectivamente) e com β -glucana (86 % e 72% de inibição respectivamente) ($p < 0,05$).

O CGI por sua vez inibiu ainda mais a liberação da citocina em ambos os grupos HIV (**Figura 51 A**) e CS (**Figura 51 B**) tanto na condição com LPS (90 % e 86 % de inibição respectivamente) que com β -glucana (89 % e 86 % de inibição, respectivamente) ($p < 0,05$).

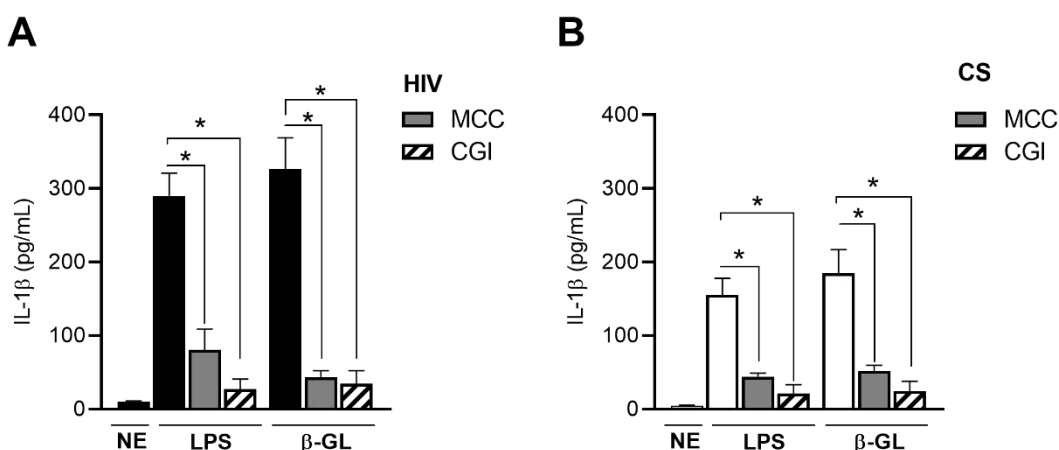


Figura 51. Inibidores reduzem a produção de IL-1 β em linfócitos B ativados.

Linfócitos B de pacientes infectados pelo HIV (HIV; $n = 5$) (**A**) ou de controles saudáveis (CS; $n = 6$) (**B**) foram pré-tratados com 10 μ M de MCC-950 (MCC) ou 10 μ M de CGI-1746 (CGI), e então estimuladas com 1 μ g/ml de LPS ou com 200 μ g/ml de β -glucana por 24 horas. A concentração de IL-1 β foi mensurada nos sobrenadantes de cultura por ELISA. Os dados são representados como média da concentração de citocina (pg/mL) \pm desvio padrão (DP). O teste de *Friedman* foi aplicado para comparar a condição estimulada (LPS ou β -glucana) com as células tratadas com inibidor (MCC ou CGI) em cada grupo (CS e HIV). Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (*).

Foi previamente reportado por Ali et al., (2017), que a estimulação de linfócitos B com CpG foi capaz de induzir a produção de IgM totais de forma dependente (embora não totalmente elucidada) do NLRP3. Considerando os nossos achados que evidenciam uma aumentada ativação do NLRP3 inflamassoma nos linfócitos B de pacientes HIV, levantamos a hipótese que esta condição possa contribuir, pelo menos em parte, na já conhecida alteração da resposta humoral de pacientes cronicamente infectados pelo HIV (Levesque et al., 2009). Para investigar a nossa hipótese, realizamos a dosagem de IgM totais no sobrenadante de cultura de linfócitos B estimulados com LPS, β -glucana e

CpG nas mesmas condições experimentais do ensaio anterior, porém após 72 horas de cultura, de acordo com Ali et al., (2017).

Como esperado, apenas o CpG, mas não o LPS ou a β -glucana, foi capaz de induzir uma produção significativa de IgM nos linfócitos B de ambos os grupos, CS e HIV ($p < 0,05$) (**Figura 52 A**), entretanto, os níveis de IgM foram maiores no grupo de pacientes comparado aos controles ($652,1 \pm 389,9$ ng/mL versus $197,0 \pm 66,47$ ng/mL; $p = 0,004$) (**Figura 52 A**).

Esse dado evidencia que tanto a produção de IL-1 β (induzida pelo LPS e β -glucana) quanto a produção de IgM (induzida pelo CpG) estão aumentados nos linfócitos B de pacientes HIV.

No intuito de demonstrar que o NLRP3 está atuando nas diversas vias de sinalização, replicamos o ensaio de estimulação com CpG na presença dos inibidores MCC-950 e CGI-1746. Como pode ser observado na **Figura 52 B**, o MCC-950 inibiu significativamente a produção de IgM em ambos os grupos HIV e CS (65 % e 77% de inibição, respectivamente; $p < 0,05$). O CGI, por sua vez, levou a uma inibição significativa e acima de 90% em ambos os grupos HIV e CS ($p < 0,05$) (**Figura 52 B**).

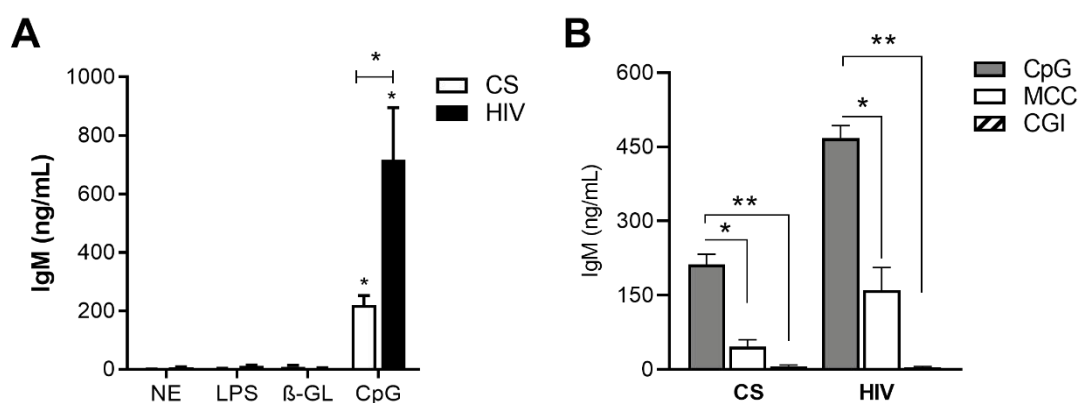


Figura 52. Inibidores reduzem a produção de IgM em linfócitos B ativados.

Linfócitos B de controles saudáveis (CS; $n = 6$) ou pacientes infectados pelo HIV (HIV; $n = 5$) foram estimuladas com **(A)** 1 μ g/ml de LPS, 200 μ g/ml de β -glucana ou 1 μ g/ml CpG por 72 horas, ou **(B)** pré-tratados com 200 μ M de MCC-950 (MCC) ou 10 μ M de CGI-1746 (CGI), e então estimulados com 1 μ g/ml de CpG por 72 horas. A concentração de IgM foi mensurada nos sobrenadantes de cultura por ELISA. Os dados são representados como média da concentração de IgM (ng/mL) \pm desvio padrão (DP). O teste de *Friedman* foi aplicado para comparar a condição estimulada (LPS, β -glucana ou CpG) com as células tratadas com inibidor (MCC ou CGI) em cada grupo (CS e HIV). Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (*).

Em seguida realizamos uma análise de correlação entre a produção de IL-1 β e de IgM. Devido ao limitado tamanho amostral dos grupos (n = 5, e n = 6 respectivamente), e considerando que em ambos os grupos a resposta aos estímulos leva a aumento da ativação do inflamassoma, executamos a análise reunindo os dados das células HIV e CS.

Como pode ser observado na **Figura 53**, a produção de IgM resultou positivamente correlacionada com os níveis de IL-1 β (r: 0,60; p = 0,043), enfatizando que existe uma via comum nessas respostas nos linfócitos B.

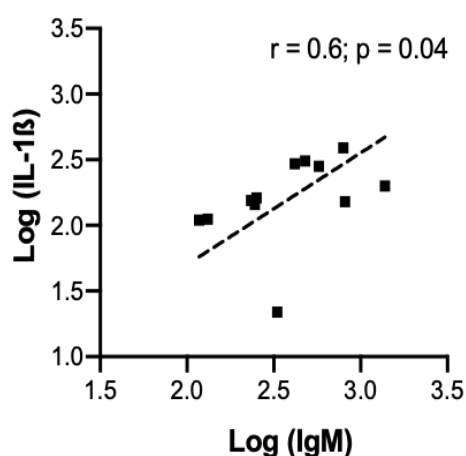


Figura 53. A produção de IL-1 β e IgM está correlacionada em linfócitos B ativados.

A correlação de *Spearman* foi realizada entre a dosagem de IL-1 β e IgM em linfócitos B estimulados com β -glucana. Os dados (em Log₁₀ das dosagens) incluídos pertencem a ambos os grupos HIV (n = 5) e CS (n = 6). São reportados o coeficiente de *Spearman* r e o *p-value* da análise.

Em conjunto, esses dados demonstram pela primeira vez a hiperativação do inflamassoma nas células CD19+ do sangue periférico de pacientes HIV em ART. Os linfócitos B circulantes de pacientes apresentam tanto um aumento de ativação basal do complexo, quanto uma maior resposta a PAMPs, tais como LPS e β -glucana, comparados com os controles.

A ativação do inflamassoma leva a maior produção de IL-1 β que pode contribuir para a inflamação crônica característica desses pacientes. Assim como já descrito (Ali et al., 2017), os nossos achados apontam para o NLRP3 como o receptor envolvido na resposta a LPS e β -glucana nos linfócitos B. Pacientes HIV aparentam ter uma maior expressão e ativação do NLRP3 nessas células comparado com os controles. A produção de IgM também resultou aumentada nos linfócitos B dos pacientes, e levando em conta a correlação

positiva dos níveis de imunoglobulinas com a concentração de IL-1 β , e o efeito de inibidores específicos do NLRP3, sugerimos que uma maior ativação do NLRP3 inflamassoma também contribui para uma maior produção de IgM.

5.7 Efeito do *background* genético do inflamassoma na ativação do complexo nos leucócitos de pacientes HIV

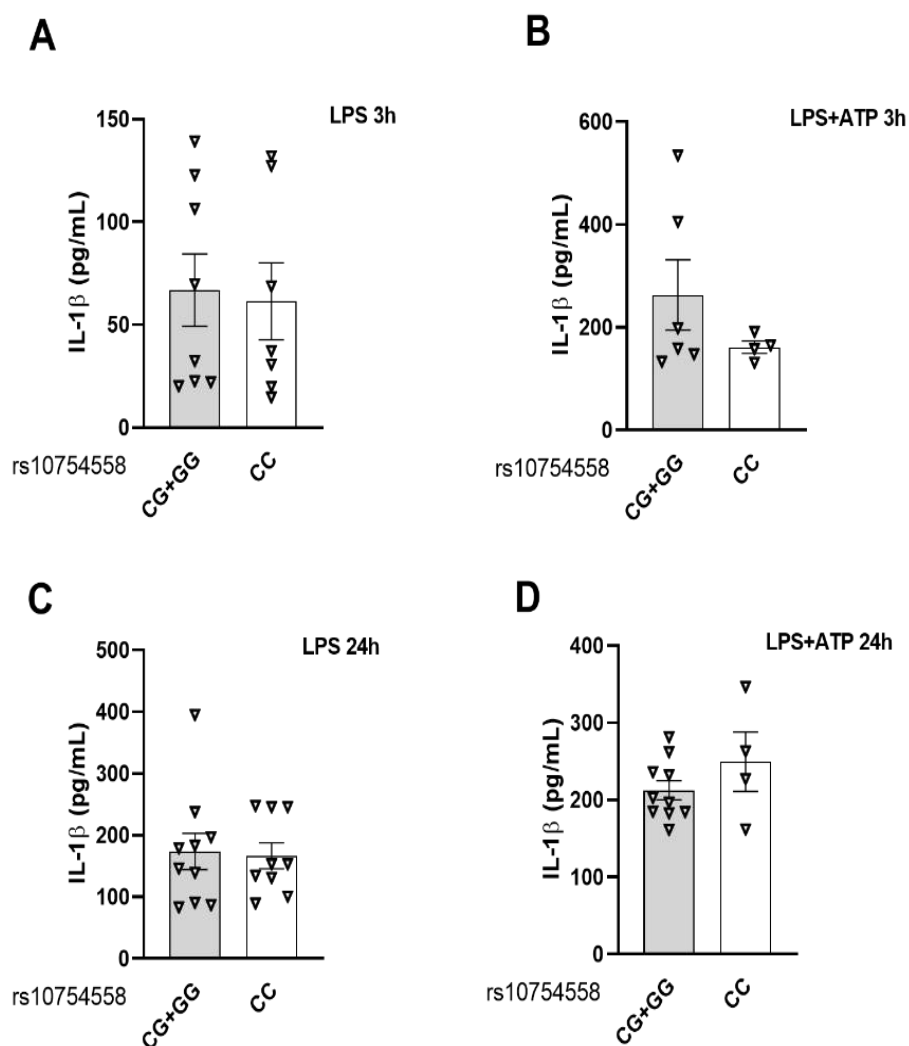
Os resultados do estudo de associação genética apontaram para polimorfismos em dois genes, *IL1B* e *NLRP3*, como fatores de contribuição para um estado clínico mais grave em pacientes cronicamente infectados pelo HIV. Contudo, levando em conta o efeito funcional conhecido dos SNPs, os resultados aparentavam ser contrastantes, sendo a variante *IL1B* rs16944 relacionada a um aumento de IL-1 β (Hall et al., 2004) associada a um pior prognóstico, e as variantes do NLRP3, relacionadas a aumento da disponibilidade e/ou de ativação do NLRP3 (Hitomi et al., 2009; Verma et al., 2012), associada a um melhor quadro clínico. No intuito de explicar essa aparente contradição, levantamos a hipótese que o efeito dos SNPs pudesse ser célula-específico ou eventualmente função-específico, levando em conta funções inflamassoma independentes, recentemente propostas para o NLRP3 (Bruchard et al., 2015).

Nas seções anteriores demonstramos como leucócitos circulantes de pacientes HIV apresentam desregulações específicas do inflamassoma e em alguns casos do NLRP3, em parte corroborando a nossa hipótese. Nesta última parte do trabalho, realizamos a avaliação do efeito dos SNPs associados (rs16944, rs10754558 e rs35829419) sobre o nível de ativação dos leucócitos estudados. Portanto, foi realizado um ensaio genótipo-guiado com a ativação do inflamassoma nos monócitos, linfócitos T CD4+ e linfócitos B de pacientes HIV frente aos estímulos descritos nas seções anteriores.

Devido a baixa frequência do SNP rs35829419 C>A (MAF = 5 %) não conseguimos realizar a análise para este polimorfismo no grupo de pacientes.

Inicialmente apresentamos os dados sobre o efeito dos SNPs nos monócitos de pacientes HIV estimulados com LPS por 3h ou 24h seguidos ou não da adição de ATP por 15 minutos (conforme protocolo de ativação descrito na seção de Materiais e métodos).

Inesperadamente, não observamos diferenças significativas na produção de IL-1 β em nenhuma das condições de estimulação entre pacientes que carregam ou não o SNP em *NLRP3* rs10754558 ($p>0,05$) (**Figura 54 A-D**) assim como para o SNP em *IL1B* rs16944 ($p>0,05$) (**Figura 54 F-G**) no modelo dominante de herança, sugerindo que, diferentemente dos doadores saudáveis o qual a presença dos SNPs afeta diretamente o nível das citocinas (como demonstrado previamente pelo nosso grupo; Dos Reis et al., 2019; Souza de Lima et al., 2020), nos pacientes HIV o efeito dos SNPs pode ser camuflado pela inflamação crônica.



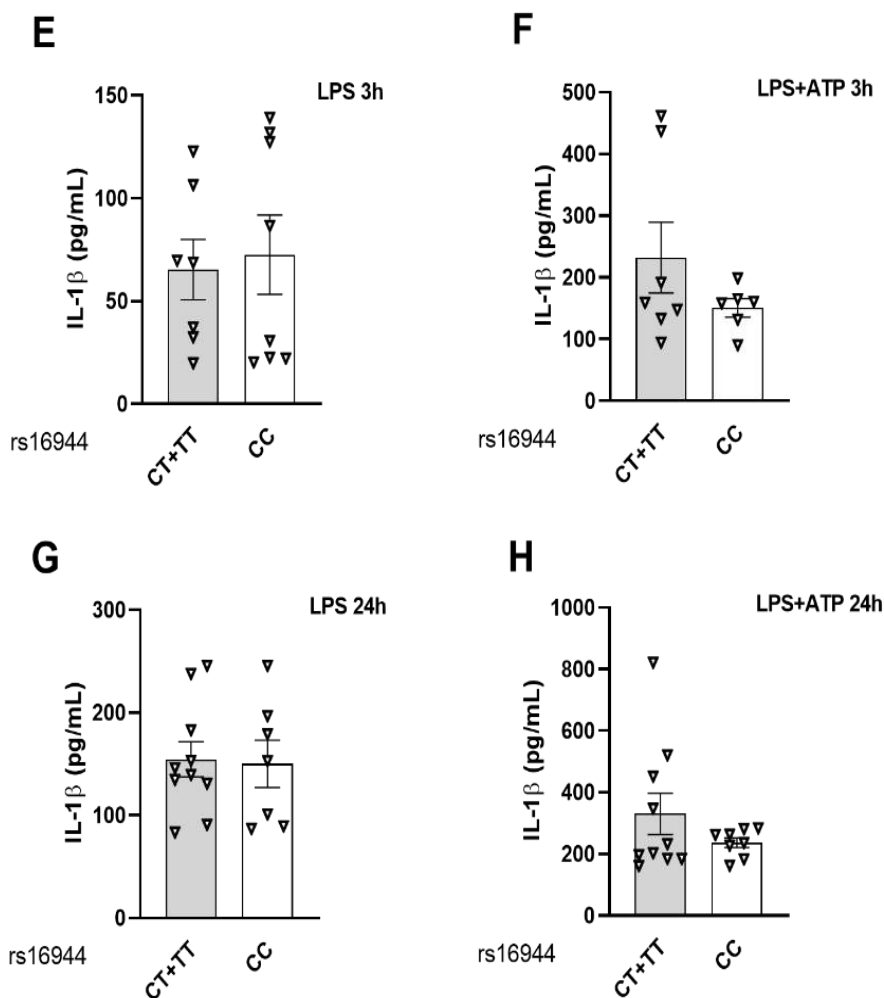


Figura 54. Efeito dos SNPs rs10754558 e rs16944 na produção de IL-1 β por monócitos CD14+ de pacientes HIV.

A produção de IL1 β pelos monócitos CD14+ de pacientes HIV (n = 22) estimulados com 1 μ g/mL de LPS por 3h (A, E) seguidos da adição de 1 mM de ATP por 15 minutos (B, F) ou com 1 μ g/mL de LPS por 24h (C, G) seguidos da adição de 1 mM de ATP por 15 minutos (D, H) foi comparada entre indivíduos carreadores dos SNPs: rs10754558 C>G (G/G+C/G, n = 7, versus C/C, n = 8) ou rs16944 C>T (C/T+T/T, n = 8, versus C/C, n = 7). Os dados foram comparados com o teste de *Mann-Whitney*, e diferenças com *p-value* < 0,05 (*) foram consideradas significativas.

Para avaliar o efeito dos SNPs na ativação do inflamassoma nos linfócitos T CD4+, comparamos a produção de IL-1 β após estimulação com anti-CD3 e anti-CD28 entre pacientes HIV agrupados pelo genótipo dos SNPs rs10754558 C>G e rs16944 C>T. Assim como nos monócitos, não foi possível observar um efeito significativo tanto do SNP em *NLRP3* (Figura 54 A) quanto do SNP em *IL1B* (Figura 54 B) nos níveis de IL-1 β produzidos pelos linfócitos T CD4+ ativados de pacientes HIV.

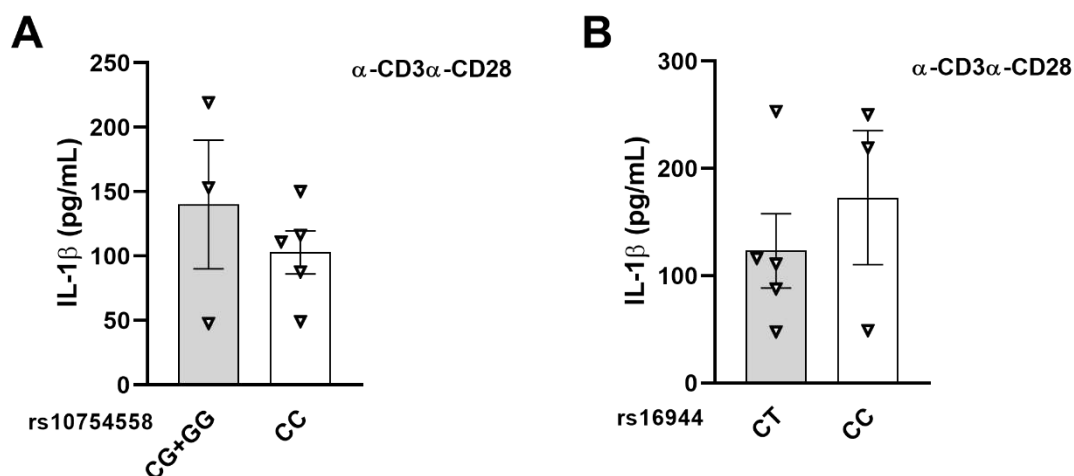


Figura 55. Efeito dos SNPs rs16944 e rs10754558 na produção de IL-1 β por linfócitos T CD4+ de pacientes HIV.

A produção de IL1 β pelos linfócitos T CD4+ de pacientes HIV (n = 10) estimulados com 2 μ g/mL de anti-CD3 e 5 μ g/mL de anti-CD28 por 72 foi comparada entre indivíduos carreadores dos SNPs: **(A)** rs10754558 C>G (G/G+C/G, n = 3, versus C/C, n = 5) ou **(B)** rs16944 C>T (C/T, n = 5, versus C/C, n = 3). Os dados foram comparados com o teste de *Mann-Whitney*, e diferenças com *p-value* < 0,05 (*) foram consideradas significativas.

Por fim, repetimos a análise com os linfócitos B de pacientes HIV (n = 9) desafiados com LPS ou β -glucana. Como pode ser observado na **Figura 56**, os linfócitos B de pacientes que carregam o alelo polimórfico rs10754558 G (C/G ou G/G) produzem significativamente mais IL-1 β tanto frente a estimulação com LPS (*p* = 0,049) (**Figura 56 A**), quanto na estimulação com β -glucana (*p* = 0,045) (**Figura 56 B**) quando comparados com os indivíduos que carregam o alelo selvagem C em homozigose (C/C). Já quando agrupado quanto aos carreadores do alelo polimórfico rs16944 T (C/T ou T/T) produzem em média mais IL-1 β frente a estimulação com LPS (**Figura 56 C**) ou com β -glucana (**Figura 56 D**) quando comparados com os indivíduos que carregam o alelo selvagem C em homozigose (C/C), entretanto essa diferença não foi estatisticamente significativa (*p* = 0,09 e *p* = 0,14 respectivamente).

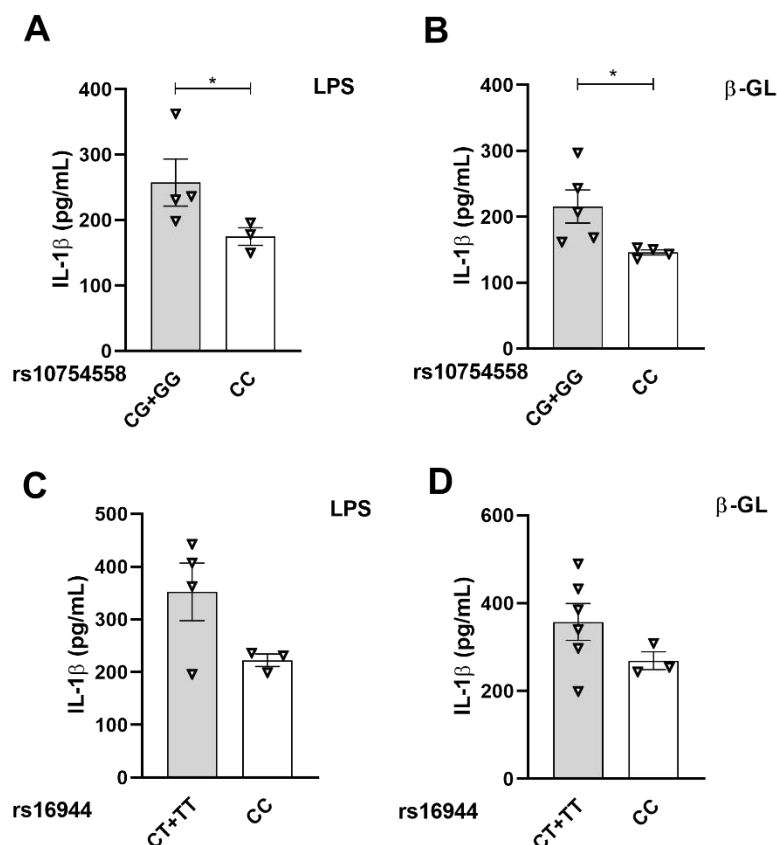


Figura 56. Efeito dos SNPs rs10754558 e rs16944 na produção de IL-1β por linfócitos B CD19+ de pacientes HIV.

A produção de IL1β pelos linfócitos B CD19+ de pacientes HIV (n = 9) estimulados com 1 μg/mL de LPS (**A, C**) ou 200 μg/mL (**B, D**) por 24h, foi comparada entre indivíduos carreadores dos SNPs: rs10754558 C>G (G/G+C/G, n = 5, versus C/C, n = 4) ou (**B**) rs16944 C>T (C/T+T/T, n = 5, versus C/C, n = 4). Os dados foram comparados com o teste de *Mann-Whitney*, e diferenças com *p-value* < 0,05 (*) foram consideradas significativas.

Esses achados demonstram que o efeito dos SNPs rs16944 e rs10754558 no nível de ativação do inflamassoma e da liberação da IL-1β em leucócitos de pacientes HIV varia de acordo com o tipo de célula, sendo que monócitos e linfócitos T CD4+ resultaram mais sensíveis a inflamação crônica que os linfócitos B. Mas também nos linfócitos B, podemos observar um efeito significativo apenas de uma das duas variantes, a rs10754558. Esta diferença no efeito dos SNPs pode em parte explicar o resultado discordante do estudo de associação genética.

Uma característica bem conhecida nos pacientes HIV é a elevada concentração plasmática de IL-18 (Stylianou et al., 2003; Wiercinska-Drpaló et al., 2004; Song et al., 2006), independente da ART. Contudo, a origem da citocina não está bem esclarecida. Os nossos dados mostram que nem

monócitos nem linfócitos circulantes podem estar contribuindo pelos níveis plasmáticos da citocina em pacientes HIV, sendo as células estudadas produtoras de baixas (ou até indetectáveis) quantidades de IL-18, mesmo na presença de estímulos (**Figura 31**, **Figura 38** e **Figura 47**).

De fato, os pacientes recrutados pelo estudo também apresentam níveis plasmáticos aumentados de IL-18 quando comparados aos controles ($p = 0,005$) (**APÊNDICE K**). Quando comparamos os níveis da citocina baseado nos genótipos dos SNPs rs10754558 e rs16944, observamos que a presença do SNP no gene NLRP3 (rs10754558) foi associada a uma maior concentração plasmática em pacientes HIV (CG+GG: $232,3 \pm 39,9$ pg/mL versus CC: $147,4 \pm 10,3$; $p = 0,006$) (**Figura 57 A**). Já a presença do SNP rs16944 no gene da *IL1B*, como esperado, não afetou significativamente a concentração de IL-18 plasmática no grupo de pacientes HIV ($p > 0,05$) (**Figura 57 B**).

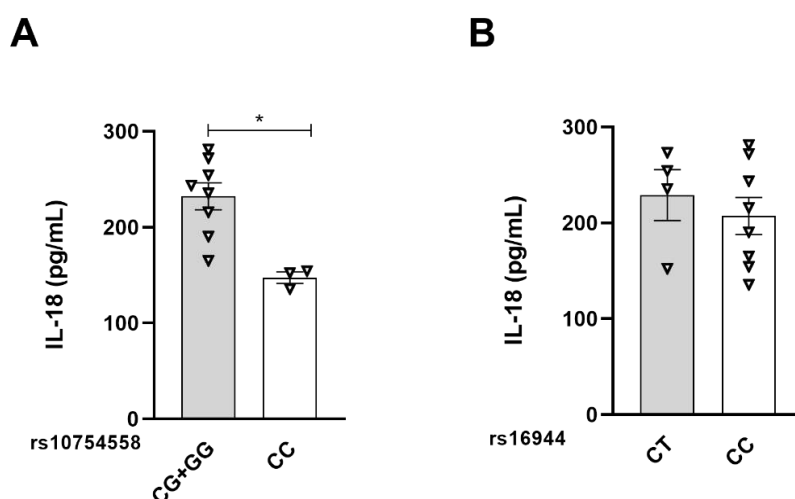


Figura 57. Efeito dos SNPs rs10754558 e rs16944 na concentração de IL-18 plasmática de pacientes HIV.

A concentração de IL18 plasmática de pacientes HIV ($n = 12$) foi comparada entre indivíduos carreadores dos SNPs: rs10754558 C>G (G/G+C/G, $n = 8$, versus C/C, $n = 3$) ou (B) rs16944 C>T (C/T, $n = 4$, versus C/C, $n = 8$). Os dados foram comparados com o teste de *Mann-Whitney*, e diferenças com *p-value* < 0,05 (*) foram consideradas significativas.

Esses resultados sugerem que o SNP em NLRP3 (rs10754558) possa contribuir com a maior ativação do inflamassoma em outras células onde a produção de IL-18 seja relevante (por exemplo o epitélio) e/ou que essa variante atue como *locus de traço quantitativo* (QTL, do inglês: *Quantitative Trait Locus*) pela produção de IL-18.

6. DISCUSSÃO

Já é amplamente reportado na literatura que pacientes infectados pelo HIV-1 apresentam uma inflamação crônica, mesmo sob tratamento antirretroviral eficaz (com carga viral indetectável) (Deeks et al., 2013). Tal inflamação foi associada, pelo menos em parte, com uma desregulação da ativação do inflamassoma (Song et al., 2006; Bandera et al., 2018; Leal et al., 2020), mas, até o momento de elaboração do presente trabalho, pouco se sabia sobre o perfil de ativação do complexo de forma célula específica e receptor específico nos pacientes. Além disso, havia uma escassez de estudos acerca da influência do *background* genético do inflamassoma na ativação do complexo e condição clínica dos pacientes HIV.

O nosso grupo foi o primeiro a sugerir um efeito de proteção do receptor NLRP3 contra a infecção pelo HIV, através de estudos de associação genética (Pontillo et al., 2010; Pontillo et al., 2012). Porém, não existiam trabalhos no que tange a influência da genética do NLRP3 nos indivíduos já cronicamente infectados com relação a condição clínica e desenvolvimento de comorbidades.

A nossa coorte de estudo incluiu pacientes cronicamente infectados, sob tratamento antirretroviral e com ausência de sinais clínicos de Aids. Essa característica inviabilizou a investigação de um possível efeito do inflamassoma no estado clínico grave (ex. Aids).

Nessa coorte de pacientes foram disponibilizados dados referentes às variáveis clínicas comumente investigadas nos estudos envolvendo pacientes HIV (CVP e contagem de linfócitos T CD4+ e CD8+), mesmo que incompleto para alguns indivíduos. Além disso, tivemos acesso ao tipo de tratamento antirretroviral utilizado, e levando em conta que o inibidor nucleosídeo da transcriptase reversa, Abacavir, tem um potencial de ativação do NLRP3 inflamassoma (Toksoy et al., 2017), nenhum paciente que fazia uso desse fármaco foi incluído nos estudos celulares.

Informações sobre a presença de comorbidades não-Aids foram necessárias para exclusão dos pacientes das coletas para os ensaios celulares, e foram utilizadas para o estudo de associação genético da coorte como um todo. Entretanto, os prontuários nem sempre reportavam essa informação, por isso, o estudo genético das comorbidades foi realizado em um grupo menor de pacientes.

Ao longo do projeto, incluímos um grupo de 120 pacientes recrutados no mesmo ambulatório por um estudo anterior de resposta à vacina por HBV (Lara et al., 2017), que resultou em dados interessantes quando analisado em conjunto com os resultados obtidos nos experimentos com os linfócitos B.

Apesar das limitações reportadas, a coorte apresentou um tamanho amostral suficiente para identificar associações significativas para as variáveis estudadas com um valor de “*power*” de 0,85.

O estudo de associação genética demonstrou um resultado significativo da variante rs16944 C>T localizada na região promotora do gene da *IL1B* (-551 C>T) e relacionada a um maior nível de transcrição da citocina (Hall et al., 2014), que resultou em um fator de risco para um pior estado clínico dos pacientes HIV (de acordo com menores níveis de linfócitos T CD4) e aumentado risco em desenvolver algumas comorbidades (Autoimunidade, doenças cardiovasculares e hepáticas).

A contribuição da IL-1 β no processo de inflamação crônica já é bem conhecida (Appay, Kelleher, 2016), podendo afetar a capacidade dos pacientes HIV em responder a outras infecções, bem como no desenvolvimento das distintas comorbidades. Elevados níveis de IL-1 β foram detectados em tecido cerebral de pacientes com encefalite associada ao HIV (HIVE) (Zhao et al., 2001), outra condição não Aids associada a inflamação crônica.

Essa variante (rs16944) foi previamente associada na literatura como fator de risco para desenvolvimento de doenças inflamatórias como doenças cardiovasculares (Fu et al., 2019), obesidade e doenças metabólicas (de Moraes Rodrigues et al., 2018), artrite reumatóide (Harrison et al., 2008; Domínguez-Pérez et al., 2017) e lupus eritematoso sistêmico (Parks et al., 2004). Além disso, foi reportada uma associação com a gravidade da infecção por vírus da influenza A, por contribuir para a leucocitose e inflamação reportada nesses pacientes (Keshavarz et al., 2019), e desenvolvimento de fibrose hepática durante a infecção por HBV (Wu et al., 2018), corroborando um efeito importante desse SNP quanto a ativação imune e perfil de resposta a condições inflamatórias crônicas ou agudas.

Os dados que obtivemos através da análise de subpopulações de PBMC apontam para um efeito da variante em linfócitos B de pacientes HIV, apesar que uma maior produção de IL-1 β basal e induzida foi observada não somente nos

linfócitos B, mas também nos linfócitos T CD4+ e monócitos. É importante ressaltar que este estudo demonstrou pela primeira vez que também os linfócitos T CD4+ e linfócitos B podem ser importantes fontes de IL-1 β dentre as populações com ativação constitutiva aumentada nos PBMC de pacientes HIV.

Em relação a IL-18, foi previamente reportado em literatura que variantes que levam a menores níveis dessa citocina plasmática são associadas a um melhor prognóstico para infecção pelo HIV (Andrade-Santos et al., 2019). Entretanto, os nossos dados não resultaram em uma associação significativa das variantes no gene da *IL18* (rs1834481 e rs5744256) com as variáveis clínicas avaliadas nos pacientes tratados. Porém, não podemos descartar um possível efeito dessas variantes em outro momento da infecção, como nos pacientes na ausência de tratamento, em etapas mais iniciais da infecção, conforme amplamente discutido no nosso artigo publicado em **APÊNDICE I**.

Curiosamente, nenhum dos leucócitos estudados dos pacientes tratados produzem níveis significativos dessa citocina, sugerindo que a sua produção possa estar acontecendo em outros leucócitos circulantes (neutrófilos (Robertson et al., 2006)) ou plaquetas (Allam et al., 2012). Vale destacar que as plaquetas foram descritas como principal fonte de IL-18 na circulação (Allam et al., 2012), as quais apresentam um fenótipo de ativação aumentado durante a infecção pelo HIV (Mayne et al., 2012). Além disso, já foi previamente reportado a produção de IL-18 por células não estritamente relacionadas ao componente imunológico, como as células epiteliais intestinais (Okazawa et al., 2004), ou no endotélio (Liu et al., 2020). Especificamente nas células endoteliais, a produção de IL-18 foi apontada por afetar as células T, levando a sua expansão, assim como a resposta humoral de células B no contexto de lesões isquêmicas de reperfusão (Liu et al., 2020). Como já mencionado, o epitélio intestinal dos pacientes HIV apresenta inflamação e dano tecidual que poderia estar associada diretamente a uma liberação desregulada da IL-18.

Contrariamente ao esperado, e aos resultados de associação com *IL1B*, os polimorfismos que aumentam a estabilidade e a ativação do NLRP3, o rs10754558 e rs35829419, resultaram associados a uma melhor condição clínica dos pacientes HIV (avaliada através do nível de linfócitos T CD4+). Essas variantes estão relacionadas com aumento de produção de IL-1 β e/ou IL-18 em monócitos, macrófagos (Souza de Lima et al., 2020) e DC (Reis et al., 2019), e

os nossos ensaios genótipo-guiados mostraram que a variante rs10754558 está associada a maiores níveis de IL-1 β em linfócitos B e IL-18 plasmática de pacientes HIV.

O estudo genético levou a uma aparente discrepância quanto ao papel benéfico da ativação do NLRP3 e o efeito prejudicial de maiores níveis de IL-1 β . Considerando a escassez de informações em relação ao papel e perfil de ativação desse receptor nos leucócitos presentes no sangue periférico (em especial nos linfócitos) no contexto da infecção crônica pelo HIV, assim como o efeito célula específico da ativação e contribuição para inflamação e a heterogeneidade clínica descrita previamente, a utilização do modelo celular *in vitro* permitiu preencher várias lacunas existentes na literatura.

Optamos por trabalhar com as subpopulações presentes nos PBMC, purificadas por seleção positiva ou negativa, no intuito de isolar o papel do NLRP3 inflamassoma nas distintas células. Além disso, levamos também em consideração que se acreditava que a maior expressão e ativação do complexo acontecesse na fração monocítica, e tentamos manter uma elevada pureza de isolamento das demais populações leucocitárias (Pureza > 95 %).

A caracterização do NLRP3 inflamassoma nas subpopulações de PBMC demonstrou uma expressão constitutiva da maioria dos genes avaliados tanto em monócitos, quanto em linfócitos T CD4+ e linfócitos B. Quando comparados pacientes e controles, pelo menos a nível transcricional, foi possível observar uma expressão aumentada de *IL1B* tanto em monócitos quanto em linfócitos T CD4+ de pacientes HIV, além de uma maior expressão do *NLRP3* e *P2X7* nos monócitos e *CASP1* nos linfócitos T CD4+ do grupo HIV.

Esta hiper-expressão constitutiva dos componentes do NLRP3 inflamassoma aparentemente leva a duas consequências:

- Aumento da ativação basal do complexo (diminuição do limiar de ativação) em todos os leucócitos analisados com consequente aumento de IL-1 β (mas não de IL-18);
- Desregulação da ativação do complexo em resposta a ativadores de modo célula-específico.

A aumentada ativação basal do NLRP3 inflamassoma em monócitos e linfócitos B, e do inflamassoma como um todo nos linfócitos T CD4+, corrobora dados da literatura que apontam para uma desregulação a nível transcricional

dos genes envolvidos na ativação do complexo NLRP3 inflamassoma (*NLRP3*, *ASC*, *CASP1*, *IL1B* e *IL18*) o qual foi associada a aumentada CVP (Feria et al., 2010) e menor resposta imunológica em termos de restauração da contagem de linfócitos T CD4+ (Bandera et al., 2018). Vale destacar que os nossos dados contribuem no sentido de demonstrar que essa desregulação a nível transcricional também é refletida por uma aumentada ativação do complexo de forma constitutiva, mesmo sob terapia antirretroviral.

Nos monócitos purificados, nossos dados também apontaram para a ativação constitutiva aumentada do inflamassoma nessas células, corroborando dados da literatura que demonstraram uma maior formação de *specks* de ASC nos monócitos de pacientes HIV na ausência de ART (Ahmad et al., 2018). A parte original do nosso trabalho, em relação aos monócitos, estaria relacionada a identificação da participação do NLRP3 nessa ativação constitutiva mesmo na presença do tratamento, o que poderia contribuir não somente para a inflamação crônica, mas também afetar o perfil de responsividade a estímulos, assim como observado anteriormente pelo nosso grupo em DC de pacientes HIV (Reis et al., 2019).

A ativação basal do inflamassoma está relacionada também a outros marcadores de ativação dos leucócitos, como CD38 e HLADR para linfócitos T (Paiardini, Müller, 2013), CD16 ou sCD163 para monócitos (Burdo et al., 2011), ou outras citocinas independentes da montagem do complexo (ex. TNF- α e IL-6) os quais são amplamente reportados como desregulados durante a infecção pelo HIV (Okay et al., 2020).

Essa ativação desregulada do inflamassoma poderia estar relacionada a uma maior indução da piroptose, entretanto, os nossos dados referentes a viabilidade celular investigada tanto pela marcação com o kit *LIVE/DEAD*, quanto pela dosagem da liberação de LDH no sobrenadante de cultura, não demonstrou uma indução significativa da morte celular, e sem diferenças entre os grupos de pacientes e controles em todas as subpopulações celulares investigadas.

Essa ativação basal do inflamassoma pode estar relacionada ao estado de inflamação crônica dos pacientes tanto como causa quanto como consequência. Em outras doenças inflamatórias crônicas foi reportado que a ativação constitutiva do NLRP3 inflamassoma decorrente de produtos metabólicos (doenças “estéreis”) gerados em condições como a síndrome

metabólica, gota ou aterosclerose, ou por PAMPs associados a outras infecções crônicas (ex. HCV), pode contribuir para a inflamação e afetar diretamente na patogênese dessas distintas doenças (Ozaki et al., 2015).

Nas doenças inflamatórias crônicas, a contrapartida de uma ativação constitutiva aumentada do NLRP3 inflamassoma, é a incapacidade de algumas células mieloides em responder adequadamente a estímulos de tipo PAMPs ou DAMPs (Guo et al. 2015). Durante a infecção por HIV, esse perfil de menor responsividade já foi previamente reportado em células dendríticas derivadas de monócitos de pacientes cronicamente infectados (Pontillo et al., 2012, Reis et al., 2019). De fato, a estimulação dos monócitos levou a uma menor responsividade a ativadores clássicos do NLRP3 (LPS e ATP), com uma menor liberação de IL-1 β , assim como já reportado por Nasi et al., (2019). Ademais, os nossos dados demonstraram pela primeira vez que esse defeito na ativação do inflamassoma é consequência de uma falha na ativação específica do NLRP3 nos monócitos de pacientes HIV, como confirmado pela utilização de inibidor específico do receptor (MCC-950).

Esse defeito do NLRP3 reportado pelo nosso grupo, tanto em monócitos quanto em DC (Reis et al., 2019) de pacientes HIV, ainda não foi totalmente elucidado.

Na condição de inflamação crônica característica dos pacientes HIV, em consequência à persistência viral, reativação de vírus endógenos (como herpes simplex), aumento da permeabilidade intestinal e translocação microbiana e citotoxicidade dos fármacos antirretrovirais (Deeks et al., 2013; Maartens et al., 2014), as células sofrem com estresse tanto metabólico quanto de ativação contínua das vias imunes, que podem ser responsáveis pela indução constitutiva do NLRP3 inflamassoma.

Além disso, observamos que os monócitos de pacientes HIV apresentam menores níveis do regulador pós-transcricional do NLRP3, o miR-223, e que os níveis de miR-223 resultam indiretamente correlacionados com os níveis de expressão constitutiva do NLRP3, assim como já reportado em doenças inflamatórias crônicas (Haneklaus et al., 2013). Diferentes níveis desse micro-RNA foram previamente encontrados em macrófagos e linfócitos T CD4+ de pacientes HIV comparados com indivíduos saudáveis (Wang, et al. 2009; Huang et al., 2007). Esse dado sugere que nos monócitos HIV a expressão de *NLRP3*

possa estar menos regulada por miR-223 que nas células de CS, contribuindo, possivelmente, para a ativação constitutiva do NLRP3-inflamassoma nos pacientes.

Vale ressaltar que todos os pacientes recrutados pelo estudo são submetidos à ART, sugerindo que a terapia não inibe o estado de ativação crônica do NLRP3 inflamassoma nesses indivíduos.

Uma maior expressão basal dos genes do inflamassoma em monócitos caracteriza outras doenças inflamatórias crônicas, como em doenças da coronária (Zhu et al., 2019), artrite reumatóide (Mathews et al., 2014; Addobbati et al., 2018) e osteomielite (Brandt et al., 2018).

No momento de escolha do tipo de estímulo para avaliar a capacidade de resposta das distintas células purificadas, optamos para os monócitos pelo modelo de estimulação com o LPS e ATP, amplamente utilizado na literatura para ativação do NLRP3 não somente nos monócitos (Gattorno et al., 2007), mas também em macrófagos (Souza de Lima et al., 2020) e células dendríticas (Reis et al., 2019). Além desse clássico ativador, optamos também por utilizar para os monócitos a beta glucana de origem fúngica (curdlan), devido ao fato de já ter sido previamente reportada com capacidade de induzir a ativação do NLRP3 em monócitos humanos (Kankkunen et al., 2010), nos permitindo avaliar a ativação deste receptor por uma via alternativa nesse modelo celular.

Em relação a menor responsividade à estimulação do NLRP3 inflamassoma observada nos monócitos, levantamos várias hipóteses não mutuamente exclusivas.

A primeira está relacionada com o conhecido papel de regulação negativa do IFN de tipo I na ativação do NLRP3 (Guarda et al., 2011). Os pacientes HIV apresentam níveis aumentados de IFN-I, mesmo em tratamento (Reis et al., 2019), sugerindo que essa citocina poderia atuar regulando negativamente a ativação do complexo, pelo menos nessa subpopulação celular. Um comportamento similar foi observado em DC de pacientes HIV (Reis et al., 2019) assim como em macrófagos de pacientes com tuberculose (Souza de Lima et al., 2020).

A prova de uma possível regulação negativa do IFN-I pode ser obtida através de um ensaio de tratamento de monócitos de doadores saudáveis com o IFN-I *in vitro*. Tal ensaio foi realizado previamente pelo nosso grupo em células

dendríticas derivadas de monócitos, sendo que o tratamento com IFN-I levou a uma redução significativa dos níveis de IL-1 β produzidas por essas células (Reis et al., 2019), enfatizando o papel inibitório do IFN do tipo I na ativação do NLRP3, e nos levando a cogitar como um dos mecanismos envolvidos no defeito de ativação do NLRP3 observados nos monócitos HIV.

A contínua estimulação com fatores pró-inflamatórios induz também a ativação de vias de regulação negativas, como as SOCS (Do inglês: *Suppressor of Cytokine Signaling*), que inibem as vias de ativação mediadas pelos PRRs (Baetz et al., 2004; Huang et al., 2020), a ubiquitinação de proteínas de sinalização dos PRRs e do próprio NLRP3 (Kattah et al., 2017; Lopez et al., 2020), e a produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β , cujos níveis são descritos aumentados em pacientes HIV (Dickinson et al., 2020).

O fenômeno conhecido como “tolerância ao LPS” foi descrito em distintas células mieloides (inclusive nos monócitos), se encaixando bem com a falta de responsividade que observamos nos monócitos de pacientes HIV. Aparentemente é um mecanismo epigenético de reprogramação conhecido como “*Innate Immune Training*” envolvendo a modulação de distintos micro-RNAs ou (lnc) RNAs capazes de regular negativamente distintas vias de sinalização, como a via de TLR. Além disso, citocinas e mediadores solúveis decorrentes da inflamação crônica, podem participar desse fenômeno ao regular esses ncRNAs (Vergadi et al., 2018).

Vale destacar que já foi reportado que na infecção pelo HIV uma expressão diferencial de enzimas envolvidas em mudanças epigenéticas, como um aumento da Histona Acetiltransferase-1 (HAT1, do inglês: *Histone Acetyltransferase 1*) sendo diretamente correlacionado com marcadores solúveis de ativação de monócitos/macrófagos (sCD163), e associada a uma baixa responsividade dessas células a patógenos como *Mycobacterium tuberculosis* (Espíndola et al., 2018).

Em relação aos linfócitos, os nossos dados demonstram pela primeira vez uma maior ativação constitutiva do inflamassoma tanto em linfócitos T CD4+ quanto em linfócitos B circulantes. Entretanto, diferentemente do observado no compartimento mieloide (monócitos, DC), os linfócitos apresentaram uma maior responsividade a ativadores do NLRP3.

Nas células B, considerando a expressão previamente descrita de TLR4 e demais proteínas envolvidas na via de sinalização nessa subpopulação celular (Schweighoffer et al., 2017), optamos também por utilizar o LPS, assim como a beta-glucana a qual foi anteriormente demonstrada possuir a capacidade de ativação do NLRP3 nos linfócitos B com sinalização via Dectina-1 e participação de distintas quinases (Syk/Btk) (Kumar et al., 2009; Ali et al., 2017). Adicionalmente, para essa subpopulação, utilizamos também a molécula de CpG, no intuito de investigar o perfil de responsividade quanto a produção de IgM (Ali et al., 2017).

Exclusivamente para os linfócitos T CD4+, considerando a ausência de uma expressão significativa de alguns PRRs envolvidos no reconhecimento de moléculas como LPS ou beta-glucana, optamos por avaliar o perfil de responsividade do NLRP3 frente a ativação com anticorpos monoclonais específicos para linfócitos T (α -CD3 α -CD28), considerando que essa ativação via TCR leva a modulação da expressão gênica e mudanças na biologia do linfócito que poderia ser refletido na ativação do NLRP3 (Arbore et al., 2016; Arbore et al., 2018).

Linfócitos T CD4+ de pacientes HIV demonstraram um aumento basal de ativação do inflamassoma, que levava a produção de IL-1 β , mas não de IL-18 (expressa a baixos níveis ou indetectável nessas células). Em resposta ao estímulo “geral” com α CD3 α CD28, observamos também um aumento significativo da liberação da IL-1 β . Além disso, observamos uma maior indução de TNF- α e IFN- γ frente a ativação, demonstrando um maior perfil geral de ativação inflamatória dessas células.

Os trabalhos de Arbore et al., (2016), demonstraram a ativação do NLRP3 inflamassoma em linfócitos T CD4+ de doadores saudáveis e um aumento de ativação e de produção de IL-1 β em linfócitos T CD4+ de pacientes com mutações ganho-de-função de NLRP3 e doença auto-inflamatória (CAPS). Os nossos dados demonstram que não apenas uma hiperativação geneticamente determinada do inflamassoma pode aumentar a liberação da IL-1 β em linfócitos T CD4+, mas também uma ativação crônica pelo “ambiente” pro-inflamatório como no caso dos pacientes HIV.

