

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

ANSELMO JIRO KAMADA

**Variantes em genes codificantes da imunidade inata na
susceptibilidade à transmissão materno-infantil do vírus da
Imunodeficiência Humana Tipo 1 (HIV-1) e progressão à
Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS)**

**Recife
2017**

ANSELMO JIRO KAMADA

Variantes em genes codificantes da imunidade inata na susceptibilidade à transmissão materno-infantil do vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 1 (HIV-1) e progressão à Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS)

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

Orientador: Prof. Dr. Sergio Crovella

Recife

2017

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Kamada, Anselmo Jiro

Variantes em genes codificantes da imunidade inata na susceptibilidade à transmissão materno-infantil do vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 1 (HIV-1) e progressão à Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) / Anselmo Jiro Kamada. – 2017.

123 f. : il.

Orientador: Sergio Crovella

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Pós-graduação em Genética, Recife, 2017.

Inclui referências e anexos

1. HIV (Vírus) 2. Transmissão da AIDS I. Crovella, Sergio (orientador) II. Título.

616.9792

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017-571

ANSELMO JIRO KAMADA

Variantes em genes codificantes da imunidade inata na susceptibilidade à transmissão materno-infantil do vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 1 (HIV-1) e progressão à Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS)

Aprovado em: 30/08/2017

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Área de concentração Genética, da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Genética.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Sergio Crovella
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Luiz Cláudio Arraes de Alencar
Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira

Dr. Paulo Roberto Eleutério de Souza
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Will de Barros Pita
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Antonio e Hiroko pelos exemplos que dão de apoio, dedicação e confiança, principalmente nos momentos de dificuldade;

Ao meu orientador Sergio Crovella, pela amizade, entusiasmo e confiança depositada, com quem posso contar pelo suporte incondicional;

À Lucas, Rafael e Ronald, principalmente pela parceria no meu período em Trieste, tornando o trabalho diário mais leve e com bom humor;

Aos amigos do grupo de Imunogenética da UFRGS, Prof. Zeca, Francis, Maria, Rúbia, Jacque, Rafael Michita, Priscila, Eriza e Tiago Veit pela amizade e colaboração no meu período em Porto Alegre;

Aos amigos de Trieste, Paola, Luisa, Fulvio, Karla, Serena, Giulia e Federica pelo ótimo convívio no laboratório, aprendizado e paciência com meus experimentos;

Aos amigos do Grupo de PatGen (Paula Sandrin, Ronaldo Celerino, Jaqueline Azevêdo, Heidi e demais membros) pela amizade, profissionalismo e compartilharem o conhecimento durante este período de convívio;

Aos amigos que levo desde a graduação em Ciências Biológicas: Vitor, Antonio, Mailton, Kézia, Caio, Edvaldo e Rafael, com os quais posso contar sempre e me conhecem mais do que ninguém;

Aos meus compadres e amigos de longa data Raphael, Daniel, Joaquim, Jorge e Anninha pelo companheirismo e apoio em todos os momentos;

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

RESUMO

A transmissão materno infantil (TMI) do vírus da imunodeficiência humana (HIV-1) representa um problema de saúde pública mundial, principalmente pela alta morbidade e mortalidade associada à infecção neonatal, atingindo cerca de 150 mil neonatos/ano. Diversos componentes do sistema imune são conhecidos na proteção à transmissão horizontal do HIV-1, no entanto o impacto de fatores imunes atuando na interface materno-infantil ainda não está bem esclarecida. Neste contexto, a tese investigou o envolvimento de genes candidatos do sistema imune inato na proteção à TMI (na gestação, parto e amamentação) em uma coorte da Zâmbia (101 gestantes infectadas e 331 filhos nascidos de mães infectadas), e complementou com uma análise em coortes de progressão infantil associada à infecção e à síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) adulta. O primeiro capítulo da tese focou em polimorfismos situados no gene codificante da teterina (*BST2*) pela sua função na retenção viral e sinalização da resposta adaptativa; enquanto o segundo capítulo avaliou polimorfismos em genes da Lactoferrina (*LTF*), β defensina 1 (*DEFB1*) e Perforina (*PRF1*), pelo envolvimento destes componentes na resposta antiviral inicial. O alelo rs9576A *BST2* e os genótipos c.*87A/A *DEFB1* e c.900C/T *PRF1* nos neonatos estavam associados à proteção durante a TMI por amamentação, enquanto o genótipo rs919266GA *BST2* contribuiu na rápida progressão à AIDS nos adultos. Embora estes marcadores genéticos sejam preliminares, a investigação da imunidade inata poderia viabilizar soluções terapêuticas a populações tão vulneráveis à epidemia do HIV-1.

Palavras-chave: HIV-1. SNPs. *BST2*. *LTF*. *DEFB1*. *PRF1*.

ABSTRACT

Mother-to-child transmission (MTCT) of Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) is a major global health issue due to high morbidity and mortality associated to neonatal infection, leading to approximately 150.000 neonatal infections/year. Host immune factors have been well described during HIV-1 horizontal transmission, although their role during MTCT is still underestimated. This thesis described the role of innate immune gene candidates in MTCT (intrauterine, intrapartum and postpartum) in a cohort of Zambia (101 HIV-1+ pregnant women e 331 infected infants), with additional analysis in a HIV-1 pediatric disease cohort and a adult acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) progression cohort. The first chapter described the role of Tetherin coding gene (*BST2*) single nucleotide polymorphisms (SNPs) in risk to MTCT; while the second chapter described the role of Lactoferrin (*LTF*), β defensin 1 (*DEFB1*) e Perforin (*PRF1*) coding genes in risk to MTCT. rs9576A *BST2* allele and c.*87A/A *DEFB1* e c.900C/T *PRF1* neonatal genotypes were associated with neonatal protection during breastfeeding, while rs919266GA *BST2* genotype was associated with rapid progression adult AIDS. Despite these genetic markers are still preliminary, the understanding of innate immune factors during MTCT should provide support to therapeutic development to vulnerable groups affected by neonatal HIV-1 infection.

Key words: HIV-1. SNPs. *BST2*. *LTF*. *DEFB1*. *PRF1*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Proporção de indivíduos de populações chave infectados e número estimado de indivíduos infectados pelo HIV-1 por região no ano de 2015.....	11
Figura 2 - a) Número de casos de AIDS no Brasil; b) nº de óbitos relacionados à AIDS	13
Figura 3 - a) Descrição das regiões codificantes e proteínas virais; e posição no genoma do HIV-1. b) Representação das etapas da infecção pelo HIV-1.	14
Figura 4 - Estabelecimento da infecção nos sítios iniciais e alvos celulares	15
Figura 5 - Progressão clínica natural da infecção pelo HIV-1..	16
Figura 6 - Padrão de diversidade viral durante a transmissão sexual do HIV-1 revela efeitos de gargalo genético.	17
Figura 7 - Representação esquemática de um locus polimórfico de base única (SNP) e as regiões (*) nas quais os SNPs podem ter importância funcional	22
Figura 8 - Diferenças inter-individuais de SNPs e representação dos haplótipos de SNPs presentes em um determinado grupo de indivíduos.....	22
Figura 9 - Grupos de estudo e fenótipos clínicos para estudo de associação genética da susceptibilidade à infecção e progressão à AIDS	23
Figura 10 - Representação esquemática de componentes da imunidade inata que modulam a resposta antiviral na mucosa.	25
Figura 11 - Regiões codificantes do gene BST2 correspondentes aos domínios protéicos da Teterina.....	26
Figura 12 – Localização do gene codificante da Teterina/BST-2 (BST2) e os fatores de transcrição (FT) envolvidos na regulação gênica do gene BST2.	27
Figura 13 - Regulação transcricional da Teterina mediado por IFN e citocinas pró-inflamatórias produzidas durante a resposta de célula dendrítica ao HIV-1.....	28
Figura 14 - a) Organização gênica da PRF1 e domínios estruturais de monômero de perforina e b) formação de poro pela oligomerização de 20-50 monômeros	29
Figura 15 - a) Organização gênica e sequência de pré própeptídeo da β defensina 1 humana (hBD-1). b) Estrutura cristalizada de hBD-1 madura	30
Figura 16 - a) Organização genômica do gene LTF e localização específica no transcrito de cada isoforma quanto à posição dos seus lobos N-terminais. b) Estrutura de Ltf cristalizada	32

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Item	Definição
AIDS	- Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
APCs	- Células apresentadoras de antígeno
BST2	- Teterina
CCR-5	- C-C receptor de quimiocina tipo 5
CGA	- Análise de genes candidatos
DCs	- Células dendríticas
DNA	- Ácido desoxirribonuléico
gp120	- Glicoproteína 120
GWAS	- Estudos associação genômica de larga escala
HAART	- Terapia antirretroviral de alta potência
HLA	- Antígeno leucocitário humano
HIV-1	- Vírus da imunodeficiência humana tipo 1
LD	- Desequilíbrio de ligação
MHC	- Complexo principal de histocompatibilidade
NK	- Células Natural Killers
PAMP	- Padrões moleculares associado a patógenos
PBMCs	- Células mononucleares do sangue periférico
PCR	- Reação em cadeia da polimerase
PRR	- Receptores reconhecedores de patógenos
RNA	- Ácido ribonuléico
SNP	- Polimorfismo de base única
TAR	- Terapia antirretroviral
TIP	- Transmissão intraparto
TIU	- Transmissão intrauterina
TLR	- Receptor semelhante a <i>Toll</i>
TMI	- Transmissão materno-infantil do HIV-1
TPP	- Transmissão pós-parto
UTR	- Região não-traduzida

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1 EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA TIPO 1 (HIV-1) ENTRE ADULTOS E CRIANÇAS/JOVENS.....	11
2.1.1 Epidemiologia da infecção pelo HIV-1 e AIDS no Brasil	12
2.2 MECANISMOS DE ENTRADA CELULAR E TRANSMISSÃO A PARTIR DE CÉLULAS-ALVO DO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA TIPO 1 (HIV-1).....	13
2.3 PROGRESSÃO CLÍNICA E PATOGÊNESE DA INFECÇÃO PELO HIV-1	15
2.4 TRANSMISSÃO MATERNO-INFANTIL DO HIV-1 (TMI)	17
2.4.1 Transmissão intrauterina (TIU).....	18
2.4.2 Transmissão intra-parto (TIP).....	19
2.4.3 Transmissão pós-parto (TPP).....	20
2.5 IMUNOGENÉTICA DO HOSPEDEIRO NA RESPOSTA À INFECÇÃO PELO HIV-1	21
2.5.1 Fatores imunogenéticos associados à transmissão materno-infantil do HIV-1 (TMI).....	24
2.5.1.1 Teterina/BST-2 (Bone marrow stromal cell antigen-2).....	26
2.5.1.2 Perforina.....	28
2.5.1.3 β Defensina 1	30
2.5.1.4 Lactoferrina	32
3 OBJETIVOS.....	34
4 MATERIAL E MÉTODOS	35
5 CAPITULO I - PROTECTIVE ROLE OF BST2 POLYMORPHISMS IN MOTHER-TO-CHILD TRANSMISSION OF HIV-1 AND ADULT AIDS PROGRESSION.....	38
6 CAPITULO II - INNATE IMMUNITY GENES POLYMORPHISMS AND HIV-1 MOTHER-TO-CHILD TRANSMISSION IN ZAMBIAN POPULATION.....	49
7 DISCUSSÃO GERAL.....	69
8 CONCLUSÃO	72
REFERÊNCIAS.....	73
APÊNDICES	83
ANEXOS	110

1 INTRODUÇÃO

A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) constitui um desafio de saúde pública global, afetando principalmente populações desassistidas por métodos preventivos e de terapia antirretroviral (TAR) em países subdesenvolvidos, nos quais a transmissão materno-infantil do HIV-1 (TMI) ainda tem persistido. Ensaio clínicos têm apontado que na ausência de TAR, a amamentação exclusiva de curta duração apresenta maiores índices de sobrevivência neonatal e menor taxa de TMI comparada ao aleitamento combinado a fórmulas nutricionais, destacando as funções benéficas de componentes nutricionais e/ou imunes específicos da interface materno-infantil, mesmo com o risco de morbidade e mortalidade associada à infecção neonatal.

A estimativa de que 75-80% dos neonatos não são infectados pelo HIV-1 mesmo com alta carga viral materna durante a gestação, indica que fatores intrínsecos do hospedeiro atuem na proteção à TMI. Neste contexto, a identificação dos principais mecanismos imunes tem sido promissor porém incipiente, seja por modelos experimentais *in vitro/in vivo* limitados quanto à reprodução do ambiente de mucosas e populações celulares locais ou por dificuldades inerentes ao acompanhamento e amostragem de neonatos infectados e gestantes não-tratadas.

O estudo de variantes genéticas envolvidas na resposta imune diferencial do hospedeiro à infecção pelo HIV-1 poderia indicar fatores protetivos durante a TMI. Diversos alelos de proteção à transmissão horizontal e progressão à AIDS já foram descritos, no entanto o impacto de alelos como o *CCR5-Δ32*, tem sido restrito principalmente pela sua frequência maior em populações menos afetadas pela epidemia (entre europeus e norte-africanos). Neste sentido, a investigação do background genético na susceptibilidade à TMI em populações mais atingidas (por ex., provenientes da porção central e sul africana) ainda tem sido subestimada, e poderia auxiliar na elaboração de estratégias específicas a grupos mais vulneráveis aos efeitos da epidemia pelo HIV-1.

Desta forma, a tese visou investigar fatores imunogenéticos envolvidos na susceptibilidade à transmissão materno-infantil do HIV-1 (na gestação, parto e amamentação) em uma coorte de gestantes provenientes da Zâmbia que participaram do ensaio clínico de aleitamento exclusivo de curta duração.

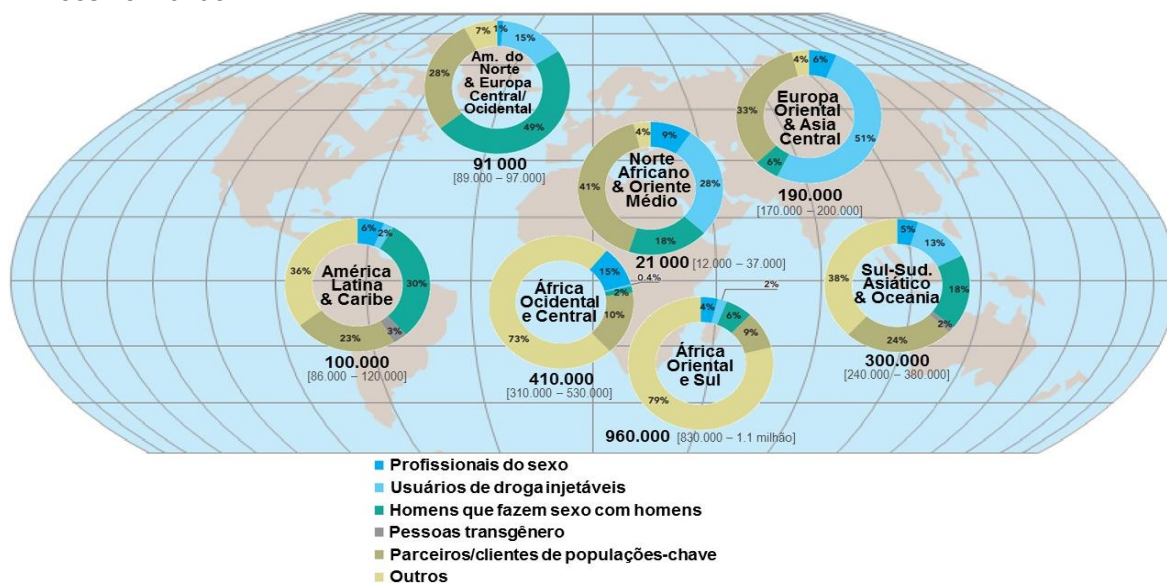
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA TIPO 1 (HIV-1) ENTRE ADULTOS E CRIANÇAS/JOVENS

A infecção pelo vírus da imunodeficiência tipo 1 (HIV-1) constitui um dos principais desafios globais de saúde pública, visto que desde sua descoberta na década de 80, aproximadamente 35 milhões de mortes foram associadas à síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) causada pelo vírus. O impacto da infecção em recém nascidos na ausência de tratamento ainda é mais dramático, levando um terço dos recém infectados a óbito já no primeiro ano de vida, enquanto metade dos infectados morrem já no segundo ano, de acordo com o Programa de HIV/AIDS das Nações Unidas (UNAIDS/WHO, 2016).

Atualmente, estima-se que 36.7 milhões de indivíduos convivem com o HIV-1, nos quais 1.8 milhões são crianças/jovens (0 a 14 anos) infectados majoritariamente por transmissão materno infantil (TMI). No ano de 2015, dentre as 2.1 milhões de novas infecções (Fig.1) e 1.1 milhão de óbitos no mundo, 150 mil novas infecções e 110 mil óbitos foram entre crianças/jovens (UNAIDS, 2016).

Figura 1 – Proporção de indivíduos de populações chave infectados e número total estimado de indivíduos infectados pelo HIV-1 por região somente no ano de 2015, totalizando 2.1 (1.8 - 2.4) milhões no mundo.



Autor: Relatório GAP report UNAIDS (2016).

A redução de custos de testes diagnósticos e maior acesso à terapia antirretroviral (TAR); e cobertura de programas nacionais e internacionais de

prevenção contribuíram na redução de novas infecções pelo HIV-1 e de mortes associadas à AIDS entre adultos e jovens. Neste sentido, a diminuição da taxa de TMI de 25.8% (2009) para 16% (2013) em países prioritários (21 países da África subsaariana com 85% de casos no mundo de TMI) tem sido influenciada pelo aumento no número de gestantes com aconselhamento e testes diagnósticos (de 26% para 44% entre 2009 a 2013)(UNAIDS/WHO, 2014).

Riscos atribuídos à TMI ainda têm persistido, principalmente quando do total de 1.3 milhões de gestantes infectadas pelo HIV-1 em 2015, 300 mil partos ainda foram realizados na ausência de terapia antirretroviral durante a gestação. Além disso, o número total de novas infecções entre mulheres na idade reprodutiva (15 a 49 anos) reduziu somente 2% nos últimos cinco anos em todo o mundo, e os índices de abandono ao tratamento tem sido alto durante a gestação e amamentação, principalmente em países prioritários (UNAIDS/WHO, 2016).

2.1.1 Epidemiologia da infecção pelo vírus da imunodeficiência tipo 1 (HIV-1) e AIDS no Brasil

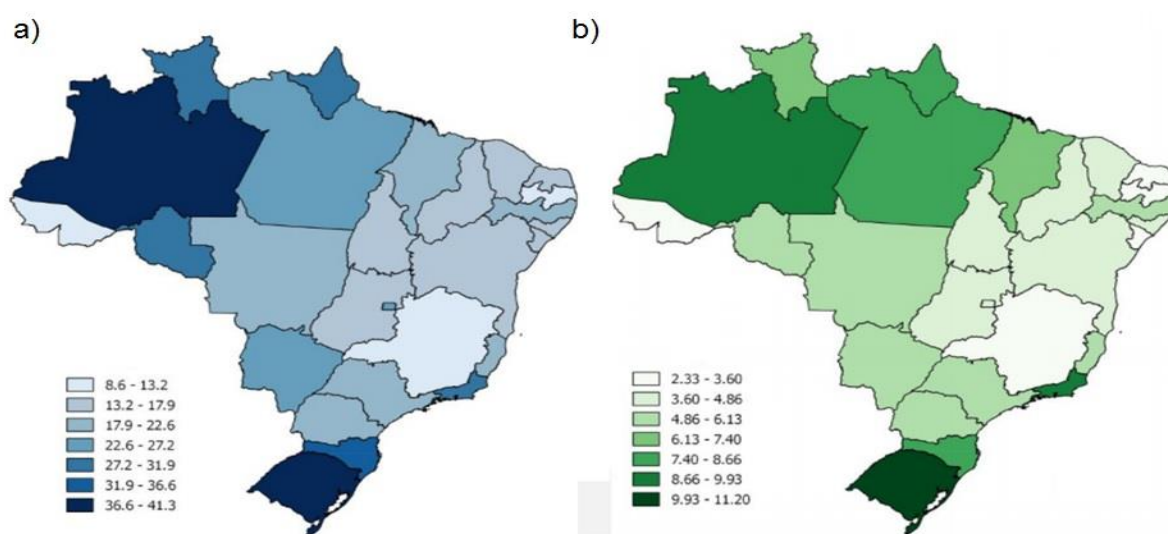
Foram registrados no Brasil desde a primeira notificação em 1983 até junho de 2013, cerca de 686 mil casos de AIDS e 278 mil mortes associadas à infecção pelo HIV-1, representando um terço dos casos de AIDS em toda a América Latina (UNAIDS/WHO, 2014). Diferentemente dos países prioritários na África, a prevalência do HIV-1 entre populações-chave no Brasil é maior, representados particularmente entre homens que fazem sexo com homens (HSH)(10.5%), profissionais do sexo (4.9%), pessoas que usam drogas (> 18 anos) (5.9%), enquanto na população entre 18 a 49 anos é de cerca de 0.4% (UNAIDS, 2015).

A política prioritária do Departamento de IST, AIDS e Hepatites Virais (Min. da Saúde) com a distribuição gratuita de medicamentos antirretrovirais pelo Sistema Único de Saúde desde 1996, destacou o Brasil entre países em desenvolvimento, apresentando em 2015 cerca de 87% de indivíduos convivendo com HIV-1 diagnosticados, no qual 64% estavam sob TAR (média mundial 46%) e destes 90% apresentaram carga viral suprimida (UNAIDS/WHO, 2014).

O cenário epidemiológico do HIV-1 no Brasil, representado atualmente por cerca de 734 mil indivíduos infectados, é considerado estável em virtude de

detecções em taxas constante com média de 20,4 casos/100 mil habitantes na maioria dos estados nos últimos cinco anos. No entanto, uma maior concentração tem sido apresentada em estados “hot spots” como Amazonas e Rio Grande do Sul, os quais tiveram respectivamente quase o dobro do número de casos de AIDS (37,4 e 41,3/100 mil hab.) e de morte associadas à infecção (8,7 e 11,2/100 mil hab.) em relação à média nacional em 2013 (Fig. 2).

Figura 2 - a) Número de casos de AIDS no Brasil; b) número de óbitos relacionados à AIDS a cada 100 mil habitantes em 2014.

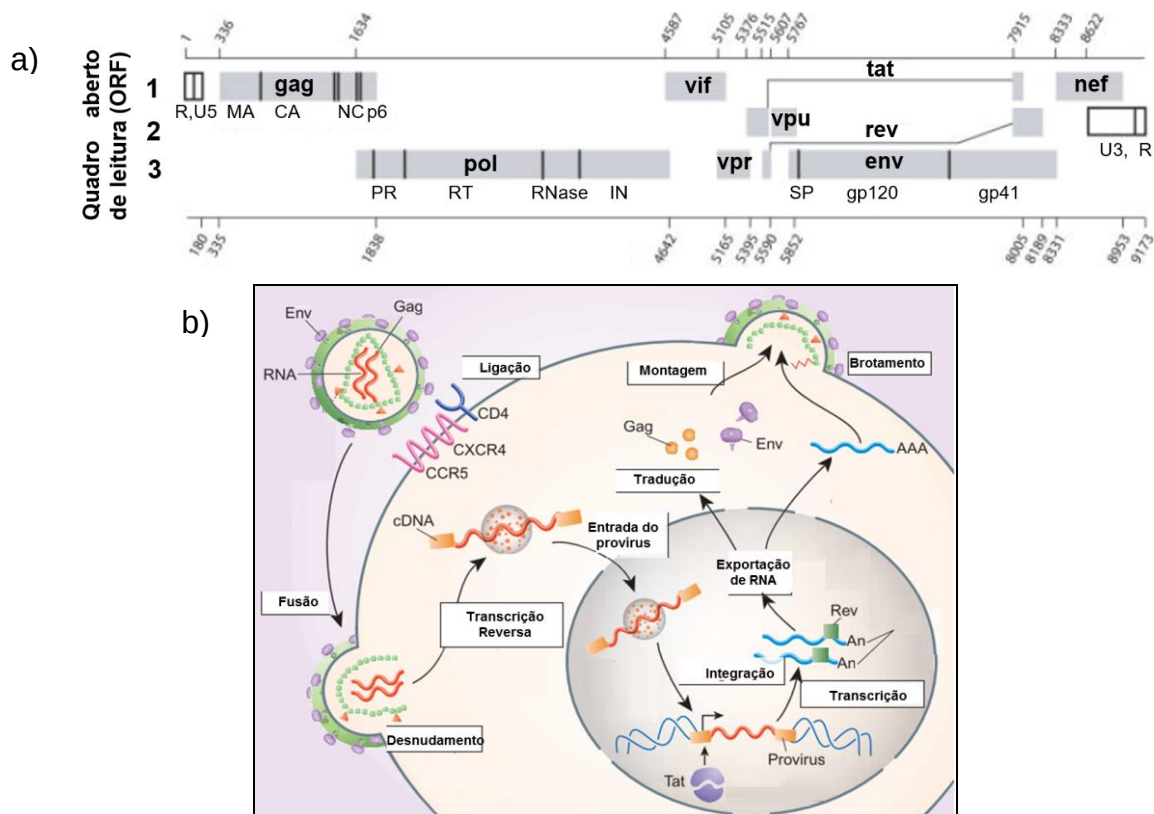


Autor: Ministério da Saúde (2014).

2.2 MECANISMOS DE ENTRADA CELULAR E TRANSMISSÃO A PARTIR DE CÉLULAS-ALVO DO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA TIPO 1 (HIV-1)

O HIV-1 é um membro da família *Lentiviridae* constituído por duas cópias idênticas de RNA genômico (com cerca de 9749 nucleotídeos) inseridas em capsídeo protéico, o qual é envolvido por um envelope externo de origem membranar do hospedeiro. Seu genoma codifica nove domínios poliprotéicos, que necessitam ser clivados proteoliticamente para dar origem ao repertório total de 15 proteínas (Fig. 3a), com funções específicas em seu ciclo viral (Fig. 3b): Env e Gag compõem estruturas do envelope e capsídeo; Pol regula a retrotranscrição e integração do genoma viral; Tat e Rev regulam a transcrição e tradução dos produtos virais; e Vif, Nef, Vpr e Vpu/Vpx desempenham funções acessórias na evasão ao sistema imune.

Figura 3 – a) Descrição das regiões codificantes e proteínas virais; e sua posição relativa no genoma do HIV-1. b) Representação esquemática das etapas da infecção pelo HIV-1



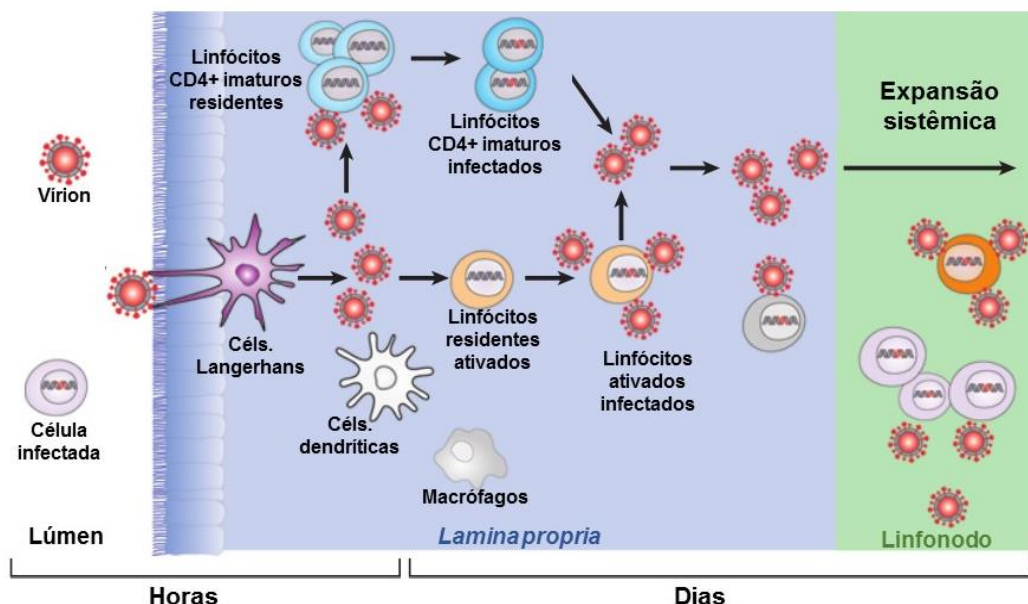
Autor: Mario Stevenson (2003).

A ligação da glicoproteína de envelope gp120 a receptores CD4 e o ancoramento da subunidade gp41 a receptores de quimiocinas CCR-5 ou CXCR-4, são essenciais para a entrada do vírus a diversas células-alvo do sistema imune, no qual populações de linfócitos T auxiliares (CD4+) são alvos preferenciais, pela sua alta densidade de receptores CD4+ e permissividade maior à replicação viral. Embora linfócitos CD4+ de memória imaturos sejam infectados com maior frequência nas mucosas, a expansão da replicação ocorre majoritariamente em linfócitos CD4+ ativados (Fig. 4 frequência de 1:70 linfócitos imaturos) nos sítios iniciais de transmissão (Haase, 2010; Saba et al., 2010).

Células apresentadoras de antígenos (APCs) como macrófagos e células dendríticas (DCs) apresentam menor produção viral e são menos frequentes que linfócitos CD4+ residentes (1:4 e 1:5, respectivamente), no entanto apresentam alta transmissão célula-a-célula a linfócitos CD4+ na *lamina propria* e linfonodos locais (Saba et al., 2010; Moir et al., 2011). Células dendríticas especializadas que se situam entre epitéliócitos, conhecidas como células de Langerhans, desempenham papel essencial no estabelecimento da infecção, pela capacidade de captura viral

através de processos membranares ao lúmen da mucosa e adesão viral por meio de ligação à gp120 por lectinas de membrana DC-SIGN (Hladik et al., 2007).

Figura 4 – Estabelecimento da infecção nos sítios iniciais de entrada do HIV-1 e seus alvos celulares.



Autor: Moir e cols. (2010).

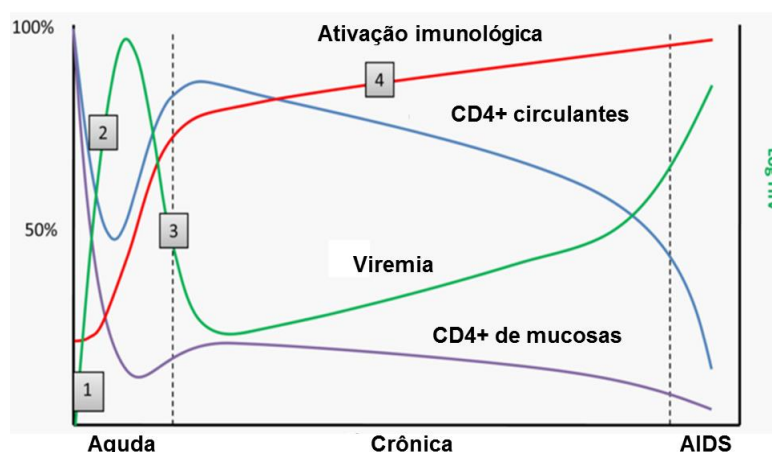
Evidências recentes têm revelado que a eficiência na entrada viral durante a transmissão célula-a-célula, é cerca de 10 a 1000 vezes maior em comparação a transmissão por vírions (partículas virais) livres, por meio de estruturas conhecidas como sinapses virais. As sinapses aumentam a transmissão simultânea do HIV-1 através de agrupamentos numerosos (*clusters*) de Env ligados a receptores CD4+, sendo estabilizados por moléculas de adesão LFA-1 e seus receptores ICAM-1,3 (Anderson, 2014). A migração de células infectadas a órgãos linfóides distais ao sítio inicial de transmissão potencializaria ainda mais os efeitos patogênicos da transmissão celular, pela abundância e contato íntimo entre células-alvo locais (Alvarez et al., 2014; Galloway et al., 2015).

2.3 PROGRESSÃO CLÍNICA E PATOGÊNESE DA INFECÇÃO PELO HIV-1

Os mecanismos patogênicos do HIV-1 têm sido atribuído majoritariamente a efeitos diretos da depleção de linfócitos T-CD4+/CD8+, e mais recentemente, inúmeros efeitos indiretos (*bystander*) induzidos por mecanismos inflamatórios e apoptose de células não-infectadas foram identificados (Haase, 2010; Iwasaki, 2012; Stevenson, 2003). Na ausência de intervenção terapêutica, sintomas e sinais

clínicos característicos resultantes desta interação vírus-hospedeiro foram classificados em três fases clínicas distintas (fase aguda, crônica e síndrome da imunodeficiência adquirida) para facilitar o reconhecimento do grau de progressão da infecção pelo HIV-1 (Fig.5)(Moir et al., 2011).

Figura 5 - Progressão clínica natural (na ausência de tratamento) da infecção pelo HIV-1. As etapas chaves no estabelecimento da infecção com possíveis alvos para intervenção terapêutica estão enumeradas: 1) Baixo fitness do HIV-1 e entrada nas primeiras células-alvo; 2) Fase ascendente de proliferação viral; 3) Contenção parcial da infecção por resposta imune celular; 4) Ativação imune crônica.



Autor: Mogensen e cols. (2010).

A fase aguda ou primária da infecção é o período de estabelecimento da infecção viral, apresentando um crescimento rápido da proliferação viral e depleção de linfócitos nas mucosas, circulação e órgãos linfóides distais (como tecido linfóide associado a trato gastro-intestinal (GALT), baço e timo), sendo controlado parcialmente pela imunidade mediada por linfócitos CD8+/CD4+, através de atividade citotóxica a células infectadas e produção de anticorpos anti-HIV-1 (McMichael et al., 2009; Mogensen et al., 2010). Esta fase pode compreender seis semanas pós-exposição, de forma assintomática ou com síndrome retroviral aguda, caracterizada por febre, linfadenopatia, e sintomas secundários como dores musculares, *rash* cutâneo e diarreia (Kahn e Walker, 1998; Mogensen et al. 2010).

A fase crônica da infecção é caracterizada por um período assintomático com uma redução persistente dos níveis de linfócitos circulantes e acompanhado de aumento lento na viremia, podendo ter duração de quatro a dez anos de acordo com a manutenção dos níveis de linfócitos CD4+ (Douek et al., 2003; Yates et al., 2007). A translocação de produtos microbianos na circulação (perda de integridade da

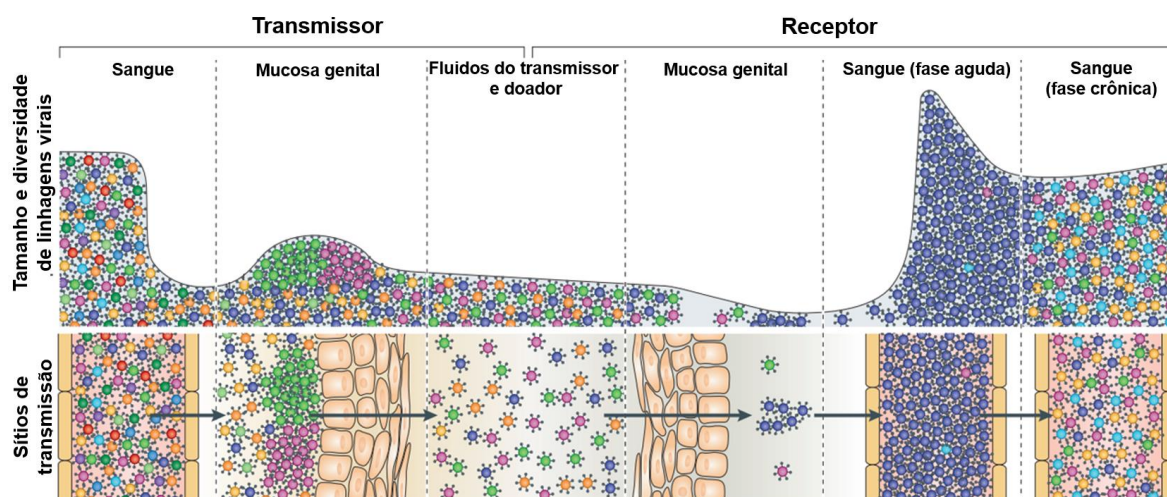
GALT e linfócitos Th-17) e liberação de produtos virais (gp120, Nef, ácidos nucleicos) propiciam ativação imune crônica e tem sido associado à inibição de resposta efetiva a infecções oportunistas por *M. tuberculosis*, citomegalovirus (CMV), vírus da herpes simplex (HSV) e fungos (Lawn et al., 2001; Douek et al., 2003).

Na persistência do quadro de ativação imune crônica, uma drástica perda funcional e numérica de linfócitos CD4⁺ e limitada capacidade regenerativa em órgãos linfóides como timo e baço (Zeng et al., 2012), caracterizam a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (Lawn et al., 2001). O colapso do sistema imune propicia o estabelecimento de infecções oportunistas e neoplasias, assim como maior morbidade em co-infecções virais (HBV, HCV, HTLV-1), que quando não tratadas levam rapidamente à morte (Pantaleo, 1993).

2.4 TRANSMISSÃO MATERNO INFANTIL DO HIV-1 (TMI)

A diversidade genética do HIV-1 na infecção crônica tem sido atribuída à adaptação de variantes em diversos compartimentos no hospedeiro, acentuada pela alta taxa de erros durante a incorporação de nucleotídeos pela transcriptase reversa (Mogensen, 2009). A redução na diversidade de variantes genéticas entre mucosas e sangue periférico na fase aguda, tem indicado que componentes estruturais, celulares ou solúveis de mucosa, epitélios ou fluidos atuem como gargalos genéticos durante a transmissão sexual e materno-infantil (Fig. 6) (Joseph et al., 2015, Nakamura et al. 2017; Ronen et al., 2015).

Figura 6 – Padrão de diversidade viral durante a transmissão sexual do HIV-1 revela efeitos de gargalo genético desempenhado em diferentes compartimentos do hospedeiro transmissor e do receptor.



Autor: Joseph e cols.(2010)

Estudos em coortes de gestantes infectadas pelo HIV-1 têm apontado que mesmo em condições de alta carga viral materna, os índices de transmissão materno-infantil (TMI) variam de 5 a 10% na gestação, 10 a 20% no parto e 5 a 15% na amamentação (Kourtis et al., 2006), enquanto a terapia antirretroviral durante a gestação reduz os índices de TMI entre 0.3 a 2% (European Collaborative Study, 2005). Eventos como a ruptura de barreiras epiteliais e mucosas, co-infecções, modo/duração do trabalho de parto, carga viral materna e do leite materno modificam propriedades inibitórias na placenta, mama e mucosas genitais maternas; assim como na placenta, mucosas orais e intestinais nos fetos/neonatos, dificultando a investigação de fatores de resistência do hospedeiro na transmissão e à exposição ao HIV-1 (Tobin e Aldrovandi, 2013).

2.4.1 Transmissão intrauterina (TIU)

A interface intrauterina é constituída por uma membrana placentária que separa o conteúdo sanguíneo materno do embrionário, no qual ocorre a troca de um conteúdo complexo formado por nutrientes, gases, anticorpos e hormônios, servindo também como barreira à transmissão de patógenos e substâncias tóxicas ao embrião. A modificação da composição de células e componentes solúveis placentários e a redução da membrana placentária ao longo da gestação tem sido indicado como eventos importantes no risco à TMI (Al-Husaini, 2009), com o risco mais baixo nas primeiras 14 semanas de gestação (1%) e maior entre a 14^a e 36^a semana (4%)(Kourtis et al., 2006).

A placenta é caracterizada por uma face materna composta pela decídua basal (de origem do endométrio) que compartimentaliza o sangue materno, uma interface materno-fetal formada por uma capa trofoblástica (citotrofoblastos e mais externamente sinciciotrofoblasto) e capilares da vilosidade coriônica de origem fetal. Células imunes como CDs, macrófagos placentários (Células de Hofbauer, CHs), *Natural Killers* (NK), linfócitos CD4⁺; e trofoblastos regulam a resposta imune local por uma variedade de citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e hormônios (Volmink and Marais, 2008; Tobin and Aldrovandi, 2013), no qual principalmente CHs, trofoblastos e linfócitos CD4⁺ foram descritos como alvos de infecção e replicação viral.

