Edione Cristina dos Reis

Caracterização genética e funcional de células dendríticas de indivíduos HIV+ estimuladas com flagelina

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

**São Paulo
2019**

Edione Cristina dos Reis

Caracterização genética e funcional de células dendríticas de indivíduos HIV+ estimuladas com flagelina

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

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Alessandra Pontillo

Versão corrigida.

**São Paulo
2019**

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

DOS REIS, EDIONE CRISTINA

Caracterização genética e funcional de células
dendríticas de indivíduos HIV+ estimuladas com
flagelina / EDIONE CRISTINA DOS REIS; orientadora
Alessandra Pontillo. -- São Paulo, 2019.

151 p.

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

1. HIV. 2. Células dendríticas. 3. Inflamassoma.
4. Flagelina. I. Pontillo, Alessandra, orientador.
II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Edione Cristina dos Reis

Titulo da Dissertação/Tese: Caracterização genética e funcional de células dendríticas de indivíduos HIV+ estimuladas com flagelina

Orientador: Alessandra Pontillo

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

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

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

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

São Paulo, 11 de dezembro de 2015.

PARECER 1263/CEPSH

CAAE: 50072315.7.0000.5467

A Comissão de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do ICB, nesta data, **APROVOU** o projeto intitulado: "*Caracterização genética e funcional de células dendríticas de pacientes HIV+ estimuladas com flagelina*" da pesquisadora Profª. Dra. **Alessandra Pontillo**.

Cabe à pesquisadora elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais e final) de acordo com a Resolução nº 466/12, item II, II.19 e II.20, do Conselho Nacional de Saúde, conforme modelo constante no site: www.icb.usp.br.

À pesquisadora cabe também finalizar o processo junto à Plataforma Brasil quando do encerramento deste.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **11.12.2016**, bem como anexado uma cópia à Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

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

*Dedico este trabalho a todos os participantes da pesquisa
À minha família, marido e amigos... Aos que me
mostram, com o brilho de olhares otimistas, que tudo está
bem... Aos que me apertam forte com os braços (ou
patinhas), me dando forças pra continuar... Aos que
me presenteiam com boa companhia e café e, com
sorrisos singelos, "saboreiam" a vida comigo... Aos
que ouvem meus anseios de coração aberto, ou me
fazem /fizeram ouvir palavras serenas... Enfim, a
todos aqueles que tocam minha alma e me inspiram...*

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro e fundamental pelo número de processo 2015/17373-0.

Àquela cuja participação nessa tese e na minha formação foi de fundamental importância nesses últimos 6 anos, minha orientadora Alessandra. Por me dar a oportunidade de aprender muito mais do que ciência! Você foi minha grande parceira nessa jornada!

À equipe do SEAP, especialmente ao Dr. Aluísio Augusto Cotrim Segurado, Dra. Amanda Nazareth por viabilizarem a pesquisa nesse local e aos nossos colaboradores que nos ajudaram diretamente com os agendamentos, abordagens, coletas e prontuários, em especial Camila Picone, Marisa, Ana Paula, Magali, Sandra, Nicole, Valéria, Creuza, Washington.

Ao laboratório de Imunogenética (Dhêmerson, Fernanda, Iohanã, Jaíne, Vinícius, - carinhosamente chamados de “Mizerávis”) pela irmandade, paciência, colaboração e convivência agradável. Estar diariamente com vocês me deu alegria e força para continuar.

Foi importante rir com suas diversas “personalidades”, admirar seu esforço e dedicação durante o doutorado, Dhêmerson.

Fê, você sempre esteve disposta a ajudar sem pedir nada em troca. Seu lado prático, focado, humano e determinado me inspirou muito.

Foi essencial ter apoio moral e animação, Jaíne. Com certeza você me ensinou muito sobre sororidade, sobre lutar como uma leoa e sobre amizade.

Foi importante também tentar passar um pouco do que sabia para quem tem um longo caminho a trilhar e recordar de como a ciência é empolgante e inspiradora- Iohanã.

Foi importante ter um parceiro no “team HIV”, companheiro de tantas lutas diárias na coleta, ao estarmos mais próximos dos pacientes e de toda bagagem de vida que eles nos trouxeram. E não poderia faltar seu lado baiano e cheio de beleza tropical, Vinícius.

Ao fim do doutorado só tenho certeza de que as pessoas certas apareceram em meu caminho para me ensinar.

À equipe técnica do departamento de Imunologia, em especial as técnicas Marlise, Áurea, Sandra, Meire e Raquel pelos incontáveis auxílios. Ao pessoal da portaria e as meninas da limpeza Neide e Salete que tanto riram com a gente.

Aos secretários que se empenharam em ajudar e facilitaram minha vida acadêmica, em especial Eni e João.

Aos professores do departamento, em especial ao professor Anderson por ceder o uso de equipamentos essenciais para meus experimentos; à professora. Bruna Alencar por contribuir

cientificamente, com reagentes, técnicas e equipamentos e à professora Lourdes por ceder espaço no freezer -80°C. Ao técnico Alexsander, Eliana Faquim e Priscila Ranéia do Butantan pelo auxílio na leitura da imunofluorescência.

Aos companheiros de departamento, especialmente Tais, Letícia, Thiago Patente e Flávio.

À Mari e Tércio pela contribuição científica e exemplo de casal. À Elaine Uehara, uma pessoa supercompetente, que transborda empatia e está sempre disposta a ajudar.

À Dra Telma Oshiro e seu grupo (Bruna, Nathália) por colocar à disposição reagentes, orientar experimentos e dividir comigo momentos de aprendizado e conhecimento e, acima de tudo, amizade.

Aos membros da banca de qualificação Paula Rigato, Sílvia Boscardin e Karina Bortoluci, pela contribuição neste trabalho.

À CAPES pelo apoio institucional e financeiro do laboratório de Imunogenética e departamento de Imunologia.

À minha amiga e colaboradora Alana Dias por ser um ombro amigo na vida pessoal e acadêmica. Às minhas amigas Aday e Ana Paula por serem meu porto seguro!

Aos meus pais por serem minha base, essência e maiores professores da vida, me passando desde cedo o que é determinação, responsabilidade e compromisso. Por me darem força para seguir mesmo quando o mundo parecia não dar valor ao que fazia. Por guiarem meus esforços ao refletirem em seus olhos o orgulho que sentem de mim.

Aos meus irmãos Éverton e Felipe por serem minha referência de inteligência e resiliência.

Àquele que no decorrer dos últimos 4 anos se fez presente ao ouvir meus lamentos e desabafos, ao me instigar, dar apoio e, acima de tudo, muito amor. Você é meu admirador incondicional, meu melhor amigo, meu companheiro de todas as aventuras e maior incentivador. Adan, te amo!

Aos meus sogros Celina e Miguel, que sempre se encantaram por minhas conquistas e acreditaram na minha capacidade.

In memoriam à minha vó Áurea que foi fortaleza, inspiração e sempre torceu por minhas conquistas. *In memoriam* à minha vó de coração, Dona Wanda que nos últimos anos sempre acompanhou meus desdobramentos e apoiou minhas lutas.

Aos meus anjos de patas Barney, Marshall e Ted por me darem apoio, alegria e esperança (e um pouquinho de bagunça) quando mais precisava.

Aos personagens do dia a dia que ainda se admiram com a pesquisa.

Enfim, a todos que me ajudaram diretamente e indiretamente nessa etapa, o meu agradecimento!

"E o amor?" Era assim que a minha avó gostava de começar uma conversa comigo. Gostava de perguntar como o Adan estava, por que ele não tinha conseguido ir pra Minas comigo. Nos últimos anos foi assim que nossas conversas começaram. E posso dizer que nossas conversas sempre terminavam com um "fica com Deus, minha filha" e um "fica com Deus também, Vó". Então, que continuemos assim... E o amor? Ele segue comigo para sempre, Vó. E "fica com Deus" a senhora também.

Trabalho realizado no laboratório de Imunogenética do Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, sob orientação da Professora Alessandra Pontillo. Projeto financiado pela CAPES e FAPESP e realizado com bolsa de doutorado FAPESP, nº 2015/17373-0.

RESUMO

REIS, E. C. **Caracterização genética e funcional de células dendríticas de indivíduos HIV-1 estimuladas com flagelina.** 2019. 151 f. Tese (Doutorado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

O inflamassoma NLRP3 desempenha um papel fundamental na ativação de células dendríticas (DC) em resposta a adjuvantes vacinais, no entanto, anteriormente foi demonstrado que não é adequadamente ativado em DC de indivíduos infectados pelo HIV (HIV-DC), explicando, pelo menos em parte, a fraca resposta à imunização desses indivíduos. Levando em conta que vários receptores citoplasmáticos são capazes de ativar o inflamassoma, e que os componentes bacterianos são considerados eficientes adjuvantes, postulamos que a flagelina bacteriana (FLG), um ligante natural do inflamassoma NAIP/NLRC4, poderia resgatar a ativação do complexo em HIV-DC. O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade da FLG em ativar adequadamente DC, principalmente HIV-DC, através da estimulação do inflamassoma. Para isso, doadores saudáveis (HD) e indivíduos infectados pelo HIV foram recrutados para isolamento de monócitos do sangue periférico e obtenção de DC. A ativação de DC pela FLG foi avaliada pelo perfil fenotípico, secreção de citocinas e capacidade de estimular a proliferação de linfócitos T CD4⁺ e a produção de IFN- γ . A clivagem da caspase-1, a expressão gênica, a formação de “specks” NLRP3 e NLRC4 foram analisadas para verificar a ativação do inflamassoma. A FLG ativou adequadamente HD-DC e HIV-DC, e foi capaz de estimular a ativação do inflamassoma em células de ambos os grupos. De fato, FLG induziu uma maior produção de IL-1 β em HIV-DC em comparação com LPS. Curiosamente, enquanto que em HD-DC a FLG ativou specks de NLRC4 e NLRP3, em HIV-DC specks de NLRP3 resultaram significativamente reduzidos. Além disso, NLRC4 e NLRP3 parecem estar colocalizados no complexo. Em conclusão, a FLG ultrapassa o defeito NLRP3-inflamassoma em HIV-DC, através da ativação de NAIP / NLRC4, indicando um possível uso futuro do componente bacteriano como um eficiente adjuvante para indivíduos imunocomprometidos

Palavras-chave; HIV-1. Células dendríticas. Inflamassoma. Flagelina.

ABSTRACT

REIS, E. C. **Functional and genetic characterization of dendritic cells from HIV-1 patients stimulated with flagellin**. 2019. 151 p. Thesis (Immunology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

NLRP3 inflammasome plays a key role in dendritic cells (DC) activation in response to vaccine adjuvants, however we previously showed that it is not properly activated in DC of HIV+ patients (HIV-DC), explaining, at least in part, the poor response to immunization of these patients. Taking in account that several cytoplasmic receptors are able to activate inflammasome, and that bacterial components are considered as a novel and efficient adjuvant, we postulated that bacterial flagellin (FLG), a natural ligand of NAIP/NLRC4 inflammasome, could rescue the activation of the complex in HIV-DC. The aim of this work was evaluate the capacity of FLG to properly activate DC, especially HIV-DC, through the stimulation of inflammasome. For this, healthy donors (HD) and HIV+ patients were recruited for peripheral blood monocytes isolation and DC obtainment. DC activation by FLG was evaluated by the meaning of phenotypic profile, cytokines secretion and ability to stimulate CD4+ T lymphocytes proliferation and IFN- γ production. Caspase-1 cleavage, genes expression, NLRP3 and NLRC4 “specks” formation were analysed to verify inflammasome activation. FLG properly activated HD-DC and HIV-DC, and it was able to stimulate inflammasome activation in both types of cells. Of note FLG induced a higher IL-1 β production in HIV-DC compared to LPS. Interestingly, while in HD-DC FLG activated both NLRC4 and NLRP3 specks, in HIV-DC NLRP3 specks resulted significantly diminished reduced. Moreover, NLRC4 and NLRP3 appeared to co-localized in the complex. In conclusion, FLG by-passes NLRP3-inflammasome defect in HIV-DC, through the activation of NAIP/NLRC4, indicating a possible future use of the bacterial component as an efficient adjuvant in immunocompromised individuals

Keywords; HIV-1. Dendritic cells. Inflammasome. Flagellin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Estrutura do HIV-1	27
Figura 2 - Ciclo de Replicação do HIV-1.....	29
Figura 3 - Etapas da infecção natural por HIV-1	33
Figura 4 - Infecção pelo HIV e mudanças após terapia antirretroviral	36
Figura 5 - Estrutura das moléculas envolvidas na ativação do inflamassoma NLRP3 e NAIP/NLRC4.....	43
Figura 6 - Desenho esquemático da hipótese de trabalho	51
Figura 7 - Representação esquemática do trabalho	55
Figura 8 - Análise morfológica das DC.....	59
Figura 9 - Análise fenotípica de monócitos e DC por citometria de fluxo.....	61
Figura 10 - Estratégia de gate para definição de marcadores fenotípicos e funcionais de células dendríticas.....	62
Figura 11 - Estratégia de gate para definição de linfócitos T produtores de IFN-γ.....	70
Figura 12 - Estratégia de gate para definição de linfócitos T que proliferaram	72
Figura 13 - Caracterização dos monócitos de indivíduos cronicamente infectados pelo HIV	78
Figura 14 - Monócitos de indivíduos infectados pelo HIV e controles estimulados com LPS+ATP ou FLG.....	79
Figura 15 - FLG ativa células dendríticas derivadas de monócitos	81
Figura 16 - Células dendríticas estimuladas com FLG induzem resposta de linfócitos ..	83
Figura 17- FLG induz a ativação do inflamassoma em DC humanas	85
Figura 18 - FLG induz a ativação da caspase-1 em HIV-DC e HD-DC	86
Figura 19 - Determinação da porcentagem de citotoxicidade em HD-DC e HIV-DC	87
Figura 20 - Formação de specks de NLRC4 e NLRP3 em HD-DC estimuladas com FLG	88
Figura 21 - Formação de specks de NLRC4 e NLRP3 em HD-DC estimuladas com FLG	89
Figura 22 - Formação de specks de NLRC4 e NLRP3 em HIV-DC estimuladas com FLG	90

Figura 23 - Formação de specks de NLRC4 e NLRP3 em HIV-DC estimuladas com FLG	91
Figura 24 - Inibição específica de NLRP3 não afeta a produção de IL-1β em HIV-DC.	92
Figura 25 - A inibição específica de NLRP3 afeta a formação de “specks” NLRP3+ em HIV-DC.	94
Figura 26 - O silenciamento gênico de NLRC4, mas não de NLRP3 afeta a produção de IL-1β nas HIV-DC estimuladas com FLG	96
Figura 27 - HIV-DC mostram uma expressão constitutiva alterada dos genes do inflamassoma.	98
Figura 28 - HIV-DC mostram uma expressão alterada dos genes do inflamassoma em resposta à FLG.	99
Figura 29 - FLG induz expressão de <i>NLRC4</i>, mas não de <i>NLRP3</i> em HIV-DC	100
Figura 30 - Indivíduos infectados pelo HIV apresentam uma concentração elevada de IFN-α no plasma	101
Figura 31 - IFN-α inibe a produção de IL-1β em HD-DC tratadas com LPS+ATP.	102
Figura 32 - O polimorfismo rs479333 em <i>NLRC4</i> afeta produção de IL-1β e IL-18 em HD-DC	104
Figura 33 - O polimorfismo rs10754558 em <i>NLRP3</i> afeta produção de IL-1β e IL-18 em HD-DC	105
Figura 34 - Análise guiada pelo genótipo do polimorfismo rs479333 em <i>NLRC4</i> em variáveis relacionadas a imunoterapia com células dendríticas	106
Figura 35 - Análise guiada pelo genótipo do polimorfismo rs10754558 em <i>NLRP3</i> em variáveis relacionadas a imunoterapia com células dendríticas	107
Figura 36 - Resultados da análise das componentes principais (PCA) em células dendríticas de indivíduos infectados pelo HIV estimuladas com FLG	109
Figura 37 - Resultados da análise das componentes principais (PCA) em células dendríticas de indivíduos infectados pelo HIV estimuladas com FLG	110
Figura 38 - Resultados da análise das componentes principais (PCA) em células dendríticas de indivíduos infectados pelo HIV estimuladas com FLG utilizando variáveis relacionadas ao inflamassoma	111
Figura 39 - A FLG ativa HIV-DC através do inflamassoma NLRC4.	122

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Anticorpos monoclonais utilizados para análise fenotípica das células dendríticas derivadas de monócitos	60
Tabela 2- Sondas de expressão gênica utilizadas para análise das células dendríticas .	66
Tabela 3 - Sequências de shRNA testadas para o silenciamento de <i>NLRP3</i> e <i>NLRP4</i> em células dendríticas	67
Tabela 4 - Anticorpos monoclonais utilizados para análise funcional das DC	69
Tabela 5 - Anticorpos monoclonais utilizados para análise de proliferação dos linfócitos	71
Tabela 6 - Seleção de SNPs candidatos	74
Tabela 7 - Frequência alélica e genotípica dos SNPs avaliados em <i>NLRP4</i>	108

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

CTRL: controle

μl: microlitro

μM: micromolar

3'UTR: do inglês, *Untranslated Region*

3TC: lamivudina

ABC: acabacavir

Aids: do inglês, *Acquired Immunodeficiency Syndrome*

AIFEC: do inglês, *Autoinflammation with infantile enterocolitis*

AIM2: do inglês, *Absent In Melanoma 2*

Alum: alumínio

APC: do inglês, *Antigen-Presenting Cell*

APOBEC3: do inglês, *Apolipoprotein B mRNA Editing enzyme Catalytic-like 3*

ART: terapia antirretroviral

ASC: do inglês, *Apoptosis-associated Speck-like protein containing a carboxy-terminal CARD*

AT-2: aldrithiol-2

ATCC: do inglês, *American Type Culture Collection*

ATV: atazanavir

AZT: zidovudina

BD: BD Bioscience®

BRCC3: do inglês, *BRCA1/BRCA2-Containing Complex Subunit 3*

C+: controle positivo

CAPPesq: Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

CAPS: do inglês, *Cryopyrin-Associated Autoinflammatory Syndromes*

CARD8: do inglês, *Caspase recruitment domain-containing protein 8*

CASP1: do inglês, *Caspase-1/Interleukin-1 converting enzyme*

CCL5: do inglês, *Chemokine (C-C motif) ligand 5*

CCL7: do inglês, *Chemokine (C-C motif) ligand 7*

CCR5: do inglês, *Chemokine (C-C motif) receptor 5*

CCR7: do inglês, *Chemokine (C-C motif) receptor 7*

CD11c: do inglês, *cluster of differentiation 11c*

CD126: do inglês, *cluster of differentiation 126*

CD14: do inglês, *cluster of differentiation 14*

CD141: do inglês, *cluster of differentiation 141*

CD303: do inglês, *cluster of differentiation 303*

CD38: do inglês, *cluster of differentiation 38*

CD4+: do inglês, *cluster of differentiation 4*

CD40: do inglês, *cluster of differentiation 40*

CD4₀: nível de linfócitos T CD4+ no sangue periférico antes do tratamento

CD4₁: nível de linfócitos T CD4+ no sangue periférico após o tratamento

CD80: do inglês, *cluster of differentiation 80*

CD83: do inglês, *cluster of differentiation 83*

CD86: do inglês, *cluster of differentiation 86*

cDNA: *complementary DNA*

CEPSH: Comitê de Ética em Pesquisas em Seres humanos do ICB;

CFSE: do inglês, *Carboxi-Fluoresceina Succinimidil Ester*

Chr: cromossomo

CI: do inglês, *Confidential interval*

CO₂: dióxido de carbono

conA: concanavalina A

Ct: do inglês, *cycle threshold*

CTCF: fluorescência total celular corrigida

CTLA-4: do inglês, *Cytotoxic T-lymphocyte–Associated Antigen 4*

CTLs: do inglês, *Cytotoxic T cells*

CVP: Carga Viral Plasmática

CXC12L: do inglês, *Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 12*

CXCR4: do inglês, *C-X-C chemokine receptor type 4*

DAMPs: do inglês, *Damage Associated Molecular Patterns*

DAPI: 4',6'-diamino-2-fenil-indol

DC: do inglês, *dendritic cell(s)*, célula(s) dendrítica(s)

HD-DC: células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos de indivíduos sadios

HIV-DC: células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos de indivíduos infectados pelo HIV

DC1: do inglês, *Polarized type-1 dendritic cells*

DC-SIGN/CD209: do inglês, *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*

DMSO: dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo

DNA: do inglês, *Deoxyribonucleic acid*

DRV: darunavir

DTG: dolutegravir

EC: do inglês, *Elite Controllers*

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

EFZ: efavirenz

EU: do inglês, *endotoxin units*

F: feminino

FAM-FLICA: probe para caspase-1 marcada com FAM

FC: do inglês, *Fold Change*

FITC: isotiocianato de fluoresceína

FLG: flagelina bacteriana

FMO: fluorescência menos um, do inglês, *Fluorescence Minus One*

FMUSP: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

FSC-A: do inglês, *Forward scatter*

g: grama

GALT: do inglês, *Gut Associated Lymphoid Tissue*

GAPDH: do inglês, *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*

GLM: do inglês, *General Linear Model*

GM-CSF: do inglês, *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*

gp120: glicoproteína 120

gp41: glicoproteína 41

HAART, do inglês *Highly Active Antiretroviral Therapy*),

HEK-293T: do inglês, *Human Embryonic Kidney 293*

HIV: do inglês, *Human Immunodeficiency Virus*

HLA-DR: do inglês, *Human leukocyte antigens-DR*

HLA-I: do inglês, *Human Leukocyte Antigen Class I*

HTLV: vírus T-linfotrópico humano

ID: identificação

iDC: dendrítica imatura

IFI16: do inglês, *Interferon Inducible Protein 16*

IFN- α : do inglês, *Interferon alpha*

IFNs: interferons

IFN- β : interferon beta

IFN- γ : interferon gama

IgG1: imunoglobulina G1

IL-10: *Interleukin 10*

IL-12 p70: do inglês *Interleukin 12* subunidade 70

IL-18: do inglês, *Interleukin 18*

IL-18BP: do inglês, *Interleukin 18 Binding Protein*

IL-1R: do inglês, *Interleukin-1 receptor*

IL-1 β : do inglês, *Interleukin-1 beta*

IL4: do inglês, *Interleukin 4*

IL6: do inglês, *Interleukin 6*

IL-8: do inglês, *Interleukin 8*

IRF-1: do inglês, *Interferon regulatory factor 1*

IRF8: do inglês, *Interferon regulatory factor 8*

ISGs, do inglês *Interferon-Stimulated Genes*

K⁺: potássio

KCl: cloreto de potássio

kDa: quilodáton

LAG3: do inglês, *Lymphocyte-activation gene 3*

LD: do inglês, *Linkage Disequilibrium*

LDH: lactato desidrogenase

MBL2: do inglês, *Mannose Binding Lectin 2*

LIM 56: Laboratório de Investigação Médica 56

LNTP: do inglês, *Long Term Non Progressors*)

Log Cópias/mm³= logatírimo de base 10 para expressar o número de cópias de HIV por mL

LPV: lopinavir

LPS: lipopolissacarídeo

M: masculino

MAF: do inglês, *Minor Allele Frequency*

MCC-950: inibidor de NLRP3

MFI: mediana da intensidade de fluorescência

MHC: do inglês, *Major Histocompatibility Complex*

miRNA: micro-RNA

MIP: do inglês, *Macrophage Inflammatory Protein*

mL: mililitro

mM: milimolar

MR: Maraviroc

mRNA: RNA mensageiro

NaCl: cloreto de sódio

NAIP: do inglês, *NLR family of apoptosis inhibitory proteins*

NC: do inglês, *Noncontrollers*

NE: não estimulado

NF: dado não fornecido

NFV: nelfinavir

NF- κ B: do inglês, *Factor Nuclear Kappa B*

ng/mL: nanograma por mililitro

NIH: National Institutes of Health

NK: do inglês, *Natural Killer*

NLR: do inglês, *Nucleotide-binding oligomerization domain_Leucine rich repeats Receptors*

TLR: do inglês, *Toll-like receptor*

NLRC4: do inglês, *NLR Family CARD Domain Containing 4*

NLRP1: do inglês, *NLR family pyrin domain containing 1*

NLRP3: do inglês, *NLR Family, Pyrin Domain Containing 3*

NVP: nevirapina

OMS: Organização Mundial da Saúde

OR: do inglês, *odds ratio*

p17: proteína 17

p24: proteína 24

P2X7: do inglês, *Purinergic type 2 receptor family (P2)*

p_{adj}: valor de p ajustado

PAMPs: do inglês, *Pathogen Associated Molecular Patterns*

PBMC: do inglês *Peripheral Blood Mononuclear Cells*

PBS: Tampão fosfato-salino

PCR: do inglês, *Polymerase Chain Reaction*

PD-1: do inglês, *Programmed cell death-1*

pDC: do inglês, *Plasmacytoid dendritic cells*

PEI: do inglês, *Polyethyleneimine*

pg/mL: picograma por mililitro

p_{H-W}: equilíbrio de Hardy-Weinberg

PMA: do inglês, *Phorbol 12-myristate 13-acetate*

Poly I:C ácido policitidílico

Poly dA:dT: : do inglês, *poly(deoxyadenylic-deoxythymidylic*

RP: do inglês, *Rapid Progressors*

PRRs: do inglês, *Pattern Recognition Receptors*

psPAX-2: do inglês, *2rd generation lentiviral packaging plasmid*

PTD: parthenolide

pVSG-G: do inglês, *vesicular stomatitis vírus G glycoprotein*

PYD: do inglês, *Pyrin domain*

PYHIN: do inglês, *Pyrin and HIN domain-containing protein.*

qPCR: do inglês, *Polymerase chain reaction quantitative real time*

RAL: raltegravir

RANTES: do inglês, *Regulated on Activation Normal T Cell Expressed and Secreted*

CXCL10 ou IP-10, do inglês, *Interferon Inducible Protein*

Ref: referência

RIG-I: do inglês, *Retinoic Acid-Inducible Gene I*

RNA: ácido ribonucleico

SAMDH1: do inglês, *SAM domain and HD domain-containing protein 1*

SEAP: Serviço de Extensão ao Atendimento de Pessoas que vivem com HIV/Aids

SFB: soro fetal bovino

shRNA: do inglês, *Small hairpin RNA*

scramble: controle universal shRNA

SIV: do inglês, *Simian Immunodeficiency virus*

SNPs: polimorfismos de base única

snRNA: do inglês, *Small Nuclear RNA*

SSC-A: do inglês, *Side scatter*

T20: enfuvirtida

TCD4+: linfócitos T CD4

TDF: tenofovir

Th17: do inglês, *T helper 17*

TIM3: do inglês, *T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3*

TLR4: do inglês, *Toll-Like Receptor 4*

TLR5: do inglês, *Toll-Like Receptor5*

TLR7: do inglês, *Toll-Like Receptor 7*

TLR8: do inglês, *Toll-Like Receptor 8*

TLR9: do inglês, *Toll-Like Receptor 9*

TLRs: do inglês, *Toll-Like Receptors*

TNE: tris NaCl EDTA

TNF- α : do inglês, *Tumor Necrosis Factor*

TNFR: do inglês, *Tumor Necrosis Factor Receptor superfamily*

Treg: do inglês, *Regulatory T cells*

TRIM5: do inglês, *Tripartite motif-containing protein 5*

UI/mL: unidades internacionais por mililitro

USP: Universidade de São Paulo

Vif: do inglês, *Viral infectivity factor*

VLPs: do inglês, *Virus like particle*

Vpx: proteína associada ao vírion

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	25
1.1 HIV e Aids	26
1.2 NOVOS DESAFIOS NA ERA DA INFECÇÃO CRÔNICA POR HIV	28
1.3 PATOGÊNESE DA INFECÇÃO PELO HIV	28
1.4 RESPOSTA IMUNE AO HIV	30
1.5 TRATAMENTO	34
1.6 ATIVAÇÃO IMUNOLÓGICA CRÔNICA E EXAUSTÃO IMUNE	37
1.7 CÉLULAS DENDRÍTICAS	39
1.8 INFLAMASSOMA	41
1.9 DESREGULAÇÃO DO INFLAMASSOMA NOS INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HIV	45
2. HIPÓTESE DE TRABALHO	48
3. OBJETIVO	52
3.1 OBJETIVO GERAL	53
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	53
4. MATERIAIS E MÉTODOS	54
4.1 DESENHO DO ESTUDO	55
4.2 INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HIV	56
4.3 INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HIV SUBMETIDOS À VACINA TERAPÊUTICA	57
4.4 INDIVÍDUOS SADIOS	57
4.5 OBTENÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE MONÓCITOS	58
4.6 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS	58
4.7 FENOTIPAGEM DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS ATRAVÉS DE CITOMETRIA DE FLUXO	59
4.8 CONFIRMAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO IN VITRO MONÓCITOS-DC	61
4.9 ENSAIOS DE ATIVAÇÃO DO INFLAMASSOMA EM CÉLULAS DENDRÍTICAS	62
4.10 DETECÇÃO DE CITOCINAS POR ELISA	64
4.11 DETECÇÃO DA ATIVAÇÃO DE CASPASE-1	64
4.12 AVALIAÇÃO DA PORCENTAGEM DE CITOTOXICIDADE	65

4.13 DETECÇÃO DE AGREGADOS DE ASC (“SPECKS”) POR IMUNOFLOURESCÊNCIA	65
4.14 ISOLAMENTO DE RNA E ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA RELATIVA ATRAVÉS DE SONDAS FLUORESCENTES GENE ESPECÍFICAS E QPCR	66
4.15 SILENCIAMENTO GÊNICO DE NLRP3 E NLRC4	67
4.16 ANÁLISE FUNCIONAL DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS: ENSAIOS DE COCULTIVO	68
4.17 RESPOSTA LINFOPROLIFERATIVA	70
4.18 MARCAÇÃO DE MOLÉCULAS DE SUPERFÍCIE.....	72
4.19 MARCAÇÃO DE MOLÉCULAS INTRACELULARES	73
4.20 ISOLAMENTO DE DNA GENÔMICO DE INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HIV	73
4. 21 SELEÇÃO DOS POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA NOS GENES DO INFLAMASSOMA PARA GENOTIPAGEM.....	73
4. 22 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	74
5. RESULTADOS	76
5.1. MONÓCITOS DE INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HIV APRESENTAM DEFEITO DE ATIVAÇÃO DE NLRP3.....	77
5.2 A FLG INDUZ A ATIVAÇÃO DE DC.....	80
5.3 A FLG INDUZ A ATIVAÇÃO DO INFLAMASSOMA EM DC DE DOADORES SADIOS E INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HIV DE MODO SEMELHANTE ..83	
5.4 A FLG INDUZ A FORMAÇÃO DE AGREGADOS (“SPECKS”) DE NLRC4 E NLRP3 EM HD-DC.....	87
5.5 A FLG INDUZ A FORMAÇÃO DE AGREGADOS (“SPECKS”) DE NLRC4 E NLRP3 EM HIV-DC	89
5.6. INIBIÇÃO ESPECÍFICA DE NLRP3 NÃO AFETA A PRODUÇÃO DE IL-1 β NAS HIV-DC ESTIMULADAS	91
5.7. O SILENCIAMENTO GÊNICO DE NLRC4 MAS NÃO DE NLRP3 AFETA A PRODUÇÃO DE IL-1 β NAS HIV-DC ESTIMULADAS COM FLG.....	95
5.8. HIV-DC MOSTRAM UM PERFIL DE EXPRESSÃO DOS GENES DO INFLAMASSOMA ALTERADO.....	97
5.9. O IFN-I INIBE A PRODUÇÃO DE IL-1 β EM DC TRATADAS COM LPS+ATP, MAS NÃO COM FLG	100
5.10 VARIANTES POLIMÓRFICAS NOS GENES NLRC4 e NLRP3 MODULAM A RESPOSTA DAS DC À FLG	102
5.11 VARIANTES POLIMÓRFICAS NOS GENES NLRC4 e NLRP3 AFETAM A RESPOSTA DE INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HIV À IMUNOTERAPIA	105

5.12 VARIANTES POLIMÓRFICAS NOS GENES NLRC4 e NLRP3 AFETAM O ESTADO CLÍNICO DOS INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HIV	107
5.13 ANÁLISE DAS COMPONENTES PRINCIPAIS NO PERFIL DE RESPOSTA DE DC FRENTE À FLG.....	109
6. DISCUSSÃO	112
7. CONCLUSÕES.....	121
REFERÊNCIAS*.....	123
APÊNDICE A - Dados demográficos e clínicos dos indivíduos infectados pelo HIV utilizados para os ensaios funcionais	138
APÊNDICE B - Resultado da titulação dos anticorpos monoclonais utilizados na análise fenotípica das DC.....	139
APÊNDICE C - Padronização da concentração da FLG e tempo de estímulo.....	140
APÊNDICE D - Escolha do tipo de FLG.....	141
APÊNDICE E - Priming com LPS.....	142
APÊNDICE F - Dosagem de IL-18BP em sobrenadantes HD-DC e HIV-DC após estimulação	143
APÊNDICE G - Estimulação em HD-DC e HIV-DC com outros agonistas	144
APÊNDICE H - Estimulação de HD-DC e HIV-DC com FLG na presença de meio com elevada concentração de K⁺	145
APÊNDICE I - Efetividade e especificidade do silenciamento.....	146
APÊNDICE J - HD-DC pulsadas com vírus HIV inativado e estimuladas com FLG, LPS e LPS+ATP.....	147
APÊNDICE L - Produção científica e participação em eventos da área.....	148

1.1 HIV e Aids

Desde que os primeiros casos de Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Aids, do inglês “*Acquired Immunodeficiency Syndrome*”) foram relatados há mais de 38 anos, iniciou-se um grande problema de saúde pública mundial.

A Aids tornou-se conhecida após levar um número elevado de pacientes do sexo masculino a desenvolver sarcoma de Kaposi e pneumonias fúngicas recorrentes nos Estados Unidos. No entanto o agente etiológico só foi descrito três anos depois, após o isolamento de um retrovírus linfotrópico de um linfonodo, denominado posteriormente de Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV, do inglês “*Human Immunodeficiency Virus*”) revisto por (LAURINDO-TEODORESCU L, 2015).

O HIV pertence à Família *Retroviridae*, gênero Lentivirus, um grupo de vírus associado a infecções persistentes, sendo constituído por duas fitas simples de RNA, um invólucro formado por bicamada lipídica e um capsídeo. É classificado em dois tipos: HIV-1 E HIV-2, sendo o HIV-1 o principal responsável pela pandemia (SALEMI et al., 2001). Nove genes constituem o genoma completo do HIV-1. Desses genes, três desempenham funções primordiais, como: *gag* que codifica proteínas estruturais internas (matriz, capsídeo, nucleocapsídeo e p6); o gene *pol* que codifica enzimas relacionadas a replicação e a integração do vírus (protease, transcriptase reversa e integrase); e o gene *env* que codifica a glicoproteína precursora do envelope gp160, a qual é clivada em gp120 e gp41. Entre os outros seis genes, *tat* e *rev* têm funções reguladoras essenciais para a replicação viral, enquanto que *nef*, *vif*, *vpr* e *vpu* são relacionados a proteínas acessórias (ENGELMAN; CHEREPANOV, 2012; SIERRA; KUPFER; KAISER, 2005). A estrutura da partícula viral está representada na **figura 1**.

Figura 1- Estrutura do HIV-1

O HIV é constituído de um envelope de membrana lipídica derivada da célula hospedeira. Vinculadas a ele estão as glicoproteínas gp41 e gp120. O envelope envolve a matriz que circunda o núcleo em forma de cone, composto pela proteína do capsídeo p24, no interior do qual estão localizadas as enzimas transcriptase reversa, integrase, protease, assim como o genoma viral. Fonte: autoria própria, REIS (2019). O modelo do vírus é do banco de dados de ilustrações disponibilizados pela Servier em: <https://smart.servier.com>. Acessado em fevereiro de 2019.

A Organização Mundial de Saúde (OMS, do inglês “*World Health Organization*”) estima que atualmente há aproximadamente 36,9 milhões de pessoas vivendo com o HIV ou Aids em todo o mundo. Dessas pessoas, 35,1 milhões são adultos e 1,8 milhões são crianças (menores de 15 anos) (UNAIDS/WHO, 2018).

Os dados regionais mostram que a maioria das pessoas que vive com HIV está na África Oriental e Austral- 19,6 milhões, seguido da Ásia e Pacífico com 5,2 milhões de infectados (UNAIDS/WHO, 2018). No Brasil, de acordo com o boletim epidemiológico de 2018, até o momento foram identificados 982.129 mil casos de Aids (BRASIL, 2018).

As populações-chave e seus parceiros sexuais constituem 47% das novas infecções pelo HIV em todo o mundo. E o maior risco de infecção pelo HIV ocorre entre homens que fazem sexo com homens; pessoas que usam drogas injetáveis; profissionais do sexo e mulheres trans (UNAIDS/WHO, 2018).

1.2 NOVOS DESAFIOS NA ERA DA INFECÇÃO CRÔNICA POR HIV

Desde a descrição do HIV em 1983 (BARRE-SINOUSSE et al., 1983; GALLO et al., 1983) grandes avanços foram feitos no conhecimento da interação vírus/hospedeiro e no tratamento da infecção, com a introdução da terapia antirretroviral (ART, do inglês “*Active Antiretroviral Therapy*”), de modo que, pelo menos nos países onde os medicamentos são acessíveis à população (cerca de 21,7 milhões; UNAIDS/WHO, 2018) (incluindo o Brasil), a letalidade por HIV/Aids reduziu drasticamente. Por outro lado, e apesar de fortes investimentos na pesquisa, ainda não existe uma cura definitiva (esterilização) nem uma vacina profilática eficaz.

Deeks e colaboradores (DEEKS, STEVEN G. et al., 2013) alertaram sobre os novos problemas de saúde relacionados à infecção crônica por HIV-1, em parte, como consequência do uso continuado da terapia antirretroviral. O indivíduo infectado pelo HIV apresenta inflamação crônica e exaustão do sistema imune que, por um lado, levam a uma maior susceptibilidade à outras infecções (comuns ou oportunistas) e, por outro, à doenças relacionadas a inflamação crônica (doenças metabólicas, neurológicas, câncer). Além disso, os pacientes tendem a ter uma baixa resposta a vacinas tanto profiláticas (BONGIOVANNI; CASANA, 2008), o que pode elevar o risco de coinfeções, quanto vacinas terapêuticas, testadas como alternativa ou complemento da terapia antirretroviral convencional (GARCIA; ROUTY, 2011). Representando uma população de risco (e em forte crescimento, de acordo com os dados da OMS), novas estratégias devem ser cogitadas para limitar a vulnerabilidade dos indivíduos infectados pelo HIV a novas infecções, por exemplo tentando aprimorar as vacinas existentes no mercado.

1.3 PATOGÊNESE DA INFECÇÃO PELO HIV

O HIV utiliza-se de estratégias para infectar as células do hospedeiro, sendo uma delas o uso de receptores e correceptores presentes principalmente na superfície de linfócitos T, macrófagos e células dendríticas para que ocorra a ligação e a adsorção viral. Isso ocorre através da interação da proteína do envelope gp120 com a molécula CD4. A proteína gp120 deve sofrer mudanças conformacionais para também ligar-se a receptores de quimiocinas, como o CCR5 e o CXCR4. Após essa ligação, a gp41 do HIV medeia a fusão do envelope viral com a membrana

citoplasmática, permitindo que o genoma e as proteínas virais associadas penetrem no citoplasma da célula hospedeira (ENGELMAN; CHEREPANOV, 2012; SIERRA et al., 2005).

Figura 2 - Ciclo de Replicação do HIV-1

A infecção é iniciada quando glicoproteínas de membrana do envelope ligam-se ao CD4 e ao CCR5 (ou CXCR4) (etapa 1) favorecendo a fusão da membrana do vírus com a membrana da célula hospedeira (etapa 2) e posterior liberação do nucleocapsídeo viral no interior da célula (etapa 3). Uma vez no citoplasma ocorre o desnudamento do material genético e a transcrição reversa do RNA viral no citoplasma da célula (etapa 4) seguida da entrada do DNA proviral no núcleo (etapa 5), onde o material genético do vírus é integrado ao DNA da célula formando o provírus (etapa 6). A transcrição proviral (etapa 7) mediada pela RNA polimerase II do hospedeiro gera novos mRNAs que ao saírem do núcleo da célula (etapa 8) são utilizados como fitas molde para a produção de proteínas virais (etapa 9). Com os componentes virais prontos ocorre a montagem do vírus (etapa 10) seguido do brotamento e liberação de partículas virais imaturas, as quais sofrem o processo de maturação por protease específica quando fora da célula, gerando a partícula viral infecciosa. Fonte: autoria própria, REIS (2019) com inspiração em: (Elgelman A e Cherepanov P, 2012). Os modelos de célula e vírus são do banco de dados de ilustrações disponibilizados pela Servier em: <https://smart.servier.com>. Acessado em fevereiro de 2019.

Os processos subsequentes à entrada do capsídeo viral no citoplasma até a integração do genoma viral incluem a conversão do RNA do vírus em DNA viral pela transcriptase reversa viral, o qual se integra ao genoma da célula devido à ação da integrase. Dessa forma, a maquinaria celular é utilizada para a replicação e o genoma viral é transcrito em RNA mensageiro (RNAm) para a síntese de proteínas e, posteriormente, para produção de novas partículas virais que são liberadas por brotamento através da membrana plasmática da célula. Os linfócitos T CD4⁺ são as células mais susceptíveis à infecção e à replicação viral, enquanto

que DC e macrófagos são sabidamente mais resistentes, (COLEMAN; WU, 2009) devido a presença de proteínas celulares importantes, como fatores de restrição.