Diferentemente dos monócitos, nos linfócitos T CD4+ existe uma baixa expressão de alguns PRRs como o TLR4 (Komai et al., 2004; Crellin et al., 2005).

Além disso, poucos estudos demonstraram a ativação do complexo diretamente nessa subpopulação celular, sendo os mecanismos de ativação em muitos aspectos ainda desconhecido.

Ainda não está claro quais fatores poderiam levar a indução da expressão dos componentes do inflamassoma nessas células. No trabalho de Bruchard et al., (2015), foi possível observar uma correlação positiva entre a citocina IL-2 e expressão de NLRP3 em linfócitos T CD4+ murinos. Além disso, foi demonstrado que a IL-2 levava a indução de STAT5 o qual era capaz de se ligar na região promotora do NLRP3 induzindo a sua expressão. Embora não sabemos se esse mecanismo se aplicaria nas células T CD4+ humanas, é interessante mencionar que níveis séricos aumentados de IL-2 já foi reportada em pacientes HIV, mesmo em terapia antirretroviral (Orsilles et al., 2006; Ikomey et al., 2020), além de existir um papel do HIV na ativação direta do STAT5 (Cesana et al., 2017).

O grupo de Arbore et al., (2016) sugeriu também que a indução da expressão dos componentes do NLRP3 inflamassoma ocorresse pela sinalização via TCR. Entretanto, não foi debatido qual(is) fator(es) poderia estar envolvidos nessa sinalização.

Sabe-se que a ativação via TCR em geral induz diversos fatores de transcrição como o NFkB e proteínas da família NFAT (Do inglês: *Nuclear Factor of Activated T-Cells*), que poderiam induzir a expressão dos componentes do NLRP3 inflamassoma. Dentre as proteínas da família NFAT, por exemplo, a NFAT5 é um fator de transcrição importante no desenvolvimento e ativação dos linfócitos T, sendo previamente relacionada com a indução da geração de linfócitos Th17 e contribuição para doenças autoimunes e inflamatórias (ex. Artrite, diabetes mellitus e esclerose múltipla) (Lee et al., 2019; Aramburu, López-Rodríguez, 2019).

Além disso, em células endoteliais, a aumentada expressão de NFAT5 é capaz de levar a ativação do NLRP3 através da indução de ROS, podendo contribuir para o desenvolvimento de comorbidades como a aterosclerose (Ma et al., 2019). Durante a infecção pelo HIV, já foi reportado uma maior expressão desse fator, induzido tanto pelo próprio HIV (Cicala et al., 2006), quanto em pacientes cronicamente infectados (Cesana et al., 2017; Lisco et al., 2019).

A geração de ROS também foi apontada como o mecanismo de indução da formação do complexo nos linfócitos T CD4+ humanos pelo grupo de Arbore

et al., (2016). Nesse estudo foi proposto que a indução via TCR e receptor do complemento (CD46) levava a ativação intracelular da proteína C5 do complemento, o qual, ao se ligar intracelularmente ao receptor C5R1, seria capaz de induzir a geração de ROS, evento chave na indução da montagem do complexo pelo receptor NLRP3. A ativação desregulada do sistema complemento com aumentada geração de fragmentos de C3 sérica já foi demonstrada durante a infecção pelo HIV (Mishra et al., 2018), o que poderia influenciar no perfil de ativação do complexo nessas células.

Vale destacar que mesmo que nossos dados apontem para uma contribuição somente parcial do receptor NLRP3 na ativação do complexo nos linfócitos T CD4+ (como observado nos ensaios de imunofluorescência e inibição com o MCC950), não podemos descartar que as alterações nos fatores destacados acima possam afetar a aumentada ativação do inflamassoma como um todo observada nessas células de pacientes HIV.

A hiperativação do inflamassoma nas células T CD4+, não foi relacionada a uma maior taxa de morte celular (medida por liberação de LDH e pela viabilidade celular através da marcação com *LIVE/DEAD* e citometria). Este achado ressalta a diferença do resultado da ativação do inflamassoma em linfócitos T CD4+ do paciente HIV cronicamente infectado (com CVP baixa ou indetectável) comparado com a infecção dos linfócitos, que como demonstrado por Monroe et al., (2013) e Doitsh et al., (2014) resulta em ativação do IFI16 e caspase-1 e indução de piroptose.

Considerando a nossa hipótese inicial que o NLRP3 pudesse estar atuando de modo inflamassoma-independente nessas células de acordo com a função alternativa sugeridas por Bruchard et al., (2015), de cofator de transcrição de IRF4 e polarização Th2, tentamos investigar um possível papel do NLRP3 na polarização das células T CD4+ dos pacientes HIV. Contudo, não observamos nenhuma tendência dos linfócitos T CD4+ circulantes a um perfil Th2 (medido pela expressão gênica de *GATA3* e *IL4*, e pela produção de IL-4) nas amostras analisadas. Isso possivelmente está relacionado ao estado clínico dos pacientes incluídos no estudo (como comentado anteriormente, foram excluídos indivíduos com Aids ou doença grave). Desta forma foi descartado o papel do NLRP3 como cofator de polarização Th2 no nosso modelo de estudo *in vitro*.

Entretanto, vale destacar que uma aumentada expressão de *IRF4* já foi observada em PBMC de pacientes HIV classificados como Progressores rápidos (Zhang et al., 2016), e o fato de não termos encontrado um papel do NLRP3 na polarização Th2 nos linfócitos periféricos da nossa coorte, não exclui a possibilidade desse papel ocorrer em outras condições clínicas, como em pacientes HIV em quadros mais graves, não incluídos neste estudo.

Quanto aos linfócitos T CD8+, devido a baixa ou indetectável expressão de NLRP3 nessas células, optamos por não continuar as investigações nesse tipo de linfócito, que está atualmente sendo estudado no laboratório por outro aluno de pós-graduação no modelo de co-cultivo com outros leucócitos. Vale destacar que o grupo de Arbore et al., (2017) reportou, durante o desenvolvimento deste projeto, que a ativação do inflamassoma nos linfócitos T CD8+ humanos aparenta não estar vinculada ao NLRP3.

Em relação aos linfócitos B, esse trabalho foi o primeiro a demonstrar uma ativação constitutiva do NLRP3 inflamassoma nessa população leucocitária no contexto da infecção pelo HIV.

Foi possível observar uma modulação diferencial na expressão constitutiva dos genes do *NLRP3* inflamassoma nos pacientes analisados, estando em acordo com o observado por outros autores para outros genes envolvidos na resposta inflamatória como um todo (ex. *NOD2*, *MYD88*) (Cotugno, et al., 2017).

Observamos também uma maior ativação do complexo e produção basal de IL-1 β (mas não de IL-18). Porém, é interessante destacar que a contribuição da produção basal de IL-1 β pelos linfócitos B dos pacientes HIV (cerca de 2,5 pg/mL por milhão de células) é a menor quando comparada a dos monócitos (cerca de 32 pg/mL por milhão de células) e dos linfócitos T CD4+ (cerca de 15 pg/mL por milhão de células). Entretanto, vale mencionar que os linfócitos B apresentam a expressão de vários PRRs podendo, portanto, estar sendo ativados em condições basais pelos mesmos PAMPs e DAMPs sugeridos para os monócitos.

Mais recentemente foi publicado um trabalho que identificou o fator ativador de células B (BAFF, do inglês: *B Cell-Activating Factor*), membro da família do TNF, como capaz de induzir a expressão de *NLRP3* e *IL1B* (via NF κ B) e também a ativação do complexo por meio do efluxo de potássio e produção de

ROS (Lim et al., 2020). No contexto da infecção pelo HIV, já foi previamente identificado aumentados níveis séricos de BAFF (Sabourin-Poirier et al., 2016), o que poderia justificar, pelo menos em parte, os nossos resultados apresentados nessa população leucocitária.

Além disso, já foi previamente reportado que linfócitos B de pacientes HIV apresentam uma maior ativação da quinase Syk (Keller et al., 2017) e um aumento de expressão da quinase Btk (Guendel et al., 2015), ambas envolvidas na ativação do NLRP3 pela via alternativa (Ali et al., 2017).

Contrariamente aos monócitos, mas de modo semelhante aos linfócitos T CD4+, a estimulação dos linfócitos B de pacientes HIV levou a um aumento da resposta do linfócito, tanto em termos de ativação do inflamassoma, quanto na produção policlonal de IgM.

O aumento da expressão das duas quinases Syk e Btk durante a infecção pelo HIV poderia justificar, pelo menos em parte, a maior responsividade dos linfócitos B a β -glucana, assim como a aumentada resposta ao LPS, considerando que a Syk também está envolvida na sinalização via TLR4 nessas células (Schweighoffer et al., 2017).

Ali et al., (2017) demonstraram que as células B de memória ativadas são as principais responsáveis pela produção de IL-1 β frente à estimulação com β -glucana. Considerando que pacientes HIV apresentam um aumento da frequência de células B de memória ativadas (Moir, Fauci, 2009), isso explicaria em parte a maior produção de IL-1 β observada nas células dos pacientes em comparação aos controles. Contudo, não podemos demonstrar isso nos nossos experimentos, onde não conseguimos avaliar a frequência das células de memória dentro das células CD19+ isoladas dos pacientes.

Levando em conta que foi demonstrada uma participação do NLRP3 na produção de IgM (Ali et al., 2017), não nos surpreendeu encontrar uma maior secreção de IgM pelos linfócitos B de pacientes HIV. De fato, como demonstrado pela utilização de MCC-950, a aumentada liberação de imunoglobulinas é dependente do NLRP3, porém não podemos excluir outros mecanismos que podem estar relacionados a produção de anticorpos como a via que envolve a proteína mTOR, cuja expressão e ativação já foi demonstrada desregulada na infecção pelo HIV (Akbay et al., 2020).

Existem algumas (poucas) evidências de que o aumento de ativação do inflamassoma esteja relacionado com uma ativação policlonal inespecífica, ao invés de uma resposta humoral monoclonal eficiente e com geração de memória, como reportado em pacientes com síndrome autoinflamatória de Hiper-IgD (HIDS; OMIM: #260920), caracterizada por ativação constitutiva do inflamassoma e altos níveis séricos de IgD e IgA (Kastner et al., 2010). No mesmo sentido, pacientes com doença de Crohn (doença inflamatória intestinal) que apresentam uma acentuada ativação do NLRP3 inflamassoma associada a SNPs no gene *CARD8*, tendem a produzir menores níveis de IgG e IgA antiglicano, sugerindo que uma maior ativação constitutiva do NLRP3 pode ser diretamente correlacionada a uma menor resposta humoral específica (IgG, IgA) (Vasseur et al., 2013).

Pacientes HIV tendem a responder de maneira menos eficaz que indivíduos da população geral a infecções tanto por patógenos diversos, quanto por microrganismos oportunistas. Essa característica pode estar relacionada, pelo menos em parte, ao demonstrado neste trabalho: tanto a reduzida capacidade de resposta das células inatas, tais como monócitos, macrófagos e DC, quanto a uma resposta não específica dos linfócitos B.

Corroborando essa ideia, já foi previamente reportado (Lind et al., 2013) que pacientes que possuem uma maior produção de IL-1 β , apresentam uma menor capacidade de responder a vacinas terapêuticas contra o HIV. Nosso grupo também demonstrou que a variante rs16944 que leva a maiores níveis de IL-1 β , foi associada a maior carga viral plasmática em pacientes submetidos a vacina terapêutica com células dendríticas derivadas de monócitos (Reis et al., 2019) (**APÊNDICE I**).

Por outro lado, reportamos que variantes que aumentam a ativação do NLRP3 foram associadas a uma melhor resposta a imunização contra o HBV. Esse resultado poderia estar não somente relacionado a um efeito direto do polimorfismo na biologia da célula B, mas eventualmente a um efeito nas demais células apresentadoras de antígeno, ou nos linfócitos T CD4+, que em conjunto afetaria o perfil de resposta à imunização. De fato, essa mesma variante foi associada com uma maior capacidade fagocítica de células dendríticas derivadas de monócitos no estudo de vacina terapêutica citado anteriormente (Reis et al., 2019) (**APÊNDICE I**).

Uma limitação desse trabalho foi a inviabilidade em realizar um ensaio *in vitro* para medir uma resposta de produção de IgG antígeno específica, sendo que investigações mais aprofundadas serão necessárias para demonstrar o efeito da desregulação do inflamassoma nos linfócitos B.

Outra limitação a mencionar, seria que os resultados obtidos com o inibidor MCC-950 podem não ser totalmente conclusivos. Isso se deve ao fato de termos utilizado um protocolo de inibição modificado do original, proposto para macrófagos derivados de monócitos e PBMC (Coll et al., 2014). O protocolo original previa o tratamento de $0,2-0,5 \times 10^6$ células com 10 ng/mL de LPS por 3 horas (*priming*), remoção do meio de cultura e adição de MCC-950 por 30 minutos, seguido de tratamento com 5 mM de ATP. Nessas condições os autores conseguiam observar cerca de 75% de redução na produção de IL-1 β na concentração de 50 nM, e mais de 90% de redução na concentração de 10 μ M de inibidor. A essa concentração a liberação de LDH foi cerca de 60%, e não foi influenciada pelo MCC-950.

Porém, no presente trabalho realizamos ensaios de dose-resposta no intuito de confirmar a utilização de 10 μ M do inibidor por $0,4 \times 10^6$ células no nosso modelo (na ausência de *priming* com LPS). Também realizamos um pré-tratamento com o MCC, sendo possível observar uma redução significativa dos níveis de IL-1 β nessa concentração e sem uma indução significativa de morte celular. Concentrações acima de 10 μ M não resultaram em uma maior taxa de inibição (**APÊNDICE F, G**).

Em conjunto, os resultados apresentados nesta tese mostram pela primeira vez alterações tanto na ativação basal do inflamassoma em monócitos, linfócitos B CD19+ e T CD4+ circulantes dos pacientes HIV em tratamento antirretroviral, quanto na resposta do inflamassoma a estímulos.

Na elaboração da hipótese deste trabalho imaginamos a possibilidade de utilizar fármacos com alvos específicos do inflamassoma em pacientes HIV. Com os dados obtidos no presente estudo, pudemos contribuir para a compreensão das vias envolvidas na ativação do inflamassoma de forma célula específica e receptor específico, assim como do efeito dessa ativação nas distintas manifestações clínicas, auxiliando na elaboração de estratégias terapêuticas que foquem em pontos específicos da ativação do complexo. Dentre tais estratégias podemos elencar a possibilidade de utilização de inibidores da IL-1 β ,

já em uso clínico (Canakunimab, Anakinra), assim como da IL-18 (Tadekinig alfa). Quanto a possibilidade de intervenção específica sobre o NLRP3, os dados são contraditórios, podendo ser benéfico ou prejudicial a depender da célula considerada.

Por fim, apesar dos dados obtidos neste trabalho reforçarem o importante papel do NLRP3 na ativação do inflamassoma no contexto da patogênese do HIV, destacamos a seguir dois pontos sugeridos pelos resultados apresentados até aqui, mas que permaneceram em aberto.

O primeiro seria relacionado com a possibilidade da participação de outros receptores do inflamassoma na ativação do complexo nos pacientes HIV. A escassez de dados sobre os demais receptores em humanos no começo deste estudo, nos levou a focar no NLRP3, porém, nesses últimos anos, evidências surgiram sobre a ativação de NLRP1 e CARD8 em linfócitos (Johnson et al., 2020), além da possibilidade de outros receptores expressos em monócitos, tais como NAIP, NLRC4 e pirina, poderem estar envolvidos na ativação do inflamassoma em pacientes HIV.

Dados de associação genética realizados em paralelo a este trabalho, mostraram a associação significativa entre SNPs em NLRP1 e NLRC4 com a contagem periférica de linfócitos T CD4+ e o desenvolvimento de comorbidades na nossa coorte de pacientes HIV (dados não apresentados nesta tese e em fase de publicação), sugerindo de fato um possível papel de outros receptores na patogênese do HIV.

No começo de 2021, durante a finalização desta tese, foi publicado também um trabalho que mostra como o NLRP1 pode ser ativado por digestão proteolítica mediada por proteases virais (Tsu et al., 2021). Apesar dos vírus estudados não contemplarem o HIV, ficamos intrigados com a hipótese de uma ativação direta deste receptor pelo vírus ou por proteases celulares ativadas na resposta intrínseca antiviral.

Por outro lado, a ativação com α -CD3/ α -CD28 é capaz de induzir NF κ B, AP1 e NFAT (Thaker et al., 2015), os quais são fatores responsáveis pela transcrição de muitos dos genes avaliados, incluindo vários receptores do inflamassoma (ex. *NLRP1*, *NAIP*, *NLRC4*, *MEFV*, *AIM2*).

Além do IFI16 já estudado no contexto da infecção pelo HIV, o outro receptor de DNA, AIM2, desempenha uma função importante não apenas em

monócitos/macrófagos, mas em linfócitos B, como fator de transcrição indutor da quimiocina CXCL16 importante no recrutamento de linfócitos T CD8 e na resposta a infecções (El-Zaatari et al., 2020).

Vale destacar também, que os resultados que reportamos aqui mostram claramente como o complexo pode estar diferentemente desregulado em leucócitos distintos. Como consequência, muda a interpretação dos dados de associação genética, que antes se baseavam, na maioria dos casos, no papel desempenhado pelo inflamassoma nos monócitos/macrófagos. Nesse sentido, uma variante polimórfica do gene *NLRP3* ou *IL1B* pode ter efeito apenas em alguns subtipos de leucócitos, podendo em parte explicar resultados contrastantes que frequentemente são encontrados em estudos de associação com doenças multifatoriais (Fernandes et al., 2020).

Estudos do inflamassoma nos demais leucócitos (granulócitos, células NK), plaquetas, e em células não imunes, como epitélio, endotélio, células do sistema nervoso central poderão auxiliar muito neste sentido.

7. CONCLUSÃO

De forma geral, este trabalho contribuiu para uma melhor compreensão acerca do perfil de ativação do NLRP3 inflamassoma nas diferentes subpopulações leucocitárias presentes nos PBMC de pacientes cronicamente infectados pelo HIV, assim como da influência do *background* genético quanto ao perfil de ativação do complexo de modo célula específica e receptor específico e o efeito no quadro clínico do paciente crônico.

Em conclusão, os principais achados foram:

- Variantes genéticas do inflamassoma previamente associadas à susceptibilidade à infecção por HIV também afetam o prognóstico dos pacientes cronicamente infectados;
- A variante que leva a uma maior expressão e produção de IL-1 β (rs16944; c. -511 C>T), anteriormente associada a proteção contra a infecção, resultou em fator de risco para pacientes HIV, afetando negativamente tanto o nível periférico de linfócitos T CD4+, quanto o desenvolvimento de comorbidades não-Aids associadas a infecção crônica pelo HIV;
- Apesar dos leucócitos de pacientes HIV apresentarem aumento basal de IL-1 β , este não foi associado a presença do SNP rs16944, sugerindo um efeito do ambiente pró-inflamatório do paciente;
- Enquanto que o SNP rs16944 associa com a produção de IL-1 β em leucócitos de doadores saudáveis estimulados, nos pacientes ele associou com a liberação de IL-1 β apenas em linfócitos B tratados com β -glucana (mas não com LPS), sugerindo que nos pacientes HIV o efeito do SNPs é célula-específico e estímulo-específico, de forma mais acentuada que em doadores saudáveis;
- Apesar de todos os leucócitos analisados apresentarem uma ativação constitutiva do inflamassoma, a capacidade de responder a estímulos resultou variada, sugerindo que o ambiente inflamatório afeta diferentemente o compartimento mieloide e linfoide;
- Como esperado, os monócitos ativaram menos o inflamassoma com menor liberação de IL-1 β quando estimulados, enfatizando mais uma vez a menor capacidade de resposta imunológica dos pacientes HIV;

- Pela primeira vez, demonstramos que linfócitos B e T CD4+ de pacientes HIV ativam mais o inflamassoma com liberação de IL-1 β em resposta a estímulos, podendo por um lado contribuir para a inflamação crônica característica dos pacientes, e por outro lado afetar a biologia dos linfócitos de modo não totalmente elucidado;
- O receptor NLRP3 contribui pela desregulação do inflamassoma observada nos leucócitos, sendo que ele resulta “defeituoso” nos monócitos, e hiperativado nos linfócitos (em especial nas células B);
- A variante rs10754558 que aumenta a estabilidade do NLRP3 e a liberação de IL-1 β /IL-18 em doadores saudáveis, resultou associada a um maior nível de linfócitos T CD4+ e a uma melhor resposta a imunização nos pacientes HIV, sugerindo um papel distinto do NLRP3 da IL-1 β (pelo menos em relação a estes parâmetros), podendo estar relacionado ao papel da IL-18 em auxiliar para uma resposta Th1 e IgG.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F. Interleukins 1 β and 6 but not transforming growth factor- β are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nature immunology*. 2007;8(9):942-9.

Addobbati C, da Cruz HLA, Adelino JE, Melo Tavares Ramos AL, Fragoso TS, Domingues A, et al. Polymorphisms and expression of inflammasome genes are associated with the development and severity of rheumatoid arthritis in Brazilian patients. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]*. 2018;67(3):255-64.

Ahmad F, Mishra N, Ahrenstorf G, Franklin BS, Latz E, Schmidt RE, et al. Evidence of inflammasome activation and formation of monocyte-derived ASC specks in HIV-1 positive patients. *AIDS*. 2018;32(3):299-307.

Akaike H. A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control*. 1974;19(6):716-23.

Akbay B, Shmakova A, Vassetzky Y, Dokudovskaya S. Modulation of mTORC1 Signaling Pathway by HIV-1. *Cells*. 2020;9(5):1090.

Alehashemi S, Goldbach-Mansky R. Human Autoinflammatory Diseases Mediated by NLRP3-, Pyrin-, NLRP1-, and NLRP4-Inflammasome Dysregulation Updates on Diagnosis, Treatment, and the Respective Roles of IL-1 and IL-18. *Frontiers in immunology*. 2020;11:1840.

Ali MF, Dasari H, Van Keulen VP, Carmona EM. Canonical Stimulation of the NLRP3 Inflammasome by Fungal Antigens Links Innate and Adaptive B-Lymphocyte Responses by Modulating IL-1 β and IgM Production. *Frontiers in immunology*. 2017;8:1504-.

Allam O, Samarani S, Marzouk R, Ahmad A. Human platelets produce and constitute the main source of IL-18 in the circulation (44.25). 2012;188(1 Supplement):44.25-44.25.

Alter G, Altfeld M. NK cells in HIV-1 infection: evidence for their role in the control of HIV-1 infection. *J Intern Med*. 2009;265(1):29-42.

Altfeld M, Gale M, Jr. Innate immunity against HIV-1 infection. *Nature immunology*. 2015;16(6):554-62.

An P, Penugonda S, Thorball CW, Bartha I, Goedert JJ, Donfield S, et al. Role of APOBEC3F Gene Variation in HIV-1 Disease Progression and Pneumocystis Pneumonia. *PLoS Genet*. 2016;12(3):e1005921-e.

An P, Winkler CA. Host genes associated with HIV/AIDS: advances in gene discovery. *Trends in genetics : TIG*. 2010;26(3):119-31.

Andrade-Santos JL, Carvalho-Silva WHV, Coelho AVC, Souto FO, Crovella S, Brandão LAC, et al. IL18 gene polymorphism and its influence on CD4+ T-cell recovery in HIV-positive patients receiving antiretroviral therapy. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2019;75:103997.

Appay V, Kelleher AD. Immune activation and immune aging in HIV infection. *Current opinion in HIV and AIDS*. 2016;11(2):242-9.

- Aramburu J, López-Rodríguez C. Regulation of Inflammatory Functions of Macrophages and T Lymphocytes by NFAT5. *Frontiers in immunology*. 2019;10:535-.
- Arbore G, West EE, Rahman J, Le Friec G, Niyonzima N, Pirooznia M, et al. Complement receptor CD46 co-stimulates optimal human CD8(+) T cell effector function via fatty acid metabolism. *Nature communications*. 2018;9(1):4186-.
- Arbore G, West EE, Spolski R, Robertson AAB, Klos A, Rheinheimer C, et al. T helper 1 immunity requires complement-driven NLRP3 inflammasome activity in CD4(+) T cells. *Science (New York, NY)*. 2016;352(6292):aad1210.
- Baetz A, Frey M, Heeg K, Dalpke AH. Suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins indirectly regulate toll-like receptor signaling in innate immune cells. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(52):54708-15.
- Bandera A, Masetti M, Fabbiani M, Biasin M, Muscatello A, Squillace N, et al. The NLRP3 Inflammasome Is Upregulated in HIV-Infected Antiretroviral Therapy-Treated Individuals with Defective Immune Recovery. *Frontiers in immunology*. 2018;9:214-.
- Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2005;21(2):263-5.
- Bauernfeind F, Rieger A, Schildberg FA, Knolle PA, Schmid-Burgk JL, Hornung V. NLRP3 inflammasome activity is negatively controlled by miR-223. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2012;189(8):4175-81.
- Becker Y. The changes in the T helper 1 (Th1) and T helper 2 (Th2) cytokine balance during HIV-1 infection are indicative of an allergic response to viral proteins that may be reversed by Th2 cytokine inhibitors and immune response modifiers--a review and hypothesis. *Virus genes*. 2004;28(1):5-18.
- Berg RK, Melchjorsen J, Rintahaka J, Diget E, Sørby S, Horan KA, et al. Genomic HIV RNA induces innate immune responses through RIG-I-dependent sensing of secondary-structured RNA. *PloS one*. 2012;7(1):e29291.
- Bergantz L, Subra F, Deprez E, Delelis O, Richetta C. Interplay between Intrinsic and Innate Immunity during HIV Infection. *Cells*. 2019;8(8):922.
- Booiman T, Kootstra NA. Polymorphism in IFI16 affects CD4(+) T-cell counts in HIV-1 infection. *International journal of immunogenetics*. 2014;41(6):518-20.
- Brandt D, Sohr E, Pablik J, Schnabel A, Kapplusch F, Mäbert K, et al. CD14(+) monocytes contribute to inflammation in chronic nonbacterial osteomyelitis (CNO) through increased NLRP3 inflammasome expression. *Clinical immunology (Orlando, Fla)*. 2018;196:77-84.
- Bray S, Gedeon J, Hadi A, Kotb A, Rahman T, Sarwar E, et al. Predictive value of CD4 cell count nadir on long-term mortality in HIV-positive patients in Uganda. *HIV/AIDS (Auckland, NZ)*. 2012;4:135-40.
- Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nature medicine*. 2006;12(12):1365-71.
- Bruchard M, Rebe C, Derangere V, Togbe D, Ryffel B, Boidot R, et al. The receptor NLRP3 is a transcriptional regulator of TH2 differentiation. 2015;16(8):859-70.

- Burdette D, Haskett A, Presser L, McRae S, Iqbal J, Waris G. Hepatitis C virus activates interleukin-1 β via caspase-1-inflammasome complex. *The Journal of general virology*. 2012;93(Pt 2):235-46.
- Burdo TH, Lo J, Abbara S, Wei J, DeLelys ME, Preffer F, et al. Soluble CD163, a novel marker of activated macrophages, is elevated and associated with noncalcified coronary plaque in HIV-infected patients. *The Journal of infectious diseases*. 2011;204(8):1227-36.
- Campbell GR, To RK, Hanna J, Spector SA. SARS-CoV-2, SARS-CoV-1, and HIV-1 derived ssRNA sequences activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages through a non-classical pathway. *iScience*. 2021:102295.
- Cesana D, Santoni de Sio FR, Rudilosso L, Gallina P, Calabria A, Beretta S, et al. HIV-1-mediated insertional activation of STAT5B and BACH2 trigger viral reservoir in T regulatory cells. *Nature Communications*. 2017;8(1):498.
- Cesana D, Santoni de Sio FR, Rudilosso L, Gallina P, Calabria A, Beretta S, et al. HIV-1-mediated insertional activation of STAT5B and BACH2 trigger viral reservoir in T regulatory cells. *Nat Commun*. 2017;8(1):498.
- Chauhan D, Vande Walle L, Lamkanfi M. Therapeutic modulation of inflammasome pathways. *Immunol Rev*. 2020;297(1):123-38.
- Chen LF, Hoy J, Lewin SR. Ten years of highly active antiretroviral therapy for HIV infection. *The Medical journal of Australia*. 2007;186(3):146-51.
- Chomont N, El-Far M, Ancuta P, Trautmann L, Procopio FA, Yassine-Diab B, et al. HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nature medicine*. 2009;15(8):893-900.
- Christgen S, Kanneganti T-D. Inflammasomes and the fine line between defense and disease. *Curr Opin Immunol*. 2020;62:39-44.
- Cicala C, Arthos J, Censoplano N, Cruz C, Chung E, Martinelli E, et al. HIV-1 gp120 induces NFAT nuclear translocation in resting CD4+ T-cells. *Virology*. 2006;345(1):105-14.
- Clerici M, Shearer GM. A TH1-->TH2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. *Immunology today*. 1993;14(3):107-11.
- Coll RC, Robertson AA, Chae JJ, Higgins SC, Munoz-Planillo R, Inserra MC, et al. A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. 2015;21(3):248-55.
- Cotugno N, De Armas L, Pallikkuth S, Rinaldi S, Issac B, Cagigi A, et al. Perturbation of B Cell Gene Expression Persists in HIV-Infected Children Despite Effective Antiretroviral Therapy and Predicts H1N1 Response. *Frontiers in immunology*. 2017;8:1083-.
- Crellin NK, Garcia RV, Hadisfar O, Allan SE, Steiner TS, Levings MK. Human CD4+ T cells express TLR5 and its ligand flagellin enhances the suppressive capacity and expression of FOXP3 in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2005;175(12):8051-9.
- de Moraes Rodrigues J, Souza de Lima D, Leal VNC, Bosco AA, Sandrim V, Pontillo A. Gain-of-function SNPs in NLRP3 and IL1B genes confer protection against obesity and

T2D: undiscovered role of inflammasome genetics in metabolic homeostasis? *Endocrine*. 2018;60(2):368-71.

Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Smith MW, Allikmets R, et al. Genetic Restriction of HIV-1 Infection and Progression to AIDS by a Deletion Allele of the *CKR5* Structural Gene. 1996;273(5283):1856-62.

Deeks SG, Lewin SR, Havlir DV. The end of AIDS: HIV infection as a chronic disease. *Lancet*. 2013;382(9903):1525-33.

Deeks SG, Overbaugh J, Phillips A, Buchbinder S. HIV infection. *Nat Rev Dis Primers*. 2015;1:15035.

Deeks SG, Tracy R, Douek DC. Systemic effects of inflammation on health during chronic HIV infection. *Immunity*. 2013;39(4):633-45.

Di Paolo JA, Huang T, Balazs M, Barbosa J, Barck KH, Bravo BJ, et al. Specific Btk inhibition suppresses B cell- and myeloid cell-mediated arthritis. *Nature chemical biology*. 2011;7(1):41-50.

Dickinson M, Kliszczak AE, Giannoulatou E, Peppas D, Pellegrino P, Williams I, et al. Dynamics of Transforming Growth Factor (TGF)- β Superfamily Cytokine Induction During HIV-1 Infection Are Distinct From Other Innate Cytokines. *Frontiers in immunology*. 2020;11:596841.

Do TN, Ucisik-Akkaya E, Davis CF, Morrison BA, Dorak MT. An intronic polymorphism of IRF4 gene influences gene transcription in vitro and shows a risk association with childhood acute lymphoblastic leukemia in males. *Biochimica et biophysica acta*. 2010;1802(2):292-300.

Doitsh G, Galloway NL, Geng X, Yang Z, Monroe KM, Zepeda O, et al. Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. *Nature*. 2014;505(7484):509-14.

Domínguez-Pérez RA, Loyola-Rodríguez JP, Abud-Mendoza C, Alpuche-Solis AG, Ayala-Herrera JL, Martínez-Martínez RE. Association of cytokines polymorphisms with chronic periodontitis and rheumatoid arthritis in a Mexican population. *Acta odontologica Scandinavica*. 2017;75(4):243-8.

Dos Reis EC, Leal VNC, Soares JLdS, Fernandes FP, Souza de Lima D, de Alencar BC, et al. Flagellin/NLRC4 Pathway Rescues NLRP3-Inflammasome Defect in Dendritic Cells From HIV-Infected Patients: Perspective for New Adjuvant in Immunocompromised Individuals. *Frontiers in immunology*. 2019;10:1291-.

Dostert C, Pétrilli V, Van Bruggen R, Steele C, Mossman BT, Tschopp J. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science (New York, NY)*. 2008;320(5876):674-7.

Duewell P, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Vladimer G, Bauernfeind FG, et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature*. 2010;464(7293):1357-61.

Dufour C, Gantner P, Fromentin R, Chomont N. The multifaceted nature of HIV latency. *The Journal of clinical investigation*. 2020;130(7):3381-90.

El-Sharkawy LY, Brough D, Freeman S. Inhibiting the NLRP3 Inflammasome. *Molecules*. 2020;25(23):5533.

- El-Zaatari M, Bishu S, Zhang M, Grasberger H, Hou G, Haley H, et al. Aim2-mediated/IFN- β -independent regulation of gastric metaplastic lesions via CD8+ T cells. *JCI insight*. 2020;5(5).
- Espíndola MS, Soares LS, Galvão-Lima LJ, Zambuzi FA, Cacemiro MC, Brauer VS, et al. HIV infection: focus on the innate immune cells. *Immunologic research*. 2016;64(5-6):1118-32.
- Espíndola MS, Soares LS, Galvão-Lima LJ, Zambuzi FA, Cacemiro MC, Brauer VS, et al. Epigenetic alterations are associated with monocyte immune dysfunctions in HIV-1 infection. *Scientific Reports*. 2018;8(1):5505.
- Fenwick C, Joo V, Jacquier P, Noto A, Banga R, Perreau M, et al. T-cell exhaustion in HIV infection. *Immunol Rev*. 2019;292(1):149-63.
- Feria MG, Taborda NA, Hernandez JC, Rugeles MT. HIV replication is associated to inflammasomes activation, IL-1 β , IL-18 and caspase-1 expression in GALT and peripheral blood. *PloS one*. 2018;13(4):e0192845.
- Fernandes FP, Leal VNC, Souza de Lima D, Reis EC, Pontillo A. Inflammasome genetics and complex diseases: a comprehensive review. *European journal of human genetics : EJHG*. 2020;28(10):1307-21.
- Fernandes-Alnemri T, Yu JW, Datta P, Wu J, Alnemri ES. AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature*. 2009;458(7237):509-13.
- Finzi D, Hermankova M, Pierson T, Carruth LM, Buck C, Chaisson RE, et al. Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science (New York, NY)*. 1997;278(5341):1295-300.
- Franchi L, Amer A, Body-Malapel M, Kanneganti TD, Ozören N, Jagirdar R, et al. Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in salmonella-infected macrophages. *Nature immunology*. 2006;7(6):576-82.
- Frayling TM, Rafiq S, Murray A, Hurst AJ, Weedon MN, Henley W, et al. An interleukin-18 polymorphism is associated with reduced serum concentrations and better physical functioning in older people. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences*. 2007;62(1):73-8.
- Fu LY, Qiu X, Deng QL, Huang P, Pi L, Xu Y, et al. The IL-1B Gene Polymorphisms rs16944 and rs1143627 Contribute to an Increased Risk of Coronary Artery Lesions in Southern Chinese Children with Kawasaki Disease. *Journal of immunology research*. 2019;2019:4730507.
- Gaidt MM, Ebert TS, Chauhan D, Schmidt T, Schmid-Burgk JL, Rapino F, et al. Human Monocytes Engage an Alternative Inflammasome Pathway. *Immunity*. 2016;44(4):833-46.
- Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity*. 2013;39(6):1003-18.
- Gattorno M, Tassi S, Carta S, Delfino L, Ferlito F, Pelagatti MA, et al. Pattern of interleukin-1beta secretion in response to lipopolysaccharide and ATP before and after interleukin-1 blockade in patients with CIAS1 mutations. *Arthritis and rheumatism*. 2007;56(9):3138-48.

Geijtenbeek TB, Kwon DS, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Middel J, et al. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell*. 2000;100(5):587-97.

Gourraud PA, Karaoui A, Woo JM, Schmidt T, Oksenberg JR, Hecht FM, et al. APOBEC3H haplotypes and HIV-1 pro-viral vif DNA sequence diversity in early untreated human immunodeficiency virus-1 infection. *Hum Immunol*. 2011;72(3):207-12.

Gritsenko A, Yu S, Martin-Sanchez F, Diaz-del-Olmo I, Nichols E-M, Davis DM, et al. Priming Is Dispensable for NLRP3 Inflammasome Activation in Human Monocytes In Vitro. 2020;11(2573).

Gu BJ, Zhang W, Worthington RA, Sluyter R, Dao-Ung P, Petrou S, et al. A Glu-496 to Ala polymorphism leads to loss of function of the human P2X7 receptor. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(14):11135-42.

Guadalupe M, Reay E, Sankaran S, Prindiville T, Flamm J, McNeil A, et al. Severe CD4+ T-cell depletion in gut lymphoid tissue during primary human immunodeficiency virus type 1 infection and substantial delay in restoration following highly active antiretroviral therapy. *J Virol*. 2003;77(21):11708-17.

Guarda G, Braun M, Staehli F, Tardivel A, Mattmann C, Forster I, et al. Type I interferon inhibits interleukin-1 production and inflammasome activation. *Immunity*. 2011;34(2):213-23.

Guarda G, Dostert C, Staehli F, Cabalzar K, Castillo R, Tardivel A, et al. T cells dampen innate immune responses through inhibition of NLRP1 and NLRP3 inflammasomes. *Nature*. 2009;460(7252):269-73.

Guendel I, Iordanskiy S, Sampey GC, Van Duyne R, Calvert V, Petricoin E, et al. Role of Bruton's tyrosine kinase inhibitors in HIV-1-infected cells. *Journal of neurovirology*. 2015;21(3):257-75.

Guo H, Gao J, Taxman DJ, Ting JPY, Su L. HIV-1 infection induces interleukin-1 β production via TLR8 protein-dependent and NLRP3 inflammasome mechanisms in human monocytes. *The Journal of biological chemistry*. 2014;289(31):21716-26.

Gurdasani D, Iles L, Dillon DG, Young EH, Olson AD, Naranbhai V, et al. A systematic review of definitions of extreme phenotypes of HIV control and progression. *AIDS*. 2014;28(2):149-62.

Gurung P, Anand PK, Malireddi RK, Vande Walle L, Van Opdenbosch N, Dillon CP, et al. FADD and caspase-8 mediate priming and activation of the canonical and noncanonical Nlrp3 inflammasomes. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2014;192(4):1835-46.

Hall SK, Perregaux DG, Gabel CA, Woodworth T, Durham LK, Huizinga TW, et al. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein. *Arthritis and rheumatism*. 2004;50(6):1976-83.

Halle A, Hornung V, Petzold GC, Stewart CR, Monks BG, Reinheckel T, et al. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nature immunology*. 2008;9(8):857-65.

Haneklaus M, Gerlic M, O'Neill LA, Masters SL. miR-223: infection, inflammation and cancer. *J Intern Med.* 2013;274(3):215-26.

Harrison P, Pointon JJ, Chapman K, Roddam A, Wordsworth BP. Interleukin-1 promoter region polymorphism role in rheumatoid arthritis: a meta-analysis of IL-1B-511A/G variant reveals association with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford, England).* 2008;47(12):1768-70.

Haurum JS, Thiel S, Jones IM, Fischer PB, Laursen SB, Jensenius JC. Complement activation upon binding of mannan-binding protein to HIV envelope glycoproteins. *AIDS.* 1993;7(10):1307-13.

Hausmann A, Böck D, Geiser P, Berthold DL, Fattinger SA, Furter M, et al. Intestinal epithelial NAIP/NLRC4 restricts systemic dissemination of the adapted pathogen *Salmonella Typhimurium* due to site-specific bacterial PAMP expression. *Mucosal Immunology.* 2020;13(3):530-44.

Hayward JA, Mathur A, Ngo C, Man SM. Cytosolic Recognition of Microbes and Pathogens: Inflammasomes in Action. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR.* 2018;82(4).

Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science (New York, NY).* 2004;303(5663):1526-9.

Hirota SA, Ng J, Lueng A, Khajah M, Parhar K, Li Y, et al. NLRP3 inflammasome plays a key role in the regulation of intestinal homeostasis. *Inflammatory bowel diseases.* 2011;17(6):1359-72.

Hitomi Y, Ebisawa M, Tomikawa M, Imai T, Komata T, Hirota T, et al. Associations of functional NLRP3 polymorphisms with susceptibility to food-induced anaphylaxis and aspirin-induced asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology.* 2009;124(4):779-85.e6.

Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, et al. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nature immunology.* 2008;9(8):847-56.

Hsu DC, Sereti I. Serious Non-AIDS Events: Therapeutic Targets of Immune Activation and Chronic Inflammation in HIV Infection. *Drugs.* 2016;76(5):533-49.

Huang J, Wang F, Argyris E, Chen K, Liang Z, Tian H, et al. Cellular microRNAs contribute to HIV-1 latency in resting primary CD4+ T lymphocytes. *Nature medicine.* 2007;13(10):1241-7.

Huang S, Liu K, Cheng A, Wang M, Cui M, Huang J, et al. SOCS Proteins Participate in the Regulation of Innate Immune Response Caused by Viruses. *Frontiers in immunology.* 2020;11:558341-.

Ikomey GM, Mbakam CH, Assoumou MCO, Brandon JG, Mesembe M, Mbamyah EL, et al. Cytokine levels of interleukin-2 and 7 amongst antiretroviral therapy success and failure HIV patients attending the University Teaching Hospital, Yaoundé, Cameroon. *International journal of biological and chemical sciences.* 2020;14(1):11-9.

Ito S, Hara Y, Kubota T. CARD8 is a negative regulator for NLRP3 inflammasome, but mutant NLRP3 in cryopyrin-associated periodic syndromes escapes the restriction. *Arthritis research & therapy*. 2014;16(1):R52-R.

Izquierdo-Useros N, Naranjo-Gómez M, Erkizia I, Puertas MC, Borràs FE, Blanco J, et al. HIV and mature dendritic cells: Trojan exosomes riding the Trojan horse? *PLoS Pathog*. 2010;6(3):e1000740-e.

Jakobsen MR, Bak RO, Andersen A, Berg RK, Jensen SB, Jin T, et al. IFI16 senses DNA forms of the lentiviral replication cycle and controls HIV-1 replication. 2013;110(48):E4571-E80.

Johnson DC, Okondo MC, Orth EL, Rao SD, Huang H-C, Ball DP, et al. DPP8/9 inhibitors activate the CARD8 inflammasome in resting lymphocytes. *Cell death & disease*. 2020;11(8):628.

Juliana C, Fernandes-Alnemri T, Wu J, Datta P, Solorzano L, Yu JW, et al. Anti-inflammatory compounds parthenolide and Bay 11-7082 are direct inhibitors of the inflammasome. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(13):9792-802.

Kadariya Y, Menges CW, Talarchek J, Cai KQ, Klein-Szanto AJ, Pietrofesa RA, et al. Inflammation-Related IL1 β /IL1R Signaling Promotes the Development of Asbestos-Induced Malignant Mesothelioma. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa)*. 2016;9(5):406-14.

Kankkunen P, Teirila L, Rintahaka J, Alenius H, Wolff H, Matikainen S. (1,3)-beta-glucans activate both dectin-1 and NLRP3 inflammasome in human macrophages. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2010;184(11):6335-42.

Kankkunen P, Teirilä L, Rintahaka J, Alenius H, Wolff H, Matikainen S. (1,3)-beta-glucans activate both dectin-1 and NLRP3 inflammasome in human macrophages. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2010;184(11):6335-42.

Karki R, Man SM, Kanneganti TD. Inflammasomes and Cancer. *Cancer immunology research*. 2017;5(2):94-9.

Kaslow RA, Carrington M, Apple R, Park L, Muñoz A, Saah AJ, et al. Influence of combinations of human major histocompatibility complex genes on the course of HIV-1 infection. *Nature medicine*. 1996;2(4):405-11.

Kastner DL, Aksentijevich I, Goldbach-Mansky R. Autoinflammatory disease reloaded: a clinical perspective. *Cell*. 2010;140(6):784-90.

Kattah MG, Malynn BA, Ma A. Ubiquitin-Modifying Enzymes and Regulation of the Inflammasome. *Journal of molecular biology*. 2017;429(22):3471-85.

Keating SM, Golub ET, Nowicki M, Young M, Anastos K, Crystal H, et al. The effect of HIV infection and HAART on inflammatory biomarkers in a population-based cohort of women. *AIDS*. 2011;25(15):1823-32.

Kelesidis T, Kendall MA, Yang OO, Hodis HN, Currier JS. Biomarkers of microbial translocation and macrophage activation: association with progression of subclinical atherosclerosis in HIV-1 infection. *The Journal of infectious diseases*. 2012;206(10):1558-67.

- Keller B, Stumpf I, Strohmeier V, Usadel S, Verhoeyen E, Eibel H, et al. High SYK Expression Drives Constitutive Activation of CD21^{low} B Cells. 2017;198(11):4285-92.
- Keshavarz M, Namdari H, Farahmand M, Mehrbod P, Mokhtari-Azad T, Rezaei F. Association of polymorphisms in inflammatory cytokines encoding genes with severe cases of influenza A/H1N1 and B in an Iranian population. *Virology journal*. 2019;16(1):79.
- Kim JK, Jin HS, Suh HW, Jo EK. Negative regulators and their mechanisms in NLRP3 inflammasome activation and signaling. *Immunology and cell biology*. 2017;95(7):584-92.
- Klück V, Jansen T, Janssen M, Comarniceanu A, Efdé M, Tengesdal IW, et al. Dapansutrile, an oral selective NLRP3 inflammasome inhibitor, for treatment of gout flares: an open-label, dose-adaptive, proof-of-concept, phase 2a trial. *The Lancet Rheumatology*. 2020;2(5):e270-e80.
- Komai-Koma M, Jones L, Ogg GS, Xu D, Liew FY. TLR2 is expressed on activated T cells as a costimulatory receptor. 2004;101(9):3029-34.
- Kömürlü S, Bradley M, Smolin N, Imam S, Pauszek RF, 3rd, Robia SL, et al. Defects in assembly explain reduced antiviral activity of the G249D polymorphism in human TRIM5 α . *PloS one*. 2019;14(3):e0212888-e.
- Kumar H, Kumagai Y, Tsuchida T, Koenig PA, Satoh T, Guo Z, et al. Involvement of the NLRP3 inflammasome in innate and humoral adaptive immune responses to fungal beta-glucan. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2009;183(12):8061-7.
- Kummer JA, Broekhuizen R, Everett H, Agostini L, Kuijk L, Martinon F, et al. Inflammasome components NALP 1 and 3 show distinct but separate expression profiles in human tissues suggesting a site-specific role in the inflammatory response. *J Histochem Cytochem*. 2007;55(5):443-52.
- Kuri-Cervantes L, de Oca GS, Avila-Ríos S, Hernández-Juan R, Reyes-Terán G. Activation of NK cells is associated with HIV-1 disease progression. *Journal of leukocyte biology*. 2014;96(1):7-16.
- Lara AN, Sartori AM, Fonseca MO, Lopes MH. Long-term protection after hepatitis B vaccination in people living with HIV. *Vaccine*. 2017;35(33):4155-61.
- Latz E, Xiao TS, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nature reviews Immunology*. 2013;13(6):397-411.
- Leal VNC, Reis EC, Pontillo A. Inflammasome in HIV infection: Lights and shadows. *Molecular immunology*. 2020;118:9-18.
- Lee HM, Yuk JM, Kim KH, Jang J, Kang G, Park JB, et al. Mycobacterium abscessus activates the NLRP3 inflammasome via Dectin-1-Syk and p62/SQSTM1. *Immunology and cell biology*. 2012;90(6):601-10.
- Lee N, Kim D, Kim W-U. Role of NFAT5 in the Immune System and Pathogenesis of Autoimmune Diseases. *Frontiers in immunology*. 2019;10:270-.
- Levesque MC, Moody MA, Hwang KK, Marshall DJ, Whitesides JF, Amos JD, et al. Polyclonal B cell differentiation and loss of gastrointestinal tract germinal centers in the earliest stages of HIV-1 infection. *PLoS medicine*. 2009;6(7):e1000107.

- Li HB, Jin C, Chen Y, Flavell RA. Inflammasome activation and metabolic disease progression. *Cytokine & growth factor reviews*. 2014;25(6):699-706.
- Lind A, Brekke K, Sommerfelt M, Holmberg JO, Aass HC, Baksaas I, et al. Boosters of a therapeutic HIV-1 vaccine induce divergent T cell responses related to regulatory mechanisms. *Vaccine*. 2013;31(41):4611-8.
- Lisco A, Wong CS, Lage SL, Levy I, Brophy J, Lennox J, et al. Identification of rare HIV-1-infected patients with extreme CD4+ T cell decline despite ART-mediated viral suppression. *JCI insight*. 2019;4(8).
- Liu D, Zeng X, Li X, Mehta JL, Wang X. Role of NLRP3 inflammasome in the pathogenesis of cardiovascular diseases. *Basic research in cardiology*. 2018;113(1):5.
- Liu L, Fang C, Fu W, Jiang B, Li G, Qin L, et al. Endothelial Cell-Derived Interleukin-18 Released During Ischemia Reperfusion Injury Selectively Expands T Peripheral Helper Cells to Promote Alloantibody Production. *Circulation*. 2020;141(6):464-78.
- Liu X, Pichulik T, Wolz OO, Dang TM, Stutz A, Dillen C, et al. Human NACHT, LRR, and PYD domain-containing protein 3 (NLRP3) inflammasome activity is regulated by and potentially targetable through Bruton tyrosine kinase. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2017;140(4):1054-67.e10.
- Lopez-Castejon G. Control of the inflammasome by the ubiquitin system. *The FEBS journal*. 2020;287(1):11-26.
- Lundgren J, Babiker AG, Neaton JD. Antiretroviral Therapy in Early HIV Infection. *The New England journal of medicine*. 2016;374(4):394.
- Ma P, Zha S, Shen X, Zhao Y, Li L, Yang L, et al. NFAT5 mediates hypertonic stress-induced atherosclerosis via activating NLRP3 inflammasome in endothelium. *Cell Communication and Signaling*. 2019;17(1):102.
- Ma Z, Ni G, Damania B. Innate Sensing of DNA Virus Genomes. *Annual review of virology*. 2018;5(1):341-62.
- Maartens G, Celum C, Lewin SR. HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. *Lancet*. 2014;384(9939):258-71.
- Mangan MSJ, Olhava EJ, Roush WR, Seidel HM, Glick GD, Latz E. Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2018;17(8):588-606.
- Mantovani A, Barajon I, Garlanda C. IL-1 and IL-1 regulatory pathways in cancer progression and therapy. *Immunol Rev*. 2018;281(1):57-61.
- Mariathasan S, Newton K, Monack DM, Vucic D, French DM, Lee WP, et al. Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature*. 2004;430(6996):213-8.
- Martine P, Chevriaux A, Derangère V, Apetoh L, Garrido C, Ghiringhelli F, et al. HSP70 is a negative regulator of NLRP3 inflammasome activation. *Cell death & disease*. 2019;10(4):256.
- Martinez-Hervas S, Martínez-Barquero V, Nuñez Savall E, Lendínez V, Olivares L, Benito E, et al. [Plasma IL-18 levels are related to insulin and are modulated by IL-18 gene polymorphisms]. *Clinica e investigacion en arteriosclerosis : publicacion oficial de la Sociedad Espanola de Arteriosclerosis*. 2015;27(6):265-71.

- Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell*. 2002;10(2):417-26.
- Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*. 2006;440(7081):237-41.
- Masters SL, Lagou V, Jéru I, Baker PJ, Van Eyck L, Parry DA, et al. Familial autoinflammation with neutrophilic dermatosis reveals a regulatory mechanism of pyrin activation. *Science translational medicine*. 2016;8(332):332ra45.
- Mathews RJ, Robinson JI, Battellino M, Wong C, Taylor JC, Eyre S, et al. Evidence of NLRP3-inflammasome activation in rheumatoid arthritis (RA); genetic variants within the NLRP3-inflammasome complex in relation to susceptibility to RA and response to anti-TNF treatment. *Annals of the rheumatic diseases*. 2014;73(6):1202-10.
- Mayne E, Funderburg NT, Sieg SF, Asaad R, Kalinowska M, Rodriguez B, et al. Increased platelet and microparticle activation in HIV infection: upregulation of P-selectin and tissue factor expression. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)*. 2012;59(4):340-6.
- Mayr LM, Su B, Moog C. Non-Neutralizing Antibodies Directed against HIV and Their Functions. *Frontiers in immunology*. 2017;8:1590-.
- McBride JA, Striker R. Imbalance in the game of T cells: What can the CD4/CD8 T-cell ratio tell us about HIV and health? *PLoS Pathog*. 2017;13(11):e1006624-e.
- McDonald D. Dendritic Cells and HIV-1 Trans-Infection. *Viruses*. 2010;2(8):1704-17.
- McMichael AJ, Borrow P, Tomaras GD, Goonetilleke N, Haynes BF. The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nature reviews Immunology*. 2010;10(1):11-23.
- Migueles SA, Connors M. Success and failure of the cellular immune response against HIV-1. *Nature immunology*. 2015;16(6):563-70.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research*. 1988;16(3):1215-.
- Mindel A, Tenant-Flowers M. ABC of AIDS: Natural history and management of early HIV infection. *BMJ (Clinical research ed)*. 2001;322(7297):1290-3.
- Mishra BB, Rathinam VA, Martens GW, Martinot AJ, Kornfeld H, Fitzgerald KA, et al. Nitric oxide controls the immunopathology of tuberculosis by inhibiting NLRP3 inflammasome-dependent processing of IL-1 β . *Nature immunology*. 2013;14(1):52-60.
- Mishra N, Mohata M, Aggarwal H, Chaudhary O, Das BK, Sinha S, et al. Expression of complement receptor 3 (CR3) and regulatory protein CD46 on dendritic cells of antiretroviral naïve and treated HIV-1 infected individuals: Correlation with immune activation status. *Molecular immunology*. 2018;96:83-7.
- Moir S, Fauci AS. B cells in HIV infection and disease. *Nature reviews Immunology*. 2009;9(4):235-45.
- Monroe KM, Yang Z, Johnson JR, Geng X, Doitsh G, Krogan NJ, et al. IFI16 DNA sensor is required for death of lymphoid CD4 T cells abortively infected with HIV. *Science (New York, NY)*. 2014;343(6169):428-32.

Muñoz-Arias I, Doitsh G, Yang Z, Sowinski S, Ruelas D, Greene WC. Blood-Derived CD4 T Cells Naturally Resist Pyroptosis during Abortive HIV-1 Infection. *Cell host & microbe*. 2015;18(4):463-70.

Muñoz-Planillo R, Kuffa P, Martínez-Colón G, Smith BL, Rajendiran TM, Núñez G. K⁺ efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. *Immunity*. 2013;38(6):1142-53.

Murakami T, Ockinger J, Yu J, Byles V, McColl A, Hofer AM, et al. Critical role for calcium mobilization in activation of the NLRP3 inflammasome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(28):11282-7.

Nasi M, Pecorini S, De Biasi S, Bianchini E, Digaetano M, Neroni A, et al. Altered Expression of PYCARD, Interleukin 1 β , Interleukin 18, and NAIP in Successfully Treated HIV-Positive Patients With a Low Ratio of CD4⁺ to CD8⁺ T Cells. *The Journal of infectious diseases*. 2019;219(11):1743-8.

Nazli A, Kafka JK, Ferreira VH, Anipindi V, Mueller K, Osborne BJ, et al. HIV-1 gp120 induces TLR2- and TLR4-mediated innate immune activation in human female genital epithelium. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2013;191(8):4246-58.

Negash AA, Olson RM, Griffin S, Gale M, Jr. Modulation of calcium signaling pathway by hepatitis C virus core protein stimulates NLRP3 inflammasome activation. *PLoS Pathog*. 2019;15(2):e1007593.

Negredo E, Massanella M, Puig J, Pérez-Alvarez N, Gallego-Escuredo JM, Villarroya J, et al. Nadir CD4 T cell count as predictor and high CD4 T cell intrinsic apoptosis as final mechanism of poor CD4 T cell recovery in virologically suppressed HIV-infected patients: clinical implications. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2010;50(9):1300-8.

Nissen SK, Højen JF, Andersen KL, Kofod-Olsen E, Berg RK, Paludan SR, et al. Innate DNA sensing is impaired in HIV patients and IFI16 expression correlates with chronic immune activation. *Clinical and experimental immunology*. 2014;177(1):295-309.

Nordlander S, Pott J, Maloy KJ. NLR4 expression in intestinal epithelial cells mediates protection against an enteric pathogen. *Mucosal Immunology*. 2014;7(4):775-85.

Novick D, Kim S, Kaplanski G, Dinarello CA. Interleukin-18, more than a Th1 cytokine. *Seminars in immunology*. 2013;25(6):439-48.

Nowarski R, Jackson R, Gagliani N, de Zoete MR, Palm NW, Bailis W, et al. Epithelial IL-18 Equilibrium Controls Barrier Function in Colitis. *Cell*. 2015;163(6):1444-56.

Nyamweya S, Hegedus A, Jaye A, Rowland-Jones S, Flanagan KL, Macallan DC. Comparing HIV-1 and HIV-2 infection: Lessons for viral immunopathogenesis. *Reviews in medical virology*. 2013;23(4):221-40.

Okazawa A, Kanai T, Nakamaru K, Sato T, Inoue N, Ogata H, et al. Human intestinal epithelial cell-derived interleukin (IL)-18, along with IL-2, IL-7 and IL-15, is a potent synergistic factor for the proliferation of intraepithelial lymphocytes. *Clinical and experimental immunology*. 2004;136(2):269-76.

Orsilles MA, Pieri E, Cooke P, Caula C. IL-2 and IL-10 serum levels in HIV-1-infected patients with or without active antiretroviral therapy. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 2006;114(1):55-60.

Ozaki E, Campbell M, Doyle SL. Targeting the NLRP3 inflammasome in chronic inflammatory diseases: current perspectives. *Journal of inflammation research*. 2015;8:15-27.

Paiardini M, Müller-Trutwin M. HIV-associated chronic immune activation. *Immunol Rev*. 2013;254(1):78-101.

Pantaleo G, Graziosi C, Fauci AS. The immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *The New England journal of medicine*. 1993;328(5):327-35.

Parikh AA, Salzman AL, Kane CD, Fischer JE, Hasselgren PO. IL-6 production in human intestinal epithelial cells following stimulation with IL-1 beta is associated with activation of the transcription factor NF-kappa B. *The Journal of surgical research*. 1997;69(1):139-44.

Parks CG, Cooper GS, Dooley MA, Treadwell EL, St Clair EW, Gilkeson GS, et al. Systemic lupus erythematosus and genetic variation in the interleukin 1 gene cluster: a population based study in the southeastern United States. *Annals of the rheumatic diseases*. 2004;63(1):91-4.

Patel MN, Carroll RG, Galván-Peña S, Mills EL, Olden R, Triantafilou M, et al. Inflammasome Priming in Sterile Inflammatory Disease. *Trends in molecular medicine*. 2017;23(2):165-80.

Pétrilli V, Dostert C, Muruve DA, Tschopp J. The inflammasome: a danger sensing complex triggering innate immunity. *Curr Opin Immunol*. 2007;19(6):615-22.

Piacentini L, Biasin M, Fenizia C, Clerici M. Genetic correlates of protection against HIV infection: the ally within. *J Intern Med*. 2009;265(1):110-24.

Pontillo A, Carvalho MS, Kamada AJ, Moura R, Schindler HC, Duarte AJ, et al. Susceptibility to Mycobacterium tuberculosis infection in HIV-positive patients is associated with CARD8 genetic variant. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)*. 2013;63(2):147-51.

Pontillo A, Oshiro TM, Girardelli M, Kamada AJ, Crovella S, Duarte AJ. Polymorphisms in inflammasome' genes and susceptibility to HIV-1 infection. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)*. 2012;59(2):121-5.

Pontillo A, Silva LT, Oshiro TM, Finazzo C, Crovella S, Duarte AJ. HIV-1 induces NALP3-inflammasome expression and interleukin-1beta secretion in dendritic cells from healthy individuals but not from HIV-positive patients. *AIDS*. 2012;26(1):11-8.

Reis EC, da Silva LT, da Silva WC, Rios A, Duarte AJ, Oshiro TM, et al. Host genetics contributes to the effectiveness of dendritic cell-based HIV immunotherapy. *Human vaccines & immunotherapeutics*. 2018;14(8):1995-2002.

Roberts RL, Van Rij AM, Phillips LV, Young S, McCormick SP, Merriman TR, et al. Interaction of the inflammasome genes CARD8 and NLRP3 in abdominal aortic aneurysms. *Atherosclerosis*. 2011;218(1):123-6.

Robertson SE, Young JD, Kitson S, Pitt A, Evans J, Roes J, et al. Expression and alternative processing of IL-18 in human neutrophils. *European journal of immunology*. 2006;36(3):722-31.

Rosenwasser LJ. Biologic activities of IL-1 and its role in human disease. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1998;102(3):344-50.

Sabourin-Poirier C, Fourcade L, Chagnon-Choquet J, Labbé A-C, Alary M, Guédou F, et al. Blood B Lymphocyte Stimulator (BLyS)/BAFF levels may reflect natural immunity to HIV in highly exposed uninfected Beninese Commercial Sex Workers. *Scientific Reports*. 2016;6(1):32318.

Saifuddin M, Hart ML, Gewurz H, Zhang Y, Spear GT. Interaction of mannose-binding lectin with primary isolates of human immunodeficiency virus type 1. *The Journal of general virology*. 2000;81(Pt 4):949-55.

Schweighoffer E, Nys J, Vanes L, Smithers N, Tybulewicz VLJ. TLR4 signals in B lymphocytes are transduced via the B cell antigen receptor and SYK. *The Journal of experimental medicine*. 2017;214(5):1269-80.

Segat L, Bevilacqua D, Boniotto M, Arraes LC, de Souza PR, de Lima Filho JL, et al. IL-18 gene promoter polymorphism is involved in HIV-1 infection in a Brazilian pediatric population. *Immunogenetics*. 2006;58(5-6):471-3.

Segat L, Brandão LAC, Guimarães RL, Pontillo A, Athanasakis E, de Oliveira RM, et al. Polymorphisms in innate immunity genes and patients response to dendritic cell-based HIV immuno-treatment. *Vaccine*. 2010;28(10):2201-6.

Shemon AN, Sluyter R, Fernando SL, Clarke AL, Dao-Ung LP, Skarratt KK, et al. A Thr357 to Ser polymorphism in homozygous and compound heterozygous subjects causes absent or reduced P2X7 function and impairs ATP-induced mycobacterial killing by macrophages. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(4):2079-86.

Shen C, Wang QZ, Shen ZY, Yuan HY, Yu WJ, Chen XD, et al. Genetic association between the NLRP3 gene and acne vulgaris in a Chinese population. *Clinical and experimental dermatology*. 2019;44(2):184-9.

Shi J, Zhao Y, Wang K, Shi X, Wang Y, Huang H, et al. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature*. 2015;526(7575):660-5.

Shimada K, Crother TR, Karlin J, Dagvadorj J, Chiba N, Chen S, et al. Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis. *Immunity*. 2012;36(3):401-14.

Shin MS, Kang Y, Lee N, Wahl ER, Kim SH, Kang KS, et al. Self double-stranded (ds)DNA induces IL-1 β production from human monocytes by activating NLRP3 inflammasome in the presence of anti-dsDNA antibodies. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2013;190(4):1407-15.

Sierra S, Kupfer B, Kaiser R. Basics of the virology of HIV-1 and its replication. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2005;34(4):233-44.

Sobti R, Sharma V, Abitew A, Berhane N, Mahdi S, Askari M, et al. IL-18 Gene Promoter Region 607C/A Polymorphism in HIV-1 Infected North Indian Population. *Balkan journal of medical genetics : BJMG*. 2011;14(2):41-8.

Song W, Wilson CM, Allen S, Wang C, Li Y, Kaslow RA, et al. Interleukin 18 and human immunodeficiency virus type 1 infection in adolescents and adults. *Clinical and experimental immunology*. 2006;144(1):117-24.

Soper A, Kimura I, Nagaoka S, Konno Y, Yamamoto K, Koyanagi Y, et al. Type I Interferon Responses by HIV-1 Infection: Association with Disease Progression and Control. *Frontiers in immunology*. 2017;8:1823.

Souza De Lima D, Bomfim CCB, Leal VNC, Reis EC, Soares JLS, Fernandes FP, et al. Combining Host Genetics and Functional Analysis to Depict Inflammasome Contribution in Tuberculosis Susceptibility and Outcome in Endemic Areas. *Frontiers in immunology*. 2020;11:550624.

Stacey AR, Norris PJ, Qin L, Haygreen EA, Taylor E, Heitman J, et al. Induction of a striking systemic cytokine cascade prior to peak viremia in acute human immunodeficiency virus type 1 infection, in contrast to more modest and delayed responses in acute hepatitis B and C virus infections. *J Virol*. 2009;83(8):3719-33.

Stiksrud B, Aass HCD, Lørvik KB, Ueland T, Trøseid M, Dyrhol-Riise AM. Activated dendritic cells and monocytes in HIV immunological nonresponders: HIV-induced interferon-inducible protein-10 correlates with low future CD4⁺ recovery. 2019;33(7):1117-29.

Stutz A, Horvath GL, Monks BG, Latz E. ASC speck formation as a readout for inflammasome activation. *Methods Mol Biol*. 2013;1040:91-101.

Stylianou E, Bjerkeli V, Yndestad A, Heggelund L, Waehre T, Damås JK, et al. Raised serum levels of interleukin-18 is associated with disease progression and may contribute to virological treatment failure in HIV-1-infected patients. *Clinical and experimental immunology*. 2003;132(3):462-6.

Thaker YR, Schneider H, Rudd CE. TCR and CD28 activate the transcription factor NF- κ B in T-cells via distinct adaptor signaling complexes. *Immunology letters*. 2015;163(1):113-9.

Toksoy A, Sennefelder H, Adam C, Hofmann S, Trautmann A, Goebeler M, et al. Potent NLRP3 Inflammasome Activation by the HIV Reverse Transcriptase Inhibitor Abacavir. *The Journal of biological chemistry*. 2017;292(7):2805-14.

Tsu BV, Beierschmitt C, Ryan AP, Agarwal R, Mitchell PS, Daugherty MD. Diverse viral proteases activate the NLRP1 inflammasome. *eLife*. 2021;10.

Unterholzner L, Keating SE, Baran M, Horan KA, Jensen SB, Sharma S, et al. IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. *Nature immunology*. 2010;11(11):997-1004.

Vasseur F, Sendid B, Broly F, Gower-Rousseau C, Sarazin A, Standaert-Vitse A, et al. The CARD8 p.C10X mutation associates with a low anti-glycans antibody response in patients with Crohn's disease. *BMC Medical Genetics*. 2013;14(1):35.

Vergadi E, Vaporidi K, Tsatsanis C. Regulation of Endotoxin Tolerance and Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome by Non-coding RNAs. *Frontiers in immunology*. 2018;9:2705.

- Verma D, Sarndahl E, Andersson H, Eriksson P, Fredrikson M, Jonsson JI, et al. The Q705K polymorphism in NLRP3 is a gain-of-function alteration leading to excessive interleukin-1beta and IL-18 production. *PLoS one*. 2012;7(4):e34977.
- Viganò E, Diamond CE, Spreafico R, Balachander A, Sobota RM, Mortellaro A. Human caspase-4 and caspase-5 regulate the one-step non-canonical inflammasome activation in monocytes. *Nature Communications*. 2015;6(1):8761.
- Vishwanath A, Quaiser S, Khan R. Role of high-sensitivity C-reactive protein measurements in HIV patients. *Indian J Sex Transm Dis AIDS*. 2016;37(2):123-8.
- Wang X, Mbondji-Wonje C, Zhao J, Hewlett I. IL-1 β and IL-18 inhibition of HIV-1 replication in Jurkat cells and PBMCs. *Biochemical and biophysical research communications*. 2016;473(4):926-30.
- Wang X, Ye L, Hou W, Zhou Y, Wang YJ, Metzger DS, et al. Cellular microRNA expression correlates with susceptibility of monocytes/macrophages to HIV-1 infection. *Blood*. 2009;113(3):671-4.
- WHO Data and Statistics <www.who.int/hiv/data/en/>. Acesso em: 18 fev. 2021;
- Wiercinska-Drapalo A, Jaroszewicz J, Flisiak R, Prokopowicz D. Plasma interleukin-18 is associated with viral load and disease progression in HIV-1-infected patients. *Microbes and infection*. 2004;6(14):1273-7.
- Wong JK, Hezareh M, Günthard HF, Havlir DV, Ignacio CC, Spina CA, et al. Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia. *Science (New York, NY)*. 1997;278(5341):1291-5.
- Wu J-F, Song S-H, Lee C-S, Chen H-L, Ni Y-H, Hsu H-Y, et al. Clinical Predictors of Liver Fibrosis in Patients With Chronic Hepatitis B Virus Infection From Children to Adults. *The Journal of infectious diseases*. 2018;217(9):1408-16.
- Yang X, Su B, Zhang X, Liu Y, Wu H, Zhang T. Incomplete immune reconstitution in HIV/AIDS patients on antiretroviral therapy: Challenges of immunological non-responders. *Journal of leukocyte biology*. 2020;107(4):597-612.
- Yasuda K, Nakanishi K, Tsutsui H. Interleukin-18 in Health and Disease. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(3).
- Yazdi AS, Ghoreschi K. The Interleukin-1 Family. *Advances in experimental medicine and biology*. 2016;941:21-9.
- Yin Y, Yan Y, Jiang X, Mai J, Chen NC, Wang H, et al. Inflammasomes are differentially expressed in cardiovascular and other tissues. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2009;22(2):311-22.
- Younai FS. Thirty years of the human immunodeficiency virus epidemic and beyond. *International journal of oral science*. 2013;5(4):191-9.
- Zhang H, Fu R, Guo C, Huang Y, Wang H, Wang S, et al. Anti-dsDNA antibodies bind to TLR4 and activate NLRP3 inflammasome in lupus monocytes/macrophages. *J Transl Med*. 2016;14(1):156-.
- Zhang X, Zhang Z, He S, Fu Y, Chen Y, Yi N, et al. FOXO3, IRF4, and XIAP Are Correlated with Immune Activation in HIV-1-Infected Men Who Have Sex with Men During Early HIV Infection. *AIDS research and human retroviruses*. 2017;33(2):172-80.

Zhao ML, Kim MO, Morgello S, Lee SC. Expression of inducible nitric oxide synthase, interleukin-1 and caspase-1 in HIV-1 encephalitis. *Journal of neuroimmunology*. 2001;115(1-2):182-91.

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

Zhong FL, Robinson K, Teo DET, Tan KY, Lim C, Harapas CR, et al. Human DPP9 represses NLRP1 inflammasome and protects against autoinflammatory diseases via both peptidase activity and FIIND domain binding. *The Journal of biological chemistry*. 2018;293(49):18864-78.

Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature*. 2011;469(7329):221-5.

Zhu J, Wu S, Hu S, Li H, Li M, Geng X, et al. NLRP3 inflammasome expression in peripheral blood monocytes of coronary heart disease patients and its modulation by rosuvastatin. *Molecular medicine reports*. 2019;20(2):1826-36.

Zimmerman PA, Buckler-White A, Alkhatib G, Spalding T, Kubofcik J, Combadiere C, et al. Inherited resistance to HIV-1 conferred by an inactivating mutation in CC chemokine receptor 5: studies in populations with contrasting clinical phenotypes, defined racial background, and quantified risk. *Mol Med*. 1997;3(1):23-36.

APÊNDICE A- Termo de Consentimento Livre Esclarecido- Pacientes HIV

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

1

Serviço de Extensão ao Atendimento de Pacientes HIV/Aids

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M F

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

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

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

2. RESPONSÁVEL LEGAL

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

DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M F

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

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

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

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: "Caracterização genética e funcional de células dendríticas de pacientes HIV+ estimuladas com flagelina"

PESQUISADOR: Alessandra Pontillo

CARGO/FUNÇÃO: Professora doutora

DEPARTAMENTO/INSTITUTO - Departamento de Imunologia- Instituto de Ciências Biomédicas

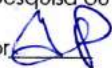
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO x RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO RISCO MAIOR

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 48 meses

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____

Rubrica do pesquisador 

Prof. Dra. Alessandra Pontillo
Laboratório de Imunogenética
Dep.to Imunologia/ICB/USP

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

O Sr(a). está convidado(a) a participar como voluntário desta pesquisa sobre "Caracterização genética e funcional de células dendríticas de pacientes HIV+ estimuladas com flagelina".

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

1 - Justificativa e objetivos do estudo – devido à necessidade de comparação de amostras de pacientes HIV+ com amostras de indivíduos sadios o (a) Sr (a) foi convidado (a) para participar desta pesquisa para compor o grupo de indivíduos infectados pelo HIV.

Para o tratamento do HIV existem medicamentos, no entanto para alguns pacientes é necessário o uso de outros tratamentos complementares. Um desses exemplos é a vacina terapêutica de células. Isso já vem sendo testado, mas nem todos os pacientes apresentam uma resposta boa. O Laboratório de Imunogenética está desenvolvendo uma pesquisa para tentar compreender melhor se existe algum estímulo capaz de melhorar essa vacina terapêutica de células e assim poder ajudar a resposta ao tratamento desses pacientes vacinados. Além disso, vamos ver se a genética da pessoa influencia nessa resposta também.

2 - Procedimentos que serão realizados e métodos que serão empregados – Caso concorde em participar desta pesquisa, o (a) Sr (a) será submetido (a) a um procedimento médico que será explicado agora. Para o estudo dos fatores genéticos serão coletados 4 mL de sangue (1 colher de chá). Para alguns indivíduos, será feita a coleta de 50 mL (5 colheres de sopa) de sangue para realizar exames comparativos aos dos indivíduos sadios

3 - Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados: como descrito acima, a princípio não está prevista nenhuma coleta extra de sangue.

4 - Explicação de possíveis desconfortos e riscos decorrentes da participação na pesquisa – O maior desconforto será no momento da coleta de sangue, porém este procedimento não trará nenhum risco à saúde dos pacientes. Todos os materiais utilizados serão descartáveis.

5 - Benefícios esperados para o participante – O voluntário não terá nenhum benefício direto, mas certamente estará colaborando para o desenvolvimento de vacinas anti-HIV. Não haverá benefício adicional por participar deste protocolo.

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____

Rubrica do pesquisador 

Profa. Dra. Alessandra Pontillo
Laboratório de Imunogenética
Dep.to Imunologia/CB/USP

6 – **Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos:** Não se aplica.

7 – **Garantia de acesso:** em qualquer etapa do estudo, você terá acesso as informações junto aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra Alessandra Pontillo que pode ser encontrado no endereço Av. Prof. Lineu Prestes, 1730, laboratório 120, tel: 3091-7367. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 – e-mail: cappesq@hcnet.usp.br

8- Concordo que o material possa ser utilizado em outros projetos desde que autorizado pela Comissão de Ética deste Instituto e pelo responsável por esta pesquisa. Caso minha manifestação seja positiva, poderei retirar essa autorização a qualquer momento sem qualquer prejuízo para mim.

() Sim ou () Não

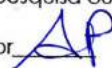
9 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

10 – Direito de confidencialidade: as informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes. Os participantes serão identificados, após a entrada no estudo, por códigos, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente;

11 – Despesas e compensações: Sua participação no estudo é totalmente voluntária, não sendo previsto nenhum tipo de compensação financeira relacionada.

12 – A equipe envolvida pela condução do estudo assume o compromisso de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____

Rubrica do pesquisador 

Prof. Dra. Alessandra Pontillo
Laboratório de Imunogenética
Dep.to Imunologia/CB/USP

APÊNDICE B – Titulação dos anticorpos monoclonais utilizados em citometria de fluxo no presente estudo

Com o intuito de estabelecer a concentração de uso dos anticorpos monoclonais a serem utilizados na marcação das subpopulações de leucócitos, foi realizada a titulação de cada anticorpo individualmente.

Anticorpos monoclonais utilizados para análise de pureza, viabilidade e perfil de ativação das células isoladas. Os marcadores identificados (especificidade), os clones do anticorpo monoclonal, o tipo de fluorocromo, o fabricante, bem como o volume recomendado e o volume titulado são reportados.

Especificidade	Clone	Fluorocromo	Fabricante	Volume recomendado (µL)	Volume titulado (µL)
CD3	UCHT1	V450	BD	5,0	2,5
CD4	RPAT4	PE	BD	20,0	5,0
CD8	SK1	PE-Cy.7	BD	5,0	2,5
CD19	HIB19	PE-Cy.5	BD	20,0	2,5
CD21	M-T271	PE	BD	5,0	1,25
CD27	B-ly4	BV421	BD	5,0	1,25
CD14	TuK4	Qdot 605	BD	20,0	5,0
CD38	HIT2	APC	Biolegend	5,0	1,25
CD69	FN50	APC-Cy7	Biolegend	5,0	2,5
IFN-γ	B27	Pacific Blue	Biolegend	5,0	1,25
IL-4	8D4-8	APC	Biolegend	5,0	1,25

Brevemente, 100 µL de 2×10^6 células isoladas/mL foram distribuídas em placas de cultura de 96 poços de fundo V (Corning), e os anticorpos foram adicionados em concentrações decrescente (1/128; 1/64; 1/32; 1/16; 1/8; 1/4; 1/2; 1/1) a partir da concentração inicial recomendada pelo fabricante. As células foram incubadas por 20 minutos a 4°C, lavadas duas vezes com PBS 1X (*Sigma-Aldrich*) e fixadas em PBS+1% Formaldeído (*Sigma-Aldrich*). Para marcação de

proteínas intracelulares (IFN- γ e IL-4), 20 μ g/mL de brefeldina A (Sigma-Aldrich) foi adicionada 6 horas antes do término de cada ensaio e marcadas intracelularmente para IFN- γ e IL-4 por 30' a 4^o C seguidos de lavagem em PBS 1 X. As células foram adquiridas no citômetro de fluxo FACSCanto II ou LSR Fortessa (*BD Biosciences*). Foi escolhida a maior diluição que não representasse uma diminuição significativa no percentual de células positivas para cada anticorpo, quando comparada à quantidade de anticorpo sugerida pelo fabricante

APÊNDICE C – Curva de concentração de estímulos- monócitos

No intuito de estabelecer a concentração de uso dos estímulos escolhidos (LPS e β -glucana), para os ensaios com monócitos purificados, foram testadas diferentes concentrações utilizando como referência a literatura atual acerca da ativação do NLRP3 em monócitos humanos (Gattorno et al., 2007).

Brevemente, foram mantidas $0,4 \times 10^6$ células CD14+ isoladas de controles saudáveis ($n = 6$) em meio RPMI-10% FBS e estimuladas com 0,1, 1 ou 10 $\mu\text{g/mL}$ de LPS por 3 e 24 h, seguidos ou não da adição de 1 mM de ATP por 15 minutos. O sobrenadante de cultura foi coletado a cada condição, e utilizado para dosagem de IL-1 β por Elisa.

Como observado no gráfico a seguir (**A**), a estimulação com 1 $\mu\text{g/mL}$ levou a uma maior produção de IL-1 β nas duas condições (sem ATP e com ATP) quando comparado a concentração de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,05$). Além disso, a estimulação com 1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS não diferiu significativamente da condição de 10 $\mu\text{g/mL}$ ($p > 0,05$). Portanto, para os todos os ensaios com monócitos foi definida a concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS por 3 e 24 horas. Além disso, considerando que a adição de ATP levou a um aumento dos níveis de IL-1 β em comparação a estimulação somente com LPS, optamos por utiliza-lo em paralelo ao LPS para os demais ensaios.

Vale destacar que embora não tenha sido realizado a dosagem de LDH no sobrenadante de cultura dos monócitos estimulados com as três concentrações de LPS, a viabilidade celular foi avaliada na condição escolhida (1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS com ou sem ATP) durante o trabalho, não sendo observado uma indução significativa de morte celular nessa concentração (**Figura 33**).

Para avaliação da concentração a ser utilizada da β -glucana, $0,4 \times 10^6$ células CD14+ de controles saudáveis ($n = 6$) também foram mantidas em meio RPMI-10% FBS e estimuladas com 50, 100 ou 200 $\mu\text{g/mL}$ de β -glucana por 3 e 24 h seguidos ou não da adição de 1 mM de ATP por 15 minutos.

Quando avaliada a concentração de IL-1 β no sobrenadante de cultura (**B**), foi possível observar que não houve uma diferença significativa nos níveis da citocina nas diferentes concentrações utilizadas, independente da presença do ATP ($p > 0,05$). Além disso, foi possível observar que na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ de β -glucana houve uma maior produção de IL-1 β a 24 horas comparado

a 3 horas na mesma concentração ($p < 0,05$). E quando avaliado a viabilidade celular (C), a concentração que levou a uma menor morte celular (abaixo de 30 %) foi a de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Portanto, baseando-se na dosagem de IL-1 β e LDH, foi escolhida a concentração de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de β -glucana por 24h sem adição de ATP para todos os ensaios realizados.

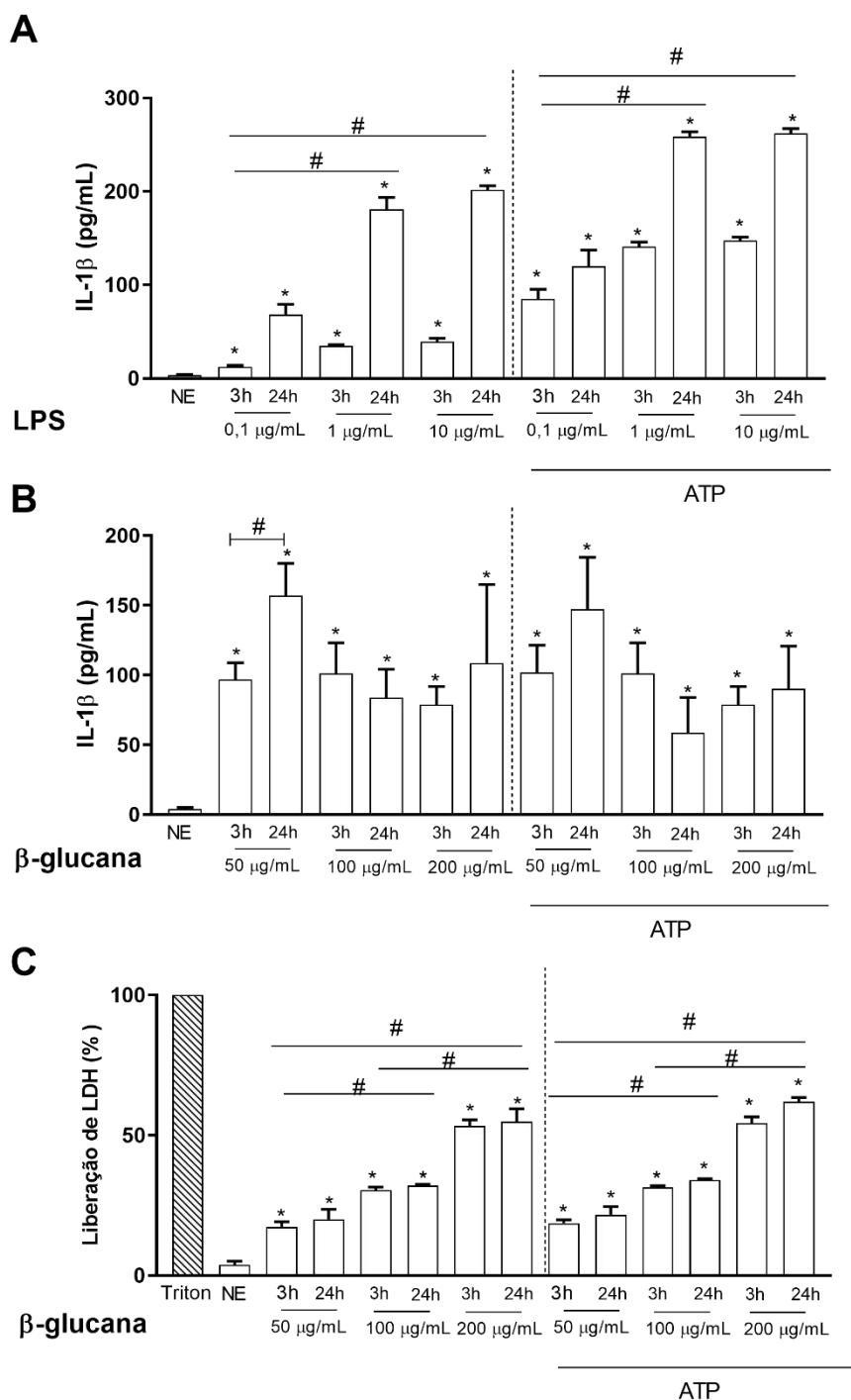


Figura. Padronização da concentração de LPS e β -glucana para estimulação de monócitos humanos.

Monócitos CD14+ foram purificados de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de controles saudáveis (CS = 6) e cultivados em RPMI-1640 com 10% de SFB, estimulados com (A) 0,1, 1 ou 10 μ g/mL de lipopolissacarídeo (LPS) por 3h ou 24h, seguidos da adição de 1mM de ATP por 15 minutos ou estimulados com (B, C) 50, 100 ou 200 μ g/mL de β -glucana por 24h seguidos da adição de 1mM de ATP. Foram coletados os sobrenadantes de cultura e dosado os níveis de IL-1 β (A,B) por Elisa e (C) LDH com kit comercial.

Todos os dados são representados como média \pm desvio padrão (DP).

O teste de *Friedman* foi aplicado para comparar as condições LPS, LPS+ATP ou β -glucana em relação ao NE (* $p < 0,05$) ou para comparar as distintas concentrações entre si (# $p < 0,05$).

NE: Não Estimulado.

APÊNDICE D – Curva de concentração de estímulos- linfócitos B

Com o objetivo de estabelecer a concentração de uso dos estímulos escolhidos (LPS, β -glucana e CpG), para os ensaios com linfócitos B purificados, foram testadas diferentes concentrações utilizando como referência a literatura atual acerca da ativação do NLRP3 em linfócitos B humanos (Ali et al., 2017).

Brevemente, foram mantidas $0,4 \times 10^6$ células CD19+ isolados de controles saudáveis ($n = 5$) em meio RPMI-10% FBS e estimuladas com 0,1 ou 1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS; 10, 100 ou 200 $\mu\text{g/mL}$ de β -glucana; 1 ou 10 $\mu\text{g/mL}$ de CpG por 24 h seguidos ou não da adição de 1 mM de ATP por 15 minutos. O sobrenadante de cultura foi coletado a cada condição, e utilizado para dosagem de IL-1 β por Elisa e dosagem de LDH por ensaio colorimétrico com kit comercial.

Como observado no gráfico abaixo (**A**), a estimulação com 1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS e 200 $\mu\text{g/mL}$ de β -glucana foram as condições que levaram a maiores níveis de IL-1 β ($p < 0,05$). Já a estimulação com CpG não levou a uma produção significativa da IL-1 β no sobrenadante de cultura. Além disso, não foi possível observar uma diferença significativa com adição de ATP (**B**) em nenhuma das condições, quando comparado a estimulação sem ATP (**A**) ($p > 0,05$).

Quando avaliado a viabilidade celular frente a estimulação, todos os estímulos foram capazes de induzir uma maior morte celular ($p < 0,05$) porém sem diferenças entre as distintas concentrações de estímulos (**C**), mesmo na presença do ATP (**D**) ($p > 0,05$).

Em conjunto esses dados nos levaram a definir a concentração de uso para todos os ensaios de 1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS, 200 $\mu\text{g/mL}$ de β -glucana e 1 $\mu\text{g/mL}$ de CpG por 24h sem adição de ATP.

Vale destacar que realizamos também a dosagem de IL-1 β nas mesmas concentrações padronizadas acima (1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS, 200 $\mu\text{g/mL}$ de β -glucana e 1 $\mu\text{g/mL}$ de CpG) no tempo de 3 horas de estimulação, porém a indução da produção de IL-1 β foi significativamente menor ou até mesmo indetectável em comparação aos níveis a 24 horas (dados não representados graficamente), nos levando a utilizar somente o tempo de 24 horas de estimulação nos ensaios com linfócitos B.

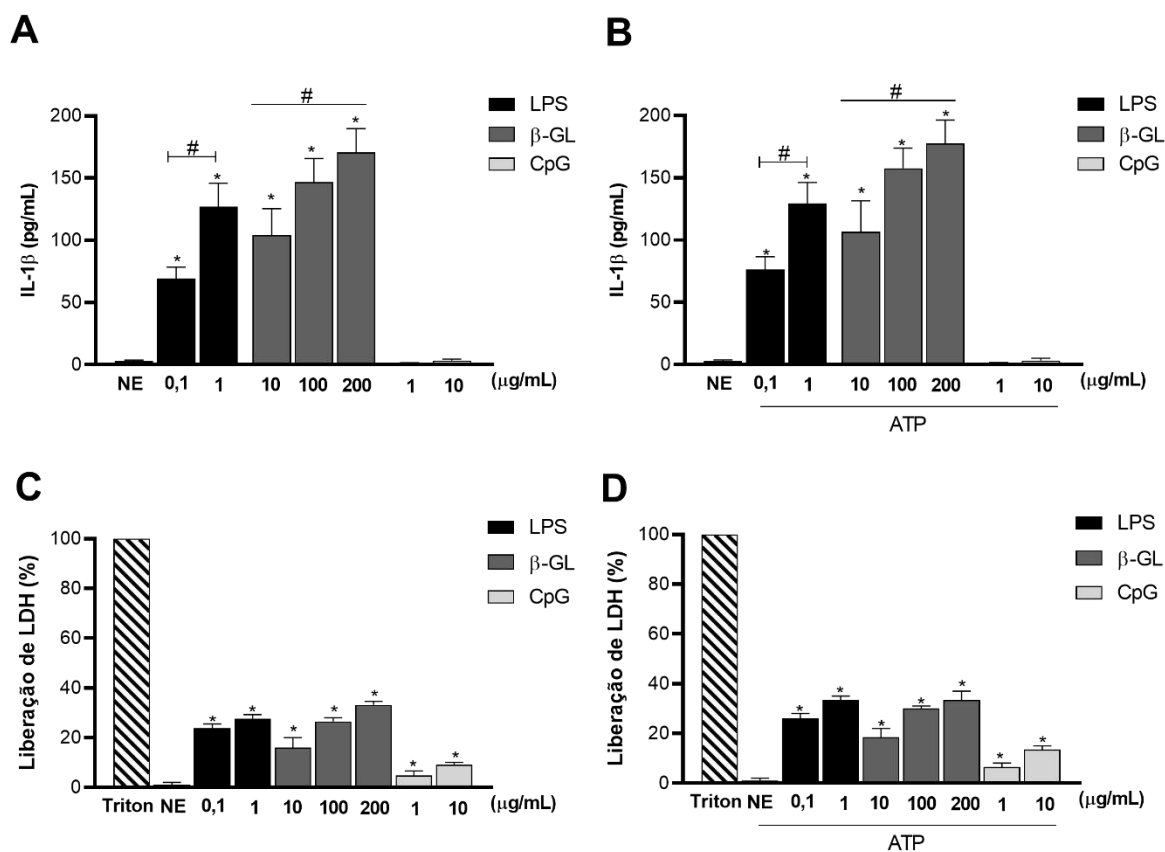


Figura. Padronização da concentração de LPS, β-glucana e CpG para estimulação de linfócitos B humanos.

Linfócitos B CD19+ foram purificados de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de controles saudáveis (CS = 5) e cultivados em RPMI-1640 com 10% de SFB, estimulados com 1 ou 10 μg/mL de lipopolissacarídeo (LPS); 10, 100 ou 200 μg/mL de β-glucana; 1 ou 10 μg/mL de CpG por 24 horas seguidos ou não da adição de 1mM de ATP por 15 minutos. Foram coletados os sobrenadantes de cultura e dosado os níveis de IL-1β nas condições sem ATP (**A**) ou com ATP (**B**) por Elisa, assim como os níveis de LDH nas condições sem ATP (**C**) ou com ATP (**D**) com kit comercial.

Todos os dados são representados como média ± desvio padrão (DP).

O teste de *Friedman* foi aplicado para comparar as condições LPS, LPS+ATP ou β-glucana em relação ao NE (*p < 0,05) ou para comparar as distintas concentrações entre si (#p < 0,05).

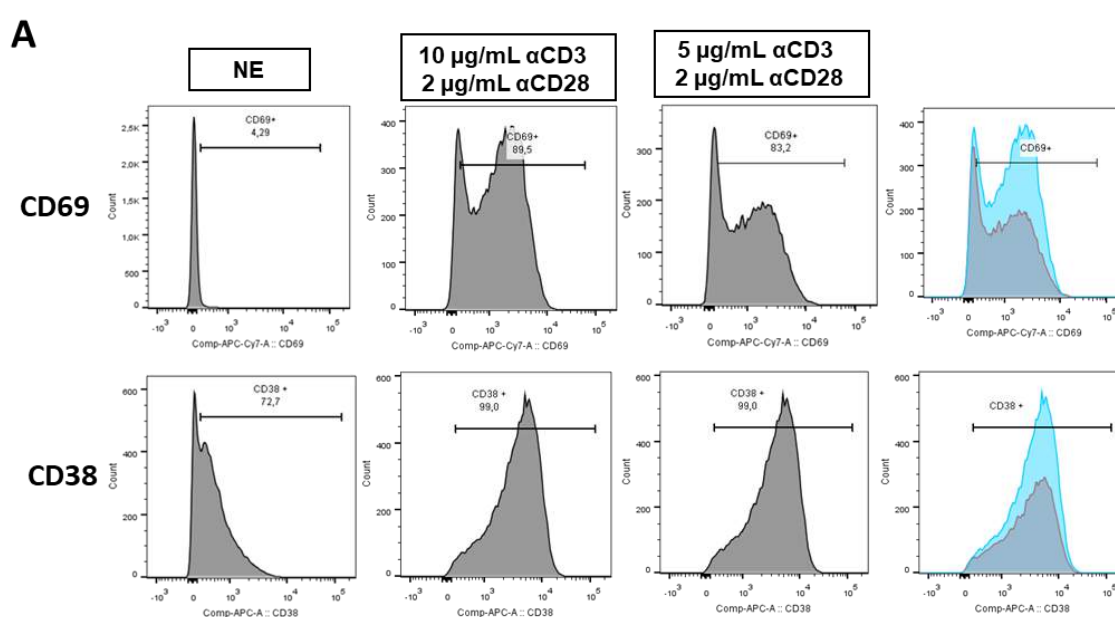
NE: Não Estimulado.

APÊNDICE E – Curva de concentração de estímulos- linfócitos T CD4+

Baseando-se nos protocolos de ativação *in vitro* de células T humanas com anticorpos monoclonais específicos (anti-CD3/antiCD28) (Bruchard et al. 2015; David J. Cousins et al., 2002; BD *Support Protocols*), inicialmente foram testadas duas concentrações do anticorpo monoclonal de ativação anti-CD3 (10 µg/mL ou 5 µg/mL) em conjunto com 2 µg/mL do anticorpo monoclonal Anti-CD28. Para tal, foram isolados 1×10^6 linfócitos T CD4+ de indivíduos controles saudáveis (n = 5), e mantidos em RPMI+10% SFB, a 37° C e 5% de CO₂ na presença dos anticorpos de ativação por 3h, 14h, 24h, 48h e 72h. O protocolo de marcação para aquisição por citometria de fluxo foi previamente descrito na seção 4.16 em Materiais e métodos.

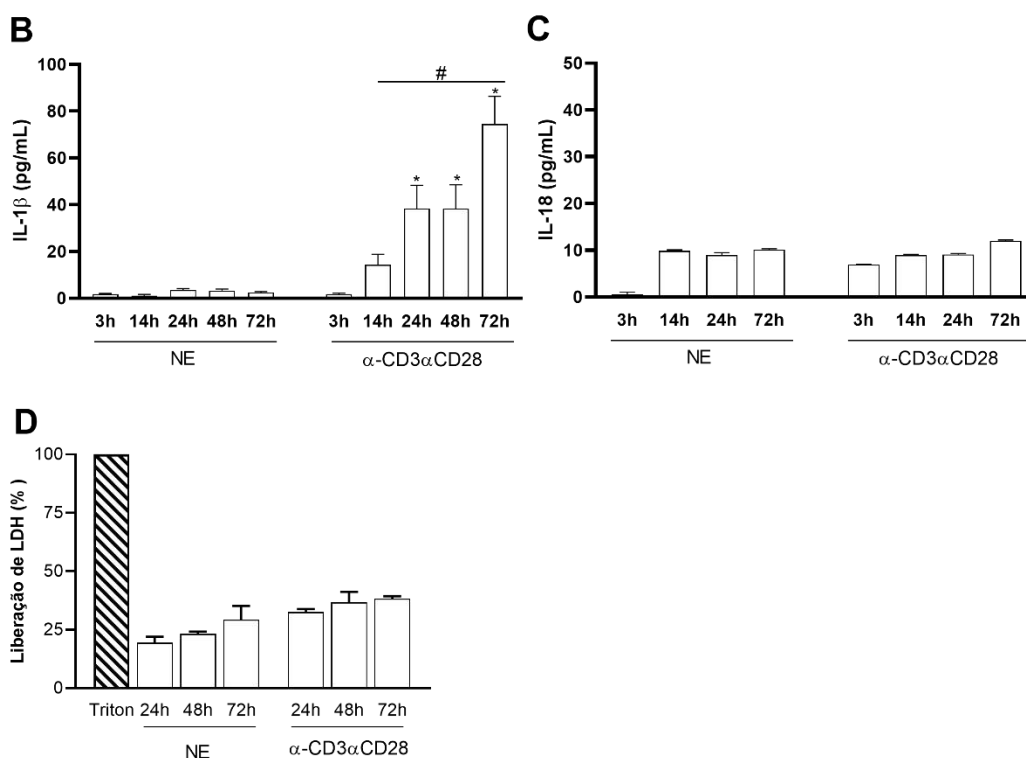
De acordo com a expressão dos marcadores de ativação CD69 e CD38, foi escolhida a menor concentração de anti-CD3 que não reduzisse significativamente o percentual de células vivas positivas para os marcadores em questão.

A seguir apresentamos uma figura (A) representativa de 1 experimento demonstrando que ambas concentrações de anti-CD3 (a 72 horas) não afetaram o nível de ativação das células T CD4+ em termos de expressão de CD69 e CD38. Portanto, definimos a concentração ideal de utilização do anti-CD3 como 5 µg/mL.



Avaliamos também os níveis de IL-1 β (**B**) e IL-18 (**C**) no sobrenadante de cultura na estimulação com a concentração padronizada (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anti-CD3 e 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anti-CD28) por tempos distintos (3h, 14, 24, 48 e 72 horas). Assim como a viabilidade celular, nas mesmas condições, através da dosagem de LDH no sobrenadante de cultura (**D**).

Foi possível observar a maior produção de IL-1 β após 72 horas de ativação (**B**) ($p < 0,05$) e sem diferenças significativas quanto a indução de morte celular nos distintos tempos (**D**) ($p > 0,05$). Além disso, não foi possível observar a indução de IL-18 em nenhum dos tempos avaliados (**C**) ($p > 0,05$).



Padronização da ativação de linfócitos T CD4+ in vitro com $\alpha\text{CD3}\alpha\text{CD28}$.

1×10^6 linfócitos T CD4+ purificados de controles saudáveis ($n = 5$) foram ativados com 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ou 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de αCD3 e 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αCD28 por 3h, 14h, 24h, 48h ou 72h para padronização do protocolo de ativação. Em (**A**) é apresentado uma figura ilustrativa na forma de histograma, representando a expressão de marcadores clássicos de ativação (CD69 e CD38) nas células estimuladas por 72 h. A estratégia de análise se baseou primeiramente na eliminação de instabilidade do laser através do cruzamento de tempo (*Time*) pelo marcador *Pacific Blue*; Seleção de eventos únicos (*singlets*) através da medida *Forward Scatter* (FSC)-A (A: área) por FSC-H (H: altura); Seleção da população de linfócitos através das medidas FSC-A (tamanho das células) por *Side Scatter* (SSC-A) (granulosidade/complexidade das células); Seleção de células vivas através da marcação com *LIVE/DEAD* e contagem dos linfócitos marcados para CD69 ou CD38 dentro da população de CD3 (*Pacific Blue*)+ e CD4 (PE)+ vivas (*LIVE/DEAD low*). É apresentado a dosagem de IL-1 β (**B**) e IL-18 (**C**) no sobrenadante de cultura das células ativadas por tempos distintos (3h, 14h, 24h, 48h, 72h) avaliado por Elisa. Em (**D**) é avaliado a viabilidade celular por dosagem de LDH presente no sobrenadante de cultura nas células ativadas (24h, 48h e 72h). Todos os dados são representados como média \pm desvio padrão (DP).

O teste de *Friedman* foi aplicado para comparar as condições estimulado em relação ao NE (* $p < 0,05$) ou para comparar as distintas concentrações entre si (# $p < 0,05$). NE: Não Estimulado.

APÊNDICE F– Curva de concentração inibidores – monócitos

No intuito de estabelecer a concentração de uso dos inibidores escolhidos para o estudo (MCC950: Inibidor específico de NLRP3; Partenolide: Inibidor amplo do inflamassoma), para os ensaios com monócitos purificados, foram testadas diferentes concentrações utilizando como referência a literatura recente (Coll et al., 2015).