A alta frequência de citocinas do tipo Th-2 como a IL-4 em placentas de mães não-transmissoras em comparação com as transmissoras, poderia indicar a importância da redução nos níveis de CCR-5 de membrana em linfócitos CD4+ locais e menor replicação do HIV-1 em tecidos placentários mediados por estas citocinas (Behbahani et al., 2000; Patterson et al., 2001). Por outro lado, a polarização de resposta para o tipo Th-1 tem sido mais frequente entre placentas de transmissores do HIV-1, no qual mecanismos como a transcrição do HIV-1 induzidos por citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α em trofoblastos infectados e aumento de CCR-5 mediado por citocinas Th-1 facilitariam a proliferação placentária do HIV-1 (Vidricaire et al., 2003). Elevados níveis séricos de IL-6, IL-1Ra e IL-7 na placenta também foram associados à transmissão intrauterina (Kumar et al., 2012), descritos previamente na indução transcricional do provírus ou associados à progressão à AIDS (Poli et al., 1990; Kreuzer et al., 1997).

2.4.2 Transmissão intra-parto (TIP)

A transmissão intra-parto (TIP) compreende o período inicial do parto até a expulsão do neonato, no qual pode haver contato com o sangue materno durante a transferência de conteúdo placentário ou com secreções na passagem do neonato pelo canal vaginal. A TIP representa o maior risco entre gestantes não tratadas com TAR, compreendendo cerca de 49% de todas TMI (Kourtis et al., 2006).

Neste contexto, o risco de transmissão é reduzido pela cesárea eletiva em torno de 70% em comparação por parto vaginal, enquanto cesáreas de emergência reduzem o risco à 20%, principalmente por maiores chances na presença de rupturas na placenta, denominadas microtransfusões placentárias (The International Perinatal HIV Group, 1999). A detecção da enzima fosfatase alcalina placentária em cordões umbilicais, tem sido utilizada como indicador de microtransfusões e maior risco à TIP (Kwiek et al., 2006).

O risco na TIP associado ao tempo de contato com o sangue materno e fluidos genitais na passagem pelo canal vaginal foi indicado por investigações em coortes de gêmeos, no qual o primeiro nascituro apresentava 35% de risco de TIP enquanto o risco era reduzido a 5% para o segundo (Duliège et al., 1995); associado a tempos prolongados no trabalho de parto (por mais de quatro horas)(Landesman et al.,

1996) e detecção de HIV-1 de sangue materno presente em aspirados gástricos nos neonatos (Nielsen et al., 1996).

2.4.3 Transmissão pós-parto (TPP)

A transmissão pós-parto através do leite materno ocorre com um sistema imune fetal e intestino mais maduro que durante a TIU e TIP, apresentando índices menores de progressão à doença e mortalidade que as demais vias de TMI (Fawzi et al., 2001; Marinda et al., 2007). Nesse contexto, a recomendação do aleitamento entre gestantes infectadas representa um dilema principalmente em países com menor acesso à TAR, pelos riscos associados à infecção pelo HIV-1, mas também por vantagens nutricionais e no amadurecimento do sistema imune neonatal associado à amamentação, atuando contra o desenvolvimento de inúmeras infecções. A redução em hospitalizações de neonatos associado à amamentação exclusiva foi de 53% em casos de diarreia e de 31% em doenças respiratórias, em comparação a fórmulas nutricionais (Quigley et al., 2007).

O epitélio mamário representa a primeira barreira durante a transmissão de partículas virais da circulação para o leite materno, apresentando em média carga viral 100 vezes menor do que a presente no sangue periférico (Heath et al., 2010) e mesmo na ausência de TAR, cerca de um terço das mulheres infectadas não apresentam níveis de RNA viral detectáveis, enquanto outro terço produz níveis de RNA viral abaixo de 50 cópias/mL (Semrau et al., 2008). Fatores associados a maior transmissão viral ao leite materno como alta carga viral materna, condições inflamatórias como mastites e abscessos, e aleitamento combinado à fórmulas são mais conhecidos, no entanto a análise de fatores protetores no leite tem sido dificultada pela alta variabilidade na composição do leite entre as mulheres e do tempo de amamentação (Moriuchi e Moriuchi, 2004; Aldrovandi e Kuhn, 2010; Van de Perre et al., 2012).

O leite contém uma rica quantidade de citocinas, quimiocinas, receptores solúveis, peptídeos antimicrobianos, anticorpos e hormônios que se interagem com componentes de mucosas orais, intestinais e sistema imune neonatal/infantil, modulando a tolerância a antígenos provenientes da dieta e de microorganismos não-invasivos, e induzindo resposta a antígenos derivados de patógenos. De forma

direta, componentes presentes no leite, como anticorpos HIV-1-específicas (IgA e indutor de citotoxicidade celular), lactoferrina e peptídeos antimicrobianos (alfa e beta defensinas) foram evidenciados respectivamente como fatores de neutralização de vírions e indução de citotoxicidade, de inibição da ligação e fusão membranar do HIV-1 em células dendríticas e como fator de lise do capsídeo viral (Groot et al., 2005; Jia et al., 2001; de Souza Campos Fernandes et al., 2011; Tobin e Aldrovandi, 2013).

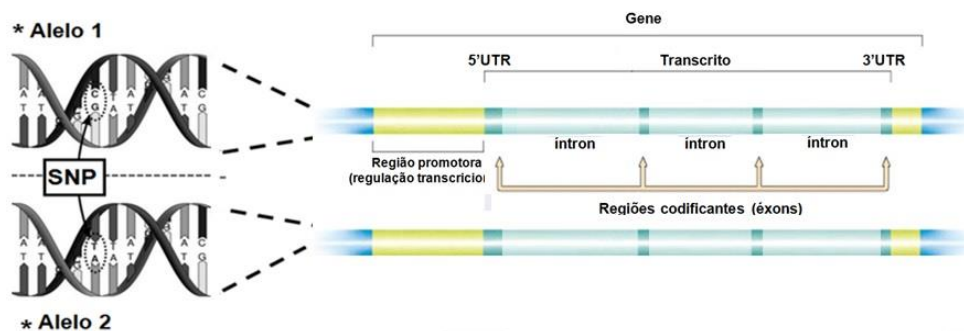
2.5 IMUNOGENÉTICA DO HOSPEDEIRO NA RESPOSTA À INFECÇÃO PELO HIV-1

Após a descrição da sequência completa de cerca de 3 bilhões de bases nucleotídicas do genoma revelado pelo Projeto Genoma Humano em 2003, foi possível viabilizar o mapeamento e distribuição de polimorfismos (variações alélicas com frequências populacionais acima de 1%) através de consórcios internacionais como o HapMap (*International Haplotype Mapping Project*) e mais recentemente *1000 Genomes* (Abecasis et al., 2011).

A função e distribuição populacional de polimorfismos gênicos, dentre os quais se destacam os polimorfismos de base única (SNPs), com cerca de 10 milhões de polimorfismos descritos em todas as populações, tem revelado como a heterogeneidade alélica foi influenciada historicamente pela composição entre diferentes populações humanas, e como isto pode implicar na interação das populações com o seu ambiente. Neste sentido, inúmeros estudos puderam evidenciar a influência de polimorfismos em diversas funções metabólicas e imunológicas, tendo implicações na susceptibilidade a doenças infecciosas e autoimunes (Syvanen et al., 2005).

Polimorfismos gênicos em regiões codificantes e regulatórias (região promotora do gene, região não-traduzida 5' (5'UTR), 3'UTR e sítios de *splicing*) podem contribuir na modulação da expressão gênica em etapas diversas, tais como: mudança estrutural/funcional da proteína, nos níveis transcricionais mediado por região promotora, na estabilidade secundária e processamento do RNA (Fig. 7)(Brookes et al., 1999).

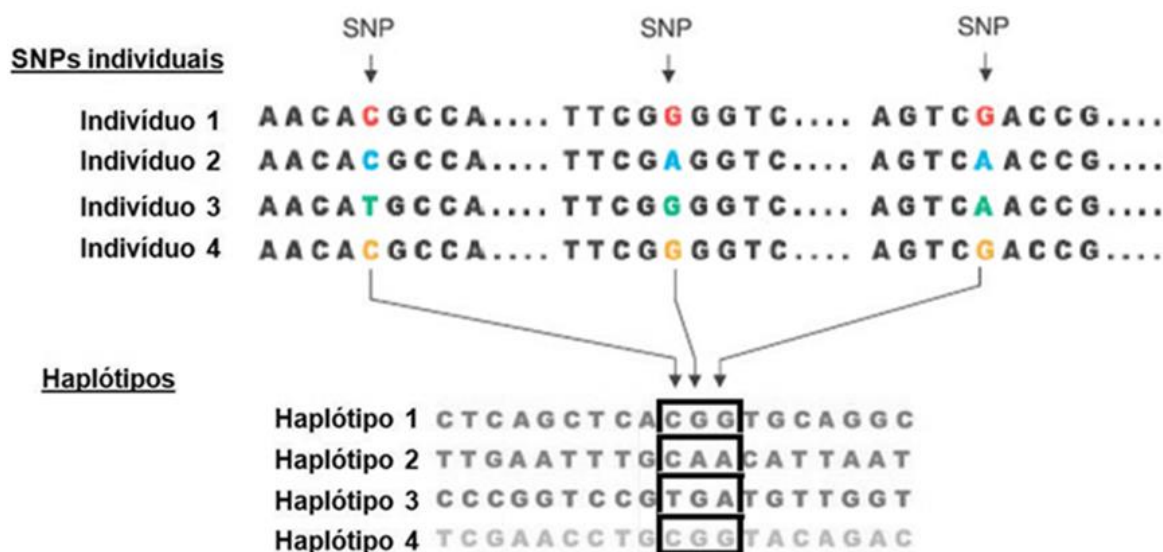
Figura 7 - Representação esquemática de um locus polimórfico de base única (SNP) e as regiões (*) nas quais os SNPs podem ter importância funcional.



Autor: Anselmo Jiro Kamada (2017).

Polimorfismos localizados em *loci* cromossômicos próximos entre si podem ser transmitidos hereditariamente em conjunto, forma de transmissão denominada efeito de desequilíbrio de ligação (ou desequilíbrio de *linkage*, LD). Além da contribuição singular de cada polimorfismo, diferentes combinações alélicas mantidas por LD, conhecidas como *haplótipos* (Fig. 8), contribuem na variação inter-individual da expressão gênica, apresentando frequência heterogênea entre as populações (Risch *et al.*, 2000).

Figura 8 – Diferenças inter-individuais de SNPs e representação dos *haplótipos* de SNPs presentes em um determinado grupo de indivíduos.



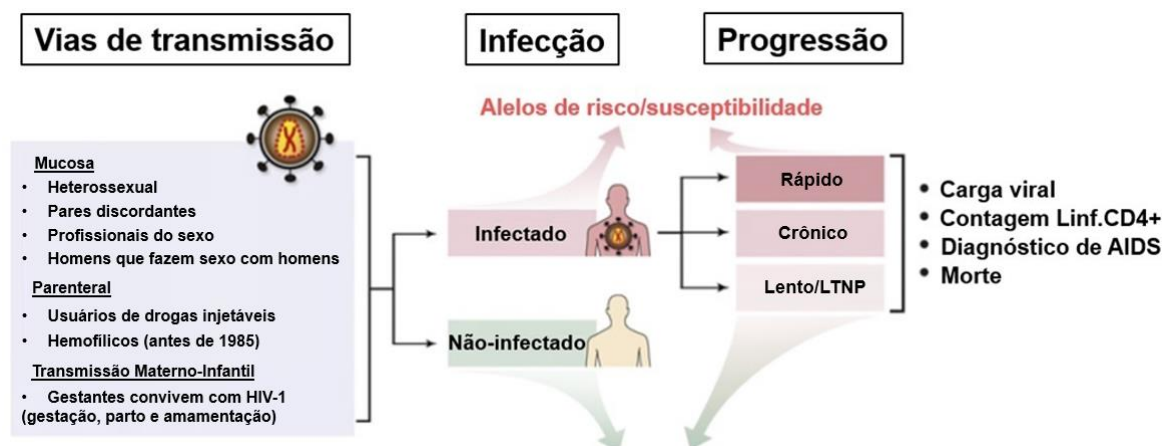
Autor: Anselmo Jiro Kamada (2017).

Diferenças inter-individuais na susceptibilidade à transmissão do HIV-1 e progressão à AIDS têm sido encontradas em populações com composição genética distintas, revelando a importância de variações polimórficas durante a transmissão (mucosal ou parenteral), tempo de progressão clínica à AIDS, co-infecção (tuberculose, HBV, HCV) e resposta ao tratamento antirretroviral (efeitos adversos,

níveis séricos de antirretrovirais)(Fig. 8)(Lama e Planelles, 2007; An, 2010; Raghavan et al., 2012; van Manen et al., 2012).

A caracterização imunogenética da infecção pelo HIV-1 pôde ser realizada através de investimentos massivos por países desenvolvidos no recrutamento e acompanhamento de coortes européias e norte-americanas, focadas principalmente em populações-chave com comportamento de risco como usuários de drogas injetáveis, homens que fazem sexo com homens (HSH) e indivíduos hemofílicos infectados na década de 80. No entanto estas descobertas refletem com menor representatividade o background genético das populações mais afetadas pela epidemia do HIV-1 em países em desenvolvimento e subdesenvolvidos, que ainda enfrentam desafios na contenção da infecção por métodos preventivos, alcance da população à terapia antirretroviral e acompanhamento pré-natal de mães infectadas (An, 2010).

Figura 9 – Grupos de estudo e fenótipos clínicos para estudo de associação genética da susceptibilidade à infecção e progressão à AIDS (Adaptado de An et al 2010). *LTNP = Não-Progressores de longo prazo (Contagem de céls. CD4+ estáveis e níveis baixos de viremia por no mínimo 10 anos na ausência de HAART).



Autor: An e cols. (2010).

Estudos de associação genética em larga escala (*“high throughput”*) conhecidos como Genome-Wide Association Studies (GWAS)(Telenti and Carrington, 2008; Fellay et al., 2010; Bashirova et al., 2011; van Manen et al., 2011, 2012) e análises de genes-candidatos (CGA)(Kaslow et al., 2005; An e Winkler, 2010) têm auxiliado na descoberta de diversos marcadores de susceptibilidade, principalmente por alelos do complexo antígeno leucocitário humano (HLA), no entanto estima-se que somente 15-20% dos casos de heterogeneidade à infecção

pelo HIV-1 possa ser explicado pelas variantes identificadas até o momento (An e Winkler, 2010). Estudos de genética reversa por RNA de interferência (siRNA e shRNA) apontaram modificadores fenotípicos por inibição transcricional (“*knock-down*”) em modelos celulares de infecção, no entanto poucos marcadores foram ratificados em GWAS e CGA (Brass et al., 2008; Yeung et al., 2009).

A análise de genes candidatos (CGA) possibilitaram evidenciar o primeiro marcador de resistência à transmissão horizontal do HIV-1 em 1996, a deleção de 32 pares de base nucleotídicas do gene codificante do CCR-5 (*CCR5-Δ32*) mais frequente em populações européias, norte africanas e da ásia ocidental (4 a 16% da população). Além da transmissão horizontal, o alelo *CCR5-Δ32* apresentou função de resistência durante a progressão à AIDS, assim como alelos em genes codificantes de receptores de quimiocinas (*CCR2*, *CXCR6*), quimiocinas (*CCL5*, *CCL2*), citocinas (*IL10*, *IFNG*), do sistema de apresentação de antígenos (*HLAB*27*, *HLAB*57*, *KIR3DS1*) e fatores de restrição (*APOBEC3G*, *APOBEC3B*, *TRIM5*) evidenciados por CGA (Carrington and O’Brien, 2003; O’Brien and Nelson, 2004; Javanbakht et al., 2006; An et al., 2009; Bashirova et al., 2011).

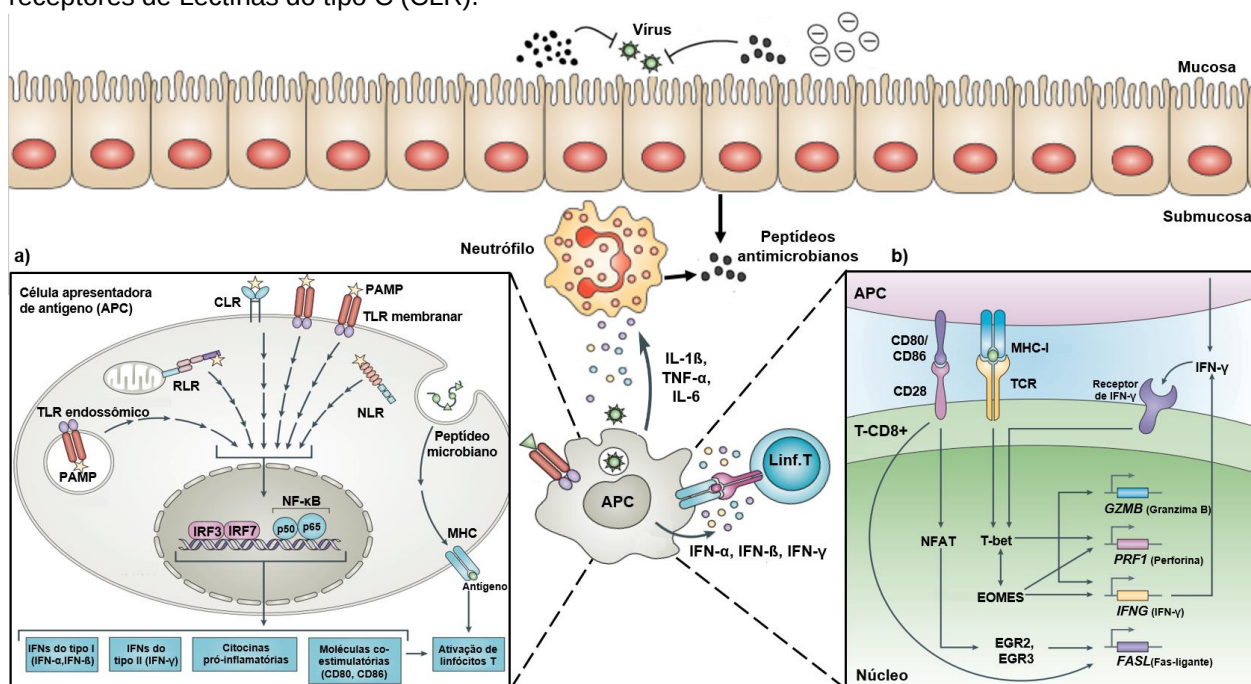
2.5.1 Fatores imunogenéticos associados à transmissão materno-infantil do HIV-1 (TMI)

Dentre os fatores genéticos associados por CGA à TMI, a discordância entre HLA de classe I materno-fetal tem se destacado durante a resistência transmissão, tendo em vista que a produção de anticorpos anti-MHC ou resposta alorreativas por linfócitos T e NK poderia elicitar efeitos protetivos contra cepas de escape da resposta imune materna (Hengel et al., 1998; MacDonald et al., 1998; Paximadis et al., 2011; Walter et al., 2008). Além da discordância de HLA, o efeito de proteção à TMI foi associada a alelos polimórficos presentes somente em um membro do par materno-neonatal: nas mães pelo HLA de classe I (B4901, B5301, A2/6802 and B18) (Winchester et al., 1995, 2004; MacDonald et al., 2001; Farquhar et al., 2004), nos neonatos pelo MHC não-clássico HLA-G (del/ins 14 pb e 3777G>C 3’UTR) (Segat et al., 2009, 2014) ou em pelo menos um dos dois (HLA-B*27 ou HLA-57:1) (Mackelprang et al., 2008; Thobakgale et al., 2009).

Além de alelos do sistema MHC no contexto da transmissão materno-infantil, o alelo *HS3ST3A1* rs8069770 T envolvido potencialmente na expressão de heparan sulfato na placenta foi associado à transmissão intrauterina pelo único estudo de GWAS (Joubert et al., 2010). Entre componentes da imunidade inata, alelos previamente associados à transmissão horizontal e progressão à AIDS foram corroborados na TMI, como alelos em genes codificantes de: quimiocinas (*SDF1*, *CCL3L1*, *CCL4L2*) (John et al., 2000; Tresoldi et al., 2002; Gonzalez et al., 2005; Shostakovich-Koretskaya et al., 2009) e seus receptores de quimiocina (*CCR5* e *CCR2*) (Michael et al., 1997; Misrahi et al., 1998; Brouwer et al., 2005).

Variações polimórficas em genes de componentes da imunidade inata como o receptor reconhecedor de padrão (PRR) Toll-like 9 (*TLR9*) (Ricci et al., 2010), lectina ligadora de manose (*MBL2*) (Boniotto et al., 2000), receptor de lectina do tipo C L-SIGN (*LSIGN*) (Boily-Larouche et al., 2009) e receptor de anticorpos IgG FcγRIIIa (*FCGR1IA*) (Brouwer et al., 2004) ratificaram a importância da resposta inata na resistência à TMI, no entanto a contribuição de variações em componentes expressos em APCs, neutrófilos, células NKs, trofoblastos, células epiteliais gastro-intestinais/mamárias, como fatores de restrição viral, componentes citotóxicos, citocinas e proteínas antimicrobianas ainda são desconhecidos (Fig. 10).

Figura 10 – Representação esquemática de componentes da imunidade inata que modulam a resposta antiviral na mucosa. Receptores semelhantes a Toll (TLR), Nod (NLR), RIG-I (RLR) e receptores de Lectinas do tipo C (CLR).



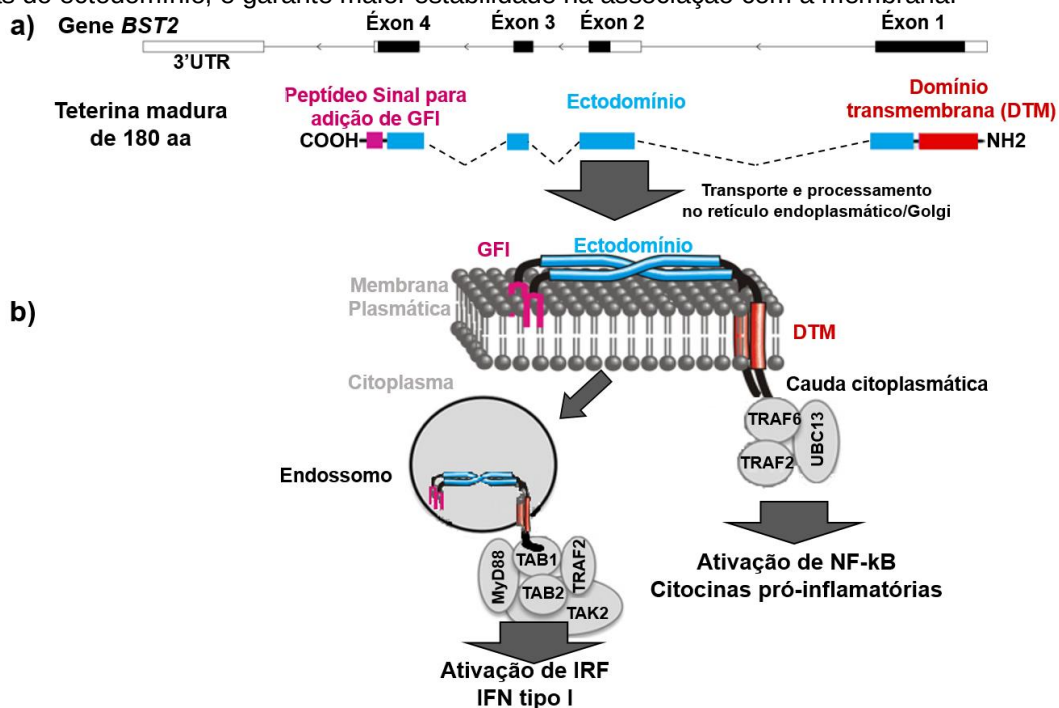
Autor: Glimcher e cols.(2004) e Munz e cols. (2009).

2.5.1.1 Teterina/BST-2 (*Bone marrow stromal cell antigen-2*)

A teterina/BST-2 (*"Bone marrow stromal cell antigen-2"* ou CD317) é uma proteína transmembranar de 30-34 kDa que foi inicialmente descrita como um receptor (ao ILT-7 produzido por células estromais) de células B maduras e mielomas. No entanto, ganhou maior notoriedade a partir de 2008 como fator de restrição em diversas infecções por vírus envelopados (HTLV-1, HCV, KSHV, Ebola, vírus de Marburg e de Lassa)(Evans et al., 2010; Yan and Chen, 2012).

A teterina é constituída por 180 a.a. organizados em uma porção N-terminal com uma cauda citoplasmática, um domínio transmembrana (DTM), um ectodomínio formado por α -hélices e glicosilfosfatidilinositol (GFI) na porção C-terminal que se ancora a *rafts* lipídicos membranares (Fig. 11). A função de restrição viral tem sido atribuída à capacidade de ancoramento das porções terminais a envelopes virais, impedindo células infectadas de liberarem vírions ao ambiente extracelular. Além da restrição direta, sua cauda citoplasmática modula a produção de citocinas pró-inflamatórias e Interferon do tipo I mediado por IRF e NF- κ B, por ligação dos motivos de tirosina a TRAF6 (Galão et al. 2012) e TAB1 e TAK1 (Tokarev et al. 2013).

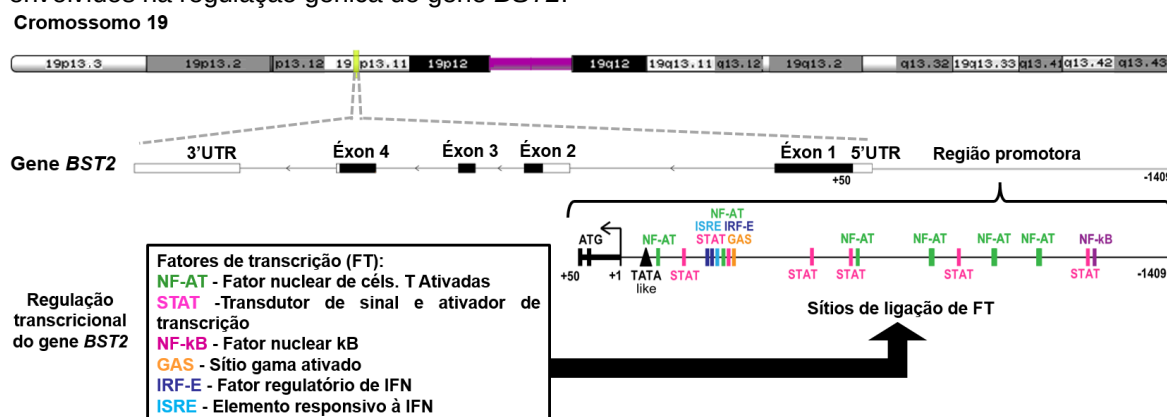
Figura 11 – a) Regiões codificantes do gene *BST2* correspondentes aos domínios protéicos da Teterina. b) estrutura em dímero associada à membrana e transdução de sinal mediado pela cauda citoplasmática. A formação em homo-dímero de Teterinas depende de ligações covalentes entre cisteínas do ectodomínio, e garante maior estabilidade na associação com a membrana.



Autor: Anselmo Jiro Kamada (2017).

O gene codificante da teterina (*BST2*) é composto por quatro éxons e está situado no cromossomo 19 (posição 19p13.1) apresentando expressão constitutiva em diversas células do sistema imune como linfócitos B e T, macrófagos, células dendríticas e monócitos (Loschko et al., 2011; Giese and Marsh, 2014). A indução de atividade antiviral nestas células é regulada principalmente por fatores de transcrição induzidos por Interferon (IFN) do tipo I e II (Fig.12) assim como fatores de restrição APOBEC3G, TRIM-5a e SAMHD-1.

Figura 12 - Localização do gene codificante da teterina/*BST2* (*BST2*) e os fatores de transcrição (FT) envolvidos na regulação gênica do gene *BST2*.



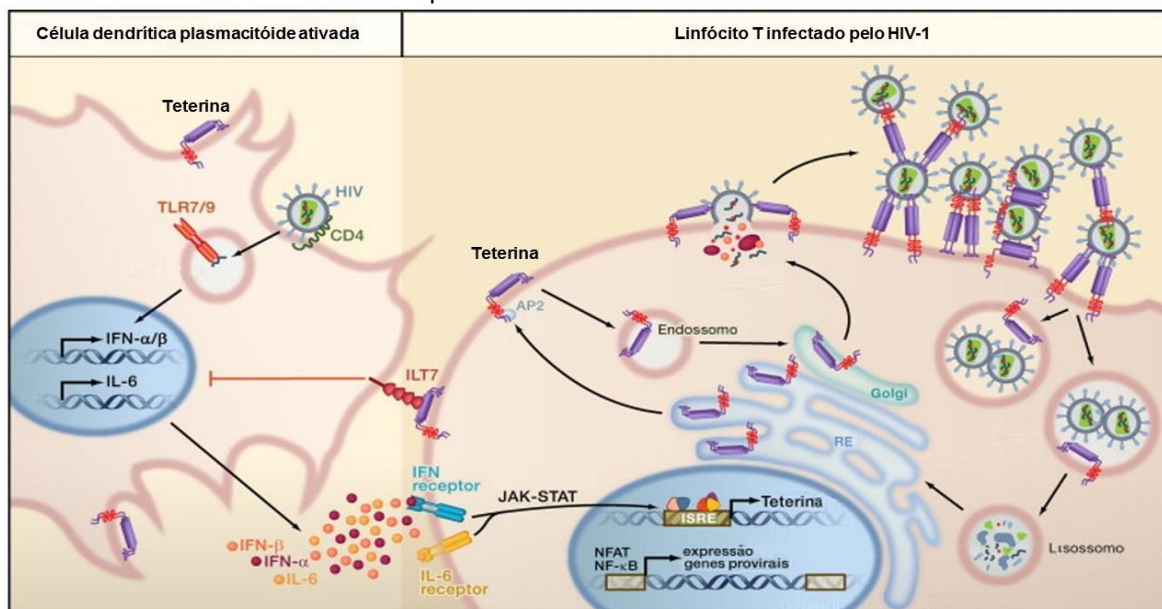
Autor: Anselmo Jiro Kamada (2017).

A retenção física de partículas de HIV-1 pela teterina foi caracterizada recentemente pela ligação do GFI ao envelope viral, o qual induz a fosforilação de resíduos de tirosina na sua porção citoplasmática e ativação de citocinas pró-inflamatórias mediada pelo fator de transcrição NF-kB (Galão et al., 2014). Além disso, a retenção física facilita a endocitose e degradação endossomal do HIV-1 (Neil et al., 2006) reforçando a suas propriedades de restrição ao vírus.

A atividade de restrição pela teterina é amplamente antagonizada pela proteína acessória Vpu do HIV-1, levando à inibição da NF-kB por fosforilação dos resíduos de tirosina em sua cauda citoplasmática (Neil et al., 2008), inibição da endocitose de partículas virais (Neil et al., 2006) e retenção de teterinas no retículo endoplasmático (Van Damme et al., 2008)(Fig.13). Evidências recentes apontam no entanto que polimorfismos de base única (SNPs) situados na região promotora do gene *BST2* investigados em uma coorte espanhola (Laplana et al., 2013) e norte-americana (Hancock et al., 2015), contribuíram respectivamente no menor tempo de progressão à AIDS e maior proteção à transmissão horizontal, indicando que fatores

que modulam a expressão de teterina podem implicar na progressão clínica e compensar possíveis efeitos inibitórios do HIV-1 à atividade de restrição da teterina.

Figura 13 – Regulação transcricional da teterina mediado por IFN e citocinas pró-inflamatória produzidos durante a resposta de célula dendrítica plasmacitóide ao HIV-1 e mecanismo de restrição da Teterina em linfócito-T infectado pelo HIV-1.

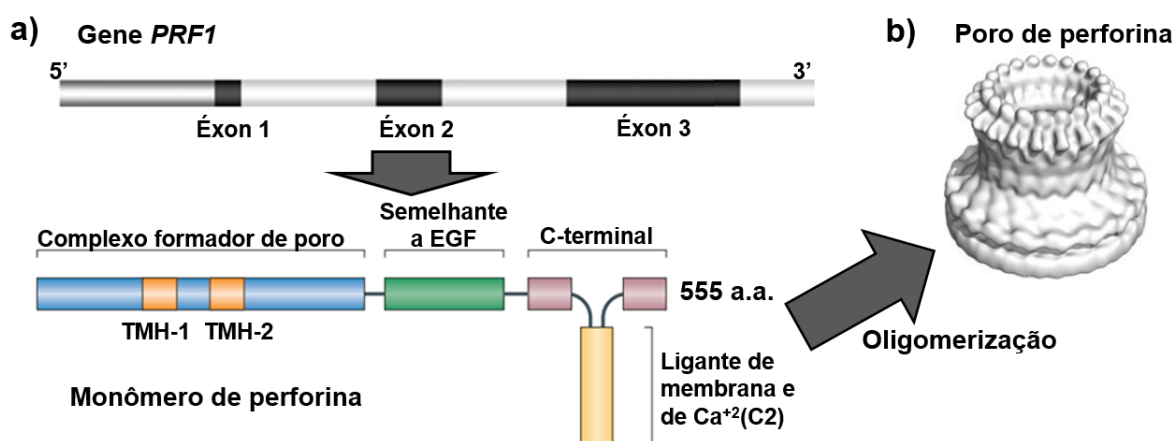


Autor: Sauter *et al.* (2010).

2.5.1.2 Perforina

A perforina é uma proteína de 72-75 kDa, membro da família de proteínas MACPF (Complexo de ataque de membrana/Perforina) que atua essencialmente como unidade componente de poros tubulares citolíticos produzidos durante a resposta citotóxica (Anderluh *et al.*, 2014). Esta função é atribuída à sua composição estrutural de 555 aminoácidos organizada em domínio MACPF (complexo formador de poro) em sua extremidade N-terminal, domínio similar à EGF e domínio C2 ligante de Ca^{2+} em sua porção C-terminal. Na presença de cálcio, a formação de poros circulares se dá a partir de monômeros de perforina seguindo-se as etapas de ligação membranar de domínio dependente de cálcio (C2); oligolimerização por ligações adjacentes entre domínios N-terminais; e rearranjo de clusters de α -hélices (TMH-1 e TMH-2) em grampos antiparalelos de folhas β que expandem o espaço intermembranar em cerca de 150 Å para a formação de poro membranar (Fig.14a e 14b) (Anderluh *et al.*, 2014).

Figura 14 – a) Organização gênica da PRF1 e domínios estruturais de um monômero de perforina e b) formação de poro de perforina pela oligomerização de 20 a 50 monômeros de perforina a membranas de células-alvo.



Autor: Voskoboinik e cols.(2015).

A indução citolítica sobre células infectadas por vírus, células tumorais ou não-próprias é regulada principalmente por reconhecimento específico e inato mediados por linfócitos citotóxicos: um dependente de apresentação antigênica por complexo MHC de classe I a TCR de linfócitos T CD8+ citotóxicos; e outro inato por ativação de receptor membranar NKG2 (com domínio de lectina) e KIR (receptor *Killer Ig-like*) em células *Natural Killers* (NK)(Voskoboinik et al., 2010). Embora as vias de ativação de células NK e linfócitos T CD8+ seja distintas, a indução do efeito citolítico mediada por exocitose de grânulos lisossomais é conservada entre ambos (D'Angelo et al., 2012). Perforinas e serina proteases conhecidas como granzimas são liberadas na sinapse imunológica a células-alvo, com funções respectivas de formação de poros de entrada para granzimas e indução citolítica por clivagem de proteínas intracelulares (Lopez et al., 2012).

O gene codificante da perforina *PRF1* (10q21-22)(Fig. 13a) tem sido alvo de investigação clínica pelos efeitos de suas mutações e variantes polimórficas nos desfechos de síndromes familiares autossômicas recessivas associadas à deficiência de perforina (denominadas perforinopatias), e como fator de modificação fenotípica em alguns tipos de cânceres hematológicos (Voskoboinik e Trapani, 2013). Síndromes como a linfo-histiocitose hemofagocítica primária, é caracterizada por atividade citotóxica e níveis de perforina baixa ou ausente em linfócitos CD8+ e NK; e maior produção de citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-6 durante infecções (Göransdotter Ericson et al., 2001). A influência de variações mais comuns como a A91V (alanina por valina na posição 91) tem conferido risco ao desenvolvimento da leucemia linfoblástica aguda infantil e leucemia linfoblástica aguda pré-B mesmo em heterozigose (Santoro et al., 2005; Mehta et al., 2006).

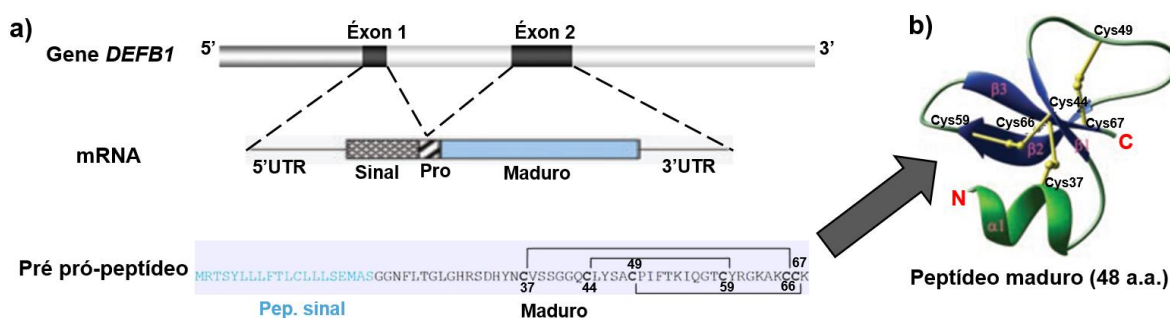
A função protetora de alelos de HLA de classe I (Winchester et al., 1995, 2004; Farquhar et al., 2004) e de susceptibilidade por KIR2DL2, KIR2DL3 e cognatos HLA-C e HLA-G (Segat et al., 2009, 2014; Paximadis et al., 2011) sugerem respectivamente que a resposta citotóxica mediada tanto por linfócitos CD8+ como por células NK pode modular a TMI. Neste contexto, a influencia de variantes no gene codificante da perforina foi investigado somente por um estudo em coorte brasileira, o qual encontrou uma associação à proteção pelo alelo *PRF1* rs885822 C (Padovan et al., 2011).

2.5.1.3 β Defensina 1

A β defensina 1 humana (hBD-1) é um membro da família de peptídeos catiônicos (de 3 a 4 KDa) denominados defensinas, classificadas em α , β e θ defensinas pelo padrão de espaçamento entre resíduos de cisteínas e pareamento das pontes dissulfeto que ligam estes resíduos (Bullard et al., 2008). A hBD-1 é codificada pelo gene *DEFB1* (8p22-p23) situado próximo à região de *cluster* gênico de defensinas (8p23.2 e 8p23.1), onde estão situados os genes da α e θ defensinas, e maioria das β -defensinas (Selsted e Ouellette, 2005; Hollox et al., 2008).

O gene *DEFB1* é composto por dois éxons e assim como as demais defensinas, sintetizam o seu produto gênico na forma de prepropeptídeo processados diferencialmente de acordo com o tipo celular específico, com o tamanho de sua forma madura variando entre 36-48 aminoácidos (Fig. 15)(Hollox et al., 2008; Prado-Montes de Oca, 2010). A hBD-1 é caracterizada estruturalmente pela presença de duas folhas beta antiparalelas e por pontes dissulfeto nos resíduos de cisteínas (37-66,44-59, 49-67)(Hollox et al., 2003; Klotman et al., 2006).

