

**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética**

Anselmo Jiro Kamada

**Caracterização funcional e imunogenética do
inflamassoma na infecção pelo HIV-1**

**Recife
2013**

Anselmo Jiro Kamada

**Caracterização funcional e imunogenética do
inflamassoma na infecção pelo HIV-1**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Dr. Sergio Crovella

Coorientadora: Dr^a Alessandra Pontilo

Recife

2013

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

K15c Kamada, Anselmo Jiro

Caracterização funcional e imunogenética do inflamassoma na infecção pelo HIV-1/ Anselmo Jiro Kamada– Recife: O Autor, 2013.

84 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Sérgio Crovella

Coorientadora: Alessandra Pontilo

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Genética, 2013.

Inclui bibliografia e anexos

- 1. HIV (infecção) 2. Expressão gênica 3. PCR (Bioquímica) I. Crovella, Sérgio (orientador) II. Pontillo, Alessandra (coorientadora) III. Título**

616.9792

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2013- 190

Anselmo Jiro Kamada

**Caracterização funcional e imunogenética do inflamassoma na
infecção pelo HIV-1**

Aprovado em ____/____/____

Banca Examinadora:

Dr. Paulo Roberto Eleutério
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

Dr^a Paula Sandrin Garcia
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dr. Rafael Lima Guimarães
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Recife
2013

Agradecimentos

Aos meus pais, Antonio e Hiroko, que com o apoio incondicional, compreensão e paciência, marcam presença em todos os momentos, principalmente nos mais difíceis;

À Sergio e Alessandra, pelo entusiasmo, persistência e confiança irrestrita, com quem pude ter grande amizade além da orientação competente;

À Lucas e Rafael, pelo exemplo de humildade e companheirismo desde o momento em que entrei no grupo, facilitando o trabalho sempre com bom humor;

Aos amigos do Grupo de Variabilidade Genética Humana (Paula, Nathália, Jaqueline, Catarina, Ronald, Ronaldinho, Priscila, Márcia, Heidi, Manu, Fernanda e tantos outros) que fazem do lab um ambiente acolhedor;

Aos amigos do LIM-56, em especial, à Telminha, Laís, Claudinha e Alexandre pela enorme atenção e carinho em me apresentar a uma área de pesquisa em que ainda tenho muito a aprender;

Aos amigos da graduação (Antonio, Vitor, Rafael, André, Edvaldo, Marx, Gabriel, Diogo, Keka, Kézia, Thamyras, Rayane e Vanessa) a quem recorro não raramente para compartilhar dos deleites e aflições da carreira científica;

À Dr^a Ana Kelly e Dr. Marcelo Magalhães, pela enorme gentileza e apoio que viabilizaram a realização da carga viral em seu laboratório;

À Dr. Edvaldo Souza e Dr. Lula pela ajuda e oportunidade para que pudesse realizar o trabalho juntamente com os pacientes do Hospital DIA – IMIP;

À Fundação HEMOPE, representados pela Dr^a Sheyla e Dr^a Paula Loureiro pela orientação e coordenação da coleta de bolsas de *buffy coat*;

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE), que apoiou financeiramente a minha trajetória acadêmica (com três bolsas de I.C. e uma de mestrado), assim como no financiamento do projeto;

Aos amigos e professores do Programa de Pós-Graduação em Genética da UFPE pela contribuição à minha formação como geneticista.

Aos meus amigos e familiares pela fidelidade, compreensão e apoio em todos os momentos;

A todos os pacientes e doadores pela solicitude, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.

“...If you can dream -- and not make dreams your master,
If you can think--and not make thoughts your aim;
If you can meet with Triumph and Disaster
And treat those two impostors just the same;
If you can bear to hear the truth you've spoken
Twisted by knaves to make a trap for fools,
Or watch the things you gave your life to, broken,
And stoop and build 'em up with worn-out tools,,,”

(Rudyard Kipling)

Resumo

Recentemente foi demonstrado o envolvimento do complexo protéico conhecido como inflamassoma na resposta inata à infecção pelo HIV-1. O inflamassoma é um complexo citoplasmático constituído principalmente por um receptor de padrões moleculares (NLRP-1, NLRP-3, NLRC-4, IFI16 ou AIM-2) e uma cisteína protease (caspase-1) responsável pela digestão de precursores e citocinas pró-inflamatórias da família IL-1 (IL-1 β , IL-18 e IL-33). A ampla atividade das citocinas IL-1 β e IL-18 na inflamação e ativação de células dendríticas e linfócitos demonstra um papel central do inflamassoma na regulação da resposta imune. A atuação deste complexo pode ter relevância particularmente na infecção pelo HIV-1 no qual o comprometimento do sistema imune é determinante na progressão da doença. Objetivo do trabalho foi avaliar o papel do inflamassoma na infecção pelo HIV-1 através de um modelo celular baseado em células dendríticas derivadas de monócitos (MDDCs). O cultivo alogênico do HIV-1 a partir do sangue periférico de portadores crônicos do HIV-1 e a padronização do protocolo de diferenciação *in vitro* em MDDCs foram estabelecidos inicialmente. Em seguida, a indução da resposta mediada pelo inflamassoma foi avaliada por expressão gênica dos componentes do inflamassoma e de produção de IL-1 β em MDDCs. Contemporaneamente, polimorfismos de base única (SNPs) nos principais genes do inflamassoma foram analisados em coortes de Recife e São Paulo de portadores do HIV-1 para verificar o papel das variações genéticas na susceptibilidade à infecção pelo HIV-1.

Palavras-chave: HIV-1; inflamassoma; expressão gênica SNPs; PCR em tempo real.

Abstract

Recently the participation of a protein complex known as inflammasome was evidenced in innate response to HIV-1 infection. The inflammasome is a cytoplasmic molecular platform constituted of an intracellular molecular pattern receptor (NLRP-1, NLRP-3, NLRC-4, AIM-2) and a cystein protease (caspase-1), which is responsible for the proteolysis of IL-1 family cytokines' precursors (IL-1 β , IL-18 and IL-33). The role of IL-1 β and IL-18 in inflammation and activation of dendritic cells and lymphocytes shows a central role of inflammasome in immune regulation. This is important particularly in HIV-1 infection in which immune system impairment is determinant to disease progression. This study aimed to investigate the role of inflammasome in HIV-1 infection in a cell model based on monocyte derived dendritic cells (MDDC). The allogenic culture of HIV-1 from peripheral blood of HIV-1 chronic carriers and *in vitro* differentiation of MDDC were standardized. Finally HIV-1 was isolated and pulsed on MDDC to evaluate the gene expression of inflammasome components and the IL-1 β secretion. Contemporaneously single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the main inflamassome genes were analyzed in cohorts of HIV-1 carriers from Recife and São Paulo to verify the role of these genetic variations in susceptibility to HIV-1 infection.

Key words: HIV-1; inflammasome; gene expression; SNPs; Real Time PCR.

Lista de Ilustrações

Figura 1 - Dados epidemiológicos de novas infecções e mortes provocadas pela AIDS.....	2
Figura 2 - Representação esquemática das etapas da infecção pelo HIV-1 (Modificado de Stevenson, 2003).....	3
Figura 3 - Curso clínico da infecção pelo HIV-1 na ausência de tratamento e as etapas cruciais da infecção (Modificado de Mogensen <i>et al.</i> , 2010)	5
Figura 4 - Mecanismo de captura do HIV-1 no sítio de entrada do vírus e apresentação antigênica mediada pelas células dendríticas (DCs) no linfonodo, com eventual transmissão de HIV-1 (Adaptado de Wu e Kewal-Ramani, 2006)....	6
Figura 5 - Representação esquemática da ativação de receptor reconhecedor de padrões (PRR) e transcrição de componentes inatos do hospedeiro e de genes virais durante a infecção pelo HIV-1 (Adaptado de Mogensen <i>et al.</i> , 2010).....	7
Figura 6 - Domínios estruturais dos diferentes inflamassomas (Adaptado de Bauernfeind <i>et al.</i> 2011)	9
Figura 7 - Mecanismos de reconhecimento viral pelo NLRP3 e AIM2-Inflamassoma e ativação de citocinas da famílias IL-1 (IL-1 β e IL-18) (Adaptado de Kanneganti, 2010)	9

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Rendimento da produção de partículas virais da cultura alogênica a partir de 3 portadores	22
--	----

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

Sigla	Significados	
	Inglês	Português
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
APC	<i>Antigen presenting cells</i>	Células apresentadoras de antígeno
DCs	<i>Dendritic cells</i>	Células dendríticas
DNA	<i>Desoxirribonucleic acid</i>	Ácido desoxirribonuléico
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>	Ensaio imunoenzimático
HIV-1	<i>Human Immunodeficiency Virus type 1</i>	Vírus da imunodeficiência humana tipo 1
IL-1 β	<i>Interleukin 1β</i>	Interleucina 1 β
IU	<i>International Units</i>	Unidades Internacionais(0.5 cópia de RNA genômico)
MDDC	<i>Monocyte Derived Dendritic Cells</i>	Células dendríticas derivadas de monócitos
NLRP 1	<i>NLR family, pyrin domain containing 1</i>	Proteína da família NLR, contendo domínio pirina 1
NLRP 3	<i>NLR family, pyrin domain containing 3</i>	Proteína da família NLR, contendo domínio pirina 3
NLR	<i>NOD-like receptor</i>	Receptor NOD-like
PAMP	<i>Pathogen associated molecular patterns</i>	Padrões moleculares associados a patógenos
PBMCs	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>	Células mononucleares do sangue periférico
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>	Reação em cadeia da polimerase
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i>	Receptor Reconhecedor de Padrões
P.V.	<i>Viral particules</i>	Partículas virais
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>	Ácido ribonuléico
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>	Polimorfismo de base única
UNAIDS	<i>Joint United Nations Programme on HIV and AIDS</i>	Programa das Nações Unidas de Combate à HIV/AIDS
WHO	<i>World Health Organization</i>	Organização Mundial de Saúde

Sumário

1. Introdução	1
2. Revisão da Literatura	2
2.1 A infecção pelo vírus da imunodeficiência Humana tipo 1 (HIV-1).....	2
2.2 Células dendríticas na infecção pelo HIV-1	5
2.3 Inflamassoma	8
3. Objetivos	12
3.1 Geral	12
3.2 Específicos	12
4. Capítulo I - Expressão de genes do inflamassoma em células dendríticas imaturas pulsadas com HIV-1	13
5. Capítulo II - Caracterização imunogenética do inflamassoma na infecção pelo HIV-1.....	31
5.1 Polymorphisms in Inflammasome' Genes and Susceptibility to HIV-1 Infection	31
5.2 Susceptibility to M tuberculosis infection in HIV-positive patients is associated with CARD8 genetic variants	37
6. Discussão geral	58
7. Conclusões gerais.....	63
8. Referências bibliográficas	64
9. Apêndices.....	67
10. Anexos	800
11. Currículo Lattes atualizado.....	833

1. Introdução

A avaliação da dinâmica interação entre o vírus e o hospedeiro representa um enorme desafio especialmente quando se trata da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1). O desenvolvimento patológico pelo HIV-1 envolve diversos aspectos imunológicos, no entanto tem sido destacado recentemente o papel da resposta inicial do hospedeiro, desempenhado principalmente pela imunidade inata, como fator positivo no prognóstico da infecção, e como objeto de estudo para o desenvolvimento terapêutico.

O sistema imune inato representa a primeira linha de defesa contra patógenos, através de barreiras epiteliais, o sistema do complemento e células apresentadoras de antígenos, como as células dendríticas (DCs), granulócitos e macrófagos. As DCs são as mais importantes células apresentadoras de antígenos do sistema imune, desempenhando papel essencial na resposta inicial ao HIV-1, através da captura de antígenos nas mucosas, migração para os linfonodos e ativação de células T imaturas.

Receptores de reconhecimento de padrões expressos nas células apresentadoras de antígenos são capazes de reconhecer componentes conservados em patógenos e de regular a interface entre a imunidade inata e adaptativa. Um complexo inflamatório conhecido como inflamassoma tem se destacado principalmente neste aspecto, através do reconhecimento de patógenos e da ativação de citocinas pró-inflamatórias da família IL-1.

Desta forma, o estabelecimento de modelos de infecção pelo HIV-1 em DCs, associado à avaliação funcional e imunogenética do inflamassoma poderá elucidar o papel deste complexo na regulação imune à infecção pelo HIV-1.

2. Revisão da Literatura

2.1 A infecção pelo vírus da imunodeficiência tipo 1 (HIV-1)

A infecção pelo vírus da imunodeficiência tipo 1 (HIV-1) constitui um dos principais desafios globais de saúde pública, visto que desde a sua descoberta na década de 80 até hoje, aproximadamente 30 milhões de mortes foram decorrentes da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) causada pelo vírus, e ainda tem afetado cerca de 33 milhões de portadores em todo o mundo (UNAIDS/WHO, 2012). No Brasil, foram notificados do início da epidemia até junho de 2011, 608.230 casos de AIDS, constituindo cerca de um terço dos portadores do HIV-1 em toda a América do Sul e Central (UNAIDS/WHO, 2012). O desenvolvimento e o maior acesso de terapias antirretrovirais, além da adoção de medidas de prevenção promovidas em diversos países, promoveram a redução nas mortes decorrentes da AIDS e aumento da qualidade de vida, no entanto a epidemia está longe de ser interrompida (Fig. 1) (UNAIDS/WHO, 2012).

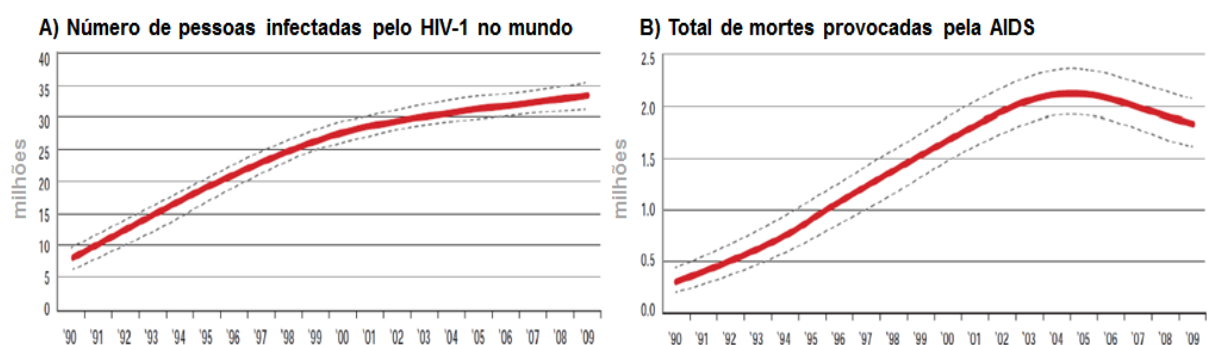


Figura 1 - Dados epidemiológicos de novas infecções e mortes provocadas pela AIDS.

O HIV-1 possui a capacidade de infectar diversos tipos celulares, dentre os quais se destacam os linfócitos T (CD4+ e CD8+) como os principais alvos, além de macrófagos, células dendríticas (DCs), monócitos e células NK (*"Natural*

Killers”) (Garzino-Demo e Gallo, 2003). Esta capacidade é atribuída à glicoproteína do envelope, a gp120, de se ligar ao receptor CD4 destas células em concomitância com receptores de quimiocinas CCR-5 ou CXCR-4 que atuam como co-receptores do vírus, de acordo com o seu tropismo (com prevalência do R5 na fase aguda e X4 na fase tardia da infecção, Fig. 2)(Coakley *et al.*, 2005).

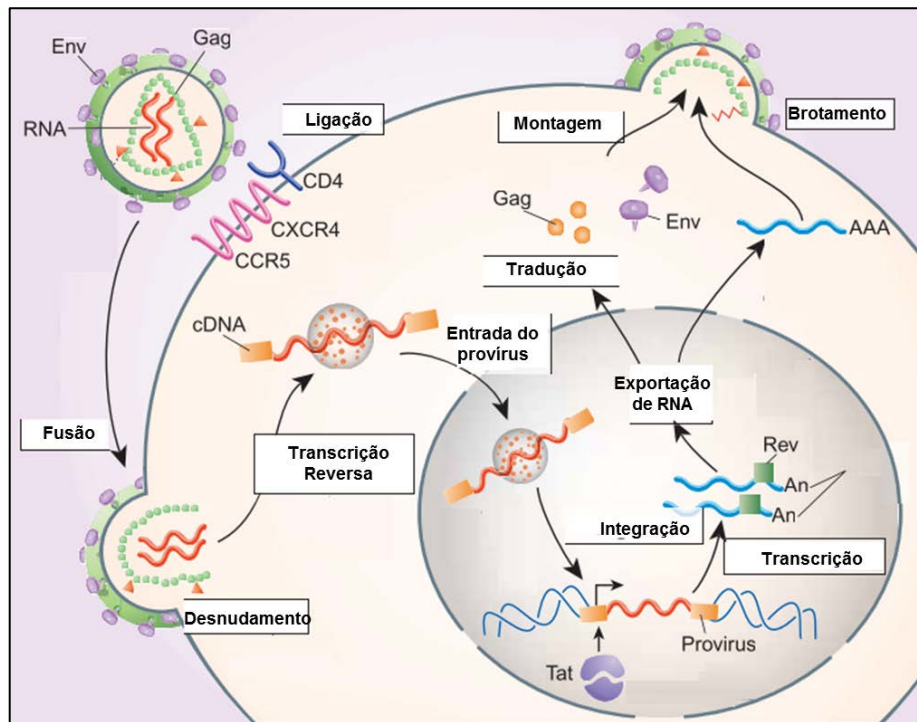


Figura 2 - Representação esquemática das etapas da infecção pelo HIV-1 (Modificado de Stevenson, 2003).

Os mecanismos patogênicos do HIV-1 têm sido atribuídos majoritariamente a efeitos diretos da depleção de linfócitos T-CD4+, bem como por efeitos indiretos, ao afetar células infectadas e não infectadas por reações aberrantes do sistema imune (Stevenson, 2003). Embora a progressão clínica da infecção, na ausência de tratamento, seja bem caracterizada (em fase aguda, fase crônica e síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS)), diversos aspectos da interação entre fatores imunes e virais que compõem cada fase continuam indefinidos (Moir *et al.*, 2011).

A fase aguda (ou primária) da infecção é o período de estabelecimento da infecção até o surgimento dos primeiros sinais clínicos, como a apresentação de níveis detectáveis de anticorpos HIV-1-específicos (McMichael *et al.*, 2009; Mogensen *et al.*, 2010). As primeiras semanas em transmissões sexuais são caracterizadas por replicação nas mucosas genitais com níveis plasmáticos de RNA viral indetectáveis. A infecção das primeiras células na mucosa induz o recrutamento de novas células alvos, provocando a expansão da infecção até os linfonodos proximais. A alta replicação viral e a depleção brusca de linfócitos nos órgãos linfóides são controladas parcialmente após uma intensa ativação do sistema imune, mediando a inflamação e efeitos citotóxicos sobre células infectadas. Esta fase aguda pode ser caracterizada de forma assintomática ou na presença de sintomas como febre, dores musculares e linfadenopatia (Kahn e Walker, 1998; Mogensen *et al.*, 2010).

A fase crônica da infecção pode ser caracterizada por um longo período assintomático com uma lenta redução dos níveis de linfócitos circulantes, no entanto, é acompanhada de ativação imune persistente com perda massiva de linfócitos T CD4+ nas mucosas (Douek *et al.*, 2003; Yates *et al.*, 2007). A sucessiva liberação de produtos virais (gp120, Nef, ácidos nucléicos), apresentação antigênica, translocação de produtos microbianos na circulação (por perda de integridade de órgãos linfóides gastrointestinais) e co-infecções são alguns dos principais fatores da ativação imune (Boasso e Shearer, 2008; Appay e Sauce, 2008). A ativação imune embora seja essencial na resposta a patógenos, é paradoxalmente responsável pela manutenção de ambiente propício para a replicação viral e progressão da doença (Fig.3), sendo de fato considerado

melhor preditor patológico do que a carga viral plasmática (Douek *et al.*, 2003; Lawn *et al.*, 2001).

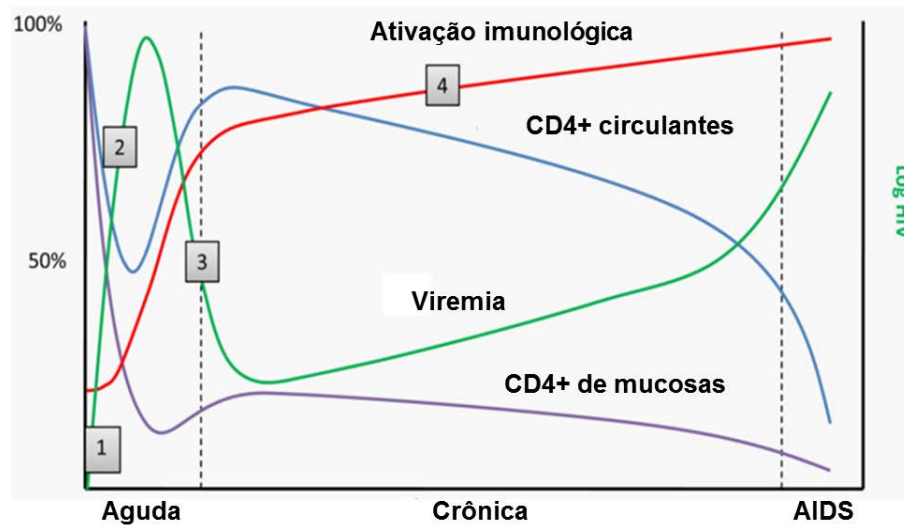


Figura 3 - Curso clínico da infecção pelo HIV-1 na ausência de tratamento, e as etapas cruciais da infecção (Modificado de Mogensen *et al.*, 2010)

O custo da progressão do quadro de ativação imune crônica se dá finalmente em uma drástica perda funcional e numérica de linfócitos CD4+ e de limitada capacidade regenerativa em órgãos linfóides, característico da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (Lawn *et al.*, 2001). O colapso do sistema imune propicia o desenvolvimento de infecções oportunistas e neoplasias, que quando não tratadas levam rapidamente à morte (Pantaleo, 1993).

2.2 Células dendríticas na infecção pelo HIV-1

O controle da ativação imune celular em infecções virais é mediado pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), como macrófagos, linfócitos-B e, principalmente, pelas células dendríticas (DCs), que atuam na captura de antígenos e ativação de linfócitos imaturos (Steinman, 2007; Takeuchi e Akira, 2009). As DCs formam um grupo heterogêneo de APCs divididas em duas

categorias: DCs convencionais (CD11c+, com capacidade de secreção de IL-12 durante a apresentação antigênica) e DCs plasmacitóides (CD123+, com capacidade de secreção de IFN- α)(Sabado *et al.*, 2007). A migração de precursores de DCs produzidos na medula óssea para os diversos tecidos produzem populações de DCs com diferentes potenciais imunológicos, induzidas por estímulos locais específicos (Buckwalter e Albert, 2009). A alta capacidade endocítica e fagocítica de DCs permite que atuem inicialmente como sentinelas nos sítios periféricos do organismo, como epitélios e mucosas genitais, que são as principais vias de entrada do HIV-1 (Wu e KewalRamani, 2006)(Fig. 4).

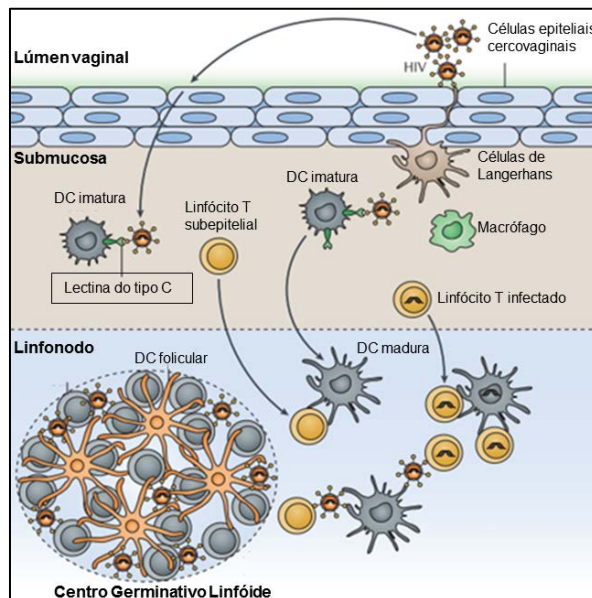


Figura 4 - Mecanismo de captura do HIV-1 no sítio de entrada do vírus e apresentação antigênica mediada pelas células dendríticas (DCs) no linfonodo, com eventual transmissão de HIV-1 (Adaptado de Wu e Kewal-Ramani, 2006).