Brevemente, foram mantidas $0,4 \times 10^6$ células CD14+ isoladas de controles saudáveis ($n = 6$) em meio RPMI-10% FBS na presença de 1, 10 e 50 μM do MCC950 por 1 hora, ou de 1, 10 ou 20 μM do Partenolide por 15 minutos. Em seguida foi adicionado LPS por 3h (**A, C**) ou 24h (**B, D**) seguidos da adição de 1 mM de ATP por 15 minutos. O sobrenadante de cultura foi coletado a cada condição, e utilizado para dosagem de IL-1 β por Elisa.

Foi possível observar uma inibição significativa da produção de IL-1 β na estimulação tanto com LPS como LPS+ATP (3h e 24h) a partir das concentrações de 10 μM de MCC950 e 10 μM de Partenolide ($p < 0,05$) e sem diferenças para as concentrações superiores ($p > 0,05$). Portanto, definimos como concentração ideal dos inibidores 10 μM de MCC950 e 10 μM de Partenolide.

Vale destacar que a presença dos inibidores em todas as condições descritas não afetou significativamente o nível de morte celular avaliada pela dosagem de LDH no sobrenadante de cultura (dados não representados graficamente).

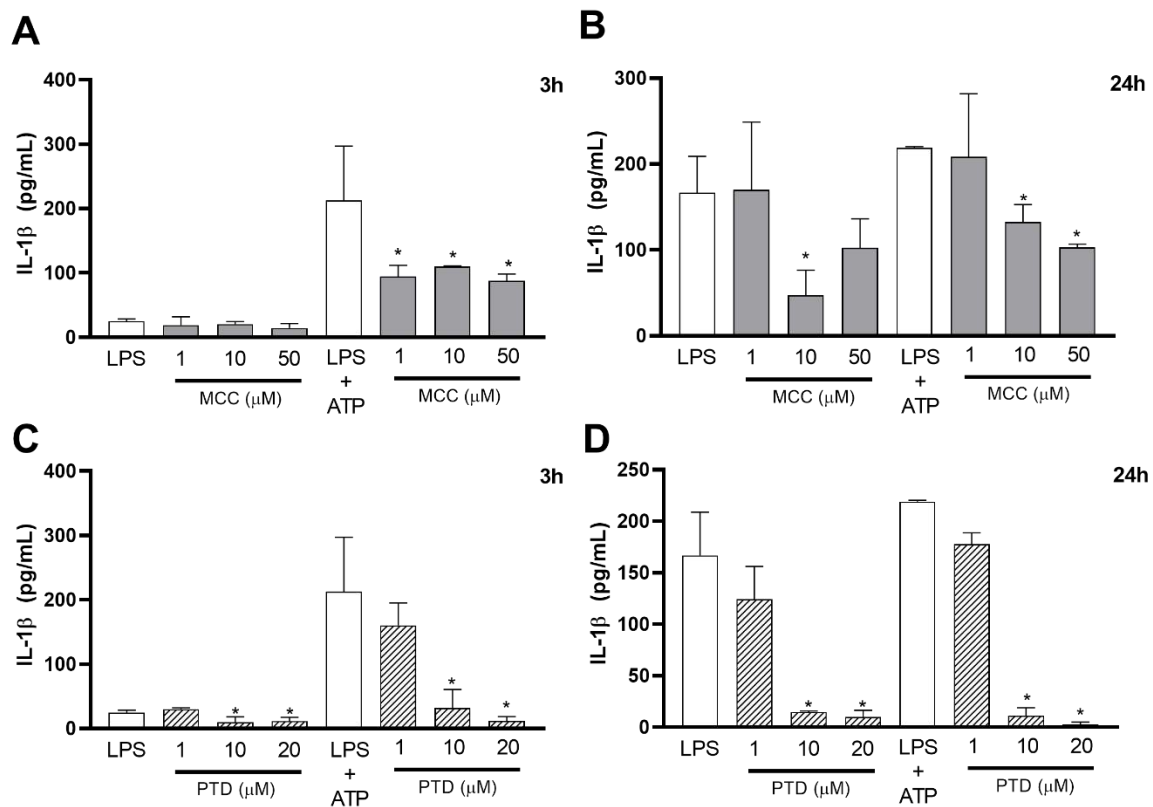


Figura. Padronização da concentração de MCC950 e Partenolide para inibição do inflamassoma nos monócitos humanos.

Monócitos CD14+ foram purificados de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de controles saudáveis (CS = 6) e cultivados em RPMI-1640 com 10% de SFB, pré-tratados com os inibidores (A, B) MCC 950 (1, 10 e 50 μM) por 1 hora ou (C, D) Partenolide (1, 10, 20 μM) por 15 minutos. Em seguida as células foram estimuladas com 1 μg/mL de lipopolissacarídeo (LPS) por 3h (A, C) ou 24h (B, D) seguidos da adição de 1mM de ATP por 15 minutos. Foram coletados os sobrenadantes de cultura e dosado os níveis de IL-1β por Elisa.

Todos os dados são representados como média ± desvio padrão (DP).

O teste de *Friedman* foi aplicado para comparar as condições LPS e LPS+ATP em relação aos inibidores (*p < 0,05).

APÊNDICE G– Curva de concentração inibidores – linfócitos B

No intuito de estabelecer a concentração de uso dos inibidores escolhidos para o estudo (MCC950: Inibidor específico de NLRP3; CGI1746: Inibidor específico da Btk), para os ensaios com linfócitos B purificados, foram testadas diferentes concentrações utilizando como referência a literatura recente (Ali et al., 2017).

Brevemente, foram mantidas $0,4 \times 10^6$ células CD19+ isoladas de controles saudáveis ($n = 5$) em meio RPMI-10% FBS na presença de 10, 100 e 200 μM do MCC950, ou de 1 e 10 μM do CGI1746 por 1 hora. Em seguida foi adicionado 1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS ou 200 $\mu\text{g/mL}$ de β -glucana por 24 horas ou 1 $\mu\text{g/mL}$ de CpG por 72h. O sobrenadante de cultura foi coletado a cada condição, e utilizado para dosagem de IL-1 β e IgM por Elisa e LDH por kits comerciais.

Na figura abaixo é possível observar que todas as concentrações de MCC950 levaram a uma inibição significativa dos níveis de IL-1 β ($p < 0,05$) tanto na estimulação com LPS (**A**) quanto na estimulação com β -glucana (**B**) e sem diferenças entre si. Já em relação ao CGI1746, somente a 10 μM que foi possível observar uma redução significativa dos níveis de IL-1 β frente a ambos estímulos (**A, B**).

Como mencionado anteriormente, para avaliação dos níveis de IgM, as células foram estimuladas com 1 $\mu\text{g/mL}$ de CpG por 72 horas, e a inibição foi observada na presença de MCC a 200 μM e CGI1746 a 10 μM .

Vale destacar que nenhuma das concentrações dos inibidores levou a um aumento significativo da morte celular avaliada pela dosagem de LDH no sobrenadante de cultura (**D**).

Em conjunto, os dados apresentados nos levaram a definir as concentrações de uso de 10 μM para o MCC950 e CGI1746. Somente nos ensaios de inibição dos níveis de IgM que foi utilizado a concentração de 200 μM de MCC950.

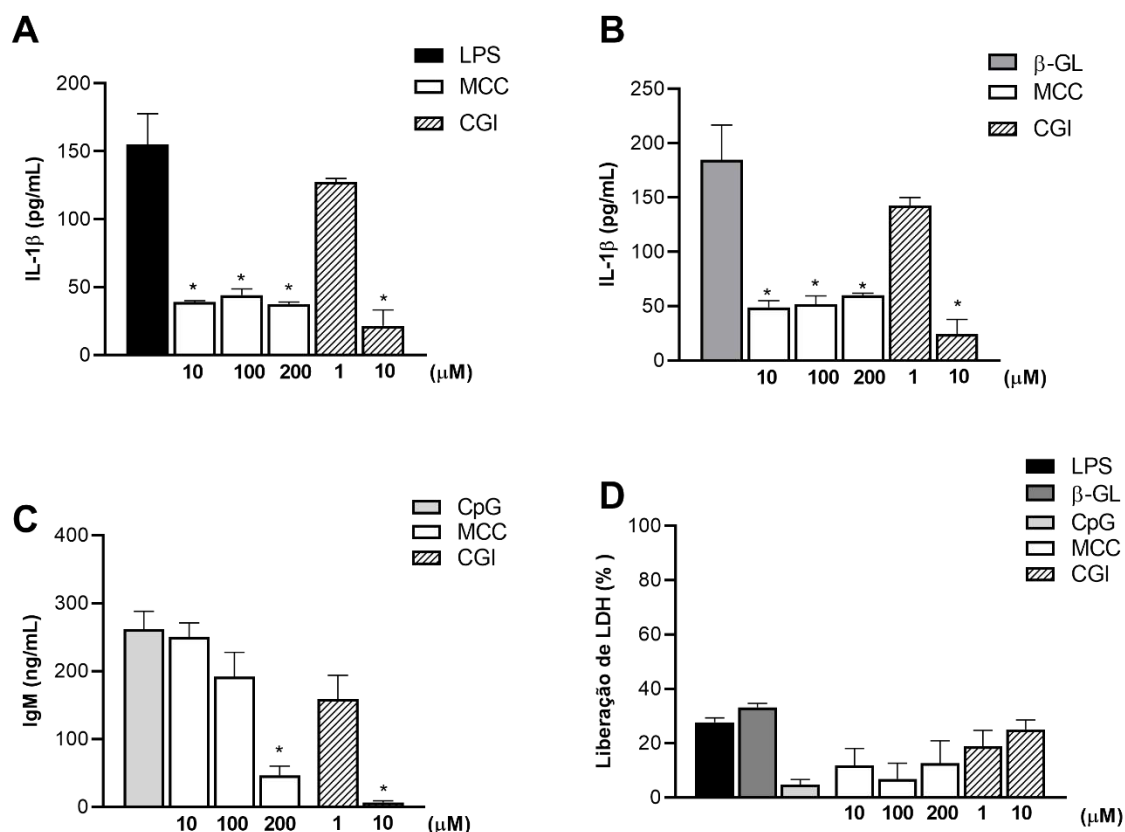


Figura. Padronização da concentração de MCC950 e CGI1746 para inibição do inflamassoma em linfócitos B humanos.

Linfócitos B CD19⁺ foram purificados de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de controles saudáveis (CS = 5) e cultivados em RPMI-1640 com 10% de SFB, pré-tratados com os inibidores MCC 950 (10, 100 ou 200 μM) ou CGI1746 (1 ou 10 μM) por 1 hora. Em seguida as células foram estimuladas com 1 μg/mL de lipopolissacarídeo (LPS) ou com 200 μg/mL de β-glucana por 24h, ou com 1 μg/mL de CpG por 72 horas. Foram coletados os sobrenadantes de cultura e dosado os níveis de IL-1β (**A**, **B**) e IgM (**C**) por Elisa, assim como a liberação de LDH (**D**). Todos os dados são representados como média ± desvio padrão (DP).

O teste de *Friedman* foi aplicado para comparar as condições LPS, β-glucana ou CpG em relação aos inibidores. (*p < 0,05).

APÊNDICE H– Resultado completo do estudo de associação

Resultado da análise de associação dos SNPs com as variáveis clínicas e laboratoriais dos pacientes HIV em ART.

Variável	Gene	SNP	<i>p-value</i>	<i>p-valuecorr</i>
CD4+ T ₁ (Células/mm ³)	NLRP3	rs10754558	0,32	0,46
		rs35829419	0,82	0,90
	IL1B	rs16944	0,006	0,001
	IL18	rs1834481	0,11	0,19
		rs5744256	0,13	0,20
	CARD8	rs2043211	0,21	0,30
	P2X7R	rs2230911	0,10	0,19
		rs3751143	0,08	0,10
IRF4	rs12203592	0,12	0,20	
KPNA2	rs8078543	0,21	0,28	
CD8+ T ₁ (Células/mm ³)	NLRP3	rs10754558	0,04	0,06
		rs35829419	0,023	0,04
	IL1B	rs16944	0,002	0,006
	IL18	rs1834481	0,29	0,32
		rs5744256	0,41	0,45
	CARD8	rs2043211	0,10	0,11
	P2X7R	rs2230911	0,42	0,50
		rs3751143	0,16	0,12
IRF4	rs12203592	0,21	0,09	
KPNA2	rs8078543	0,06	0,03	
Razão CD4+/CD8+ T ₁ (Células/mm ³)	NLRP3	rs10754558	0,29	0,22
		rs35829419	0,18	0,16
	IL1B	rs16944	0,11	0,10
	IL18	rs1834481	0,08	0,06
		rs5744256	0,09	0,07
	CARD8	rs2043211	0,43	0,41
	P2X7R	rs2230911	0,29	0,26
		rs3751143	0,41	0,44
IRF4	rs12203592	0,62	0,63	
KPNA2	rs8078543	0,29	0,27	
Nadir CD4+ T ₁ (Células/mm ³)	NLRP3	rs10754558	0,24	0,28
		rs35829419	0,56	0,54
	IL1B	rs16944	0,001	0,002
	IL18	rs1834481	0,31	0,33
		rs5744256	0,11	0,09
	CARD8	rs2043211	0,49	0,47
	P2X7R	rs2230911	0,13	0,12
		rs3751143	0,07	0,08
IRF4	rs12203592	0,15	0,19	
KPNA2	rs8078543	0,09	0,06	
Doença Autoimune (Sim/Não)	NLRP3	rs10754558	0,54	0,50
		rs35829419	0,16	0,14
	IL1B	rs16944	0,005	0,01
	IL18	rs1834481	0,89	0,81
		rs5744256	0,85	0,86
	CARD8	rs2043211	0,31	0,35
	P2X7R	rs2230911	0,21	0,14
		rs3751143	0,02	0,04
IRF4	rs12203592	0,14	0,12	
KPNA2	rs8078543	0,08	0,09	
	NLRP3	rs10754558	0,41	0,49

Doença Cardiovascular (Sim/Não)		rs35829419	0,57	0,73
	<i>IL1B</i>	rs16944	0,008	0,006
	<i>IL18</i>	rs1834481	0,85	0,81
		rs5744256	0,81	0,86
	<i>CARD8</i>	rs2043211	0,08	0,17
	<i>P2X7R</i>	rs2230911	0,35	0,44
		rs3751143	0,07	0,09
	<i>IRF4</i>	rs12203592	0,03	0,04
<i>KPNA2</i>	rs8078543	0,25	0,20	
Diabetes (Sim/Não)	<i>NLRP3</i>	rs10754558	0,21	0,26
		rs35829419	0,07	0,06
	<i>IL1B</i>	rs16944	0,12	0,19
	<i>IL18</i>	rs1834481	0,57	0,62
		rs5744256	0,54	0,56
	<i>CARD8</i>	rs2043211	0,09	0,13
	<i>P2X7R</i>	rs2230911	0,31	0,33
		rs3751143	0,08	0,10
<i>IRF4</i>	rs12203592	0,02	0,02	
<i>KPNA2</i>	rs8078543	0,11	0,13	
Doença Renal (Sim/Não)	<i>NLRP3</i>	rs10754558	0,15	0,19
		rs35829419	0,12	0,10
	<i>IL1B</i>	rs16944	0,16	0,13
	<i>IL18</i>	rs1834481	0,70	0,72
		rs5744256	0,71	0,75
	<i>CARD8</i>	rs2043211	0,62	0,68
	<i>P2X7R</i>	rs2230911	0,41	0,41
		rs3751143	0,06	0,07
<i>IRF4</i>	rs12203592	0,01	0,03	
<i>KPNA2</i>	rs8078543	0,26	0,28	
Doença Hepática (Sim/Não)	<i>NLRP3</i>	rs10754558	0,40	0,41
		rs35829419	0,91	0,92
	<i>IL1B</i>	rs16944	0,004	0,01
	<i>IL18</i>	rs1834481	0,51	0,56
		rs5744256	0,60	0,63
	<i>CARD8</i>	rs2043211	0,17	0,19
	<i>P2X7R</i>	rs2230911	0,41	0,41
		rs3751143	0,28	0,29
<i>IRF4</i>	rs12203592	0,22	0,27	
<i>KPNA2</i>	rs8078543	0,01	0,02	
Osteoporose (Sim/Não)	<i>NLRP3</i>	rs10754558	0,32	0,36
		rs35829419	0,64	0,67
	<i>IL1B</i>	rs16944	0,01	0,03
	<i>IL18</i>	rs1834481	0,83	0,84
		rs5744256	0,78	0,79
	<i>CARD8</i>	rs2043211	0,21	0,25
	<i>P2X7R</i>	rs2230911	0,32	0,38
		rs3751143	0,09	0,08
<i>IRF4</i>	rs12203592	0,13	0,10	
<i>KPNA2</i>	rs8078543	0,0	0,02	
Anti-HBsAg Média (mmIU/mL)	<i>NLRP3</i>	rs10754558	0,001	0,000
		rs35829419	0,31	0,37
	<i>IL1B</i>	rs16944	0,62	0,61
	<i>IL18</i>	rs1834481	0,35	0,41
		rs5744256	0,21	0,51
	<i>CARD8</i>	rs2043211	0,10	0,11
<i>P2X7R</i>	rs2230911	0,11	0,14	
	rs3751143	0,02	0,04	

p_{corr} "p" corrigido por gênero, idade, tempo de doença e tempo de ART.

APÊNDICE I – Artigo publicado: “Antagonistic role of IL-1 β and NLRP3/IL-18 genetics in chronic HIV-1 infection”.



Antagonistic role of IL-1 β and NLRP3/IL-18 genetics in chronic HIV-1 infection



Edione C. Reis^a, Vinicius N.C. Leal^a, Lais T. da Silva^b, Marília M.L. dos Reis^c, Enrique R. Argañaraz^c, Telma M. Oshiro^b, Alessandra Pontillo^{a,*}

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

^b Laboratório de Investigação em Dermatologia e Imunodeficiências - LIM 56, Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, SP, Brazil

^c Laboratório de Virologia Molecular, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília/UNB, Brasília, DF, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

HIV-1, chronic infection
NLRP3
Inflammasome
IL-1 β
IL-18

ABSTRACT

Host genetics affects both susceptibility and progression of HIV-1 infection. NLRP3 inflammasome provides a first-line defense in viral infections, and, accordingly, gain-of-function variants in *NLRP3* have been associated with protection against HIV-1.

Despite antiretroviral treatment (ART), HIV-infected patients continue to present systemic inflammation with a heterogeneous prognosis. As NLRP3 inflammasome is involved in several chronic diseases by amplifying “sterile” inflammation, its role in chronic phase of HIV infection has been postulated.

Little is known about inflammasome genetics in HIV-infected patients and whether it may play a role in the different clinical outcomes. Therefore, we questioned whether NLRP3 inflammasome genetics could affect the clinical course of HIV-1 infection as it does in host/virus interaction.

For this purpose, we analyzed selected single nucleotide polymorphisms (SNPs) in ART-treated HIV-infected patients ($n = 300$), in Long Term Non-Progressors/Elite Controllers and progressors ($n = 133$), and in HIV-infected individuals submitted to dendritic cell (DC)-based immunotherapy ($n = 19$).

SNPs leading to increased activation of NLRP3 inflammasome are beneficial for patients, while SNPs that negatively affect NLRP3 activation or IL-18 production, detrimental. In contrast, gain-of-function variant in *IL1B* is also detrimental for patients, suggesting that while IL-1 β possible contributes to immune exhaustion, the axis NLRP3-inflammasome/IL-18 could act positively in chronic infection. Functional assays supported genetic results: *NLRP3* variants associated with good quality HIV+ DC, and *IL1B* -511C > T with a poor one. Loss-of-function SNPs affect HIV + T cells proliferation.

These findings proposed for the first time that NLRP3 inflammasome, mainly through IL-18, play a protective role in chronic HIV infection.

1. Introduction

To counteract infections, several cytoplasmic innate immune receptors (i.e.: NLRP3, NLR4, AIM2) are known to induce the assembly of the multiprotein complex termed inflammasome, which lead to the activation of inflammatory caspase-1 and the consequent cleavage of several substrates including the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and IL-18, and the cell death pyroptosis protein, gasdermin D [1]. On the other side, inflammasome could be improperly activated in sterile condition causing severe chronic inflammatory disorders, such as autoimmunity, obesity and cardiovascular diseases [2].

Some inflammasome receptors (i.e.: NLR4 and AIM2) directly

recognize molecular patterns both from pathogens (PAMPs) or from host tissue damage/stress (DAMPs), while others, such as NLRP3, can be indirectly activated by several PAMPs and DAMPs through the induction of cytoplasmic alterations, such as ATP-dependent K⁺ efflux (by P2X7 receptor), lysosomal or mitochondrial damage [1].

Gain-of-function polymorphisms in NLRP3 (i.e.: missense substitution p.Q705K/rs35829419; 3'UTR variant rs10754558) lead to the decrease of inflammasome activation threshold and a general increase of IL-1 β and IL-18 production [3,4]. Loss-of-function variants in NLRP3 regulators could increase inflammasome activation, such in the case of the non-sense variation rs2043211 (Cys10Ter) in NLRP3 inhibitor CARD8 [5], or decrease it, as for missense substitutions in P2X7 (as

* Corresponding author at: Avenida Prof. Lineu Prestes, 1730, Cidade Universitária, São Paulo, SP, Brazil.

E-mail address: alepontillo@usp.br (A. Pontillo).

<https://doi.org/10.1016/j.clim.2019.108266>

Received 28 August 2019; Received in revised form 23 September 2019; Accepted 2 October 2019

Available online 24 October 2019

1521-6616/ © 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

Table 1

Demographic and clinical characteristics of HIVinfected cohorts. Sex, age, time of diagnosis (total and before the treatment) as well as plasma viral load (PVL) and CD4+ T cells counts before (0) and after [1] the treatment (ART or DC-based immunotherapy) were reported. For CD4+ T cells mean level and nadir of values collected during follow-up were indicated. Data are expressed as mean \pm standard deviation (SD), except where alternatively indicated. LTNP: long-term non progressors; EC: elite controllers; P: progressors. TB: tuberculosis.

Cohort ID	Cohort 1	Cohort 2	Cohort 3
Subjects, n	300	133	19
Sub-groups, (n)	–	LTNP/EC (84)	P (49)
Sex (M/F), n	187/113	58/26	36/13
Age (years), mean \pm SD	52.22 \pm 10.95	43.06 \pm 11.55	37.33 \pm 10.78
Time of diagnosis (years), mean \pm SD	19.43 \pm 5.74	10.92 \pm 7.02	5.47 \pm 3.57
Time of diagnosis before treatment (years), mean \pm SD	0.85 \pm 1.94	–	–
Subjects with non-HIV morbidity, n	52	0	0
PVL ₀ (log RNA copies/mm ³)	4.55 \pm 1.10	2.50 \pm 1.65	3.54 \pm 1.66
PVL ₁ (log RNA copies/mm ³)	\leq 1.7	–	–
CD4+ T ₀ (cells/mm ³), mean \pm SD	322.5 \pm 278.3	609.4 \pm 213.3	314.6 \pm 244
CD4+ T ₁ (cells/mm ³), mean \pm SD	755.4 \pm 471.0	–	–
CD4+ T ₁ (cells/mm ³), mean nadir \pm SD	403.9 \pm 229.5	–	–

largely reviewed by Di Virgilio et al. [6,7]. As expected, due to NLRP3 inflammasome role in innate immunity and inflammation, these polymorphisms have been associated with protection against microbes [8–11] or eventually to susceptibility to chronic sterile diseases [8,12].

Previous results from our group have shown the protective effect of *NLRP3* rs10754558 3'UTR gain-of-function variant on HIV-1 susceptibility [13,14], suggesting an important role of NLRP3 during the first contact with HIV. Subsequent studies demonstrated that the virus is able to activate NLRP3 inflammasome in monocytes [15] and dendritic cells (DC) [16] resulting in IL-1 β and IL-18 production, innate immune response and inflammation at the site of infection.

Altogether, these findings indicate a role of NLRP3 inflammasome in the first line defense against HIV-1. However, poor data are nowadays available about the role of the complex in the chronic infection and the resulting immune system exhaustion of HIV-infected patients. Despite antiretroviral treatment (ART), HIVinfected patients continue to present systemic inflammation with heterogeneous prognosis (i.e.: cardiovascular diseases, metabolic disorders and neurologic impairment) [17]. Since NLRP3 inflammasome is dysregulated in several chronic diseases, such as metabolic disorders and obesity, neurodegenerative diseases, autoinflammatory syndromes and autoimmune diseases [2], in which it plays a pivotal function amplifying “sterile” inflammation, a role in chronic phase of HIV infection also have been postulated [18,19]. Several molecules were developed to specifically inhibit different checkpoints of inflammasome activation [20,21]. Pharmacologic inhibition of inflammasome could represent a targeted treatment for chronic complications in HIV-infected patients, and the demonstration of inflammasome contribution is an appealing challenge.

As above-mentioned, genetic variants in inflammasome components and/or regulators modulate the threshold of complex activation and contribute to the heterogeneity of clinical manifestations of specific infectious or sterile diseases, leading to the use of inflammasome inhibitors in genetic positive individuals [21].

Although it was demonstrated an important role of inflammasome genetics during the first contact with HIV [13,14], little is known about inflammasome genetics in HIV-infected patients and whether it may play a role in the different clinical outcomes. Therefore, we questioned whether NLRP3 inflammasome genetics could affect the clinical course of HIV-1 infection as it does in host/virus interaction.

Whether at the first host/virus interaction the activation of NLRP3 inflammasome seems to be important to counteract HIV-1 acquisition [15,16], we hypothesize that, once the infection is established, the activation of inflammasome, leading to the production of pro-inflammatory cytokines IL-1 β and IL-18, and/or eventually contributing to immune cells loss through pyroptosis, may be disadvantageous rather than beneficial.

Considering that host genetics affect both the susceptibility as well

as the progression of HIV infection, we then questioned whether inflammasome genetics could affect the clinical course of HIV-1 infection.

For this purpose, we evaluated the effect of functional NLRP3 inflammasome genetic variants on plasma viral load and T lymphocytes level in a cohort of HIV+ chronically infected patients. We then replicated the study in a cohort of patients classified as Long Term Non-Progressors (LTNP) or Elite Controllers (EC) and progressors (P), and in a group of HIV-infected individuals submitted to DC-based immunotherapy. These last two cohorts help us to refine our results by elucidating the contribution of inflammasome genetics in individuals that naturally control HIV infection (LTNP/EC), or better respond to immunization, as an indirect measure of immune system preservation/exhaustion of HIVinfected patients.

2. Patients and methods

2.1. Cohort 1: São Paulo (SP) HIV cohort

300 HIV-infected patients (52.22 \pm 10.95 years), proceeding from the metropolitan area of São Paulo (SP, Brazil), seropositive for at least 5 years (19.43 \pm 5.74 years), in antiretroviral therapy were recruited for genomic DNA isolation at the service for HIV-infected patients health care (SEAPH) of “Hospital das Clinicas” and Faculty of Medicine, University of São Paulo (HC-FMUSP; SP, Brazil) from January 2016 to December 2018. Plasma HIV RNA levels and CD4+ T cell counts were measured either before the start of ART and during the course of clinical care by the clinical laboratory associated with the medical center. As all the patients were nowadays in ART, we estimated the genetic association taking into account the clinical data before and after the start of ART (mean or nadir values obtained from follow-up data). 52 out of 300 patients present of at least one of non-HIV diseases (i.e.: tuberculosis, opportunistic infection, osteoporosis, cardiovascular diseases, autoimmune diseases, renal or liver failure). Demographic characteristics of the participants, as well as PVL and T lymphocytes counts before and after the start of ART are summarized in Table 1.

2.2. Cohort 2: long-term non-progressors (LTNP), elite controllers (EC) and progressors (P)

Genomic DNA of 133 HIV infected patients (43.06 \pm 11.55 years) naïve for ART and grouped according to clinical disease progression in EC (50–1000 copies HIV genome/mm³, and > 400 CD4+ T lymphocytes/mm³), LTNP (< 10,000 copies HIV genome/mm³, and > 400 CD4+ T lymphocytes/mm³), and P (> 10,000 copies HIV genome/mm³, and < 200 CD4+ T lymphocytes/mm³) was included in the study. Main characteristics of this cohort are described in [22] and summarized in Table 1. For genotyping analysis we grouped EC and

LTNP ($n = 84$) and P ($n = 49$).

2.3. Cohort 3: Immunized HIV-infected patients

Genomic DNA and peripheral blood samples of 19 HIV-infected patients from metropolitan area of São Paulo (SP, Brazil) and submitted to DC-immunotherapy at the Laboratory of Medical Investigation (LIM)-56 of HC-FMUSP (phase I/II clinical trial; clinical [trial.gov](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02766049) ID: NCT02766049) were used for genotyping and cellular assays. All patients were adult (34.37 ± 7.97 years), seropositive for at least 5 years (8.37 ± 2.16), naïve for ART for at least 1 year, and without clinical AIDS or other infectious or chronic diseases, with blood CD4⁺ T cells count > 350 cells/mm³, and PVL > 1000 copies HIV genome/mm³ before the start of the immunization. They were vaccinated with three doses of $3\text{--}30 \times 10^6$ autologous HIV-pulsed DC in 2-week intervals (according to phase-I trial [23]) and followed-up for 1 year. Complete data of the trial are not yet published, however the immunization product resulted safe, with no adverse events, but with a modest effect on PVL and T cell count. Main characteristics of the participants, as well as PVL and T lymphocytes counts before and after 1 year of the immunization, are summarized in Table 1.

2.3.1. Ethical statement

All subjects gave informed consent and the research protocols were approved by the corresponding institutional review boards on the conduct of research human subjects at each study site.

2.3.2. Laboratory analysis

The plasma viral load was quantified using the VersantR HIV-1 RNA 3.0 Assay bDNA kit (Bayer Corporation) and System 340 bDNA. The T lymphocytes count was performed using CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC with BD Trucount™ Tubes by flow cytometry (FACSCalibur) (BD Biosciences).

2.3.3. SNPs genotyping

Eight single nucleotide polymorphisms in NLRP3 inflammasome components and related cytokines were selected based on literature and on previous results, as detailed in Table 2. Genotyping was performed by commercially available allele-specific TaqMan assays (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) and qPCR on a QuantStudio 3.0 real-time PCR instrument (Applied Biosystems). Allelic discrimination was performed using the QuantStudio 3.0 software (Applied Biosystems).

2.3.4. Cellular functional assays

Peripheral blood of HIV-infected patients belonging to cohort 3 was collected for monocytes-derived DC obtainment before the start of immunization protocol. Briefly, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from fresh blood by Ficoll-Paque gradient (GE Healthcare), following the manufacturer's protocol. PBMC were used for monocytes and lymphocytes obtainment. Monocytes were cultured at $1.5\text{--}2 \times 10^6$ cells/ml in AIM-V medium (Gibco, Thermo Fisher Scientific) containing 50 ng/ml GM-CSF (Cell-Genix) and 50 ng/ml IL-4 (Cell-Genix) for 5 days to differentiate in immature DC (iDC). Lymphocytes were frozen and stored to be used for autologous DC-lymphocytes co-culture assays. DC were pulsed with autologous aldrithiol-inactivated HIV-1 (10^6 viral particles/ 30×10^3 DC) for 4 h, and then treated with 50 ng/ml IL-4, 50 ng/ml GM-CSF, 50 ng/ml TNF, 10 ng/ml IL-1 β , 100 ng/ml IL-6 for 48 h to become mature DC (mDC). DC maturation and activation were analyzed by the expression of cell surface markers (CD14, CD11c, HLA-DR, CD80, CD86, CD83, CD40, DC-SIGN, CCR6) and flow cytometry (FACSCalibur) (BD Biosciences). Cell viability was determined by the use of LIVE/DEAD® kit (Thermo Fisher Scientific) and flow cytometry (FACSCalibur) (BD Biosciences). Phagocytosis capacity of iDC was evaluated by cell internalization of fluorescently labelled (FITC) dextran beads and flow cytometry.

Ability of mDC to activate T cells was tested by mDC/autologous T

lymphocytes co-culture assays. Briefly, 4×10^4 mDC were cultured with 2×10^5 autologous T lymphocytes (ratio: 1/5) in duplicates in 96-round bottom wells plates for 24 and 96 h. Brefeldin A (20 μ g/ml; Sigma-Aldrich) was added 6 h before the end of assay. T lymphocytes proliferation was measured by the mean of CFSE dilution (Thermo Fisher Scientific). IFN- γ , MIP-1 β , IL-2 and TNF production by T lymphocytes were measured by intracellular staining and flow cytometry (FACSCalibur) (BD Biosciences).

2.3.5. Statistical analysis

Multivariate analysis and general linear model (GLM) were used to analyse the SNPs associated with clinical or laboratory variables ("SNPassoc" package; www.r-project.org). Data were adjusted for sex, age, time from diagnosis and presence of non-HIV chronic diseases (yes/no). Akaike information criterion (AIC) was used for the selection of the best fitting model of inheritance of each SNP [24]. Haploview software [25] was used to investigate the linkage disequilibrium (LD) pattern and for deriving the haplotypes. The Fig. 1 showed the LD blocks and the haplotypes for blocks. Rare haplotypes (< 0.05) were excluded from analysis. Taking into account that *IL1B* and *IL18* SNPs share the same genetic locus (2q13-q21), and that 2 SNPs of *NLRP3* and *P2X7* also are supposed to present a LD, a formal Bonferroni correction for the number of independent genetic loci would require a significance threshold of $p = .013$ (p_0/n , $p_0 = 0.05$, $n = 4$ independent loci). Multi t -test was applied in time-course analysis.

3. Results

Multivariate analysis of inflammasome SNPs distribution in HIV-infected patients (cohort 1) was performed according to PVL and CD4+ T lymphocytes count before and after ART (the arithmetic mean and nadir of 10-years follow-up have been used). Sex, age and time of disease before ART or total time of disease, respectively, were included in the analysis as confounder variables. Complete analysis is included in Supplementary File 1. Statistically significant results are resumed in Table 3.

Both *IL18* variants resulted significantly associated with PVL before the start of ART, being more frequent in patients with a high PVL₀, according to a dominant model of inheritance for the minor allele (rs1834481 C/G + G/G: 5.0 ± 0.1 , versus C/C: 4.4 ± 0.1 ; and rs5744256 A/G + G/G: 5.0 ± 0.1 , versus A/A: 4.1 ± 0.1) (Table 3).

Accordingly, the haplotype containing minor alleles of both SNPs (rs1834481/G-rs5744256/G; frequency: 0.16) was significantly associated to increased PVL₀ when compared to the wild type one (rs1834481/A-rs5744256/C: frequency: 0.83) (G-G: 4.8 ± 0.3 log RNA copies/ml, versus A-C: 3.8 ± 0.1 log RNA copies/mm³; $p_{\text{adj}} = 0.006$).

These two variants (analyzed alone or in haplotypes) did not associate to CD4+ T cells count before ART ($p_{\text{adj}} > 0.05$), nor with clinical variables after ART ($p_{\text{adj}} < 0.05$) (Supplementary File 1). *IL18* haplotypes did not associate with PVL₁, or CD4+ T cells count.

Differently from *IL18* SNPs, the gain-of-function promoter variant *IL1B* rs16944 (previously known as -511C > T) resulted differently distributed according to CD4+ T cells level in ART treated patients (CD4+ T₁) being more frequent in patients with a lower lymphocytes' count after the start of the treatment (T/T: 538.4 ± 39.0 cells/mm³; C/C + C/T: 660.1 ± 20.5 ; according to a recessive model of inheritance for the minor T allele (Table 3). Moreover, during follow-up, rs16944 T/T carriers showed a reduction of CD4+ T cells level compared to non-carriers (C/C + C/T) ($p = .001$) (Fig. 2).

P2X7 rs2230911 (Ser357Thr) resulted significantly associated with PVL in HIV-infected individuals before the start of ART, being G/G genotype more frequent in patients with higher PVL₀ (G/G: 6.2 ± 0.2 log RNA copies/mm³), than C/C or C/G (C/C + C/G: 4.5 ± 0.1 log RNA copies/mm³), according to a recessive model of inheritance for the minor G allele (Table 3). The same polymorphism resulted associated to lower plasma level of CD4+ T₀ (G/G: 27.5 ± 26.5 cells/mm³) than C/

Table 2

Genetic variants in inflammasome components. Identification number of polymorphism (ID), gene and RefSeq sequences, chromosomal position (Position; from GRCh38.p12 sequencing release), nucleotide and amino acidic change (Variation), functional effect (Effect) and relative reference (Ref), as well as minor allele frequency (MAF) in different populations (EUR: european-ancestral; AFR: african-ancestral; SAS: south asian-ancestral; EAS: east-asian ancestral; AMR: amerindian-ancestral; from 1000Genome project) are reported. For each gene, the chromosomal locus, the mRNA and protein reference sequences are indicated. Data about functional effect of polymorphism were obtained from literature, and/or from public databases of gene/protein expression (<https://www.GTEX.org>; and/or <https://www.proteinatlas.org>).

Gene (RefSeq)	ID	Position (GRCh38.p12)	Variation	Effect	EUR	AFR	SAS	EAS	AMR
<i>NLRP3</i> NG_00709.2 NM_004895.4	rs35829419	247425556	g.247425556 C > A c.2113C > A p.(Gln705Lys)	Increased IL-1 β /IL-18 production [3]	0.05	0.01	0.04	0	0.02
	rs10754558	247448734	g.247448734 G > C c.*230 G > C	Higher <i>NLRP3</i> mRNA stability; [4] lower miR223, miR4273 binding	0.46	0.25	0.37	0.41	0.25
<i>IL1B</i> NG_008851.1 NM_000576.2	rs16944	112837290	g.112837290 A > G c.-598 T > C	Increased IL-1 β release [23]	0.35	0.57	0.60	0.47	0.55
<i>IL18</i> NG_028143.1 NM_001562.4	rs5744256	112152125	g.112152125 A > G	Lower plasma level of IL-18 [26]	0	0.22	0.06	0	0.10
	rs1834481	112153104	g.112153104C > G	Lower plasma level of IL-18 [29]	0.20	0	0.06	0	0.10
<i>CARD8</i> NG_029574.2 NM_001184900.3	rs2043211	48234449	g.48234449 A > T c.304 T > A p.(Phe102Ile)	Increased IL-1 β release Higher <i>CARD8</i> expression* [5]	0.33	0.18	0.32	0.51	0.27
<i>P2X7R</i> NG_011471.2 NM_002562.6	rs3751143	121184501	g.121184501A > C	Loss of function – suboptimal receptor assembly affecting pore formation [7]	0.20	0.08	0.32	0.27	0.19
	rs2230911	121177328	g.121177328C > G	Loss of function – partial reduction in channel and pore formation [7]	0.08	0.16	0.19	0.17	0.26

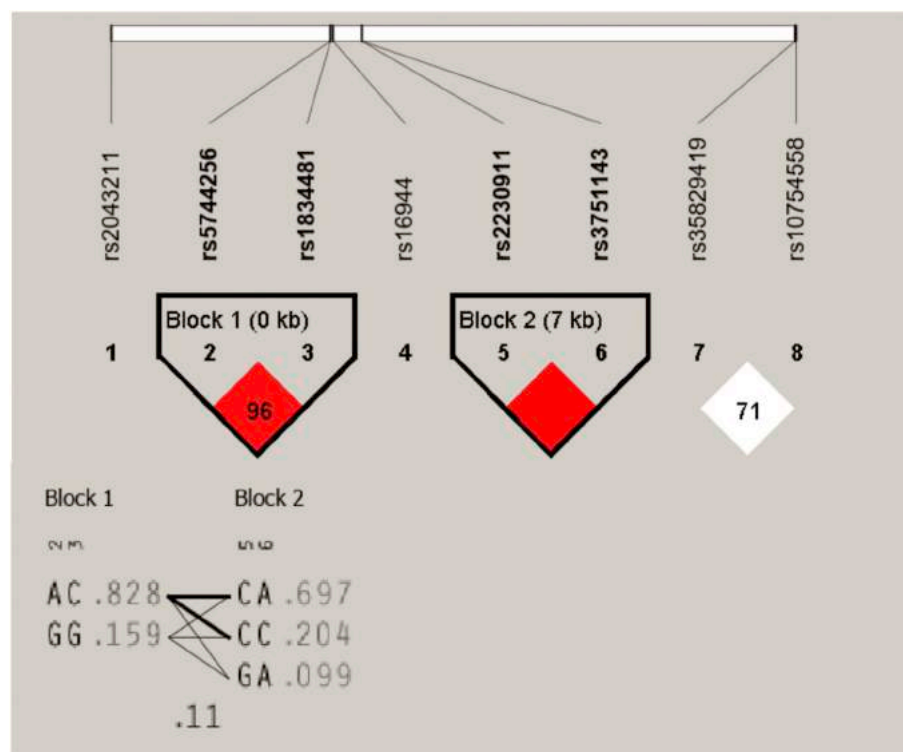


Fig. 1. Linkage Disequilibrium analysis results for inflammasome SNPs in the studied cohort. Haploview plot shows haploblocks and Linkage Disequilibrium (LD) values (reported as D'/LOD) for inflammasome SNPs genotyped in cohort 1.

C or C/G (C/C + C/G: 331.2 ± 19.2 cells/mm³) according to a recessive model of inheritance (Table 3). Differently, rs3751143 (Glu496Ala) was not associated with PVL₀ and CD4 + ₀ T cells count ($p_{adj} > 0.05$) (Supplementary File 1). None of those SNPs significantly

associated with clinical data after ART (Supplementary File 1). Accordingly, *P2X7* haplotypes did not result significantly associated to PVL nor to CD4 + T cells count (data not shown).

NLRP3 variants rs35829419 (Gln705Lys) and rs10754558 (3'UTR)

Table 3

Multivariate analysis results for inflammasome SNPs association with HIV-infected patients clinical variables. Multivariate analysis was performed for inflammasome SNPs and plasma viral load (PVL) and CD4 T cells count (CD4 + T) before and after antiretroviral therapy (ART). Sex, age, time of disease and presence of non-HIV morbidities were included in the analysis as confounder variables. Only statistically significant results after correction for multiple comparisons ($p < .013$) are reported. Gene, single nucleotide polymorphism (SNP) or SNPs haplotype, genotypes and haplotypes distribution (frequency), mean \pm standard error (SE), adjusted p -values (p_{adj}) are reported for plasma viral load before (PVL₀) and after (PVL₁) the start of ART, and for CD4 + T cells count before (CD4 + T₀) and after (CD4 + T₁) the start of ART.

Clinical variable	Gene	SNP/haplotype (minor allele)	Genotypes /Haplotypes (frequency)	Mean \pm SE	P_{adj}
Before ART					
PVL ₀ (log RNA copies/mm ³)	<i>IL18</i>	rs1834481 (G)	C/C (0.68)	4.4 \pm 0.1	0.005
			C/G (0.30)	5.0 \pm 0.1	
			G/G (0.02)	4.9 \pm 0.3	
		rs5744256 (G)	A/A (0.70)	4.1 \pm 0.1	0.006
			A/G (0.27)	4.9 \pm 0.1	
			G/G (0.03)	5.2 \pm 0.3	
		rs1834481(G)-rs5744256 (G)	others (0.83)	4.3 \pm 0.1	0.006
			/G-/G (0.16)	4.8 \pm 0.3	
	<i>P2X7</i>	rs2230911 (G)	C/C (0.81)	4.6 \pm 0.1	0.012
			C/G (0.18)	4.1 \pm 0.3	
			G/G (0.01)	6.2 \pm 0.2	
CD4 + T ₀ (cells/mm ³)	<i>P2X7</i>	rs2230911 (G)	C/C (0.84)	288.1 \pm 18.4	0.008
			C/G (0.16)	424.6 \pm 49.5	
			G/G (0.01)	27.5 \pm 26.5	
After ART					
CD4 + T ₁ (cells/mm ³)	<i>IL1B</i>	rs16944 (T)	C/C (0.34)	724.8 \pm 41.3	0.002
			C/T (0.51)	652.5 \pm 24.7	
			T/T (0.15)	497.8 \pm 38.2	

as well as *CARD8* rs2043211 (Cys10Ter) did not result significantly associated with PVL or CD4 + T cells count in this cohort after Bonferroni correction.

Taking into account that all studied SNPs affect the same complex, we then analyzed the effect of interaction (epistasis) between SNPs in different genes (*NLRP3*, *CARD8*, *P2X7*, *IL1B* and *IL18*) and clinical parameters by the meaning of a two-SNPs model of interaction. In Fig. 3 adjusted p -values for SNPs interaction log-likelihood ratio (LRT) test were graphically resumed for PVL₀ (Fig. 3a), PVL₁ (Fig. 3b), CD4 + T₀ (Fig. 3c) and CD4 + T₁ (Fig. 3d). When we performed the multivariate analysis of SNPs with major interactions score, we observed that none

of the combinations significantly associated with clinical variables according to Bonferroni threshold (Supplementary File 2).

Then we tested the SNPs interaction in 10-years follow up, we observed that *NLRP3* SNPs together (rs35829419 and rs10754558) or as well as rs35829419 (Gln705Lys) and *CARD8* rs2043211 (Cys10Ter) combination positively affect CD4 + T cells levels (Fig. 3e–f).

Altogether these results point out for an opposite role of inflammasome cytokines in chronic HIV infection. For what concerns *NLRP3* receptor, it appears to exert a beneficial role during chronic infection.

According to these findings we hypothesized that *NLRP3/IL-18* axis

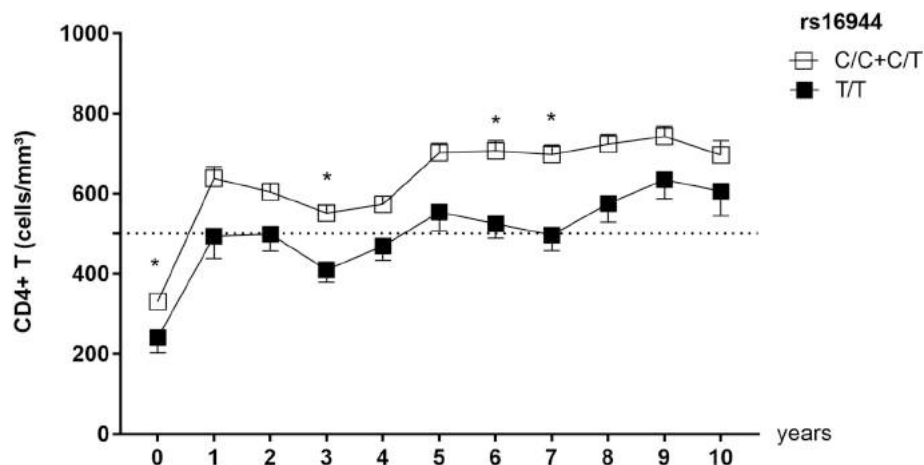


Fig. 2. Effect of variant *IL1B* rs16944 on CD4 + T lymphocytes level in HIV-infected patients. CD4 + T cells levels according to *IL1B* rs16944 genotypes during 10-years follow up. Multiple t -test significance (*: $p < .05$). Dotted line indicated the threshold for CD4 + T cells (500 cells/mm³).

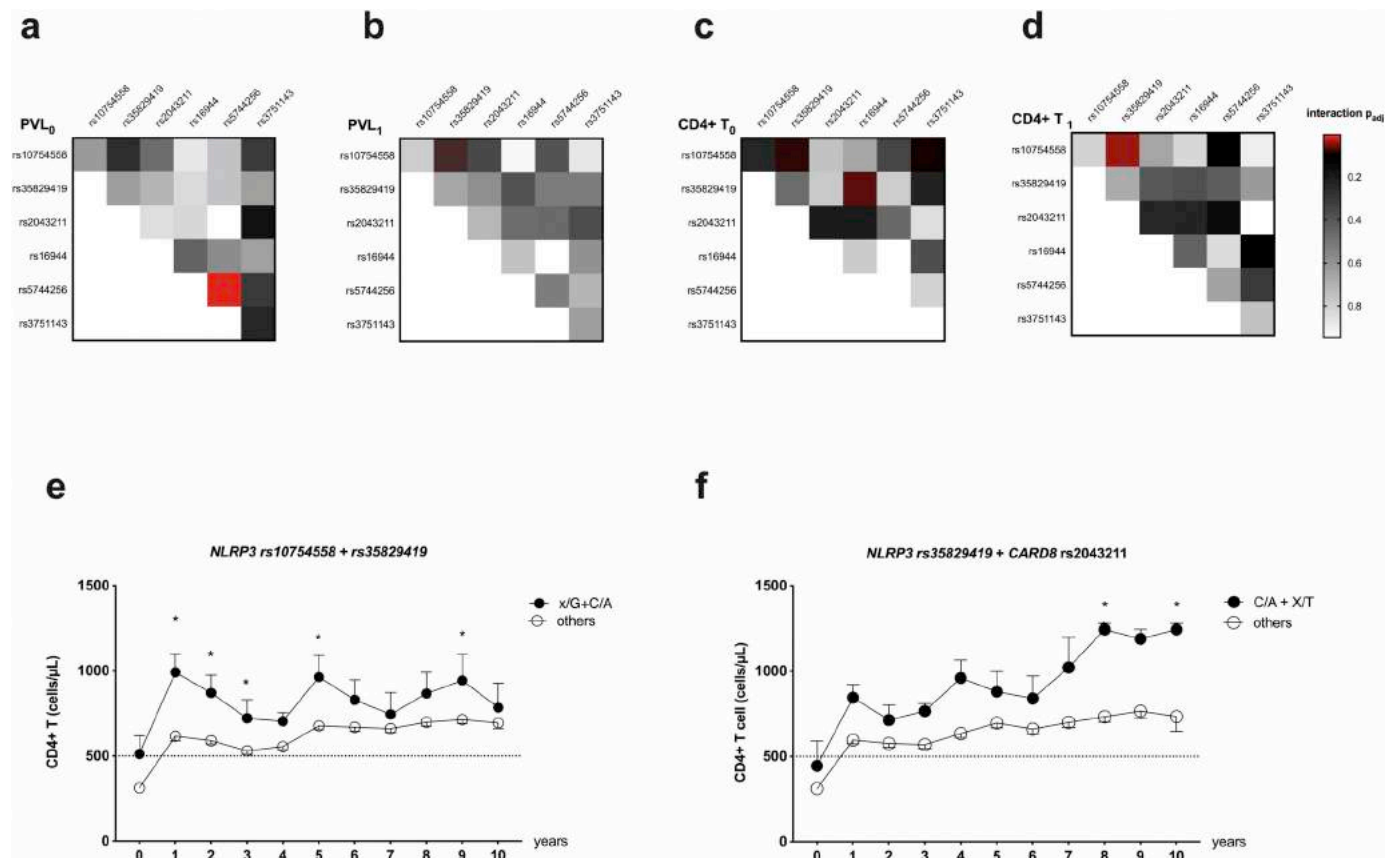


Fig. 3. Effect of SNP-SNP interaction on clinical variable of HIV-infected patients.

a–d) A SNP-SNP interaction analysis was performed in cohort 1 by the meaning of a log-likelihood ratio test. Interaction plots for each SNP using for genetic models. Each plot contains the adjusted p -values (p_{adj}) for the interaction (epistasis) log-likelihood ratio (LRT) test obtained for PVL_0 (a), PVL_1 (b), $CD4 + T_0$ (c) and $CD4 + T_1$ (d) variables.

e) 10-years time-course of $CD4 + T$ cells count in HIV-infected patients of cohort 1. Data were grouped according to *NLRP3* rs10754558 C > G and rs35829419 C > A individual genotypes (dominant model for rs10754558). Multiple t -test significance (*: $p < .05$). Dotted line indicated the threshold for T $CD4 +$ cells (500 cells/ mm^3).

f) 10-years time-course of $CD4 + T$ cells count in HIVinfected patients of cohort 1. Data were grouped according to *NLRP3* rs35829419 C > A and *CARD8* rs2043211 individuals genotypes (dominant model for rs2043211). Multiple t -test significance (*: $p < .05$). Dotted line indicated the threshold for T $CD4 +$ cells (500 cells/ mm^3).

could be relevant in natural infection and contribute to the HIV controlling phenotype. Therefore we genotyped the eight polymorphisms in a cohort ($n = 133$) of untreated HIV-infected patients classified in elite controllers, long-term non-progressors and progressors (cohort 2). However any statistical significant difference after Bonferroni correction was observed when SNPs frequency was compared between LTNP/EC and P (Supplementary File 3), even if a trend of protective effect toward a worse progression was observed for *NLRP3* rs10754558 ($p_{adj} = 0.034$; $OR_{adj} = 0.24$).