Figure 15 – a) Organização gênica e sequência de pré propeptídeo da β defensina 1 humana (hBD-1). b) Estrutura cristalizada de hBD-1 madura com o posicionamento de suas pontes dissulfeto mostrados em amarelo.



Autor: Hollox e cols. (2008)

A sua atuação como membro da primeira linha de defesa é atribuída à expressão constitutiva nos principais sítios de entrada de patógenos como a pele e mucosa oral, nasal, pulmonar, urogenital, estomacal, intestinal e renal, e em secreções como o leite materno (Klotman e Ryan, 2006; Ryan e Diamond, 2017). A indução da expressão do hBD-1 também foram descritos em monócitos e neutrófilos por estímulos como o LPS de bactérias gram negativas, IFN- α e IFN- γ ; em queratinócitos por IL-6 IL-1 β , TNF- α e IFN- γ e em células epiteliais (intestinais e pulmonares) por RNA viral de fita dupla (agonista de receptor *Toll-like-3*) (Klotman e Chang, 2006; Selsted e Ouellette, 2005; Corleis et al., 2017).

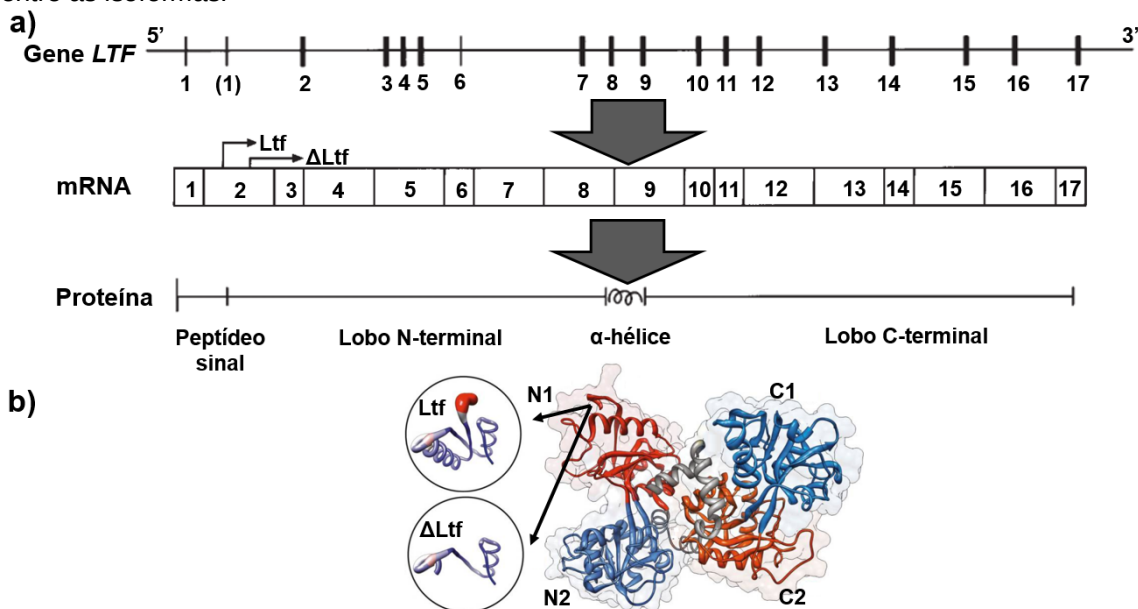
A proteção conferida pela hBD-1 durante infecções bacterianas, fúngicas e de vírus envelopados é atribuída à mudança de permeabilidade membranar e formação de poros pela interação eletrostática do hBD-1 a microorganismos (Pagzbier *et al.* 2006). Recentemente, foi demonstrado que a atividade antimicrobiana pode ser aumentada em ambientes redutores como o muco intestinal, ao favorecer a abertura de pontes dissulfetos e gerar interações entre resíduos livres de cisteína nas hBD-1 reduzidas e formar aglomerados (“*nets*”) que atuam no killing e imobilização de bactérias gram negativas e positivas (*E. coli*, *B. subtilis* e *S. aureus*), enquanto hBD-1 oxidadas apresentaram atividade bacteriostática limitadas a gram-negativas (Raschig *et al.*, 2017).

Atividades associadas à proteção à infecção pelo HIV-1 por α e β defensinas foram atribuídas principalmente aos efeitos de quimiotaxia mediado por receptor CCR-6 em APCs (β -defensinas 2 e 3), efeitos na replicação viral (α -defensina 1) e inibição de entrada viral (α defensina 5) (Chang et al., 2005; Sun et al., 2005; Furci et al., 2012). Estudos de genes candidatos têm indicado no entanto que alguns alelos polimórficos da região 5' UTR do gene *DEFB1* atuam como fatores de susceptibilidade à transmissão horizontal e vertical do HIV-1 em populações italianas e brasileiras (Braidia *et al.*, 2004; Ricci *et al.*, 2009; Segat *et al.*, 2009; Tesse *et al.*, 2009), o que corroboraria também com a função antiviral da β -defensina 1 tendo em vista que é expressa na resposta mediada por IFN- α durante a infecção aguda ao HIV-1 (Corleis et al., 2017).

2.5.1.4 Lactoferrina

A lactoferrina (ou lactotransferrina, Ltf) é uma glicoproteína de 80kDa pertencente à família das transferrinas com funções antimicrobianas e imunorregulatórias em mucosas e secreções. A Ltf ao apresentar um sítio de alta afinidade a íons Fe^{+3} em cada um dos seus dois lobos globulares (N-terminal e C-terminal, Fig.16b), atua como quelante de Fe^{+3} e inibe processos metabólicos de microorganismos dependentes deste cofator (Legrand, 2016). A porção N-terminal (principalmente através do peptídeo lactoferricina (1^o-47^o aa)) confere características antiinflamatórias à Ltf como sítio de ligação a agonista (lipopolissacarídeo) e co-receptor (CD14 solúvel) de receptor TLR-4 (Elass-Rochard et al., 1998; Majerle et al., 2003), assim como atua na imunomodulação de receptores de lectina como Siglec-1 e ICAM-3 em APCs e lectina do tipo C em células endoteliais (Zimecki, 2002; Ward et al., 2005; Graham et al., 2011).

Figura 16 – a) Organização genômica do gene LTF e localização específica no transcrito de cada isoforma quanto à posição dos seus lobos N-terminais. b) Estrutura de Ltf cristalizada e apresentação de diferenças estruturais nas extremidades N-terminais da Ltf e Δ Ltf: a presença do peptídeo sinal e dos primeiros 27 aa no lobo N-terminal conferem diferenças de localização, processamento e função entre as isoformas.



Autor: Mariller e cols. (2012) e Teng e cols. (2002).

O gene *LTF* localizado no cromossomo 3 (3p21.3), apresenta 17 éxons que codificam isoformas reguladas por dois sítios promotores (P1 e P2): uma é secretada e apresenta funções antimicrobianas e imunomodulatórias (Ltf) e a outra é intracelular e atua como fator de transcrição (Δ Ltf) (Mariller et al., 2012). A indução

transcricional pelo promotor P1 promove a síntese de Ltf e também da ativação do promotor P2 (localizado no íntron 1) pelo qual é sintetizado Δ Ltf, gerando um transcrito idêntico de Ltf mas com um éxon mais curto (éxon (1))(Fig 15a), justamente em porção do lobo N-terminal associada à ligação a receptores imunes e função de killing bacteriano pelo Ltf (Ward et al., 2005; Legrand, 2016).

A lactoferrina é produzida em células epiteliais e em grânulos secundários de neutrófilos, se apresentando em fluidos exócrinos como saliva, lágrima, fluidos biliares, pancreáticos, gástricos e genital, e particularmente no leite materno (com concentração no colostro maior em cerca de sete vezes ao leite maduro)(Teng, 2002). Neste contexto, a expressão da *LTF* é constitutiva na maioria das secreções, no entanto pode ser induzida por hormônios e citocinas inflamatórias da ativação de fatores de transcrição como o elemento responsivo ao estrógeno (ERE), elemento responsivo à hormônio *half site* (1/2 HRE) e por NF-kB/cRel (Liu et al., 2003; Hoedt et al., 2010).

Mecanismos antivirais atribuídos à Ltf durante a infecção por HIV-1 foram evidenciados previamente como o bloqueio da interação entre a gp120 a co-receptores CCR-5 e CXCR-4 e inibição de replicação viral em células infectadas (Berkhout et al., 2002; Saidi et al., 2006). Neste contexto, a influência de polimorfismos do gene *LTF* (T29A and R47K) foram avaliados entre quatro coortes (italiana, brasileira, indiana e zambiana) de transmissão materno-infantil por Zupin et al. (2016), no entanto nenhuma das variantes conferiu risco à TMI.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência de polimorfismos genéticos em genes codificantes de componentes da imunidade inata na susceptibilidade à transmissão materno-infantil (TMI) do vírus da Imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Identificar amostras elegíveis ao estudo quanto aos critérios clínicos de exposição viral nas vias distintas de TMI (intrauterina, intra-parto e pós-parto) a partir de banco de amostras de mães e neonatos/crianças da coorte de amamentação exclusiva de Lusaka (Zambia);

3.2.2 Identificar amostras elegíveis quanto à progressão clínica a partir da coorte brasileira de progressão adulta à AIDS de Porto Alegre (Brasil) e da coorte italiana de progressão infantil à infecção pelo HIV-1 de Trieste (Itália);

3.2.3 Avaliar polimorfismos de base única (SNPs) no gene codificante da Teterina (*BST2*) entre gestantes infectadas pelo HIV-1 como fatores de transmissão viral materna e como fatores de susceptibilidade em crianças expostas ao HIV-1 por diferentes vias de TMI;

3.2.4 Avaliar o risco conferido por SNPs do gene codificante da Teterina (*BST2*) quanto ao tempo de progressão à AIDS adulta e na progressão infantil ao HIV-1.

3.2.5 Avaliar o risco conferido por SNPs em genes codificantes da Lactoferrina (*LTF*), Beta-Defensina 1 (*DEFB1*) e Perforina (*PRF1*) como fatores de transmissão viral em mães infectadas pelo HIV-1 e em neonatos expostos a diferentes vias de TMI.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 GRUPO DE ESTUDO

A avaliação da susceptibilidade genética conferida por componentes da imunidade inata durante a transmissão materno-infantil do HIV-1 (descrita nos Capítulos I e II) foi realizada através do estudo do tipo caso-controle em coorte de 101 mães que convivem com HIV-1 e 331 neonatos expostos à transmissão do HIV-1 durante o parto. A coleta foi coordenada pela Dr^a Louise Kuhn durante o ensaio clínico randomizado *Zambian Exclusive Breastfeeding Study* (ZEBS, ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00310726) nos ambulatórios da *George Clinic* e *Chawama Clinic* na cidade de Lusaka, compreendendo o período de Maio de 2001 a Setembro de 2004.

No capítulo I, a influência de variantes do gene *BST2* na progressão clínica da infecção pelo HIV-1 em adultos e em crianças foi avaliada respectivamente em uma população brasileira de Porto Alegre e italiana de Trieste. A triagem de 88 portadores adultos com diferentes perfis de progressão à Síndrome da Imunodeficiência Adquirida - AIDS (37 progressores rápidos, 30 progressores crônicos e 21 não-progressores de longo prazo) foi coordenada pela Dr^a Sabrina Esteves em população brasileira proveniente de Porto Alegre (RS) através do Hospital Conceição e Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS). Co-variáveis como idade, etnia, frequência alélica da deleção CCR5 Δ 32, tempo de progressão clínica (diagnóstico até a AIDS), tipo de exposição ao HIV-1 e presença de co-infecções na coorte adulta de progressão foram considerados juntamente com o perfil genotípico para avaliação da influência de cada um no desfecho clínico.

A coorte pediátrica de 88 crianças italianas infectadas pelo HIV-1 com diferentes perfis de progressão clínica (classificadas de acordo com os critérios da 1994 *CDC AIDS surveillance case definition*) foi selecionada no ambulatório da divisão pediátrica do Hospital IRCCS Burlo Garofolo em Trieste. Foram considerados Progressores rápidos (RP) aqueles com desenvolvimento clínico severo nos primeiros dois anos de infecção e os progressores lentos (SP) aqueles que desenvolviam imunossupressão severa após oito anos de idade.

4.2 PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS

O DNA genômico foi extraído por meio do método *salting out* a partir de amostras de células mononucleares de sangue periférico cedidas pelos voluntários adultos enquanto amostras sanguíneas de neonatos da coorte ZEBS e coorte pediátrica italiana foram obtidas com o uso do cartão *Guthrie*.

4.3 SELEÇÃO DE POLIMORFISMOS E GENOTIPAGEM

A escolha de SNPs do gene *BST2* no Capítulo I inicialmente baseou-se em uma seleção prévia daqueles com frequência significativa na coorte africana de 331 portadores do HIV-1, através de sequenciamento completo do gene *BST2*, coordenado pelo Dr. Sergio Crovella no IRCCS Burlo Garofolo – Trieste (Itália). A réplica do estudo foi proposta para três populações distintas com o intuito de avaliar a susceptibilidade à infecção durante a transmissão vertical (Zâmbia), progressão à AIDS infantil (Itália) e adulta (Brasil). Os SNPs rs919266, rs919267 e rs9576 do gene codificante do fator de restrição Teterina (BST-2) foram replicados a partir de uma coorte infantil infectada por transmissão vertical do HIV-1 (Zâmbia) para uma coorte de progressão à AIDS adulta em coorte brasileira.

A genotipagem dos SNPs (rs919266, rs919267 e rs9576) na coorte brasileira foi realizada por sondas *TaqMan SNP Genotyping* (Applied Biosystems), em PCR em tempo real ABI 7500 (Applied Biosystems) no Departamento de Genética da UFRGS. Os sete polimorfismos dos genes *DEFB1*, *LTF* e *PRF1* foram detectados por sondas *TaqMan SNP Genotyping* (Applied Biosystems), e *TaqMan® GTXpress™ Master Mix* em PCR em tempo real ABI7900HT (Applied Biosystems - Life Technologies, Carlsbad, California, U.S.A.) nas amostras da coorte ZEBS. Os SNPs *DEFB1* 5'UTR -52G>A (rs1799946), -44C>G (rs1800972), -20G>A (rs11362) and 3'UTR c.*87A>G (rs1800971) foram detectados respectivamente com as sondas C__11636795_20, C__11636794_20, C__11636793_20 e C__8845559_10, enquanto os polimorfismos do éxon 1 do *LTF*, T29A (rs1126477) e R47K (rs1126478) com sondas C__9698511_10 and C__9698521_10 assays e *PRF-1* c.900C>T (rs885822) com C__1799201_10.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística para a avaliação da influência de cada genótipo durante a progressão foi realizada por testes log-rank e curvas de Kaplan-Meier, além da análise multivariada por regressão de Cox para inferir quais variáveis influenciam mais no desfecho da AIDS (<350 céls./mm³) entre os portadores. As variáveis, tais como idade, sexo, etnia, formas de transmissão, co-infecções, deleção do CCR5, que possuíam valor de $p < 0.1$ em análise de regressão univariada foram consideradas no modelo de análise multivariada. Todos os testes foram realizados no software IBM SPSS Statistics v. 20.

A associação de alelos e genótipos e a conformidade ao equilíbrio de Hardy-Weinberg foram avaliadas respectivamente, por Teste Exato de Fisher e teste de qui-quadrado (χ^2) com o software R, considerando o nível de significância de 5%, indicando se alelos ou genótipos se distribuem igualmente entre os grupos. O cálculo da razão de chances (*odds ratio*, OR) e um intervalo de confiança de 95% (IC=95%) associado, indicam o grau de associação entre o alelo de risco e o desfecho clínico.

5 CAPITULO I - PROTECTIVE ROLE OF *BST2* POLYMORPHISMS IN MOTHER-TO-CHILD TRANSMISSION OF HIV-1 AND ADULT AIDS PROGRESSION.

Autores: Anselmo Jiro Kamada ¹; Anna Monica Bianco ², Luisa Zupin ²; Martina Girardelli ²; Maria Cristina Cotta Matte ³; Rúbia Marília de Medeiros ³; Sabrina Esteves de Matos Almeida ⁴; Louise Kuhn ⁵; Ludovica Segat², José Artur Bogo Chies ³; Sergio Crovella.

¹ Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil; ² Institute for Maternal and Child Health, Istituto Di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico “Burlo Garofolo,” Trieste, Italy, ³ Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Porto Alegre – Rio Grande do Sul, Brazil; ⁴ Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde, Porto Alegre, Brazil; ⁵ Columbia University, New York, USA.

Publicado no periódico Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (JAIDS).
1 July 2016 - Volume 72 - Issue 3 - p 237–241

doi: 10.1097/QAI.0000000000000949

Fator de Impacto (JCR 2015): 3.806

Classificação Qualis A2 – Ciências Biológicas I

Protective Role of *BST2* Polymorphisms in Mother-to-Child Transmission of HIV-1 and Adult AIDS Progression

Anselmo J. Kamada, MSc,* Anna M. Bianco, PhD,† Luisa Zupin, MSc,† Martina Girardelli, PhD,† Maria C. C. Matte, MSc,‡ Rúbia Marília de Medeiros, MSc,‡ Sabrina Esteves de Matos Almeida, PhD,§ Marineide M. Rocha, MD,|| Ludovica Segat, PhD,† José A. B. Chies, PhD,‡ Louise Kuhn, PhD,¶ and Sergio Crovella, PhD†

Abstract: Bone marrow stromal cell antigen-2 (BST-2)/Tetherin is a restriction factor that prevents Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) release from infected cells and mediates proinflammatory cytokine production. This study investigated the risk conferred by single nucleotide polymorphisms (rs919266, rs919267, and rs9576) at BST-2 coding gene (*BST2*) in HIV-1 mother-to-child transmission and in disease progression. Initially, 101 HIV-1+ pregnant women and 331 neonates exposed to HIV-1 from Zambia were enrolled. Additional *BST2* single nucleotide polymorphism analyses were performed in 2 cohorts with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) progression: an adult Brazilian cohort (37 rapid, 30 chronic and 21 long-term non-progressors) and an Italian pediatric cohort (21 rapid and 67 slow progressors). The rs9576A allele was nominally associated with protection during breastfeeding ($P = 0.019$) and individuals carrying rs919266 GA showed slower progression to AIDS ($P = 0.033$). Despite the influence of rs919266 and rs9576 on *BST2* expression being still undetermined, a preventive role by *BST2* polymorphisms was found during HIV-1 infection.

Key Words: HIV-1, *BST2*, SNPs, mother-to-child transmission of HIV-1, AIDS progression

(*J Acquir Immune Defic Syndr* 2016;72:237–241)

Received for publication November 19, 2015; accepted February 1, 2016.
From the *Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil; †Institute for Maternal and Child Health, Istituto Di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico “Burlo Garofolo,” Trieste, Italy; ‡Department of Genetics, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; §Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde, Porto Alegre, Brazil; ||Infectious Diseases Section, Hospital Nossa Senhora da Conceição, Porto Alegre, Brazil; and ¶Department of Epidemiology, Columbia University, New York, NY.
Supported by CAPES/CNPq (Casadinho 06/2011), IRCCS “Burlo Garofolo” (RC13/12) and National Institute of Health (HD57617).

The authors have no funding or conflicts of interest to disclose.

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

Correspondence to: Anselmo J. Kamada, MSc, Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, S/N, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, CEP: 50670-901, Brazil (e-mail: anselmojro@gmail.com).

Copyright © 2016 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

INTRODUCTION

Rate of mother-to-child transmission (MTCT) of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) ranges from 5% to 10% during pregnancy, 20% to 30% during delivery, and 10% to 20% through breastfeeding in the absence of treatment, whereas it is reduced to less than 2% with antiretroviral therapy during gestation.¹ Since the majority of newborns from infected mothers do not become infected, several host factors have been investigated by clinical follow-up of untreated pregnant women, mainly in countries with limited antiretroviral regimen coverage. Despite obstetric, nutritional, socio-demographic, and viral factors being involved in natural prevention to MTCT,² innate immunity have been recently highlighted as a modulator of early antiviral response at the fetal-maternal interface.³

“Bone marrow stromal cell antigen-2” (BST-2/Tetherin) transmembrane protein prevents HIV-1 particles release by virion retention at membranes of infected cells.⁴ HIV-1 tethering leads to BST-2 cytoplasmic tail phosphorylation, which triggers proinflammatory cytokines production mediated by NF- κ B signaling,⁵ and may also facilitate HIV-1 endocytosis followed by type I interferon (IFN) expression.⁶ Although BST-2 constitutive expression was found at various immune cells [macrophages, monocytes, plasmacytoid dendritic cells (pDCs), B and T-lymphocytes],^{5,7,8} tissues (liver, lung, cord blood and decidua),^{9–11} and secretions (colostrum and semen),^{11,12} the influence of BST-2 on early HIV-1 prevention and pathogenesis is still underestimated.

Recent studies investigated the role of BST-2 genetic background in differential response to HIV-1 infection. An insertion/deletion polymorphism at the promoter region (rs3217318) and a single nucleotide polymorphism (SNP, rs10415893) of *BST2* gene (located at 19p13.1) were associated with lower transcriptional levels of *BST2* and faster disease progression in a Spanish cohort,¹³ whereas rs113189798 SNP was described as a risk factor to HIV-1 acquisition in North American seroprevalent drug users.¹⁴

Thus, this study evaluated the role of *BST2* SNPs in susceptibility to MTCT of HIV-1 in a cohort of 331 infants and 101 infected mothers. Additional analyses were performed in 88 pediatric patients and 88 adults to investigate the influence of *BST2* SNPs on HIV-1-associated disease progression.

MATERIALS AND METHODS

Study Group

A cohort of 101 pregnant women living with HIV-1 and 331 infants with confirmed HIV-1 transmission status were selected from a randomized clinical trial “Zambia Exclusive Breastfeeding Study” (ZEBs) in 2 primary health clinics (George Clinic and Chawama Clinic) from Lusaka (Zambia) (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00310726).¹⁵ ZEBs evaluated the benefits of short duration exclusive breastfeeding in prevention of MTCT and infant mortality in low resource settings among women that received a single-dose nevirapine regimen. Among 331 infants, 22 were infected through intrauterine transmission [positive HIV-1 Polymerase Chain Reaction (PCR) within 2 days of birth], 25 were infected during delivery (positive HIV-1 PCR within 42 days of birth), 38 were infected during breastfeeding (positive HIV-1 PCR after 42 days of birth) and 246 infants did not become infected (see Supplemental Digital Content 1 and Supplemental Table S1, <http://links.lww.com/QAI/A792>).

A retrospective cohort of 88 adults with clinical progression to AIDS (37 rapid progressors, 30 chronic progressors, and 21 long-term nonprogressors) was established after review of approximately 3300 patient charts from Infectious Diseases Service at Conceição Hospital Group in Porto Alegre (Brazil). The clinical endpoint (AIDS) was determined with highly active antiretroviral therapy start or CD4⁺ cells count below 350 cells per mm³. All participants signed an informed consent, answered a standard socio-demographic questionnaire, and provided peripheral blood sample. The ethical committee of Conceição Hospital Group approved the study (N. 01–213) (see Supplemental Digital Content 2, <http://links.lww.com/QAI/A792>).

A retrospective cohort of 88 infected children with HIV-1-related disease progression from Pediatric Division of IRCCS Burlo Garofolo in Trieste (Italy) was classified according to 1994 CDC AIDS surveillance case definition¹⁶: 21 rapid progressors (developed severe clinical manifestations within the first 2 years of infection, defined as “Category C”) and 67 slow progressors (neither progressed to Category C nor developed severe immunosuppression beyond 8 years of age). Children with clinical symptoms (Categories A, B or C) or immune suppression (categories 2 or 3)¹⁷ were started with highly active antiretroviral therapy (triple combination of stavudine or zidovudine, lamivudine, and zalcitabine or didanosine or zalcitabine). The ethical committee of IRCCS Burlo Garofolo approved the study (Prot. L1106).

Sample Processing and *BST2* Genotyping

DNA extraction from dried blood spot samples of ZEBs cohort was performed using “DNA Extract All Reagents” kit (Life Technologies, Carlsbad, CA). Genomic DNA was extracted from peripheral blood samples in Italian and Brazilian cohorts by conventional salting-out procedures.¹⁸

Only 14 out of 37 SNPs (rs112492472, rs12609479, rs73921425, rs28413174, rs28413175, rs28413176, rs11542666, rs34737311, rs113321277, rs2278234, rs919265, rs919266, rs919267, and rs9576) found in public databases (UCSC

Genome Browser, NCBI and 1000 Genomes)¹⁹ were selected due to a minor allele frequency greater than 5% in sub-Saharan African populations (YRI, LWK, ESN, and GWD). Specific regions in *BST2* coding gene were amplified by PCR using KAPA2G Readymix (RESNOVA, Genzano di Roma, Rome, Italy) with a 2720 Thermal Cycler (Life Technologies) and then directly sequenced using ABI PRISM 3130XL sequencer (Life Technologies). The primers used for PCR and sequencing were **BST2EXON1F** 5'-CTGCCTCTTCAGGTCATAG-3'; **BST2EXON1R** 5'-GAACCTAGTCCCTTGATG-3'; **BST2EXON2/3F** 5'-GAGGACCCACATGCTTATG-3'; **BST2EXON4F** 5'-GGATAACTTAGCCCCCTAGG-3'; **BST2EXON2/3R** 5'-CAGCAGCAC AATCAGCAGC-3'; **BST2EXON4R** 5'-CCATAACAA CAGGACGAC-3'.

The *BST2* gene sequencing was performed in 331 samples from the Zambian cohort, and since only rs9576, rs919266, and rs919267 SNPs showed a minor allele frequency greater than 5%, these SNPs were replicated in Brazilian and Italian cohorts with TaqMan SNP Genotyping Assays (C_11454228_10, C_7493933_10, and C_2931310_10, respectively) and TaqMan GTXpress Master Mix (Life Technologies) on ABI7500 Real Time PCR (Life Technologies).

Data Analysis

Fisher exact and Mann-Whitney tests were performed, respectively, in univariate analysis of categorical and quantitative variables with R Software 3.1.0. Bonferroni correction method for multiple tests (eg, $P = 0.05/N^{\circ}$ of analyzed SNPs) was performed for all analyzed SNPs. All clinical/demographic variables that reached a P value lower than 0.10 in univariate analysis (see Supplemental Digital Content 2, <http://links.lww.com/QAI/A792>) were included as covariates in logistic regression model analysis, using SNPstats.²⁰ Extensively described risk factors like HIV-1 viral load, CD4⁺ cell count, and *CCR5*Δ32 were included in adjusted analysis. The haplotypes and linkage disequilibrium of *BST2* SNPs were determined in Haploview v.4.2.²¹ Kaplan-Meier survival analysis was performed in IBM SPSS Statistics v.20 to evaluate the influence of *BST2* SNPs on time to adult AIDS progression.

RESULTS

BST2 SNPs in a Cohort of Mother-to-child Transmission of HIV-1

Maternal CD4⁺ cell counts ($P < 0.0001$) and plasma viral load ($P < 0.0001$) were higher in all groups of HIV-1 infected infants (intrauterine (IU), intrapartum (IP), and postpartum (PP) transmission) than in exposed uninfected infants (EU), whereas other features such as maternal (age, BMI, and hemoglobin level) and neonate characteristics (sex and weight) were not associated with infection status (see Supplemental Table S1, <http://links.lww.com/QAI/A792>). Breast milk viral load was also higher in PP infants than in EU infants [3.10 (2.81–3.24) vs 1.69 (1.46–1.88) log₁₀ copies per milliliter, $P < 0.0001$].

rs919266, rs919267, and rs9576 *BST2* SNPs were investigated as candidate markers of natural protection during mother-to-child transmission of HIV-1 (Table 1). SNP frequencies in Zambian infants were all in Hardy-Weinberg equilibrium (HWE). The rs9576A allele was more frequent in EU than in PP [14.85% vs 5.26%, OR = 0.32 (0.11–0.9); $P = 0.019$] although the difference between allelic frequencies did not reach statistical significance after Bonferroni correction ($P > 0.017$). None of *BST2* SNPs were associated with either IU or IP transmission ($P > 0.017$). The minor allele rs919266A was not found only in the PP infected group, even with a larger sample size than other infected groups. Thus, it was not possible to test the association of rs919266 in transmission of HIV-1 during breastfeeding.

rs919266, rs919267, and rs9576 SNPs were also tested as risk factors to HIV-1 vertical transmission regardless of route of transmission, although none of the *BST2* alleles, genotypes

or haplotypes were associated as risk factors ($P > 0.017$; see Supplemental Table S2, <http://links.lww.com/QAI/A792>). All SNPs but rs919266 in 101 HIV-1 infected mothers were in HWE. HIV-1 infected mothers with rs919266A allele also presented a lower CD4⁺ cell count during delivery than with rs919266 G [200.33 ± 43.88 cells per mm³ ($n = 9$) vs 339.56 ± 21.64 cells per mm³ ($n = 92$), $P = 0.008$; data not shown], whereas rs919267 and rs9576 SNPs did not influence CD4⁺ cells count and plasma viral load.

BST2 SNPs in Adult and Pediatric AIDS Progression

The difference found in CD4⁺ cells count between rs919266 variants in HIV-1 infected mothers could indicate a putative role of *BST2* SNPs in the maintenance of CD4⁺ cells during HIV-1 infection. Since the ZEBs consortium did

TABLE 1. Frequency of *BST2* Polymorphisms in a Cohort of Zambian Infants Born From HIV-1 Infected Mothers

<i>BST2</i> SNPs	HIV-1 Infected Infants; n = 85			Exposed-Uninfected Infants (EU)	IU vs EU		IP vs EU		PP vs EU	
	Intrauterine (IU)*	Intrapartum (IP)†	Postpartum (PP)‡		OR (95% CI)§	P	OR (95% CI)§	P	OR (95% CI)¶	P
MAF	n = 22 (%)	n = 25 (%)	n = 38 (%)	n = 246 (%)						
rs919266										
A	3 (6.82)	4 (8.00)	0 (0.00)	26 (5.28)	1.31 (0.38–4.52)	0.934	0.56 (0.52–4.66)	0.634	—	
rs919267										
T	17 (38.64)	21 (42.00)	21 (27.63)	154 (31.30)	1.38 (0.73–2.61)	0.406	1.59 (0.73–2.61)	0.167	0.84 (0.49–1.43)	0.609
rs9576										
A	7 (15.91)	11 (22.00)	4 (5.26)	73 (14.84)	1.09 (0.47–2.53)	0.976	1.62 (0.79–3.31)	0.259	0.32 (0.11–0.9)	0.019
Genotypes										
rs919266										
G/G	19 (86.36)	21 (84.00)	38 (100.00)	220 (89.43)	Reference	0.932	Reference	0.624	—	
G/A	3 (13.64)	4 (16.00)	0 (0.00)	26 (10.57)	1.33 (0.37–4.82)		0.61 (0.51–5.06)		—	
A/A	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	—		—		—	
rs919267										
C/C	8 (36.36)	7 (28.00)	19 (50.00)	117 (47.56)	Reference	0.589	Reference	0.166	Reference	0.632
C/T	11 (50.00)	15 (60.00)	17 (44.74)	104 (42.28)	1.55 (0.6–3.99)		2.41 (0.95–6.14)		1.01 (0.5–2.04)	
T/T	3 (13.64)	3 (12.00)	2 (5.26)	25 (10.16)	1.75 (0.43–7.08)		2.01 (0.48–8.3)		0.49 (0.11–2.25)	
rs9576										
C/C	16 (72.73)	15 (60.00)	34 (89.47)	176 (71.54)	Reference	0.437	Reference	0.336	Reference	0.062
C/A	5 (22.73)	9 (36.00)	4 (10.53)	67 (27.24)	0.82 (0.29–2.33)		1.57 (0.66–3.77)		0.31 (0.11–0.9)	
A/A	1 (4.55)	1 (4.00)	0 (0.00)	3 (1.22)	3.66 (0.08–8.36)		3.91 (0.38–39.95)		—	
Haplotypes										
rs919266-rs919267-rs9576 (D' = 0.97; R ² = 0.29)										
G-C-C	27 (61.36)	29 (58.00)	55 (72.36)	333 (68.52)	Reference		Reference		Reference	
G-T-C	10 (22.72)	10 (20.00)	17 (22.37)	85 (17.49)	1.45 (0.60–3.24)	0.39	1.35 (0.56–2.98)	0.41	1.21 (0.62–2.25)	0.53
G-T-A	4 (9.09)	7 (14.00)	4 (5.26)	43 (8.85)	1.14 (0.28–3.52)	0.77	1.86 (0.65–4.70)	0.18	0.56 (0.14–1.64)	0.37
A-T-A	3 (6.81)	4 (8.0)	0 (0.00)	25 (5.14)	1.48 (0.26–5.34)	0.47	1.83 (0.43–5.85)	0.29	—	—

*Intrauterine transmission (IU) confirmed with positive HIV-1 PCR within 2 days of birth.

†Intrapartum transmission (IP) confirmed with positive PCR result within 42 days of birth.

‡Postpartum transmission (PP) with positive PCR result at 42 days or older.

§Adjusted for maternal CD4⁺ cell count and HIV-1 plasma viral load.

¶Adjusted for maternal CD4⁺ cell count, HIV-1 plasma viral load and milk viral load.

CI, confidence interval; SNP, MAF, minor allele frequency; OR, odds ratio; SNPs, single nucleotide polymorphisms.

not cover maternal disease progression, our group investigated *BST2* SNPs as disease risk factors in pediatric and adult cohorts with clinical progression follow-up from 2 different populations [Trieste (Italy) and Porto Alegre (Brazil), respectively].

The genotype distribution of rs919266, rs919267, and rs9576 was in HWE within the pediatric Italian cohort. The influence of rs919266 and rs9576 on disease progression has not been tested due to the absence of their minor alleles in rapid progressors group (Table 2). None of the *BST2* alleles, genotypes, or haplotypes were associated with pediatric disease progression ($P > 0.017$).

All rs919266, rs919267, and rs9576 SNPs in the Brazilian cohort of AIDS progression were in HWE. The European-descent Brazilians had lower frequencies of rs919266A (2.75% vs 7.46%) and rs9576A (3.70% vs 12.50%) than

African-descent individuals, and represented the major ethnic group in this study [56/92 (58.9%); see Supplemental Digital Content 2, <http://links.lww.com/QAI/A792>].

rs919266A allele was more frequent in long-term nonprogressors than in the rapid progressors group [$P = 0.025$, OR = 0.17 (0.02–1.00)] (Table 2), whereas rs919266 GA carriers also showed a slower progression to AIDS than rs919266 GG carriers [10.33 (7.17–13.49) vs 6.56 (5.52–7.60) years, log-rank test $P = 0.033$], even without statistical significance after Bonferroni correction. rs919267 and rs9576 allele and genotype frequencies did not show statistical differences (see Supplemental Digital Content 3, <http://links.lww.com/QAI/A792>).

A lower coefficient of linkage disequilibrium was observed in the Brazilian cohort ($D' = 0.95$) compared with Zambian ($D' = 0.97$) and Italian ($D' = 0.96$) groups, with the

TABLE 2. Frequency of *BST2* Polymorphisms in a Cohort of Pediatric and Adult Disease Progression From Trieste (Italy) and Porto Alegre (Brazil) respectively

BST2 SNPs	Pediatric Disease Progression*				Adult AIDS Progression†			
	Rapid Progressors	Slow Progressors	OR (95% CI)	P	Rapid Progressors	Long-Term Nonprogressors (LTNP)	OR (95% CI)‡	P
MAF	n = 21 (%)	n = 67 (%)			n = 37 (%)	n = 21 (%)		
rs919266								
A	0 (0.0)	1 (0.75)	—		A	2 (3.33)	6 (14.29)	0.17 (0.02–1.00) 0.025
rs919267								
T	1 (2.63)	7 (5.38)	2.03 (0.25–94.32)	0.69	T	6 (10.00)	7 (16.67)	0.87 (0.28–2.91) 0.795
rs9576								
A	0 (0.0)	2 (1.49)	—		A	3 (5.00)	7 (16.67)	0.28 (0.06–1.22) 0.094
Genotypes								
rs919266								
G/G	20 (100.0)	66 (98.51)	—		G/G	28 (93.33)	15 (71.42)	Reference
G/A	0 (0.0)	1 (1.49)	—		G/A	2 (6.67)	6 (28.58)	0.14 (0.02–0.87) 0.023
rs919267								
C/C	18 (94.74)	60 (89.55)	Reference	0.68	C/C	24 (80.00)	14 (66.67)	Reference
C/T	1 (5.26)	7 (10.45)	2.09 (0.24–99.79)		C/T	6 (20.00)	7 (33.33)	1.13 (0.32–3.95) 0.85
rs9576								
C/C	20 (100.0)	65 (97.02)	—		C/C	27 (90.00)	14 (66.67)	Reference
C/A	0 (0.0)	2 (2.98)	—		C/A	3 (10.00)	7 (33.33)	0.27 (0.06–1.13) 0.068
Haplotypes								
rs919266-rs919267-rs9576 (D' = 0.96; R² = 0.49)					rs919266-rs919267-rs9576 (D' = 0.95; R² = 0.48)			
G-C-C	40 (95.23)	127 (94.81)	Reference		61 (82.43)	34 (80.95)	Reference	
G-T-C	2 (4.77)	5 (3.73)	1.42 (0.15–13.04)	0.76	9 (12.17)	0 (0.00)		
A-T-A	0 (0.0)	1 (0.75)	—		2 (2.70)	6 (14.29)	0.18 (0.02–1.13)	0.053
G-C-A	0 (0.0)	0 (0.0)	—		2 (2.70)	0 (0.00)		
G-T-A	0 (0.0)	1 (0.75)	—		0 (0.0)	2 (4.76)		

*HIV-1-infected children were classified in 2 groups: RP (developed severe clinical manifestations within the first 2 years of infection, defined as “Category C” of CDC 1994 AIDS surveillance case definition) and SP (who neither progressed to Category C nor developed severe immunosuppression beyond 8 years of age).

†HIV-1 infected adults from Porto Alegre (Brazil), according to AIDS progression criteria by Casado et al (2010).

‡Adjusted for *CCR5* 32bp deletion (*CCR5* Δ32) genotype and ethnicity.

CI, confidence interval; D' , coefficient of linkage disequilibrium; MAF, minor allele frequency; OR, odds ratio; R^2 , correlation coefficient of alleles; SNPs, single nucleotide polymorphisms.

occurrence of a novel rs919266G-rs919267C-rs9576A haplotype (Table 2).

DISCUSSION

Tethering of HIV-1 particles and induction of pro-inflammatory cytokines were described as restriction mechanisms by BST-2 during HIV-1 infection,⁴ despite the strong counteraction by HIV-1 vpu protein that leads to intracellular BST-2 degradation and NF- κ B downregulation.^{22,23} The protective role of BST-2 was corroborated by recent findings in cohorts of HIV-1 seroprevalent drug users with BST2 variants that showed a higher BST2 transcription and slower progression to AIDS by rs3217318 and rs10415893 in a Spanish cohort,¹³ and also in prevention to horizontal transmission by rs113189798 in a North American cohort.¹⁴

The nominally significant association of rs9576 (located at BST2 3'UTR) with prevention of HIV-1 infection during breastfeeding may suggest a novel role of BST-2 in neonatal innate response, even without statistical significance after Bonferroni correction. Although the role of rs9576A allele in BST2 expression is still unknown, differential expression of BST-2 could lead to an enforcement of HIV-1 restriction by immune cells like macrophages⁵ or altering type I IFN production by pDCs,²⁴ since neonatal pDCs already have a lower capacity of IFN- α production than adult pDCs.²⁵ Despite maternal BST2 SNPs being not involved as a risk factor during breastfeeding, recent findings demonstrated that colostrum cells from HIV-1-infected mothers presented higher levels of BST-2 expression than healthy mothers but the influence on HIV-1 transmission rate is still unknown.¹¹

The BST2 intronic allele rs919266A was associated with a slower progression to AIDS and more frequent in Brazilian long-term nonprogressors than in rapid progressors, although rs919266A was associated with lower CD4⁺ cell count during delivery but did not influence HIV-1 maternal transmission in Zambian cohort. The functional role of rs919266 has not been demonstrated yet, but the linkage disequilibrium with rs10415893 ($D' = 1.0$; Spanish population/IBS from 1000 Genomes), a tag SNP associated with AIDS progression in a Spanish cohort,¹³ suggests a protective role by the tagged region during AIDS progression. Moreover, it has not been possible to determine the impact of rs919266 SNP on the risk to pediatric disease progression and breastfeeding transmission, since rs919266A allele was not found in rapid pediatric progressors and postpartum-infected infants from Zambia.