A capacidade de detecção e captura de patógenos se dá principalmente durante a fase imatura das DCs através da atuação de um grande repertório de componentes inatos conhecidos como receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) (Mogensen, 2009). A ativação dos receptores ao reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) é responsável pela transdução de

sinais de fatores de transcrição (como NF- κ B, IRF-1, e AP-1) em DCs para maturação e ativação de linfócitos (Fig. 5) (Iwasaki e Medzhitov, 2010; Mogensen *et al.*, 2010).

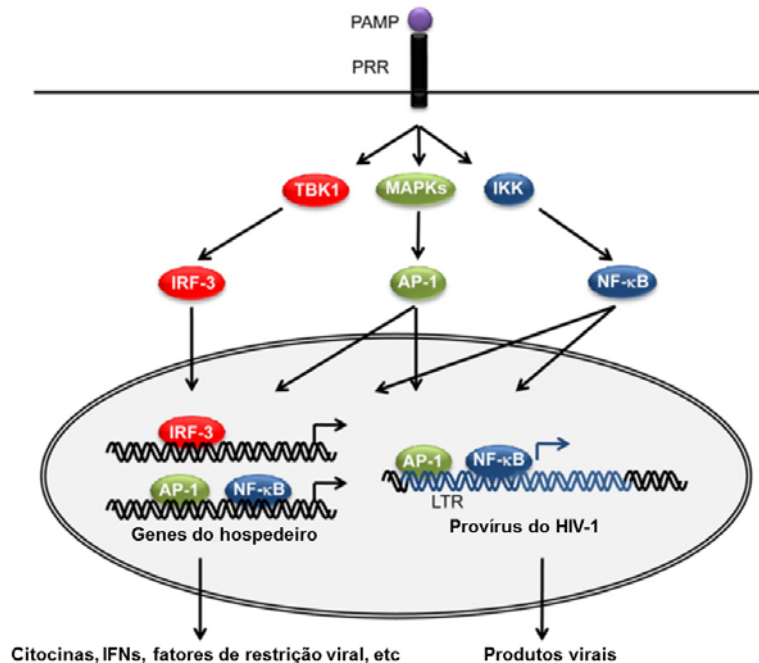


Figura 5 – Representação esquemática de ativação do receptor reconhecedor de padrões (PRR) e transcrição de componentes inatos do hospedeiro e de genes virais durante a infecção pelo HIV-1 (Adaptado de Mogensen *et al.*, 2010).

Neste contexto, diversos PRRs foram descritos entre tipos específicos de DCs no reconhecimento direto do HIV-1, dentre os quais se destacam os receptores de lectinas tipo C (DC-SIGN, receptor de manose (MR) e Langerina)(Geijtenbeek *et al.*, 2000; Coleman e Wu, 2009) e receptores *Toll-like* (TLR-7 e TLR-8)(Heil *et al.*, 2004; Gringhuis *et al.*, 2010). A produção de citocinas pró-inflamatórias, interferon (IFN) do tipo I e moléculas co-estimulatórias mediadas pelas PRRs, acarreta na maior permeabilidade dos vasos sanguíneos, recrutamento de células efetoras ao sítio de infecção e ativação mais eficiente de linfócitos CD8⁺ e CD4⁺ HIV-1-específicos durante a apresentação antigênica (Buckwalter e Albert, 2009; Manel *et al.*, 2010).

2.3 Inflamassoma

Os inflamassomas são complexos citoplasmáticos, compostos essencialmente por um receptor de reconhecimento de patógenos (PRR) e uma caspase-1, com formação de oligômeros que direcionam a resposta inflamatória a estímulos microbianos ou stress endógeno (Schroder e Tschopp, 2010). Esta resposta ocorre pela ativação da caspase-1, enzima responsável pela maturação das citocinas pró-inflamatórias da família IL-1 (IL-1 β , IL-18 e IL-33)(Gross *et al.*, 2011). Os inflamassomas são expressos entre diferentes tipos celulares (monócitos, macrófagos, DCs), epitélios (mucosas, endotélis) e tecidos restritos (placenta, cérebro e testículos)(Kummer *et al.*, 2007), atuando ainda na regulação da morte celular conhecida como piroptose e da reparação dos tecidos (Strowig *et al.*, 2012).

Algumas PRRs são capazes de atuar na ativação do inflamassoma: três pertencem à família de receptores Nod-Like (NLRP-1, NLRP-3, NLRC-4) e dois à família de proteínas HIN (AIM-2 e IFI16) (Fig. 6). A formação do NLRP-1-, NLRC4-, AIM2 e IFI16-inflamassoma tem sido associado a estímulos específicos (muramil-dipeptídeo, flagelinam, DNA virais de vaccínia vírus e Sarcoma de Kaposi Herpes vírus respectivamente) enquanto a ativação do NALP3-inflamassoma é a mais estudada atualmente e tem sido relacionada a diferentes agentes microbianos (bactérias, toxinas, vírus), sinais de injúrias conhecidos como DAMPs (“*danger associated molecular patterns*”) (ATP, ácido úrico, HMGB1) e adjuvantes vacinais (hidróxido de alumínio e fosfato de alumínio)(Kool *et al.*, 2008; Unterholzner *et al.*, 2010; Gross *et al.*, 2011).

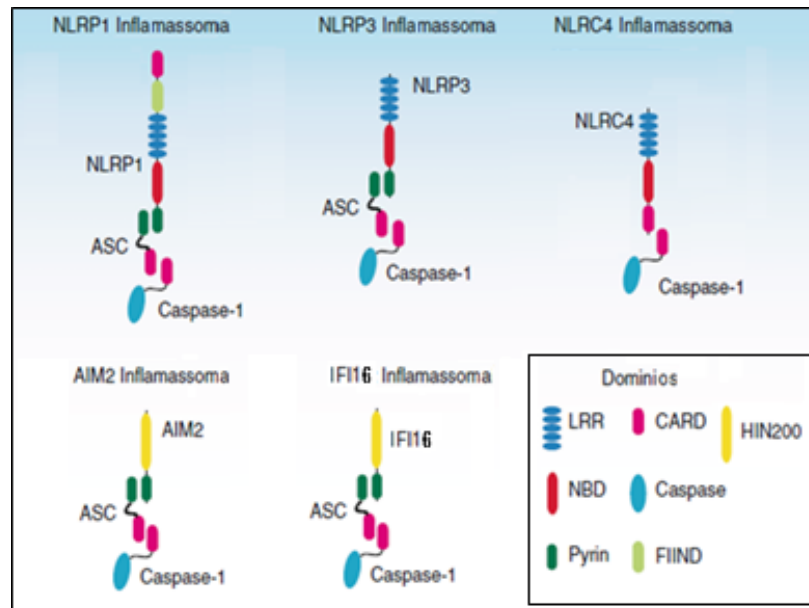


Figura 6 - Domínios estruturais dos diferentes inflamassomas (Adaptado de Bauernfeind, *et al.* 2011)

Ácidos nucleicos (RNA de fita simples (ssRNA) e DNA de fita dupla (dsDNA)) e proteínas de alguns vírus (influenza, Sendai e adenovírus) têm sido indicados como ativadores do NLRP3-inflamassoma e IL-1 β (Fig. 7). A produção de proteína inibitória da ativação do ASC/caspase-1 e de morte celular na infecção por vírus Mixoma foi identificado como mecanismo de evasão à resposta antiviral mediada pelo inflamassoma (Muruve *et al.*, 2008; Allen *et al.*, 2009).

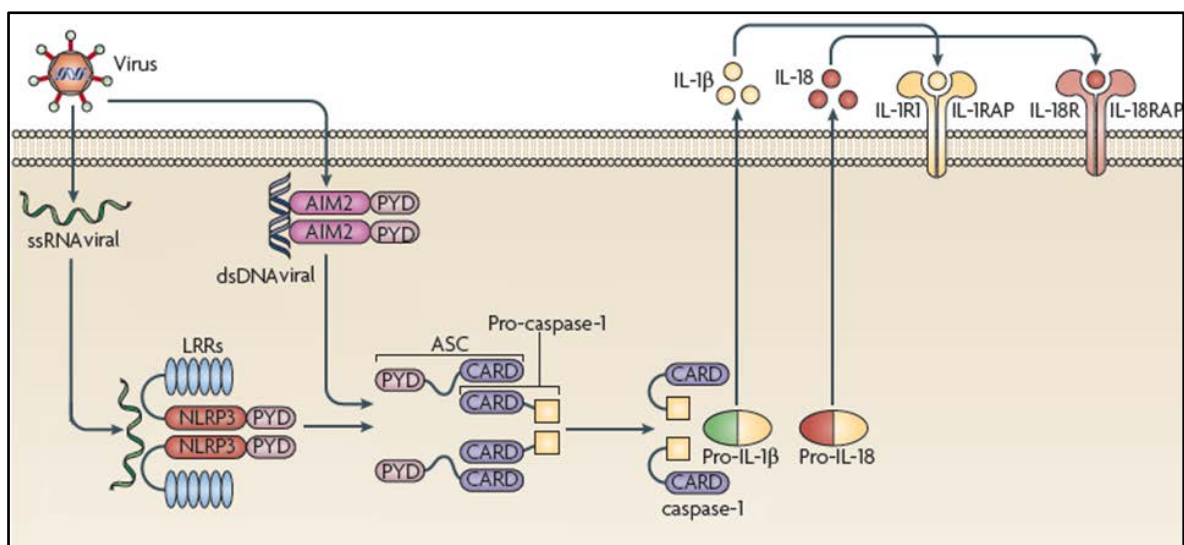


Figura 7 - Mecanismos de reconhecimento viral pelo NLRP3 e AIM2-Inflamassoma e ativação de citocinas da famílias IL-1 (IL-1 β e IL-18) (Adaptado de Kanneganti, 2010)

Considerando que algumas das células-alvo durante a entrada do HIV-1 expressam os inflamassomas, como os monócitos, macrófagos e DCs, a hipótese de que o HIV-1 pudesse induzir a ativação do inflamassoma e resposta inflamatória nas primeiras fases da infecção só foi testada recentemente (Pontillo *et al.*, 2012). Os resultados demonstraram que a entrada do vírus em DCs imaturas (iDCs) é capaz de induzir a expressão do NLRP3-inflamassoma e a secreção de IL-1 β , sugerindo que o NLRP3 possa ser um dos principais receptores intracelulares ativados pelo vírus. No entanto, ainda não foi esclarecido como ocorre a ativação do NLRP3-inflamassoma durante a infecção e a influência na resposta de DCs maduras (mDCs) (Pontillo *et al.*, 2012).

A ampla atuação deste complexo pode ter implicações em comorbidades importantes durante a infecção pelo HIV-1, como durante a co-infecção com a tuberculose. Diversos estudos em modelos animais apontam a ativação do NLRP3 e AIM2-inflamassoma na resposta à infecção ao *Mycobacterium tuberculosis*, um dos principais patógenos oportunistas de co-infecção ao HIV-1 (Master *et al.*, 2008; Saiga *et al.* 2012).

A ativação do NLRP3-inflamassoma na maturação e ativação das DCs, poderia esclarecer como o vírus direciona uma via inflamatória específica. Em portadores crônicos do HIV-1, o NLRP3-inflamassoma não é induzido eficientemente por DCs o qual pode ter sido associado ao seu status de inflamação crônica (Pontillo *et al.*, 2012). A avaliação de componentes inatos em DCs entre portadores pode evidenciar possíveis alvos para a intervenção em soluções terapêuticas ao HIV-1 baseadas no uso de DCs (Lu *et al.*, 2004).

A inflamação e apoptose têm sido envolvidos em diversos mecanismos diretos e indiretos de resposta inata à infecção pelo HIV-1. Um estudo recente

demonstrou que em tecidos linfóides infectados por HIV-1, cerca de 95% de seus linfócitos CD4+ locais são refratários à expressão de genes virais, no entanto a resistência à infecção acarreta na depleção destas células por uma rápida ativação inata das vias pró-inflamatória e pró-apoptótica, mediada pela caspase-1 e caspase-3. O mecanismo abortivo se mostrou dependente do reconhecimento de ácidos nucleicos virais durante a etapa de retrotranscrição, sugerindo um modelo patogênico regulado principalmente por um PRR, que ainda não foi identificado (Doitsh *et al.*, 2010).

Polimorfismos de base única (SNPs, “*Single Nucleotide Polimorphisms*”) nos genes do inflamassoma foram associados a diferentes tipos de infecções e doenças autoimunes comuns na população. SNPs no gene *NLRP3* foram associados à susceptibilidade a infecções como na candidíase (Lev-Sagie *et al.*, 2009) e pelo HIV-1 (Pontillo *et al.*, 2010). O polimorfismo da região 3’UTR do gene *NLRP3*, conhecido como rs10754558, foi evidenciado em três populações diferentes (Recife, São Paulo e Trieste - Itália) como fator de risco ao HIV-1, atribuído à alteração na estabilidade do mRNA conferido pelo SNP, o que poderia destacar a importância do inflamassoma na susceptibilidade à infecção por uma menor ativação do NLRP3-inflamassoma (Pontillo *et al.*, 2010).

3. Objetivo

3.1 Geral

Avaliar o papel do HIV-1 na indução de uma resposta imune mediada pelo inflamassoma.

3.2 Específicos

- Padronização da cultura alogênica e isolamento do vírus da Imunodeficiência Humana tipo I (HIV-1) provenientes de portadores crônicos do IMIP, em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs);
- Padronização do protocolo de diferenciação de células dendríticas (MDDC) a partir de monócitos do sangue periférico;
- Análise da expressão de genes do complexo inflamassoma em células dendríticas imaturas no estímulo inicial ao HIV-1 (em controles saudáveis);
- Avaliação do perfil de produção de IL-1 β em células dendríticas maduras pulsadas com HIV-1.
- Avaliação da associação de polimorfismos de componentes do inflamassoma na população de Recife e São Paulo;
- Avaliação da associação de polimorfismos de componentes do inflamassoma na suscetibilidade à co-infecção por tuberculose (HIV-TB)

4. Capítulo I – Expressão de genes do inflamassoma em células dendríticas imaturas pulsadas com HIV-1

Autores: Anselmo Jiro Kamada¹, Alessandra Pontillo², Sergio Crovella¹.

1 Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Genética, Recife Brasil. 2 Universidade de São Paulo/ Departamento de Imunologia

Resumo

Os componentes da imunidade inata humana desempenham papel essencial na resposta inicial à infecção pelo HIV-1, regulando a atividade das principais células apresentadoras de antígenos, conhecidas como células dendríticas (DCs). A descoberta de um complexo ativador da caspase 1 e regulador da resposta pró-inflamatória por reconhecimento de patógenos e stress celular, denominado inflamassoma, tem evidenciado função antiviral essencial nas DCs e seu papel será investigado neste estudo na resposta inicial ao HIV-1. A análise de padrões de expressão gênica de receptores e componentes acessórios do inflamassoma em DCs e a produção associada de IL-1 β objetiva delinear mecanismos inatos do inflamassoma na resposta ao HIV-1. Inicialmente, partículas virais foram produzidas em cultura de células mononucleares de portadores HIV-1+ do IMIP para estímulos de culturas de células dendríticas saudáveis. O monitoramento de partículas virais foi realizado por ELISA *p24* (*Perkin Elmer*) e quantificadas por PCR em tempo real (CFX96-BIO-RAD) em parceria com o Laboratório Marcelo Magalhães. A expressão diferencial do gene *AIM2*, juntamente com *NLRP3* e produção de IL-1 β associada ao estímulo do HIV-1, pode indicar uma atividade regulatória de receptores do inflamassoma na resposta de DCs ao HIV-1.

Introdução

O sistema imune inato representa a primeira linha de defesa contra patógenos invasores e baseia-se sobre as barreiras epiteliais, o sistema do complemento, e células apresentadoras de antígenos, tais como células dendríticas (DCs), granulócitos e macrófagos.

As DCs são as mais importantes células apresentadoras de antígenos do sistema imune; desempenhando a captura de antígenos, migração para os linfonodos e ativação de células T imaturas. Diversos grupos de pesquisa elaboraram estratégias terapêuticas baseadas na utilização de DCs para o aumento da resposta do hospedeiro às infecções virais ou ao desenvolvimento tumoral (Gonzalez *et al.* 2005).

Tem sido atribuído um papel central na defesa imune inata aos receptores de reconhecimento de padrões e às moléculas de reconhecimento de padrões, devido à capacidade de reconhecer estruturas evolutivamente conservadas em patógenos, denominados padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs).

A detecção de PAMPs por receptores citoplasmáticos Nod-like (NLRs) foi descrita recentemente, sendo mediada por complexos protéicos conhecidos como inflamassomas que atuam na maturação de DCs e na ativação de células-T ((Kool *et al.* 2008a). O reconhecimento de PAMPs genômicos em RNA de fita simples (ssRNA), RNA de fita dupla (dsRNA) e DNA virais por inflamassomas é capaz de produzir uma resposta inflamatória eficiente através da ativação das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18 (Martinon *et al.*, 2009, Thomas *et al.*, 2009). Resultados obtidos por Pontillo *et al.* (2011) demonstraram uma resposta inflamatória diferencial em DCs através do NLR ativador do inflamassoma

conhecido como NACHT, LRR and PYD -containing protein 3 (NALP 3) em portadores crônicos pelo HIV-1, evidenciando assim como um candidato promissor na avaliação da resposta imune inata à infecção.

Desta forma, o aperfeiçoamento do protocolo de cultura de DCs e a análise da expressão de componentes do complexo inflamassoma em DCs podem contribuir para o desenvolvimento terapêutico assim como na compreensão da importância de DCs na mediação da resposta imunológica à infecção pelo HIV-1.

Materiais e métodos

População alvo

Quatro pacientes cronicamente infectados pelo HIV-1 e seis controles saudáveis foram recrutados ao longo do estudo através do Hospital DIA no Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP) para a coleta de aproximadamente 40 mL de sangue de cada indivíduo, necessária para o isolamento dos monócitos e produção de partículas de HIV-1 em cultura alogênica. A pesquisa foi realizada no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), órgão suplementar da Universidade Federal de Pernambuco, em parceria com o IMIP. A colaboração do Dr. Edvaldo da Silva Souza (Hospital DIA – IMIP) consistiu da realização da anamnese dos pacientes e registro dos dados em prontuário, sem a necessidade de aplicação de questionário, de forma que aqueles que estiverem de acordo com os critérios de inclusão estabelecidos fossem convidados a participar do estudo.

Indivíduos menores de 18 anos, mulheres grávidas, portadores com linfócitos CD4+ abaixo de 350 células/mm³ ou carga viral abaixo de 5000 cópias/mL foram excluídos, assim como não foram considerados indivíduos com

neoplasias, infecções oportunistas nos últimos 6 meses, doenças autoimunes e imunodeficiências primárias.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do IMIP a respeito dos pacientes e controles recrutados no Hospital DIA, procedentes da Região Metropolitana do Recife (nº 2274-11) preservando o anonimato dos pacientes de acordo com a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

Padronização do cultivo alogênico, isolamento e quantificação do HIV-1

A expansão alogênica do HIV-1 obtida através de amostra de sangue periférico de portadores crônicos do HIV-1 foi realizado segundo o protocolo obtido da ACTG (*AIDS Clinical Trials Group Network*) Laboratory Technologist Committee, e modificado no Laboratório de Investigação Médica em Dermatologia e Imunodeficiências - LIM-56 (HC/FMUSP).

Todas as etapas, incluindo a expansão e inativação, foram realizadas no laboratório do Instituto de Imunoterapia de Pernambuco - IPIPE do LIKA (nível de biossegurança 3), cujo acesso tem sido gentilmente cedido através do Prof. Dr. Luiz Cláudio Arraes de Alencar (LIKA).

PBMCs isolados de 40 mL de sangue periférico de portadores crônicos do HIV-1 foram utilizados para constituir culturas alogênicas de HIV-1. 10^7 PBMCs foram cultivados em RPMI-1640 (10% soro fetal bovino - FBS) com 20 UI/mL de IL-2. A cada 3 dias o meio foi trocado com RPMI-1640 (10% FBS) e IL-2 fresco. No 6º dia a cultura foi alimentada com cerca de 10^7 PBMCs de doadores sadios

(proveniente de bolsas de desleucocitação de indivíduos aptos do HEMOPE) previamente ativadas com 5 µL/mL de fitohemaglutinina (PHA) e IL-2 (20 UI/mL).

As culturas foram monitoradas pela detecção da proteína p24 do HIV-1 em sobrenadante de cultura pelo método de ELISA (*Perkin Elmer*). Culturas positivas foram expandidas em garrafas maiores e as culturas que se mantiveram por mais de 4 semanas negativas foram excluídas.

A cada repique o sobrenadante da cultura, contendo as partículas virais, foi armazenado a -80°C para posterior inativação. Após acúmulo de cerca de 500 mL de sobrenadante comprovadamente positivo para p24, o vírus HIV-1 foi inativado e isolado.

Para a inativação de vírus obtidos por expansão em PBMC de doador sadio foi utilizado protocolo descrito por Rossio *et al.*(1998) e modificado no laboratório LIM-56. Sobrenadantes obtidos das culturas de expansão viral foram reunidos e incubados com 0.11g/ml de Aldrithiol-2 (Sigma-Aldrich) com agitação por 1 hora a 37°C.

Após a inativação o material foi centrifugado a 3500xG por 20 minutos para remoção de debris celulares e a seguir concentrado em dispositivo de filtração Centricon Plus 70 (Millipore) com membrana de 100 kDa. Após a concentração de todo o volume, o material foi reunido e centrifugado na ultracentrifuga Optima LE-80K (Beckman Coulter) utilizando rotor de ângulo móvel (SW28) no Núcleo de Integração Tecnológica (NIT-CPqAM). Para tanto, o material foi acondicionado sobre solução de sacarose 20% em TNE (20 mM de Tris/HCl, 20 mM de NaCl e 2,5 mM de EDTA), na proporção de 1/3 de sacarose:2/3 sobrenadante concentrado e foi realizada centrifugação a 4°C por 90 minutos a 100.000xG

(23.550 rpm). Após este período, todo o material acima da sacarose foi removido e o pellet ressuspenso em TNE. Procedeu-se à nova centrifugação por mais 1 hora a 100000xg e em seguida o pellet foi ressuspenso em meio AIM-V e quantificado com relação ao número de partículas virais.

A quantificação do número de partículas virais inativadas foi avaliada inicialmente no LIKA (Dados complementares. pág.29), no entanto posteriormente a quantificação foi estabelecida em parceria com o Laboratório Marcelo Magalhães através da quantificação do número de cópias de RNA genômico do HIV-1 (carga viral ou C.V.) por PCR em tempo real. As alíquotas diluídas ($1/10^6$) em duplicata do concentrado viral foram extraídas com kit Qiaamp RNA Viral Mini Kit (Qiagen) e quantificados no equipamento CFX96 (BIO-RAD) por primers e sondas específicas ao HIV-1, desenvolvidas para uso diagnóstico (Applied Biosystems).