1.4 RESPOSTA IMUNE AO HIV

O HIV entra no organismo através das membranas mucosas, na maioria dos casos, do trato genital ou retal por exposição sexual. Nesse primeiro contato barreiras físicas (integridade do epitélio da mucosa) e barreiras químicas presentes nas mucosas (moléculas e peptídeos antimicrobianos, tais como pH, as β -defensinas e mucinas) exemplificam a primeira defesa do sistema imune inato. As primeiras células que encontram o vírus são as células teciduais residentes, como macrófagos teciduais, linfócitos T residentes e células dendríticas da mucosa. Essas células reconhecem o vírus através de seus receptores de reconhecimento de padrões (PRRs, do inglês “*Pattern Recognition Receptors*”) (ESPINDOLA et al., 2016). Dentre os receptores, destacam-se os receptores do tipo Toll (TLR, do inglês “*Toll Like Receptor*”) 2 e 4, (NAZLI et al., 2013) e o receptor de lectina DC-SIGN (do inglês, “*Dendritic Cell-Specific Intercellular Adhesion Molecule-3-Grabbing Non-integrin*”) que estão presentes na superfície celular e reconhecem a glicoproteína do envelope viral gp120 (GEIJTENBEEK et al., 2000); os TLR-7 e 8, que reconhecem o RNA viral no compartimento endossômico (HEIL et al., 2004); os receptores citoplasmáticos RIG-I (do inglês, “*Retinoic Acid-Inducible Gene I*”) e IFI16 (do inglês, “*Interferon Inducible Protein 16*”) que reconhecem no citosol o RNA viral e o genoma viral após retrotranscrição (cDNA), respectivamente (BERG et al., 2012; JAKOBSEN et al., 2013), o receptor do inflamassoma NLRP3 (do inglês “*NACHT- and LRR Receptor containing a pyrin domain/PYD-3*”) (GUO, HAITAO et al., 2014). Existem também moléculas de reconhecimento de padrões solúveis, tais como Lectina Ligadora de Manose 2 (MBL2, do inglês “*Mannose Binding Lectin 2*”) (SAIFUDDIN et al., 2000).

Após reconhecer o vírus através desses PRRs, inicia-se uma sinalização intracelular que culmina na ativação de fatores de transcrição, tais como fator nuclear kappa B (NF- κ B, do inglês “*Factor Nuclear Kappa B*”) e/ou fatores reguladores de interferon (IRFs, do inglês “*Interferon Regulatory Factors*”). Esses fatores são responsáveis pela transcrição de genes de citocinas pró-inflamatórias, tais como a interleucina (IL, do inglês “*Interleukin*”) -1 β , IL-6, IL-8, o fator de necrose tumoral (TNF, do inglês “*Tumor Necrosis Factor*”), das quimiocinas MIP (do inglês “*Macrophage Inflammatory Protein*”) -1a, MIP-1b, RANTES (do inglês “*Regulated*

on Activation Normal T Cell Expressed and Secreted”), CXCL10 (ou IP-10, do inglês “*Interferon Inducible Protein*”), interferons de tipo I: IFN- α (do inglês “*interferon alpha*”) e IFN- β . Esses dois últimos levam à indução de genes estimulados por interferon (ISGs, do inglês “*Interferon-Stimulated Genes*”), como, SAMDH1 (do inglês “*SAM domain and HD domain-containing protein 1*”), APOBEC3 (do inglês “*Apolipoprotein B mRNA Editing enzyme Catalytic-like 3*”) e MX2 (do inglês “*Human Myxovirus resistance 2*”) que constituem importantes fatores de restrição (SOPER et al., 2017).

Esse reconhecimento/ativação faz com que essas células residentes no tecido iniciem a resposta imune e liberem citocinas e quimiocinas, o que resulta no recrutamento de novas células ao tecido, como neutrófilos, células NK (do inglês, “*Natural Killer*”), monócitos e células dendríticas imaturas (WU, L.; KEWALRAMANI, V. N., 2006; ZHANG, Z. et al., 1999).

Em tecidos periféricos, DC imaturas são especializadas em capturar e processar antígenos através do MHC (do inglês, “*Major Histocompatibility Complex*”). Após a captura do antígeno, as células dendríticas se maturam. Esse processo é fortemente aumentado por citocinas inflamatórias (MELLMAN; STEINMAN, 2001) e mediadores inflamatórios. No contexto da infecção pelo HIV, as células dendríticas imaturas endocitam o microrganismo, resultando em sua ativação e migração para os órgãos linfoides secundários. Nos linfonodos, as células dendríticas já estão maduras e apresentam os epítomos derivados da internalização do vírus aos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, os quais são ativados para desempenhar uma resposta imune (IZQUIERDO-USEROS et al., 2010). No entanto, o vírus se espalha para outros tecidos linfoides, particularmente para o tecido linfoide associado ao intestino (GALT, do inglês, “*Gut – Associated Lymphoid Tissue*”), onde infecta cerca de 20% dos linfócitos T CD4⁺ ali presentes. Além disso cerca de 60% das células que não se infectaram são ativadas e morrem por apoptose, o que leva a uma profunda depleção de células T CD4 no GALT (MCMICHAEL et al., 2010). Somado a isso, ocorre morte ou disfunção de enterócitos, o que pode aumentar a permeabilidade do trato gastrointestinal e, conseqüentemente, a passagem de produtos microbianos, como lipopolissacarídeos (LPS), do lúmen intestinal para os tecidos/ sangue (BRENCHLEY et al., 2006). Adicionalmente ocorre uma profunda mudança nas subpopulações de células T, incluindo uma perda preferencial de células T de memória da mucosa intestinal, preferencialmente de linfócitos T *helper* 17 (Th17) (PRENDERGAST et al., 2010) e células T invariáveis associadas à mucosa, as quais são cruciais para a defesa contra bactérias (COSGROVE et al., 2013).

Enquanto o vírus replica no GALT e outros tecidos linfoides, a viremia sobe exponencialmente. A partir disso, o vírus livre circulante pode ser capturado e infectar diretamente eosinófilos, monócitos e neutrófilos, podendo atingir a medula óssea e infectar as células progenitoras, estabelecendo um novo reservatório viral (GEIJTENBEEK et al., 2000).

Existem evidências de que as respostas imunes dos linfócitos T CD8⁺, através da ação citotóxica de linfócitos T citotóxicos (CTLs- do inglês “*Cytotoxic T cells*”) contribuam para o declínio da viremia na infecção aguda. Isso ocorre porque há uma elevação e expansão de linfócitos T CD8⁺ o que contribui para um controle parcial da carga viral plasmática (CVP) (GOONETILLEKE et al., 2009; STREECK et al., 2014).

No entanto essa potente resposta imune adaptativa seleciona mutações do epítomos virais, levando a um escape imune (GOONETILLEKE et al., 2009). Essa expansão e elevação de linfócitos T CD8⁺ persiste durante toda a infecção pelo HIV-1. Enquanto que subpopulações de linfócitos CD8⁺ diferenciadas estão dramaticamente elevadas, linfócitos T CD8⁺ *naive* e de memória central diminuem progressivamente (ROEDERER et al., 1995)

Os linfócitos B não são depletados durante a infecção aguda pelo HIV. No entanto, a resposta imune humoral é comprometida devido à ativação policlonal e exaustão dos linfócitos B com mudança no perfil das subpopulações de memória e a destruição de outros tipos celulares que são importantes para o desenvolvimento dos centros germinativos (LEVESQUE et al., 2009), principalmente aqueles localizados no intestino (BRENNAN et al., 2009). Isso implica no atraso da indução de anticorpos neutralizantes autólogos, levando cerca de 12 semanas até serem produzidos.

Na evolução natural da infecção, de 12 a 20 semanas após a infecção, é esperado que a viremia caia e atinja um nível estável, chamado de *set point* viral. Nesse momento os níveis de linfócitos T CD4⁺ no sangue atingem um número normal, no entanto o dano no tecidos linfóides periféricos, como o GALT, permanece (MCMICHAEL et al., 2010). Inicia-se, então, a fase crônica da doença.

Figura 3 - Etapas da infecção natural por HIV-1

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

Fonte: adaptado de Pantaleo, 1993 (PANTALEO; GRAZIOSI; FAUCI, 1993).

Com o passar de alguns anos, pode ocorrer a fase de progressão para a Aids na qual observa-se uma elevação na viremia plasmática, que culmina numa contínua depleção de linfócitos T CD4⁺ (< 200 células/μL) juntamente com o aparecimento de doenças oportunistas que podem levar o paciente ao óbito (MINDEL; TENANT-FLOWERS, 2001).

Visto esses eventos, o andamento natural da infecção pelo HIV pode ser dividido resumidamente em três partes. A fase aguda é marcada por uma redução da contagem de linfócitos T CD4⁺ acompanhada pelo aumento da CVP. Esta fase pode ser assintomática ou apresentar sintomas inespecíficos. Após isso, inicia-se uma resposta de CTLs e a produção de anticorpos que, em resposta, levam à redução da CVP e aumento da contagem de linfócitos T CD4⁺, podendo levar à fase de latência e cronificação da infecção. Na fase de progressão para a Aids observa-se uma elevação na viremia plasmática, uma nova depleção de linfócitos T CD4⁺ e aparecimento de doenças oportunistas (**Figura 3**).

Curiosamente, sabe-se que entre os indivíduos que entram em contato com o vírus, alguns não contraem a infecção ou conseguem montar uma resposta eficaz com eliminação do vírus, enquanto outros são mais susceptíveis a infecção com diferentes perfis de controle da

replicação viral e progressão da doença. Levando em consideração o perfil de resposta na ausência de ART, existem as seguintes classificações: (1) Não progressores a longo prazo (LNTP, do inglês “*Long Term Non Progressors*”): indivíduos assintomáticos com contagens de linfócitos T CD4⁺ ≥ 500 células/mm³ de sangue por um período prolongado (>10 anos) e baixa viremia; (2) Controladores de elite (EC, do inglês “*Elite Controllers*”): mantêm a contagem de linfócitos T CD4⁺ estável e apresentam viremia indetectável; (3) Progressores Rápidos (RP, do inglês “*Rapid Progressors*”): apresentam contagem de linfócitos T CD4⁺ menor que 300 células/mm³ no período de 3 anos após o primeiro teste soropositivo e (4) Não controladores (NC, do inglês, “*Noncontrollers*”): mantêm a CVP acima de 10000 cópias/mm³ (GURDASANI et al., 2014).

Essa heterogeneidade de resposta ao HIV-1 pode estar associada tanto a fatores genéticos do hospedeiro, como deleção do CCR5, $\Delta 32$; presença do HLA B27, presença de variantes polimórficas em genes da resposta imune, quanto às particularidades do vírus. De fato, o estabelecimento de uma infecção crônica muito se deve ao escape imunológico viral, o qual pode ocorrer devido à elevada taxa de mutagênese do HIV-1 e, consequente, interferência no reconhecimento específico dos receptores linfocitários, quanto ao fato de existir proteínas do HIV-1 capazes de antagonizar os fatores de restrição viral (DEEKS, S. G. et al., 2015) (ex.: o fator de infectividade viral/Vif) (SOPER et al., 2017).

1.5 TRATAMENTO

Nessas últimas três décadas de epidemia, avanços científicos contribuíram para um melhor entendimento da interação patógeno/hospedeiro, fornecendo subsídios para o desenvolvimento de potentes agentes antirretrovirais (YOUNAI, 2013). E, mesmo que o número de indivíduos infectados tenha permanecido elevado, o advento da terapia antirretroviral levou a uma diminuição da mortalidade e morbidade da doença (LUNDGREN; BABIKER; NEATON, 2016).

Atualmente, estima-se que 21,7 milhões de indivíduos infectados pelo HIV tenham acesso à ART (UNAIDS/WHO, 2018).

Os antirretrovirais aprovados e comercialmente disponíveis agem em estágios da replicação do HIV e consistem em: inibidores nucleosídeos e nucleotídeos para transcriptase reversa, como acabacavir (ABC), lamivudina (3TC), tenofovir (TDF) e Zidovudina (AZT);

inibidores não-nucleosídeos da transcriptase reversa, como efavirenz (EFZ) e Nevirapina (NVP) ; inibidores de protease , como Atazanavir (ATV), Darunavir (DRV), Lopinavir (LPV), Nelfinavir (NFV); inibidores de fusão, como Enfuvirtida (T20); inibidores de integrase, como Dolutegravir (DTG) e Raltegravir (RAL); inibidores de entrada, Maraviroc (MR) e combinação de medicamentos de classes diferentes (CHEN; HOY; LEWIN, 2007; YOUNAI, 2013). No Brasil em 1996 foi introduzida a terapia antirretroviral de alta potência (HAART, do inglês “*Highly Active Antiretroviral Therapy*”), na qual é utilizada uma combinação de três ou mais drogas. Essa estratégia é utilizada amplamente pelo mundo.

Na maioria dos indivíduos infectados pelo HIV-1, a administração de ART resulta no aumento da contagem de linfócitos T CD4⁺ e na redução da viremia plasmática, que pode ser mantida durante anos (CHEN et al., 2007; FINZI; SILICIANO, 1998). Nesse cenário, a infecção pelo HIV passou a ser considerada uma situação crônica e controlável.

Entretanto, o sucesso da terapia antirretroviral é limitado pelo desenvolvimento de resistência, pelos efeitos colaterais associados à interações com outros medicamentos e pelo tempo de uso prolongado, que pode levar a complicações metabólicas (hiperglicemia, resistência insulínica, hiperlipidemia) e doenças cardiovasculares (CHEN et al., 2007; MURATA; HRUZ; MUECKLER, 2000).

Além disso ocorre uma supressão viral incompleta devido à permanência do genoma viral integrado ao DNA de células hospedeiras, particularmente em santuários anatômicos virais (CORY et al., 2013). Dessa forma, em poucas semanas, a interrupção do tratamento leva à replicação do HIV e aumento da CVP em células latentes como linfócitos T CD4⁺ de memória (PALMER; JOSEFSSON; COFFIN, 2011).

Do ponto de vista imunológico, mesmo sob o uso da terapia combinada, a resposta inflamatória e a ativação imune celular persistem (REGIDOR et al., 2011). Há evidências de que pacientes tratados e com níveis adequados de linfócitos T CD4⁺ ainda apresentem uma inflamação residual, o que é exemplificado pela **figura 4**.

Figura 4 - Infecção pelo HIV e mudanças após terapia antirretroviral

Com a redução do RNA e antígenos virais, os linfócitos T diminuem após terapia antirretroviral, enquanto os anticorpos persistem em todos os pacientes. A ativação imune diminui após a terapia, mas na maioria dos pacientes, permanece significativamente aumentada quando comparada com indivíduos controle.

Fonte: adaptado de Maartens, 2014 (MAARTENS; CELUM; LEWIN, 2014).

Mesmo a infecção pelo HIV constituindo uma situação crônica e controlável, ainda são necessários muitos esforços para elucidar essa questão.

Nesse contexto de tratamento, alguns estudos sugerem que vacinas terapêuticas baseadas em células dendríticas fornecem resultados promissores no controle da infecção pelo HIV, embora ainda seja necessário aprofundar os conhecimentos sobre os mecanismos de proteção induzidos por essas vacinas (GARCIA et al., 2012). Foram publicados vários ensaios clínicos utilizando imunoterapia com DC em indivíduos infectados pelo HIV. A maioria mostrou algum grau de resposta imune relacionada com o controle da CVP, apesar da grande variabilidade individual na resposta (GARCIA; ROUTY, 2011).

1.6 ATIVAÇÃO IMUNOLÓGICA CRÔNICA E EXAUSTÃO IMUNE

Uma das características mais marcantes na fase crônica da infecção pelo HIV-1 é ativação imunológica generalizada.

Desde o surgimento dos primeiros casos, Lane e colaboradores (LANE et al., 1983) descreveram anormalidades em linfócitos B, como a hiperativação. Após isso, a descrição de disfunções em células de indivíduos infectados pelo HIV tornaram-se comuns e inúmeros trabalhos caracterizaram o fenômeno, no qual ocorre a indução de citocinas próinflamatórias e quimiocinas e acarreta a disfunção de linfócitos, exaustão celular e senescência (MOIR, SUSAN; CHUN; FAUCI, 2011). A persistência da ativação imunológica crônica na infecção pelo HIV, tanto na resposta adaptativa quanto inata, também é agravada por anormalidades na coagulação (LICHTFUSS et al., 2011).

Dentre as ocorrências mais bem caracterizadas desse fenômeno está a enteropatia decorrente da perda de linfócitos T CD4⁺ na mucosa intestinal e aumento da permeabilidade. Esse conjunto de fatores culmina na translocação microbiana, o que é evidenciado pelo aumento de níveis séricos de LPS e de seu ligante CD14 solúvel. O LPS é um potente ativador de TLR-4 e leva produção de citocinas próinflamatórias, como IL-6, IL-1 β e IL-18 e TNF- α (BRENCHLEY et al., 2006) por monócitos, células dendríticas e linfócitos (T e B) ativados (DEEKS, STEVEN G.; TRACY; DOUEK, 2013). Além disso, a perda de regulação do sistema imunológico, com a redução de linfócitos Th17 e células T regulatórias, (PRENDERGAST et al., 2010) pode estar associada ao aumento de translocação microbiana.

Igualmente, algumas coinfeções, como a citomegalovirose e hepatite C, podem induzir uma profunda expansão de linfócitos T ativadas (HSUE et al., 2006), falseando a contagem de linfócitos T ao elevar seu número, mas não restaurando sua função imune. É importante ressaltar que o tratamento para as coinfeções pode reduzir o nível de ativação de linfócitos T (GONZALEZ et al., 2009; HUNT et al., 2011).

Com a ativação imunológica crônica, é vista também uma particular redução dos linfócitos B de memória em repouso e aumento de linfócitos B de memória ativadas (MOIR, S. et al., 2010).

Outra ocorrência relevante nesse cenário é que o HIV pode ter um efeito direto nos receptores TLR -7 e -8 expressos em células dendríticas plasmacitóides, levando a produção de interferon- α (MEIER et al., 2009).

Uma vez que esses marcadores de inflamação residual estejam aumentados, tem sido feitas inúmeras associações com o prognóstico, como, por exemplo, um índice aumentado de mortalidade (KULLER et al., 2008), doenças cardiovasculares (HSUE et al., 2006), câncer (MARKS et al., 2013), doenças neurológicas (ANCUTA et al., 2008) e hepáticas (ANDRADE et al., 2013).

Outra característica marcante da fase crônica da infecção pelo HIV-1 é a exaustão imune, a qual é definida como a redução da função efetora celular sustentada pela expressão de moléculas supressoras como receptores PD-1 (SAUCE et al., 2007; TRAUTMANN et al., 2006), CTLA-4 (KAUFMANN et al., 2007), TIM3 (CHEW et al., 2016) e LAG3 (TIAN et al., 2015), em ambos os linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺. A expressão dessas moléculas é aumentada, sobretudo em indivíduos infectados não-tratados, no entanto, mesmo em ART, a expressão declina, mas continua aumentada em comparação com indivíduos não-infectados (WYKES; LEWIN, 2017).

A expressão aumentada de PD1 é vista predominantemente em linfócitos T de memória central (ZHANG, J. Y. et al., 2007), enquanto que ambas PD1 e CTLA-4 são expressas por células Treg, e LAG3 é expresso por linfócitos T de memória efetora (TIAN et al., 2015). Além disso, PD1 é expresso concomitantemente com proteínas que ajudam a promover a ativação de linfócitos T, como CD38 e MHC de classe II (SAUCE et al., 2007).

Por fim, a exaustão imune vista em indivíduos infectados pelo HIV pode comprometer a resposta imune a maioria das vacinas conhecidas (ABZUG, 2009; GERETTI; DOYLE, 2010).

Através de uma metanálise, foi visto que a duração da soroproteção nos indivíduos infectados pelo HIV é mais curta do que em indivíduos saudáveis para a maioria das vacinas licenciadas. Além disso, muitos dos vacinados têm perda dos anticorpos de proteção antes mesmo do reforço preconizado (KERNÉIS et al., 2014). Além do mais, a resposta vacinal é enfraquecida, como baixas taxas de resposta às vacinações padrões para HBV em indivíduos infectados por vírus quando comparados com indivíduos saudáveis (YAO; MOORMAN, 2013).

Uma abordagem multidisciplinar e multifacetada, com o desenho de novos imunógenos, o desenvolvimento de melhores adjuvantes, rotas alternativas e a invenção de novos veículos de entrega, é necessária para a superação dessas barreiras.

1.7 CÉLULAS DENDRÍTICAS

O comprometimento na resposta vacinal tem sido associado tanto a uma reduzida frequência de DC (DONAGHY et al., 2003; SABADO et al., 2010), quanto a alterações fenotípicas e funcionais nessas células (CARDONE et al., 2015).

As DC constituem as mais potentes células apresentadoras de antígeno (APC, do inglês, “*Antigen-Presenting Cell*”) capazes de ativar linfócitos T *naïve*, sendo responsáveis por iniciar e manter as respostas imunes contra antígenos (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998; STEINMAN, 1991; WU; DAKIC, 2004). Além disso, essas células, consideradas sentinelas naturais, desempenham um papel central na regulação imune (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998).

Após o reconhecimento de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs, do inglês, “*Pathogen Associated Molecular Patterns*”) ou dano (DAMPs, do inglês, “*Damage Associated Molecular Patterns*”) pelos receptores inatos PRRs, DC são ativadas e tornam-se eficientes APC. A diferenciação final de uma DC é caracterizada pelo aumento de expressão de moléculas como MHC de classe II, CD86 e CD80 e pela produção de citocinas importantes para ativação de linfócitos T CD4⁺ na sinapse imunológica, como IL-12, IL-18, IL-1 β , IL-4. O resultado da ativação de DC direciona a expansão clonal dessas células e polariza para os diferentes tipos de resposta T (por exemplo, Th1, Th2, Th17, Treg), dependendo do perfil de citocinas produzido e do microambiente onde se dá a apresentação antigênica (STEINMAN, 2007).

Foram descritos vários subtipos de DC desde a sua descoberta em 1970. Entre as classificações propostas temos: migratórias e residentes. As DC migratórias estão presentes no sangue, expressam baixos níveis de CD11c e altos níveis de MHC II. As DC residentes encontram-se nos tecidos e expressam baixos níveis de MHC II e altos níveis de CD11c (SATO; FUJITA, 2007).

De forma geral, as DC migratórias podem ser divididas entre DC mielóides e plasmocitóides. As DC mielóides mantêm os precursores da linhagem mielóide CD11c, HLA, CD4 e não expressam CD14 (MERAD et al., 2013). As pDC, encontradas em zonas de células T de órgãos linfoides, no timo e no sangue, apresentam os marcadores específicos CD126, CD303 e CD304 e são responsáveis pela produção de interferon de tipo I (HANIFFA; COLLIN; GINHOUX, 2013; REIZIS et al., 2011).

Durante anos, esses subtipos foram descritos e amplamente aceitos pela comunidade científica. No entanto, em 2017 foi publicado um trabalho que, através de análises fenotípicas *high throughput*, mostrou existir mais subtipos, totalizando seis. Sendo eles: DC1 (CD141/BDCA-3⁺ cDC1); DC2 e DC3 (CD1C/BDCA-1⁺ cDC2); DC4 (CD1C⁻CD141⁻CD11C⁺ DC); DC5 e DC6 (CD123, CD303/BDCA-2⁺) (VILLANI; SATIJA, 2017).

Desde sua descoberta, as DC têm sido objeto de investigação por vários grupos de pesquisa (STEINMAN, 2007). Inicialmente, tais estudos eram muito limitados devido ao número baixo de DC circulantes do sangue. A descoberta de que monócitos poderiam dar origem a DC revolucionou o campo de pesquisas com DC porque descobriu-se que era possível derivar DC a partir de monócitos *in vitro*, através da adição de fatores de como GM-CSF (do inglês: “*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*”) e IL-4 interleucina (IL-4) (SALLUSTO; LANZAVECCHIA, 1994). A citocina GM-CSF permite a sobrevivência e diferenciação dos monócitos *in vitro*, enquanto a IL-4 exerce um efeito inibitório na diferenciação de monócitos em macrófagos (CONTI; GESSANI, 2008). Os protocolos de diferenciação dos monócitos em DC, em sua maioria, estabelece o tempo de cultivo de 5-7 dias.

Se o modelo de derivação utiliza monócitos, logo as características dessas células podem influenciar a qualidade do produto final. Sabe-se que são encontradas três subpopulações, a maior população dos monócitos humanos (90%) com CD14^{high} e nenhuma expressão para CD16, denominados de monócitos clássicos. Enquanto a menor população (10%) de monócitos humanos é subdividida em intermediários com CD14^{high} e CD16^{low} e em não clássicos com CD16^{high}CD14^{low} (ZIEGLER-HEITBROCK et al., 2010). Quando foram avaliadas as características dos monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos através do perfil de expressão gênica notou-se que monócitos clássicos expressam genes proinflamatórios; enquanto que os monócitos intermediários têm uma alta expressão de MHC de classe II (WONG et al., 2011).

Uma vez que foi possível estabelecer um modelo de DC, essas células foram utilizadas amplamente por pesquisadores do mundo todo, o que possibilitou muitas descobertas sobre suas propriedades biológicas e moleculares.

Uma dessas descobertas diz a respeito sobre sua maturação, a qual é fortemente aumentada por citocinas inflamatórias (MELLMAN; STEINMAN, 2001) e mediadores inflamatórios, incluindo ligantes de NLR (do inglês, “*Nucleotide-binding oligomerization domain_Leucine rich repeats Receptors*”) e TLR, como LPS (JANEWAY; MEDZHITOV,

2002; MELLMAN; STEINMAN, 2001) e tem como objetivo potencializar a capacidade de apresentação antigênica aos linfócitos T *naïve*.

Voltando ao contexto das DC durante a infecção pelo HIV, vários grupos têm observado alterações. Uma delas diz respeito ao reduzido número circulante dessas células em pacientes sem tratamento (*naïve*), o que correlaciona inversamente ao nível de CVP (SCHMIDT et al., 2006). Outros grupo de pesquisa observaram ainda um fenótipo de ativação parcial de DC (DILLON et al., 2008) com produção espontânea de citocinas inflamatórias (ALMEIDA et al., 2005).

Comparadas às células de indivíduos-controle, as DC derivadas de indivíduos infectados pelo HIV apresentam uma diminuída eficiência na estimulação de linfócitos T, com expressão reduzida de moléculas coestimuladoras como CD80 e CD86 (WU, LI; KEWALRAMANI, VINEET N., 2006).

Esse comprometimento em DC visto em indivíduos infectados pelo HIV pode estar associado a uma pobre resposta vacinal. E esse cenário pode ser causado por uma resposta diminuída ou defeituosa a adjuvantes comumente utilizados (LIU; OSTROWSKI, 2017).

Preparações vacinais bem-sucedidas ativam adequadamente DC, levando a produção de uma imunidade protetora de memória. Junto com o antígeno do patógeno, os adjuvantes contribuem fortemente para a efetividade da vacina. Essa ação é mediada por PRRs, como TLR e NLR, através da ativação de vias intracelulares levando a produção de importantes citocinas para ativação de células T (MAISONNEUVE et al., 2014). Uma dessas vias intracelulares chama-se inflamassoma.

1.8 INFLAMASSOMA

O inflamassoma foi descrito como um complexo proteico citosólico de alto peso molecular que recruta e ativa proteases inflamatórias baseadas em cisteína e ácido aspártico (caspase, do inglês “*cysteine-aspartic-acid-proteases*”) (caspase-1, -4, -5), levando à produção das formas ativas das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18 (MARTINON; BURNS; TSCHOPP, 2002) e/ou à morte celular fortemente inflamatória, chamada de piroptose. A estrutura das moléculas envolvidas na ativação do inflamassoma está esquematizada na **Figura 5**.

O inflamassoma é formado após o reconhecimento de PAMPs ou DAMPs por um sensor citoplasmático da família de receptores que contém os domínios central NACHT e domínio C-terminal rico em repetições de leucina (LRR, do inglês, “*Leucine- Rich Repeats*”) - NLR, do inglês “*NACHT and LRR containing receptors*” ou da família de receptores do tipo PYHIN (do inglês, “*PYD and HIN domain-containing protein*”). Constituem exemplos de NLRs, os receptores NLRP1 e NLRP3 (que contém o domínio N-terminal de tipo pirínico/PYD), NAIP (que contém o domínio N-terminal de tipo BIR) e NLRC4 (que contém o domínio N-terminal para recrutamento de caspases, CARD); e entre os PYHINs, o AIM2 (do inglês, “*Absent In Melanoma 2*”) e IFI16.

Alguns receptores tais como AIM2 (FERNANDES-ALNEMRI et al., 2009; HORNUNG et al., 2009), IFI16 (UNTERHOLZNER et al., 2010) e NAIP reconhecem diretamente o DNA ou a flagelina bacteriana (FLG), respectivamente. Enquanto que outros são ativados de forma indireta, como no caso do NLRP3 e NLRC4.

O inflamassoma NLRP3 é um componente crucial da defesa imune do hospedeiro sendo indispensável para resposta a vários tipos de microrganismos, ao dano celular, na resposta a substâncias tóxicas ou ambientais e a adjuvantes vacinais (ex.: alumínio,) desta forma sendo fundamental para ativação de células dendríticas e imunização (EISENBARTH et al., 2008; KOOL et al., 2008; LI et al., 2008). O NLRP3 responde a um amplo número de estímulos, sugerindo ser ativado por modificações citoplasmáticas induzidas pelos PAMPs (de origem tanto bacteriana quanto viral) e DAMPs, em vez de apenas pela interação direta com eles (LAMKANFI; DIXIT, 2014; TSCHOPP; SCHRODER, 2010).

A ativação de NLRP3 ainda não está totalmente estabelecida, porém alguns mecanismos são hoje universalmente aceitos. Entre eles, está o efluxo de K^+ causado por toxinas microbianas que criam poros na membrana plasmática (ex.: nigericina) ou pela ativação do receptor purinérgico P2X7 após aumento de ATP no meio extracelular, geralmente em consequência a dano tecidual e necrose (MUNOZ-PLANILLO et al., 2013; PETRILLI et al., 2007). Um segundo mecanismo proposto envolve a liberação de catepsinas lisossomais, em consequência a mecanismos de escape de patógenos fagocitados/endocitados ou por desestabilização do fagossomo por cristais ou partículas inorgânicas, seguido da ruptura lisossoma e liberação de catepsinas (HORNUNG et al., 2008; LAGE, S. L. et al., 2013). O terceiro evento reconhecido por ser capaz de ativar o receptor é a liberação de espécies reativas de oxigênio (HANEKLAUS; O'NEILL; COLL, 2013) e proteínas mitocondriais (SHIMADA et al., 2012) no citosol, em consequência ao dano mitocondrial causado tanto por toxinas microbianas quanto por substâncias tóxicas. Como um quarto mecanismo proposto temos o estresse do retículo

endoplasmático e mudanças nos níveis de Ca^{2+} citosólico (HANEKLAUS et al., 2013; MURAKAMI et al., 2012).

Figura 5 - Estrutura das moléculas envolvidas na ativação do inflamassoma NLRP3 e NAIP/NLRC4

(A) Proteínas que compõem os inflamassomas: NLRP3 - contém o domínio N-terminal de tipo pirínico/PYD, domínio NACHT de oligomerização (NBD), região de repetições ricas em leucina (LRR) ativado após reconhecimento de PAMPs e DAMPs como LPS+ATP e nigericina; NLRC4 - contém o domínio N-terminal de tipo CARD, NBD e LRR; NAIP contém o domínio N-terminal de tipo BIR ativado após reconhecimento de PAMPs como a flagelina bacteriana (FLG); ASC= molécula adaptadora; Pró-caspase-1 – Enzima contendo domínio CARD e duas subunidades (P10 e p20). (B) Na ativação por via não canônica, o LPS liberado no citoplasma liga-se às caspases -4 e -5 em humanos e -11 em camundongos. Essas caspases clivam a gasdermina D (GSDMD) e o fragmento N-terminal inicia a ativação do inflamassoma NLRP3, a maturação da citocinas IL-1β e IL-18 dependente de caspase-1 e piroptose. (C) Na ativação canônica do inflamassoma NLRP3, o primeiro sinal (*priming*) é fornecido pela ativação de PRRs em resposta a PAMPs ou DAMPs ou por receptores de citocinas como IL-1R ou TNFR, o que leva à transcrição de NLRP3, e das formas inativas de IL-1β e IL-18. O segundo sinal é induzido por agonistas de NLRP3 que alteram a homeostase celular, como produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), efluxo de K⁺ e ruptura lisossomal. O segundo sinal desencadeia a oligomerização desse sensor, o recrutamento de ASC e de pró-caspase. (D) A ativação do inflamassoma NLRC4 é iniciada após o reconhecimento da FLG pelo NAIP, o que induz uma alteração conformacional em NAIP e permite o recrutamento e oligomerização de NLRC4, o qual pode recrutar pró-caspase de forma direta ou sem a necessidade da molécula adaptadora ASC. A ativação dos inflamassomas leva à clivagem das formas pró-IL-1β e pró-IL-18 e de GSDMD, resultando na secreção de IL-1β, IL-18 e piroptose, respectivamente.

Fonte: autoria própria, REIS (2019) com inspiração em: (AWAD et al., 2018).

Por sua vez, o NLRC4, inicialmente descrito como o receptor citosólico da FLG, (FRANCHI et al., 2006; MARIATHASAN et al., 2004; MIAO et al., 2006), foi demonstrado ser o receptor do complexo NAIP: FLG (KOFOED; VANCE, 2011; LIGHTFIELD et al., 2011; ZHAO et al., 2011). A FLG, componente estrutural do flagelo, é uma proteína expressa por uma variedade de bactérias flageladas (*Salmonella typhimurium*, por exemplo) assim como

bactérias não flageladas (como, *Escherichia coli*). Quando levada ao citosol celular, através de sistemas de secreção do tipo III e IV, presentes em bactérias como *S. typhimurium* e *L. pneumophila*, respectivamente, a FLG é reconhecida pelo receptor de tipo NLR, Naip5, e induz a ativação inflamassoma NAIP/NLRC4 (KOFOED; VANCE, 2011; LIGHTFIELD et al., 2011; ZHAO et al., 2011) em camundongos, com consequente ativação da caspase-1, liberação das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18 e piroptose (FRANCHI; MUNOZ-PLANILLO; NUNEZ, 2012). É importante ressaltar que as células humanas possuem apenas um tipo de NAIP, o qual é capaz de ativar o inflamassoma NAIP/NLRC4 (KORTMANN; BRUBAKER; MONACK, 2015).

Enquanto NAIP liga-se diretamente à FLG, NLRC4 reconhece o complexo NAIP: FLG e ativa o inflamassoma NAIP/NLRC4, resultando na produção de IL-1 β e IL-18 (DIEBOLDER et al., 2015; HU et al., 2015; ZHANG, L. et al., 2015).

Uma vez que o receptor é ativado pelos PAMPs/DAMPs, ele recruta diretamente (se possuir um domínio CARD, como o NLRC4) ou indiretamente (pela interação de domínios PYD) através da proteína adaptadora chamada ASC (do inglês, “*apoptosis-associated speck-like protein containing a carboxy-terminal CARD*”) ou PYCARD (proteína que contém domínio PYD e domínio CARD), a caspase inflamatória, geralmente a caspase-1 (MARTINON; TSCHOPP, 2004). Sabe-se que ASC está envolvida na nucleação dos inflamassomas, sendo de fundamental importância para a formação “punctas” ou “specks”, que são agregados citoplasmáticos visualizados por microscopia óptica e que indicam ativação do complexo (STUTZ et al., 2013). Após a ativação desses receptores, a caspase inflamatória é recrutada, induzindo assim a ativação da via canônica do complexo inflamassoma (MARTINON et al., 2002).

O complexo assim formado ativa a caspase-1, que cliva a pró-IL-1 β e/ou pró-IL-18 nas suas formas biologicamente ativas (IL-1 β e IL-18) e a gasdermina D, molécula cujo fragmento de 30 kDa se insere na membrana plasmática formando poros e levando a liberação das citocinas e/ou a morte celular altamente inflamatória, conhecida como piroptose (BROZ; DIXIT, 2016; SHI, J. et al., 2015).

As vias alternativas e não canônicas para a ativação do inflamassoma foram descritas posteriormente. Nesse caso o LPS citosólico ativa diretamente as caspases inflamatórias -4 e -5 (-11 em camundongo), que podem clivar a gasdermina D ou ativar NLRP3 e/ou a caspase-1 (via não canônica de NLRP3). Por outro lado, a sinalização mediada por PRRs (tais como, TLRs e dectin-1) induz a ativação de caspase-8 podendo clivar a pró-IL-1 β diretamente ou

ativar NLRP3 e/ou NLRC4 e/ou a caspase-1 (via alternativa de ativação do inflamassoma) (LATZ; XIAO; STUTZ, 2013).

Os componentes do inflamassoma são expressos em células do sistema imune inato, tais como monócitos e DC, mas também em linfócitos, assim como em células não leucocitárias, como células epiteliais, endoteliais ou neurônios de forma constitutiva ou induzida através das vias de sinalização ativadas por PRRs e receptores para citocinas (ex.: IL-1R e TNFR) que culminam na ação dos fatores de transcrição NF- κ B ou IRFs (MANGAN et al., 2018). Por exemplo, o LPS é reconhecido pelo TLR4 que induz a transcrição de NLRP3 através do NF- κ B, enquanto que a FLG é reconhecida pelo TLR5 que promove a transcrição de NAIP e NLRC4 (HAYASHI et al., 2001; YOON et al., 2012).

Além dessa regulação a nível transcricional existem outros mecanismos que regulam a ativação do inflamassoma, tais como o miR-223 que inibe a tradução do mRNA do NLRP3 (BAUERNFEIND et al., 2012); modificações pós-transcricionais, tais como a deubiquitinação de NLRP3 e ASC, a nitrosilação de NLRP3 (LATZ et al., 2013), a fosforilação de NLRP3 por NEK (XU; LU; LI, 2016) e de NLRC4; a interação dos componentes do complexo com proteínas inibitórias, tais como CARD8, inibidor de NLRP3 (YANG, JIE; LIU; XIAO, 2016). A sinalização via IFN γ R1/2 inibe a expressão dos componentes do inflamassoma, em particular o NLRP3, e interfere com a ativação do complexo (GUARDA et al., 2011). Além disso, um trabalho demonstrou que IRF8 é um regulador transcricional de Naips em camundongos (KARKI et al., 2018).

A importância da regulação da ativação do inflamassoma pela homeostasia do indivíduo é destacada por patologias caracterizadas por inflamação estéril constitutiva e níveis elevados de IL-1 β e IL-18, como as assim chamadas síndromes autoinflamatórias; multifatoriais como gota, artrite reumatóide, aterosclerose e obesidade (MANGAN et al., 2018) ou monogênicas, como a síndrome periódica associada à crioprina (CAPS, OMIM: #120100) e a febre periódica autoinflamatória com enterocolite (AIFEC, OMIM: #616050), causadas por mutações autossômicas dominantes nos genes *NLRP3* e *NLRC4*, respectivamente.

1.9 DESREGULAÇÃO DO INFLAMASSOMA NOS INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HIV

Recentes descobertas apontaram para um papel importante do inflamassoma na

patogênese do HIV-1. Como mencionado anteriormente na seção de resposta imune, o inflamassoma está intimamente ligado a patogênese do HIV, desde o reconhecimento por receptores do inflamassoma, como IFI16 e NLRP3, até a instalação da infecção crônica e progressão para Aids.

Inicialmente, foi demonstrado por nosso grupo uma associação entre a variante polimórfica na região 3'UTR do gene *NLRP3*, que está associada a um aumento de estabilidade do RNA mensageiro (mRNA) do receptor (HITOMI, Y. et al., 2009), com proteção à infecção pelo HIV-1 (PONTILLO et al., 2010). Esse dado sugeriu que uma maior disponibilidade do NLRP3 resultaria em uma melhor resposta contra o vírus no momento da infecção, aumentando assim a chance de eliminação do vírus e diminuindo o risco de contrair a infecção.

Posteriormente, foi evidenciado que o HIV-1 é capaz de induzir a ativação do inflamassoma NLRP3 e a produção de IL-1 β em células dendríticas (PONTILLO; SILVA; et al., 2012). Além disso, foi demonstrado por outro trabalho que, em macrófagos, o reconhecimento do RNA viral aconteceria através de TRL8, que por sua vez ativaria o NLRP3 (GUO, H. et al., 2014).

Desta forma, o inflamassoma NLRP3 parece desempenhar uma das primeiras respostas ao HIV, assim como reconhecimento via TLR, contribuindo para a resposta imune de uma maneira benéfica no início da infecção (ESPINDOLA et al., 2016). Por outro lado, o papel do complexo após o estabelecimento da infecção ainda não está totalmente esclarecido.

Foi observado um aumento dos níveis basais de ativação de caspase-1 nas células mononucleadas de sangue periférico (PBMC, do inglês "*Peripheral Blood Mononuclear Cells*") em indivíduos cronicamente infectados pelo HIV-1 (FERIA; TABORDA, 2018). Acredita-se que DAMPs e outros fatores produzidos durante fase crônica da infecção, e não apenas o vírus, possam ativar o inflamassoma e contribuir para a sustentação da inflamação, representando um notável papel na patogênese das doenças inflamatórias associadas à infecção, mesmo na presença de ART (HERNANDEZ; LATZ; URCUQUI-INCHIMA, 2014).

Além do envolvimento na inflamação crônica, o inflamassoma foi apontado também como fator influenciador da perda de linfócitos durante a infecção pelo HIV, contribuindo assim para a progressão para Aids. Foi demonstrado que o acúmulo de transcritos reversos incompletos durante a replicação do HIV-1 no citosol de linfócitos T CD4⁺ nos órgãos linfoides secundários ("infecção abortiva") ativa a caspase-1 através de um outro receptor, o sensor citoplasmático de DNA, IFI16, consequentemente causando a morte dos linfócitos por piroptose (MONROE et al., 2014).

Por outro lado foi demonstrado que, em monócitos e células dendríticas de indivíduos

infectados pelo HIV, o inflamassoma NLRP3 está constitutivamente ativado. No entanto, quando esse inflamassoma é requerido na resposta a PAMPs (ex. LPS) e DAMPs (ex.: ATP) é vista uma falha nessa ativação (INCALCATERRA et al., 2010; PONTILLO et al., 2010; PONTILLO; OSHIRO; et al., 2012). Vale lembrar que os indivíduos infectados pelo HIV apresentam níveis de IL-18 alterados quando comparados com indivíduos não-infectados, sugerindo assim uma desregulação na ativação do inflamassoma (AHMAD et al., 2002; SAMARANI et al., 2016). Esses achados sugerem que a exaustão imune observada nos indivíduos infectados pelo HIV possa envolver a resposta inata também e, dessa forma, afetar a suscetibilidade à infecções assim como a resposta aos desafios vacinais.

Levando em consideração que variantes polimórficas nos genes do inflamassoma estão associadas a diferentes níveis de ativação constitutiva do complexo (ganho ou perda de função) e a heterogeneidade na progressão vista nos indivíduos infectados pelo HIV, acredita-se que o background genético possa contribuir para a evolução clínica. Nesse contexto, algumas variantes nos genes do inflamassoma já foram associadas a susceptibilidade à infecção pelo HIV-1 e a progressão à Aids (INCALCATERRA et al., 2010; PONTILLO et al., 2010; PONTILLO; OSHIRO; et al., 2012).

