



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

PHILIPPE QUAGLIATO BELLINATI

**ASSOCIAÇÃO ENTRE AS VARIANTES GENÉTICAS
rs10157379 e rs10754558 DO *NLRP3* COM A INFECÇÃO
PELO VÍRUS DA IMUNOEFICIÊNCIA HUMANA TIPO 1,
ATEROSCLEROSE SUBCLÍNICA E MARCADORES
INFLAMATÓRIOS**

Londrina
2025

PHILIPPE QUAGLIATO BELLINATI

**ASSOCIAÇÃO ENTRE AS VARIANTES GENÉTICAS
rs10157379 e rs10754558 DO *NLRP3* COM A INFECÇÃO
PELO VÍRUS DA IMUNOEFICIÊNCIA HUMANA TIPO 1,
ATEROSCLEROSE SUBCLÍNICA E MARCADORES
INFLAMATÓRIOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Edna Maria Vissoci Reiche.

Coorientador: Prof. Dr. Marcell Alysson Batisti Lozovoy.

Londrina
2025

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Bellinati, Philipe Quagliato Bellinati.

Associação entre as variantes genéticas rs10157379 e rs10754558 do NRLP3 com a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana tipo 1, aterosclerose subclínica e marcadores inflamatórios / Philipe Quagliato Bellinati Bellinati. - Londrina, 2025.
89 f.

Orientador: Edna Maria Vissoci Reiche Reiche.

Coorientador: Marcell Alysson Batisti Lozovoy Lozovoy .

Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, 2025.
Inclui bibliografia.

1. biomarcadores - Tese. 2. variantes genéticas - Tese. 3. HIV - Tese. 4. aterosclerose - Tese. I. Reiche, Edna Maria Vissoci Reiche. II. Lozovoy, Marcell Alysson Batisti Lozovoy. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial. IV. Título.

CDU 61

PHILIPPE QUAGLIATO BELLINATI

**ASSOCIAÇÃO ENTRE AS VARIANTES GENÉTICAS
rs10157379 e rs10754558 DO *NLRP3* COM A INFECÇÃO
PELO VÍRUS DA IMUNOEFICIÊNCIA HUMANA TIPO 1,
ATEROSCLEROSE SUBCLÍNICA E MARCADORES
INFLAMATÓRIOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Edna Maria Vissoci
Reiche
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^ª. Dr^ª. Andrea Name Colado Simão
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^ª. Dr^ª. Daniela Frizon Alfieri
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^ª. Dr^ª. Marla Karine Amarante
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Carlos Eduardo Coral de Oliveira
Escola de Medicina - PUCPR

Londrina, 14 de abril de 2025.

PHILIPPE QUAGLIATO BELLINATI

**ASSOCIAÇÃO ENTRE AS VARIANTES GENÉTICAS
rs10157379 e rs10754558 DO *NLRP3* COM A INFECÇÃO
PELO VÍRUS DA IMUNOEFICIÊNCIA HUMANA TIPO 1,
ATEROSCLEROSE SUBCLÍNICA E MARCADORES
INFLAMATÓRIOS**

BANCA EXAMINADORA (SUPLENTES)

Prof^a. Dr^a. Márcia Regina Eches Perugini
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a. Rubia Casagrande
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 14 de abril de 2025.

AGRADECIMENTOS

Desafio tão grande quanto escrever esta Tese, foi escrever este agradecimento às pessoas que fizeram parte da minha trajetória no Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, por longos anos.

Dedico esta tese de doutorado à minha amada mãe Glacilda Helena Quagliato Bellinati (*in memoriam*), que partiu, contra sua vontade, ainda no início da minha graduação, sem imaginar que esse curso pudesse se concretizar. Agradeço meu pai, Ricardo Martins Bellinati, por me oferecer oportunidade de estudar e estar sempre presente.

Após finalizar a residência médica, a dra Zuleica Naomi Tano, me convenceu a continuar os estudos na pós-graduação, sendo acolhido pela Prof. Edna como orientadora durante o mestrado e doutorado. Uma verdadeira mãe para mim nesse período. Não existem palavras para agradecer a senhora! Não posso deixar de citar a dra Susana Wiechmann, por ceder o ambulatório para realização deste.

Tenho que agradecer inúmeros amigos, não me arrisco a citar todos, que fizeram parte deste, me incentivaram e não me deixaram desistir, principalmente na reta final desse projeto.

Agradeço aos professores que compuseram a Banca do Exame de Qualificação e da Defesa da Tese de Doutorado que participaram e contribuíram de forma valiosa para melhoria desta tese.

Agradeço ainda, a todos os colaboradores, funcionários, alunos de pós-graduação do Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, alunos de graduação do Programa de Iniciação Científica e pacientes que ajudaram e participaram disso tudo; principalmente aos colaboradores e professores do Laboratório de Análises Clínicas.

E finalizo agradecendo ao Prof. Marcell Alysson Batisti Lozovoy que me acolheu e aceitou ser co-orientador desse doutorado, contribuindo de forma grandiosa para sua conclusão.

BELLINATI, Philipe Quagliato. **Associação entre as variantes genéticas rs10157379 e rs10754558 do *NLRP3* com a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana tipo 1, aterosclerose subclínica e marcadores inflamatórios.** 89 p. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial. Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2025.

RESUMO

Introdução: Os mecanismos envolvidos na resposta inflamatória associada à infecção pelo vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) não são totalmente compreendidos. Eles são multifatoriais e, entre os componentes da resposta imune inata, tem-se os inflamassomas. Inflamassomas são componentes multiproteicos da resposta imune inata que contribuem para a sinalização inflamatória na infecção pelo HIV-1. Entre os inflamassomas, o NLRP3 é o mais estudado e variantes nos genes que codificam as suas proteínas têm sido associadas a suscetibilidade a agentes infecciosos e/ou desenvolvimento de complicações graves durante infecções. A variante *NLRP3* rs10754558 C>G, localizada na região 3' não traduzida (3'UTR), foi associada à proteção contra a infecção pelo HIV-1; no entanto, os resultados são conflitantes e escassos para outras variantes, como a *NLRP3* rs10157379 T>C. Além disto, o advento da terapia antirretroviral combinada (TARV) eficaz permitiu que pessoas vivendo com HIV-1 e aids (PVHA) tivessem expectativas de vida significativamente prolongadas, com diminuição da morbidade e mortalidade associadas à infecção pelo HIV-1. No entanto, esses indivíduos sofrem de inflamação sistêmica crônica cuja etiologia multifatorial está associada a várias comorbidades, entre elas as doenças cardiovasculares e aterosclerose. Ainda assim, os dados sobre a correlação entre a ativação do inflamassoma e os marcadores de aterosclerose em PVHA são limitados.

Objetivo: Determinar a associação entre as variantes genéticas rs10157379 T>C e rs10754558 C>G do *NLRP3* e a infecção pelo HIV-1, aterosclerose subclínica, carga viral do HIV-1 e marcadores da resposta inflamatória e metabólica em um grupo de indivíduos infectados pelo HIV-1.

Métodos: Neste estudo caso-controle, foram inseridos 78 PVHA, em uso de TARV há, pelo menos, cinco anos, atendidos no Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina (AEHU/UEL). Como grupo controle, foram avaliados 147 indivíduos saudáveis provenientes do Hemocentro Regional de Londrina e da população geral. A ultrassonografia *doppler* (USGD) de carótida foi realizada nos indivíduos que foram, posteriormente, categorizados de acordo com a espessura da íntima-média da carótida (cIMT) em <0,9 ou ≥0,9 mm, grau de estenose (<50,0 ou ≥ 50,0%) e presença de placa (≥1,5 mm). Dados demográficos, fatores de estilo de vida e história médica foram coletados pela avaliação clínica e aplicação de um questionário padrão. Biomarcadores inflamatórios e metabólicos foram avaliados como contagem de leucócitos periféricos, contagem de plaquetas, níveis plasmáticos de proteína C reativa com método ultrasensível (usPCR), perfil lipídico, níveis de glicose, ferritina, homocisteína, adiponectina, interleucina (IL)-6, IL-10 e fator de necrose tumoral (TNF)-α. Além disso, foram avaliadas a contagem de linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e a quantificação plasmática do RNA do HIV-1. As variantes *NLRP3* rs10157379 T>C e rs10744558 C>G foram determinadas a partir do DNA genômico usando a reação em cadeia da polimerase em tempo real. A associação entre variantes genéticas e infecção pelo HIV-1 foi avaliada em modelos genéticos codominantes, recessivos, dominantes e superdominantes

usando regressão logística. Razão de chances [*odds ratio* (OR)] e intervalo de confiança de 95% (IC 95%) foram avaliados com ajuste para potenciais fatores de confusão.

Resultados: Artigo 1: As PHVA eram mais velhas que os controles ($p=0,028$), 39 (50,0%) eram do sexo feminino (OR: 1,10; IC95%: 0,63-1,90, $p=0,734$) e 41 (52,6%) eram não caucasianos (OR: 1,96; IC95%: 1,12-3,43, $p=0,017$). Não foi observada associação entre as variantes rs10744558 e rs10157379 do *NLRP3* e a infecção pelo HIV-1 em todos os modelos genéticos. Para a variante rs10157379, a distribuição dos genótipos no modelo codominante (TT, TC e CC) foi semelhante entre os grupos ($p=0,932$ para TC e $p=0,733$ para CC). Da mesma forma, para a variante rs10754558, a distribuição dos genótipos CC, GC e GG não mostrou diferença entre as PHVA e controles ($p=0,290$ para CG e $p=0,309$ para GG). Análises adicionais usando os modelos dominante, recessivo e superdominante também não mostraram associação significativa entre essas variantes e a suscetibilidade ao HIV-1. **Artigo 2:** Entre as PHVA 39 (50,0%) eram do sexo feminino e 37 (47,4%) eram caucasianos. A cIMT $\geq 0,9$ mm estava presente em 34 (43,6%) PHVA. O modelo univariado revelou uma associação entre c-IMT ($\geq 0,9$ mm) e sexo masculino ($p=0,006$), não caucasianos ($p=0,001$), uso de inibidor de transcriptase reversa análogo de nucleosídeo (INTR) ($p=0,001$), inibidor de protease (IP) ($p=0,002$), medicamentos anti-hipertensivos ($p=0,018$), medicamentos hipolipemiantes ($p=0,009$), tabagismo ($p=0,043$), estilo de vida sedentário ($p=0,012$), presença de síndrome metabólica ($p=0,011$) e contagem de células T CD4 < 500 células/mm³ ($p=0,013$). Comparadas com as PHVA com cIMT $< 0,9$ mm, as PHVA com cIMT $\geq 0,9$ mm eram mais velhas ($p=0,027$), apresentavam aumento de homocisteína ($p=0,017$), ferro ($p=0,049$), IL-10 ($p=0,039$) e diminuição de lipoproteína do colesterol de alta densidade (HDL-C) ($p=0,039$). No entanto, todas as variáveis perderam a significância no modelo de regressão logística, indicando que não estavam associadas com a cIMT. A cIMT não foi associada às variantes do *NLRP3*. Além disso, as PHVA portadoras da homozigose para o alelo variante G da *NLRP3* rs10754555 apresentaram maior frequência de carga viral indetectável do que aquelas portadoras dos genótipos CC + CG.

Conclusão: Os resultados indicam que as variantes *NLRP3* rs10744558 e rs10157379 não estão associadas à infecção pelo HIV-1 e com a presença de aterosclerose subclínica nas PHVA em uso de TARV. No entanto, PHVA portadoras da homozigose para o alelo variante G da *NLRP3* rs10754555 apresentaram maior frequência de carga viral indetectável do que aquelas portadoras dos genótipos CC + CG. Um ponto forte do estudo é que, pela primeira vez, o papel das variantes *NLRP3* rs10157379 T>C e rs10754558 C>G foi avaliado na fisiopatologia da aterosclerose subclínica associada à infecção pelo HIV-1.

Palavras-chave: HIV; inflamassoma; *NLRP3*, inflamação, suscetibilidade, aterosclerose; espessura da íntima média, biomarcadores

BELLINATI, Philippe Quagliato. **Association between genetic variants rs10157379 and rs10754558 of *NLRP3* with human immunodeficiency virus type 1 infection, subclinical atherosclerosis, and inflammatory biomarkers.** Doctoral Thesis. 89 p. Program of - Postgraduate in Laboratorial and Clinical Pathophysiology. State University of Londrina. 2025.

ABSTRACT

Introduction: The mechanisms involved in the inflammatory response associated with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection are not fully understood. They are multifactorial and, among the components of the innate immune response, there are inflammasomes. Among the inflammasomes, *NLRP3* is the most studied and variants in the genes that encode its proteins have been associated with susceptibility to infectious agents and/or developing severe complications during infections. The *NLRP3* rs10754558 C>G variant, located in the 3' untranslated region (3' UTR), has been associated with protection against HIV-1 infection; however, results are scarce, and the role of *NLRP3* rs10157379 T>C variant in HIV-1 infection is unknown. Furthermore, the advent of effective combination antiretroviral therapy (cARV), adherence, and good response has allowed individuals with HIV-1 infection to have prolonged life expectancies; however, these individuals suffer from chronic systemic inflammation whose multifactorial etiology is associated with cardiovascular disease and atherosclerosis. Data on the association between inflammatory, metabolic, and these *NLRP3* genetic variants in individuals with HIV-1 are limited.

Objective: The aim of the study was to determine the association between the *NLRP3* rs10157379 T>C and rs10754558 C>G variants with the HIV-1 infection, as well as the association between these *NLRP3* variants with subclinical atherosclerosis, HIV-1 viral load, and inflammatory and metabolic biomarkers.

Methods: In this case-control study, 78 HIV-1-infected individuals on cARV for, at least, five years treated at the Specialty Outpatient Clinic of the University Hospital of the State University of Londrina (AEHU/UEL) were included. As control group, 147 healthy individuals from the Regional Blood Center of Londrina and the general population were evaluated. Carotid Doppler ultrasonography was performed in individuals who were subsequently categorized according to carotid intima-media thickness (cIMT) as <0.9 or ≥0.9 mm. Demographic data, lifestyle factors, and medical history were collected by clinical evaluation and application of a standard questionnaire. Inflammatory and metabolic biomarkers were evaluated, such as peripheral leukocyte count, platelet count, plasma levels of C-reactive protein with high sensitivity method (hsPCR), lipid profile, glucose levels, ferritin, homocysteine, adiponectin, interleukin (IL)-6, IL-10, and tumor necrosis factor (TNF)- α . In addition, CD4⁺ T, CD8⁺ T lymphocyte count and plasma HIV-1 RNA quantification were evaluated. The *NLRP3* variants rs10157379 T>C and rs10744558 C>G were determined using genomic DNA and real-time polymerase chain reaction. The association between genetic variants and HIV-1 infection was evaluated under codominant, recessive, dominant, and overdominant genetic models using logistic regression. Odds ratio (OR) and 95% confidence interval (95%CI) were determined after adjusted for potential confounders.

Results: Article 1: The individuals with HIV-1 were older than controls ($p=0.028$), 39 (50.0%) were female (OR: 1.10; 95%CI: 0.63-1.90, $p=0.734$), and 41 (52.6%) were Non-Caucasians (OR: 1.96; 95%CI: 1.12-3.43, $p=0.017$). No association was observed between the *NLRP3* rs10744558 and rs10157379 variants and HIV-1 infection in all genetic models. For the rs10157379 variant, the distribution of codominant genotypes (TT, TC, and CC) was similar between the groups, ($p=0.932$ for TC and $p=0.733$ for CC). Similarly, for the rs10744558

variant, the distribution of the CC, GC, and GG genotypes did not show difference between individuals with HIV-1 patients and controls ($p=0.290$ for CG and $p=0.309$ for GG). Additional analyses using the dominant, recessive, and overdominant models also showed no significant association between these variants and HIV-1 infection. **Article 2:** Among the individuals with HIV-1, 39 (50.0%) were female and 37 (47.4%) were Caucasians. The $cIMT \geq 0.9$ mm was present in 34 (43.6%) individuals with HIV-1. The univariate model revealed an association between $cIMT (\geq 0.9$ mm) and male sex ($p=0.006$), Non-Caucasians ($p=0.001$), use of nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NRTI) ($p=0.001$), protease inhibitor (PI) ($p=0.002$), anti-hypertensive drugs ($p=0.018$), lipid lowering drugs ($p=0.009$), smoking ($p=0.043$), sedentary lifestyle ($p=0.012$), presence of metabolic syndrome ($p=0.011$), and $CD4^+$ T cell count < 500 cells/mm³ ($p=0.013$). Compared with individuals with HIV-1 with $cIMT < 0.9$ mm, individuals with HIV-1 with $cIMT \geq 0.9$ mm were older ($p=0.027$), showed higher levels of homocysteine ($p=0.017$), iron ($p=0.049$), IL-10 ($p=0.039$), and lower cholesterol high-density lipoprotein (HDL-C) ($p=0.039$). However, all the variables lost significance in the regression model, indicating that they were not associated with the $cIMT$. The analysis indicates that these variables explain approximately 12.0% of the outcome of atherosclerotic disease, but not independently. The $cIMT$ was not associated with the *NLRP3* variants. Moreover, individuals with HIV-1 carrying the homozygosity for the variant G allele of the *NLRP3* rs10754555 variant showed higher frequency of undetectable viral load than those carrying the CC + CG genotypes. **Conclusion:** The results indicate that the *NLRP3* rs10744558C>G and rs10157379 T>C variants are not associated with HIV-1 infection and with the presence of atherosclerosis in HIV-1 patients receiving ART. Moreover, individuals with HIV-1 carrying the homozygosity for the variant G allele of the *NLRP3* rs10754555 variant showed higher frequency of undetectable viral load than those carrying the CC + CG genotypes. A strength of the study is that, for the first time, the role of the *NLRP3* rs10157379 T>C and rs10754558 C>G variants was evaluated in the pathophysiology of HIV-1-associated subclinical atherosclerosis.

Keywords: HIV-1; inflammation; inflammasome; NLRP3, atherosclerosis, carotid intima-media thickness; susceptibility, biomarkers

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3TC	Lamivudina
ACC	Artéria carótida comum
ACI	Artéria carótida interna
AIDS	<i>Acquired immunodeficiency syndrome</i> – Síndrome da imunodeficiência adquirida
ARV	Antirretroviral
ASC	Proteína semelhante a uma partícula associada à apoptose contendo um CARD
ASCVD	<i>Atherosclerotic Cardiovascular Disease</i> , doença aterosclerótica cardiovascular
AVE	Acidente vascular encefálico
AZT	Zidovudina
BMI	<i>Body Mass Index</i> – Índice de massa corpórea
cARV	<i>Combined antiretroviral therapy</i> – Terapia antirretroviral combinada
CCL2	Quimiocina CC ligante 2
CDC	<i>Centers for Diseases Control and Prevention</i> – Centro de Controle e Prevenção de Doenças
CI	<i>Confidence interval</i> – Intervalo de confiança
cIMT	<i>Carotid intima-media thickness</i> – Espessura íntima-média carotídea
CMV	Citomegalovírus
CRP	<i>C-reactive protein</i> – Proteína C reativa
CT	Colesterol total
CVD	<i>Cardiovascular disease</i> – Doença cardiovascular
DAPC	Doença arterial periférica crônica
DBP	<i>Diastolic blood pressure</i> – Pressão sanguínea diastólica
DCV	Doença cardiovascular
DMT2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTG	Dolutegravir
EBV	<i>Epstein Barr Virus</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ESR	<i>Erythrocyte sedimentation rate</i> – Velocidade de hemossedimentação

EFZ	Efavirenz
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FRS	<i>Framingham Risk Score</i> , Escore de Risco de Framingham
HAART	<i>Highly active antiretroviral therapy</i> – terapia antirretroviral altamente ativa
HBV	<i>Hepatitis B virus</i> – Vírus da hepatite B
HCV	<i>Hepatitis C virus</i> – Vírus da hepatite C
HDL-C	<i>High-density lipoprotein</i> – Lipoproteína do colesterol de alta densidade
HIV-1	<i>Human immunodeficiency virus</i> – Vírus da imunodeficiência humana tipo 1
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i> – Antígeno leucocitário humano
hsCRP	<i>High sensitivity C-reactive protein</i> – Proteína C reativa por metodologia ultrasensível
IAM	Infarto agudo do miocárdio
IC	Intervalo de confiança
ICAM-1	<i>Intracellular cell adhesion molecule 1</i> – Molécula de adesão intracelular 1
IMC	Índice de massa corpórea
IFN	<i>Interferon</i> – Interferon
IL	<i>Interleukin</i> – Interleucina
INI	<i>Integrase inhibitor</i> – Inibidor de integrase
ITRN	Inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos
ITRNN	Inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos
LAC	Laboratório de Análises Clínicas
LDL-C	<i>Low-density lipoprotein</i> – Lipoproteína de baixa densidade
LT	Linfócito T
MDP	Dipeptídeo muramil
MMP	<i>Matrix metalloproteinase</i> – Metaloproteinases de matriz
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa B</i> – Fator nuclear <i>kappa B</i>
NINJ1	Proteína 1 induzida por lesão nervosa
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	<i>Odds ratio</i> – razão de chance
oxLDL	<i>Oxidized low-density lipoprotein</i> – Lipoproteína do colesterol de baixa densidade oxidada
PAS	Pressão arterial sistólica
PCDT	Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas
PCR	Proteína C-reativa

PVHA	Pessoas vivendo com HIV/aids
qPCR	<i>Polymerase chain reaction quantitative real time</i> – Reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> – espécies reativas de oxigênio
sCD14	marcador solúvel do CD163
sCD163	marcador solúvel do CD163
sTNFR1	receptores solúveis do TNF- α tipo 1
sTNFR2	receptores solúveis do TNF- α tipo 2
SBP	<i>Systolic blood pressure</i> – Pressão sanguínea sistólica
SUS	Sistema Único de Saúde
T2DM	<i>Type 2 diabetes mellitus</i> – Diabete <i>mellitus</i> tipo 2
TARV	Terapia antirretroviral
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TDF	Tenofovir
TG	<i>Tryglicerides</i> – Triglicerídeos
TLR	<i>Toll like receptor</i> – Receptores tipo Toll
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i> – Fator de necrose tumoral
TNFR	<i>Tumor necrosis factor receptor</i> – Receptor do fator de necrose tumoral
UNAIDS	<i>Joint United Nations Programme on HIV/AIDS</i> – Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS
USGD	Ultrassonografia pelo <i>doppler</i>
usPCR	Proteína C reativa por metodologia ultrasensível
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i> – Molécula de adesão vascular 1
VHS	Velocidade de hemossedimentação
VLDL	<i>Very-low-density lipoprotein</i> – Lipoproteína do colesterol de densidade muito baixa
vWF	<i>Von Willebrand Factor</i> – Fator de von Willebrand

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fases da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana tipo 1 e as alterações dos marcadores laboratoriais na progressão da infecção ao longo do tempo.....	4
Figura 2 - Taxa de detecção de aids (x 100 mil habitantes) segundo região de residência, por ano de diagnóstico, no Brasil, de 2013 a 2023.....	5
Figura 3 - Coeficiente de mortalidade padronizado de aids (por 100.000 habitantes) segundo região de residência, por ano do óbito, Brasil, 2013 a 2023.....	6
Figura 4 – Linha do tempo da terapia antirretroviral.....	8
Figura 5 - Influência da ativação imunológica e resposta inflamatória na doença cardiovascular associada à infecção pelo vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1).....	11
Figura 6 - Mecanismos que contribuem para doença cardiovascular no indivíduo com infecção pelo vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1).....	14
Figura 7 - Mecanismos de ativação do inflamassoma NLRP3.....	17
Figura 8 - Mecanismos de sinalização da ativação do inflamassoma NLRP3 na infecção pelo HIV-1.....	19
Figura 9 – Participação do inflamassoma NLRP3 na ocorrência e do desenvolvimento da aterosclerose.....	21
Figura 10 - Principais estruturas e variantes genéticas do <i>NLRP3</i>	23

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Infecção pelo HIV-1.....	1
1.2	Epidemiologia da infecção pelo HIV	3
1.3	Tratamento de Pessoas com HIV/Aids.....	5
1.4	HIV-1, Inflamação e Doença Cardiovascular	7
1.5	HIV-1 e Aterosclerose	11
1.5.1	Espessura da íntima média da carótida (cIMT) em PVHA	13
1.6	Infecção pelo HIV-1 e Inflamassoma	15
1.7	Marcadores Inflamatórios e Anti-inflamatórios na infecção pelo HIV-1 e a cIMT...	21
1.8	Variantes genéticas do <i>NLRP3</i>	22
3	OBJETIVOS.....	27
3.1	Objetivo Geral	27
3.2	Objetivos Específicos	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS	28
5	RESULTADOS.....	33
6	CONCLUSÃO	72
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	73
	REFERÊNCIAS	74
	ANEXOS	81
	ANEXO 1 – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP.....	81
	APÊNDICES	86
	APÊNDICE 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	86
	Pesquisador Responsável	88
	APÊNDICE 2 - QUESTIONÁRIO PARA COLETA DE DADOS DOS INDIVÍDUOS	89

1 INTRODUÇÃO

1.1 Infecção pelo HIV-1

O vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) é um vírus de RNA fita simples que, após a invasão da célula do hospedeiro por meio da ligação em receptores e correceptores na membrana, faz a transcrição desse material em DNA (transcrição reversa), que por sua vez, se integra ao núcleo das células-alvo. O vírus infecta massivamente linfócitos T, que apresentam em sua superfície o marcador CD4, e em menor escala, macrófagos (Focaccia; Siciliano, 2021).

A infecção aguda pelo HIV-1 ocorre nas primeiras semanas após a exposição ao vírus quando este se replica intensivamente nos tecidos linfoides. Durante essa fase, tem-se carga viral elevada e níveis decrescentes de linfócitos, em especial os linfócitos T CD4⁺ (LT CD4⁺), uma vez que estes são recrutados para a reprodução viral. Na fase de latência clínica, enquanto a contagem de LT CD4⁺ permanece acima de 350 células/mm³, os episódios infecciosos mais frequentes são, geralmente, bacterianos. Com a progressão da infecção, o paciente evolui para fase aids (definida pela contagem de LT CD4⁺ abaixo de 350 células/mm³ ou presença de doença definidora, conforme Tabela 1). Surgem, portanto, as infecções oportunistas, resposta tardia a antibioticoterapia ou reativação de infecções latentes. O aparecimento de infecções oportunistas e neoplasias características, como Sarcoma de Kaposi são critérios definidores da síndrome da imunodeficiência adquirida (aids). Nessas situações, a contagem de LT CD4⁺ situa-se abaixo de 200 células/mm³, na maioria das vezes (Brasil, 2024a).

Para a definição de caso de aids, vários critérios foram propostos, implantados e redefinidos de acordo com os avanços no diagnóstico e monitoramento da infecção pelo HIV-1. Para os adultos, o principal critério de definição utilizado é o estabelecido pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (*Centers for Disease Control and Prevention, CDC*) adaptado (Brasil, 2024a), apresentado no Quadro 1.

Quadro 1 - Doenças definidoras da síndrome da imunodeficiência adquirida (aids), segundo o critério do Centro de Controle e Prevenção de Doenças

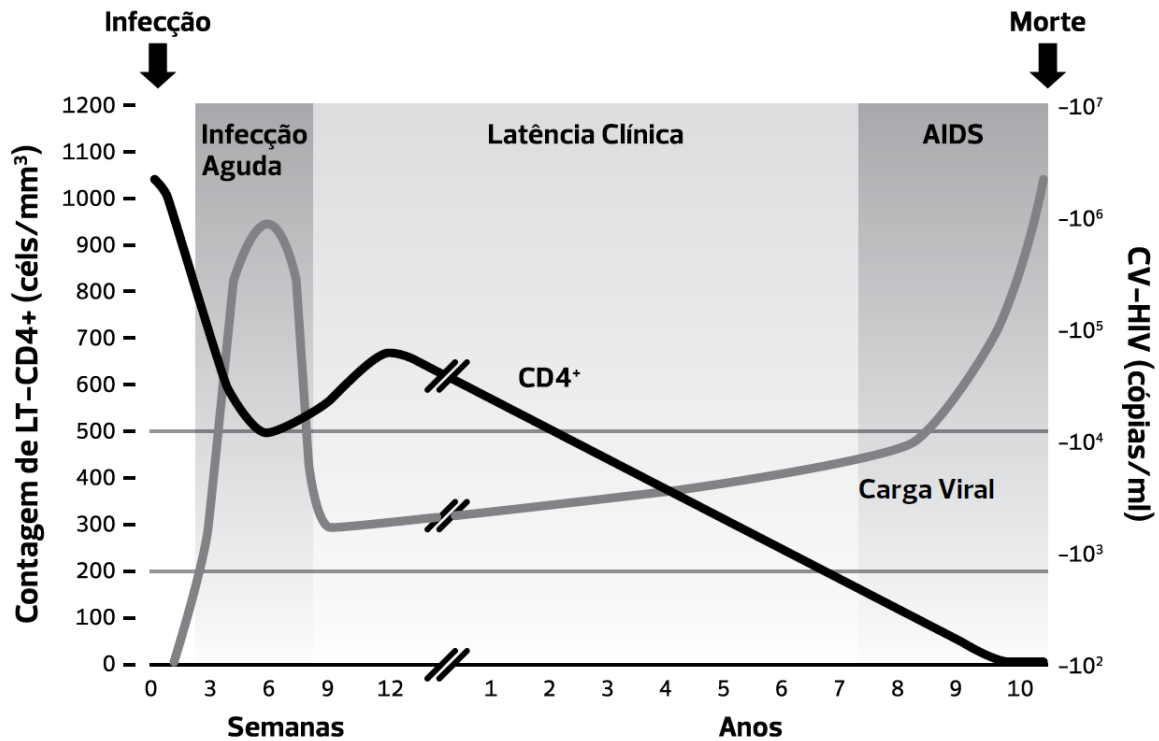
Doenças definidoras de aids
Criptococose extrapulmonar
Câncer cervical invasivo
Candidíase esofágica, traquéia, brônquio ou pulmões
Citomegalovirose (retinite ou outros órgãos, exceto fígado, baço e linfonodos)
Contagem de linfócitos T CD4 ⁺ menor que 350 células/mm ³
Criptosporidiose intestinal crônica (> 1 mês)
Encefalopatia pelo HIV
Herpes simples com úlceras mucocutâneas (duração > 1 mês) ou visceral de qualquer localização
Histoplasmose disseminada
Infecções disseminadas por micobactérias não <i>M. tuberculosis</i>
Isosporidiose intestinal crônica (> 1 mês)
Leucoencefalopatia multifocal progressiva
Linfoma não-Hodgkin de células B
Linfoma Primário do Sistema Nervoso Central
Nefropatia ou cardiomiopatia sintomática associada ao HIV
Neurotoxoplasmose
Síndrome consumptiva associada ao HIV, associada a diarreia crônica ou fadiga crônica e febre \geq 1 mês
Pneumonia por <i>Pneumocystis jiroveci</i>
Pneumonia bacteriana recorrente (2 ou mais episódios em 1 ano)
Reativação de doença de Chagas (meningoencefalite e/ou miocardite)
Sarcoma de Kaposi
Septicemia recorrente por <i>Salmonella não thyphi</i>
Tuberculose extrapulmonar

Fonte: Adaptado de Brasil (2024a).