Isolamento de monócitos e diferenciação em células dendríticas imaturas e maduras

As PBMCs dos seis controles saudáveis foram coletadas e isoladas pelo protocolo de gradiente Ficoll/Hepaque 1077 (GE Healthcare), a partir do qual a suspensão de PBMCs é contada em câmara de Neubauer e os PBMCs são distribuídos na concentração de 4×10^6 células/mL em meio RPMI 1640 (Gibco) em placas de cultura celular de 24 poços (Corning). As culturas foram mantidas por 2 horas para que ocorra a aderência característica dos monócitos (em tensão de 5% de CO_2 e à $37^\circ C$). Após lavagem em meio PBS estéril tamponado (Sigma Aldrich) para a retirada das células não aderentes, os monócitos são cultivados em meio AIM-V (Gibco) suplementado com 50 ng/mL de IL-4 e 50 ng/mL de GM-CSF (Peprotech) para a diferenciação em MDDC nos próximos seis dias. No

terceiro dia, a cultura foi suplementada com IL-4 e GM-CSF nas mesmas concentrações e somente no sexto dia de cultura as células são consideradas MDDC imaturas (iDCs) . No sexto dia, as iDCs são pulsadas com HIV inativado ou com LPS e, após a lavagem com meio PBS (*Gibco*), são incubadas por 48 horas com o cocktail de citocinas (50 ng/ml IL-4 + 50 ng/ml GM-CSF + 50 ng/ml TNF alfa + 10 ng/ml IL-1 β + 100 ng/ml IL-6) segundo o protocolo de Lu *et al.*(2004).

Estimulo de células dendríticas imaturas (iDCs)

As iDCs foram pulsadas com HIV-1 inativado ou lipopolissacarídeo bacteriano (LPS *Escherichia coli* O55:B5; *Sigma Aldrich*) para avaliação da expressão gênica de componentes do inflamassoma após quatro horas do estímulo de acordo com Pontillo *et al.*(2012) e em mDCs, a expressão foi avaliada após 48 hs do estímulo para a avaliação de expressão e produção de IL-1 β durante a maturação completa de DCs.

Em alguns experimentos foi adicionado por 15' ao meio de cultura de mDCs 1mM de adenosina 5' trifostato (ATP, *Sigma Aldrich*) de acordo com o protocolo de Gattorno *et al.*(2007), com o intuito de avaliar a capacidade de produção de IL-1 β associada à presença de um sinal de perigo (DAMP).

Isolamento do RNA e RT-PCR dos genes do inflamassoma

O RNA total de cada poço foi isolado utilizando-se o kit de extração RNAqueous Micro kit (Ambion). O cDNA for preparado utilizando-se o kit SuperScript™ III (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante.

A quantidade e qualidade do RNA foram avaliadas por espectrofotômetro (Nanodrop N-1000). A expressão dos principais componentes do inflamassoma (*NLRP1*, *NLRP3*, *NLRC4*, *AIM2*, *PYCARD*, *CASP1*, *IL1B*) foi avaliada através de sondas TaqMan® específicas na plataforma ABI 7500 (Applied Biosystems).

Os níveis de mRNA foram normalizados contra os níveis de mRNA do gene endógeno *ACTB*, gene codificante da Beta actina (Applied Biosystems). O número do ciclo em que a transcrição do gene de interesse é detectável (CT) foi normalizado com o número do ciclo de detecção do gene endógeno *ACTB*, referida como delta Ct (Δ CT). A diferença de expressão do gene de interesse em relação às provas entre cada experimento (i.e.: estimulado contra não estimulado) foi expressa em $2^{-\Delta\Delta Ct}$, na qual $\Delta\Delta Ct$ é igual à ΔCt da prova (i.e.: estimulado) menos o ΔCt do basal (i.e.: não estimulado), que foi normalizado para 1 (Livak e Schmittgen, 2001).

Quantificação de IL-1 β

A IL-1 β foi dosada nos sobrenadantes das culturas celulares como marcador de ativação do inflamassoma. A dosagem da citocina foi realizada com o kit Quantikine Immunoassay Human IL-1 β (R&D Systems) pela técnica de ELISA, segundo especificações do fabricante. O limite de detecção para a citocina foi de 5 pg/ml, no sobrenadante obtido das culturas de MDDC, durante a incubação na ausência ou presença de LPS ou de HIV-1 inativado. As alíquotas desse material foram conservadas a -80°C até o momento da dosagem.

Análise dos dados

Os dados de expressão genica e de secreção de IL-1 β foram analisados por meio de teste T pareado não paramétrico ou ANOVA para comparações múltiplas utilizando o software GraphPad Prism 5.

Resultados

Padronização do cultivo alogênico do HIV-1

Para a produção de partículas de HIV-1 destinada ao estímulo das DCs, foram realizadas duas coletas de PBMCs: a primeira a partir de dois pacientes (1 e 2) e a segunda coleta dos pacientes 3 e 4.

O nível de produção de partículas de HIV-1 se leva em torno 2 a 3 semanas para que seja detectável (densidade óptica acima do controle negativo) pelo ELISA (Figura 1), que tem uma sensibilidade 17.1pg/mL ao antígeno p24 do HIV-1. O sobrenadante do paciente 2 não produziu resultados positivos no período estimado, desta forma foi descontinuada e a cultura do paciente 1 foi dividida em duas garrafas diferentes de cultura (P1a e P1b).

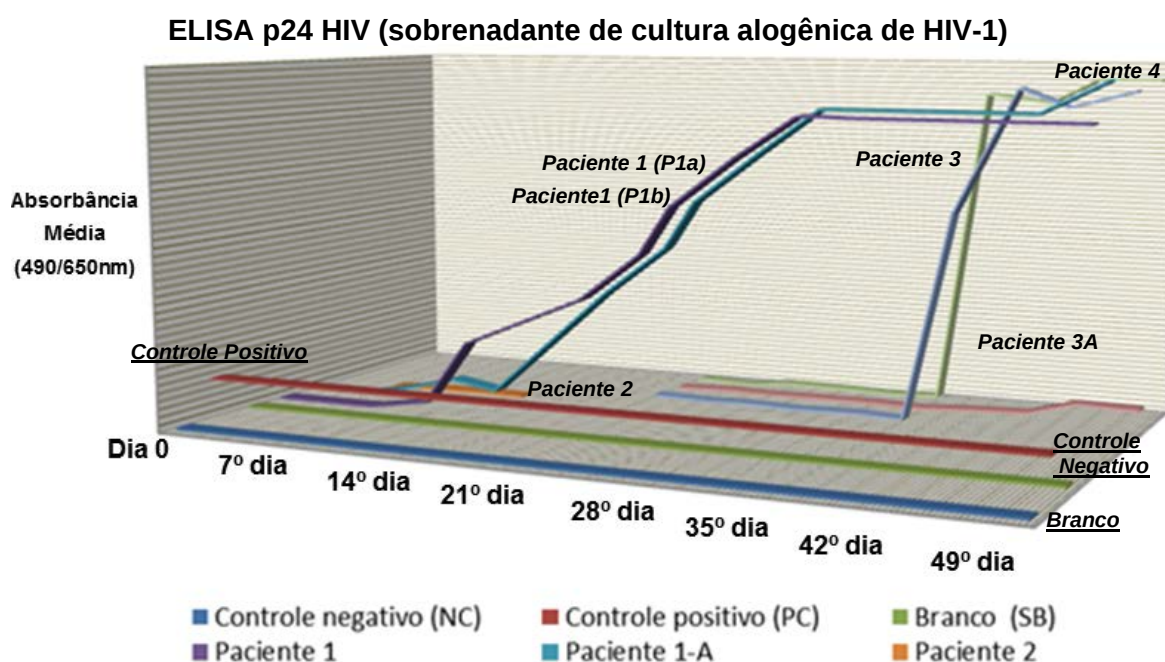


Figura 1 – Acompanhamento das sete primeiras semanas de produção de partículas de HIV-1 a partir de quatro pacientes (P1, P2, P3 e P4).

Cerca de 560 mL foram coletados a partir dos sobrenadantes positivos pelo ELISA de P1a e P1b (P1). Em seguida, procedeu-se a inativação, concentração de partículas virais (p.v. de P1 ressuspensas em 1mL de RPMI), separação de alíquota para extração de RNA e quantificação por PCR em tempo real.

As partículas de P1 foram utilizadas para a padronização de estímulo das DCs enquanto as culturas P3 e P4 foram utilizadas para os experimentos em controles saudáveis. As culturas P3 e P4 que produziram respectivamente 11.3×10^9 p.v./mL e 18.6×10^9 p.v./mL a cada 500 mL de sobrenadante (Tab. 1), foram quantificados por PCR em tempo real no Laboratório Marcelo Magalhães e pulsados em MDDCs de controles saudáveis para avaliação da resposta mediada pela expressão de genes do inflamassoma.

Tabela 1 - Rendimento da produção de partículas virais da cultura alogênica a partir de 3 portadores.

Amostras	Total de partículas virais produzidas	Concentração de partículas virais (p.v./mL)
P1	11.23 bilhões de p.v./mL	16.51 milhões de p.v./mL
P3	11.35 bilhões de p.v./mL	20.26 milhões de p.v./mL
P4	18.60 bilhões de p.v./mL	47.69 milhões de p.v./mL

Padronização do protocolo de DCs para expressão gênica dos componentes do inflamassoma estimuladas com HIV-1

O estabelecimento de um número padrão de MDDC para cultura e o volume padrão de cDNA se deram respectivamente através da contagem de MDDC a partir de diferentes concentrações iniciais de PBMCs e o estabelecimento de um CT máximo (*Cycle Threshold*) para amplificação do controle endógeno gene *ACTB* para avaliação por PCR em tempo real de cada

amostra. Inicialmente, três concentrações em duplicata de PBMCs ($4 \times 10^6/\text{mL}$, $6 \times 10^6/\text{mL}$ e $8 \times 10^6/\text{mL}$) provenientes de 3 controles saudáveis foram induzidas por citocinas recombinantes (IL-4 e GM-CSF) para a diferenciação em MDDCs imaturas (iDCs) no 6º dia de cultura. Foi possível observar que em média, cerca de 5% dos PBMCs diferenciaram em iDCs (Fig. 2), após contagem em câmara de Neubauer.

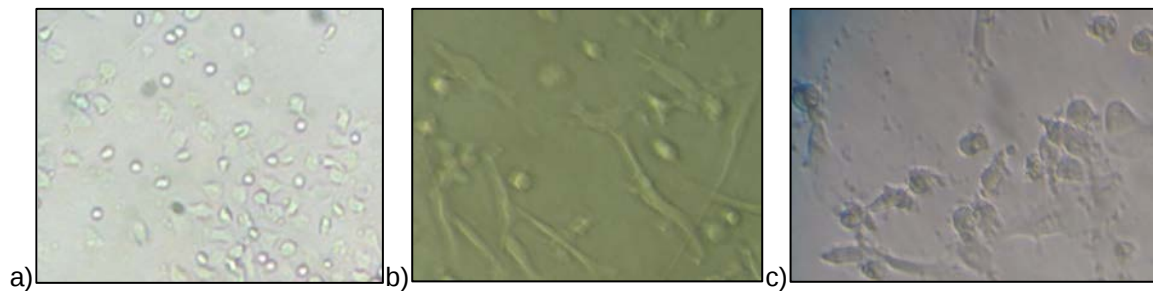


Figura 2- (a) Monócitos aderidos, (b) DCs imaturas e (c) DCs maduras (aumento de 40x)

A expressão de *ACTB* foi avaliada entre as três concentrações de iDCs iniciais (2×10^5 , 3×10^5 e 4×10^5) e a partir disso, o RNA foi extraído e 3 volumes de cDNA diferentes produzidos de cada amostra (1uL, 1.5uL e 2uL de solução inicial de cDNA) foram avaliados em duplicata técnica. Foi observado que não houve diferença na expressão entre as diferentes concentrações iniciais ($p > 0.05$), assim como não houve diferenças significativas na avaliação da expressão de *ACTB* entre diferentes volumes de cDNA inicial ($p > 0.05$). Desta forma foi possível estabelecer uma quantidade de 2×10^5 DCs e um volume de cDNA inicial de 1uL por reação sem afetar a qualidade de futuras análises.

Após a padronização da cultura de DCs e do protocolo de expressão gênica por PCR em tempo real, foi necessário avaliar a concentração mínima de partículas de HIV-1 inativado (p.v.) capaz de estimular DCs que pudesse fornecer um padrão de expressão gênica dos componentes do Inflamassoma. Quatro condições (Não tratado - "Untreated", 5×10^8 p.v., 10^8 p.v. e 5×10^7 p.v.) em $2 \times$

10^5 DCs/mL foram aplicados em culturas provenientes de 3 controles saudáveis, nos quais 7 genes de interesse e um controle endógeno *ACTB*, *NLRP1*, *NLRP3*, *NLRC4*, *AIM2*, *PYCARD*, *CASP1*, *IL1B*) foram estudados (Fig 3.).

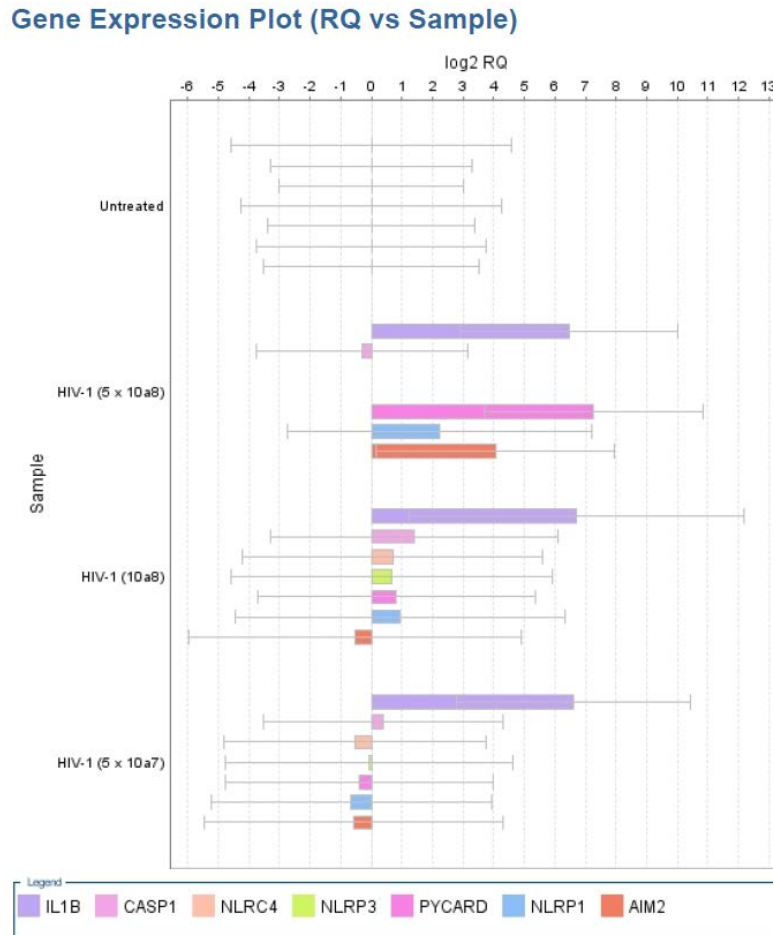


Figura 3- Expressão de genes do inflamassoma com diferentes concentrações de partículas virais

Foi possível observar altos desvios padrões relacionados a um baixo número de controles saudáveis avaliados, no entanto altos valores relativos de expressão de alguns componentes como os genes *PYCARD*, *NLRP1* e *AIM2* em alta concentração do vírus (0.5×10^9 p.v.). Devido a divergência entre a expressão a estímulos com concentrações mais baixas do vírus, o estímulo com a maior concentração viral (0.5×10^9 p.v.) foi aplicada a um número maior de replicatas biológicas (de seis controles saudáveis) e comparados ao tratamento com LPS (como estímulo positivo da resposta inflamatória do inflamassoma).

Expressão de inflamassoma em iDCs

Um notável aumento da expressão do gene *IL1B* (182.0 ± 67.07) e de um aumento de *AIM2* (2.6 ± 1.19) e *NLRP3* (2.08 ± 0.62) (Figura 4a) foi encontrado inicialmente após estímulo de iDCs ao LPS, enquanto durante a fase madura (Figura 4b), houve maior expressão do *PYCARD* (4.54 ± 1.67) e *IL1B* (2.55 ± 1.62).

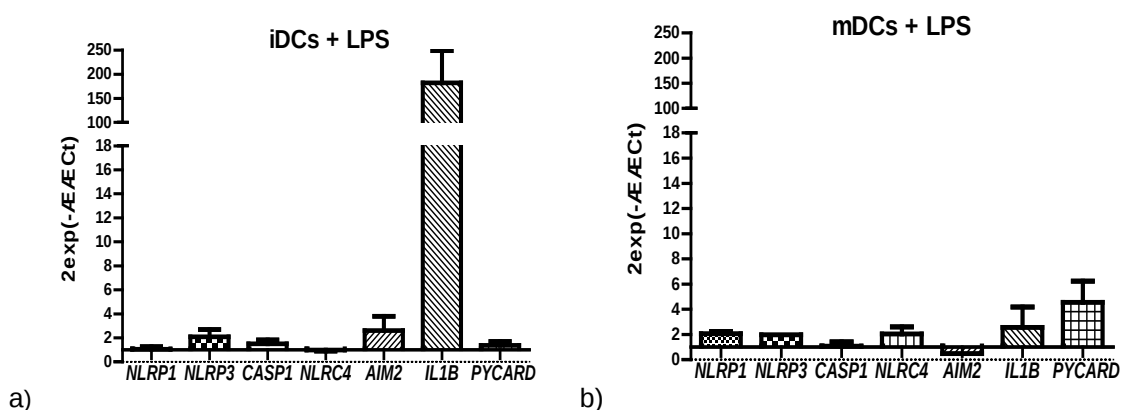


Figura 4 - Expressão diferencial de genes do inflamassoma em células dendríticas imaturas (iDCs) e maduras (mDCs) ao estímulo com LPS, 4 horas e 48 hs após o estímulo.

As iDCs estimuladas com HIV-1 inativado apresentaram expressão diferencial de *AIM2* mais acentuada (11.33 ± 4.72) acompanhado da expressão de *NLRP3* (3.74 ± 1.66), *CASP1* (3.64 ± 0.87) e *IL1B* (3.75 ± 1.20) na fase inicial de resposta ao HIV-1 em comparação à expressão já na fase madura (Fig. 5).

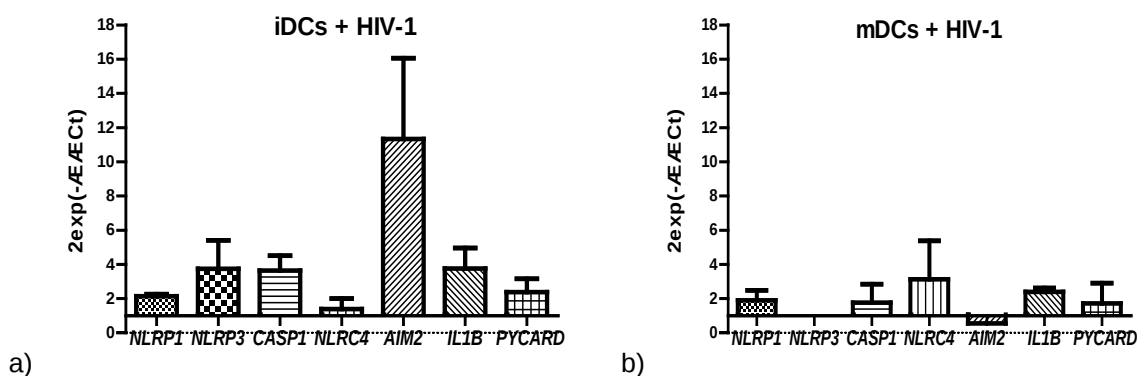


Figura 5 - Expressão diferencial de genes do inflamassoma em células dendríticas imaturas (a) e maduras (b) estimuladas com HIV-1 inativado por AT-2 (4 horas e 48 horas pós estímulo respectivamente).

Secreção de IL1 β em mDCs

A elevada concentração de IL-1 β em sobrenadante de mDCs (provenientes de seis controles) alcançou uma concentração limite de detecção do ensaio imunoenzimático (Fig. 7). Após lavagem do meio de cultura, o estímulo com o ATP (1 mM) gerou uma produção maior de IL-1 β após o tratamento com o LPS do que em relação ao HIV-1, no entanto, não apresentou diferença significativa entre os tratamentos ($p>0.05$). Foi observada uma diferença significativa entre produção de IL-1 β entre mDCs estimulados (+ATP) e não estimulados (sem ATP) ($p=0.0039$).

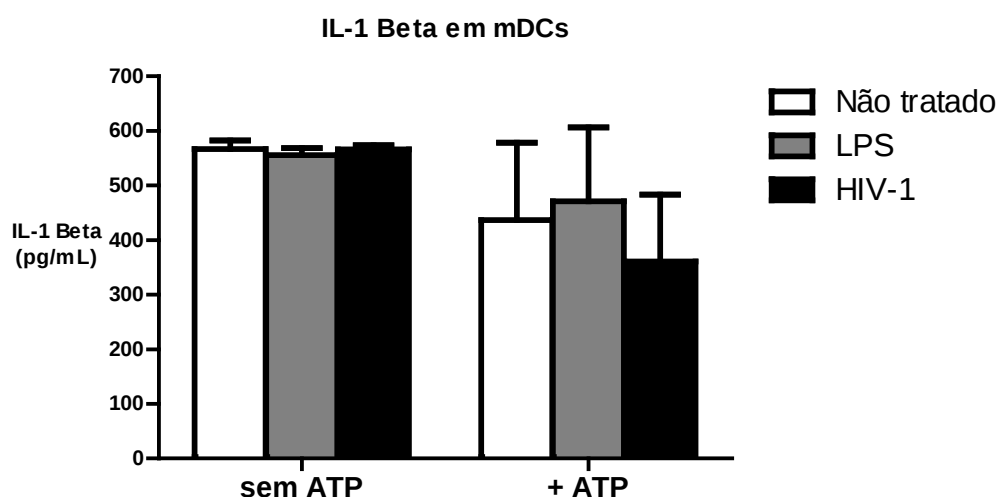


Figura 6 – IL-1 β presente no sobrenadante de cultura de células dendríticas maduras (mDCs) em dois momentos: anterior e posterior à exposição ao ATP.

Discussão

A produção em cultura de PBMCs de HIV-1 inativado tem mostrado eficiência na produção de partículas virais para ensaios celulares em diversos estudos (Lu *et al.*2004; Pontillo *et al.*2012a; Rossio *et al.*1998) assim como apresentado pelos nossos resultados, no qual a produção de 11 bilhões de p.v. foi

quantificada em 560 mL de sobrenadante de cultura. No entanto, o valor quantificado pelo kit Artus HI vírus (Qiagen) foi utilizado somente como parâmetro para a padronização da expressão gênica das DCs. A padronização da concentração de 2×10^5 DCs/mL embora seja o dobro do utilizado por Pontillo *et al.*(2012), apresentou resultados robustos para a sua utilização em controles saudáveis de nosso estudo. No mesmo sentido, a determinação do volume de 1uL solução de cDNA a ser empregado também respalda o seu uso na avaliação da expressão gênica.

A indução de genes do complexo NLRP-3 inflamassoma (*NLRP3*, *CASP1* e *IL1B*) após quatro horas do pulso com HIV-1, assim como a baixa expressão de genes do inflamassoma após o estímulo foi corroborado pelo estudo de Pontillo *et al.* (2012). A notável diferença relativa nos dados de expressão gênica entre ambos, pode ser atribuído ao número limitado das amostras utilizadas pelo nosso estudo (n=6) em comparação com apresentado por Pontillo *et al.*(2012)(n=20), no entanto, os mesmos componentes principais do inflamassoma foram identificados.

A alta indução de *AIM2* (11.33 ± 4.72) apresentado pelo nosso estudo, de forma inédita indica a participação do receptor AIM-2 na resposta inicial ao HIV-1. A ativação do inflamassoma mediada pelo receptor AIM-2 tem sido atribuída durante o reconhecimento de dsDNA de diversos patógenos, inclusive de dsDNA viral (Citomegalovírus e vaccínia vírus)(Iwasaki, 2012). Estudos de linfócitos abortivos por infecção ao HIV-1 em tecidos linfóides, evidenciou a ativação da caspase 1 mediada pelo reconhecimento de cDNAs cumulativos da etapa de retrotranscrição, sendo cogitado o reconhecimento mediado pela AIM-2. No entanto não foi evidenciada a participação do mesmo e ainda permanece desconhecido o receptor de inflamassoma (Doitsh *et al.*2010). Embora ainda não

tenham sido encontradas evidências da participação do AIM-2 no reconhecimento do HIV-1, a sua participação pode ser importante na ativação do inflamassoma em células dendríticas.