Desde 2012, foi nos dada a oportunidade de acompanhar um ensaio clínico de vacina terapêutica baseada em células dendríticas para indivíduos cronicamente infectados pelo HIV, desenvolvido pelo grupo da Dra. Telma Oshiro e Prof. Alberto JS Duarte da Faculdade de Medicina da USP. O objetivo desse ensaio de fase I/II era primordialmente verificar a segurança do protocolo e concomitantemente tentar reproduzir os resultados obtidos em 2004 numa coorte de indivíduos infectados pelo HIV de Recife (PE) por um grupo franco-brasileiro (LU et al., 2004). Esse ensaio clínico anterior resultou em uma resposta positiva de 8 dos 18 tratados, ou seja, quase a metade dos indivíduos tratados com DC autólogas pulsadas com vírus inativado conseguiram controlar a CVP por mais de um ano, na ausência de outro tipo de terapia.

Essa resposta parcial dos indivíduos infectados pelo HIV e tratados despertou o interesse do nosso grupo de pesquisa que começou a indagar os possíveis fatores relacionados a essa diferente resposta à imunização, entre eles a genética do hospedeiro e a qualidade das DC utilizadas para imunoterapia.

Dessa forma, já foi visto que a genética do hospedeiro pode associar-se com uma resistência à infecção por HIV-1, e/ou a um menor risco de desenvolver Aids, como, por exemplo, variantes em PARD3B, CCL5, CCR2, RANTES, HLA-B27 e -B57 (AN; WINKLER, 2010; O'BRIEN; GAO; CARRINGTON, 2001; TROYER et al., 2011) poderiam estar afetando também a resposta à imunoterapia. Além disso, variantes nos genes do inflamassoma previamente associadas à suscetibilidade a infecção pelo HIV-1 como rs10754558 em NLRP3 (PONTILLO et al., 2010) ou risco de desenvolver Aids como rs1417806 em IFI16 (BOOIMAN; KOOTSTRA, 2014) poderiam afetar também a resposta à vacina terapêutica.

Por outro lado, a parcialidade de resposta exibida pelo indivíduos infectados pelo HIV e tratados com a imunoterapia poderia ser resultado do comprometimento das próprias DC utilizadas no tratamento, como amplamente discutido por vários autores (GARCIA; ROUTY, 2011; WU, LI; KEWALRAMANI, VINEET N., 2006).

De acordo com os estudos que demonstraram que o inflamassoma NLRP3 está envolvido na completa ativação de DC por adjuvantes vacinais (KOOL et al., 2008; LI et al., 2008), nosso grupo demonstrou que DC de indivíduos infectados pelo HIV apresentam uma insuficiente ativação do inflamassoma NLRP3 (PONTILLO; SILVA; et al., 2012). Isso sugere que o defeito em NLRP3 poderia, pelo menos em parte, explicar a incapacidade das DC em induzir uma resposta eficiente nos indivíduos infectados pelo HIV que foram tratados com a imunoterapia de DC.

Partindo dessa observação percebemos a necessidade de implementar novas estratégias para tentar reverter o baixo nível de ativação do inflamassoma e melhorar o estado de ativação

das DC de indivíduos infectados pelo HIV. Dessa forma, essa estratégia poderia auxiliar tanto a resposta desses indivíduos quanto o desenvolvimento de imunoterapias e imunizações profiláticas comuns.

Para melhorar o desenvolvimento de vacinas, novas estratégias têm sido propostas, como o uso de agonistas PRRs, como LPS ou FLG, como adjuvantes vacinais, como foi amplamente revisado por HAJAM e colaboradores (HAJAM et al., 2017). A FLG já foi estudada como possível adjuvante em diversos estudos de imunoterapia (HULEATT et al., 2007; MCDONALD et al., 2007; MCEWEN et al., 1992) e utilizada como adjuvante em vários ensaios clínicos (TREANOR et al., 2010; TURLEY et al., 2011). No entanto, até onde se sabe, não existem dados disponíveis sobre a sua capacidade de ativar DC em indivíduos infectados pelo HIV.

Como é conhecido na literatura e detalhado na seção anterior desse trabalho, diferentemente do LPS ou outros PAMPs que são capazes de ativar o NLRP3, a FLG ativa o inflamassoma através de NAIP/NLRC4. Logo, levantou-se a hipótese de que a FLG poderia ser uma opção promissora na tentativa de contornar o defeito de NLRP3 e restabelecer a ativação do inflamassoma das DC de indivíduos infectados pelo HIV e, desta forma, melhorar a resposta à imunização desses pacientes.

Além disso, considerando que variantes genéticas já foram associadas com a resposta à imunização em indivíduos infectados pelo HIV (PONTILLO et al., 2014; REIS et al., 2018) e que indivíduos com maior expressão de TRL5, o que favorece a resposta à FLG, respondem melhor à vacina profilática, como a de influenza, (NAKAYA et al., 2011; OH et al., 2014), levantamos a hipótese que variantes genéticas nas vias do inflamassoma envolvidas com a resposta à FLG poderiam estar associadas com a resposta à imunoterapia baseada em DC e com uma melhor apresentação clínica em indivíduos infectados pelo HIV.

Nesse contexto, o desenvolvimento desse projeto visou compreender como a FLG ativa o inflamassoma em células humanas, especificamente em DC derivadas de monócitos, e fornecer evidências sobre o uso da FLG como adjuvante, abrindo caminhos para o aperfeiçoamento da vacina terapêutica em indivíduos infectados pelo HIV e como o *background* genético pode influenciar nessa resposta.

Figura 6 - Desenho esquemático da hipótese de trabalho

Indivíduos infectados pelo HIV possuem ativação constitutiva do inflamassoma e produzem altos níveis de IL-1 β . Células dendríticas desses indivíduos não se ativam corretamente frente a agonistas como LPS. Essa diminuída ativação de NLRP3 frente a seus agonistas pode estar associada com a inflamação crônica e consequente exaustão imune vista nesses indivíduos. Nossa hipótese é que a flagelina pode resgatar a ativação do inflamassoma em células dendríticas através dos receptores NAIP/NLRC4.

Fonte: autoria própria, REIS (2019).

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar células dendríticas derivadas de monócitos (DC) de indivíduos infectados pelo HIV-1 frente à flagelina (FLG) com relação a aspectos fenotípicos e funcionais e avaliar se essas células são capazes de ativar o inflamassoma.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudar o mecanismo de ação da FLG em DC humanas;
2. Avaliar o efeito da FLG em DC de indivíduos infectados pelo HIV;
3. Avaliar a capacidade de DC estimuladas com FLG em induzir resposta específica de linfócitos *in vitro*;
4. Avaliar o perfil genético e epigenético de DC desafiadas com FLG;
5. Genotipar genes de resposta à FLG em indivíduos infectados pelo HIV, como NLRC4 e NLRP3;
6. Comparar a capacidade adjuvante da FLG em DC obtidas de doadores saudáveis e indivíduos infectados pelo HIV e relacioná-la com marcadores genéticos ou epigenéticos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DESENHO DO ESTUDO

No desenho do estudo geral (**Figura 7**), os focos de análises consistem tanto na parte genética quanto funcional de células estimuladas com FLG e LPS de indivíduos infectados pelo HIV, e eventualmente, a comparação com indivíduos saudáveis (controle).

Figura 7 - Representação esquemática do trabalho

Na figura estão representados os indivíduos saudáveis e infectados pelo HIV. Células mononucleares de sangue periférico foram isoladas por meio de um gradiente de densidade e monócitos isolados pelo método de adesão em plástico. Os monócitos foram diferenciados em células dendríticas utilizando GM-CSF e IL-4 por 5 dias. Após isso, essas células foram estimuladas com LPS ou flagelina (FLG) ou LPS+ATP. Essas células foram utilizadas para avaliação do perfil fenotípico por citometria de fluxo, avaliação da clivagem da caspase-1 por FAM-FLICA, imunofluorescência para os receptores do inflamassoma ou lisadas para extração de RNA e expressão gênica. Os sobrenadantes foram utilizados para dosagem de citocinas. Além disso, essas células foram utilizadas para ensaios de cocultivo com linfócitos autólogos para avaliação da produção de IFN- γ e proliferação e silenciadas para comprovar a participação dos receptores na resposta imune. Dos indivíduos também foram separadas amostras para extração de DNA e genotipagem.

Fonte: autoria própria, REIS (2019).

4.2 INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HIV

300 indivíduos cronicamente infectados por HIV-1 (187 homens /113 mulheres) procedentes da área metropolitana da região de São Paulo, foram recrutados na Casa da Aids (SEAP - Serviço de Extensão ao Atendimento de Pessoas que vivem com HIV/Aids), após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido aprovado pela CAPPesq e pelo Comitê de Ética em Pesquisas em Seres humanos do ICB (parecer no 1263/CEPSH; 11/12/2015).

Foram coletadas amostras por conveniência em dias e períodos variados, tanto para os ensaios genéticos (4 mL em tubos com EDTA) quanto para os funcionais (50 mL em tubos com heparina).

Os critérios de inclusão compreendiam idade mínima de 18 anos ($52,22 \text{ anos} \pm 10,95$); soropositividade para o HIV-1 de pelo menos 1 ano ($19,43 \text{ anos} \pm 5,74$).

Para os estudos funcionais os critérios de inclusão compreendiam também contagem de linfócitos T CD4⁺ de no mínimo 500 células/mm³ ($403,9 \text{ células/mm}^3 \pm 229,5$), ausência de sinais clínicos de Aids, e presença de quaisquer doenças crônicas (autoimunidade, cardiovascular, renal, obesidade, câncer) e ausência de coinfeções, tais como HTLV, Hepatite C, Hepatite B, Herpes, Citomegalovírus, Sífilis.

Outros dados desses indivíduos incluíam: uma média de tratamento com ART de $0,85 \text{ anos} \pm 1,94$; uma contagem de linfócitos T CD4⁺ antes do tratamento de $322,5 \text{ células/mm}^3 \pm 278,3$; uma CVP antes do tratamento de $4,55 \log_{10} \text{ cópias/mm}^3 \pm 1,10$ e CVP após o tratamento de $\leq 1,7 \log_{10} \text{ cópias/mm}^3$.

A partir dos prontuários dos pacientes, dados sócio-demográficos (idade, sexo) e clínicos (nível de linfócitos T CD4⁺ no sangue periférico e CVP antes e após introdução da terapia antirretroviral; presença de coinfeções, tais como HTLV, Hepatite C, Hepatite B, Herpes, Citomegalovírus, Sífilis; ocorrência de falha terapêutica e eventual genotipagem viral), foram coletados e incluídos em uma planilha de Excel, e em um banco de dados criado no software Epi Info 7.0 do “*Centers for Disease Control and Prevention*”; obedecendo às normas de bioética em pesquisa, como confidencialidade das informações obtidas dos indivíduos incluídos na pesquisa.

No APÊNDICE A são resumidas as principais informações demográficas e clínicas dos 30 indivíduos incluídos no estudo funcional.

4.3 INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HIV SUBMETIDOS À VACINA TERAPÊUTICA

Em algumas análises foram utilizadas amostras de DNA genômico e dados de uma coorte de indivíduos infectados pelo HIV submetidos à imunoterapia baseada em células dendríticas (ensaio clínico fase I/II), NCT02766049 (ClinicalTrials.gov). Os indivíduos vacinados eram adultos ($34,37 \pm 7,97$ anos), soropositivos por no mínimo 5 anos ($8,37 \pm 2,16$), sem nunca ter realizado tratamento antirretroviral, sem sinais clínicos de Aids ou outras doenças, com contagem de linfócitos T CD4⁺ > 350 células/mm³, e CVP > 1000 cópias/mm³ de HIV antes do início da imunização, procedentes da área metropolitana de São Paulo. Eles foram vacinados com três doses de $3-30 \times 10^6$ células dendríticas pulsadas com o vírus autólogo intervalo de 2 semanas (em acordo com o ensaio clínico de fase I) (LU et al., 2004) e seguidos por 1 ano. A imunização se mostrou segura sem efeitos adversos, mas com um modesto efeito em CVP e contagem de linfócitos T CD4⁺. É importante ressaltar que esses dados funcionais e de genotipagem foram obtidos durante meu mestrado e, nesse momento, esses dados foram reanalisados focando nos objetivos do atual trabalho e corroboração da hipótese de trabalho.

4.4 INDIVÍDUOS SADIOS

30 adultos indivíduos (16 homens /14 mulheres; $51,46 \pm 11,92$ anos) foram incluídos no estudo. Esses indivíduos foram recrutados pelo Instituto de Hemoterapia do Hospital Alemão Oswaldo Cruz para procedimento de plasmaférese e o excedente do material biológico, caracterizado por câmaras de leucorredução (LRS) (do inglês, *Leucocyte Reduction System*) contendo concentrados de leucócitos obtidos após o procedimento, foi utilizado para o isolamento de células.

Os doadores, com idade mínima de 18 anos e soronegatividade para HIV, eram procedentes da área metropolitana da região de São Paulo (SP, Brasil) e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido aprovado pelo comitê de ética do instituto, para doação das câmaras LRS. Como critérios de exclusão, aplicamos os seguintes: doadores que apresentavam sinais aparentes de infecções virais, bacterianas e fúngicas e que estivessem fazendo uso de medicamentos anti-inflamatórios.

4.5 OBTENÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE MONÓCITOS

As células mononucleares de sangue periférico, as PBMC, foram obtidas a partir da amostra de sangue total (50 mL diluídas 1:2 em PBS (Sigma-Aldrich, ST-EUA), utilizando o Ficoll-Paque (GE healthcare, Biosciences, NC-USA) pelo método de gradiente de densidade, de acordo com as instruções do fabricante. As PBMC assim obtidas foram lavadas a 250 x g por 10 minutos, ressuspensas em meio de cultura RPMI-1640 (Gibco/Thermo Fisher Scientific, MA-EUA), quantificadas e avaliadas por microscopia óptica para o cálculo da viabilidade celular em câmara de Neubauer utilizando o corante vital azul de *Trypan* 0,4% (Sigma-Aldrich).

Os monócitos foram separados das outras células mononucleadas (prevalentemente linfócitos) por adesão em superfície plástica. Logo, 4×10^6 PBMC/mL foram distribuídas em placa de cultura (Corning, MA-EUA) de 24 poços (1 mL/poço) ou em placa de 96 poços (0,2 mL/poço) e incubadas a 37°C e 5% CO₂ por 2 horas.

Em seguida, as células não-aderentes foram retiradas por meio de 3 lavagens com PBS, e os monócitos aderidos cultivados por 5 dias em RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino/SFB (Gibco-Thermo Fisher Scientific) acrescido de 50 ng/mL IL-4 e 50 ng/mL GM-CSF (Peprotech, NJ-EUA) para obtenção das células dendríticas (DC). No final do protocolo eram recuperadas 2×10^5 células/mL. A análise dos marcadores de DC por fenotipagem e viabilidade foi efetuada (como descrito a seguir) para demonstrar a qualidade das células diferenciadas.

O restante de células não aderentes, predominantemente linfócitos, foi quantificado. Alíquotas de 1×10^8 células/mL foram congeladas em soro fetal bovino (SFB; Gibco/Thermo Fisher) contendo 10% de dimetil sulfoxido (DMSO; Sigma-Aldrich) para a utilização em ensaios de cocultivo com as DC. As células foram conservadas em -80° C por até 7 dias.

As DC de indivíduos sadios foram chamadas de HD-DC e as de indivíduos infectados pelo HIV de HIV-DC neste trabalho.

4.6 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

Para a análise do perfil morfológico das DC as imagens foram capturadas com o auxílio da câmera de microscopia digital Moticam 1000 1.3 M Pixel USB 2.0 conectada a um computador.

Para verificar a diferenciação monócitos/DC, foram avaliados os marcadores morfológicos nos monócitos e DC em cultura. Na **Figura 8** é reportada a análise morfológica relativa a monócitos e DC de 1 indivíduo controle como representativa dos outros experimentos. É possível observar o aspecto arredondado dos monócitos (**Figura 8A**) e uma morfologia mais espalhada, com a presença de dendritos na superfície celular nas DC e estruturas fusiformes (**Figura 8B**).

Figura 8 - Análise morfológica das DC

Microscopia ótica de monócitos isolados de sangue periférico de indivíduo-controle (A) e células dendríticas imaturas do mesmo indivíduo após 5 dias de cultivo (B). É mostrado um aumento de 200x.

Com base nas fotografias obtidas foi possível observar que monócitos e as DC apresentam-se arredondadas. Sendo que as DC perdem um pouco essa característica após 5 dias, tornando-se mais espalhadas, o que é característico da diferenciação em células dendríticas imaturas.

4.7 FENOTIPAGEM DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS ATRAVÉS DE CITOMETRIA DE FLUXO

Para verificar a diferenciação monócitos/DC, foram avaliados os marcadores fenotípicos (CD14, CD11c, HLA-DR, DC-SIGN/CD209) nos monócitos e DC em cultura através da marcação fluorescente de moléculas de superfície e citometria de fluxo. Da mesma forma, para avaliar o estado de ativação das DC foi medido o nível de expressão de marcadores

de ativação (HLA-DR, CD40, CD86). Todos os anticorpos foram titulados previamente como descrito no APÊNDICE B.

Portanto, as DC foram coletadas da placa de cultura após incubação com tampão fosfato salino (PBS; Sigma-Aldrich) 1% 0,5mM EDTA (solução de “Rinse”) a 37°C 5% CO₂ por 15 minutos, e em seguida lavadas em PBS. 2x10⁵ DC/mL foram marcadas com anticorpos monoclonais fluorescentes contra as moléculas de superfície selecionadas, de acordo com o protocolo otimizado no laboratório para esses ensaios, como descrito a seguir. Os anticorpos utilizados e seus respectivos fluorocromos estão listados na **Tabela 1**.

As células foram incubadas com os anticorpos por 20 minutos a 4° C, lavadas por duas vezes com PBS e ressuspensas em 200 µL de PBS com 4% Formaldeído.

Tabela 1 - Anticorpos monoclonais utilizados para análise fenotípica das células dendríticas derivadas de monócitos

Especificidade	Clone	Fluorocromo	Fabricante
CD14	MEM15	PE	Exbio
CD11c	3.9	FITC	Biolegend
CD40	5C3	Horizon 450	BD
CD86	2331 (FUN-1)	Pe-Cy7	BD
CD209	DCN46	APC	BD
HLA-DR	G46-6	V500	BD

Os marcadores identificados (especificidade), os clones do anticorpo monoclonal, o tipo de fluorocromo e o fabricante são reportados. BD= BD Bioscience®.

Em seguida, as células foram analisadas em citômetro de fluxo BD FACSCanto II (BD Bioscience®, CA-EUA) ou eventualmente BD LSR FORTRESSA (BD Bioscience®) usando o software FACSDiva (BD Biosciences).

Para a exclusão de células mortas, antes de receberem anticorpos monoclonais, as DC foram primeiramente incubadas com o marcador de viabilidade Live/Dead Fixable Aqua stain (Life Technologies/Thermo Fisher Scientific, MA-EUA) ou Fixable Green stain (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific), dependendo do painel estudado. Seguindo as recomendações do fabricante, as células foram incubadas por 30 minutos a 4 °C com 0,2 µL do marcador de viabilidade diluído em 500 µL de PBS por tubo de células. Em seguida, as amostras

foram lavadas duas vezes (600 x g por 5 minutos à temperatura ambiente) com 500 µL de PBS. Finalizada esta etapa, as células receberam os marcadores direcionados à superfície e/ou intracelulares, como será mencionado em seções posteriores.

Um mínimo de 50000 eventos foi adquirido. Os dados foram analisados usando o software FlowJo (Tree Star®, OR-EUA) e apresentados como porcentagem de células positivas (%) ou como mediana da intensidade de fluorescência (MFI).

4.8 CONFIRMAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO *IN VITRO* MONÓCITOS-DC

Para verificar a diferenciação monócitos/DC, foi avaliada a expressão dos marcadores CD14 e CD11c nos monócitos e DC, como descrito anteriormente.

A análise fenotípica de marcadores específicos comprova que o processo de diferenciação dos monócitos em DC foi bem-sucedido vista a expressão de CD11c e diminuição significativa da expressão do marcador de monócitos CD14 nas DC imaturas ($p=0,003$) (Figura 9).

Figura 9 - Análise fenotípica de monócitos e DC por citometria de fluxo

Porcentagem (%) (A) e mediana da intensidade de fluorescência (MFI) (B) de monócitos e células dendríticas de 3 indivíduos-controle expressando as moléculas de superfície CD11c e CD14. Comparações estatísticas foram feitas por teste t $*p<0.05$.

Os demais marcadores de superfície foram vistos seguindo a estratégia de *gate* representada na **figura 10**. A partir dessa análise, foram estudados os marcadores de interesse descritos posteriormente na seção de resultados.

Figura 10 - Estratégia de *gate* para definição de marcadores fenotípicos e funcionais de células dendríticas

Primeiramente, foi utilizada a estratégia de *gate* PE-Cy7/PE-Cy5/PE versus Time a fim de eliminar possíveis variações dos lasers que tenham ocorrido durante a aquisição das amostras. A população de dendríticas foi determinada com base em SSC-A x FSC-A. Em seguida, um *gate* foi desenhado na população de células vivas utilizando a estratégia SSC x Live/Dead. Foram definidas as células CD11c+, a partir daí foram definidas as porcentagens e mediana da intensidade de fluorescência (MFI) dos demais marcadores imunofenotípicos ou funcionais estudados. A delimitação dos *gates* de dendríticas positivas para cada marcador foi feita com o auxílio do controle FMO (fluorescência menos um, do inglês, “*Fluorescence Minus One*”).

4.9 ENSAIOS DE ATIVAÇÃO DO INFLAMASSOMA EM CÉLULAS DENDRÍTICAS

Para avaliar a ativação do NLRP3 e/ou NAIP/NLRC4 inflamassoma, foi medida a produção de IL-1 β no sobrenadante de cultura das DC após desafios específicos. As DC foram estimuladas com 1 μ g/mL LPS (de *Escherichia coli* cepa 0111: B4; Sigma-Aldrich) por 3, 8, 18 e 24 horas.

Para ativação do NAIP/NLRC4 inflamassoma as DC foram estimuladas com 5 μ g/mL flagelina (FLG) da bactéria gram-negativa *Salmonella typhimurium* em duas diferentes preparações, standard (ST) e ultrapure (ambas da InvivoGen, CA-EUA), de acordo com o protocolo de ativação para monócitos e macrófagos humanos (CANNA et al., 2014) por 3, 8, 18 e 24 horas. Segundo o fabricante, a diferença entre as duas formulações é o grau de pureza, sendo a FLA-ST em torno de 10% e a FLA-ST Ultrapure >95%. Enquanto que a standard é purificada por hidrólise ácida, aquecimento e ultrafiltração, a ultrapura tem uma etapa adicional de cromatografia, utilizando anticorpo monoclonal específico anti-FliC. Mesmo a pureza da standard sendo baixa, o fabricante afirma que o nível de endotoxina é de 1-10 EU/ μ g (unidade de endotoxina por micrograma).

Em alguns experimentos:

- as DC foram pré-tratadas (“*priming*”) com 1 μ g/mL LPS por 4 horas, seguidos de 2 horas de estimulação com 5 μ g/mL FLG (CANNA et al., 2014);

- 1mM ATP (Sigma-Aldrich) foi adicionado nos últimos 15 minutos de tempo de incubação dos estímulos para verificar a participação do efluxo de K^+ dependente de ATP e mediado por P2X7; de acordo com o protocolo para ativação do NLRP3-inflamassoma em monócitos humanos (GATTORNO et al., 2007);

- 10 μ M Parthenolide (Sigma-Aldrich) foi adicionado 15 minutos antes da estimulação das DC para verificar a participação do inflamassoma na estimulação com FLG, de acordo com o protocolo proposto por (JULIANA et al., 2010);

- MCC-950 (Invivogen) foi adicionado 1 hora antes da estimulação das DC para verificar a participação do inflamassoma NLRP3 na estimulação com FLG, de acordo com o protocolo proposto por (COLL et al., 2015);

- as DC foram estimuladas em meio contendo 130 mM KCl (Sigma-Aldrich), (elevada concentração de K^+ extracelular), para verificar a participação do efluxo de K^+ dependente de ATP e mediado por P2X7, de acordo com o protocolo proposto por (MUNOZ-PLANILLO et al., 2013; PETRILLI et al., 2007; TSCHOPP; SCHRODER, 2010);

- as DC foram estimuladas em meio contendo 130 mM NaCl (Sigma-Aldrich), (elevada concentração de cloreto de sódio extracelular), para verificar se a participação o efeito do efluxo de K^+ dependente de ATP é específico, de acordo com o protocolo proposto por (MUNOZ-PLANILLO et al., 2013);

- as DC foram estimuladas com 4 μ g/mL CpG 2395 (InvivoGen), um agonista de TLR9 que não ativa diretamente o inflamassoma, como controle negativo de ativação do complexo, de acordo com (MARTINSON et al., 2007);

- as DC foram estimuladas com 20 μ g/mL Poly I: C (InvivoGen), um agonista de TLR3 que não ativa diretamente o inflamassoma, como controle negativo de ativação do complexo, de acordo com (LUNDBERG et al., 2007) por 48 horas;

- as DC foram estimuladas com 1 μ g/mL Poly dA: dT (InvivoGen), um agonista de AIM2, como controle de especificidade de ativação do complexo, de acordo com o fabricante;

- as DC foram estimuladas com Nigericina 10 μ g/mL (Invivogen), um agonista de NLRP3, de acordo com o protocolo proposto por (SHI, H.; WANG; LI; ZHAN; TANG; et al., 2016);

- as DC foram estimuladas por 18 horas com 1000 UI/mL de IFN- α -2b (Schering-Plough, NJ-EUA) um forte indutor de genes estimulados por interferon e com ação anti-viral e inibitória de NLRP3 (GUARDA et al., 2011; SIMMONS et al., 2012);

- $2,6 \times 10^6$ partículas de HIV-1 inativado com aldrithiol-2 (AT-2) foram adicionadas às DC em placa de 24 poços por 4 horas antes dos estímulos com LPS ou FLG, simulando em parte uma infecção aguda por HIV-1 (PONTILLO; SILVA; et al., 2012).

Após os estímulos, os sobrenadantes de cultura das DC foram coletados para a detecção de citocinas; as células marcadas para avaliação de clivagem de caspase, imunofluorescência, imunofenotipagem, ensaios de cocultivo por citometria de fluxo, utilizadas para silenciamento ou lisadas com 150 µl/poço de Lysis Buffer (Ambion-Thermo Fisher Scientific) e armazenadas a -80°C para posterior extração de RNA e avaliação da expressão gênica.

4.10 DETECÇÃO DE CITOCINAS POR ELISA

A concentração das citocinas IL-1 β , IL-18, IL-18BP, IL-6, TNF- α e IL-12p70 nos sobrenadantes de cultura obtidos após a estimulação foi determinada por ELISA com os kits Human ELISA MAXTM Deluxe (Biolegend, CA-EUA) para IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-18BP; Human Total IL-18 DuoSet da R&D (R&D, MN-EUA) para IL-18; Ready-SET-Go!- (eBioscience®/Thermo Fisher Scientific) para IL-12p70; IFN- α (PBL Assay Science, NJ-EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Os dados foram reportados como pg/mL.

4.11 DETECÇÃO DA ATIVAÇÃO DE CASPASE-1

Foram marcadas 2×10^5 células com FAM-FLICA após a estimulação por 24 horas com FLG (5 µg/mL), de acordo com as instruções do fabricante (FAM-FLICA KIT; Immunochemistry Technologies, MN-EUA) por 1 hora a 37°C, 5% CO₂. Após isso a clivagem de caspase-1/ativação foi medida no citômetro LSRFortessaTM X-20 (BD Biosciences). O marcador de viabilidade Live/Dead Fixable Cell Stain Kit (Life Technology/Thermo Fisher Scientific) foi utilizado de acordo com as instruções do fabricante. Dentro do *gate* característico de tamanho e granulosidade de DC, cerca de 50000 eventos foram adquiridos com o software DIVA® (BD Biosciences®). Os dados brutos obtidos foram analisados com o auxílio do software FlowJo (Tree Star). Os dados analisados foram apresentados como porcentagem de células positivas (%).

4.12 AVALIAÇÃO DA PORCENTAGEM DE CITOTOXICIDADE

A quantidade de lactato desidrogenase (LDH) liberada pelas células tratadas com os estímulos LPS, LPS+ATP e FLG foi avaliada utilizando um kit específico Pierce™ LDH Citotoxicity Assay Kit (Thermo Fisher Scientific), e realizado de acordo com o protocolo do fabricante. O sinal de leitura medido pela absorbância foi realizado em espectrofotômetro de microplacas (SpectraMax, Molecular Device, CA-EUA) utilizando o filtro de 490nm e 680nm. Os dados analisados foram apresentados como porcentagem de citotoxicidade (%).

4.13 DETECÇÃO DE AGREGADOS DE ASC (“SPECKS”) POR IMUNOFLOURESCÊNCIA

Cerca de 2×10^5 DC foram cultivadas em lâminas para imunofluorescência do tipo “*chamber slide*” (Thermo Fisher Scientific) e estimuladas com 5 µg/mL FLG por 24 horas a 37°C em 5% CO₂. Depois da incubação, as células foram imediatamente fixadas e permeabilizadas com Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) por 30 minutos a 37°C em 5% CO₂. As amostras foram então incubadas *overnight* à temperatura ambiente com o anticorpo primário para NLRP3 (1:100 camundongo-anti-NLRP3 humano, Abcam) e/ou para NLRC4 (1:200 coelho-anti-NLRC4 humano; Biolegend); e então com 1 µg/mL do anticorpo secundário (IgG1 de cabra anti-camundongo conjugado com Alexa 488; IgG1 cabra anti-coelho conjugado com Alexa 647, respectivamente) por 1 hora. O corante 4',6-Diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride (DAPI; Sigma-Aldrich) foi usado para marcação do núcleo. A aquisição de imagens foi realizada no Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan (São Paulo, SP, Brasil) pelo microscópio confocal DMi8 equipado com câmera digital DFC310 FX (Leica, Alemanha). O software ImageJ (v1.51) e plugins relacionados (National Institutes of Health, ML-EUA) foram utilizados para o processamento de imagens e colocalização. A magnitude da fluorescência para cada marcador foi calculada como fluorescência total celular corrigida (CTCF) = densidade integrada - (área da célula selecionada × média da fluorescência das leituras do *background*) (MCCLOY et al., 2014).

4.14 ISOLAMENTO DE RNA E ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA RELATIVA ATRAVÉS DE SONDAS FLUORESCENTES GENE ESPECÍFICAS E QPCR

O RNA total foi isolado de 2×10^5 DC usando o kitRNAqueous-Micro (Ambion, Thermo Fisher Scientific), de acordo com as instruções do fabricante, e quantificado usando Nanodrop N-1000 (Agilent). 0,5 µg de RNA total foi convertido em cDNA usando o kit Superscript III One-step (Applied Biosystems, CA-EUA). Os genes *GAPDH*, *NLRP1*, *NLRP3*, *NAIP*, *NLRC4*, *CASP1*, *IL1B*, *IL18*, *BRCC3*, *NEDD8* e *CARD8* foram amplificados usando sonda fluorogênicas do tipo TaqMan® (Applied Biosystems) e qPCR no aparelho QuantStudio 3.0 Real-Time PCR (Applied Biosystems). Enquanto que para o gene *PYCARD/ASC* foram utilizados primers F: AAGCCAGGCCTGCACTTTAT/R: CTGGTACTGCTCATCCGTCA e SYBR green (**Tabela 2**).

Tabela 2- Sondas de expressão gênica utilizadas para análise das células dendríticas

Gene	ID sonda de expressão	Localização no cromossomo
<i>GAPDH</i>	hs02758991	Chr.12: 6534405 - 6538375
<i>NLRP1</i>	hs00248187	Chr.17: 5501399 - 5584512
<i>NLRP3</i>	hs00366465	Chr.1: 247416156 - 247449108
<i>NLRC4</i>	hs00368367	Chr.2: 32224449 - 32265743
<i>NAIP</i>	hs03037952	Chr.5: 70968483 - 71025114
<i>CASP1</i>	hs00354836	Chr.11: 105025508 - 105035591
<i>IL18</i>	hs01038788	Chr.11: 112143251 - 112164117
<i>IL1B</i>	hs01555410	Chr.2: 112829758 - 112836842
<i>BRCC3</i>	hs02386484	Chr.X: 155071403 - 155126766
<i>NEDD8</i>	hs01921826	Chr.14: 24216851 - 24232370
<i>CARD8</i>	hs01088221	Chr.19: 48203148 - 48256269
miR-223	hsa-miR-223-3p	ChrX :66018870-66018979

O software QuantStudio 3.0 foi usado para obter os valores de cycle threshold (Ct) para análise de expressão gênica relativa de acordo ao método de Fold Change (FC) (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008). Os dados brutos (Ct) foram normalizados com a expressão do gene endógeno glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase/GAPDH (ΔCt), e o FC foi calculado comparando as condições estimulado e não estimulado (NE) ($FC = 2^{-\Delta \Delta Ct}$; $\Delta \Delta Ct = \Delta Ct_{estimulado} - \Delta Ct_{NE}$). Alguns genes foram utilizados para avaliação da expressão basal, como é o caso dos genes *NLRP3*, *NAIP*, *ASC (PYCARD)*, *CASP1*, *NLRC4*, *IL1B* e *IL18*. Além

disso, foram analisadas as expressões basais de reguladores negativos do NLRP3, como miR-223, BRCC3, NEDD8 e CARD8 para averiguar se existia uma diferente expressão entre HD-DC e HIV-DC.

No entanto para a avaliação da expressão basal do miR-223, o RNA total foi isolado a partir de 2×10^6 leucócitos isolados e lisados em Trizol (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. De acordo com as instruções do fabricante, 10 ng de miRNA foram retrotranscritos utilizando o kit TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). O miR-223 foi amplificado por meio da sonda fluorogênica específica de tipo Taqman (Applied Biosystems) e qPCR na plataforma QuantStudioR 3 Real Time PCR System (Applied Biosystems). O software QuantStudio™ Design & Analysis foi utilizado para obtenção dos dados brutos (Ct). O U6 snRNA (do inglês “*Small Nuclear RNA*”) foi utilizado como controle endógeno para normalização dos dados brutos (ΔCt). Os dados obtidos foram expressos como $2^{-\Delta Ct}$.

4.15 SILENCIAMENTO GÊNICO DE *NLRP3* E *NLRC4*

Os plasmídeos pVSG-G (do inglês, “*Vesicular Stomatitis Virus G Glycoprotein*”) e psPAX-2 (do inglês, “*2nd generation lentiviral packaging plasmid*”) foram adquiridos do NIH Aids Reagent Program pela professora Bruna Alencar, do departamento de Imunologia e gentilmente cedidos para a realização do ensaio. Enquanto que as sequências *mission* especificadas de shRNA ou controle universal (shScrambles) de cada gene foram adquiridas na Sigma-Aldrich. (**Tabela 3**).

Tabela 3 - Sequências mission de shRNA testadas para o silenciamento de *NLRP3* e *NLRC4* em células dendríticas

Gene	ID da sequência
<i>NLRP3</i>	TRCN0000427726 pLKO.1 (puro)
<i>NLRP3</i>	TRCN0000431574 pLKO.1 (puro)
<i>NLRP3</i>	TRCN0000419896 pLKO.1 (puro)
<i>NLRP3</i>	TRCN0000420883 pLKO.1 (puro)
<i>NLRP3</i>	TRCN0000432208 pLKO.1 (puro)
<i>NLRC4</i>	TRCN0000162759 pLKO.1 (puro)
<i>NLRC4</i>	TRCN0000162758 pLKO.1 (puro)
<i>NLRC4</i>	TRCN0000158998 pLKO.1 (puro)
<i>NLRC4</i>	TRCN0000159999 pLKO.1 (puro)
<i>NLRC4</i>	TRCN0000160000 pLKO.1 (puro)

Para avaliação da efetividade foram realizados testes com qPCR para os genes *NLRP3*, *NLRC4* e *IL1B* para definir qual sequência tinha a maior taxa de silenciamento para cada gene, sendo eleitas duas sequências (*NLRP3*-TRCN0000431574 e *NLRC4* -TRCN0000158998).

Para a produção lentiviral foi utilizada a linhagem HEK293T (ATCC #CTRL 11268). Após a aderência das células, os plasmídeos foram incubados com polietilenoimina (PEI- 2,6 x a quantidade total de DNA) por 20 minutos e utilizados para transfecção.

As HEK293T foram transfectadas com diferentes quantidades de psPAX-2 (que contém as proteínas gag e pol responsáveis pelo empacotamento viral) e pVSV-G (que codifica a glicoproteína de envelope do vírus de estomatite) na proporção de psPAX-2: pVSV-G= 2,5.

Dezoito horas depois, o meio de cultura foi trocado e as células foram incubadas por mais 48 horas. Após a incubação, o sobrenadante foi centrifugado a 10000 x g sobre uma camada de 20% de sacarose em tampão de TNE (tris NaCl, EDTA) por 2 horas e armazenados a -80° C para posterior transdução.

Para a transdução, foi necessário produzir também o controle Scramble e SIV-VLP (partículas semelhantes a vírus-VLP do SIV que contém a proteína Vpx) pseudotipado com o envelope do vírus da estomatite (VSV-G). Para isso, as células HEK-293T foram transfectadas com 20 ug/mL do plasmídeo pSIV-3+ e 2 ug/mL de pVSG-G e após 48 horas o sobrenadante foi centrifugado como mencionado acima. Uma vez com SIV-VLP, sh para cada sequência mission e Scramble produzidos, os monócitos foram incubados com 50 ng/mL IL-4 e 50 ng/mL GM-CSF (Peprotech) para obtenção das células dendríticas e também com SIV-VLP+ sh para cada sequência mission ou sh scramble. Após 2 dias de incubação pós-transdução, foi adicionado 1µg/mL de puromicina (Sigma-Aldrich). Nesses experimentos a concentração de IL-1β foi mensurada por ELISA.

4.16 ANÁLISE FUNCIONAL DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS: ENSAIOS DE COCULTIVO

A capacidade das DC de induzir a ativação de linfócitos T autólogos foi avaliada por meio de ensaios de cocultivo DC-linfócitos T autólogos e determinação da indução da produção de IFN-γ nos linfócitos.

4×10^5 de PBMC autólogos (células não-aderentes após adesão em placa de cultura, predominantemente linfócitos) foram cocultivados com $0,4 \times 10^5$ DC/poço em uma placa de fundo U de 96 poços, em duplicata por 96 e 120 horas numa proporção de 1:10 (1 DC: 10

linfócitos) em volume final de 200 μ L de meio RPMI suplementado com 10% de SFB (Gibco-Thermo Fisher).

A avaliação dos linfócitos T produtores de IFN- γ (IFN⁺) foi feita através de marcação intracelular com anticorpo fluorogênico e citometria de fluxo. As células foram tratadas com 2 μ g /ml BrefeldinA (Sigma-Aldrich) nas últimas 5 horas do período da cultura, para inibir a secreção proteica, lavadas e incubadas com anticorpos anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8 marcados, respectivamente com APC (Exbio), PE e PE-Cy7 (BD Bioscience®) (**Tabela 4**). Em seguida, as células foram permeabilizadas com a solução Cytotfix/Cytoperm (BD Bioscience®) e marcadas com o anticorpo anti-IFN- γ conjugado com V450 (BD Bioscience®). A avaliação de linfócitos T IFN⁺ foi feita no citômetro de fluxo BD FACSCanto II (BD Bioscience®). A estratégia de *gate* utilizada para análise está na **Figura 11**. O marcador de viabilidade Live/Dead Fixable Cell Stain Kit (Life Technology, Thermo Fisher Scientific) foi utilizado de acordo com as instruções do fabricante e as células foram adquiridas como mencionado na seção análise fenotípica.

A estimulação com 10ng/mL (concentração final) PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate) (Sigma-Aldrich) e 1 μ g/mL (concentração final) de Ionomicina (Sigma-Aldrich) por 6 horas antes do término da cultura foi usada como controle positivo. Nos poços do controle negativo (basais), os linfócitos permaneceram sem estímulo.

Após 96 e 120 horas em cultura, as células foram marcadas extra- e intracelularmente com os anticorpos monoclonais listados na **tabela 4**.

Tabela 4 - Anticorpos monoclonais utilizados para análise funcional das DC

Anticorpo monoclonal	Clone	Fluorocromo	Fabricante
CD3	MEM-57	APC	Exbio
CD4	RPAT4	PE	BD
CD8	SK1	PE-CY7	BD
IFN- γ	B27	V450	BD

A porcentagem de IFN- γ produzido pelos linfócitos foi calculada por meio da subtração da produção espontânea, ou seja, linfócitos cultivados na ausência de DC (**Figura 11**).

Figura 11 - Estratégia de *gate* para definição de linfócitos T produtores de IFN- γ

Primeiramente, foi utilizada a estratégia de *gate* PE-Cy7/PE-Cy5/PE versus Time a fim de eliminar possíveis variações dos lasers que tenham ocorrido durante a aquisição das amostras. A população de linfócitos foi determinada com base em SSC-A x FSC-A. Foram definidas as células CD3⁺. Em seguida, um *gate* foi desenhado na população de células vivas utilizando a estratégia SSC x Live/Dead. As populações seguintes foram analisadas de acordo com a expressão dos marcadores CD4 e CD8. Posteriormente, para cada subpopulação de linfócitos, foram definidas as células produtoras de IFN- γ , *versus* SSC. Após a delimitação dos *gates* de linfócitos positivos para cada marcador foi feita com base em amostras não-estimuladas, ou seja, cultivadas na ausência de DC, com o auxílio do controle FMO.

4.17 RESPOSTA LINFOPROLIFERATIVA

O potencial das DC estimuladas com FLG ou LPS em induzir a proliferação de linfócitos T autólogos foi avaliado pelo monitoramento da expressão de Carboxifluoresceína succinimidil ester (CFSE Cell Division Tracking Kit, Biolegend®) por citometria de fluxo, visto que o CFSE possui propriedades de excitação e emissão semelhantes ao FITC.

Para este ensaio, células não-aderentes autólogas (predominantemente linfócitos) foram primeiramente marcadas com CFSE, seguindo as orientações do fabricante. Para tanto, 1×10^7 linfócitos foram incubados com 2,5 μ M de CFSE (concentração final) em meio RPMI 1640 aquecido, durante 15 minutos em banho-maria a 37 °C, sob agitação. A seguir, o excesso do

corante não difundido nas células foi retirado por meio de três lavagens (800 x g por 7 minutos a 15 °C) com meio RPMI 1640 contendo 10% de SFB.