Finally, we have the opportunity to test the same polymorphisms in a limited ($n = 19$) but an interesting cohort of untreated HIV-infected individuals submitted to DC-based immunotherapy and followed up for one year. Previous results from our group have shown that individual genetic background could influence the immunization success in these patients [26,27] as well as it affects HIV susceptibility and/or prognosis, possibly through modulation of immune cells status. Therefore, we hypothesize to observe a similar trend of association between individuals with good control of infection in cohort 1 (ART-treated HIV patients) and individuals with a successful immunization in cohort 3 (DC-immunized HIV patients), and vice-versa. With this purpose, a multivariate analysis was realized for the SNPs according to PVL and $CD4 + T$ lymphocytes count. Age, sex and time of disease were included in the analysis as confounding variables. Main results are presented in

Table 4.

In line with the above-mentioned findings, *IL1B* rs16944 significantly associated with high PVL_0 in this cohort ($p_{adj} = 0.005$). On the other side, the loss-of-function variant rs2043211 in *CARD8* positively impact $CD4 + T_0$ counts ($p_{adj} = 0.009$), whereas *P2X7* rs3751143 was encountered to be more frequent in patients with a reduced $CD4 + T$ counts before the immunization ($p_{adj} = 0.010$). The same variant appeared to be more frequent in individuals with a high PVL_1 ($p_{adj} = 0.012$).

Once again, our results pointed to an opposite role of *IL-1 β* and *NLRP3* pathway.

Trying to better understand how inflammasome genetics could affect immunity in these patients, we then performed a multivariate analysis taking into account phenotypic and functional characterization of monocytes, DC and T lymphocytes of HIVinfected patients before the immunization. Age, sex and time of disease were included in the analysis as confounding variables. Due to the limited size of cohort, we decided to exclude results with groups of only 1 patient, independently from the p -value. Statistical significant results are summarized in Table 5 (complete results in Supplementary File 4) and selected results are reported graphically in Fig. 4.

As detailed below, the analysis returned a set of results that quite fitting with previous findings. Two SNPs that positively increased

Table 4

Multivariate analysis results for inflammasome SNPs association with HIV-infected patients response to dendritic cell-based immunotherapy. Multivariate analysis was performed for inflammasome SNPs and plasma viral load (PVL) and CD4 T cells count (CD4 + T) before and after dendritic cell-based immunotherapy. Sex, age and time of disease were included in the analysis as confounder variables. Only statistically significant results after correction for multiple comparisons ($p < .013$) are reported. Gene, single nucleotide polymorphism (SNP), genotypes distribution (individual count, n), mean \pm standard error (SE), adjusted p-values (p_{adj}) are reported for plasma viral load before (PVL₀) and after (PVL₁) the start of ART, and for CD4 + T cells count before (CD4 + T₀) and after (CD4 + T₁) the start of immunization.

Clinical variable	Gene/SNP ID (minor allele)	Genotypes (n)	Mean \pm SE	p_{adj}
Before immunotherapy				
PVL ₀ (log RNA copies/mm ³)	<i>IL1B</i> rs16944 (T)	C/C (7)	3.9 \pm 0.2	0.005
		C/T (8)	4.0 \pm 0.2	
		T/T (4)	4.8 \pm 0.3	
CD4 + T ₀ (cells/mm ³)	<i>CARD8</i> rs2043211 (T)	A/A (7)	378.1 \pm 37.7	0.009
		A/T (9)	508.9 \pm 30.6	
		T/T (3)	490.0 \pm 26.85	
	<i>P2X7</i> rs3751143 (C)	A/A (12)	492.8 \pm 28.2	0.010
		A/C (5)	390.8 \pm 34.62	
		C/C (2)	360.0 \pm 40.0	
After immunotherapy				
PVL ₁ (log RNA copies/mm ³)	<i>P2X7</i> rs3751143 (C)	A/A (12)	2.9 \pm 0.4	0.012
		A/C (5)	4.6 \pm 0.4	
		C/C (2)	-0.0 \pm 0.2	

NLRP3 inflammasome activation, namely *NLRP3* rs10754558 and *CARD8* rs2043211, associated with a better quality of monocytes-derived DC suggests that patients carrying these SNPs were less prone to constitutive immune activation than non-carriers.

On the other side, *IL1B* rs16944, which was previously associated with a worse condition of HIV-infected patients, here associated less clearly with DC activation.

Monocytes used for DC differentiation from patients with *CARD8* rs2043211 polymorphism resulted more activated (according to increased surface expression of CD86) than non-carriers ($p_{adj} = 5.5 \times 10^{-5}$) (Table 5).

iDC from patients with *NLRP3* rs10754558 or *IL1B* rs16944 variants performed a higher phagocytic activity iDC from non (Table 5; Fig. 4a–b). *NLRP3* rs10754558 oppositely affects DC-SIGN and CCR6 surface expression in iDC (Table 5).

After maturation and in vitro stimulation with autologous inactivated virus, mDC from rs10754558 carriers resulted more activated, at least in term of surface expression (Table 5; Fig. 4c). CCR5 and CCR6 resulted significantly downregulated in these patients compared to non-carriers (Table 5; Fig. 4d–e). Accordingly, the loss-of-function variant *CARD8* rs2043211 positively associated with CD86 surface expression (Table 5). *IL1B* rs16944 significantly associated with surface expression of chemokine receptor CXCR4 (Table 5; Fig. 4f).

4. Discussion

The main findings in this study including: [1] it described the distribution of NLRP3 inflammasome SNPs in ART-treated HIV-infected patients showing that a gain-of-function of NLRP3 is beneficial for clinical outcome; [2] it detected the significant and opposite association of genetic variants in *IL1B* and *IL18* with HIV + clinical outcome; [3] it suggests that the same variants affect HIV + clinical outcome in ART-treated patients, in DC-immunized patients as well in untreated ones,

possibly due to a common effect on patients' immune cells.

Recently it has been proposed that, in ART era, chronic HIV + infection becomes a chronic inflammatory disease [17]. As we have previously demonstrated that gain-of-function SNPs in NLRP3 inflammasome protect against HIV infection [13,14], but those same variants were associated also to sterile inflammatory diseases (such as autoimmune diseases, neurologic disorders, obesity and metabolic syndrome, etc), we questioned the role of NLRP3 inflammasome variants in clinical outcome of chronic HIV-infected patients.

The present study pointed out that in untreated HIV-infected patients a diminished activation of inflammasome (reduced level of IL-18 or loss-of-function of P2X7) is, as expected, associated with poor control of viral replication (high PVL; low CD4 + T level). However, after ART, our findings suggest a more complex scenery where genetic variations leads to increased inflammasome activation (i.e.: NLRP3 Gln705Lys + CARD8 Cys10Ter) and is still associated to PVL control, but with an unexpected effect on CD4 + T count depending on the candidate gene, such as for the gain-of-function *IL1B* rs16944 which resulted more frequent in patients with a reduced level of CD4 + T cells. These findings could be explained considering that despite the ART-induced viral suppression, HIV-infected patients continue to present chronic inflammation and immune activation, and individuals carrying pro-inflammatory polymorphisms could be benefited in terms of viral control but disadvantaged due to the amplification effect of these variants on chronic inflammation. Moreover, it is noteworthy that while an increased amount of IL-1 β appeared to be bad for chronic patients, for IL-18 it's just the opposite, reinforcing the idea of a distinct role of the two inflammasome-derived cytokines on immune system activation [1,2]. As immune activation in chronic HIV infection is mainly due to intestinal microbial translocation through a compromised gut epithelium [17], it appears that SNPs which contribute to a reduce epithelium integrity and microbiota imbalance, such as the loss-of-function variants in *IL18* promote also a worse patients' condition.

These data support the idea that an increased constitutive activation of NLRP3 inflammasome is associated with a better control of HIV-1 infection, independently of the genetic variant is a gain-of-function of inflammasome sensor NLRP3 (rs10754558, rs35829419) or a loss-of-function of the NLRP3-inhibitor *CARD8* (rs2043211) or of the purinergic receptor P2X7 (rs3751143, rs2230911), which is involved in NLRP3 activation through the mediation of ATP-dependent K⁺ efflux.

On the other hand, it is intriguing to understand why we observed opposite results for cytokine variants. While the rs1834481 polymorphism, which negatively affects IL-18 plasma level [28], resulted more frequent in patients with higher PVL₀, and according to above-mentioned data, represent a risk factor for PVL control, the rs16944 SNP resulted associated to low CD4 + T cells counts after the ART, and high PVL₀ in naïve HIV-infected patients submitted to immunotherapy. This promoter variant (-511 T) is known to increase *IL1B* transcription [29] and could be related to a constitutive high availability of pro-IL-1 β for caspase-1 cleavage, and consequently to higher production of the pro-inflammatory cytokine. The observed association of gain-of-function *IL1B* SNP with a worse condition of HIV-infected patients appeared to be coherent with previously reported studies on chronic inflammation in these individuals [17] and also with recent findings of inflammasome activation (ASC-specks) in HIV + PBMC [18].

We can try to explain these apparently incongruences taking into account the diverse roles of NLRP3 inflammasome in driving IL-1 β or IL-18 production in a cell-type- or signal-dependent manner, in maintaining homeostasis or even in exacerbating pathologic conditions [1,2]. Therefore, we can hypothesize that while IL-1 β represents a risk factor for chronic HIV-1 infection, possibly augmenting a positive feedback loop on immune cells, NLRP3 inflammasome activation per se contributes to a better response against the virus in the acute infection as well as in chronic condition. This protective effect could be related to an increased response of immune cells against new infection cycles (anti-viral role of NLRP3) and/or to the homeostatic role of NLRP3

Table 5

Multivariate analysis results for inflammasome SNPs association with HIV patients dendritic cells quality markers and functionality assays. Multivariate analysis was performed for inflammasome SNPs and quality markers and functionality assays of dendritic cell obtained from cohort 3 HIV-infected patients (n = 19). Sex, age and time of disease were included in the analysis as confounder variables. Only statistically significant results after correction for multiple comparisons (p < .013) are reported. Dendritic cells precursors (monocytes), immature (iDC) and mature dendritic cells (mDC) were examined for surface activation markers. iDC were tested also for phagocytic capacity. Gene, single nucleotide polymorphism (SNP), genotypes distribution (individual count, n), mean ± standard error (SE) for median fluorescence intensity (MFI) or percentage of fluorescent staining positive cells (%), adjusted p-values (p_{adj}) are reported.

Characteristic	Gene, SNP ID (minor allele)	Genotypes (n)	Mean ± SE	P _{adj}
Monocytes				
CD86+ cells (MFI)	CARD8 rs2043211 (T)	A/A (7)	2162 ± 573.0	5.5 × 10 ⁻⁵
		A/T (8)	4206 ± 1051.4	
		T/T (3)	1082 ± 312.5	
iDC				
Phagocytosis (MFI)	NLRP3 rs10754558 (G)	C/C (3)	2421 ± 378.2	0.012
		C/G (4)	2135 ± 990.1	
		G/G (8)	8732 ± 1553.0	
CCR6 + cells (%)	NLRP3 rs10754558 (G)	C/C (3)	3.5 ± 2.1	0.004
		C/G (4)	0.4 ± 0.2	
		G/G (8)	0.8 ± 0.2	
DCSIGN + cells (MFI)	NLRP3 rs10754558 (G)	C/C (3)	631.0 ± 362.7	0.003
		C/G (4)	640.0 ± 202.5	
		G/G (8)	1987.4 ± 248.5	
mDC				
CD86+ cells (MFI)	CARD8 rs2043211 (T)	A/A (7)	40,410 ± 10,213	0.003
		A/T (8)	39,856 ± 9582	
		T/T (3)	78,922 ± 2200	
CD40+ cells (%)	NLRP3 rs10754558 (G)	C/C (3)	94.8 ± 2.2	0.006
		C/G (4)	51.1 ± 6.2	
		G/G (8)	74.5 ± 4.5	
CCR5+ cells (MFI)	NLRP3 rs10754558 (G)	C/C (3)	977.3 ± 350.2	0.005
		C/G (4)	508.8 ± 76.6	
		G/G (8)	547.8 ± 109.6	
CCR6+ cells (%)	NLRP3 rs10754558 (G)	C/C (3)	10.8 ± 4.1	0.001
		C/G (4)	1.7 ± 1.2	
		G/G (8)	0.8 ± 0.1	
CXCR4+ cells (MFI)	IL1B rs16944 (T)	C/C (5)	789.4 ± 172.6	9.1 × 10 ⁻⁵
		C/T (7)	1743.0 ± 195.9	
		T/T (3)	2256.0 ± 475.6	

within mucosal surfaces through the induction of IL-18 [1,2]. According to this concept, HIV-infected individuals carrying gain-of-function variants of NLRP3 inflammasome, and/or in *IL18* gene, could be more protected than non-carriers against gut damage and microbial translocation, and the consequent systemic activation and exhaustion of immune cells.

We are aware that the study presents some limitations, such as the limited size of cohort 2 and 3, however these two cohorts are very original and poor exploited by genetics approach, therefore we believe that their investigation confers originality to the entire study.

5. Conclusion

NLRP3 inflammasome genetics contribute to clinical outcome of HIV infection in treated as well as in untreated patients, due to its role on activation state of peripheral immune cells.

Funding

This work was supported by the São Paulo Research foundation (FAPESP) (2013/06142-1; 2015/23395-6; 2015/50650-7), E.C.R. and V.N.C.L. are recipient of a PhD Fellowship from FAPESP. A.P. is recipient of a Fellowship from CNPq.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgements

We thank the SEAPH (Department of Infectious Disease, Faculty of Medicine, University of São Paulo, Brazil) for SP HIV-infected patients' recruitment; Dr. Alexandre De Almeida (Faculty of Medicine, University of São Paulo, Brazil) for Immunized HIV-infected patients' recruitment. We wish to thank all patients for the collaboration.

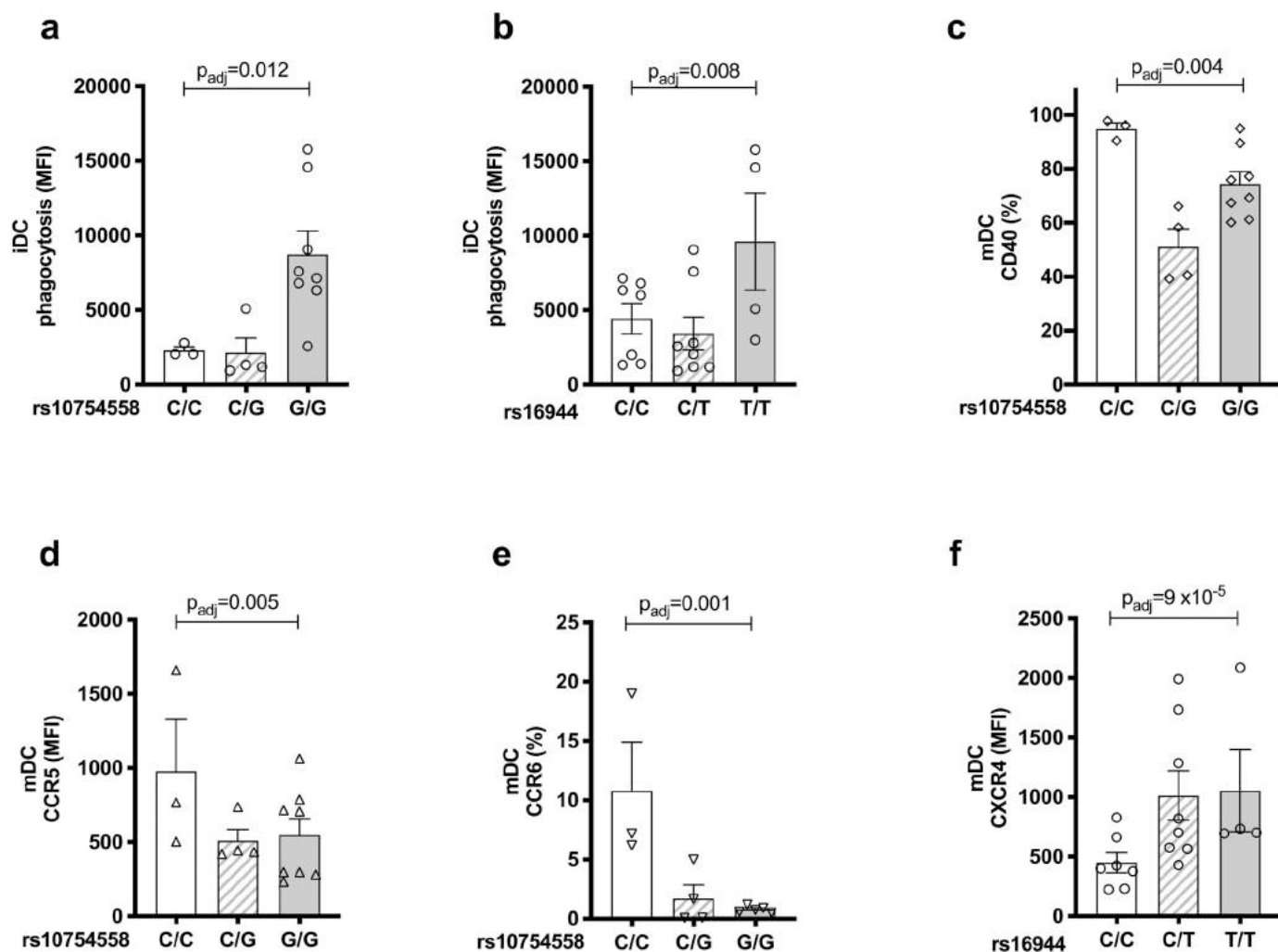


Fig. 4. Effect of inflammasome SNPs on dendritic cells quality.

DC donors were genotyped for *NLRP3* rs10754558 and *IL1B* rs16944 SNPs and functional cell data were grouped accordingly.

a–b) 1×10^6 iDC were incubated with 1 mg/ml fluorescently-labelled (FITC)-dextran for 60 min at 37 °C 5% CO₂, before cell surface staining with anti-CD14 and anti-CD11c fluorescently-labelled antibodies for 20 min at 4 °C. Phagocytosis capacity of iDC was evaluated by cell internalization of FITC-dextran and flow cytometry (mean fluorescence intensity, MFI). At least 50,000 events were acquired by a LRS Fortessa flow cytometry equipment (BD Bioscience). Data were grouped according to rs10754558 C > G (a) and rs16944 C > T (b) genotypes.

c–f) 0.2×10^6 mDC were stained with anti-CD40, anti-CCR5, anti-CCR6 and anti-CXCR4 fluorescently-labelled antibodies for 20 min at 4 °C. mDC activation state and quality was evaluated by surface markers expression levels and flow cytometry (MFI and percentage of positive cells). At least 50,000 events were acquired by a LRS Fortessa flow cytometry equipment (BD Bioscience). Data were grouped according to rs10754558 C > G (c–e) and rs16944 C > T (f) genotypes.

Mean values and standard errors are indicated. Multivariate analysis adjusted p -values (p_{adj}) are shown. MFI: median fluorescence intensity; %: percentage of positive cells.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.clim.2019.108266>.

References

- [1] M. Lamkanfi, V.M. Dixit, Mechanisms and functions of inflammasomes, *Cell* 157 (2014) 1013–1022.
- [2] M.N. Patel, R.G. Carroll, S. Galvan-Pena, E.L. Mills, R. Olden, M. Triantafyllou, A.I. Wolf, C.E. Bryant, K. Triantafyllou, S.L. Masters, Inflammasome priming in sterile inflammatory disease, *Trends Mol. Med.* 23 (2017) 165–180.
- [3] D. Verma, E. Sarndahl, H. Andersson, P. Eriksson, M. Fredriksson, J.I. Jonsson, M. Lerm, P. Soderkvist, The Q705K polymorphism in NLRP3 is a gain-of-function alteration leading to excessive interleukin-1beta and IL-18 production, *PLoS One* 7 (2012) e34977.
- [4] Y. Hitomi, M. Ebisawa, M. Tomikawa, T. Imai, T. Komata, T. Hirota, M. Harada, M. Sakashita, Y. Suzuki, N. Shimojo, Y. Kohno, K. Fujita, A. Miyatake, S. Doi, T. Enomoto, M. Taniguchi, N. Higashi, Y. Nakamura, M. Tamari, Associations of functional NLRP3 polymorphisms with susceptibility to food-induced anaphylaxis and aspirin-induced asthma, *J. Allergy Clin. Immunol.* 124 (2009) 779–785 e776.
- [5] S. Ito, Y. Hara, T. Kubota, CARD8 is a negative regulator for NLRP3 inflammasome, but mutant NLRP3 in cryopyrin-associated periodic syndromes escapes the restriction, *Arthritis Res. Ther.* 16 (2014) R52.
- [6] F. Di Virgilio, D. Dal Ben, A.C. Sarti, A.L. Giuliani, S. Falzoni, The P2X7 receptor in infection and inflammation, *Immunity* 47 (2017) 15–31.
- [7] C.M. Miller, N.R. Boulter, S.J. Fuller, A.M. Zakrzewski, M.P. Lees, B.M. Saunders, J.S. Wiley, N.C. Smith, The role of the P2X₇ receptor in infectious diseases, *PLoS Pathog.* 7 (2011) e1002212.
- [8] G.V. Paramel, A. Sirsjo, K. Fransen, Role of genetic alterations in the NLRP3 and CARD8 genes in health and disease, *Mediat. Inflamm.* 2015 (2015) 846782.
- [9] D. Souza de Lima, M.M. Ogusku, A. Sadahiro, A. Pontillo, Inflammasome genetics contributes to the development and control of active pulmonary tuberculosis, *Infect. Genet. Evol.* 41 (2016) 240–244.
- [10] S.L. Fernando, B.M. Saunders, R. Sluyter, K.K. Skarratt, J.S. Wiley, W.J. Britton, Gene dosage determines the negative effects of polymorphic alleles of the P2X7 receptor on adenosine triphosphate-mediated killing of mycobacteria by human macrophages, *J. Infect. Dis.* 192 (2005) 149–155.
- [11] A.N. Shemon, R. Sluyter, S.L. Fernando, A.L. Clarke, L.P. Dao-Ung, K.K. Skarratt, B.M. Saunders, K.S. Tan, B.J. Gu, S.J. Fuller, W.J. Britton, S. Petrou, J.S. Wiley, A Thr357 to Ser polymorphism in homozygous and compound heterozygous subjects causes absent or reduced P2X7 function and impairs ATP-induced mycobacterial

- killing by macrophages, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 2079–2086.
- [12] C.A. Yang, B.L. Chiang, Inflammasomes and human autoimmunity: a comprehensive review, *J. Autoimmun.* 61 (2015) 1–8.
- [13] A. Pontillo, L.A. Brandao, R.L. Guimaraes, L. Segat, E. Athanasakis, S. Crovella, A 3'UTR SNP in NLRP3 gene is associated with susceptibility to HIV-1 infection, *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 54 (2010) 1999 236–240.
- [14] A. Pontillo, T.M. Oshiro, M. Girardelli, A.J. Kamada, S. Crovella, A.J. Duarte, Polymorphisms in inflammasome' genes and susceptibility to HIV-1 infection, *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 59 (2012) 1999 121–125.
- [15] H. Guo, J. Gao, D.J. Taxman, J.P. Ting, L. Su, HIV-1 infection induces interleukin-1beta production via TLR8 protein-dependent and NLRP3 inflammasome mechanisms in human monocytes, *J. Biol. Chem.* 289 (2014) 21716–21726.
- [16] A. Pontillo, L.T. Silva, T.M. Oshiro, C. Finazzo, S. Crovella, A.J. Duarte, HIV-1 induces NALP3-inflammasome expression and interleukin-1beta secretion in dendritic cells from healthy individuals but not from HIV-positive patients, *AIDS (London, England)* 26 (2012) 11–18.
- [17] S.G. Deeks, S.R. Lewin, D.V. Havlir, The end of AIDS: HIV infection as a chronic disease, *Lancet (London, England)* 382 (2013) 1525–1533.
- [18] A. Bandera, M. Masetti, M. Fabbiani, M. Biasin, A. Muscatello, N. Squillace, M. Clerici, A. Gori, D. Trabattoni, The NLRP3 Inflammasome is upregulated in HIV-infected antiretroviral therapy-treated individuals with defective immune recovery, *Front. Immunol.* 9 (2018) 214.
- [19] F. Ahmad, N. Mishra, G. Ahrenstorf, B.S. Franklin, E. Latz, R.E. Schmidt, L. Bossaller, Evidence of inflammasome activation and formation of monocyte-derived ASC specks in HIV-1 positive patients, *AIDS (London, England)* 32 (2018) 299–307.
- [20] H. Guo, J.B. Callaway, J.P. Ting, Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics, *Nat. Med.* 21 (2015) 677–687.
- [21] B.-Z. Shao, Z.-Q. Xu, B.-Z. Han, D.-F. Su, C. Liu, NLRP3 inflammasome and its inhibitors: a review, *Front. Pharmacol.* 6 (2015) 262.
- [22] T.C. Ferreira, E.P. Sampaio, G.A. Arganaraz, M.V. Gondim, L. Shapiro, E.R. Arganaraz, Increased prevalence of the alpha-1-antitrypsin (A1AT) deficiency-related S gene in patients infected with human immunodeficiency virus type 1, *J. Med. Virol.* 86 (2014) 23–29.
- [23] W. Lu, L.C. Arraes, W.T. Ferreira, J.M. Andrieu, Therapeutic dendritic-cell vaccine for chronic HIV-1 infection, *Nat. Med.* 10 (2004) 1359–1365.
- [24] H. Akaike, A new look at the statistical model identification, *IEEE Trans. Autom. Control* 19 (1974) 716–723.
- [25] J.C. Barrett, Haploview: visualization and analysis of SNP genotype data, *Cold Spring Harb Protoc* 2009 (2009) pdb.ip71.
- [26] R. Moura, A. Pontillo, P. D'Adamo, N. Pirastu, A. Campos Coelho, S. Crovella, Exome analysis of HIV patients submitted to dendritic cells therapeutic vaccine reveals an association of CNOT1 gene with response to the treatment, *J. Int. AIDS Soc.* 17 (2014) 18938.
- [27] E.C. Reis, L.T. da Silva, W.C. da Silva, A. Rios, A.J. Duarte, T.M. Oshiro, S. Crovella, A. Pontillo, Host genetics contributes to the effectiveness of dendritic cell-based HIV immunotherapy, *Hum. Vaccines Immunotherapeutics* 14 (2018) 1995–2002.
- [28] S. Martinez-Hervas, V. Martinez-Barquero, E. Nunez Savall, V. Lendinez, L. Olivares, E. Benito, J.T. Real, F.J. Chaves, J.F. Ascaso, [Plasma IL-18 levels are related to insulin and are modulated by IL-18 gene polymorphisms], *Clinica e investigacion en arteriosclerosis: publicacion oficial de la Sociedad Espanola de Arteriosclerosis* 27 (2015) 265–271.
- [29] S.K. Hall, D.G. Perregaux, C.A. Gabel, T. Woodworth, L.K. Durham, T.W. Huizinga, F.C. Breedveld, A.B. Seymour, Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein, *Arthritis Rheum.* 50 (2004) 1976–1983.

APÊNDICE J - Artigo publicado: “Common pathogen-associated molecular patterns induce the hyper-activation of NLRP3 inflammasome in circulating B lymphocytes of HIV-infected individuals”.

Common pathogen-associated molecular patterns induce the hyper-activation of NLRP3 inflammasome in circulating B lymphocytes of HIV-infected individuals

Vinícius Nunes Cordeiro Leal^a, Edione Cristina Reis^a,
Fernanda Pereira Fernandes^a, Jaíne Lima da Silva Soares^a,
Iohanã Gabriely Costa Oliveira^a, Dhêmerson Souza de Lima^a,
Amanda Nazareth Lara^b, Marta Heloísa Lopes^b and
Alessandra Pontillo^a

Objective: Despite the antiretroviral treatment, people with HIV (PWH) still experience systemic chronic inflammation and immune-senescence, which represent risk factors for severe comorbidities and inefficient response to pathogens and vaccines. Given the dysregulation of NLRP3 inflammasome in PWH and the recently demonstrated role played by NLRP3 in B lymphocytes, we hypothesized that NLRP3 dysregulation in B cells can contribute to chronic inflammation and humoral dysfunction in PWH.

Design: NLRP3 inflammasome activation was evaluated in B lymphocytes and correlated with antibodies production and immunization response in PWH.

Methods: NLRP3 inflammasome activation was compared in B lymphocytes isolated from PWH and healthy donors, in resting and stimulated conditions. Functional polymorphic variants in *NLRP3* and *IL1B* genes were analysed in a cohort of PWH submitted to anti-HBV vaccine to assess the effect of NLRP3 inflammasome on humoral response.

Results: The NLRP3 inflammasome activation in response to common PAMPs (LPS, β -glucan) resulted higher in B lymphocytes of PWH than in HD. CpG-induced IgM secretion was also increased in B cells of PWH. *NLRP3*, but not *IL1B*, gain-of-function polymorphism associated to anti-HBs levels.

Conclusion: These data reveal the dysregulation of NLRP3 inflammasome in B lymphocytes of PWH. Differently from myeloid compartment, which present an exhausted NLRP3 inflammasome, the complex appears to be hyper-activated in B cells of PWH, likely contributing to chronic inflammation and affecting humoral response.

Copyright © 2021 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

AIDS 2021, 35:000–000

Keywords: B lymphocytes, HIV, inflammasome, NLRP3, single nucleotide polymorphisms

^aLaboratório de Imunogenética, Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP), and ^bDepartamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM-USP), São Paulo, SP, Brazil.

Correspondence to Alessandra Pontillo, Laboratório de Imunogenética, ICB/USP Av. Prof. Lineu Prestes, 1730, Cidade Universitária, São Paulo SP), Brazil;

E-mail: alepontillo@usp.br

Received: 10 January 2020; revised: 19 May 2020; accepted: 13 June 2020.

DOI:10.1097/QAD.0000000000002833

Introduction

Inflammasome is a multiprotein complex formed by a cytosolic pattern recognition receptor (PRR) (i.e. NLRP1, NLRP3, AIM2, IFI16), an adaptor protein ASC, and an effector enzyme, generally caspase-1, which activates the release of interleukin (IL)-1 β and IL-18 [1], and the pore-formation in cell membrane mediated by gasdermin-D (GSDMD). GSDMD under certain conditions mediates a lytic and pro-inflammatory cell death known as pyroptosis [2]. Several pathogen or damage-associated molecular patterns (PAMPs and DAMPs, respectively) are sensed by distinct inflammasome receptors and induce the complex activation through the so-called canonical pathway [3]. Alternatively, cytosolic LPS can directly activate caspase-4/5 ('noncanonical activation'); or even certain membrane-bound PRRs (such as the C-type lectin receptor Dectin-1) can represent an upstream signal for inflammasome activation [4].

The inflammasome plays a key role in host defense against infections [3,4] as well as sterile harmful agents [5]. Inflammasome-derived cytokines act as a connection between innate and adaptive immunity, influencing the polarization of T helper (Th) lymphocytes and the resulting adaptive response [6]. Initially described in myeloid cells [7], the inflammasome has been later discovered in CD4⁺ [8,9] and CD8⁺ [10] T lymphocytes, and recently in human circulating B lymphocytes, wherein it modulates IL-1 β or polyclonal IgM production depending on the PRR involved [11–13].

B lymphocytes express several PRRs that regulate the production of cytokines in physiologic conditions, and also in chronic inflammatory diseases (i.e. diabetes, periodontal disease) contributing to their pathogenesis [14].

Despite the advent of antiretroviral therapy (ART), people with HIV (PWH) still present chronic immune activation and inflammation, culminating in dramatic immune dysfunction. As a result, PWH have an inefficient response to several microbes, not necessarily pathogenic, such as opportunistic organisms, and to immunizations (prophylactic or therapeutic vaccines), a condition commonly known as immunosenescence [15,16].

We have previously demonstrated how in PWH the constitutive activation of the NLRP3 inflammasome affects dendritic cells response to common PAMPs, suggesting a novel mechanism involved in the dysfunction of these cells and of the resulting adaptive response [17–19]. The constitutive expression and/or activation of the inflammasome was also seen in PWH' peripheral blood mononuclear cells (PBMCs); however, it was suggested to occur in the myeloid compartment [20–24].

Taking into account the recent description of the NLRP3 inflammasome in circulating human B lymphocytes

[11,12], and our previous analysis which helped us to define the detrimental role of the NLRP3 inflammasome in PWH' dendritic cell [17–19], we hypothesized that the NLRP3 inflammasome could be improperly activated in PWH' B lymphocytes, thus contributing not only to the chronic inflammatory profile, but also to the inefficient humoral response of these patients. Given the growing evidence over the potential role of NLRP3 as a therapeutic target [25], the demonstration of NLRP3 inflammasome dysregulation in PWH' leucocytes could support the use of NLRP3 inhibitors in PWH.

Materials and methods

Study design

The aim of this study was to determine whether the activation of NLRP3 inflammasome is dysregulated in PWH B lymphocytes compared with healthy donors in basal and stimulated conditions. A genetic association study was conducted in PWH, who underwent anti-HBV vaccine, to evaluate the contribution of *NLRP3* and *IL1B* single nucleotide variations (SNVs) on humoral response.

People living with HIV and healthy donors

Twenty PWH adults were recruited at the 'Serviço de Extensão ao Atendimento de Pacientes com HIV/AIDS (SEAPH)' of the 'Hospital das Clínicas' and Faculty of Medicine of the University of São Paulo (HC-FMUSP; SP, Brazil). All are infected for at least 5 years, in ART, with blood CD4⁺ T cells count more than 500 cells/ μ l, without clinical AIDS or other chronic or infectious diseases. Twenty healthy donors, matched by sex (Fisher test $P = 0.06$) and age (Mann–Whitney test $P > 0.05$) with PWH, were recruited at the Blood Bank Service of the 'Oswaldo Cruz' Hospital (São Paulo, SP, Brazil). Main characteristics of volunteers are summarized in Supplementary File 1, <http://links.lww.com/QAD/C5>. Peripheral blood was used for the isolation of PBMCs. The study was carried out in accordance with the Ethical Committees and volunteers gave written informed consent to participate.

Association study

Genomic DNA of 121 PWH recruited at the SEAPH of HC-FMUSP and submitted to hepatitis B virus (HBV) vaccine [26,27] (Supplementary File 2, <http://links.lww.com/QAD/C6>), was used for association study. On the basis of anti-HBsAg titer, PWH are classified into responders (anti-HBsAg > 10 mIU/ml) and nonresponders (anti-HBsAg < 10 mIU/ml). Two well known gain-of-function SNVs in *NLRP3* (namely rs35829419 C>A, Gln705Lys [28]; and rs10754558 C>G in the 3'UTR region [29]) and a gain-of-function SNV in *IL1B* promoter (rs16944, -511 C>T) [30], previously associated with HIV prognosis [19], were genotyped by allele-specific Taqman assays (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) and

qPCR on a QuantStudio 3.0 real-time PCR equipment (Applied Biosystems).

CD19+ cells

PBMCs were isolated by Ficoll-Paque gradient (GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA). CD19+ cells were isolated by negative selection using magnetic beads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) and cultured in RPMI-1640 with 10% Fetal Bovine Serum (FBS; Gibco, Thermo Fisher Scientific) (culture medium). Each preparation was repeatedly observed to contain an average of $98 \pm 1.2\%$ CD19+ cells (Supplementary File 3, <http://links.lww.com/QAD/C7>).

Cytokines and IgM detection

4×10^5 cells/well were stimulated with $1 \mu\text{g/ml}$ LPS (*Escherichia coli*, strain: O111:B4; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) or $200 \mu\text{g/ml}$ β -glucan (*A. faecalis*; Sigma-Aldrich) or $1 \mu\text{g/ml}$ CpG (ODN 2396; InvivoGen, San Diego, California, USA) for 24 h for cytokines dosage or 72 h for total IgM measurement. In some experiments, cells were pretreated with the NLRP3 inhibitor MCC-950 ($10 \mu\text{mol/l}$; InvivoGen, San Diego, California, USA) or the BTK inhibitor CGI-1746 ($10 \mu\text{mol/l}$; Selleckchem, Houston, Texas, USA) for 1 h [31] or 15 min [32], respectively. Cell supernatants were analysed for IL-1 β , IL-18, TNF- α , IL-6, IL-10 and IgM production using ELISA kits (for IL-1 β , TNF- α , IL-6 of Biolegend (San Diego, California, USA); for IL-18 of R&D Systems, Inc. (Minneapolis, Minnesota, USA); for IL-10 of BD Biosciences (San Diego, California, USA); for IgM Thermo Fisher Scientific).

Caspase-1 activity assay

Caspase-1 activity was measured using FAM-FLICA Caspase-1 Assay Kit (Immunochemistry Technologies, Bloomington, Minnesota, USA) and flow cytometry.

Lactate dehydrogenase release

Cell cytotoxicity was assessed by the quantification of lactate dehydrogenase (LDH) release in supernatants using the LDH Cytotoxicity Assay Kit (ThermoFisher Scientific). For all the experiments, the cytotoxicity did not exceed 35%.

'Specks' formation

For immunofluorescence assays, cells were cultured in 16-wells chamber slides (Thermo Fisher Scientific) and stained with antibody for NLRP3 (ab4207; Abcam, Cambridge, Massachusetts, USA) and ASC (cat.653902; Biolegend). The counting of specks was manually performed at the DMi8 confocal laser scanning microscope [33].

Gene expression analysis

NLRP3, *NLRP1*, *NLR4*, *IFI16*, *AIM2*, *CASP1*, *IL1B* and *IL18* genes were amplified by the use of gene-specific Taqman assays (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific) and qPCR. GAPDH was used as endogenous control for data normalization. Relative gene expression was calculated according to [34].

Data analysis

Nonparametric analysis was executed to compare two or more data sets as specified in each graph using the software Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Multivariate analysis based on general linear model (GLM) was performed to evaluate SNVs distribution using R-project (R version 3.5.1.; R Foundation, Vienna, Austria) and the specific package 'SNPassoc' (version 1.9–2).

Results

B lymphocytes from HIV-infected patients present a constitutive NLRP3 inflammasome activation

To assess and compare the NLRP3 inflammasome expression in human B lymphocytes isolated from PWH and healthy donors, we performed a gene expression analysis assay and a confocal microscopy experiment in freshly isolated CD19+ cells. We detected the expression of *NLRP3*, *CASP1* and *IL1B*, but not of *IL18*, mRNAs in CD19+ cells (Fig. 1a). The intracellular staining confirmed the expression of NLRP3 and ASC in CD19+ cells (Fig. 1b,c). mRNA levels and the number of NLRP3+ ASC+ specks (Fig. 1b,c) appear to be higher in PWH lymphocytes than in controls, although the difference was not statistically significant (Fig. 1a,b). B cells released a low amount of IL-1 β , but levels were significantly higher in PWH than in controls. (Fig. 1d). The production of IL-18 and of inflammasome-independent cytokines TNF- α , IL-6 and IL-10 was similar in the two groups (Fig. 1d). In accordance with the increase in IL-1 β production, PWH showed a higher percentage of active caspase-1 positive B cells than healthy donors (Fig. 1e). This result supports the idea that the inflammasome is constitutively activated in PWH B lymphocytes.

Of note, this constitutive inflammasome activation was not followed by a significant B cell death, as demonstrated by the low release of LDH in cell supernatants (Fig. 1f), suggesting that, even in the presence of an increase in basal caspase-1 activity, pyroptosis does not occur in significant levels, and that the main caspase substrate in B cells is IL-1 β .

Lipopolysaccharide and β -glucan induce a greater NLRP3 inflammasome response in HIV-infected individuals' B lymphocytes than in healthy donors

To define whether the constitutive activation of the inflammasome negatively affects the response to PRRs ligands in PWH B lymphocytes, we examined the activation of inflammasome in CD19+ cells isolated from PWH and healthy donors stimulated *in vitro* with LPS, β -glucan or CpG, compounds known to activate B cells

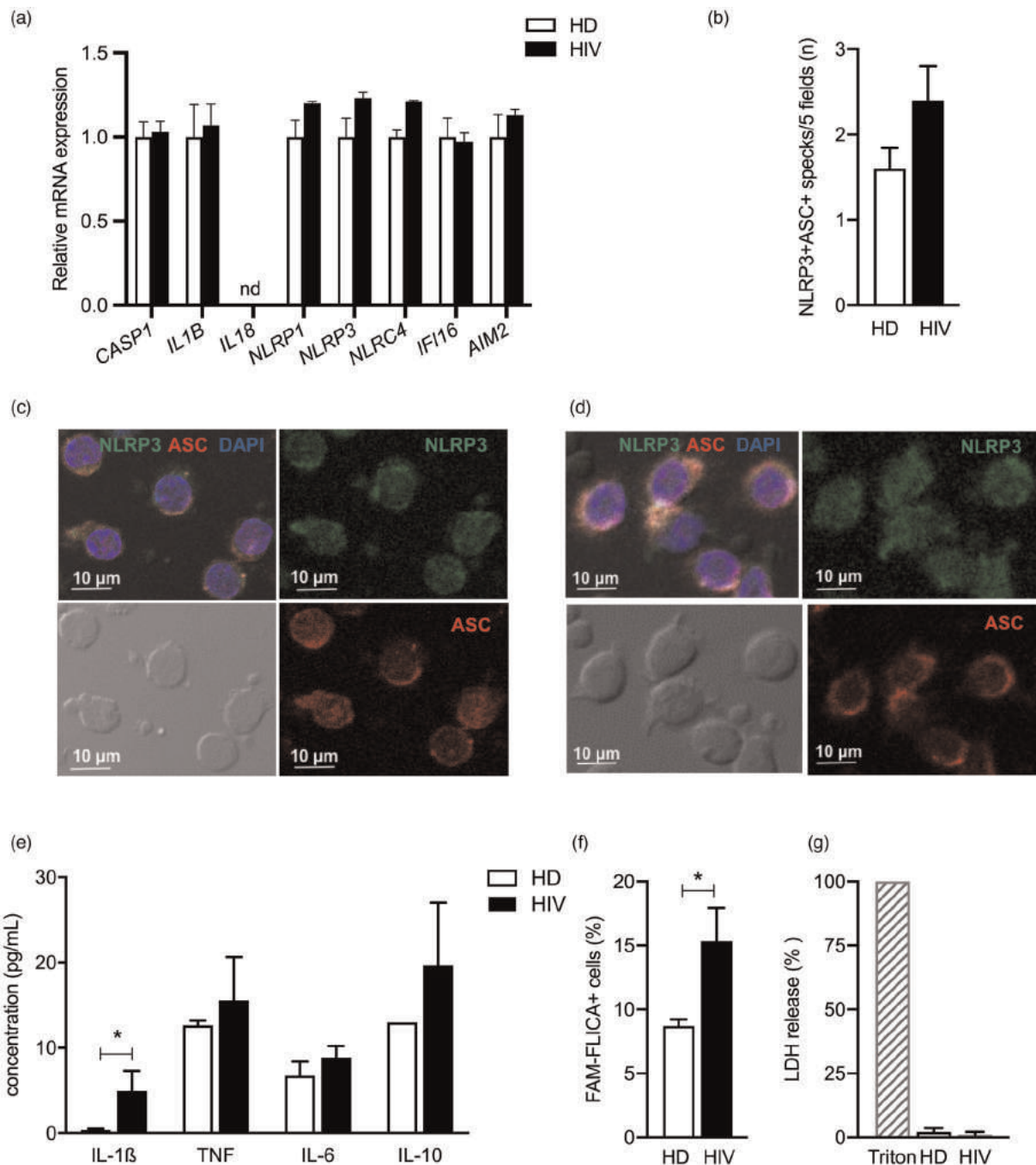


Fig. 1. B lymphocytes from HIV-infected patients present a constitutive NLRP3 inflammasome activation. (a) qRT-PCR analysis of main inflammasome genes expression (namely *NLRP1*, *NLRP3*, *NLR4*, *IFI16*, *AIM2*, *CASP1*, *IL1B*, *IL18*) was performed in CD19+ cells from healthy donors (HD; $n = 3$) and people living with HIV (HIV; $n = 3$). Normalized basal expression in HIV cells is reported proportional to that in HD (equal to 1). (b–d) NLRP3+ ASC+ ‘specks’ formation was observed in confocal microscopy after immunofluorescence staining in HD and HIV CD19+ cells and manually counted in five independent experiments (number of specks in five image fields). Data were reported as bar graphs (b) and microscopy photographs for one representative experiment for HD (c) and HIV (d) samples. NLRP3 is detected by Alexa-488 (green) fluorescence, ASC by Alexa 647 (red) fluorescence. DAPI was used for nuclei coloration (blue). (e) IL-1 β , IL-18, TNF and IL-10 levels were measured in culture supernatants of CD19+ cells from HD ($n = 10$) and HIV ($n = 12$). (f) Caspase-1 activation was measured in CD19+ cells from HD ($n = 3$) and HIV ($n = 3$). Results are reported as percentage of FAM-FLICA positive CD19+ cells. (g) LDH liberation was measured in culture supernatants of CD19+ cells from HD ($n = 3$) and HIV ($n = 3$). Data are expressed as percentage respect to the positive control (Triton, 100% cell lysis). All data are reported as mean \pm standard error (SE). Two-way ANOVA with Bonferroni multiple comparison test (a, e) or Mann-Whitney test (b, f, g) was applied to compare HD and HIV groups. Differences with a $P < 0.05$ were considered statistically significant (*).

[35–41], and the NLRP3 inflammasome in these cells [11,12].

PWH CD19+ cells released more IL-1 β than controls in response to LPS and β -glucan, but not CpG (Fig. 2a). LPS and β -glucan, but not CpG, induced low IL-18 levels, which were similar between PWH and controls (Fig. 2b). All stimuli induced the secretion of TNF- α and IL-6 in CD19+ cells, but without significant differences between the two groups (Fig. 2c,d). As expected [41], CpG, but not LPS and β -glucan, stimulated a huge release of IL-10 in both groups (Fig. 2E).

All stimuli significantly increased the pro-caspase-1 cleavage in CD19+ cells (Fig. 2f). The observed activation of caspase-1 is line with the release of IL-1 β in B lymphocytes treated with LPS or β -glucan. Moreover, it also supports previous report about the ability of CpG to induce inflammasome activation in B lymphocytes without IL-1 β release, through a not yet elucidated mechanism [12]. Cytotoxicity did not exceed 35% (Fig. 2g), suggesting that pyroptosis does not significantly occur in B lymphocytes.

Subsequently, considering that the PRRs ligands induce the production of polyclonal IgM [35] and that it has recently been shown that some ligands act through the NLRP3 inflammasome pathway [12], we hypothesized that the PWH B lymphocytes, which present a hyper-responsive inflammasome, could also produce huge amounts of IgM. Therefore, we measured total IgM levels in supernatants of B lymphocyte stimulated *in vitro*. According to Ali *et al.* [12], CpG, but not LPS or β -glucan, was able to induce the release of a significant amount of IgM in CD19+ cells (Fig. 2h). The production of IgM was greater in the lymphocytes of HIV-infected patients than in the healthy donors (Fig. 2h). LPS and β -glucan, but not CpG, induced the formation of cytosolic aggregates positive for NLRP3 and ASC staining (NLRP3+ASC+ 'specks') (Fig. 3a). This result strongly supports the assembling of inflammasome [33] and evidences a key role of NLRP3 in the inflammasome activation during B cell response. The hyper-activation of the inflammasome in PWH B lymphocytes was associated with greater formation of NLRP3+ASC+ 'specks' compared with healthy donors (Fig. 3a). The number of 'specks' resulted significantly greater in the B lymphocytes of PWH than in healthy donors in both conditions (LPS and β -glucan) (Fig. 3b). A positive correlation exists between the number of NLRP3+ASC+ specks and the level of released IL-1 β in B lymphocytes (Fig. 3c,d). Of note, however, this correlation resulted statistically significant only for PWH cells.

These results evidence that PWH B lymphocytes present an augmented activation of the inflammasome, which results in an increased release of IL-1 β and IgM, while

other signalling pathways of PRRs seem to work similarly in PWH and healthy donors.

Specific inhibition of NLRP3 reduces lipopolysaccharide and β -glucan-induced interleukin-1 β release as well as CpG-induced IgM production in B lymphocytes

As our data support previous findings about the role of NLRP3 in activating the inflammasome in B lymphocytes [11,12], to define whether and to what extent NLRP3 contributes to inflammasome' activation and to the increase of IL-1 β and IgM production in PWH, we replicated some experiments using two chemical inhibitors of NLRP3: the specific NLRP3 inhibitor MCC-950 [31] and the Bruton Tyrosin Kinase (BTK) inhibitor CGI-1746, which prevents Syk-dependent NLRP3 activation [42] (Fig. 4A).

MCC-950 or CGI-1746 significantly reduced IL-1 β production in LPS and β -glucan-treated B cells (Fig. 4b,c), more in PWH than in healthy donors. The inhibitors had little effect on the release of IL-1 β induced by CpG (Fig. 4d), on the secretion of TNF, IL-6 and IL-10 (Supplementary File 3 A–C, <http://links.lww.com/QAD/C7>), or on cell cytotoxicity (Supplementary File 3 D–F, <http://links.lww.com/QAD/C7>). These data are in agreement with results of the correlation analysis performed for IL-1 β and NLRP3+ASC+ specks (Fig. 3c,d), and suggest that the contribution of NLRP3 in the activation of inflammasome in B lymphocytes is greater in PWH than in healthy donors.