Após a indução pelo ATP, a menor produção de IL-1 β em mDCs tratadas com HIV-1 (em relação aos tratamentos com LPS e não tratado) pode estar associada a uma expressão menor do *IL1B* após o estímulo ao HIV-1. O estímulo com LPS e indução posterior pelo ATP (potentes ativadores do NLRP-3) apresentaram maior produção de IL-1 β , no entanto não houve diferença significativa entre os tratamentos. O estímulo com ATP em mDCs não influenciou em maior produção de IL-1 β entre controles saudáveis. Estes dados podem ser importantes em futuras avaliações de expressão correlacionadas a produção de IL-1 β entre mDCs e da avaliação do potencial inflamatório do ATP em quadros de infecção crônica, que acarretam em produção inflamatória deficiente por DCs relacionadas a citocinas pró-inflamatórias (Buisson *et al.*, 2009; Pontillo *et al.*, 2012) e da ativação de ATP por ligação à gp120 em DCs (Séror *et al.*, 2011).

Embora os dados de expressão e produção de IL1 β de nosso estudo apresentem limitação quanto à amostragem (n=6), foi possível obter resultados que indicam a importância da expressão de componentes específicos do inflamassoma (*NLRP3* e *AIM2*) e na ativação da IL-1 β na resposta ao HIV-1.

Conclusão

A identificação de componentes regulatórios do inflamassoma ao HIV-1 em células dendríticas apresenta inúmeros desafios pelo desconhecimento da função do inflamassoma na resposta ao vírus. As citocinas da família IL-1 ativadas pelo complexo inflamassoma (IL-1 β , IL-18 e IL-33) podem ter papel essencial em células dendríticas, podendo extrapolar diversas funções imunológicas na interface entre a imunidade inata e adaptativa. Desta forma, a resolução desta questão é fundamental para o entendimento da resposta ao HIV-1, com potencial aplicação no desenvolvimento terapêutico.

Dados complementares

Quantificação viral

A comparação de diferentes métodos extração de RNA a partir da cultura de alogênica de HIV-1 foi realizada a partir de duas soluções com 750uL de p.v. de P1 diluídas 10⁶ vezes em meio RPMI, após a etapa de ultracentrifugação. Os rendimentos das extrações pelo kit AMBION e TRI-Reagent foram avaliados inicialmente por espectrofotômetro que apontou maior pureza e concentração de RNA pelo kit AMBION (260/280 nm = 1.85; concentração= 96 ng/uL) enquanto pelo TRI-Reagent (260/280 nm = 1.61; concentração= 27.ng/uL) em cerca de 14 uL de volume de solução final de extração.

A determinação do número de cópias a partir das soluções das extrações de RNA ("P1 AMBION - HIV 10⁶" e "P1 TRIReagent - HIV 10⁶") foi determinada por quantificação em PCR em tempo real com o kit Artus HI Virus (Fig. 8).

No.	Colour	Name	Type	Ct	Given Conc (IU/ul)	Calc Conc (IU/ul)	% Var
1		Standard 10.000	Standard	26.10	10,000	9,919	0.8%
2		Standard 1.000	Standard	29.00	1,000	1,104	10.4%
3		Standard 100	Standard	32.40	100	84	15.9%
4		Standard 10	Standard	35.11	10	11	8.6%
19		P1 AMBION - HIV 10 ⁶	Unknown	29.80		602	
20		P1 TRIReagent - HIV 10 ⁶	Unknown	32.97		55	
22		Branco	Negative Control				

Threshold	0.0312
Left Threshold	1.000
Standard Curve Imported	No
Standard Curve (1)	conc= 10 [^] (-0.329*CT + 12.574)
Standard Curve (2)	CT = -3.043*log(conc) + 38.260
Reaction efficiency (*)	1.13128 (* = 10 [^] (-1/m) - 1)
R Value	0.99912
R^2 Value	0.99825

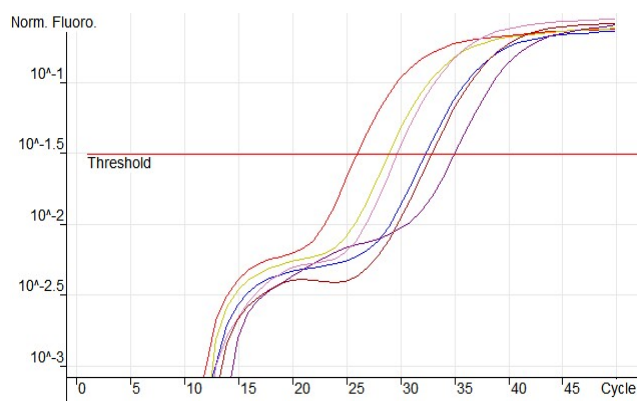


Figura 8 – Quantificação de HIV-1 por PCR em tempo real de duas amostras extraídas por métodos diferentes de extração

Conforme a figura 8, um maior número de cópias genômicas de RNA viral da amostra “P1 AMBION - HIV 10⁶” em relação ao “P1 TRIReagent - HIV 10⁶” foi detectada, apontando 11.23 bilhões de partículas virais produzidas da cultura P1, como segue abaixo:

$$1) 602 \text{ IU/uL} \times 14 \text{ uL} = 8428 \text{ IU}$$

$$2) 8428 \text{ IU} \text{ ----- } 750 \text{ uL de diluído } (10^6)$$

$$x \text{ ----- } 1000 \text{ uL da solução P1 concentrada}$$

$$x = \underline{\underline{11.23 \times 10^9 \text{ partículas virais em P1}}}$$

5. Capítulo II – Caracterização imunogenética do inflamassoma na infecção pelo HIV-1

5.1 Polymorphisms in Inflammasome' Genes and Susceptibility to HIV-1 Infection

Título: “Polymorphisms in Inflammasome' Genes and Susceptibility to HIV-1 Infection”

Autores: Alessandra Pontillo¹; Telma Miyuki Oshiro¹; Martina Girardelli²; Anselmo Jiro Kamada³; Sergio Crovella³; Alberto José da Silva Duarte¹.

1 Universidade de São Paulo/ Laboratório de Dermatologia e Imunodeficiências – LIM 56-USP, São Paulo, Brasil; 2 IRRCS Burlo Garofolo, Trieste, Itália; 3 Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Genética, Recife Brasil.

Publicado no periódico Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999) em 01/02/2012, Volume 59, Edição 2, págs. 121 a 125

Fator de Impacto (JCR 2011): 4.425 / Qualis A1



Polymorphisms in Inflammasome' Genes and Susceptibility to HIV-1 Infection

Alessandra Pontillo, PhD,* Telma M. Oshiro, PhD,* Martina Girardelli, BSc,†
Anselmo J. Kamada, BSc,‡ Sergio Crovella, Prof,‡ and Alberto J. S. Duarte, Prof*

Abstract: The involvement of inflammasome genes in the susceptibility to HIV-1 infection was investigated. Twelve single nucleotide polymorphisms within *NLRP1*, *NLRP3*, *NLRC4*, *CARD8*, *CASP1*, and *IL1B* genes were analyzed in 150 HIV-1-infected Brazilian subjects and 158 healthy controls. The 2 polymorphisms rs10754558 in *NLRP3* and rs1143634 in *IL1B* were significantly associated to the HIV-1 infection. These findings supported the previously hypothesized involvement of NALP3-inflammasome in HIV-1 pathogenesis, underlining once more the key role of inflammation and innate immunity in the susceptibility to HIV-1 infection.

Key Words: genetics, HIV-1, inflammasome, IL-1 β , innate immunity, NALP3/NLRP3, polymorphisms

(*J Acquir Immune Defic Syndr* 2012;59:121–125)

INTRODUCTION

The role of innate immunity in the initial detection of HIV-1 and in an efficient response against the virus has appeared increasingly important in recent years.¹ Furthermore, the susceptibility to HIV-1 infection and pathogenesis has been associated with polymorphisms in genes involved in innate immune response.^{2–7}

Pathogen recognizing receptors, including toll-like receptors and nod-like receptors (NLRs), expressed in phagocytes and dendritic cells are major triggers of innate immunity.

Three proteins belonging to NLRs, “NLR Family pyrin domain containing 1” (NALP1 NLRP1), “NLR Family pyrin

domain containing 3” (NALP3 NLRP3), and “NLR family CARD domain containing 4” (IPAF NLRC4) interact with several adaptor proteins to form molecular complexes known as inflammasomes, leading to the activation of caspase-1 and the production of interleukin (IL)-1 β .⁸ Inflammasome and IL-1 β were previously reported as an innate mechanism, alternative to type-1 interferon, able to recognize nucleic acids and virus into the cytoplasm, and to induce a proinflammatory response.⁸ In particular, NLRP3 recognizes cytidine-phosphate-guanosine DNA motifs that are present in bacteria and viruses and it is able to sense ssRNA, dsRNA, and some virus (influenza virus, Sendai virus, adenovirus).^{8–10}

To our knowledge, the involvement of NLRs or inflammasome in HIV recognition or in the anti-HIV response has not been yet demonstrated. However, we recently reported the association between a 3'UTR polymorphism in *NALP3/NLRP3* gene (rs10754558) and the susceptibility to HIV-1 infection, suggesting a potential role of NLRP3 inflammasome in the pathogenesis of HIV.¹¹

Here we evaluated the frequency distribution of 12 single nucleotide polymorphisms (SNPs) within 6 inflammasome genes (*NLRP1*, *NLRP3*, *NLRC4*, caspase recruitment domain family, member 8/*CARD8*, caspase 1/*CASP1*, interleukin 1 beta/*IL1B*) in patients chronically infected by HIV-1 and healthy individuals, all from Southern Brazil (Sao Paulo state), to investigate whether these SNPs could be associated with the susceptibility to HIV.

PATIENTS AND METHODS

Patients and Controls

One hundred fifty HIV-1-positive Brazilian adults (HIV+; 80 males/70 females; mean age 34 years $\pm$ SD: 12.4) were enrolled at the ambulatory of secondary immunodeficiencies (ADEE 3002) of “Hospital das Clínicas” (Faculty of Medicine, University of Sao Paulo/FMUSP, Sao Paulo, Brazil). One hundred fifty-eight healthy controls (HCs; 72 males/86 females; 29 years $\pm$ 7.8) from the same metropolitan area (Sao Paulo) were also recruited. Individuals were classified as European-derived or African-derived according to phenotypic characteristics and ethnicity data of parents/grandparents reported by the participants in an appropriate questionnaire. The issue concerning skin-color-based classification criteria adopted in Brazil is well documented and has been already assessed in previous studies.^{12,13} One hundred twenty-four HCs (78%) and 129 HIV+ (86%) were classified as European derived, whereas 34 HCs (22%) and 21 HIV+ (14%) as African derived.

Received for publication July 5, 2011; accepted September 22, 2011.

From the *Laboratory of Medical Investigation in Dermatology and Immunodeficiency, Faculty of Medicine, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil; †Institute for Maternal and Child Health—IRCCS “Burlo Garofolo,” Trieste, Italy; and ‡Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil.

Supported by the São Paulo Research foundation (FAPESP) (09/53575-5), by the Pernambuco Research foundation (FACEPE) (APQ-0757-2.02/10) and by a grant RC 07/08 from IRCCS “Burlo Garofolo,” Trieste, Italy. A.P. was recipient of a visiting researcher grant from FAPESP. S.C. is recipient of a grant from the TALENTS Program (7th R&D Framework Program, Specific Program: PEOPLE—Marie Curie Actions—COFUND).

The authors have no conflicts of interest to disclose.

Supplemental digital content is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text and are provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's Web site (www.jaids.com).

Correspondence to: Dr Alessandra Pontillo, PhD, Laboratory of Medical Investigation in Dermatology and Immunodeficiency, LIM-56, Faculty of Medicine, University of Sao Paulo, Av. Dr Eneas de Carvalho Aguiar, 500, Sao Paulo 05403-000, Brazil (e-mail: pontillo.a@gmail.com).

Copyright © 2012 by Lippincott Williams & Wilkins

Written informed consent was obtained according to the protocol of "Hospital das Clínicas" ethical committee (CAPPesq) (n 0791/09, 04/11/2009) (São Paulo, Brazil).

DNA Extraction

Genomic DNA was extracted from peripheral whole blood using the Qiagen genomic DNA purification kit (Qiagen, Milan, Italy) following standard laboratory protocols.

SNPs Selection and Genotyping

Twelve SNPs in 6 inflammasome genes (*NALP1/NLRP1*, *NALP3/NLRP3*, *IPAF/NLRC4*, *CARD8*, *CASP1*, *IL1B*) were selected from public databases Hapmap (www.hapmap.org) and GeneBrowser (www.genome.ucsc.edu) (Figure 1). Two SNPs in *NLRP1* (rs12150220 and rs2670660) and in *NLRP3* (rs10754558 and rs35829419) were chosen among others due to previously published association study.¹¹ All polymorphisms in *NLRC4*, *CARD8*, *CASP1*, and *IL1B* genes, resulted from Hapmap and GeneBrowser databases, were included in the study (see **Table, Supplemental Digital Content 1**, <http://links.lww.com/QAI/A230>).

Genotyping was performed by commercially available TaqMan assays (Applied Biosystems/AB, Life Technologies, Carlsbad, CA). TaqMan reactions were set up based on the manufacturer's protocols and samples run on an ABI7300 real-time instrument (AB). Allelic discrimination was performed using the sequence detection system software (v.2.3) (AB).

Data Analysis

Allelic and genotypic SNP frequencies were calculated using the Genotype Transposer software¹⁴ and then analyzed by Fisher exact test. The Haploview software¹⁵ was used to investigate the association and linkage disequilibrium pattern and for deriving the haplotypes. The open-source R package (www.r-project.org) was used for Fisher exact test and odds ratio (OR) calculation and for the analysis of covariance.

A formal Bonferroni correction for the number of the tests performed (considering alleles and genotypes comparisons) would require a significance threshold of $P = 0.0021$ (P^0/N , $P^0 = 0.05$, $N = 24$ test). When dominant/recessive model has been analyzed, according to Lewis,¹⁶ the significant threshold was $P = 0.0019$. The P values are presented in the text without correction.

RESULTS

Six inflammasome genes were considered for this association study: *NLRP1*, *NLRP3*, and *NLRC4* as intracellular pathogen recognizing receptors, *CARD8* as adaptor molecule, *CASP1* and *IL1B* as effector molecules. A graphical representation of the selected SNPs within the inflammasome genes is reported in Figure 1.

Twelve inflammasome SNPs were genotyped in 150 HIV+ patients and 158 HCs. SNPs allelic and genotypic frequencies were in Hardy-Weinberg equilibrium in patients and controls and are reported in (Table 1).

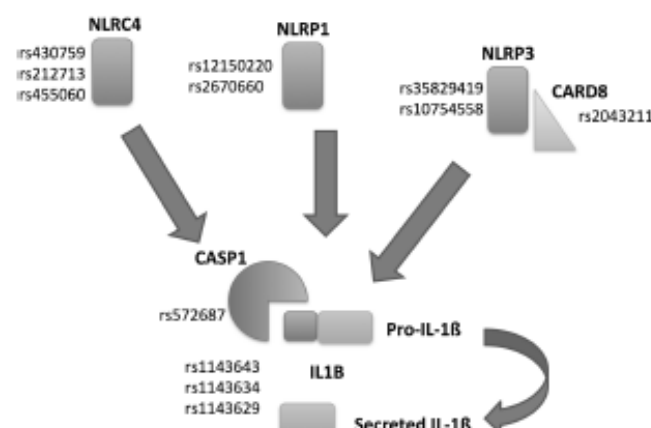


FIGURE 1. Schematic representation of SNPs within the inflammasome components.

Because this is the first study, to our knowledge, considering the selected polymorphisms in *NLRC4*, *CARD8*, *CASP1*, and *IL1B* genes in a Brazilian population, we remark that the allelic frequencies of the SNPs analyzed (Table 1) were between those reported in the HapMap database (<http://www.hapmap.org>) for white and Afroamerican (see **Table, Supplemental Digital Content 1**, <http://links.lww.com/QAI/A230>), as expected due to the mixed ethnical origins of the Brazilian population.^{12,13}

When considering SNPs in the inflammasome receptors genes, *NLRP1* and *NLRC4* polymorphisms was not associated with HIV-1 infection (Table 1).

NLRP3 rs35829419 polymorphism seems not to be associated with HIV infection, whereas the rs10754558 minor G allele was significantly less frequent in HIV+ than in HC (0.35 versus 0.48, $P = 0.002$) suggesting a protective role against the virus infection (OR = 0.61). rs10754558 genotype distribution varied in the 2 groups even if it was not significantly different after Bonferroni correction ($P = 0.003$) (Table 1). The G allele behaved according to a recessive model ($P = 8 \times 10^{-4}$; OR = 0.44; 95%CI = 0.26 to 0.72) rather than to a dominant one ($P = 0.245$).

The rs2043211 variation in the adaptor molecule *CARD8* was not significantly associated to HIV infection (Table 1). The recently reported interaction between *NLRP3* rs35829419 and *CARD8* rs2043211¹⁷ was also evaluated without any significant results (data not shown).

When looking at polymorphisms of inflammasome effector genes *CASP1* and *IL1B*, a significant difference between patients and controls was observed only for *IL1B* rs1143634; the minor A allele was more frequent in HIV+ than in HC (0.41 versus 0.19; $P = 1.56 \times 10^{-9}$) suggesting a predisposing effect on HIV susceptibility (OR = 3.0) (Table 1). The rs1143634 genotype distribution is also significantly different between the 2 groups ($P = 1.14 \times 10^{-4}$) (Table 1) with the rs1143634 A allele behaved according to a recessive model (4.26 $\times 10^{-7}$; OR = 3.31; 95% CI = 2.03–5.46) rather than to a dominant one (5.12 $\times 10^{-5}$; OR = 4.9; 95% CI = 2.09 to 12.71).

The analysis of linkage disequilibrium for the SNPs in *NLRP1*, *NLRP3*, *NLRC4*, and *IL1B* did not show any

TABLE 1. SNPs Allelic and Genotypic Frequencies in HIV+ Brazilian Patients and HCs

Gene	SNP ID (rs)	HIV+ (n = 150)	HC (n = 158)	Fisher Test		
				P	OR	CI
NLRP1	rs12150220					
	A	188 (0.63)	192 (0.61)	0.679	0.92	0.66 to 1.29
	T	112 (0.37)	124 (0.39)	—		
	A/A	71 (0.47)	59 (0.37)	0.014		
	A/T	46 (0.31)	74 (0.47)	—		
NLRP1	rs2670660					
	T/T	33 (0.22)	25 (0.16)	—		
	A	149 (0.50)	185 (0.58)	0.029	1.43	1.03 to 1.99
	G	151 (0.50)	131 (0.42)	—		
	A/A	42 (0.30)	49 (0.30)	0.006		
NLRP3	rs35829419					
	A/G	65 (0.43)	87 (0.55)	—		
	G/G	43 (0.27)	22 (0.15)	—		
	A	3 (0.01)	15 (0.05)	0.007	0.20	0.04 to 0.73
	C	297 (0.99)	301 (0.95)	—		
NLRP3	rs10754558					
	A/A	0	2 (0.01)	0.032		
	A/C	3 (0.02)	11 (0.07)	—		
	C/C	147 (0.98)	145 (0.92)	—		
	C	194 (0.65)	166 (0.52)	0.002	0.61	0.43 to 0.85
NLRC4	rs430759					
	G	106 (0.35)	150 (0.48)	—		
	CC	68 (0.45)	42 (0.26)	0.003		
	CG	58 (0.39)	82 (0.52)	—		
	GG	24 (0.16)	34 (0.22)	—		
NLRC4	rs212713					
	A	98 (0.33)	117 (0.37)	0.272	0.83	0.58 to 1.17
	G	202 (0.67)	199 (0.63)	—		
	A/A	21 (0.14)	61 (0.39)	0.117		
	A/G	56 (0.37)	77 (0.49)	—		
NLRC4	rs455060					
	G/G	73 (0.49)	20 (0.12)	—		
	C	128 (0.43)	151 (0.48)	0.225	0.81	0.58 to 1.13
	T	172 (0.57)	165 (0.52)	—		
	C/C	26 (0.17)	34 (0.22)	0.451		
NLRC4	rs2043211					
	C/T	76 (0.51)	83 (0.53)	—		
	T/T	48 (0.32)	41 (0.25)	—		
	A	202 (0.67)	216 (0.68)	0.800	1.05	0.74 to 1.49
	G	98 (0.33)	100 (0.32)	—		
CARD8	rs2043211					
	A/A	68 (0.45)	79 (0.50)	0.409		
	A/G	66 (0.44)	58 (0.37)	—		
	G/G	16 (0.11)	21 (0.13)	—		
	T	119 (0.40)	98 (0.31)	0.028	1.46	1.03 to 2.07
CARD8	A	181 (0.60)	218 (0.69)	—		
	T/T	29 (0.19)	19 (0.12)	0.110		
	T/A	61 (0.41)	60 (0.38)	—		
	A/A	60 (0.40)	79 (0.50)	—		

(continued on next page)

TABLE 1 (Continued) SNPs Allelic and Genotypic Frequencies in HIV+ Brazilian Patients and HCs

Gene	SNP ID (rs)	HIV+ (n = 150)	HC (n = 158)	Fisher Test			
				P	OR	CI	
CASP1	rs572687						
	A	52 (0.17)	55 (0.17)	1.0	1.0	0.64 to 1.54	
	G	248 (0.83)	261 (0.83)	—			
	A/A	3 (0.02)	5 (0.03)	0.803			
	A/G	46 (0.31)	45 (0.28)	—			
IL1B	rs1143643	G/G	101 (0.67)	108 (0.68)	—		
		C	169 (0.56)	188 (0.58)	0.463	1.14	0.82 to 1.59
		T	131 (0.44)	128 (0.42)	—		
		C/C	51 (0.34)	60 (0.38)	0.750		
		C/T	67 (0.45)	68 (0.43)	—		
IL1B	rs1143634	T/T	32 (0.21)	30 (0.19)	—		
		G	176 (0.59)	256 (0.81)	1.56 exp-09	3.0	2.06 to 4.40
		A	124 (0.41)	60 (0.19)	—		
		G/G	57 (0.38)	106 (0.67)	1.14 exp-04		
		G/A	62 (0.41)	44 (0.28)	—		
IL1B	rs1143629	A/A	31 (0.21)	8 (0.05)	—		
		A	177 (0.59)	212 (0.67)	0.045	1.42	1.0 to 1.99
		G	123 (0.41)	104 (0.33)	—		
		A/A	50 (0.33)	69 (0.44)	0.105		
		A/G	77 (0.51)	74 (0.47)	—		
		G/G	23 (0.15)	15 (0.09)	—		

Allelic and genotypic counts and frequencies are reported for the 12 inflammasome SNPs in HIV+ Brazilian patients (HIV+; n = 150) and in HCs (n = 158). Gene name and identification SNP code (SNP ID, rs) were indicated. Fisher test was used to compare SNPs distributions. The P value for alleles and genotypes frequency comparisons, OR, and CI were showed. In bold are indicated P values <0.004 (significant threshold after Bonferroni correction), whereas in italic are indicated P values <0.05.

significant results (see **Figure, Supplemental Digital Content 2**, <http://links.lww.com/QAI/A231>).

The combined effect of the HIV-associated polymorphisms *NLRP3* rs10754558 and *IL1B* rs1143634 has been evaluated: 4 allelic combinations resulted (C-G, G-G, C-A, G-A) and 3 were significantly differently distributed in our groups. In particular, the combination rs10754558 minor allele G and rs1143634 major allele G showed a protective effect against the viral infection ($P = 3.82 \exp-8$; OR = 0.37), whereas the 2 combinations carrying the rs1143634 minor allele A showed a predisposing effect on HIV infection ($P = 5.24 \exp-6$; OR = 2.72 and $P = 0.003$; OR = 2.21) especially when the rs10754558 major C allele was present.