Finalmente, 4×10^5 linfócitos autólogos marcados com CFSE foram cocultivados com $0,4 \times 10^5$ DC estimuladas com FLG ou LPS (proporção de 1 DC:10 linfócitos), em duplicata (placa de 96 poços fundo em U), no volume final de 200 μ L de meio RPMI com 10% de SFB. A cultura foi mantida em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 120 horas.

O controle positivo (C+) foi constituído por linfócitos ativados durante as últimas 72 horas em cultura com 5 μ g/mL de conA (ConA; Sigma Aldrich) e o controle negativo (basal), por linfócitos que não receberam estímulo.

Após o término do tempo estudado (120 horas) foi realizada a marcação extracelular dos linfócitos utilizando os anticorpos monoclonais CD3 (v450), CD4 (PE) e CD8 (PECY7) listados na **tabela 5** e o marcador de viabilidade Aqua Stain (Life Technologies-Thermo Fisher Scientific). A proliferação de linfócitos foi medida pela média da diluição de CFSE, de acordo com as instruções do fabricante (Thermo Fisher Scientific). As células foram adquiridas como mencionado na seção análise fenotípica.

Tabela 5 - Anticorpos monoclonais utilizados para análise de proliferação dos linfócitos

Anticorpo monoclonal	Clone	Fluorocromo	Fabricante
CD3	UCHT1	V450	BD
CD4	RPAT4	PE	BD
CD8	SK1	PE-CY7	BD

A porcentagem de proliferação linfocitária foi calculada por meio da subtração da proliferação basal, ou seja, linfócitos que proliferaram na ausência de DC. A estratégia de *gate* utilizada para análise está na **Figura 12**.

Figura 12 - Estratégia de *gate* para definição de linfócitos T que proliferaram

Primeiramente, foi utilizada a estratégia de *gate* PE-Cy7/PE-Cy5/PE versus Time a fim de eliminar possíveis variações dos lasers que tenham ocorrido durante a aquisição das amostras. A população de linfócitos foi determinada com base em SSC-A x FSC-A. Foram definidas as células CD3⁺. Em seguida, um *gate* foi desenhado na população de células vivas utilizando a estratégia SSC x Live/Dead. As populações seguintes foram analisadas de acordo com a expressão dos marcadores CD4 e CD8. Posteriormente, para cada subpopulação de linfócitos, foram definidas as que proliferaram (CFSE^{low}). A delimitação dos *gates* de linfócitos positivos para cada marcador foi feita com base em amostras não-estimuladas, ou seja, cultivadas na ausência de DC, com o auxílio do controle FMO.

4.18 MARCAÇÃO DE MOLÉCULAS DE SUPERFÍCIE

2x10⁵/tubo de linfócitos foram marcados com os anticorpos específicos nas quantidades previamente determinadas por meio da titulação, referida no APÊNDICE B.

Para isso, as amostras foram incubadas em 100 µL de PBS, juntamente com os anticorpos monoclonais para os marcadores de interesse, durante 20 minutos a 4 °C e ao abrigo da luz. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 600 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente, com 500 µL do mesmo tampão. Finalmente, ao pellet obtido foram adicionados 200 µL de solução isotônica.

Foram adquiridos 50000 eventos totais para linfócitos provenientes de cocultivo no citômetro de fluxo BD FACSCanto II (BD Bioscience®) com o auxílio do programa DIVA. Os resultados obtidos foram analisados utilizando o programa FlowJo.

4.19 MARCAÇÃO DE MOLÉCULAS INTRACELULARES

Para a análise de citocinas intracelulares, linfócitos já marcados com anticorpos de superfície foram permeabilizados utilizando-se 300 µL do reagente Cytofix/Cytoperm (BD Bioscience®) e incubados por 20 minutos a 4 °C e no escuro. A seguir, as células foram lavadas duas vezes (600 x g por 5 minutos a temperatura ambiente) com 400 µL do reagente Perm/Wash (BD Bioscience®). Ao pellet foram adicionados 25 µL da solução permeabilizante Perm/Wash juntamente com os anticorpos específicos para as citocinas intracelulares em quantidades previamente tituladas.

Finalmente, após incubação de 30 minutos a 4 °C e ao abrigo da luz, as células foram lavadas mais duas vezes com 200 µL de Perm/Wash e receberam 200 µL de tampão para a fixação dos linfócitos. As células foram adquiridas como relatado anteriormente.

4.20 ISOLAMENTO DE DNA GENÔMICO DE INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HIV

O DNA genômico foi isolado a partir de 1 ml de sangue periférico em tubo contendo EDTA utilizando o método de “Salting Out” (MILLER; DYKES; POLESKY, 1988). A concentração (ng/µL) e a pureza do DNA (relação 260/280 nm e 260/230 nm) foram avaliadas por meio do Nanodrop (ThermoScientific). Em seguida, as amostras de DNA na concentração padrão de 100 ng/µl foram amplificadas por meio de sondas alelo-específico. O DNA genômico purificado foi conservado a -20°C até o momento dos ensaios de genotipagem a serem realizados posteriormente.

4. 21 SELEÇÃO DOS POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA NOS GENES DO INFLAMASSOMA PARA GENOTIPAGEM

Os polimorfismos de base única (SNPs) nos genes *NLRP3* rs10754558 (3'UTR) e *NLRC4* rs479333 (íntron) foram selecionados considerando a frequência do alelo menor (MAF >5%), o impacto funcional e eventuais associações com doenças infecciosas ou inflamatórias crônica reportadas na literatura **Tabela 6**.

Tabela 6 - Seleção de SNPs candidatos

Gene ID (lôcus)	SNP ID	Variação	MAF	Efeito funcional	Ref
<i>NLRP3</i> (1q44)	rs10754558	c.3745 C>G (3'UTR)	G (0.36)	Aumento na estabilidade do mRNA de NLRP3	(HITOMI, YUKI et al., 2009)
<i>NLRP4</i> (2p22.3)	rs479333	c.- 119+649 C>G (ínton)	G (0.31)	Diminuição da expressão de NLRP4; Concentração sérica reduzida de IL-18	(ZELLER et al., 2015); (MATTEINI et al., 2014)

A lista de SNPs candidatos selecionados em genes do inflamassoma é relatada com informações básicas, como a identificação de gene (gene ID) e a respectiva posição cromossômica (lôcus), a identificação do polimorfismo de base única (SNP ID) e a correspondente variação nucleotídica e aminoacídica (quando em uma região codificante) ou indicação da região gênica (quando em uma região não codificante), frequência do alelo menor (MAF) na população caucasiana (de acordo com o banco público de dados “HapMap”), o efeito funcional (quando conhecido) e as próprias referências bibliográficas.

Os SNPs foram avaliados por meio de ensaio alelo específico do tipo Taqman e PCR em tempo real na plataforma QuantStudioR 3 Real Time PCR System (Applied Biosystems). O QuantStudio™ Design & Analysis Software foi utilizado para análise dos resultados de discriminação alélica e obtenção dos genótipos para cada indivíduo.

4. 22 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para as análises estatísticas dos dados, foram utilizados os softwares R-project (R version 3.2.2) e GraphPad Prism versão 7.0.

Os dados funcionais foram coletados e analisados de no mínimo três experimentos independentes. O teste de normalidade foi aplicado aos dados e a análise paramétrica e não paramétrica foram utilizadas da seguinte forma: comparação de dois (Teste t Student) ou mais grupos de dados (Two-Way ANOVA ou múltiplo teste t). O valor de $p < 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo. Os cálculos foram realizados com o pacote estatístico do software GraphPad Prism 7.0.

Já a distribuição de frequência dos SNPs de genotipagem foi analisada por meio de análise multivariada e modelo geral linear (GLM, do inglês “*General Linear Model*”) com auxílio do programa R-project (versão 3.2.2) e do pacote SNPAssoc (versão 1.5-2). O software Haploview foi utilizado para investigar o desequilíbrio de ligação (LD, do inglês “*Linkage Disequilibrium*”). Como variáveis confundentes foram incluídas no modelo sexo, idade e tempo de diagnóstico. Foi aplicada a correção para comparações múltiplas independentes de Bonferroni e ajustamos o nível de significância de $p=0,05$ a $p=0,025$ ($0,05/2$).

5.1. MONÓCITOS DE INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HIV APRESENTAM DEFEITO DE ATIVAÇÃO DE NLRP3

De acordo com o estudo de Guo e colaboradores, 2014, o HIV-1 induz a expressão de NF- κ B dependente de pró-IL-1 β e da ativação do inflamassoma NLRP3 em monócitos de sangue periférico, o que possivelmente envolve a via de sinalização iniciada por TLR8, e esse evento contribui para a defesa do hospedeiro contra o vírus (GUO, H. et al., 2014). Por outro lado, a ativação constitutiva de caspase-1 observada nos monócitos de indivíduos infectados pelo HIV (NETEA et al., 2009), indica que, uma vez que a infecção esteja estabelecida no hospedeiro, o inflamassoma contribua para a ativação inflamatória crônica nos monócitos, o que correlaciona diretamente com a patogênese e progressão da doença (DEEKS, STEVEN G. et al., 2013; ESPINDOLA et al., 2016; WILSON et al., 2014).

Com intuito de caracterizar o estado de ativação dos monócitos isolados do sangue periférico de indivíduos infectados pelo HIV e verificar o estado de ativação dessas células antes do processo de diferenciação em DC, foram analisados o perfil fenotípico e os níveis de produção constitutiva das citocinas TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-18 de monócitos isolados de PBMC de indivíduos infectados pelo HIV e doadores saudáveis. Portanto, foram analisadas a viabilidade, o perfil de expressão dos marcadores de ativação HLA-DR e CD86 e a concentração das citocinas no sobrenadante de cultura das células.

Os monócitos de indivíduos infectados pelo HIV e doadores saudáveis apresentam um fenótipo semelhante. Logo a expressão de HLA-DR e CD86, assim como a viabilidade, não mostraram diferenças significativas entre os dois grupos analisados (**Figura 13A**).

Figura 13 - Caracterização dos monócitos de indivíduos cronicamente infectados pelo HIV

A

B

C

D

E

Os monócitos de indivíduos infectados pelo HIV (HIV; n=5) e doadores sadios (HD; n=5) foram isolados por adesão e cultivados em RPMI-1640 + 10% SFB por 24 horas a 37°C e 5% CO₂. As células foram coletadas e utilizadas para análise da viabilidade e do perfil fenotípico por citometria de fluxo, e o sobrenadante de cultura para dosagem da citocinas por ELISA. (A) 2×10^5 monócitos foram marcados com CD11c, CD14, HLA-DR e CD86. A viabilidade e a expressão dos marcadores de superfície HLA-DR e CD86 foram calculadas dentro da população de células CD14⁺ CD11c⁺, e expressas como porcentagem de células positivas. (B-E) A concentração de citocinas no sobrenadante de cultura é expressa em pg/mL. Os dados são reportados como média $\pm$ desvio padrão. Two-Way ANOVA (A) e Teste t Student (B-E) foram aplicados para as comparar as variáveis ou grupos em HD e HIV (*: $p < 0,05$).

Não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas entre a produção constitutiva de citocinas nos dois grupos de monócitos, apesar de ser observada uma concentração três vezes maior de IL-1 β nos monócitos HIV+ ($4,0 \pm 1,4$ pg/mL) comparados com os monócitos de doadores sadios ($1,3 \pm 0,7$ pg/mL) (**Figura 13B-E**).

Esses resultados revelam que, apesar de acreditarmos num maior nível de ativação basal das células em indivíduos infectados pelo HIV, isso não foi visto em nossos experimentos. O que evidencia que as células que tomamos como precursoras são bastante homogêneas dentre os critérios analisados em um estado basal.

Em seguida, para detectar possíveis diferenças na capacidade de resposta, os monócitos de ambos os grupos foram estimulados com 1 μ g/mL LPS+ 1mM de ATP ou 5 μ g/mL flagelina (FLG) por 3, 8, 18 e 24 horas para avaliar a produção de IL-1 β . Essa concentração de FLG foi baseada no trabalho de Canna (CANNA et al., 2014), o qual utilizou também monócitos humanos. A partir disso, vimos que a produção de IL-1 β frente ao LPS+ATP é estatisticamente diferente em 3, 18 e 24 horas entre os dois grupos (**Figura 14A**).

No entanto, essa diferença entre os grupos não é vista quando estimulamos monócitos com FLG. Para FLG, a produção média para o grupo controle a 3 horas foi de: 56,6 pg/mL, enquanto que para o grupo HIV foi: 79,5 pg/mL; a 8 horas foi visto 98,2 pg/mL em HD e 143,3 pg/mL em HIV em 18 horas: 94 pg/mL em HD e 149,3 pg/mL em HIV e em 24 horas 142,1 pg/mL em HD e 176,8 pg/mL em HIV (**Figura 14B**).

Figura 14 - Monócitos de indivíduos infectados pelo HIV e controles estimulados com LPS+ATP ou FLG

2×10^5 monócitos de doadores sadios (HD; n=5) e indivíduos infectados pelo HIV (HIV; n=5) foram estimulados com 1 μ g/mL de LPS (**A**) ou 5 μ g/mL de flagelina (FLG) (**B**) por 24 horas a 37°C e 5% CO₂. Em seguida, os sobrenadantes foram utilizados para a dosagem de IL-1 β . Os dados são reportados como média $\pm$ erro padrão. Two-Way ANOVA foi aplicado para comparar os tempos de estímulo de FLG em HD- e HIV+ (*: $p < 0,05$).

Esses resultados mostram que a ativação basal nos monócitos em ambos os grupos é semelhante, no entanto quando é requerida a ativação do inflamassoma, percebe-se que há uma diferente resposta aos estímulos. Esse aspecto será melhor avaliado nos tópicos seguintes a partir da diferenciação dos monócitos tanto de indivíduos HIV quanto controles em células dendríticas.

5.2 A FLG INDUZ A ATIVAÇÃO DE DC

Pouco se sabe sobre a capacidade da FLG em ativar células dendríticas humanas via inflamassoma. Portanto, padronizamos o protocolo de estimulação *in vitro* das DC tanto em relação ao tempo, ao tipo de FLG (ultrapura ou standard) e a concentração (**APÊNDICE C-D**). A seguir são reportados os dados relativos ao protocolo padronizado escolhido para todos os demais experimentos.

As DC de indivíduos infectados pelo HIV e de indivíduos saudáveis foram desafiadas com FLG por 24 horas. O nível de ativação das DC foi medido através da viabilidade celular, do perfil fenotípico, em particular da expressão dos marcadores de ativação HLA-DR, CD86, CD40 e CD209, assim como da produção das citocinas no sobrenadante de cultura.

Na **Figura 15A** observamos que a FLG é capaz de induzir um aumento de todos os marcadores de ativação tanto nas HD-DC que nas HIV-DC quando comparadas com as DC não estimuladas, com exceção da molécula CD209.

Nas HD-DC, a FLG induz um aumento significativo de CD40 ($39,77 \pm 3,68$ %, versus $7,84 \pm 2,01$ % células positivas; $p=3 \times 10^{-5}$) e um aumento, mesmo que não significativo, de HLA-DR ($95,83 \pm 0,68$, versus $77,5 \pm 4,42$ % células positivas). A expressão de superfície de CD86 aparece diminuída em HD-DC comparada com células não estimuladas (NE) ($62,77 \pm 4,28$ % versus $91,07 \pm 2,87$ % células positivas; $p=0,001$), no entanto, isso pode ser devido a um mecanismo de feedback, previamente descrito (BARAVALLE et al., 2011).

Nas HIV-DC observamos um aumento significativo de HLA-DR ($83,45 \pm 6,05$ %, versus $49,23 \pm 9,49$ % células positivas; $p=0,006$) e CD40 ($48,73 \pm 5,43$ %, versus $17,38 \pm 1,73$ % células positivas; $p=0,020$).

Essa aumentada expressão de moléculas coestimuladoras é acompanhada por uma aumentada produção de citocinas (**Figura 15B-E**).

Figura 15 - FLG ativa células dendríticas derivadas de monócitos

A

B

C

D

E

2×10^5 DC de doadores saudáveis (HD-DC; $n=5$) e indivíduos infectados pelo HIV (HIV-DC; $n=5$) foram estimuladas com $5 \mu\text{g/mL}$ de flagelina (FLG) por 24 horas por a 37°C e 5% CO_2 . (A) Análise do perfil, e (B) dosagem de $\text{TNF-}\alpha$ (C) IL-6 (D) IL-12p70 (E) IL-10 foram realizadas em HD-DC e HIV-DC. Os dados são reportados como média $\pm$ erro padrão. Teste t múltiplo (A) e Two-Way ANOVA (B-E) foram aplicados para comparar as condições tratado com FLG e não estimulada (NE) em HD- e HIV-DC dentro do grupo (*: $p<0,05$) e entre grupos (HIV-DC versus HD-DC; §: $p<0,05$)

A FLG estimula um aumento significativo de produção de $\text{TNF-}\alpha$ em HD-DC e HIV-DC ($p<0,05$; **Figura 15B**), assim como de IL-6 e IL-12p70, pelo menos no grupo HD-DC ($p=0,016$ e $p=7 \times 10^{-4}$, respectivamente) (**Figura 15C-D**). A indução de IL-6 e IL-12p70 em

HIV-DC aparece ser menos pronunciada (IL-6; $63,90 \pm 6,94$ pg/mL versus $38,18 \pm 12,14$ pg/mL; $p > 0,05$) (**Figura 15C-D**). Por fim, apesar de não terem sido observadas diferenças estatisticamente significativas na secreção da IL-10, as DC estimuladas com FLG produziram altas quantidades de IL-10 tanto no grupo controle ($480,7 \pm 199,4$ pg/mL, versus $130,6 \pm 18,75$ pg/mL), quanto no grupo HIV+ ($314,3 \pm 172,64$ pg/mL, versus $168,8 \pm 30,79$ pg/mL) (**Figura 15E**).

Considerando a maioria dos parâmetros escolhidos, podemos afirmar que a FLG ativa as DC. Nas HIV-DC observamos uma elevada produção basal de IL-6 e uma menor produção de IL-12p70. Considerando que IL-12p70 tem um papel importante na produção de IFN- γ por linfócitos T e promove a diferenciação de linfócitos T CD4⁺ para o perfil Th1, o perfil observado nas HIV-DC poderia estar propiciando a diferenciação para outros perfis em vez de Th1.

Para aprofundar esse aspecto, decidimos medir a capacidade das DC estimuladas com FLG de ativar os linfócitos. Portanto, as DC foram estimuladas por 24 horas com FLG e incubadas com linfócitos autólogos por 96 e 120 horas para avaliar a produção de IFN- γ e a proliferação dos linfócitos, respectivamente (**Figura 16**).

As DC tratadas com FLG induzem um significativo aumento de linfócitos T CD4⁺ IFN- γ ⁺ tanto em doadores sadios ($12,9 \pm 5,5$ versus $1,3 \pm 0,4$ % células positivas; $p < 0,05$) quanto em indivíduos infectados pelo HIV ($9,6 \pm 1,8$ versus $0,1 \pm 0,1$ % células $p < 0,05$) (**Figura 16A**). O efeito observado sobre os linfócitos T CD8⁺ IFN- γ ⁺ foi ainda mais expressivo tanto no grupo controle ($8,9 \pm 1,0$ versus $1,4 \pm 0,4$ % células positivas; $p < 0,05$) quanto em indivíduos infectados pelo HIV ($10,6 \pm 1,9$ versus $0,1 \pm 0,1$ % células positivas; $p < 0,05$) (**Figura 16B**).

De modo similar HD-DC e HIV-DC tratadas com FLG foram hábeis em induzir uma significativa proliferação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ (**Figuras 16C e D**).

Apesar da relativa baixa capacidade da FLG de induzir a produção de IL-12p70 em HIV-DC, juntos esses resultados indicam que a FLG é hábil em induzir a ativação de DC de doadores sadios e indivíduos infectados pelo HIV.

Figura 16 - Células dendríticas estimuladas com FLG induzem resposta de linfócitos

2×10^5 DC de doadores saudáveis (HD-DC; $n=5$) e indivíduos infectados pelo HIV (HIV-DC; $n=5$) foram estimuladas com $5 \mu\text{g/mL}$ de flagelina (FLG) por 24 horas a 37°C e $5\% \text{ CO}_2$. Após isso, 4×10^5 DC tratadas com FLG foram cultivadas com 4×10^5 de linfócitos autólogos (DC/linfócitos: 1/10) por 96 horas a 37°C e $5\% \text{ CO}_2$. Ao final da cultura, as células foram marcadas com o marcador de superfície CD3 e CD4 e intracelular IFN- γ e analisados por citometria de fluxo (**A e B**). Os linfócitos foram marcados com $5 \mu\text{M}$ CFSE e a proliferação foi avaliada pela média de diluição de CFSE^{LOW} após 120 horas a 37°C e $5\% \text{ CO}_2$ (**C e D**). Linfócitos sozinhos foram utilizados como controle negativo. Os dados são reportados como média $\pm$ erro padrão. Teste t múltiplo e Two-Way ANOVA foram aplicados para comparar as condições tratado com FLG e não estimulado em HD- e HIV-DC dentro do grupo (*: $p < 0,05$) e entre grupos (HIV-DC versus HD-DC; §: $p < 0,05$)

5.3 A FLG INDUZ A ATIVAÇÃO DO INFLAMASSOMA EM DC DE DOADORES SADIOS E INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HIV DE MODO SEMELHANTE

Resultados publicados pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram um defeito de ativação do inflamassoma NLRP3 em células dendríticas de indivíduos infectados por HIV (HIV-DC) desafiadas com LPS e ATP (PONTILLO; SILVA; et al., 2012). Levando em consideração que foi observado o mesmo defeito nos monócitos de indivíduos infectados pelo HIV (**Figura 14A**), que a FLG induziu melhor a produção de IL-1 β nos monócitos (**Figura**

14B) e é capaz de ativar eficazmente tanto as DC de doadores sadios quanto as de indivíduos infectados pelos HIV, o passo seguinte foi utilizar a FLG como possível ativador do inflamassoma nas HIV-DC.

No começo desse trabalho não existiam muitos protocolos para avaliar a ativação do inflamassoma em DC humanas tratadas com FLG. Sendo assim, para padronizar os nossos ensaios realizamos experimentos baseados no trabalho de Canna e colaboradores (CANNA et al., 2014) que previa um pré-tratamento (“*priming*”) com LPS por 4 horas antes da estimulação com FLG por 2 horas. Levamos em consideração também um trabalho anterior que previa a estimulação das DC com LPS por 24 horas (PONTILLO; SILVA; et al., 2012) e os dados obtidos com a estimulação das DC com FLG por 24 horas (seção 5.2). Como o “*priming*” de LPS não modificou de modo significativo a estimulação de FLG, optamos por uma estimulação apenas com FLG por 24 horas. Os resultados desses ensaios de padronização estão apresentados no APÊNDICE E.

A ativação do inflamassoma foi medida em HD-DC e HIV-DC tratadas com FLG através da dosagem de IL-1 β e IL-18 no sobrenadante de cultura e da detecção da atividade da caspase-1 ativada. A estimulação com LPS e LPS+ATP foi utilizada como controle positivo para a ativação do inflamassoma (via não-canônica) e do inflamassoma NLRP3, respectivamente (GATTORNO et al., 2007).

Nas HD-DC a FLG induziu uma produção significativa de IL-1 β em comparação às células não estimuladas ($155,3 \pm 20,7$ versus $4,0 \pm 1,9$ pg/mL; $p < 1 \times 10^{-4}$) e em níveis semelhantes ao LPS ($132,4 \pm 9,9$ pg/mL) (**Figura 17A**). O tratamento com LPS+ATP resultou em um aumento significativo na liberação de IL-1 β comparado ao LPS ($p = 0,002$), indicando uma resposta apropriada do inflamassoma NLRP3 nessas células (GATTORNO et al., 2007).

De modo semelhante nas HIV-DC, a FLG induziu um aumento significativo de IL-1 β em comparação às células não estimuladas ($121,3 \pm 9,9$ versus $18,3 \pm 9,3$ pg/mL; $p = 2 \times 10^{-4}$). O LPS induziu o aumento de produção da citocina, mas significativamente menor que nas HD-DC ($p < 0,05$) (**Figura 17A**). A adição do ATP não aumenta significativamente a produção de IL-1 β pelas HIV-DC tratadas com LPS, como observado nas HD-DC (**Figura 17A**).

Não existem diferenças significativas na produção de IL-18 entre HD-DC e HIV-DC tratadas com FLG ou LPS, porém quando o ATP é adicionado as HIV-DC produzem significativamente menos IL-18 do que as HD-DC (**Figura 17B**). Em acordo, vimos também em nosso modelo altos níveis do inibidor de IL-18, a IL18BP em HIV-DC após os estímulos, o que pode sugerir que essa não responsividade de IL-18 pode ser em função dos altos níveis de seu inibidor (APÊNDICE F).

Foi dosada a concentração de IL-1 β após o estímulo com outros agonistas do inflamassoma ou de TLR para verificar se o efeito visto nessa citocina era específica da FLG. Esses dados estão reportados no APÊNDICE G. O uso desses agonistas não induziu um aumento significativo na ativação do inflamassoma e nem mostrou diferenças estatísticas significantes entre os grupos. Quando tentamos utilizar o LPS para o “*priming*” dessas células antes dos estímulos com esses agonistas, novamente não vimos diferenças significativas.

Figura 17- FLG induz a ativação do inflamassoma em DC humanas

2×10^5 de DC de doadores saudáveis (HD-DC; n=20) ou indivíduos infectados pelo HIV (HIV-DC; n=20) foram estimuladas com 5 μ g/ml de flagelina (FLG) por 24 horas ou 1 μ g/ml de LPS por 24 horas ou 1 μ g/ml LPS por 24 horas seguido de 1mM de ATP por 15 minutos a 37°C e 5% CO₂. A concentração de IL-1 β (A) e IL-18 (B) foi dosada nos sobrenadantes de cultura. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão NE= não estimulado. Two-Way ANOVA foi aplicado para comparar as condições dentro do grupo (HIV-DC ou HD-DC *: $p < 0,05$; LPS+ATP versus LPS: #: $p < 0,05$) e entre grupos (HIV-DC versus HD-DC §: $p < 0,05$).

Em seguida, medimos a ativação da caspase-1 nas células tratadas e observamos um perfil de ativação semelhante na produção das citocinas (**Figura 18**).

Figura 18 - FLG induz a ativação da caspase-1 em HIV-DC e HD-DC

2×10^5 de DC de doadores saudáveis (HD-DC; $n=3$) ou indivíduos infectados pelo HIV (HIV-DC; $n=3$) foram estimuladas com $5 \mu\text{g/ml}$ de flagelina (FLG) por 24 horas ou $1 \mu\text{g/ml}$ de LPS por 24 horas ou $1 \mu\text{g/ml}$ LPS por 24 horas seguido de 1mM de ATP por 15 minutos a 37°C e 5% CO_2 . A porcentagem de células CD11c+ FLICA+ foi reportada para as células tratadas com FLG, LPS ou LPS+ATP e não estimuladas (NE). Two-Way ANOVA foi aplicado para comparar as condições tratadas com FLG, LPS, LPS+ATP e não estimuladas (NE) em HD- e HIV-DC (*: $p<0,05$). O teste t Student foi aplicado para comparar HIV-DC tratadas com FLG ou LPS (*: $p<0,05$). Dados são apresentados com média $\pm$ erro padrão.

Levando em conta que a ativação do inflamassoma também pode induzir morte celular com liberação maciça de IL- 1β e IL-18 (piroptose) (BROZ; DIXIT, 2016; SHI, J. et al., 2015), medimos indiretamente a citotoxicidade dos estímulos sobre as DC. Como mostrado na **Figura 19**, nenhum dos estímulos levou ao aumento significativo da liberação de LDH no sobrenadante de cultura, sugerindo que a produção das citocinas observada não está correlacionada a um aumento de piroptose nas células.

Figura 19 - Determinação da porcentagem de citotoxicidade em HD-DC e HIV-DC

2×10^5 DC de doadores saudáveis (HD-DC; $n=5$) ou indivíduos infectados pelo HIV (HIV-DC; $n=5$) foram estimuladas com 5 $\mu\text{g/ml}$ de flagelina (FLG) por 24 horas ou 1 $\mu\text{g/ml}$ de LPS por 24 horas seguido de 1mM de ATP por 15 minutos a 37°C e 5% CO_2 . A quantificação de LDH foi realizada a partir dos sobrenadantes de cultura e essas porcentagens são em relação à quantidade máxima de liberação de LDH pelas DC (controle positivo de morte). Não estimuladas (NE). Two-Way ANOVA foi aplicado para comparar as condições. Os dados são reportados como média $\pm$ erro padrão.

Em conjunto esses dados mostram que a FLG induz a ativação do inflamassoma nas DC tanto de indivíduos saudáveis quanto de indivíduos infectados pelo HIV. Vale ressaltar que as HIV-DC apresentam uma menor resposta ao estímulo de LPS+ATP quando comparadas às HD-DC, o que sugere um defeito na via de NLRP3, como previamente demonstrado (PONTILLO; SILVA; et al., 2012).

5.4 A FLG INDUZ A FORMAÇÃO DE AGREGADOS (“SPECKS”) DE NLRC4 E NLRP3 EM HD-DC

Stutz e colaboradores (STUTZ et al., 2013) propuseram um método para visualização do inflamassoma através da marcação fluorescente dos seus componentes e observação ao microscópio dos agregados perinucleares, chamados de “punctas” ou “specks”, que indicam ativação do complexo.

Para confirmar a ativação de NLRC4 em resposta à FLG, avaliamos a formação de “specks” contendo NLRC4 (NLRC4+) nas HD-DC tratadas com esse estímulo. A marcação para o receptor NLRP3 em células não estimuladas foi utilizada como controle negativo.

Como esperado, é possível observar “specks” NLRC4 positivos (NLRC4+) nas DC tratadas com FLG em comparação às células não tratadas (**Figura 20**). Curiosamente, observamos também a presença de um número significativo de “specks” NLRP3+ (**Figura 20 e 21**). É interessante destacar que a marcação para NLRC4 e NLRP3 encontram-se localizadas nas mesmas células.

Figura 20 - Formação de specks de NLRC4 e NLRP3 em HD-DC estimuladas com FLG

2×10^5 DC de doadores saudáveis (HD-DC; $n=5$) foram estimuladas com 5 µg/ml FLG ou não (NE) por 24 horas. Em seguida, as células foram permeabilizadas e marcadas para NLRC4 e NLRP3 para posterior análise de microscopia. Painele de imagens obtidas por um microscópio confocal com um aumento de 63x, representativas de um experimento, mostrando a formação de agregados de NLRC4 e/ou NLRP3 no citoplasma. NLRC4 (vermelho, Alexa-647) e NLRP3 (verde, Alexa-488). DAPI foi usado com marcador de núcleo (azul).

Utilizando o índice de CTCF, a FLG induziu significativamente tanto “specks” de NLRC4 quanto de NLRP3 em HD-DC (FLG versus NE: $p<0,0001$) (**Figura 21**).

Figura 21 - Formação de specks de NLRC4 e NLRP3 em HD-DC estimuladas com FLG

2×10^5 DC de doadores saudáveis (HD-DC; $n=5$) foram estimuladas com 5 $\mu\text{g/ml}$ FLG ou não (NE) por 24 horas. Em seguida, as células foram permeabilizadas e marcadas para NLRC4 e NLRP3 para posterior análise de microscopia. Quantificação da intensidade de fluorescência de células com specks positivos para NLRC4 ou NLRP3. Dados representativos de 3 experimentos independentes. O teste t Student foi aplicado para comparar as condições tratada com FLG e não estimulada (NE). *: $p < 0,05$. Os dados são representados com média $\pm$ erro padrão

Esses resultados confirmam a participação do NLRC4 na ativação do inflamassoma nas HD-DC tratadas com FLG, mas por outro lado indicam que o mesmo PAMP pode induzir também ativação de NLRP3, o que inicialmente não era esperado.

5.5 A FLG INDUZ A FORMAÇÃO DE AGREGADOS (“SPECKS”) DE NLRC4 E NLRP3 EM HIV-DC

Quando replicamos a marcação dos “specks” nas HIV-DC estimuladas com FLG, observamos uma maior formação de “specks” de NLRC4+ em comparação com as células não tratadas. Por outro lado, a FLG não foi capaz de induzir um aumento significativo de “specks” NLRP3+ nas HIV-DC (**Figura 22 e 23**).

Figura 22 - Formação de specks de NLRC4 e NLRP3 em HIV-DC estimuladas com FLG

2×10^5 DC de indivíduos infectados pelo HIV (HIV-DC; $n=5$) foram estimuladas com 5 $\mu\text{g/ml}$ FLG ou não (NE) por 24 horas. Em seguida, as células foram permeabilizadas e marcadas para NLRC4 e NLRP3 para posterior análise de microscopia. Pannel de imagens obtidas por um microscópio confocal com um aumento de 63x, representativas de um experimento, mostrando a formação de agregados de NLRC4 e/ou NLRP3 no citoplasma. NLRC4 (vermelho, Alexa-647) e NLRP3 (verde, Alexa-488). DAPI foi usado com marcador de núcleo (azul).

Utilizando o índice de CTCF, a FLG induziu preferencialmente os specks de NLRC4 em HIV-DC frente à FLG (CTCF FLG versus NE: $p=0,0001$) e em menor extensão os “specks” de NLRP3+ ($p>0,05$) (**Figura 23**).

Figura 23 - Formação de specks de NLRC4 e NLRP3 em HIV-DC estimuladas com FLG

2×10^5 DC de indivíduos infectados pelo HIV (HIV-DC; $n=5$) foram estimuladas com 5 $\mu\text{g/ml}$ FLG ou não (NE) por 24 horas. Em seguida, as células foram permeabilizadas e marcadas para NLRC4 e NLRP3 para posterior análise de microscopia. Quantificação da intensidade de fluorescência de células com specks positivos para NLRC4 ou NLRP3. Dados representativos de 3 experimentos independentes. O teste t Student foi aplicado para comparar as condições tratada com FLG e não estimulada (NE). *: $p < 0,05$. Os dados são representados com média $\pm$ erro padrão.

Esses dados confirmam a participação de NLRC4 na resposta das HIV-DC à FLG, mas enfatizam mais uma vez o defeito de NLRP3 presente nas HIV-DC.

5.6. INIBIÇÃO ESPECÍFICA DE NLRP3 NÃO AFETA A PRODUÇÃO DE IL-1 β NAS HIV-DC ESTIMULADAS

Para melhor investigar o envolvimento de NLRP3 na resposta à FLG, avaliamos a produção de IL-1 β em DC previamente incubadas com 10 μM MCC-950, um inibidor específico de NLRP3 (COLL et al., 2015) ou com 10 μM parthenolide/PTD, um inibidor de amplo espectro do inflamassoma (JULIANA et al., 2010) (**Figura 24**).

Figura 24 - Inibição específica de NLRP3 não afeta a produção de IL-1 β em HIV-DC

2×10^5 células dendríticas de doadores saudáveis (HD-DC; $n=5$) (**A**) ou indivíduos infectados pelo HIV (HIV-DC; $n=5$) (**B**) foram pré-tratadas com $10 \mu\text{M}$ MCC-950 (MCC) ou $10 \mu\text{M}$ parthenolide (PTD), e então estimuladas com $5 \mu\text{g/ml}$ FLG por 24 horas a 37°C e 5% CO_2 . A concentração de IL-1 β foi mensurada em sobrenadantes. O teste de Kruskal-Wallis com múltiplas comparações pós-teste foi aplicado para comparar as condições entre os grupos (estimulado FLG, LPS e LPS+ATP versus não estimulado (NE) * $p < 0,05$) ou dentro dos grupos (Meio versus tratado com PTD ou MCC-950; §: $p < 0,05$); LPS+ATP versus LPS: #: $p < 0,05$).

Os inibidores MCC-950 e PTD inibiram significativamente a produção de IL-1 β em HD-DC tratadas com FLG (88% e 84% de inibição, respectivamente; $p < 0,05$), assim como as células tratadas com LPS+ATP (69% e 82% de inibição, respectivamente; $p < 0,05$), e

parcialmente a ativação do inflamassoma induzida por LPS (69% e 80% de inibição, respectivamente; $p<0,05$) (**Figura 24A**).

Por outro lado, MCC-950 não foi capaz de reduzir significativamente a produção da citocina em HIV-DC estimuladas com FLG (37% de inibição; $p>0,05$), LPS (38% de inibição $p>0,05$) ou LPS+ATP (45% de inibição; $p>0,05$) (**Figura 24B**). O PTD similarmente inibiu a produção de IL-1 β nas HIV-DC tratadas com FLG (89% de inibição $p=0,002$), tratadas com LPS ou LPS+ATP- (88 e 77% de inibição respectivamente; $p=0,002$).

A mesma diferença de inibição de MCC-950 entre HIV-DC foi observada na formação de “specks” NLRP3+ (**Figura 25**).

Esses dados evidenciam que existe uma contribuição de NLRP3 na resposta à FLG, mas, de acordo com a nossa hipótese nas HIV-DC, a contribuição de NLRP3 é menor devido ao defeito dessa via nos indivíduos infectados pelo HIV.

Como uma tentativa de avaliar a contribuição do NLRP3 na montagem do NAIP/NLRC4 inflamassoma, nos ensaios de estimulação das DC com FLG utilizamos um meio com elevada concentração de K⁺ (130 mM KCl) com intuito de bloquear o efluxo de K⁺ ATP-dependente, representando uma inibição indireta do NLRP3 (APÊNDICE H). Apesar do dado corroborar a participação do NLRP3 na sinalização mediada por FLG, o fato da alta concentração de NaCl também inibir a produção de IL-1 β implica em uma possível inibição inespecífica. Logo, não se pode afirmar que há uma participação purinérgica na ativação vista em nosso modelo.

Figura 25 - A inibição específica de NLRP3 afeta a formação de “specks” NLRP3+ em HIV-DC

2×10^5 células dendríticas de indivíduos infectados pelo HIV (HIV-DC; $n=3$) foram estimuladas com 5 $\mu\text{g/ml}$ FLG por 24 horas a 37°C e 5% CO_2 na presença ou não de 10 μM de MCC (1 hora antes). Em seguida, as células foram permeabilizadas e marcadas para NLRC4 e NLRP3 para posterior análise de microscopia. **(A)** Painel de imagens obtidas por um microscópio confocal com um aumento de 63x, representativas de um experimento, mostrando a formação de agregados de NLRC4 e/ou NLRP3 no citoplasma. NLRC4 (vermelho, Alexa-647) e NLRP3 (verde, Alexa-488). DAPI foi usado com marcador de núcleo (azul). **(B)** Quantificação de células com specks positivos para NLRC4 ou NLRP3. Dados representativos de 3 experimentos independentes. O teste t Student foi aplicado para comparar as condições tratada com MCC+FLG e FLG. *: $p < 0,05$. Os dados são representados com média $\pm$ erro padrão.

5.7. O SILENCIAMENTO GÊNICO DE *NLRC4* MAS NÃO DE *NLRP3* AFETA A PRODUÇÃO DE IL-1 β NAS HIV-DC ESTIMULADAS COM FLG

Em seguida, para avaliar a contribuição relativa dos dois receptores na resposta à FLG as HD-DC e HIV-DC, realizamos um experimento de silenciamento gênico utilizando shRNA de *NLRC4* ou *NLRP3*. O teste do silenciamento encontra-se no APÊNDICE I. A produção de IL-1 β foi avaliada no sobrenadante de cultura das DC^{shNLRC4} e DC^{shNLRP3} tratadas com FLG, LPS ou LPS+ATP.

Como esperado o silenciamento de *NLRC4* reduziu significativamente a produção de IL-1 β em resposta à FLG tanto nas HD-DC quanto nas HIV-DC. De modo contrário, o silenciamento de *NLRP3* afeta a produção de IL-1 β apenas nas HD-DC (**Figura 26**). A resposta ao LPS e LPS+ATP resultou significativamente reduzida apenas nas HD-DC^{shNLRP3}, enquanto que nas HIV-DC^{shNLRP3} não observamos uma inibição significativa da produção de IL-1 β .

Figura 26 - O silenciamento gênico de *NLRC4*, mas não de *NLRP3* afeta a produção de IL-1 β nas HIV-DC estimuladas com FLG

2×10^5 células dendríticas de indivíduos infectados pelo HIV (HIV-DC; $n=3$) (A) ou doadores saudáveis (HD-DC; $n=3$) (B) foram transduzidas com o vetor vazio (scramble: Scr), shNLRC4 ou shNLRP3 e então estimuladas com 5 $\mu\text{g/ml}$ FLG por 24 horas a 37°C e 5% CO_2 . A concentração de IL-1 β foi mensurada em sobrenadantes. O teste de Kruskal-Wallis com múltiplas comparações pós-teste foi aplicado para comparar as condições Scr, shNLRC4 e shNLRP3 em não estimulado (NE) e estimulado (FLG, LPS, LPS+ATP versus NE: * $p<0,05$; LPS+ATP versus LPS #: $p<0,05$; shNLRC4 or shNLRP3 versus Scr #: $p<0,05$).

Esses dados mais uma vez enfatizam que tanto o NLRC4 quanto NLRP3 são ativados em resposta à FLG nas HD-DC, enquanto que nas HIV-DC a participação de NLRP3 é menos pronunciada pelo defeito dessa via nos indivíduos infectados pelo HIV.

5.8. HIV-DC MOSTRAM UM PERFIL DE EXPRESSÃO DOS GENES DO INFLAMASSOMA ALTERADO

Os resultados apresentados nas seções anteriores apontaram para uma diferente contribuição de NLRC4 e NLRP3 na resposta à FLG nas HIV-DC, relacionado ao defeito em NLRP3 previamente reportado (PONTILLO; SILVA; et al., 2012).

Levando em conta que a inflamação crônica característica dos indivíduos infectados pelo HIV (DEEKS, STEVEN G. et al., 2013) poderia estar afetando a resposta das HIV-DC, por que isso aconteceria apenas para NLRP3 e não NLRC4?

Logo, levantamos a hipótese de que as células de indivíduos infectados pelo HIV, por estarem cronicamente submetidas a um meio inflamatório, a produtos microbianos derivados da alterada permeabilidade intestinal e a DAMPs de diversas origens, incluindo células mortas pelo efeito citotóxico da terapia antirretroviral (MAARTENS et al., 2014), pudesse estar regulando diferentemente a expressão gênica dos componentes do inflamassoma e dos seus reguladores.