Our study supports a protective role by genetic variants of BST2 in adult AIDS progression and mother-to-child transmission. Despite the limited sample size and ethnic heterogeneity of the cohorts, our findings suggest that BST-2 activity in infants deserves further investigations as an early innate mechanism during breastfeeding and also corroborate previous findings indicating BST2 SNPs as protective factors during AIDS progression.

REFERENCES

1. Aldrovandi GM, Kuhn L. What infants and breasts can teach us about natural protection from HIV infection. *J Infect Dis*. 2010;202(suppl):S366–S370.
2. Kourtis AP, Lee FK, Abrams EJ, et al. Mother-to-child transmission of HIV-1: timing and implications for prevention. *Lancet Infect Dis*. 2006;6:726–732.
3. Prendergast AJ, Klennerman P, Goulder PJR. The impact of differential antiviral immunity in children and adults. *Nat Rev Immunol*. 2012;12:636–648.
4. Perez-Caballero D, Zang T, Ebrahimi A, et al. Tetherin inhibits HIV-1 release by directly tethering virions to cells. *Cell*. 2009;139:499–511.
5. Giese S, Marsh M. Tetherin can restrict cell-free and cell-cell transmission of HIV from primary macrophages to T cells. *PLoS Pathog*. 2014;10:e1004189.
6. Galão RP, Le Tortorec A, Pickering S, et al. Innate sensing of HIV-1 assembly by Tetherin induces NF κ B-dependent proinflammatory responses. *Cell Host Microbe*. 2012;12:633–644.
7. Loschko J, Schlitzer A, Dudziak D, et al. Antigen delivery to plasmacytoid dendritic cells via BST2 induces protective T cell-mediated immunity. *J Immunol*. 2011;186:6718–6725.
8. Ishikawa J, Kaisho T, Tomizawa H, et al. Molecular cloning and chromosomal mapping of a bone marrow stromal cell surface gene, BST2, that may be involved in pre-B-cell growth. *Genomics*. 1995;26:527–534.
9. Pontén F, Schwenk JM, Asplund A, et al. The Human Protein Atlas as a proteomic resource for biomarker discovery. *J Intern Med*. 2011;270:428–446.
10. Erikson E, Adam T, Schmidt S, et al. In vivo expression profile of the antiviral restriction factor and tumor-targeting antigen CD317/BST-2/HM1.24/tetherin in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108:13688–13693.
11. Pereira NZ, Cardoso EC, Oliveira LM, et al. Upregulation of innate antiviral restricting factor expression in the cord blood and decidual tissue of HIV-infected mothers. *PLoS One*. 2013;8:e84917.
12. Madison MN, Roller RJ, Okeoma CM. Human semen contains exosomes with potent anti-HIV-1 activity. *Retrovirology*. 2014;11:102.
13. Laplana M, Caruz A, Pineda JA, et al. Association of BST-2 gene variants with HIV disease progression underscores the role of BST-2 in HIV type 1 infection. *J Infect Dis*. 2013;207:411–419.
14. Hancock DB, Gaddis NC, Levy JL, et al. Associations of common variants in the BST2 region with HIV-1 acquisition in African American and European American people who inject drugs. *AIDS*. 2015;29:767–777.
15. Kuhn L, Aldrovandi GM, Sinkala M, et al. Differential effects of early weaning for HIV-free survival of children born to HIV-infected mothers by severity of maternal disease. *PLoS One*. 2009;4:e6059.
16. CDC. Revised Classification System for Human Immunodeficiency Virus Infection in Children Less Than 13 Years of Age. 1994. Available at: <http://wonder.cdc.gov/wonder/PrevGuid/m0032890/m0032890.asp>. Accessed November 4, 2015.
17. Guidelines for the use of antiretroviral agents in pediatric HIV infection. Center for Disease Control and Prevention. *MMWR Recomm Rep*. 1998;47:1–43.
18. Lahiri DK, Numberger JI. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res*. 1991;19:5444–5444.
19. Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, et al. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature*. 2012;491:56–65.
20. Solé X, Guinó E, Valls J, et al. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*. 2006;22:1928–1929.
21. Barrett JC, Fry B, Maller J, et al. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 2005;21:263–265.
22. Van Damme N, Goff D, Katsura C, et al. The interferon-induced protein BST-2 restricts HIV-1 release and is downregulated from the cell surface by the viral Vpu protein. *Cell Host Microbe*. 2008;3:245–252.
23. Neil SJ, Zang T, Bieniasz PD. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature*. 2008;451:425–430.
24. Cao W, Bover L, Cho M, et al. Regulation of TLR7/9 responses in plasmacytoid dendritic cells by BST2 and ILT7 receptor interaction. *J Exp Med*. 2009;206:1603–1614.
25. Schüller SS, Sadeghi K, Wisgrill L, et al. Preterm neonates display altered plasmacytoid dendritic cell function and morphology. *J Leukoc Biol*. 2013;93:781–788.

Supplementary Digital Content 1

Clinical followup and inclusion criteria from the Zambian Exclusive Breastfeeding Study (ZEBS)(ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00310726).

Infant samples

Initially 358 infants born from the ZEBS cohort prior to 10/31/2002 were eligible to *BST2* genotyping, as this date was selected as the final PCR results were available. All but three samples from infected children could be found and genotyped (one missing in each group). We defined as uninfected all children with a negative PCR when last seen at a minimum of 28 days if lost to follow-up or died before 24 months of age. There were 242 uninfected children and all but four could be found and genotyped. We also included in the uninfected group nine children who tested negative before death but who died less than 28 days of age. These were combined in the group considered “uninfected”. Exclusion of these children did not change the results. We did not select for genotyping 19 children with a last negative PCR results <28 days who were not known to have died.

Transmission rate in the cohort selected for genotyping

The HIV transmission rates were slightly, but not significantly, higher in the genotyped cohort than in the entire ZEBS cohort who were not genotyped. Intrauterine, intrapartum and postpartum transmission rates were 7.1%, 7.4% and 11.8%, respectively, in the 331 children who were genotyped and 5.6%, 6.4% and 8.6%, respectively in the 592 children who were not genotyped but who could be classified using the same definitions ($p=0.26$).

Supplementary Digital Content 2

Table S1- Clinical and demographic variables in Zambian cohort of mother-to-child transmission of HIV-1

Variables	HIV-1 infected infants (II); n = 85			Exposed uninfected infants (EU) n = 246	p-value (II vs. EU) ^d
	IU ^a n = 22	IP ^b n = 25	PP ^c n = 38		
Maternal age [IQR]	26.0 [22.8 - 31.2]	27.0 [21.0 - 30.0]	26.9 [24.9 - 28.8]	25.0 [22.0 - 29.0]	0.26
Maternal body mass index					
<18.5 kg/m ²	5 (22.7%)	6 (24.0%)	12 (31.6%)	45 (18.9%)	0.25
≥18.5 kg/m ²	17 (77.3%)	19 (76.0%)	26 (68.4%)	193 (81.1%)	
Hemoglobin					
<10 g/dl	9 (40.9%)	10 (40.0 %)	14 (36.8%)	66 (27.2%)	0.16
≥10 g/dl	13 (59.1%)	15 (60.0 %)	24 (63.2%)	177 (72.8%)	
Maternal CD4+ cell count during delivery [IQR]	215.5 [134.3 - 327.0]	242.0 [154.5 - 305.5]	209.0 [106.0 -318.8]	373.0 [268.5 - 528.3]	< 0.0001
Maternal plasma viral load in delivery [IQR] (log ₁₀ copies/ml)	5.19 [4.66 - 5.39]	5.12 [4.52 - 5.33]	5.12 [4.64 - 5.33]	4.54 [3.92 - 5.05]	< 0.0001
Breast milk viral load [IQR] (log ₁₀ copies/ml)	2.97 [2.66 - 3.08]	3.46 [3.05 - 3.59]	3.10 [2.81 - 3.24]	1.69 [1.46 - 1.88]	< 0.0001 ^e
Infant sex, female (%)	10 (45.4%)	9 (37.5%)	19 (50.0%)	113 (46.3%)	0.89
Infant birth weight					
< 2500 g	3 (13.7%)	4 (19.1%)	5 (13.5%)	28 (11.7%)	0.44
≥ 2500 g	19 (86.3%)	17 (80.9%)	32 (86.5%)	212 (88.3%)	

^a Intrauterine transmission (IU) confirmed with positive HIV-1 PCR within 2 days of birth;

^b Intrapartum transmission (IP) confirmed with positive PCR result within 42 days of birth;

^c Postpartum transmission (PP) with positive PCR result at 42 days or older;

^d Mann-Whitney test and Fisher exact test were performed respectively for continuous and categorical variables;

^e Postpartum infected infants (PP) vs. Exposed uninfected infants (EU).

Supplementary Digital Content 3

Brazilian cohort of adult AIDS progression

The period to AIDS was defined as HAART initiation or CD4+ T cell count below 350 cells/mm³ and HIV-1 infection diagnosis, thus patients were classified in categories according to time (in years) to AIDS: rapid progressors (RP), chronic (CP) and long-term nonprogressors (LTNP). RP were defined as having at least, one HIV-1 negative /undetermined test before the first HIV-1 positive serological test, as long as the interval of both measures does not exceed three years, CP started HAART or developed symptomatic comorbidities between four to nine years after seroconversion and LTNP started HAART or developed symptomatic comorbidities after ten years, according to Casado *et al.* (2010) criteria. After signed an informed consent form, the patients were interviewed about behaviour and socio-demographics characteristics using a standard questionnaire and peripheral blood was collected.

Table S2 - Clinical and demographic characteristics of a Brazilian cohort with AIDS progression follow up.

Clinical characteristics	Long-term nonprogressors n = 21	Rapid progressors (RP) n = 37	Chronic progressors (CP) n = 30	p-value (RP vs CP)
Age (years)[IQR]	39.2 [35.4 - 43.0]	39.8 [35.8 - 43.8]	40.3 [35.5 - 43.0]	0.56
Sex, female (%)	20 (95.23)	23 (62.16)	24 (80.0)	0.18
Ethnicity (% European-descendant)	13 (61.90)	27 (72.97)	20 (66.67)	0.60
CCR5-Δ32 allelic frequency (%)	14.28	5.41	5.00	0.62
Time from HIV-1 diagnosis to AIDS ^a	1.57 [1.29 - 1.37] 9.40 [9.17 - 9.63]			
Routes of exposure to HIV-1 (%) ^b				
Heterosexual	20 (95.23)	30 (81.09)	25 (83.33)	1
Men who have sex with men	0 (0.00)	6 (16.21)	2 (6.67)	0.28
Injection drug users	0 (0.00)	1 (2.70)	2 (6.67)	0.58
Others	1 (4.76)	0 (0.00)	1 (3.33)	
Coinfections (%)				
Hepatitis C virus	0 (0.00)	3 (8.11)	7 (23.33)	0.09
Hepatitis B virus	0 (0.00)	2 (5.41)	1 (3.33)	1
Tuberculosis	1 (4.76)	2 (5.41)	2 (6.67)	1
Human T-lymphotropic virus type 1	0 (0.00)	1 (2.21)	0 (0.00)	
Toxoplasmosis	1 (4.76)	5 (13.51)	0 (0.00)	
Human papillomavirus	0 (0.00)	1 (2.21)	0 (0.00)	
Others ^b	1 (4.76)	7 (18.91)	0 (0.00)	

^a AIDS progression criteria according to Casado *et al.* (2010): RP were classified according to measurements below 350 CD4+ cells/mm³ within three years of seroconversion, CP included patients with four to ten years without HAART and measurements below 350 CD4+ cells/mm³ and LTNP;

^b “Others” category include at least one of the following coinfections: Human papillomavirus, cytomegalovirus, herpes zoster and syphilis.

Supplementary Digital Content 4

Table S3 - *BST2* polymorphisms in infected mothers and exposed infants from a Zambian cohort of HIV-1 vertical transmission.

<i>BST2</i> SNPs		HIV-1 exposed infants				HIV-1 infected mothers			
		Infected	Uninfected	OR [95% CI] ^a	<i>p</i> -value	Transmitters	Non-transmitters	OR [95% CI] ^a	<i>p</i> -value
MAF		n = 85 (%)	n = 246 (%)			n = 26 (%)	n = 75 (%)		
rs919266	A	7 (4.12)	26 (5.28)	0.88 [0.34 - 2.26]	0.69	4 (7.69)	6 (4.0)	3.98 [0.88 - 18.04]	0.49
rs919267	T	59 (34.71)	154 (31.30)	1.55 [0.90 - 2.70]	0.47	18 (34.62)	45 (30.0)	1.23 [0.48 - 3.12]	0.66
rs9576	A	22 (12.94)	73 (14.84)	0.80 [0.43 - 1.49]	0.63	7 (13.46)	22 (14.67)	1.11 [0.39 - 3.15]	0.99
Genotypes									
rs919266	G/G	78 (91.76)	220 (89.43)	Reference	0.68	22 (84.62)	70 (93.33)	Reference	0.35
	G/A	7 (8.24)	26 (10.57)	0.89 [0.35 - 2.25]		4 (15.38)	4 (5.33)	4.8 [0.99 - 23.16]	
	A/A	0 (0.0)	0 (0.0)	-		0 (0.0)	1 (1.34)	-	
rs919267	C/C	34 (40.00)	117 (47.56)	Reference	0.19	11 (42.31)	34 (45.33)	Reference	0.97
	C/T	43 (50.59)	104 (42.28)	1.68 [0.95 - 3.00]		12 (46.15)	37 (49.33)	1.04 [0.39 - 2.76]	
	T/T	8 (9.41)	25 (10.16)	1.10 [0.43 - 2.83]		3 (11.54)	4 (5.34)	3.41 [0.59 - 19.65]	
rs9576	C/C	65 (76.47)	176 (71.54)	Reference	0.44	19 (73.08)	55 (73.33)	Reference	0.89
	C/A	18 (21.18)	67 (27.24)	0.75 [0.40 - 1.43]		7 (26.92)	18 (24.00)	1.22 [0.43 - 3.50]	
	A/A	2 (2.35)	3 (1.22)	2.27 [0.29 - 17.66]		0 (0.0)	2 (2.67)	-	
Haplotypes									
rs919266-	G-C-C	111 (65.29)	333 (68.52)	Reference	0.24	34 (65.38)	105 (70.00)	Reference	0.39
rs919267-	G-T-C	37 (21.76)	85 (17.49)	1.31 [0.81 - 2.06]		11 (21.15)	23 (15.33)	1.47 [0.58 - 3.54]	
rs9576	G-T-A	15 (8.82)	43 (8.85)	1.05 [0.52 - 2.01]		4 (7.69)	16 (10.67)	0.77 [0.18 - 2.62]	
(D'=0.97; R ² =0.29)	A-T-A	7 (4.11)	25 (5.14)	0.84 [0.30 - 2.07]		3 (5.77)	6 (4.0)	1.54 [0.23 - 7.68]	

CI, Confidence interval; D', Coefficient of linkage disequilibrium; MAF, Minor allele frequency; OR, Odds ratio; R², Correlation coefficient of alleles; SNPs, Single nucleotide polymorphisms.

^a Adjusted for maternal CD4+ cell count and HIV-1 plasma viral load.

Supplementary Digital Content 5

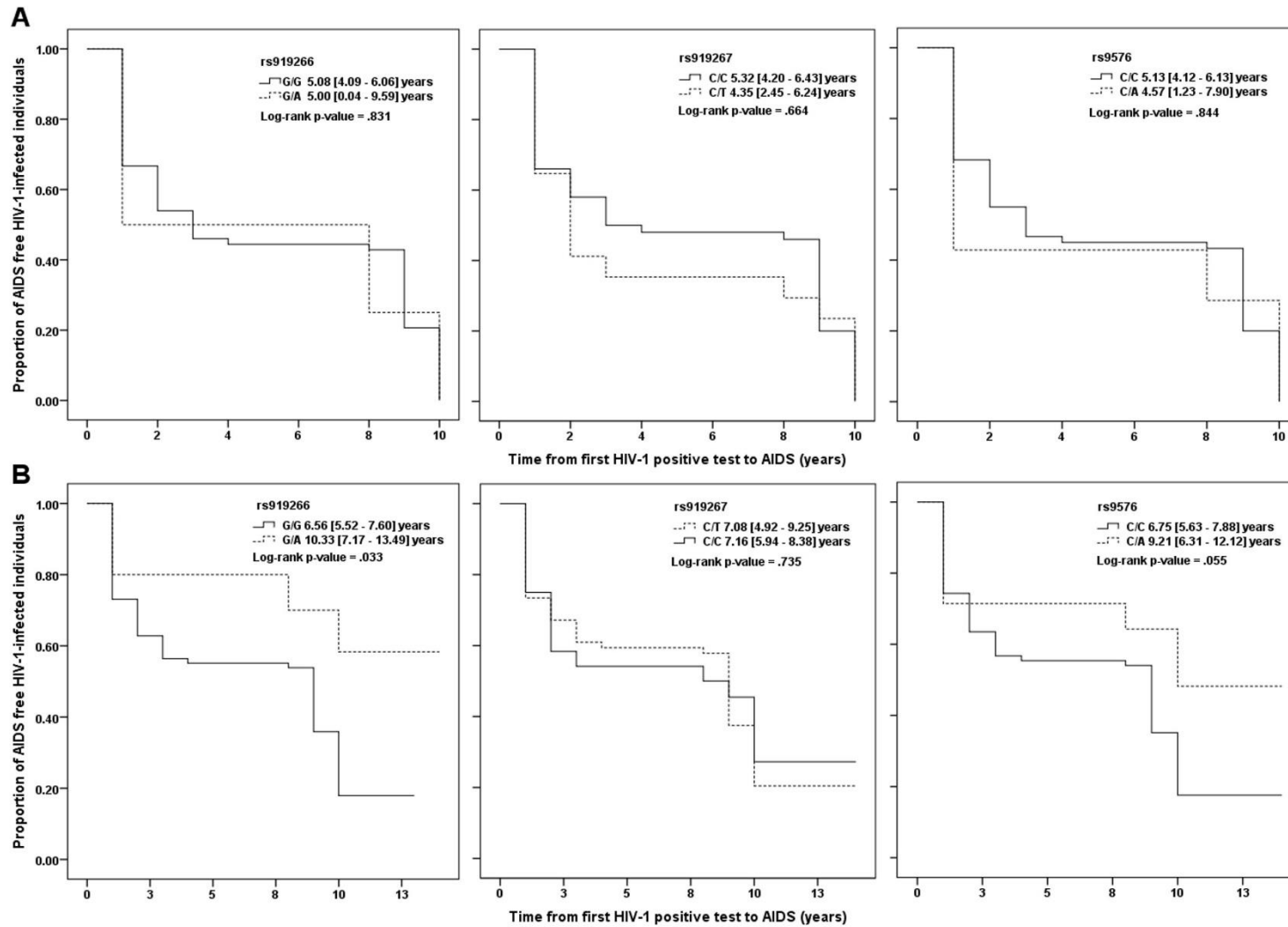


Figure S1 – Kaplan-Meier analysis was performed to evaluate the influence of three *BST2* SNPs (rs919266, rs919267 and rs9576) genotypes in a Brazilian cohort of: **A)** Chronic progressors (CP, n=37) and rapid progressors (RP, n=30); **B)** CP, RP and Long-term non progressors (LTNP=21). Time to AIDS was defined as the interval from the first HIV-1 positive result until the date of the first diagnostic of CD4+ cells decline (<350 cells /mm³) or HAART intervention.

6 CAPITULO II - INNATE IMMUNITY GENES POLYMORPHISMS AND HIV-1 MOTHER-TO-CHILD TRANSMISSION IN ZAMBIAN POPULATION

Autores: Luisa Zupin ¹; Vania Polesello ²; Ludovica Segat ²; Anselmo Jiro Kamada ³; Louise Kuhn ⁴; Sergio Crovella ^{1,3}.

¹ Department of Medicine, Surgery and Health Sciences, University of Trieste, Trieste, Italy; ² Institute for Maternal and Child Health IRCCS “Burlo Garofolo”, Trieste, Italy; ³ Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil ⁴ Gertrude H. Sergievsky Center and Department of Epidemiology, Mailman School of Public Health, Columbia University, New York, NY, USA

Submetido ao periódico Immunologic Research (1982) ISSN 1559-0755 (Online)

Fator de Impacto (JCR 2015): 2.934

Classificação Qualis B1 – Ciências Biológicas 1

Innate immunity genes polymorphisms and HIV-1 mother-to-child transmission in Zambian population

Abstract

It is widely known that host immunity is crucial in limiting viral infections and innate immunity could be considered as the first line of defence against pathogens. Human Beta Defensin-1 (hBD-1), Lactoferrin and Perforin-1 (P1) are three components of the innate immune system, already reported as involved in HIV-1 infection susceptibility and HIV-1 mother-to-child transmission (MTCT) in different populations.

Seven selected polymorphisms within *DEFB1*, *LTF* and *PRF1* genes (encoding for hBD-1, Lactoferrin and P1 respectively) were analysed among 101 HIV-1 positive mothers and 331 infants born to HIV-1-positive mothers from Zambia, performing a genetic association study with the aim of investigating the possible role of these genetic variants in HIV-1 MTCT.

The children and mothers samples were genotyped for *DEFB1* 5'UTR -52G>A, -44C>G, -20G>A and 3'UTR c.*87A>G polymorphisms, *LTF* exon 1 polymorphisms, T29A and R47K, *PRF1* c.900C>T polymorphisms using TaqMan SNPs genotyping assays.

Maternal *LTF* T29A A/A and A/G genotypes as well as children *DEFB1* c.*87 A/A genotype, *DEFB1* GCGA and ACGG haplotypes and *PRF1* c.900 C/T genotype were significantly associated with decreased HIV-1 MTCT susceptibility.

The *LTF*, *DEFB1* and *PRF1* polymorphism were correlated with protection against HIV-1 MTCT in this Zambian population.

Keywords: innate immunity, HIV-1, MTCT, polymorphisms, genotyping.

Introduction

Human immunodeficiency type-1 (HIV-1) mother-to-child transmission (MTCT) has been dramatically reduced with antiretroviral drugs [1]. Nevertheless, data from prior years in which antiretroviral drugs were not yet available for prevention provide a unique model to understand the role of host genetic factors in the modulation of HIV-1 infection susceptibility in the multifactorial context of *in vivo* viral infection [2].

So far several genes and genetic polymorphisms (e.g. single nucleotide polymorphisms, SNPs) have been described as conferring risk or protection towards HIV-1 infection [3]. Since innate immunity is known to play a crucial role in the immune system of the foetus, we

focused our attention on functional genetic variations distributed in primary natural defence genes such as *DEFB1* (8p22–23), encoding the human beta defensins 1 (hBD-1) antimicrobial peptide, *LTF* (3p21.3) encoding the iron carrier protein lactoferrin and *PRF1* (10q22) encoding the pore forming protein Perforin-1 (P1), molecules already reported to be somehow associated with HIV-1 MTCT [4-7].

So, considering the potential role of the molecules mentioned above in the modulation of HIV-1 MTCT in different ethnic groups and previous studies reporting the functional effects of genetic variants in hBD-1, lactoferrin and P1 encoding genes [4-7], we analysed selected polymorphisms in *LTF*, T29A and R47K (rs1126477 and rs1126478) previously associated with oral pathologies [8-11], *DEFB1*, –52G>A (rs1799946), –44C>G (rs1800972) and –20G>A (rs11362) at the 5' untranslated region (5'UTR) and c.*87A>G (rs1800972) at the 3'UTR possibly modulating hBD-1 expression in different cellular models [12-14], and *PRF1*, c.900C>T (rs885822) polymorphism reported as correlated with protection towards HIV-1 infection susceptibility [7] in the context of HIV-1 MTCT in 101 HIV-1 positive mothers and 331 infants born to HIV-1-positive mothers from Zambia with the aim of investigating their potential role in risk or protection towards HIV-1 perinatal infection.

Materials and methods

Study Design and Population

The Zambia Exclusive Breastfeeding Study (Lusaka Zambia, ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00310726) population enrolled for this study was previously analysed in another work by Segat et al. [15].

For the current genetic analysis 331 infants were selected: 85 were HIV-1 infected (designed as HIV+): 22 (6.9%) had intrauterine MTCT (IU), 25 (7.5%) had intrapartum MTCT (IP) and 38 (14.4%) had postnatal (breastfeeding) MTCT (PP). The remainder 246 were HIV-1-exposed uninfected children (designed as HIV-). The samples of 101 HIV-1 positive mothers (mean age 26 years, range 18-45) of these children were selected and included in the genotyping analysis: 26 of these transmitted the HIV-1 infection to their newborns (designed as TR): 26.9% (7/26) were IU transmitted MTCT, 30.8% (8/26) were IP transmitted, and 42.3% (11/26) were PP transmitted via breastfeeding; 75 mothers did not transmit HIV-1 to their infants (designed as NTR). The mothers samples were not randomly selected but were chosen to over-represent children who died before 24 months of age.

All women provided written informed consent for participating in the study. All the study experiments and procedures have been performed in accordance with ethical standards of the 1975 Declaration of Helsinki (7th revision, 2013) and the ethical committee of IRCCS Burlo Garofolo approved the study (protocol L-1106, 1 May 2010).

DNA extraction and genotyping

The DNA extraction was performed as described in Segat et al. [15].

The seven polymorphisms in *DEFB1*, *LTF* and *PRF1* genes were detected using TaqMan SNPs genotyping assays and TaqMan® GTXpress™ Master Mix on the ABI7900HT Real Time PCR platform (Applied Biosystems - Life Technologies, Carlsbad, California, U.S.A.), following manufacturer instructions: *DEFB1* 5'UTR -52G>A (rs1799946), -44C>G (rs1800972), -20G>A (rs11362) and 3'UTR c.*87A>G (rs1800971) polymorphisms using respectively C__11636795_20, C__11636794_20, C__11636793_20 and C__8845559_10 assays, *LTF* exon 1 polymorphisms, T29A (rs1126477) and R47K (rs1126478) using respectively C__9698511_10 and C__9698521_10 assays, , *PRF-1* c.900C>T polymorphisms (rs885822) using C__1799201_10 assay.

Statistical analysis

The *DEFB1*, *LTF* and *PRF1* allele and genotype frequencies were calculated by direct counting, while haplotype frequencies and linkage disequilibrium were computed using the Arlequin software version 3.5.1.2 [16].

Nonparametric Wilcoxon rank sum test with continuity correction were used to compare continuous variables. Fisher's exact test was used for pairwise comparison of allele, genotype and haplotype frequencies. Logistic regression and Wald's test were conducted to examine the association between polymorphisms genotypes and the risk of HIV-1 MTCT. The statistical tests were performed with the free software R version 3.1.3 [17]. P-value for linkage disequilibrium analysis was calculated using the permutation test with the EM algorithm, on Arlequin [16], whereas D' and r² measures were computed with SNPstat [18]. Post-hoc power calculations were performed with G*Power software version 3.1.9.2 using post-hoc calculation using Fisher's exact test [19].

Results

HIV-1 MTCT status significantly correlated with maternal CD4 cells count and plasma viral load (Wilcoxon rank sum test with continuity correction $p=3.544e-08$ and $p=2.35e-13$ respectively) (data not shown).

DEFB1 polymorphisms

DEFB1 polymorphisms at position -52G>A, -44C>G and -20G>A were in Hardy Weinberg equilibrium (HWE) in all groups with the exception of -44C>G variation in the HIV- children group. The polymorphisms were in linkage disequilibrium in the children but not in the mothers group ($D'>0.51$, $r^2>0.01$, $p<0.04$ and $D'>0.645$, $r^2>0.02$, $p<0.07$ respectively) and combined to form three major haplotypes, namely ACGA, GCAA, ACGG and other minor haplotypes (with frequency <0.05).

Analysing *DEFB1* polymorphisms' allele and genotype frequency distribution no statistical significant differences were observed between HIV+ and HIV- children, also when stratifying for HIV-1 routes of MTCT (table supplementary 1). The only exceptions were c.*87 G allele and A/G genotype, more frequent among IU HIV+ and associated with increased risk of IU HIV-1 MTCT (power: 0.57 G allele and 0.38 A/G genotype), also after adjustment for maternal CD4 cells count and plasma HIV-1 viral load (table 1).

However when *DEFB1* haplotypes were considered, the GCGA haplotype was significantly more frequent among HIV- children than HIV+ and associated with a protection towards HIV-1 infection (table 1) (power: 0.93).

When the children were stratified according to HIV-1 route of MTCT the GCGA and ACGG haplotypes were more represented among HIV- respect to the ACGA haplotype (power: 0.80 ACGG and 0.36 GCGA), more frequent among IP HIV+, and associated with a protection towards IP HIV-1 MTCT (table 1).

No statistical significant association was detected between maternal *DEFB1* polymorphisms and the risk of HIV-1 MTCT, comparing NTR and TR mothers (table supplementary 2).

Finally no association was found between the maternal *DEFB1* polymorphisms' genotypes and maternal plasma viral load (data not shown).

LTF polymorphisms

The *LTF* T29A and R47K frequency distributions were in HWE in all groups except for the polymorphism T29A in the group of NTR mother and for the polymorphism R47K in the group of HIV- children. T29A and R47K polymorphisms were in linkage disequilibrium ($D'=0.996$, $r^2=0.06$, $p<0.01$ for mother group and $D'=0.62$, $r^2=0.03$, $p<0.01$ for children

group) and combined to form two major (AG and GG) and two minor haplotypes (GA and AA, frequency <0.05).

No statistical significant association was found comparing infant allele, genotype and haplotype *LTF* frequencies in HIV- and HIV+ children nor when stratifying according with HIV-1 type of MTCT (table supplementary 1).

No statistical significant association was detected for the *LTF* R47K polymorphism confronting NTR with TR mothers MTCT (table supplementary 2); while for the T29A polymorphism the G/G genotype was more frequent in TR than in NTR (table 2) (power: 0.68); this result was confirmed among PP MTCT group ($p=0.02$; OR=0.08; CI=0.005-0.90) (data not shown).

The haplotype analysis did not show any statistically significant correlations (table supplementary 2).

LTF R47K maternal genotypes were associated with plasma viral load (Kruskal-Wallis rank sum test, KW chi-squared=6.08, df=1, p-value=0.01, G/A genotype median: 1033 copies/ml, GG: 66355,5 copies/ml). Instead maternal *LTF* T29A genotypes were not correlated with maternal plasma viral load (data not shown).

PRF1 polymorphism

The *PRF1* c.900C>T frequency distribution was in HWE in all groups with the exception of HIV + children and HIV+ PP children.

The C/T genotype was more frequent among HIV- respect to HIV+ and associated with decreased risk of acquiring HIV-1 infection also after adjustment for maternal CD4 cells count and HIV-1 plasma viral load (table 3) (power: 0.68). When the children were subdivided according to the route of transmission, C allele and C/T genotype correlated with protection towards HIV-1 MTCT in the group of PP infected children (power: 0.64 C allele and 0.50 C/T genotype), also after adjustment for maternal CD4 cells count and HIV-1 plasma viral load (table 3).

The allele and genotype frequencies between TR and NTR mothers were similar: no statistical significant correlation was observed between the *PRF1* c.900C>T polymorphism and the risk of HIV-1 MTCT (table supplementary 2).

Finally the maternal *PRF1* c.900C>T genotypes were not associated with maternal plasma viral load (data not shown).

Stratification for maternal CD4 cells count and plasma viral load

The mothers and children data were also stratified based on maternal CD4 cells count (low and high, cut off=350 cells/mm³) and plasma viral load (low and high, cut off=50000 copies/ml): *DEFB1*, *LTF* and *PRF1* polymorphisms frequencies were not different comparing different TR and NTR mothers and also between HIV+ and HIV- children (data not shown).

Discussion

In our study we tested the possible association between functional variations at *DEFB1*, *LFT* and *PRF1* genes and susceptibility to HIV-1 infection in mothers and children from Zambia.

LTF T29A polymorphism associated with HIV-1 MTCT, being the T29A G/G genotype more represented among NTR mothers respect TR, moreover *LTF* R47K was correlated with HIV-1 maternal infection, indeed G/A genotype was linked with low maternal viral load instead G/G with high maternal viral load.

Lactoferrin possesses antiviral activity against HIV-1 inhibiting viral replication and blocking the spread of HIV-1 infection in peripheral blood mononuclear cell cultures [20] and is able to inhibit HIV-1 reverse transcriptase [21]. The presence of low concentrations of lactoferrin in the mother's serum has been reported as increasing the risk of HIV-1 MTCT [20]; however, few studies analysed the *LTF* genetic background. The *LTF* T29A polymorphism is known to cause a single-point A>G nucleotide mutation resulting in a threonine/alanine substitution at position 11 of the secreted lactoferrin protein, instead R47K produces a transition A>G leading to a lysine to arginine changing at position 29 [6]. No previous study associated these polymorphisms with HIV-1 infection [22], notwithstanding the T29A G allele was associated with periodontitis among African American individuals [9], instead R47K G allele was correlated to susceptibility towards periodontitis development among Taiwanese patients [8] and African Americans [9] and it has been also linked with risk of dental caries in Brazilians [11] and North Americans [10].

The importance of T29A and R47K polymorphisms and their associations with HIV-1 infection in our study could be hypothesized according to the position of the amino acidic substitutions caused by these polymorphism in the basic N-terminal region of the lactoferrin molecule that mediates its antimicrobial properties [23]. However *in silico* analysis with PolyPhen-2 [24] and SIFT [25] software predicted the polymorphisms as benign and thus not able to radically affect the protein.

In our study the other *LTF* polymorphism, R47K, was not associated with MTCT, nevertheless *DEFB1* and *PRF1* variations were correlated with HIV-1 MTCT among children.

DEFB1 c.*87 A allele and A/A genotype was related to decreased susceptibility towards IU HIV-1 MTCT, additionally considering *DEFB1* haplotypes, the GCGA associated with protection towards acquiring HIV-1 MTCT, moreover when the children were stratified according to the route of virus MTCT, the GCGA and ACGG haplotypes were correlated with decreased IP HIV-1 MTCT susceptibility.

Other previous works showed associations between *DEFB1* polymorphisms and HIV-1 infection in other ethnic groups, namely European Caucasian, Italians (for the -52A>G and -44C>G polymorphisms) [26] and Brazilians (for the -52A>G and -20G>A polymorphisms) [13].

In our study the -52A>G polymorphism was linked to MTCT, but only in the haplotype combination, instead the c.87*A/G polymorphism was associated with MTCT risk in this work for the first time.

Beta-defensins are important mediators of innate mucosal defence against microbial infection and are also known for their antiviral activities [27]. There are controversial reports regarding *DEFB1* mRNA expression in various tissues or cell lines [28, 14, 12], nevertheless hBD-1 is constitutively expressed at the mucosa surface [27]. Our study indicated that the four *DEFB1* polymorphisms could be involved in the HIV-1 infection susceptibility, suggesting also an additive and cooperative effect: it is possible to speculate that the *DEFB1* c.*87 G allele and A/G genotype and *DEFB1* ACGA haplotype, more frequent among HIV+ children might decrease the hBD-1 expression leading to an increased risk of acquiring HIV-1 infection.

PRF1 c.900C>T polymorphism was associated with HIV-1 infection susceptibility also after adjustment for maternal CD4 cells count and HIV-1 plasma viral load. When the children were stratified based on routes of HIV-1 infection, the statistical significance was maintained only in the HIV+ PP group: the *PRF1* c.900 T/T genotype was associated with an increased risk of acquiring HIV-1 infection, specially in the post partum period.

Our results partially agree with the data of Padovan et al. [7], in fact both studies observed an increased frequency of c.900 T allele in the HIV-1 positive children group respect to the group of HIV-1 exposed but not infected children. Our study found the c.900 T/T genotype more frequent among HIV+ respect to T/C genotype, instead in the study of Padovan et al. T/T was more frequent compared to C/C homozygous genotype.

The study of McIlliroy et al. [29] analysed also this *PRF1* gene polymorphism in a cohort of French HIV+ sero-converters. They observed that *PRF1* c.900C>T polymorphism seemed to not alter the amino acidic sequence of P1 protein and it was not associated with HIV-1 infection or progression. Ethnic differences could account for the divergent results as well as the different modality of HIV-1 transmission.

Despite the importance of subject's genetic background, other major factors are supposed to be involved in the susceptibility to the HIV-1 infection such as maternal viral load, virus subtypes and advancement of immune deficiency status [30].

In agreement with previous research, in our study HIV-1 MTCT was associated with low maternal CD4 cells count and high plasma viral load. Garcia et al. found high HIV-1 RNA plasma levels associated with a significant risk of HIV-1 MTCT [31], similarly in our study maternal viral loads were significantly higher in transmitters than in non-transmitters. Moreover in our study, low maternal CD4 cells count was correlated with an increased risk of HIV-1 MTCT and this finding was in agreement with previous studies [32].

In spite of our positive findings, taken into account some deviations from HWE, probably due to the low number of subjects present in some groups and the medium value of the power analysis, further studies should be necessary to clarify the role of *LTF*, *DEFB1* and *PRF1* gene polymorphisms in the multifactorial trait HIV-1 MTCT, since we just analysed the genome component of our samples not being available any biological material other than dried blood spot, for the functional validation (i.e. ELISA quantification of lactoferrin, hBD1 and P1) of the associations observed.

Acknowledgements and funding:

This work has been supported by RC06/11 and RC13/12 grants from IRCCS Burlo Garofolo Trieste / Ministry of Health (Italy). This study was supported in part by grants from the *Eunice Kennedy Shriver*, National Institute of Child Health and Human Development (NICHD), National Institutes of Health (NIH) (HD39611, HD40777, HD57617).

VP was recipient of fellowship from IRCCS Burlo Garofolo.

Conflict of interest

The authors declared no conflict of interest

References

1. UNAIDS. Global AIDS Response Progress Reporting 2015, <http://www.unaids.org>. 2015.
2. Singh KK, Spector SA. Host genetic determinants of human immunodeficiency virus infection and disease progression in children. *Pediatr Res*. 2009;65:55R-63R.
3. McLaren PJ, Coulonges C, Ripke S, van den Berg L, Buchbinder S, Carrington M et al. Association study of common genetic variants and HIV-1 acquisition in 6,300 infected cases and 7,200 controls. *PLoS Pathog*. 2013;9:e1003515.
4. Semba RD, Miotti PG, Lan Y, Chipangwi JD, Hoover DR, Dallabetta GA et al. Maternal serum lactoferrin and vertical transmission of HIV. *AIDS*. 1998;12:331-2.
5. Ricci E, Malacrida S, Zanchetta M, Montagna M, Giaquinto C, De Rossi A. Role of beta-defensin-1 polymorphisms in mother-to-child transmission of HIV-1. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2009;51:13-9.
6. Appay V, Papagno L, Spina CA, Hansasuta P, King A, Jones L et al. Dynamics of T cell responses in HIV infection. *J Immunol*. 2002;168:3660-6.
7. Padovan L, Segat L, Crovella S. A polymorphism in PRF1 gene is associated with HIV-1 vertical transmission in Brazilian children. *AIDS*. 2011;25:535-7.
8. Wu YM, Juo SH, Ho YP, Ho KY, Yang YH, Tsai CC. Association between lactoferrin gene polymorphisms and aggressive periodontitis among Taiwanese patients. *J Periodontal Res*. 2009;44:418-24.
9. Jordan WJ, Eskdale J, Lennon GP, Pestoff R, Wu L, Fine DH et al. A non-conservative, coding single-nucleotide polymorphism in the N-terminal region of lactoferrin is associated with aggressive periodontitis in an African-American, but not a Caucasian population. *Genes Immun*. 2005;6:632-5.
10. Fine DH, Toruner GA, Velliyagounder K, Sampathkumar V, Godbole D, Furgang D. A lactotransferrin single nucleotide polymorphism demonstrates biological activity that can reduce susceptibility to caries. *Infect Immun*. 2013;81:1596-605.
11. Azevedo LF, Pecharki GD, Brancher JA, Cordeiro CA, Jr., Medeiros KG, Antunes AA et al. Analysis of the association between lactotransferrin (LTF) gene polymorphism and dental caries. *J Appl Oral Sci*. 2010;18:166-70.
12. Sun CQ, Arnold R, Fernandez-Golarz C, Parrish AB, Almekinder T, He J et al. Human beta-defensin-1, a potential chromosome 8p tumor suppressor: control of transcription and induction of apoptosis in renal cell carcinoma. *Cancer Res*. 2006;66:8542-9.