Considering the ethnical admixture characteristic of the Brazilian population, we evaluated the frequency distribution of the 12 SNPs in our case/control cohort stratified for European or African origin. All the polymorphisms presented a similar allele frequency in European and African HIV+/HC groups (see **Data, Supplemental Digital Content 3**, <http://links.lww.com/QAI/A232>). In subjects of European origin, the rs1143634 minor A allele resulted more frequent in HIV+ subjects than in HC (0.44 vs. 0.15; $P = 3.3 \exp-13$; OR = 4.5; 95%CI = 2.89 to 7.12). *NLRP3* rs10754558 appeared not to be statistically different distributed between HIV+ and HC ($P = 0.03$). In subjects of African origin, probably due to the low number of individuals, no significant association was

observed. To exclude the influence of ethnicity on rs10754558 and rs1143634 frequency distribution, ethnic origin was put into covariate and analysis of covariance test (analysis of covariance) was carried out. After this correction, significant difference was observed again for rs1143634 in European-origin group ($P = 1.5 \exp-9$).

DISCUSSION

Inflammasomes are known to be involved in recognizing several pathogens and in triggering the consequent innate immune response.⁸ Recently, we reported the association between *NLRP3* and HIV-1 infection hypothesizing a role of *NLRP3* inflammasome and IL-1 β in HIV pathogenesis.¹¹ To deeper investigate this association, 12 SNPs within 6 genes with a key function in inflammasome assembling or IL-1 β secretion were selected (Fig. 1), and their distribution was evaluated in a novel cohort of south Brazilian HIV+ subjects.

Among the 12 SNPs, rs10754558 in *NLRP3* and rs1143634 in *IL1B* were significantly associated to the HIV-1 infection.

The rs10754558 G allele resulted protective against the infection. This result was concordant with our previously published data reporting the association of rs10754558 with protection from HIV-1 infection in groups of patients characterized by different ethnic composition.¹¹

Although the *NLRP3* rs35829419 allele frequencies distribution in patients and controls was the same in the present and in the previous "Sao Paulo" cohort,¹¹ the significant threshold has not reached in this study maybe due to the lower number of enrolled individuals (150/158 vs. 192/192¹¹), the higher number of SNPs evaluated (12 versus 4¹¹), and the consequent complexity of statistical analysis.

Despite the quite limited size of the population studied, we believe that present findings support once again our previously reported hypothesis about the involvement of *NLRP3* in the HIV-1/immune system interaction during the early steps of HIV infection.¹¹

The augmented mRNA stability demonstrated for the rs10754558 G allele¹⁸ could augment the synthesis of *NLRP3* increasing the number of anti-HIV available receptors and the rate of inflammasome assembling, resulting in a more effective early immune response against the virus. Whether *NLRP3* acts directly as a HIV receptor or belongs to an intracellular antiviral pathway have not yet demonstrated, and functional studies are needed to clarify the *NLRP3*/HIV interaction.

The other 2 *NLRs* involved in the inflammasome assembling, *NLRP1* and *NLRP4*, seemed not to be associated to HIV pathogenesis, reinforcing the hypothesis of a specific role of *NLRP3* in HIV sensing.

The minor *IL1B* rs1143634 A allele was more frequent in HIV+ subjects suggesting a predisposing role of this allele to HIV infection. To our knowledge, it is the first time that this variation has been associated with HIV-1 infection. The rs1143634 polymorphism is a Tag SNP leading to a synonymous substitution (F105F) with a still unknown functional effect. This association emphasizes the importance of inflammasome and IL-1 β secretion in HIV pathogenesis. High levels of IL-1 β have been observed in patients from the early stages of HIV-1 infection,¹⁹ suggesting a role of *NLRP3* inflammasome in driving this sustained inflammatory response.

Moreover *NLRP3* inflammasome and IL-1 β were reported to be prominent factors in the maturation and activation of dendritic cells^{8,20,21}; playing a pivotal role not only in the innate immune response but also in the specific humoral and cellular immune response.

Whether a high activation of inflammasome is good or not for the immune activation against HIV-1 is an open question because a chronic inflammation is predictive of an adverse prognosis for the infected patients.¹⁹ In the first steps of infection, HIV enters the mucosal residential macrophages and dendritic cells inducing a inflammatory response that leads to early activation of the immune system against the virus, but also to the recruitment of a large number of immune cells targeted by the virus, enlarging its spreading.

Even if further investigations are needed to elucidate the role of *NALP3* inflammasome in HIV-1 infection, our results demonstrate that genetic polymorphisms in *NLRP3* and *IL1B*, 2 genes with a key role in the inflammasome biology, are associated to HIV-1 infection underlining once more the importance of innate immune genetic background in the susceptibility to the virus.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the ambulatory of secondary immunodeficiencies (ADEE 3002) of Hospital das Clínicas (FMUSP, Sao Paulo, Brazil) for HIV+ patients' recruitment, Prof. Dr. Andrade Jr H. F. and the laboratory of Protozoology (Institute of Tropical Medicine, FMUSP) for the helpful technical support, and all patients for the collaboration.

REFERENCES

- Kawai T, Akira S. Innate immune recognition of viral infection. *Nat Immunol*. 2006;7:131–137.
- Kaslow RA, Dorak T, Tang JI. Influence of host genetic variation on susceptibility to HIV type 1 infection. *J Infect Dis*. 2005;191(suppl 1):S68–S77.
- Gonzalez E, Bamshad M, Sato N, et al. Race-specific HIV-1 disease-modifying effects associated with CCR5 haplotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:12004–12009.
- Gonzalez E, Kulkarni H, Bolivar H, et al. The influence of CCL3L1 gene-containing segmental duplications on HIV-1/AIDS susceptibility. *Science*. 2005;307:1434–1440.
- Dolan MJ, Kulkarni H, Camargo JF, et al. CCL3L1 and CCR5 influence cell-mediated immunity and affect HIV-AIDS pathogenesis via viral entry-independent mechanisms. *Nat Immunol*. 2007;8:1324–1336.
- Ji X, Gewurz H, Spear GT. Mannose binding lectin (MBL) and HIV. *Mol Immunol*. 2005;42:145–152.
- Mangano A, Gonzalez E, Dhandu R, et al. Concordance between the CC-chemokine receptor 5 genetic determinants that alter risks of transmission and disease progression in children exposed perinatally to human immunodeficiency virus. *J Infect Dis*. 2001;183:1574–1585.
- Martinson F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:229–265.
- Thomas PG, Dash P, Aldridge JR Jr, et al. The intracellular sensor NLRP3 mediates key innate and healing responses to influenza A virus via the regulation of caspase-1. *Immunity*. 2009;30:566–575.
- Homung V, Ablasser A, Charrel-Dennis M, et al. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature*. 2009;458:514–518.
- Pontillo A, Brandão LA, Guimarães RL, et al. A 3'UTR SNP in *NLRP3* gene is associated with susceptibility to HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2010;54:236–240.
- Vargas AE, Marrero AR, Salzano FM, et al. Frequency of CCR5delta32 in Brazilian populations. *Braz J Med Biol Res*. 2006;39:321–325.
- Veit TD, Cordero EA, Mucenic T, et al. Association of the HLA-G 14 bp polymorphism with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2009;18:424–430.
- Cox DG, Canzian F. Genotype transposer: automated genotype manipulation for linkage disequilibrium analysis. *Bioinformatics*. 2001;17:738–739.
- Barrett JC, Fry B, Maller J, et al. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 2005;21:263–265.
- Lewis CM. Genetic association studies: design, analysis and interpretation. *Brief Bioinform*. 2002;3:146–153; Review.
- Roberts RL, Topless RKG, Phipps-Green AJ, et al. Evidence of interaction of CARD8 rs2043211 with *NALP3* rs35829419 in Crohn's disease. *Genes Immun*. 2010;11:351–356.
- Hitomi Y, Ebisawa M, Tomikawa M, et al. Associations of functional *NLRP3* polymorphisms with susceptibility to food-induced anaphylaxis and aspirin-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124:779–785.
- Appay V, Sauce D. Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. *J Pathol*. 2008;214:231–241.
- Kool M, Petrilli V, De Smedt T, et al. Alum adjuvant stimulates inflammatory dendritic cells through activation of the *NALP3* inflammasome. *J Immunol*. 2008;205:869–882.
- Eisenbarth SC, Colegio OR, O'Connor W, et al. Crucial role for the *Nalp3* inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature*. 2008;453:1122–1126.

5.2 Susceptibility to M tuberculosis infection in HIV-positive patients is associated with *CARD8* genetic variant

Título: “Susceptibility to M tuberculosis infection in HIV-positive patients is associated with *CARD8* genetic variant.”

Autores: Alessandra Pontillo¹; Marcia Schneider Carvalho²; Anselmo Jiro Kamada²; Ronald Moura²; Haiana Charifker Schindler³; Sergio Crovella².

¹Universidade de São Paulo/ Laboratório de Dermatologia e Imunodeficiências – LIM 56-USP, São Paulo, Brasil; ²Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Genética, Recife Brasil; ³Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães – Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM – Fiocruz), Recife Brasil.

Aceito pelo periódico Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999)

Fator de Impacto (JCR 2011): 4.425 / Qualis A1



Susceptibility to M tuberculosis infection in HIV-positive patients is associated with *CARD8* genetic variant

Alessandra PONTILLO¹, Marcia Schneider CARVALHO², Anselmo J KAMADA²,
Ronald MOURA², Haiana Charifker SCHINDLER³, Sergio CROVELLA⁴.

1. Laboratory of Medical Investigation in Dermatology and Immunodeficiency LIM-56, Faculty of Medicine, University of Sao Paulo (Sao Paulo, Brazil)
2. Department of Genetics, Federal University of Pernambuco (Recife, Brazil)
3. Department of Immunology, Aggeu Magalhães Research Center-CPqAM/FIOCRUZ (Recife, Brazil).
4. Institute for Maternal and Child Health, IRCCS Burlo Garofolo, and University of Trieste (Trieste, Italy).

Corresponding Author: Dr. Alessandra Pontillo; pontillo.a@gmail.com

Laboratory of Medical Investigation in Dermatology and Immunodeficiency, LIM-56.,
Faculty of Medicine, University of Sao Paulo,(Sao Paulo, Brazil)
Av. Dr Eneas de Carvalho Aguiar, 500; 05403-000 Sao Paulo

Running head: SNPs in inflammasome genes and HIV-TB co-infection.

Grant Support

This work was supported by the Pernambuco Research Foundation (FACEPE) (project number APQ-0757-2.02/10) and Sao Paulo Research foundation (FAPESP) (project number 09/53575–5). A.P. was recipient of a visiting researcher grant from Brazilian National Council of Research and Technology (CNPq) (n. 311949/2011-8).

Conflict of Interest

The authors declare no competing financial interests.

Total number of words: 2020

ABSTRACT

Objective: Development of tuberculosis (TB) in HIV positive (HIV+) patients is influenced by HLA and other genetic variants that play important role in the innate as well as adaptive immunity. Recently, our research group demonstrated that variants in NLRP3-inflammasome contribute to HIV-1 susceptibility, and hypothesized that inflammasome genetics could also affect the susceptibility to M tuberculosis in HIV+ individuals. The present study investigated the possible association between selected variants in inflammasome genes and HIV-1 and M tuberculosis (HIV+TB+) co-infection in a case/control cohort of Brazilian individuals.

Methods: 19 SNPs in 8 inflammasome genes (*NLRP1*, *NLRP3*, *AIM2*, *CARD8*, *CASP1*, *IL1B*, *IL1R*, *HSP90*) were genotyped in 96 HIV+TB+, 96 TB+, 192 HIV+ patients and 150 healthy controls coming from metropolitan area of Recife (Pernambuco, North-East of Brazil).

Results: Carriers of *CARD8* rs6509365 minor G allele were significantly more frequent in HIV+TB+ than in HIV+ patients ($p=5 \times 10^{-5}$) suggesting a predisposing role of this variant in M tuberculosis susceptibility in HIV+ subjects (OR=2.45), and this effect is even stronger when this allele is combined to *CARD8* rs2043211 major allele A. *CARD8* rs6509365 variant was associated exclusively with HIV+TB+ co-infection and not with single infection (TB+ or HIV+).

Conclusion: Our results support the novel association between the *CARD8* gene and HIV+TB+ co- infection, demonstrate once more that inflammasome genetics could influence HIV-1 infection and the development of opportunistic infection.

INTRODUCTION

The emergence of human immunodeficiency virus (HIV) and its synergistic association with tuberculosis (TB) poses a great challenge to the health systems in developing countries. TB is the most life threatening opportunistic infection among HIV patients.

Variability in the clinical outcomes of individuals exposed to and infected with HIV-1 and tuberculosis is determined by multiple factors including host genetic variations. Development of TB in HIV patients is influenced by HLA and other genetic variants that play important role in the innate as well as adaptive immunity [1]. Within host innate immune strategies, many studies have now uncovered the crucial role of inflammasomes in different microbial infections. Inflammasomes are molecular platforms that are assembled by hetero-oligomerization of an innate immune receptor, an adaptor protein ASC and the effector enzyme caspase-1, which lead to the cleavage of pro-IL-1 β into biologically active IL-1 β . Each kind of receptor (NLRP1, NLRP3, NLRC4, AIM2) could recognize different pathogen associated molecular patterns (PAMPs) inducing the assembling of inflammasome, the activation of caspase-1 and finally the secretion of the pro-inflammatory cytokine IL-1 β . Several proteins have been described as negative regulators of inflammasome and IL-1 β secretion, such as CARD8, HSP90 and the IL-1 receptor antagonist (IL1RA) [2-3]. Deregulation of inflammasome has been associated with susceptibility to microbial infection, as it was reported for knockout animal models [2-3] and in human genetic association studies [4]. Critical role for the NLRP3-inflammasome has also been reported during *Mycobacterium* spp infection in mice [5-8], whereas limited knowledge is nowadays available about the effect of inflammasome deregulation on TB in humans.

Recently, our research group demonstrated that variants in NLRP3-inflammasome contribute to HIV-1 susceptibility [9-10], and we hypothesized that inflammasome genetics could also affect the susceptibility to *M. tuberculosis* in HIV positive (HIV+) patients.

The present study investigated the possible association between selected variants in inflammasome genes and HIV-1 and *M. tuberculosis* (HIV+TB+) co-infection. For this purpose, the frequency distribution of 19 single nucleotide polymorphisms (SNPs) within 8 inflammasome genes (*NLRP1*, *NLRP3*, *AIM2*, *CARD8*, *CASP1*, *IL1B*, *IL1RA*, *HSP90*) has been analysed in a case/control cohort of Brazilian individuals.

PATIENTS AND METHODS

Patients and controls

96 HIV-1 positive and TB positive Brazilian adults (HIV+TB+; 62 males/39 females; mean age 37.61 years $\pm$ SD 10.65), 96 TB positive (TB+; 60 males/36 females; mean age 27.79 years $\pm$ SD 20.18) and 192 HIV-1 positive Brazilian adults (HIV+; 54 males/138 females; mean age 36.39 years $\pm$ SD 9.06) were enrolled at the immunological ambulatory of “Correia Picanço”, “Hospital das Clínicas – UFPE” and “Instituto de Medicina Integrada Prof. Fernando Figueira” hospitals. 150 healthy controls (HC; 27 males/123 females; 33.47 years $\pm$ 13.4) from the same metropolitan area (Recife) were also recruited. Individuals were classified as European- or African-derived according to phenotypic characteristics and ethnicity data of parents/grandparents reported by the participants in an appropriate questionnaire. The issue concerning skin colour-based classification criteria adopted in Brazil is well documented and has been already assessed in previous studies [11-12]. 63 HC (42%), 27 HIV+TB+ (28%), 27 TB+ (28%) and 44 HIV+ (23%) were classified as European derived, whereas 87 HC (58%), 69 HIV+TB+ (72%), 69 TB+

(72%) and 148 HIV+ (77%) as African-derived. Characteristics of the patients and controls are listed in Table 1. Written informed consent was obtained according to the protocol of “Centro de Ciências da Saúde - Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE)” Ethical Committee (nº 173/11) (Recife, Brazil).

DNA extraction.

Genomic DNA was extracted from peripheral whole blood using the Qiagen genomic DNA purification kit (Qiagen, USA) following standard laboratory protocols.

SNPs selection and genotyping.

19 SNPs in 8 inflammasome genes (*NLRP1*, *NLRP3*, *NLRC4*, *AIM2*, *CARD8*, *CASP1*, *IL1B*, *IL1R*, *HSP90*) were selected from public databases Hapmap (www.hapmap.org) and GeneBrowser (www.genome.ucsc.edu) and are listed in Figure 1. 14 SNPs were chosen based on previously published association studies [10; 13-14]. Three other SNPs in *NLRP3* were included (rs4925659, rs12239046 and rs10754555) considering novel findings [15-16]. Functional polymorphisms in *IL1R* (rs3917254) and *HSP90* (rs11621560) genes were also included due to their possible impact in down-regulating inflammasome activation [2-3].

SNPs genotyping was performed using commercially available TaqMan assays (*Applied Biosystems/AB*, *LifeTechnologies*, USA). TaqMan reactions were set up based on the manufacturer’s protocols and samples run on an ABI7500 Real-Time instrument (AB).

Data analysis

Allelic and genotypic SNP frequencies were calculated using the Genotype Transposer software [17]. Bonferroni correction for multiple tests was also performed. The Haploview software [18] was used to investigate the association and linkage disequilibrium pattern, as well as for deriving the haplotypes. The open-source R-project (www.r-project.org) was used to perform Fisher’s exact test and Odds Ratio (OR) calculation for alleles and

haplotypes calculation, as well as for genotypes association and modelling (package “SNP assoc” version 1.5-2).

RESULTS

19 SNPs within 8 inflammasome genes (*NLRP1*, *NLRP3*, *AIM2*, *CARD8*, *CASP1*, *IL1B*, *ILR1*, *HSP90*) were genotyped in 96 HIV+TB+ patients and 192 HIV+ individuals. SNPs allelic and genotypic frequencies were in Hardy–Weinberg equilibrium in both groups. Four variations (rs10754558, rs2043211, rs6509365, rs1143634) were differently distributed between HIV+TB+ and HIV+, even if only rs6509365 in *CARD8* resulted significantly associated with co-infection after Bonferroni correction. Table 2 shows *NLRP3*, *CARD8*, *IL1B* rs10754558, rs2043211, rs6509365, rs1143634 SNPs genotypes frequencies and p-values corrected for sex and ethnicity.

Carriers of *CARD8* rs6509365 minor G allele were significantly more frequent in HIV+TB+ than in HIV+ patients ($p=5 \times 10^{-5}$) suggesting a predisposing role of this variant in *M tuberculosis* susceptibility in HIV+ subjects (OR=2.45; 95%CI=1.56-3.84). (Table 2). According to the Akaike information criterion (AIC), the rs6509365 G allele behaved according to a dominant model.

The linkage disequilibrium analysis showed a significant result only for *NLRP3* SNPs rs12239046 and rs4925659 ($D'=1$; $r^2=0.39$) (Supplementary File S1). The resulting haplotypes were differently distributed within HIV+TB+ and HIV+ groups, whereas not in a statistical significant way after Bonferroni correction ($p=0.02$) (Supplementary File S1).

The combined effect of polymorphisms within the same genes has been evaluated and significant results were reported in Table 3. The *CARD8* SNPs rs2043211 and rs6509235 formed four allelic combinations (A-A, T-A, T-G, A-G). In particular, the combination A-G showed a predisposing effect for co-infection ($p=9.0 \times 10^{-4}$; OR=2.60; 95%CI= 1.43-

4.78), whereas the A-A a protective one ($p=1.5 \times 10^{-4}$; OR=0.49; 95%CI: 0.34-0.72). *IL1B* SNPs combination resulted in 6 haplotypes with frequency > 0.05 in HIV+TB+ and HIV+ subjects. The combined haplotype rs1143643 A-rs1143634 G-rs1143629 G showed a significant higher frequency in HIV+TB+ when compared to HIV+ (0.10 versus 0.03; $p=0.002$; OR=3.4; 95%CI= 1.50-8.23).

Considering the ethnical admixture characteristic of the Brazilian population we evaluated the frequency distribution of the 19 SNPs in our groups stratified for European or African ethnic origin.

In subjects of European origin the rs243211 SNP has been excluded from analysis because it was not in Hardy-Weinberg equilibrium. Even if the frequency of the two polymorphisms rs6509365 and rs1143634 varied in HIV+TB+ and HIV+, none of the polymorphisms resulted significant differently distributed after Bonferroni correction (Supplementary file 2).

In African-derived group the rs6509365 G allele resulted significantly associated with the susceptibility to HIV-1 and TB co-infection ($p=9 \times 10^{-5}$; OR=3.46; 95%CI=1.83-6.52, corrected by sex) behaving according to a dominant model. The rs1143634 SNP resulted associated to the co-infection according with an over-dominant model even if the p-value did not reach the significant threshold after Bonferroni correction ($p=0.010$) (Supplementary file 2).

Considering that the variants associated to HIV+TB+ co-infection could be related to single infection, we genotyped and compared TB+ subjects and healthy controls (HC), all coming from the same metropolitan region of HIV+TB+ individuals (Recife, Pernambuco). The rs10754558 polymorphism was excluded for the analysis because it was not in Hardy-Weinberg equilibrium in TB+ group ($p=0.006$).

The *CARD8* rs6509365 variation resulted to be more frequent in TB+ patients with respect to controls, even if not in a statistically significant way after Bonferroni correction ($p=0.010$). The distribution of the other SNPs did not significantly differ between TB+ and HC groups. (Supplementary File S3)

The linkage disequilibrium analysis showed a significant result for *CARD8* SNPs rs2043211 and rs6509235 ($D'=0.96$; $r^2=0.72$) and *NLRP3* SNPs rs4925659 and rs10754558 ($D'=0.95$; $r^2=0.30$). The resulting haplotypes were differently distributed in TB+ and HC+ groups, whereas not in a statistical significant way (Supplementary File S4). When the analysis was performed in European-derived TB+ case/control cohorts, the frequency of the SNPs did not vary (Supplementary File S3). Whereas when considering African-derived individuals, *NLRP1* rs3473379, *CARD8* rs2043211 and rs6509365 were differently distributed even if not in a significant way after Bonferroni correction (Supplementary File S3).

When TB form (pulmonary or extra-pulmonary) was taken in account, both in HIV+TB+ and TB+ groups, the rs6509235 variant appeared to be less frequent in pulmonary form than in extra-pulmonary manifestation in HIV+TB+ ($p=0.004$; OR=0.13; 95% CI=0.03-0.59) and also in TB+ ($p=0.009$; OR=0.25; 95%=0.08-0.76), even if the p-value did not reach the significant threshold after Bonferroni correction. (Supplementary File S5).

DISCUSSION

Susceptibility to HIV/AIDS as well as development of TB in HIV patients is multifactorial and is influenced by both environmental and genetic components. Innate immunity and inflammation have been proposed as important factors in the susceptibility and in the development of HIV/AIDS and TB.

Inflammasomes are known to be involved in recognizing several pathogens and in

triggering the consequent innate immune response [2-3]. Recently we reported the association between *NLRP3* and HIV-1 infection hypothesizing a role of *NLRP3*-inflammasome and IL-1 β in HIV pathogenesis [9-10]. Moreover, it has been proposed a role of *NLRP3*-inflammasome also in *Mycobacterium* spp infection in animal model [5-8]. Polymorphisms in purinergic receptor P2X7, the cationic channel activated by extracellular ATP involved in inflammasome assembling, have been reported to be associated to extrapulmonary TB [19-21], suggesting a role of inflammasome genetics in *M tuberculosis* infection and TB development.

To our knowledge this is the first time that inflammasome polymorphisms have been evaluated in association with HIV+TB+ co-infection.

Our results strongly suggest the novel association between the *CARD8* gene and HIV+TB+ co-infection. In particular HIV+ patients carrying rs6509365 minor G allele are more prone to co-infection, and this effect is even stronger when this allele is combined to *CARD8* rs2043211 major allele A.