A depleção de LT CD4⁺ leva à desorganização da resposta imune e a maior suscetibilidade a processos infecciosos e neoplásicos. Além da aids, ocorre ativação inflamatória e processos degenerativos, contribuindo com o aumento de doenças cardiovasculares (DCV) e cerebrovasculares nessa população (Focaccia; Siciliano, 2021)

A Figura 1 ilustra as fases da infecção pelo HIV-1 e as alterações dos marcadores laboratoriais na progressão da infecção ao longo do tempo.

Figura 1 - Fases da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana tipo 1 e as alterações dos marcadores laboratoriais na progressão da infecção ao longo do tempo



CV: carga viral; HIV: vírus da imunodeficiência humana; LT: linfócitos T.

Fonte: Brasil (2018).

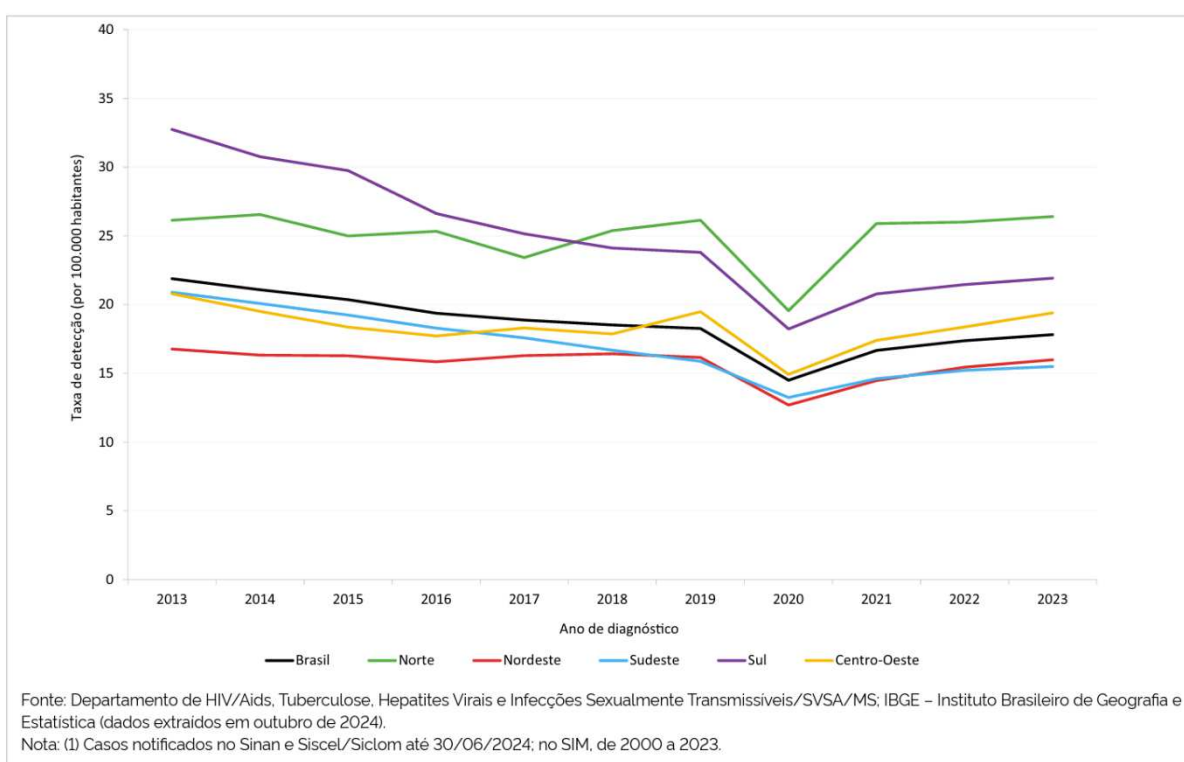
1.2 Epidemiologia da infecção pelo HIV

Segundo o relatório do Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS (*Joint United Nations Programme on HIV/AIDS*, UNAIDS), estima-se que, em 2023, havia aproximadamente 39,9 milhões de pessoas infectadas pelo HIV-1 no mundo, sendo 38,6 milhões de adultos. Apesar de ter reduzido 60,0% o número de novas infecções no período de 1995-2023, houve 1,3 milhões de novos casos no último em 2023 (UNAIDS, 2024). Com o uso da terapia antirretroviral (TARV), a mortalidade por doenças oportunistas diminuiu e, assim, resultou no aumento da expectativa de vida que já se assemelha à população geral. Com a maior sobrevivência destes indivíduos, houve mudança no perfil de morbidade e mortalidade, previamente com um predomínio de eventos relacionados à aids, como a reativação de

infecções oportunistas, superada pelos eventos não relacionados à aids (D’Ettorre *et al.*, 2016). O aumento em larga escala do uso da TARV é um dos principais contribuintes para um declínio de 69,0% da mortalidade por causas relacionadas à aids no período de 2004-2023 (UNAIDS, 2024).

A Figura 2 demonstra a taxa de detecção de aids (x 100 mil habitantes) segundo região de residência no Brasil, por ano de diagnóstico, no período de 2013 a 2023. Apesar da queda da taxa de detecção da aids, tem-se observado aumento na taxa de detecção da infecção pelo HIV-1, provavelmente pela notificação compulsória desta infecção a partir de 2014, o que impede uma análise mais precisa e rigorosa (Brasil, 2024a).

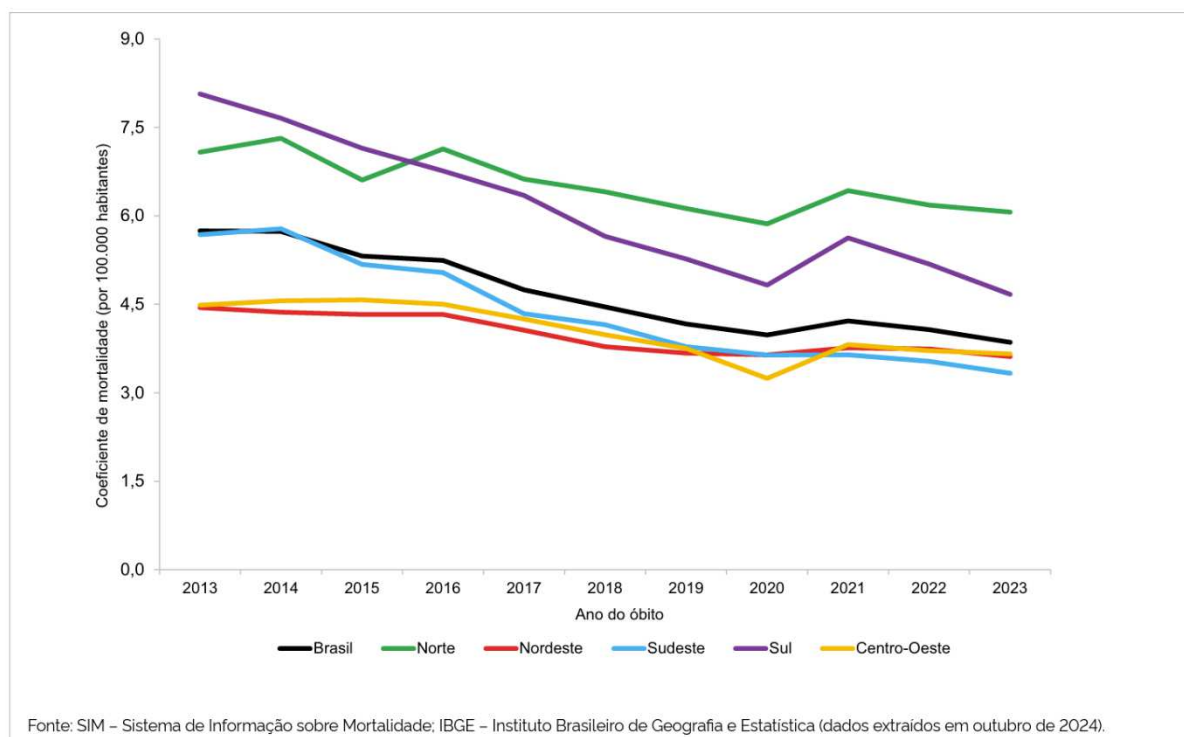
Figura 2 - Taxa de detecção de aids (x 100 mil habitantes) segundo região de residência, por ano de diagnóstico, no Brasil, de 2013 a 2023.



Fonte: Brasil. Boletim Epidemiológico HIV Aids 2024 (Brasil, 2024a).

No Brasil, entre 2013 e 2023, observou-se uma redução de 32,9% no coeficiente padronizado de mortalidade por aids, que passou de 5,7 para 3,9 óbitos por 100 mil habitantes (Figura 3).

Figura 3 - Coeficiente de mortalidade padronizado de aids (por 100.000 habitantes) segundo região de residência, por ano do óbito, Brasil, 2013 a 2023.



Fonte: Brasil. Boletim Epidemiológico HIV Aids 2024 (Brasil, 2024a).

1.3 Tratamento de Pessoas com HIV/Aids

O tratamento da infecção pelo HIV-1 com a TARV melhorou significativamente o prognóstico e a expectativa de vida desses indivíduos. Inicialmente, PVHA foram tratadas com monoterapia, seguida de terapia dupla com os inibidores de transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (ITRN), preferencialmente zidovudina (AZT) e lamivudina (3TC). O surgimento de novas classes de ARVs, os inibidores de protease (IP), aumentou as opções de tratamento. Introduziu-se essa classe de ARV e inaugurou-se, então, a terapia antirretroviral de alta potência (HAART, *highly active antirretroviral therapy*) com a combinação de três ou mais medicamentos. Nesse mesmo ano, foi adotado o esquema tríplice, que combinava dois ITRN e um IP e, assim, inaugurava a terapia antirretroviral combinada. Na ocasião, ela tornou-se um meio de restauração da imunidade das PVHA, manutenção e recuperação da saúde de uma doença progressiva e fatal, tornando a infecção pelo HIV-1 uma doença crônica complexa.

Com a atualização dos protocolos de tratamento, em 2008, optou-se por iniciar um inibidor da transcriptase reversa não nucleosídeo (ITRNN), preferencialmente o efavirenz

(EFZ), no lugar de IP, associado à dupla de ITRN como terapia inicial. A utilização desse esquema farmacológico levou à inibição da replicação do HIV-1 e diminuição da carga viral para níveis indetectáveis e com menores efeitos adversos metabólicos como resistência insulínica e dislipidemia associados aos IP (Brasil, 2008).

O Protocolo Clínico de Diretrizes Terapêuticas (PCDT) para o Manejo de Infecção pelo HIV, obedecia às recomendações do Ministério da Saúde do Brasil de acordo com as orientações da Organização Mundial da Saúde (OMS). Esse protocolo foi reformulado em 2013, quando houve nova alteração no PCDT. O esquema preferencial de primeira linha de terapia antirretroviral tenofovir (TDF) + 3TC + EFZ, passou a ser fabricado coformulado, sendo conhecido como dose fixa combinada, quando se indicou TARV para todos, independentemente da contagem de LT CD4⁺, comorbidades ou carga viral (Brasil, 2018).

Desde fevereiro de 2017, a nova proposta de tratamento inclui combinações de três ARV, sendo o esquema preferencial: 3TC e TDF com dolutegravir (DTG), um inibidor da integrase (INI), inclusive nos casos de coinfeção com tuberculose, mulheres vivendo com HIV/aids com possibilidade de engravidar e gestantes, além de crianças (Brasil, 2018; 2024).

Para a OMS, esse novo protocolo é o mais indicado para o tratamento de HIV/AIDS e o Brasil adotou essa estratégia como forma de oferecer maior eficiência no tratamento com envolvimento do Sistema Único de Saúde (SUS). Atualmente, a terapia inicial é individualizada e depende do país (*U.S. Department Of Health And Human Services*, 2019).

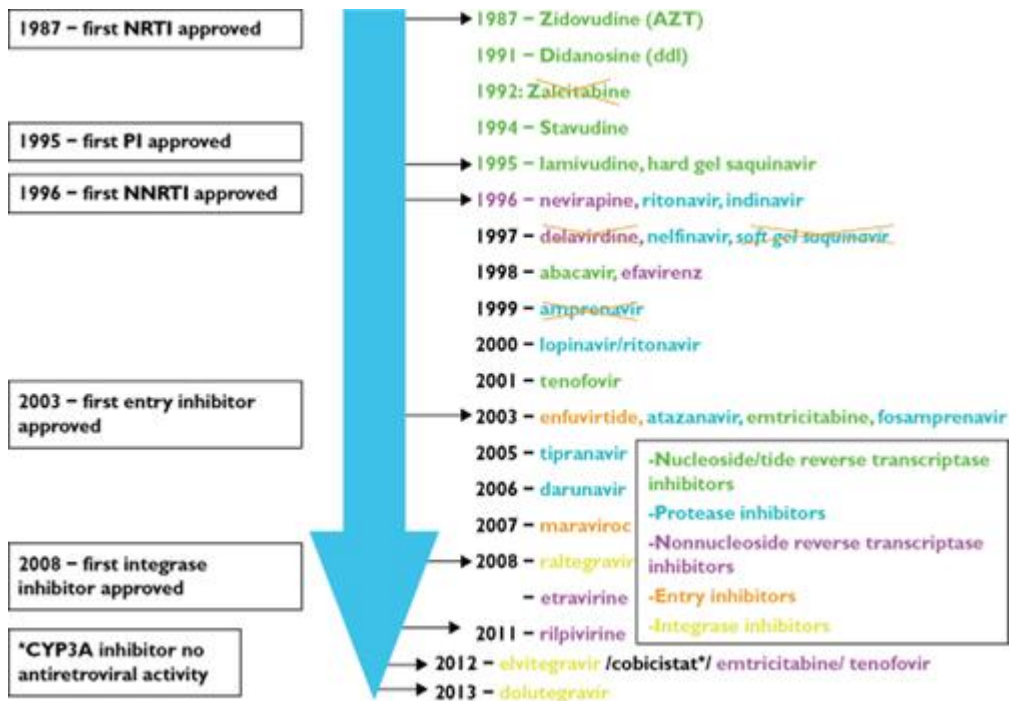
A adesão ao tratamento da infecção pelo HIV-1 e a boa resposta à terapia são fatores que contribuem para o aumento da expectativa de vida e melhor prognóstico. Com o aumento da sobrevivência destes indivíduos, eles são expostos a fatores intrínsecos (como idade) e extrínsecos (como o tabagismo) que aumentam o risco de obesidade, diabetes *mellitus* tipo 2 (DMT2) e DCV. A DCV tornou-se uma das principais causas de morbimortalidade em PVHA, como na população geral (Hsue *et al.*, 2012; D'Abramo *et al.*, 2014).

Os benefícios globais da supressão viral e a melhora na função imunológica como resultado da TARV superam largamente os riscos dos efeitos adversos a alguns antirretrovirais. Os novos esquemas da TARV estão associados a menos efeitos adversos graves e a maior tolerância que os esquemas utilizados no passado; assim, as descontinuidades do tratamento têm sido menos frequentes. Uma vez que a TARV é recomendada para todas as PVHA, independentemente da contagem de T CD4⁺ e a terapia não deve ser interrompida, o tratamento de cada pessoa deve ser individualizado, evitando efeitos adversos em longo prazo (Brasil, 2024b). Os efeitos adversos variam de acordo com a classe de antirretroviral. Entre os mais comuns e/ou graves são: a) acidose láctica; b) alteração da densidade mineral óssea; c)

diabetes/resistência insulínica; d) dislipidemia; e) DCV; f) eventos hepáticos como esteatose e, quanto coinfetados com HIV-HBV, pode ocorrer exacerbação grave da hepatite, com potencial fulminante; g) eventos renais/ urolitíase; h) lipodistrofia; i) supressão da medula óssea; j) síndrome de Stevens Johnson/necrólise epidérmica tóxica, entre outros (Brasil, 2024b). No caso de DCV, o uso de abacavir foi associado a um risco maior de infarto agudo do miocárdio em pessoas com fatores de risco tradicionais de DCV (Brasil, 2024b).

A Figura 4 resume, cronologicamente, o surgimento das terapias antirretrovirais ao longo dos anos.

Figura 4 – Linha do tempo da terapia antirretroviral.



Cronogramas de desenvolvimento de antiretrovirais. O curso temporal do desenvolvimento de mais de 25 medicamentos em cinco classes diferentes até 2013 é destacado de acordo com a data de aprovação da *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos da América. Aqueles que não estão mais em uso ou disponíveis são ilustrados com um 'X' neles.

Fonte: Tseng; Seet; Phillips (2014).

1.4 HIV-1, Inflamação e Doença Cardiovascular

Com a eficácia da TARV, ocorreu aumento da idade média da população com HIV-1, e assim, favorecendo o desenvolvimento de comorbidades não infecciosas comumente observadas em idosos, muitas das quais relacionadas à DCV como DMT2, hipertensão arterial

sistêmica (HAS) e doença renal crônica (Guaraldi *et al.*, 2011). Além do envelhecimento cronológico, acredita-se que os PVHA vivenciam o envelhecimento biológico acelerado, contribuindo para o desenvolvimento precoce de comorbidades relacionadas à idade. Observa-se uma mudança nos padrões de morbimortalidade entre indivíduos infectados pelo HIV-1, com predomínio de comorbidade não relacionadas à aids, em que a DCV desempenha um papel central (Deeks; Phillips, 2009).

Apesar dos fatores de risco tradicionais para DCV serem mais prevalentes em PVHA, como HAS, tabagismo, dislipidemia e DMT2 (Nou; Lo; Grinspoon, 2016), existem outros mecanismos relacionados a própria infecção pelo HIV-1 e pelo uso da TARV (Baker *et al.*, 2011; Hsue *et al.*, 2012; Longenecker; Hoit, 2012).

A inflamação é um dos fatores de risco para a DCV e a infecção pelo HIV-1 não tratada é um exemplo de inflamação crônica que pode ocasionar aterosclerose e alterações metabólicas que aumentam o risco de DCV (Adeyemi *et al.*, 2008; Kotler, 2008). Portanto, a infecção pelo HIV-1, por si só, é um fator de risco para DCV (Adeyemi *et al.*, 2008). No entanto, tanto na população geral como PVHA, a DCV é um processo multifatorial, no qual incluem a TARV, fatores genéticos, ambientais e o próprio HIV-1 (Vachiat *et al.*, 2017).

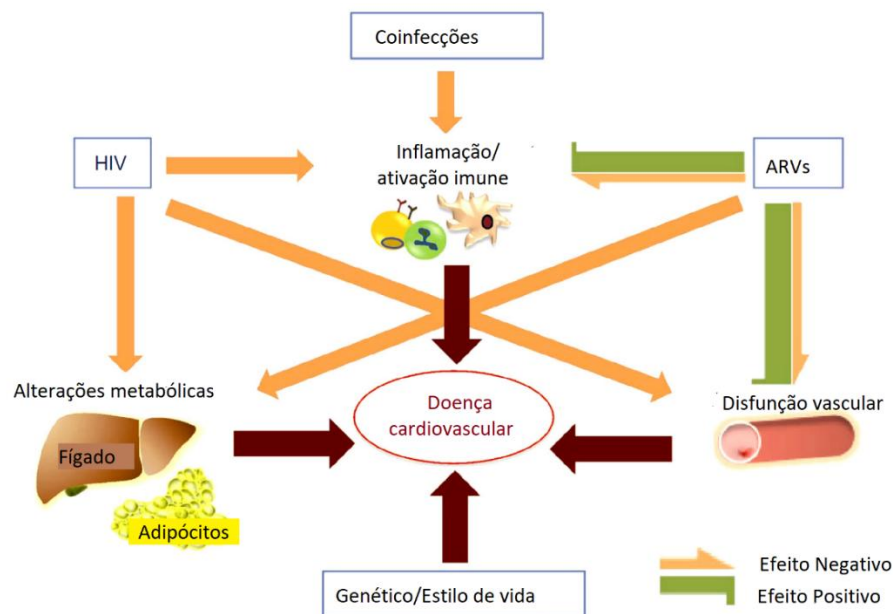
A infecção não controlada pelo HIV-1 pode ter uma influência maior sobre as DCV do que a TARV, aumentando o risco cardiovascular por vários mecanismos: 1) inflamação persistente e ativação imune; 2) dano endotelial; 3) aumento da atividade trombótica; 4) maior estresse oxidativo; e 5) distúrbios metabólicos indiretos [(*The Strategies For Management Of Antiretroviral Therapy (Smart) Study Group et al.*, 2006)]. A infecção pelo HIV-1 leva à ativação de várias vias inflamatórias com a liberação de citocinas e a expressão de moléculas de adesão endotelial que facilitam a adesão e a migração de leucócitos. Várias citocinas induzem ativação endotelial e alteram sua funcionalidade. Além disso, o HIV-1 produz danos diretos nas células endoteliais, aumentando a permeabilidade endotelial, favorecendo a apoptose e aumentando a expressão de moléculas de adesão, como a E-selectina, molécula de adesão vascular 1 (VCAM-1) e molécula de adesão intracelular 1 (ICAM-1) (Beltrán *et al.*, 2015). A infecção pelo HIV-1, também, é acompanhada de ativação imune determinada pela elevação de vários marcadores de ativação em monócitos e macrófagos e uma proporção aumentada de linfócitos T CD8⁺ ativados para o antígeno leucocitário humano (*human leukocyte antigen*, HLA) HLA-DR⁺ CD38⁺ (Martin *et al.*, 2013).

Um estudo de meta-análise, estimou que a taxa de DCV foi 60 por 10.000 PVHA/ano, comparável a outros grupos de alto risco cardiovasculares, como DMT2. Além disso, PVHA tinham risco de DCV duas vezes maior, com maior impacto observado na África Subsaariana.

A carga global de DCV atribuíveis à infecção pelo HIV-1 triplicou nas últimas décadas, principalmente em países de baixa renda, resultado do aumento na prevalência do HIV-1, morbidade e mortalidade da DCV.

Indivíduos com infecção pelo HIV-1 têm taxas mais altas de DCV aterosclerótica do que a população geral (Currier *et al.*, 2008) e apresentam mais eventos cardiovasculares clínicos, como doença coronariana, doença arterial periférica (Currier *et al.*, 2003; Triant *et al.*, 2007; Islam *et al.*, 2012), dano cardiovascular subclínico como aumento da espessura da íntima-média da carótida (cIMT), calcificação coronariana, isquemia miocárdica silenciosa ou disfunção endotelial. Além disso, a incidência de acidente vascular encefálico (AVE) isquêmico na população infectada pelo HIV-1 é consideravelmente alta, particularmente em adultos jovens (Chow *et al.*, 2012; Sico *et al.*, 2015). A **Figura 5** resume a influência da ativação da resposta imune inflamatória no risco de DCV aterogênica associada à infecção pelo HIV-1.

Figura 5 - Influência da ativação imunológica e resposta inflamatória na doença cardiovascular associada à infecção pelo vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1)



Há uma interação complexa de vários fatores, dentre eles, o HIV-1 e TARV que apresentam efeitos diretos no tecido adiposo e função hepática com dislipidemia subsequente, lipodistrofia e resistência à insulina. Outro impacto direto inclui efeitos sobre as células endoteliais e células do músculo liso vascular que conduzem a disfunção endotelial vascular e hipertensão arterial sistêmica com subsequente aterosclerose e infarto agudo do miocárdio. A presença de coinfeções leva a uma ativação imune contínua e a replicação viral podem levar a uma ativação permanente de linfócitos T que também pode ser afetada por uma reativação de outros vírus latentes no indivíduo. A terapia com TARV e o HIV-1 podem, também, estimular um estado crônico de inflamação e ter uma complexa interação com fatores de coagulação e disfunção endotelial. Todos estes mecanismos levam à aterosclerose em indivíduos infectados pelo HIV-1. HIV: vírus da imunodeficiência humana; TARV: terapia antirretroviral.

Fonte: Adaptado de Béltran *et al.* (2015).

A infecção pelo HIV-1 *per se* pode causar anormalidades no perfil lipídico, incluindo elevação dos triglicerídeos (TG) e diminuição da fração lipoprotéica do colesterol de alta densidade (HDL-C) (Grunfeldt *et al.*, 1992), cujas alterações correlacionam-se com o grau de imunossupressão (Khangte *et al.*, 2007), além da elevação da pressão sanguínea (Rachid; Schechter, 2008; Bonfanti *et al.*, 2010).

As citocinas contribuem como um dos mecanismos de modulação das desordens lipídicas em indivíduos com HIV-1 virgens de tratamento. Há uma associação entre os níveis plasmáticos de TG e interferon (IFN) γ circulante em PVHA, e que esse marcador aumentaria os níveis de TG pela diminuição do *clearance* de TG assim como pelo aumento da lipogênese hepática e da síntese de lipoproteína do colesterol de densidade muito baixa (VLDL-C) (Grunfeldt *et al.*, 1992).

Vários fatores contribuem para a elevada prevalência de alterações metabólicas observada em PVHA, tais como história familiar de dislipidemia, tempo e tipo de TARV utilizada, em especial os IP (Farhi; De Lima; Cunha, 2008).

A dislipidemia é, frequentemente, observada em indivíduos infectados pelo HIV-1 em uso de TARV, demonstrada pelas mudanças no perfil lipídico com aumento das concentrações de colesterol total, lipoproteína do colesterol de baixa densidade (LDL-C), TG e diminuição de HDL-C, constituindo um perfil lipídico altamente aterogênico (Valente *et al.*, 2006). A patogênese da dislipidemia na infecção pelo HIV-1 é complexa e envolve fatores relacionados ao vírus, ao hospedeiro e à terapia TARV, uma vez que nem todos os indivíduos em uso da TARV apresentam distúrbios metabólicos (Oh; Hegele, 2007). Desta maneira, a infecção pelo HIV-1 e o tratamento com TARV são associadas ao aceleração da aterosclerose e aumento do número de casos de infarto agudo do miocárdio (Estrada; Portilla, 2011). A combinação de hiperlipidemia, resistência à insulina e acúmulo de gordura visceral se assemelha à síndrome metabólica e levanta a preocupação de que indivíduos infectados pelo HIV-1 em tratamento estão mais susceptíveis em desenvolver DCV e DMT2 (Kotler *et al.*, 1999; Gougeon *et al.*, 2004; Valente *et al.*, 2006; Indumati *et al.*, 2014).

A TARV suprime a replicação viral abaixo do limite de detecção no plasma, promove a recuperação e estabilidade da contagem de LT CD4⁺ e diminui a inflamação e ativação da resposta imune. No entanto, a replicação viral persiste, provavelmente dentro dos órgãos linfóides e, esse nível indetectável de replicação viral contribui, em parte, para o aumento dos níveis inflamatórios em PVHA tratados com TARV (Eckard *et al.*, 2016).

Com a ativação imune persistente ocorre alteração da imunidade da mucosa intestinal que permite a translocação bacteriana, cujas próprias bactérias e seus produtos circulantes no

plasma promovem aumento dos marcadores inflamatórios. A ativação imune persistente, apesar da viremia controlada, se deve a imunidade inata com ativação de macrófagos e células dendríticas, citocinas como o fator de necrose tumoral (TNF)- α , interleucina (IL)-1, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-18, quimiocinas, proteínas de fase aguda como proteína amiloide sérica A, proteína C reativa (PCR), elementos da cascata de coagulação, tais como D-dímero e fator tecidual, elementos de fibrose com a ativação das enzimas matriz metaloproteinases (MMPs) e deposição de colagenase, além dos sensores microbianos como as proteínas ligadoras de lipopolissacarídeos e CD14 solúvel. E na imunidade adaptativa, ocorre aumento do *turnover* e exaustão de LT (Douek, 2013).