13. Milanese M, Segat L, Pontillo A, Arraes LC, de Lima Filho JL, Crovella S. DEFB1 gene polymorphisms and increased risk of HIV-1 infection in Brazilian children. *AIDS*. 2006;20:1673-5.
14. Milanese M, Segat L, Crovella S. Transcriptional effect of DEFB1 gene 5' untranslated region polymorphisms. *Cancer Res*. 2007;67:5997; author reply
15. Segat L, Zupin L, Kim HY, Catamo E, Thea DM, Kankasa C et al. HLA-G 14 bp deletion/insertion polymorphism and mother-to-child transmission of HIV. *Tissue Antigens*. 2014;83:161-7.
16. Excoffier L, Lischer HE. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour*. 2010;10:564-7.
17. RcoreTeam. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/> 2015.
18. Sole X, Guino E, Valls J, Iñesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*. 2006;22:1928-9.
19. Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods*. 2007;39:175-91.
20. Viani RM, Gutteberg TJ, Lathey JL, Spector SA. Lactoferrin inhibits HIV-1 replication in vitro and exhibits synergy when combined with zidovudine. *AIDS*. 1999;13:1273-4.
21. Wang H, Ye X, Ng TB. First demonstration of an inhibitory activity of milk proteins against human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase and the effect of succinylation. *Life Sci*. 2000;67:2745-52.
22. Zupin L, Polesello V, Coelho AV, Boniotto M, Arraes LC, Segat L et al. Lactotransferrin gene functional polymorphisms do not influence susceptibility to human immunodeficiency virus-1 mother-to-child transmission in different ethnic groups. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110:222-9.
23. Zhang GH, Mann DM, Tsai CM. Neutralization of endotoxin in vitro and in vivo by a human lactoferrin-derived peptide. *Infect Immun*. 1999;67:1353-8.
24. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*. 2010;7:248-9.
25. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc*. 2009;4:1073-81.

26. Braidia L, Boniotto M, Pontillo A, Tovo PA, Amoroso A, Crovella S. A single-nucleotide polymorphism in the human beta-defensin 1 gene is associated with HIV-1 infection in Italian children. *AIDS*. 2004;18:1598-600.
27. Schneider JJ, Unholzer A, Schaller M, Schafer-Korting M, Korting HC. Human defensins. *J Mol Med (Berl)*. 2005;83:587-95.
28. Kalus AA, Fredericks LP, Hacker BM, Dommisch H, Presland RB, Kimball JR et al. Association of a genetic polymorphism (-44 C/G SNP) in the human DEFB1 gene with expression and inducibility of multiple beta-defensins in gingival keratinocytes. *BMC Oral Health*. 2009;9:21.
29. McIlroy D, Meyer L, Dudoit Y, Samri A, Delfraissy JF, Autran B et al. Polymorphism in the proximal promoter region of the perforin gene and its impact on the course of HIV infection. *Int J Immunogenet*. 2006;33:73-9.
30. European Collaborative Study. Risk factors for mother-to-child transmission of HIV-1. *Lancet*. 1992;339:1007-12.
31. Garcia PM, Kalish LA, Pitt J, Minkoff H, Quinn TC, Burchett SK et al. Maternal levels of plasma human immunodeficiency virus type 1 RNA and the risk of perinatal transmission. Women and Infants Transmission Study Group. *N Engl J Med*. 1999;341:394-402.
32. Kuhn L, Coutoudis A, Trabattoni D, Archary D, Rossi T, Segat L et al. Synergy between mannose-binding lectin gene polymorphisms and supplementation with vitamin A influences susceptibility to HIV infection in infants born to HIV-positive mothers. *Am J Clin Nutr*. 2006;84:610-5.

Table 1: *DEFB1* polymorphisms frequency distribution in children from Zambia

Children								
<i>DEFB1</i> c.*87A>G rs1800971	IU n=22	HIV- n=246	IU vs. HIV-					
			Fisher test		Logistic Regression (Wald's test)			
			Unadjusted OR (95% CI)	p-value	Unadjusted OR (95% CI)	p-value	Adjusted OR* (95% CI)	p-value
A	0.57 (25)	0.73 (361)	1.00					
G	0.43 (19)	0.27 (131)	2.09 (1.05-4.10)	0.02				
A/A	0.27 (6)	0.53 (131)	1.00		1.00		1.00	
G/A	0.59 (13)	0.40 (99)	2.85 (0.97-9.49)	0.05	2.87 (1.05-7.81)	0.04	2.94 (1.05-8.26)	0.04
G/G	0.14 (3)	0.06 (16)	4.04 (0.60-21.25)	0.08	4.09 (0.93-17.98)	0.06	4.38 (0.92-20.87)	0.06
HWE	$\chi^2=0.92$ p=0.34	$\chi^2=0.22$ p=0.64						
<i>DEFB1</i> Haplotypes	HIV+ n=85	HIV- n=246	HIV+ vs. HIV-					
			Fisher test					
			Unadjusted OR (95% CI)	p-value				
ACGA	0.33 (56)	0.30 (147)	1.00					
GCAA	0.25 (43)	0.25 (121)	0.93 (0.57-1.52)	0.81				
ACGG	0.22 (38)	0.24 (117)	0.85 (0.51-1.41)	0.55				
GCGA	0.02 (3)	0.09 (43)	0.18 (0.03-0.61)	0.002				
others	0.18 (30)	0.13 (64)	1.25 (0.70-2.18)	0.49				
<i>DEFB1</i> Haplotypes	IP n=25	HIV- n=246	IP vs HIV-					
			Fisher test					
			Unadjusted OR (95% CI)	p-value				
ACGA	0.44 (22)	0.30 (147)	1.00					
GCAA	0.26 (13)	0.25 (121)	0.72 (0.32-1.56)	0.47				
ACGG	0.08 (4)	0.24 (117)	0.23 (0.06-0.70)	0.006				
GCGA	0.02 (1)	0.09 (43)	0.16 (0.004-1.02)	0.05				
others	0.20 (10)	0.13 (64)	1.04 (0.42-2.46)	1.00				

*adjusted for maternal CD4 + cells count and HIV-1 plasma viral load. Bold character indicates statistical significance.

HWE = Hardy Weinberg equilibrium; HIV- = HIV-1 exposed but not infected children; HIV+ = HIV-1 infected children; IU = intrauterine HIV-1 mother to child; transmission ;IP = intrapartum HIV-1 mother to child transmission ; OR= odds ratio; CI= confidence interval

Table 2: *LTF* polymorphisms frequency distribution in mothers from Zambia

Mothers			TR vs NTR					
<i>LTF</i> T29A rs1126477	TR n=26	NTR n=75	Fisher test		Logistic Regression (Wald's test)			
			Unadjusted OR (95% CI)	p-value	Unadjusted OR (95% CI)	p-value	Adjusted OR* (95% CI)	p-value
A	0.65 (34)	0.73 (110)	1.00					
G	0.35 (18)	0.27 (40)	1.43 (0.69-3.00)	0.29				
A/A	0.50 (13)	0.49 (37)	1.00		1.00		1.00	
A/G	0.31 (8)	0.48 (36)	0.63 (0.21-1.88)	0.46	0.60 (0.22-1.61)	0.31	0.69 (0.23-2.04)	0.50
G/G	0.19 (5)	0.03 (2)	6.83 (0.97-79.85)	0.03	7.12 (1.23-41.25)	0.03	5.14 (0.81-32.58)	0.08
HWE	$\chi^2=2.67$; p=0.10	$\chi^2=3.87$; p=0.05						

* adjusted for CD4 + cells count and HIV-1 plasma viral load

Bold character indicates statistical significance

TR = transmitter mother; NTR = non-transmitter mothers; HWE = Hardy Weinberg equilibrium; OR= odds ratio; CI= confidence interval.

Table 3: *PRF1* polymorphism frequency distribution in children from Zambia

Children			HIV+ vs HIV-					
			Fisher test		Logistic Regression (Wald's test)			
			Unadjusted OR (95% CI)	p-value	Unadjusted OR (95% CI)	p-value	Adjusted OR* (95% CI)	p-value
<i>PRF1</i> c.900C>T rs885822	HIV+ n=85	HIV- n=246						
T	0.89 (151)	0.83 (410)	1.00					
C	0.11 (19)	0.17 (82)	0.63 (0.35-1.09)	0.11				
T/T	0.81 (69)	0.70 (171)	1.00		1.00		1.00	
C/T	0.15 (13)	0.28 (68)	0.47 (0.25-0.91)	0.03	0.47 (0.25-0.91)	0.03	0.40 (0.19-0.81)	0.01
C/C	0.04 (3)	0.03 (7)	1.06 (0.27-4.23)	1.00	1.06 (0.27-4.23)	0.93	1.82 (0.39-8.58)	0.45
HWE	$\chi^2=4.48$ p=0.03	$\chi^2=0.01$ p=0.94						
			PP vs. HIV-					
			Fisher test		Logistic Regression (Wald's test)			
			Unadjusted OR (95% CI)	p-value	Unadjusted OR (95% CI)	p-value	Adjusted OR* (95% CI)	p-value
<i>PRF1</i> c.900C>T rs885822	PP n=38	HIV- n=246						
T	0.93 (71)	0.83 (410)	1.00					
C	0.07 (5)	0.17 (82)	0.35 (0.11-0.90)	0.02				
T/T	0.87 (34)	0.70 (171)	1.00		1.00		1.00	
C/T	0.13 (3)	0.28 (68)	0.22 (0.04-0.74)	0.01	0.22 (0.07-0.75)	0.015	0.19 (0.05-0.66)	0.009
C/C	0.004 (1)	0.03 (7)	0.72 (0.01-5.90)	1.00	0.72 (0.09-6.03)	0.76	1.10 (0.12-10.49)	0.93
HWE	$\chi^2=4.86$ p=0.03	$\chi^2=0.01$ p=0.94						

* adjusted for CD4 + cells count and HIV-1 plasma viral load

Bold character indicates statistical significance.

HWE = Hardy Weinberg equilibrium; HIV- = HIV-1 exposed but not infected children; HIV+ = HIV-1 infected children; PP = postpartum HIV-1 mother to child transmission; OR= odds ratio CI= confidence interval

Supp. table 1: *DEFB1*, *LTF* and *PRF1* polymorphism allele, genotype frequencies (and counts) in HIV-1 exposed but not infected children (HIV-) and HIV-1 infected children, also stratifying for timing of HIV-1 MTCT in intrauterine (IU), intrapartum (IP) and postpartum (PP) groups.

CHILDREN	IU n=22	IP n=25	PP n=38	HIV+ n=85	HIV- n=246	HIV+ vs. HIV- Fisher test p-value	IU vs. HIV- Fisher test p-value	IP vs. HIV- Fisher test p-value	PP vs. HIV- Fisher test p-value
<i>DEFB1</i> -52A>G rs1799946									
A	0.57 (25)	0.56 (28)	0.66 (50)	0.61 (103)	0.60 (293)	0.86	0.75	0.65	0.38
G	0.43 (19)	0.44 (22)	0.34 (26)	0.39 (67)	0.40 (199)				
A/A	0.41 (9)	0.28 (7)	0.39 (15)	0.36 (31)	0.36 (89)				
G/A	0.32 (7)	0.56 (14)	0.53 (20)	0.48 (41)	0.47 (115)	0.96	0.29	0.67	0.41
G/G	0.27 (6)	0.16 (4)	0.08 (3)	0.15 (13)	0.17 (42)				
HWE	$\chi^2=2.72$ p=0.10	$\chi^2=0.46$ p=0.50	$\chi^2=1.09$ p=0.30	$\chi^2=0.01$ p=0.93	$\chi^2=0.22$ p=0.64				
<i>-44C>G</i> rs1800972									
C	0.93 (41)	0.92 (46)	0.97 (74)	0.95 (161)	0.94 (462)	0.85	0.75	0.54	0.29
G	0.07 (3)	0.08 (4)	0.03 (2)	0.05 (9)	0.06 (30)				
C/C	0.86 (19)	0.84 (21)	0.95 (36)	0.89 (76)	0.89 (219)				
C/G	0.14 (3)	0.16 (4)	0.05 (2)	0.11 (9)	0.10 (24)	0.79	0.60	0.48	0.71
G/G	0.00 (0)	0.00 (0)	0.00 (0)	0.00 (0)	0.01 (3)				
HWE	$\chi^2=0.12$ p=0.73	$\chi^2=0.19$ p=0.66	$\chi^2=0.03$ p=0.87	$\chi^2=0.27$ p=0.61	$\chi^2=5.39$ p=0.02				
<i>-20A>G</i> rs11362									
G	0.70 (31)	0.70 (35)	0.67 (51)	0.69 (117)	0.71 (348)	0.63	1.00	1.00	0.50
A	0.30 (13)	0.30 (15)	0.33 (25)	0.31 (53)	0.29 (144)				

G/G	0.59 (13)	0.48 (12)	0.42 (16)	0.48 (41)	0.51 (125)				
G/A	0.23 (5)	0.44 (11)	0.50 (19)	0.41 (35)	0.40 (98)	0.87	0.17	0.95	0.49
A/A	0.18 (4)	0.08 (2)	0.08 (3)	0.11 (9)	0.09 (23)				
HWE	$\chi^2=4.54$ p=0.03	$\chi^2=0.06$ p=0.81	$\chi^2=0.67$ p=0.41	$\chi^2=0.14$ p=0.71	$\chi^2=0.35$ p=0.55				
c.*87A>G									
rs1800971									
A	0.57 (25)	0.82 (41)	0.70 (53)	0.70 (119)	0.73 (361)				
G	0.43 (19)	0.18 (9)	0.30 (23)	0.30 (51)	0.27 (131)	0.43	0.02	0.23	0.49
A/A	0.27 (6)	0.64 (16)	0.47 (18)	0.47 (40)	0.53 (131)				
G/A	0.59 (13)	0.36 (9)	0.45 (17)	0.46 (39)	0.40 (99)	0.59	0.04	0.42	0.76
G/G	0.14 (3)	0.00 (0)	0.08 (3)	0.07 (6)	0.06 (16)				
HWE	$\chi^2=0.92$ p=0.34	$\chi^2=1.20$ p=0.27	$\chi^2=0.14$ p=0.71	$\chi^2=0.73$ p=0.39	$\chi^2=0.22$ p=0.64				
Haplotypes									
ACGA	0.23 (10)	0.44 (22)	0.32 (24)	0.33 (56)	0.30 (147)				
GCAA	0.25 (11)	0.26 (13)	0.25 (19)	0.25 (43)	0.25 (121)				
ACGG	0.32 (14)	0.08 (4)	0.26 (20)	0.22 (38)	0.24 (117)	0.01	0.08	0.01	0.45
GCGA	0.00 (0)	0.02 (1)	0.03 (2)	0.02 (3)	0.09 (43)				
others	0.20 (9)	0.20 (10)	0.14 (11)	0.18 (30)	0.13 (64)				
LTF									
T29A									
rs1126477									
A	0.80 (35)	0.64 (32)	0.70 (53)	0.71 (120)	0.71 (350)				
G	0.20 (9)	0.36 (18)	0.30 (23)	0.29 (50)	0.29 (142)	0.92	0.29	0.33	0.79
A/A	0.64 (14)	0.36 (9)	0.47 (18)	0.48 (41)	0.49 (121)				0.96
A/G	0.32 (7)	0.56 (14)	0.45 (17)	0.45 (38)	0.44 (108)	0.98	0.46	0.43	
G/G	0.04 (1)	0.08 (2)	0.08 (3)	0.07 (6)	0.07 (17)				

HWE	$\chi^2=0.01$ p=0.92	$\chi^2=1.16$ p=0.28	$\chi^2=0.14$ p=0.71	$\chi^2=0.50$ p=0.48	$\chi^2=1.18$ p=0.28				
R47K									
rs1126478									
G	0.98 (43)	0.98 (49)	0.99 (75)	0.98 (167)	0.97 (476)	0.43	1.00	1.00	0.71
A	0.02 (1)	0.02 (1)	0.01 (1)	0.02 (3)	0.03 (16)				
G/G	0.95 (21)	0.96 (24)	0.97 (37)	0.97 (82)	0.94 (232)				
A/G	0.04 (1)	0.04 (1)	0.03 (1)	0.03 (3)	0.05 (12)	0.87	1.00	1.00	1.00
A/A	0.00 (0)	0.00 (0)	0.00 (0)	0.00 (0)	0.01 (2)				
HWE	$\chi^2=0.01$ p=0.91	$\chi^2=0.01$ p=0.92	$\chi^2=0.01$ p=0.93	$\chi^2=0.03$ p=0.87	$\chi^2=12.43$ p=0.0004				
Haplotypes									
AG	0.80 (35)	0.64 (32)	0.70 (53)	0.71 (120)	0.70 (346)	0.64	0.46	0.53	0.71
GG	0.19 (8)	0.34 (17)	0.29 (22)	0.28 (47)	0.26 (130)				
others	0.01 (1)	0.02 (1)	0.02 (1)	0.02 (3)	0.03 (16)				
PRF1									
c.900C>T									
rs885822									
T	0.82 (36)	0.88 (44)	0.93 (71)	0.89 (151)	0.83 (410)	0.11	0.83	0.54	0.02
C	0.18 (8)	0.12 (6)	0.07 (5)	0.11 (19)	0.17 (82)				
T/T	0.73 (16)	0.76 (19)	0.87 (34)	0.81 (69)	0.70 (171)				
C/T	0.18 (4)	0.24 (6)	0.13 (3)	0.15 (13)	0.28 (68)	0.06	0.19	0.91	0.02
C/C	0.09 (2)	0.00 (0)	0.004 (1)	0.04 (3)	0.03 (7)				
HWE	$\chi^2=3.33$ p=0.07	$\chi^2=0.46$ p=0.49	$\chi^2=4.86$ p=0.03	$\chi^2=4.48$ p=0.03	$\chi^2=0.01$ p=0.94				

HWE = Hardy Weinberg equilibrium; HIV- = HIV-1 exposed but not infected children; HIV+ = HIV-1 infected children; IU = intrauterine HIV-1 transmission; IP = intrapartum HIV-1 transmission; PP = postpartum HIV-1 transmission

Supp. table 2: Analysis of HIV-1 MTCT according to maternal *DEFB1*, *LTF* and *PRF1* allele, genotype and haplotype frequencies comparing transmitter (TR) and non transmitter (NTR) mothers.

MOTHERS	TR n=26	NTR n=75	TR vs. NTR Fisher test p-value
<i>DEFB1</i> -52A>G rs1799946			
A	0.60 (31)	0.61 (92)	0.87
G	0.40 (21)	0.39 (58)	
A/A	0.35 (9)	0.37 (28)	1.00
G/A	0.50 (13)	0.48 (36)	
G/G	0.15 (4)	0.15 (11)	
HWE	$\chi^2=0.04$; p=0.84	$\chi^2=0.01$; p=0.92	
-44C>G rs1800972			
C	0.94 (49)	0.96 (144)	0.70
G	0.06 (3)	0.04 (6)	
C/C	0.88 (23)	0.92 (69)	0.69
C/G	0.12 (3)	0.08 (6)	
HWE	$\chi^2=0.10$; p=0.75	$\chi^2=0.13$; p=0.72	
-20A>G rs11362			
G	0.71 (37)	0.69 (104)	0.86
A	0.29 (15)	0.31 (46)	
G/G	0.54 (14)	0.51 (38)	0.95
G/A	0.35 (9)	0.37 (28)	
A/A	0.12 (3)	0.12 (9)	
HWE	$\chi^2=0.64$; p=0.42	$\chi^2=1.12$; p=0.29	
c.*87A>G rs1800971			
A	0.83 (43)	0.71 (106)	0.10
G	0.17 (9)	0.29 (44)	
A/A	0.65 (17)	0.49 (37)	0.22
G/A	0.35 (9)	0.43 (32)	
G/G	0.00 (0)	0.08 (6)	
HWE	$\chi^2=1.14$; p=0.29	$\chi^2=0.06$; p=0.80	
Haplotypes			
ACGA	0.38 (20)	0.33 (50)	0.345
GCAA	0.25 (13)	0.29 (43)	
ACGG	0.17 (9)	0.27 (40)	

GCGA	0.10 (5)	0.04 (6)	
others	0.10 (5)	0.07 (11)	
<i>LTF</i>			
T29A			
rs1126477			
A	0.65 (34)	0.73 (110)	0.29
G	0.35 (18)	0.27 (40)	
A/A	0.50 (13)	0.49 (37)	0.015
A/G	0.31 (8)	0.48 (36)	
G/G	0.19 (5)	0.03 (2)	
HWE	$\chi^2=2.67$; p=0.10	$\chi^2=3.87$; p=0.05	
R47K			
rs1126478			
G	0.98 (51)	0.97 (146)	0.65
A	0.02 (2)	0.03 (4)	
G/G	0.96 (25)	0.95 (71)	1.00
A/G	0.04 (1)	0.05 (4)	
HWE	$\chi^2=0.01$; p=0.92	$\chi^2=0.06$; p=0.81	
Haplotypes			
AG	0.63 (34)	0.73 (110)	0.44
GG	0.31 (17)	0.24 (36)	
others	0.02 (1)	0.03 (4)	
<i>PRF1</i>			
c.900C>T			
rs885822			
T	0.81 (42)	0.89 (134)	0.15
C	0.19 (10)	0.11 (16)	
T/T	0.69 (18)	0.80 (60)	0.20
C/T	0.23 (6)	0.19 (14)	
C/C	0.08 (2)	0.01 (1)	
HWE	$\chi^2=1.72$; p=0.19	$\chi^2=0.03$; p=0.86	

HWE = Hardy Weinberg equilibrium

7 DISCUSSÃO GERAL

Análises de genes candidatos associados à transmissão do HIV-1 apresentam desafios importantes quanto ao grau de exposição viral, visto que fatores virais, imunes, comportamentais e obstétricos podem enviesar ou dificultar a detecção de efeitos genéticos do hospedeiro associados à transmissão (Hill, 2006; Fellay et al., 2010). Neste contexto, o presente estudo realizou a avaliação de genes candidatos da imunidade inata como fatores de transmissão materno-infantil do HIV-1 (TMI) através da adoção de critérios clínicos rigorosos de exposição viral [sobretudo contagem de linf. CD4+ (parto), carga viral materna (parto e colostro), tempo de gestação e co-infecções] e caracterização das vias de TMI (intrauterina, intraparto ou pós-parto). A ausência de diferenças significativas entre os neonatos infectados quanto às principais variáveis clínicas de exposição favoreceu a análise de polimorfismos como fatores de susceptibilidade à TMI na coorte *Zambian Exclusive Breastfeeding Study* (ZEBS) de Lusaka.

Os índices de transmissão durante a gestação, parto e amamentação encontrados foram respectivamente de 7.1, 7.4 e 11.8%, os quais foram corroborados por índices similares aos de gestantes infectadas em estudos anteriores (5-10% na gestação, 10-20% no parto e 5-15% na amamentação)(John e Kreiss, 1996; Tobin e Aldrovandi, 2013), ratificando que fatores da interação materna-infantil impedem que a TMI ocorra de forma majoritária mesmo na ausência de tratamento antirretroviral (TAR) durante a gestação. Os menores índices de transmissão intraparto na coorte ZEBS poderia ser atribuída a benefícios da dose única de nevirapina empregada (no início do trabalho de parto) na coorte, associada anteriormente à redução de 8.1% em transmissões intrapartos (Jackson et al., 2003).

A ativação de resposta citotóxica durante a exposição ao HIV-1 tem se apresentado como evento essencial na proteção de neonatos/crianças durante a amamentação. Crianças infectadas tardiamente (após o 1º mês) durante a amamentação apresentam menor *set point* viral (Obimbo et al., 2009) e produção mais robusta de IFN- γ em linfócitos CD8+ HIV-1 específicos (Lohman-Payne et al., 2009) comparados aos infectados no 1º mês; assim como neonatos não-infectados mas expostos à TMI durante a amamentação também apresentam maior produção de IFN- γ entre CD8+ HIV-1-específicas (John-Stewart et al., 2009) e produção média

maior de perforina entre células NK (Slyker et al., 2012) em comparação aos infectados.

Neste contexto, a importância da resposta efetora mediada por IFN- γ foi ratificada pelos alelos de proteção à TMI por amamentação (rs9576A do gene *BST2* e c.900 C do gene *PRF1*) encontrados pelo nosso estudo, visto que regiões promotoras nestes genes são induzidos durante a ativação do receptor de IFN- γ (IFNGR) respectivamente pelos fatores de transcrição STAT1 (Mahauad-Fernandez e Okeoma, 2016) e T-bet (Pipkin et al., 2010). A expressão diferencial destes genes em células imunes ao longo da mucosa gastrointestinal pode interferir na expansão viral após a entrada de células infectadas e/ou vírions pelo leite, por aumento da contenção viral em membranas pela teterina (Chu et al., 2012) e da atividade citolítica induzida por perforina através de linfócitos CD8+ e células NKs locais (Alter e Altfeld, 2009).

Embora o impacto funcional do alelo protetor rs9576A situado na 3'UTR do gene *BST2* durante transmissão do HIV-1 ainda seja desconhecido, variantes encontradas em desequilíbrio de ligação (LD) a este polimorfismo também ratificaram o seu papel protetor à infecção pelo HIV-1, mas entre coortes de progressão à AIDS adulta. Em duas coortes de origens distintas [coorte brasileira avaliada pelo nosso estudo e coorte espanhola (Laplana et al., 2013)] as variantes *BST2* rs919266A e *BST2* rs10415893 foram associadas respectivamente à progressão mais lenta à AIDS adulta, se encontrando em LD ($D'=1.0$; de acordo com população ibérica - IBS do catálogo de variantes humanas *1000 Genomes* - www.internationalgenome.org/). O papel do alelo rs9576A também foi investigado pelo nosso estudo em coorte italiana de progressão infantil ao HIV-1, no entanto a sua influência na progressão não foi detectada pela ausência alélica em nosso grupo amostral, devido à baixa frequência alélica entre algumas populações européias, evidenciadas no catálogo *1000 genomes*.

O alelo c.900 C do gene *PRF1* teve sua função protetora corroborada por estudo de TMI em coorte brasileira por Padovan et al. (2011), apresentando o mesmo alelo *PRF1* c.900C com função protetora, no entanto a via de transmissão não foi identificada e indivíduos saudáveis não foram expostos ao HIV-1 neste estudo. Embora o mesmo alelo não tenha apresentado risco associado à transmissão horizontal e progressão adulta à AIDS em grupo francês de usuários de

droga injetáveis (McIlroy *et al.*, 2006), o efeito de risco/proteção poderia ser comprometido por diferenças no background genético das populações.

Interferons do tipo I (IFN- α , IFN- β) e β -quimiocinas (RANTES e MIP-1 β), expressas constitutivamente por células trofoblásticas (Lee *et al.*, 2001), têm se apresentado como alguns dos principais fatores de resistência à transmissão intrauterina por atuarem respectivamente na supressão transcricional do HIV-1 em trofoblastos infectados (Zachar *et al.*, 2002) e na diminuição da infecção trofoblástica pelo HIV-1 como antagonistas de co-receptor viral CCR5 (Derrien *et al.*, 2005). Neste sentido, o alelo da 3'UTR *DEFB1* c.*87A poderia atuar como modulador da transmissão intrauterina tendo em vista que a β -defensina-1 é constitutivamente expressa em trofoblasto e membrana coriônica (King *et al.*, 2007) e poderia atuar como alvo de indução de IFN- α durante a infecção aguda pelo HIV-1 na interface placentária (Corleis *et al.*, 2017).

Os alelos situados na 5'UTR *DEFB1* -44 G em coorte italiana (Segat *et al.*, 2006) e o alelo *DEFB1* -52 A em coorte brasileira (Milanese *et al.*, 2006) foram previamente relacionados à proteção à TMI do HIV-1, no entanto em ambos os estudos os efeitos de proteção foram baseados em comparação a neonatos saudáveis que não foram expostos ao HIV-1. O estudo em nossa coorte apontou uma função de proteção do alelo -52A entre infectados durante o parto somente quando era encontrado em bloco haplotípico 52A/-44G/-20G/*87G.

O genótipo *LTF* T29A GG foi a única variante avaliada que conferiu resistência materna à transmissão perinatal do HIV-1, enquanto *LTF* R47K G estava associado somente à carga viral materna maior, sem conferir risco à TMI. A expressão protéica mais baixa de Ltf associada ao haplótipo T29A A-,R47K G - rs2073495 C - rs9110 C (AGCC) foi encontrada em tecidos epiteliais ovarianos em população chinesa, mas com limitações na amostragem e correlação de expressão protéica restrita somente a um haplótipo, sem evidenciar os efeitos isolados dos polimorfismos T29A e R47K nos níveis de lactoferrina (Cao *et al.*, 2011). A função dos polimorfismos T29A e R47K em neonatos expostos ao HIV-1 foram avaliados também em coortes de TMI da Itália, Índia, Brasil e Zimbábue, e corroboraram os nossos resultados quanto à ausência de risco associado à neonatos portadores destas variantes (Zupin *et al.*, 2015).

8 CONCLUSÃO

Através do presente estudo foi possível indicar alelos em genes da imunidade inata como fatores de proteção em vias de transmissão materno-infantil (TMI), no qual o alelo 3'UTR *DEFB1* c.*87A conferiu proteção em neonatos expostos ao HIV-1 durante a gestação enquanto alelos 3'UTR *BST2* rs9576A e *PRF1* c.900 C conferiram resistência de neonatos à TMI durante a amamentação. Dentre os genes estudados, a função de proteção foi ratificada entre adultos na progressão mais lenta à AIDS atribuída ao gene *BST2* (alelo rs919266A), enquanto o gene codificante da lactoferrina (genótipo *LTF* T29A GG) teve função demonstrada entre adultos, mas como fator de risco materno de transmissão viral.

Apesar da heterogeneidade genética entre as coortes de TMI, de progressão adulta e pediátrica, assim como de limitações do número amostral entre os grupos, foi possível destacar a influência de genes de imunidade inata em um grupo vulnerável à infecção pelo HIV-1 e ainda pouco explorado por estudos imunogenéticos. A investigação aprofundada da função destes genes candidatos podem futuramente contribuir em estudos translacionais, como alvos terapêuticos para restrição da TMI entre gestantes e na proteção de neonatos durante a exposição viral.

REFERÊNCIAS

- Al-Husaini a M. Role of placenta in the vertical transmission of human immunodeficiency virus. **J Perinatol** 29:331–6. 2009.
- Aldrovandi GM, Kuhn L. What infants and breasts can teach us about natural protection from HIV infection. **J Infect Dis** 202 Suppl:S366-70. 2010.
- Alter G, Altfeld M. NK cells in HIV-1 infection: Evidence for their role in the control of HIV-1 infection. **J Intern Med** 265:29–42. 2009.
- Alvarez RA, Barría MI, Chen BK. Unique features of HIV-1 spread through T cell virological synapses. **PLoS Pathog** 10:e1004513. 2014.
- An P, Johnson R, Phair J, Kirk GD, Yu X-F, Donfield S, Buchbinder S, Goedert JJ, Winkler CA. APOBEC3B deletion and risk of HIV-1 acquisition. **J Infect Dis** 200:1054–8. 2009.
- An P, Winkler C a. Host genes associated with HIV/AIDS: advances in gene discovery. **Trends Genet** 26:119–31. 2010.
- Anderluh G, Kisovec M, Kraševac N, Gilbert RJC. Distribution of MACPF/CDC Proteins. In: **Sub-cellular biochemistry**. Vol. 80. . p 7–30. 2014.
- Anderson DJ. Modeling mucosal cell-associated HIV type 1 transmission in vitro. **J Infect Dis** 210:S648–S653. 2014.
- Anon. The Mode of Delivery and the Risk of Vertical Transmission of Human Immunodeficiency Virus Type 1 — A Meta-Analysis of 15 Prospective Cohort Studies. **N Engl J Med** 340:977–987. 1999.
- Anon. Mother-to-Child Transmission of HIV Infection in the Era of Highly Active Antiretroviral Therapy. **Clin Infect Dis** 40:458–465. 2005.
- Bashirova AA, Thomas R, Carrington M. HLA/KIR restraint of HIV: surviving the fittest. **Annu Rev Immunol** 29:295–317. 2011.
- Behbahani H, Popek E, Garcia P, Andersson J, Spetz A-L, Landay A, Flener Z, Patterson BK. Up-Regulation of CCR5 Expression in the Placenta Is Associated with Human Immunodeficiency Virus-1 Vertical Transmission. **Am J Pathol** 157:1811–1818. 2000.
- Berkhout B, Van Wamel JLB, Beljaars L, Meijer DKF, Visser S, Floris R. Characterization of the anti-HIV effects of native lactoferrin and other milk proteins and protein-derived peptides. **Antiviral Res** 55:341–355. 2002.
- Boily-Larouche G, Iscache A-L, Zijenah LS, Humphrey JH, Mouland AJ, Ward BJ, Roger M. Functional Genetic Variants in DC-SIGNR Are Associated with Mother-to-Child Transmission of HIV-1. **PLoS One** 4:e7211. 2009.
- Boniotto M, Crovella S, Pirulli D, Scarlatti G, Spanò A, Vatta L, Zezlina S, Tovo PA, Palomba E, Amoroso A. Polymorphisms in the MBL2 promoter correlated with risk of HIV-1 vertical transmission and AIDS progression. **Genes Immun** 1:346–8. 2000.
- Brass AL, Dykxhoorn DM, Benita Y, Yan N, Engelman A, Xavier RJ, Lieberman J, Elledge SJ. Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. **Science** 319:921–6. 2008.

Brouwer KC, Lal RB, Mirel LB, Yang C, van Eijk AM, Ayisi J, Otieno J, Nahlen BL, Steketee R, Lal AA, Shi YP. Polymorphism of Fc receptor IIa for IgG in infants is associated with susceptibility to perinatal HIV-1 infection. **AIDS** 18:1187–94. 2004.

Brouwer KC, Yang C, Parekh S, Mirel LB, Shi YP, Otieno J, Lal AA, Lal RB. Effect of CCR2 Chemokine Receptor Polymorphism on HIV Type 1 Mother-to-Child Transmission and Child Survival in Western Kenya. **AIDS Res Hum Retroviruses** 21:358–362. 2005.

Cao L, Zhou Y, Li X, Yi H. The relationship of haplotype in lactotransferrin and its expression levels in Chinese Han ovarian cancer. **Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)** 43:884–890. 2011.

Carrington M, O'Brien SJ. The influence of HLA genotype on AIDS. **Annu Rev Med** 54:535–51. 2003.

Chang TL, Vargas J, DelPortillo A, Klotman ME. Dual role of α -defensin-1 in anti-HIV-1 innate immunity. **J Clin Invest** 115:765–773. 2005.

Chu H, Wang J-J, Qi M, Yoon J-J, Chen X, Wen X, Hammonds J, Ding L, Spearman P. Tetherin/BST-2 is essential for the formation of the intracellular virus-containing compartment in HIV-infected macrophages. **Cell Host Microbe** 12:360–72. 2012.

Corleis B, Lisanti AC, K $\ddot{u}$ rner C, Schiff AE, Rosenberg ES, Allen TM, Altfeld M, Kwon DS. Early type I Interferon response induces upregulation of human α -defensin 1 during acute HIV-1 infection. **PLoS One** 12:e0173161. 2017.

Van Damme N, Goff D, Katsura C, Jorgenson RL, Mitchell R, Johnson MC, Stephens EB, Guatelli J. The interferon-induced protein BST-2 restricts HIV-1 release and is downregulated from the cell surface by the viral Vpu protein. **Cell Host Microbe** 3:245–52. 2008.

Derrien M, Faye A, Dolcini G, Chaouat G, Barré-Sinoussi F, Menu E. Impact of the placental cytokine-chemokine balance on regulation of cell-cell contact-induced human immunodeficiency virus type 1 translocation across a trophoblastic barrier in vitro. **J Virol** 79:12304–10. 2005.

Dickover RE, Garratty EM, Plaeger S, Bryson YJ. Perinatal transmission of major, minor, and multiple maternal human immunodeficiency virus type 1 variants in utero and intrapartum. **J Virol** 75:2194–203. 2001.

Douek DC, Picker LJ, Koup RA. T cell dynamics in HIV-1 infection. **Annu Rev Immunol** 21:265–304. 2003.

Duliège AM, Amos CI, Felton S, Biggar RJ, Goedert JJ. Birth order, delivery route, and concordance in the transmission of human immunodeficiency virus type 1 from mothers to twins. **J Pediatr** 126:625–632. 1995.

Elass-Rochard E, Legrand D, Salmon V, Roseanu A, Trif M, Tobias PS, Mazurier J, Spik G. Lactoferrin inhibits the endotoxin interaction with CD14 by competition with the lipopolysaccharide-binding protein. **Infect Immun** 66:486–91. 1998.

Evans DT, Serra-Moreno R, Singh RK, Guatelli JC. BST-2/tetherin: a new component of the innate immune response to enveloped viruses. **Trends Microbiol** 18:388–96. 2010.

Farquhar C, Rowland-Jones S, Mbori-Ngacha D, Redman M, Lohman B, Slyker J,

Otieno P, Obimbo E, Rostron T, Ochieng J, Oyugi J, Bosire R, John-Stewart G. Human leukocyte antigen (HLA) B*18 and protection against mother-to-child HIV type 1 transmission. **AIDS Res Hum Retroviruses** 20:692–7. 2004.

Fawzi W, Msamanga G, Renjifo B, Spiegelman D, Urassa E, Hashemi L, Antelman G, Essex M, Hunter D. Predictors of intrauterine and intrapartum transmission of HIV-1 among Tanzanian women. **AIDS** 15:1157–65. 2001.

Fellay J, Shianna K V, Telenti A, Goldstein DB. Host genetics and HIV-1: the final phase? **PLoS Pathog** 6:e1001033. 2010.

Furci L, Tolazzi M, Sironi F, Vassena L, Lusso P. Inhibition of HIV-1 Infection by Human α -Defensin-5, a Natural Antimicrobial Peptide Expressed in the Genital and Intestinal Mucosae. **PLoS One** 7:e45208. 2012.

Galão RP, Pickering S, Curnock R, Neil SJD. Retroviral Retention Activates a Syk-Dependent HemITAM in Human Tetherin. **Cell Host Microbe** 16:291–303. 2014.

Galloway NLK, 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** 12:1555–1563. 2015.

Giese S, Marsh M. Tetherin can restrict cell-free and cell-cell transmission of HIV from primary macrophages to T cells. **PLoS Pathog** 10:e1004189. 2014.

Gonzalez E, Kulkarni H, Bolivar H, Mangano A, Sanchez R, Catano G, Nibbs RJ, Freedman BI, Quinones MP, Bamshad MJ, Murthy KK, Rovin BH, Bradley W, Clark RA, Anderson SA, O'connell RJ, Agan BK, Ahuja SS, Bologna R, Sen L, Dolan MJ, Ahuja SK. The Influence of CCL3L1 Gene-Containing Segmental Duplications on HIV-1/AIDS Susceptibility. **Science** (80-) 307:1434–1440. 2005.