The role of *CARD8* in the biology of inflammasome is far to be fully characterized. *CARD8* inhibits caspase-1 [22] and NF-KB pathway [23], and regulates apoptosis [24]. The loss-of-function polymorphism rs2043211 (C10X), and the consequent inappropriate strong caspase-1 response, have been associated with systemic inflammatory response syndrome and autoimmunity [25]. In a genome-wide study, Ko and colleagues showed that the two *CARD8* polymorphisms, rs2043211 and rs6509365, found in strong LD, were associated with *Salmonella*-induced cell death [26]. The rs6509365 SNP is an intronic variant and its functional effect is still unknown, even if it has been postulated that it could reduce *CARD8* gene expression [26].

According to this hypothesis, HIV+ patients carrying rs6509365 G allele would have a higher caspase-1 activation and cell death in immune cells, being more susceptible to

develop opportunistic infection, such as TB. On the other side, the augmented activation of inflammasome could overcome the inhibition on inflammasome proteins mediated by *M tuberculosis* [27], increasing the spread of bacteria through out the body.

Whether this variation could affect the response against *M tuberculosis* in healthy subjects is not fully demonstrated, because in our data the difference in rs6509365 distribution between TB+ and controls did not reach the statistical significance. We are aware that it could be due to the limited size of our groups.

On the other side, we did not find an association between this variant and susceptibility to HIV-1 infection (data not shown), so we could hypothesize that rs6509365 affects specifically TB development, especially in immune compromised individuals.

Similarly to the data reported about P2X7 polymorphisms [19-21], also this inflammasome variant rs6509365 appeared to be more associated with extra-pulmonary TB.

The *IL1B* rs1143634 polymorphism, especially in combination with the other two *IL1B* SNPs (rs1143643 and rs1143629) was associated with HIV+TB+ co-infection, and not with TB. In our previous report, this variant has been associated with susceptibility to HIV-1 infection [10]. The rs1143634 polymorphism is a Tag SNP leading to a synonymous substitution (F105F) with a still unknown functional effect. This association has emphasized the importance of inflammasome and IL-1 β secretion in HIV pathogenesis [28] and now point out a role of this pro-inflammatory cytokine in the susceptibility to opportunistic infection.

Even if further investigations are needed to elucidate the role of CARD8 and inflammasome in HIV-TB co-infection, our results demonstrate once more that inflammasome genetics could influence HIV-1 infection and the development of opportunistic infection.

LEGENDS

Table 1. Characteristic of patients and controls.

Table 2. Distribution of genotypes and results of the association study of the 4 genes significantly associate with the co-infection HIV+TB+ (UNADJ $p < 0.05$). Results were corrected for sex and ethnicity. Polymorphisms that continued to be associated after Bonferroni correction are reported in bold characters.

Table 3. Results of the association study of the SNPs combined alleles in *CARD8* and *IL1B* genes (A) in HIV+TB+ and HIV+ groups (UNADJ $p < 0.05$). Polymorphisms that continued to be associated after Bonferroni correction are reported in bold characters (B).

Supplementary File S1. Results of Linkage Disequilibrium analysis (A) and of the association study of the *NLRP3* haplotype block in HIV+TB+ and HIV+ groups (UNADJ $p < 0.05$) (B).

Supplementary File S2. Results of the association study in HIV+TB+ and HIV+ patients stratified for European (Eur) and African origin (Afr). Unadjusted p- values were reported according to different models of genotypes inheritance. Results were corrected for sex. Polymorphisms that continued to be associated after Bonferroni correction are reported in bold characters.

Supplementary File S3. Results of the association study in TB+ and HC individuals. Unadjusted p-values were reported according to different models of genotypes inheritance ($p < 0.05$ were reported in Italic). Results in un-stratified groups (ALL) were corrected for sex and ethnicity. Results in groups stratified for European (EUR) and African origin (AFR) were corrected for sex. Polymorphisms that continued to be associated after Bonferroni correction are reported in bold characters.

Supplementary File S4. Results of Linkage Disequilibrium analysis in TB+ and HC

(A) and of the association study of the *CARD8* and *NLRP3* haplotypes blocks in TB+ and HC+ groups (UNADJ $p < 0.05$) (B).

Supplementary File_S5. Results of the association study in TB+ and HIVTB+ patients with pulmonary and extra-pulmonary form of disease. Unadjusted p- values were reported according to different models of genotypes inheritance ($p < 0.05$ in *Italic characters*). Results were corrected for ethnicity and sex. Polymorphisms that continued to be associated after Bonferroni correction are reported in **bold characters**. Polymorphisms out of Hardy-Weinberg equilibrium or with a genotyping rate $< 50\%$ were excluded from the analysis.

References

1. Raghavan S, Alagarasu K, Selvaraj P. Immunogenetics of HIV and HIV associated tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*. 2012 Jan;92(1):18-30.
2. Gross O, Thomas CJ, Guarda G, Tschopp J. The inflammasome: an integrated view. *Immunol Rev*. 2011 Sep;243(1):136-51.
3. Broz P, Monack DM. Molecular mechanisms of inflammasome activation during microbial infections. *Immunol Rev*. 2011 Sep;243(1):174-90
4. Lamkanfi M, Dixit VM. Inflammasomes and Their Roles in Health and Disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2012 Sep 10.
5. Mishra BB, Moura-Alves P, Sonawane A, Hacohen N, Griffiths G, Moita LF, Anes E. Mycobacterium tuberculosis protein ESAT-6 is a potent activator of the NLRP3/ASC inflammasome. *Cell Microbiol*. 2010 Aug;12(8):1046-63. Epub 2010 Feb 9.
6. Wong KW, Jacobs WR Jr. Critical role for NLRP3 in necrotic death triggered by Mycobacterium tuberculosis. *Cell Microbiol*. 2011 Sep;13(9):1371-84.
7. Dorhoi A, Nouailles G, Jörg S, Hagens K, Heinemann E, Pradl L, Oberbeck-Müller D, Duque-Correa MA, Reece ST, Ruland J, Brosch R, Tschopp J, Gross O, Kaufmann SH. Activation of the NLRP3 inflammasome by Mycobacterium tuberculosis is uncoupled from susceptibility to active tuberculosis. *Eur J Immunol*. 2012 Feb;42(2):374-84.
8. Abdalla H, Srinivasan L, Shah S, Mayer-Barber KD, Sher A, Sutterwala FS, Briken V. Mycobacterium tuberculosis Infection of Dendritic Cells Leads to Partially Caspase-1/11-Independent IL-1 β and IL-18 Secretion but Not to Pyroptosis. *PLoS One*. 2012;7(7):e40722. Epub 2012 Jul 24.
9. Pontillo A, Brandão LA, Guimarães RL, Segat L, Athanasakis E, Crovella S. A 3'UTR SNP in NLRP3 gene is associated with susceptibility to HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2010 Jul;54(3):236-40.
10. Pontillo A, Oshiro TM, Girardelli M, Kamada AJ, Crovella S, Duarte AJ. Polymorphisms in inflammasome' genes and susceptibility to HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2012 Feb 1;59(2):121-5.
11. Vargas AE, Marrero AR, Salzano FM, *et al.* Frequency of CCR5delta32 in Brazilian populations. *Braz J Med Biol Res*. 2006;39:321–325.

12. Veit TD, Cordero EA, Mucenic T, *et al.* Association of the HLA-G 14 bp polymorphism with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2009;18: 424–430
13. Pontillo A, Catamo E, Arosio B, Mari D, Crovella S. NALP1/NLRP1 Genetic Variants are Associated With Alzheimer Disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 2012 Jul;26(3):277-81.
14. Pontillo A, Girardelli M, Kamada AJ, Pancotto JA, Donadi EA, Crovella S, Sandrin-Garcia P. Polimorphisms in inflammasome genes are involved in the predisposition to systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity*. 2012 Jun;45(4):271-8
15. Day TG, Ramanan AV, Hinks A, Lamb R, Packham J, Wise C, Punaro M, Donn RP. Autoinflammatory genes and susceptibility to psoriatic juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum*. 2008 Jul;58(7):2142-6.
16. Dehghan A, Dupuis J, Barbalic M, Bis JC, Eiriksdottir G, Lu C, Pellikka N, Wallaschofski H, *et al.* Meta-analysis of genome-wide association studies in >80 000 subjects identifies multiple loci for C-reactive protein levels. *Circulation*. 2011 Feb 22;123(7):731-8.
17. Cox DG, Canzian F. Genotype transposer: automated genotype manipulation for linkage disequilibrium analysis. *Bioinformatics*. 2001;17:738–739.
18. Barrett JC, Fry B, Maller J, *et al.* Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 2005;21:263–265.
19. Fernando SL, Saunders BM, Sluyter R, Skarratt KK, Goldberg H, Marks GB, Wiley JS, Britton WJ. A polymorphism in the P2X7 gene increases susceptibility to extrapulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007 Feb 15;175(4):360-6.
20. Li CM, Campbell SJ, Kumararatne DS, Bellamy R, Ruwende C, McAdam KP, Hill AV, Lammas DA. Association of a polymorphism in the P2X7 gene with tuberculosis in a Gambian population. *J Infect Dis*. 2002 Nov 15;186(10):1458-62
21. Sambasivan V, Murthy KJ, Reddy R, Vijayalakshimi V, Hasan Q. P2X7 gene polymorphisms and risk assessment for pulmonary tuberculosis in Asian Indians. *Dis Markers*. 2010;28(1):43-8.
22. Razmara M, Srinivasula SM, Wang L, Poyet JL, Geddes BJ, DiStefano PS, Bertin J, Alnemri ES. CARD-8 protein, a new CARD family member that regulates caspase-1 activation and apoptosis. *J Biol Chem*. 2002 Apr 19;277(16):13952-8.
23. Bouchier-Hayes L, Conroy H, Egan H, Adrain C, Creagh EM, MacFarlane M, Martin SJ. CARDINAL, a novel caspase recruitment domain protein, is an inhibitor

of multiple NF-kappa B activation pathways. *J Biol Chem.* 2001 Nov 23;276(47):44069-77

24. Pathan N, Marusawa H, Krajewska M, Matsuzawa S, Kim H, Okada K, Torii S, Kitada S, Krajewski S, Welsh K, Pio F, Godzik A, Reed JC. TUCAN, an antiapoptotic caspase-associated recruitment domain family protein overexpressed in cancer. *J Biol Chem.* 2001 Aug 24;276(34):32220-9.
25. Wellcome Trust Case Control Consortium. (2007). Genomewide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 447, 661–678.
26. Ko DC, Shukla KP, Fong C, Wasnick M, Brittnacher MJ, Wurfel MM, Holden TD, O'Keefe GE, Van Yserloo B, Akey JM, Miller SI. A genome-wide in vitro bacterial-infection screen reveals human variation in the host response associated with inflammatory disease. *Am J Hum Genet.* 2009 Aug;85(2):214-27.
27. Master SS, Rampini SK, Davis AS, Keller C, Ehlers S, Springer B, Timmins GS, Sander P, Deretic V. Mycobacterium tuberculosis prevents inflammasome activation. *Cell Host Microbe.* 2008 Apr 17;3(4):224-32.
28. Appay V, Sauce D. Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. *J Pathol.* 2008;214:231–241.

Table 1. Characteristic of patients and controls.

	HIV+TB+ (n=96)	HIV+ (n=192)	TB+ (n=96)	HC (n=150)
Sex, M/F	58/38	54/138	60/36	27/123
Age, mean (standard deviation)	37.30 (10.70)	36.39 (9.06)	27.79 (20.18)	33.47 (13.4)
Ethnicity, Caucasian/African	27/69	44/148	27/69	63/87
Tuberculosis, Pulmonar/Extra	64/32	-	59/37	-

Figure 1

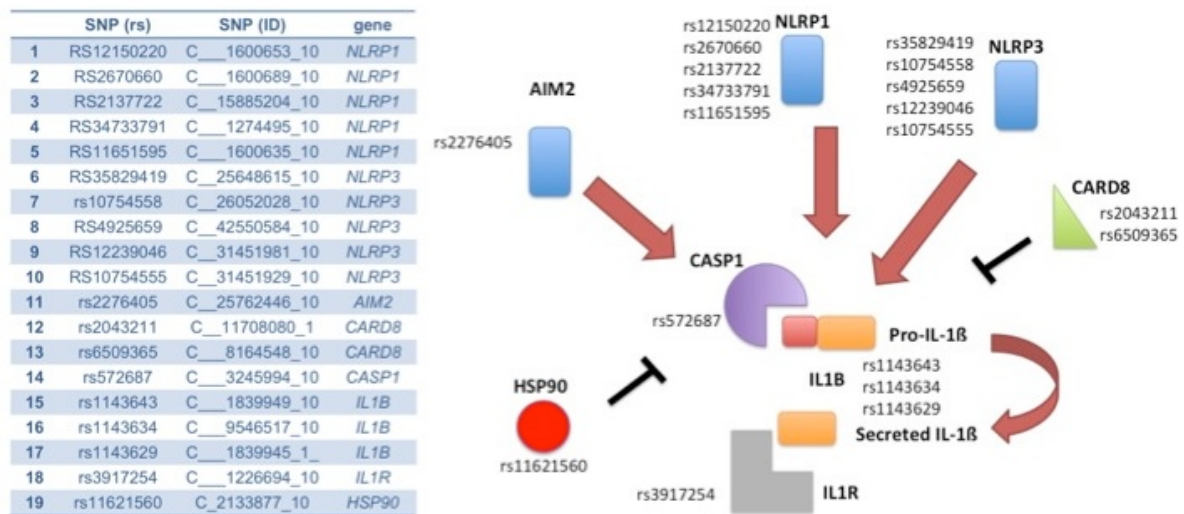
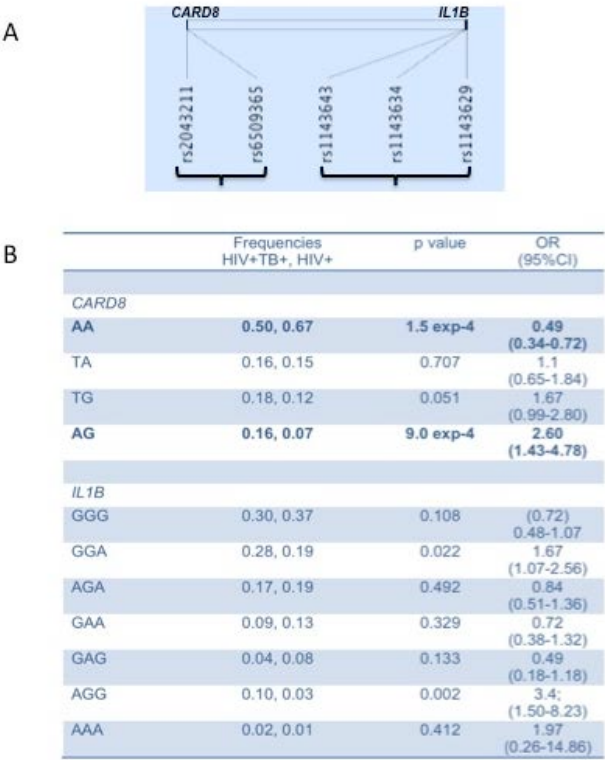


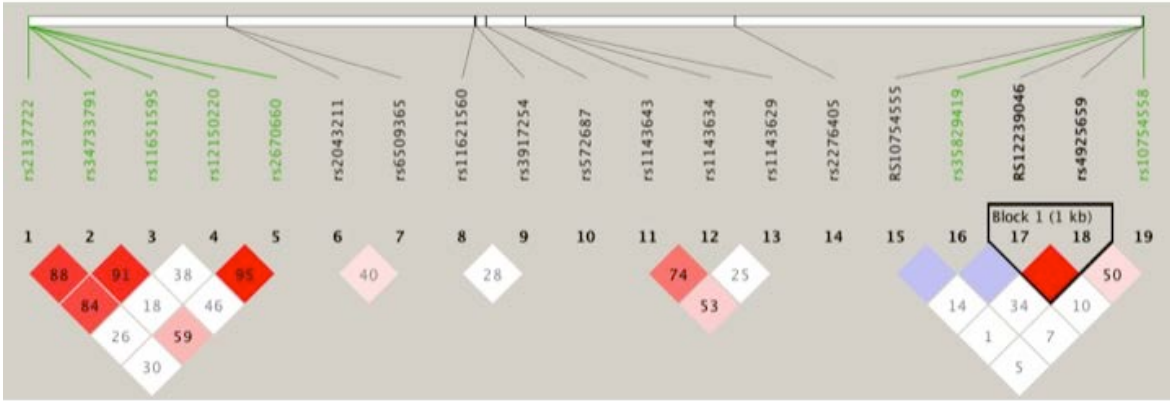
Table 2. Distribution of genotypes and results of the association study of the 4 genes significantly associate with the co-infection HIV+TB+ (UNADJ p < 0.05). Results were corrected for sex and ethnicity. Polymorphisms that continued to be associated after Bonferroni correction are reported in bold characters.

Gene	SNP (rs)	Genotypes	Genotype frequency HIV+TB+ (n=96)	Genotype frequency HIV+ (n=192)	p-value (model)	OR (95% CI)
NLRP3	rs10754558	G/G	0.20	0.08	0.031 (rec)	1.19 (0.80-1.79)
		C/G	0.38	0.48		
		C/C	0.42	0.44		
CARD8	rs2043211	T/T	0.07	0.06	0.026 (dom)	1.56 (0.99-2.47)
		A/T	0.55	0.42		
		A/A	0.38	0.52		
CARD8	rs6509365	G/G	0.12	0.03	5exp-5 (dom)	2.45 (1.56-3.84)
		A/G	0.45	0.28		
		A/A	0.43	0.69		
IL1B	rs1143634	A/A	0.04	0.03	0.002 (overdom)	0.51 (0.29-0.91)
		A/G	0.19	0.36		
		G/G	0.77	0.61		

Table 3



Supplementary File S1



<i>NLRP3</i>	Haplotypes	Haplotype frequency HIV+TB+ (n=96)	Haplotype frequency HIV+ (n=192)	p-value	OR (95% CI)
rs12239046-rs4925659	T-G	0.50	0.50	1	1 (0.70-1.44)
(D'=1; r ² =0.39)	C-A	0.22	0.30	0.02	0.62 (0.41-0.95)
	C-G	0.28	0.20	0.03	1.56 (1.02-2.37)

Supplementary File S2. Results of the association study in HIV+TB+ and HIV+ patients stratified for European (Eur) and African origin (Afr). Unadjusted p-values were reported according to different models of genotypes inheritance. Results were corrected for sex. Polymorphisms that continued to be associated after Bonferroni correction are reported in bold characters.

SNP (rs)	codominant		dominant		recessive		overdominant		log-additive	
	Eur	Afr	Eur	Afr	Eur	Afr	Eur	Afr	Eur	Afr
rs121522	0,132	0,616	0,045	0,342	0,437	0,585	0,101	0,536	0,055	0,333
rs26766	0,924	0,232	0,829	0,194	0,792	0,618	0,711	0,093	0,969	0,580
rs2137722	0,617	0,299	0,534		0,530		0,436		0,662	
rs34733791	0,555	0,744	0,448		0,536		0,361		0,573	
rs11651595	0,932	0,451	0,915		0,709		0,937		0,823	
rs35829419	0,182	0,093								
rs1754558	0,491	0,075	0,411	0,972	0,666	0,030	0,236	0,139	0,708	0,248
rs4925659	0,365	0,190	0,962	0,139	0,160	0,158	0,668	0,397	0,657	0,079
rs1223946	0,358	0,120	0,203	0,107	0,332	0,477	0,708	0,046	0,155	0,576
rs1754555	0,606	0,407	0,709	0,322	0,317	0,243	0,692	0,915	0,445	0,193
rs227645		0,959								
rs243211	excl	0,362	excl	0,159	excl	0,543	excl	0,280	excl	0,170
rs659365	0,037	4exp-4	0,274	9exp-5	0,011	0,246	0,965	6exp-4	0,074	4exp-4
rs572668	0,469	0,450	0,499	0,346	0,370	0,537	0,364	0,246	0,680	0,506
rs1143643	0,097	0,586	0,805	0,566	0,031	0,321	0,657	0,943	0,406	0,387
rs1143634	0,354	0,034	0,170	0,029	0,589	0,529	0,199	0,010	0,158	0,113
rs1143629	0,874	0,306	0,828	0,124	0,707	0,667	0,613	0,280	0,930	0,197
rs3917254	0,313	0,676	0,883	0,506	0,162	0,734	0,392	0,393	0,655	0,669
rs1162156	0,489	0,925	0,272	0,956	0,377	0,699	0,788	0,783	0,237	0,794

SNP: Single Nucleotide Polymorphim

Eur: individuals from European origin

Afr: individuals from African origin

excl: SNP out of Hardy-Weinberg equilibrium and excluded from the analysis

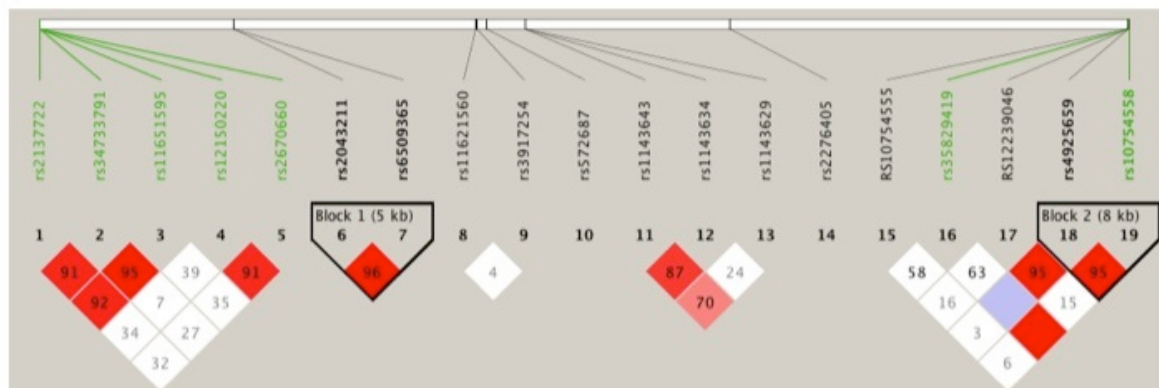
Supplementary File S3. Results of the association study in TB+ and HC individuals. Unadjusted p-values were reported according to different models of genotypes inheritance (p<0.05 were reported in Italic). Results in un-stratified groups (ALL) were corrected for sex and ethnicity. Results in groups stratified for European (EUR) and African origin (AFR) were corrected for sex. Polymorphisms that continued to be associated after Bonferroni correction are reported in bold characters.

SNP	codominant			dominant			recessive			over-dominant			log-additive		
	ALL	EUR	AFR	ALL	EUR	AFR	ALL	EUR	AFR	ALL	EUR	AFR	ALL	EUR	AFR
rs12150220	0,775	0,468	0,217	0,564	0,713	0,631	0,848	0,222	0,150	0,475	0,595	0,197	0,733	0,387	0,820
rs2670660	0,341	0,798	0,081	0,394	0,874	0,361	0,382	0,503	0,104	0,148	0,712	0,038	0,913	0,622	0,827
rs2137722	0,475	0,262	0,691	0,414		0,852	0,442		0,433	0,336		0,711	0,519		0,989
rs34733791	0,132	0,130	0,124	0,060	0,585	0,048	0,241	0,044	0,962	0,115	0,914	0,042	0,045	0,284	0,076
rs11651595	0,089	0,092	0,682	0,238	0,134	0,699	0,038	0,052	0,397	0,518	0,397	0,837	0,118	0,059	0,602
rs35829419	0,871	0,493	0,486												
rs10754558	excl	excl	excl	excl	excl	excl	excl	excl	excl	excl	excl	excl	excl	excl	excl
rs4925659	0,629	0,700	0,861	0,563	0,739	0,664	0,362	0,399	0,654	0,977	0,821	0,853	0,394	0,519	0,594
rs12239046	0,666	0,345	0,985	0,776	0,718	0,983	0,489	0,258	0,875	0,407	0,208	0,882	0,843	0,732	0,939
rs10754555	0,642	0,839	0,347	0,453	0,763	0,448	0,717	0,572	0,316	0,347	0,916	0,191	0,694	0,596	0,882
rs2276405	0,926	0,432	0,847												
rs2043211	0,153	0,746	0,085	0,176	0,759	0,060	0,090	0,548	0,101	0,594	0,559	0,295	0,074	0,975	0,028
rs6509365	0,037	0,349	0,021	0,025	0,943	0,006	0,061	0,157	0,171	0,287	0,531	0,080	0,010	0,529	0,008
rs5726680	0,132	0,574	0,258	0,085	0,353	0,171	0,212	0,560	0,268	0,133	0,403	0,245	0,064	0,326	0,136
rs1143643	0,757	0,335	0,926	0,488	0,308	0,905	0,973	0,519	0,695	0,467	0,143	0,916	0,611	0,667	0,791
rs1143634	0,519	0,573	0,772	0,674	0,433	0,964	0,270	0,418	0,477	0,812	0,534	0,889	0,565	0,375	0,962
rs1143629	0,343	0,148	0,428	0,155	0,319	0,320	0,920	0,206	0,277	0,264	0,054	0,968	0,345	0,936	0,194
rs3917254	0,666	0,939	0,628	0,600		0,452	0,401		0,421	0,843		0,704	0,460		0,355
rs11621560	0,935	0,574	0,987	0,714	0,395	0,882	0,902	0,435	0,986	0,813	0,838	0,883	0,747	0,292	0,927

Supplementary File S4. Results of Linkage Disequilibrium analysis in TB+ and HC

(A) and of the association study of the *CARD8* and *NLRP3* haplotypes blocks in TB+ and HC+ groups (UNADJ $p < 0.05$) (B).