1.5 HIV-1 e Aterosclerose

A aterosclerose é um processo inflamatório multifatorial, crônico e progressivo que promove alteração nas paredes dos vasos sanguíneos, caracterizada pelo acúmulo de macrófagos, monócitos, células espumosas e linfócitos além da deposição de lipídios oxidados nas artérias de grande e médio tamanho (Piconi *et al.*, 2013; Hanna *et al.*, 2015). Essa alteração que provoca a formação das placas e, posteriormente, a DCV, é um processo patológico envolvido no IAM, AVE e doença arterial periférica crônica. A progressão da aterosclerose ocorre mais rapidamente em PVHA do que em indivíduos controles, mesmo quando apresentam viremia controlada (Hsue *et al.*, 2012). A viremia do HIV-1 ativa configura-se como um fator de riscos para progressão da aterosclerose, sendo que a viremia não controlada está associada de forma independentemente ao agravamento dessa condição (Baker *et al.*, 2011). No entanto, ainda que a supressão viral seja alcançada por meio da TARV o risco DCV permanece elevado entre as PVHA. Apesar disso, estudos tem demonstrado de forma consistente que o uso da TARV exercem sobre a aterosclerose, contribuindo com a atenuação do processo inflamatório vascular (Torriani *et al.*, 2008)

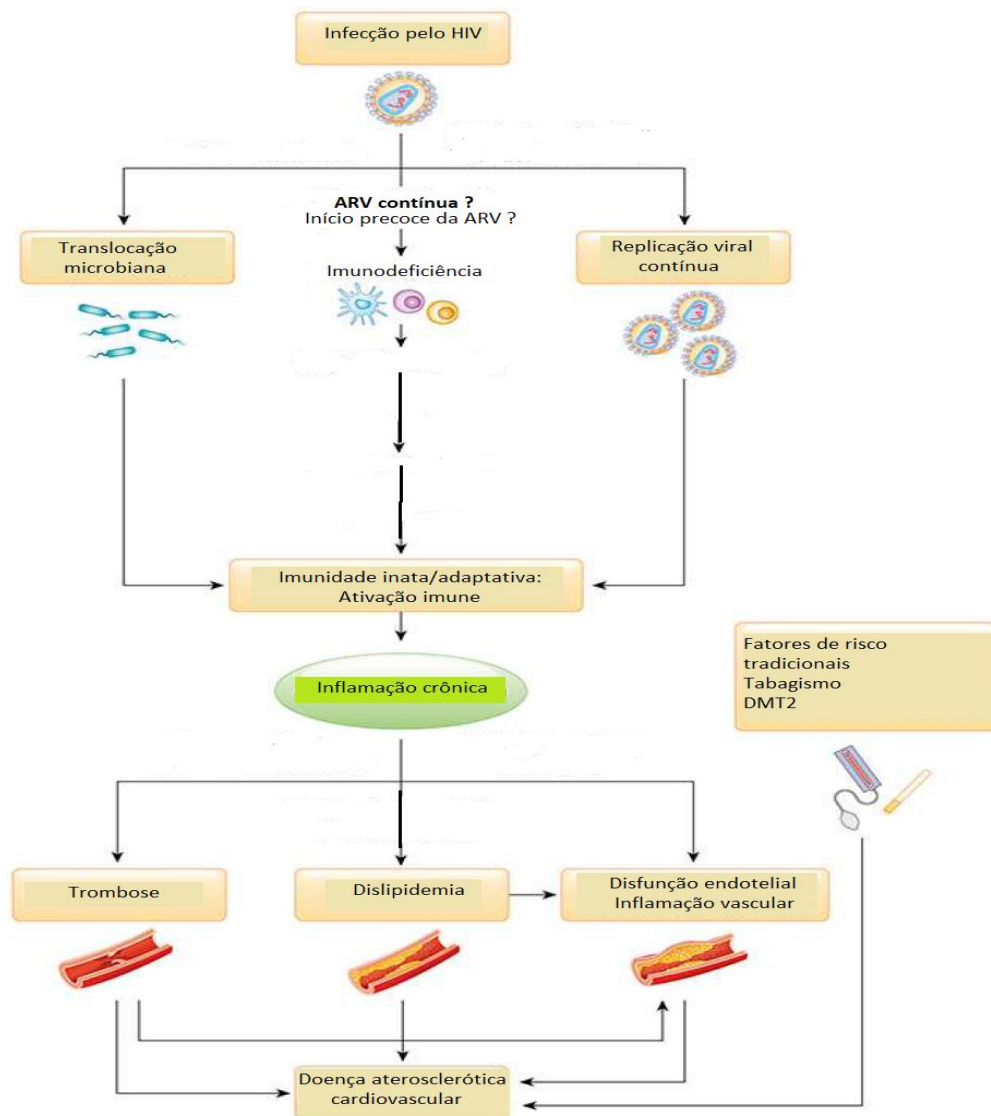
Monócitos e macrófagos desempenham um papel central na gênese e no desenvolvimento da aterosclerose. Nas placas ateroscleróticas, os macrófagos fagocitam as lipoproteínas modificadas, promovem a secreção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas e mediam o efluxo de colesterol da parede arterial. A infecção pelo HIV-1 aumenta a proporção de monócitos CD14⁺/CD16⁺, pois estes monócitos CD14⁺ exibem um fenótipo ativado com aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias (Beltrán *et al.*, 2015).

A inflamação e a ativação imunológica também estão associadas ao aumento da atividade trombótica, com a elevação de biomarcadores do sistema de coagulação/fibrinólise, como dímero D (um produto de degradação da fibrina), fator de von Willebrand (vWF, *Von Willebrand Factor*) e fibrinogênio (Funderburg, 2014).

A resposta imune persistentemente ativada resulta na inflamação crônica, que associada ao envelhecimento precoce do sistema imune, a imunossenescência, promovem o início e o desenvolvimento da aterosclerose (D'Abramo *et al.*, 2014). Além da resposta imune, o estresse oxidativo está relacionado com a inflamação e com o aparecimento de lesões ateroscleróticas precoces. PVHA apresentam níveis mais elevados de lipoproteína do colesterol de baixa-densidade oxidada (oxLDL, *oxidized low-density lipoprotein*) e esta relaciona-se com aterosclerose subclínica na infecção pelo HIV-1 (Hileman *et al.*, 2016).

Lesões ateroscleróticas predominam em áreas de baixa tensão de cisalhamento que geralmente dependem do fluxo sanguíneo como a bifurcação das carótidas. Esse processo promove aterosclerose por vários mecanismos como o comprometimento da função endotelial, aumento da absorção endotelial de LDL-C e aumento da trombogenicidade da placa (Baker *et al.*, 2011; Hsue *et al.*, 2012; D'Abramo *et al.*, 2014). Dessa forma, PVHA, em tratamento ou não, apresentam progressão mais rápida da aterosclerose medidas por cIMT. No entanto, alguns resultados têm sido conflitantes (Pacheco *et al.*, 2016) e necessitam ser melhor investigados. A **Figura 6** ilustra os mecanismos que contribuem para DCV no indivíduo com infecção pelo HIV-1.

Figura 6 - Mecanismos que contribuem para doença cardiovascular no indivíduo com infecção pelo vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1)



HIV: vírus da imunodeficiência humana; ARV: antirretroviral; DMT2: diabetes mellitus tipo 2

Fonte: Adaptado de Hsue *et al.*, (2019).

1.5.1 Espessura da íntima média da carótida (cIMT) em PVHA

A cIMT, avaliada pelo modo-B da ultrassonografia da carótida por *doppler* (USGD), é um método não invasivo e barato, que não submete o paciente a radiação e é facilmente reproduzível, que pode avaliar a presença de aterosclerose subclínica (Longenecker; Hoit, 2012; Nezu *et al.*, 2016). A avaliação da cIMT pode identificar indivíduos com risco de eventos cardiovasculares futuros (Polak; O’Leary, 2016). Medidas aumentadas são associadas a fatores

de risco vasculares (Chambless *et al.*, 1997) e à presença de aterosclerose mais avançada, incluindo doença arterial coronariana (Rosvall *et al.*, 2005; Lorenz *et al.*, 2007).

A cIMT é considerada um marcador para DCV aterosclerótica e seu aumento proporcional é associado a um número de eventos cardiovasculares em PVHA. Estudos mostram que a espessura da cIMT de PVHA foi maior do que em indivíduos controles (van Vonderen *et al.*, 2009; Krikke *et al.*, 2017). No entanto, não observaram diferença comparando crianças e adolescentes, em supressão virológica, quando comparados com controles (Longenecker *et al.*, 2017; Pacheco *et al.*, 2016).

As modificações da cIMT são resultados do dano inicial aos vasos, permitindo a penetração de células inflamatórias nas paredes arteriais; o aumento progressivo da íntima-média está associado com maior probabilidade de DCV, e ainda não há correlação com escores de risco cardiovascular como o escore de risco ASCVD (*Atherosclerotic Cardiovascular Disease*, doença aterosclerótica cardiovascular) e o Escore de Risco *Framingham* (FRS, *Framingham Risk Score*) (Mosepele *et al.*, 2017). Indivíduos tratados com TARV apresentam cIMT significativamente mais espessa do que os indivíduos virgens de tratamento. As alterações nos parâmetros metabólicos, como a homocisteína, são mais intensas em indivíduos tratados, sugerindo um processo metabólico decorrente da TARV (Piconi *et al.*, 2013).

A espessura da íntima média está aumentada em condições inflamatórias infecciosas crônicas, explicada pelo fato de que os receptores *toll-like receptors* (TLRs), que são moléculas que reconhecem moléculas expressas pelos patógenos, são envolvidos na patogênese da aterosclerose. Em particular, a expressão do TLR2 e TLR4 está aumentada em placas ateroscleróticas e associada à infiltração de células inflamatórias na parede arterial, assim como a progressão da doença aterosclerótica (Erridge, 2009).

A infecção crônica pelo HIV-1 pode levar ao endotélio vascular a danificar e aumentar a espessura da parede do vaso (Papita *et al.*, 2011). Em uma coorte multicêntrica, um grupo de indivíduos infectados pelo HIV-1 apresentou valores mais baixos de cIMT do que os controles, caracterizados por serem mais velhos (> 50 anos) e sem tratamento, terem níveis mais elevados de carga viral e baixas contagens de LT CD4⁺. Os valores mais baixos de cIMT, apesar do aumento geral do risco de DCV aterosclerótica (Hanna *et al.*, 2015) é um cenário ainda em discussão.

Resultados conflitantes têm sido relatados por estudos que investigaram a relação entre a infecção pelo HIV-1 e exposição a TARV com a cIMT. Um grupo brasileiro comparou indivíduos infectados pelo HIV-1 virgens de tratamento, infectados em uso de TARV e não infectados pelo HIV-1, para determinar a associação entre exposição à ARV, a própria infecção

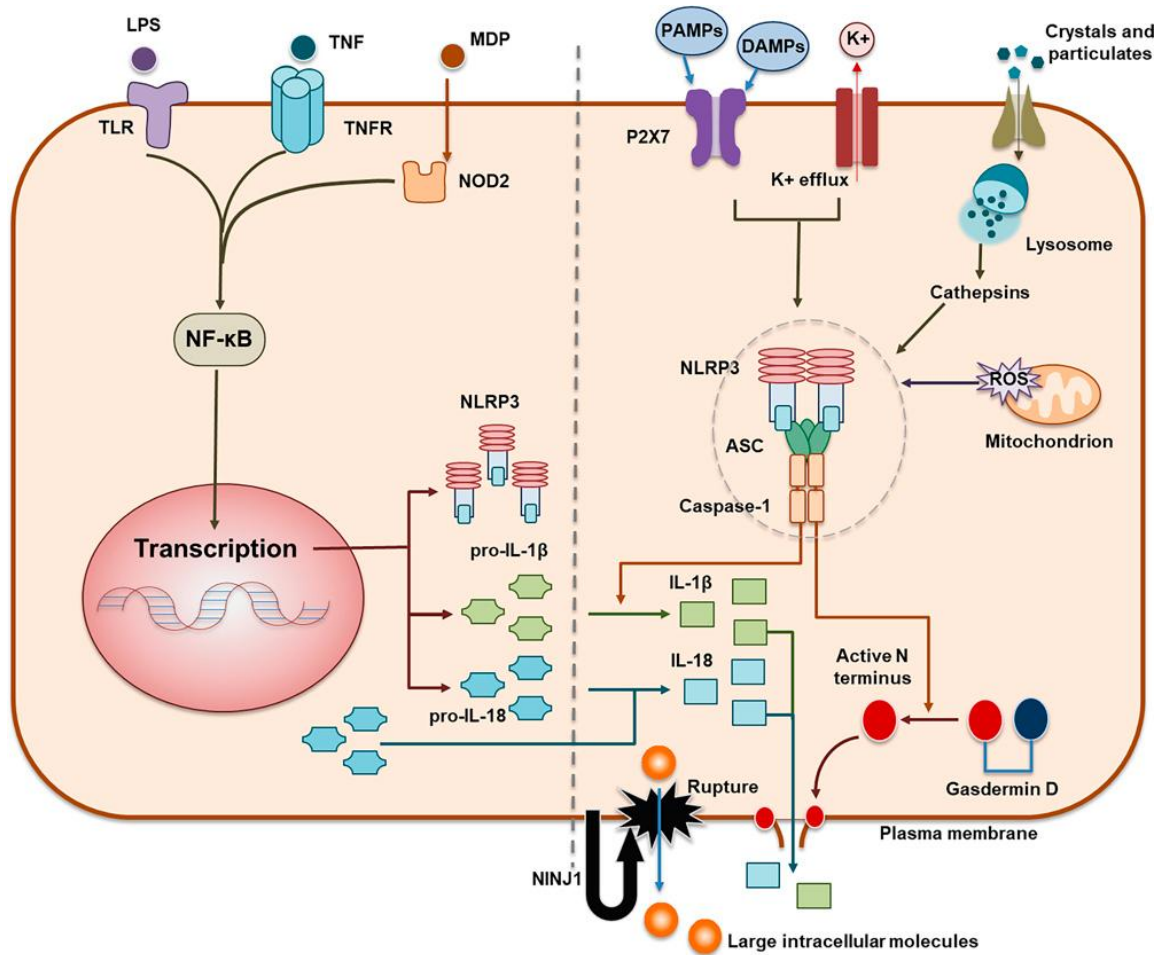
pelo HIV-1 e risco de aterosclerose. No entanto, o estudo não evidenciou qualquer associação entre uso e duração da TARV, infecção por HIV-1 e cIMT > 1 mm. Possivelmente, o impacto do tratamento do HIV-1 nos parâmetros metabólicos podem levar mais tempo para traduzir-se em mudanças na cIMT (Bongiovanni *et al.*, 2008).

1.6 Infecção pelo HIV-1 e Inflamassoma

O termo “inflamassoma” apareceu pela primeira vez em que os autores descreveram um complexo necessário para a oligomerização e ativação da protease pró-inflamatória caspase-1 (Martinon; Burns; Tschopp, 2002). Posteriormente revelaram que o inflamassoma é encontrado principalmente em células do sistema imune inato que combatem micro-organismos. Ele detecta patógenos e sinais de perigo, iniciando respostas inflamatórias e piroptose (Chen; Li, 2024; Martinon; Burns; Tschopp, 2002)

A ativação do inflamassoma é parte da resposta do sistema imunológico inato altamente conservado a estímulos estranhos agindo na defesa do hospedeiro contra bactérias, vírus e restos celulares. Em resposta a esses sinais, o sistema imunológico inicia a produção de citocinas inflamatórias. A formação do inflamassoma depende do reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), entre eles o lipopolissacarídeo (LPS), ou padrões moleculares associados a danos (DAMPs) por receptores de reconhecimento de padrões (PRR), como TLRs, receptores NOD-like (NLRs) ou ausentes em receptores do tipo melanoma 2 (AIM) (ALRs). Em resposta a esses sinais, NLRs ou ALRs oligomerizam para formar o complexo inflamassoma. Posteriormente, esse complexo inflamassoma recruta e ativa a pró-caspase-1, que ativa ainda mais a pró-IL-1 β e a pró-IL-18, levando à geração das citocinas ativas, IL-1 β e IL-18, e subsequentes cascatas inflamatórias (Kearns *et al.*, 2017). A Figura 7 ilustra os mecanismos de ativação do NLRP3 (adaptado de Li *et al.*, 2024).

Figura 7 - Mecanismos de ativação do inflamassoma NLRP3



A formação do inflamassoma NLRP3 inicia o processo autoproteolítico da caspase-1, clivando assim substratos celulares incluindo pro-IL-1 β , pro-IL-18 e gasdermina D e convertendo-os em formas ativas. Posteriormente, a oligomerização do N-terminal da gasdermina forma poros na membrana plasmática, impulsionando a liberação extracelular de IL-1 β e IL-18 e mediando a morte celular piroptótica. Neste momento, a água também entra nas células que estão morrendo, causando inchaço celular e ruptura da membrana plasmática dependente de proteína 1 induzida por lesão nervosa (NINJ1), resultando na liberação de macromoléculas das células. LPS; Lipopolissacarídeo; TLR: *toll-like* receptor; TNF: Fator de necrose tumoral; TNFR: Receptor de fator de necrose tumoral; MDP: dipeptídeo muramíl; PAMPs: padrões moleculares associados a patógenos; DAMPs: padrões moleculares associados a danos; NF- κ B: fator de transcrição nuclear *kappa* B; NLRP3: família de receptores 3 do tipo NOD, contendo domínio de pirina; ASC: proteína semelhante a uma partícula associada à apoptose contendo um CARD; ROS: espécies reativas de oxigênio; NINJ1: proteína 1 induzida por lesão nervosa

Fonte: Adaptado de Li *et al.* (2024).

Os inflamassomas são reconhecidos como sensores e receptores do sistema imunológico inato que gerenciam a ativação da caspase-1 e estimulam a resposta inflamatória. Os componentes do inflamassoma são, principalmente, expressos em células imunes inatas, como monócitos e macrófagos, mas também em células dendríticas e neutrófilos (Awad *et al.*, 2018). A presença de LPS, derivado de paredes celulares bacterianas, tem sido associada à ativação imunológica e à progressão da doença pelo HIV-1. Além disso, coinfeções, como citomegalovírus (CMV) e vírus Epstein–Barr (EBV), introduzem PAMPs adicionais que podem

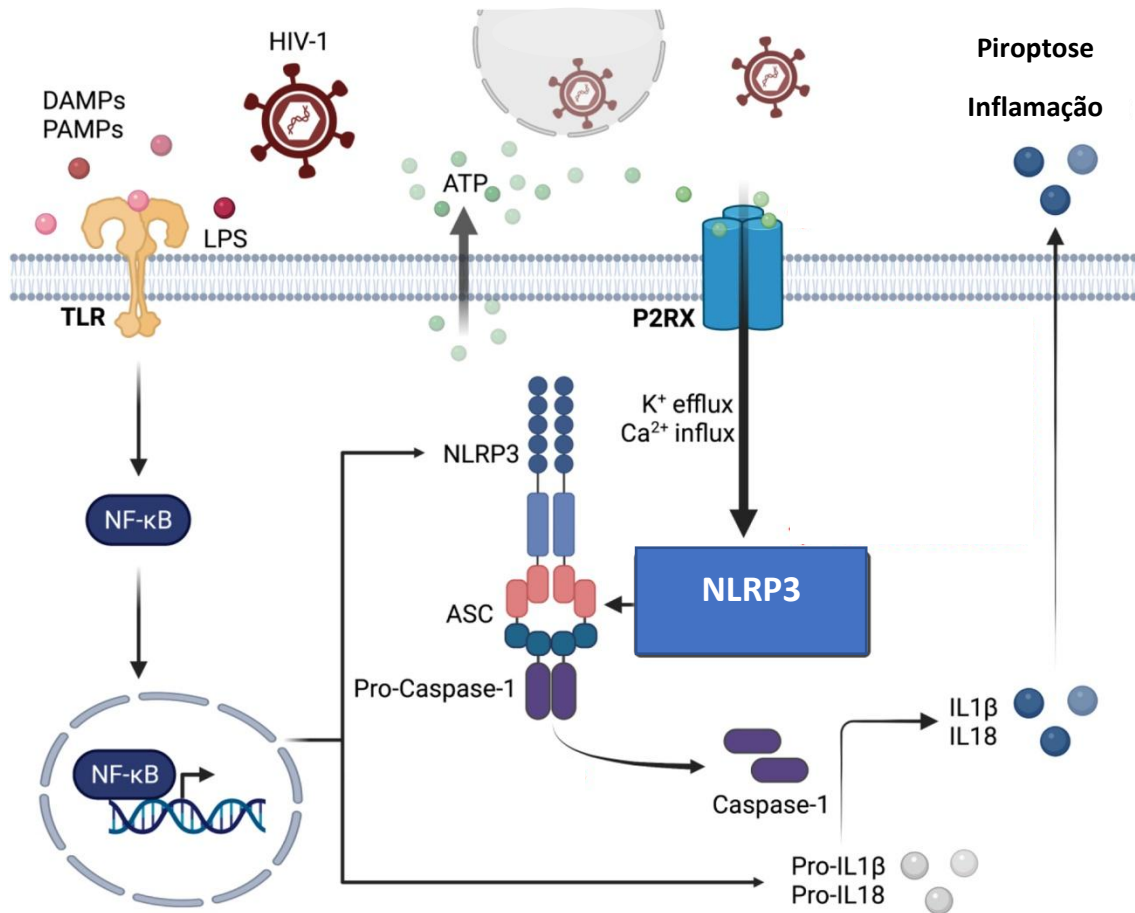
influenciar o meio inflamatório em PVHA. Esses herpesvírus são conhecidos por provocar respostas imunes e contribuir para a inflamação crônica, impactando potencialmente a progressão da infecção pelo HIV-1 (Brenchley; Douek, 2008; Dennis *et al.*, 2018).

Evidências implicam o inflamassoma NLRP3 na patogênese infecção pelo HIV-1. Em indivíduos em uso de TARV, a infecção pelo HIV-1 não apenas media a ativação de células imunes e a disfunção endotelial, mas também ativa uma série de vias celulares, como formação de inflamassoma/ativação de caspase-1, autofagia, estresse oxidativo e estresse do retículo endoplasmático. Esses mecanismos têm uma contribuição estabelecida no desenvolvimento da aterosclerose tradicional (Kearns *et al.*, 2017).

A própria infecção pelo HIV-1 atua como um gatilho para a ativação do inflamassoma (Guo *et al.*, 2021). O inflamassoma NLRP3, um complexo multiproteico que recruta a pró-caspase-1 via ASC, uma proteína adaptadora semelhante a uma partícula associada à apoptose contendo um CARD, crucial para o processamento e liberação de IL-1 β e IL-18 e amplificação da cascata inflamatória. A importância da IL-1 β e IL-18 no contexto da ativação do inflamassoma NLRP3 é ressaltada por seu envolvimento em várias condições inflamatórias, incluindo doenças infecciosas e distúrbios autoimunes (Chen; Li, 2024; Martinon; Burns; Tschopp, 2002; Dinarello, 2009; Latz; Xiao; Stutz, 2013). O envolvimento da caspase-1 na piroptose, uma forma de morte celular, é um fator significativo que contribui para a depleção de células T CD4⁺. Essa depleção, juntamente com a exaustão imunológica, pode explicar parcialmente a associação da progressão do HIV-1 com uma baixa proporção de células T CD4⁺/T CD8⁺, uma indicação de deterioração da resposta imunológica (Doitsh *et al.*, 2014).

A **Figura 8** sumariza os mecanismos de sinalização da ativação do inflamassoma NLRP3 na infecção pelo HIV-1.

Figura 8 - Mecanismos de sinalização da ativação do inflamassoma NLRP3 na infecção pelo HIV-1



A infecção pelo HIV-1 está associada à produção de PAMPs/DAMPs detectados por sensores de detecção de estresse e ativação da sinalização do inflamassoma a jusante. Por exemplo, o LPS é detectado por receptores *toll-like* (TLR) que estimulam a transcrição dependente de NF-κB dos genes precursores do inflamassoma NLRP3: NLRP3, pro-IL-1β, pro-IL-18 e casp1. Simultaneamente, o ATP extracelular liberado pelas células infectadas pelo HIV-1 é detectado por receptores purinérgicos P2X seletivos, levando ao efluxo de íons potássio e influxo de íons cálcio e ativando a montagem do inflamassoma NLRP3. A caspase-1 ativada cliva pro-IL-1β e pro-IL-18 em IL-1β e IL-18 secretoras maduras que induzem piroptose ou morte celular programada pró-inflamatória. PAMP: padrão molecular associado ao patógeno; DAMP: padrão molecular associado ao dano; LPS: lipopolissacarídeo; TLR: receptor *toll-like*; ATP: adenosina trifosfato; NF-κB: fator de transcrição nuclear *kappa* B; ASC: proteína semelhante a uma partícula associada à apoptose contendo um CARD.

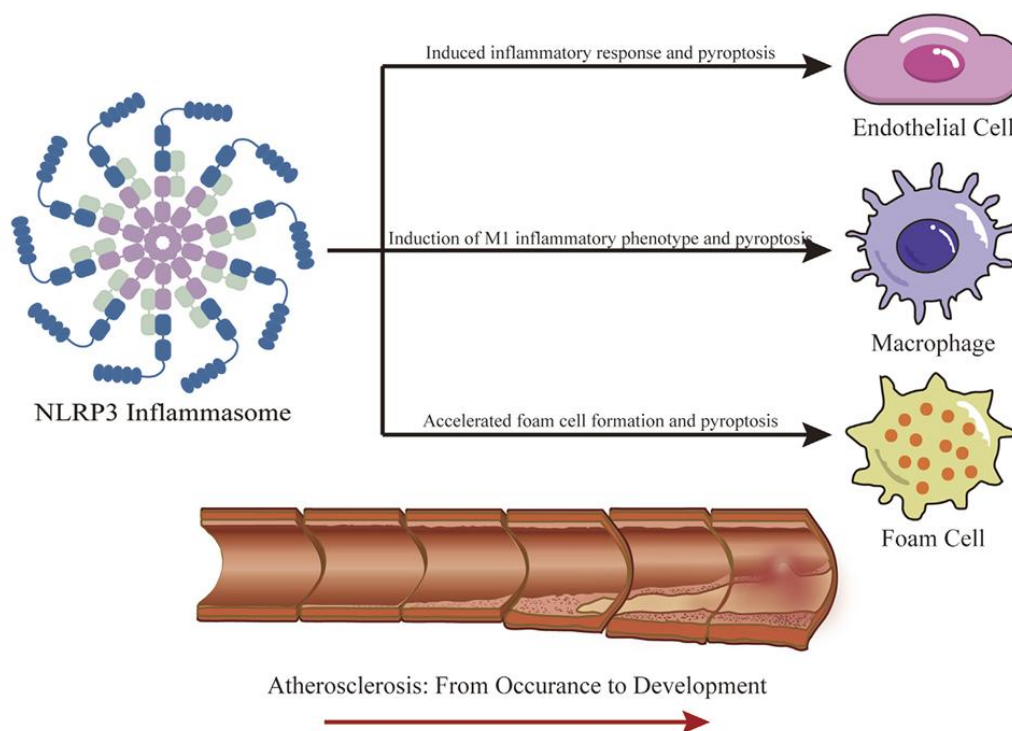
Fonte: Adaptado de Min *et al.* (2023).

Em um estudo, foi demonstrado que PVHA que não receberam TAV tiveram níveis mais altos de caspase-1 plasmática, um componente do inflamassoma NLRP3 quando comparados com controles não infectados (Toribio *et al.*, 2020). Outro estudo encontrou uma correlação entre o inflamassoma NLRP3 e a composição e gravidade da placa da artéria coronária em PVHA em TARV (Schnittman *et al.*, 2023). Caocci *et al.* (2024) mostraram que a formação de células espumosas foi significativamente diminuída quando o NLRP3 foi inibido, demonstrando o envolvimento crítico do NLRP3 no desenvolvimento de células espumosas na aterogênese mediada pelo HIV-1. Estes autores mostraram que o HIV-1 aumentou a formação de células espumosas e a expressão das citocinas IL-1 β , IL-18 e NLRP3, que estavam abundantes em células pro ateroscleróticas. (Guo *et al.*, 2021).

A atividade do inflamassoma na DCV é modulada por fatores de risco cardiovascular, incluindo hiperglicemia, obesidade e hiperuricemia (Li *et al.*, 2014). A IL-1 β é elevada em indivíduos com HAS e DMT2 (Liu *et al.*, 2017; Krishnan *et al.*, 2014). Evidências, também, apoiam o papel do inflamassoma NLRP3 como um condutor de DCV na infecção pelo HIV-1 (Kearns *et al.*, 2017; Kearns *et al.*, 2019). Portanto, a infecção pelo HIV-1 pode mediar a ativação do inflamassoma NLRP3, potencializando assim um estado pró-inflamatório e aumentando o risco de aterosclerose.