Göransdotter Ericson K, Fadeel B, Nilsson-Ardnor S, Söderhäll C, Samuelsson A, Janka G, Schneider M, Gürgey A, Yalman N, Révész T, Egeler R, Jahnukainen K, Storm-Mathiesen I, Haraldsson A, Poole J, de Saint Basile G, Nordenskjöld M, Henter J. Spectrum of perforin gene mutations in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. **Am J Hum Genet** 68:590–7. 2001.

Graham SA, Antonopoulos A, Hitchen PG, Haslam SM, Dell A, Drickamer K, Taylor ME. Identification of neutrophil granule glycoproteins as Lewis(x)-containing ligands cleared by the scavenger receptor C-type lectin. **J Biol Chem** 286:24336–49. 2011.

Groot F, Geijtenbeek TBH, Sanders RW, Baldwin CE, Sanchez-Hernandez M, Floris R, van Kooyk Y, de Jong EC, Berkhout B. Lactoferrin prevents dendritic cell-mediated human immunodeficiency virus type 1 transmission by blocking the DC-SIGN--gp120 interaction. **J Virol** 79:3009–15. 2005.

Haase AT. Early Events in Sexual Transmission of HIV and SIV and Opportunities for Interventions. **Annu Rev Med** . 2010.

Hancock DB, Gaddis NC, Levy JL, Bierut LJ, Kral AH, Johnson EO. Associations of common variants in the BST2 region with HIV-1 acquisition in African American and European American people who inject drugs. **AIDS** 29:767–777. 2015.

Heath L, Conway S, Jones L, Semrau K, Nakamura K, Walter J, Decker WD, Hong J, Chen T, Heil M, Sinkala M, Kankasa C, Thea DM, Kuhn L, Mullins JI, Aldrovandi GM. Restriction of HIV-1 Genotypes in Breast Milk Does Not Account for the Population Transmission Genetic Bottleneck That Occurs following Transmission. **PLoS One**

5:e10213. 2010.

HENGEL RL, KENNEDY MS, STEKETEE RW, THEA DM, ABRAMS EJ, LAMBERT G, McDOUGAL JS. Neutralizing Antibody and Perinatal Transmission of Human Immunodeficiency Virus Type 1. **AIDS Res Hum Retroviruses** 14:475–481. 1998.

Hill AVS. Aspects of genetic susceptibility to human infectious diseases. **Annu Rev Genet** 40:469–86. 2006.

Hladik F, Sakchalathorn P, Ballweber L, Lentz G, Fialkow M, Eschenbach D, McElrath MJ. Initial events in establishing vaginal entry and infection by human immunodeficiency virus type-1. **Immunity** 26:257–70. 2007.

Hoedt E, Hardivill? S, Mariller C, Ellass E, Perraudin J-P, Pierce A. Discrimination and evaluation of lactoferrin and delta-lactoferrin gene expression levels in cancer cells and under inflammatory stimuli using TaqMan real-time PCR. **BioMetals** 23:441–452. 2010.

Hollox EJ, Barber JCK, Brookes AJ, Armour J a L. Defensins and the dynamic genome: what we can learn from structural variation at human chromosome band 8p23.1. **Genome Res** 18:1686–97. 2008.

Iwasaki A. Innate Immune Recognition of HIV-1. **Immunity** 37:389– 2012

Jackson JB, Musoke P, Fleming T, Guay LA, Bagenda D, Allen M, Nakabiito C, Sherman J, Bakaki P, Owor M, Ducar C, Deseyve M, Mwatha A, Emel L, Duefield C, Mirochnick M, Fowler MG, Mofenson L, Miotti P, Gigliotti M, Bray D, Mmiro F. Intrapartum and neonatal single-dose nevirapine compared with zidovudine for prevention of mother-to-child transmission of HIV-1 in Kampala, Uganda: 18-Month follow-up of the HIVNET 012 randomised trial. **Lancet** 362:859–868. 2003.

Javanbakht H, An P, Gold B, Petersen DC, O’Huigin C, Nelson GW, O’Brien SJ, Kirk GD, Detels R, Buchbinder S, Donfield S, Shulenin S, Song B, Perron MJ, Stremlau M, Sodroski J, Dean M, Winkler C. Effects of human TRIM5alpha polymorphisms on antiretroviral function and susceptibility to human immunodeficiency virus infection. **Virology** 354:15–27. 2006.

Jia HP, Starner T, Ackermann M, Kirby P, Tack BF, McCray PB. Abundant human β -defensin-1 expression in milk and mammary gland epithelium. **J Pediatr** 138:109–112. 2001.

John-Stewart GC, Mbori-Ngacha D, Payne BL, Farquhar C, Richardson BA, Emery S, Otieno P, Obimbo E, Dong T, Slyker J, Nduati R, Overbaugh J, Rowland-Jones S. HIV-1–Specific Cytotoxic T Lymphocytes and Breast Milk HIV-1 Transmission. **J Infect Dis** 199:889–898. 2009.

John GC, Rousseau C, Dong T, Rowland-Jones S, Nduati R, Mbori-Ngacha D, Rostron T, Kreiss JK, Richardson BA, Overbaugh J. Maternal SDF1 3’A polymorphism is associated with increased perinatal human immunodeficiency virus type 1 transmission. **J Virol** 74:5736–9. 2000.

Joseph SB, Swanstrom R, Kashuba ADM, Cohen MS. Bottlenecks in HIV-1 transmission: insights from the study of founder viruses. **Nat Rev Microbiol** 13:414–425. 2015.

Joubert BR, Lange EM, Franceschini N, Mwapasa V, North KE, Meshnick SR. A whole genome association study of mother-to-child transmission of HIV in Malawi.

Genome Med 2:17. 2010.

Kaslow R a, Dorak T, Tang JJ. Influence of host genetic variation on susceptibility to HIV type 1 infection. **J Infect Dis** 191 Suppl:S68-77. 2005.

King AE, Paltoo A, Kelly RW, Sallenave JM, Bocking AD, Challis JRG. Expression of Natural Antimicrobials by Human Placenta and Fetal Membranes. **Placenta** 28:161–169. 2007.

Kourtis AP, Lee FK, Abrams EJ, Jamieson DJ, Bulterys M. Mother-to-child transmission of HIV-1: timing and implications for prevention. **Lancet Infect Dis** 6:726–32. 2006.

Kreuzer KA, Dayer JM, Rockstroh JK, Sauerbruch T, Spengler U. The IL-1 system in HIV infection: peripheral concentrations of IL-1beta, IL-1 receptor antagonist and soluble IL-1 receptor type II. **Clin Exp Immunol** 109:54–8. 1997.

Kumar SB, Rice CE, Milner DA, Ramirez NC, Ackerman WE, Mwapasa V, Turner AN, Kwiek JJ, Turner AN, Kwiek JJ. Elevated cytokine and chemokine levels in the placenta are associated with in-utero HIV-1 mother-to-child transmission. **AIDS** 26:685–94. 2012.

Kwiek JJ, Mwapasa V, Milner DA, Alker AP, Miller WC, Tadesse E, Molyneux ME, Rogerson SJ, Meshnick SR. Maternal-fetal microtransfusions and HIV-1 mother-to-child transmission in Malawi. **PLoS Med** 3:70–75. 2006.

Lama J, Planelles V. Host factors influencing susceptibility to HIV infection and AIDS progression. **Retrovirology** 4:52. 2007.

Landesman SH, Kalish LA, Burns DN, Minkoff H, Fox HE, Zorrilla C, Garcia P, Fowler MG, Mofenson L, Tuomala R. Obstetrical factors and the transmission of human immunodeficiency virus type 1 from mother to child. The Women and Infants Transmission Study. **N Engl J Med** 334:1617–1623. 1996.

Laplana M, Caruz A, Pineda JA, Puig T, Fibla J. Association of BST-2 gene variants with HIV disease progression underscores the role of BST-2 in HIV type 1 infection. **J Infect Dis** 207:411–9. 2013.

Lawn SD, Butera ST, Folks TM. Contribution of immune activation to the pathogenesis and transmission of human immunodeficiency virus type 1 infection. **Clin Microbiol Rev** 14:753–77, 2001.

Lee BN, Hammill H, Popek EJ, Cron S, Kozinetz C, Paul M, Shearer WT, Reuben JM. Production of interferons and beta-chemokines by placental trophoblasts of HIV-1-infected women. **Infect Dis Obstet Gynecol** 9:95–104. 2001.

Legrand D. Overview of Lactoferrin as a Natural Immune Modulator. **J Pediatr** 173:S10–S15. 2016.

Liu D, Wang X, Zhang Z, Teng CT. An intronic alternative promoter of the human lactoferrin gene is activated by Ets. **Biochem Biophys Res Commun** 301:472–9. 2003.

Lohman-Payne B, Slyker JA, Richardson BA, Farquhar C, Majiwa M, Maleche-Obimbo E, Mbori-Ngacha D, Overbaugh J, Rowland-Jones S, John-Stewart G. Infants with late breast milk acquisition of HIV-1 generate interferon-gamma responses more rapidly than infants with early peripartum acquisition. **Clin Exp**

Immunol 156:511–517. 2009.

Lopez JA, Brennan AJ, Whisstock JC, Voskoboinik I, Trapani JA. Protecting a serial killer: pathways for perforin trafficking and self-defence ensure sequential target cell death. **Trends Immunol** 33:406–12. 2012.

Loschko J, Schlitzer A, Dudziak D, Drexler I, Sandholzer N, Bourquin C, Reindl W, Krug AB. Antigen delivery to plasmacytoid dendritic cells via BST2 induces protective T cell-mediated immunity. **J Immunol** 186:6718–25. 2011.

MacDonald KS, Embree J, Njenga S, Nagelkerke NJ, Ngatia I, Mohammed Z, Barber BH, Ndinya-Achola J, Bwayo J, Plummer FA. Mother-child class I HLA concordance increases perinatal human immunodeficiency virus type 1 transmission. **J Infect Dis** 177:551–6. 1998.

MacDonald KS, Embree JE, Nagelkerke NJ, Castillo J, Ramhadin S, Njenga S, Oyug J, Ndinya-Achola J, Barber BH, Bwayo JJ, Plummer FA. The HLA A2/6802 supertype is associated with reduced risk of perinatal human immunodeficiency virus type 1 transmission. **J Infect Dis** 183:503–6. 2001.

Mackelprang R, John?Stewart G, Carrington M, Richardson B, Rowland?Jones S, Gao X, Mbori?Ngacha D, Mabuka J, Lohman?Payne B, Farquhar C. Maternal HLA Homozygosity and Mother?Child HLA Concordance Increase the Risk of Vertical Transmission of HIV?1. **J Infect Dis** 197:1156–1161. 2008.

Mahauad-Fernandez WD, Okeoma CM. The role of BST-2/Tetherin in host protection and disease manifestation. **Immunity, Inflamm Dis** 4:4–23. 2016.

Majerle A, Kidriq J, Jerala R. Enhancement of antibacterial and lipopolysaccharide binding activities of a human lactoferrin peptide fragment by the addition of acyl chain. **J Antimicrob Chemother** 51:1159–1165. 2003.

van Manen D, van 't Wout AB, Schuitemaker H. Genome-wide association studies on HIV susceptibility, pathogenesis and pharmacogenomics. **Retrovirology** 9:70. 2012.

van Manen D, Delaneau O, Kootstra NA, Boeser-Nunnink BD, Limou S, Bol SM, Burger JA, Zwinderman AH, Moerland PD, van 't Slot R, Zagury J-F, van 't Wout AB, Schuitemaker H. Genome-wide association scan in HIV-1-infected individuals identifying variants influencing disease course. **PLoS One** 6:e22208. 2011.

Mariller C, Hardivill? S, Hoedt E, Huvent I, Pina-Canseco S, Pierce A. Delta-lactoferrin, an intracellular lactoferrin isoform that acts as a transcription factor **Biochem Cell Biol** 90:307–319. 2012.

Marinda E, Humphrey JH, Iliff PJ, Mutasa K, Nathoo KJ, Piwoz EG, Moulton LH, Salama P, Ward BJ, ZVITAMBO Study Group. Child Mortality According to Maternal and Infant HIV Status in Zimbabwe. **Pediatr Infect Dis J** 26:519–526. 2007.

McMichael AJ, Borrow P, Tomaras GD, Goonetilleke N, Haynes BF. The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. **Nat Rev Immunol** 10:11–23. 2009

Mehta PA, Davies SM, Kumar A, Devidas M, Lee S, Zamzow T, Elliott J, Villanueva J, Pullen J, Zewge Y, Filipovich A, Children's Oncology Group. Perforin polymorphism A91V and susceptibility to B-precursor childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology Group. **Leukemia** 20:1539–41. 2006.

Michael NL, Chang G, Louie LG, Mascola JR, Dondero D, Birx DL, Sheppard HW. The role of viral phenotype and CCR-5 gene defects in HIV-1 transmission and disease progression. **Nat Med** 3:338–40. 1997.

Milanese M, Segat L, Pontillo A, Arraes LC, Jos#233, Crovella S. Defb1 gene polymorphisms and increased risk of Hiv-1 infection in Brazilian children. **Aids** 20:1673–1675. 2006.

Misrahi M, Teglas JP, N'Go N, Burgard M, Mayaux MJ, Rouzioux C, Delfraissy JF, Blanche S. CCR5 chemokine receptor variant in HIV-1 mother-to-child transmission and disease progression in children. French Pediatric HIV Infection Study Group. **JAMA** 279:277–80. 1998.

Mogensen TH. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. **Clin Microbiol Rev** 22:240–73. 2009.

Mogensen TH, Melchjorsen J, Larsen CS, Paludan SR. Innate immune recognition and activation during HIV infection. **Retrovirology** 7:54. 2010.

Moir S, Chun T-W, Fauci AS. Pathogenic mechanisms of HIV disease. **Annu Rev Pathol** 6:223–48. 2011.

Moriuchi M, Moriuchi H. Cell-type-dependent effect of transforming growth factor beta, a major cytokine in breast milk, on human immunodeficiency virus type 1 infection of mammary epithelial MCF-7 cells or macrophages. **J Virol** 78:13046–52. 2004

Neil SJD, Eastman SW, Jouvenet N, Bieniasz PD. HIV-1 Vpu promotes release and prevents endocytosis of nascent retrovirus particles from the plasma membrane. **PLoS Pathog** 2:e39. 2006

Neil SJD, Zang T, Bieniasz PD. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. **Nature** 451:425–30. 2008.

Nielsen K, Boyer P, Dillon M, Wafer D, Wei LS, Garratty E, Dickover RE, Bryson YJ. Presence of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 and HIV-1-specific antibodies in cervicovaginal secretions of infected mothers and in the gastric aspirates of their infants. **J Infect Dis** 173:1001–4.1996.

O'Brien SJ, Nelson GW. Human genes that limit AIDS. **Nat Genet** 36:565–74. 2004.

Obimbo EM, Wamalwa D, Richardson B, Mbori-Ngacha D, Overbaugh J, Emery S, Otieno P, Farquhar C, Bosire R, Payne BL, John-Stewart G. Pediatric HIV-1 in Kenya: Patterns and Correlates of Viral Load and Association with Mortality. **J Acq Immune Defic Syndr** 51:209–215. 2009.

Padovan L, Segat L, Crovella S. A polymorphism in PRF1 gene is associated with HIV-1 vertical transmission in Brazillian children. **Aids** 56743633:535–539. 2011.

Patterson BK, Behbahani H, Kabat WJ, Sullivan Y, O'Gorman MR, Landay A, Flener Z, Khan N, Yogev R, Andersson J. Leukemia inhibitory factor inhibits HIV-1 replication and is upregulated in placentae from nontransmitting women. **J Clin Invest** 107:287–94. 2001.

Paximadis M, Minevich G, Winchester R, Schramm DB, Gray GE, Sherman GG, Coovadia AH, Kuhn L, Tiemessen CT. KIR-HLA and Maternal-Infant HIV-1 Transmission in Sub-Saharan Africa. **PLoS One** 6:e16541. 2011.

Van de Perre P, Rubbo P-A, Viljoen J, Nagot N, Tylleskär T, Lepage P, Vendrell J-P, Tuillon E. HIV-1 Reservoirs in Breast Milk and Challenges to Elimination of Breast-Feeding Transmission of HIV-1. **Sci Transl Med** 4. 2012.

Pipkin ME, Rao A, Lichtenheld MG. The transcriptional control of the perforin locus. **Immunol Rev** 235:55–72. 2010.

Poli G, Bressler P, Kinter A, Duh E, Timmer WC, Rabson A, Justement JS, Stanley S, Fauci AS. Interleukin 6 induces human immunodeficiency virus expression in infected monocytic cells alone and in synergy with tumor necrosis factor alpha by transcriptional and post-transcriptional mechanisms. **J Exp Med** 172:151–8. 1990.

Prado-Montes de Oca E. Human beta-defensin 1: a restless warrior against allergies, infections and cancer. **Int J Biochem Cell Biol** 42:800–4. 2010.

Quigley MA, Kelly YJ, Sacker A. Breastfeeding and Hospitalization for Diarrheal and Respiratory Infection in the United Kingdom Millennium Cohort Study. **Pediatrics** 119:e837–e842. 2007.

Raghavan S, Alagarasu K, Selvaraj P. Immunogenetics of HIV and HIV associated tuberculosis. **Tuberculosis (Edinb)** 92:18–30. 2012

Ricci E, Malacrida S, Zanchetta M, Mosconi I, Montagna M, Giaquinto C, De Rossi A. Toll-like receptor 9 polymorphisms influence mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1. **J Transl Med** 8:49. 2010.

Ryan L, Diamond G. Modulation of Human β -Defensin-1 Production by Viruses. **Viruses** 9:153. 2017

Saba E, Grivel J-C, Vanpouille C, Brichacek B, Fitzgerald W, Margolis L, Lisco A. HIV-1 sexual transmission: early events of HIV-1 infection of human cervico-vaginal tissue in an optimized ex vivo model. **Mucosal Immunol** 3:280–290. 2010.

Saidi H, Eslahpazir J, Eslaphazir J, Carbonneil C, Carthage L, Requena M, Nassreddine N, Belec L. Differential modulation of human lactoferrin activity against both R5 and X4-HIV-1 adsorption on epithelial cells and dendritic cells by natural antibodies. **J Immunol** 177:5540–9. 2006.

Santoro A, Cannella S, Trizzino A, Lo Nigro L, Corsello G, Aricò M. A single amino acid change A91V in perforin: a novel, frequent predisposing factor to childhood acute lymphoblastic leukemia? **Haematologica** 90:697–8. 2005

Segat L, Catamo E, Fabris A, Padovan L, Morgutti M, Crovella S. HLA-G 3' UTR haplotypes and HIV vertical transmission. **AIDS** 23:1916–8. 2009

Segat L, Milanese M, Boniotto M, Crovella S, Bernardon M, Costantini M, Alberico S, The Italian Group Sigo HIV in Obste TIGSH. DEFB-1 genetic polymorphism screening in HIV-1 positive pregnant women and their children. **J Matern Neonatal Med** 19:13–16. 2006.

Segat L, Zupin L, Kim H-Y, Catamo E, Thea DM, Kankasa C, Aldrovandi GM, Kuhn L, Crovella S. HLA-G 14 bp deletion/insertion polymorphism and mother-to-child transmission of HIV. **Tissue Antigens** 83:161–7. 2014.

Selsted ME, Ouellette AJ. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. **Nat Immunol** 6:551–557. 2005.

Semrau K, Ghosh M, Kankasa C, Sinkala M, Kasonde P, Mwiya M, Thea DM, Kuhn

L, Aldrovandi GM. Temporal and lateral dynamics of HIV shedding and elevated sodium in breast milk among HIV-positive mothers during the first 4 months of breast-feeding. **J Acquir Immune Defic Syndr** 47:320–8. 2008.

Shostakovich-Koretskaya L, Catano G, Chykarenko ZA, He W, Gornalusse G, Mummidi S, Sanchez R, Dolan MJ, Ahuja SS, Clark RA, Kulkarni H, Ahuja SK. Combinatorial content of CCL3L and CCL4L gene copy numbers influence HIV-AIDS susceptibility in Ukrainian children. **AIDS** 23:679–88. 2009.

Slyker JA, Lohman-Payne B, John-Stewart GC, Dong T, Mbori-Ngacha D, Tapia K, Atzberger A, Taylor S, Rowland-Jones SL, Blish CA. The impact of HIV-1 infection and exposure on natural killer (NK) cell phenotype in Kenyan infants during the first year of life. **Front Immunol** 3:1–16. 2012.

de Souza Campos Fernandes RC, de Souza TL, Medina-Acosta E. Role of maternal, transplacentally acquired HIV-1-specific neutralizing antibodies in protecting the uninfected offspring against HIV-1 transmission via breast milk. **Future Virol** 6:1029–1034. 2011.

Stevenson M. HIV-1 pathogenesis. **Nat Med** 9:853–60. 2003.

Sun L, Finnegan CM, Kish-Catalone T, Blumenthal R, Garzino-Demo P, La Terra Maggiore GM, Berrone S, Kleinman C, Wu Z, Abdelwahab S, Lu W, Garzino-Demo A. Human beta-defensins suppress human immunodeficiency virus infection: potential role in mucosal protection. **J Virol** 79:14318–29. 2005.

Telenti A, Carrington M. Host factors associated with outcome from primary human immunodeficiency virus-1 infection. **Curr Opin HIV AIDS** 3:28–35. 2008.

Teng CT. Lactoferrin gene expression and regulation: an overview. **Biochem Cell Biol** 80:7–16. 2002.

Thobakgale CF, Prendergast A, Crawford H, Mkhwanazi N, Ramduth D, Reddy S, Molina C, Mncube Z, Leslie A, Prado J, Chonco F, Mphahshwe W, Tudor-Williams G, Jeena P, Blanckenberg N, Dong K, Kiepiela P, Coovadia H, Ndung'u T, Walker BD, Goulder PJR. Impact of HLA in Mother and Child on Disease Progression of Pediatric Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. **J Virol** 83:10234–10244. 2009.

Tobin NH, Aldrovandi GM. Immunology of pediatric HIV infection. **Immunol Rev** 254:143–169. 2013.

Tresoldi E, Romiti ML, Boniotto M, Crovella S, Salvatori F, Palomba E, Pastore A, Cancrini C, de Martino M, Plebani A, Castelli G, Rossi P, Tovo PA, Amoroso A, Scarlatti G. Prognostic value of the stromal cell-derived factor 1 3'A mutation in pediatric human immunodeficiency virus type 1 infection. **J Infect Dis** 185:696–700. 2002.

Vidricaire G, Tardif MR, Tremblay MJ. The low viral production in trophoblastic cells is due to a high endocytic internalization of the human immunodeficiency virus type 1 and can be overcome by the pro-inflammatory cytokines tumor necrosis factor- α and interleukin-1. **J Biol Chem** 278:15832–41. 2003.

Volmink J, Marais B. 2008. HIV: mother-to-child transmission. **BMJ Clin Evid** 2008.

Voskoboinik I, Dunstone MA, Baran K, Whisstock JC, Trapani JA. Perforin: structure, function, and role in human immunopathology. **Immunol Rev** 235:35–54. 2010.

Voskoboinik I, Trapani JA. Perforinopathy: a spectrum of human immune disease caused by defective perforin delivery or function. **Front Immunol** 4:441. 2013.

Walter J, Kuhn L, Aldrovandi GM. Advances in basic science understanding of mother-to-child HIV-1 transmission. **Curr Opin HIV AIDS** 3:146–50. 2008.

Ward PP, Paz E, Conneely OM. Multifunctional roles of lactoferrin: a critical overview. **Cell Mol Life Sci** 62:2540–2548. 2005.

Winchester R, Chen Y, Rose S, Selby J, Borkowsky W. Major histocompatibility complex class II DR alleles DRB1*1501 and those encoding HLA-DR13 are preferentially associated with a diminution in maternally transmitted human immunodeficiency virus 1 infection in different ethnic groups: determination by an automated sequence-based typing method. **Proc Natl Acad Sci U S A** 92:12374–8. 1995.

Winchester R, Pitt J, Charurat M, Magder LS, Göring HHH, Landay A, Read JS, Shearer W, Handelsman E, Luzuriaga K, Hillyer G V, Blattner W. Mother-to-child transmission of HIV-1: strong association with certain maternal HLA-B alleles independent of viral load implicates innate immune mechanisms. **J Acquir Immune Defic Syndr** 36:659–70. 2004.

Yan N, Chen ZJ. Intrinsic antiviral immunity. **Nat Immunol** 13:214–22. 2012.

Yates A, Stark J, Klein N, Antia R, Callard R. 2007. Understanding the slow depletion of memory CD4+ T cells in HIV infection. **PLoS Med** 4:e177. 2007.

Yeung ML, Houzet L, Yedavalli VSRK, Jeang K-T. 2009. A genome-wide short hairpin RNA screening of jurkat T-cells for human proteins contributing to productive HIV-1 replication. **J Biol Chem** 284:19463–73. 2009.

Zachar V, Fink T, Koppelhus U, Ebbesen P. 2002. Role of Placental Cytokines in Transcriptional Modulation of HIV Type 1 in the Isolated Villous Trophoblast. **AIDS Res Hum Retroviruses** 18:839–847. 2002.

Zeng M, Haase AT, Schacker TW. Lymphoid tissue structure and HIV-1 infection: life or death for T cells. **Trends Immunol** :1–9. 2012.

Zimecki M. Immunoregulatory Activities of Lactoferrin in the Delayed Type Hypersensitivity in Mice are Mediated by a Receptor with Affinity to Mannose. **Immunobiology** 205:120–131. 2002.

Zupin L, Polesello V, Coelho AVC, Boniotto M, Arraes LC, Segat L, Crovella S. Lactotransferrin gene functional polymorphisms do not influence susceptibility to human immunodeficiency virus-1 mother-to-child transmission in different ethnic groups. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 110:222–9. 2015.

APÊNDICES

APÊNDICE A

NLRP3 polymorphism is associated with protection against human T-lymphotropic virus 1 infection

Autores: Anselmo Jiro Kamada¹, Alessandra Pontillo^{2,+}, Rafael Lima Guimarães¹, Paula Loureiro³, Sergio Crovella¹, Lucas André Cavalcanti Brandão⁴.

¹ Departamento de Genética ⁴Departamento de Patologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil. ² Laboratório de Imunogenética, Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil. ³ Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco, Recife, PE, Brasil. ⁴ Department of Pathology, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

DOI: 10.1590/0074-0276140154

Publicado no periódico MEM INST OSWALDO CRUZ, RIO DE JANEIRO.
NOVEMBER 2014 em 01/02/2012, Volume 109, Edição 7, págs. 957 a 960

Fator de Impacto (JCR 2015): 1.789 / Qualis B2

NLRP3 polymorphism is associated with protection against human T-lymphotropic virus 1 infection

Anselmo Jiro Kamada¹, Alessandra Pontillo^{2/+}, Rafael Lima Guimarães¹, Paula Loureiro³, Sergio Crovella¹, Lucas André Cavalcanti Brandão⁴

¹Departamento de Genética ⁴Departamento de Patologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

²Laboratório de Imunogenética, Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil ³Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

Inter-individual heterogeneity in the response to human T-lymphotropic virus 1 (HTLV-1) infection has been partially attributed to host genetic background. The antiviral activity of the inflammasome cytoplasmic complex recognises viral molecular patterns and regulates immune responses via the activation of interleukin (IL)-1 family (IL-1, IL-18 and IL-33) members. The association between polymorphisms in the inflammasome receptors NLRP1 and NLRP3 and HTLV-1 infection was evaluated in a northeastern Brazilian population (84 HTLV-1 carriers and 155 healthy controls). NLRP3 rs10754558 G/G was associated with protection against HTLV-1 infection ($p = 0.012$; odds ratio = 0.37). rs10754558 affects NLRP3 mRNA stability; therefore, our results suggest that higher NLRP3 expression may augment first-line defences, leading to the effective protection against HTLV-1 infection.

Key words: NLRP3 - NLRP1 - single nucleotide polymorphisms - innate immunity - HTLV-1

The initial stage of human T-lymphotropic virus 1 (HTLV-1) infection involves cell-cell transmission of HTLV-1 from infected to uninfected T-lymphocytes, followed by the clonal expansion of infected cells, with almost undetectable levels of circulating virions (Pique & Jones 2012). The pathogenic outcome has been strongly associated with the clonal expansion and infiltration of infected lymphocytes into affected tissues (Lairmore et al. 2012), while efficient antigen presentation and cytolytic activity of HTLV-1-specific CD8⁺ cytotoxic T-lymphocytes have been associated with HTLV-1 proviral load (PVL) control. Several cytokine-coding genes and human leukocyte antigen variants were previously described as important restriction factors of PVL and HTLV-1 pathogenesis; therefore, the genetic backgrounds of several host immunity components have recently been investigated (Vine et al. 2002, Haddad et al. 2011, Rocha-Júnior et al. 2012).

The early innate response to several viruses such as influenza virus, Sendai virus, hepatitis C virus (HCV) and adenovirus consists of interleukin (IL)-1 β production via inflammasome activation. The inflammasome is a cytosolic complex that detects pathogen or danger-associated molecular patterns and leads to the activation of caspase-1, the enzyme responsible for pro-IL-1 β /IL-1 β conversion (Gram et al. 2012). Significant expression of IL-1 β has been reported to be induced by HTLV-1 transactivator protein in macrophages, microglial cells and astrocytes

(Banerjee et al. 2007, Takahashi et al. 2013), suggesting an innate response through inflammasome regulation. Furthermore, the HTLV-1-specific cytolytic response was shown to be modulated by IL-1 in mice because this cytokine enhanced the expansion and tissue localisation of antigen-driven CD8⁺ T cell (Ben-Sasson et al. 2013).

The inflammasome plays a major role in IL-1 β production and may also be involved in the cytoplasmic recognition of HTLV-1; therefore, we investigated the possible association between selected single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the inflammasome receptor genes *NLRP3* and *NLRP1* and susceptibility to HTLV-1 infection in HTLV-1-infected patients and controls from northeastern Brazil.

Eighty-four HTLV-1-infected subjects (46.32% males, 53.68% females; mean age = 45.29 ± 2.60 years) were enrolled from the metropolitan area of Recife, state of Pernambuco (PE), Brazil. All participants were screened for the presence of plasma anti-HTLV-1 antibodies (ELISA: Murex Biotech Limited, UK) and positivity was confirmed by qualitative nested-polymerase chain reaction (PCR) analysis performed at the Hemope Foundation (blood center of PE). A total of 155 healthy controls (HCs) (46.46% male, 53.54% females; mean age = 21.72 ± 2.45 years) with negative HTLV-1 serology and negative qualitative PCR were recruited as control subjects from the same metropolitan area at Hemope. Written informed consent was obtained according to the Hemope Ethical Committee (protocol 016/2010).

The HTLV-1 carriers and HCs were admixed northeastern Brazilians. The ethnicity of the patients and HCs was analysed using ancestry markers as reported by Kosoy et al. (2009) and the ethnic background results demonstrated similar frequencies of approximately 58% Caucasian, 25% African and 17% Amerindian backgrounds.

DNA was obtained from the peripheral blood of uninfected HCs and HTLV-1 carriers using the "salting

doi: 10.1590/0074-0276140154

Financial support: FACEPE (APQ-0757-2.02/10)

+ Corresponding author: alepontillo@usp.br

Received 5 May 2014

Accepted 6 August 2014

APÊNDICE B

META-ANALYSIS AND TIME SERIES MODELLING ALLOW A SYSTEMATIC REVIEW OF PRIMARY HIV-1 DRUG-RESISTANT PREVALENCE IN LATIN AMERICA AND CARIBBEAN.

Antonio Victor Campos Coelho¹, Ronald Rodrigues De Moura¹, Ronaldo Celerino Da Silva¹, Anselmo Jiro Kamada¹, Rafael Lima Guimarães¹, Lucas André Cavalcanti Brandão¹, Hemílio Fernandes Campos Coelho² and Sergio Crovella¹.

1 Department of Genetics, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, PE (Brazil). 2 Department of Statistics, Federal University of Paraíba (UFPB), João Pessoa, Brazil.

DOI: 10.2174/1570162X13999150317155040

Publicado no periódico Current HIV Research, em 01/03/2015, Volume 13, Edição 2, págs. 125 a 142.

Fator de Impacto (JCR 2011): 1.562

Classificação Qualis B2 – Ciências Biológicas I

Meta-Analysis and Time Series Modeling Allow a Systematic Review of Primary HIV-1 Drug-Resistant Prevalence in Latin America and Caribbean

Antonio Victor Campos Coelho*, Ronald Rodrigues De Moura, Ronaldo Celerino Da Silva, Anselmo Jiro Kamada, Rafael Lima Guimarães, Lucas André Cavalcanti Brandão, Hemílio Fernandes Campos Coelho and Sergio Crovella

Department of Genetics, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida da Engenharia, Cidade Universitária, Recife, PE, Postal Code: 50740-600, Brazil



Antonio V.C. Coelho

Abstract: Here we review the prevalence of HIV-1 primary drug resistance in Latin America and Caribbean using meta-analysis as well as time-series modeling. We also discuss whether there could be a drawback to HIV/AIDS programs due to drug resistance in Latin America and Caribbean in the next years. We observed that, although some studies report low or moderate primary drug resistance prevalence in Caribbean countries, this evidence needs to be updated. In other countries, such as Brazil and Argentina, the prevalence of drug resistance appears to be rising. Mutations conferring resistance against reverse transcriptase inhibitors were the most frequent in the analyzed populations (70% of all mutational events). HIV-1 subtype B was the most prevalent in Latin America and the Caribbean, although subtype C and B/F recombinants have significant contributions in Argentina and Brazil. Thus, we suggest that primary drug resistance in Latin America and the Caribbean could have been underestimated. Clinical monitoring should be improved to offer better therapy, reducing the risk for HIV-1 resistance emergence and spread, principally in vulnerable populations, such as men who have sex with men transmission group, sex workers and intravenous drug users.

Keywords: Drug resistance mutation, HAART, primary drug resistance, meta-analysis, systematic review, time series.

1. INTRODUCTION

Estimations indicate that around 35 million people are living with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) globally. Among these, around 1.75 million live in Latin America and Caribbean. The implementation of highly active antiretroviral therapy (HAART) in 1996 saved 6.6 million lives [1]. However, the fight against HIV-1 is far to be over. One of the most challenging aspects in the management of HIV-1 infection is the emergence of strains resistant to antiretroviral drugs.

HIV-1 typically produces high levels of viral particles. As its reverse transcriptase (RT) is error-prone, it consequently generates high degree of genetic diversity. Poor adherence to HAART regimens leads to suboptimal drug levels, which are insufficient to maintain persistent virus suppression. The virus then continues to replicate, albeit at lower replication rates. Thus, if a mutation conferring resistance to drugs arises, this will turn into a selective advantage for resistant *quasispecies*. In some cases, a single mutation can cause cross-resistance against all members of an antiretroviral drug class [2, 3].

A resistant HIV-1 strain may be transmitted to other persons. This is defined as primary HIV-1 drug resistance (PDR), and it complicates the choice of which regimen a patient with PDR should receive, because it increases the risk of

*Address correspondence to this author at the Department of Genetics, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida da Engenharia, Cidade Universitária, Recife, PE, Postal Code: 50740-600, Brazil; Tel: 55 81 2126 8522; E-mails: avccbio@gmail.com, antonio.victor@ufpe.br

APÊNDICE C

DENDRITIC CELL-BASED IMMUNOTHERAPIES TO FIGHT HIV: HOW FAR FROM A SUCCESS STORY? A SYSTEMATIC REVIEW AND META-ANALYSIS.

Antonio Victor Campos Coelho¹, Ronald Rodrigues De Moura¹, Anselmo Jiro Kamada¹, Ronaldo Celerino Da Silva¹, Rafael Lima Guimarães¹, Lucas André Cavalcanti Brandão¹, Luiz Cláudio Arraes de Alencar² and Sergio Crovella¹.

¹ Department of Genetics, Federal University of Pernambuco; Recife (Brazil).

² Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco, Recife (Brazil).

³ Department of Pathology, Federal University of Pernambuco, Recife (Brazil).

⁴ Department of Tropical Medicine, Federal University of Pernambuco, Recife (Brazil).

⁵ Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP), Recife (Brazil).

⁶ IRCCS Burlo Garofolo and University of Trieste, Trieste (Italy).

DOI:10.3390/ijms17121985

Publicado no periódico International Journal of Molecular Sciences (Online), em 26/11/2016, Volume 17, Edição 12. Fator de Impacto (JCR 2015): 3.257

Classificação Qualis B1 – Ciências Biológicas I



Review

Dendritic Cell-Based Immunotherapies to Fight HIV: How Far from a Success Story? A Systematic Review and Meta-Analysis

Antonio Victor Campos Coelho ¹, Ronald Rodrigues de Moura ¹, Anselmo Jiro Kamada ¹, Ronaldo Celerino da Silva ², Rafael Lima Guimarães ^{1,2}, Lucas André Cavalcanti Brandão ^{2,3}, Luiz Cláudio Arraes de Alencar ^{4,5} and Sergio Crovella ^{6,*}

¹ Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Avenida da Engenharia, Cidade Universitária, Recife 50740-600, Brazil; avccbio@gmail.com (A.V.C.C.); ronaldmoura1989@gmail.com (R.R.d.M.); anselmojiro@gmail.com (A.J.K.); rafaellg@gmail.com (R.L.G.)

² Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco, Avenida da Engenharia, Cidade Universitária, Recife 50740-600, Brazil; ronaldocelerino@yahoo.com.br (R.C.d.S.); lucabrand@gmail.com (L.A.C.B.)

³ Department of Pathology, Federal University of Pernambuco, Avenida Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife 50670-901, Brazil

⁴ Department of Tropical Medicine, Federal University of Pernambuco, Avenida Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife 50670-901, Brazil; lularraes@hotmail.com

⁵ Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP), Boa Vista, Recife 50070-550, Brazil

⁶ IRCCS Burlo Garofolo and University of Trieste, Via dell' Istria 65/1, Trieste 34137, Italy

* Correspondence: sergio.crovella@burlo.trieste.it; Tel.: +39-040-378-5273

Academic Editor: Brian Wigdahl

Received: 23 September 2016; Accepted: 22 November 2016; Published: 26 November 2016

Abstract: The scientific community still faces the challenge of developing strategies to cure HIV-1. One of these pursued strategies is the development of immunotherapeutic vaccines based on dendritic cells (DCs), pulsed with the virus, that aim to boost HIV-1 specific immune response. We aimed to review DCs-based therapeutic vaccines reports and critically assess evidence to gain insights for the improvement of these strategies. We performed a systematic review, followed by meta-analysis and meta-regression, of clinical trial reports. Twelve studies were selected for meta-analysis. The experimental vaccines had low efficiency, with an overall success rate around 38% (95% confidence interval = 26.7%–51.3%). Protocols differed according to antigen choice, DC culture method, and doses, although multivariate analysis did not show an influence of any of them on overall success rate. The DC-based vaccines elicited at least some immunogenicity, that was sometimes associated with plasmatic viral load transient control. The protocols included both naïve and antiretroviral therapy (ART)-experienced individuals, and used different criteria for assessing vaccine efficacy. Although the vaccines did not work as expected, they are proof of concept that immune responses can be boosted against HIV-1. Protocol standardization and use of auxiliary approaches, such as latent HIV-1 reservoir activation and patient genomics are paramount for fine-tuning future HIV-1 cure strategies.

Keywords: human immunodeficiency virus; dendritic cell; clinical trial; vaccine; meta-regression

1. Introduction

The adaptive immune response during viral infections is mediated by antigen-presenting cells (APC), such as macrophages, B lymphocytes and dendritic cells (DCs), which capture antigens and present them to naïve lymphocytes [1,2].