Portanto executamos uma análise do perfil de expressão gênica basal (constitutivo) nas HIV-DC e comparamos com as HD-DC. Escolhemos analisar os níveis de mRNA das citocinas pró-IL-1 β e IL-18 (*IL1B* e *IL18*), da caspase-1 (*CASP1*) e de ASC (*PYCARD*), dos receptores que estão em foco nesse trabalho (*NLRP3*, *NLRC4*, *NAIP*), mais um receptor não relacionado (*NLRP1*) e de alguns fatores que foram descritos como inibidores de NLRP3, o micro RNA 223 (*miR223*) (YANG, Z. et al., 2015) e os genes para a deubiquitinase BRCC3 (*BRCC3*) (PY et al., 2013), a proteína semelhante a ubiquitina NEDD8 (*NEDD8*) (SEGOVIA et al., 2015) e a proteína que contém um domínio de recrutamento de caspase (CARD) 8 (*CARD8*) (ITO; HARA; KUBOTA, 2014).

As HIV-DC apresentaram uma expressão constitutiva de *NLRP1*, *IL1B*, *IL18*, *miR223*, *BRCC3* e *CARD8* significamente maior que as HD-DC (**Figura 27**). Por outro lado, os níveis de *CASP1* e *NEDD8* resultaram menos que nas HIV-DC quando comparados às HD-DC (**Figura 27**).

Figura 27 - HIV-DC mostram uma expressão constitutiva alterada dos genes do inflamassoma

2×10⁵ células dendríticas de indivíduos infectados pelo HIV (HIV-DC; n=5) ou doadores saudáveis (HD-DC; n=5) foram utilizadas para o isolamento de RNA total e avaliação da expressão basal por qPCR de *NLRP1*, *NLRP3*, *NAIP*, *NLRC4*, *ASC*, *CASP1*, *IL18* e *IL1B* e dos reguladores *miR223*, *BRCC3*, *NEDD8* e *CARD8*, representados como 2^{-ΔCt}. Para *miR223*, o RNA não codificante U6 foi usado como gene endógeno para a normalização dos dados brutos (ΔCt). Os dados são representados como média ± erro padrão. O teste t múltiplo foi aplicado para comparar a expressão relativa de *NLRP3* e *NLRC4* em HD-DC e HIV-DC (*: p<0,05).

Esses dados apontam para uma maior disponibilidade das pró-formas das citocinas compatível com uma maior produção basal dos mediadores em HIV-DC, mas também para uma maior indução de reguladores endógenos do NLRP3, o que indicaria um defeito de ativação do receptor, além de uma menor expressão dele nas HIV-DC.

Em seguida, analisamos o efeito da estimulação da FLG sobre a expressão dos genes selecionados do inflamassoma em HD-DC e HIV-DC tratadas por 3, 8, 18 e 24 horas. Os resultados são reportados na **Figura 28** na forma de “heatmap”.

Figura 28 - HIV-DC mostram uma expressão alterada dos genes do inflamassoma em resposta à FLG

2×10^5 células dendríticas de indivíduos infectados pelo HIV (HIV-DC; $n=5$) ou doadores saudáveis (HD-DC; $n=5$) foram estimuladas com 5 $\mu\text{g/ml}$ FLG por 3, 8, 18 e 24h. O RNA foi isolado de cada amostra e analisado para a expressão dos genes *NLRP1*, *NLRP3*, *NLRC4*, *NAIP*, *PYCARD* (*ASC*), *CASP1*, *IL1B* e *IL18*, por qPCR. *GAPDH* foi usado como gene endógeno para a normalização dos dados brutos (ΔCt). A modulação da expressão em DC tratadas com FLG ou não estimuladas foi calculada como $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (fold-change, FC). O heatmap reporta os valores de $\log_2\text{FC}$ para *NLRP1*, *NLRP3*, *NLRC4*, *NAIP*, *CASP1*, *IL1B* e *IL18* em HD-DC e HIV-DC. Valores de FC para *NLRP3* e *NLRC4* são comparados em HD-DC e HIV-DC em todos os tempos. Os dados são representados como média (FC) $\pm$ erro padrão. O teste t múltiplo foi aplicado para comparar a expressão relativa de *NLRP3* e *NLRC4* em HD-DC e HIV-DC (*: $p < 0,05$).

Como pode ser observado, o perfil de expressão gênica induzido pela FLG é diferente nos dois grupos de DC, sendo menos acentuado nas HIV-DC, onde mais genes resultaram menos expressos ($\text{FC} < 1$); cor verde). Porém, vale ressaltar que o tratamento com FLG induziu um aumento na expressão de *IL1B* e *IL18*, pelo menos após 18 horas (**Figura 28**).

Quando focamos a atenção nos dois receptores *NLRP3* e *NLRC4*, detectamos que a FLG induz uma expressão significativa do gene *NLRC4* nos dois grupos de células após 24 horas de estimulação ($\text{FC} > 1$). As HIV-DC, aparentemente, precisam de um maior tempo para iniciar a transcrição em relação as HD-DC (**Figura 29A**). O *NAIP*, que interage com *NLRC4* para ativação do inflamassoma pela FLG, não resultou muito modulado em ambos os grupos.

O mesmo efeito não é encontrado quando analisamos a expressão do *NLRP3* (**Figura 29B**) que resulta pouco ou nada modulado pela FLG nas HIV-DC, enquanto é induzido após 3 horas de tratamento com FLG nas HD-DC.

Figura 29 - FLG induz expressão de *NLRC4*, mas não de *NLRP3* em HIV-DC

2×10^5 células dendríticas de indivíduos infectados pelo HIV (HIV-DC; $n=5$) ou doadores saudáveis (HD-DC; $n=5$) foram estimuladas com $5 \mu\text{g/ml}$ FLG por 3, 8, 18 e 24 horas. O RNA foi isolado de cada amostra e analisado para a expressão dos genes *NLRP3*, e *NLRC4* genes por qPCR. *GAPDH* foi usado como gene endógeno para a normalização dos dados brutos (ΔCt). A modulação da expressão em DC tratadas com FLG foi calculada como $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (fold-change, FC). Valores de FC para *NLRC4* (A) e *NLRP3* (B) são comparados em HD-DC e HIV-DC em todos os tempos. Os dados são representados como média (FC) $\pm$ erro padrão. O teste t múltiplo foi aplicado para comparar a expressão relativa de *NLRP3* e *NLRC4* em HD-DC e HIV-DC (*: $p < 0,05$).

Esses resultados comprovam, por um lado, que a FLG é capaz de induzir a expressão das citocinas do inflamassoma nas HIV-DC e também de *NLRC4*, porém, por outro lado enfatizam que existe um defeito também transcricional do *NLRP3* nestas células.

5.9. O IFN-I INIBE A PRODUÇÃO DE IL-1 β EM DC TRATADAS COM LPS+ATP, MAS NÃO COM FLG

Levando em consideração que o interferon do tipo I (IFN-1) contribui para uma regulação negativa de *NLRP3* (GUARDA et al., 2011; SIMMONS et al., 2012) e que indivíduos infectados pelo HIV são conhecidos por apresentar um alto nível de IFN-I no plasma (KHATISSIAN et al., 1996; STYLIANOU et al., 2000; VON SYDOW et al., 1991), nos perguntamos se o IFN-I era o responsável pelo diferente perfil de ativação do inflamassoma nos indivíduos infectados pelo HIV.

Primeiramente, avaliamos a concentração de IFN- α no plasma dos indivíduos infectados pelo HIV recrutados para o estudo. Como é possível observar na **Figura 30**, os níveis

plasmático de IFN- α estão significativamente aumentados nos indivíduos infectados pelo HIV comparados com o grupo de doadores saudáveis.

Figura 30 - Indivíduos infectados pelo HIV apresentam uma concentração elevada de IFN- α no plasma

As concentrações de IFN- α foram mensuradas no plasma de doadores saudáveis (HD-DC; n=4) ou indivíduos infectados pelo HIV (HIV-DC; n=4). O teste t múltiplo foi aplicado para comparar HD- e HIV-DC. Dados são representados como média e $\pm$ erro padrão (*: $p < 0,05$).

Em seguida, executamos um ensaio onde as HD-DC foram pré-tratadas com IFN- α antes de estimulação com FLG ou LPS+ATP e a produção de IL-1 β foi comparada com às HIV-DC (sem tratamento exógeno com IFN- α).

O tratamento com IFN- α reduziu significativamente a produção de IL-1 β especificamente em HD-DC tratadas com LPS+ATP, mas não nas HD-DC tratadas FLG ou LPS (**Figura 31**). O efeito inibitório do IFN- α exógeno sobre a produção de IL-1 β é comparável ao defeito de resposta ao LPS+ATP que pode ser observado nas HIV-DC.

Figura 31 - IFN- α inibe a produção de IL-1 β em HD-DC tratadas com LPS+ATP

2×10^5 células dendríticas de doadores saudáveis (HD-DC; $n=3$) foram pré-tratadas com 1000 UI/mL de IFN- α -2b por 18 horas e, então, não estimuladas (NE) ou estimuladas com 5 μ g/ml FLG ou 1 μ g/mL LPS por 24 horas ou 1 μ g/mL LPS mais 1 mM ATP por mais 15 minutos. O teste Kruskal-Wallis foi aplicado para comparar HD-DC, HD-DC+IFN e HIV-DC (*: $p < 0,05$).

Esses dados enfatizam o papel inibidor de IFN-I especificamente sobre o inflamassoma NLRP3 (responsivo a LPS+ATP), e não sobre as outras vias de ativação do complexo (FLG:NAIP/NLRC4 ou vias não canônicas), sugerindo que o elevado nível sistêmico de IFN-I poderia ser uma possível causa da inibição específica do NLRP3 nas HIV-DC.

5.10 VARIANTES POLIMÓRFICAS NOS GENES *NLRC4* e *NLRP3* MODULAM A RESPOSTA DAS DC À FLG

Um dos objetivos desse trabalho foi analisar a distribuição de variantes polimórficas em genes do inflamassoma relacionados com a resposta à FLG em indivíduos infectados pelo HIV com intuito de correlacionar o *background* genético do hospedeiro com a ativação das DC e, consequentemente, com a resposta à imunoterapia e com o estado clínico do paciente.

É interessante notar que, diferentemente dos modelos experimentais, não existem (ou ainda não foram encontrados) indivíduos com ausência de receptores do inflamassoma. No entanto, existem variantes genéticas presentes na população geral que podem indicar um maior ou menor nível de ativação do inflamassoma. Dessa forma, decidimos utilizar a genética como

modelo para avaliar o efeito de uma maior ou menor ativação do NLRC4 na resposta de indivíduos infectados pelo HIV.

Portanto, procuramos por variantes funcionais no gene *NLRC4* e selecionamos o polimorfismo de base única (SNP) rs479333 C>G, anteriormente associado a uma menor produção de IL-18 e expressão gênica de *NLRC4* (MATTEINI et al., 2014; ZELLER et al., 2015).

A partir disso, foi realizado um ensaio genótipo-guiado pela ativação do inflamassoma nas DC desafiadas com FLG. Portanto, doadores sadios recrutados para a obtenção de DC foram genotipados pelo SNP rs479333 e, após os ensaios *in vitro* de ativação das DC com FLG, os níveis de IL-1 β e IL-18 nos sobrenadantes de cultura foram comparados entre os grupos de doadores homozigoto para o alelo polimórfico G e os doadores carregadores dos demais genótipos (C/C, C/G), de acordo com um modelo de herança recessivo pelo alelo menor G.

Como pode ser observado na **Figura 32**, as DC de indivíduos que carregam em homozigose a variante polimórfica rs479333 (G/G) produzem significativamente menos IL-1 β ($p=0,020$) e IL-18 ($p=0,001$) quando comparadas com as DC de indivíduos que carregam o alelo selvagem (C/C+C/G).

Figura 32 - O polimorfismo rs479333 em *NLRC4* afeta produção de IL-1 β e IL-18 em HD-DC

HD-DC (n=19) foram estimuladas com 5 μ g/ml FLG por 24 horas. As concentrações de IL-1 β (A) e IL-18 (B) foram mensuradas em sobrenadantes. Teste t Student foi aplicado para comparar o genótipo polimórfico G/G versus os demais genótipos C/C+G/C. *: $p < 0,05$. Dados são representados como média e $\pm$ erro padrão.

Esses dados demonstram que existe um efeito genético importante atuando na resposta das DC à FLG, e que o polimorfismo selecionado para o estudo representa um bom marcador de resposta à FLG para os experimentos de genotipagem e associação genética descritos nos próximos parágrafos.

Paralelamente, nos propomos avaliar se também variantes genéticas no gene *NLRP3* poderiam afetar a ativação do inflamassoma nas DC desafiadas com FLG, ao considerar os resultados descritos nesse trabalho anteriormente em relação a capacidade da FLG em induzir também a ativação do NLRP3 e não apenas da via NAIP/NLRC4.

Portanto, os mesmos doadores utilizados para os ensaios genótipo-guiados do SNP rs479333 (**Figura 32**) foram genotipados também para a variante polimórfica rs10754558 previamente associada a uma maior resistência à infecção por HIV-1 (PONTILLO et al., 2010) e que está relacionada a uma maior estabilidade do mRNA do *NLRP3* e, consequentemente, a uma maior disponibilidade do receptor (HITOMI, Y. et al., 2009).

Como apresentado na **Figura 33**, as DC de indivíduos homozigotos pelo alelo polimórfico rs10754558 G produzem maior nível de IL-1 β e IL-18 frente ao estímulo com FLG comparadas com as DC de indivíduos que carregam os demais genótipos (C/C+G/C), de acordo com o modelo recessivo de herança da variante.

Figura 33 - O polimorfismo rs10754558 em *NLRP3* afeta produção de IL-1 β e IL-18 em HD-DC

HD-DC (n=13) foram estimuladas com 5 μ g/ml FLG por 24 horas. As concentrações de IL-1 β (A) e IL-18 (B) foram mensuradas em sobrenadantes. Teste t Student foi aplicado para comparar o genótipo polimórfico G/G versus os demais genótipos C/C+G/C. *: $p < 0,05$. Dados são representados como média e $\pm$ erro padrão.

Esses dados demonstram que existe um efeito “ganho-de-função” dessa variante de *NLRP3* sobre a resposta das DC a FLG.

Juntos, os resultados dos ensaios genótipo-guiados pelos SNPs rs479333 *NLRP4* e rs10754558 *NLRP3* oferecem uma ferramenta importante de estudo, pois mostram que as DC de indivíduos que carregam essas variantes respondem menos ou mais, respectivamente, à FLG, pelo menos em termo de ativação do inflamassoma.

A seguir, encontram-se as análises efetuadas para essas duas variantes e a resposta a imunoterapia, assim como a condição clínica dos indivíduos infectados pelo HIV.

5.11 VARIANTES POLIMÓRFICAS NOS GENES *NLRP4* e *NLRP3* AFETAM A RESPOSTA DE INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HIV À IMUNOTERAPIA

A genética do hospedeiro pode afetar a ativação do inflamassoma induzida pela FLG. No intuito de entender se o que foi visto em nossos resultados poderia ser aplicado em ensaios clínicos e se a genética do inflamassoma poderia afetar a resposta a imunização de indivíduos

infectados pelo HIV submetidos à imunoterapia, genotipamos as duas variantes selecionadas rs479333 e rs10754558 no grupo de 19 indivíduos infectados pelo HIV submetidos à imunoterapia baseada em células dendríticas (ensaio clínico fase I/II; NCT02766049). Em seguida, analisamos a distribuição dos polimorfismos de acordo tanto com a qualidade das DC utilizadas na imunização, quanto com o resultado do ensaio clínico. Dados como sexo, idade e tempo de diagnóstico foram incluídas como variáveis confundentes na análise multivariada.

De acordo com os dados anteriores que mostram que DC de indivíduos que carregam a variante polimórfica rs479333 em homozigose (G/G) apresentam uma menor ativação do inflamassoma, as DC dos indivíduos infectados pelo HIV imunizados apresentam um perfil “pior” em relação a capacidade de ativar os linfócitos T *in vitro* (menor produção de TNF- α) assim como uma pior resposta após a imunoterapia (a maior CVP) (**Figura 34**).

Figura 34 - Análise guiada pelo genótipo do polimorfismo rs479333 em *NLRC4* em variáveis relacionadas a imunoterapia com células dendríticas

Avaliação da produção de TNF- α por linfócitos T cocultivados com células dendríticas pulsadas com o vírus HIV-1 autólogo inativado por 96 horas, por citometria de fluxo, porcentagem de células positivas % (**A**). Carga viral plasmática após a imunoterapia com células dendríticas (Log₁₀ de cópias do vírus/mm³) (**B**). Nadir de linfócitos T CD4 (células/mm³). (**C**) Dados de associação são representados como média do genótipo polimórfico G/G versus os demais genótipos C/C+C/G e $\pm$ erro padrão. $p_{ajust.}$ = Valor de p ajustado por sexo, idade e tempo de diagnóstico.

Por outro lado, como esperado, as DC dos pacientes imunizados carregadores da variante rs10754558 em homozigose apresentaram melhores marcadores fenotípicos e funcionais (aumento maior de HLA-DR e moléculas coestimuladoras como CD80 e CD40, alta produção de IL-12; melhor capacidade de fagocitose) em relação àquelas que não carregavam a variante (**Figura 35**).

Figura 35 - Análise guiada pelo genótipo do polimorfismo rs10754558 em *NLRP3* em variáveis relacionadas a imunoterapia com células dendríticas

Avaliação da expressão dos marcadores de superfície HLA-DR, CD80 e CD40 em células dendríticas pulsadas com o vírus HIV-1 autólogo inativado, por citometria de fluxo; mediana de intensidade de fluorescência (MFI) ou porcentagem de células positivas % (A, B, C). MFI das partículas Dextran-FITC relacionadas com a capacidade de captação das células dendríticas imaturas. Avaliação da produção de IL-12 p70 por células dendríticas pulsadas com o vírus HIV-1 autólogo inativado avaliados por ELISA (D). Dados de associação são representados como média do genótipo polimórfico G/G versus os demais genótipos C/C+C/G e $\pm$ erro padrão. $p_{ajust.}$ = Valor de p ajustado por sexo, idade e tempo de diagnóstico.

Juntos esses achados enfatizam que uma boa capacidade de ativação tanto do NLRP3 que do NLRC4 é essencial para o bom funcionamento das DC de indivíduos infectados pelo HIV e da capacidade do paciente de responder à imunização.

5.12 VARIANTES POLIMÓRFICAS NOS GENES *NLRP3* e *NLR4* AFETAM O ESTADO CLÍNICO DOS INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HIV

Em seguida, com objetivo de avaliar o efeito das variantes *NLRP3* rs10754558 e *NLR4* rs479333 na condição clínica, decidimos genotipá-las em uma coorte de 300 indivíduos

infectados pelo HIV (as principais características da coorte estão resumidas na seção Materiais e métodos).

Os SNPs resultaram em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p > 0,05$) indicando que a coorte de pacientes configura razoavelmente um grupo representativo da população estudada.

A distribuição dos SNPs foi avaliada de acordo com a CVP e o nível de linfócitos T CD4⁺, a razão CD4/CD8 e o valor da menor contagem de CD4 antes da introdução da ART (nadir). Por meio de uma análise multivariada, sexo, idade e tempo de doença foram incluídas como variáveis confundentes. O teste de normalidade foi aplicado às variáveis sendo observado uma distribuição normal. A associação dos polimorfismos com as variáveis foi testada nos modelos de herança “codominante”, “dominante” e “recessivo” pelo alelo menor, e o modelo mais plausível foi escolhido de acordo com o critério de Akaike (AKAIKE, 1974). Diferenças na distribuição dos SNPs foram consideradas estatisticamente significativas quando $p \leq 0,025$, de acordo com a correção por múltiplas comparações de Bonferroni para marcadores independentes.

Apenas os resultados significativos obtidos na análise são apresentados na **Tabela 7**.

Tabela 7 - Frequência alélica e genotípica dos SNPs avaliados em *NLRC4*

Gene	SNP ID	Efeito funcional	Genótipos	n	Média Nadir ₀	Valor de p	Valor de p ajust.
<i>NLRC4</i>	rs479333 (G)	Perda de função	C/C	13	316	0,001	0,001
			C/G-G/G	74	159		

Os indivíduos infectados pelo HIV que carregam o alelo G do rs479333 apresentam um menor nível de linfócitos T CD4⁺ antes do tratamento, assim como um menor nadir de linfócitos T CD4⁺, em acordo com o modelo de herança dominante.

Quando categorizamos os indivíduos infectados pelo HIV com base na contagem de linfócitos T CD4⁺ (abaixo e acima de 200 células/mm³), a mesma variante está mais frequente no grupo com menor contagem de linfócitos. Além disso, a variante também afetou negativamente a relação CD4/CD8.

Esses resultados destacam um importante papel de *NLRC4* na infecção crônica indivíduos infectados pelo HIV, sugerindo que quando não há funcionamento do receptor, esses

indivíduos tendem a apresentar um quadro clínico pior. É interessante enfatizar que esses achados concordam e complementam os dados funcionais obtidos *in vitro* que mostram como a ativação do NLRC4 consegue contornar o defeito do NLRP3 típico das DC dos indivíduos infectados pelo HIV.

Em desacordo com o dado publicado anteriormente pelo nosso grupo, a variante com ganho-de-função de NLRP3 não resultou associada ao estado clínico dos indivíduos infectados pelo HIV, sugerindo um papel de NLRP3 limitado, aparentemente, ao primeiro contato com o vírus.

5.13 ANÁLISE DAS COMPONENTES PRINCIPAIS NO PERFIL DE RESPOSTA DE DC FRENTE À FLG

Por último foi realizada uma análise de componente principal (PCA) utilizando os resultados dos indivíduos infectados pelo HIV referentes às DC estimuladas com FLG (**Figura 36**).

Figura 36 - Resultados da análise das componentes principais (PCA) em células dendríticas de indivíduos infectados pelo HIV estimuladas com FLG

Valores padronizados obtidos a partir dos resultados apresentados anteriormente. Cada ponto representa um indivíduo.

A análise da componente principal revelou diferentes agrupamentos entre os indivíduos infectados pelo HIV, sendo que um dos grupos contém a maior parte dos indivíduos analisados e outros dois grupos contém indivíduos mais dispersos. Isso sugere que a maior parte dos indivíduos infectados pelo HIV apresentam uma resposta padrão à FLG, incluindo expressão de moléculas e produção de citocinas relacionadas ao inflamassoma.

Quando foram avaliadas características funcionais, como a proliferação e produção de IFN- γ de linfócitos cocultivados com DC estimuladas com FLG, produção de IL-12, juntamente com variáveis relacionadas à ativação do inflamassoma, como produção de IL-1 β , IL-18, atividade de caspase-1 (Flica) (**Figura 37**), é possível observar que a maior parte dos indivíduos é influenciada pelo primeiro componente.

Figura 37 - Resultados da análise das componentes principais (PCA) em células dendríticas de indivíduos infectados pelo HIV estimuladas com FLG

Valores padronizados obtidos a partir dos resultados apresentados anteriormente. Cada ponto representa um indivíduo.

Em seguida, foram avaliadas algumas variáveis relacionadas ao inflamassoma, como a atividade de caspase-1, dosagem de IL-1 β e IL-18, e expressão gênica de NLRP3, NLRC4, NAIP e ASC (PYCARD) (**Figura 38**). É possível observar que as variáveis relacionadas à expressão gênica de NLRC4 e NAIP tem uma maior contribuição na resposta à FLG, enquanto

que NLRP3 contribui menos para essa resposta. Além disso, é possível observar que a maioria dos indivíduos analisados apresentam essa característica.

Figura 38 - Resultados da análise das componentes principais (PCA) em células dendríticas de indivíduos infectados pelo HIV estimuladas com FLG utilizando variáveis relacionadas ao inflamassoma

Valores padronizados obtidos a partir dos resultados apresentados anteriormente. Cada ponto representa um indivíduo.

A ideia deste trabalho surgiu a partir da observação de que: DC de indivíduos infectados pelo HIV apresentam defeito na ativação do inflamassoma NLRP3; uma resposta vacinal depende da ativação do inflamassoma; existe uma demanda em desenvolver protocolos de ensaios clínicos eficientes para essa população com imunodesregulação.

Um número grande de componentes microbianos tem sido proposto como alternativa aos adjuvantes comumente utilizados. Esses adjuvantes tem o intuito de aumentar a resposta imune de vacinas conhecidas por apresentarem baixa imunogenicidade e, em alguns casos, aumentar a resposta em indivíduos imunocomprometidos. Primeiramente testada em camundongos (como extensamente revisado por (HAJAM et al., 2017) a flagelina (FLG) foi também utilizada em ensaios clínicos para vacinas profiláticas em humanos (TREANOR et al., 2010).

Os estudos em camundongos vem mostrando a grande capacidade da FLG em induzir tanto a resposta humoral quanto celular, quando empregada juntamente com antígenos dos patógenos (DIDIERLAURENT et al., 2004; MCSORLEY et al., 2002) ou em imunoterapia para câncer (ZHENG et al., 2017). O fato da FLG se ligar a receptores da imunidade inata e ativar células apresentadoras de antígeno já é um grande indício de sua possível capacidade adjuvante em formulações vacinais.

Frente a isso, nossa hipótese propôs que se a ativação do inflamassoma pudesse ser restabelecida nas DC dos indivíduos infectados pelo HIV através do estímulo com a FLG, essas células poderiam ser mais eficientes na apresentação antigênica da resposta vacinal e até mesmo como produto vacinal para as imunoterapias.

Os dados apresentados neste trabalho suportam a nossa hipótese inicial e demonstram que a FLG é capaz de ativar o inflamassoma nas HIV-DC, assim como restaurar a funcionalidade típica das DC, como a expressão de moléculas coestimuladoras, produção de mediadores e ativação de linfócitos T autólogos.

Esses resultados são originais por vários motivos. Embora tenha sido previamente reportada que FLG estimula a produção de IL-1 β em células dendríticas humanas através do reconhecimento de TLR5, o inflamassoma não foi levado em consideração nesse contexto (MEANS et al., 2003). Além disso, estudos prévios mostraram a habilidade da FLG em ativar o inflamassoma NAIP/NLRC4 na linhagem celular pró-monocítica U38 (CIACCI-WOOLWINE et al., 1998) e em células primárias humanas, como macrófagos e monócitos (CANNA et al., 2014; KORTMANN et al., 2015; REYES RUIZ et al., 2017). No entanto, pouco é conhecido sobre o seu papel em células dendríticas humanas. Portanto, este é o primeiro trabalho que aborda o papel do inflamassoma na resposta a FLG nas DC humanas.

Na literatura existem dados sobre a ativação constitutiva do inflamassoma na infecção pelo HIV-1. A expressão de caspase-1 já foi vista aumentada no GALT e PBMC e correlacionada com as contagens de linfócitos T CD4⁺ e carga viral plasmática (FERIA e TABORDA, 2018). Em outros compartimentos celulares também foi visto um aumento de expressão de caspase-1, contribuindo inclusive para a depleção de linfócitos T CD4⁺ (SLOAND et al., 1998) e linfócitos T CD8⁺ (SLOAND et al., 1998; SCHEURING et al., 1999). Além disso, foram vistos altos níveis plasmáticos de caspase-1 e IL-18 em indivíduos infectados pelo HIV (AHMAD et al., 2002; STYLIANOU et al., 2003; WIERCINSKA-DRAPALO et al., 2004; SONG et al., 2006; IANNELLO et al., 2010; SONG et al., 2015).

Em relação às DC, sabe-se que indivíduos infectados pelo HIV, sem ART, apresentam deficiências numéricas e funcionais em suas subpopulações (SCHMIDT et al., 2006). Além disso, as HIV-DC podem apresentar um perfil de ativação parcial (DILLON et al., 2008), produção espontânea de citocinas (ALMEIDA et al., 2005) e baixa capacidade em induzir a proliferação de linfócitos T (DONAGHY et al., 2003).

No entanto, nenhum trabalho focou na diferença de resposta de DC frente a diversos PAMPs, como LPS e FLG, em relação ao inflamassoma. Os nossos dados demonstraram que a FLG induz ativação do inflamassoma via NAIP/NLRC4 em HIV-DC, sugerindo que essa via se mantém efetiva, ao contrário do que ocorre com NLRP3 (PONTILLO; SILVA; et al., 2012).

Um estudo recente com modelo murino implicou um efeito espectador da detecção de NLRC4 de FLG bacteriana na presença de infecção por rotavírus indicando que, na presença de diferentes PAMPs, o NLRC4 pode ajudar a estimular a resposta imune a outros tipos de patógenos (ZHANG, B. et al., 2014). Em analogia aos nossos dados e à imunoterapia baseada em células dendríticas, essa ativação de NLRC4 poderia resultar em células mais efetivas no combate ao HIV-1.

Os dados genéticos suportam esses resultados, sendo que a variante polimórfica rs479333, que está relacionada a uma menor ativação de NLRC4 e menores níveis de IL-18, associa-se a uma menor capacidade de ativação das HIV-DC e com uma pior resposta à imunoterapia com DC e, de modo geral, a um pior quadro clínico em indivíduos infectados pelo HIV. É interessante ressaltar que, diferentemente dos modelos experimentais, não existem (ou ainda não foram encontrados) indivíduos com ausência de receptores do inflamassoma. O fato de avaliarmos o efeito funcional dessa variantes em *NLRC4*, que foi previamente demonstrado por Matteini e colaboradores, se mostrou útil em nosso modelo (MATTEINI et al., 2014).

Por outro lado, as DC utilizadas para a imunoterapia que carregam a variante com ganho de função de *NLRP3* resultaram mais ativadas com uma alta produção de IL-12 e maior

expressão de moléculas coestimuladoras, o que sugere que mesmo não tendo o inflamassoma NLRP3 completamente funcional, o ganho de função já foi capaz de induzir melhores DC.

Desta forma, assim como outros trabalhos que demonstram que variantes genéticas podem afetar a resposta à imunoterapia em indivíduos infectados pelo HIV (PONTILLO et al., 2014; REIS et al., 2018), os polimorfismos de *NLRC4* podem ser levados em consideração para a seleção de indivíduos com maior potencial de responder a esse tipo de tratamento.

Um outro aspecto original levantado por este estudo é a contribuição de NLRP3 na montagem do inflamassoma em resposta à FLG. NLRC4 e NLRP3 encontram-se nos “specks” de DC tratadas com FLG e, curiosamente, as marcações para NLRC4 e NLRP3 encontram-se localizadas nas mesmas células. Esses achados estão de acordo com relatos anteriores sobre a colocalização de NLRC4 e NLRP3 em um complexo único em células HEK293 (MAN et al., 2014) e em macrófagos derivados de medula óssea em camundongos durante a infecção por *Salmonella* (QU et al., 2016). Apesar da visualização da imunofluorescência de punctas de NLRP3 e NLRC4, nossos dados não são suficientes para determinar se os dois receptores estão realmente colocalizados no mesmo complexo inflamassômico, sendo necessário mais investigações para determinar essa questão.

De acordo com os dados anteriores que apontam o defeito de NLRP3 nas HIV-DC, observamos que a contribuição de NLRP3 nessas células é menor que nas HD-DC em relação a resposta à FLG.

O defeito específico do inflamassoma NLRP3 nas HIV-DC ainda não foi totalmente elucidado. Essa baixa resposta de NLRP3 em HIV-DC pode ser atribuída à inflamação crônica vista nos indivíduos infectados pelo HIV, em consequência à persistência viral, reativação de vírus endógenos (como herpes simplex), exaustão imune, aumento da permeabilidade intestinal e translocação microbiana (principalmente de LPS) e da citotoxicidade de drogas antirretrovirais (DEEKS, STEVEN G. et al., 2013; MAARTENS et al., 2014). Porém, esses mesmos fatores poderiam estar afetando também outros receptores da imunidade inata e até mesmo o NLRC4.

Ao tentarmos investigar essa questão, vimos que HIV-DC apresentam uma expressão basal aumentada de moléculas inibidoras de NLRP3, como CARD8 (ITO et al., 2014), BRCC3 (PY et al., 2013) e miR-223 (YANG, Z. et al., 2015), o que é compatível com a inibição específica vista nas células dos infectados. Por outro lado, não sabemos quais seriam as vias de ativação desses inibidores nos indivíduos infectados pelo HIV.

Nós especulamos ainda se níveis aumentados de IFN- α nos indivíduos infectados pelo HIV poderiam ser a possível causa da inibição de NLRP3, considerando o efeito antiviral e

inibidor de NLRP3 já conhecido (SIMMONS et al., 2012). De fato, quando as HD-DC foram tratadas com IFN- α exógeno, essas células apresentaram uma menor resposta a estímulos para NLRP3, sugerindo um perfil compatível ao das HIV-DC.

Pode se dizer que existe uma relação indireta também entre NLRC4 e interferon do tipo I. Isso porque há uma estreita relação entre os fatores de transcrição IRFs que regulam o interferon do tipo I, especificamente o IRF8, com a ativação do inflamassoma NLRC4. Nesse caso, o IRF8 atua como um regulador transcricional de Naip (KARKI et al., 2018). No entanto, esses dados referem-se ao modelo animal e ainda precisam ser mais explorados.

É preciso entender que o inflamassoma é importante nos processos patofisiológicos, ao inibir nichos de replicação de microrganismos e ao propagar os sinais de perigo para o restante do sistema imunológico. No entanto, como discutido anteriormente, uma ativação constitutiva do inflamassoma e altos níveis de mediadores proinflamatórios podem não ser benéficos em uma doença crônica. A importância em restaurar/ultrapassar um defeito está relacionada ao fato de se ter uma resposta adequada a microrganismos que, frequentemente, levariam a outras complicações ou até mesmo em auxiliar a imunoproteção mediada por vacinas, as quais muitas vezes não chegam a ser eficientes em indivíduos imunosuprimidos. Dessa forma, não se trata da magnitude da resposta, mas sim em se ter o tipo de resposta adequada à situação, seja um processo infeccioso agudo ou não.

A importância desses dados pode estar relacionada com os futuros ensaios clínicos de imunoterapia em indivíduos infectados pelo HIV, uma vez que os ensaios existentes mostraram que nem todos os indivíduos respondem de modo eficaz às próprias células dendríticas previamente ativadas *in vitro* para induzir uma resposta linfocitária eficiente *in vivo* (GARCIA; ROUTY, 2011; LU et al., 2004). Entre os fatores responsáveis por essa heterogeneidade de resposta há a exaustão imune característica desses indivíduos (BRENCHLEY; PRICE; et al., 2006; RIBEIRO-DOS-SANTOS et al., 2012) e fatores genéticos do hospedeiro (PONTILLO et al., 2014; REIS et al., 2018).

Apesar das contribuições importantes deste trabalho numa área específica de conhecimento, observamos também algumas limitações, das quais queremos enfatizar alguns tópicos.

Uma questão que chama a atenção é o dado da viabilidade ser discretamente menor em HIV-DC em relação às HD-DC, que é visto também nos resultados de LDH (citotoxicidade), o que poderia ser consequência do meio proinflamatório de onde essas células são isoladas, já que a característica é vista desde as células não estimuladas.

Neste estudo, o nível de expressão do receptor de lectina tipo C, o CD209, diminui em HD-DC estimulada com FLG. Em HIV-DC, apesar de não ser significativo, houve um aumento da expressão desse marcador, sendo que o esperado é uma diminuição na atividade fagocitária após o estímulo, o que caracteriza o processo de maturação (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998), juntamente com aumentos concomitantes na expressão de moléculas de superfície como CD86, CD40 e HLA-DR que facilitam a apresentação de antígenos e ativação do sistema imune adaptativo (KANTO et al., 1999; VERHASSELT et al., 1997).

Além disso, um aumento significativo de CD40 e HLA-DR em HD-DC e HIV-DC em relação à condição não estimulada foi observado. No entanto, nossos experimentos mostraram uma diminuição de CD86 em HD-DC e HIV-DC, o que sugere um fenótipo com maturação resistente e que os linfócitos T podem não ser adequadamente estimulados. Uma vez ativadas, a expressão de CD40, entre outras moléculas, é fundamental para a interação das células dendríticas com seus ligantes presentes nos linfócitos (CD40L e CD28, respectivamente), levando à ativação linfocitária a fim de gerar uma resposta específica e a proliferação de linfócitos T (MA; CLARK, 2009).

A produção da citocina supressora de linfócitos T, IL-10, e da citocina estimuladora de linfócitos T, IL-12p70, por HD-DC e HIV-DC em comparação com a condição não estimulada, não foi significativa. Talvez os níveis de expressão reduzidos de CD86 estejam relacionados aos efeitos da IL-10 (TZE et al., 2011).

Outra questão interessante são os altos níveis de IL-6 em HIV-DC não estimuladas. Altos níveis de IL-6 e TNF- α no plasma são considerados marcadores de ativação imune (CONNOLLY; RIDDLER; RINALDO, 2005), o que reforça mais uma vez a ativação constitutiva desses indivíduos.

Em conjunto, esses dados indicam que a estimulação de FLG de HIV-DC leva à geração de um fenótipo de DC maduro com aumento da expressão de marcadores de imunogenicidade e moléculas pró-inflamatórias e nenhuma mudança na produção de citocinas supressoras e estimulantes de citocinas.

A FLG leva à produção e proliferação de citocinas pelos linfócitos T, já que ambas as DC de controle saudável e HIV levam os linfócitos T a proliferarem e a produzir de IFN- γ . É interessante ressaltar que o inflamassoma também é alvo do sistema imune adaptativo, especificamente pelos linfócitos T efetores e de memória. Foi demonstrado em um contexto tumoral que a IL-1 β é indispensável para a produção de IFN- γ pelos linfócitos T CD8 (GHIRINGHELLI et al., 2009).

Algumas questões continuam em aberto e merecem atenção, apesar de não terem sido o foco de estudo desse trabalho. Portanto, alguns pontos que consideramos interessantes são discutidos abaixo.

A FLG é sentida por dois importantes receptores da imunidade inata, TLR5 (HAYASHI et al., 2001) e por NAIP/NLRC4 (FRANCHI et al., 2006; KOFOED; VANCE, 2011; MIAO et al., 2006). Foi demonstrado que células humanas tem um único NAIP que é capaz de reconhecer proteínas do sistema de secreção do tipo 3 (T3SS) e a FLG (KORTMANN et al., 2015; REYES RUIZ et al., 2017; YANG, J. et al., 2013). Dessa forma, pode-se dizer que NAIP humano apresenta uma promiscuidade, possivelmente decorrente do processo evolutivo.

Não abordamos nesse trabalho questões sobre o mecanismo de ação do receptor NLRC4. É sabido que ele se encontra no citosol em uma forma inativa. Alguns estudos revelaram uma reorganização dos domínios de NLRC4 após a ligação de NAIP com seus ligantes (DIEBOLDER et al., 2015). Apesar de não estar completamente elucidado o processo de ativação do inflamassoma NAIP/NLRC4, o atual modelo de ativação propõe que o reconhecimento dos ligantes bacterianos induz uma mudança conformacional em NAIP, o que permite que NLRC4 se ligue, induza a oligomerização de NLRC4-CARD e o recrutamento de moléculas pró-caspase-1 (HAFNER-BRATKOVIČ, 2017).

Alguns estudos apontam que a FLG purificada de *S. typhimurium* é capaz de adentrar o citosol celular, sem a necessidade de sistemas de transporte (LAGE, S., 2015), como é o caso do nosso modelo experimental. Especula-se que possa ocorrer uma interação com os fosfolípidos da membrana plasmática ou que possa ocorrer um dano lisossomal (LAGE, S., 2015).

No entanto, essa questão ainda divide opiniões já que o trabalho de Karki de 2018 relata que o tratamento da FLG sem um agente de transfecção falha em induzir o processamento de caspase-1 (KARKI et al., 2018).

Sabe-se que a ativação desse inflamassoma é altamente regulada no intuito de prevenir a perda de controle inflamatório. Alguns estudos mostram que níveis de expressão basais de NLRC4 já são suficientes para suportar ativação necessária em células epiteliais e imunes. Entre os mecanismos de regulação melhor descritos está a ligação dos próprios ligantes e a fosforilação (DUNCAN; CANNA, 2018). De fato, em nossos dados é possível observar um nível de expressão de NLRC4 discretamente maior em HIV-DC do que HD-DC, no entanto, a diferença não é significativa.

Por que uma ativação de NLRC4 seria benéfica para indivíduos infectados pelo HIV? É importante considerar que, uma vez detectado um defeito de NLRP3 que pode resultar em células dendríticas menos responsivas para o uso em imunoterapia, o fato de NLRC4 ser diferentemente regulado e ativado pode implicar em um melhor resultado para os imunizados.

Apesar de defendermos o uso da FLG como um adjuvante no nosso modelo *in vitro*, há de se considerar que a FLG pode atuar como fator desencadeador de ativação imunológica crônica *in vivo*.

Os indivíduos infectados pelo HIV apresentam possivelmente translocação microbiana, com enfraquecimento da barreira intestinal e dissipação de produtos microbianos, como LPS. Dessa forma, esses indivíduos mantêm uma ativação constitutiva para LPS através da estimulação da via TLR e da indução de expressão do inflamassoma NLRP3 via NF- κ B.

Em relação a FLG, já foram descritos elevados níveis circulantes de anticorpos anti-FLG em indivíduos infectados pelo HIV em comparação aos não infectados (NOWAK et al., 2012). O que determina esses indivíduos a responderem a um antígeno que frequentemente está disponível como LPS, mas não necessariamente a FLG? Uma vez que ao estimular com LPS é percebido um defeito na ativação, enquanto a FLG, via NAIP/NLRC4, parece ultrapassar essa questão.

A administração de doses contínuas de LPS foi mostrada como capaz de induzir tolerância em camundongos (GEISEL et al., 2007), entretanto nenhum dado sobre FLG foi mostrado. Uma vez que uma exposição a longo prazo ao LPS pode induzir tolerância, a FLG também seria capaz de induzir esse mesmo tipo de resposta?

O trabalho de Svard e colaboradores, 2015, comenta sobre a dificuldade em se encontrar um método de detecção capaz de encontrar a FLG solúvel na circulação dos indivíduos infectados pelo HIV. O que poderia ser em função da curta meia-vida da FLG solúvel no sangue ou que translocação da FLG seja concentrada apenas na mucosa intestinal. O fato é que nesse estudo foi vista apenas uma correlação entre anti-FLG com outros marcadores de ativação, mas sem diferenças entre indivíduos infectados pelo HIV e os não infectados (SVARD et al., 2015). Sendo assim, talvez a disponibilidade da FLG possa ser escassa ao ponto de levar à tolerância, como no caso do LPS. Uma vez detectada, a resposta é mais potente, o que vai em encontro com os nossos dados.