A



B

	Haplotype	Haplotype frequency TB+	Haplotype frequency HC	p value	OR (95%CI)
<i>CARD8</i> (block 1)					
rs2043211-rs6509365	A-A	0.60	0.71	0.017	0.61 (0.40-0.93)
($D'=0.96$; $r^2=0.72$)	T-G	0.30	0.24	0.181	1.37 (0.87-2.15)
	A-G	0.09	0.04	0.037	2.36 (1.0-5.68)
<i>NLRP3</i> (block 2)					
rs4925659-rs10754558	G-G	0.37	0.41	0.483	0.86 (0.57-1.30)
($D'=0.95$; $r^2=0.30$)	A-C	0.28	0.35	0.145	0.73 (0.47-1.121)
	G-C	0.33	0.24	0.048	1.56 (1.0-2.43)

Supplementary File_S5. Results of the association study in TB+ and HIV+TB+ patients with pulmonary and extra-pulmonary form of disease. Unadjusted p-values were reported according to different models of genotypes inheritance (p<0.05 in *Italic* characters). Results were corrected for ethnicity and sex. Polymorphisms that continued to be associated after Bonferroni correction are reported in **bold characters. Polymorphisms out of Hardy-Weinberg equilibrium or with a genotyping rate <50% were excluded from the analysis.**

	codominant		dominant		recessive		overdominant		log-additive	
	TB+	HIV+TB+	TB+	HIV+TB+	TB+	HIV+TB+	TB+	HIV+TB+	TB+	HIV+TB+
rs12150220	excluded									
rs2670660		0.282		0.449		0.113		0.553		0.174
rs2137722		0.089	0.755							
rs34733791	0.400	0.535	0.774		0.176		0.903		0.549	
rs11651595	excluded									
rs35829419	0.606	0.237								
rs10754558	excl	0.222	excl	0.202	excl	0.114	excl	0.981	excl	0.092
rs4925659	0.254	0.275	0.115	0.298	0.954	0.172	0.105	0.472	0.203	0.208
rs12239046	excl	0.828	excl	0.539	excl	0.890	excl	0.700	excl	0.632
rs10754555	excluded									
rs2276405	0.264	0.172								
rs2043211	0.136	0.053	0.057	0.015	0.998	0.559	0.059	0.039	0.156	0.029
<i>rs6509365</i>	<i>0.025</i>	<i>0.014</i>	<i>0.009</i>	0.126	0.896	<i>0.004</i>	0.018	0.687	0.066	<i>0.012</i>
rs5726680	0.552	0.408		0.791		0.182		0.990		0.608
rs1143643	0.141	0.218	0.051	0.760	0.780	0.085	0.070	0.482	0.104	0.319
rs1143634	<i>0.008</i>	0.206		0.828		0.083		0.615		0.473
rs1143629	0.114	0.192	0.592	0.276	0.070	0.306	0.074	0.071	0.532	0.878
rs3917254	0.571	0.539	0.677	0.480	0.295	0.577	0.968	0.307	0.462	0.720
rs11621560	excl	0.267	excl	0.232	excl	0.577	excl	0.110	excl	0.668

6. Discussão geral

6.1 Capítulo I – Expressão de genes do inflamassoma em células dendríticas imaturas pulsadas com HIV-1

Inicialmente, o presente estudo contribuiu no desenvolvimento dos protocolos de produção do HIV-1 e expressão gênica do inflamassoma em DCs diferenciadas de monócitos imaturas e maduras. Embora o papel do inflamassoma em DCs na infecção pelo HIV-1 tenha sido associado ao *NLRP3* por Pontillo *et al.*(2012) o receptor AIM-2 ainda não foi estudado em DCs, e devido à limitada amostragem, os resultados necessitam ser melhor suportados para que possamos de fato evidenciar a importância da AIM-2. A confirmação da expressão diferencial do AIM2 com atividade inflamatória pelo estudo poderá ratificar o seu papel em mais um tipo de reconhecimento viral (Citomegalovírus e vaccínia vírus)(Iwasaki 2012), assim como representar a primeira evidência do AIM-2 na resposta ao HIV-1, o que não foi encontrado na investigação da ativação de caspase 1 em linfócitos abortivos por infecção ao HIV-1 em modelos linfóides (Doitsh *et al.*2010).

Embora os dados de expressão de nosso estudo tenha limitado poder estatístico, a continuidade do estudo com o aumento do número de replicatas biológicas, avaliação também em DCs maduras e de novos receptores descobertos do inflamassoma (*NLRP6*, *NLRP12* e *IFI16*)(Rathinam *et al.*2012), poderemos evidenciar de forma mais clara a atividade pró-inflamatória do inflamassoma em DCs.

6.2 Capítulo II – Caracterização imunogenética do inflamassoma na infecção pelo HIV-1

6.2.1 Polymorphisms in Inflammasome' Genes and Susceptibility to HIV-1 Infection

Os inflamassomas estão envolvidos no reconhecimento de diversos patógenos e no desencadeamento da resposta imune inata. Recentemente, estudos de associação com SNPs do *NLRP1* e *NLRP3* (Pontillo *et al.*2010), assim como em ensaios funcionais (Pontillo *et al.*2012c) têm indicado que o NLRP-3 juntamente com a IL-1 β estão envolvidos na infecção pelo HIV-1. O presente estudo visou aprofundar a questão através da avaliação de 12 SNPs em seis genes codificadores de componentes do inflamassoma (*NLRP1*, *NLRP3*, *NLRC4*, *CARD8*, *CASP1* e *IL1B*) na susceptibilidade à infecção pelo HIV-1 em uma população da região metropolitana de São Paulo.

Apesar do tamanho amostral limitado, foi evidenciado que entre os 12 SNPs estudados, o alelo G rs10754558 do gene *NLRP3* ($p=0.002$; O.R.= 0.61) e o alelo G rs1143634 do gene *IL1B* ($p=1.56 \times 10^{-9}$; O.R= 0.33) estão associados à maior proteção à infecção pelo HIV-1.

O alelo G rs10754558 do gene *NLRP3* foi apontado por métodos de predições computacionais (Hitomi *et al.*2009) como alelo que confere maior estabilidade da 3' UTR do mRNA, com potencial aumento da produção do receptor NLRP-3. A maior disponibilidade do receptor pode estar ligado a uma atividade de proteção inflamatória durante contenção da viremia nos momentos iniciais da infecção. Os resultados foram suportados pelo estudo de Pontillo *et al.*, (2010) no qual tanto o alelo G como o genótipo homozigoto G/G foram associados

à proteção à infecção pelo HIV-1 em três populações distintas (Recife e São Paulo no Brasil; e Trieste na Itália).

O polimorfismo rs1143634 do gene *IL1B* associado à proteção durante a infecção é um TagSNP sinônimo (F105F) com função ainda desconhecida. A associação encontrada enfatizaria a importância da influência genética na atividade pró-inflamatória mediada pela IL-1 β , que é bastante caracterizada durante a fase aguda da infecção pelo HIV-1 (Appay e Sauce, 2008).

O NLRP3-inflamassoma e a IL-1 β têm sido reportados como fatores essenciais na maturação e ativação de células dendríticas (Eisenbarth *et al.*, 2008; Kool *et al.*, 2008a; Martinon *et al.*, 2009), o que poderia auxiliar justamente no controle inicial da infecção nos sítios de entrada do vírus, como as mucosas. Pontillo *et al.* (2012) evidenciaram uma importante atividade pró-inflamatória da IL-1 β mediada por expressão do *NLRP3* em células dendríticas na fase inicial da infecção, no entanto sua ativação pelo HIV-1 se mostrou ineficiente em quadros de infecção crônica.

O presente estudo ratificou a importância do background genético dos genes *NLRP3* e *IL1B* na susceptibilidade à infecção pelo HIV-1. Desta forma, a contribuição das diferenças interindividuais na regulação do inflamassoma frente ao HIV-1 precisa ser melhor investigada em diferentes populações, assim como uma melhor caracterização do inflamassoma na contenção ou patogênese da infecção para que se possa esclarecer a sua influência no cenário multifatorial e complexo da infecção pelo HIV-1.

6.2.2 Susceptibility to *M tuberculosis* infection in HIV-positive patients is associated with *CARD8* genetic variant

A susceptibilidade à infecção pelo HIV-1 assim como no desenvolvimento de co-infecções entre os portadores é de caráter multifatorial com influência ambiental e de componente genético do hospedeiro. O desencadeamento do processo inflamatório e da atividade da imunidade inata têm sido reconhecidos como fatores essenciais na susceptibilidade e desenvolvimento da AIDS e da co-infecção da tuberculose (TB). Para compreender o papel de fatores genéticos do hospedeiro do HIV-1 na susceptibilidade à co-infecção pela TB, 19 polimorfismos de base única (SNPs) em oito genes codificantes de componentes do inflamassoma (*NLRP1*, *NLRP3*, *AIM2*, *CARD8*, *CASP1*, *IL1B*, *ILR1*, *HSP90*) foram avaliados pelo presente estudo.

O estudo evidenciou de forma inédita a associação do gene *CARD8* na susceptibilidade de portadores do HIV-1 à infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*. O alelo G rs6509365 do *CARD8* foi associado a um risco maior à co-infecção ($p=5 \times 10^{-5}$, O.R.=2.45) seguindo um modelo dominante, com um efeito de risco mais proeminente quando combinado ao alelo A rs2043211 do *CARD8* ($p=9.0 \times 10^{-4}$; O.R.=2.60). Embora o rs6509365 do *CARD8* tenha apresentado maior frequência entre TB+ ($p=0.010$), não foi encontrado nenhum polimorfismo associado a infecções exclusivas tanto pela tuberculose (TB+) como pelo HIV-1 (HIV+) após a correção de Bonferroni.

O papel do *CARD8* na regulação do inflamassoma ainda não está plenamente estabelecido, no entanto a sua atuação tem sido demonstrada na inibição da caspase 1 e da via NF- κ B, e na regulação da apoptose (Bouchier *et*

al., 2001, Pathan *et al.*, 2001, Razmara *et al.*, 2002). O papel do alelo G rs6509365 tem sido postulado como redutor da expressão gênica do *CARD8*, enquanto o rs2043211 (C10X) está associado à perda de função do gene, acarretando em uma exacerbada atividade da caspase 1, em casos de inflamações sistêmicas e auto-imunidade (Welcome Trust Case Control Consortium, 2007). O efeito de predisposição à co-infecção pelo *M. tuberculosis* associado ao alelo G rs6509365 e do haplótipo GA rs6509365/rs2043211 poderia ser explicado por uma maior ativação da morte de células do sistema imune mediada pela caspase 1, aumentando a susceptibilidade às infecções oportunistas.

O alelo G rs10754558 do gene *NLRP3* embora tenha sido encontrado com maior frequência nos controles ($p=0.004$), não apresentou associação no modelo recessivo à proteção ao HIV-1 após correção de Bonferroni, como foi evidenciado em estudos prévios (Pontillo *et al.*, 2010; Pontillo *et al.*, 2012a).

O alelo G rs6509365 do *CARD8* esteve associado ao desenvolvimento de TB extrapulmonar, assim como por polimorfismos no gene codificador do canal catiônico P2X7 (Fernando *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2002; Sambasivan *et al.*, 2010), que permite a ativação do inflamassoma regulando a entrada do ATP, ratificando a importância do inflamassoma na patogênese da TB. A contenção inicial deficiente por meio da apoptose de macrófagos pulmonares infectados pelo *M. tuberculosis*, poderia estar envolvido em maior risco de propagação extrapulmonar da infecção.

7. Conclusões gerais

Os estudos evidenciaram a importância de componentes funcionais e genéticos de um complexo inflamatório, o inflamassoma, relacionados a aspectos importantes da infecção pelo HIV-1, assim como no desenvolvimento da tuberculose em comorbidade, suportado por diversas evidências clínicas, genéticas e imunológicas levantadas por estudos na área avaliada.

Elucidar estas questões principalmente através de diferentes estratégias de investigação se faz necessário, seja funcionalmente por estudos em diferentes modelos celulares ou mesmo com réplicas em coortes bem definidas e com caracterização genéticas distintas. O aprofundamento destas questões poderá fornecer subsídios com alto valor prognóstico e no desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficientes.

8. Referências bibliográficas

- Appay V, Sauce D (2008) Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. *J Pathol* 214:231–241. doi: 10.1002/path.2276
- Buckwalter MR, Albert ML (2009) Orchestration of the immune response by dendritic cells. *Current biology* :CB19:R355–61. doi:10.1016/j.cub.2009.03.012
- Buisson S, Benlahrech A, Gazzard B, et al. (2009) Monocyte-derived dendritic cells from HIV type 1-infected individuals show reduced ability to stimulate T cells and have altered production of interleukin (IL)-12 and IL-10. *The Journal of infectious diseases* 199:1862–71. doi: 10.1086/599122
- Coakley E, Petropoulos CJ, Whitcomb JM (2005) Assessing chemokine co-receptor usage in HIV. *Current Opinion in Infectious Diseases* 18:
- Coleman CM, Wu L (2009) HIV interactions with monocytes and dendritic cells: viral latency and reservoirs. *Retrovirology* 6:51. doi: 1742-4690-6-51 [pii] 10.1186/1742-4690-6-51
- Doitsh G, Cavois M, Lassen KG, et al. (2010) Abortive HIV Infection Mediates CD4 T Cell Depletion and Inflammation in Human Lymphoid Tissue. *Cell* 143:789–801. doi: 10.1016/j.cell.2010.11.001
- Douek DC, Picker LJ, Koup RA (2003) T CELL DYNAMICS IN HIV-1 INFECTION*.
- Eisenbarth SC, Colegio OR, O'Connor W, et al. (2008) Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature* 453:1122–1126. doi: nature06939 [pii] 10.1038/nature06939
- Fernando SL, Saunders BM, Sluyter R, et al. (2007) A polymorphism in the P2X7 gene increases susceptibility to extrapulmonary tuberculosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 175:360–6. doi: 10.1164/rccm.200607-970OC
- Garzino-Demo A, Gallo RC (2003) HIV receptors on lymphocytes. *Current Opinion in Hematology* 10:279–283. doi: 10.1097/00062752-200307000-00005
- Gattorno M, Tassi S, Carta S, et al. (2007) 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* 56:3138–48. doi: 10.1002/art.22842
- Geijtenbeek TB, Kwon DS, Torensma R, et al. (2000) DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 100:587–97.
- Gringhuis SI, Van der Vlist M, Van den Berg LM, et al. (2010) HIV-1 exploits innate signaling by TLR8 and DC-SIGN for productive infection of dendritic cells. *Nature immunology* 11:419–26. doi: 10.1038/ni.1858
- Gross O, Thomas CJ, Guarda G, Tschoep J (2011) The inflammasome: an integrated view. *Immunological reviews* 243:136–51. doi: 10.1111/j.1600-065X.2011.01046.x
- Heil F, Hemmi H, Hochrein H, et al. (2004) Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science (New York, NY)* 303:1526–9. doi: 10.1126/science.1093620
- Hitomi Y, Ebisawa M, Tomikawa M, et al. (2009) Associations of functional NLRP3 polymorphisms with susceptibility to food-induced anaphylaxis and aspirin-induced asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* 124:779–85.e6. doi: 10.1016/j.jaci.2009.07.044

- Iwasaki A (2012) A Virological View of Innate Immune Recognition. *Annual Review of Microbiology* 66:177–196. doi: 10.1146/annurev-micro-092611-150203
- Iwasaki A, Medzhitov R (2010) Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* (New York, NY) 327:291–5. doi: 10.1126/science.1183021
- Kool M, Petrilli V, De Smedt T, et al. (2008a) Cutting edge: alum adjuvant stimulates inflammatory dendritic cells through activation of the NALP3 inflammasome. *J Immunol* 181:3755–3759. doi: 181/6/3755 [pii]
- Kool M, Soullié T, Van Nimwegen M, et al. (2008b) Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 205:869–82. doi: 10.1084/jem.20071087
- Lawn SD, Butera ST, Folks TM (2001) Contribution of immune activation to the pathogenesis and transmission of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clinical microbiology reviews* 14:753–77, table of contents. doi: 10.1128/CMR.14.4.753-777.2001
- Li CM, Campbell SJ, Kumararatne DS, et al. (2002) Association of a polymorphism in the P2X7 gene with tuberculosis in a Gambian population. *The Journal of infectious diseases* 186:1458–62. doi: 10.1086/344351
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods San Diego Calif* 25:402–408.
- Lu W, Arraes LC, Ferreira WT, Andrieu JM (2004) Therapeutic dendritic-cell vaccine for chronic HIV-1 infection. *Nat Med* 10:1359–1365. doi: nm1147 [pii] 10.1038/nm1147
- Manel N, Hogstad B, Wang Y, et al. (2010) A cryptic sensor for HIV-1 activates antiviral innate immunity in dendritic cells. *Nature* 467:214–7. doi: 10.1038/nature09337
- Martinon F, Mayor A, Tschopp J (2009) The inflammasomes: guardians of the body. *Annual review of immunology* 27:229–65. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132715
- Master SS, Rampini SK, Davis AS, et al. (2008) Mycobacterium tuberculosis prevents inflammasome activation. *Cell host & microbe* 3:224–32. doi: 10.1016/j.chom.2008.03.003
- McMichael AJ, Borrow P, Tomaras GD, et al. (2009) The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nature Reviews Immunology* 10:11–23. doi: 10.1038/nri2674
- Mogensen TH (2009) Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clinical microbiology reviews* 22:240–73, Table of Contents. doi: 10.1128/CMR.00046-08
- Mogensen TH, Melchjorsen J, Larsen CS, Paludan SR (2010) Innate immune recognition and activation during HIV infection. *Retrovirology* 7:54. doi: 1742-4690-7-54 [pii] 10.1186/1742-4690-7-54
- Moir S, Chun T-W, Fauci AS (2011) Pathogenic mechanisms of HIV disease. *Annual review of pathology* 6:223–48. doi: 10.1146/annurev-pathol-011110-130254
- Pontillo A, Brandao LA, Guimarães RL, et al. (2010) 3' UTR SNP in NLRP3 Gene is Associated With Susceptibility to HIV-1 Infection. *Infection* 54:236–240.
- Pontillo A, Oshiro TM, Girardelli M, et al. (2012a) Polymorphisms in inflammasome' genes and susceptibility to HIV-1 infection. *Journal of*

- acquired immune deficiency syndromes (1999) 59:121–5. doi: 10.1097/QAI.0b013e3182392ebe
- Pontillo A, Silva LT, Oshiro TM, et al. (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) 26:11–8. doi: 10.1097/QAD.0b013e32834d697f
- Pontillo A, Silva LT, Oshiro TM, et al. (2012c) HIV-1 induces NALP3-inflammasome expression and interleukin-1 β secretion in dendritic cells from healthy individuals but not from HIV-positive patients. *AIDS* 26:
- Rathinam V a K, Vanaja SK, Fitzgerald K a (2012) Regulation of inflammasome signaling. *Nature immunology* 13:333–2. doi: 10.1038/ni.2237
- Rossio JL, Esser MT, Suryanarayana K, et al. (1998) Inactivation of human immunodeficiency virus type 1 infectivity with preservation of conformational and functional integrity of virion surface proteins. *Journal of Virology* 72:7992–8001.
- Sabado RL, Babcock E, Kavanagh DG, et al. (2007) Pathways utilized by dendritic cells for binding, uptake, processing and presentation of antigens derived from HIV-1. *European journal of immunology* 37:1752–63. doi: 10.1002/eji.200636981
- Saiga H, Kitada S, Shimada Y, et al. (2012) Critical role of AIM2 in Mycobacterium tuberculosis infection. *International Immunology* . doi: 10.1093/intimm/dxs062
- Sambasivan V, Murthy KJR, Reddy R, et al. (2010) P2X7 gene polymorphisms and risk assessment for pulmonary tuberculosis in Asian Indians. *Disease Markers* 28:43–48. doi: 10.3233/DMA-2010-0682
- Schroder K, Tschopp J (2010) The inflammasomes. *Cell* 140:821–32. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.040
- Sérór C, Melki M-T, Subra F, et al. (2011) Extracellular ATP acts on P2Y2 purinergic receptors to facilitate HIV-1 infection. *The Journal of experimental medicine* 208:1823–34. doi: 10.1084/jem.20101805
- Steinman RM (2007) Dendritic cells: versatile controllers of the immune system. *Nat Med* 13:1155–1159.
- Stevenson M (2003) HIV-1 pathogenesis. *Nature medicine* 9:853–60. doi: 10.1038/nm0703-853
- Takeuchi O, Akira S (2009) Innate immunity to virus infection. *Immunological reviews* 227:75–86. doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00737.x
- Unterholzner L, Keating SE, Baran M, et al. (2010) IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. *Nature immunology* 11:997–1004. doi: 10.1038/ni.1932
- Wu L, KewalRamani VN (2006) Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nat Rev Immunol* 6:859–868. doi: nri1960 [pii] 10.1038/nri1960
- Yates A, Stark J, Klein N, et al. (2007) Understanding the slow depletion of memory CD4+ T cells in HIV infection. *PLoS medicine* 4:e177. doi: 10.1371/journal.pmed.0040177

9. Apêndices

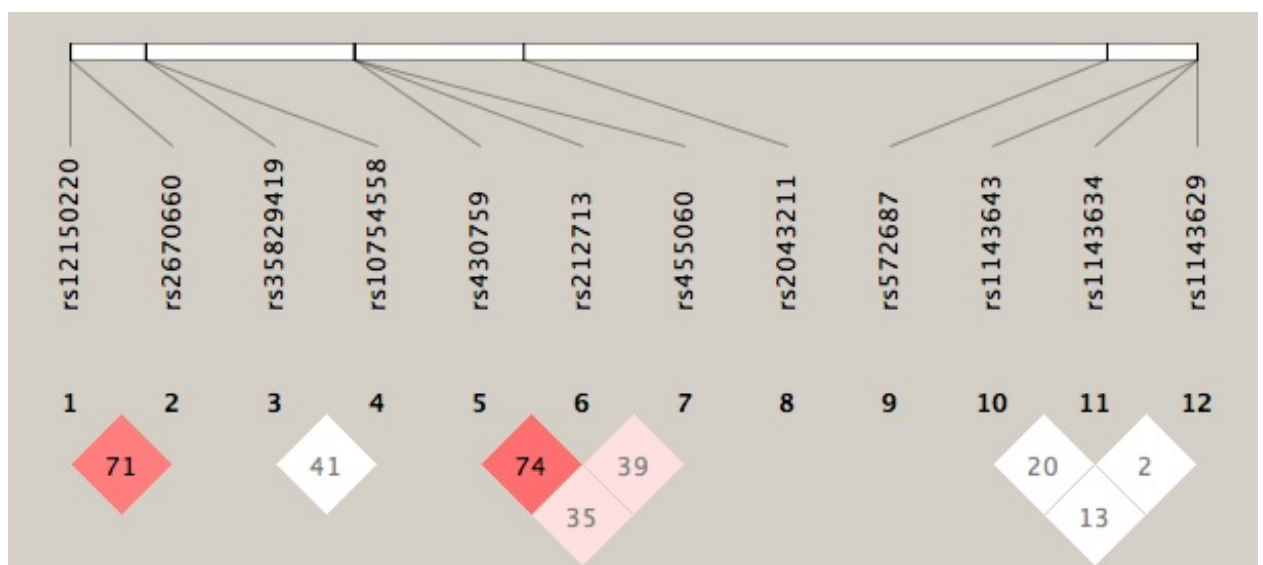
9.1 Dados suplementares - Capítulo II (Polymorphisms in Inflammasome' Genes and Susceptibility to HIV-1 Infection)

Supplemental Digital Content 1 - Table S1: Selected SNPs from public databases Genome Browser and HapMap. Gene name, identification codes (hCV and rs), type, and minor allele frequency (MAF) of each polymorphism in Afro American and Caucasian populations are reported.