A **Figura 9** ilustra como o inflamassoma NLRP3 participa da ocorrência e do desenvolvimento da aterosclerose.

Figura 9 – Participação do inflamassoma NLRP3 na ocorrência e do desenvolvimento da aterosclerose



O NLRP3 participa da ocorrência e do desenvolvimento da aterosclerose, envolvendo principalmente três tipos de células: células endoteliais, macrófagos e células espumosas. A IL-1 β e a IL-18 produzidas a partir da ativação do NLRP3 promovem a resposta inflamatória e o estresse oxidativo nas células endoteliais, levando à lesão celular. A produção de IL-1 β e IL-18 por NLRP3 em macrófagos cria um ambiente inflamatório, além de estar amplamente envolvido na formação de células espumosas.

Fonte: Adaptado de Chen e Li (2024)

Embora os inflamassomas sejam essenciais na imunidade inata na defesa contra patógenos, o controle rigoroso sobre sua sinalização também é essencial. A superativação da sinalização do inflamassoma tem sido associada à desregulação imunológica e à superprodução de citocinas pró-inflamatórias, aumentando o risco de desenvolver doenças autoimunes e doenças inflamatórias crônicas, incluindo aterosclerose (Guo; Callaway; Ting, 2015; Rathinam; Fitzgerald, 2016; de Zoete *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2020; Schroder; Tschopp, 2010). Doenças cardiovasculares, distúrbios metabólicos, deficiências neurocognitivas e certos tipos de câncer têm sido associados à superativação da sinalização do inflamassoma (Min *et al.*, 2023).

1.7 Marcadores Inflamatórios e Anti-inflamatórios na infecção pelo HIV-1 e a cIMT

Existem evidências que apoiam o papel da inflamação e da ativação e disfunção endotelial no desenvolvimento da formação de placas e na progressão da aterosclerose. Níveis elevados da citocina pró-inflamatória IL-6 e da PCR estão associados à aterosclerose subclínica e são preditivos de eventos cardiovasculares. Além disso, o TNF- α tem sido implicado na disfunção miocárdica após síndromes coronarianas agudas, e seus níveis mostraram-se mais elevados em indivíduos que tiveram IAM.

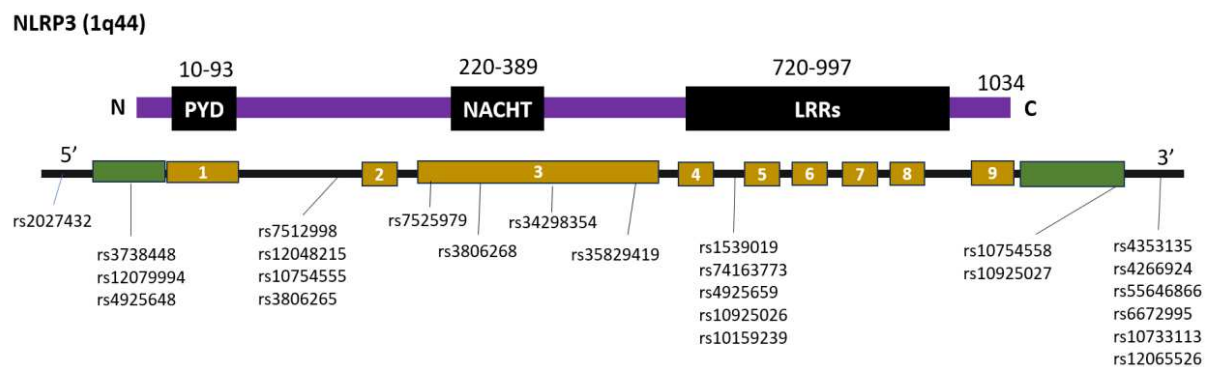
PVHA têm risco maior de aterosclerose subclínica e eventos cardiovasculares, mesmo entre aqueles com níveis suprimidos de carga viral em comparação com pessoas não infectadas (Triant *et al.*, 2007; Hanna *et al.*, 2015; Sico *et al.*, 2015). Os mecanismos responsáveis por esse aumento do risco associado ao HIV-1 podem incluir ativação imunológica, efeitos adversos metabólicos da TARV e uma maior prevalência de fatores de risco tradicionais para DCV entre PVHA (Subramanya *et al.*, 2019). Estudos relatam associações entre os níveis de biomarcadores inflamatórios como PCR, IL-6, receptores solúveis do TNF- α tipo 1 e tipo 2 (sTNFR1 e sTNFR2) e biomarcadores de ativação de monocitárias como CD14 solúvel (sCD14), CD163 solúvel (sCD163), quimiocina CC ligante 2 (CCL2) e D-dímero com DCV subclínica independentemente dos fatores de risco cardiovasculares tradicionais (Longenecker; Sullivan; Baker, 2016; Subramanya *et al.*, 2019). Da mesma forma, os níveis de VCAM-1 e ICAM-1 solúveis, bem como os do fator de vWF são associados com aumento da ativação de células endoteliais na aterosclerose (Chow *et al.*, 2016). Vos e colaboradores, em estudo de meta-análise, evidenciaram a relação do papel da inflamação, da DCV e a cIMT com a infecção pelo HIV-1. Embora tenha sido observada uma associação entre marcadores pró-inflamatórios (PCR, IL-6 e D-dímero) e DCV, não foi encontrada associação entre os marcadores pró-inflamatórios e cIMT (Vos *et al.*, 2016). A resposta anti-inflamatória também tem sido associada a aterosclerose subclínica em PVHA. Bellinati *et al.* (2020) mostraram que baixos níveis plasmáticos de adiponectina, uma adipocina com ação anti-inflamatória, antiaterogênica e antioxidante, foram associados a espessura da cIMT mais elevada em PVHA em uso de TARV. Os autores demonstraram que valores baixos de adiponectina em combinação com idade e tabagismo podem explicar, em parte, o aumento da aterosclerose subclínica observada nesses indivíduos. Outras evidências sugerem que a PCR, IL-6, IL-18, adiponectina e leptina podem, independentemente, contribuir para o risco de DCV tanto em indivíduos não infectados pelo HIV-1, como em indivíduos infectados. Indivíduos em uso de TARV com alto risco

cardiovascular têm níveis plasmáticos aumentados de leptina, IL-6, IL-18 e cistatina C e diminuídos de adiponectina (Falasca *et al.*, 2007, 2010).

1.8 Variantes genéticas do *NLRP3*

Algumas variantes têm sido determinadas no gene *NLRP3* (1q44), como demonstra a **Figura 10**.

Figura 10 - Principais estruturas e variantes genéticas do *NLRP3*.



O gene *NLRP3* está localizado no cromossomo 1 (1q44), possui uma região C-terminal com o domínio LRRs e uma região N-terminal com o domínio PYD. O tamanho dos exons é proporcional dentro cada região de codificação. O tamanho dos íntrons não é proporcional. O número de aminoácidos é indicado acima dos domínios principais. PYD: Domínio pirin; NACHT: domínio de ligação a nucleotídeos; LRRs: domínio de oligomerização, repetições ricas em leucina.

Fonte: Adaptado de Fernandes *et al.* (2020).

Grande atenção tem sido reservada à genética do inflamassoma desde a descoberta de variantes dominantes herdadas no *NLRP3*, que codifica a proteína criopirina/*NLRP3*, causam uma produção constitutivamente alta de IL-1 β . As variantes genéticas podem ser de ganhos de função e aumentam o nível de expressão do gene alvo que resulta no aumento da inflamação e resposta imunológica, que pode ser responsável por distúrbios imunológicos ou pode predispor a doenças multifatoriais. Por outro lado, as variantes com perda de função prejudicam a disponibilidade de componentes do inflamassoma e/ou função, ou ativação de caspases e consequentemente, processamento e liberação de IL-1 β e/ou IL-18 (Fernandes *et al.*, 2020).

O *NLRP3* está localizado no cromossomo 1 (1q44) e consiste em nove exons abrangendo 4470 pares de bases. De acordo com o banco de dados público Ensembl (Zerbino *et al.*, 2018), o gene tem oito transcrições (variantes de *splicing*) correspondentes a seis proteínas codificadas. Variantes genéticas nos componentes do inflamassoma têm sido associadas a doenças comuns na população geral, como doenças autoinflamatórias e autoimunes, DCV, obesidade e SM,

doenças neurodegenerativas e câncer. A variante rs10754558 no gene *NLRP3* foi associada a síndrome coronária aguda (Gonzalez-Pacheco *et al.*, 2017), doença arterial coronariana (Zhou *et al.*, 2016), resistência à insulina em indivíduos com DMT2 (Wang *et al.*, 2015), AVE isquêmico (Zhu *et al.*, 2016) e SM (Zhang *et al.*, 2016). Maes *et al.* (2022) estudaram as rs10157379 e rs10754558 em 528 pacientes brasileiros com *Coronavirus Disease 2019* (COVID-19). Os resultados mostraram que o genótipo CT da variante rs10157379, aumento da idade e sexo masculino foram positivamente associados à síndrome respiratória aguda grave e à gravidade da COVID-19. Além disso, os autores descreveram que o genótipo GG da rs10754558 mostrou associação com níveis aumentados do complexo de sintomas da doença (SSC) que incluem fadiga, anergia, mialgia, hiperalgesia, mal-estar, apatia, perda de interesse em interações sociais, retardo psicomotor, anorexia e perda de peso; ao contrário, os genótipos CC e CG da rs10754558 teriam um efeito protetor mediado por SSC (Maes *et al.*, 2022).

Além disso, a suscetibilidade a agentes infecciosos e/ou desenvolver complicações graves durante infecções também têm sido relacionadas à genética do *NLRP3*. A variante rs10754558, localizada na região 3' não traduzida (3'UTR), foi associada à proteção contra a infecção pelo HIV-1 (Pontillo *et al.*, 2010; 2012) e pelo vírus linfotrópico de linfócitos T (HTLV)- 1 (Kamada *et al.*, 2014) e tuberculose (Souza de Lima *et al.*, 2016). Foi proposto que essa variante afeta a estabilidade do RNA mensageiro (mRNA) do gene *NLRP3* (Hitomi *et al.*, 2009) interferindo na ligação do microRNA (miR)-223 (Bauernfeind *et al.*, 2012).

Evidências sugerem que variantes que levam a aumento das taxas de ativação do inflamassoma e aumento da liberação de IL-1 β e/ou IL-18 tenham sido associadas à proteção contra infecções. As variantes do *NLRP3* que resultam em ganho de função conferem proteção contra várias infecções virais, como HIV-1 (Pontillo *et al.*, 2010; 2012) e vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV) (Kamada *et al.*, 2014). A variante *NLRP3* rs10754558 resultou significativamente associada a um menor risco de infecção pelo papilomavírus humano vírus (HPV) de alto risco (Pontillo *et al.*, 2016).

No entanto, quando a progressão e/ou resultado de infecções crônicas é levado em conta, os resultados parecem ser mais complexos. Na verdade, uma vez que o patógeno tenha conseguido sua entrada dentro do hospedeiro e a infecção tenha sido estabelecida, a ativação do inflamassoma pode ser prejudicial para o hospedeiro devido à perda de células mediada por inflamação e dano tecidual. Como modelo desta hipótese, a variante *NLRP3* rs10754558, que confere ganho de função mencionada, foi associada à proteção contra *Mycobacterium tuberculosis* (Souza de Lima *et al.*, 2016). Estes autores mostraram que o genótipo GG da variante *NLRP3* rs10754558 foi significativamente menos frequente em indivíduos com

tuberculose pulmonar ativa do que em controles (indivíduos expostos), sugerindo um papel protetor do alelo G contra o desenvolvimento de tuberculose pulmonar ativa, de acordo com um modelo recessivo de herança (Souza de Lima *et al.*, 2016). No entanto, esta mesma variante foi associada à tuberculose grave em indivíduos infectados (Ravimohan *et al.*, 2018), sugerindo que o efeito genético poderia mudar dependendo da fase da resposta imune

2 JUSTIFICATIVA

A ativação do inflamassoma e a participação de seus receptores específicos têm sido amplamente implicadas na resposta imune frente a diversas doenças infecciosas, incluindo a infecção pelo HIV-1. Evidências demonstram que a variante rs10754558 C>G do gene *NLRP3*, associada ao aumento da ativação do inflamassoma e à maior liberação de IL-1 β e/ou IL-18, pode conferir um efeito protetor contra a infecção pelo HIV-1 (Pontillo *et al.*, 2010; Pontillo *et al.*, 2012). Em contrapartida, estudos também apontam que, uma vez estabelecida a infecção, a ativação exacerbada do inflamassoma pode contribuir negativamente para o prognóstico, promovendo inflamação crônica, dano tecidual e depleção celular. Apesar do crescente interesse na via do inflamassoma no contexto da infecção pelo HIV-1, a variante rs10157379 T>C do *NLRP3* permanece pouco explorada quanto à sua influência na susceptibilidade à infecção e na regulação da resposta inflamatória.

O inflamassoma pode, potencialmente, servir como um mediador do risco de DCV em PVHA, pois foi implicado tanto na patogênese do HIV-1 quanto na DCV na população geral. A infecção pelo HIV-1 media uma série de vias de sinalização molecular, incluindo ativação do inflamassoma, com papel patogênico estabelecido na aterosclerose. No entanto, há dados limitados sobre a correlação entre a ativação do inflamassoma e os índices de placa coronária em PVHA (Kearns *et al.*, 2019). Além disto, o papel das variantes do *NLRP3* rs10157379 T>C e rs10754558 C>G na patogênese da aterosclerose associada ao HIV-1 e suas complicações ainda permanece indefinido. A investigação do papel das variantes genéticas do *NLRP3* rs10157379 T>C e rs10754558 C>G na suscetibilidade e ativação de inflamação das células imunes na vasculatura, levando ao início e progressão da aterosclerose, pode contribuir para um melhor entendimento destas características genéticas do hospedeiro na fisiopatologia da infecção pelo HIV-1 e desenvolvimento da aterosclerose associada ao HIV-1.

Contudo, a literatura ainda é escassa quanto à avaliação direta da ativação do inflamassoma e sua correlação com indicadores de aterosclerose, como a presença e a extensão de placas coronarianas, em PVHA (Kearns *et al.*, 2019). De maneira semelhante, o papel das variantes genéticas *NLRP3* rs10754558 C>G e rs10157379 T>C na suscetibilidade à infecção pelo HIV-1, bem como na ativação inflamatória vascular e no desenvolvimento da aterosclerose associada ao HIV, permanece indefinido.

Diante desse panorama, a investigação do impacto dessas variantes genéticas na ativação do inflamassoma e na resposta inflamatória imune na vasculatura pode oferecer importantes insights sobre os mecanismos fisiopatológicos que interligam a infecção pelo HIV-

1, a genética do hospedeiro e o risco cardiovascular. Este conhecimento poderá contribuir para a identificação de novos biomarcadores genéticos de risco e para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas personalizadas voltadas à prevenção e manejo da aterosclerose em PVHA.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a associação entre as variantes genéticas rs10157379 T>C e rs10754558 C>G do *NLRP3* e a infecção pelo HIV-1, carga viral, formação de placas carotídeas e marcadores inflamatórios e metabólicos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar as frequências das variantes genéticas rs10157379 T>C e rs10754558 C>G do *NLRP3* em PVHA e indivíduos controles;
- Determinar a frequência de aterosclerose subclínica em PVHA;
- Determinar os fatores associados com a aterosclerose subclínica em PVHA;
- Avaliar a associação das variantes genéticas rs10157379 T>C e rs10754558 C>G do *NLRP3* e a aterosclerose subclínica em PVHA;
- Avaliar a associação entre as variantes genéticas rs10157379 T>C e rs10754558 C>G do *NLRP3* e a carga viral do HIV-1, biomarcadores inflamatórios e metabólicos em PVHA em uso de TARV.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina (UEL), e, 23/11/2017, Parecer n. 2.395.912, registrado com o número CAAE 73545417.0.0000.5231 (Anexo 1). Todos os indivíduos que consentiram a sua participação voluntária no estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice 1). Na impossibilidade de o paciente manifestar seu consentimento, sua participação foi autorizada pelos seus responsáveis por meio da assinatura do TCLE.

4.2 DELINEAMENTO

Foi realizado um estudo caso-controle, com dois grupos de indivíduos, sendo um grupo de PVHA e outro de indivíduos controles se infecção pelo HIV-1, em que os marcadores inflamatórios e metabólicos foram descritos e comparados. Posteriormente, estes marcadores foram avaliados no grupo de PVHA categorizados de acordo com os resultados de cIMT obtidos na USGD.

4.3 POPULAÇÃO

A população do estudo foi composta por indivíduos adultos de ambos os sexos, diagnosticados com infecção pelo HIV-1 ou aids há pelo menos cinco anos e em tratamento com TARV por igual período. Todos os participantes eram acompanhados no Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário de Londrina (HU) da UEL (AEHU/UEL).

4.4 AMOSTRA

Trata-se de uma amostra consecutiva, de conveniência de tempo e local, com a inclusão, prospectiva de 78 indivíduos com diagnóstico de infecção pelo HIV-1, segundo o protocolo brasileiro (Brasil, 2024a) e com tempo de infecção e tratamento com TARV de, pelo menos, cinco anos, atendidos no AEHU/UEL. Como grupo controle, foram utilizadas as amostras de material biológico de 147 controles sem infecção pelo HIV-1 que foram previamente inseridos no projeto de pesquisa aprovado em 20/12/2011, pelo CEP/UEL (Parecer 294/2011, CAAE: 0250.0.268.000-11, Folha de Rosto: 462193, cadastrado na PROPPG n.08103, iniciado em

27/08/2012 e finalizado em 31/07/2015). Estes indivíduos eram doadores de sangue fidelizados do Hemocentro Regional de Londrina e indivíduos da população geral que já assinaram o TCLE para o projeto de pesquisa citado.

4.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos as PVHA e controles: a) que apresentaram processo inflamatório ou infeccioso em tratamento no momento da avaliação (incluindo doença autoimune, infecção aguda ou crônica de origem bacteriana ou viral como pneumonia, infecção do trato urinário; b) em uso crônico de corticosteroides ou imunossupressores; c) portadores de doença renal crônica, hepatopatia crônica, incluindo infecção pelos vírus da Hepatite B (HBV) e infecção pelo vírus da hepatite C (HCV), neoplasias e doenças neurodegenerativas; d) com doença aterosclerótica estabelecida como doença arterial coronariana, AVE, doença arterial periférica crônica (DAPC); e) pós-operatório imediato e, f) trauma nos últimos 30 dias.

4.6 DADOS DEMOGRÁFICOS, CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS

As informações sobre os dados demográficos, fatores de estilo de vida e história médica foram obtidas por meio de uma avaliação clínica com a aplicação de um questionário padrão (Apêndice 2) respondido pelo paciente ou por seus responsáveis. Os dados foram, também, obtidos por meio de consulta aos prontuários médicos e à base de dados LABHOS do Laboratório de Análises Clínicas (LAC) do HU/UUEL. A duração da infecção pelo HIV-1 e as terapias utilizadas foram registradas para cada paciente. Os participantes foram questionados quanto ao uso de medicamentos hipolipemiantes, anti-hipertensivos, hipoglicemiantes e uso suplementos antioxidantes e consumo de álcool. O peso corporal foi medido com aproximação de 0,1 quilograma (kg) utilizando uma balança eletrônica, com os indivíduos vestindo roupas leves, sem sapatos e no período da manhã. A altura foi medida com uma aproximação de 0,1 centímetro (cm) por meio de um estadiômetro. O índice de massa corporal (IMC) foi calculado como peso (kg) dividido pela altura (m) ao quadrado. A circunferência abdominal foi mensurada e expressa em cm. Duas aferições de pressão arterial foram realizadas com um intervalo de um minuto com o paciente sentado. A média destas aferições, expressas em mmHg, foi utilizada na análise dos dados. PAS \geq 130 mmHg e PAD \geq 90 mmHg ou uso de anti-hipertensivo foram os critérios considerados para definir HAS (James *et al.*, 2014). Presença de DMT2 foi definida como glicose em jejum \geq 126 mg/dL, ou hemoglobina glicada (HbA1c) \geq 6,5% e/ou o uso de medicamentos antidiabéticos (American Diabetes Association, 2014; Johnson *et al.*, 2019). Dislipidemia foi definida pela presença de uma ou mais das concentrações

anormais de lipídeos no soro, como colesterol total ≥ 200 mg/dL, LDL-C ≥ 130 mg/dL; HDL-C < 40 mg/dL (*National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel On Detection, Evaluation, 2002*). A presença de síndrome metabólica (SM) baseou-se nos critérios propostos pela *International Diabetes Federation (IDF)* em conjunto com a *American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute (AHA/NHLBI)*, que definem a SM pela presença de obesidade central (circunferência da cintura específica para a etnia e sexo) acrescida de pelo menos dois dos seguintes fatores: triglicérides elevados (≥ 150 mg/dL ou tratamento específico), HDL colesterol reduzido (< 40 mg/dL em homens e < 50 mg/dL em mulheres ou tratamento específico), pressão arterial elevada (PAS ≥ 130 mmHg ou PAD ≥ 85 mmHg ou tratamento anti-hipertensivo) e glicemia de jejum elevada (≥ 100 mg/dL ou diagnóstico prévio de DMT2) (Alberti *et al.*, 2009). Quanto à lipodistrofia, a sua classificação seguiu as diretrizes que consideram a etiologia (congenita ou adquirida) e a extensão da perda de tecido adiposo (generalizada, parcial ou localizada), sendo o diagnóstico estabelecido por meio da avaliação clínica da distribuição da gordura corporal, complementada por dados antropométricos, de imagem (quando aplicável) e perfil metabólico, conforme descrito por Garg (2011) e atualizações consensuais na área (Garg, 2011; Fiasco; Fazeli, 2018).

4.7 DADOS DE IMAGEM

O exame de USGD de carótidas foi realizado no HU/UEL, utilizando-se o equipamento *Siemens Acuson X300 Color Doppler Machine* (Siemens, Alemanha). Todos as PVHA foram avaliados pelo mesmo examinador, colaborador deste estudo. Foram avaliadas da espessura da camada íntima, o grau de estenose e presença de placa na artéria carótida interna (ACI) direita e ACI esquerda. Os resultados foram expressos pela média dos dados obtidos em ambos os vasos, sendo a cIMT expressa em mm, o grau de estenose expresso em %. Considerou-se como presença de placa quando o grau de estenose era $\geq 50\%$ ou $\geq 1,5$ mm, mesmo observados, em apenas, um dos vasos avaliados. As PVHA foram, também, categorizados de acordo com a cIMT ($< 0,9$ mm e $\geq 0,9$ mm) (Pirs *et al.*, 2014), grau de estenose ($< 50\%$ e $\geq 50\%$) e presença de placa ($\geq 1,5$ mm ou $\geq 50\%$) (Williams *et al.*, 2018).

4.8 COLETA DE AMOSTRA BIOLÓGICA E EXAMES LABORATORIAIS

Após jejum de 12 horas, as PVHA foram submetidas à coleta de sangue venoso em tubo de coleta à vácuo, sem anticoagulante e com anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). O soro e plasma foram obtidos após centrifugação 10 min 2500 r.p.m. e armazenados

no *freezer* -80°C até o momento do uso. Os exames laboratoriais foram realizados nos setores do LAC/HU, utilizando-se de métodos padronizados e reagentes disponíveis comercialmente. Foram realizados contagem de leucócitos periféricos e plaquetas por método automatizado.

Os níveis plasmáticos de IL-6, TNF- α e IL-10 e adiponectina foram determinados por imunofluorimetria (Novex Life Technologies, Frederick, USA) com plataforma Luminex MAGPIX® (Luminex Corp., TX, USA). Os níveis de PCR foram avaliados pelo método automatizado de turbidimetria (C8000®, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA). A velocidade de hemossedimentação (VHS) foi determinada por método automatizado (Ves-Matic® CUBE 30, DIESSE, Siena, Italy); contagem de leucócitos periféricos e de plaquetas foram realizadas por método automatizado; as dosagens de ferritina e homocisteína foram determinadas por quimioluminescência em micropartícula (Architect i2000, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA).

Foram, também, analisados marcadores metabólicos como níveis séricos de colesterol total, triglicerídeos, HDL-C, LDL-C, glicose e ferro por método automatizado (Dimension™, Siemens Healthcare Diagnósticos, Brasil).

A contagem de células T CD45⁺, T CD3⁺, T CD4⁺ e T CD8⁺ foi realizada pelo método de citometria de fluxo (plataforma BD FACSCalibur®, BD Bioscience, San Jose, CA, USA). Os resultados foram expressos em células/mm³, segundo as recomendações do fabricante. Os valores foram, também, categorizados em > 500 células/mm³ e ≤ 500 células/mm³ (Bandera *et al.*, 2018; Lewden *et al.*, 2007). A quantificação do RNA do HIV-1 no plasma foi realizada por metodologia de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR, *Polymerase chain reaction quantitative real time*) utilizando-se a plataforma Abbott, (Abbott Real Time HIV-1, Abbott Molecular Inc. USA), segundo as recomendações do fabricante. Os valores foram expressos como cópias/mL e \log_{10} RNA do HIV-1. Os valores foram, também, categorizados em > 50 cópias/mL e ≤ 50 cópias/mL.

4.9 GENOTIPAGEM DAS VARIANTES DO *NLRP3*

As variantes genéticas rs10157379 T>C e rs10754558 C>G do *NLRP3* foram avaliadas por qPCR pelo método de TaqMan®. Para tanto, foram utilizados ensaios *Taqman*® *SNP Genotyping Assay 40X* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) contendo dois primers e duas sondas TaqMan® MGB alelo-específicas com um corante repórter na extremidade 5' (VIC® ou FAM®) e *TaqMan*® *Universal Genotyping Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Os níveis de fluorescência dos produtos da reação em cadeia da polimerase

em tempo real foram avaliados pelo termociclador QuantStudio® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis categóricas foram expressas como número absoluto (n) e porcentagem (%) e as variáveis contínuas foram expressas como média \pm erro padrão da média (SEM). Análises de tabelas de contingência (teste do χ^2) foram empregadas para verificar as associações entre variáveis categóricas e grupos diagnósticos. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para avaliar a normalidade da distribuição. A transformação logarítmica (Ln) de dados contínuos foi utilizada na análise quando as variáveis não estavam normalmente distribuídas ou quando havia heterogeneidade de variância, conforme avaliado pelo teste de Levene. Avaliamos as diferenças nas variáveis contínuas entre os grupos usando análises de variância (ANOVA). A associação das variantes genéticas com as variáveis de estudo foi avaliada nos modelos genéticos codominante, dominante, recessivo e overdominante. A distribuição dos genótipos das variantes genéticas foi comparada para o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Além da análise univariada, a associação com as variáveis que apresentaram $p < 0,1$ no teste de ANOVA entre os grupos entre cIMT $< 0,9$ mm e $\geq 0,9$ mm foi avaliada usando três modelos diferentes de análise de regressão logística binária automática (*stepwise*) controlada por covariáveis que poderiam confundir a associação de interesse. *Odds ratio* (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC) foram determinados. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o IBM SPSS, versão do Windows 24. Os testes foram bicaudais e um nível alfa de 0,05 indicou resultados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos foram apresentados e discutidos em dois artigos científicos que serão submetidos à publicação em revista internacional.

Artigo 1 - ***NLRP3* rs10157379 and rs10754558 genetic variants are not associated with HIV-1 infection: a case-control study**

Artigo 2 - **Association of *NLRP3* rs10157379 and rs10754558 genetic variants with subclinical atherosclerosis, inflammatory, and metabolic biomarkers in HIV-1 infection**

5.1 ARTIGO 1

***NLRP3* rs10157379 and rs10754558 genetic variants are not associated with HIV-1 infection: a case-control study**

Philippe Quagliato Belinati^{1,2,3}; Marcell Alysson Batisti Lozovoy^{1,4}, Tainah Mendes Ahrens¹, Eduarda Santos¹; Beatriz Neves Bruniera⁵; Luana Machado Sakamoto⁶, Daniel Felipe Piva dos Santos⁶, Pedro Luis Cândido de Sousa Cassela⁶; Caio Hideki Cruz Martins⁶, Guilherme Lerner Trigo⁶, Andrea Name Colado Simão^{1,4}, Edna Maria Vissoci Reiche^{1,3,5}

¹ Postgraduate Program of Clinical and Laboratory Pathophysiology, Health Sciences Center, Londrina State University, Londrina, Paraná, Brazil;

² Infectious Diseases Unity, University Hospital, Londrina State University, Londrina, Paraná, Brazil;

³ Pontifical Catholic University of Paraná, Londrina Campus, School of Medicine, Londrina, Paraná, Brazil.

⁴ Department of Applied Pathology, Clinical and Toxicological Analyses, Health Sciences Center, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil;

⁵ Postgraduate Program of Health Sciences, Health Sciences Center, Londrina State University, Londrina, Paraná, Brazil;

⁶ Graduate School of Medicine, Health Sciences Center, Londrina State University, Londrina, Paraná, Brazil.

Abstract

Background: The role of the NLRP3 inflammasome in the pathogenesis of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection has gained increasing attention, given its involvement in regulating the innate immune response. Genetic variants such as *NLRP3* rs10754558 C>G have been proposed to influence HIV-1 susceptibility by modifying immune activation, but the evidence remains inconclusive. Additionally, the impact of *NLRP3* rs10157379 T>C on HIV-1 infection has yet to be explored. This study aimed to investigate whether these *NLRP3* genetic variants are associated with HIV-1 infection in a Brazilian population.