Por outro lado, nesse mesmo trabalho de Svard e colaboradores, 2015, comenta-se sobre a correlação inversa em monócitos entre os níveis de TLR5 em relação a anti-FLG, indicando que a presença de FLG solúvel poderia diminuir a expressão de TLR5 e que níveis altos de anti-

FLG correlacionam com uma alta produção basal de citocinas e baixa indução de citocinas após desafio com FLG.

Para o nosso trabalho, tentamos ver a expressão gênica de TLR5, mas sem sucesso. Outra limitação deste estudo foi não ter avaliado os níveis de anti-FLG ou até mesmo a FLG solúvel para tentar correlacionar com nossos resultados.

Por fim, outra consideração importante a se fazer é que este trabalho não focou na infecção aguda, no entanto tentamos entender se o vírus HIV poderia influenciar a ativação do inflamassoma em nosso contexto. O experimento utilizado para essa avaliação não mostrou diferenças significativas entre o pulsado com vírus e não pulsado. Sendo assim, apesar de existir uma tendência de redução na resposta do inflamassoma tanto com LPS+ATP quanto de FLG na presença do vírus, não foi suficiente para detectar um efeito significativo (APÊNDICE J).

7. CONCLUSÕES

Como conclusão nossos dados suportam o uso da FLG no desenho de futuras vacinas, visando uma maior efetividade em indivíduos imunocomprometidos, como nos indivíduos infectados pelo HIV. De acordo com os nossos achados, a FLG ativa as células dendríticas de doadores sadios e de indivíduos infectados pelo HIV através do inflamassoma NAIP/NLRC4, com a participação de NLRP3, ao menos em células de doadores sadios. A FLG foi capaz de ultrapassar o defeito em NLRP3 nas HIV-DC, contribuindo para a ativação do inflamassoma e, consequentemente, para uma maturação/coestimulação completa das células dendríticas e capacidade de ativar linfócitos *in vitro* dos indivíduos infectados pelo HIV, podendo resultar em um produto vacinal mais adequado para o uso em eventuais imunoterapias.

Figura 39 – A FLG ativa HIV-DC através do inflamassoma NLRC4

Os indivíduos infectados pelo HIV possuem ativação constitutiva do inflamassoma e produzem altos níveis de IL-1 β . As células dendríticas desses indivíduos não ativam o inflamassoma NLRP3 corretamente frente a agonistas como LPS, nigericina, ATP e isso resulta em um pior resultado à imunização. As células dendríticas de indivíduos infectados pelo HIV quando estimuladas com flagelina (FLG) ativam o inflamassoma através dos receptores NAIP/NLRC4 contribuindo para uma maturação/coestimulação completa e capacidade de ativar linfócitos *in vitro*, podendo resultar em um produto vacinal mais adequado para o uso em eventuais imunoterapias. Fonte: autoria própria, REIS (2019)

REFERÊNCIAS*

- ABZUG, M. J. Vaccination in the immunocompromised child: a probe of immune reconstitution. **Pediatr Infect Dis J**, v. 28, n. 3, p. 233-6, Mar 2009.
- AHMAD, R. et al. Elevated levels of circulating interleukin-18 in human immunodeficiency virus-infected individuals: role of peripheral blood mononuclear cells and implications for AIDS pathogenesis. **Journal of virology**, v. 76, n. 24, p. 12448-12456, 2002.
- AKAIKE, H. A new look at the statistical model identification. **IEEE Transactions on Automatic Control**, v. 19, n. 6, p. 716-723, 1974.
- ALMEIDA, M. et al. Different subsets of peripheral blood dendritic cells show distinct phenotypic and functional abnormalities in HIV-1 infection. **Aids**, v. 19, n. 3, p. 261-71, Feb 18 2005.
- AN, P.; WINKLER, C. A. Host genes associated with HIV/AIDS: advances in gene discovery. **Trends Genet**, v. 26, n. 3, p. 119-31, Mar 2010.
- ANCUTA, P. et al. Microbial translocation is associated with increased monocyte activation and dementia in AIDS patients. **PLoS One**, v. 3, n. 6, p. e2516, Jun 25 2008.
- ANDRADE, B. B. et al. Biomarkers of inflammation and coagulation are associated with mortality and hepatitis flares in persons coinfecting with HIV and hepatitis viruses. **J Infect Dis**, v. 207, n. 9, p. 1379-88, May 1 2013.
- AWAD, F. et al. Inflammasome biology, molecular pathology and therapeutic implications. **Pharmacol Ther**, v. 187, p. 133-149, Jul 2018.
- BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v. 392, n. 6673, p. 245-52, Mar 19 1998.
- BARAVALLE, G. et al. Ubiquitination of CD86 Is a Key Mechanism in Regulating Antigen Presentation by Dendritic Cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 187, n. 6, p. 2966-2973, 08/1706/27/nihms-submitted 07/08/pmc-release 2011.
- BARRE-SINOUSSE, F. et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Science**, v. 220, n. 4599, p. 868-71, May 20 1983.
- BAUERNFEIND, F. et al. NLRP3 inflammasome activity is negatively controlled by miR-223. **J Immunol**, v. 189, n. 8, p. 4175-81, Oct 15 2012.
- BERG, R. K. et al. Genomic HIV RNA induces innate immune responses through RIG-I-dependent sensing of secondary-structured RNA. **PLoS One**, v. 7, n. 1, p. e29291, 2012.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002

BEZBRADICA, J. S.; COLL, R. C.; SCHRODER, K. Sterile signals generate weaker and delayed macrophage NLRP3 inflammasome responses relative to microbial signals. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 14, p. 118, 03/21/online 2016.

BOOIMAN, T.; KOOTSTRA, N. A. Polymorphism in IFI16 affects CD4(+) T-cell counts in HIV-1 infection. **Int J Immunogenet**, v. 41, n. 6, p. 518-20, Dec 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **AIDS Boletim Epidemiológico: AIDS/DST**, 2018.

BRENCHLEY, J. M. et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. **Nat Med**, v. 12, n. 12, p. 1365-71, Dec 2006.

BRENNAN, T. P. et al. Analysis of human immunodeficiency virus type 1 viremia and provirus in resting CD4+ T cells reveals a novel source of residual viremia in patients on antiretroviral therapy. **Journal of virology**, v. 83, n. 17, p. 8470-8481, 2009.

BROZ, P.; DIXIT, V. M. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. **Nat Rev Immunol**, v. 16, n. 7, p. 407-420, 07/print 2016.

CANNA, S. W. et al. An activating NLRC4 inflammasome mutation causes autoinflammation with recurrent macrophage activation syndrome. **Nat Genet**, v. 46, n. 10, p. 1140-6, Oct 2014.

CARDONE, M. et al. HIV-1-Induced Impairment of Dendritic Cell Cross Talk with $\gamma\delta$ T Lymphocytes. **Journal of Virology**, v. 89, n. 9, p. 4798-4808, 02/11 12/23/received 01/29/accepted 2015.

CHEN, L. F.; HOY, J.; LEWIN, S. R. Ten years of highly active antiretroviral therapy for HIV infection. **Med J Aust**, v. 186, n. 3, p. 146-51, Feb 5 2007.

CHEW, G. M. et al. TIGIT Marks Exhausted T Cells, Correlates with Disease Progression, and Serves as a Target for Immune Restoration in HIV and SIV Infection. **PLOS Pathogens**, v. 12, n. 1, p. e1005349, 2016.

CIACCI-WOOLWINE, F. et al. Salmonella Flagellin Induces Tumor Necrosis Factor Alpha in a Human Promonocytic Cell Line. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 3, p. 1127-1134, 09/29/received 11/19/rev-request 12/30/accepted 1998.

COLEMAN, C. M.; WU, L. HIV interactions with monocytes and dendritic cells: viral latency and reservoirs. **Retrovirology**, v. 6, p. 51-51, 2009.

COLL, R. C. et al. A small molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome is a potential therapeutic for inflammatory diseases. **Nature medicine**, v. 21, n. 3, p. 248-255, 02/16 2015.

CONNOLLY, N. C.; RIDDLER, S. A.; RINALDO, C. R. Proinflammatory cytokines in HIV disease-a review and rationale for new therapeutic approaches. **AIDS Rev**, v. 7, n. 3, p. 168-80, Jul-Sep 2005.

CONTI, L.; GESSANI, S. GM-CSF in the generation of dendritic cells from human blood monocyte precursors: recent advances. **Immunobiology**, v. 213, n. 9-10, p. 859-70, 2008.

CORY, T. J. et al. Overcoming pharmacologic sanctuaries. **Curr Opin HIV AIDS**, v. 8, n. 3, p. 190-5, May 2013.

COSGROVE, C. et al. Early and nonreversible decrease of CD161⁺⁺ /MAIT cells in HIV infection. **Blood**, v. 121, n. 6, p. 951-61, Feb 7 2013.

DEEKS, S. G. et al. HIV infection. **Nat Rev Dis Primers**, v. 1, p. 15035, Oct 1 2015.

DEEKS, S. G.; TRACY, R.; DOUEK, D. C. Systemic Effects of Inflammation on Health during Chronic HIV Infection. **Immunity**, v. 39, n. 4, p. 633-645, 2013.

DIDIERLAURENT, A. et al. Flagellin promotes myeloid differentiation factor 88-dependent development of Th2-type response. **J Immunol**, v. 172, n. 11, p. 6922-30, Jun 1 2004.

DIEBOLDER, C. A. et al. Cryoelectron Tomography of the NAIP5/NLRC4 Inflammasome: Implications for NLR Activation. **Structure**, v. 23, n. 12, p. 2349-2357, Dec 1 2015.

DILLON, S. M. et al. Plasmacytoid and myeloid dendritic cells with a partial activation phenotype accumulate in lymphoid tissue during asymptomatic chronic HIV-1 infection. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 48, n. 1, p. 1-12, May 1 2008.

DONAGHY, H. et al. Dysfunction and infection of freshly isolated blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells in patients infected with HIV-1. **Blood**, v. 101, n. 11, p. 4505-11, Jun 1 2003.

DUNCAN, J. A.; CANNA, S. W. The NLRC4 Inflammasome. v. 281, n. 1, p. 115-123, Jan 2018.

EISENBARTH, S. C. et al. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. **Nature**, v. 453, n. 7198, p. 1122-6, Jun 19 2008.

ENGELMAN, A.; CHEREPANOV, P. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. **Nat Rev Microbiol**, v. 10, n. 4, p. 279-90, Mar 16 2012.

ESPINDOLA, M. S. et al. HIV infection: focus on the innate immune cells. **Immunol Res**, v. 64, n. 5-6, p. 1118-1132, Dec 2016.

FERIA, M. G.; TABORDA, N. A. HIV replication is associated to inflammasomes activation, IL-1 β , IL-18 and caspase-1 expression in GALT and peripheral blood. v. 13, n. 4, p. e0192845, 2018.

FERNANDES-ALNEMRI, T. et al. AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. **Nature**, v. 458, n. 7237, p. 509-13, Mar 26 2009.

FINZI, D.; SILICIANO, R. F. Viral Dynamics in HIV-1 Infection. **Cell**, v. 93, n. 5, p. 665-671, 5/29/ 1998.

FRANCHI, L. et al. Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1 β in salmonella-infected macrophages. **Nat Immunol**, v. 7, n. 6, p. 576-82, Jun 2006.

FRANCHI, L.; MUNOZ-PLANILLO, R.; NUNEZ, G. Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes. **Nat Immunol**, v. 13, n. 4, p. 325-32, Mar 19 2012.

GAIDT, MORITZ M. et al. Human Monocytes Engage an Alternative Inflammasome Pathway. **Immunity**, v. 44, n. 4, p. 833-846, 2016/04/19/ 2016.

GALLO, R. C. et al. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Science**, v. 220, n. 4599, p. 865-7, May 20 1983.

GARCIA, F.; ROUTY, J. P. Challenges in dendritic cells-based therapeutic vaccination in HIV-1 infection Workshop in dendritic cell-based vaccine clinical trials in HIV-1. **Vaccine**, v. 29, n. 38, p. 6454-63, Sep 2 2011.

GATTORNO, M. et al. Pattern of interleukin-1beta secretion in response to lipopolysaccharide and ATP before and after interleukin-1 blockade in patients with CIAS1 mutations. **Arthritis Rheum**, v. 56, n. 9, p. 3138-48, Sep 2007.

GEIJTENBEEK, T. B. et al. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. **Cell**, v. 100, n. 5, p. 587-97, Mar 3 2000.

GEISEL, J. et al. IL-6 and Maturation Govern TLR2 and TLR4 Induced TLR Agonist Tolerance and Cross-Tolerance in Dendritic Cells. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 9, p. 5811, 2007.

GERETTI, A. M.; DOYLE, T. Immunization for HIV-positive individuals. **Curr Opin Infect Dis**, v. 23, n. 1, p. 32-8, Feb 2010.

GHIRINGHELLI, F. et al. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors. **Nat Med**, v. 15, n. 10, p. 1170-8, Oct 2009.

GONZALEZ, V. D. et al. High levels of chronic immune activation in the T-cell compartments of patients coinfecting with hepatitis C virus and human immunodeficiency virus type 1 and on highly active antiretroviral therapy are reverted by alpha interferon and ribavirin treatment. **J Virol**, v. 83, n. 21, p. 11407-11, Nov 2009.

GOONETILLEKE, N. et al. The first T cell response to transmitted/founder virus contributes to the control of acute viremia in HIV-1 infection. **The Journal of experimental medicine**, v. 206, n. 6, p. 1253-1272, 2009.

GUARDA, G. et al. Type I interferon inhibits interleukin-1 production and inflammasome activation. **Immunity**, v. 34, n. 2, p. 213-23, Feb 25 2011.

GUO, H. et al. HIV-1 infection induces interleukin-1beta production via TLR8 protein-dependent and NLRP3 inflammasome mechanisms in human monocytes. **J Biol Chem**, v. 289, n. 31, p. 21716-26, Aug 01 2014.

GURDASANI, D. et al. A systematic review of definitions of extreme phenotypes of HIV control and progression. **Aids**, v. 28, n. 2, p. 149-62, Jan 14 2014.

HAFNER-BRATKOVIČ, I. The NLRC4 inflammasome: The pieces of the puzzle are falling into place. **De Guryter**, 2017.

HAJAM, I. A. et al. Bacterial flagellin-a potent immunomodulatory agent. **Exp Mol Med**, v. 49, n. 9, p. e373, Sep 1 2017.

HANEKLAUS, M.; O'NEILL, L. A.; COLL, R. C. Modulatory mechanisms controlling the NLRP3 inflammasome in inflammation: recent developments. **Curr Opin Immunol**, v. 25, n. 1, p. 40-5, Feb 2013.

HANIFFA, M.; COLLIN, M.; GINHOUX, F. Ontogeny and functional specialization of dendritic cells in human and mouse. **Adv Immunol**, v. 120, p. 1-49, 2013.

HAYASHI, F. et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. **Nature**, v. 410, n. 6832, p. 1099-103, Apr 26 2001.

HEIL, F. et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. **Science**, v. 303, n. 5663, p. 1526-9, Mar 5 2004.

HERNANDEZ, J. C.; LATZ, E.; URCUQUI-INCHIMA, S. HIV-1 induces the first signal to activate the NLRP3 inflammasome in monocyte-derived macrophages. **Intervirology**, v. 57, n. 1, p. 36-42, 2014.

HITOMI, Y. et al. Associations of functional NLRP3 polymorphisms with susceptibility to food-induced anaphylaxis and aspirin-induced asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 124, n. 4, p. 779-785, Oct 2009.

HORNUNG, V. et al. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. **Nature**, v. 458, n. 7237, p. 514-8, Mar 26 2009.

HORNUNG, V. et al. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. **Nat Immunol**, v. 9, n. 8, p. 847-56, Aug 2008.

HSUE, P. Y. et al. Increased carotid intima-media thickness in HIV patients is associated with increased cytomegalovirus-specific T-cell responses. **Aids**, v. 20, n. 18, p. 2275-83, Nov 28 2006.

HU, Z. et al. Structural and biochemical basis for induced self-propagation of NLRC4. **Science**, v. 350, n. 6259, p. 399-404, Oct 23 2015.

HULEATT, J. W. et al. Vaccination with recombinant fusion proteins incorporating Toll-like receptor ligands induces rapid cellular and humoral immunity. **Vaccine**, v. 25, n. 4, p. 763-75, Jan 8 2007.

HUNT, P. W. et al. Valganciclovir reduces T cell activation in HIV-infected individuals with incomplete CD4+ T cell recovery on antiretroviral therapy. **J Infect Dis**, v. 203, n. 10, p. 1474-83, May 15 2011.

INCALCATERRA, E. et al. Role of genetic polymorphisms in myocardial infarction at young age. **Clin Hemorheol Microcirc**, v. 46, n. 4, p. 291-8, 2010.

ITO, S.; HARA, Y.; KUBOTA, T. CARD8 is a negative regulator for NLRP3 inflammasome, but mutant NLRP3 in cryopyrin-associated periodic syndromes escapes the restriction. **Arthritis Res Ther**, v. 16, n. 1, p. R52, Feb 12 2014.

IZQUIERDO-USEROS, N. et al. HIV and mature dendritic cells: Trojan exosomes riding the Trojan horse? **PLoS Pathog**, v. 6, n. 3, p. e1000740, Mar 26 2010.

JAKOBSEN, M. R. et al. IFI16 senses DNA forms of the lentiviral replication cycle and controls HIV-1 replication. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 48, p. E4571-80, Nov 26 2013.

JANEWAY, C. A., JR.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annu Rev Immunol**, v. 20, p. 197-216, 2002.

JULIANA, C. et al. Anti-inflammatory compounds parthenolide and Bay 11-7082 are direct inhibitors of the inflammasome. **J Biol Chem**, v. 285, n. 13, p. 9792-802, Mar 26 2010.

KANTO, T. et al. Impaired allostimulatory capacity of peripheral blood dendritic cells recovered from hepatitis C virus-infected individuals. **J Immunol**, v. 162, n. 9, p. 5584-91, May 1 1999.

KARKI, R. et al. IRF8 Regulates Transcription of Naips for NLRC4 Inflammasome Activation. **Cell**, v. 173, n. 4, p. 920-933.e13, May 3 2018.

KAUFMANN, D. E. et al. Upregulation of CTLA-4 by HIV-specific CD4+ T cells correlates with disease progression and defines a reversible immune dysfunction. **Nat Immunol**, v. 8, n. 11, p. 1246-54, Nov 2007.

KERNÉIS, S. et al. Long-term immune responses to vaccination in HIV-infected patients: a systematic review and meta-analysis. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 58, n. 8, p. 1130-1139, 2014.

KHATISSIAN, E. et al. The relationship between the interferon alpha response and viral burden in primary SIV infection. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 12, n. 13, p. 1273-8, Sep 1 1996.

KOFOED, E. M.; VANCE, R. E. Innate immune recognition of bacterial ligands by NAIPs determines inflammasome specificity. **Nature**, v. 477, n. 7366, p. 592-5, Sep 29 2011.

KOOL, M. et al. Cutting Edge: Alum Adjuvant Stimulates Inflammatory Dendritic Cells through Activation of the NALP3 Inflammasome. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 6, p. 3755-3759, 2008.

KORTMANN, J.; BRUBAKER, S. W.; MONACK, D. M. Cutting Edge: Inflammasome Activation in Primary Human Macrophages Is Dependent on Flagellin. **J Immunol**, v. 195, n. 3, p. 815-9, Aug 1 2015.

KULLER, L. H. et al. Inflammatory and Coagulation Biomarkers and Mortality in Patients with HIV Infection. **PLOS Medicine**, v. 5, n. 10, p. e203, 2008.

LAGE, S. Papel do inflamassomas e vias lisossomais na morte celular e resposta imune induzidas pela flagelina. **Universidade de São Paulo**, 2015.

LAGE, S. L. et al. Cytosolic flagellin-induced lysosomal pathway regulates inflammasome-dependent and -independent macrophage responses. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 35, p. E3321-30, Aug 27 2013.

LAMKANFI, M.; DIXIT, V. M. Mechanisms and functions of inflammasomes. **Cell**, v. 157, n. 5, p. 1013-22, May 22 2014.

LANE, H. C. et al. Abnormalities of B-Cell Activation and Immunoregulation in Patients with the Acquired Immunodeficiency Syndrome. **New England Journal of Medicine**, v. 309, n. 8, p. 453-458, 1983.

LATZ, E.; XIAO, T. S.; STUTZ, A. Activation and regulation of the inflammasomes. **Nat Rev Immunol**, v. 13, n. 6, p. 397-411, Jun 2013.

LAURINDO-TEODORESCU L, T. P. Histórias da aids no Brasil, 1983-2003. **Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde/Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais**, 2015.

LEVESQUE, M. C. et al. Polyclonal B cell differentiation and loss of gastrointestinal tract germinal centers in the earliest stages of HIV-1 infection. **PLoS Med**, v. 6, n. 7, p. e1000107, Jul 7 2009.

LI, H. et al. Cutting Edge: Inflammasome Activation by Alum and Alum's Adjuvant Effect Are Mediated by NLRP3. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 1, p. 17, 2008.

LICHTFUSS, G. F. et al. Biomarkers of immune dysfunction following combination antiretroviral therapy for HIV infection. **Biomark Med**, v. 5, n. 2, p. 171-86, Apr 2011.

LIGHTFIELD, K. L. et al. Differential requirements for NAIP5 in activation of the NLRC4 inflammasome. **Infect Immun**, v. 79, n. 4, p. 1606-14, Apr 2011.

LIU, J.; OSTROWSKI, M. Development of targeted adjuvants for HIV-1 vaccines. **AIDS Research and Therapy**, v. 14, p. 43, 09/12 03/22/received 08/11/accepted 2017.

LU, W. et al. Therapeutic dendritic-cell vaccine for chronic HIV-1 infection. **Nat Med**, v. 10, n. 12, p. 1359-65, Dec 2004.

LUNDBERG, A. M. et al. Key differences in TLR3/poly I:C signaling and cytokine induction by human primary cells: a phenomenon absent from murine cell systems. **Blood**, v. 110, n. 9, p. 3245-52, Nov 1 2007.

LUNDGREN, J.; BABIKER, A. G.; NEATON, J. D. Antiretroviral Therapy in Early HIV Infection. **N Engl J Med**, v. 374, n. 4, p. 394, Jan 28 2016.

MA, D. Y.; CLARK, E. A. The role of CD40 and CD154/CD40L in dendritic cells. **Seminars in immunology**, v. 21, n. 5, p. 265-272, 2009.

MAARTENS, G.; CELUM, C.; LEWIN, S. R. HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. **Lancet**, v. 384, n. 9939, p. 258-71, Jul 19 2014.

MAISONNEUVE, C. et al. Unleashing the potential of NOD- and Toll-like agonists as vaccine adjuvants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 34, p. 12294, 2014.

MAN, S. M. et al. Inflammasome activation causes dual recruitment of NLRC4 and NLRP3 to the same macromolecular complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 20, p. 7403, 2014.

MANGAN, M. S. J. et al. Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases. **Nat Rev Drug Discov**, v. 17, n. 9, p. 688, Sep 2018.

MARIATHASAN, S. et al. Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. **Nature**, v. 430, n. 6996, p. 213-8, Jul 8 2004.

MARKS, M. A. et al. Markers of microbial translocation and risk of AIDS-related lymphoma. **Aids**, v. 27, n. 3, p. 469-74, Jan 28 2013.

MARTINON, F.; BURNS, K.; TSCHOPP, J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. **Mol Cell**, v. 10, n. 2, p. 417-26, Aug 2002.

MARTINON, F.; TSCHOPP, J. Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. **Cell**, v. 117, n. 5, p. 561-74, May 28 2004.

MARTINSON, J. A. et al. Impact of class A, B and C CpG-oligodeoxynucleotides on in vitro activation of innate immune cells in human immunodeficiency virus-1 infected individuals. **Immunology**, v. 120, n. 4, p. 526-535, 08/14/received 10/27/revised 11/08/accepted 2007.

MATTEINI, A. M. et al. Novel gene variants predict serum levels of the cytokines IL-18 and IL-1ra in older adults. **Cytokine**, v. 65, n. 1, p. 10-6, Jan 2014.

MCCLOY, R. A. et al. Partial inhibition of Cdk1 in G 2 phase overrides the SAC and decouples mitotic events. **Cell cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 13, n. 9, p. 1400-1412, 2014.

MCDONALD, W. F. et al. A West Nile virus recombinant protein vaccine that coactivates innate and adaptive immunity. **J Infect Dis**, v. 195, n. 11, p. 1607-17, Jun 1 2007.

MCEWEN, J. et al. Synthetic recombinant vaccine expressing influenza haemagglutinin epitope in Salmonella flagellin leads to partial protection in mice. **Vaccine**, v. 10, n. 6, p. 405-11, 1992.

MCMICHAEL, A. J. et al. The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 1, p. 11-23, Jan 2010.

MCSORLEY, S. J. et al. Bacterial flagellin is an effective adjuvant for CD4+ T cells in vivo. **J Immunol**, v. 169, n. 7, p. 3914-9, Oct 1 2002.

MEANS, T. K. et al. The Toll-Like Receptor 5 Stimulus Bacterial Flagellin Induces Maturation and Chemokine Production in Human Dendritic Cells. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 10, p. 5165, 2003.

MEIER, A. et al. Sex differences in the Toll-like receptor-mediated response of plasmacytoid dendritic cells to HIV-1. **Nat Med**, v. 15, n. 8, p. 955-9, Aug 2009.

MELLMAN, I.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. **Cell**, v. 106, n. 3, p. 255-8, Aug 10 2001.

MERAD, M. et al. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. **Annu Rev Immunol**, v. 31, p. 563-604, 2013.

MIAO, E. A. et al. Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via Ipaf. **Nat Immunol**, v. 7, n. 6, p. 569-75, Jun 2006.

MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 3, p. 1215, 1988.

MINDEL, A.; TENANT-FLOWERS, M. Natural history and management of early HIV infection. **BMJ : British Medical Journal**, v. 322, n. 7297, p. 1290-1293, 2001.

MOIR, S. et al. B cells in early and chronic HIV infection: evidence for preservation of immune function associated with early initiation of antiretroviral therapy. **Blood**, v. 116, n. 25, p. 5571-9, Dec 16 2010.

MOIR, S.; CHUN, T.-W.; FAUCI, A. S. Pathogenic Mechanisms of HIV Disease. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 6, n. 1, p. 223-248, 2011.

MONROE, K. M. et al. IFI16 DNA sensor is required for death of lymphoid CD4 T cells abortively infected with HIV. **Science**, v. 343, n. 6169, p. 428-32, Jan 24 2014.

MUNOZ-PLANILLO, R. et al. K(+) efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. **Immunity**, v. 38, n. 6, p. 1142-53, Jun 27 2013.

MURAKAMI, T. et al. Critical role for calcium mobilization in activation of the NLRP3 inflammasome. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 28, p. 11282-7, Jul 10 2012.

MURATA, H.; HRUZ, P. W.; MUECKLER, M. The mechanism of insulin resistance caused by HIV protease inhibitor therapy. **J Biol Chem**, v. 275, n. 27, p. 20251-4, Jul 7 2000.

NAKAYA, H. I. et al. Systems biology of vaccination for seasonal influenza in humans. **Nat Immunol**, v. 12, n. 8, p. 786-95, Aug 2011.

NAZLI, A. et al. HIV-1 gp120 induces TLR2- and TLR4-mediated innate immune activation in human female genital epithelium. **J Immunol**, v. 191, n. 8, p. 4246-58, Oct 15 2013.

NETEA, M. G. et al. Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1 β in monocytes and macrophages. **Blood**, v. 113, n. 10, p. 2324-35, Mar 5 2009.

NOWAK, P. et al. Impact of HMGB1/TLR Ligand Complexes on HIV-1 Replication: Possible Role for Flagellin during HIV-1 Infection. **Int J Microbiol**, v. 2012, p. 263836, 2012.

O'BRIEN, S. J.; GAO, X.; CARRINGTON, M. HLA and AIDS: a cautionary tale. **Trends Mol Med**, v. 7, n. 9, p. 379-81, Sep 2001.

OH, J. Z. et al. TLR5-mediated sensing of gut microbiota is necessary for antibody responses to seasonal influenza vaccination. **Immunity**, v. 41, n. 3, p. 478-492, Sep 18 2014.

PALMER, S.; JOSEFSSON, L.; COFFIN, J. M. HIV reservoirs and the possibility of a cure for HIV infection. **Journal of Internal Medicine**, v. 270, n. 6, p. 550-560, Dec 2011.

PANTALEO, G.; GRAZIOSI, C.; FAUCI, A. S. The immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. **N Engl J Med**, v. 328, n. 5, p. 327-35, Feb 4 1993.

PETRILLI, V. et al. Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. **Cell Death Differ**, v. 14, n. 9, p. 1583-9, Sep 2007.

PONTILLO, A. et al. A 3'UTR SNP in NLRP3 gene is associated with susceptibility to HIV-1 infection. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 54, n. 3, p. 236-40, Jul 2010.

PONTILLO, A. et al. Host genomic HIV restriction factors modulate the response to dendritic cell-based treatment against HIV-1. **Hum Vaccin Immunother**, v. 10, n. 2, p. 512-8, 2014.

PONTILLO, A. et al. Polymorphisms in inflammasome' genes and susceptibility to HIV-1 infection. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 59, n. 2, p. 121-5, Feb 1 2012.

PONTILLO, A. et al. HIV-1 induces NALP3-inflammasome expression and interleukin-1 β secretion in dendritic cells from healthy individuals but not from HIV-positive patients. **Aids**, v. 26, n. 1, p. 11-8, Jan 2 2012.

PRENDERGAST, A. et al. HIV-1 infection is characterized by profound depletion of CD161+ Th17 cells and gradual decline in regulatory T cells. **Aids**, v. 24, n. 4, p. 491-502, Feb 20 2010.

PY, B. F. et al. Deubiquitination of NLRP3 by BRCC3 critically regulates inflammasome activity. **Mol Cell**, v. 49, n. 2, p. 331-8, Jan 24 2013.

QU, Y. et al. NLRP3 recruitment by NLRC4 during *Salmonella* infection. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 213, n. 6, p. 877-885, 2016.

REGIDOR, D. L. et al. Effect of highly active antiretroviral therapy on biomarkers of B-lymphocyte activation and inflammation. **AIDS (London, England)**, v. 25, n. 3, p. 303-314, 2011.

REIS, E. C. et al. Host genetics contributes to the effectiveness of dendritic cell-based HIV immunotherapy. **Hum Vaccin Immunother**, v. 14, n. 8, p. 1995-2002, 2018.

REIZIS, B. et al. Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions. **Annu Rev Immunol**, v. 29, p. 163-83, 2011.

REYES RUIZ, V. M. et al. Broad detection of bacterial type III secretion system and flagellin proteins by the human NAIP/NLRC4 inflammasome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 50, p. 13242, 2017.

ROEDERER, M. et al. CD8 naive T cell counts decrease progressively in HIV-infected adults. **The Journal of clinical investigation**, v. 95, n. 5, p. 2061-2066, 1995.

SABADO, R. L. et al. Evidence of dysregulation of dendritic cells in primary HIV infection. **Blood**, v. 116, n. 19, p. 3839-52, Nov 11 2010.

SAIFUDDIN, M. et al. Interaction of mannose-binding lectin with primary isolates of human immunodeficiency virus type 1. **J Gen Virol**, v. 81, n. Pt 4, p. 949-55, Apr 2000.

SALEMI, M. et al. Dating the common ancestor of SIVcpz and HIV-1 group M and the origin of HIV-1 subtypes using a new method to uncover clock-like molecular evolution. **Faseb j**, v. 15, n. 2, p. 276-8, Feb 2001.

SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. **J Exp Med**, v. 179, n. 4, p. 1109-18, Apr 1 1994.

SAMARANI, S. et al. Imbalanced production of IL-18 and its antagonist in human diseases, and its implications for HIV-1 infection. **Cytokine**, v. 82, p. 38-51, Jun 2016.

SATO, K.; FUJITA, S. Dendritic cells: nature and classification. **Allergol Int**, v. 56, n. 3, p. 183-91, Sep 2007.

SAUCE, D. et al. PD-1 expression on human CD8 T cells depends on both state of differentiation and activation status. **Aids**, v. 21, n. 15, p. 2005-13, Oct 1 2007.

SCHMIDT, B. et al. Variations in plasmacytoid dendritic cell (PDC) and myeloid dendritic cell (MDC) levels in HIV-infected subjects on and off antiretroviral therapy. **J Clin Immunol**, v. 26, n. 1, p. 55-64, Jan 2006.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. **Nat Protoc**, v. 3, n. 6, p. 1101-8, 2008.

SEGOVIA, J. A. et al. Nedd8 Regulates Inflammasome-Dependent Caspase-1 Activation. **Molecular and Cellular Biology**, v. 35, n. 3, p. 582-597, 01/07 06/06/received08/08/rev-request11/14/accepted 2015.

SHI, H. et al. NLRP3 activation and mitosis are mutually exclusive events coordinated by NEK7, a new inflammasome component. **Nature immunology**, v. 17, n. 3, p. 250-258, 2016.

SHI, J. et al. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. **Nature**, v. 526, n. 7575, p. 660-5, Oct 29 2015.

SHIMADA, K. et al. Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis. **Immunity**, v. 36, n. 3, p. 401-14, Mar 23 2012.

SIERRA, S.; KUPFER, B.; KAISER, R. Basics of the virology of HIV-1 and its replication. **J Clin Virol**, v. 34, n. 4, p. 233-44, Dec 2005.

SIMMONS, D. P. et al. Type I IFN drives a distinctive dendritic cell maturation phenotype that allows continued class II MHC synthesis and antigen processing. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 188, n. 7, p. 3116-3126, 2012.

SOPER, A. et al. Type I Interferon Responses by HIV-1 Infection: Association with Disease Progression and Control. **Front Immunol**, v. 8, p. 1823, 2017.

STEINMAN, R. M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. **Annu Rev Immunol**, v. 9, p. 271-96, 1991.

_____. Dendritic cells: understanding immunogenicity. **Eur J Immunol**, v. 37 Suppl 1, p. S53-60, Nov 2007.

STREECK, H. et al. Emergence of Individual HIV-Specific CD8 T Cell Responses during Primary HIV-1 Infection Can Determine Long-Term Disease Outcome. **Journal of Virology**, v. 88, n. 21, p. 12793, 2014.

STUTZ, A. et al. ASC speck formation as a readout for inflammasome activation. **Methods Mol Biol**, v. 1040, p. 91-101, 2013.

STYLIANOU, E. et al. Interferons and interferon (IFN)-inducible protein 10 during highly active anti-retroviral therapy (HAART)-possible immunosuppressive role of IFN-alpha in HIV infection. **Clin Exp Immunol**, v. 119, n. 3, p. 479-85, Mar 2000.

SVARD, J. et al. Role of translocated bacterial flagellin in monocyte activation among individuals with chronic HIV-1 infection. **Clin Immunol**, v. 161, n. 2, p. 180-9, Dec 2015.

TIAN, X. et al. The upregulation of LAG-3 on T cells defines a subpopulation with functional exhaustion and correlates with disease progression in HIV-infected subjects. **J Immunol**, v. 194, n. 8, p. 3873-82, Apr 15 2015.

TRAUTMANN, L. et al. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. **Nat Med**, v. 12, n. 10, p. 1198-202, Oct 2006.

TREANOR, J. J. et al. Safety and immunogenicity of a recombinant hemagglutinin influenza-flagellin fusion vaccine (VAX125) in healthy young adults. **Vaccine**, v. 28, n. 52, p. 8268-74, Dec 6 2010.

TROYER, J. L. et al. Genome-wide Association Study Implicates PARD3B-based AIDS Restriction. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 203, n. 10, p. 1491-1502, 09/30/received 12/22/accepted 2011.

TSCHOPP, J.; SCHRODER, K. NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production? **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 3, p. 210-5, Mar 2010.

TURLEY, C. B. et al. Safety and immunogenicity of a recombinant M2e-flagellin influenza vaccine (STF2.4xM2e) in healthy adults. **Vaccine**, v. 29, n. 32, p. 5145-52, Jul 18 2011.

TZE, L. E. et al. CD83 increases MHC II and CD86 on dendritic cells by opposing IL-10-driven MARCH1-mediated ubiquitination and degradation. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 208, n. 1, p. 149-165, 2011.

UNAIDS/WHO. Report on the global AIDS epidemic. 2018.

UNTERHOLZNER, L. et al. IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. **Nature immunology**, v. 11, n. 11, p. 997-1004, 2010.

VERHASSELT, V. et al. Bacterial lipopolysaccharide stimulates the production of cytokines and the expression of costimulatory molecules by human peripheral blood dendritic cells: evidence for a soluble CD14-dependent pathway. **J Immunol**, v. 158, n. 6, p. 2919-25, Mar 15 1997.

VILLANI, A. C.; SATIJA, R. Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. v. 356, n. 6335, Apr 21 2017.

VON SYDOW, M. et al. Interferon-alpha and tumor necrosis factor-alpha in serum of patients in various stages of HIV-1 infection. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 7, n. 4, p. 375-80, Apr 1991.

WILSON, E. M. P. et al. Monocyte-Activation Phenotypes Are Associated With Biomarkers of Inflammation and Coagulation in Chronic HIV Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 210, n. 9, p. 1396-1406, 2014.

WONG, K. L. et al. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. **Blood**, v. 118, n. 5, p. e16-31, Aug 4 2011.

WU, L.; DAKIC, A. Development of dendritic cell system. **Cell Mol Immunol**, v. 1, n. 2, p. 112-8, Apr 2004.

WU, L.; KEWALRAMANI, V. N. Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. **Nat Rev Immunol**, v. 6, n. 11, p. 859-68, Nov 2006.

WU, L.; KEWALRAMANI, V. N. Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. **Nature reviews. Immunology**, v. 6, n. 11, p. 859-868, 2006.

WYKES, M. N.; LEWIN, S. R. Immune checkpoint blockade in infectious diseases. **Nature Reviews Immunology**, v. 18, p. 91, 10/09/online 2017.

XU, J.; LU, L.; LI, L. NEK7: a novel promising therapy target for NLRP3-related inflammatory diseases. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 48, n. 10, p. 966-968, 2016.

YANG, J.; LIU, Z.; XIAO, T. S. Post-translational regulation of inflammasomes. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 14, p. 65, 06/27/online 2016.

YANG, J. et al. Human NAIP and mouse NAIP1 recognize bacterial type III secretion needle protein for inflammasome activation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 35, p. 14408-13, Aug 27 2013.

YAO, Z. Q.; MOORMAN, J. P. Immune exhaustion and immune senescence: two distinct pathways for HBV vaccine failure during HCV and/or HIV infection. **Archivum immunologiae et therapiae experimentalis**, v. 61, n. 3, p. 193-201, 2013.

YOON, S. I. et al. Structural basis of TLR5-flagellin recognition and signaling. **Science**, v. 335, n. 6070, p. 859-64, Feb 17 2012.

YOUNAI, F. S. Thirty years of the human immunodeficiency virus epidemic and beyond. **Int J Oral Sci**, v. 5, n. 4, p. 191-9, Dec 2013.

ZELLER, T. et al. Molecular Characterization of the NLRC4 Expression in Relation to Interleukin-18 Levels. **Circ Cardiovasc Genet**, v. 8, n. 5, p. 717-26, Oct 2015.

ZHANG, B. et al. Prevention and cure of rotavirus infection via TLR5/NLRC4-mediated production of IL-22 and IL-18. **Science**, v. 346, n. 6211, p. 861, 2014.

ZHANG, J. Y. et al. PD-1 up-regulation is correlated with HIV-specific memory CD8⁺ T-cell exhaustion in typical progressors but not in long-term nonprogressors. **Blood**, v. 109, n. 11, p. 4671-8, Jun 1 2007.

ZHANG, L. et al. Cryo-EM structure of the activated NAIP2-NLRC4 inflammasome reveals nucleated polymerization. **Science**, v. 350, n. 6259, p. 404-9, Oct 23 2015.

ZHANG, Z. et al. Sexual transmission and propagation of SIV and HIV in resting and activated CD4⁺ T cells. **Science**, v. 286, n. 5443, p. 1353-7, Nov 12 1999.

ZHAO, Y. et al. The NLRC4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus. **Nature**, v. 477, n. 7366, p. 596-600, Sep 29 2011.

ZHENG, J. H. et al. Two-step enhanced cancer immunotherapy with engineered Salmonella typhimurium secreting heterologous flagellin. **Sci Transl Med**, v. 9, n. 376, Feb 8 2017.

ZIEGLER-HEITBROCK, L. et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. **Blood**, v. 116, n. 16, p. e74-80, Oct 21 2010.