APÊNDICE D

ASSOCIATION OF HLA-G 3' UTR POLYMORPHISMS AND HAPLOTYPES WITH SEVERE SEPSIS

Eriza Cristina Hahn^{1*}, Francis Maria Bão Zambra^{1*}, Anselmo Jiro Kamada², Francieli Delongui³, Edna Maria Vissoci Reiche³, José Artur Bogo Chies¹

¹Department of Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil. ²Department of Genetics, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Recife, PE, Brazil. ³Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology, Universidade Estadual de Londrina - UEL, PR, Brazil.

Submetido ao periódico Critical Care, em 12/02/2016.

Fator de Impacto (JCR 2015): 4.950

Classificação Qualis A1 – Ciências Biológicas I

Abstract

Background: Sepsis is a systemic inflammatory process developed in response to a local infection and is a main cause of mortality in Intensive Care Units (ICU). The human leukocyte antigen G (HLA-G) is an important molecule involved in the immune system modulation, acting in the maintenance of a state of immune tolerance. The 3' untranslated region (3' UTR) of the *HLA-G* gene regulates gene expression and some polymorphisms in this region were previously associated to distinct levels of HLA-G expression and were associated to sepsis in a previous study. In the present study, haplotypes and polymorphisms of the *HLA-G* 3'UTR were analyzed in septic patients from Londrina city (Paraná state, Brazil).

Methods: DNA samples from 64 septic patients (with severe sepsis or septic shock) and 190 controls were assessed. The 3'UTR of *HLA-G* gene was amplified by PCR, sequenced and eight polymorphisms, including the 14 bp insertion/deletion (rs371194629), +3003T/C (rs1707), +3010C/G (rs1710), +3027A/C (rs17179101), +3035C/T (rs17179108), +3142G/C (rs1063320), +3187A/G (rs9380142) and +3196C/G (rs1610696) were genotyped. The haplotypes for each sample and haplotype frequencies were inferred with the software PHASE. Association tests were performed through chi square and binary logistic regression analyses.

Results: Amongst the polymorphisms evaluated, the +3027AC genotype presented a significantly higher frequency in sepsis, conferring an increased risk to the disease development (OR 3.17, 95%CI 1.40 – 7.17, $P_{\text{Bonferroni}}$ 0.048). Further, the presence of the UTR-7 haplotype was associated to sepsis (OR 2.97, 95%CI 1.30 – 6.69, $P_{\text{Bonferroni}}$ 0.018), as well as the presence of 14bp-Ins_+3142G_+3187A haplotype (OR 2.39, 95%CI 1.19 – 5.08, $P_{\text{Bonferroni}}$ 0.045), conferring susceptibility to sepsis.

Conclusion: Our data confirms an important influence of *HLA-G* 3' UTR polymorphisms in the development of severe forms of sepsis (severe sepsis and septic shock). The genotyping of *HLA-G* genetic variants and haplotypes could be useful as a prediction tool of increased risk to severe sepsis.

Keywords: haplotypes, HLA-G, polymorphisms, sepsis, untranslated region.

APÊNDICE E

“REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DO INFLAMASSOMA NA MUCOSITE ORAL EM PACIENTES ONCOLÓGICOS TRATADOS COM TERAPIA À LASER”

Anselmo Jiro Kamada¹, Giulia Ottaviani², Sergio Crovella¹, Serena Zacchigna².

1 Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil. 2 International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB), Trieste, Itália

Relatório final do Auxílio à mobilidade discente FACEPE (AMD-0088-2.00/16)

Período de vigência da bolsa: 15 de agosto/2016 a 15 de Fevereiro/2017

1) IDENTIFICAÇÃO

Nº do Processo: AMD-0088-2.00/16

Aluno: Anselmo Jiro Kamada

Curso: Doutorado pelo Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal de Pernambuco – PPGG-UFPE

Supervisor de instituição local: PhD Sergio Crovella

Supervisor de instituição receptora: PhD Serena Zacchigna

Período de vigência da bolsa: 15 de agosto/2016 a 15 de Fevereiro/2017

2) RESUMO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

O uso clínico do laser terapêutico de baixa potência (*Low Level Laser Therapy* - LLLT) tem contribuído na redução do quadro inflamatório, dor e tempo de recuperação tecidual da mucosite oral (MO) associada à radioterapia e quimioterapia em pacientes oncológicos, no entanto ainda não está claro quais os mecanismos fisiológicos bem como as populações celulares que são estimuladas pela terapia. Neste contexto, o projeto realizou inicialmente um *screening* dos componentes solúveis (citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento) diferencialmente expressos na mucosa oral em pacientes com MO submetidos ao LLLT, o qual revelou a diminuição de citocinas inflamatórias IL-1 β , TNF- α , e IL-7, e quimiocina IL-8, associadas principalmente à resposta inflamatória local e recrutamento de neutrófilos. Em seguida, foi observada a inibição da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) entre neutrófilos humanos expostos ao LLLT de 970nm, indicando que o LLLT atua de forma direta na redução destes mediadores inflamatórios, que são comumente associados à lesão tecidual em condições de inflamação crônica. Apesar de limitações na amostragem, estes resultados preliminares revelam um efeito biológico mediado pelo LLLT ainda pouco descrito, o que poderia contribuir futuramente na elaboração de imunobiológicos complementares durante a aplicação LLLT e otimizar o tempo de recuperação e qualidade de vida de pacientes afetados pela mucosite oral.

3) OBJETIVOS

Geral

Identificar mecanismos celulares associados à redução da inflamação na mucosite oral (MO) através do perfil inflamatório de pacientes submetidos ao tratamento com laser terapêutico de baixa potência (LLLT) e ensaios *in vitro*.

Específicos

- Avaliar citocinas inflamatórias e quimiocinas diferencialmente expressas no quadro de mucosite oral após a aplicação do LLLT;
- Identificar populações celulares induzidas pelo LLLT através do padrão de expressão de citocinas/quimiocinas diferencialmente expressas na mucosite oral;
- Avaliar a indução/inibição direta do LLLT na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas células-alvo identificadas;
- Avaliar a indução transcricional de componentes do complexo inflamatório Inflamassoma em linhagem de queratinócitos expostas ao LLLT.

4) RESULTADOS ESPERADOS

O projeto intitulado inicialmente de “Regulação da expressão do Inflamassoma na mucosite oral em pacientes oncológicos tratados com terapia à laser” investigou através de um modelo experimental, os efeitos do laser terapêutico de baixa potência (LLLT) nos níveis transcricionais de genes codificantes do complexo Inflamassoma (responsável pela regulação de citocinas inflamatórias IL-1 β e IL-18 dependente de caspase-1) em linhagens celulares epiteliais (Figura 6). No entanto, a possibilidade de explorar dados da dosagem de 39 citocinas e quimiocinas em pacientes oncológicos com mucosite oral tratados com LLLT durante o período do projeto se mostrou como estratégia chave na caracterização da resposta à terapia de forma mais específica em comparação com testes em linhagens celulares. Desta forma, foi priorizada a identificação de possíveis marcadores e células-alvo pelo padrão diferencial de moléculas solúveis produzidas, e posteriormente experimentos *in vitro* foram conduzidos em células-alvo identificadas para a avaliação do efeito da LLLT no padrão de produção de espécies reativas de oxigênio, mediador inflamatório essencial no desencadeamento de resposta inflamatória.

5) METODOLOGIA

GRUPO DE ESTUDO

A formação da coorte de pacientes com câncer de cabeça/pescoço sob quimioterapia se iniciou desde novembro de 2015, sendo acompanhada pelo setor de Odonto-estomatologia clínica do Hospital Maggiore de Trieste – Itália quanto à presença de mucosite oral e submetidos ao termo de consentimento livre e esclarecido durante o recrutamento para o protocolo de LLLT. O projeto foi aprovado pelo Comitê de ética em pesquisa do hospital (Protocolo L.1436).

No primeiro dia de visita, pacientes foram submetidos a um questionário de histórico clínico e avaliação de severidade da mucosite oral. A escala de analogia visual (VAS) foi empregada como referência para a avaliação de parâmetros como: alteração de voz, dificuldade de deglutição, alterações na mucosa e dificuldade de higiene oral.

Após o protocolo de higienização oral, a cavidade oral foi examinada para classificação de mucosite oral, com a caracterização da distribuição e tamanho da ulceração e/ou eritema pela Escala de Toxicidade a Quimioterapia, critério desenvolvido por Sonis *et al.* (2004) e adotado pelo Instituto Nacional de Câncer (NCI)(<http://ctep.cancer.gov/>). Quatro pacientes masculinos que apresentavam quadro de grau dois pelo CTC (eritema dolorosa, edema ou úlcera, com possibilidade de ingestão e deglutição) e sem histórico de sessões de radioterapia foram incluídos e completaram as sessões no estudo.

PROTOCOLO DE LASER TERAPÊUTICO DE BAIXA POTÊNCIA (LLLT)

O protocolo consistiu de sessões diárias de laser terapêutico de baixa potência (LLLT) aplicadas por quatro dias seguidos. O equipamento de diodo laser de Arseniato de Gálio e Alumínio-GaAlAs (classe IV, K-Laser, Eltech S.r.l, Treviso, Italia) foi configurado para emissão de laser a 970 nm de comprimento de onda e 5W de potência (ciclo 50%) incididos por cm² de área de mucosa oral, durante um período de 230 segundos. Foram empregados óculos de proteção como equipamento de proteção individual tanto pelo paciente como pelo operador do protocolo para a prevenção de riscos associados à exposição ao laser durante as sessões. Para experimentos *in vitro* com células irradiadas com LLLT em placas de cultura celular de 96 wells, foi empregado o suporte para placas automatizado (Eltech) e programado de acordo com o tempo de emissão específico para os comprimentos de onda (445 nm, 660 nm, 800 nm e 970 nm).

AMOSTRAGEM E DOSAGEM DE CITOCINAS

Amostras de saliva foram coletadas com um swab oral em áreas da mucosa (lábios superiores e inferiores, bochecha, língua e palatos mole e duro) afetadas e não-afetadas (saudável) pela mucosite oral, sendo coletadas anteriormente e posteriormente à aplicação do laser (dentro de um intervalo máximo de cinco minutos). As amostras foram aliquotadas em diluições (1:4) para volumes de 50uL e posteriormente estocadas em freezer -80°C.

A dosagem simultânea de 39 citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (IL-1 β , IL-17, IL-12, IFN-G, IL-6, IL-10, IL-4, HGF, MIP-1b, G-CSF, GM-CSF, TNF- α , IL-2, IL-7, IL-8, IL-18, IL-1a, IFN- α 2, IL-13, IL-5, CTACK, GRO α , LIF, MCP-3, M-CSF, MIF, MIG, bNGF, SCF, SCGF-b, TRAIL, RANTES, SDF-1a, MCP-1, IL-2Ra, IL-3, IL-12p40, IL-16, TNF-b) nas amostras de swab foi realizada através de ensaios com equipamento Bio-Plex 200 reader (Bio-Rad) do Instituto Burlo Garofolo, empregando-se painéis de anticorpos específicos Bio-Plex Pro Human Cytokine 17-Plex Panel e Pro Human Cytokine Group II 21-Plex Panel, complementados com anticorpo específico para a quimiocina RANTES/CCL5, e analisados com o Bio-Plex Manager v.5(Bio-Rad).

PROTOCOLO DE ISOLAMENTO DE NEUTRÓFILOS E IRRADIAÇÃO DE LLLT EM MODELO CELULAR

A redução de citocinas e quimiocinas associadas à atividade de neutrófilos encontrados com o Luminex indicou um possível efeito biológico do LLLT sobre neutrófilos. Desta forma, ensaios de estímulo direto de LLLT sobre neutrófilos foram estabelecidos.

Inicialmente, o isolamento de neutrófilos foi realizado a partir do sangue periférico de indivíduos saudáveis (n=5) por gradiente de Ficoll (Ficoll-Paque Plus, GE Healthcare), utilizando-se de centrifugação à 400xG (30 mins) para a separação de neutrófilos da interface de células mononucleares. Em seguida, a lise de hemácias com solução tamponada de cloreto de amônia [Tris (1,7 mM)-NH₄Cl (16 mM)] foi realizada seguida de lavagem de neutrófilos com centrifugação à 150xG (10 mins) em solução HANKS (Sigma Aldrich), tendo como concentração final 10⁶ neutrófilos/mL para posterior exposição ao LLLT em placa de cultura celular.

AValiação DE ESPÉCIE REATIVA DE OXIGÊNIO (ROS) POR CITOMETRIA DE FLUXO E FLUORIMETRO

Para a avaliação da cinética da produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS) após exposição ao LLLT (660 nm e 970 nm), os neutrófilos foram incubados com o fluoróforo 2'7'diacetato de diclorofluoresceína à 10uM (DCFH-DA, Sigma Aldrich) por 10 minutos e lidos (1 detecção/min) no fluorímetro Envision (Perkin Elmer) durante os próximos 120 minutos. Após a avaliação temporal da produção de ROS, neutrófilos foram analisados no citômetro de fluxo FACScalibur (BD Biosciences) para a avaliação da viabilidade e comparação do ROS induzido por LLLT em relação ao induzido lipopolissacarídeo (LPS), como controle positivo.

EXPRESSÃO DIFERENCIAL DO COMPLEXO INFLAMASSOMA EM LINHAGENS HACAT INDUZIDOS POR LLLT

A linhagem aneuplóide imortalizada de queratinócitos HaCaT foi utilizado em testes preliminares para a avaliação da expressão diferencial de genes do complexo inflamassoma (receptor NLRP-3, Caspase-1 e Interleucina-1 β) frente ao tratamento com quatro comprimentos de onda de laser (445 nm - 0.5W - 40J/cm²; 660 nm - 0.5W - 6J/cm²; 800 nm - 1W - 20J/cm²; 970 nm - 0.1W - 3J/cm²), visto que uma das principais vias de ativação de caspase 1/IL-1 β mediada por ROS é dependente de receptor NLRP-3.

O RNA total foi isolado de células HaCaT após a exposição ao laser, utilizando-se o kit de extração RNAqueous Micro kit (Ambion), seguido de produção de cDNA utilizando-se o kit SuperScript™ III (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. A expressão gênica foi avaliada por PCR em tempo real ABI 7500 (Applied Biosystems) com o uso de sondas TaqMan específicas (*NLRP3*, *CASP1* e *IL1B*) em triplicata.

Os níveis de mRNA foram normalizados contra os níveis de mRNA de gene *ACTB* (gene codificante da Beta actina como controle endógeno). O número do ciclo em que a transcrição do gene de interesse é detectável (CT) foi normalizado com o número do ciclo de detecção do gene endógeno *ACTB*, referida como delta Ct (Δ CT). A diferença de expressão do gene de interesse em relação às provas entre

cada experimento (i.e.: estimulado contra não estimulado) foi expressa em $2^{-\Delta\Delta Ct}$, na qual $\Delta\Delta Ct$ é igual à ΔCt da prova (i.e.: estimulado) menos o ΔCt do basal (i.e.: não estimulado), que foi normalizado para 1 (Livak e Schmittgen, 2001).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a avaliação de diferenças significativas nos níveis de citocinas/quimiocinas entre mucosa saudável e com mucosite oral foi empregado o teste ANOVA de comparações múltiplas enquanto diferenças nos níveis anterior e posterior ao tratamento do LLLT foram avaliados por Teste t-pareado. Diferenças nos níveis de expressão gênica foram analisados por meio de teste T pareado não paramétrico ou ANOVA para comparações múltiplas utilizando o software GraphPad Prism 5.

6) RESULTADOS & DISCUSSÃO

Dentre as 39 moléculas solúveis avaliadas, quinze apresentaram maior expressão nos sítios de mucosite oral em comparação à mucosa saudável, dentre os quais se destacaram citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-1 β , TNF- α), quimiocinas (IL-8 e MIP-1b) e fatores de crescimento (GM-CSF, G-CSF)(Tabela 1), por apresentarem características essenciais na quimiotaxia, função, diferenciação e maturação de neutrófilos durante a resposta inflamatória inicial. Ao comparar a expressão das quinze citocinas diferencialmente expressas nos sítios de mucosite oral (Tabela 2), houve uma redução significativa principalmente nos níveis de IL-1 β , TNF- α e IL-7($p < 0.05$), com IL-8 após a aplicação do LLLT (970nm)(Figuras 1, 2 e 3).

Tabela 1 – Níveis de citocinas e quimiocinas (em ng/mL) em amostras de swab oral em tecido saudável e com mucosite oral (de quatro pacientes oncológicos sob quimioterapia).

Citocinas/ Quimiocinas*	Saud. x Mucosite p-value**	Mucosa saudável						Mucosite oral					
		1ª sessão	2ª sessão	3ª sessão	4ª sessão	Média	Desv. padrão	1ª sessão	2ª sessão	3ª sessão	4ª sessão	Média	Desv. padrão
IL-1β	0.0044	14,17	39,13	17,64	30,34	25,32	4,77	191,52	410,38	318,14	639,35	389,85	121,72
IL-17	7,28E+08	5,65	12,71	6,52	7,90	8,20	1,40	18,11	20,61	24,08	31,86	23,67	2,52
IL-12	0.0005	2,34	3,57	2,89	3,03	2,96	0,21	3,50	5,06	5,32	6,14	5,01	0,51
IFN-γ	4,52E+08	7,37	20,38	9,39	8,68	11,45	2,64	27,51	37,62	50,00	60,24	43,84	5,63
IL-6	7,01E+08	1,15	4,39	1,92	2,12	2,40	0,63	17,10	12,31	13,39	28,37	17,79	2,64
IL-10	0.0014	4,17	6,75	4,74	5,05	5,18	0,42	6,39	6,30	8,87	10,61	8,04	0,80
IL-4	8,02E+08	0,69	1,06	0,65	0,74	0,79	0,09	1,38	1,69	2,31	3,15	2,13	0,28
HGF	0.0039	44,76	49,51	41,82	46,51	45,65	3,86	343,64	609,87	242,25	175,66	342,85	91,86
MIP-1b	0.0001	4,97	15,24	5,15	7,09	8,11	1,96	17,11	22,61	34,21	39,07	28,25	4,56
G-CSF	2,21E+08	4,44	10,89	4,95	5,20	6,37	1,20	26,83	30,97	37,88	47,62	35,83	4,74
GM-CSF	3,57E+09	45,65	49,89	46,76	51,29	48,40	0,83	53,07	53,53	57,75	62,60	56,74	1,73
TNF-α	0.0001	1,34	4,86	2,42	3,05	2,91	0,73	12,86	19,11	16,35	25,16	18,37	3,32
IL-2	0.0004	0,06	0,87	0,56	0,97	0,61	0,13	0,65	1,76	2,45	3,00	1,97	0,39
IL-7	0.0059	0,71	1,12	0,45	0,53	0,70	0,15	1,97	0,93	2,33	2,87	2,03	0,41
IL-8	0.0005	101,82	141,06	96,20	115,96	113,76	18,96	538,50	613,87	485,62	473,52	527,88	94,39
IL-18	0.2191	16,18	83,67	20,58	45,76	41,55	17,23	71,63	75,88	62,43	87,06	74,25	17,58
IL-1a	0.2021	87,34	68,58	31,40	67,22	63,63	16,10	91,93	141,61	68,75	60,59	90,72	12,91
IFN-α2	0.6555	11,70	7,58	9,10	8,78	9,29	1,42	8,87	11,46	6,27	7,35	8,49	1,00
IL-13	0.0817	0,38	0,85	0,60	0,51	0,59	0,08	0,69	0,88	2,00	1,38	1,24	0,35
IL-5	0.0218	0,58	0,89	0,58	0,58	0,66	0,08	0,69	0,51	1,33	1,50	1,01	0,16
CTACK	0.7797	15,09	5,74	7,26	9,06	9,29	2,25	9,13	13,63	9,47	8,33	10,14	1,86
GROα	0.0162	213,08	492,30	482,37	291,36	369,78	59,71	717,80	1041,43	862,84	534,22	789,07	142,42
LIF	0.0123	4,61	2,05	1,05	1,38	2,27	0,63	4,71	9,71	7,37	3,66	6,36	1,33
MCP-3	0.1555	3,50	0,73	0,46	0,49	1,29	0,54	0,70	0,80	0,46	0,46	0,61	0,10
M-CSF	0.1156	23,50	19,50	19,50	26,38	22,22	2,93	34,12	58,84	30,46	23,57	36,75	8,16
MIF	0.1047	66,15	175,10	115,46	124,64	120,34	23,42	380,00	419,12	215,38	196,39	302,72	102,87
MIG	0.2292	31,14	43,23	24,89	42,54	35,45	6,92	92,28	129,46	51,34	26,85	74,99	31,01
bNGF	0.8719	0,76	0,39	0,23	0,20	0,40	0,16	0,49	0,49	0,18	0,28	0,36	0,13
SCF	0.9821	4,32	1,56	1,49	1,48	2,21	0,58	2,43	2,98	1,86	1,50	2,19	0,60
SCGF-β	0.2822	34,83	15,20	15,20	15,20	20,11	4,91	50,81	74,91	15,20	15,20	39,03	16,67
TRAIL	0.2570	26,09	15,94	28,98	16,23	21,81	4,52	30,30	46,62	32,44	21,30	32,67	7,78
RANTES	0.0260	0,93	1,62	1,03	1,33	1,23	0,23	5,91	2,40	2,08	2,54	3,23	0,84
SDF-1α	0.0852	89,25	63,19	78,82	55,72	71,75	8,18	88,67	104,64	96,67	84,63	93,65	8,65
MCP-1	0.6758	59,23	110,78	84,58	97,05	87,91	14,91	56,76	113,26	74,24	71,62	78,97	13,78
IL-2Ra	0.7012	22,67	13,50	13,72	9,00	14,72	2,68	11,55	16,36	12,85	13,25	13,50	1,91
IL-3	0.1273	75,65	42,20	55,22	60,95	58,51	5,49	83,02	77,24	69,66	61,62	72,89	7,15
IL-12p40	0.1658	129,28	108,72	165,63	145,15	137,19	19,51	191,63	193,80	149,58	158,21	173,30	15,11
IL-16	0.0414	36,57	2,55	1,62	0,37	10,28	6,63	50,10	47,59	35,55	15,33	37,14	11,10
TNF-β	0.1938	3,51	2,25	2,85	2,30	2,73	0,29	5,21	3,34	2,60	5,12	4,07	0,91

***em negrito – citocinas/quimiocinas com diferenças significativas entre tecido saudável e com mucosite oral (p<0.005). ** Two way ANOVA.**

Tabela 2 - Níveis de citocinas/quimiocinas expressas diferencialmente na mucosite oral antes e depois da aplicação do laser terapêutico (LLLT).

Citocinas/ Quimiocinas	Pré LT x Pós LT	Mucosite oral pré LLLT						Mucosite oral pós LLLT					
	p-value**	1ª sessão	2ª sessão	3ª sessão	4ª sessão	Média	Desv. padrão	1ª sessão	2ª sessão	3ª sessão	4ª sessão	Média	Desv. padrão
IL-1B	0.034	191,52	410,38	318,14	639,35	389,85	121,72	189,77	96,01	243,48	111,61	160,22	69,02
IL-17	0.47	18,11	20,61	24,08	31,86	23,67	2,52	21,33	12,45	26,49	14,37	18,66	6,46
IL-12	0.35	3,50	5,06	5,32	6,14	5,01	0,51	4,25	3,17	5,67	3,44	4,13	1,12
IFN-G	0.25	27,51	37,62	50,00	60,24	43,84	5,63	38,70	18,72	48,76	18,74	31,23	15,01
IL-6	0.37	17,10	12,31	13,39	28,37	17,79	2,64	28,40	11,19	16,59	35,99	23,04	11,23
IL-10	0.16	6,39	6,30	8,87	10,61	8,04	0,80	7,39	5,30	9,33	6,30	7,08	1,73
IL-4	0.21	1,38	1,69	2,31	3,15	2,13	0,28	1,91	1,15	2,35	1,14	1,64	0,60
HGF	0.067	343,64	609,87	242,25	175,66	342,85	91,86	444,73	153,28	319,52	128,49	261,51	148,71
MIP-1b	0.071	17,11	22,61	34,21	39,07	28,25	4,56	25,10	16,40	31,50	25,59	24,65	6,22
G-CSF	0.39	26,83	30,97	37,88	47,62	35,83	4,74	46,47	33,19	46,91	41,51	42,02	6,38
GM-CSF	0.25	53,07	53,53	57,75	62,60	56,74	1,73	56,43	50,70	56,06	50,46	53,41	3,28
TNF-a	0.047	12,86	19,11	16,35	25,16	18,37	3,32	10,82	8,48	17,17	8,00	11,12	4,22
IL-2	0.46	0,65	1,76	2,45	3,00	1,97	0,39	1,70	0,67	1,95	0,91	1,31	0,61
IL-7	0.016	1,97	0,93	2,33	2,87	2,03	0,41	1,78	1,30	1,98	0,53	1,40	0,64
IL-8	0.048	538,50	613,87	485,62	473,52	527,88	94,39	549,51	235,76	448,44	283,44	379,29	145,54

*em vermelho – citocinas/quimiocinas com diferenças significativas após a aplicação do LLLT (970 nm) ($p < 0.05$). ** Two way ANOVA.

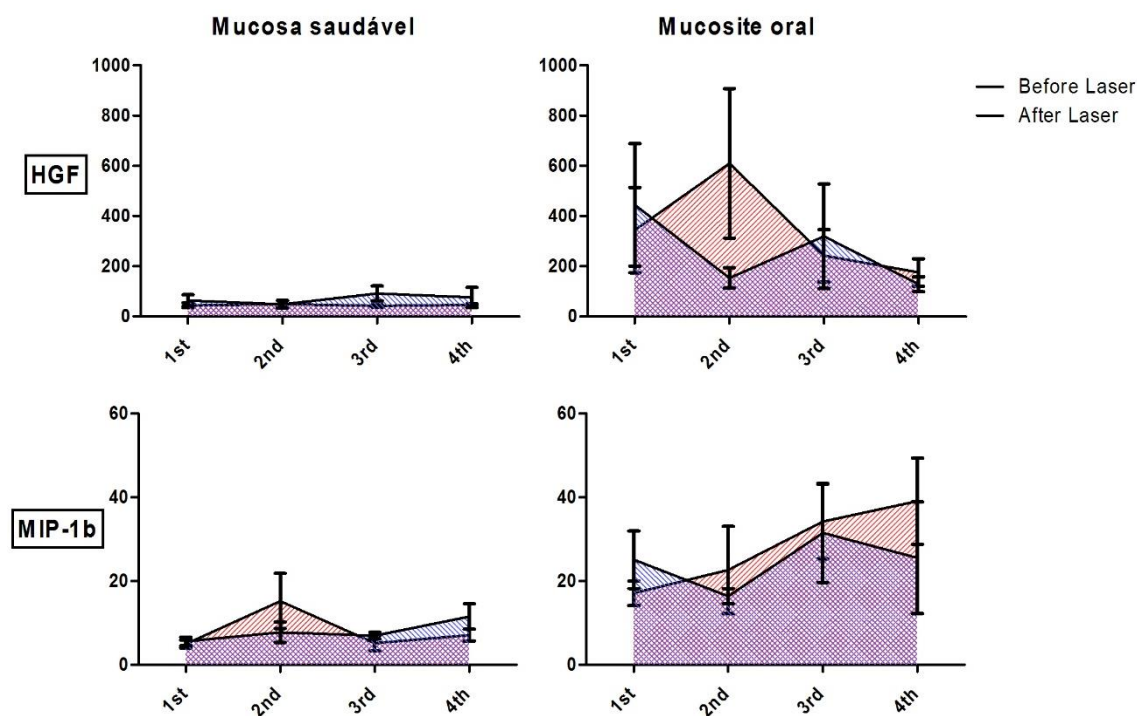
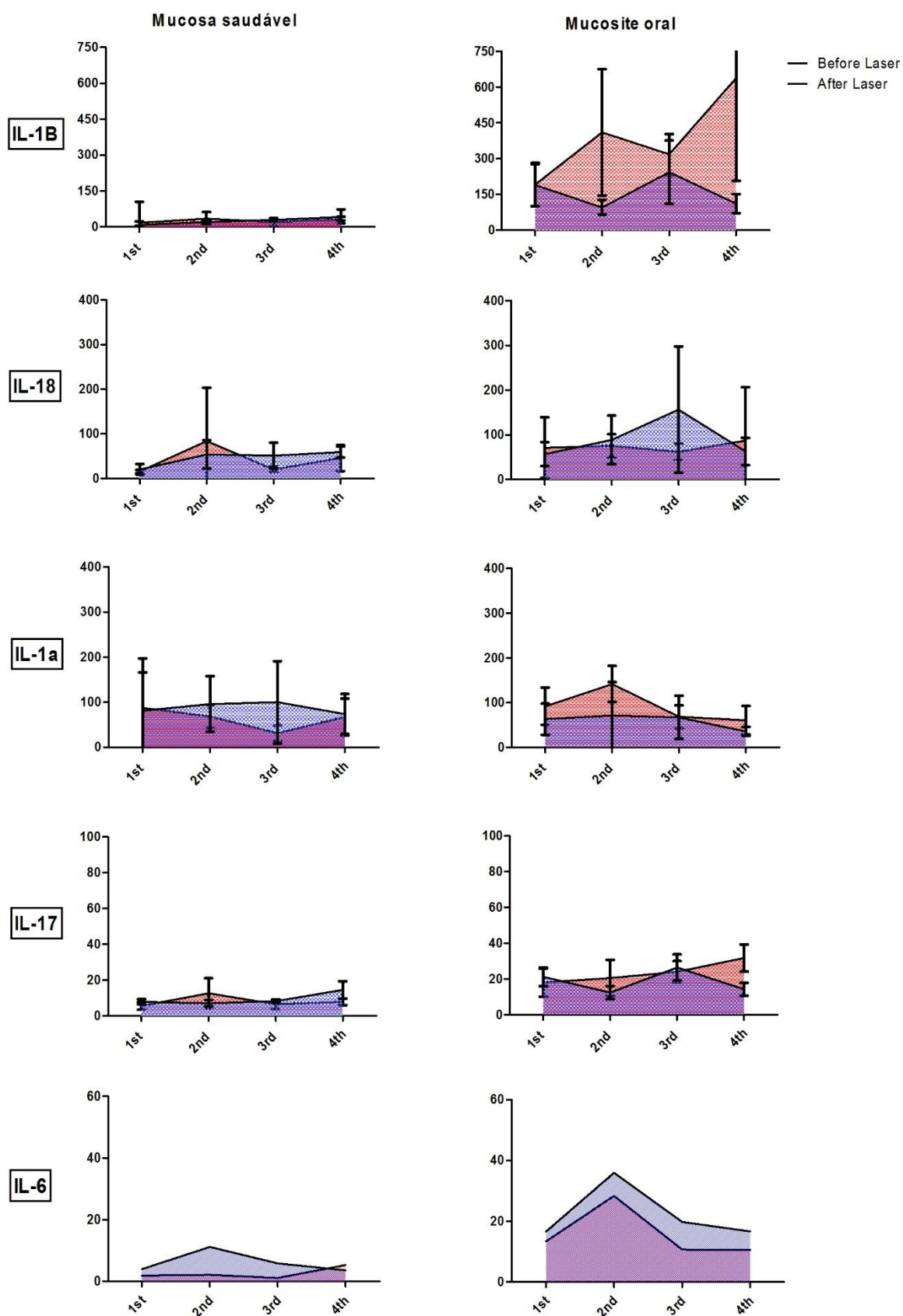


Figura 1 - Dosagem de citocinas e quimiocinas a partir de swab em tecidos de mucosa oral saudável e com mucosite oral, anteriormente (azul) e posteriormente (em vermelho) à aplicação do laser terapêutico (LLLT).



Fig

ura 2 - Dosagem de moléculas solúveis a partir de swab em tecidos de mucosa oral saudável e com mucosite oral, anteriormente (azul) e posteriormente (em vermelho) à aplicação do laser terapêutico.
* Somente o sinal fluorescente de uma amostra foi reconhecida na dosagem IL-6.

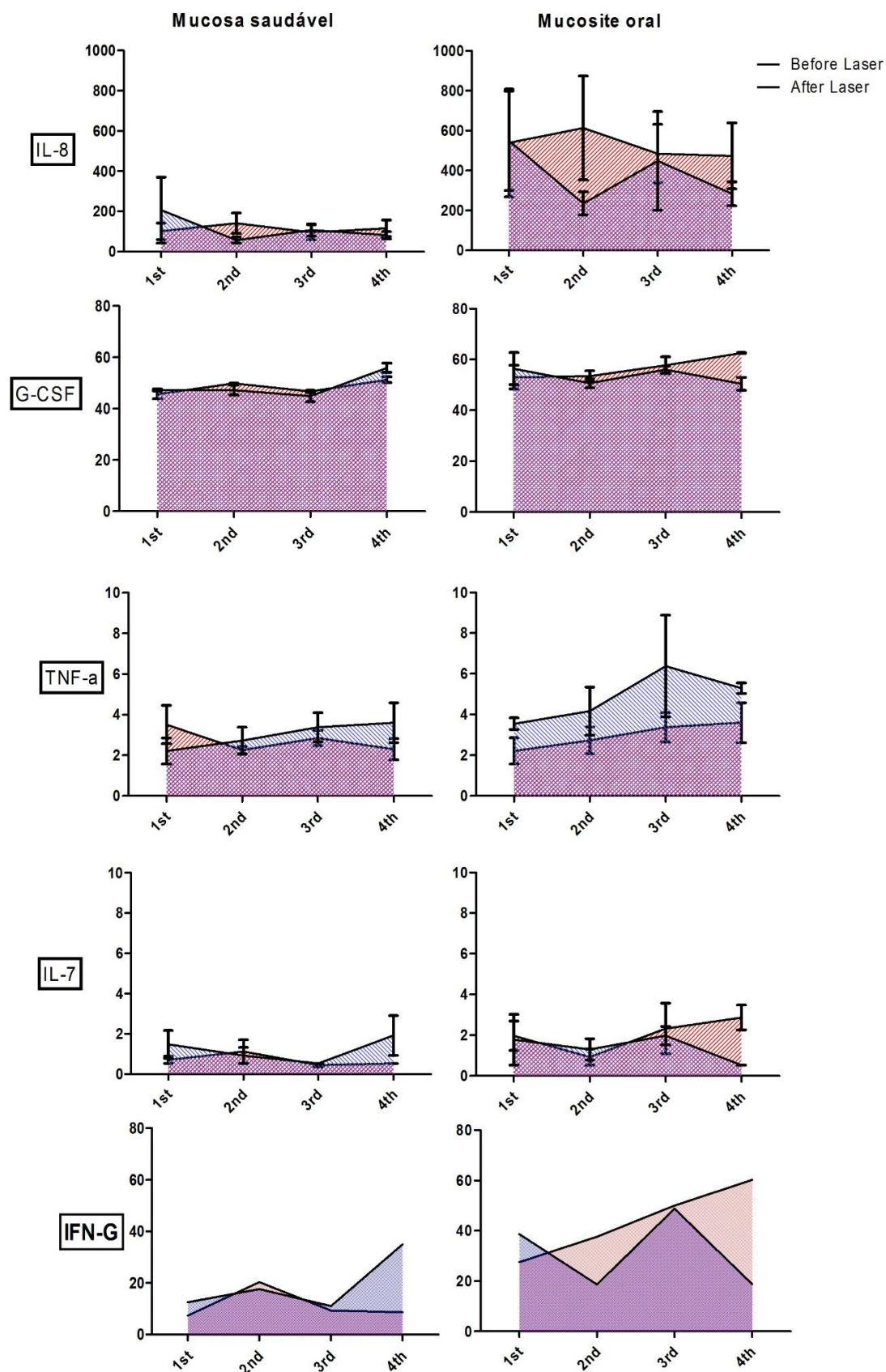


Figura 3 - Dosagem de moléculas solúveis a partir de swab em mucosa oral saudável e com mucosite oral, anteriormente (azul) e posteriormente (em vermelho) à aplicação do laser terapêutico.*Somente o sinal fluorescente de uma amostra foi reconhecida na dosagem IFN-G.

A indução de moléculas associadas à inflamação aguda local em amostras com mucosite oral e a redução de citocinas e quimiocinas associadas à função de neutrófilos (IL-1 β , TNF- α , IL-7 e IL-8) após LLLT, poderia indicar um possível efeito anti-inflamatório sobre estas células-alvos (Figura 4), tendo em vista seu papel essencial como primeiras sentinelas em lesões teciduais e na amplificação da resposta inflamatória local.

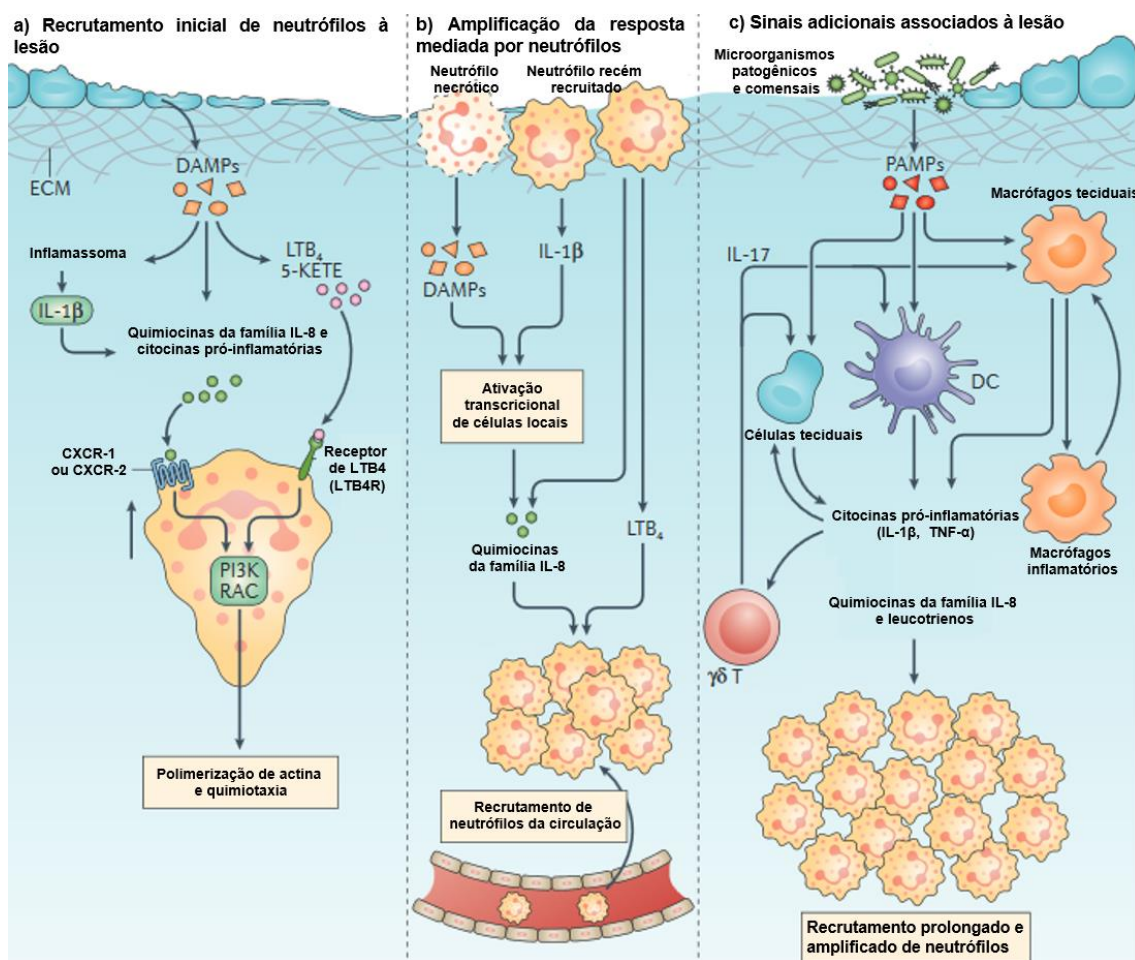


Figura 4 - Papel central de neutrófilos em diferentes fases de uma lesão tecidual. a) Produção de padrões moleculares associados a danos (DAMPs) no sítio de lesão, produção de citocinas pró inflamatórias e quimiotaxia dos primeiros neutrófilos recrutados ao sítio de lesão; b) DAMPs produzidas por neutrófilos necróticos e produção contínua de citocinas amplifica o recrutamento de células diretamente da circulação, principalmente por quimiocinas e leucotrienos (como o LTB₄) ; c) A manutenção da lesão favorece a entrada de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), e de DAMPs induzindo resposta em um repertório maior de células locais e dificultando a resolução do quadro inflamatório. Modificado de de Oliveira *et al.* (2016).