Methods: We conducted a case-control study including 78 HIV-1-infected patients on combination antiretroviral therapy (cART) for at least five years and 147 healthy controls. The *NLRP3* rs10157379 T>C and rs10754558 C>G variants were genotyped using real-time polymerase chain reaction (qPCR). The association between genetic variants and HIV-1 infection was evaluated under codominant, recessive, dominant, and overdominant genetic models.

Results: The patients were older than controls ($p = 0.028$), and a greater proportion were non-Caucasians (52.6% vs. 36.1%, $p = 0.017$). No significant association was observed between *NLRP3* rs10157379 and rs10754558 variants and HIV-1 infection under any genetic model. For rs10157379, the distribution of TT, TC, and CC genotypes was similar between groups ($p = 0.932$ for TC, $p = 0.733$ for CC). Similarly, for rs10754558, the CC, CG, and GG genotypes showed no association with HIV-1 infection ($p = 0.290$ for CG, $p = 0.309$ for GG).

Conclusion: This study did not find evidence that *NLRP3* rs10157379 and rs10754558 genetic variants influence HIV-1 susceptibility. While previous studies suggested a protective role of rs10754558, our findings indicate that these variants alone do not significantly alter HIV-1 infection risk. The impact of other genetic or environmental factors should be explored in future research, particularly in treatment-naïve HIV-1 patients. Additionally, functional studies are needed to clarify the mechanistic role of the *NLRP3* inflammasome in HIV-1 infection. Understanding host immune responses and inflammasome activation may inform future therapeutic strategies for HIV-1 management.

Keywords: HIV-1 infection; Inflammasome; *NLRP3*; susceptibility; genetic variants

Introduction

Innate immune responses are the host's first line of defense against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection, with pattern recognition receptors detecting viral specific pathogen-associated molecular patterns and initiating antiviral responses. Inflammasomes are cytoplasmic complexes that mediate innate immune response against pathogen- or danger-derived signals (PAMPs and DAMPs, respectively) leading to the caspase-1-mediated processing and production of proinflammatory interleukin (IL)-1 β and IL-18. This, in turn, activates the expression of other immune genes and facilitates lymphocyte recruitment to the site of primary infection, thereby controlling invading pathogens. Moreover, inflammasomes counteract viral replication and remove infected immune cells through an inflammatory form of programmed cell death known as pyroptosis (Shrivastava et al., 2016).

Among various inflammasomes, NLRP3 is the most extensively characterized and is present in multiple cell types, including macrophages, neutrophils, monocytes and dendritic cells, and certain non-immune cells (Deng et al., 2019; Fusco et al., 2020). NLRP3 activation is implicated in viral infection, responding to various stimuli, including viral replication and ATP. Viral infections promote reactive oxygen species generation, promote potassium efflux, and the release of lysosomal cathepsin B into the cytoplasm, ultimately leading to NLRP3 inflammasome activation. Activated caspase-1 processes pro-IL-1 β and pro-IL-18 into their mature forms. Alternatively, NLRP3 inflammasomes may trigger pyroptosis (Zheng et al., 2023).

The role of inflammasome NLRP3 in the pathogenesis of HIV-1 infection has gained increasing attention, as it plays crucial roles in regulating the innate immune system. NLRP3 activation with release of IL-1 β were reported to be prominent factors in the maturation and activation of dendritic cells (Martinon et al., 2009; Eisenbarth et al., 2008), playing a pivotal role not only in the innate immune response but also in the specific humoral and cellular immune response. High levels of IL-1 β have been observed in patients from the early stages of HIV-1 infection, supporting the importance of inflammasome and IL-1 β secretion in HIV-1 pathogenesis, as well as the role of NLRP3 inflammasome in driving this sustained inflammatory response (Appay; Sauce, 2008).

The *NLRP3* is located on chromosome 1 (1q44) harbors various genetic variants that can influence inflammasome activity. The rs10754558 variant in the *NLRP3* gene has been associated with acute coronary syndrome (Gonzalez-Pacheco et al., 2017), coronary artery disease (Zhou et al., 2016), insulin resistance in patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM)

(Wang et al., 2015), ischemic stroke (Zhu et al., 2016), and metabolic syndrome (Zhang et al., 2016). The rs10754558 C>G variant, located in the 3' untranslated region (3'UTR) and affects NLRP3 mRNA stability by interfering with microRNA (miR)-223 binding (Hitomi et al., 2009). The *NLRP3* rs10754558 C>G variant has been associated with susceptibility to HIV -1 infection in Brazilian population, suggesting a potential role of NLRP3 inflammasome in the pathogenesis of HIV-1 (Pontillo et al., 2010).

The *NLRP3* rs10754558 C>G and rs10157379 T>C were evaluated in Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) (Maes et al., 2022) and the results showed that the CT genotype of rs10157379, increasing age, and male sex were positively associated with severe acute respiratory syndrome (SARS) and critical illness severity; moreover, the GG genotype of the rs10754558 variant showed association with increased sickness symptoms complex (SSC) levels while the CC and CG genotypes showed a protective effect mediated by SSC (Maes et al., 2022). To our knowledge, the *NLRP3* rs10157379 T>C variant has not been previously evaluated for its role in HIV-1 infection. Thus, this study aimed to investigate the association between the *NLRP3* rs10157379 T>C and rs10754558 C>G variants and the HIV-1 infection.

Methods

This study was approved by the Institutional Research Ethics Committee of the State University of Londrina (Paraná, Brazil) (CAAE n. 73547417.0.0000.5231) and conducted in accordance with the ethical standards outlined in the Declaration of Helsinki. All participants provided written informed consent for study participation and sample collection

Study Population

This case-control study enrolled 78 adults diagnosed with HIV-1 who were undergoing cARV for at least five years at the Specialized Outpatient Clinic of the University Hospital of Londrina, a regional reference center for HIV-1 diagnosis and treatment in southern Brazil. The cARV regimen included nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs), non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs), protease inhibitors (PIs), and integrase inhibitors (INIs) according to Brazilian guidelines (Brazil, 2018). Some patients were not receiving NRTIs due to adverse effects or therapeutic failure. The control group included 147 healthy individuals from previous studies conducted by our research group, all of whom also provided written informed consent.

Exclusion Criteria

Exclusion criteria included participants with: (a) inflammatory or infectious diseases at the time of study inclusion, including autoimmune diseases and acute or chronic bacterial or viral infections; (b) chronic use of corticosteroids or immunosuppressive drugs; (c) chronic kidney disease, chronic liver disease, neurodegenerative diseases, or cancer; (d) established atherosclerotic disease, such as stroke, acute myocardial infarction, or peripheral arterial disease; (e) recent surgical procedures (immediate postoperative period); and (f) history of significant trauma within the last 30 days.

Genotyping

Genomic DNA was extracted from peripheral mononuclear cells using ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) as an anticoagulant. The *NLRP3* rs10157379 T>C and rs10754558 C>G genetic variants were genotyped using qualitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) with the TaqMan™ SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Fluorescence levels of the qPCR products were evaluated using the QuantStudio™ Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Statistical Analysis

Categorical variables were expressed as absolute numbers (n) and percentages (%) and compared using the chi-square test (χ^2) or Fisher's exact test, when appropriate. Continuous variables were expressed as median with interquartile range (IQR) and analyzed using the Mann-Whitney test. Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was assessed for the observed genotype frequencies of the *NLRP3* rs10157379 T>C and rs10754558 C>G variants using an online HWE calculator (<https://www.sebc.me/bioblog/labs/hwe-calculator>). The association of genetic variants with study variables was assessed using codominant, recessive, dominant, and overdominant genetic models. In addition to univariate analysis, the association with variables that presented $p < 0.1$ in the ANOVA test between groups between cIMT < 0.9 mm and ≥ 0.9 mm was evaluated using three different automatic binary logistic regression analysis models (stepwise) controlled for covariates that could confound the association of interest. Odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CIs) were determined, and p-values < 0.05 were considered statistically significant. Statistical analysis was performed using SPSS for Windows, version 24.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results

The study included 78 patients infected with HIV-1 and 147 healthy controls (**Table 1**). The patients were older than controls ($p=0.028$), 39 (50.0%) were female (OR: 1.10; 95% CI: 0.63-1.90, $p=0.734$), and 41 (52.6%) were Non-Caucasians (OR: 1.96; 95%CI: 1.12-3.43, $p=0.017$). Regarding the HIV-1 infection, 17 (21.8%) had aids. As the inclusion criteria, all the patients were using cARV: 51 (67.1%) were using INRT, 21 (27.6%) were using INNTR, 35 (46.1%) were using IP, and 7 (9.2%) were using INI. The analysis confirmed that both variants were in Hardy-Weinberg equilibrium among controls ($p > 0.05$), indicating that the control population was genetically stable and that no significant deviations due to selection, mutation, or population stratification were detected.

The frequency of the *NLRP3* T>C (rs10157379) and C>G (rs1075455) genetic variants, evaluated in different genetic models, are shown in **Table 2**. The analysis indicated that the control population was genetically stable and that no significant deviations due to selection, mutation, or population stratification were detected.

Table 1 Baseline characteristics of the patients infected with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and controls

Characteristic		Control n=147	HIV-1 patients n=78	OR (95% CI)	p value
Age (year)		47 (43-54)	52 (45-56)		0.028
Sex	Male	77 (52.4)	39 (50.0)	1.10 (0.63-1.90)	0.734
	Female	70 (47.6)	39 (50.0)		
Ethnicity	Caucasian	94 (63.9)	37 (47.4)	1.96 (1.12-3.43)	0.017
	Non-Caucasian	53 (36.1)	41 (52.6)		
Smoking	No	123 (84.2)	63 (80.8)	1.27 (0.62-2.61)	0.509
	Yes	23 (15.8)	15 (19.2)		

HIV-1: human immunodeficiency virus type 1; OR: odds ratio; CI: confidence interval. Categorical variables were expressed as absolute number (n) and percentage (%) and evaluated by the chi-square test (χ^2). Continuous variables were expressed as median and 25-75% interquartile range (IQR) and were evaluated by the Mann-Whitney test.

Table 2 Frequency of the *NLRP3* T>C (rs10157379) and C>G (rs1075455) genetic variants, evaluated in different genetic models, in patients with HIV-1 infection and healthy controls

		Control		HIV-1 patient		OR (95% CI)	p value
		n (146)	%	n (78)	%		
<i>NLRP3</i> rs10157379							
Codominant	TT	56	38.1	28	35.9		Reference
	TC	60	40.8	31	39.7	1.02 (0.53-1.98)	0.932
	CC	31	21.1	19	24.4	1.14 (0.53-2.45)	0.733
Dominant	TC+C	91	61.9	50	64.1		Reference
	C						
Recessive	TT	56	38.1	28	35.9	0.93 (0.51-1.69)	0.826
	TT+T	116	78.9	59	75.6		Reference
	C						
Overdominant	CC	31	21.1	19	24.4	1.12 (0.56-2.24)	0.736
	CC+T	87	59.2	47	60.3		Reference
	T						
	TC	60	40.8	31	39.7	0.98 (0.54-1.76)	0.946
<i>NLRP3</i> rs10754558							
Codominant	CC	60	40.8	39	50.0		Reference
	CG	63	42.9	30	38.5	0.71 (0.37-1.33)	0.290
	GG	24	16.3	9	11.5	0.62 (0.25-1.54)	0.309
Dominant	CG+G	87	59.2	39	50.0		Reference
	G						
Recessive	CC	60	40.8	39	50.0	1.45 (0.80-2.61)	0.216
	CC+C	123	83.7	69	88.5		Reference
	G						
Overdominant	GG	24	16.3	9	11.5	0.74 (0.31-1.73)	0.493
	CC+G	84	57.1	48	61.5		Reference
	G						
	CG	63	42.9	30	38.5	0.80 (0.44-1.44)	0.463

HIV-1: human immunodeficiency virus 1; OR: odds ratio; CI: confidence interval

The categorical variables were expressed as number (n) and percentage (%). Data were controlled by age, sex, and ethnicity.

Discussion

This study did not find association between the *NLRP3* rs10157379 T>C and rs10754558 C>G genetic variants and HIV-1 infection. Prior research in Brazilian populations suggested that the *NLRP3* rs10754558 G allele might offer protection against HIV-1 infection (Pontillo et al., 2010; 2012). However, our findings did not support these previous reports, underscoring the complexity of host genetic contributions to HIV-1 infection.

The *NLRP3* rs10157379 T>C single nucleotide variant (SNV) could be implicated in gene regulatory mechanisms that may influence NLRP3 inflammasome activation. According to ENSEMBL database phenotype data (Cunningham et al, 2022), this variant is located within a regulatory region associated with NLRP3, suggesting a potential role in modulating its transcriptional activity. Additionally, RegulomeDB predictions (Boyle et al, 2012) indicate that rs10157379 variant may alter transcription factor binding sites, possibly affecting enhancer activity or chromatin accessibility in immune cells, particularly monocytes and macrophages, which are primary effectors of inflammasome activation.

Mechanistically, genetic variants in the 3'UTR or promoter regions can modify the binding affinity of transcription factors, microRNAs (miRNAs), or RNA-binding proteins (RBPs), ultimately altering mRNA stability and gene expression levels. Studies have demonstrated that NLRP3 expression is tightly regulated at both transcriptional and post-transcriptional levels, with specific genetic variants modulating its responsiveness to inflammatory stimuli such as IL-1 β , TNF- α , and pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) (Zhou et al., 2016). Furthermore, genome-wide association studies (GWAS) have linked rs10157379 variant to fibrinogen concentrations, an acute-phase protein regulated by inflammatory pathways, reinforcing the hypothesis that this SNV may influence systemic inflammation and vascular pathology (de Vries et al, 2016).

The implications of the *NLRP3* rs10157379 T>C in HIV-1-associated atherosclerosis warrant further investigation, as chronic immune activation and endothelial dysfunction are key drivers of cardiovascular complications in HIV-1-infected individuals. Given that inflammasome activation contributes to vascular inflammation and plaque instability, alterations in NLRP3 expression mediated by rs10157379 may influence atherosclerotic progression in this population. Functional studies examining allele-specific transcription factor binding and NLRP3 mRNA stability in primary immune cells could provide mechanistic

insights into how genetic variants modulate innate immune responses in inflammatory and infectious diseases.

The *NLRP3* rs10754558 G allele has been associated with enhanced mRNA stability due to its localization within the miR-223 binding region (Hitomi et al., 2009). This gain-of-function may increase NLRP3 synthesis and the availability of anti-HIV-1 receptors, thereby promoting a more effective early immune response. However, it remains unclear whether NLRP3 functions as an HIV-1 receptor or as part of an intracellular antiviral pathway. Further functional studies are necessary to elucidate the NLRP3/HIV-1 interaction (Pontillo et al., 2012).

An important role of the NLRP3 has been revealed in infectious diseases, including HIV-1 infection. While some results suggest that the *NLRP3* rs10754558 C>G variant, which leads to increased rates of inflammasome activation and increased release of IL-1 β and/or IL-18, has been associated with protection against HIV-1 infection (Pontillo et al., 2010; Pontillo et al., 2012), other studies suggest that, once the pathogen has gained entry into the host and infection has been established, inflammasome activation may be detrimental to the host due to inflammation-mediated cell loss and tissue damage, suggesting that the genetic effect could change depending on the phase of the immune response (Souza de Lima et al., 2016; Ravimohan et al., 2018). Therefore, in HIV-1 infection, the NLRP3 inflammasome appears to have a dual role. On one hand, it may help control infection by inhibiting viral entry and preventing intracellular accumulation of viral nucleocapsid (Ekabe et al., 2021). The NLRP3 protein has been shown to suppress HIV-1 infection through interactions with the purinergic receptor P2Y2, which regulates F-actin remodeling required for viral entry (Paoletti et al., 2019). On the other hand, sustained inflammasome activity contributes to CD4⁺ T cell depletion, cardiovascular disease, neurocognitive impairment, and chronic HIV-1 infection. It mediates caspase-1 activation and pyroptosis, leading to extensive CD4⁺ T cell loss (Galloway et al., 2015). This depletion weakens immune defenses, increasing susceptibility to opportunistic infections and malignancies (Deeks et al., 2015). Additionally, elevated NLRP3 inflammasome components and cytokines such as caspase-1, IL-1 β , and IL-18 contribute to foam cell formation, heightening cardiovascular risk in HIV-1 patients (Alam et al., 2023).

Our findings emphasize the need for comprehensive investigations that consider not only genetic variation but also broader immunological and environmental contexts. Further research should explore additional *NLRP3* variants and functional assays assessing inflammasome activity in HIV-1-infected individuals to provide deeper insights into the role of NLRP3 in HIV-1 pathogenesis.

The primary strength of this study lies in its rigorous genotyping methodology and inclusion of well-characterized patient and control groups. However, the relatively small sample size and single-center study design may limit the generalizability of our findings. Larger, multi-center studies with diverse populations are necessary to validate these results and further elucidate the genetic determinants of HIV-1 susceptibility. However, the present study was the first to evaluate the *NLRP3* rs10157379 T>C in HIV-1 infection.

Conclusion

This study did not demonstrate association between the *NLRP3* rs10157379 T>C and rs10754558 (C>G) variants and HIV-1 infection. While the NLRP3 inflammasome plays a crucial role in the innate immune response, these specific genetic variants do not appear to significantly impact HIV-1 susceptibility. Future research should explore additional *NLRP3* variants and their interactions with other genetic and environmental factors to better understand the complex mechanisms underlying HIV-1 infection susceptibility.

References

- Alam MA, Caocci M, Ren M, Chen Z, Liu F, Khatun MS, Kolls JK, Qin X, Burdo TH. Deficiency of Caspase-1 Attenuates HIV-1-Associated Atherogenesis in Mice. *Int J Mol Sci.* 2023; 24(16):12871. doi: 10.3390/ijms241612871.
- Appay V, Sauce D. Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. *J Pathol.* 2008; 214:231–241.
- Boyle AP, Hong EL, Hariharan M, et al. Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB. *Genome Res.* 2012;22(9):1790-1797. doi:10.1101/gr.137323.112
- Brazil. Ministry of Health. Clinical Protocol and Therapeutic Guidelines for Management of HIV Infection in Adults. Brasília. 2018.
- Cunningham F, Allen J, Allen J, et al. Ensembl 2022. *Nucleic Acids Res.* 2022;50(D1):D988-D995. doi:10.1093/nar/gkab1049

Deeks SG, Overbaugh J, Phillips A, Buchbinder S. HIV infection. *Nat Rev Dis Primers*. 2015; 1:15035. doi: 10.1038/nrdp.2015.35.

Deng Q, Geng Y, Zhao L, Li R, Zhang Z, Li K, Liang R, Shao X, Huang M, Zuo D, Wu Y, Ma Q. NLRP3 inflammasomes in macrophages drive colorectal cancer metastasis to the liver. *Cancer Lett*. 2019; 442:21-30. doi: 10.1016/j.canlet.2018.10.030.

de Vries PS, Chasman DI, Sabater-Lleal M, et al. A meta-analysis of 120 246 individuals identifies 18 new loci for fibrinogen concentration. *Hum Mol Genet*. 2016; 25(2):358-70. doi: 10.1093/hmg/ddv454.

Eisenbarth SC, Colegio OR, O'Connor W, et al. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature*. 2008; 453:1122–1126.

Ekabe CJ, Clinton NA, Kehbila J, Franck NC. The Role of Inflammasome Activation in Early HIV Infection. *J Immunol Res*. 2021; 2021:1487287. doi: 10.1155/2021/1487287.

Fusco R, Siracusa R, Genovese T, Cuzzocrea S, Di Paola R. Focus on the Role of NLRP3 Inflammasome in Diseases. *Int J Mol Sci*. 2020; 21(12):4223. doi: 10.3390/ijms21124223

Galloway NL, Doitsh G, Monroe KM, Yang Z, Muñoz-Arias I, Levy DN, Greene WC. Cell-to-Cell Transmission of HIV-1 Is Required to Trigger Pyroptotic Death of Lymphoid-Tissue-Derived CD4 T Cells. *Cell Rep*. 2015; 12(10):1555-1563. doi: 10.1016/j.celrep.2015.08.011.

Gonzalez-Pacheco H, Vargas-Alarcon G, Angeles-Martinez J, Martinez-Sanchez C, Perez-Mendez O, Herrera-Maya G, Martinez-Rios MA, Peña-Duque MA, Posadas-Romero C, Fragoso JM. The NLRP3 and CASP1 gene polymorphisms are associated with developing of acute coronary syndrome: a case-control study. *Immunol Res*. 2017; 65(4):862-868. doi: 10.1007/s12026-017-8924-0.

Hitomi Y, Ebisawa M, Tomikawa M, Imai T, Komata T, Hirota T, Harada M, Sakashita M, Suzuki Y, Shimojo N, Kohno Y, Fujita K, Miyatake A, Doi S, Enomoto T, Taniguchi M, Higashi N, Nakamura Y, Tamari M. Associations of functional NLRP3 polymorphisms with

susceptibility to food-induced anaphylaxis and aspirin-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2009; 124(4):779–785. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.07.044>

Maes M, Tedesco Junior WLD, Lozovoy MAB, Mori MTE, Danelli T, Almeida ERD, Tejo AM, Tano ZN, Reiche EMV, Simão ANC. In COVID-19, NLRP3 inflammasome genetic variants are associated with critical disease and these effects are partly mediated by the sickness symptom complex: a nomothetic network approach. *Mol Psychiatry.* 2022; 27(4):1945-1955. doi: 10.1038/s41380-021-01431-4.

Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol.* 2009; 27:229–265

Paoletti, A., A. Allouch, M. Caillet, H. Saïdi, F. Subra, R. Nardacci, Q. Wu, Z. Muradova, L. Voisin, S. Q. Raza, et al. HIV-1 envelope overcomes NLRP3-mediated inhibition of F-actin polymerization for viral entry. *Cell Rep.* 2019; 28: 3381-3394.e7.

Pontillo A, Brandão LA, Guimarães RL, et al. A 3'UTR SNP in NLRP3 gene is associated with susceptibility to HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2010; 54:236–240.

Pontillo A, Oshiro TM, Girardelli M, Kamada AJ, Crovella S, Duarte AJ. polymorphisms in inflammasome' genes and susceptibility to HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2012; 59(2):121-5. doi: 10.1097/QAI.0b013e3182392ebe.

Ravimohan S, Nfanyana K, Tamuhla N, Tiemessen CT, Weissman D, Bisson GP. Common Variation in *NLRP3* Is Associated With Early Death and Elevated Inflammasome Biomarkers Among Advanced HIV/TB Co-infected Patients in Botswana. *Open Forum Infect Dis.* 2018; 5(5):ofy075. doi: 10.1093/ofid/ofy075.

Shrivastava G, León-Juárez M, García-Cordero J, Meza-Sánchez DE, Cedillo-Barrón L. Inflammasomes and its importance in viral infections. *Immunol Res.* 2016;64(5-6):1101-1117. doi: 10.1007/s12026-016-8873-z.

Souza de Lima D, Ogusku MM, Sadahiro A, Pontillo A. Inflammasome genetics contributes to the development and control of active pulmonary tuberculosis. *Infection, Genetics and Evolution*, 2016; 41, 240–244. doi:10.1016/j.meegid.2016.04.015

Wang S, Fang F, Jin WB, Wang X, Zheng XS. Investigation into the association between NLRP3 gene polymorphisms and susceptibility to type 2 diabetes mellitus. *Genet Mol Res*. 2015; 14 (4):17447–17452. <https://doi.org/10.4238/2015>.

Zhang L, Zhang D, Zheng Y, Hu Z, Zeng Y, Yue F. Association of NLRP3 gene single nucleotide polymorphisms with metabolic syndrome. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*. 2016; 33(4):530–534. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2016.04.024>

Zheng Q, Hua C, Liang Q, Cheng H. The NLRP3 inflammasome in viral infection (Review). *Mol Med Rep*. 2023;28(3):160. doi: 10.3892/mmr.2023.13047.

Zhou D, Wang X, Chen T, Wen W, Liu Y, Wu Y, Yuan Z. The NLRP3 rs10754558 Polymorphism Is Associated with the Occurrence and Prognosis of Coronary Artery Disease in the Chinese Han Population. *Biomed Res Int*. 2016; 2016:3185397. doi: 10.1155/2016/3185397.

Zhou Y, He C, Yang Y, et al. The association between NLRP3 gene polymorphisms and susceptibility to coronary artery disease in a Chinese Han population. *J Cardiovasc Transl Res*. 2016; 9(6):460-468. doi:10.1007/s12265-016-9701-x

Zhu Z, Yan J, Geng C, Wang D, Li C, Feng S, Wang H. A Polymorphism Within the 3'UTR of NLRP3 is Associated with Susceptibility for Ischemic Stroke in Chinese Population. *Cell Mol Neurobiol*. 2016; 36(6):981-988. doi: 10.1007/s10571-015-0288-1.

5.2 ARTIGO 2

Association of *NLRP3* rs10157379 and rs10754558 genetic variants with subclinical atherosclerosis, inflammatory, and metabolic biomarkers in HIV-1 infection

Philippe Quagliato Bellinati^{1,2,3}, Marcell Alysson Batisti Lozovoy^{1,4,5}, Tainah Mendes Ahrens^{1,4}, Paulo Fernando Gasparetto Junior⁶, Eduarda Santos^{1,4}; Daniel Nascimento⁴; Thiago Matias Alvarenga⁴, Luana Machado Sakamoto^{4,7} Daniel Felipe Piva dos Santos^{4,7}, Julia Fajardo^{4,7}, Guilherme Lerner Trigo^{4,7}, Pedro Luís Cândido de Sousa Cassela^{4,7}; Caio Hideki Cruz Martins^{4,7}, Andrea Name Colado Simão^{1,4,5}, Edna Maria Vissoci Reiche^{1,3,4}

¹ Postgraduate Program of Clinical and Laboratory Pathophysiology, Health Sciences Center, Londrina State University, Londrina, Paraná, Brazil;

² Infectious Diseases Unity, University Hospital, Londrina State University, Londrina, Paraná, Brazil;

³ Pontifical Catholic University of Paraná, Londrina Campus, School of Medicine, Londrina, Paraná, Brazil.

⁴ Laboratory of Research in Applied Immunology, Health Sciences Center, Londrina State University, Londrina, Paraná, Brazil;

⁵ Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology, Health Sciences Center, Londrina State University, Londrina, Paraná, Brazil;

⁶ Vascular Unity, University Hospital, Londrina State University, Londrina, Paraná, Brazil;

⁷ Graduate School of Medicine, Health Sciences Center, Londrina State University, Londrina, Paraná, Brazil.

Abstract

Background: Atherosclerosis is a significant comorbidity in patients with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) undergoing combined antiretroviral therapy (cART). The NLRP3 inflammasome, along with inflammatory and metabolic markers, has been implicated in atherosclerosis; however, its specific role in subclinical HIV-1-associated atherosclerosis remains unclear. This study aimed to investigate the association between *NLRP3* rs10157379 T>C and rs10754558 C>G genetic variants, with the subclinical atherosclerosis, HIV-1 viral load, inflammatory, and metabolic biomarkers in individuals infected with HIV-1.

Methods: This study included 78 HIV-1-infected individuals on cARV. Carotid Doppler ultrasonography was performed to assess carotid intima-media thickness (cIMT), classifying patients as cIMT < 0.9 mm or \geq 0.9 mm. Demographic data, lifestyle factors, medical history, inflammatory and metabolic biomarkers, CD4⁺ T/CD8⁺ T lymphocyte counts, and plasma HIV-1 RNA levels were analyzed. The *NLRP3* rs10157379 T>C and rs10754558 C>G variants were genotyped using real-time polymerase chain reaction (qPCR).

Results: Among the participants, 39 (50.0%) were female, and 37 (47.4%) were Caucasian. The cIMT \geq 0.9 mm was observed in 34 patients (43.6%). In the univariate analysis, male sex (p=0.006), non-Caucasian ethnicity (p = 0.001), use of nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) (p < 0.001), protease inhibitors (PIs) (p=0.002), antihypertensive drugs (p=0.018), lipid-lowering drugs (p=0.009), smoking (p=0.043), sedentary lifestyle (p=0.012), metabolic syndrome (p=0.011), and CD4⁺ T cell count < 500 cells/mm³ (p=0.013) were associated with higher cIMT. Additionally, patients with cIMT \geq 0.9 mm were older (p=0.027), had increased levels of homocysteine (p=0.017), iron (p=0.049), IL-10 (p=0.039), and decreased HDL-cholesterol (p=0.039). However, in the multivariable regression model, none of these variables retained statistical significance, suggesting that they did not independently influence cIMT. The model explained 12.0% of the variance in atherosclerosis risk, though no independent predictors were identified. There was no significant association between the *NLRP3* variants and cIMT. However, patients homozygous for the G allele of *NLRP3* rs10754558 had a higher frequency of undetectable HIV-1 viral load than those carrying the CC + CG genotypes.

Conclusions: To our knowledge, this study was the first to evaluate the *NLRP3* rs10157379 T>C and rs10754558 C>G variants in the pathophysiology of subclinical HIV-1-associated atherosclerosis. Although the study found no independent association between inflammatory/metabolic markers and cIMT, the *NLRP3* rs10754558 G allele appears to influence viral suppression. Further research is necessary to clarify these findings and explore additional biomarkers for early atherosclerosis detection in HIV-1 patients.