APÊNDICE A - Dados demográficos e clínicos dos indivíduos infectados pelo HIV utilizados para os ensaios funcionais

Dados demográficos e clínicos dos indivíduos infectados pelo HIV incluídos nos ensaios celulares

Código Paciente	Sexo	Idade (Anos)	Cor/Raça	Nadir (células/mm ³)	Data de coleta	Tempo diagnóstico tratamento (Anos)	Pré-tratamento				Pós-tratamento			
							Tempo (Anos)	CD4+ (células/mm ³)	CVP (log ₁₀)	CVP (cópias/mL)	CD4+ (células/mm ³)	CVP (log ₁₀)	CVP (cópias/mL)	
25	M	57	Branca	11	14/07/2016	23	21	11	NF	NF	682,44	1,70	≤50	
27	F	77	Branca	118	14/07/2016	21	19	6	5,87	630,96	391,50	3,19	1,58	
41	M	43	Branca	1320	28/07/2016	17	8	1320	4,49	31,62	830,78	1,70	≤50	
42	F	55	Branca	24	28/07/2016	6	4	24	NF	NF	1006,67	2,56	398	
44	F	29	Branca	835	28/07/2016	NF	7	835	2,9	794,00	779,13	2,98	1000	
101	M	47	Branca	682	28/09/2016	23	19	682	NF	NF	860,63	1,70	≤50	
104	M	54	Negra	749	28/09/2016	24	20	749	2,6	398,00	819,56	1,72	50	
142	F	49	Parda	46	30/11/2016	23	21	46	4,17	15,85	696,00	1,70	≤50	
145	M	66	Branca	15	30/11/2016	18	16	15	NF	NF	550,44	1,70	≤50	
147	F	20	Branca	NF	30/11/2016	20	18	NF	NF	NF	343,10	2,44	316	
181	F	57	Branca	NF	01/06/2017	25	22	516	4,76	50,12	330,33	1,70	≤50	
182	F	61	Branca	360	01/06/2017	NF	21	11	NF	NF	853,67	2,04	100	
191	M	52	Branca	112	06/07/2017	NF	22	1320	4,49	31,62	496,00	1,70	≤50	
192	F	61	Branca	NF	06/07/2017	NF	NF	24	NF	NF	550,00	1,70	≤50	
194	M	45	Branca	288	06/07/2017	2	1	835	2,89	794,00	1010,30	1,70	≤50	
232	M	60	Branca	347	03/08/2017	28	22	682	NF	NF	1231,56	1,91	79	
238	M	37	Negra	440	18/01/2018	4	4	749	2,6	398,00	682,00	1,79	63	
239	M	66	Parda	NF	18/01/2018	18	18	46	4,17	15,85	347,00	3,36	2,512	
241	M	58	Branca	312	01/02/2018	20	20	15	NF	NF	648,50	4,29	19,953	
242	F	39	Branca	232	01/02/2018	18	9	NF	NF	NF	294,89	3,32	1,995	
248	M	58	Branca	374	01/03/2018	20	20	NF	NF	NF	885,50	1,70	≤50	
253	M	54	Branca	392	14/03/2018	16	9	360	NF	NF	443,91	3,48	3,162	
258	M	49	Parda	104	18/04/2018	NF	NF	112	3,6	3,98	1118,64	1,70	≤50	
260	F	50	Branca	327	18/04/2018	19	8	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
261	M	45	Branca	134	25/04/2018	11	8	288	4,33	19,95	474,82	NF	NF	
263	F	46	Branca	NF	25/04/2018	23	20	NF	NF	NF	814,18	1,70	≤50	
264	M	58	Branca	NF	02/05/2018	28	21	NF	NF	NF	511,50	1,70	≤50	
296	F	43	Negra	NF	21/09/2018	14	13	403	5,14	12,59	323,00	1,70	≤50	
297	M	51	Parda	NF	21/09/2018	23	21	456	NF	NF	997,00	1,70	≤50	
300	M	52	Branca	NF	03/10/2018	11	11	NF	NF	NF	NF	1,70	≤50	

Abreviações: M= masculino, F= feminino; CVP=carga viral plasmática; CD4+= linfócitos T CD4+, NF=dado não fornecido.

APÊNDICE B - Resultado da titulação dos anticorpos monoclonais utilizados na análise fenotípica das DC

Anticorpo monoclonal	Volume recomendado (µL)	Volume titulado (µL)	Stain Index
CD14 PE	20	5	147.16
CD11c FITC	5.0	2,5	13.76
CD40 Horizon 450	5.0	5.0	32.78
CD86 Pe-Cy7	5.0	1.25	170.00
CD209 APC	20.0	5.0	53.89
HLADR V500	5.0	0.63	185.5

Para cada anticorpo monoclonal são reportados o volume de uso recomendado pelo fabricante, o volume resultante da titulação e o stain index.

A fim de definir a quantidade ótima de cada anticorpo monoclonal necessária para a marcação das células e análise por citometria de fluxo, foi realizada a titulação dos anticorpos individualmente em um painel de 8 diferentes diluições para cada anticorpo. Assim, 100 µL de 2×10^6 DC/mL foram distribuídas em placas de cultura de 96 poços de fundo V e os anticorpos foram adicionados em concentração decrescente (1/128; 1/64; 1/32; 1/16; 1/8; 1/4; 1/2; 1/1) a partir da concentração inicial recomendada pelo fabricante.

A maior diluição que não representasse uma diminuição significativa no percentual de células positivas, quando comparada à quantidade de anticorpo sugerida pelo fabricante, foi a escolhida. Além disso, foi calculado o stain index (população positiva – população negativa / 2x desvio padrão) para comprovar o volume que melhor separou as populações quando a população era bimodal. Com base neste critério, foi possível reduzir as concentrações de uso da maioria dos anticorpos, com relação ao recomendado pelo fabricante.

APÊNDICE C - Padronização da concentração da FLG e tempo de estímulo

Para determinar a concentração para o estímulo com flagelina (FLG) e cinética foram testadas três concentrações: 1,25, 5 e 7 $\mu\text{g/mL}$ FLG por 3, 8, 18 e 24 horas.

A partir dos dados resultantes de concentração e tempo de estímulo foi selecionada a concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$ e 24 horas para a realização dos experimentos.

(A) 2×10^5 de DC de doadores sadios (HD-DC; $n=5$) foram estimuladas com 1, 2,5, 5 ou 7 $\mu\text{g/mL}$ de flagelina (FLG) por 24 horas. (B) 2×10^5 de DC de doadores sadios (HD-DC; $n=5$) foram estimuladas com 5 $\mu\text{g/mL}$ de flagelina (FLG) por 3, 8, 18 e 24 horas. As concentrações de IL-1 β foram mensuradas nos sobrenadantes de cultura. Two-Way ANOVA foi aplicado para comparar entre as condições testadas. Dados são representados como média e $\pm$ erro padrão.

APÊNDICE D - Escolha do tipo de FLG

Para determinar qual FLG utilizar nos experimentos foram testadas as flagelinas standard (FLG) e a flagelina ultrapura (FLG UP) por 24 horas na concentração de 5 µg/mL. A partir disso, decidimos utilizar a standard para todos os experimentos visando o nível de ativação e a FLG ultrapura para confirmar os resultados.

2×10^5 de DC de doadores saudáveis (HD-DC; n=5) ou indivíduos infectados pelo HIV (HIV-DC; n=5) foram estimuladas com 5 µg/ml de flagelina standard (FLG) e a flagelina ultrapura (FLG UP) por 24 horas. As concentrações de IL-1 β foram mensuradas nos sobrenadantes de cultura. Two-Way ANOVA foi aplicado para comparar as condições tratadas com FLG e FLG UP e não estimuladas (NE) em HD- e HIV-DC (*: p<0.05). Dados são representados como média e $\pm$ erro padrão.

APÊNDICE E - *Priming* com LPS

De acordo com o protocolo utilizado em monócitos e macrófagos humanos descrito por Canna e colaboradores (CANNA et al., 2014), em alguns ensaios as DC foram estimuladas com FLG por 2 horas com prévia incubação com 1 µg/mL LPS por 4 horas. Dessa forma, testamos um “*priming*” com LPS por 4h seguido de 2h de estimulação com FLG e comparamos com a produção de IL-1β após 24 horas de estímulo apenas com FLG. A produção de IL-1β não resultou significativamente maior com o “*priming*” de LPS em relação a estimulação apenas com FLG, desta forma decidimos prosseguir os ensaios sem o “*priming*”.

2×10^5 DC de doadores saudáveis (HD-DC; $n=5$) foram estimuladas com 5 µg/mL de flagelina (FLG) por 24 horas ou com 1 µg/mL LPS por 4 horas e FLG por 2 horas. A dosagem de IL-1β foi realizada em HD-DC por ELISA. Os dados são reportados como média $\pm$ erro padrão. Teste t Student foi aplicado para comparar as condições tratado com FLG e primado com LPS e tratado com FLG em HD-DC.

APÊNDICE F - Dosagem de IL-18BP em sobrenadantes HD-DC e HIV-DC após estimulação

Com o intuito de entender se o nível de IL-18 correlaciona com o nível de seu inibidor IL18BP, foi realizada a determinação de IL-18 após o estímulo de LPS, LPS+ATP e FLG.

2×10^5 de DC de doadores saudáveis (HD-DC; n=5) ou indivíduos infectados pelo HIV (HIV-DC; n=5) foram estimuladas com 5 µg/ml de flagelina (FLG) por 24 horas ou 1 µg/ml de LPS por 24 horas ou 1 µg/ml LPS por 24 horas seguido de 1mM de ATP por 15 minutos. A concentração de IL-18BP foi mensurada nos sobrenadantes. Two-Way ANOVA foi aplicado para comparar as condições tratadas com FLG, LPS, LPS+ATP e não estimuladas (NE) em HD- e HIV-DC (*: p<0.05). Dados são representados como média e $\pm$ erro padrão.

APÊNDICE G - Estimulação em HD-DC e HIV-DC com outros agonistas

Para entender se o efeito visto está associado apenas com nosso modelo, realizamos um teste com HD e HIV-DC estimuladas com outros agonistas, como nigericina (NLRP3), CpG (TLR9), poly I: C (TLR3) (BEZBRADICA; COLL; SCHRODER, 2016; GAIDT et al., 2016; SHI, H.; WANG; LI; ZHAN; TAN; et al., 2016) e poly dA:dT/LyoVec (AIM2).

2×10^5 DC de doadores saudáveis (HD-DC; $n=3$) e indivíduos infectados pelo HIV (HIV-DC; $n=3$) foram estimuladas com $10 \mu\text{g/mL}$ de nigericina ou $4 \mu\text{g/mL}$ de CpG 2395 ou $20 \mu\text{g/mL}$ de Poly I:C ou $1 \mu\text{g/mL}$ de Poly dA:dT complexo com Lyovec após a prévia incubação com $1 \mu\text{g/mL}$ de LPS (A), ou não (B). Os dados são reportados como média $\pm$ erro padrão. Teste t múltiplo foi aplicado para comparar HD- e HIV-DC (*: $p<0.05$).

APÊNDICE H - Estimulação de HD-DC e HIV-DC com FLG na presença de meio com elevada concentração de K^+

Mais uma vez para tentar averiguar a contribuição do NLRP3 na montagem do NAIP/NLRC4 inflamassoma, nos ensaios de estimulação das DC com FLG utilizamos um meio com elevada concentração de K^+ (130 mM KCl) com intuito de bloquear o efluxo de K^+ ATP-dependente, representando uma inibição indireta do NLRP3. Como controle negativo do bloqueio da via, utilizamos um meio com alta concentração de NaCl (130 mM).

A produção de IL-1 β induzida por FLG nas HD-DC (meio: 0% inibição) foi inibida de modo significativo em todas as condições (alta concentração K^+ : 95.3% e alta concentração NaCl: 96%). Nas HIV-DC, a inibição foi um pouco maior quando utilizamos uma alta concentração K^+ : 98%, enquanto que a alta concentração NaCl inibiu 95.3% da produção de IL-1 β induzida por FLG. Apesar do dado corroborar a participação do NLRP3 na sinalização mediada por FLG, o fato da alta concentração de NaCl também inibir implica em uma possível inibição específica. Logo, não se pode afirmar que há uma participação purinérgica na ativação vista em nosso modelo.

2×10^5 DC de doadores saudáveis (HD-DC; n=10) e indivíduos infectados pelo HIV (HIV-DC; n=10) foram estimuladas com 5 μ g/ml FLG por 24 horas na presença de meio de cultura a 130 mM de KCl ou NaCl. A concentração de IL-1 β foi mensurada em sobrenadantes. Teste t student foi aplicado para comparar as condições não estimulado e estimulado*: $p < 0.05$. Dados são representados como média e $\pm$ erro padrão.

APÊNDICE I - Efetividade e especificidade do silenciamento

Com o intuito de avaliar a efetividade e especificidade do silenciamento foram realizados testes com qPCR para os genes *NLRP3* e *NLRC4*.

2×10^5 de células dendríticas derivadas de monócitos foram transduzidas usando as mesmas quantidades de partículas de lentivírus condicionando controle vazio ou shRNA específicos para NLRC4 ou NLRP3 na presença de SIV3+ VLP por 48 horas. Após isso, as células foram tratadas com 5 $\mu\text{g/mL}$ FLG ou 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS por 24 horas. A eficiência do silenciamento para a proteína alvo nas células transduzidas com lentivírus foi avaliada por expressão gênica. WT: expressão gênica “selvagem” para NLRC4 e NLRP3.

APÊNDICE J - HD-DC pulsadas com vírus HIV inativado e estimuladas com FLG, LPS e LPS+ATP

Com o intuito de entender se o vírus HIV pode influenciar a ativação do inflamassoma em nosso contexto, realizamos a dosagem em amostras de indivíduos sadios pulsadas com partículas de vírus HIV-1 inativado. Para isso, as HD-DC foram tratadas com vírus HIV inativado com aldrithiol-2 por 4 horas e, em seguida, estimuladas com LPS ou LPS+ATP ou FLG. A partir disso não foram vistas diferenças significativas entre o pulsado com vírus e não pulsado, sendo assim, apesar de existir uma tendência de redução na resposta do inflamassoma tanto com LPS+ATP quanto de FLG, não foi suficiente para detectar um efeito significativo.

A liberação de IL-1 β mostrou diferenças significativas em LPS, LPS+ATP e FLG em relação à condição não estimulada, na ausência do vírus. Quando as HD-DC foram tratadas com vírus e estimuladas, vimos um aumento significativo em relação ao não estimulado apenas em relação ao estímulo com LPS+ATP.

2×10^5 de DC de doadores sadios (HD-DC; $n=5$) ou indivíduos infectados pelo HIV (HIV-DC; $n=5$) foram não estimuladas (NE) ou estimuladas com 5 $\mu\text{g/ml}$ de flagelina (FLG) por 24 horas ou 1 $\mu\text{g/ml}$ de LPS por 24 horas ou 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS por 24 horas seguido de 1mM de ATP por 15 minutos. Two-Way ANOVA foi aplicado para comparar as condições dentro do grupo (NE versus LPS, LPS+ATP ou FLG em HD-DC ou HD-DC+HIV+AT2*: $p < 0.05$; LPS+ATP versus LPS: #: $p < 0.05$) e entre grupos (HD-DC versus HD+HIV+AT2). Dados são representados como média e $\pm$ erro padrão.

APÊNDICE L - Produção científica e participação em eventos da área

Artigos/capítulo de livro publicados:

- **REIS, EDIONE CRISTINA DOS**; LEAL, VINÍCIUS NUNES CORDEIRO ; SOARES, JAÍNE LIMA DA SILVA ; FERNANDES, FERNANDA PEREIRA ; SOUZA DE LIMA, DHÊMERSON ; DE ALENCAR, BRUNA CUNHA ; PONTILLO, ALESSANDRA . Flagellin/NLRC4 Pathway Rescues NLRP3-Inflammasome Defect in Dendritic Cells From HIV-Infected Patients: Perspective for New Adjuvant in Immunocompromised Individuals. *Frontiers in Immunology*, v. 10, p. 1, 2019.
- **REIS, EDIONE C.**; DA SILVA, LAIS T ; DA SILVA, WANESSA C. ; RIOS, ALEXANDRE ; DUARTE, ALBERTO J ; OSHIRO, TELMA M. ; CROVELLA, SERGIO ; PONTILLO, ALESSANDRA . Host genetics contributes to the effectiveness of dendritic cell-based HIV immunotherapy. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, v. 1, p. 1-21, 2018.
- PONTILLO, ALESSANDRA ; REIS, **EDIONE C.** ; DA SILVA, LAIS T. ; DUARTE, ALBERTO J.S. ; CROVELLA, SERGIO ; OSHIRO, TELMA M. . Dendritic cells used in anti-HIV immunotherapy showed different modulation in anti-HIV genes expression: New concept for the improvement of patients' selection criteria. *Journal of Cellular Immunotherapy*, v. 3, p. 1-10, 2016.
- ELLWANGER, JOEL HENRIQUE ; CROVELLA, SERGIO ; **DOS REIS, EDIONE CRISTINA** ; PONTILLO, ALESSANDRA ; CHIES, JOSÉ ARTUR BOGO . Exosomes are possibly used as a tool of immune regulation during the dendritic cell-based immune therapy against HIV-I. *Medical Hypotheses*, v. 95, p. 67-70, 2016.
- SANTOS, MARINA L.S. ; **REIS, EDIONE CRISTINA** ; BRICHER, PAMELA N. ; SOUSA, TAIS N. ; BRITO, CRISTIANA F.A. ; LACERDA, MARCUS V.G. ; FONTES, COR J.F. ; CARVALHO, LUZIA H. ; PONTILLO, ALESSANDRA . Contribution of inflammasome genetics in *Plasmodium vivax* malaria. *Infection, Genetics and Evolution* (Print), v. 40, p. 162-166, 2016.
- da Silva, Wanessa Cardoso ; **REIS, EDIONE C.** ; OSHIRO, TELMA M. ; PONTILLO, ALESSANDRA . Genetics of Inflammasomes. In: Mario D. Cordero; Elisabet Alcocer-Gómez. (Org.). *Experientia Supplementum*. 1ed.: Springer International Publishing, 2018, v. 108, p. 321-341.

Artigos em submissão ou submetidos ou aceitos para publicação:

- **Edione C. REIS**, Vinicius N.C. LEAL, Lais T. da SILVA, Enrique. R. ARGANÁRAZ, Marília M.L. dos REIS, Telma M. OSHIRO, Alessandra PONTILLO. Antagonistic role of IL-1 β and NLRP3/IL-18 axis in chronic HIV-1 infection.

- **REIS Edione Cristina***, LEAL Vinicius Nunes Cordeiro*, PONTILLO Alessandra. INFLAMMASOME IN HIV INFECTION: LIGHTS AND SHADOWS. *Contribuição igualitária dos autores
- Pereira Fernandes F, Leal VNC, Souza LD, **Reis EC**, Pontillo A. Inflammasome genetics and complex diseases: a comprehensive review.
- Vinicius Nunes Cordeiro Leal, **Edione Cristina dos Reis**, Fernanda Pereira Fernandes, Iohanã Gabriely Oliverira, Jaíne Soares Lima da Silva, Dhêmerson Souza de Lima, Alessandra Pontillo. NLRP3 inflammasome dysregulation in peripheral blood CD19+ Lymphocytes contributes to chronic inflammation and eventually poor immune response of HIV+ patients.
- Dhêmerson Souza de Lima; Vinicius Nunes Cordeiro Leal; **Edione Cristina dos Reis**; Jaíne Soares Lima da Silva; Fernanda Pereira Fernandes; Eduardo Pinheiro Amaral; Caio César Barbosa Bomfim; Maria R D'Império Lima; Flavio Vieira Loures; Mauricio Morishi Ogusku; Aya Sadahiro; Alessandra Pontillo. NLRP3- and NLRC4-driven inflammasome activation contributes to tuberculosis establishment and outcome in endemic areas"

Participação em congressos, encontros e simpósios:

- 14th World Congress on Inflammation. Sidney. Austrália. 2019. (Congresso).
- VII Annual Meeting of the Graduate Program in Immunology, 2019, São Paulo. Brasil. (Encontro).
- 15th International Symposium on Dendritic Cells, 2018, Aachen (Alemanha). (Simpósio- Travel Award)
- Toll 2018, 2018, Porto, Portugal. Toll 2018 Editing Innate Immunity, 2018. v. 1. p. 1-95. (Congresso).
- XIII Curso Avançado de Patogênese do HIV. 2018. São Paulo. Brasil.
- Third International Symposium on Inflammatory diseases-INFLAMMA II. 2017. Ribeirão Preto. Brasil. (Simpósio).
- XLII Congress of the Brazilian Society of Immunology. 2017. Salvador, Brasil. (Congresso).
- XLI Congress of the Brazilian Society of Immunology. 2016. Campos do Jordão, Brasil. (Congresso).
- VI Encontro do Programa de Pós-graduação em Imunologia. 2016. São Paulo. Brasil. (Encontro).

- UofT-USP Workshop on Cancer, Inflammation and immunity. 2016. São Paulo. Brasil. (Workshop).
- V Encontro do Programa de Pós-graduação em Imunologia. 2016. São Paulo. Brasil. (Encontro).
- XLICongress of the Brazilian Society of Immunology. 2016. Guarujá, Brasil. (Congresso).
- 61° Congresso Brasileiro de Genética. 2015. Águas de Lindóia. Brasil. (Congresso).

Flagellin/NLRC4 Pathway Rescues NLRP3-Inflammasome Defect in Dendritic Cells From HIV-Infected Patients: Perspective for New Adjuvant in Immunocompromised Individuals

Edione Cristina dos Reis^{1*}, Vinícius Nunes Cordeiro Leal¹, Jaíne Lima da Silva Soares¹, Fernanda Pereira Fernandes¹, Dhêmerson Souza de Lima¹, Bruna Cunha de Alencar² and Alessandra Pontillo¹

¹ Laboratory of Immunogenetics, Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences/ICB, University of São Paulo/USP, São Paulo, Brazil, ² Laboratory of Immune System Cell Biology, Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences/ICB, University of São Paulo/USP, São Paulo, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Daniela Santoro Rosa,
Federal University of São Paulo, Brazil

Reviewed by:

Osamu Takeuchi,
Kyoto University, Japan
Ezequiel Ruiz-Mateos,
Institute of Biomedicine of Seville
(IBIS), Spain

*Correspondence:

Edione Cristina dos Reis
edionereis@usp.br

Specialty section:

This article was submitted to
Antigen Presenting Cell Biology,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 30 July 2018

Accepted: 21 May 2019

Published: 11 June 2019

Citation:

Reis EC, Leal VNC, Soares JLS,
Fernandes FP, Souza de Lima D,
de Alencar BC and Pontillo A (2019)
Flagellin/NLRC4 Pathway Rescues
NLRP3-Inflammasome Defect in
Dendritic Cells From HIV-Infected
Patients: Perspective for New
Adjuvant in Immunocompromised
Individuals. *Front. Immunol.* 10:1291.
doi: 10.3389/fimmu.2019.01291

Introduction: NLRP3 inflammasome plays a key role in dendritic cells (DC) activation in response to vaccine adjuvants, however we previously showed that it is not properly activated in DC from HIV-infected patients (HIV-DC), explaining, at least in part, the poor response to immunization of these patients. Taking in account that several cytoplasmic receptors are able to activate inflammasome, and that bacterial components are considered as a novel and efficient adjuvant, we postulated that bacterial flagellin (FLG), a natural ligand of NAIP/NLRC4 inflammasome, could rescue the activation of the complex in HIV-DC.

Objective: Demonstrate that FLG is able to activate monocyte-derived dendritic cells from HIV-infected individuals better than LPS, and to what extent the entity of inflammasome activation differs between DC from HIV-infected patients and healthy donors.

Methods: Monocyte-derived dendritic cells from HIV-infected patients (HIV-DC) and healthy donors (HD-DC) were stimulated with FLG, and inflammasome as well as DC activation (phenotypic profile, cytokine production, autologous lymphocytes activation) were compared. Chemical and genetic inhibitors were used to depict the relative contribution of NLRC4 and NLRP3 in HIV/HD-DC response to FLG.

Results: FLG properly activates HD-DC and HIV-DC. FLG induces higher inflammasome activation than LPS in HIV-DC. FLG acts through NLRC4 and NLRP3 in HD-DC, but at a lesser extent in HIV-DC due to intrinsic NLRP3 defect.

Conclusions: FLG by-passes NLRP3 defect in HIV-DC, through the activation of NAIP/NLRC4 inflammasome, indicating possible future use of the bacterial component as an efficient adjuvant in immunocompromised individuals.

Keywords: dendritic cell, inflammasome, HIV, flagellin, NLRC4, adjuvant

INTRODUCTION

Dendritic cells (DC) are a specialized professional antigen presenting cells (APC) with unique capability to initiate and maintain primary immune responses when pulsed with antigens (1–3). Following recognition of pathogen- or damage-associated molecular patterns (PAMPs or DAMPs, respectively) by innate pattern recognition receptors (PRRs), DC activate and turn into a potent APC. The final differentiation of activated DC is characterized by plasma membrane up-regulation of MHC-II and co-stimulatory molecules (i.e., CD86, CD80), and the production of cytokines important for T CD4⁺ lymphocytes activation at the immunologic synapsis (i.e., IL-12 and IL-18; and/or IL-1 β ; or IL-4). The result of DC activation drives the polarization of T CD4⁺ lymphocytes, and therefore of the immune response (4).

Successful vaccine preparations have to properly activate DC to induce a long-term memory protective immunity. Together with pathogen' antigens, adjuvants strongly contribute to the effectiveness of a vaccine. Their action is mediated by DC PRRs, such as Toll-like receptors (TLRs) and NACHT and LRR containing receptors (NLRs), through the activation of intracellular pathways leading to the production of cytokines important for T cell activation (5). Alum (aluminum hydroxide), a commonly used adjuvant, activates murine DC through the induction of the NLR-containing a PYD domain 3 (NLRP3) and the consequent mounting of the cytoplasmic complex, known as inflammasome, which results in caspase-1 activation and IL-1 β and IL-18 production. The absence of NLRP3 results in the loss of adjuvant responsivity (6), emphasizing the central role of inflammasome in the activation of DC and in the induction of an efficient immune response.

Accordingly, recent findings have reported that individuals with a low response to vaccines, such infants (7) or cancer patients (8) present a substantial alteration in inflammasome expression and/or activity.

Immune response to many current vaccines is known to be impaired and/or less effective in chronically HIV-infected individuals (9). This impairment has been associated to both a reduced frequency of DC (10, 11), together with phenotypic and functional alterations of these cells (12). As HIV-infected patients present well-documented DC impairment, it has been proposed that a poor response to vaccination could be caused by a diminished and/or defective response to common adjuvants (13).

We have previously demonstrated that NLRP3 inflammasome is not correctly activated by bacterial lipopolysaccharide (LPS) in monocyte-derived dendritic cells (MDDC) from HIV-infected patients (HIV-DC) (14), possibly as a result of the HIV-associated chronic inflammation and the consequent immune system exhaustion (15). As NLRP3 inflammasome is involved in the activation of DC by vaccine adjuvants (6, 16), the defect observed in NLRP3 inflammasome possibly contributes to the less extend immunization response in HIV-infected individuals.

To counteract the low immune response, new vaccination strategies have been proposed, such as the use of PRRs agonists, such as LPS or flagellin (FLG), as largely reviewed in (17).

FLG is the main component of a bacterial flagellum, and it is recognized extracellularly by TLR5 inducing a Myd88 signaling and promoting the transcription of NF- κ B-related genes (18, 19); and by the intracellular receptors, NLR-containing a BIR domain (NAIP) and NLR-containing a CARD domain (NLRC)-4. NAIP directly binds FLG, while NLRC4 recognizes the NAIP:FLG complex and mounts the NAIP/NLRC4 inflammasome, resulting in IL-1 β and IL-18 production (20–22).

FLG has already been used as an adjuvant in a number of clinical trials of healthy individuals (23, 24), however to our knowledge none or poor data are available about its ability to activate MDDC in both healthy or immuno-compromised individuals via NAIP/NLRC4 inflammasome.

Taking in account the key role of the inflammasome in proper DC activation, and the impairment of NLRP3 activation observed in HIV-DC, we hypothesize that FLG could represent an alternative adjuvant for HIV-infected patients, by activating inflammasome in DC through NAIP and NLRC4 receptors, and in this way by-passing the NLRP3 defect. Therefore, the aim of this study was to demonstrate that FLG is able to activate MDDC from HIV-infected individuals better than LPS, and to what extent the entity of inflammasome activation differs between HIV-DC and HD-DC.

MATERIALS AND METHODS

HIV-Infected Patients

Twenty-seven HIV-infected adults patients (16 males/11 females; 51.9 ± 11.7 years), proceeding from the metropolitan area of São Paulo (SP, Brazil), seropositive for at least 5 years (26.9 ± 16.9 years), in antiretroviral therapy (ART), with blood CD4⁺ T cells count >500 cells/ μ l, without clinical AIDS or other chronic diseases (i.e., neoplasias, cardiovascular disease, autoimmune disease, kidney disease, obesity) or infectious diseases (i.e., human T-lymphotropic virus/HTLV, hepatitis B or hepatitis C virus), were recruited from January 2016 to May 2018 at the “Serviço de Extensão ao Atendimento de Pacientes HIV/AIDS” (SEAP) of the Faculty of Medicine, University of São Paulo (São Paulo, SP, Brazil). Fifty milliliter of the peripheral blood was collected in heparin tubes. All volunteers assigned the informed consent approved by the Institutional Ethical Committee. Patients' main characteristics are summarized in **Table 1**.

Healthy Donors (HD)

Twenty-seven adults (15 males/12 females; 45.5 ± 13.4 years), proceeding from the metropolitan area of São Paulo (SP, Brazil), without clinical HIV or other chronic or infectious diseases, were recruited at the Blood Bank Service of the Hospital “Oswaldo Cruz” (São Paulo, SP, Brazil). Fifty milliliter of the peripheral blood was collected in heparin tubes. All volunteers assigned the informed consent approved by the Hospital Ethical Committee. HD demographic data were included in **Table 1**. Of note, any significant difference exists in gender ratio (Fisher test $p > 0.05$) or age mean value (t -test $p > 0.05$) between HD and HIV-infected patients.

TABLE 1 | Main characteristics of healthy donors and HIV-infected patients.

	HD (n = 27)	HIV (n = 27)
Gender (M/F), n	15/12	16/11
Age (years), mean ± SD	45.5 ± 13.4	51.9 ± 11.7
Time from diagnosis (years), mean ± SD		26.9 ± 16.9
PVL* (log RNA copies/μL), mean ± SD		1.77 ± 0.37
PVL ⁰ (log RNA copies/μL), mean ± SD		4.00 ± 1.02
PVL ¹ (log RNA copies/μL), mean ± SD		2.25 ± 0.77
CD4 ⁺ T* (cells/μL), mean ± SD		768.9 ± 283.1
CD4 ⁺ T ⁰ (cells/μL), mean ± SD		377.5 ± 389.9
CD4 ⁺ T ¹ (cells/μL), mean ± SD		679.0 ± 252.7

Gender and age are reported for healthy donors (HD) and HIV-infected patients (HIV). Time from HIV-1 diagnosis as well as plasma viral load (PVL) and CD4⁺ T cells counts at the time of blood collection (*), before (⁰) and after (¹) the start of anti-retroviral therapy (ART) were included for HIV-infected patients. The detection limit of PVL was 1.70 log HIV-1 RNA copies/ml. M, males; F, females; n, number of individuals; SD, standard deviation.

Human Monocyte-Derived Dendritic Cells (MDDC)

Mononuclear cells were isolated from 50 mL of peripheral blood by Ficoll-Hypaque (GE Healthcare) density gradient, and monocytes were separated from lymphocytes by plastic adherence. Briefly, 4×10^6 mononuclear cells/well were incubated in 24-wells culture plates (Corning-Costar). After 2 h, non-adherent cells (mainly lymphocytes) were removed and cryopreserved at -80°C for co-culture assays, while adherent cells (mainly monocytes) were cultured with 50 ng/mL GM-CSF (Peprotech) and 50 ng/mL IL-4 (Peprotech) in RPMI-1640 (Gibco, Thermo Fisher Scientific) supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS; Gibco) at 37°C in 5% CO_2 for 5 days (25). Monocytes-to-DC differentiation was confirmed by flow cytometry analysis of CD14 and CD11c surface markers (Supplementary File 1).

MDDC (HIV-DC or HD-DC) were stimulated with purified 5 μg/mL FLG from *S. typhimurium* (FLA-ST, Invivogen) or 1 μg/mL LPS from *E. coli* (Sigma-Aldrich, Merck) for 3, 8, 18, and 24 h and 1 mM ATP was added for more 15 min (26). In some experiments, MDDC were pre-incubated with 10 μg/mL MCC-950 (Invivogen), a specific NLRP3 inhibitor (27), or 10 μM parthenolide (PTD; Sigma-Aldrich, Merck), a NF-κB and caspases inhibitor (28); or with 1,000 UI/mL IFN-α-2b (Schering-Plough) for 18 h (29, 30). Cell supernatants were collected for cytokines measurement. MDDC were used for cytometric assays or RNA isolation and genes expression analysis.

To assess MDDC ability to activate CD4⁺ T lymphocytes, 0.4×10^5 MDDC were distributed in 96-well U-bottom suspension culture plates with 4.0×10^5 autologous lymphocytes (cryopreserved non-adherent peripheral blood mononuclear cells) (co-culture MDDC/lymphocytes ratio: 1/10) in duplicates and cultured in the presence of unspecific (not antigen-specific) stimuli for 96 or 120 h to measure IFN-γ production and lymphocytes proliferation, respectively. Lymphocytes alone were used as a negative control (Neg).

MDDC Phenotype Analysis

2×10^5 DC/mL were incubated in Phosphate Buffer Saline (PBS; Sigma-Aldrich, Merck) with the optimal dilution of anti-CD14 PE (MEM15; Exbio), anti-CD11c (3.9; Biolegend), anti-HLA-DR V500 (G46-6; BD Biosciences), anti-CD86 PE-cy7 (2331/FUN-1, B), and anti-CD40 Horizon 450 (5C3; BD Biosciences) antibodies for 20 min at 4°C . Cells were then washed twice with PBS and resuspended in 200 μL of 4% Formaldehyde-PBS. The Live/Dead Fixable Cell Stain Kit (Life Technology, Thermo Fisher Scientific) was added to the assay according to the manufacturer's instructions. A minimum of 50,000 events was acquired on a LSRFortessa™ X-20 flow cytometer (BD Biosciences) using the FACS Diva software (BD Biosciences). Data were analyzed using the FlowJo software (Tree Star). The gates strategy for one representative experiment was reported in Supplementary File 2.

CD4⁺ T Lymphocytes Activation Assay

CD4⁺ T lymphocytes activation was measured by the meaning of intracellular staining of IFN-γ. Briefly, autologous co-cultures of MDDC and lymphocytes were treated with lymphocyte mitogens Ionomycin (1 μg/mL; Sigma-Aldrich, Merck) and Phorbol Myristate Acetate (10 ng/mL; Sigma-Aldrich, Merck) for 96 h (31). Twenty microgram per milliliter Brefeldin A (Sigma-Aldrich, Merck) was added 6 h before the end of co-culture to block Golgi secretory pathway. Cells were then labeled for surface marker anti-CD3 APC (MEM-57) and anti-CD4 PE (RPAT4) (BD Biosciences), permeabilized with Cytofix/Cytoperm solution (BD Biosciences), and finally stained for anti-IFN-γ V450 (B27; BD Biosciences). The Live/Dead Fixable Cell Stain Kit was added to the assay according to the manufacturer's instructions. Cells were then washed twice with PBS and resuspended in 200 μL of 4% Formaldehyde-PBS to proceed to flow cytometry analysis as above-mentioned.

CD4⁺ T Lymphocytes Proliferation Assay

The CFSE Cell Division Tracker Kit (Biolegend) was used for flow cytometry analysis of *in vitro* CD4⁺ T cells proliferation assay according to manufacturers' protocol. Briefly, autologous lymphocytes were pre-treated with 0.1 μM CFSE before being added to MDDC cultures in the presence of the lymphocyte mitogen Concanavalin A (5 μg/mL; Sigma Aldrich, Merck) for 120 h (32). At the end of assay, cells were then labeled for anti-CD3 APC (MEM-57) and anti-CD4 PE (RPAT4) (BD Biosciences). The Live/Dead Fixable Cell Stain Kit was added to the assay according to the manufacturer's instructions. Cells were then washed twice with PBS and resuspended in 200 μL of 4% Formaldehyde-PBS to proceed to flow cytometry analysis as above-mentioned.

Cytokines Measurement in Culture Supernatants

IL-1β, IL-18, TNF-α, and IL-12p70 were measured in MDDC culture supernatants by ELISA according to the manufacturers' protocols (Biolegend for IL-1β; IL-18, TNF; eBioscience for IL12p70). Data were reported as pg/mL.

Caspase-1 Activity Assay

The detection of caspase-1 activity in MDDC was measured with the FAM FLICA Caspase-1 Assay Kit (Immunochemistry Technologies) and flow cytometry according to the manufacturer's protocol. Briefly, $10 \mu\text{L}$ 30x FLICA was added to 2×10^5 MDDC in 300 μL and cells incubated for 1 h at 37°C 5% CO_2 . The Live/Dead Fixable Cell Stain Kit was used. Cells were then washed twice with PBS and resuspended in 200 μL of 4% Formaldehyde-PBS to proceed to flow cytometer analysis as above-mentioned. Live MDDC were gated based on their forward (FSC) and side light scatter (SSC). Histograms for one representative experiment was reported in **Supplementary File 3**.

Inflammasome Genes Expression Analysis

Total RNA was isolated from 2×10^5 MDDC using the RNAqueous-Micro kit (Ambion, Thermo Fisher Scientific) according to manufacturer's protocol and quantified using Nanodrop N-1000 (Agilent). 0.5 μg of total RNA was converted into cDNA using Superscript III RT kit and random primers (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). *NLRP1* (hs00248187), *NLRP3* (hs00366465), *NAIP* (hs03037952), *NLRC4* (hs00368367), *CASP1* (hs00354836), *IL1B* (hs01555410), *IL18* (hs01038788), *CARD8* (hs01088221), *BRCC3* (hs02386484), and *NEDD8* (hs01921826) genes were amplified using TaqMan[®] gene-specific assays (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) and qPCR on the QuantStudio 3.0 Real-Time PCR equipment (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific). The QuantStudio 3.0 software was used to obtain cycle threshold values (Ct) for relative gene expression analysis according to Fold Change (FC) method (33). Raw expression data (Ct) were normalized with the expression of the housekeeping gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase/*GAPDH* (hs02758991; TaqMan[®] assay) (ΔCt), and the FC was calculated comparing stimulated and unstimulated (UN) conditions ($\text{FC} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$; $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{stimulated}} - \Delta\text{Ct}_{\text{UN}}$). Alternatively, the basal (constitutive) gene expression was calculated as $2^{-\Delta\text{Ct}}$.

miR-223 Expression Analysis

Total RNA was isolated from 2×10^5 MDDC by mirVana[™] miRNA Isolation Kit (Ambion, Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. 0.5 μg of total RNA were converted into cDNA using kit TaqMan[™] MicroRNA Reverse Transcription and miRNA-specific primers (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific). miR-223 was amplified using TaqMan[®] miR-specific assays (*TM:002098*; Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) and qPCR on the QuantStudio 3.0 Real-Time PCR equipment. The QuantStudio 3.0 software was used to obtain cycle threshold values (Ct) for relative gene expression analysis according to Fold Change (FC) method (33). Raw expression data (Ct) were normalized with the expression of and non-coding small RNA control U6 (*TM:001973*; TaqMan[®] assay) (ΔCt), and the FC was calculated comparing stimulated and unstimulated (UN) conditions ($\text{FC} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$; $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{stimulated}} - \Delta\text{Ct}_{\text{UN}}$). Alternatively, the basal (constitutive) gene expression was calculated as $2^{-\Delta\text{Ct}}$.

Detection of "Specks" Formation

Detection of inflammasome "specks" formation was performed by confocal microscopy and immunofluorescence, as previously described (34). Briefly, 2×10^5 MDDC were cultured in 16-wells chamber slides (Thermo Fisher Scientific) and stimulated with 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FLG or 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS for 24 h at 37°C 5% CO_2 with or without 1 mM ATP. Cells were then fixed and permeabilized with Cytofix/Cytoperm reagent (BD Biosciences) for 30 min at 37°C 5% CO_2 , and incubated with primary antibody for NLRP3 (1:100 mouse anti-human NLRP3, Abcam) and/or NLRC4 (1:200 rabbit anti-human NLRC4; Biolegend) overnight at room temperature. Fluorescent secondary antibodies (Alexa 488-conjugated goat-anti-mouse IgG1, or Alexa 647-conjugated goat-anti-rabbit IgG1; Biolegend) were then added for 1 h. Finally, cells were washed and fixed to image acquisition at DMi8 confocal laser scanning microscope (Leica). 4',6-Diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride (DAPI; Sigma-Aldrich, Merck) was used for nuclear counterstaining. ImageJ software and related plugins (National Institutes of Health) were used for image processing. The counting of NLRP3+ and NLRC4+ specks in MDDC was performed manually by observing specks formation within the cells (34), and through the ImageJ software by calculating the corrected total cellular fluorescence (CTCF) for each marker as integrated density–(area of selected cell $\times$ mean fluorescence of background readings) (35).

NLRC4 and NLRP3 Silencing

Pre-validated shRNA for human *NLRC4* and *NLRP3* was obtained from MISSION[®] shRNA Plasmid DNA (Sigma-Aldrich, Merck). The shRNAs for NLRP3 and NLRC4 used in the study are listed in **Supplementary File 4**. 2×10^5 MDDC were transduced using with the same amounts of lentiviral particles encoding non-targeting control or gene-specific shRNA in the presence of SIV3+ VLP for 48 h. Thereafter, cells were treated with 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FLG or 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS for 24 h. The shRNA knockdown efficiency of the target protein in lentivirus-transduced cells was assessed by gene expression (**Supplementary File 5**). The concentrations of IL-1 β in cell culture supernatants was measured by ELISA.

Data Analysis

All data were collected and analyzed from at least three independent experiments. Normality test was applied to the data, and parametric or non-parametric analysis was used accordingly to compare two or more data sets as specified for each graph. The level of significance was $p < 0.05$. Calculations were performed using the statistical software package GraphPad Prism 7.0.

Biosecurity and Institutional Safety Procedures

All research was performed following the guidelines of biosecurity and safety of Institute of Biomedical Science (ICB/USP).

RESULTS

Flagellin Similarly Activates MDDC From HIV-Infected Patients and Healthy Donors

MDDC were treated with 5 $\mu\text{g/mL}$ FLG for 24 h and phenotypic profile, TNF and IL-12 secretion as well as CD4⁺ T lymphocytes activation in co-culture experiments were assessed based on previously published protocols (31, 32).

FLG activates MDDC, both HIV-DC and HD-DC, as indicated by the increase of co-stimulatory molecules, cytokines release and CD4⁺ T lymphocytes activation (**Figure 1**).

As expected, FLG induced the up-regulation of HLA-DR (95.83 ± 0.68 % positive cells) compared to untreated cells (UN: 77.5 ± 4.4 % positive cells) and the significant increase of CD40 (FLG: 39.8 ± 3.7 %, vs. UN: 7.8 ± 2.0 % positive cells; $p = 3 \times 10^{-5}$) in HD-DC, but not of CD86, which appeared to be decreased in HD-DC+FLG compared to untreated cells (FLG: 62.8 ± 4.3 %, vs. UN: 91.1 ± 2.9 % positive cells; $p = 0.001$) (**Figure 1A**). However, this result could be due to a previously reported positive feedback mechanism and not to a negative effect of FLG (36). A significant augment of HLA-DR (FLG: 83.5 ± 6.1 %, vs. UN: 49.2 ± 9.5 % positive cells; $p = 0.006$) and CD40 (FLG: 48.7 ± 5.4 %, vs. UN: 17.4 ± 1.7 % positive cells; $p = 0.020$) was observed in HIV-DC challenged with FLG. The expression of CD86 did not change in treated or untreated cells (**Figure 1A**).

It is interesting to emphasize that the entity of surface markers expression did not significantly differ between HIV-DC and HD-DC in both untreated or treated conditions (**Figure 1A**). Even if we observed lower viability in HIV-DC compared to HD-DC, this difference did not result statistically significant ($p > 0.999$).