For what concern the secretion of IgM, CGI-1746 was able to totally prevent the production of antibodies both in the B lymphocytes of healthy donors and PWH (Fig. 4e–g), underlining the crucial role of BTK in the biology of B cell [32]. MCC-950 has only partially reduced the production of IgM in all the conditions, confirming that the activation of NLRP3 contributes to the production of antibodies [12], but as expected, it does not represent the most important pathway involved in this function.

Gain-of-function variants in NLRP3 are significantly associated with humoral response in HIV patients

We recently reported the opposite effect of gain-of-function SNVs in the *NLRP3* and *IL1B* genes on disease prognosis in PWH [19]. Taking into account the hyper-responsiveness of the NLRP3 inflammasome observed in PWH B cells (Figs. 2 and 3), we questioned whether a constitutive gain-of-function of NLRP3 could affect the humoral response in PWH. Therefore, we realized an association study in PWH who underwent several series of HBV vaccinations [26,27] evaluating the impact of gain-of-function SNVs rs35829419, rs10754558 and rs16944 on the response to the immunization using a

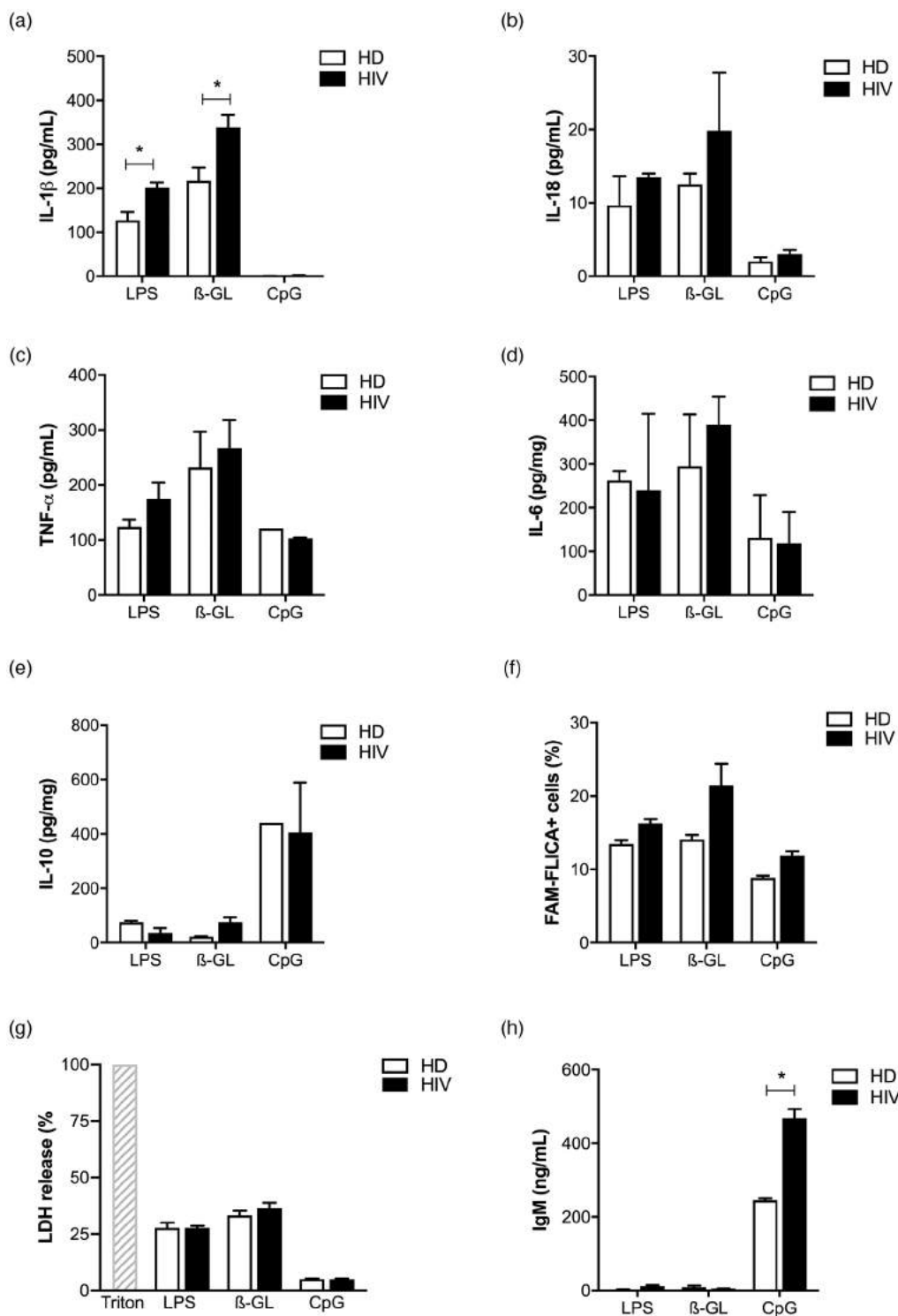


Fig. 2. Lipopolysaccharide and β -glucan induce higher inflammasome response in B lymphocytes from HIV-infected individuals compared to healthy donors. CD19⁺ cells isolated from healthy donors (HD; $n=10$) and people living with HIV (HIV; $n=12$) were treated with 1 μ g/ml lipopolysaccharide (LPS), 200 μ g/ml β -glucan (β -GL) or 1 μ g/ml dinucleotide CpG for 24 h (a–g) or 72 h (h). The release of IL-1 β (a), IL-18 (b), TNF (c), IL-6 (d) and IL-10 (e) was measured in culture supernatants. (f) Caspase-1 activation was measured in three independent experiments. Results are reported as percentage of FAM-FLICA positive CD19⁺ cells. (g) LDH liberation was measured in culture supernatant of three independent experiments. Data are expressed as percentage respect to the positive control (Triton, 100% cell lysis). (h) Total IgM level was measured in culture supernatants of three independent experiments. All data are reported as mean \pm standard error (SE). Two-way ANOVA with Bonferroni multiple comparison test was applied to compare HD and HIV groups. Differences with a $P < 0.05$ were considered statistically significant (*).

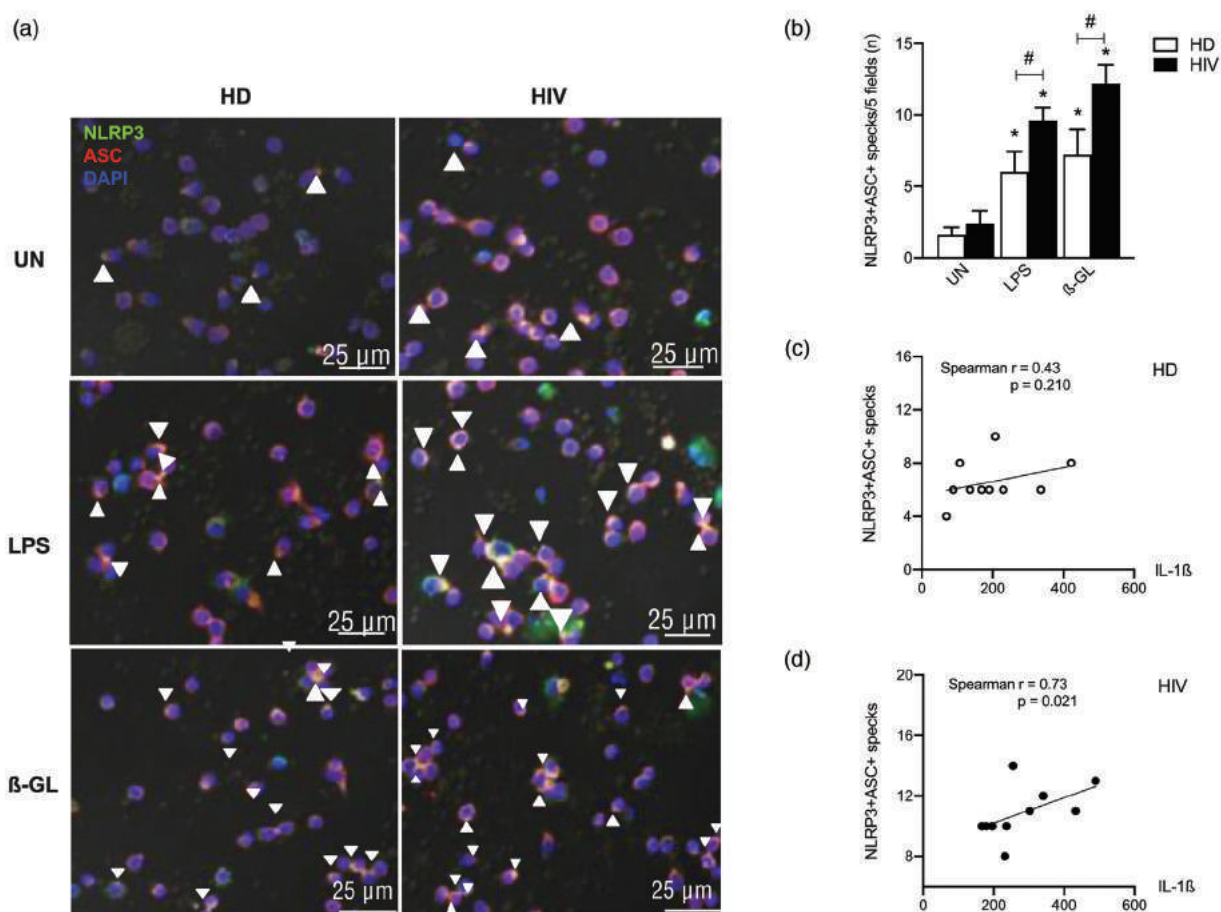


Fig. 3. LPS and β -glucan induce higher NLRP3+ ASC+ specks formation in B lymphocytes from HIV-infected individuals compared to healthy donors. CD19+ cells isolated from healthy donors (HD; $n = 5$) and people living with HIV (HIV; $n = 5$) were treated with 1 μ g/ml lipopolysaccharide (LPS) or 200 μ g/ml β -glucan (β -GL) for 24 h. NLRP3+ ASC+ 'specks' formation was observed in confocal microscopy after immunofluorescence staining in HD and HIV CD19+ cells. (a) Microscopy photographs for one representative experiment for HD and HIV samples. NLRP3 is detected by Alexa-488 (green) fluorescence, ASC by Alexa 647 (red) fluorescence. DAPI was used for nuclei coloration (blue). NLRP3+ASC+ 'specks' formation was indicated by white arrows (magnification: 63 \times). (b) Specks were manually counted in five independent experiments (number of specks in five image fields). Data are reported as mean \pm standard error (SE). Two-way ANOVA with Bonferroni multiple comparison test *: $P < 0.05$ (stimulated versus unstimulated); # $P < 0.05$ (HIV versus HD). (c–d) Correlation analysis between NLRP3+ASC+ specks count and IL-1 β production in CD19+ cells from HD and HIV. Spearman correlation coefficient r and P-value are indicated.

multivariate analysis adjusted for sex, age and time of disease. Main results are reported in Table 1.

A better humoral response was associated with the *NLRP3* variants, both in the analysis of the initial (rs35829419) and final (rs10754558) anti-HBs titres. PWH who carry rs35829419 minor A allele showed a significant higher initial level of anti-HBs than non-carriers ($P = 0.022$). Similarly, the SNV rs10754558 is more frequent in patients with higher final level of anti-HBs than noncarriers considering both the comparison between responders and nonresponders ($P = 0.0005$) and the mean level of anti-HBs ($P = 0.006$). *IL1B* rs16944 was not associated to the humoral response ($P > 0.05$; data not shown). As shown in our previous work [19], this variant resulted detrimental for the clinical status of

PWH, being more frequent in patients with a low CD4⁺ T-cell count. In the present analysis, low titre of CD4⁺ T cells tend to be more frequent in PWH carrying the rs16944 (T/T: 424.1 ± 50.1 cells/ μ l) than noncarriers (C/C+C/T: 497.8 ± 28.3 cells/ μ l), but the difference was not statistically significant ($P = 0.062$), maybe due to the limited size of the analysed cohort.

Discussion

We have previously demonstrated that PWH dendritic cells present a constitutive activation of the NLRP3 inflammasome, which negatively interferes with antigen presenting function, finally contributing to the chronic

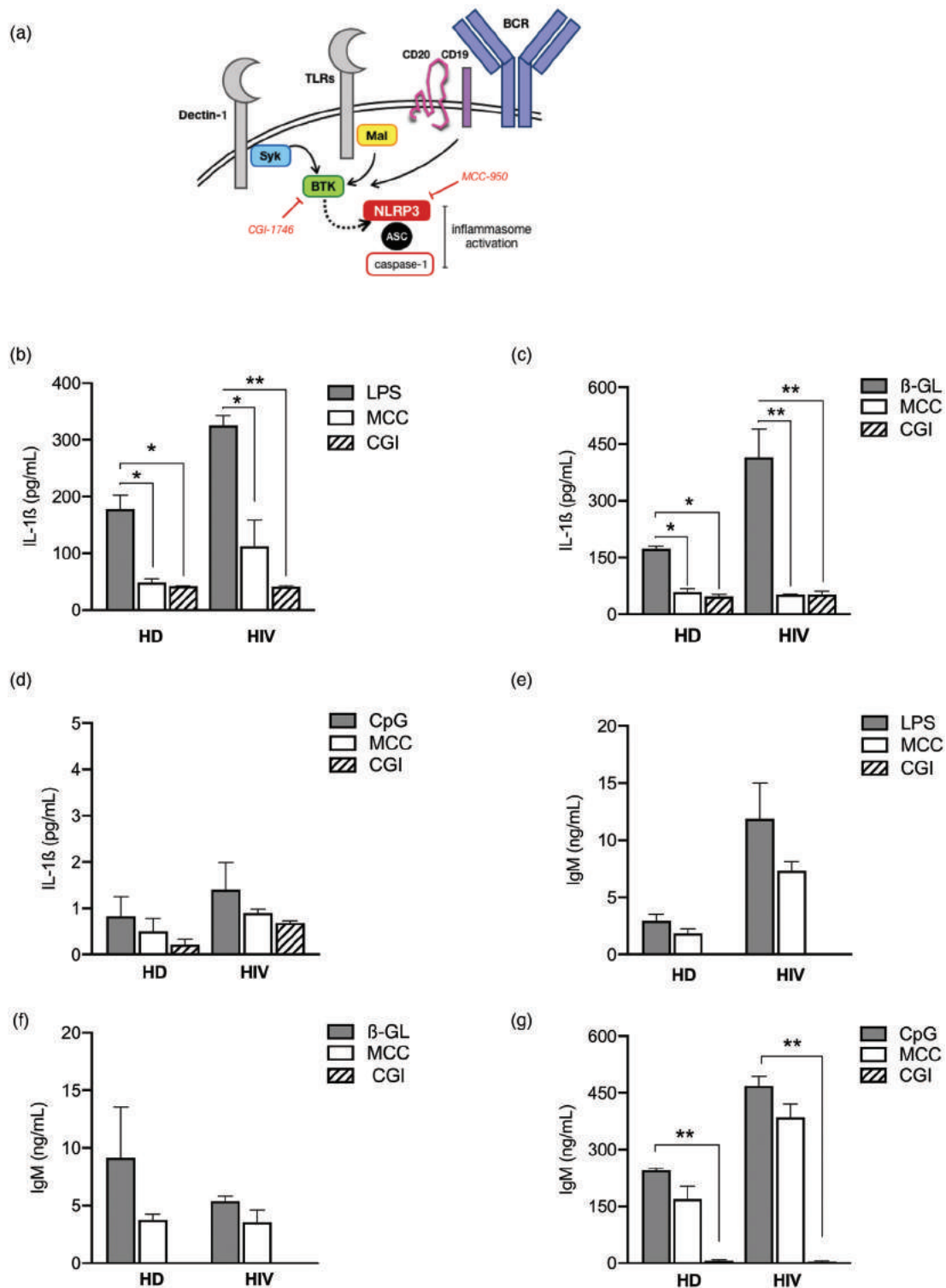


Fig. 4. Specific inhibition of NLRP3 dramatically reduces LPS- and β -glucan-induced IL-1 β as well as CpG-induced IgM production in B lymphocytes. (a) Schematic representation of the NLRP3 inhibition points. MCC-950 specifically inhibits the NLRP3 activation. CGI-1746 inhibits the BTK, affecting the alternative pathway of NLRP3 activation (Dectin-1/Syk). TLRs: Toll-like receptors; BCR: B cell receptor; Syk: Spleen tyrosine kinase; Mal: MyD88 adapter-like. (b–g) CD19 $^{+}$ cells isolated from healthy donors (HD; $n = 3$) and people living with HIV (HIV; $n = 3$) were pre-treated or not with 10 μ mol/l MCC-950 (1 h) or 10 μ mol/l CGI-1746 (15 min) and then stimulated with 1 μ g/ml LPS, or 200 μ g/ml β -GL, or 1 μ g/ml CpG. The release of IL-1 β (b–d) and total IgM (e–g) were measured in culture supernatants after 24 or 72 h, respectively. Data are reported as mean \pm standard error (SE). Kruskal-Wallis with Bonferroni multiple comparison test was applied to compare stimulated CD19 $^{+}$ cells with and without inhibition within each group. Differences with a $P < 0.05$ were considered statistically significant (* $P < 0.05$; ** $P < 0.001$).

Table 1. Detailed results from multivariate analysis of NLRP3 and IL1B SNPs distribution in HIV patients submitted to anti-HBV vaccine.

Initial anti-HBs (after first vaccine series)				
Gene and SNP	Genotype	Individuals (n)	Anti-HBs (mIU/ml)	adj P
NLRP3 rs35829419 C>A	C/C	116	59.8 ± 12.2	0.022
	C/A	5	248.8 ± 181.9	
Final anti-HBs (after one or more boosts)				
Gene and SNP	Genotype	Responder (n; %)	Non-responder (n;%)	adj P
NLRP3 rs10754558 C>G	C/C	27 (0.37)	25 (0.57)	0.0005
	C/G	39 (0.53)	10 (0.23)	
	G/G	8 (0.1)	9 (0.21)	
Gene and SNP	Genotype	Individuals (n)	Anti-HBs (mIU/ml)	adj P
NLRP3 rs10754558 C>G	C/C	53	126.2 ± 34.1	0.006
	C/G	50	186.3 ± 40.2	
	G/G	18	162.6 ± 79.5	
CD4 ⁺ T lymphocytes (cells/ μ l)				
Gene and SNP	Genotype	Individuals (n)	CD4 ⁺ T (mean + SE)	adj P
NLRP3 rs10754558 C>G	C/C	48	482.5 ± 43.3	0.062
	C/T	49	512.7 ± 36.8	
	T/T	24	424.1 ± 50.1	

Single nucleotide polymorphism (SNP) identification number (ID) and respective genotypes are reported for associated variants. For continuous variables, analysis results are reported as number of individuals (*n*) carrying a determined genotype, mean value and standard error (SE) for the variables and *P*-value adjusted for sex, age and time of HIV diagnosis. (adj *p*-value) For two groups comparisons, analysis results are reported as number of individual (*n*) of a determined genotype in each group and *P*-value adjusted for sex, age and time of HIV diagnosis (adj *P*-value).

inflammation and immune system senescence of these individuals [17,18].

Here, we have shown that PWH exhibit an altered inflammasome activation not only in myeloid cells but also in circulating B lymphocytes. To our knowledge, this is the first study that evaluates the dysregulation of the complex in PWH B cells, and that suggests that this contributes to the chronic inflammatory state, and that it can affect the humoral response of these individuals, regardless of the ART.

Intriguingly, although in the myeloid compartment the constitutive activation of the inflammasome results in a failure of response against common activators [17,18], LPS and β -glucan strongly activate the complex and the production of IL-1 β in PWH B lymphocytes, suggesting that in these cells the increase of the inflammasome pathway may affect the biology of B lymphocytes.

The results reported in this study strongly indicate that NLRP3 is the main receptor involved in the activation of the inflammasome in B lymphocytes and that it is up-regulated in these cells during chronic HIV infection. It is interesting to underline that both canonical and alternative pathways seem to be altered in PWH B lymphocytes, as demonstrated by the similar inhibitory effect of MCC-950 and CGI-1726 on LPS- or β -glucan-treated cells.

Whether the observed hyper-activation of NLRP3 inflammasome in PWH B cells is beneficial or not to the patient is hard to say. A limitation of this study is the unviability to measure an antigen-specific IgG response in our in-vitro assay. However, taking into account the well described polyclonal activation of B lymphocytes and the increase in immunoglobulin production of all isotypes in PWH [43,44], our findings let us try to hypothesize that a greater activation of the inflammasome may be associated with a polyclonal, rather than monoclonal and efficient, humoral response and that this contributes with the low rate of immunization, typical of these individuals [45]. This hypothesis is supported by the work of Lind *et al.* [46], wherein ART-treated PWH with a higher IL-1 β production exhibit a lesser ability to respond to boosters of a therapeutic HIV-1 vaccine.

A constitutive activation of NLRP3 was observed in patients with the auto-inflammatory syndrome Hyper-IgD Syndrome (OMIM: 260920), characterized by elevated serum IgD levels [47]. Moreover, the loss-of-function SNV rs2043211 in *CARD8* gene, an endogenous inhibitor of NLRP3, has been associated with a low level of antiglycan IgG and IgA in patients with Crohn's disease [48], suggesting that the NLRP3 activation directly correlated with a primary polyclonal humoral response (IgM) and not with a more specific one (IgG, IgA).

Trying to depict this key question and given the poor literature about inflammasome and humoral response, we performed a genetic association study with the aim to evaluate the effect of gain-of-function polymorphisms in *NLRP3* and *IL1B* genes on antibodies production in HIV-infected patients who underwent anti-HBV vaccination. Although *IL1B* promoter variant rs16944 was not associated with immunization response, the two gain-of-function variants in *NLRP3* (rs35829419 and rs10754558) resulted significantly associated with a better immunization response, suggesting a beneficial role of constitutive increase NLRP3 level and/or function, but not of IL-1 β , on humoral response. In a similar way, we have previously reported that gain-of-function variants in *NLRP3* and *IL1B* genes have opposite roles on the CD4⁺ T cells count and consequently on disease prognosis [19]. Therefore, we can hypothesize two scenarios, one in which the *NLRP3* SNVs directly affect the biology of B lymphocytes, maybe through the pathway involving the still unclear activation of NLRP3 and the resulting IgM production by CpG [12], and another in which *NLRP3* genetics contributes to the activation of other cells, such as antigen presenting cells or CD4⁺ T cells for a T cell dependent activation of B lymphocytes.

Despite the use of ART, PWH suffer with a chronic inflammatory condition, which mainly arises from early established gut breach, followed by microbial translocation and consequent wide activation of immune system. The chronic inflammation increased the risk of these patients to develop comorbidities, such as cardiovascular disease, lipodystrophy and neurologic pathologies [49]. Moreover, the consequent abnormalities observed in dendritic cells, T and B cells negatively affect individual response to infections, often opportunistic [50], and also to prophylactic [26,27,45,51,52] or therapeutic [53,54] immunization. It becomes clear that PWH need an anti-inflammatory treatment to be used together with ART trying to avoid or at least to limit the risk of HIV-related chronic inflammatory diseases, and concomitantly to ameliorate the immune senescence. Maybe targeting NLRP3 inflammasome could represent a therapy option.

In conclusion, our findings show for the first time that PWH B lymphocytes also present an augmented activation of the NLRP3 inflammasome, which not only contribute to the high levels of IL-1 β and chronic constitutive inflammation, but also affects the production of immunoglobulins, possibly in a caspase-independent way, as suggested by the genetic association study.

Acknowledgements

We acknowledged all the staff of ‘Serviço de Extensão ao Atendimento de Pacientes com HIV/AIDS (SEAPH)’ of the ‘Hospital das Clínicas’ and Faculty of Medicine

(University of São Paulo, SP, Brazil) for assistance in the recruitment of HIV-infected patients; the Blood Bank of the ‘Oswaldo Cruz’ Hospital (São Paulo, SP, Brazil) for the donation of postplasmapheresis blood donors chambers; Prof. Alexander N.R. Weber (University of Tubingen, Germany) for kindly donation of the BTK inhibitor CGI-1776; Prof. Anderson de Sá Nunes (Departamento de Imunologia, Instituto de Ciencias Biomedicas, Universidade de São Paulo, SP, Brazil) for kind donation of Human IL-10 ELISA kit; Prof. Bruna Cunha de Alencar Bargieri (Departamento de Imunologia, Instituto de Ciencias Biomedicas, Universidade de São Paulo, SP, Brazil) for providing CD19 magnetic beads; Dr Eliana Faquim (PI of ‘Laboratorio de Imunopatologia’ at Butantan Institute) and Alessander Souza (technician of ‘Laboratorio de Biologia Celular’ at Butantan Institute) for the use of the microscope facility at the Butantan Institute (São Paulo, SP, Brazil); Prof. Flávio Vieira Loures (Universidade Federal de São Paulo, SP, Brazil) for kindly donation of the β -glucan (Curdlan).

V.N.C.L. and A.P. designed the study. V.N.C.L. performed all the in-vitro cellular assays. E.C.R. performed the flow cytometry analysis; F.P.F. performed the gene expression analysis; J.S. and I.O. performed the ELISA assays; V.N.C.L. and D.S.L. performed the immunofluorescence assays and confocal imaging analysis. V.N.C.L. performed the genotyping assays; V.N.C.L. and A.P. performed the statistical analysis. A.N.L. and M.H.L. recruited and analysed HIV patients of the cohort studied for HBsAg persistence. All the authors discussed the results and edited the manuscript written by V.N.C.L. and A.P.

This work was supported by the ‘Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo’ [FAPESP; grant numbers: 2015/23395-6, and 2015/50650-7]. A.P. received a Research Fellowship from Brazilian National Council for Research (CNPq). V.N.C.L. and E.C.R. received a PhD Fellowship from FAPESP (process numbers: 2017/10824-1 and 2015/17373-0). J.S. received a MD Fellowship from CAPES; FPF received a MD Fellowship from FAPESP (process number: 2018/04361-1). D.S.L. had received a PhD Fellowship from ‘Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado da Amazonas’ (FAPEAM).

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Supplementary File 4, <http://links.lww.com/QAD/C8>

References

1. Martinon F, Burns K, Tschopp J. **The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- β .** *Molecular cell* 2002; **10**:417–426.

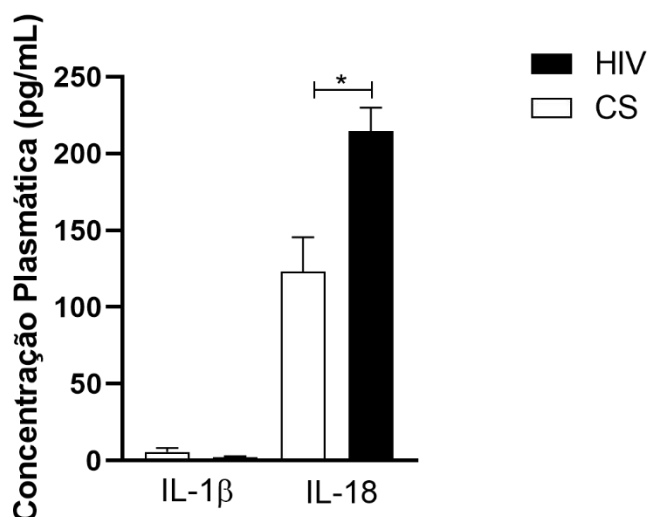
2. Shi J, Zhao Y, Wang K, *et al.* Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature* 2015; **526**:660–665.
3. Kesavardhana S, Kanneganti TD. Mechanisms governing inflammasome activation, assembly and pyroptosis induction. *Int Immunol* 2017; **29**:201–210.
4. Hayward JA, Mathur A, Ngo C, Man SM. Cytosolic recognition of microbes and pathogens: inflammasomes in action. *Microbiol Mol Biol Rev* 2018; **82**:e00015–e00018.
5. Patel MN, Carroll RG, Galvan-Pena S, Mills EL, Olden R, Triantafilou M, *et al.* Inflammasome priming in sterile inflammatory disease. *Trends Mol Med* 2017; **23**:165–180.
6. Evavold CL, Kagan JC. How inflammasomes inform adaptive immunity. *J Mol Biol* 2018; **430**:217–237.
7. Kummer JA, Broekhuizen R, Everett H, Agostini L, Kuijk L, Martinon F, *et al.* Inflammasome components NALP 1 and 3 show distinct but separate expression profiles in human tissues suggesting a site-specific role in the inflammatory response. *J Histochem Cytochem* 2007; **55**:443–452.
8. Bruchard M, Rebe C, Derangere V, Togbe D, Ryffel B, Boidot R, *et al.* The receptor NLRP3 is a transcriptional regulator of TH2 differentiation. *Nat Immunol* 2015; **16**:859–870.
9. Arbore G, West EE, Spolski R, Robertson AAB, Klos A, Rheinheimer C, *et al.* T helper 1 immunity requires complement-driven NLRP3 inflammasome activity in CD4(+) T cells. *Science (New York, NY)* 2016; **352**:aad1210.
10. Arbore G, West EE, Rahman J, Le Friec G, Niyonzima N, Pirooznia M, *et al.* Complement receptor CD46 co-stimulates optimal human CD8⁺ T cell effector function via fatty acid metabolism. *Nat Commun* 2018; **9**:4186.
11. Kumar H, Kumagai Y, Tsuchida T, Koenig PA, Satoh T, Guo Z, *et al.* Involvement of the NLRP3 inflammasome in innate and humoral adaptive immune responses to fungal beta-glucan. *J Immunol* 2009; **183**:8061–8067.
12. Ali MF, Dasari H, Van Keulen VP, Carmona EM. Canonical stimulation of the NLRP3 inflammasome by fungal antigens links innate and adaptive B-lymphocyte responses by modulating IL-1beta and IgM production. *Front Immunol* 2017; **8**:1504.
13. Kankkunen P, Teirilä L, Rintahaka J, Alenius H, Wolff H, Matikainen S. (1,3)-beta-glucans activate both dectin-1 and NLRP3 inflammasome in human macrophages. *J Immunol* 2010; **184**:6335–6342.
14. Jagannathan M, Hasturk H, Liang Y, Shin H, Hetzel JT, Kantarci A, *et al.* TLR cross-talk specifically regulates cytokine production by B cells from chronic inflammatory disease patients. *J Immunol* 2009; **183**:7461–7470.
15. Leal VNC, Reis EC, Pontillo A. Inflammasome in HIV infection: lights and shadows. *Mol Immunol* 2020; **118**:9–18.
16. Sokoya T, Steel HC, Nieuwoudt M, Rossouw TM. HIV as a cause of immune activation and immunosenescence. *Mediators Inflamm* 2017; **2017**:6825493.
17. Pontillo A, Silva LT, Oshiro TM, Finazzo C, Crovella S, Duarte AJ. HIV-1 induces NALP3-inflammasome expression and interleukin-1beta secretion in dendritic cells from healthy individuals but not from HIV-positive patients. *AIDS* 2012; **26**:11–18.
18. Dos Reis EC, Leal VNC, Soares J, Fernandes FP, Souza de Lima D, de Alencar BC, Pontillo A. Flagellin/NLR4 pathway rescues NLRP3-inflammasome defect in dendritic cells from HIV-infected patients: perspective for new adjuvant in immunocompromised individuals. *Front Immunol* 2019; **10**:1291.
19. Reis EC, Leal VNC, da Silva LT, Dos Reis MML, Arganaraz ER, Oshiro TM, Pontillo A. Antagonistic role of IL-1β and NLRP3/IL-18 genetics in chronic HIV-1 infection. *Clin Immunol* 2019; **209**:108266.
20. Bandera A, Masetti M, Fabbiani M, Biasin M, Muscatello A, Squillace N, *et al.* The NLRP3 inflammasome is upregulated in HIV-infected antiretroviral therapy-treated individuals with defective immune recovery. *Front Immunol* 2018; **9**:214–1214.
21. Feria MG, Taborda NA. HIV replication is associated to inflammasomes activation, IL-1beta IL-18 and caspase-1 expression in GALT and peripheral blood. *Plos One* 2018; **13**:e0192845.
22. Ahmad R, Sindhu STA, Toma E, Morisset R, Ahmad A. Elevated levels of circulating interleukin-18 in human immunodeficiency virus-infected individuals: role of peripheral blood mononuclear cells and implications for AIDS pathogenesis. *J Virol* 2002; **76**:12448–12456.
23. Ahmad F, Mishra N, Ahrenstorf G, Franklin BS, Latz E, Schmidt RE, Bossaller L. Evidence of inflammasome activation and formation of monocyte-derived ASC specks in HIV-1 positive patients. *AIDS (London, England)* 2018; **32**:299–307.
24. Nasi M, Pecorini S, De Biasi S, Bianchini E, Digaetano M, Neroni A, *et al.* Altered expression of PYCARD, interleukin 1beta, interleukin 18, and NAIP in successfully treated HIV-positive patients with a low ratio of CD4+ to CD8+ T cells. *J Infect Dis* 2019; **219**:1743–1748.
25. Mangan MSJ, Olhava EJ, Roush WR, Seidel HM, Glick GD, Latz E. Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2018; **17**:588–606.
26. Fonseca MO, Pang LW, de Paula Cavalheiro N, Barone AA, Heloisa Lopes M. Randomized trial of recombinant hepatitis B vaccine in HIV-infected adult patients comparing a standard dose to a double dose. *Vaccine* 2005; **23**:2902–2908.
27. Lara AN, Sartori AM, Fonseca MO, Lopes MH. Long-term protection after hepatitis B vaccination in people living with HIV. *Vaccine* 2017; **35**:4155–4161.
28. Verma D, Särndahl E, Andersson H, Eriksson P, Fredrikson M, Jönsson J-I, *et al.* The Q705K polymorphism in NLRP3 is a gain-of-function alteration leading to excessive interleukin-1 (and IL-18 production). *PLoS One* 2012; **7**:e34977–e134977.
29. Hitomi Y, Ebisawa M, Tomikawa M, Imai T, Komata T, Hirota T, *et al.* Associations of functional NLRP3 polymorphisms with susceptibility to food-induced anaphylaxis and aspirin-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2009; **124**:779–785e6.
30. Hall SK, Perregaux DG, Gabel CA, Woodworth T, Durham LK, Huizinga TW, *et al.* Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein. *Arthritis Rheum* 2004; **50**:1976–1983.
31. Coll RC, Robertson AA, Chae JJ, *et al.* A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. *Nat Med* 2015; **21**:248–255.
32. Hendriks RW, Yuvaraj S, Kil LP. Targeting Bruton's tyrosine kinase in B cell malignancies. *Nat Rev Cancer* 2014; **14**:219–232.
33. Stutz A, Horvath GL, Monks BG, Latz E. ASC speck formation as a readout for inflammasome activation. *Methods Mol Biol* 2013; **1040**:91–101.
34. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative (CT) method. *Nat Protoc* 2008; **3**:1101–1108.
35. Browne EP. Regulation of B-cell responses by Toll-like receptors. *Immunology* 2012; **136**:370–379.
36. Xu H, Liew LN, Kuo IC, Huang CH, Goh DL-M, Chua KY. The modulatory effects of lipopolysaccharide-stimulated B cells on differential T-cell polarization. *Immunology* 2008; **125**:218–228.
37. Peng SL. Signaling in B cells via Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 2005; **17**:230–236.
38. Ali MF, Driscoll CB, Walters PR, Limper AH, Carmona EM. β-glucan-activated human B lymphocytes participate in innate immune responses by releasing proinflammatory cytokines and stimulating neutrophil chemotaxis. *J Immunol* 2015; **195**:5318–5326.
39. Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, *et al.* CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 1995; **374**:546–549.
40. Bauer S, Kirschning CJ, Hacker H, Redecke V, Hausmann S, Akira S, *et al.* Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98**:9237–9242.
41. Lighaam LC, Unger PA, Vredevoogd DW, Verhoeven D, Vermeulen E, Turksma AW, *et al.* In vitro-induced human IL-10(+) B cells do not show a subset-defining marker signature and plastically co-express IL-10 with pro-inflammatory cytokines. *Front Immunol* 2018; **9**:1913.
42. Liu X, Pichulik T, Wolz OO, Dang TM, Stutz A, Dillen C, *et al.* Human NACHT, LRR, and PYD domain-containing protein 3 (NLRP3) inflammasome activity is regulated by and potentially targetable through Bruton tyrosine kinase. *J Allergy Clin Immunol* 2017; **140**:1054–1067.
43. Miedema F, Petit AJ, Terpstra FG, Schattenkerk JK, de Wolf F, Al BJ, *et al.* Immunological abnormalities in human immunodeficiency virus (HIV)-infected asymptomatic homosexual men. HIV affects the immune system before CD4+ T helper cell depletion occurs. *J Clin Invest* 1988; **82**:1908–1914.

44. Shirai A, Cosentino M, Leitman-Klinman SF, Klinman DM. **Human immunodeficiency virus infection induces both polyclonal and virus-specific B cell activation.** *J Clin Invest* 1992; **89**:561–566.
45. Geretti AM, Doyle T. **Immunization for HIV-positive individuals.** *Curr Opin Infect Dis* 2010; **23**:32–38.
46. Lind A, Brekke K, Sommerfelt M, Holmberg JO, Aass HC, Baksaas I, *et al.* **Boosters of a therapeutic HIV-1 vaccine induce divergent T cell responses related to regulatory mechanisms.** *Vaccine* 2013; **31**:4611–4618.
47. Kastner DL, Aksentijevich I, Goldbach-Mansky R. **Autoinflammatory disease reloaded: a clinical perspective.** *Cell* 2010; **140**:784–790.
48. Vasseur F, Sendid B, Broly F, Gower-Rousseau C, Sarazin A, Standaert-Vitse A, *et al.* **The CARD8 p.C10X mutation associates with a low antiglycans antibody response in patients with Crohn's disease.** *BMC Med Genet* 2013; **14**:35.
49. Deeks SG, Lewin SR, Havlir DV. **The end of AIDS: HIV infection as a chronic disease.** *Lancet* 2013; **382**:1525–1533.
50. Zandoni BC, Gandhi RT. **Update on opportunistic infections in the era of effective antiretroviral therapy.** *Infect Dis Clin North Am* 2014; **28**:501–518.
51. Rey D, Krantz V, Partisani M, Schmitt MP, Meyer P, Libbrecht E, *et al.* **Increasing the number of hepatitis B vaccine injections augments anti-HBs response rate in HIV-infected patients: effects on HIV-1 viral load.** *Vaccine* 2000; **18**:1161–1165.
52. Mena G, García-Basteiro AL, Bayas JM, Hepatitis B. **A vaccination in HIV-infected adults: a review.** *Hum Vaccin Immunother* 2015; **11**:2582–2598.
53. Leal L, Lucero C, Gatell JM, Gallart T, Plana M, García F. **New challenges in therapeutic vaccines against HIV infection.** *Expert Rev Vaccines* 2017; **16**:587–600.
54. García F, Plana M, Climent N, León A, Gatell JM, Gallart T. **Dendritic cell based vaccines for HIV infection: the way ahead.** *Hum Vaccin Immunother* 2013; **9**:2445–2452.

APÊNDICE K– Concentração plasmática de IL-18 aumentada em pacientes cronicamente infectados pelo HIV tratados.

Foi avaliada a concentração plasmática das citocinas decorrentes da ativação do inflamassoma, a IL-1 β e IL-18, em pacientes HIV (n = 15) e controles (n = 10) através de Elisa.

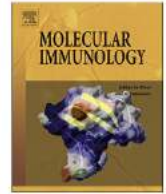
Como demonstrado na figura abaixo, não foi possível observar um nível significativo da IL-1 β no plasma de pacientes e controles ($p > 0,05$). Já para IL-18, foram detectados maiores níveis plasmáticos no grupo de pacientes (214 ± 53 pg/mL) em comparação aos controles (123 ± 58 pg/mL), $p = 0,005$.



Concentração plasmática de IL-1 β e IL-18 em pacientes cronicamente infectados pelo HIV e CS.

Foram dosados os níveis de IL-1 β e IL-18 no plasma de pacientes HIV (n = 15) e controles (n = 10) através de Elisa. Os dados foram representados como média \pm DP em gráfico de barras. Os dados foram comparados com o teste de *Mann-Whitney*, e diferenças com p -value $< 0,05$ (*) foram consideradas significativas.

APÊNDICE L - Artigo publicado: “Inflammasome in HIV infection: Lights and shadowss”.



Inflammasome in HIV infection: Lights and shadows

Vinicius Nunes Cordeiro Leal, Edione Cristina Reis, Alessandra Pontillo*

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

ARTICLE INFO

Keywords:

HIV-1
Inflammasome
NLRP3
IL-1 β
IL-18

ABSTRACT

The importance of inflammasome, and related cytokines IL-1 β and IL-18, in host defense against pathogens is well documented, however, at the same time, dysregulation of inflammasome has been associated to multifactorial diseases characterized by chronic inflammation (i.e.: metabolic disorders, cardiovascular diseases, neurodegenerative diseases, autoimmunity, cancer).

Inflammasome activation has been described in response to HIV-1 and possibly contributes to the resistance against virus establishment, however, on the other hand, when viral infection becomes chronic, independently from antiretroviral therapy, the increase constitutive activation of inflammasome has been eventually associated to a worse prognosis, raising the question about the role played by inflammasome and/or some specific receptors in this context. Due to the chance to imply targeted therapies that inhibit inflammasome activation and/or cytokines release, it will be important to define the impact of the complex in the pathogenesis of HIV.

The purpose of this review is to depict the double-faced inflammasome role in HIV-1 infection, trying to unveil whether besides its role in first line defense against the virus, it exerts a harmful effect during the chronic phase of infection.

1. Introduction

Innate immunity plays a key role in the control of viral infections by detecting viral proteins, DNA or RNA, and eliciting anti-viral response and inflammation. The activation of intracellular signaling pathways culminates in the activation of interferon regulatory factors (IRFs) and type I interferon (IFN-I) production, as well as of pro-inflammatory transcription factors NF- κ B and AP-1 and the consequent expression of several inflammatory mediators, including interleukin (IL)-1 β and IL-18 (Takeuchi and Akira, 2009). These cytokines are expressed as inactive cytosolic pro-forms that require cleavage to release their mature and active molecules. This processing is mediated by inflammasome, a cytoplasmic multiprotein complex mounted in response to infectious and/or sterile stimuli (Martinon et al., 2002).

In the so-called “canonical” pathway for inflammasome activation, pathogen-associated or damage-associated molecular patterns (PAMPs and DAMPs, respectively) are detected by cytosolic innate immune sensors belonging to the superfamily of the nucleotide-binding domain and leucine-rich repeats containing receptors (NLRs), NLRP1/NLRP3, NAIP/NLRC4, or proteins containing at least a PYD domain, such as AIM2, IFI16 and pyrin. While some receptors, like NAIP/NLRC4, IFI16 and AIM2 directly recognize cytosolic bacterial flagellin (Zhao et al., 2011) or dsDNA in the nuclear (Kerur et al., 2011) and/or cytosolic

compartment (Rathinam et al., 2010). Specific alterations in cellular homeostasis are responsible for NLRP1, NLRP3 and pyrin activation.

In humans NLRP1 (Zhong et al., 2018) and pyrin (Xu et al., 2014) have been recently shown to be activated when the corresponding inhibitor protein is dismissed by infectious or sterile stimuli.

A wide range of stimuli (i.e.: bacterial toxins, viral genome, organic and inorganic crystals, ATP, etc) has been reported to activate NLRP3, likely through the induction of common cellular perturbations which are sensed by the receptor. Multiple mechanisms have been proposed for NLRP3 activation (as largely reviewed by Kelley et al., 2019), including (1) ionic flux, such as K⁺ efflux, Ca²⁺ mobilization, Cl⁻ efflux, and Na⁺ influx; (2) mitochondrial dysfunction (and consequent release of reactive oxygen species/ROS, mtDNA, etc); (3) lysosomal damage (and consequent release of content, including cathepsins). In some cell types (i.e.: macrophages) the activation of NLRP3 needs a priming step (provided by microbial components or endogenous cytokines) to up-regulate the expression of inflammasome components, mainly NLRP3 itself and pro-IL-1 β . Several post-translational modification (i.e.: ubiquitination, nitrosylation, phosphorylation) have been described to be involved in NLRP3 activation, at least in animal models (reviewed by Yang et al., 2019). Moreover endogenous interacting molecules (i.e.: CARD8, NEK7) may affect NLRP3 function.

After the recognition of PAMPs and/or DAMPs, activated receptors

* Corresponding author at: Avenida Prof. Lineu Prestes, 1730, 05505-000 Cidade Universitaria, São Paulo, SP, Brazil.

E-mail address: alepontillo@usp.br (A. Pontillo).

<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2019.12.001>

Received 29 July 2019; Received in revised form 27 November 2019; Accepted 3 December 2019

Available online 10 December 2019

0161-5890/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

oligomerize and recruit an inflammatory caspase, generally caspase-1, directly or through the interaction with the adaptor protein ASC (Apoptosis-associated Speck-like protein containing the caspase activation and recruitment domain/CARD). Inflammasome assembly promotes the activation of protease function of caspase-1 which cleaves pro-IL-1 β and pro-IL-18, and another substrate, the pore forming protein gasdermin-D (GSDMD). (Kayagaki et al., 2015; Shi et al., 2015). GSDMD mediates the formation of pores within the cell membrane facilitating IL-1 β and IL-18 release and eventually inducing a lytic and highly inflammatory cell death, known as pyroptosis (He et al., 2015).

Other two mechanism of PAMPs/DAMPs sensing enable the activation of inflammasome, the non-canonical and the alternative pathways. Cytosolic bacterial lipopolysaccharide (LPS), possibly with the contribution of guanylate-binding proteins (GBPs), could be detected by the non-canonical inflammatory caspase-4 and -5 (-11 in mice) (Shi et al., 2014; Liu et al., 2018), which directly cleave GSDMD, but only indirectly induce cytokines maturation, through the activation of canonical pathway (He et al., 2015). Membrane-bound receptors, such as TLR4 or Dectin-1, have also been described to trigger inflammasome assembly through the activation of FADD/RIPK1/caspase-8 (Maelfait et al., 2008) or Syk/BTK/NLRP3 (Kankkunen et al., 2010; Liu et al., 2017) or Syk/CARD9/caspase-8 (Gringhuis et al., 2012) intracellular signaling pathways (alternative route for inflammasome activation).

Inflammasome' components are expressed not only in leukocytes, but also in non-immune cells, including tissue epithelial cells and keratinocytes, which constitute the first barriers against pathogens. Depending on the cell type and condition (homeostasis, infection/stress), their expression can be constitutive or inducible, through Myd88/NF- κ B (i.e.: NLRP3, ASC, IL1B, CASP1) or TRIF/IRFs pathways. (i.e.: AIM2, IFI16, IL18, CASP4/5) (Latz et al., 2013).

The release of IL-1 β and IL-18 following inflammasome activation is a key event in activating innate immune cells, but there is a growing body of evidence that shows the role of cytokines in the polarization of adaptive immune system response, such as IL-1 β induces Th17 response, and IL-18 contributes to Th1 responses and IFN- γ secretion by CD8 + T cells (as largely reviewed in Dostert et al., 2013).

Due to the dramatic pro-inflammatory effect of cytokines related to inflammasome and cell death, the activation of the complex must be strictly regulated. Several mechanisms contribute to the "basal" physiological control: (a) transcription of the components; (b) post-translational modifications of the components (i.e., ubiquitination); (c) maintenance of "closed" conformation of the sensors; (d) presence of inhibitory proteins or microRNAs (i.e.: miR-223) (Latz et al., 2013). Furthermore, there are negative feedback mechanisms that are induced after activation of the inflammasome in order to switch it off, such as IFN1 signaling, nitrosylation, interaction with activated T lymphocytes (through CD40/CD40L and/or IFN- γ production) (largely reviewed in Dostert et al., 2013).

The importance of inflammasome in host defense against pathogens is well documented, however at the same time dysregulation of inflammasome has been associated to both rare monogenic syndromes (auto-inflammatory syndromes) as well as multifactorial diseases characterized by chronic inflammation (i.e.: metabolic disorders, cardiovascular diseases, neurodegenerative diseases, autoimmunity, cancer) (Awad et al., 2018). In the last decades, the discovery of inhibitors for IL-1 β , IL-18 or specific components of inflammasome (i.e.: NLRP3, caspase-1) has allowed a targeted therapeutic approach in auto-inflammatory syndromes, expanding the possibility of use also in other diseases with inflammatory dysregulation (such as rheumatoid arthritis, inflammatory epilepsy, melanoma) (Awad et al., 2018).

Several receptors have been demonstrated to be important in inflammasome formation in response to viruses, including NLRP3 (i.e.: Influenza virus, Adenovirus, Herpes simplex virus (HSV), Varicella zoster virus, Dengue virus, Zika virus, West Nile virus, Hepatitis C virus (HCV), Measles virus, Poliovirus and HIV-1), AIM2 (i.e.: Human

cytomegalovirus, Epstein-Barr virus (EBV), Hepatitis B virus (HBV), Human Papilloma virus (HPV)-16, Chikungunya virus) and IFI16 (EBV, HSV and HIV-1) either inducing cytokines production and/or pyroptosis (as largely reviewed in Man et al., 2017; Mathur et al., 2018).

It is interesting to notice that, differently from the other receptors, IFI16 is localized predominantly in the nucleus, where it binds dsDNA and induces inflammasome activation, but it has been described to exert its function also in the detection of cytosolic dsDNA therefore activating an anti-viral response through the interaction with signaling protein STING (Unterholzner et al., 2010).

Even if it has been demonstrated that inflammasome is activated by several viruses, it remains unclear whether this response is beneficial or not for the host. The fact that some viruses (i.e.: Influenza virus, measles virus (Ichinohe et al., 2013; Komune et al., 2011) expressed molecules that inhibit inflammasome assembling suggest that, at least for these viruses, the complex activation contributes to the viral elimination.

In contrast, when viral infection becomes chronic, such as for HIV-1, HCV or HPV, the inflammatory state of patient heavily contributes to a worse prognosis (largely reviewed in Zicari et al., 2019; Zampino et al., 2013; Fernandes et al., 2015), raising the question about the role played by inflammasome and/or some specific receptors in this context.

The purpose of this review is to depict the double-faced inflammasome role in HIV-1 infection, trying to unveil whether besides its role in first line defense against the virus, it exerts a harmful effect during the chronic phase of infection.

2. Inflammasome sensing of HIV-1: double faces of inflammasome activation

Human immunodeficiency virus, type 1 (HIV-1) is a lentivirus transmitted as single-stranded, positive-sense, enveloped RNA virus, by three main routes: sexual contact, significant exposure to infected body fluids or tissues, and from mother to child during pregnancy, delivery, or breastfeeding (the so-called "vertical" transmission). HIV-1 infects CD4+ cells, mainly T helper cells (Th), but also macrophages and dendritic cells, and directly or indirectly destroys CD4 + T cells leading to the spectrum of disease known as HIV/AIDS (Deeks et al., 2015).