Keywords: HIV-1 infection; Inflammasome; NLRP3; atherosclerosis; cIMT.

Introduction

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) remains a significant global health challenge, with approximately 36.9 million people living with HIV-1 infection. The advent of combined antiretroviral therapy (cART) has successfully suppressed plasma viremia and restored CD4⁺ T lymphocyte counts, improving the prognosis and life expectancy of HIV-1-infected individuals. However, despite effective viral suppression, persistent immune dysfunction, chronic inflammation, and coagulation abnormalities continue to contribute to non-AIDS-related morbidity and mortality (Deeks et al., 2015). (Deeks; Phillips, 2009; Guaraldi et al., 2011). Cardiovascular disease (CVD) has become one of the main causes of morbidity and mortality in people living with HIV/AIDS (PLWHA).

With increased survival, HIV-1 patients are at heightened risk for age-related comorbidities, including obesity, type 2 diabetes mellitus (T2DM), and cardiovascular disease (CVD), particularly atherosclerosis, a progressive condition affecting the arterial walls (Deeks and Phillips, 2009; Guaraldi et al., 2011). Studies indicate that HIV-1-infected patients experience accelerated biological aging, predisposing them to early-onset atherosclerosis and cardiovascular complications (D'Abramo et al., 2014). Compared to the general population, HIV-1 patients exhibit higher rates of atherosclerotic CVD, with an increased incidence of coronary heart disease, peripheral arterial disease, and subclinical cardiovascular damage, including increased carotid intima-media thickness (cIMT), coronary calcification, silent myocardial ischemia, and endothelial dysfunction (Sico et al., 2015; Currier et al., 2008; Hsue et al., 2012; Islam et al., 2012; Triant et al., 2007).

Inflammasomes, key components of the innate immune system, contribute to chronic inflammation in atherosclerosis. Among these, the NLRP3 inflammasome is one of particular interest. The NLRP3 inflammasome is a multimeric cytosolic protein complex which assembles in response to cellular perturbations. It can be activated by pattern-recognition receptors (PRRs), including toll-like receptor 4 (TLR4), which are stimulated by invading pathogens, dead cells, or environmental irritants, called either pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) or damage-associated molecular patterns (DAMPs), including reactive oxygen species (ROS), triglycerides, cholesterol crystals, oxLDL, and cigarette smoking (Duewell et al., 2010; Takeuchi; Akira, 2010; Guo et al., 2015; Mehta et al., 2020). Inflammasome activity in CVD is also modulated by cardiovascular risk factors, including hyperglycemia, obesity, and hyperuricemia (Li et al., 2014).

The NLRP3 activation leads to the activation of caspase-1, which promotes maturation and release of inflammatory IL-1 β and IL-18 cytokines, inflammatory cell death, and pyroptosis (Awad et al., 2018; Kearns et al., 2017; Guo et al., 2015; Duewell et al., 2010; Takeuchi; Akira, 2010). These inflammatory cytokines contribute to the development of systemic low-grade inflammation.

HIV-1 infection has been shown to potentiate NLRP3 inflammasome activation, exacerbating inflammation and increasing CVD risk (Kearns et al., 2017; Kearns et al., 2019). Aberrant NLRP3 activation has been linked to various inflammatory diseases, including atherosclerosis (Kelley et al., 2019; Duewell et al., 2010). Previous research suggests that inflammasome activation may have phase-dependent effects: while initial activation may enhance innate immune responses against HIV-1, chronic activation can contribute to inflammation-mediated tissue damage (Souza de Lima et al., 2016; Ravimohan et al., 2018). However, the specific roles of the *NLRP3* rs10157379 T>C and rs10754558 C>G variants in the pathogenesis of subclinical HIV-1-associated atherosclerosis, as measured by cIMT, remain unclear.

The *NLRP3* gene, located on chromosome 1q44, consists of nine exons and harbors numerous single-nucleotide variants (SNVs) that influence inflammasome activity (Villani et al., 2009). So far, about 60 SNPs in the *NLRP3* gene have been identified. Among them, the most common variants rs35829419, rs10754558, rs4612666, rs4925648, and rs10925019 (Zhang et al., 2011). The *NLRP3* rs10754558 variant, located in the 3'untranslated region (3'UTR), has been associated with acute coronary syndrome (Gonzalez-Pacheco et al. 2017), coronary artery disease (Zhou et al., 2016), insulin resistance in patients with T2DM (Wang et al., 2015), ischemic stroke (Zhu et al, 2016), and metabolic syndrome (Zhang et al., 2016). Additionally, this variant has been linked to protection against HIV-1 infection (Pontillo et al., 2010; Pontillo et al., 2012). Moreover, little is known about the role of *NLRP3* rs10157379 T>C and rs10754558 C>G variants in the pathogenesis of subclinical HIV-1-associated atherosclerosis measured by the cIMT. Therefore, this study aimed to investigate the association between the *NLRP3* rs10157379 T>C and rs10754558 C>G variants with the subclinical HIV-1-associated atherosclerosis, as well as with HIV-1 viral load, and inflammatory and metabolic biomarkers. By analyzing these factors, we seek to identify potential biomarkers for early detection and management of subclinical atherosclerosis in HIV-1-infected individuals.

Methods

This study was approved by the Institutional Research Ethics Committee of the State University of Londrina (Paraná, Brazil) (CAAE n. 73547417.0.0000.5231) and conducted in accordance with the ethical standards outlined in the Declaration of Helsinki. All participants provided written informed consent for study participation and sample collection. All data were anonymized to maintain confidentiality.

Study Design and Participants

This case-control study included 78 adults diagnosed with HIV-1 infection and receiving combined antiretroviral therapy (cARV) for, at least, five years, regardless of the specific antiretroviral regimen. Participants were recruited consecutively from the Specialized Outpatient Clinic at the University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil, a regional referral center for HIV-1 diagnosis and treatment.

Inclusion criteria were: a) confirmed diagnosis of HIV-1 infection; b) minimum of five years on cARV; c) use of nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs), non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs), protease inhibitors (PIs), or integrase inhibitors (INIs) as per Brazilian guidelines (Brazil, 2018); d) patients who had discontinued NRTI-based therapy due to adverse effects or therapeutic failure were also included. Participants were excluded if they presented with: a) acute or chronic inflammatory/infectious diseases at the time of study enrollment (including autoimmune diseases); b) chronic use of corticosteroids or immunosuppressive therapy; c) chronic kidney disease, chronic liver disease, neurodegenerative disorders, or active cancer; d) established atherosclerotic disease, including stroke, acute myocardial infarction, or peripheral arterial disease; and e) recent surgery or trauma within 30 days. Each participant provided written informed consent,

Data Collection and Clinical Assessment

Demographic information, lifestyle factors, and medical history were obtained through structured interviews and clinical evaluations. Ethnicity was classified based on self-reported skin color as Caucasian or non-Caucasian. Body mass index (BMI) was calculated as weight (kg) divided by height squared (m²). Waist circumference (WC) was measured using a flexible tape at the midpoint between the lower rib margin and iliac crest. Systolic blood pressure (SBP), and diastolic blood pressure (DBP) were measured twice using an automated sphygmomanometer, with the average used for analysis. Systemic arterial hypertension (SAH)

was defined as SBP \geq 140 mmHg and/or DBP \geq 90 mmHg or current use of antihypertensive medication (James et al., 2014). T2DM was defined as fasting glucose \geq 126 mg/dL, glycated hemoglobin (HbA1c) \geq 6.5%, or use of hypoglycemic medication (American Diabetes Association, 2014). Dyslipidemia was diagnosed based on total cholesterol (TC) \geq 200 mg/dL, low-density cholesterol lipoprotein (LDL-C) \geq 130 mg/dL, or high-density cholesterol lipoprotein (HDL-C) $<$ 40 mg/dL (NCEP, 2002).

Inflammatory and Metabolic Biomarkers

Venous blood samples were collected in vacuum tubes containing ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and sodium fluoride anticoagulants. After centrifugation at 2500 rpm for 10 minutes, plasma and serum aliquots were stored at -80°C for later analysis. Inflammatory biomarkers included plasma levels of IL-6, IL-10, and TNF- α that were measured using a multiplex microsphere immunoassay (Luminex MAGPIX[®], Luminex Corp., USA); white blood cells and platelet counts were determined using an automated hematology analyzer; erythrocyte sedimentation rate (ESR) was measured using an automated method (Ves-Matic[®] CUBE 30, DIESSE, Italy); hsCRP was quantified by turbidimetry (Abbott C8000[®], Abbott Laboratory, USA); homocysteine and ferritin levels were measured using a chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA, Architect i2000, Abbott Laboratory, USA).

Genotyping of NLRP3 Variants

Genomic DNA was extracted from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) using EDTA-anticoagulated blood samples. The *NLRP3* rs10157379 T>C and rs10754558 C>G SNVs were analyzed using real-time polymerase chain reaction (qPCR) with the TaqMan[™] SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Each reaction included TaqMan[™] MGB probes labeled with VIC[™] or FAM[™] reporter dyes and was run using the QuantStudio[™] Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Negative control samples were included in all runs.

HIV-1 Infection Biomarkers

CD4⁺ T cell counts were assessed using flow cytometry (BD FACSCalibur[™], BD Biosciences, USA) and categorized as $<$ 500 cell/mL (without CD4T cell recovery) *versus* \geq 500 cells/mL (recovery) (Bandera et al., 2018; Lewden et al., 2007). HIV-1 viral load was quantified using qPCR (Abbott Real Time HIV-1, Abbott Molecular Inc., USA), with a detection limit of

50 copies/mL. Categorization of HIV-1 viral load was <50 copies/mL (undetectable) *versus* \geq 50 copies/mL (detectable).

Carotid intima-media thickness measurement

Carotid ultrasonography with Doppler imaging was performed using a *Siemens Acuson X300 Color Doppler* machine (Siemens, Germany). All evaluations were conducted by a single trained vascular physician to ensure consistent cIMT measurement: The mean of three measurements from both the left and right internal carotid arteries was calculated and recorded as the final cIMT value. The categorization of cIMT <0.9 mm (normal) and \geq 0.9 mm (increased) (Grunfeld et al., 2008; Williams et al., 2018).

Statistical analysis

Categorical variables were expressed as absolute numbers (n) and percentages (%), analyzed using the chi-square test (χ^2) or Fisher's exact test. Continuous variables were expressed as median and interquartile range (IQR), compared using the Mann-Whitney U test. Genotypic associations were evaluated using codominant, dominant, recessive, and overdominant genetic models. Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was assessed for the observed genotype frequencies of the *NLRP3* rs10157379 T>C and rs10754558 C>G variants using an online HWE calculator (<https://www.sebc.me/bioblog/labs/hwe-calculator>). The expected genotype frequencies were compared to the observed frequencies in the control group using the chi-square test. Logistic regression analysis was performed to assess independent associations with cIMT, adjusting for age, sex, ethnicity, smoking status, HIV-1 viral load, CD4⁺ T cell count, and cARV regimen. Odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (95% CI) were reported. All statistical analyses were conducted using SPSS v24.0 (IBM, Chicago, IL, USA), with p-values <0.05 considered statistically significant.

Results

Characteristics of the Study Population.

Out of 78 HIV-1-infected patients, 39 (50.0%) were males and 39 (50.0%) were females with a median age of 52 years (45-56); 41 (52.6%) were non-Caucasians, and 15 (19.2%) were smokers. Regarding the HIV-1 infection, 17 (21.8%) had aids. As the inclusion criteria, all the

patients were using cARV. Of them, 51 (67.1%) were on INRT, 21 (27.6%) were on INNTR, 35 (46.1%) were on IP, and 7 (9.2%) were on INI based regimens.

Carotid Intima-Media Thickness, Inflammatory, and Metabolic Markers.

Among the 78 HIV-1 patients, 44 (56.4%) presented normal cIMT (< 0.9 mm) and 34 (43.6%) presented increased cIMT (\geq 0.9 mm). The baseline categorical variables, such as demographic, epidemiological, and cARV regimen, distributed according to the cIMT are shown in **Table 1**. The univariate model revealed an association between increased cIMT (\geq 0.9 mm) and male sex ($p=0.006$), non-Caucasians ($p=0.001$), use of therapies such as INTR ($p=0.001$), IP ($p=0.002$), anti-hypertensive drugs ($p=0.018$), lipid lowering drugs ($p=0.009$), smoking ($p=0.043$), sedentary lifestyle ($p=0.012$), presence of metabolic syndrome ($p=0.011$), and CD4⁺ T cell count < 500 cells/mm³ ($p=0.013$).

The baseline continues variables, such as age, BMI, SBP, DBP, inflammatory, and metabolic markers, distributed according to the cIMT are shown in **Table 2**. Compared with the patients with cIMT <0.9 mm, patients with cIMT \geq 0.9 mm were older ($p=0.027$), showed higher levels of homocysteine ($p=0.017$), iron ($p=0.049$), IL-10 ($p=0.039$), and lower HDL-C ($p=0.039$). Further, these significant variables were analyzed by multivariable logistic regression. The variables entered on step 1 were age, BMI, INTR, INNTR, lipodystrophy, hypoglycemic drugs, smoking, and iron. All the variables lost significance in the regression model, indicating that they do not affect the outcome cIMT independently. The outcome without the model was explained by 70.6%, but with this model it was explained by 82.4%. This result indicates that these variables explained, approximately, 12.0% of the outcome of atherosclerotic disease, but not independently (data not shown).

Table 1 Baseline categorical variables distributed according to the cIMT in patients with HIV-1 infection

		cIMT				OR (95% CI)	p value
		<0.9 mm		≥0.9 mm			
		n	%	n	%		
Sex	Male	16	36.4	23	67.6	0.27 (0.10-0.70)	0.006
	Female	28	63.6	11	32.4		
Ethnicity	C	28	63.6	9	26.5	4.86 (1.82-12.93)	0.001
	NC	16	36.4	25	73.5		
NTRI	No	24	54.5	3	8.8	12.40 (3.29-46.66)	<0.001
	Yes	20	45.4	31	91.2		
NNTRI	No	35	79.5	22	64.7	2.12 (0.76-5.85)	0.143
	Yes	9	20.5	12	35.3		
PI	No	31	70.5	12	35.3	4.37 (1.68-11.37)	0.002
	Yes	13	29.5	22	64.7		
INI	No	41	93.2	30	88.2	1.82 (0.37-8.75)	0.448
	Yes	3	6.8	4	11.8		
SPB	No	37	84.1	24	70.6	2.20 (0.73-6.57)	0.152
	Yes	7	15.9	10	29.4		
T2DM	No	38	86.4	28	82.4	1.35 (0.39-4.65)	0.626
	Yes	6	13.6	6	17.6		
Dyslipidemia	No	31	70.5	21	61.8	1.47 (0.57-3.80)	0.419
	Yes	13	29.5	13	38.2		
Lipodystrophy	No	43	97.7	30	88.2	5.73 (0.61-53.87)	0.090
	Yes	1	2.3	4	11.8		
MetS	No	40	90.9	23	67.6	4.78 (1.36-16.76)	0.011
	Yes	4	9.1	11	32.4		
Smoking	No	39	88.6	24	70.6	3.25 (0.99-10.66)	0.043
	Yes	5	11.4	10	29.4		
Alcoholism	No	40	90.9	29	85.3	1.72 (0.42-6.98)	0.337
	Yes	4	9.1	5	14.7		
Sedentary lifestyle	No	16	36.4	4	11.8	4.28 (1.27-14.38)	0.012
	Yes	28	63.6	30	88.2		

Antihypertensive	No	43	97.7	28	82.4	9.21 (1.05-80.68)	0.018
	Yes	1	2.3	6	17.6		
Hypoglycemic	No	43	97.7	31	91.2	4.16 (0.41-41.91)	0.193
	Yes	1	2.3	3	8.8		
Lipid-lowering	No	41	93.2	24	70.6	5.69 (1.42-22.75)	0.009
	Yes	3	6.8	10	29.4		
Anticoagulant	No	44	100.0	33	97.1	0.42 (0.33-0.55)	0.436
	Yes	0	0.0	1	2.9		
HIV-1 viral load (copies/mL)	≥50	4	9.1	13	38.2	0.16 (0.04-0.55)	0.002
	<50	40	90.9	21	61.8		
CD4 ⁺ T count (cell/mm ³)	≤500	35	79.5	18	52.9	3.45 (1.27-9.35)	0.013
	>500	9	20.5	16	47.1		

Categorical variables were expressed and absolute number (n) and percentage (%). cIMT: carotid intima-media thickness; HIV-1: human immunodeficiency virus type 1; OR: odds ratio; CI: confidence interval; NRTI: nucleoside reverse transcriptase inhibitors; NNRTI: non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors; PI: protease inhibitors; INI: integrase inhibitors; SBP: systemic blood pressure; T2DM: type 2 diabetes mellitus; MetS: metabolic syndrome. Data were controlled by age, sex, ethnicity and smoking.

Table 2 Baseline continuous variables distributed according to the carotid intima-media thickness (cIMT) in patients with HIV-1 infection

	Carotid intima-media thickness (cIMT)						p value
	< 0.9 mm			≥ 0.9 mm			
	Median	P25	P75	Median	P25	P75	
Age (year)	47	41	56	53	49	56	0.027
BMI (kg/m ²)	25	22	27	24	22	27	0.688
SBP (mmHg)	115	110	130	120	110	130	0.319
DBP (mmHg)	70	60	80	80	70	80	0.240
WC (cm)	87	79	100	88	78	100	0.831
WBC (cells/mm ³)	5170	4400	6200	5325	4420	6530	0.916
Platelets (cells/mm ³)	232	185	264	207	182	263	0.476
ESR (mm/h)	14	9	23	22	10	46	0.202
Homocysteine (μmol/L)	10	6	12	11	9	15	0.017
hsCRP (mg/L)	2	1	8	2	1	7	0.972
Ferritin (ng/mL)	81	52	185	163	88	263	0.140
Glucose (mg/dL)	93	88	100	102	90	110	0.057
Iron (μg/dL)	87	60	96	98	71	122	0.049
TC (mg/dL)	179	156	201	178	147	202	0.686
HDL-C (mg/dL)	58	46	79	45	42	56	0.039
LDL-C (mg/dL)	100	77	131	100	82	121	0.884
TG (mg/dL)	119	76	158	144	102	202	0.137
CD4 ⁺ T cell (μL)	532	356	733	512	386	706	0.952
CD8 ⁺ T cell (μL)	870	684	1251	871	621	1053	0.260
IL-6 (pg/mL)	3.313	1.822	5.849	5.849	1.822	13.108	0.146
IL-10 (pg/mL)	3.662	1.853	7.659	7.659	4.248	13.105	0.039
TNF-α (pg/mL)	2.186	1.291	4.266	2.483	1.291	6.637	0.346
Adiponectin (mg/L)	12,6	8,7	16,2	8,9	4,5	12,5	0.064

Continuous variables were expressed as median and interquartile range (P25 and P75). cIMT: carotid intima-media thickness; HIV-1: human immunodeficiency virus type 1; BMI: body mass index; SBP: systemic blood pressure; DBP: diastolic blood pressure; WC: waist circumference; WBC: White blood cells; ESR: erythrocyte sedimentation rate; hsCRP: high

sensitivity C-reactive protein; TC: total cholesterol; HDL-C: high-density lipoprotein cholesterol; LDL-low-density lipoprotein cholesterol; IL: interleukin; TNF: tumor necrosis factor. Data were controlled by age, sex, ethnicity, and smoking.

3.3 *NLRP3* rs10157379 T>C and rs10754558 C>G, Carotid Intima-Media Thickness, Inflammatory, and Metabolic biomarkers

The association between the *NLRP3* rs10157379 T>C and rs10754558 C>G genetic variants with the cIMT of HIV-1 patients was evaluated in different genetic models (**Table 3**). The distribution of the frequencies of the genetic variants was in HWE in study groups ($p > 0.05$). Both genetic variants were not associated with the cIMT ≥ 0.9 mm. These results were controlled by sex, age, ethnicity, smoking, the use of INTR and IP regimens, HIV-1 viral load, and CD4⁺ T cell count. Circulating levels of the inflammatory and metabolic markers were not associated with the *NLRP3* gene variants (data not shown).

3.4 *NLRP3* rs10157379 T>C and rs10754558 C>G and HIV-1 Infection Biomarkers

The HIV-1 viral load and the CD4⁺ T cell count were evaluated according to the *NLRP3* genetic variants in different genetic models. Only the recessive genetic model of the *NLRP3* rs10754558 C>G was associated with the HIV-1 viral load (**Table 4**). Patients carrying the homozygous genotype for the variant G allele (GG genotype) showed higher frequency of undetectable viral load in plasma samples than those carrying the CC + CG genotypes (75.4% versus 88.8%, OR 0.16, 95%CI: 0.08-0.20, $p=0.003$).

Table 3 Association between the *NLRP3* rs10157379 T>C and rs10754558 C>G genetic variants with the carotid intima-media thickness (cIMT) of the patients with HIV-1

		cIMT				Odds ratio	
		<0.9 mm		≥0.9 mm			
		n	%	n	%		
<i>NLRP3</i> rs10157379 Codominant	TT	17	38.6	11	32.4		Reference
	TC	14	31.8	17	50.0	1.85 (0.53- 6.41)	0.328
	CC	13	29.5	6	17.6	0.75 (0.18- 3.15)	0.700
Dominant	TC+C	27	61.4	23	67.6		Reference
	TT	17	38.6	11	32.4	0.76 (0.25- 2.31)	0.634
Recessive	TC+T	31	70.5	28	82.4		Reference
	CC	13	29.5	6	17.6	0.55 (0.15- 2.02)	0.376
Overdominant	TT+C	30	68.2	17	50.0		Reference
	TC	14	31.8	17	50.0	2.06 (0.67- 6.33)	0.206
<i>NLRP3</i> rs10754558 Codominant	CC	23	52.3	16	47.1		Reference
	CG	15	34.1	15	44.1	1.07 (0.33- 3.41)	0.908
	GG	6	13.6	3	8.8	1.44 (0.25- 8.17)	0.680
Dominant	CG+G	21	47.7	18	52.9		Reference
	CC	23	52.3	16	47.1	2.83 (0.30- 2.51)	0.796
Recessive	CC+C	38	86.4	31	91.2		Reference
	GG	6	13.6	3	8.8	1.40 (0.26- 7.53)	0.693
Overdominant	CC+G	29	65.9	19	55.9		Reference
	CG	15	34.1	15	44.1	1.00 (0.33- 3.08)	0.989

cIMT: carotid intima-media thickness; HIV-1: human immunodeficiency virus type 1. Adjusted by sex, age, ethnicity; smoking; nucleoside reverse transcriptase inhibitor; protease inhibitor; HIV-1 viral load, and CD4⁺ T cell count.

Table 4 Association between the HIV-1 viral load and the *NLRP3* rs10754558 C>G variant in the recessive genetic model.

		<i>NLRP3</i> rs10754558 C>G				Odds ratio	p value
		CC+CG		GG			
		n	%	n	%		
HIV-1 viral load	≥ 50	17	24.6	0	0	Reference	
(copies/mL)	<50	52	75.4	9	100	0.16 (0.08 -0.20)	0.003

≥ 50 copies/mL: HIV-1 viral load detectable

< 50 copies/mL: HIV-1 viral load undetectable. Data were controlled by age, sex, ethnicity, and smoking.

Discussion

This study investigated the associations between *NLRP3* rs10157379 T>C and rs10754558 C>G SNVs with subclinical atherosclerosis, and inflammatory and metabolic biomarkers in HIV-1-infected patients on cART. Our primary finding was that 43.6% of HIV-1 patients exhibited pathological cIMT (≥ 0.9 mm), highlighting the high prevalence of subclinical atherosclerosis in this population. This finding aligned with previous reports demonstrating an increased risk of atherosclerosis in HIV-1 patients (Leite et al., 2020; Salmazo et al., 2018; Freiberg et al., 2013; Falcão et al., 2012; Friis-Møller et al., 2010). While short-term adverse effects of cART are generally well tolerated (Rachid; Schechter, 2008), long-term use has been associated with metabolic complications, including dyslipidemia, insulin resistance, and increased CVD risk (Valente et al., 2005). Even in patients with well-controlled viremia, atherosclerosis progression occurs more rapidly than in uninfected individuals (Hsue et al., 2012).

The cIMT is a well-established surrogate marker of atherosclerosis, with increases in cIMT serving as predictors of future cardiovascular events (Lee; Park, 2014). Prior studies have shown that up to 44.7% of HIV-1 patients exhibit pathological cIMT, with elevated IL-6 levels associated with increased atherosclerosis severity (D'Abramo et al., 2014).

Atherosclerotic CVD remains a leading cause of morbidity and mortality worldwide. HIV-1 infection, along with aging, traditional CVD risk factors, immune activation, and chronic inflammation, has been implicated in the pathogenesis of atherosclerosis in HIV-1-infected patients (Neuhaus et al., 2020; Hart et al., 2018; Hsue et al., 2006). While cART has improved life expectancy, it has also been associated with metabolic and cardiovascular complications, particularly with PI-based regimens (Hsue; Waters, 2018; Cerrato et al., 2015; Smith et al., 2010). The interplay of these factors accelerates atherosclerosis progression in HIV-1 individuals, increasing their risk of subclinical and overt CVD.

Patients with cIMT ≥ 0.9 mm were older and had higher levels of homocysteine, iron, IL-10, and lower HDL-C levels. Elevated homocysteine, iron, and IL-10 levels have also been previously linked to endothelial dysfunction and vascular damage, reinforcing their potential role in atherosclerosis development in HIV-1 patients (Vinchi et al., 2014). Oxidative stress also plays a critical role in atherosclerosis, as reactive oxygen species (ROS) drive low-density lipoprotein (LDL) oxidation, a key event in disease progression (Kita et al., 2001). Increased iron and glucose levels may further exacerbate ROS production, accelerating atherosclerosis (Vinchi et al., 2014; Ye et al., 2022; Yu et al., 2011).

The observed elevation of IL-10 levels in patients with increased cIMT (≥ 0.9 mm) may seem paradoxical given IL-10's well-documented anti-inflammatory properties. However, emerging evidence suggests that increased IL-10 levels in the context of HIV-1-associated atherosclerosis is likely to reflect a compensatory response to chronic inflammation rather than a protective mechanism. IL-10, a key immunoregulatory cytokine, is primarily secreted by monocytes, macrophages, and regulatory T cells (Tregs) to counteract excessive immune activation and suppress pro-inflammatory cytokines such as IL-6, TNF- α , and IL-1 β (Trøseid et al., 2012; Couper et al., 2008). In HIV-1-infected individuals, persistent immune activation, driven by viral replication, gut microbial translocation, and chronic cARV exposure, induces systemic inflammation and endothelial dysfunction, both of which are implicated in atherosclerosis pathogenesis (Tenorio et al., 2014; Hsue et al., 2012).

In univariate analysis of the present study, several factors were associated with higher cIMT, including male sex, non-Caucasian ethnicity, use of NRTIs and PIs, antihypertensive, and lipid-lowering drugs, as well as smoking, sedentary lifestyle, metabolic syndrome, and CD4⁺ T cell count <500 cells/mm³. Unexpectedly, all of these variables lost their statistical significance in the multivariable regression model, suggesting that none of these factors independently influence cIMT. Previous studies have reported independent associations between age, male sex, ethnicity, metabolic syndrome, smoking, and inflammation as risk

factors for atherosclerosis in both HIV-1-infected and uninfected individuals (Bellinati et al., 2020; Vinchi et al., 2014; Welsh et al., 2011; Ahluwalia et al., 2010). In this regard, there are several potential explanations for this unexpected finding, such as: a) the sample size limitations (with only 78 participants, the study may have been underpowered to detect independent associations after adjusting for multiple variables); b) unmeasured confounders (other factors such as diet, genetic background, physical activity levels, and family history of CVD were not accounted for and may have influenced the results); c) heterogeneity in cART regimens (variability in antiretroviral drug exposure and duration of therapy could have introduced confounding effects).

Role of NLRP3 genetic variants and Subclinical Atherosclerosis

To our knowledge, this is the first study to evaluate the association between the *NLRP3* rs10157379 T>C and rs10754558 C>G variants and subclinical HIV-1-associated atherosclerosis. Contrary to our hypothesis, no significant association was observed between these variants and cIMT. These results contrast with previous reports linking *NLRP3* variants to coronary artery disease and metabolic disorders (Opstad et al., 2022; Zhou et al., 2016; Gonzalez-Pacheco et al., 2017). The *NLRP3* rs10754558 C>G variant, located in the 3'UTR, is known to affect mRNA stability by interfering with microRNA-223 (miR-223) binding (Hitomi et al., 2009). This could lead to increased *NLRP3* expression, potentially strengthening innate immune defenses against HIV-1 (Pontillo et al., 2010; Pontillo et al., 2012). While this result is novel, further functional studies are needed to elucidate the precise mechanisms linking *NLRP3* variants to viral control in HIV-1 patients.