FLG induced the secretion of a good and similar amount of TNF in HD-DC and HIV-DC ($p < 0.05$) (**Figure 1B**). On the other hand, the production of IL-12 differs between HD-DC and HIV-DC ($p = 0.029$): while HD-DC produced significant level of IL-12 in response to the molecular pattern (FLG: 212.7 ± 53.1 pg/mL, vs. UN: 50.5 ± 2.9 pg/mL; $p = 7 \times 10^{-4}$), the induction of cytokine appeared to be less pronounced in HIV-DC (FLG: 63.9 ± 6.9 pg/mL, vs. UN: 38.2 ± 12.1 pg/mL; $p > 0.05$) (**Figure 1C**).

Altogether these data indicate that FLG is able to activate HIV-DC in a similar way to that seen for HD-DC.

To test whether FLG-treated MDDC are able to induce a properly adaptive immunity response, a MDDC/lymphocytes co-culture assay was performed using autologous cells as previously described (31, 32). Lymphocytes alone were used as a negative control (Neg) (**Figures 1D,E**).

A significant increment of IFN- γ ⁺ CD4⁺ T cells was observed in healthy donors (FLG: 12.9 ± 5.5 % vs. UN: 1.3 ± 0.4 % positive cells; $p = 0.022$) as well as in HIV-infected individuals (FLG: 9.6 ± 1.8 % vs. UN: 0.1 ± 0.1 % positive cells; $p = 0.014$). Of note, the percentage of IFN- γ ⁺ CD4⁺ T cells after FLG treatment was similar in healthy donor and patients ($p > 0.999$). Negative control resulted similar to untreated co-cultures ($p > 0.05$) (**Figure 1D**), emphasizing that the increasing percentage of positive cells is not an artifact.

Moreover, FLG-treated MDDC were able to induce a significant proliferation of CD4⁺ T lymphocytes in healthy donors (FLG: 51.0 ± 12.1 %, vs. UN: 3.7 ± 0.9 % positive cells; $p = 0.026$) and patients (FLG: 24.3 ± 2.8 %, vs. UN: 3.5 ± 0.8 % positive cells; $p = 0.038$), even if in a lesser extent in patients compared to HD ($p = 0.004$). Negative control presented a proliferation rate similar to untreated co-cultures ($p > 0.05$) (**Figure 1E**).

It is interesting to underline that the limited percentage of positive cells in this type of assay is in accord with previously published data for autologous MDDC and T cells co-culture both in healthy donors (32) and even in HIV-infected patients (31) treated with unspecific stimuli (mitogens). Moreover, despite its limited entity, the activation of lymphocytes is consequence of MDDC stimulation as in the absence of MDDC (negative control) mitogens cannot activate T cells (**Figures 1D,E**).

Taking in account the activation status of FLG-treated HIV-DC (**Figures 1A–C**) together with their ability to induce lymphocytes activation (**Figures 1D,E**), we clearly demonstrated that FLG is able to activate HIV-DC similarly to what observed for HD-DC. It is interesting to emphasize that, on the contrary, we have previously shown that HIV-DC did not properly respond to bacterial LPS (14).

Flagellin, but Not LPS, Induces Comparable Inflammasome Activation in MDDC From HIV-Infected Patients and Healthy Donors

We then investigated the ability of flagellin to stimulate inflammasome in MDDC by the meaning of inflammasome cytokines production and caspase-1 activity. LPS alone or in combination with ATP was added to the assay as a positive control for inflammasome or NLRP3 inflammasome activation, respectively (26) (**Figure 2**). A time-course assay treating MDDC with 5 $\mu\text{g/mL}$ FLG or 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS was performed to determine the best experimental time for IL-1 β detection in this model, (**Supplementary File 6**), and selected 24 h for all the experiments.

FLG induced a significant IL-1 β release in HD-DC (155.3 ± 20.7 pg/mL), compared to unstimulated cells (4.0 ± 1.9 pg/mL; $p < 0.0001$) and similarly to LPS (132.4 ± 9.9 pg/mL; $p < 0.0001$). The treatment with LPS+ATP resulted in a significant increase of IL-1 β release compared to LPS ($p = 0.002$), indicating a proper response of NLRP3 inflammasome in HD-DC (**Figure 2A**).

In HIV-DC, the entity of IL-1 β production resulted lower than in HD-DC but significantly augmented compared to resting cells (FLG: 121.3 ± 34.3 pg/mL; vs. UN: 18.3 ± 9.3 pg/mL; $p = 2 \times 10^{-4}$) and also to LPS-treated cells (84.4 ± 17.5 pg/mL; $p = 0.002$). However, ATP did not alter LPS-induced IL-1 β production ($p > 0.05$) (**Figure 2A**), confirming the previously observed dysregulation of NLRP3 inflammasome in MDDC from HIV-infected patients (14).

In a similar way, FLG also induced significantly IL-18 release in HD-DC (FLG: 91.1 ± 19.3 pg/mL, vs. UN: 12.8 ± 6.1 pg/mL; $p = 0.018$) and at lower extent in HIV-DC (FLG: 50.5 ± 5.6 pg/mL, vs. UN: 2.9 ± 1.5 pg/mL; $p = 0.009$). HD-DC better respond to LPS and LPS+ATP than HIV-DC also in term of IL-18. There

FIGURE 1 | Flagellin similarly activates HIV-DC and HD-DC. 2×10^5 MDDC from healthy donors (HD-DC; $n = 5$) and HIV-infected patients (HIV-DC; $n = 5$) were stimulated with $5 \mu\text{g/ml}$ flagellin (FLG) for 24 hours. Viability, expression of characteristic DC surface markers (A) as well as TNF (B) and IL-12p70 (C) secretion were analyzed and compared between untreated (UN) and stimulated (FLG) conditions as well between HD-DC and HIV-DC groups. 0.4×10^5 FLG-treated MDDC were cultured with 4×10^5 autologous lymphocytes (MDDC/lymphocytes ratio: 1/0) for 96 hours to detect IFN- γ production in CD4 $^+$ T lymphocytes (percentage of CD3 $^+$ CD4 $^+$ T IFN- γ^+ cells) (D), or 120 hours to measure CD4 $^+$ T lymphocytes proliferation (percentage of CD3 $^+$ CD4 $^+$ T CFSE $^{\text{low}}$ cells) (E). Lymphocytes alone were used as a negative control (Neg). Data are reported as mean $\pm$ standard error. Multiple t -test (A) and Two-Way ANOVA test (B–E) were applied to compare conditions within a group (HIV-DC or HD-DC; * $p < 0.05$) and between groups (HIV-DC vs. HD-DC; § $p < 0.05$).

were no statistical differences in the production of IL-18 between HD- and HIV-DC (Figure 2B).

Inflammasome cytokines release revealed that FLG is able to induce complex activation in MDDC from healthy as well as HIV-infected individuals. Accordingly, FLG increased caspase-1 activity in HD-DC (FLG: 6.8 ± 2.0 %, vs. UN: 0.3 ± 0.0 % positive cells) and in HIV-DC (FLG: 6.9 ± 0.7 %, vs. UN: 3.5 ± 0.5 % positive cells). HIV-DC presented a constitutively activated caspase-1, however a lower activation in response to LPS+ATP compared to HD-DC, once more emphasizing the specific dysregulation of NLRP3 pathway (Figure 2C). Even if these differences did not reach statistical significance ($p = 0.07$), we underline that caspase-1 activity accompanies above-mentioned cytokines data, and that this is the first study showing a tendency in caspase-1 activation

defect in MDDC from HIV-infected individuals. Although other studies have reported statistically significant differences in caspase-1 activity in healthy donors and HIV-infected patients, those results referred to lymphoid compartment or peripheral blood mononuclear cells, while little is known in myeloid cells (37–40).

Flagellin Induces Inflammasome Activation by Stimulated NAIP/NLRC4 and NLRP3 Receptors in HD-DC, but Not in HIV-DC

Once assessed that FLG is able to induce inflammasome activation in MDDC, we therefore tried to depict the pathways involved in complex formation and to detect any differences between HD-DC and HIV-DC.

Gene expression analysis revealed that HIV-DC presents a significant higher constitutive expression of *IL1B* and *IL18* compared to HD-DC. *NLRP3* also resulted increased even if not in a statistically significant way, while the level of *NAIP* and *NLRC4* was similar between MDDC (Figure 3A).

When the effect of flagellin was evaluated in genes modulation, we observed a revealed a different expression profile

in HD-DC and HIV-DC at all the analyzed time-points (3, 8, 18, and 24 h) (Figure 3B).

In particular, we focused our attention on the two receptors *NLRP3* and *NLRC4*. While, as expected, FLG induces *NLRC4* gene modulation in HD-DC and HIV-DC (Figure 3C), *NLRP3* appeared to be defective in HIV-DC, as FLG was able to induce *NLRP3* expression in HD, but not in HIV-DC (Figure 3D), according to our previously published data (14).

The dysregulation observed for *NLRP3* could be due to an imbalance of inhibitor and activator signals. *NLRP3* is tightly regulated by endogenous proteins *CARD8* (41), *BRCC3* (42) and *NEDD8* (43), and by *miR-223* (44). Interestingly, the basal expression of *CARD8* and *BRCC3*, as well as of *miR-223*, resulted significantly augmented in HIV-DC compared to HD-DC (Figure 3E), suggesting a possible cause of low responsiveness of *NLRP3*. Moreover, taking in account that IFN-I also contributes to the negative regulation of *NLRP3* (29, 30) and that HIV-infected patients are known to present high level of circulating IFN-I (45–47), we shown that the treatment of HD-DC with IFN- α significantly reduced IL-1 β release specifically in LPS+ATP treated cells up to cytokine level observed in HIV-DC (Figure 3F), emphasizing the inhibitory role of IFN-I on *NLRP3* and suggesting that this could be another cause of a specific *NLRP3* defect in HIV-DC.

According to our initial hypothesis, flagellin appears to be able to by-pass this defect of *NLRP3* in HIV-DC, and at the same time our results have shown the involvement of both *NLRC4* and *NLRP3* receptors in HD-DC response to flagellin.

This hypothesis of a “two-receptors” mechanism is supported also by inflammasome “specks” detection through immunofluorescence staining of *NLRP3* and *NLRC4* (Figure 4). *NLRC4*+ specks were evidenced in confocal images of FLG-treated HD-DC (Figure 4A) and HIV-DC (Figure 4B). *NLRP3*+ specks resulted more in FLG-treated HD-DC (Figure 4A) than in HIV-DC (Figure 4B). In general *NLRC4* and *NLRP3* staining localized in the same cells. By the use of CTCF index, we showed that FLG significantly induced both *NLRC4*+ and *NLRP3*+ specks in HD-DC (FLG vs. UN: $p < 0.0001$) (Figure 4C). On the other hands, in HIV-DC FLG induced preferentially *NLRC4*+ specks (CTCF FLG vs. UN: $p = 0.0001$) and at lesser extent *NLRP3*+ specks ($p > 0.05$) (Figure 4D). These findings demonstrated that in healthy donor cells, FLG not only activates inflammasome through the expected *NAIP/NLRC4* pathway but also through the *NLRP3* one.

To better investigate the involvement of *NAIP/NLRC4* and *NLRP3* in response to FLG in our model, we evaluated the IL-1 β production in FLG-treated MDDC previously incubated with $10 \mu\text{M}$ MCC-950, a specific *NLRP3* inhibitor (27), or with $10 \mu\text{M}$ parthenolide/PTD, a large spectrum inflammasome inhibitor (28) (Figures 5A,B).

MCC-950 and PTD significantly inhibited IL-1 β production in FLG-treated HD-DC (78 and 90% of inhibition, respectively; $p < 0.05$), as well as LPS+ATP-treated cells (78 and 90% of inhibition, respectively; $p < 0.05$), and partially LPS-induced inflammasome activation (78 and 90% of inhibition, respectively; $p < 0.05$) (Figure 5A), due to the contribution of other pathway in inflammasome activation by LPS (48).

FIGURE 3 | NLRP4 and NLRP3 are differentially involved in flagellin activation in HD-DC and HIV-DC. 2×10^5 MDDC from healthy donors (HD-DC; $n = 5$) or HIV-infected patients (HIV-DC; $n = 5$) were stimulated with $5 \mu\text{g/ml}$ flagellin (FLG) for 3, 8, 18, and 24 hours. Cells were harvested for total RNA isolation and evaluation of relative gene expression by qPCR (**A–E**). (**A**) Basal gene expression of *NLRP3*, *NAIP*, *NLRP4*, *CASP1*, *IL1B*, and *IL18* was expressed as $2^{-\Delta Ct}$. (**B**) FLG-induced expression of *NLRP3*, *NLRP4*, *NAIP*, *CASP1*, *IL1B*, and *IL18* genes was calculated as $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (fold-change, FC) and reported as logFC in a heat-map graph for HD-DC and HIV-DC. (**C**) FC values for *NLRP4* are compared between HD-DC and HIV-DC at all the time-points. (**D**) FC values for *NLRP3* are compared between HD-DC and HIV-DC at all the time-points. (**E**) Basal gene expression of *miR223*, *BRCC3*, *NEDD8*, and *CARD8* was expressed as $2^{-\Delta Ct}$. (**F**) 2×10^5 MDDC from healthy donors (HD-DC; $n = 3$) were pre-treated with $1,000 \text{ UI/mL}$ of IFN- α 2b (Schering-Plough) for 18 h and then with $5 \mu\text{g/ml}$ flagellin (FLG) or LPS $1 \mu\text{g/mL}$ LPS for 24 hours, or $1 \mu\text{g/mL}$ LPS for 24 hours plus 1 mM ATP for more 15 minutes. IL-1 β concentration was measured in culture supernatants of HD-DC with and without IFN- α 2b pre-treatment and compared with HIV-DC ($n = 3$) stimulated with FLG. Data are represented as mean $\pm$ standard error. Multiple *t*-test was applied to compare HD- and HIV-DC in (**A, C–E**). Kruskal-Wallis test was applied to compare HD-DC, HD-DC + IFN- α 2b, and HIV-DC sets in (**F**) ($p < 0.05$).

On the other side, MCC-950 was not able to significantly reduce cytokine release in HIV-DC stimulated with FLG (48% of inhibition; $p > 0.05$), LPS (48% of inhibition; $p > 0.05$) or LPS+ATP (48% of inhibition; $p > 0.05$) (Figure 5B). Accordingly, in the presence of MCC-950 a

reduction not significantly of NLRP3+ specks was observed in HIV-DC (Supplementary File 7). PTD similarly inhibited IL-1 β production in both FLG-treated HIV-DC (84% of inhibition $p = 0.002$), LPS or LPS+ATP-treated HIV-DC (84% of inhibition; $p = 0.002$), as expected due to

FIGURE 4 | Flagellin induces NLRC4+ and NLRP3+ specks formation in MDDC. 2×10^5 MDDC from healthy donors (HD-DC; $n = 3$) or HIV-infected patients (HIV-DC; $n = 3$) were cultured in 16-wells chamber slides and stimulated with $5 \mu\text{g/mL}$ FLG or $1 \mu\text{g/mL}$ LPS for 24 hours at 37°C 5% CO_2 with or without 1 mM ATP for more 15 minutes. Mouse anti-human NLRP3 and rabbit anti-human NLRC4 antibodies and fluorescent secondary antibodies (Alexa 488-conjugated goat-anti-mouse IgG1; Alexa 647-conjugated goat-anti-rabbit IgG1) were used to label NLRP3+ and NLRC4+ specks, respectively. DAPI was used to counterstain nuclei. Images acquisition was performed using a DMi8 confocal laser scanning microscope. A representative experiment (magnification: 63x) was reported for HD-DC (A) and HIV-DC (B). Arrows indicated NLRC4+ or NLRP3+ specks. (C,D) CTCF index for NLRP3+ and NLRC4+ specks in untreated (UN) and FLG-treated (FLG) MDDC. Data are represented as mean $\pm$ standard error. Mann-Whitney test was applied to compare UN and FLG conditions in (C,D) ($p < 0.05$).

the caspase-1 and NF- κB dependency for FLG-induced response (49), as well as for LPS-mediated one (48). These data confirm the greater involvement of NLRP3 in response to FLG in healthy donors compared to HIV-infected individuals.

Then we compared the differences in IL-1 β release in FLG-treated MDDC following *NLRC4* or *NLRP3* shRNA knockdown (Figures 5C,D). In *NLRC4* shRNA-transduced MDDC, FLG induced a lower level of IL-1 β production compared to untreated cells both in HD-DC (Figure 5C) and in HIV-DC (Figure 5D). In *NLRP3* siRNA-transduced MDDC, FLG induced a lower level of IL-1 β compared to untreated cells in HD-DC (Figure 5C), however this effect was not observed in HIV-DC (Figure 5D). These data are in accord with above-reported effect of chemical NLRP3 inhibitor MCC-950 (Figures 5A,B).

Altogether these findings allow us to suggest that FLG activates the inflammasome in human MDDC through the induction of NAIP/NLRC4 and NLRP3 receptors; the contribution of NLRP3 in FLG-signaling is less pronounced in HIV-DC due to the well-known “exhausted” profile of these cells (50).

DISCUSSION

A number of microbial components have been proposed as alternative adjuvants to augment the immune responses of poorly immunogenic vaccines and/or of not fully immunocompetent individuals. Emerging evidence pointed out the possible use of bacterial flagellin in this context, firstly in mice [as extensively revised in Hajam et al. (17)], but also in a human clinical trial of prophylactic vaccine (23). Studies in mice show the stimulatory capacity of flagellin to induce both humoral and cellular immune responses when implied together with pathogen’ antigens as adjuvant (51, 52) or in cancer immunotherapy (53).

Taking in account that, even in ART treatment, HIV-infected individuals continue to experience immune dysfunction, leading, among others side effects, to a deficient vaccine response (9), the necessity of new vaccine strategy in this population appear to be urgent.

Using the *in vitro* model of peripheral blood monocytes-derived-dendritic cells developed for HIV-infected patient’s immunotherapy by Lu and collaborators (54), we demonstrated

FIGURE 5 | Flagellin significantly induces NLRC4 but not NLRP3 in HIV-DC. 2×10^5 MDDC from healthy donors (HD-DC; $n = 5$) (A) and HIV-infected patients (HIV-DC; $n = 5$) (B) were pretreated with $10 \mu\text{M}$ MCC-950 or $10 \mu\text{M}$ parthenolide (PTD), and then stimulated with $5 \mu\text{g/ml}$ FLG for 24 hours or $1 \mu\text{g/ml}$ LPS for 24 hours with or without 1 mM ATP for more 15 minutes. IL-1 β concentration was measured in culture supernatants. 2×10^5 MDDC from healthy donors (HD-DC; $n = 3$) (C) and HIV-infected patients (HIV-DC; $n = 3$) (D) were transduced with empty vector (scramble: Scr), shNLRC4 or shNLRP3, and then stimulated with $5 \mu\text{g/ml}$ FLG for 24 hours, or $1 \mu\text{g/ml}$ LPS for 24 hours with or without 1 mM ATP for more 15 minutes. IL-1 β concentration was measured in culture supernatants. Kruskal-Wallis test with multi comparison post-test was applied (treated vs. UN: * $p < 0.05$; LPS+ATP vs. LPS # $p < 0.05$; within each group: \$ $p < 0.05$; +MCC-950 vs. +PTD: § $p < 0.05$; shNLRC4 vs. shNLRP3: £ $p < 0.05$; shNLRC4 vs. Scr: @ $p < 0.05$).

that flagellin is able to activate MDDC from HIV-infected patients as well as from healthy donors. Previous studies have evidenced the ability of flagellin to activate primary human monocytes, or human pro-monocytic cell line U38 (55), however here we demonstrated that flagellin is able to activate human MDDC considering both the MDDC profile as well as the MDDC-mediated lymphocytes activation (Figure 1), with the exception of IL-12 production which results lower in HIV-DC compared to HD-DC, but in accord with previously published data (56).

Flagellin is sensed by two main innate immune receptors, TLR5 (18) and NAIP/NLRC4 (57–59). While it has been shown that flagellin induces NAIP/NLRC4 inflammasome activation in primary human macrophages and monocytes (49, 60, 61), little is known about its role in human DC. Despite it has been previously reported that flagellin stimulates IL-1 β production in human MDDC (62), any evidence about NLRC4 or NLRP3 pathway in IL-1 β induction have been shown nor hypothesized. Besides the description of these two receptors within inflammasome activation by flagellin, our study also demonstrated for the first time the different contribution of the two receptors in HIV-DC response to flagellin.

As expected, flagellin induces the inflammasome activation through NAIP/NLRC4 both in HD-DC as well as HIV-DC (Figure 2), suggesting that this pathway is still effective in HIV-infected patients, contrary to what seen for NLRP3 (14). Actually, HIV-DC presents a basal increased expression of NLRP3 inhibitory molecules, namely CARD8 (41), BRCC3 (42) and miR-223 (44), compatible with specific inhibition of this receptor (Figure 3E).

While the low rate of NLRP3 response in HIV-DC has been attributed to the chronic inflammation of HIV-infected patients, consequent of HIV-1 persistence, endogenous viruses reactivation (i.e., herpes simplex virus), immune system exhaustion, increased intestinal permeability and microbial translocation (mainly LPS) and antiretroviral drugs cytotoxicity (15, 63) and taking in account that flagellate bacteria also could be present in gut microbiota, it remains obscure why the NAIP/NLRC4 pathway continues “ready-to-go.” The administration of continues doses of LPS was found to be tolerogenic in mice (64), however any data are available about flagellin. We speculated that the increased IFN- α production in HIV-infected individuals (even if at lower levels in ART-treated patients) could be a possible cause of specific NLRP3 inhibition due to the known effect of the anti-viral mediator as NLRP3 negative regulators (30). It is important to underline that our cohort of ART-treated HIV-infected individuals presented a mean value of plasma IFN- α of about 50 pg/mL , 5-fold more than healthy individuals (about 10 pg/mL) (data not shown). Moreover, when HD-DC were treated with IFN- α their NLRP3 response is diminished similarly to what observed in HIV-DC (Figure 3F), supporting our hypothesis. Another possible explication concerns the higher constitutive recruitment of adaptor molecule ASC (Apoptosis speck like with a CARD) in inflammasome complex in HIV-infected patients compared to healthy controls as recently observed by Ahmad and colleagues (65) in PBMC. In this case, inflammasome receptors, which need ASC to mount the complex (i.e., NLRP3), could be disadvantaged in respect to sensors that directly recruit caspase-1, such as NLRC4.

Beyond the main purpose of this article, and for the first time to our knowledge, we demonstrated that NLRP3 also contribute to flagellin response in human MDDC, as revealed by NLRP3+ specks formation in FLG-treated cells (**Figure 4**) and by specific (chemical and genetic) inhibition of this receptor (**Figure 5**). Our findings are in lines with previous reports about NLRC4 and NLRP3 co-localization into a unique complex in HEK293 cells (66) and in mice bone marrow-derived macrophages during *Salmonella* infection (67).

Therefore, flagellin induces the two pathways in HD-DC, whereas it preferentially activates NLRC4 pathway in HIV-DC due to the defect in NLRP3 in these cells. Despite the immunofluorescence visualization of both NLRP3+ and NLRC4+ specks, our data are not sufficient to determine whether the two receptors are truly co-localized in the same inflammasome complex, and further investigations will be needed to finally prove it.

In conclusion, our data support the use of flagellin in the design of future vaccines effective also in immunocompromised individuals, such as HIV-infected patients. According to our findings, flagellin activates human MDDC from healthy and HIV-infected individuals through the NAIP/NLRC4 inflammasome, with the participation of NLRP3 at least in healthy donors cells. Flagellin was able to by-pass the NLRP3 defect in HIV-DC, contributing to inflammasome activation and consequently full MDDC maturation in HIV-infected patients.

ETHICS STATEMENT

All research involving human participants was approved by the Institutional Ethics Committees of Oswaldo Cruz Hospital, Hospital das Clínicas/Faculty of Medicine of the University of São Paulo (FMUSP) and of the Institute of Biomedical Science (ICB/USP). Written informed consent was obtained from all participants, and clinical investigations were conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

EdR, BdA, and AP: conceived and designed experiments. EdR: performed MDDC experiments. VL: collection of samples. DdL:

performed the immunofluorescence experiments. FF and JdS: ELISA. EdR, DdL, and AP: statistical analysis. EdR, DdL, VL, FF, and AP: discussion of results. EdR and AP: wrote the article. BdA: designed and discussed silencing experiments.

FUNDING

This project was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (research grant 2015/23395-6 and 2015/50660-7 to AP; 2014/23225-0 to BdA). ECR (2015/17373-0), VL (2017/10824-1) and FF (2018/04361-1) receive FAPESP post-graduation fellowships; JdS had received a CAPES master' degree fellowships; DdL receives a Ph.D. fellowship from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado Amazonas (FAPEAM). AP receives a CNPq Researcher Fellowship. The funders had no role in this study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

We are very grateful to the Oswaldo Cruz Hospital Blood Bank Service and the Serviço de Extensão ao Atendimento de Pacientes HIV/AIDS (SEAP) of the FMUSP (SP, Brazil) for the recruitment of healthy donors and HIV-infected patients, respectively. We acknowledge Prof. Niels Olsen Câmara for slide chambers and qPCR reagents; Dr. Telma Miyuki Oshiro for anti-human NLRP3 antibody, and IL-12p70 ELISA reagents; Prof. Karina Ramalho Bortoluci, Dr. Paula Ordonhez Rigato, and Prof. Silvia Boscardin for helpful suggestions and discussion. We acknowledge Prof. Eliana Faquim and the technician Alessander Souza for the microscope facility of the Laboratory of Cellular Biology at the Butantan Institute (São Paulo, SP, Brazil) by the use of a DMi8 confocal laser scanning microscope; the Laboratory of Immune Cell Biology (Department of Immunology, ICB, USP) for technical support in silencing experiments.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.01291/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol.* (1991) 9:271–96. doi: 10.1146/annurev.iy.09.040191.001415
- Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* (1998) 392:245–52. doi: 10.1038/32588
- Wu L, Dakic A. Development of dendritic cell system. *Cell Mol Immunol.* (2004) 1:112–8.
- Steinman RM. Dendritic cells: understanding immunogenicity. *Eur J Immunol.* (2007) (37Suppl. 1):S53–60. doi: 10.1002/eji.200737400
- Maisonneuve C, Bertholet S, Philpott DJ, De Gregorio E. Unleashing the potential of NOD- and Toll-like agonists as vaccine adjuvants. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2014) 111:12294. doi: 10.1073/pnas.1400478111
- Li H, Willingham SB, Ting JPY, Re F. Cutting edge: inflammasome activation by alum and alum's adjuvant effect are mediated by NLRP3. *J Immunol.* (2008) 181:17. doi: 10.4049/jimmunol.181.1.17
- Surendran N, Nicolosi T, Pichichero M. Infants with low vaccine antibody responses have altered innate cytokine response. *Vaccine.* (2016) 34:5700–3. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.09.050
- Van Deventer HW, Burgents JE, Wu QP, Woodford RMT, Brickey WJ, Allen IC, et al. The inflammasome component Nlrp3 impairs antitumor vaccine by enhancing the accumulation of tumor-associated myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res.* (2010) 70:10161–9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1921
- Geretti AM, Doyle T. Immunization for HIV-positive individuals. *Curr Opin Infect Dis.* (2010) 23:32–8. doi: 10.1097/QCO.0b013e328334fec4
- Donaghy H, Gazzard B, Gotch F, Patterson S. Dysfunction and infection of freshly isolated blood myeloid and plasmacytoid dendritic

- cells in patients infected with HIV-1. *Blood*. (2003) 101:4505–11. doi: 10.1182/blood-2002-10-3189
11. Sabado RL, O'Brien M, Subedi A, Qin L, Hu N, Taylor E, et al. Evidence of dysregulation of dendritic cells in primary HIV infection. *Blood*. (2010) 116:3839–52. doi: 10.1182/blood-2010-03-273763
 12. Cardone M, Ikeda KN, Varano B, Gessani S, Conti L. HIV-1-induced impairment of dendritic cell cross talk with $\gamma\delta$ T lymphocytes. *J Virol*. (2015) 89:4798–808. doi: 10.1128/JVI.03681-14
 13. Liu J, Ostrowski M. Development of targeted adjuvants for HIV-1 vaccines. *AIDS Res Ther*. (2017) 14:43. doi: 10.1186/s12981-017-0165-8
 14. Pontillo A, Silva LT, Oshiro TM, Finazzo C, Crovella S, Duarte AJ. HIV-1 induces NALP3-inflammasome expression and interleukin-1 β secretion in dendritic cells from healthy individuals but not from HIV-positive patients. *AIDS*. (2012) 26:11–8. doi: 10.1097/QAD.0b013e32834d697f
 15. Deeks SG, Tracy R, Douek DC. Systemic effects of inflammation on health during chronic HIV infection. *Immunity*. (2013) 39:633–45. doi: 10.1016/j.immuni.2013.10.001
 16. Kool M, Pétrilli V, De Smedt T, Rolaz A, Hammad H, Van Nimwegen M, et al. Cutting edge: alum adjuvant stimulates inflammatory dendritic cells through activation of the NALP3 inflammasome. *J Immunol*. (2008) 181:3755–9. doi: 10.4049/jimmunol.181.6.3755
 17. Hajam IA, Dar PA, Shah Nawaz I, Jaume JC, Lee JH. Bacterial flagellin—a potent immunomodulatory agent. *Exp Mol Med*. (2017) 49:e373. doi: 10.1038/emmm.2017.172
 18. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*. (2001) 410:1099–103. doi: 10.1038/35074106
 19. Yoon SJ, Kurnasov O, Natarajan V, Hong M, Gudkov AV, Osterman AL, et al. Structural basis of TLR5-flagellin recognition and signaling. *Science*. (2012) 335:859–64. doi: 10.1126/science.1215584
 20. Diebold CA, Halff EF, Koster AJ, Huizinga EG, Koning RI. Cryoelectron tomography of the NAIP5/NLRC4 inflammasome: implications for NLR activation. *Structure*. (2015) 23:2349–57. doi: 10.1016/j.str.2015.10.001
 21. Hu Z, Zhou Q, Zhang C, Fan S, Cheng W, Zhao Y, et al. Structural and biochemical basis for induced self-propagation of NLRC4. *Science*. (2015) 350:399–404. doi: 10.1126/science.aac5489
 22. Zhang L, Chen S, Ruan J, Wu J, Tong AB, Yin Q, et al. Cryo-EM structure of the activated NAIP2-NLRC4 inflammasome reveals nucleated polymerization. *Science*. (2015) 350:404–9. doi: 10.1126/science.aac5789
 23. Treanor JJ, Taylor DN, Tussey L, Hay C, Nolan C, Fitzgerald T, et al. Safety and immunogenicity of a recombinant hemagglutinin influenza-flagellin fusion vaccine (VAX125) in healthy young adults. *Vaccine*. (2010) 28:8268–74. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.10.009
 24. Turley CB, Rupp RE, Johnson C, Taylor DN, Wolfson J, Tussey L, et al. Safety and immunogenicity of a recombinant M2e-flagellin influenza vaccine (STF2.4xM2e) in healthy adults. *Vaccine*. (2011). 29:5145–52. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.05.041
 25. Sallusto F, Palermo B, Lenig D, Miettinen M, Matikainen S, Julkunen I, et al. Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function. *Eur J Immunol*. (1999) 29:1617–25. doi: 10.1002/(SICI)1521-4141(199905)29:05<1617::AID-IMMU1617>3.0.CO;2-3
 26. Gattorno M, Tassi S, Carta S, Delfino L, Ferlito F, Pelagatti MA, et al. Pattern of interleukin-1 β secretion in response to lipopolysaccharide and ATP before and after interleukin-1 blockade in patients with CIAS1 mutations. *Arthritis Rheum*. (2007) 56:3138–48. doi: 10.1002/art.22842
 27. Coll RC, Robertson AA, Chae JJ, Higgins SC, Munoz-Planillo R, Inerra MC, et al. A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. *Nat Med*. (2015) 21:248–55. doi: 10.1038/nm.3806
 28. Juliana C, Fernandes-Alnemri T, Wu J, Datta P, Solorzano L, Yu JW, et al. Anti-inflammatory compounds parthenolide and Bay 11-7082 are direct inhibitors of the inflammasome. *J Biol Chem*. (2010) 285:9792–802. doi: 10.1074/jbc.M109.082305
 29. Guarda G, Braun M, Staehli F, Tardivel A, Mattmann C, Forster I, et al. Type I interferon inhibits interleukin-1 production and inflammasome activation. *Immunity*. (2011) 34:213–23. doi: 10.1016/j.immuni.2011.02.006
 30. Simmons DP, Wearsch PA, Canaday DH, Meyerson HJ, Liu YC, Wang Y, et al. Type I IFN drives a distinctive dendritic cell maturation phenotype that allows continued class II MHC synthesis and antigen processing. *J Immunol*. (2012) 188:3116–26. doi: 10.4049/jimmunol.1101313
 31. Da Silva LT, Da Silva WC, De Almeida A, Da Silva Reis D, Santillo BT, Rigato PO, et al. Characterization of monocyte-derived dendritic cells used in immunotherapy for HIV-1-infected individuals. *Immunotherapy*. (2018) 10:871–85. doi: 10.2217/imt-2017-0165
 32. Shinde P, Fernandes S, Melinkeri S, Kale V, Limaye L. Compromised functionality of monocyte-derived dendritic cells in multiple myeloma patients may limit their use in cancer immunotherapy. *Sci Rep*. (2018) 8:5705. doi: 10.1038/s41598-018-23943-w
 33. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*. (2008) 3:1101–8. doi: 10.1038/nprot.2008.73
 34. Stutz A, Horvath GL, Monks BG, Latz E. ASC speck formation as a readout for inflammasome activation. *Methods Mol Biol*. (2013) 1040:91–101. doi: 10.1007/978-1-62703-523-1_8
 35. McCloy RA, Rogers S, Caldon CE, Lorca T, Castro A, Burgess A. Partial inhibition of Cdk1 in G 2 phase overrides the SAC and decouples mitotic events. *Cell Cycle*. (2014) 13:1400–12. doi: 10.4161/cc.28401
 36. Baravalle G, Park H, Mcsweeney M, Ohmura-Hoshino M, Matsuki Y, Ishido S, et al. Ubiquitination of CD86 is a key mechanism in regulating antigen presentation by dendritic cells. *J Immunol*. (2011). 187:2966–73. doi: 10.4049/jimmunol.1101643
 37. Doitsh G, Galloway NLK, Geng X, Yang Z, Monroe KM, Zepeda O, et al. Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. *Nature*. (2013) 505:509. doi: 10.1038/nature12940
 38. Walsh JG, Reinke SN, Mamik MK, McKenzie BA, Maingat F, Branton WG, et al. Rapid inflammasome activation in microglia contributes to brain disease in HIV/AIDS. *Retrovirology*. (2014) 11:35. doi: 10.1186/1742-4690-11-35
 39. Bandera A, Masetti M, Fabbiani M, Biasin M, Muscatello A, Squillace N, et al. The NLRP3 inflammasome is upregulated in HIV-infected antiretroviral therapy-treated individuals with defective immune recovery. *Front Immunol*. (2018) 9:214. doi: 10.3389/fimmu.2018.00214
 40. Faria MG, Taborda NA. HIV replication is associated to inflammasomes activation, IL-1 β , IL-18 and caspase-1 expression in GALT and peripheral Blood. *PLoS ONE*. (2018) 13:e0192845. doi: 10.1371/journal.pone.0192845
 41. Ito S, Hara Y, Kubota T. CARD8 is a negative regulator for NLRP3 inflammasome, but mutant NLRP3 in cryopyrin-associated periodic syndromes escapes the restriction. *Arthritis Res Ther*. (2014) 16:R52. doi: 10.1186/ar4483
 42. Py BF, Kim MS, Vakifahmetoglu-Norberg H, Yuan J. Deubiquitination of NLRP3 by BRCC3 critically regulates inflammasome activity. *Mol Cell*. (2013) 49:331–8. doi: 10.1016/j.molcel.2012.11.009
 43. Segovia JA, Tsai S-Y, Chang T-H, Shil NK, Weintraub ST, Short JD, et al. Nedd8 regulates inflammasome-dependent caspase-1 activation. *Mol Cell Biol*. (2015) 35:582–97. doi: 10.1128/MCB.00775-14
 44. Yang Z, Zhong L, Xian R, Yuan B. MicroRNA-223 regulates inflammation and brain injury via feedback to NLRP3 inflammasome after intracerebral hemorrhage. *Mol Immunol*. (2015) 65:267–76. doi: 10.1016/j.molimm.2014.12.018
 45. Von Sydow M, Sonnerborg A, Gaines H, Strannegard O. Interferon- α and tumor necrosis factor- α in serum of patients in various stages of HIV-1 infection. *AIDS Res Hum Retrovirus*. (1991) 7:375–80. doi: 10.1089/aid.1991.7.375
 46. Khatissian E, Tovey MG, Cumont MC, Monceaux V, Lebon P, Montagnier L, et al. The relationship between the interferon α response and viral burden in primary SIV infection. *AIDS Res Hum Retrovirus*. (1996) 12:1273–8. doi: 10.1089/aid.1996.12.1273
 47. Stylianou E, Aukrust P, Bendtzen K, Muller F, Froland SS. Interferons and interferon (IFN)-inducible protein 10 during highly active anti-retroviral therapy (HAART)-possible immunosuppressive role of IFN- α in HIV infection. *Clin Exp Immunol*. (2000) 119:479–85. doi: 10.1046/j.1365-2249.2000.01144.x
 48. Kayagaki N, Wong MT, Stowe IB, Ramani SR, Gonzalez LC, Akashi-Takamura S, et al. Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4. *Science*. (2013) 341:1246–9. doi: 10.1126/science.1240248

49. Kortmann J, Brubaker SW, Monack DM. Cutting edge: inflammasome activation in primary human macrophages is dependent on flagellin. *J Immunol.* (2015) 195:815–9. doi: 10.4049/jimmunol.1403100
50. Blanchet FP, Moris A, Nikolic DS, Lehmann M, Cardinaud S, Stalder R, et al. Human immunodeficiency virus-1 inhibition of immunoamphisomes in dendritic cells impairs early innate and adaptive immune responses. *Immunity.* (2010) 32:654–69. doi: 10.1016/j.immuni.2010.04.011
51. Mcsorley SJ, Ehst BD, Yu Y, Gewirtz AT. Bacterial flagellin is an effective adjuvant for CD4+ T cells *in vivo*. *J Immunol.* (2002) 169:3914–9. doi: 10.4049/jimmunol.169.7.3914
52. Didierlaurent A, Ferrero I, Otten LA, Dubois B, Reinhardt M, Carlsen H, et al. Flagellin promotes myeloid differentiation factor 88-dependent development of Th2-type response. *J Immunol.* (2004) 172:6922–30. doi: 10.4049/jimmunol.172.11.6922
53. Zheng JH, Nguyen VH, Jiang SN, Park SH, Tan W, Hong SH, et al. Two-step enhanced cancer immunotherapy with engineered *Salmonella typhimurium* secreting heterologous flagellin. *Sci Transl Med.* (2017) 9:9537. doi: 10.1126/scitranslmed.aak9537
54. Lu W, Arraes LC, Ferreira WT, Andrieu JM. Therapeutic dendritic-cell vaccine for chronic HIV-1 infection. *Nat Med.* (2004) 10:1359–65. doi: 10.1038/nm1147
55. Ciacchi-Woolwine F, Blomfield IC, Richardson SH, Mizel SB. *Salmonella* flagellin induces tumor necrosis factor alpha in a human promonocytic cell line. *Infect Immun.* (1998) 66:1127–34.
56. Buisson S, Benlahrech A, Gazzard B, Gotch F, Kelleher P, Patterson S. 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. *J Infect Dis.* (2009) 199:1862–71. doi: 10.1086/599122
57. Franchi L, Amer A, Body-Malapel M, Kanneganti TD, Ozoren N, Jagirdar R, et al. Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in salmonella-infected macrophages. *Nat Immunol.* (2006) 7:576–82. doi: 10.1038/ni1346
58. Miao EA, Alpujch-Aranda CM, Dors M, Clark AE, Bader MW, Miller SI, et al. Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via Ipaf. *Nat Immunol.* (2006) 7:569–75. doi: 10.1038/ni1344
59. Kofoed EM, Vance RE. Innate immune recognition of bacterial ligands by NAIPs determines inflammasome specificity. *Nature.* (2011) 477:592–5. doi: 10.1038/nature10394
60. Canna SW, De Jesus AA, Gouni S, Brooks SR, Marrero B, Liu Y, et al. An activating NLRC4 inflammasome mutation causes autoinflammation with recurrent macrophage activation syndrome. *Nat Genet.* (2014) 46:1140–6. doi: 10.1038/ng.3089
61. Reyes Ruiz VM, Ramirez J, Naseer N, Palacio NM, Siddharthan IJ, Yan BM, et al. Broad detection of bacterial type III secretion system and flagellin proteins by the human NAIP/NLRC4 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2017) 114:13242. doi: 10.1073/pnas.1710433114
62. Means TK, Hayashi F, Smith KD, Aderem A, Luster AD. The toll-like receptor 5 stimulus bacterial flagellin induces maturation and chemokine production in human dendritic cells. *J Immunol.* (2003) 170:5165. doi: 10.4049/jimmunol.170.10.5165
63. Maartens G, Celum C, Lewin SR. HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. *Lancet.* (2014) 384:258–71. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60164-1
64. Geisel J, Kahl F, Müller M, Wagner H, Kirschning CJ, Autenrieth IB, et al. IL-6 and maturation govern TLR2 and TLR4 induced TLR agonist tolerance and cross-tolerance in dendritic cells. *J Immunol.* (2007) 179:5811. doi: 10.4049/jimmunol.179.9.5811
65. Ahmad F, Mishra N, Ahrenstorf G, Franklin BS, Latz E, Schmidt RE, et al. Evidence of inflammasome activation and formation of monocyte-derived ASC specks in HIV-1 positive patients. *AIDS.* (2018) 32:299–307. doi: 10.1097/QAD.0000000000001693
66. Man SM, Hopkins LJ, Nugent E, Cox S, Glück IM, Tourlomousis P, et al. Inflammasome activation causes dual recruitment of NLRC4 and NLRP3 to the same macromolecular complex. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2014) 111:7403–8. doi: 10.1073/pnas.1402911111
67. Qu Y, Misaghi S, Newton K, Maltzman A, Izrael-Tomasevic A, Arnott D, et al. NLRP3 recruitment by NLRC4 during *Salmonella* infection. *J Exp Med.* (2016) 213:877–85. doi: 10.1084/jem.20132234

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Reis, Leal, Soares, Fernandes, Souza de Lima, de Alencar and Pontillo. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.