After the virus enters the body, there is a period of intense viral replication, leading to an abundance of virus in lymphatic tissues and in peripheral blood, and concomitantly a marked drop in the level of circulating CD4 + T cells, which can expose the host to opportunistic infections or even cancer. HIV-1 infection of activated CD4 + T cells ("permissive" cells; about 5 % of the total CD4 + T cells) leads to lymphocytes apoptosis through a caspase-3-dependent pathway (Doitsh and Greene, 2016). Moreover, Natural Killer (NK) cytotoxic action together with the induction of a cell-mediated antiviral adaptive immune response, through the activation of CD8 + T cells, heavily contribute to the depletion of infected CD4 + T cells. The cytotoxic response is important in controlling virus levels, and even if it does not eliminate the virus, it has been linked to slower disease progression and a better prognosis (Deeks et al., 2015).

Upon entry into the target cell, the viral RNA genome is converted (reverse transcribed) into double-stranded DNA (dsDNA) by a virally encoded reverse transcriptase that is transported along with the viral genome in the virus particle. The viral DNA is imported into the cell nucleus and integrated into the cellular DNA and become latent, or alternatively transcribed, producing new RNA genomes, which are exported to the cytoplasm and enter the cell machinery for viral protein synthesis (i.e.: Gag, Gag-Pol, Env, Vif, Vpr, Rev, Tat, Nef, Vpr). Once new virus particles are assembled, novel HIV virions are released from the cell, starting a novel infective viral cycle (Ohlmann et al., 2014).

HIV-1 presents several PAMPs (i.e.: envelope, capsid, RNA, reverse-transcribed DNA), that may be detected by innate immune sensors, including Toll-like receptors (TLRs), C-type lectin-like receptors (CLRs), NLRs and nucleic acid receptors (RIG-like receptors and PYD) and

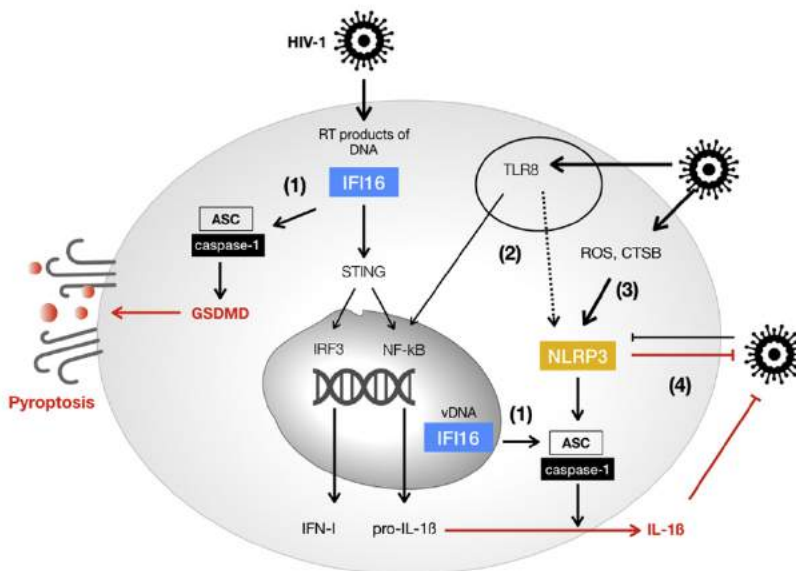


Fig. 1. HIV-1 induces inflammasome activation. Once entering the cell, HIV-1 starts its life cycle and its intermediary products are detected by IFI16 (1) which recruits ASC and caspase-1 leading to inflammasome activation, and through the interaction with STING could induce IFN-I. HIV-1 is sensed by TLR8 (2) and induce the activation of anti-viral response (through IRF3 transcription factors) and inflammatory response (through NF-kB transcription factor), leading to interferon type I (IFN-I) and inflammasome components production, respectively. Moreover through a still unknown mechanism (dotted line) TLR8 is able to induce the activation of NLRP3 inflammasome (2). Through the induction of reactive oxygen species (ROS) and cathepsin B (CTSB) release, HIV-1 could also activate NLRP3 inflammasome (3). It was recently proposed that the interaction of NLRP3 with the purinergic receptor P2Y2 inhibit HIV-1 entry into target cells, however the virus is able to subvert this resistance response by inducing NLRP3 degradation (4). Depending on cell-type and on the entity of the infection, the inflammasome activation could lead to IL-1 β and/or IL-18 production, and eventually to pyroptosis. RT: retro-transcriptase; vDNA: viral DNA.

induce a IFN-I response, including the expression of anti-viral restriction factors, such as APOBEC3C, SAMHD1, CyPA (Colomer-Lluch et al., 2018), and the expression of pro-inflammatory cytokines and chemokines, through the NF-kB transcription pathway.

During these first steps of infection, the virus activates also the sensors NLRP3 and IFI16 (Fig. 1) inducing the expression of inflammasome components (priming) or either the complex assembling and cytokines production and/or pyroptosis depending on the cell type.

HIV-1 is able to induce NLRP3 and IL1B genes expression and leads to inflammasome activation in human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells (DC) (Pontillo et al., 2012b), human monocytes and monocytes-derived macrophages (MDM) (Chattergoon et al., 2014; Guo et al., 2014) and in monocytic cell lines THP-1 (Guo et al., 2014). However the exact mechanism of NLRP3 activation by the virus still remains unclear. According to Guo et al., HIV-1-derived RNA induces both pro-IL-1 β expression (through TLR8 signaling) and NLRP3 activation, through ROS production as well as cathepsin B liberation (Guo et al., 2014). On the other hand, Hernandez et al. demonstrated that HIV-1 induces the transcription of NLRP3 inflammasome components, but it is unable to activate the complex (Hernandez et al., 2015). While the majority of studies measured IL-1 β production, Iannello et al., shown that *in vitro* infection of human MDM with HIV-1 induces high levels of IL-18 (Iannello et al., 2010).

Of note, HIV-1 activates inflammasome also in other macrophage-like cells, such as liver macrophages (Chattergoon et al., 2014), microglia (Chivero et al., 2017; Mamik et al., 2017; Rawat et al., 2019; Walsh et al., 2014b) and not strictly immune cells, such as astrocytes (Ojeda et al., 2018). The common suggested mechanism is based on the virus-induced mitochondrial damage and consequent increased production of ROS, which in turn activate NLRP3 (Zhou et al., 2011). Moreover it has been observed that HIV-1 Tat protein up-regulates NLRP3 inflammasome expression in human microglia (through NF-kB), lowering the threshold of inflammasome activation (Chivero et al., 2017). The viral envelope protein gp120 was also shown to induce efflux of K⁺ from rat cortical neurons (Chen et al., 2011), suggesting a possible mechanism for NLRP3 inflammasome activation in central nervous system (CNS).

Finally, a novel mechanism has been recently proposed in which NLRP3, through the interaction with the purinergic receptor P2Y2, initially represses HIV-1 entry into target cells. However the virus is able to overcome this cellular resistance response by inducing NLRP3 degradation (Paoletti et al., 2019).

Lymphoid compartment, and specifically CD4 + T lymphocytes

represent the preferential target of HIV-1 infection. The first clue of inflammasome activation in HIV-infected CD4 + T cells was reported in 1998 (some years before the description of the inflammasome complex by Martinon et al. (Martinon et al., 2002), which demonstrated the involvement of caspase-1 in HIV-1-mediated programmed cell death (Sloand et al., 1998). More recently, it has been shown that resting CD4 + T lymphocytes (non-permissive to HIV infection) which represents the majority of CD4 + T cells, succumb to pyroptosis, rather than apoptosis (Doitsh et al., 2010, 2014). Cytosolic accumulation of incomplete viral DNA transcripts induces IFI16 inflammasome assembling and activates caspase-1, which in turn mediates cytokines release and pyroptosis of abortively infected CD4 + T cells, heavily contributing to CD4 + T cells depletion and inflammation in lymphoid organs (Galloway et al., 2015; Monroe et al., 2014). (Fig. 2B)

It has been hypothesized that pyroptosis represents a mechanism originated along the evolution to fight intracellular pathogens and revert their escape strategies (He et al., 2015). However in the context of HIV-1 infection this innate immune trick shows its double sword effect, being responsible for inducing a strong inflammatory response and a large recruitment of HIV-1 target cells.

The activation of inflammasome and the induction of an important inflammatory response at this step of virus/host interplay appears to be beneficial for the host, as the treatment with recombinant IL-1 β (rIL-1 β) inhibits HIV-1 replication in PBMC (Wang et al., 2016) (Fig. 2A). Regarding to IL-18, discordant results reported either a beneficial (Wang et al., 2016) or detrimental (Iannello, 2010) role on HIV-1 replication.

Accordingly, gain-of-function genetic variants in NLRP3 gene (rs10754558) (Pontillo et al., 1999, 2012a; Pontillo et al., 2013) and IL1B gene (rs16944, rs1143634) (Pontillo et al., 2012a; Ahir et al., 2013) protect exposed individuals and prevent HIV-1 establishment. The loss-of-function variant in IL18 promoter (rs1946518) increases the risk of HIV infection (Segat et al., 2006) supporting a beneficial rather than detrimental role of this cytokine in host/virus interplay.

3. Chronic HIV-1 infection: the dark side of inflammasome activation

Once the HIV-1 infection has been established, a clinically chronic phase initiates and could last years or decades before HIV-1 begins its life cycle again leading to a strong CD4 + T cells depletion and ultimately to AIDS. The latent phase is characterized by chronic inflammation and immune exhaustion which, also in the presence of

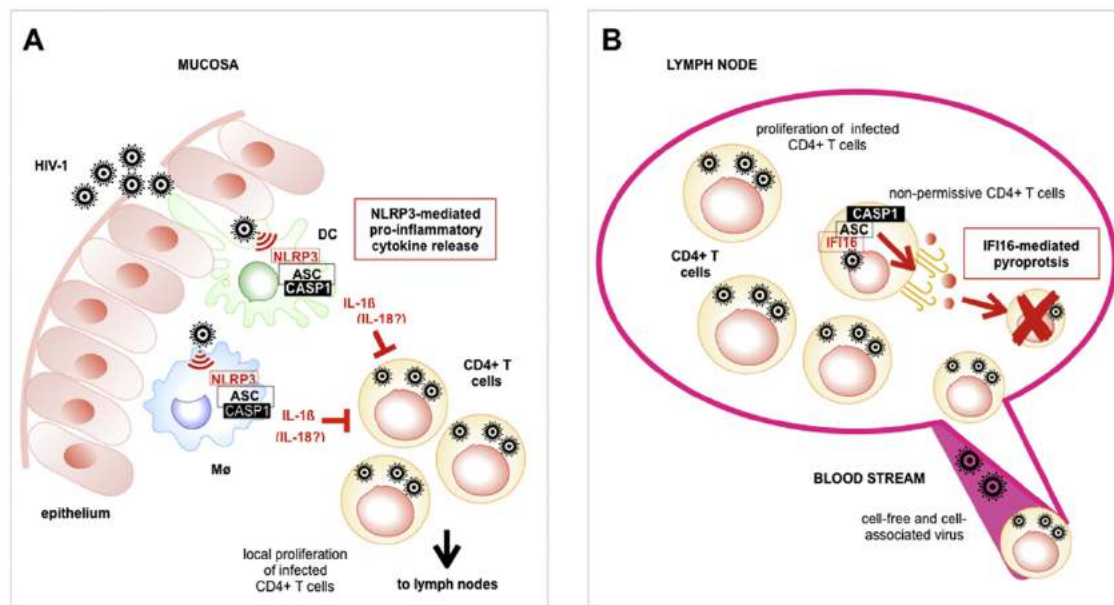


Fig. 2. Inflammasome activation in mucosa and lymphoid tissues. (A) When HIV-1 enter the mucosal surface, it is sensed by resident innate immune cells, such as dendritic cells (DC) and macrophages (M ϕ), and induce the activation of inflammasome and the consequent release of IL-1 β and/or IL-18, which contribute to viral replication restriction in activated CD4 + T lymphocytes, the preferential target of the virus. (B) In infected lymph nodes, the majority of CD4 + T cells are non-permissive to HIV-1 infection, and in these cells intermediate products of abortive infection activates IFI16- and caspase-1-dependent pyroptosis.

reasonable CD4 + T cells count, make HIV-infected individuals more susceptible to infections (Maartens et al., 2014; Zanoni and Gandhi, 2014), cancer (Rubinstein et al., 2014) and, at the same time, less responsive to prophylactic vaccines (Geretti and Doyle, 2010; Mena et al., 2012; Rey et al., 2000). Several factors contribute to this state, including continuous low levels of HIV-1 replication within the so-called “viral reservoirs” (DC, macrophages, brain cells, bone-marrow cells), the damage of gastrointestinal mucosal barrier and the consequent microbial translocation (i.e.: bacterial PAMPs, DAMPs from dying cells), which in turn lead to chronic activation of the immune system (Deeks et al., 2013).

As a consequence of the presence of constant, even if limited, viral replication and especially of circulating PAMPs and DAMPs, a constitutive increased expression of inflammasome components is expected not only in HIV-target cells but also in CD4 negative leukocytes and non-hematopoietic cells (i.e.: in brain tissue) (Zhao et al., 2001) due to the systemic activation of PRRs signaling pathways. This augmented basal transcription of inflammasome molecules has been detected in peripheral blood or tissues and often has found confirmation at protein level. Activated caspase-1 could be also easily identify by assessing cleaved enzymes. More recently, given the newly described technique to show the inflammasome assembling and activation by immunofluorescence staining and microscopy (Stutz et al., 2013), not only single protein of inflammasome have been examined, but also cytosolic agglomerates containing at least the adaptor ASC, the so-called ASC + “specks”. We have described the available literature here below and summarized it in Table 1.

According with the chronic systemic inflammation characteristic of HIV infection, (Deeks et al., 2013) inflammasome genes expression was generally increased in in haematopoietic cells from HIV infected patients. Depending on the cell type and *ex-vivo* or *in vitro* model, an increased expression of specific inflammasome components has been reported in patients’ cells compared with healthy donors.

The up-regulation of *NLRP3*, *AIM2*, *ASC*, *IL1B*, and *IL18* was observed in PBMC from HIV-1-infected individuals compared to healthy donors, and this expression positively correlates with patients’ PVL (Marín-Palma et al., 2018). The mRNA expression of *CASP1*, *IL1B* and *IL18* resulted increased in rapid progressors compared to HIV

controllers (Feria et al., 2018). Nissen et coll. shown that mRNA level of *IFI16* was increased in PBMC from ART-naive patients compared to healthy donors, and that *IFI16* expression was also correlated with high PVL and low CD4 + T cell count (Nissen et al., 2014). Since monocytes and lymphocytes transcription contributes to PBMC global expression levels, and considering the quite different function of inflammasome depending on the cell type (Sharma and Kanneganti, 2016), it could be interesting to better understand whether inflammasome dysregulation is similar in all PBMC or each leukocyte present a specific dysregulation of complex components. Few studies contribute to our knowledge.

The examination of mRNA levels in specific PBMC sub-populations evidenced that *IFI16* expression level is specifically up-regulated in CD4 + T lymphocytes (Cai et al., 2017; Munoz-Arias et al., 2015) and *CASP1* in CD8 + T lymphocytes (Scheuring et al., 1999).

These findings support the idea that even if in T cells from HIV infected patients an increased expression of inflammasome components mRNA was detected, the activation of the complex does not induce cytokines release (absence of cytokine transcripts’ modulation), but more likely other caspase-1-related functions, such as gasdermin-D cleavage and pyroptosis (Shi et al., 2015), or alternatively non-caspase-1 mediated functions, such as transcriptional assistance (Unterholzner et al., 2010), or some not yet described activities. The reported increased *IFI16* mRNA level in CD4 + T lymphocytes (Cai et al., 2017; Munoz-Arias et al., 2015) apparently support the pro-pyroptotic role of this dsDNA receptor in T helper cells, as showed during HIV replication (Monroe et al., 2014). The importance of IFI16- and caspase-1-mediated cell death has been emphasized by the significant association of gain-of-function polymorphism in *IFI16* gene and CD4 + T counts and disease progression (Booiman and Kootstra, 2014). The function of inflammasome in cytotoxic lymphocytes remains still unresolved, but the observed nuclear translocation of NLRP3 in human activated CD8 + T cells (Arbore et al., 2018) suggest a non-canonical transcriptional role of this sensor as previously observed for CD4 + T lymphocytes (Bruchard et al., 2015).

An increased basal expression of *NLR4*, *IL1B* and *IL18* was detected in neutrophils from HIV-infected patients compared to HIV-exposed seronegative individuals (Hernandez et al., 2015), suggesting a detrimental role of inflammasome activation in neutrophils in HIV infection.

Table 1
Alteration in inflammasome expression and/or activation in ART “naive” and ART treated HIV + patients.

Cells/tissues	Molecule	Alteration	Ref
ART naïve HIV Patients			
Serum/plasma	caspase-1	Increased versus HD	Song et al., 2015
	IL-18	Increased versus HD	t al., 2010; Song et al., 2006; Stylianou et al., 2003; Wiercinska-Drapalo et al., 2004
	IL-18BP	Decreased versus HD	Iannello et al., 2010
	<i>NLRP1</i> mRNA	Increased in patients with high PVL	Marín-Palma et al., 2018
	<i>NLRP3</i> mRNA	Increased in patients with high PVL	Feria et al., 2010
	<i>AIM2</i> mRNA	Increased in patients with high PVL	Marín-Palma et al., 2018
PBMC	<i>ASC</i> mRNA	Increased in patients with high PVL	Feria et al., 2010; 70
	<i>CASP1</i> mRNA	Increased in patients with high PVL	Feria et al., 2010
	<i>IL1B</i> mRNA	Increased in patients with high PVL	Feria et al., 2010
	<i>IL18</i> mRNA	Increased in patients with high PVL	Feria et al., 2010
Monocytes	ASC + specks	Increased versus HD	
CD4+ T cells	<i>IFI16</i> mRNA	Increased versus HD	Ahmad et al., 2018
		Decreased versus HD	Nissen et al., 2014
	caspase-1	Decreased versus HD	Munoz-Arias et al., 2015
	<i>CASP1</i> mRNA	Increased versus HD	Munoz-Arias et al., 2015
CD8+ T cells	caspase-1	Increased versus HD	Scheuring et al., 1999
Neutrophils	<i>NLR4</i> mRNA	Increased versus HD	Scheuring et al., 1999
			Hernandez et al., 2015
CSF	IL-18	Increased in patients with CNS infection	von Giesen et al., 2004
Brain tissue	caspase-1	Increased in HIVE versus HD	Zhao et al., 2001
	IL-1 β	Increased in HIVE versus HD	
GALT	<i>NLRP1</i> mRNA	Increased in patients with low CD4 + T	
	<i>CASP1</i> mRNA	Increased in patients with high PVL	Feria et al., 2010
	<i>IL1B</i> mRNA	Increased in patients with high PVL	
	<i>IL18</i> mRNA	Increased in patients with high PVL	
ART Treated HIV Patients			
Serum	IL-18	Decreased versus ART naïve patients	Ahmad Song et al., 2006; Stylianou et al., 2003; Wiercinska-Drapalo et al., 2004
		Increased in INR patients versus IR	Balagopal et al., 2016; Stylianou et al., 2003; Wiercinska-Drapalo et al., 2004
PBMC	<i>NLRP3</i> mRNA	Increased in INR patients versus IR	Bandera et al., 2018
	<i>IFI16</i> mRNA	Increased in patients with high PVL	Nissen et al., 2014
	<i>CASP1</i> mRNA	Increased in INR patients versus IR	Bandera et al., 2018
	<i>IL18</i> mRNA	Decreased versus HD	David et al., 2000
Monocytes	IL-1 β	Increased in patients with low CD4/CD8 T cells ratio	Nasi et al., 2018

HD: Healthy Donors; CNS: Central Nervous System; HIVE: HIV-1 encephalitis; PVL: Plasma Viral Load; IR: Immunological Responders; INR: Immunological Non-responders; CSF: cerebrospinal fluid; PBMC: peripheral blood mononuclear cells; IL-18 BP: IL-18 binding protein. IL-1 β : interleucin 1 β ; IL-18: interleucin 18; mRNA: Messenger RNA; GALT: gut-associated lymphoid tissue; ART: antiretroviral therapy.

Similarly *NLRP3* and *IL1B* genes are up-regulated in peripheral blood monocytes-derived DC from HIV patients compared to healthy donors (Pontillo et al., 2012b)

When looking at protein levels, several authors reported the increased plasma level of caspase-1 protein (Song et al., 2015) and/or IL-18 (Stylianou et al., 2003; Wiercinska-Drapalo et al., 2004; Song et al., 2006; Iannello et al., 2010) in HIV infected patients compared to healthy donors as well as in HIV progressors compared to controllers (Feria et al., 2018), suggesting a direct correlation between viral replication and inflammasome activation and IL-18 production.

Increased caspase-1 activity was found in CD4 + T cells from HIV-infected patients' peripheral blood and tonsils, especially in activated (CD38+) and memory cells (Munoz-Arias et al., 2015). On the other side Ahmad et al., 2002 observed a decreased constitutive activation of caspase-1 in PBMC of HIV patients compared to HD.

Furthermore, HIV patients' peripheral blood monocytes present an elevated number of ASC + specks, which correlates with a low CD4 + T cell count and high plasma viral load (PVL) (Ahmad et al., 2018).

IL-18 plasma level has been correlated both with anti-viral activity (Sailer et al., 2007), but also with progression to AIDS (Allam et al., 2017, 2018). Intriguingly, PBMC are poor IL-18 producers (Ahmad et al., 2002) opening a question about the source of observed high plasma level of cytokine in HIV-infected patients. Inflamed peripheral tissues could participate to IL-18 release, but also plasma platelets as recently reported as a possible source of this cytokine (Allam et al., 2017). Moreover hypothalamus–pituitary–adrenal axis may be also involved in IL-18 release due to chronic physical and psychological stress suffered by HIV-infected patients (as suggested by Samarani et al., 2016).

Of note, the elevated plasma levels of IL-18 observed in HIV-infected individuals do not correlate with a better individual anti-viral response, probably due to the dysregulation of other cytokines, such as IL-12 and IL-15 (Chehimi et al., 1994; A. Ahmad et al., 2000; Chambers et al., 2002), that are necessary to induce a protective antiviral IFN- γ -based response (Th1). Moreover, in contrast with its well-known role in mucosal homeostasis (Rathinam and Chan, 2018), IL-18 appears to contribute to intestinal epithelium damage, therefore favoring microbial translocation and immune activation (Allam et al., 2018).

Of note plasma IL-1 β levels appeared not to be significantly different between HIV-infected individuals and general population (Reddy and Grieco, 1989).

About 70 % of HIV-infected patients develop neurologic complications in the peripheral and/or central nervous system (CNS), secondary of a direct virus effect or of the HIV-related immunosuppression (Bilgrami and O'Keefe, 2014; Sacktor, 2002; von Giesen et al., 2004). Inflammasome activation has been found in brain injury and neurodegenerative diseases (Awad et al., 2018), therefore it was not surprising that IL-18 level in cerebrospinal fluid has been found elevated in HIV-infected patients with neurologic presentation (von Giesen et al., 2004). Moreover brains from HIV-infected individuals with encephalitis present areas with robust staining for caspase-1 and IL-1 β (Zhao et al., 2001), suggesting an important contribution of the complex to the neuroinflammation observed in those patients. As recently reviewed by Gougeon et al., the liberation of alarmins by damaged cells (i.e.: HMGB1, IL-33) activates inflammasome and IL-1 β release in circulating monocytes entering the blood brain barrier, as well as in microglia and astrocytes (Gougeon, 2017), supporting previous findings.

Altogether these data shown d a general constitutive increased

inflammasome expression in HIV-infected patients, as a consequence of chronic PRRs stimulation, therefore lowering complex activation threshold and resulting in the augmented specks formation, caspase-1 cleavage and cytokines release, in turn contributes to the chronic inflammation state of the patients. Of note, association studies corroborate that once the infection is established, a genetically determined constitutively increased inflammasome activation is generally associated to a worse progression of the disease (Booiman and Kootstra, 2014; Reis et al., 2019).

Moreover, this constitutive inflammasome activation appears to be detrimental to the patients, as HIV-infected individuals with high PVL and low CD4 + T cells exhibit higher expression of *ASC*, *CASP1*, *IL1B* and *IL18* genes in gut-associated lymphoid tissue (GALT) and PBMC compared with patients which better control virus replication, once more emphasizing that inflammasome activation goes together with a poor capacity of the host to counteract HIV infection (Feria et al., 2018).

Independently from the initial trigger (i.e.: residual viral replication, microbial translocation, alarmins release or general immune system dysfunction), the increased basal expression/activation of inflammasome appears to be associated to leukocytes unresponsiveness against certain PAMPs and DAMPs, as reported for HIV PBMC (R. Ahmad et al., 2002), monocytes (Nasi et al., 2018) and DC (Pontillo et al., 2012b), suggesting a contribution to the general immune system exhaustion of HIV-infected patients. In response to LPS stimulation HIV patients' PBMC expressed relatively reduced levels of activated caspase-1 (R. Ahmad et al., 2002), while DC release a lower amount of IL-1 β (Pontillo et al., 2012b). In monocytes from patients with a low CD4 + /CD8 + T cells ratio higher *NAIP* and *ASC/PYCARD* messenger RNA levels have been described (Nasi et al., 2018).

Taking into account the important role of NLRP3 inflammasome in DC activation by vaccine adjuvants (Sokolovska et al., 2007; Franchi and Nunez, 2008; Kool et al., 2008), this poor activation state of HIV-infected-patients-derived DC can also contribute to the low responsiveness to vaccination (Geretti and Doyle, 2010; Mena et al., 2012; Rey et al., 2000).

Another interesting example comes from data about DC-based immunotherapy for HIV-infected patients. Discordant results were obtained from clinical trials and considering the key role of NLRP3 for an efficient DC activation (Franchi and Nunez, 2008; Kool et al., 2008; Sokolovska et al., 2007), our group has proposed that the low success rate of this approach could be related to the poor activation rate of NLRP3 inflammasome toward PAMPs/DAMPs in DC from HIV-infected patients (Pontillo et al., 2012b; Dos Reis et al., 2019).

The unresponsiveness of inflammasome, especially NLRP3 inflammasome could be the consequence of regulatory feedback mechanisms (i.e.: Gas-linked G protein coupled receptors) (Sokolovska et al., 2015; Song and Li, 2018) and/or related to

the high IFN-I plasma level commonly observed in HIV-infected patients (Hardy et al., 2013), as it specifically inhibits NLRP3 activation (Guarda et al., 2011).

Up to now, the majority of the studies focused on the NLRP3 receptor, and little is known about an eventual defect in other activation pathways. It could be interesting to deeper investigate how inflammasome is dysregulated in HIV-infected patients. Recently our group have demonstrated that in DC from HIV-infected patients the flagelin/NLRC4 activation pathway does not resulted affected (Reis EC, 2019) suggesting that HIV chronic infection may affect specific but not all mechanisms for inflammasome activation.

4. What about inflammasome activation in ART era?

The introduction of antiretroviral therapy (ART) represented an important therapeutic approach to control HIV infection and profoundly increase the life expectancy, however it is not able to completely eliminate viral latency, chronic inflammation and immune

exhaustion, therefore leading to a new challenge in HIV/AIDS landscape (Deeks et al., 2013). Once HIV-1 infection is controllable, it becomes an inflammatory chronic disease with other lethal consequences: increased risk to cardiovascular events, atherosclerosis, metabolic dysfunction and neurologic disorders (Deeks et al., 2013). All these diseases have been previously associated with inflammasome dysregulation in general population (Masters et al., 2011; Lang and Chu, 2018). Therefore, it is not surprising that ART-treated HIV-infected patients continuing to present constitutive inflammasome activation which can in turn contribute to the pathogenesis of those chronic inflammation-related diseases.

ART drugs act on viral replication reducing one of the possible pro-inflammatory factors in chronic HIV infection. Moreover the nucleoside reverse transcript inhibitors (NRTI) Ritonavir (used since 1996 in HIV-infected patients treatment) has been shown to inhibit assembly of NLRP-3 mediated by P2RX7 ligands (Fowler et al., 2014), reduce the activation of caspase-1 (Weichold et al., 1999; Sloand et al., 1999, 2000) and pyroptosis in CD4 + T cells (Fowler et al., 2014) therefore mediating an anti-inflammatory effect together with the expected antiviral one.

On the other hand, the ART-mediate tissue toxicity and the subsequent generation of DAMPs may contribute to inflammasome activation, as observed for the nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTI), like AZT and Abacavir, which may induce NLRP3 activation, by affecting mitochondria and causing oxidative stress (Toksoy et al., 2017) reviewed in (Torres and Lewis, 2014).

Thus, despite the ability of ART to provide sustained viral suppression, inflammasome remains often dysregulated suggesting that low level of HIV replication and/or the generation of DAMPs may be driving the persistent inflammatory response.

The entity of constitutive inflammasome activation, and related plasma IL-18 levels, in ART-treated HIV-infected patients is lower compared to ART-naive patients (Ahmad et al., 2002; Stylianou et al., 2003; Wiercinska-Drapalo et al., 2004; Song et al., 2006) and depends on the success of the therapy, being lower in the so-called “immunological responders” (IR) compared to “immunological non-responders” (INR) (Stylianou et al., 2003; Wiercinska-Drapalo et al., 2004; Balagopal et al., 2016). Moreover, among IR, patients with a lower CD4/CD8 ratio (< 0.4) showed a better activation of inflammasome in LPS-treated monocytes compared to those with higher CD4/CD8 ratio (> 1.2), emphasizing that ART tends to reduce immune exhaustion in HIV + patients, at least in a subgroup of treated individuals (Nasi et al., 2018). Thus, although ART contributes to the generation of DAMPs and in many cases its effect is controversial, therapy is associated with a better clinical presentation of patients.

In the ART era, HIV-infected patients continue to present an elevated risk of infectious (*M.tuberculosis*, HBV, HCV, CMV, *Cryptococcus* spp), but also non-infectious diseases (cardiovascular diseases, metabolic and neurologic disorders) (Deeks et al., 2013). If in the case of infectious diseases, failure of inflammasome activation can easily be associated with increased susceptibility (or opportunistic microbes), the interplay between sterile diseases and inflammasome dysregulation is more intricate to decipher. The constitutive inflammasome activation determines or, at least, contributes to the disease pathogenesis. On the other hand, other factors such as ART toxicity could trigger the inflammasome and amplify the dysregulation?

In this sense, infectious and non-infectious co-morbidities may result from this constitutive activation of the inflammasome as they may actively contribute to this condition. Literature is elusive about it, possibly due to the difficult in separating several pathogenic factors.

Here we limited our revision to a general description of reported inflammasome activation in different co-morbidities associated with HIV, such as tuberculosis (TB) and cryptococcal infections (Table 2).

Among the most relevant infectious co-morbidities in HIV-infected individuals, TB remains a dramatic world-wide health problem especially in countries with poor access to ART. *M.tuberculosis* is known to

Table 2
Alteration in inflammasome expression and/or activation in HIV patients affected with co-morbidities.

HIV patients	Sample	Molecule	Alteration	Ref
<i>M. tuberculosis</i>				
ART naive HIV patients	PBMC (CD64 + monocytes) Serum	activated (cleaved) caspase-1 IL-1 β	Increased in HIV-TB vs HIV Increased in HIV-TB vs HIV	Tan et al., 2016
	Serum	IL-1 β	Increased in TB IRIS vs TB	Lai et al., 2015
ART treated HIV patients	Whole blood	CASP5 mRNA	Increased in TB IRIS vs TB	
	Whole blood	NLR4, IL1B mRNA	Increased in active TB vs latent TB or no infection	Gebremicael et al., 2018
	Serum	IL-18	Increased in TB IRIS vs TB or non TB	
	PBMC (CD64 + monocytes)	activated (cleaved) caspase-1	Increased in TB IRIS vs TB	Tan et al., 2016
	Monocytes	NLRP1, NLRP3, AIM2, CASP1 mRNA	Increased in TB IRIS vs TB or non TB	
	Whole blood	NLR4 AIM2, CASP1, CASP4, IL1B mRNA	Increased in TBM IRIS vs TBM	Marais et al., 2017
	CSF	caspase-1	Increased in TBM IRIS vs TBM	
HCV				
ALIVE study	Serum	IL-18	Increased in HIV-HCV vs HIV or HCV	Veenhuis et al., 2017
<i>C. meningitis</i>				
ART treated HIV patients	Whole blood	NLRP3, NLR4, NAIP, AIM2, CASP1, CASP5, IL1B mRNA	Increased in HIV C-IRIS (early and late) versus HIV-CM preART	Vlasova-St Louis et al., 2018
Non-infectious co-morbidities				
ART treated HIV patients	Plasma	IL-18	Increased in HIV patients with atherosclerotic plaque compared to those without plaques	Kearns et al., 2019
ART naive patients	Brain	IL-1 β , caspase-1	Increased staining in multinucleated giant cells, macrophages, and microglia in HIVE	Zhao et al., 2001

TB: Tuberculosis; TB-IRIS: Tuberculosis-Associated Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome; C-IRIS: Cryptococcal-Associated Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome; CNS: Central Nervous System; HIVE: HIV-associated encephalitis.

activate NLRP3 inflammasome and the consequent release of IL-1 β and IL-18 in human macrophages (Wassermann et al., 2015), and the capacity of the host in inducing a relevant IL-1 β production is directly correlated to protection against the development of active TB (Mayer-Barber et al., 2014). This concept remains valid also for HIV-infected patients co-infected with *M.tuberculosis* as suggested by the high level of activated caspase-1 in circulating leukocytes and serum concentration of IL-1 β (Tan et al., 2016) (Table 2).

However it is not clear whether the resulting activation of NLRP3 inflammasome is beneficial to HIV-infected patients to counteract *M.tuberculosis* infection as it is for the general population, since a loss-of-function genetic variant in the NLRP3 inhibitor CARD8 (rs2043211; Cys10Ter), which increases activation of NLRP3 inflammasome (Ito et al., 2014), has been associated to an increased risk for HIV-infected patients to develop TB (Pontillo et al., 2013; Ravimohan et al., 2018). As described above, a constitutive increased expression of inflammasome components results in HIV leukocytes unresponsiveness towards PRRs ligands (Pontillo et al., 2012b; Dos Reis et al., 2019), suggesting that the same situation is occurring during mycobacterial infections.

The majority of literature about TB in HIV-infected patients referred to the so-called tuberculosis-immune reconstitution inflammatory syndrome (TB-IRIS), a condition associated to the start of ART in a restricted number of HIV-infected patients which experiment new or worsening of TB symptoms, or even tuberculous meningitis (TBM) with high mortality risk (Namale et al., 2015). In HIV-infected patients which develop TB-IRIS a significant increase of serum IL-1 β (Lai et al., 2015) and IL-18 (Tan et al., 2016) was observed compared to HIV-infected patients with TB or non TB (Table 2). This high level of cytokines appears to be the consequence of increase of caspase-1 activation in circulating leukocytes from TB-IRIS patients (Tan et al., 2016) and also protein level in cerebrospinal fluid (CSF) from TBM-IRIS patients (Marais et al., 2017). Distinct groups described inflammasome mRNA signature in whole blood or isolated monocytes of both TB-IRIS (Tan et al., 2016; Gebremicael et al., 2018; Lai et al., 2015) and TBM-IRIS (Marais et al., 2017) patients (Table 2). Altogether these data suggest the up-regulation of both canonical and non-canonical inflammasome

components. Taking into account the dramatic clinical presentation of TB-IRIS and TBM-IRIS patients, it appears that an increasing inflammasome activation rate is detrimental, rather than beneficial, in HIV-infected patients to counteract *M.tuberculosis*.

A similar landscape has been described for other co-infection such as for the hepatitis C virus (HCV) (Veenhuis et al., 2017) or *C. meningitis* and the Cryptococcus-Related Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome (C-IRIS) (Vlasova-St Louis et al., 2018; Vlasova-St Louis et al., 2018). (Table 2). Of note, loss-of-function variants in *IL18* gene have been reported to affect the severity and outcome of HIV-HCV coinfection (Vergara et al., 2017).

In the context of sterile diseases, ART-treated HIV-infected patients suffer with profound metabolic alterations, including increased level of uric acid (Pirro et al., 2018), dyslipidemia, and low levels of HDL cholesterol (Kearns et al., 2017), which represent severe risks for metabolic and cardiovascular diseases, at least in part through the activation of NLRP3 inflammasome in immune cells and non-hematopoietic cells (i.e. endothelial cells) (Pirro et al., 2018).

Several studies have demonstrated the role of IL-1 β and IL-18 in atherosclerotic plaques formation and cardiovascular diseases (Hsu et al., 2016; Hsue et al., 2018; Pashun and Frishman, 2015; Ridker et al., 2017). Moreover, taking into account the role of activated platelets in atherosclerosis pathogenesis (Hottz et al., 2015) and that platelets represent a main source of plasma IL-1 β (E. D. Hottz et al., 2013), also an increased inflammasome activation in platelets could be hypothesized as co-factor of atherosclerosis and cardiovascular diseases in HIV-infected patients. At that moment, only one study reported that an inflammasome dysregulation could represent a risk factor for the development of this class of diseases. In fact, IL-18 levels resulted increased in ART-treated HIV-infected patients with coronary atherosclerotic plaque compared to those with no atherosclerotic plaque (Kearns et al., 2019).

Inflammasome activation has been implicated in multiple infectious and immune diseases involving the brain (largely reviewed by (Walsh et al., 2014a)), therefore it will not be surprising that may be involved also in neurologic impairment and AIDS dementia experimented by HIV-

infected patients. Brain tissues from HIV-infected patients died for HIV-related encephalitis (HIVE) resulted highly positive for caspase-1 and IL-1 β staining (M. L. Zhao et al., 2001), corroborating this hypothesis.

It has been reported that neurologic complications in ART-treated HIV-infected patients are less severe than in ART-naive individuals, but remain highly prevalent (Kolson, 2017) and possibly related to the still present systemic chronic inflammation.

Indeed, the neuroinflammation can be aggravated by substance abuse (i.e.: alcohol and drugs). Atluri et al. showed that cocaine abuse contribute to neurologic disorders in HIV-infected patients through the up-regulation of AIM2 and NLRP3, and the concomitant inhibition of inflammasome negative regulators (Atluri et al., 2016).

Although much is known about comorbidities such as diabetes, cancer, coagulopathies, bone loss in HIV-infected patients, little is known about its association with the activation of inflammasome. Thus, there are many fields of study to be elucidated.

5. Concluding remarks

The description of inflammasome role in HIV-1 pathogenesis accompanies the different areas of HIV studies, first the investigation of the host/virus contact and innate immune response, including inflammasome receptors among possible cytosolic sensors, and later the attempts to describe the events leading to chronic inflammation and immune system exhaustion in established infection, where inflammasome-related cytokines IL-1 β and especially IL-18 significantly contribute to the chronic condition. Besides the importance of deeply characterize both susceptibility to HIV-1 and/or prognosis, and immune dysfunction in chronic infection, the interest about inflammasome biology within HIV-1 pathogenesis derived from the possibility to use inflammasome components as blood markers for differential prognosis and/or ART response, and over all from the great chance to imply commercially available inflammasome inhibitors as supportive therapy to prevents co-morbidities. Moreover the rescue of correct inflammasome activation in HIV-infected patients could also contribute to a better response towards vaccination.

References

Ahir, S., Chaudhari, D., Chavan, V., Samant-Mavani, P., Nanavati, R., Mehta, P., Mania-Pramanik, J., 2013. Polymorphisms in IL-1 gene cluster and its association with the risk of perinatal HIV transmission, in an Indian cohort. *Immunol. Lett.* 153, 1–8.

Ahmad, A., Ahmad, R., Toma, E., Morisset, R., Menezes, J., 2000. Impaired induction of IL-15 in response to herpes simplex virus type 1 infection in peripheral blood mononuclear cells of HIV-infected patients. *AIDS (London, England)* 14, 744–746.

Ahmad, F., Mishra, N., Ahrenstorff, G., Franklin, B.S., Latz, E., Schmidt, R.E., Bossaller, L., 2018. Evidence of inflammasome activation and formation of monocyte-derived ASC specks in HIV-1 positive patients. *AIDS (London, England)* 32, 299–307.

Ahmad, R., Sindhu, S.T.A., Toma, E., Morisset, R., Ahmad, A., 2002. Elevated levels of circulating interleukin-18 in human immunodeficiency virus-infected individuals: role of peripheral blood mononuclear cells and implications for AIDS pathogenesis. *J. Virol.* 76, 12448–12456.

Allam, O., Samarani, S., Jenabian, M.A., Routy, J.P., Tremblay, C., Amre, D., Ahmad, A., 2017. Differential synthesis and release of IL-18 and IL-18 Binding Protein from human platelets and their implications for HIV infection. *Cytokine* 90, 144–154.

Allam, O., Samarani, S., Mehraj, V., Jenabian, M.-A., Tremblay, C., Routy, J.-P., Amre, D., Ahmad, A., 2018. HIV induces production of IL-18 from intestinal epithelial cells that increases intestinal permeability and microbial translocation. *PLoS One* 13, e0194185–e0194185.

Arbore, G., West, E.E., Rahman, J., Le Friec, G., Niyonzima, N., Pirooznia, M., 2018. Complement receptor CD46 co-stimulates optimal human CD8(+) T cell effector function via fatty acid metabolism. *Nat. Commun.* 9, 4186.

Atluri, V.S., Pilakka-Kanthikeel, S., Garcia, G., Jayant, R.D., Sagar, V., Samikkannu, T., Yndart, A., Nair, M., 2016. Effect of cocaine on HIV infection and inflammasome gene expression profile in HIV infected macrophages. *Sci. Rep.* 6, 27864.

Awad, F., Assrawi, E., Louvrier, C., Jumeau, C., Georjin-Lavialle, S., Grateau, G., Amsellem, S., Giurgea, I., Karabina, S.A., 2018. Inflammasome biology, molecular pathology and therapeutic implications. *Pharmacol. Ther.* 187, 133–149.

Balagopal, A., Gupte, N., Shivakoti, R., Cox, A.L., Yang, W.-T., Berendes, S., Mwelase, N., Kanyama, C., Pillay, S., Samaneka, W., Santos, B., Poongulali, S., Tripathy, S., Riviere, C., Lama, J.R., Cardoso, S.W., Sugandhavesa, P., Semba, R.D., Hakim, J., Hosseinipour, M.C., Kumarasamy, N., Sanne, I., Asmuth, D., Campbell, T., Bollinger,

R.C., Gupta, A., 2016. Continued elevation of interleukin-18 and interferon- γ after initiation of antiretroviral therapy and clinical failure in a diverse multicountry human immunodeficiency virus cohort. *Open Forum Infect. Dis.* 3, ofw118–ofw118.

Bandera, A., Masetti, M., Fabbiani, M., Biasin, M., Muscatello, A., Squillace, N., Clerici, M., Gori, A., Trabattini, D., 2018. The NLRP3 inflammasome is upregulated in HIV-Infected antiretroviral therapy-treated individuals with defective immune recovery. *Front. Immunol.* 9, 214–214.

Bilgrami, M., O'Keefe, P., 2014. Neurologic diseases in HIV-infected patients. *Handb. Clin. Neurol.* 121, 1321–1344.

Booiman, T., Kootstra, N.A., 2014. Polymorphism in IFI16 affects CD4(+) T-cell counts in HIV-1 infection. *Int. J. Immunogenet.* 41, 518–520.

Bruchard, M., Rebe, C., Derangere, V., Togbe, D., Ryyffel, B., Boidot, R., Humblin, E., Hamman, A., Chalmin, F., Berger, H., Chevriaux, A., Limagne, E., Apetoh, L., 2015. The receptor NLRP3 is a transcriptional regulator of TH2 differentiation. *Nat. Immunol.* 16, 859–870.

Cai, R., Liu, L., Luo, B., Wang, J., Shen, J., Shen, Y., Zhang, R., Chen, J., Lu, H., 2017. Caspase-1 activity in CD4+ T cells is downregulated following antiretroviral therapy for HIV-1 infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 33, 164–171.

Chambers, K.A., Parato, K.G., Angel, J.B., 2002. Active cellular infection of myeloid cells is required for HIV-1-mediated suppression of interleukin-12 p40 expression. *Cell. Immunol.* 215, 120–132.

Chattergoon, M.A., Latanich, R., Quinn, J., Winter, M.E., Buckheit 3rd, R.W., Blankson, J.N., Pardoll, D., Cox, A.L., 2014. HIV and HCV activate the inflammasome in monocytes and macrophages via endosomal toll-like receptors without induction of type 1 interferon. *PLoS Pathog.* 10, e1004082.

Chehimi, J., Starr, S.E., Frank, I., D'Andrea, A., Ma, X., MacGregor, R.R., Sennelier, J., Trinchieri, G., 1994. Impaired interleukin 12 production in human immunodeficiency virus-infected patients. *J. Exp. Med.* 179, 1361–1366.

Chen, L., Liu, J., Xu, C., Keblesh, J., Zang, W., Xiong, H., 2011. HIV-1gp120 induces neuronal apoptosis through enhancement of 4-aminopyridine-sensitive outward K+ currents. *PLoS One* 6, e25994.

Chivero, E.T., Guo, M.L., Periyasamy, P., 2017. HIV-1 tat primes and activates microglial NLRP3 inflammasome-mediated neuroinflammation. *J. Neurosci.* 37, 3599–3609.

Colomer-Lluich, M., Ruiz, A., Moris, A., Prado, J.G., 2018. Restriction factors: from intrinsic viral restriction to shaping cellular immunity against HIV-1. *Front. Immunol.* 9, 2876–2876.

David, D., Chevrier, D., Treilhou, M.P., Jousset, M., Dupont, B., Theze, J., Guesdon, J.L., 2000. IL-18 underexpression reduces IL-2 levels during HIV infection: a critical step towards the faulty cell-mediated immunity? *AIDS (London, England)* 14, 2212–2214.

Deeks, S.G., Lewin, S.R., Havlir, D.V., 2013. The end of AIDS: HIV infection as a chronic disease. *Lancet (London, England)* 382, 1525–1533.

Deeks, S.G., Overbaugh, J., Phillips, A., Buchbinder, S., 2015. HIV infection. *Nature reviews. Dis. Primers* 1, 15035.

Doitsh, G., Cavrois, M., Lassen, K.G., Zepeda, O., Yang, Z., Santiago, M.L., Hebbeler, A.M., Greene, W.C., 2010. Abortive HIV infection mediates CD4 T cell depletion and inflammation in human lymphoid tissue. *Cell* 143, 789–801.

Doitsh, G., Galloway, N.L., Geng, X., Yang, Z., Monroe, K.M., Zepeda, O., Hunt, P.W., Hatano, H., Sowinski, S., Munoz-Arias, I., Greene, W.C., 2014. Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. *Nature* 505, 509–514.

Doitsh, G., Greene, W.C., 2016. Dissecting how CD4+ T cells are lost during HIV infection. *Cell Host Microbe* 19, 280–291.

Dos Reis, E.C., Leal, V.N.C., Soares, J., Fernandes, F.P., Souza de Lima, D., de Alencar, B.C., Pontillo, A., 2019. Flagellin/NLR4 pathway rescues NLRP3-Inflammasome defect in dendritic cells from HIV-infected patients: perspective for new adjuvant in immunocompromised individuals. *Front. Immunol.* 10, 1291.

Dostert, C., Ludjigs, K., Guarda, G., 2013. Innate and adaptive effects of inflammasomes on T cell responses. *Curr. Opin. Immunol.* 25, 359–365.

Feria, M.G., Taborada, N.A., Hernandez, J.C., Rugeles, M.T., 2018. HIV replication is associated to inflammasomes activation, IL-1 β , IL-18 and caspase-1 expression in GALT and peripheral blood. *PLoS One* 13, e0192845–e0192845.

Fernandes, J.V., De Medeiros Fernandes, T.A.A., De Azevedo, J.C.V., Cobucci, R.N.O., De Carvalho, M.G.F., Andrade, V.S., De Araújo, J.M.G., 2015. Link between chronic inflammation and human papillomavirus-induced carcinogenesis (Review). *Oncol. Lett.* 9, 1015–1026.

Fowler, B.J., Gelfand, B.D., Kim, Y., Kerur, N., Tarallo, V., Hirano, Y., Amamath, S., Fowler, D.H., Radwan, M., Young, M.T., Pittman, K., Kubes, P., Agarwal, H.K., Parang, K., Hinton, D.R., Bastos-Carvalho, A., Li, S., Yasuma, T., Mizutani, T., Yasuma, R., Wright, C., Ambati, J., 2014. Nucleoside reverse transcriptase inhibitors possess intrinsic anti-inflammatory activity. *Science (New York, N.Y.)* 346, 1000–1003.

Franchi, L., Nunez, G., 2008. The Nlrp3 inflammasome is critical for aluminium hydroxide-mediated IL-1 β secretion but dispensable for adjuvant activity. *Eur. J. Immunol.* 38, 2085–2089.

Galloway, N.L., Doitsh, G., Monroe, K.M., Yang, Z., Munoz-Arias, I., Levy, D.N., Greene, W.C., 2015. Cell-to-cell transmission of HIV-1 is required to trigger pyroptotic death of lymphoid-tissue-derived CD4+ T cells. *Cell Rep.* 12, 1555–1563.

Gebremicael, G., Kassa, D., Quinten, E., Alemayehu, Y., Gebregziabier, A., Belay, Y., van Baarle, D., Ottenhoff, T.H.M., Cliff, J.M., Haks, M.C., 2018. Host gene expression kinetics during treatment of tuberculosis in HIV-coinfected individuals is independent of highly active antiretroviral therapy. *J. Infect. Dis.* 218, 1833–1846.

Geretti, A.M., Doyle, T., 2010. Immunization for HIV-positive individuals. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 23, 32–38.

Gougeon, M.L., 2017. Alarmins and central nervous system inflammation in HIV-associated neurological disorders. *J. Intern. Med.* 281, 433–447.