Study Limitations

These results should be considered with caution. First, the limited number of participants may have reduced statistical power, affecting the ability to detect independent associations. Second, the cross-sectional design precludes causal inferences, limiting conclusions about longitudinal disease progression. Third, while previous studies have confirmed the link between HIV-1 infection and cIMT (Sico et al., 2015; Triant et al., 2007), a control group would have strengthened comparisons. Finally, unmeasured lifestyle factors, genetic predisposition, and environmental influences may have impacted the results. Future studies should employ larger sample sizes, longitudinal follow-up, and functional analyses to clarify the roles of inflammatory markers, *NLRP3* SNVs, and cIMT in HIV-1 patients.

Conclusion and Clinical Implications

This study highlights the high prevalence of subclinical atherosclerosis in HIV-1-infected individuals, reinforcing the importance of cardiovascular risk assessment and early intervention in this population. Given the complex interplay between HIV-1, chronic inflammation, and atherosclerosis, future research should focus on identifying additional biomarkers for early detection of cardiovascular risk, exploring the functional impact of *NLRP3* SNVs on viral suppression and immune activation, and developing personalized prevention strategies to mitigate CVD risk in HIV-1 patients. A proactive approach integrating lifestyle modifications, optimized antiretroviral regimens, and targeted anti-inflammatory therapies may help reduce cardiovascular complications and improve long-term outcomes in HIV-1-infected individuals.

References

Ahluwalia N, Genoux A, Ferrieres J, Perret B, Carayol M, Drouet L, and Ruidavets JB. Iron status is associated with carotid atherosclerotic plaques in middle-aged adults. *J Nutr.* 140: 812–816, 2010

American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes – 2014. *Diabetes Care.* 2014; 37(Supplement_1): S14-80.

Awad F, Assrawi E, Louvrier C, Jumeau C, Georgin-Lavialle S, Grateau G, Amselem S, Giurgea I, Karabina SA. Inflammasome biology, molecular pathology and therapeutic implications. *Pharmacol Ther.* 2018; 187:133-149. doi: 10.1016/j.pharmthera.2018.02.011.

Bandera A, Masetti M, Fabbiani M, Biasin M, Muscatello A, Squillace N, Clerici M, Gori A, Trabattoni D. 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.

Bellinati PQ, Alfieri DF, Flauzino T, Junior PFG, Rossi DJ, Breganó JW, Simão ANC, de Almeida ERD, Lozovoy MAB, Reiche EMV. Association of Lower Adiponectin Plasma Levels, Increased Age and Smoking with Subclinical Atherosclerosis in Patients with HIV-1 Infection. *Curr HIV Res.* 2020;18(4):292-306. doi: 10.2174/1570162X18666200609114741.

Brazil. Ministry of Health. Clinical Protocol and Therapeutic Guidelines for Management of HIV Infection in Adults. Brasília. 2018.

Cerrato E, Calcagno A, D'Ascenzo F, Biondi-Zoccai G, Mancone M, Grosso Marra W, et al. Cardiovascular disease in HIV patients: from bench to bedside and backwards. *Open Heart.* 2015; 2:e000174. doi: 10.1136/openhrt-2014-000174

Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol.* 2008; 180(9):5771-7. doi: 10.4049/jimmunol.180.9.5771.

Currier JS, Lundgren JD, Carr A, Klein D, Sabin CA, Sax PE, Schouten JT, Smieja M; Working Group 2. Epidemiological evidence for cardiovascular disease in HIV-infected patients and relationship to highly active antiretroviral therapy. *Circulation*. 2008;118(2):e29-35. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.189624.

D'Abramo A, Zingaropoli MA, Oliva A, D'Agostino C, Al Moghazi S, De Luca G, Iannetta M, Mastroianni CM, Vullo V. Immune activation, immunosenescence, and osteoprotegerin as markers of endothelial dysfunction in subclinical HIV-associated atherosclerosis. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:192594. doi: 10.1155/2014/192594.

Deeks SG, Phillips AN. HIV infection, antiretroviral treatment, ageing, and non-AIDS related morbidity. *BMJ*. 2009; 338:a3172. doi: 10.1136/bmj.a3172.

Deeks SG, Overbaugh J, Phillips A, Buchbinder S. HIV infection. *Nat Rev Dis Primers*. 2015; 1:15035. doi: 10.1038/nrdp.2015.35.

Duewell P, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Vladimer G, Bauernfeind FG, et al. NLRP3 Inflammasomes are Required for Atherogenesis and Activated by Cholesterol Crystals. *Nature*. 2010; 464(7293):1357–61. doi: 10.1038/nature08938

Falcão MdaC, Zírpoli JC, Albuquerque VM, *et al*. Association of biomarkers with atherosclerosis and risk for coronary artery disease in patients with HIV. *Arq Bras Cardiol*. 2012; 99(5): 971-8. <http://dx.doi.org/10.1590/s0066-782x2012005000093>

Freiberg MS, Chang CCH, Kuller LH, *et al*. HIV infection and the risk of acute myocardial infarction. *JAMA Intern Med*. 2013; 173(8): 614-22. <http://dx.doi.org/10.1001/jamainternmed.2013.3728>

Friis-Møller N, Thiébaud R, Reiss P, *et al*. DAD study group. Predicting the risk of cardiovascular disease in HIV-infected patients: the data collection on adverse effects of anti-HIV drugs study. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2010; 17(5): 491-501. <http://dx.doi.org/10.1097/HJR.0b013e328336a150>

Gonzalez-Pacheco H, Vargas-Alarcon G, Angeles-Martinez J, Martinez-Sanchez C, Perez-Mendez O, Herrera-Maya G, Martinez-Rios MA, Peña-Duque MA, Posadas-Romero C, Fragoso JM. The NLRP3 and CASP1 gene polymorphisms are associated with developing of acute coronary syndrome: a case-control study. *Immunol Res.* 2017; 65(4):862-868. doi: 10.1007/s12026-017-8924-0.

Grunfeld C, Kotler DP, Arnett DK, *et al.* Working Group 1. Contribution of metabolic and anthropometric abnormalities to cardiovascular disease risk factors. *Circulation.* 2008; 118(2): e20-8. <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.189623>

Guaraldi G, Orlando G, Zona S, Menozzi M, Carli F, Garlassi E, Berti A, Rossi E, Roverato A, Palella F. Premature age-related comorbidities among HIV-infected persons compared with the general population. *Clin Infect Dis.* 2011; 53(11):1120-6. doi: 10.1093/cid/cir627.

Guo H, Callaway JB, Ting JP. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat Med.* 2015; 21(7):677-87. doi: 10.1038/nm.3893.

Hart BB, Nordell AD, Okulicz JF, Palfreeman A, Horban A, Kedem E, *et al.* Inflammation-related morbidity and mortality among HIV-positive adults: how extensive is it? *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2018; 77:1– 7. doi: 10.1097/QAI.0000000000001554

Hitomi Y., Ebisawa M., Tomikawa M., Imai T., Komata T., Hirota T., *et al.* Associations of functional NLRP3 polymorphisms with susceptibility to food-induced anaphylaxis and aspirin-induced asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2009; 124:779.e6–785.e6. 10.1016/j.jaci.2009.07.044

Hsue PY, Hunt PW, Sinclair E, Brecht B, Franklin A, Killian M, *et al.* Increased carotid intima-media thickness in HIV patients is associated with increased cytomegalovirus-specific T-cell responses. *AIDS.* 2006; 20:2275– 83. doi: 10.1097/QAD.0b013e3280108704

Hsue PY, Scherzer R, Hunt PW, Schnell A, Bolger AF, Kalapus SC, Maka K, Martin JN, Ganz P, Deeks SG. Carotid Intima-Media Thickness Progression in HIV-Infected Adults Occurs Preferentially at the Carotid Bifurcation and Is Predicted by Inflammation. *J Am Heart Assoc.* 2012; 1(2):jah3-e000422. doi: 10.1161/JAHA.111.000422.

Hsue PY, Waters DD. Time to recognize HIV infection as a major cardiovascular risk factor. *Circulation*. 2018; 138:1113–5. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.036211

Islam FM, Wu J, Jansson J, Wilson DP. Relative risk of cardiovascular disease among people living with HIV: a systematic review and meta-analysis. *HIV Med*. 2012; 13(8):453-68. doi: 10.1111/j.1468-1293.2012.00996.x.

James PA, Oparil S, Carter BL, et al. 2014 evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults: report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). *JAMA*. 2014; 311(5): 507-20. <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2013.284427>.

Kearns A, Gordon J, Burdo TH, Qin X. HIV-1-associated atherosclerosis: unraveling the missing link. *J Am Coll Cardiol*. 2017; 69:3084–98. doi: 10.1016/j.jacc.2017.05.012

Kearns AC, Liu F, Dai S, Robinson JA, Kiernan E, Tesfaye Cheru L, et al. Caspase-1 activation is related with HIV-associated atherosclerosis in an HIV transgenic mouse model and HIV patient cohort. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2019; 39:1762–75. doi: 10.1161/ATVBAHA.119.312603

Kelley N, Jeltema D, Duan Y, He Y. The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. *Int J Mol Sci*. 2019; 20(13):3328. doi: 10.3390/ijms20133328.

Kita T, Kume N, Minami M, Hayashida K, Murayama T, Sano H, et al. Role of Oxidized LDL in Atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci*. 2001; 947:199–205. doi: 10.1111/j.1749-6632.2001.tb03941.x

Lee CJ, Park S. The role of carotid ultrasound for cardiovascular risk stratification beyond traditional risk factors. *Yonsei Med J*. 2014; 55(3):551-7. doi: 10.3349/ymj.2014.55.3.551.

Leite KME, Santos Júnior GG, Godoi ETAM, *et al*. Inflammatory Biomarkers and Carotid Thickness in HIV Infected Patients under Antiretroviral Therapy, Undetectable HIV-1 Viral Load, and Low Cardiovascular Risk. *Arq Bras Cardiol*. 2020; 114(1): 90-7.

Lewden C, Chene G, Morlat P, Raffi F, Dupon M, Dellamonica P, Pellegrin JL, Katlama C, Dabis F, Leport C; Agence Nationale de Recherches sur le Sida et les Hepatites Virales (ANRS) CO8 APROCO-COPILOTE Study Group; Agence Nationale de Recherches sur le Sida et les Hepatites Virales (ANRS) CO3 AQUITAINE Study Group. HIV-infected adults with a CD4 cell count greater than 500 cells/mm³ on long-term combination antiretroviral therapy reach same mortality rates as the general population. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2007; 46(1):72-7. doi: 10.1097/QAI.0b013e318134257a.

Mehta S, Srivastava N, Bhatia A, Dhawan V. Exposure of cigarette smoke condensate activates NLRP3 inflammasome in vitro and in vivo: A connotation of innate immunity and atherosclerosis. *Int Immunopharmacol*. 2020; 84:106561. doi: 10.1016/j.intimp.2020.106561

Merlini E, Luzi K, Suardi E, et al. T-cell phenotypes, apoptosis and inflammation in HIV+ patients on virologically effective cART with early atherosclerosis. *PloS One*. 2012; 7:e46073. doi: 10.1371/journal.pone.0046073.

National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*. 2002; 106(25): 3143-421. <http://dx.doi.org/10.1161/circ.106.25.3143>

Neuhaus J, Jacobs DR Jr, Baker JV, Calmy A, Duprez D, La Rosa A, et al. Markers of inflammation, coagulation, and renal function are elevated in adults with HIV infection. *J Infect Dis*. 2010; 201:1788–95. doi: 10.1086/652749

Opstad TB, Nordeng J, Pettersen AR, Åkra S, Bratseth V, Zaidi H, Helseth R, Solheim S, Seljeflot I. The NLRP3 Genetic Variant (rs10754555) Reduces the Risk of Adverse Outcome in Middle-Aged Patients with Chronic Coronary Syndrome. *J Immunol Res*. 2022; 2022:2366695. doi: 10.1155/2022/2366695.

Pontillo A, Brandão LA, Guimarães RL, et al. A 3'UTR SNP in NLRP3 gene is associated with susceptibility to HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2010; 54:236–240.

Pontillo A, Oshiro TM, Girardelli M, Kamada AJ, Crovella S, Duarte AJ. polymorphisms in inflammasome' genes and susceptibility to HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2012; 59(2):121-5. doi: 10.1097/QAI.0b013e3182392ebe.

Rachid, M.; Schechter. M. *Manual de HIV/Aids*. 9a. ed. Rio de Janeiro: Editora Revinter, 2008.

Ravimohan, S., Nfanyana, K., Tamuhla, N., Tiemessen, C. T., Weissman, D., Bisson, G. P. Common Variation in NLRP3 Is Associated With Early Death and Elevated Inflammasome Biomarkers Among Advanced HIV/TB Co-infected Patients in Botswana. *Open Forum Infectious Diseases*. 2018; 5(5). <https://doi.org/10.1093/ofid/ofy075>

Salmazo PS, Bazan SGZ, Shiraishi FG, Bazan R, Okoshi K, Hueb JC. Frequency of Subclinical Atherosclerosis in Brazilian HIV-Infected Patients. *Arq Bras Cardiol*. 2018; 110(5): 402-10. <http://dx.doi.org/10.5935/abc.20180058> PMID: 29641646.

Sico JJ, Chang CC, So-Armah K, *et al*. Veterans Aging Cohort Study. HIV status and the risk of ischemic stroke among men. *Neurology*. 2015; 84(19): 1933-40. <http://dx.doi.org/10.1212/WNL.0000000000001560>

Smith C, Sabin CA, Lundgren JD, Thiebaut R, Weber R, LawM, *et al*. Factors associated with specific causes of death amongst HIV-positive individuals in the D:A:D Study. *AIDS*. 2010; 24:1537–48.

Souza de Lima, D., Ogusku, M. M., Sadahiro, A., & Pontillo, A. Inflammasome genetics contributes to the development and control of active pulmonary tuberculosis. *Infect Genet Evol*. 2016; 41: 240–244. doi:10.1016/j.meegid.2016.04.015

Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 2010; 19;140(6):805-20. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.022.

Tenorio AR, Zheng Y, Bosch RJ, Krishnan S, Rodriguez B, Hunt PW, Plants J, Seth A, Wilson CC, Deeks SG, Lederman MM, Landay AL. Soluble markers of inflammation and coagulation but not T-cell activation predict non-AIDS-defining morbid events during suppressive antiretroviral treatment. *J Infect Dis*. 2014; 210(8):1248-59. doi: 10.1093/infdis/jiu254.

Triant VA, Lee H, Hadigan C, Grinspoon SK. Increased acute myocardial infarction rates and cardiovascular risk factors among patients with human immunodeficiency virus disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; 92(7): 2506–2512.

Trøseid M, Seljeflot I, Arnesen H. The role of interleukin-18 in the metabolic syndrome. *Cardiovasc Diabetol.* 2010; 9:11. doi: 10.1186/1475-2840-9-11.

Valente AM, Reis AF, Machado DM, Succi RC, Chacra AR. Alterações metabólicas da síndrome lipodistrófica do HIV [Metabolic alterations in HIV-associated lipodystrophy syndrome]. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2005; 49(6):871-81. doi: 10.1590/s0004-27302005000600004.

Villani A. C., Lemire M., Fortin G., Louis E., Silverberg M. S., Collette C., et al. Common variants in the NLRP3 region contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat. Genet.* 2009; 41, 71–76. 10.1038/ng.285

Vinchi F, Muckenthaler MU, Da Silva MC, Balla G, Balla J, and Jeney V. Atherogenesis and iron: from epidemiology to cellular level. *Front Pharmacol.* 2014; 5: 94.

Ye J, Li L, Wang M, Ma Q, Tian Y, Zhang Q, Liu J, Li B, Zhang B, Liu H, Sun G. Diabetes Mellitus Promotes the Development of Atherosclerosis: The Role of NLRP3. *Front Immunol.* 2022; 13:900254. doi: 10.3389/fimmu.2022.900254.

Yu T, Jhun BS, Yoon Y. High-Glucose Stimulation Increases Reactive Oxygen Species Production Through the Calcium and Mitogen-Activated Protein Kinase-Mediated Activation of Mitochondrial Fission. *Antioxid Redox Signal.* 2011; 14(3):425–37. doi: 10.1089/ars.2010.3284

Wang S, Fang F, Jin WB, Wang X, Zheng XS. Investigation into the association between NLRP3 gene polymorphisms and susceptibility to type 2 diabetes mellitus. *Genet Mol Res.* 2015; 14 (4):17447–17452. <https://doi.org/10.4238/2015>.

Welsh P, Murray HM, Ford I, *et al.* PROSPER Study Group. Circulating interleukin-10 and risk of cardiovascular events: a prospective study in the elderly at risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011; 31(10): 2338-44. <http://dx.doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.231795>

Williams B, Mancia G, Spiering W, *et al.* ESC Scientific Document Group. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. *Eur Heart J.* 2018; 39(33): 3021-104. <http://dx.doi.org/10.1093/eurheartj/ehy339>

Wolff B, Volzke H, Ludemann J, Robinson D, Vogelgesang D, Staudt A, Kessler C, Dahm JB, John U and Felix SB. Association between high serum ferritin levels and carotid atherosclerosis in the study of health in Pomerania (SHIP). *Stroke.* 2004;35:453–7.

Zhang AQ, Zeng L, Gu W, Zhang LY, Zhou J, Jiang DP, *et al.* Clinical relevance of single nucleotide polymorphisms within the entire NLRP3 gene in patients with major blunt trauma. *Crit. Care.* 2011; 15:R280. [10.1186/cc10564](https://doi.org/10.1186/cc10564)

Zhou D, Wang X, Chen T, Wen W, Liu Y, Wu Y, Yuan Z. The NLRP3 rs10754558 Polymorphism Is Associated with the Occurrence and Prognosis of Coronary Artery Disease in the Chinese Han Population. *Biomed Res Int.* 2016; 2016:3185397. doi: [10.1155/2016/3185397](https://doi.org/10.1155/2016/3185397).

Zhu Z, Yan J, Geng C, Wang D, Li C, Feng S, Wang H. A Polymorphism Within the 3'UTR of NLRP3 is Associated with Susceptibility for Ischemic Stroke in Chinese Population. *Cell Mol Neurobiol.* 2016; 36(6):981-988. doi: [10.1007/s10571-015-0288-1](https://doi.org/10.1007/s10571-015-0288-1).

6 CONCLUSÃO

O presente estudo permite as seguintes conclusões:

- Não foi observada associação entre as variantes rs10754558 C>G e rs10157379 T>C do *NLRP3* e a infecção pelo HIV-1 em todos os modelos genéticos;
- Para a variante rs10157379 T>C, a distribuição dos genótipos no modelo codominante (TT, TC e CC) foi semelhante entre os grupos. Para a variante rs10754558 C>G, a distribuição dos genótipos CC, GC e GG não mostrou diferença entre as PVHA e controles. Análises adicionais usando os modelos dominante, recessivo e superdominante também não mostraram associação significativa entre essas variantes e a suscetibilidade ao HIV-1;
- O espessamento da camada íntima-média da carótida $\geq 0,9$ mm estava presente em 34 (43,6%) PVHA;
- O modelo univariado revelou uma associação entre o espessamento da camada íntima-média da carótida $\geq 0,9$ mm e sexo masculino, não caucasianos, uso de INTR, IP, medicamentos anti-hipertensivos, medicamentos hipolipemiantes, tabagismo, estilo de vida sedentária, presença de SM e contagem de células T CD4⁺ < 500 células/mm³; no entanto, todas estas variáveis perderam a significância no modelo de regressão logística, indicando que não estão associadas à cIMT;
- Comparados com as PVHA com o espessamento da camada íntima-média da carótida $< 0,9$ mm, as PVHA com $\geq 0,9$ mm eram mais velhas, apresentavam aumento de homocisteína, ferro, IL-10 e diminuição de HDL-C;
- As variantes rs10744558 e rs10157379 do *NLRP3* não foram associadas ao espessamento da camada íntima-média da carótida;
- As PVHA portadoras da homozigose para o alelo variante G da *NLRP3* rs10754555 apresentaram maior frequência de carga viral indetectável do que aquelas portadores dos genótipos CC + CG.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em resumo, o estudo não demonstrou associação entre as variantes rs10157379 T>C e rs10754558 C>G do gene *NLRP3* e a infecção pelo HIV-1 e com o espessamento da camada íntima-média da carótida nos indivíduos infectados pelo HIV-1. Embora o inflamassoma *NLRP3* seja um mecanismo-chave da resposta imune inata contra patógenos, as variantes genéticas *NLRP3* rs10157379 e rs10744558 analisadas no presente estudo, por si só, parecem não desempenharem um papel central na modulação da resposta imune frente ao HIV-1 e no desenvolvimento da aterosclerose nestes indivíduos.

Resultados discordantes obtidos pelo presente estudo e outros relatados anteriormente podem ser explicados por alguns fatores tais como o delineamento caso-controle, o número limitado de PVHA e controles incluídos, não realização do exame de USGD no grupo controle e variações em fatores demográficos, genéticos e ambientais entre os grupos de estudo. Além disso, é evidente que o estudo de apenas duas variantes do gene *NLRP3* é insuficiente para explicar a complexidade da suscetibilidade ao HIV-1 e a fisiopatologia da aterosclerose nestes indivíduos. Portanto, estudos adicionais devem abordar outros componentes da resposta inflamatória, em especial do inflamassoma, que podem regular a resposta imune inata, juntamente com outros fatores genéticos do hospedeiro que estão associados à proteção do HIV-1, o que contribui para o entendimento dos mecanismos complexos envolvidos na infecção pelo HIV-1 e a fisiopatologia da aterosclerose.

Por outro lado, um ponto forte do presente estudo é que, pela primeira vez, até onde sabemos, o *NLRP3* rs10157379 T>C foi investigado em relação à infecção pelo HIV-1 e na fisiopatologia da aterosclerose subclínica associada ao HIV-1. Estudos adicionais podem ser realizados para explorar outras variantes do gene *NLRP3* ou para avaliar sua interação com outros genes e fatores ambientais na suscetibilidade ao HIV-1. Entender a resposta do hospedeiro à infecção por patógenos e à hiperativação inflamatória do *NLRP3* pode ajudar a desenvolver regimes de tratamento mais eficazes e melhorar os resultados clínicos.

O estudo reforça a importância da continuidade do cuidado com PVHA, em especial se concentrando em estratégias para reduzir o risco cardiovascular nesses indivíduos por meio de mudanças no estilo de vida, controle glicêmico, dislipidêmico e da hipertensão, bem como o metabolismo do ferro, entre outros fatores associados às DCV e à aterosclerose. Além disso, as pesquisas também devem procurar identificar biomarcadores adicionais associados a desfechos clínicos, como aterosclerose que podem contribuir para o diagnóstico precoce da aterosclerose subclínica nesses indivíduos.

REFERÊNCIAS

ADEYEMI, O. *et al.* Metabolic Syndrome in Older HIV-Infected Patients: Data from the CORE50 Cohort. **AIDS Patient Care and STDs**. v.22, n.12, p.941-945, 2008.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes - 2014. **Diabetes Care**, v. 37, S 1, p. 14-80, 2014.

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

BAKER, J. V. *et al.* Progression of carotid intima-media thickness in a contemporary human immunodeficiency virus cohort. **Clinical Infectious Diseases**. v.53, n.8, p.826-35, 2011.

BANDERA, A., *et al.* The NLRP3 Inflammasome Is Upregulated in HIV-Infected Antiretroviral Therapy-Treated Individuals with Defective Immune Recovery. *Frontier of Immunology*, v.9, p. 214, 2018. doi: 10.3389/fimmu.2018.00214.

BAUERNFEIND, F., *et al.* NLRP3 inflammasome activity is negatively controlled by miR-223. **Journal of Immunology**. v. 189, n. 8, p. 4175–4181, 2012.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201516>

BELLINATI, P. Q., *et al.* Association of Lower Adiponectin Plasma Levels, Increased Age and Smoking with Subclinical Atherosclerosis in Patients with HIV-1 Infection. **Current HIV Research**, v. 18, n. 4, p. 292–306, 2020.

<https://doi.org/10.2174/1570162X18666200609114741>

BELTRÁN, L. M. *et al.* Influence of immune activation and inflammatory response on cardiovascular risk associated with the human immunodeficiency virus. **Vascular Health and Risk Management**, v.6, n.11, p.35-48, 2015.

BONFANTI, P. *et al.* Is Metabolic Syndrome Associated to HIV Infection Per Se? Results from the HERMES Study. **Current HIV Research**, v. 8, n. 2, p. 165–171, 2010.

BONGIOVANNI, M. *et al.* Predictive factors of vascular intima media thickness in HIV-positive subjects. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n. 1, p. 195–199, 2008.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de tratamento: recomendações para terapia antirretroviral em adultos e adolescentes infectados pelo HIV**. Brasília. 2008.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manejo da infecção pelo HIV em adultos**. Brasília, 2008.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da infecção pelo HIV em adultos**. Brasília. 2018.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim Epidemiológico: HIV AIDS**. Brasília: 2024a.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos: Módulo 1**. Brasília: 2024b.

CAOCCI, M. *et al.* HIV Infection Drives Foam Cell Formation via NLRP3 Inflammasome Activation. **International Journal of Molecular Sciences**, v.25, p. 2367, 2024.

CHAMBLESS, L. E. *et al.* Association of coronary heart disease incidence with carotid arterial wall thickness and major risk factors: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study, 1987-1993. **American Journal of Epidemiology**, v.146, n.6, p.483-494, 1997.

CHOW, F. C. *et al.* Comparison of ischemic stroke incidence in HIV-infected and non-HIV-infected patients in a US health care system. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v.60, n4, p.351-358, 2012.

CHOW, D. C. *et al.* Non-classical monocytes predict progression of carotid artery bifurcation intima-media thickness in HIV-infected individuals on stable antiretroviral therapy. **HIV Clinical Trials**, v. 17, n. 3, p. 114–122, 2016.

CURRIER, J. S., *et al.* Coronary heart disease in HIV-infected individuals. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 33, n. 4, p.506-512, 2003.

CURRIER, J. S., *et al.* Epidemiological evidence for cardiovascular disease in HIV-infected patients and relationship to highly active antiretroviral therapy. **Circulation**, v.118, n.2, p.e29-e35, 2008.

D'ABRAMO, A. *et al.* Immune activation, immunosenescence, and osteoprotegerin as markers of endothelial dysfunction in subclinical HIV-associated atherosclerosis. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, 2014.

DE ZOETE, M. R. *et al.* Inflammasomes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 6, n. 12, p. a016287–a016287, 1 dez. 2014.

DEEKS, S. G.; PHILLIPS, A. N. HIV infection, antiretroviral treatment, ageing, and non-AIDS related morbidity. **BMJ**, v.338, p. a3172, 2009.

DENNIS, E. A. *et al.* Cytomegalovirus promotes intestinal macrophage-mediated mucosal inflammation through induction of Smad7. **Mucosal Immunology**, v. 11, n. 6, p. 1694–1704, nov. 2018.

D'ETTORRE, G. *et al.* What happens to cardiovascular system behind the undetectable level of HIV viremia? **AIDS Research and Therapy**, v. 13, n. 1, p. 21, 2016.

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

DOITSH, G. *et al.* Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. **Nature**, v. 505, n. 7484, p. 509–514, 23 jan. 2014.

DOUEK, D. C. Immune activation, HIV persistence, and the cure. **Topics in Antiviral Medicine**, v. 21, n. 4, p. 128–32, 2013.

DUEWELL, P. *et al.* NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. **Nature**, v. 464, n. 7293, p. 1357–1361, 29 abr. 2010.

ECKARD, A. R. *et al.* Cardiovascular Disease, Statins, and HIV. **Journal of Infectious Diseases**, v. 214, n. suppl 2, p. S83–S92, 2016.

ERRIDGE, C. The roles of toll-like receptors in atherosclerosis. **Journal of Innate Immunity**, v. 1, n. 4, p. 340–349, 2009.

ESTRADA, V.; PORTILLA, J. Dyslipidemia related to antiretroviral therapy. **AIDS Reviews**, v. 13, n. 1, p. 49–56, 2011.

FALASCA, K. *et al.* Metabolic syndrome and cardiovascular risk in HIV-infected patients with lipodystrophy. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v.20, n.3, p.519-527, 2007.

FALASCA, K. *et al.* Cystatin C, Adipokines and Cardiovascular Risk in HIV Infected Patients. **Current HIV Research**, v. 8, n. 5, p. 405–410, 2010.

FARHI, L.; DE LIMA, D. B.; CUNHA, C. B. Dislipidemia em pacientes HIV/AIDS em uso de antirretrovirais num hospital universitário, Rio de Janeiro, Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 44, n. 3, p. 175–184, 2008.

FEINSTEIN, M. J. *et al.* Characteristics, Prevention, and Management of Cardiovascular Disease in People Living With HIV: A Scientific Statement from the American Heart Association. **Circulation**, v.140, n.2, p. 1–27, 2019.

FOCACCIA, R., SICILIANO, R. F. **Tratado de Infectologia** (6^a.ed., Vol. 2). São Paulo: Atheneu, 2021.

FUNDERBURG, N. T. Markers of coagulation and inflammation often remain elevated in ART-treated HIV-infected patients. **Current Opinion in HIV and AIDS**, v.9, n.1, p.80-86. 2014.

GOUGEON, M. L. *et al.* Adipocytes targets and actors in the pathogenesis of HIV-associated lipodystrophy and metabolic alterations. **Antivir Ther.** v.9, n.2, p.161-177, 2004.