Gene	SNP ID (hCV)	SNP ID (rs)	Type	African American MAF	Caucasian MAF
NALP1/NLRP1	hCV8718919	rs872569	Validated	37	17
	hCV1274517	rs11653832	Validated nsSNP	5	8
	hCV1274504	rs35596958	Validated nsSNP	6	8
	hCV1274432	rs2175827	Validated	47	49
	hCV1600657	rs884367	Validated	7	14
	hCV11678497	rs925598	Validated	11	47
	hCV1600653	rs12150220	Validated	1	45
	hCV1600689	rs2670660	Validated	-	-
NALP3/NLRP3	hCV26052028	rs10754558	Validated	23	35
	hCV25648615	rs35829419	Validated	3	15
	hCV27954088	rs4925648	Validated	9	10
	hCV26646000	rs12137901	Validated	41	23
	hCV26646008	rs4925650	Validated	11	42
	hCV31451929	rs10754555	Validated	44	37
	hCV26646014	rs3806268	Validated	1	45
	hCV26646027	rs10925019	Validated	6	12
	hCV31451953	rs4925654	Validated	29	21
	hCV26646029	rs4612666	Validated	40	22

	hCV30076082	rs10157379	Validated	34	35
	hCV26052034	rs12130711	Validated	24	37
	hCV26052032	rs12565738	Validated	35	12
	hCV30713882	rs10925027	Validated	48	43
	hCV30713873	rs10733112	Validated	32	50
IPAF/NLRC4	hCV3219258	rs430759	Validated	30	38
	hCV1029137	rs212713	Validated	45	45
	hCV2486339	rs455060	Validated	31	36
CARD8	hCV11708080	rs2043211	Validated nsSNP	22	34
CASP1	hCV3245994	rs572687	Validated	10	16
IL1B	hCV1839949	rs1143643	Validated	19	34
	hCV9546517	rs1143634	Validated	8	19
	hCV1839945	rs1143629	Validated	43	32

Supplemental Digital Content 2 – Figure S1



Supplemental Digital Content 3. Comparison between allelic frequencies in subjects of European or African origin. Fisher test was applied to obtain a p-value. Significant threshold corrected for Bonferroni is 0.0021.

SNP ID	Associated allele	Frequencies European-origin HIV+, HC	Frequencies African-origin HIV+, HC	p-value
rs12150220	A	0.632, 0.617	0.595, 0.574	0.075
rs2670660	G	0.500, 0.403	0.524, 0.456	0.067
rs35829419	C	0.988, 0.944	1.000, 0.985	0.011
rs10754558	C	0.628, 0.532	0.762, 0.500	0.340
rs430759	G	0.659, 0.637	0.762, 0.603	0.245
rs212713	T	0.566, 0.532	0.619, 0.485	0.254
rs455060	G	0.729, 0.698	0.667, 0.368	0.631
rs2043211	T	0.399, 0.323	0.381, 0.265	0.352
rs572687	G	0.818, 0.823	0.881, 0.838	0.052
rs1143643	T	0.453, 0.415	0.333, 0.368	0.146
rs1143634	A	0.442, 0.149	0.238, 0.338	0.898
rs1143629	G	0.434, 0.343	0.262, 0.279	0.208

9.2 Termo de consentimento livre e esclarecido (Capítulo I)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título: PAPEL DO INFLAMASSOMA NA RESPOSTA IMUNE AO HIV-1 E IMPLICAÇÕES PARA A VACINA TERAPÊUTICA COM CÉLULAS DENDRÍTICAS CONTRA O HIV-1

Pesquisador responsável: Dr. Sergio Crovella, Universidade Federal de Pernambuco

Unidade: Instituto de Medicina Integral de Pernambuco Professor Fernando Figueira

Endereço: Rua dos Coelhoos, nº 300, Boa Vista - Recife - PE - Brasil.

Você está sendo convidado(a) a participar de um estudo da análise da resposta imune (resposta do sistema de defesa) inata de portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV-1) na região metropolitana do Recife. Através deste documento, você será informado(a), em detalhes, sobre o estudo acima. Sua participação neste estudo é totalmente voluntária, e caso decida não participar após a leitura deste documento, não haverá nenhum prejuízo para o seu tratamento neste hospital. O seu anonimato será garantido de acordo com a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS), ou seja, a sua participação terá sigilo completo, através da identificação da sua amostra numerada por códigos e assim sua participação estará protegida de exposição.

Você foi selecionado(a) para participar deste estudo pois é portador da infecção pelo HIV-1, o qual o objetivo é avaliar o potencial de componentes da defesa para o desenvolvimento de uma terapia vacinal. Informamos que será aplicado um questionário e a coleta de cerca de 40 mL do seu sangue será realizada para a avaliação da resposta de células dendríticas (células de defesa) contra o HIV-1 pelo nosso estudo.

Caso decida participar, será solicitado a você que, ao final da leitura, assine no local indicado, para confirmar que recebeu todas as informações necessárias e que sua participação é voluntária.

Assinando abaixo, você concorda em seguir as instruções das pessoas que estão conduzindo este estudo, de forma a obter o máximo de benefícios da atenção médica oferecida por esta pesquisa.

Fui orientado quanto aos benefícios deste estudo, que visa aprofundar os conhecimentos quanto à resposta imune à infecção pelo HIV-1 nos indivíduos em nossa região e propor medidas para melhoria da qualidade de vida e assistência aos portadores da infecção. Fui informado que não receberei qualquer compensação financeira pela participação neste estudo e que posso recusar ou retirar o consentimento sem sofrer nenhum tipo de penalização ou pressão.

Data: ____/____/____

Nome do paciente: _____

Data de nascimento: ____/____/____

Endereço: _____

Fone: _____

Nome da testemunha: _____

Assinatura: _____

Nome do médico responsável: Edvaldo da Silva Souza

Contato: Celular: (81)99758035; Hospital- (81)3182-4660

Assinatura: _____

Instituto de Medicina Integral de Pernambuco Professor Fernando Figueira

Rua dos Coelho, 300 Boa Vista - Recife - PE - Brasil. CEP 50070-550.

9.3 Termo de consentimento livre e esclarecido (Capítulo II)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº:
SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE
CEP: TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **POSSÍVEL PAPEL DO INFLAMASOMA NA RESPOSTA IMUNE AO VIRUS HIV-1.**

2. **PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Prof. Dr Alberto José da Silva Duarte

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 16915

CARGO/FUNÇÃO: Responsável pelo LIM-56

UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de Dermatologia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

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

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 36 meses

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

1 – Justificativa e os objetivos da pesquisa. Nem todos os indivíduos expostos ao vírus HIV-1 tem a mesma resposta imune. A modulação da resposta de defesa (resposta imune) ao vírus HIV-1 pode ser influenciada por informações contidas nas células do paciente (características genéticas), fatores ambientais e subtipo de vírus.

Assim, é importante estudar de que modo as características genéticas do paciente influenciam a entrada do vírus nas células e assim a resposta imune de cada indivíduo, que é o objetivo deste trabalho.

2 –procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais. Neste trabalho, após avaliação clínica feita pelo médico, será coletado um volume de 40 mL de sangue que será levado para um laboratório, onde as células serão separadas para os testes. Após a separação as células entrarão em contato com o vírus HIV inativado. Será feita a análise de DNA e RNA destas células a análise das substâncias produzidas por estas células.

3 –procedimentos rotineiros e como são realizados. Coleta de sangue por punção periférica da veia do antebraço;

4 –desconfortos e riscos esperados. O maior desconforto será no momento da coleta do sangue, porém este procedimento não traz nenhum risco à saúde do paciente. Todos os materiais utilizados serão descartáveis.

5 – Benefícios para o participante. O voluntário não terá nenhum benefício adicional por participar deste protocolo, mas estará contribuindo enormemente para o estudo sobre o HIV.

6 –procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo. Não haverá procedimentos alternativos

7 – Garantia de acesso. Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr Alberto José da Silva Duarte. que pode ser encontrado no endereço Av. Dr. Arnaldo, 455 sala 2345. Telefone(s) 11 3061 7194

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: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

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

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

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

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

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

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo " POSSÍVEL PAPEL DO INFLAMASOMA NA RESPOSTA IMUNE AO VÍRUS HIV-1"

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

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

Assinatura da testemunha Data ____/____/____

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

(Somente para o responsável do projeto)

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

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____/____/____

JUSTIFICATIVA QUANTO A NECESSIDADE E OPORTUNIDADE PARA USOS FUTUROS.

SUBESTUDOS

Se você decidir participar de algum subestudo, será solicitada a sua assinatura em outro termo livre e esclarecido, específico para o subestudo. Você não é obrigado a participar de um subestudo para poder participar do estudo principal. Você pode posteriormente resolver sair de qualquer subestudo em que estiver participando e permanecer no estudo principal, sem que isto afete o seu tratamento médico ou acarrete qualquer penalidade.

AUTORIZAÇÃO PARA ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS

Por favor, leia cuidadosamente as declarações abaixo e pense sobre a sua escolha.

A permissão para que amostras do seu sangue sejam guardadas é voluntária. Você pode decidir por não ter amostras armazenadas e ainda assim participar deste estudo ou de outro estudo, futuramente.

Se você decidir agora que suas amostras podem ser armazenadas para estudos futuros, você poderá mudar de opinião a qualquer tempo. Você deverá entrar em contato com seu médico do estudo ou enfermeira e informá-los que você não quer que suas amostras sejam mais usadas para futuros estudos. Suas amostras não serão mais utilizadas.

Suas amostras de sangue somente serão usadas em estudos aprovados pelos órgãos regulatórios apropriados, incluindo o Comitê de Ética em Pesquisa e o Comitê Nacional de Ética em Pesquisa, e após você ter assinado um outro termo de consentimento livre e esclarecido autorizando o seu uso.

Após ler e entender as condições descritas acima, Eu concordo que meu sangue colhido com o propósito deste projeto será armazenado e utilizado para futuras pesquisas relacionadas ao estudo das características genéticas que podem influenciar a resposta imune de cada indivíduo.

____ SIM or ____ NÃO

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

Assinatura da testemunha Data ____ / ____ / ____

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

(Somente para o responsável do projeto)

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

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____ / ____ / ____

9.4 Termo de consentimento livre e esclarecido (Capítulo II)

PACIENTE: _____	IDADE: _____
HOSPITAL: _____	Prontuário: _____
ENDEREÇO DO PACIENTE: _____	Nº: _____
BAIRRO: _____	CIDADE: _____ ESTADO: _____

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

INDIVÍDUO SAUDÁVEL

O Sr(a) está sendo convidado(a) a participar como voluntário(a) do grupo controle negativo da pesquisa: **“Variantes dos genes TLR4 e MBL2 na susceptibilidade a tuberculose em pacientes infectados com HIV em Pernambuco”**. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizado (a) de forma alguma.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

TÍTULO DO PROJETO DE PESQUISA: Associação de Polimorfismos de Base Única (SNPs) nos genes TLR4 e MBL2 na susceptibilidade a tuberculose em pacientes infectados com HIV em Pernambuco.

Pesquisador (a) Responsável: Márcia Schneider Zuzarte de Mendonça Gomes de Carvalho

Endereço: Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, Laboratório de Imunoepidemiologia, Departamento de Imunologia, Avenida Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária. Campus da UFPE.

Telefones para contato: (81) 2101-2560 ou 2101-2569

Pesquisadores Participantes: Dr. Sérgio Crovella, Dra Haiana Charifker Schindler, Lilian Montenegro.

Objetivos: Avaliar a associação dos polimorfismos dos genes da proteína ligadora da manose (*MBL2*) e do receptor Toll like (TLR4) na susceptibilidade a tuberculose em pacientes infectados com HIV.

Procedimentos do estudo: Quando o Sr(a) for atendido pelo médico(a) assistente do hospital, você responderá a um questionário onde irão constar: nome, endereço, telefone para contato, característica do domicílio, escolaridade, queixas principais e tempo de duração, se está tomando algum remédio, exames físico, laboratoriais e tratamento atual. O preenchimento do questionário será feito por um dos colaboradores da pesquisa.

Para a nossa pesquisa coletaremos 4ml de sangue que será encaminhado ao laboratório de Imunoepidemiologia do departamento de Imunologia do CPqAM para ser submetida a técnica de PCR por profissionais capacitados. As amostras serão congeladas e armazenadas para uso futuro caso seja necessário.

Riscos e Benefícios: O Sr(a) não será submetido a qualquer risco a não ser ao desconforto da picada na altura da coleta. Seguiremos a rotina estabelecida pelo profissional de saúde, seja a nível ambulatorial ou enfermaria. O benefício para o(a) Sr(a) será a possibilidade de um melhor tratamento e cura mais rápida da tuberculose com um possível diagnóstico pela técnica de PCR ajudando deste modo no desenvolvimento de técnicas mais sensíveis e rápidas que possam ser implantadas à realidade do nosso sistema de Saúde.

Custo/Reembolso para o paciente: Não haverá nenhum gasto com sua participação. As consultas, exames, tratamentos serão totalmente gratuitos, não recebendo nenhuma cobrança com o que será realizado. Você também não receberá nenhum pagamento com a sua participação.

Banco de Amostras: Serão guardadas no laboratório de imunoepidemiologia do CPqAM as amostras do sangue coletado para que possamos repetir o exame de PCR, caso seja necessário. O Sr (a) poderá entrar em contato com o responsável pela amostra no endereço abaixo:

Contato pesquisador: Márcia Schneider Zuzarte de Mendonça Gomes de Carvalho

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ

Laboratório de Imunoepidemiologia, Departamento de Imunologia

Avenida Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária.

Campus da UFPE.

Fone: (81) 2101-2569

Comitê de Ética em Pesquisas

Avenida da Engenharia, s/n - 1º Andar, Cidade Universitária, Recife-PE

CEP:50740-600

Campus da UFPE.

Fone: (81) 2126-8588

CONSENTIMENTO

Eu, _____,

RG/CPF _____ declaro que entendi os objetivos da pesquisa e sem ter sido pressionado ou constrangido concordo participar da pesquisa. Tenho consciência do meu direito de abandonar a pesquisa a qualquer momento e de que as informações colhidas serão mantidas em sigilo. Os resultados da pesquisa podem ser apresentados em congressos ou publicados em revistas de cunho técnico, sem que seja divulgado o nome do paciente.

Endereço do Paciente: _____

Telefone: _____

Assinatura do voluntário

Assinatura do médico/pesquisador

Assinatura da 1ª testemunha

Assinatura da 2ª testemunha

_____, ____/____/____.

10. Anexos

10.1 Aprovação do CEP- IMIP (Capítulo I)

Instituto de Medicina Integral
Prof. Fernando Figueira
Escola de Pós-graduação em Saúde Materno Infantil
Instituição Civil Filantrópica



DECLARAÇÃO

Declaro que o projeto de pesquisa nº 2274 – 11 intitulado “**Papel do Inflassoma na Resposta Imune ao HIV - 1 e Implicações para a Vacina Terapêutica com Células Dendríticas contra o HIV - 1**”. Apresentado pelo (a) pesquisador (a) **Anselmo Jiro Kamada** foi **APROVADO** pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira – IMIP, em reunião ordinária de 20 de Julho de 2011.

Recife, 21 de Julho de 2011


Dr. José Eulálio Cabral Filho
Coordenador do Comitê de Ética
em Pesquisa em Seres Humanos do
Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP)

UTILIDADE PÚBLICA MUNICIPAL - Lei. 9851 de 08/11/67
UTILIDADE PÚBLICA ESTADUAL - Lei. 5013 de 14/05/64
UTILIDADE PÚBLICA FEDERAL - Dec. 86238 de 30/07/81
INSCRIÇÃO MUNICIPAL: 05.897-1
INSCRIÇÃO ESTADUAL - Isento
CNPJ: 10.988.301/0001-29

Rua dos Coelho, 300 Boa Vista
Recife - PE - Brasil - CEP: 50.070-550
PABX: (81) 2122.4100
Fax: (81) 2122.4722 Cx. Postal 1393
e-mail: imip@imip.org.br
www.imip.org.br

10.2 Aprovação do CEP- HEMOPE (Capítulo I)

	COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA Rua. Joaquim Nabuco, 171- Graças Recife-PE. CEP: 52011.000 Tel.: 81- 3182-4771 Fax: 81- 3182-4660 E-mail: cep.hemope@gmail.com	 Governo do Estado de PE Secretaria de Saúde do Estado de PE
---	--	---

PARECER FINAL : Nº. 12/2012

1 - DADOS SOBRE O PROJETO

Título do Projeto: Papel do Inflamassoma Na Resposta Imune ao HIV-1 e Implicações Para a Vacina Terapêutica com Células Dendríticas Contra o HIV-1 .

Instituição Solicitante: Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco-HEMOPE.

Pesquisador: Anselmo Jiro Kamada

CPF: 068.093.554-13 **Telefone:** 81 – 21268586

Endereço: R. João Francisco Lisboa nº. 121 , BLOCO 13, Aptº 304 Várzea Recife

Orientador: Sergio Crovella

Local de Desenvolvimento do Projeto: Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira – IMIP.

2 - COMENTÁRIOS DOS RELATORES:

Objetivo Geral: Estudar o Papel das Proteínas NALPs e do Inflamossoma Resposta Imune Contra o Vírus HIV.

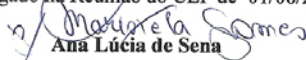
Objetivos Específicos: O papel da imunidade inata e em particular do inflamassoma resposta do pacientes ao vírus HIV + será avaliado tanto como perfil genômico dos genes do inflamossoma quanto como perfil de expressão destes genes.

3 - PARECER DO RELATOR: O Comitê de Ética em Pesquisa do Hemope (CEP), em cumprimento aos dispositivos da Resolução 196/96 e complementares, após acatar as considerações do relator, membro deste Comitê, relativamente às exigências apontadas no **Parecer nº. 12/2012**, considera **APROVADO** o protocolo de pesquisa supracitado, uma vez que este não colide, aparentemente com os princípios básicos da bioética – a não maleficência, a beneficência, a autonomia e a justiça, além do sigilo.

4 - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES:

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem prejuízo ao seu cuidado (Res. 196/96 – Item IV.1.f), devendo receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, por ele assinado (Item IV.2.d).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após serem analisadas as razões da descontinuidade, pelo CEP, que o aprovou (Res. CND Item III. 1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou, quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3).
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave, ocorrido – mesmo que tenha sido em outro centro e enviar notificação ao CEP e ANVISA, junto com o seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-los também à ANVISA, junto com o parecer aprovatório³⁴ do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97. Item III.2.e).
- **Relatórios parcial e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.**

Homologado na Reunião do CEP de 01/08/2012


Ana Lúcia de Sena
Coordenadora

Comitê de Ética em Pesquisa -HEMOPE

10.3 Aprovação do CEP- HC - FMUSP (Capítulo II)



APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 04/11/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0791/09**, intitulado: "**POSSÍVEL PAPEL DO INFLAMASOMA NA RESPOSTA IMUNE AO VIRUS HIV-1**", apresentado pelo Departamento de **DERMATOLOGIA**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **PROF. DR. ALBERTO JOSÉ DA SILVA DUARTE**

CAPPesq, 06 de Novembro de 2009

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br
matc

11. Currículo Lattes atualizado

Anselmo Jiro Kamada

Dados pessoais

Nome Anselmo Jiro Kamada
Filiação Antonio Shoji Kamada e Hiroko Mimuro Kamada
Nascimento 25/08/1986 - Kumamoto/ - Japão
Carteira de Identidade 6290707 SDS - PE - 23/07/2004
CPF 068.093.554-13

Formação acadêmica/titulação

- 2011** Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Genética.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: "Caracterização funcional e imunogenética do inflamassoma na infecção pelo HIV-1"
Orientador: Sergio Crovella
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco
- 2007 - 2010** Graduação em Ciências Biológicas.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Polimorfismos genéticos da β -Defensina 1 e do receptor NALP 3 na susceptibilidade à infecção pelo vírus T-linfotrópico humano tipo 1 (HTLV-I)
Orientador: Sergio Crovella
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco
-

Áreas de atuação

1. Genética
 2. Genética Humana e Médica
 3. Imunogenética
 4. Imunologia Celular
 5. Biologia Molecular
-

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. Pontillo, Alessandra, Girardelli, Martina, **Kamada, Anselmo J.**, Pancotto, Joao At, Donadi, Eduardo A., Crovella, S, Sandrin-Garcia, Paula
Polymorphisms in inflammasome genes are involved in the predisposition to systemic lupus erythematosus. Autoimmunity (Amsterdam. Print).v.1, p.1-1, 2012.

2. Pontillo, Alessandra, Oshiro, Telma M., Girardelli, Martina, **Kamada, Anselmo J.**, Crovella, Sergio, Duarte, Alberto J. S.

Polymorphisms in Inflammasome¿ Genes and Susceptibility to HIV-1 Infection. Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999). , v.59, p.121 - 125, 2012.

3. Schreiber, R., Campos-Coelho, A. V., Brandão, L., Guimarães, R. L., **Kamada, A. J.**, Ferreira-Sae, M. C., Matos-Souza, J. R., Cipolli, J. A., de Lima-Filho, J. L., CROVELLA, S., Nadruz, W.

Mannose-binding lectin (MBL2) polymorphisms and inflammation in hypertensive patients. International Journal of Immunogenetics (Print). , v.38, p.525 - 527, 2011.

Artigos aceitos para publicação

1. Alessandra Pontillo; Marcia Schneider Carvalho; **Anselmo Jiro Kamada**; Ronald Moura; Haiana Charifker Schindler; Alberto José da Silva Duarte, .Sergio Crovella. Susceptibility to M tuberculosis infection in HIV-positive patients is associated with CARD8 genetic variant. Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999).

Apresentação de trabalho

1. KAMADA, A.J., CAMPOS, A.V., BRANDAO, L.A.C., GUIMARAES, R.L., LOUREIRO, P, CROVELLA, S.

ARE IL18 GENETIC POLYMORPHISMS INVOLVED IN SUSCEPTIBILITY TO HTLV-I INFECTION?, 2011. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

2. PONTILLO, A., OSHIRO, T., GIRARDELLI, M., **KAMADA, A. J.**, CROVELLA, S., DUARTE, A.J.S.

POLYMORPHISMS IN INFLAMMASOME GENES AND SUSCEPTIBILITY TO HIV-1 INFECTION, 2011. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

3. PONTILLO, A., GIRARDELLI, M., **KAMADA, A. J.**, PANCOTTO, J.A.T., DONADI, E.A., CROVELLA, S., SANDRIN-GARCIA, P.

POLYMORPHISMS IN INFLAMMASOME GENES INVOLVED IN PREDISPOSITION TO SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS, 2011. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Poster **XXXVI BRAZILIAN CONGRESS OF IMMUNOLOGY**, 2011. (Congresso) **POLYMORPHISMS IN INFLAMMASOME GENES AND SUSCEPTIBILITY TO HIV-1 INFECTION**.

2. **VI Curso Avançado de Patogênese do HIV**, 2011. (Outra)

3. **II Simpósio em Citometria de Fluxo**, 2011. (Simpósio)