Gringhuis, S.I., Kaptein, T.M., Wevers, B.A., Theelen, B., van der Vliet, M., Boekhout, T.,

- Geijtenbeek, T.B., 2012. Dectin-1 is an extracellular pathogen sensor for the induction and processing of IL-1 β via a noncanonical caspase-8 inflammasome. *Nat. Immunol.* 13, 246–254.
- Guarda, G., Braun, M., Staehli, F., Tardivel, A., Mattmann, C., Forster, I., Farlik, M., Decker, T., Du Pasquier, R.A., Romero, P., Tschopp, J., 2011. Type I interferon inhibits interleukin-1 production and inflammasome activation. *Immunity* 34, 213–223.
- Guo, H., Gao, J., Taxman, D.J., Ting, J.P.Y., Su, L., 2014. HIV-1 infection induces interleukin-1 β production via TLR8 protein-dependent and NLRP3 inflammasome mechanisms in human monocytes. *J. Biol. Chem.* 289, 21716–21726.
- Hardy, G.A., Sieg, S., Rodriguez, B., Anthony, D., Asaad, R., Jiang, W., Mudd, J., Schacker, T., Funderburg, N.T., Pilch-Cooper, H.A., Debernardo, R., Rabin, R.L., Lederman, M.M., Harding, C.V., 2013. Interferon-alpha is the primary plasma type-I IFN in HIV-1 infection and correlates with immune activation and disease markers. *PLoS One* 8, e56527.
- He, W.T., Wan, H., Hu, L., Chen, P., Wang, X., Huang, Z., Yang, Z.H., Zhong, C.Q., Han, J., 2015. Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1 β secretion. *Cell Res.* 25, 1285–1298.
- Hernandez, J.C., Giraldo, D.M., Paul, S., Urcuqui-Inchima, S., 2015. Involvement of neutrophil hyporesponsiveness and the role of Toll-like receptors in human immunodeficiency virus 1 protection. *PLoS One* 10, e0119844–e0119844.
- Hotz, E.D., Lopes, J.F., Freitas, C., Valls-de-Souza, R., Oliveira, M.F., Bozza, M.T., Da Poian, A.T., Weyrich, A.S., Zimmerman, G.A., Bozza, F.A., Bozza, P.T., 2013. Platelets mediate increased endothelium permeability in dengue through NLRP3-inflammasome activation. *Blood* 122, 3405–3414.
- Hotz, E.D., Monteiro, A.P.T., Bozza, F.A., Bozza, P.T., 2015. Inflammasome in platelets: allying coagulation and inflammation in infectious and sterile diseases? *Mediators Inflamm.* 2015, 435783–435783.
- Hsu, D.C., Ma, Y.F., Hur, S., Li, D., Rupert, A., Scherzer, R., Kalapus, S.C., Deeks, S., Sereti, L., Hsue, P.Y., 2016. Plasma IL-6 levels are independently associated with atherosclerosis and mortality in HIV-infected individuals on suppressive antiretroviral therapy. *AIDS (London, England)* 30, 2065–2074.
- Hsue, P.Y., Li, D., Ma, Y., Ishai, A., Manion, M., Nahrendorf, M., Ganz, P., Ridker, P.M., Deeks, S.G., Tawakol, A., 2018. IL-1 β inhibition reduces atherosclerotic inflammation in HIV infection. *J. Am. Coll. Cardiol.* 72, 2809–2811.
- Iannello, A., Boulassel, M.R., Samarani, S., Tremblay, C., Toma, E., Routy, J.P., Ahmad, A., 2010. HIV-1 causes an imbalance in the production of interleukin-18 and its natural antagonist in HIV-infected individuals: implications for enhanced viral replication. *J. Infect. Dis.* 201, 608–617.
- Ichinohe, T., Yamazaki, T., Koshiba, T., Yanagi, Y., 2013. Mitochondrial protein mitofusin 2 is required for NLRP3 inflammasome activation after RNA virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 17963–17968.
- Ito, S., Hara, Y., Kubota, T., 2014. CARD8 is a negative regulator for NLRP3 inflammasome, but mutant NLRP3 in cryopyrin-associated periodic syndromes escapes the restriction. *Arthritis Res. Ther.* 16, R52–R52.
- Kankkunen, P., Teirila, L., Rintahaka, J., Alenius, H., Wolff, H., Matikainen, S., 2010. (1,3)-beta-glucans activate both dectin-1 and NLRP3 inflammasome in human macrophages. *J. Immunol. (Baltimore, Md.: 1950)* 184, 6335–6342.
- Kayagaki, N., Stowe, I.B., Lee, B.L., O'Rourke, K., Anderson, K., Warming, S., Cuellar, T., Haley, B., Roose-Girma, M., Phung, Q.T., Liu, P.S., Lill, J.R., Li, H., Wu, J., Kummerfeld, S., Zhang, J., Lee, W.P., Snipas, S.J., Salvesen, G.S., Morris, L.X., Fitzgerald, L., Zhang, Y., Bertram, E.M., Goodnow, C.C., Dixit, V.M., 2015. Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. *Nature* 526, 666–671.
- Kearns, A., Gordon, J., Burdo, T.H., Qin, X., 2017. HIV-1-Associated atherosclerosis: unraveling the missing link. *J. Am. Coll. Cardiol.* 69, 3084–3098.
- Kearns, A.C., Liu, F., Dai, S., Robinson, J.A., Kiernan, E., Tesfaye Cheru, L., Peng, X., Gordon, J., Morgello, S., Abuova, A., Lo, J., Zanni, M.V., Grinspoon, S.K., Burdo, T.H., Qin, X., 2019. Caspase-1 activation is related with HIV-associated atherosclerosis in an HIV transgenic mouse model and HIV patient cohort. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 39, 1762–1775.
- Kelley, N., Jeltama, D., Duan, Y., He, Y., 2019. The NLRP3 inflammasome: an overview of mechanisms of activation and regulation. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 3328.
- Kerur, N., Veetil, M.V., Sharma-Walia, N., Bottero, V., Sadagopan, S., Otageri, P., Chandran, B., 2011. IFI16 acts as a nuclear pathogen sensor to induce the inflammasome in response to Kaposi Sarcoma-associated herpesvirus infection. *Cell Host Microbe* 9, 363–375.
- Kolson, D., 2017. Neurologic complications in persons with HIV infection in the era of antiretroviral therapy. *Top. Antivir. Med.* 25, 97–101.
- Komune, N., Ichinohe, T., Ito, M., Yanagi, Y., 2011. Measles virus V protein inhibits NLRP3 inflammasome-mediated interleukin-1 β secretion. *J. Virol.* 85, 13019–13026.
- Kool, M., Petrilli, V., De Smedt, T., Rolaz, A., Hammad, H., van Nimwegen, M., Bergen, L.M., Castillo, R., Lambrecht, B.N., Tschopp, J., 2008. Cutting edge: alum adjuvant stimulates inflammatory dendritic cells through activation of the NALP3 inflammasome. *J. Immunol. (Baltimore, Md.: 1950)* 181, 3755–3759.
- Lai, R.P., Meintjes, G., Wilkinson, K.A., Graham, C.M., Marais, S., Van der Plas, H., Deffur, A., Schutz, C., Bloom, C., Munagala, I., Anguiano, E., Goliath, R., Maartens, G., Banchereau, J., Chaussabel, D., O'Garra, A., Wilkinson, R.J., 2015. HIV-tuberculosis-associated immune reconstitution inflammatory syndrome is characterized by Toll-like receptor and inflammasome signalling. *Nat. Commun.* 6, 8451.
- Lang, Y., Chu, F., 2018. Role of inflammasomes in neuroimmune and neurodegenerative diseases: a systematic review. *Mediators Inflamm.* 2018, 1549549.
- Latz, E., Xiao, T.S., Stutz, A., 2013. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 397–411.
- Liu, B.C., Sarhan, J., Panda, A., Muendlein, H.L., Ilyukha, V., Coers, J., Yamamoto, M., Isberg, R.R., Poltorak, A., 2018. Constitutive interferon maintains GBP expression required for release of bacterial components upstream of pyroptosis and anti-dna responses. *Cell Rep.* 24, 155–168.e155.
- Liu, X., Pichulik, T., Wolz, O.O., Dang, T.M., Stutz, A., Dillen, C., Delmiro Garcia, M., Kraus, H., Dickhofer, S., Daiber, E., Munzenmayer, L., Wahl, S., Rieber, N., Kummerle-Deschner, J., Yazdi, A., Franz-Wachtel, M., Macek, B., Radsak, M., Vogel, S., Schulte, B., Walz, J.S., Hartl, D., Latz, E., Stögenbauer, S., Grimbacher, B., Miller, L., Brunner, C., Wolz, C., Weber, A.N.R., 2017. Human NACHT, LRR, and PYD domain-containing protein 3 (NLRP3) inflammasome activity is regulated by and potentially targetable through Bruton tyrosine kinase. *J. Allergy Clin. Immunol.* 140, 1054–1067.e1010.
- Maartens, G., Celum, C., Lewin, S.R., 2014. HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. *Lancet (London, England)* 384, 258–271.
- Maelfait, J., Vercammen, E., Janssens, S., Schotte, P., Haegman, M., Magez, S., Beyaert, R., 2008. Stimulation of Toll-like receptor 3 and 4 induces interleukin-1 β maturation by caspase-8. *J. Exp. Med.* 205, 1967–1973.
- Mamik, M.K., Hui, E., Branton, W.G., McKenzie, B.A., Chisholm, J., Cohen, E.A., Power, C., 2017. HIV-1 viral protein r activates NLRP3 inflammasome in microglia: implications for HIV-1 associated neuroinflammation. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 12, 233–248.
- Man, S.M., Karki, R., Kanneganti, T.D., 2017. Molecular mechanisms and functions of pyroptosis, inflammatory caspases and inflammasomes in infectious diseases. *Immunol. Rev.* 277 (1), 61–75.
- Marais, S., Lai, R.P.J., Wilkinson, K.A., Meintjes, G., O'Garra, A., Wilkinson, R.J., 2017. Inflammasome activation underlying central nervous system deterioration in HIV-associated tuberculosis. *J. Infect. Dis.* 215, 677–686.
- Marín-Palma, D., Castro, G.A., Cardona-Arias, J.A., Urcuqui-Inchima, S., Hernandez, J.C., 2018. Lower high-density lipoproteins levels during human immunodeficiency virus type 1 infection are associated with increased inflammatory markers and disease progression. *Front. Immunol.* 9, 1350–1350.
- Martinon, F., Burns, K., Tschopp, J., 2002. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-1 β . *Mol. Cell* 10, 417–426.
- Masters, S.L., Latz, E., O'Neill, L.A., 2011. The inflammasome in atherosclerosis and type 2 diabetes. *Sci. Transl. Med.* 3, 81ps17.
- Mathur, A., Hayward, J.A., Man, S.M., 2018. Molecular mechanisms of inflammasome signaling. *J. Leukoc. Biol.* 103, 233–257.
- Mayer-Barber, K.D., Andrade, B.B., Oland, S.D., Amaral, E.P., Barber, D.L., Gonzales, J., Derrick, S.C., Shi, R., Kumar, N.P., Wei, W., Yuan, X., Zhang, G., Cai, Y., Babu, S., Catalano, M., Salazar, A.M., Via, L.E., Barry 3rd, C.E., Sher, A., 2014. Host-directed therapy of tuberculosis based on interleukin-1 and type I interferon crosstalk. *Nature* 511, 99–103.
- Mena, G., Lluja, A., Garcia-Basteiro, A.L., Diez, C., Leon, A., Garcia, F., Bayas, J.M., 2012. Assessing the immunological response to hepatitis B vaccination in HIV-infected patients in clinical practice. *Vaccine* 30, 3703–3709.
- Monroe, K.M., Yang, Z., Johnson, J.R., Geng, X., Doitsh, G., Krogan, N.J., Greene, W.C., 2014. IFI16 DNA sensor is required for death of lymphoid CD4 T cells abortively infected with HIV. *Science (New York, N.Y.)* 343, 428–432.
- Munoz-Arias, I., Doitsh, G., Yang, Z., Sowinski, S., Ruelas, D., Greene, W.C., 2015. Blood-derived CD4 T cells naturally resist pyroptosis during abortive HIV-1 infection. *Cell Host Microbe* 18, 463–470.
- Namale, P.E., Abdullahi, L.H., Fine, S., Kamukemah, M., Wilkinson, R.J., Meintjes, G., 2015. Paradoxical TB-IRIS in HIV-infected adults: a systematic review and meta-analysis. *Future Microbiol.* 10, 1077–1099.
- Nasi, M., Pecorini, S., De Biasi, S., Bianchini, E., Digaetano, M., Neroni, A., Lo Tartaro, D., Pullano, R., Pinti, M., Gibellini, L., Mussini, C., Cossarizza, A., 2018. Altered expression of PYCARD, IL-1 β , IL-18 and NAIP in successfully treated HIV+ patients with low CD4/CD8 ratio. *J. Infect. Dis.*
- Nissen, S.K., Hojen, J.F., Andersen, K.L., Kofod-Olsen, E., Berg, R.K., Paludan, S.R., Ostergaard, L., Jakobsen, M.R., Tolstrup, M., Mogensen, T.H., 2014. Innate DNA sensing is impaired in HIV patients and IFI16 expression correlates with chronic immune activation. *Clin. Exp. Immunol.* 177, 295–309.
- Ohlmann, T., Mengardi, C., López-Lastra, M., 2014. Translation initiation of the HIV-1 mRNA. *Translation (Austin)* 2, e960242–e960242.
- Ojeda, D.S., Grasso, D., Urquiza, J., Till, A., Vaccaro, M.I., Quarleri, J., 2018. Cell death is counteracted by Mitophagy in HIV-productively infected astrocytes but is promoted by inflammasome activation among non-productively infected cells. *Front. Immunol.* 9, 2633–2633.
- Paoletti, A., Allouch, A., Caillet, M., Saidi, H., Subra, F., Nardacci, R., Wu, Q., Muradova, Z., Voisin, L., Raza, S.Q., Law, F., Thoreau, M., Dakhli, H., Delelis, O., Poirier-Beaudouin, B., Dereuddre-Bosquet, N., Le Grand, R., Lambotte, O., Saez-Cirion, A., Pancino, G., Ojcius, D.M., Solary, E., Deutsch, E., Piacentini, M., Gougeon, M.L., Kroemer, G., Perfettini, J.L., 2019. HIV-1 envelope overcomes NLRP3-Mediated inhibition of F-Actin polymerization for viral entry. *Cell Rep.* 28, 3381–3394.e3387.
- Pashun, R.A., Frishman, W.H., 2015. Therapeutic role of innovative anti-inflammatory medications in the prevention of acute coronary syndrome. *Cardiol. Rev.* 23, 252–260.
- Pirro, M., Bianconi, V., Schiaroli, E., Francisci, D., Mannarino, M.R., Bagaglia, F., Sahebkar, A., Merriman, T., Baldelli, F., 2018. Elevated serum uric acid levels are associated with endothelial dysfunction in HIV patients receiving highly-active antiretroviral therapy. *Atherosclerosis* 272, 101–107.
- Pontillo, A., Brandao, L.A., Guimaraes, R.L., Segat, L., Athanakis, E., Crovella, S., 2010. A 3'UTR SNP in NLRP3 gene is associated with susceptibility to HIV-1 infection. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 54 (1999), 236–240.
- Pontillo, A., Carvalho, M.S., Kamada, A.J., Moura, R., Schindler, H.C., Duarte, A.J., Crovella, S., 2013. Susceptibility to Mycobacterium tuberculosis infection in HIV-

- positive patients is associated with CARD8 genetic variant. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 63 (1999), 147–151.
- Pontillo, A., Oshiro, T.M., Girardelli, M., Kamada, A.J., Grovella, S., Duarte, A.J., 2012a. Polymorphisms in inflammasome genes and susceptibility to HIV-1 infection. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 59 (1999), 121–125.
- Pontillo, A., Silva, L.T., Oshiro, T.M., Finazzo, C., Grovella, S., Duarte, A.J., 2012b. HIV-1 induces NALP3-inflammasome expression and interleukin-1 β secretion in dendritic cells from healthy individuals but not from HIV-positive patients. *AIDS (London, England)* 26, 11–18.
- Rathinam, V.A.K., Chan, F.K., 2018. Inflammasome, inflammation, and tissue homeostasis. *Trends Mol. Med.* 24, 304–318.
- Rathinam, V.A.K., Jiang, Z., Waggoner, S.N., Sharma, S., Cole, L.E., Waggoner, L., Vanaja, S.K., Monks, B.G., Ganesan, S., Latz, E., Hornung, V., Vogel, S.N., Szomolanyi-Tsuda, E., Fitzgerald, K.A., 2010. The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses. *Nat. Immunol.* 11, 395–402.
- Ravimohan, S., Nfanyana, K., Tamuhla, N., Tiemessen, C.T., Weissman, D., Bisson, G.P., 2018. Common variation in NLRP3 is associated with early death and elevated inflammasome biomarkers among advanced HIV/TB co-infected patients in Botswana. *Open Forum Infect. Dis.* 5 ofy075-ofy075.
- Rawat, P., Teodorof-Diedrich, C., Spector, S.A., 2019. Human immunodeficiency virus Type-1 single-stranded RNA activates the NLRP3 inflammasome and impairs autophagic clearance of damaged mitochondria in human microglia. *Glia* 67, 802–824.
- Reddy, M.M., Grieco, M.H., 1989. Neopterin and alpha and beta interleukin-1 levels in sera of patients with human immunodeficiency virus infection. *J. Clin. Microbiol.* 27, 1919–1923.
- Reis, E.C., Leal, V.N.C., da Silva, L.T., Dos Reis, M.M.L., Arganaraz, E.R., Oshiro, T.M., Pontillo, A., 2019. Antagonistic role of IL-1 α and NLRP3/IL-18 genetics in chronic HIV-1 infection. *Clin. Immunol. (Orlando, Fla.)* 209, 108266.
- Rey, D., Krantz, V., Partisani, M., Schmitt, M.P., Meyer, P., Libbrecht, E., Wendling, M.J., Vetter, D., Nicolle, M., Kempf-Durepaire, G., Lang, J.M., 2000. Increasing the number of hepatitis B vaccine injections augments anti-HBs response rate in HIV-infected patients. Effects on HIV-1 viral load. *Vaccine* 18, 1161–1165.
- Ridker, P.M., Everett, B.M., Thuren, T., MacFadyen, J.G., Chang, W.H., Ballantyne, C., Fonseca, F., Nicolau, J., Koenig, W., Anker, S.D., Kastelein, J.J.P., Cornel, J.H., Pais, P., Pella, D., Genest, J., Cifkova, R., Lorenzatti, A., Forster, T., Kobalava, Z., Vida-Simiti, L., Flather, M., Shimokawa, H., Ogawa, H., Dellborg, M., Rossi, P.R.F., Troquay, R.P.T., Libby, P., Glynn, R.J., 2017. Antiinflammatory therapy with Canakinumab for atherosclerotic disease. *N. Engl. J. Med.* 377, 1119–1131.
- Rubinstein, P.G., Abouafia, D.M., Zloza, A., 2014. Malignancies in HIV/AIDS: from epidemiology to therapeutic challenges. *AIDS (London, England)* 28, 453–465.
- Sacktor, N., 2002. The epidemiology of human immunodeficiency virus-associated neurological disease in the era of highly active antiretroviral therapy. *J. Neurovirol.* 8 (Suppl. 2), 115–121.
- Sailer, C.A., Pott, G.B., Dinarello, C.A., Whinney, S.M., Forster, J.E., Larson-Duran, J.K., Landay, A., Al-Harhi, L., Schooley, R.T., Benson, C.A., Judson, F.N., Thompson, M., Palella, F.J., Shapiro, L., 2007. Whole-blood interleukin-18 level during early HIV-1 infection is associated with reduced CXCR4 coreceptor expression and interferon-gamma levels. *J. Infect. Dis.* 195, 734–738.
- Samarani, S., Allam, O., Sagala, P., Aldabah, Z., Jenabian, M.A., Mehraj, V., Tremblay, C., Routy, J.P., Amre, D., Ahmad, A., 2016. Imbalanced production of IL-18 and its antagonist in human diseases, and its implications for HIV-1 infection. *Cytokine* 82, 38–51.
- Scheuring, U.J., Sabzevari, H., Corbeil, J., Theofilopoulos, A.N., 1999. Differential expression profiles of apoptosis-affecting genes in HIV-infected cell lines and patient T cells. *AIDS (London, England)* 13, 167–175.
- Segat, L., Bevilacqua, D., Boniotto, M., Arraes, L.C., de Souza, P.R., de Lima Filho, J.L., Grovella, S., 2006. IL-18 gene promoter polymorphism is involved in HIV-1 infection in a Brazilian pediatric population. *Immunogenetics* 58, 471–473.
- Sharma, D., Kanneganti, T.D., 2016. The cell biology of inflammasomes: mechanisms of inflammasome activation and regulation. *J. Cell Biol.* 213, 617–629.
- Shi, J., Zhao, Y., Wang, K., Shi, X., Wang, Y., Huang, H., Zhuang, Y., Cai, T., Wang, F., Shao, F., 2015. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature* 526, 660–665.
- Shi, J., Zhao, Y., Wang, Y., Gao, W., Ding, J., Li, P., Hu, L., Shao, F., 2014. Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. *Nature* 514, 187–192.
- Sloand, E.M., Kumar, P.N., Kim, S., Chaudhuri, A., Weichold, F.F., Young, N.S., 1999. Human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor modulates activation of peripheral blood CD4(+) T cells and decreases their susceptibility to apoptosis in vitro and in vivo. *Blood* 94, 1021–1027.
- Sloand, E.M., Maciejewski, J., Kumar, P., Kim, S., Chaudhuri, A., Young, N., 2000. Protease inhibitors stimulate hematopoiesis and decrease apoptosis and ICE expression in CD34(+) cells. *Blood* 96, 2735–2739.
- Sloand, E.M., Maciejewski, J.P., Sato, T., Bruny, J., Kumar, P., Kim, S., Weichold, F.F., Young, N.S., 1998. The role of interleukin-converting enzyme in Fas-mediated apoptosis in HIV-1 infection. *J. Clin. Invest.* 101, 195–201.
- Sokolovska, A., Hem, S.L., HogenEsch, H., 2007. Activation of dendritic cells and induction of CD4(+) T cell differentiation by aluminum-containing adjuvants. *Vaccine* 25, 4575–4585.
- Sokolovska, M., Chen, L.Y., Liu, Y., Martinez-Anton, A., Qi, H.Y., Logun, C., Alsaaty, S., Park, Y.H., Kastner, D.L., Chae, J.J., Shelhamer, J.H., 2015. Prostaglandin E2 inhibits NLRP3 inflammasome activation through EP4 receptor and intracellular cyclic AMP in human macrophages. *J. Immunol. (Baltimore, Md.: 1950)* 194, 5472–5487.
- Song, J., Jiao, Y., Zhang, T., Zhang, Y., Huang, X., Li, H., Wu, H., 2015. Longitudinal changes in plasma Caspase-1 and Caspase-3 during the first 2 years of HIV-1 infection in CD4Low and CD4High patient groups. *PLoS One* 10, e0121011.
- Song, N., Li, T., 2018. Regulation of NLRP3 inflammasome by phosphorylation. *Front. Immunol.* 9 2305-2305.
- Song, W., Wilson, C.M., Allen, S., Wang, C., Li, Y., Kaslow, R.A., Tang, J., 2006. Interleukin 18 and human immunodeficiency virus type 1 infection in adolescents and adults. *Clin. Exp. Immunol.* 144, 117–124.
- Stutz, A., Horvath, G.L., Monks, B.G., Latz, E., 2013. ASC speck formation as a readout for inflammasome activation. *Methods Mol. Biol.* 1040, 91–101.
- Stylianou, E., Bjerke, V., Yndestad, A., Heggelund, L., Waehre, T., Damás, J.K., Aukrust, P., Frøland, S.S., 2003. Raised serum levels of interleukin-18 is associated with disease progression and may contribute to virological treatment failure in HIV-1-infected patients. *Clin. Exp. Immunol.* 132, 462–466.
- Takeuchi, O., Akira, S., 2009. Innate immunity to virus infection. *Immunol. Rev.* 227, 75–86.
- Tan, H.Y., Yong, Y.K., Shankar, E.M., Paukovics, G., Ellegard, R., Larsson, M., 2016. Aberrant inflammasome activation characterizes tuberculosis-associated immune reconstitution inflammatory syndrome. *J. Immunol.* 196, 4052–4063.
- Toksoy, A., Sennefelder, H., Adam, C., Hofmann, S., Trautmann, A., Goebeler, M., Schmidt, M., 2017. Potent NLRP3 inflammasome activation by the HIV reverse transcriptase inhibitor abacavir. *J. Biol. Chem.* 292, 2805–2814.
- Torres, R.A., Lewis, W., 2014. Aging and HIV/AIDS: pathogenetic role of therapeutic side effects. *Lab. Invest.* 94, 120–128.
- Unterholzer, L., Keating, S.E., Baran, M., Horan, K.A., Jensen, S.B., Sharma, S., Sirois, C.M., Jin, T., Latz, E., Xiao, T.S., Fitzgerald, K.A., Paludan, S.R., Bowie, A.G., 2010. IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. *Nat. Immunol.* 11, 997–1004.
- Veenhuis, R.T., Astemborski, J., Chattergoon, M.A., Greenwood, P., Jarosinski, M., Moore, R.D., Mehta, S.H., Cox, A.L., 2017. Systemic elevation of proinflammatory interleukin 18 in HIV/HCV coinfection versus HIV or HCV monoinfection. *Clin. Infect. Dis.* 64, 589–596.
- Vergara, C., Thio, C., Latanich, R., Cox, A.L., Kirk, G.D., Mehta, S.H., Busch, M., Murphy, E.L., Villacres, M.C., Peters, M.G., French, A.L., Golub, E., Eron, J., Lahiri, C.D., Shrestha, S., Gustafson, D., Young, M., Anastos, K., Aouizerat, B., Kim, A.Y., Lauer, G., Thomas, D.L., Duggal, P., 2017. Genetic basis for variation in plasma IL-18 levels in persons with chronic hepatitis C virus and human immunodeficiency virus-1 infections. *Genes Immun.* 18, 82–87.
- Vlasova-St Louis, I., Chang, C.C., Shahid, S., French, M.A., Bohjanen, P.R., 2018. Transcriptomic predictors of paradoxical cryptococcosis-associated immune reconstitution inflammatory syndrome. *Open Forum Infect. Dis.* 5, ofy157.
- von Giesen, H.-J., Jander, S., Köller, H., Arendt, G., 2004. Serum and cerebrospinal fluid levels of interleukin-18 in human immunodeficiency virus type 1-associated central nervous system disease. *J. Neurovirol.* 10, 383–386.
- Walsh, J.G., Muruve, D.A., Power, C., 2014a. Inflammasomes in the CNS. *Nature reviews. Neurosciences* 15, 84–97.
- Walsh, J.G., Reinke, S.N., Mamik, M.K., McKenzie, B.A., Maingat, F., Branton, W.G., Broadhurst, D.I., Power, C., 2014b. Rapid inflammasome activation in microglia contributes to brain disease in HIV/AIDS. *Retrovirology* 11, 35.
- Wang, X., Mbondji-Wonje, C., Zhao, J., Hewlett, L., 2016. IL-1 β and IL-18 inhibition of HIV-1 replication in Jurkat cells and PBMCs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 473, 926–930.
- Wassermann, R., Gulen, M.F., Sala, C., Perin, S.G., Lou, Y., Rybnik, J., Schmid-Burgk, J.L., Schmidt, T., Hornung, V., Cole, S.T., Ablasser, A., 2015. Mycobacterium tuberculosis differentially activates cGAS- and inflammasome-dependent intracellular immune responses through ESX-1. *Cell Host Microbe* 17, 799–810.
- Weichold, F.F., Bryant, J.L., Pati, S., Barabitskaya, O., Gallo, R.C., Reitz Jr., M.S., 1999. HIV-1 protease inhibitor ritonavir modulates susceptibility to apoptosis of uninfected T cells. *J. Hum. Virol.* 2, 261–269.
- Wiercinska-Drapalo, A., Jaroszewicz, J., Flisiak, R., Prokopowicz, D., 2004. Plasma interleukin-18 is associated with viral load and disease progression in HIV-1-infected patients. *Microbes Infect.* 6, 1273–1277.
- Xu, H., Yang, J., Gao, W., Li, L., Li, P., Zhang, L., Gong, Y.N., Peng, X., Xi, J.J., Chen, S., Wang, F., Shao, F., 2014. Innate immune sensing of bacterial modifications of Rho GTPases by the P2Y $_1$ inflammasome. *Nature* 513, 237–241.
- Yang, Y., Wang, H., Kouadir, M., Song, H., Shi, F., 2019. Recent advances in the mechanisms of NLRP3 inflammasome activation and its inhibitors. *Cell Death Dis.* 10 128-128.
- Zampino, R., Marrone, A., Restivo, L., Guerrero, B., Sellitto, A., Rinaldi, L., Romano, C., Adinolfi, L.E., 2013. Chronic HCV infection and inflammation: clinical impact on hepatic and extra-hepatic manifestations. *World J. Hepatol.* 5, 528–540.
- Zanoni, B.C., Gandhi, R.T., 2014. Update on opportunistic infections in the era of effective antiretroviral therapy. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 28, 501–518.
- Zhao, M.L., Kim, M.O., Morgello, S., Lee, S.C., 2001. Expression of inducible nitric oxide synthase, interleukin-1 and caspase-1 in HIV-1 encephalitis. *J. Neuroimmunol.* 115, 182–191.
- Zhao, Y., Yang, J., Shi, J., Gong, Y.N., Lu, Q., Xu, H., Liu, L., Shao, F., 2011. The NLR4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus. *Nature* 477, 596–600.
- Zhong, F.L., Robinson, K., Teo, D.E.T., Tan, K.Y., Lim, C., Harapas, C.R., Yu, C.H., Xie, W.H., 2018. Human DPP9 represses NLRP1 inflammasome and protects against autoinflammatory diseases via both peptidase activity and FIIND domain binding. *J. Biol. Chem.* 293, 18864–18878.
- Zhou, R., Yazdi, A.S., Menu, P., Tschoop, J., 2011. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 469, 221–225.
- Zicari, S., Sessa, L., Cotugno, N., Ruggiero, A., Morrocchi, E., Concato, C., Rocca, S., Zangari, P., Manno, E.C., Palma, P., 2019. Immune activation, inflammation, and Non-AIDS Co-morbidities in HIV-Infected patients under long-term ART. *Viruses* 11, 200.

ATIVIDADES ACADÊMICAS EXTRACURRICULARES NO PERÍODO

- **Participação em eventos na área:**

1. *IX Annual Meeting of the Postgraduate Program in Immunology.* **Apresentação Oral:** NLRP3 INFLAMMASOME ACTIVATION IN CD4+ T AND CD19+ B LYMPHOCYTES DURING CHRONIC HIV INFECTION. Online, 2020. (Encontro).
2. III Curso Introdutório LADIISC. **Palestra ministrada:** Aspectos gerais sobre a infecção pelo HIV e novas perspectivas em vacinas. São Paulo/SP, 2019. (Curso).
3. *Novel concepts in Innate Immunity.* **Poster:** Contribution of nlrp3 inflammasome in activation state of peripheral blood mononuclear cells in art-treated HIV+ patients and its relationship with clinical outcome. Tubinga/Alemanha, 2019. (Congresso).
4. *VIII Annual Meeting of the Graduate Program in Immunology.* **Apresentação Oral:** NLRP3 inflammasome activation in peripheral blood mononuclear cells in art-treated HIV+ patients. São Paulo/SP, 2019. (Encontro).
5. XIV Curso Avançado de Patogênese do HIV. **Poster:** NLRP3 inflammasome activation in peripheral blood lymphocytes during chronic HIV infection in ART-treated patients. São Paulo/SP, 2019. (Outra). ***Premiação de melhor apresentação.**
6. *Toll 2018 Editing Innate Immunity.* **Poster:** ROLE OF NLRP3 INFLAMMASOME IN PERIPHERAL BLOOD LEUKOCYTES DURING CHRONIC HIV-1 INFECTION. Porto/Portugal, 2018. (Congresso).
7. 25º Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da USP. **Avaliação de posters.** São Paulo/SP, 2017. (Simpósio).
8. Imunologia BMI 296. **Avaliador de posters** na disciplina de graduação Imunologia BMI 296. 2017. (Outra).

9. VI Encontro da Pós-Graduação em Imunologia. **Apresentação Oral:** Caracterização genética e funcional do NLRP3 em linfócitos e monócitos de indivíduos cronicamente infectados por HIV-1. São Paulo/SP, 2017. (Encontro).
10. *XLII Congress of the Brazilian Society of Immunology 2017.* **Poster:** CASPASE-1 DEPENDENT AND INDEPENDENT ROLE OF NLRP3 IN HIV-1 PATHOGENESIS. São Paulo/SP, 2017. (Congresso).
11. *UofT-USP Workshop on Cancer, Inflammation and Immunity.* São Paulo/SP, 2016. (Outra).
12. *XLI Congress of the Brazilian Society of Immunology.* **Poster:** ANALYSIS OF NLRP3-INFLAMMASOME IN PERIPHERAL BLOOD LEUKOCYTES ISOLATED FROM CHRONICALLY INFECTED HIV-1 PATIENTS. 2016. (Congresso).

- **Estágio em docência:**

- Participou do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE) como monitor da disciplina Imunologia Básica (BMI-165) ministrada para o curso de Farmácia-Bioquímica noturno, pelos docentes Prof. Dr. Alexandre A. Steiner e Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes (Março/2018-Junho/2018);

PRODUÇÃO CIENTÍFICA NO PERÍODO

- **Publicações em revistas internacionais indexadas:**

- 1- **LEAL, VINÍCIUS NUNES CORDEIRO;** REIS, EDIONE CRISTINA; FERNANDES, FERNANDA PEREIRA; SOARES, JAÍNE LIMA DA SILVA; OLIVEIRA, IOHANÃ GABRIELY COSTA; SOUZA DE LIMA, DHÊMERTON; LARA, AMANDA NAZARETH; LOPES, MARTA HELOÍSA; PONTILLO, ALESSANDRA. Common PAMPs induce the hyper activation of NLRP3 inflammasome in circulating B

lymphocytes of HIV-infected individuals. AIDS, v. *Publish Ahead of Print*, p. 1, 2021. (**Artigo em APÊNDICE J**);

- 2- BRAGA, TARCIO TEODORO; DAVANSO, MARIANA RODRIGUES; MENDES, DAVI; DE SOUZA, TIAGO ANTONIO; DE BRITO, ANDERSON FERNANDES; CRUZ, MARIO COSTA; HIYANE, MEIRE IOSHIE; DE LIMA, DHEMERSON SOUZA; **NUNES, VINICIUS**; DE FÁTIMA GIAROLA, JULIANA; SOUTO, DENIO EMANUEL PIRES; PRÓCHNICKI, TOMASZ; LAUTERBACH, MARIO; BISCAIA, STELLEE MARCELA PETRIS; DE FREITAS, RILTON ALVES; CURI, RUI; PONTILLO, ALESSANDRA; LATZ, EICKE; CAMARA, NIELS OLSEN SARAIVA. Sensing soluble uric acid by Naip1-Nlrp3 platform. *Cell Death & Disease*, v. 12, p. 1, 2021.
- 3- **LEAL, VINICIUS NUNES CORDEIRO**; REIS, EDIONE CRISTINA; PONTILLO, ALESSANDRA. Inflammasome in HIV infection: Lights and shadows. *MOLECULAR IMMUNOLOGY*, v. 118, p. 9-18, 2020. (**Artigo em APÊNDICE L**).
- 4- REIS, ARAMYS S. BARBOZA, RENATO MURILLO, OSCAR BARATEIRO, ANDRÉ PEIXOTO, ERIKA P. M. LIMA, FLÁVIA A. GOMES, VINÍCIUS M. DOMBROWSKI, JAMILLE G. **LEAL, VINÍCIUS N. C.** ARAUJO, FRANCIELE BANDEIRA, CARLA L. ARAUJO, ROSANA B. D. NERES, RITA SOUZA, RODRIGO M. COSTA, FABIO T. M. PONTILLO, ALESSANDRA BEVILACQUA, ESTELA WRENGER, CARSTEN WUNDERLICH, GERHARD PALMISANO, GIUSEPPE LABRIOLA, LETICIA BORTOLUCI, KARINA R. PENHA-GONÇALVES, CARLOS GONÇALVES, LÍGIA A. EPIPHANIO, SABRINA , et al.; Inflammasome activation and IL-1 signaling during placental malaria induce poor pregnancy outcomes. *SCIENCE ADVANCES*, v. 6, p. eaax6346, 2020.
- 5- CAMBUI, RAYLANE ADRIELLE GONÇALVES; DO ESPÍRITO SANTO, GILMAR FERREIRA; FERNANDES, FERNANDA

- PEREIRA; **LEAL, VINICIUS NUNES CORDEIRO**; GALERA, BIANCA BORSATTO; FÁVARO, EMERSON GIULIANO PALACIO; RIZZO, LEONARDO AMORIM; ELIAS, ROSA MARIA; PONTILLO, ALESSANDRA. Double-edged sword of inflammasome genetics in colorectal cancer prognosis. *CLINICAL IMMUNOLOGY*, v. 1, p. 108373, 2020.
- 6- FERNANDES, FERNANDA PEREIRA; **LEAL, VINICIUS N. C.**; SOUZA DE LIMA, DHEMERSON; REIS, EDIONE C.; PONTILLO, ALESSANDRA. Inflammasome genetics and complex diseases: a comprehensive review. *EUROPEAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS*, v. 1, p. 631, 2020.
- 7- SOUZA DE LIMA, DHÊMERTON; BOMFIM, CAIO C. B.; **LEAL, VINÍCIUS N. C.**; REIS, EDIONE C.; SOARES, JAÍNE L. S.; FERNANDES, FERNANDA P.; AMARAL, EDUARDO P.; LOURES, FLAVIO V.; OGUSKU, MAURICIO M.; LIMA, MARIA R. D'IMPERIO; SADAHIRO, AYA; PONTILLO, ALESSANDRA. Combining Host Genetics and Functional Analysis to Depict Inflammasome Contribution in Tuberculosis Susceptibility and Outcome in Endemic Areas. *Frontiers in Immunology*, v. 11, p. 11, 2020.
- 8- DAVANSO, MARIANA RODRIGUES; CRISMA, AMANDA RABELLO; BRAGA, TÁRCIO TEODORO; MASI, LAUREANE NUNES; DO AMARAL, CÁLIA LIRA; **LEAL, VINÍCIUS NUNES CORDEIRO**; DE LIMA, DHÊMERTON SOUZA; PATENTE, THIAGO ANDRADE; BARBUTO, JOSÉ ALEXANDRE; CORRÊA-GIANNELLA, MARIA LUCIA; LAUTERBACH, MARIO; KOLBE, CARL CHRISTIAN; LATZ, EICKE; CAMARA, NIELS O.S.; PONTILLO, ALESSANDRA; CURI, RUI. Macrophage inflammatory state in type 1 diabetes: triggered by NLRP3/iNOS pathway and attenuated by docosahexaenoic acid (DHA). *CLINICAL SCIENCE*, v. 1, p. 1, 2020.

- 9- REIS, EDIONE CRISTINA DOS; **LEAL, VINÍCIUS NUNES CORDEIRO**; SOARES, JAÍNE LIMA DA SILVA; FERNANDES, FERNANDA PEREIRA; SOUZA DE LIMA, DHÊMERTON; DE ALENCAR, BRUNA CUNHA; PONTILLO, ALESSANDRA. Flagellin/NLRC4 Pathway Rescues NLRP3-Inflammasome Defect in Dendritic Cells From HIV-Infected Patients: Perspective for New Adjuvant in Immunocompromised Individuals. *Frontiers in Immunology*, v. 10, p. 1, 2019.
- 10-REIS, EDIONE C.; **LEAL, VINICIUS N.C.**; DA SILVA, LAIS T.; DOS REIS, MARILIA M.L.; ARGANÁRAZ, ENRIQUE R.; OSHIRO, TELMA M.; PONTILLO, ALESSANDRA. Antagonistic role of IL-1 β and NLRP3/IL-18 genetics in chronic HIV-1 infection. *CLINICAL IMMUNOLOGY*, v. 209, p. 108266, 2019. (**APÊNDICE K**).
- 11-**LEAL, VINICIUS NUNES CORDEIRO**; GENOV, ISABEL RUGUE; MALLOZI, MÁRCIA C; SOLÉ, DIRCEU; PONTILLO, ALESSANDRA. Polymorphisms in inflammasome genes and risk of asthma in Brazilian children. *MOLECULAR IMMUNOLOGY*, v. 93, p. 64-67, 2018.
- 12-DE MORAES RODRIGUES, JULIANA; SOUZA DE LIMA, DHEMERSON; **LEAL, VINICIUS N. C.**; BOSCO, ADRIANA A.; SANDRIM, VALERIA; PONTILLO, ALESSANDRA. Gain-of-function SNPs in NLRP3 and IL1B genes confer protection against obesity and T2D: undiscovered role of inflammasome genetics in metabolic homeostasis?. *ENDOCRINE*, v. 55, p. pp 1?4, 2017.
- 13-DE LIMA, DHEMERSON SOUZA; **NUNES, VINICIUS C.L.**; OGUSKU, MAURICIO M.; SADAHIRO, AYA; PONTILLO, ALESSANDRA; DE CUNHA ALENCAR, BRUNA. Polymorphisms in SIGLEC1 contribute to susceptibility to pulmonary active tuberculosis through the modulation of IL-1 β . *INFECTION GENETICS AND EVOLUTION*, v. 55, p. 313-317, 2017.

14-GADELHA, S. R.; SOARES-BARRETO, D. M. V.; COSTA, G. B.; **LEAL, V. C. N.**; GOMES, L. G. S.; SANTOS, U. R.; FERREIRA, G. C. S.; CARVALHO, L. D.; SORAES-ALMEIDA, S. M. V.; MELLO, M. A. G.; MARIANO, A. P. M.; SOUSA, S. M. B.; VAGO, A. R.; MARIN, L. J. Clinical, laboratory and epidemiological aspects of HPV infection in a low-income population from South Bahia, Brazil. *EPIDEMIOLOGY AND INFECTION*, v. online, p. 1-7, 2017.

15-PONTILLO, A.; BRICHER, P.; **LEAL, V.N.C.**; LIMA, S.; SOUZA, P.R.E.; CROVELLA, S.. Role of inflammasome genetics in susceptibility to HPV infection and cervical cancer development. *JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY*, v. 88, p. 1646-1651, 2016.

- **Artigos submetidos ou em fase de submissão:**

- Valéria de Freitas Dutra, **Vinícius N C Leal**; Fernanda P Fernandes, Claudia Regina L Souza; Maria Stella Figueiredo; Alessandra Pontillo. Genetic Contribution and functional impairment of inflammasome in sickle cell disease. **Submetido na revista *Cytokine*.**
- Fernandes F.P, Cambui R.A.G, Soares J.L, **Leal V.N.C**, Souza de Lima D, Reis E.C, Pontillo A . Cervical cancer induces NLRP3 inflammasome activation in human peripheral blood monocytes. **Submetido na revista *Molecular Immunology*.**
- **Vinícius Nunes Cordeiro LEAL**, Edione Cristina dos REIS, Laís Teodoro da SILVA, Amanda Nazareth LARA, Marta Heloísa LOPES, Telma Miyuki OSHIRO, Alessandra PONTILLO. Common variants in inflammasome receptors NLRP1 and NLRC4 protect against HIV. **Em fase de submissão.**
- Raylane Adrielle Gonçalves Cambui; Fernanda Pereira Fernandes; **Vinícius Nunes Cordeiro Leal**; Edione Cristina dos Reis; Dhêmerson Souza de Lima; Gilma Fereira do Espírito Santo; Rosa Maria Elias; Alessandra Pontillo. The Ala134Thr variant in colorectal cancer prognosis by increasing NLRP3 inflammasome activation. **Em fase de submissão.**



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

São Paulo, 11 de dezembro de 2015.

PARECER 1263/CEPSH

CAAE: 50072315.7.0000.5467

A Comissão de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do ICB, nesta data, **APROVOU** o projeto intitulado: "*Caracterização genética e funcional de células dendríticas de pacientes HIV+ estimuladas com flagelina*" da pesquisadora Profa. Dra. **Alessandra Pontillo**.

Cabe à pesquisadora elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais e final) de acordo com a Resolução nº 466/12, item II, II.19 e II.20, do Conselho Nacional de Saúde, conforme modelo constante no site: www.icb.usp.br.

À pesquisadora cabe também finalizar o processo junto à Plataforma Brasil quando do encerramento deste.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **11.12.2016**, bem como anexado uma cópia à Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

Prof. Dr. **PAOLO M. A. ZANOTTO**

Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

TERMO DE ANUÊNCIA

Autorizamos o fornecimento gratuito de parte do kit descartável de aférese (câmara LRS), contendo o sangue residual rico em leucócitos dos doadores voluntários de sangue, para o laboratório de Imunogenética (responsável: Profa.Dra. Alessandra Pontillo) do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para fins de pesquisa acadêmica, de acordo com o TCLE aplicado aos voluntários antes do procedimento.

São Paulo, 11 de Janeiro de 2019



Joselito Bomfim Brandão
Diretor médico

DR. JOSELITO BOMFIM BRANDÃO
CRM-SP 69.429





USP - INSTITUTO DE
CIÊNCIAS BIOMÉDICAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - ICB/USP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ATIVAÇÃO PATOLÓGICA DO INFLAMASSOMA EM PACIENTES CRONICAMENTE INFECTADOS PELO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV)

Pesquisador: ALESSANDRA PONTILLO

Área Temática: Genética Humana:

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

Versão: 1

CAAE: 33847020.5.0000.5467

Instituição Proponente: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo - ICB/USP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.156.490

Apresentação do Projeto:

Para o estudo serão utilizados leucócitos de pacientes infectados pelo HIV cujas respostas serão comparadas a de participantes saudáveis (HIV negativos). A análise prevê duas abordagens:

- genética: estudo de distribuição de variantes polimórficas em genes do inflamassoma em uma casuística de pacientes com HIV de acordo com estado clínico e comorbidades. A genotipagem será efetuada com ensaios alelo-específicos;
- celular: estudo da ativação do inflamassoma e a caracterização das vias de ativação em leucócitos isolados de sangue periférico de pacientes com HIV. A ativação do complexo será medida através de produção de citocinas (ELISA), expressão gênica, ativação da caspase-1.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo do projeto é investigar os diversos mecanismos (transcricionais e pós-transcricionais) que contribuem para o controle da ativação do inflamassoma em pacientes HIV.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: mínimos, com exceção daqueles associados à coleta de sangue, porém este procedimento não trará nenhum risco à saúde dos voluntários. Todos os materiais utilizados serão descartáveis.

Benefícios: Não haverá benefícios diretos aos participantes, mas o participante estará colaborando

Endereço: Av. Profº Lineu Prestes, 2415

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7733

E-mail: cep@icb.usp.br



Continuação do Parecer: 4.156.490

para o entendimento da infecção crônica pelo HIV e para o possível desenvolvimento de novas terapias e ferramentas de acompanhamento clínico.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto justifica-se pela importância do tema: entender melhor a infecção crônica pelo HIV. O projeto está bem apresentado e planejado. A hipótese é viável. Os objetivos estão claramente definidos e são relevantes para o melhor entendimento da infecção crônica pelo HIV. Os métodos de análise propostos são adequados para atingir os objetivos e são de domínio do grupo, que tem tradição e reconhecimento na área do estudo. Os critérios de inclusão e exclusão dos infectados por HIV estão explicitados, entretanto não há referência ao modo e onde serão recrutados os voluntários do grupo controle nem os critérios de inclusão e exclusão dos mesmos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória foram anexados como as cartas de anuência do SEAP e dos colaboradores.

A linguagem dos TCLEs é adequada ao público a que se destina. Sugiro entretanto, em ambos TCLEs para Controle e HIV,

- 1- incluir a informação que pode aparecer mancha arroxeadada e dor no local da retirada de sangue;
- 2 - incluir o endereço completo da CEP-SH do ICB, no item correspondente;

Recomendações:

Recomendo que nos TCLEs (Controle e HIV)seja

- 1- incluída a informação que pode aparecer mancha arroxeadada e dor no local da retirada de sangue;
- 2- incluído o endereço completo da CEP-SH do ICB, no item correspondente.

Deve ser corrigida a inconsistência em Informações Básicas onde declara que não haverá retenção de amostra pois há pedido de cadastramento de biorrepositório na relação de documentos anexa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Concluo por manter o projeto pendente até que sejam resolvidas as pendências apresentadas no item Recomendações.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado do CEP - ICB concorda com o parecer do relator em aprovar o projeto. Cabe aos

Endereço: Av. Profº Lineu Prestes, 2415

Bairro: Cidade Universitária

UF: SP

Município: SAO PAULO

CEP: 05.508-000

Telefone: (11)3091-7733

E-mail: cep@icb.usp.br



Continuação do Parecer: 4.156.490

pesquisadores executantes elaborar e apresentar a este comitê relatórios anuais (parciais ou final) de acordo com o item II, II.19 e II.20 da resolução 466/12 do Conselho Nacional da Saúde. Com relação às amostras biológicas, em não havendo ainda um biorepositório e se houver retenção de material deverá ser solicitado o devido cadastro conforme modelo constante no "site" do ICB. Ao pesquisador cabe também finalizar o processo junto à plataforma Brasil quando do encerramento deste.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1541563.pdf	16/06/2020 18:24:55		Aceito
Outros	resposta_a_pendencias.pdf	16/06/2020 18:24:32	ALESSANDRA PONTILLO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CartaAnuenciaVinicius.pdf	16/06/2020 18:17:46	ALESSANDRA PONTILLO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	cartaanuenciaMariela.pdf	16/06/2020 18:17:30	ALESSANDRA PONTILLO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_HIV.pdf	15/05/2020 18:39:17	ALESSANDRA PONTILLO	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto_CEP_HIV_assinado.pdf	15/05/2020 18:38:44	ALESSANDRA PONTILLO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	anuencia_SEAP.pdf	15/05/2020 18:38:01	ALESSANDRA PONTILLO	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Cadastramento_de_Biorepositorio.pdf	15/05/2020 18:37:30	ALESSANDRA PONTILLO	Aceito
Outros	anuencia_uso_prontuarios.pdf	15/05/2020 18:36:01	ALESSANDRA PONTILLO	Aceito
Outros	Anexo_2.pdf	16/04/2020 18:37:36	ALESSANDRA PONTILLO	Aceito
Outros	Anexo_1.pdf	16/04/2020 18:37:15	ALESSANDRA PONTILLO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_controle_2020.pdf	16/04/2020 18:33:52	ALESSANDRA PONTILLO	Aceito
TCLE / Termos de	TCLE_HIV_2020.pdf	16/04/2020	ALESSANDRA	Aceito

Endereço: Av. Profº Lineu Prestes, 2415

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7733

E-mail: cep@icb.usp.br



USP - INSTITUTO DE
CIÊNCIAS BIOMÉDICAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - ICB/USP



Continuação do Parecer: 4.156.490

Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_HIV_2020.pdf	18:33:33	PONTILLO	Aceito
--	-------------------	----------	----------	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 15 de Julho de 2020

Assinado por:
Camila Squarzoni Dale
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Profº Lineu Prestes, 2415

Bairro: Cidade Universitária

UF: SP

Município: SAO PAULO

CEP: 05.508-000

Telefone: (11)3091-7733

E-mail: cep@icb.usp.br