GRUNFELDT, C.; JENSEN, P.; FEINGOLD, R. Lipid, Lipoproteins, Triglyceride clearance and Cytokine in Human Immunodeficiency Syndrome. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 74, n. 5, p. 1045– 1052, 1992.

GUARALDI, G. *et al.* Premature age-related comorbidities among HIV-infected persons compared with the general population. **Clinical Infectious Diseases**, v.53, n.11, p.1120-1126, 2011.

GUIMARÃES, M. M. M. *et al.* Distribuição da gordura corporal e perfis lipídico e glicêmico de pacientes infectados pelo HIV. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 51, n. 1, p. 42–51, 2007.

GUO, H. *et al.* Multi-omics analyses reveal that HIV-1 alters CD4⁺ T cell immunometabolism to fuel virus replication. **Nature Immunology**, v. 22, n. 4, p. 423–433, 25 abr. 2021.

HANNA, D. B. *et al.* HIV Infection Is Associated With Progression of Subclinical Carotid Atherosclerosis. **Clinical infectious disease**. v. 61, n. 4, p. 640–50, 2015.

- HAYWARD, J. A. *et al.* Cytosolic Recognition of Microbes and Pathogens: Inflammasomes in Action. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 82, n. 4, dez. 2018.
- HILEMAN, C. O. *et al.* Changes in oxidized lipids drive the improvement in monocyte activation and vascular disease after statin therapy in HIV. *Aids*, v. 30, n. 1, p. 65–73, 2016.
- HSUE, P. Y. *et al.* Carotid Intima-Media Thickness Progression in HIV-Infected Adults Occurs Preferentially at the Carotid Bifurcation and Is Predicted by Inflammation. ***Journal of the American Heart Association***, v. 1, n. 2, p. 1–12, 2012.
- HSUE, P. Y. Mechanisms of Cardiovascular Disease in the Setting of HIV Infection. ***Canadian Journal of Cardiology***, v. 35, n. 3, p. 238–248, 2019.
- INDUMATI, V. *et al.* Comparison of serum lipid profile in HIV positive patients on art with art naïve patients. ***Journal of Clinical and Diagnostic Research***, v. 8, n.10, p. CC06-CC09, 2014.
- ISLAM, F. M. *et al.* Relative risk of cardiovascular disease among people living with HIV: A systematic review and meta-analysis. ***HIV Medicine***, v. 13, n. 8, p. 453-68, 2012.
- JAMES, P. A. *et al.* 2014 evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults: report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). ***JAMA***, v. 311, n. 5, p. 507–20, 2014.
- JOHNSON, E. L. *et al.* Standards of medical care in diabetes—2019. ***Clinical Diabetes***, v.42, S.01, 2019.
- KEARNS, A. C. *et al.* Caspase-1 Activation Is Related With HIV-Associated Atherosclerosis in an HIV Transgenic Mouse Model and HIV Patient Cohort. ***Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology***, v. 39, n. 9, p. 1762–1775, set. 2019.
- KEARNS, A. *et al.* HIV-1–Associated Atherosclerosis. ***Journal of the American College of Cardiology***, v. 69, n. 25, p. 3084–3098, jun. 2017.
- KHIANGTE, L. *et al.* A study of serum lipid profile in human immunodeficiency virus (HIV) infected patients. ***Journal, Indian Academy of Clinical Medicine***, v. 8, n. 4, p. 307–311, 2007.
- KOTLER, D. P. *et al.* Studies of body composition and fat distribution in HIV-infected and control subjects. ***Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome Human Retrovirology***. v.20, n.3, p.228-237, 1999.
- KOTLER, D. P. HIV and antiretroviral therapy: lipid abnormalities and associated cardiovascular risk in HIV-infected patients. ***Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes***, v. 49 Suppl 2, p. 79–85, 2008.
- KRIKKE, M. *et al.* Greater carotid intima media thickness at a younger age in HIV-infected patients compared with reference values for an uninfected cohort. ***HIV Medicine***, v. 18, n. 4, p. 275–283, 2017.
- LEWDEN, C., *et al.* HIV-infected adults with a CD4 cell count greater than 500 cells/mm³ on long-term combination antiretroviral therapy reach same mortality rates as the general

population. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome*, v. 46, n.1, p. 72-77, 2007. doi: 10.1097/QAI.0b013e318134257a.

LONGENECKER, C. T.; HOIT, B. D. Imaging atherosclerosis in HIV: Carotid intima-media thickness and beyond. **Translational Research**, v. 159, n. 3, p. 127–139, 2012.

LONGENECKER, C. T.; SULLIVAN, C.; BAKER, J. V. Immune activation and cardiovascular disease in chronic HIV infection. **Current Opinion in HIV and AIDS**, v.11, n.2, p.216-225, 2016.

LONGENECKER, C. T. *et al.* Arterial stiffness in HIV-infected youth and associations with HIV-related variables. **Virulence**, v. 8, n. 7, p. 1265–1273, 2017.

LORENZ, M. W. *et al.* Prediction of clinical cardiovascular events with carotid intima-media thickness: A systematic review and meta-analysis. **Circulation**, v. 115, n. 4, p. 459–467, 2007.

MAES M, *et al.* In COVID-19, NLRP3 inflammasome genetic variants are associated with critical disease and these effects are partly mediated by the sickness symptom complex: A nomothetic network approach. *Molecular Psychiatry*, v. 12, p. 1-11, 2022.

MARTIN, G. E. *et al.* Age-Associated Changes in Monocyte and Innate Immune Activation Markers Occur More Rapidly in HIV Infected Women. **PLoS ONE**, v.8, n.1, p. e55279, 2013.

MIN, A. K. *et al.* Inflammasomes as mediators of inflammation in HIV-1 infection. **Translational Research**, v. 252, p. 1–8, fev. 2023.

MOSEPELE, M. *et al.* Cardiovascular disease risk prediction by the American College of Cardiology (ACC)/American Heart Association (AHA) Atherosclerotic Cardiovascular Disease (ASCVD) risk score among HIV-infected patients in sub-Saharan Africa. **PLoS ONE**, v. 12, n. 2, p. 1–10, 2017.

NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. **Circulation**, v. 106, n.25, p. 3143-421, 2002.

NEZU, T. *et al.* Carotid Intima-Media Thickness for Atherosclerosis. **Journal of atherosclerosis and thrombosis**, v. 23, n. 1, p. 18–31, 2016.

NOU, E.; LO, J.; GRINSPOON, S. K. Inflammation, immune activation, and cardiovascular disease in HIV. **AIDS**, v.30, n.10, p. 1495–1509, 2016.

OH, J.; HEGELE, R. A. HIV-associated dyslipidaemia: pathogenesis and treatment. **Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 12, p. 787–796, 2007.

O’LEARY, D. H. *et al.* Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults. Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. **New England Journal of Medicine**, v.340, n.1, p.14-22, 1999.

- PACHECO, A. G. *et al.* HIV infection is not associated with carotid intima-media thickness in Brazil: A cross-sectional analysis from the INI/ELSA-Brazil study. **PLoS ONE**, v. 11, n. 7, p. 1–12, 2016.
- PAPITA, A. *et al.* Arterial stiffness and carotid intima-media thickness in HIV infected patients. **Medical Ultrasonography**, v. 13, n. 2, p. 127–134, 2011.
- PICONI, S. *et al.* Atherosclerosis is associated with multiple pathogenic mechanisms in HIV-infected antiretroviral-naive or treated individuals. **AIDS**, v. 27, n. 3, p. 381–9, 2013.
- PIRS, M. *et al.* Relationship between markers of endothelial dysfunction and inflammation and subclinical atherosclerosis in HIV-infected male patients below 55 years of age. **Acta Dermatovenereologica Alpina, Pannonica et Adriatica**, v. 23, n. 3, p. 49–52, 2014.
- POLAK, J. F.; O'LEARY, D. H. Carotid Intima-Media Thickness as Surrogate for and Predictor of CVD. **Global Heart**, v. 11, n. 3, p. 295- 312.e3, 2016.
- PONTILLO, A. *et al.* A 3'UTR SNP in NLRP3 gene is associated with susceptibility to HIV-1 infection. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome**, v. 54, p. 236–240, 2010.
- RACHID, M.; SCHECHTER, M. **Manual de HIV/Aids**. 9a. ed. Rio de Janeiro: Editora Revinter, 2008.
- ROSVALL, M. *et al.* Incident coronary events and case fatality in relation to common carotid intima-media thickness. **Journal of Internal Medicine**, v.257, n.5, p.430-437, 2005.
- SHAH, A. S. V. *et al.* Global Burden of Atherosclerotic Cardiovascular Disease in People Living with the Human Immunodeficiency Virus: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Circulation**, v. 138, n. 11, p. 1100-1112, 2018.
- SHAH, A. S. V. *et al.* Global Burden of Atherosclerotic Cardiovascular Disease in People Living with the Human Immunodeficiency Virus: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Circulation**, v. 138, n. 11, p. 1100-1112, 2018.
- SHARMA, B. R.; KANNEGANTI, T.-D. NLRP3 inflammasome in cancer and metabolic diseases. **Nature Immunology**, v. 22, n. 5, p. 550–559, 2021.
- SICO, J. J. *et al.* HIV status and the risk of ischemic stroke among men. **Neurology**, v. 84, n. 19, p. 1933-1940, 2015.
- SUBRAMANYA, V. *et al.* Inflammatory biomarkers and subclinical carotid atherosclerosis in HIV-infected and HIV-uninfected men in the Multicenter AIDS Cohort Study. **PLoS ONE**, v. 14, n. 4, p. 1–17, 2019.
- THE STRATEGIES FOR MANAGEMENT OF ANTIRETROVIRAL THERAPY (SMART) STUDY GROUP *et al.* CD4+ Count-Guided Interruption of Antiretroviral Therapy. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 22, p. 2283–2296, 2006.
- TORRIANI, F. J. *et al.* Endothelial Function in Human Immunodeficiency Virus-Infected Antiretroviral-Naive Subjects Before and After Starting Potent Antiretroviral Therapy. The ACTG (AIDS Clinical Trials Group) Study 5152s. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 52, n. 7, p. 569-576, 2008.

TRIAANT, V. A. *et al.* Increased acute myocardial infarction rates and cardiovascular risk factors among patients with human immunodeficiency virus disease. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 92, n. 7, p. 2506–2512, 2007.

TSENG, A.; SEET, J.; PHILLIPS, E. J. The evolution of three decades of antiretroviral therapy: challenges, triumphs and the promise of the future. **British Journal of Clinical Pharmacology**. v. 79, n. 2, p. 182-194, fev. 2015.

UNAIDS. 2024 Global AIDS report — **The Urgency of Now: AIDS at a Crossroads**. Disponível em: https://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/2024-unaidsglobal-aids-update_en.pdf. Acesso em: 07 fev 2025.

U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. **Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents**. Department of Health and Human Services. *E-book*. Disponível em: <http://www.aidsinfo.nih.gov/ContentFiles/Adultan>. Acesso em: 01 ago 2019.

VACHIAT, A. *et al.* HIV and Ischemic Heart Disease. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 69, n. 1, p. 73-82, 2017.

VALENTE, A. M. M. *et al.* Alterações metabólicas da síndrome lipodistrófica do HIV. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 49, n.1 6, 2006.

VAN VONDEREN, M. G. A. *et al.* Carotid intima-media thickness and arterial stiffness in HIV-infected patients: The role of HIV, antiretroviral therapy, and lipodystrophy. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 50, n. 2, p. 153–161, 2009.

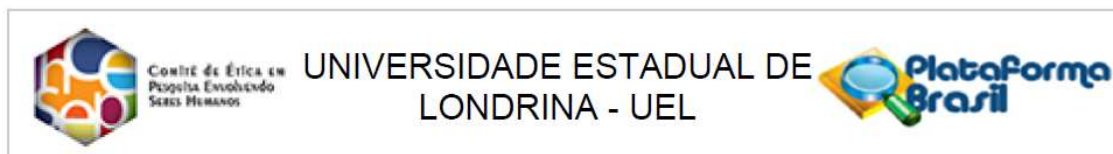
VOS, A. G. *et al.* Pro-Inflammatory Markers in Relation to Cardiovascular Disease in HIV Infection. A Systematic Review. **PloS One**, v. 11, n. 1, p. e0147484, 2016.

WILLIAMS, B., *et al.* 2018 ESC / ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. **European Heart Journal**. v.39, n.33, p.3021-3104, 2018.

ZHANG, L. *et al.* Association of NLRP3 gene single nucleotide polymorphisms with metabolic syndrome. **Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi**. V. 33, n. 4, p. 530–534, Aug 2016.

ANEXOS

ANEXO 1 – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Associação entre marcadores inflamatórios, anti-inflamatórios e metabólicos com as placas carotídeas examinadas com doppler em pacientes vivendo com HIV/AIDS

Pesquisador: Edna Maria Vissoci Reiche

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 73547417.0.0000.5231

Instituição Proponente: CCS - Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicologias

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.395.912

Apresentação do Projeto:

Na fase inicial do estudo será realizado um estudo observacional e transversal com dois grupos de indivíduos, um grupo de PVHA (Portadores do Virus HIV/AIDS) e outro de indivíduos controles saudáveis, em que os marcadores inflamatórios, anti- inflamatórios e metabólicos serão descritos e comparados. Posteriormente, estes marcadores serão avaliados no grupo de PVHA categorizados de acordo com as características morfológicas da placa de aterosclerose, grau de estenose e ecogenicidade da placa de aterosclerose. Serão avaliados indivíduos adultos, de ambos os sexos e com diagnóstico de infecção pelo HIV-1 ou AIDS há pelo menos 5 anos, acompanhados no AEHU/Uel no período de 12 meses. Trata-se de uma amostra consecutiva, de conveniência de tempo e local, com a inclusão, prospectiva de aproximadamente 100 pacientes com sorologia positiva para antiHIV-1 e tempo de doença de pelo menos 5 anos, atendidos no AEHU/Uel. Como grupo controle, serão utilizadas as amostras de material biológico de 200 indivíduos saudáveis que foram previamente inseridos no projeto de pesquisa já aprovado pelo CEP/Uel sob o Parecer 294/2011. Estes participantes de pesquisa são constituídos por doadores de sangue fidelizados do Hemocentro Regional de Londrina e indivíduos saudáveis da população em geral que já assinaram o TCLE para o projeto de pesquisa acima citado. As informações sobre os dados demográficos, fatores de estilo de vida e história médica serão obtidas por avaliação clínica com a

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

UF: PR

Telefone: (43)3371-5455

Município: LONDRINA

CEP: 86.057-970

E-mail: cep268@uel.br



Conselho de Ética em
Pesquisa envolvendo
Serres Humanos

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
LONDRINA - UEL



Continuação do Parecer: 2.395.912

aplicação de um questionário padrão respondido pelo paciente ou por seus responsáveis. Os dados serão também, obtidos por meio de consulta aos prontuários médicos e à base de dados LABHOS do Laboratório de Análises Clínicas (LAC) do HU/UEL. A duração da doença e as terapias utilizadas serão registradas para cada paciente. Os participantes serão questionados quanto ao uso de dieta específica, medicamentos para tratamento da hiperlipidemia, hipertensão, hiperglicemia ou suplementos antioxidantes e consumo de álcool. O peso corporal será medido com aproximação de 0,1 quilograma (kg) utilizando uma balança eletrônica, com os indivíduos vestindo roupas leves, sem sapatos e no período da manhã. A altura será medida com uma aproximação de 0,1 centímetro (cm) por um estadiômetro. O índice de massa corporal (IMC) será calculado como peso (kg) dividido pela altura (m) ao quadrado. A circunferência abdominal será mensurada e expressa em cm. Três aferições de pressão arterial serão realizadas com um intervalo de um minuto com o paciente sentado. A média destas aferições, expressas em mmHg, será utilizada na análise dos dados. PAS 130 mmHg e PAD 90 mmHg ou uso de anti hipertensivo serão os critérios considerados para definir hipertensão. Presença de DMT2 será definida como glicose em jejum 100 mg/dL, e não-jejum 200 mg/dL e/ou o uso de medicamentos antidiabéticos. Dislipidemia será definida pela presença de uma ou mais das concentrações anormais de lipídeos no soro, como colesterol total 200 mg/dL, LDL 130 mg/dL; colesterol de lipoproteína de alta densidade (HDL) <40 mg/dL. O exame de USGD de carótidas será realizado pelo no HU/UEL. Todos os participantes da pesquisa serão avaliados pelo mesmo examinador, colaborador deste estudo. Os resultados serão expressos de acordo com o grau de estenose, espessura da camada médio-íntima da carótida interna e ecogenicidade da placa. Os pacientes serão classificados de acordo com as características morfológicas da placa, grau de estenose e ecogenicidade da placa de aterosclerose. Serão incluídos todos os pacientes, de ambos os sexos, adultos, maiores de 18 anos, acompanhados no AEHU/UEL no período de 12 meses, com diagnóstico de HIV/Aids há pelo menos 5 anos, em uso de terapia antirretroviral, que consentirem previamente sua participação voluntária no estudo e assinarem o TCLE. Na impossibilidade de o paciente manifestar seu consentimento, sua participação deverá ser autorizada pelos seus responsáveis por meio da assinatura do TCLE. Serão excluídos os pacientes que: apresentem processo inflamatório ou infeccioso em tratamento no momento da avaliação, que façam uso crônico de corticosteróides ou imunossupressores, portadores de doença renal crônica, hepatopatia crônica, neoplasias e doença de Alzheimer, que apresentaram infarto do miocárdio, acidente vascular encefálico, pós-operatório imediato, trauma nos últimos 30 dias. Uma primeira hipótese deste estudo é que indivíduos com maior resposta inflamatória e alterações metabólicas, demonstradas pela elevação

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

CEP: 86.057-970

UF: PR

Município: LONDRINA

Telefone: (43)3371-5455

E-mail: cep268@uel.br



Comitê de Ética em
Pesquisa Envolvendo
Seres Humanos

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
LONDRINA - UEL



Continuação do Parecer: 2.395.912

de marcadores inflamatórios e metabólicos, respectivamente, além de maior carga viral circulante, apresentariam maiores alterações na cIMT, com a presença de placas de aterosclerose e maior grau de estenose das mesmas. Esta associação indicaria que PVHA que apresentarem alterações nestes marcadores apresentariam maior chance de ocorrência de aterosclerose, e por consequente, maior risco de DCV. Uma segunda hipótese é que a diminuição dos níveis de marcadores anti-inflamatórios pode ser também um dos mecanismos moleculares envolvidos na formação de aterosclerose. Sendo estas duas hipóteses aceitas, o processo inflamatório e as alterações metabólicas poderão ser importantes alvos terapêuticos para o tratamento de PVHA com aterosclerose ainda subclínica.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Analisar a associação entre alterações na resposta inflamatória, anti-inflamatória e metabólica com a doença carotídea aterosclerótica em um grupo de pacientes com sorologia positiva para HIV-1, atendidos no Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina. **Objetivos Secundários:** Determinar os níveis séricos de marcadores inflamatórios, antiinflamatórios e metabólicos em um grupo de pacientes com sorologia positiva para HIV-1 e controles saudáveis; Determinar a espessura da camada íntima média da carótida, grau de estenose e ecogenicidade da placa de aterosclerose em um grupo de pacientes com sorologia positiva para HIV-1; Determinar a associação entre as alterações na resposta inflamatória, anti-inflamatória e metabólica com a aterosclerose de carótidas internas avaliadas por USGD, segundo o grau de estenose e ecogenicidade da placa de aterosclerose em pacientes HIV-1 positivos; Determinar a associação entre as alterações na resposta inflamatória, anti-inflamatória e metabólica, o grau de estenose e ecogenicidade da placa de aterosclerose com o tempo de doença, terapia antirretroviral utilizada, carga viral e contagem de células T CD4+ na avaliação do paciente.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo a pesquisadora não há riscos para os indivíduos inseridos no estudo. Nos pacientes, será realizado um exame não invasivo de ultrassonografia com doppler da carótida para avaliar a presença e a espessura de placas de aterosclerose. O exame é indolor e não usa contrastes, não trazendo risco ao paciente. O sangue que será coletado para a pesquisa será parte da mesma coleta de exames de rotina que será realizada independentemente de sua participação ou não no estudo e desta forma, não acarreta em nenhum risco adicional. A coleta de sangue venoso será realizada por profissionais treinados do HU/UEL e pode ocasionar sinais decorrentes da punção venosa e consiste em dor no local da punção venosa ou pequeno hematoma e, muito raramente,

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

UF: PR

Município: LONDRINA

CEP: 86.057-970

Telefone: (43)3371-5455

E-mail: cep268@uel.br



Comitê de Ética em
Pesquisa Envolvendo
Serres Humanos

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
LONDRINA - UEL



Continuação do Parecer: 2.395.912

vermelhidão ou infecção local. Mesmo sendo mínimos, caso ocorra algum tipo de desconforto o participante será prontamente atendido e amparado pelos farmacêuticos responsáveis pela coleta de sangue e um dos pesquisadores deste estudo.

Os benefícios esperados são um melhor conhecimento das alterações inflamatórias e do metabolismo associadas com a placa de aterosclerose na carótida que poderá ser uma alternativa precoce e simples de antever a evolução de doença cardiovascular nos pacientes vivendo com HIV/Aids a fim de auxiliar na decisão terapêutica destes pacientes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é relevante.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A pesquisadora apresentou folha de rosto e autorização da instituição devidamente assinadas. O cronograma está adequado. O TCLE foi apresentado em forma de convite e está adequado. O orçamento prevê os kits dos exames e a pesquisadora declara que o exame de imagem faz parte da rotina de atendimento. Apresentou também Termos de confidencialidade e sigilo e prevê o armazenamento do material biológico.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências ou inadequações.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_945845.pdf	01/11/2017 22:58:01		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Parecer_HU_Elizabeth_Ursi.pdf	01/11/2017 15:31:14	Edna Maria Vissoci Reiche	Aceito
Outros	Resposta_pendencias.pdf	01/11/2017 15:27:44	Edna Maria Vissoci Reiche	Aceito
Folha de Rosto	Nova_folha_rosto.PDF	01/11/2017 15:26:19	Edna Maria Vissoci Reiche	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Comite_de_Etica.pdf	20/06/2017 14:46:36	Edna Maria Vissoci Reiche	Aceito
Outros	Declara_Sigilio_Dados.PDF	20/06/2017 10:16:52	Edna Maria Vissoci Reiche	Aceito

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

CEP: 86.057-970

UF: PR

Município: LONDRINA

Telefone: (43)3371-5455

E-mail: cep268@uel.br



Conselho de Ética em
Pesquisa Envolvendo
Serres Humanos

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
LONDRINA - UEL



Continuação do Parecer: 2.395.912

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.doc	20/06/2017 10:16:03	Edna Maria Vissoci Reiche	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Declara_Banco_Material.PDF	20/06/2017 10:15:44	Edna Maria Vissoci Reiche	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

LONDRINA, 23 de Novembro de 2017

**Assinado por:
Rosana Lopes
(Coordenador)**

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

CEP: 86.057-970

UF: PR

Município: LONDRINA

Telefone: (43)3371-5455

E-mail: cep268@uel.br

APÊNDICES

APÊNDICE 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

“ASSOCIAÇÃO ENTRE MARCADORES INFLAMATÓRIOS, ANTI-INFLAMATÓRIOS E METABÓLICOS COM ATEROSCLEROSE SUBCLÍNICA EM PACIENTES COM VIVENDO COM HIV/AIDS”

Prezado(a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidá-lo (a) para participar da pesquisa “ASSOCIAÇÃO ENTRE MARCADORES INFLAMATÓRIOS, ANTI-INFLAMATÓRIOS E METABÓLICOS COM ATEROSCLEROSE SUBCLÍNICA EM PACIENTES VIVENDO COM HIV/AIDS”, a ser realizada no Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina (AEHU/UEL)”. O objetivo da pesquisa é “analisar a associação entre alterações na resposta inflamatória e no metabolismo de gorduras e de açúcar com a presença de placas de aterosclerose na carótida em um grupo de pacientes com sorologia positiva para HIV, atendidos no AEHU/UEL”. Sua participação é muito importante e ela se daria da seguinte forma: sua participação será voluntária para fornecer informações quanto ao sexo, idade, etnia (raça), peso, altura, pressão arterial, uso de medicamentos, hábitos de vida como atividade física, uso de álcool e fumo. Será realizado um exame de ultrassonografia com *doppler* da carótida para avaliar a presença e a espessura de placas de aterosclerose.

O (a) senhor(a) participará com a coleta de uma amostra de sangue periférico (20 mL) para a realização de exames laboratoriais que fazem parte da rotina de atendimento aos pacientes, como hemograma, provas de coagulação, avaliação dos lipídeos (como colesterol e triglicérides), glicose, insulina e provas inflamatórias.

Esclarecemos que sua participação é totalmente voluntária, podendo o (a) senhor (a): recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento, sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Esclarecemos, também, que suas informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade. Solicitamos ainda sua autorização para que após o término do presente estudo, o material de sangue coletado possa ser armazenado em *freezer* no Setor de Imunologia Clínica do HU/UEL, identificado de maneira sigilosa e sob a responsabilidade da equipe de pesquisadores, para ser utilizada em futuros estudos sobre os

fatores de risco associados a formação de aterosclerose a serem desenvolvidos por esta mesma equipe de pesquisadores. Caso não autorize, informamos que o material coletado para este estudo, será descartado após o término da presente pesquisa.

Esclarecemos ainda, que o(a) senhor(a) não pagará e nem será remunerado(a) por sua participação. Garantimos, no entanto, que todas as despesas decorrentes da pesquisa serão ressarcidas, quando devidas e decorrentes especificamente de sua participação.

Os benefícios esperados são um melhor conhecimento das alterações inflamatórias e do metabolismo associadas com a placa de aterosclerose na carótida que poderá ser uma alternativa precoce e simples de antever a evolução de doença cardiovascular nos pacientes vivendo com HIV/Aids a fim de auxiliar na decisão terapêutica destes pacientes.

Quanto aos riscos, informamos que sua participação não acarretará em qualquer risco à sua saúde nem alteração de qualquer um dos seus tratamentos. A ultrassonografia com *doppler* de carótida é um exame indolor e não invasivo que não apresenta risco ao paciente. O sangue que será coletado para a pesquisa será parte da mesma coleta de exames de rotina que será realizada independentemente de sua participação ou não no estudo e desta forma, não vos acarreta em nenhum risco adicional. A coleta de sangue venoso será realizada por profissionais treinados do HU/UEL e pode ocasionar sinais decorrentes da punção venosa e consiste em dor no local da punção venosa ou pequeno hematoma e, muito raramente, vermelhidão ou infecção local. Mesmo sendo mínimos, caso ocorra algum tipo de desconforto o participante será prontamente atendido e amparado pelos farmacêuticos responsáveis pela coleta de sangue e um dos pesquisadores deste estudo.

Caso o(a) senhor(a) tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos poderá nos contatar a professora e pesquisadora Edna Maria Vissoci Reiche, no Laboratório de Análises Clínicas do HU/UEL, na avenida Robert Koch, 60, Vila Operária, pelos telefones 43-3371-2321 (laboratório) ou 43-9991-1467 (celular), ou ainda por email (reiche@sercomtel.com.br), ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, situado junto ao LABESC – Laboratório Escola, no Campus Universitário, telefone 3371-5455, e-mail: cep268@uel.br.

Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas devidamente preenchida, assinada e entregue ao (à) senhor(a).

Londrina, ___ de _____ de 202__.

Pesquisador Responsável

Professora Dra. Edna Maria Vissoci Reiche

RG: 1.242.514-7 (SSP-PR)

Telefone: 43-3371-2321

_____, tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar **voluntariamente** da pesquisa descrita acima.

Assinatura (ou impressão dactiloscópica): _____

Data: _____

APÊNDICE 2 - QUESTIONÁRIO PARA COLETA DE DADOS DOS INDIVÍDUOS

Data de inclusão ____/____/____ Data da coleta ____/____/____ Horário ____:____

IDENTIFICAÇÃO

Nome: _____ ID _____

Idade: _____ anos Sexo: () M () F Etnia _____

Antecedentes Mórbitos Pessoais: () HAS () DM tipo 1
 () Dislipidemia () DM tipo 2
 () Doença Autoimune () Doença Hematológica
 () Doença Infecciosa () AVC () IAM () Outro:

Medicamentos de uso contínuo: _____

() anti-hipertensivo () hipoglicemiante () hipolipemiante () anticoagulante

() antioxidantes () vitaminas () Outro: _____

Terapia antirretroviral e tempo de uso:

Data do diagnóstico: _____

Últimos exames (CD4 e carga viral):

_____/_____/_____

 _____/_____/_____

Antecedentes Mórbitos Familiares: () HAS () DM tipo 2 () Dislipidemia
 () AVC () IAM () Morte súbita
 () DCV () Outro: _____

Condições e hábitos de vida: () Tabagismo () Etilismo () Sedentarismo

Atividade física:

() SIM () 1x semana () 2x semana () 3x semana () > 3 x semana

() NÃO

Exposição solar:

Dieta: () Normal () Vegano () Vegetariano () Restrição, qual? _____

História Clínica e Exame Físico da Entrada (*baseline*):Peso (Kg) _____ Altura (m) _____ IMC (Kg/m²) _____

Pressão arterial (mmHg) _____ Circunferência abdominal (cm) _____