Desta forma, a investigação visou avaliar o ROS intracelular como mediador inflamatório em neutrófilos, através de ensaios *in vitro* com neutrófilos isolados de indivíduos saudáveis e estimulados com dois tipos de comprimentos de onda distintos (970 nm e 660 nm).

Os lasers apresentaram efeitos opostos, com a redução na produção de espécie reativa de oxigênio (ROS) intracelular induzida pelo LT de 970nm após 90 minutos, enquanto o aumento de ROS pelo LT de 660 nm foi significativo somente após 120 minutos do estímulo (Figura 5 e Tabela 3).

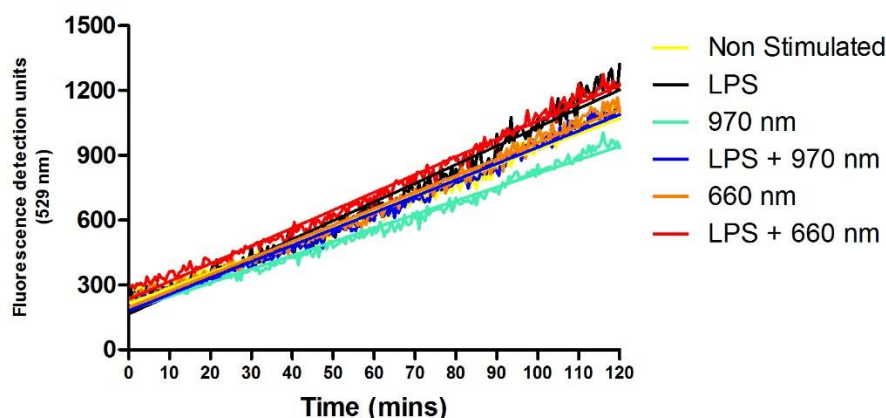


Figura 5 – Fluorescência associada à produção de ROS em granulócitos isolados por gradiente de ficoll após o tratamento com LLLT. *Concentração do LPS (100ng/mL).

Tabela 3 – Cinética de ROS intracelular após tratamento com os lasers 970 nm e 660nm.

Slope/ Tempo	Não estimulado (NE)	LPS (100 ng/ml)	970 nm	LPS + 970 nm	660 nm	LPS + 660 nm	NE vs. 970nm*	NE vs. 660nm*
45 mins	5.60 ± 0.12	6.27 ± 0.13	4.97 ± 0.41	5.97 ± 0.14	5.99 ± 0.12	6.44 ± 0.13	0.556	0.328
90 mins	6.43 ± 0.06	7.62 ± 0.06	5.78 ± 0.21	6.93 ± 0.06	6.98 ± 0.05	7.61 ± 0.06	0.023	0.686
120 mins	7.14 ± 0.05	8.65 ± 0.06	6.32 ± 0.17	7.57 ± 0.05	7.63 ± 0.05	8.24 ± 0.05	0.0001	0.0001

* *p*-value da regressão linear

Através da análise de citometria de fluxo foi possível observar a redução dos níveis de ROS após duas horas do tratamento com LPS seguidos da exposição ao laser de 970 nm, enquanto o laser de 660 nm aumentou ainda mais os níveis de ROS após o tratamento prévio com LPS. Na ausência do LPS, o laser de 660 nm apresentou maior produção em comparação ao não estimulado, enquanto não houve diferença para o laser de 970 nm. A redução apresentada pelo laser de 660 nm foi corroborado por Cerdeira *et al.* (2016), que evidenciou aumento no burst respiratório entre neutrófilos tratados com o mesmo comprimento de onda, apresentando como efeito associado maior capacidade fungicida contra a *Candida albicans* por neutrófilos e geração de radicais superóxido intra e extracelulares.

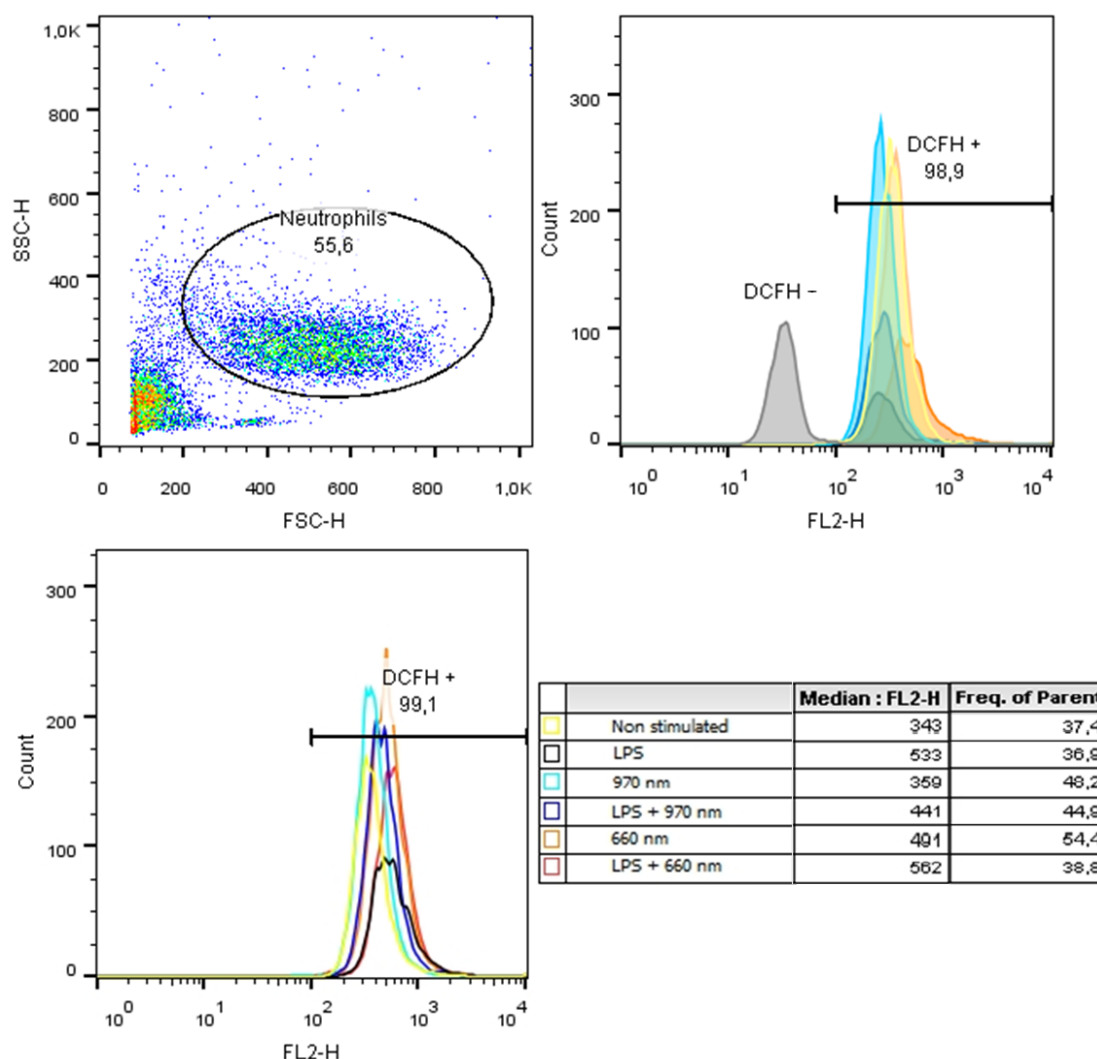


Figura 6 – a) Gate de neutrófilos isolados de sangue periférico pelo gradiente de ficoll em gráfico de granulocidade e tamanho (FSCxSSC, contagem mínima de 10^5 neutrófilos); b) Neutrófilos marcados e não marcados com 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína. (DCFH-DA); c) Produção de ROS em neutrófilos após 2 horas do tratamento do LLLT (660 nm e 970 nm) e comparação com aplicação simultânea de lipopolissacarídeo (LPS).

Visto que a produção de ROS intracelular tem sido descrito como ativador da produção de IL-1 β mediado pelo complexo NLRP-3 inflamassoma em diversas células como monócitos, macrófagos, neutrófilos, células epiteliais e endoteliais (Latz *et al.*, 2013), decidimos usar como modelo experimental a linhagem imortalizada de queratinócitos HACAT exposta a quatro comprimentos de onda de LLLT distintos (Figura 7). Dentre elas, o laser de 660 nm foi o único que induziu o aumento na transcrição de *NLRP3* acompanhado do aumento na *IL1B* e *CASP1* após 2 horas do estímulo, no qual a maior transcrição de *NLRP3* poderia indicar um mecanismo compensatório ao aumento de ROS induzido pelo laser de forma análoga aos neutrófilos, apresentando um aumento pós LLLT também em tempo

similar (Fig. 8), enquanto o laser de 970 nm não apresentou aumento de *NLRP3* em células HACAT e inibiu a formação de ROS intracelular em neutrófilos.

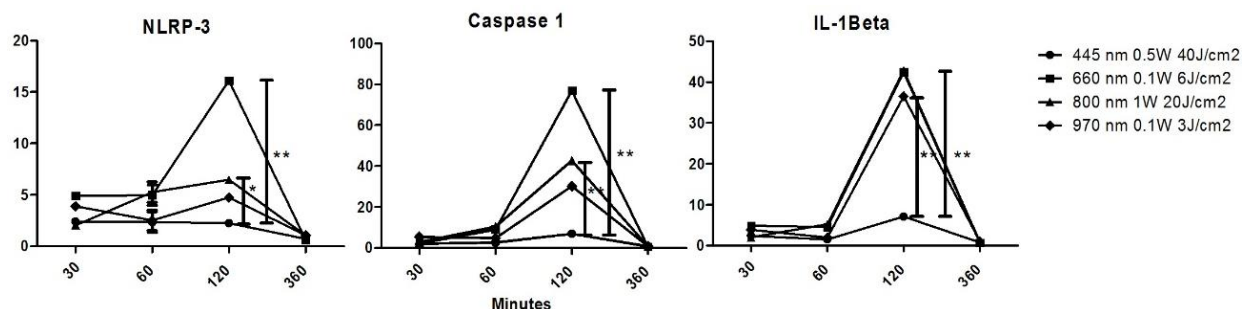


Figura 7 – Indução transcricional de genes codificantes do receptor *NLRP-3*, caspase-1 e Interleucina 1 β em linhagem de queratinócitos HACAT após estímulo ao LLLT (laser de 445 nm foi empregado como controle). * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ (Análise ANOVA uma via).

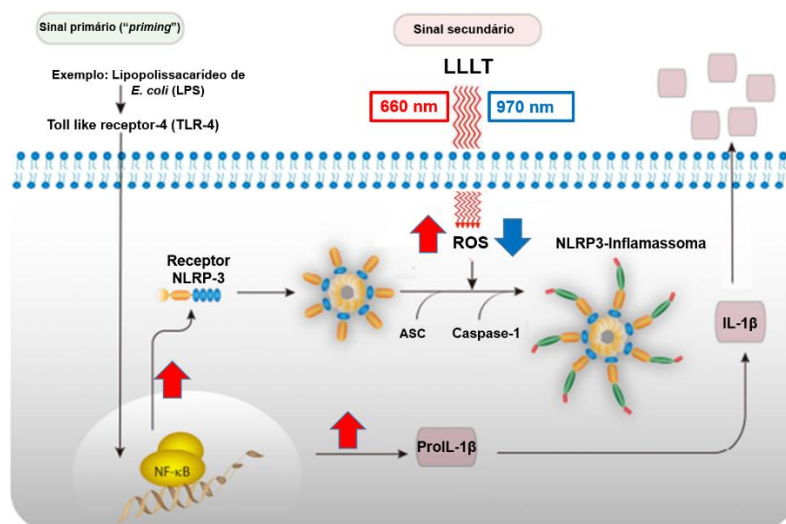


Figura 8 – Modelo putativo de regulação de ROS intracelular mediado pelo LLLT de 660 nm, atuando como sinal primário (indução transcricional de *NLRP3*, *CASP1* e *IL1B*) e secundário (aumento de ROS), destacados com setas em vermelho. O LLLT de 970 nm utilizado em pacientes atua na inibição de ROS (destacado com setas em azul) em neutrófilos, com possível implicação na produção de *IL-1 β* mediado pelo *NLRP3*-inflamassoma.

A identificação do grau de desenvolvimento inflamatório em uma lesão (Figura 4) e contexto patológico de um paciente pode ter implicações quanto à eficiência do LLLT a ser escolhido e resolução da inflamação contra sinais inflamatórios de natureza diferente (origem infecciosa ou imunes). Burger e cols (2016). evidenciaram uma redução no influxo de neutrófilos associado à aplicação de LLLT de 660 nm entre indivíduos saudáveis, no qual estes infiltrados apresentaram maior atividade contra o fungo *Paracoccidioides brasiliensis* mesmo em menor número. Por outro lado, Lejeune et al. (1996) evidenciaram uma menor capacidade de produção de ROS em neutrófilos provenientes de pacientes sob quimioterapia e menor função microbicida contra *S. aureus*. A aplicação do laser LLLT 970 nm se mostrou benéfico entre pacientes sob quimioterapia em nosso estudo, no entanto ainda não está claro se a

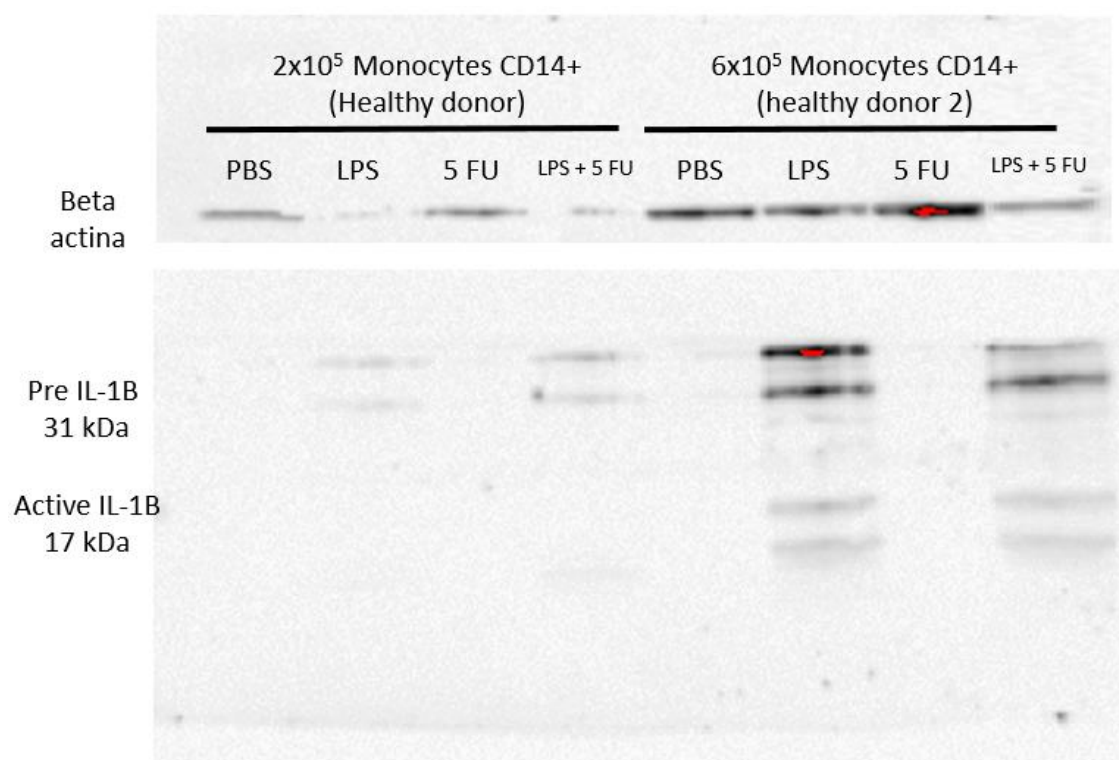
redução nos níveis de ROS em neutrófilos foram responsáveis diretamente por este efeito, e se poderia causar uma redução importante nos níveis de ROS e diminuir a capacidade microbicida associada à quimioterapia no tratamento da MO.

CONCLUSÃO

A persistência crônica de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas encontradas em lesões pode estar associado a manutenção de sinais inflamatórios de diferentes origens na mucosite oral, seja por padrões moleculares de danos (DAMPs) liberados por diferentes células lesadas e neutrófilos recrutados/mantidos no sítio infeccioso, assim como de padrões moleculares associados patógenos (PAMPs) de microorganismos instalados na lesão, o que adiciona complexidade ao cenário e dificulta o encontro de somente um alvo terapêutico específico.

Este estudo ao integrar dados moleculares e clínicos, conseguiu propor mecanismos associados a uma população celular com papel central na resolução da inflamação, através da redução direta de ROS intracelular nos neutrófilos pelo LLLT de 660 nm e aumento de ROS pelo laser de 970 nm, o que impactaria em diferentes funções antimicrobianas, liberação de citocinas inflamatórias e atividade quimiotática. A consequente redução da inflamação, como por exemplo através da inibição da IL-1 β , pode representar um passo importantes no desenvolvimento de uma solução terapêutica não-invasiva mais eficaz e acessível a um grupo de indivíduos que ainda se encontra em situação vulnerável.

DADOS SUPLEMENTARES



Dados suplementares 1 – Avaliação dos efeitos do quimioterápico 5 Fluorouracil (5 FU) na produção de IL-1 β ativa em monócitos de indivíduos saudáveis (por Western Blotting). Foi demonstrado que não houve diferença significativa na produção de IL-1 Beta ativa na presença ou ausência de estímulo com controle positivo (priming com lipopolissacarídeo – LPS 100 ng/mL por 30 mins)($p>0.05$).

CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

ATIVIDADES	Agosto 2016	Setembro 2016	Outubro 2016	Novembro 2016	Dezembro 2016	Jan/Fev 2017
1. Padronização de cultura de células HaCaT e expressão gênica em resposta ao LLLT	OK	OK				
2. Análise de resultados do Bio-plex de 4 pacientes oncológicos		OK	OK			
3. Padronização de isolamento de neutrófilos e da cinética de ROS em fluorímetro com LPS e LLLT			OK	OK		
4. Padronização de detecção de ROS em citômetro de fluxo com LPS e LLLT				OK	OK	
5. Detecção de ROS em citômetro e fluorímetro em neutrófilos de indivíduos saudáveis					OK	OK
6. Revisão e atualização da literatura	OK	OK	OK	OK	OK	OK

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Burger E, Mendes AC, Bani GM, Brigagão MR, Santos GB, Malaquias LC, Chavasco JK, Verinaud LM, de Camargo ZP, Hamblin MR, Sperandio FF. Low-level laser therapy to the mouse femur enhances the fungicidal response of neutrophils against *Paracoccidioides brasiliensis*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015 Feb 12;9(2):e0003541. doi: 10.1371/journal.pntd.0003541

Cerdeira CD, Lima Brigagão MR, Carli ML, de Souza Ferreira C, de Oliveira Isac Moraes G, Hadad H, Costa Hanemann JA, Hamblin MR, Sperandio FF. Low-level laser therapy stimulates the oxidative burst in human neutrophils and increases their fungicidal capacity. *J Biophotonics*. 2016 Dec;9(11-12):1180-1188. doi: 10.1002/jbio.201600035.

de Oliveira S, Rosowski EE, Huttenlocher A. Neutrophil migration in infection and wound repair: going forward in reverse. *Nat Rev Immunol*. 2016 May 27;16(6):378-91. doi: 10.1038/nri.2016.49.

Lejeune M, Sariban E, Cantinieaux B, Ferster A, Devalck C, Fondu P. Granulocyte functions in children with cancer are differentially sensitive to the toxic effect of chemotherapy. *Pediatr Res*. 1996 May;39(5):835-42.

Latz E, Xiao TS, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat Rev Immunol*. 2013 Jun;13(6):397-411. doi: 10.1038/nri3452.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8.

Ottaviani G, Gobbo M, Sturnega M, Martinelli V, Mano M, Zanconati F, Bussani R, Perinetti G, Long CS, Di Lenarda R, Giacca M, Biasotto M, Zacchigna S. Effect of class IV laser therapy on chemotherapy-induced oral mucositis: a clinical and experimental study. *Am J Pathol*. 2013 Dec;183(6):1747-57. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.09.003.

Rathinam VA, Vanaja SK, Fitzgerald KA. Regulation of inflammasome signaling. *Nat Immunol*. 2012 Mar 19;13(4):333-42. doi: 10.1038/ni.2237.

Sonis ST, Elting LS, Keefe D, Peterson DE, Schubert M, Hauer-Jensen M, Bekele BN, Raber-Durlacher J, Donnelly JP, Rubenstein EB; Mucositis Study Section of the Multinational Association for Supportive Care in Cancer; International Society for Oral Oncology. Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. *Cancer*. 2004 May 1;100(9 Suppl):1995-2025.

ANEXOS

ANEXO A - CAPÍTULO I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa: "Avaliação de polimorfismos em genes envolvidos na resposta imunológica de pacientes infectados com HIV-1"

Pesquisadora Principal: Sabrina Esteves de Matos Almeida - telefone 3352-0336, email: sabrinamatos.almeida@gmail.com e endereço: Av. Ipiranga, 5400. 3º andar, Bairro Jardim Botânico - PoA.
Pesquisadores envolvidos: Maria Cristina Cotta Matte^{1,2}, Rúbia Marília de Medeiros^{1,2}, Dennis Maletich Junqueira^{1,2}, Leonardo Augusto Luvison Araújo¹, José Artur Bogo Chies², Cynara Nunes Carvalho³, Marineide Gonçalves de Melo⁴, Breno Riegel Santos⁴, Luiz Fernando Job Jobim⁵, Maria Lucia Rossetti¹.

- | | |
|--|---------------------|
| 1. Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - FEPPS | Tel: (51) 3352-0336 |
| 2. Laboratório de Imunogenética - UFRGS | Tel: (51) 3308-6737 |
| 3. Serviço de Atendimento Especializado da Vila dos Comerciantes - SMS/PoA | Tel: (51) 3289-4097 |
| 4. Serviço de Infectologia - Hospital Nossa Senhora da Conceição | Tel: (51) 3357-2126 |
| 5. Serviço de Imunologia - Hospital de Clínicas de Porto Alegre | Tel: (51) 3359-8020 |

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa intitulada: "Avaliação de polimorfismos em genes envolvidos na resposta imunológica de pacientes infectados com HIV-1" que tem como objetivo principal avaliar fatores imunológicos que estão envolvidos na progressão da AIDS. O tema escolhido se justifica, pois pode propiciar um maior entendimento sobre os mecanismos envolvidos na infecção pelo HIV e auxiliar em um acompanhamento e tratamento adequado para todos os pacientes soropositivo. Além disso, pode propiciar novos estudos que tenham como objetivo o desenvolvimento de novos medicamentos ou vacinas. O trabalho está sendo realizado sob orientação da pesquisadora Sabrina Esteves de Matos Almeida. Para alcançar os objetivos do estudo será realizada uma entrevista individual, na qual você irá responder 22 perguntas pré-estabelecidas. Os dados de identificação serão confidenciais e os nomes reservados. Os dados obtidos serão utilizados somente para este estudo, sendo os mesmos armazenados pelo(a) pesquisador(a) principal durante 5 (cinco) anos e após totalmente destruídos (conforme preconiza a Resolução 196/96).

Como são feitas as análises? As análises do DNA dos genes do sistema imune serão realizadas a partir de coleta de sangue, como uma coleta normal para hemograma. Com o uso de agulhas e seringas descartáveis será coletada de você uma amostra de sangue (quantidade aproximada de uma colher de sopa). Esta coleta será feita por um indivíduo treinado. Após, o sangue será examinado para determinar variações genéticas referentes ao sistema imune. As amostras serão identificadas por números. Todos os dados que vinculem sua identidade com os dados obtidos a partir de sua amostra de sangue serão mantidos em um banco de dados sigiloso, ao qual só terão acesso os pesquisadores acima citados.

Quais os riscos em participar? Não há riscos em participar do projeto. Poderá, no entanto, haver formação de um hematoma no braço em função da coleta de sangue.

O que o paciente ganha com este estudo? Embora este trabalho não possa gerar nenhum benefício imediato aos participantes, este estudo poderá trazer vários benefícios em longo prazo (conhecimento das características genéticas presentes na nossa população) podendo assim, auxiliar em novas diretrizes do tratamento e acompanhamento futuro dos pacientes que vivem com HIV/AIDS. Este estudo não fornecerá nenhum auxílio financeiro aos participantes.

Quais são os seus direitos? Os seus registros médicos serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados deste estudo só poderão ser usados para fins científicos, e você não será identificado por nome. Sua participação no estudo é voluntária, caso você decida não participar, isto não afetará no tratamento normal que você tem direito. Além disso, você terá a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento, caso desejar. Você poderá procurar qualquer pesquisador envolvido para responder a qualquer pergunta ou obter esclarecimentos acerca dos assuntos relacionados a esta pesquisa. Caso você queira esclarecer alguma dúvida sobre as questões éticas deste projeto você poderá entrar em contato Daniel Demétrio Faustino da Silva, Coordenador-geral do Comitê de Ética em Pesquisa do GHC pelo telefone 3357-2407.

EU _____, recebi as informações sobre os objetivos e a importância desta pesquisa de forma clara e concordo em participar do estudo.

Declaro que também fui informado:

* Da garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento acerca dos assuntos relacionados a esta pesquisa.

Versão Aprovada em

30 NOV. 2010

 Daniel Demétrio Faustino da Silva
 Coordenador-geral do CEP-GHC

* De que minha participação é voluntária e terei a liberdade de retirar o meu consentimento, a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo para a minha vida pessoal e nem para o atendimento prestado a mim.

* Da garantia que não serei identificado quando da divulgação dos resultados e que as informações serão utilizadas somente para fins científicos do presente projeto de pesquisa.

* Sobre o projeto de pesquisa e a forma como será conduzido e que em caso de dúvida ou novas perguntas poderei entrar em contato com a pesquisadora Sabrina Esteves de Matos Almeida no telefone 3352-0336, email: sabrinamatos.almeida@gmail.com e endereço: Av. Ipiranga, 5400. 3º andar. Bairro Jardim Botânico – Porto Alegre.

* Também que, se houverem dúvidas quanto a questões éticas, poderei entrar em contato com Daniel Demétrio Faustino da Silva, Coordenador-geral do Comitê de Ética em Pesquisa do GHC pelo telefone 3357-2407.

* Se houverem dúvidas quanto a questões éticas, poderei entrar em contato com qualquer um dos pesquisadores envolvidos.

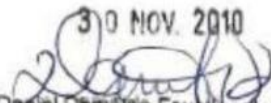
Declaro que recebi cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, ficando outra via com a pesquisadora.

Nome do entrevistado: _____ Assinatura do entrevistado _____

Nome do Pesquisador: _____ Assinatura do Pesquisador: _____

Este formulário foi lido para _____ (nome do paciente) em
/ / (data) pelo _____ (nome do pesquisador) enquanto eu
estava presente.

Versão Aprovada em

30 NOV. 2010

Daniel Demétrio Faustino da Silva
Coordenador-geral do CEP-GHC



HOSPITAL N. S. DA CONCEIÇÃO S.A.
Av. Francisco Tavares, 140
CEP 91304-200 - Porto Alegre - RS
Fone: 3357-2000
CNPJ: 02.747.116/0001-20

HOSPITAL DA CRIANÇA CONCEIÇÃO
(Hospital Pediátrico do Hospital Conceição)
Sede e do Grupo S.A.
Fone: 3357-4100
CNPJ: 02.747.116/0001-26

HOSPITAL CRISTO REDENTOR S.A.
Rua Conceição, 100
CEP 91040-000 - Porto Alegre - RS
Fone: 3357-4100
CNPJ: 02.747.116/0001-26

HOSPITAL FEMINA S.A.
Rua Washington, 17
CEP 91420-001 - Porto Alegre - RS
Fone: 3354-1200
CNPJ: 02.747.116/0001-20



Vinculados ao Ministério da Saúde - Decreto nº 99.344/96

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP/GHC

O Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo Hospitalar Conceição (CEP/GHC), que é reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS desde 31/10/1997, pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB0001105) e pelo FWA - Federalwide Assurance (FWA 00000378), em 30 de novembro de 2010, reavaliou o seguinte projeto de pesquisa:

Projeto: 10-213

Versão do Projeto:

Versão do TCLE:

Pesquisadores:

JOSÉ ARTUR BOGO CHIES
LUIZ FERNANDO JOBIM
MARIA CRISTINA COTTA MATTE
RÚBIA MARÍLIA MEDEIROS
DENNIS MALETICH JUNQUEIRA
LEONARDO AUGUSTO LUVISON ARAÚJO
CYNARA CARVALHO NUNES
MARINEIDE GONÇALVES DE MELO
BRENO RIEGEL SANTOS
MARIA LÚCIA ROSA ROSSETTI
SABRINA ESTEVES DE MATOS ALMEIDA

Título: Avaliação de polimorfismos em genes envolvidos na resposta imunológica de pacientes infectados com HIV-1.

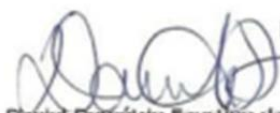
Documentação: Aprovados

Aspectos Metodológicos: Aprovados

Aspectos Éticos: Aprovados

Parecer final: Este projeto, por estar de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde, obteve o parecer de APROVADO.

Considerações Finais: Toda e qualquer alteração do projeto, deverá ser comunicada imediatamente ao CEP/GHC. Lembramos do compromisso de encaminhar dentro dos prazos estipulados, o(s) relatório(s) parcial(ais) e/ou final ao Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo Hospitalar Conceição e ao Centro de Resultado onde a pesquisa for desenvolvida.


Daniel Demétrio Faustino da Silva
Coordenador-geral do CEP/GHC

Porto Alegre, 30 de novembro de 2010.

ANEXO B - CAPÍTULO II – INNATE IMMUNITY GENES POLYMORPHISMS AND HIV-1 MOTHER-TO-CHILD TRANSMISSION IN ZAMBIAN POPULATION



Medicine - Internal Medicine | Immunologic Research – incl. option to publish open access



Immunologic Research

Editor-in-Chief: Julius M. Cruse

ISSN: 0257-277X (print version)

ISSN: 1559-0755 (electronic version)

Journal no. 12026 **\$99.00** [Personal Rate e-only for the Americas](#)



[Get Subscription](#)

Online subscription, valid from January through December of current calendar year

Immediate access to this year's issues via SpringerLink

1 Volume(-s) with 6 issue(-s) per annual subscription

Automatic annual renewal

More information: >> [FAQs](#) // >> [Policy](#)

[ABOUT THIS JOURNAL](#) [EDITORIAL BOARD](#) [ETHICS & DISCLOSURES](#) [INSTRUCTIONS FOR AUTHORS](#)

Instructions for Authors

AUTHORSHIP POLICY

Authorship should incorporate and should be restricted to those who have contributed substantially to the work in one or more of the following categories:

- Conceived of or designed study
- Performed research
- Analyzed data
- Contributed new methods or models

- Wrote the paper

EDITORIAL PROCEDURE

Double-blind peer review

This journal follows a double-blind reviewing procedure. Authors are therefore requested to submit two documents at the time of their submission:

- ▶ A title page only, which includes:
 - A concise and informative title
 - The name(s) of the author(s)
 - The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
 - The e-mail address and fax number of the corresponding author
 - ▶ A blinded manuscript without any author names and affiliations. Authors should avoid language that could identify themselves as the authors. Authors should properly cite and reference their own work, but should not use phrases such as “In our previous work (Smith, 2011), we presented...” which identifies the author. Such work should be referred to in the third person, e.g., “Previously Smith (Smith, 2011) presented...”.
- The blinded manuscript should contain:
- A concise and informative title
 - Abstract: Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.
 - Keywords: Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

MANUSCRIPT SUBMISSION

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

TITLE PAGE

Title Page

The title page should include:

- # The name(s) of the author(s)
- # A concise and informative title
- # The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- # The e-mail address, and telephone number(s) of the corresponding author
- # If available, the 16-digit ORCID of the author(s)

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

TEXT

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- # Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- # Use italics for emphasis.
- # Use the automatic page numbering function to number the pages.
- # Do not use field functions.
- # Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- # Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- # Use the equation editor or MathType for equations.
- # Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

LaTeX macro package (zip, 182 kB)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data).

Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

SCIENTIFIC STYLE

Genus and species names should be in italics.

SCIENTIFIC STYLE

Please use the standard mathematical notation for formulae, symbols etc.:

Italic for single letters that denote mathematical constants, variables, and unknown quantities

Roman/upright for numerals, operators, and punctuation, and commonly defined functions or abbreviations, e.g., cos, det, e or exp, lim, log, max, min, sin, tan, d (for derivative)

Bold for vectors, tensors, and matrices.

REFERENCES

Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

The entries in the list should be numbered consecutively.

Journal article

Smith JJ. The world of science. *Am J Sci*. 1999;36:234–5.

Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL. Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. 2000; doi:10.1007/s001090000086

Book

Blenkinsopp A, Paxton P. Symptoms in the pharmacy: a guide to the management of common illness. 3rd ed. Oxford: Blackwell Science; 1998.

Book chapter

Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. In: Bourne GH, Danielli JF, Jeon KW, editors. *International review of cytology*. London: Academic; 1980. pp. 251–306.

Online document

Doe J. Title of subordinate document. In: *The dictionary of substances and their effects*. Royal Society of Chemistry. 1999. [http://www.rsc.org/dose/title of subordinate document](http://www.rsc.org/dose/title%20of%20subordinate%20document). Accessed 15 Jan 1999.

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

ISSN.org LTWA

If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

EndNote style (zip, 3 kB)

TABLES

- # All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- # Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- # For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- # Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- # Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

ARTWORK AND ILLUSTRATIONS GUIDELINES

Electronic Figure Submission

- # Supply all figures electronically.
- # Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- # For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- # Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- # Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art

- # Definition: Black and white graphic with no shading.
- # Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- # All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- # Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- # Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.

If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.

Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Color Art

Color art is free of charge for online publication.

If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.

If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.

Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- # To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- # Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- # Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- # Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- # Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

All figures are to be numbered using Arabic numerals.

Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.

Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).

If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures,

"A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- ✦ Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- ✦ Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- ✦ No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- ✦ Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- ✦ Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

Figures should be submitted separately from the text, if possible.

When preparing your figures, size figures to fit in the column width.

For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.

For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used. Before submitting research datasets as electronic supplementary material, authors should read the journal's Research data policy. We encourage research data to be archived in data repositories wherever possible.

Submission

Supply all supplementary material in standard file formats.

Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.

To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Text and Presentations

Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.

A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended. If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.

Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., “... as shown in the animation (Online Resource 3)”, “... additional data are given in Online Resource 4”.

Name the files consecutively, e.g. “ESM_3.mpg”, “ESM_4.pdf”.

ANEXO C

CURRICULUM VITAE**MSc. Anselmo Jiro Kamada****Formal Education**

- 2013 -** PhD Student in Genetics.
Federal University of Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Title: Role of BST-2/Tetherin immunogenetics in mother-to-child transmission of HIV-1 and AIDS progression.
Advisor: Sergio Crovella
Scholarship from: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Ministry of Education
- 2011 - 2012** Master's in Genetics.
Federal University of Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Title: Inflammasome immunogenetics and gene expression in monocyte-derived dendritic cells (Mo-DCs) during HIV-1 infection.
Advisor: Sergio Crovella
Scholarship from: Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco
- 2007 - 2010** Graduation in Biological Sciences.
Federal University of Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Title: β -Defensin 1 and NALP-3 receptor polymorphisms in susceptibility to Human T-Lymphotropic virus type 1 (HTLV-I)
Advisor: Sergio Crovella
Scholarship from: Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco

Languages

Brazilian Portuguese: Native language

English: High (reading), fair (speaking, writing) level. (TOEFL Certificate)

Japanese: Fair (Speaking), limited (reading, writing) level.

Peer-reviewed publications

1. COELHO, A. V. C. ; MOURA, RONALD ; KAMADA, ANSELMO JIRO ; SILVA, RONALDO ; GUIMARAES, R. L. ; BRANDAO, L. A. C. ; ARRAES, L. C. ; Crovella, S . Dendritic Cell-Based Immunotherapies to Fight HIV: How Far from a Success Story? A Systematic Review and Meta-Analysis. International Journal of Molecular Sciences (Online), v. 17, p. 1985, 2016.
2. KAMADA, ANSELMO JIRO, BIANCO, ANNA MONICA, ZUPIN, LUISA, Girardelli, Martina, MATTE, MARIA CRISTINA COTTA, MEDEIROS, RÚBIA MARÍLIA DE, ALMEIDA, SABRINA ESTEVES DE MATOS, ROCHA, MARINEIDE MELO, SEGAT, LUDOVICA, CHIES, JOSÉ ARTUR BOGO, KUHN, LOUISE, CROVELLA, SERGIO Protective role of BST2 polymorphisms in mother-to-child transmission of HIV-1 and adult AIDS progression.

Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999). v.72, p.1 - , 2016.

3. COELHO, ANTONIO, MOURA, RONALD, SILVA, RONALDO, KAMADA, ANSELMO, GUIMARAES, RAFAEL, BRANDAO, LUCAS, COELHO, HEMILIO, CROVELLA, SERGIO
Meta-Analysis and Time Series Modeling Allow a Systematic Review of Primary HIV-1 Drug-Resistant Prevalence in Latin America and Caribbean. Current HIV Research (Print). v.13, p.125 - 142, 2015.
4. KAMADA, ANSELMO JIRO, PONTILLO, ALESSANDRA, GUIMARÃES, RAFAEL LIMA, LOUREIRO, PAULA, Crovella, Sergio, BRANDÃO, LUCAS ANDRÉ CAVALCANTI
NLRP3 polymorphism is associated with protection against human T-lymphotropic virus 1 infection. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz (Impresso). v.109, p.960 - 963, 2014.
5. PONTILLO, ALESSANDRA, CARVALHO, MARCIA SCHNEIDER, KAMADA, ANSELMO J, MOURA, RONALD, SCHINDLER, HAIANA CHARIFKER, DUARTE, ALBERTO JS, CROVELLA, SERGIO
Susceptibility to M tuberculosis infection in HIV-positive patients is associated with CARD8 genetic variant. Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999)., v.63, p.147 - 151, 2013.
6. PONTILLO, ALESSANDRA, GIRARDELLI, MARTINA, KAMADA, ANSELMO J., PANCOTTO, JOAO A.T., DONADI, EDUARDO A., CROVELLA, SERGIO, SANDRIN-GARCIA, PAULA
Polymorphisms in Inflammasome Genes Are Involved in the Predisposition to Systemic Lupus Erythematosus. Autoimmunity. v.45, p.271 - 278, 2012.
7. PONTILLO, ALESSANDRA, OSHIRO, TELMA M., GIRARDELLI, MARTINA, KAMADA, ANSELMO J., CROVELLA, SERGIO, DUARTE, ALBERTO J. S.
Polymorphisms in Inflammasome Genes and Susceptibility to HIV-1 Infection. Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999). v.59, p.121 - 125, 2012.
8. SCHREIBER, R., CAMPOS-COELHO, A. V., BRANDÃO, L., GUIMARÃES, R. L., KAMADA, A. J., FERREIRA-SAE, M. C., MATOS-SOUZA, J. R., CIPOLLI, J. A., DE LIMA-FILHO, J. L., CROVELLA, S., NADRUZ, W.
Mannose-binding lectin (MBL2) polymorphisms and inflammation in hypertensive patients. International Journal of Immunogenetics (Print). v.38, p.525 - 527, 2011.

Technical skills (Work experience)

Molecular Biology:

Real time PCR (gene expression and SNP genotyping)(8 years), Gel electrophoresis (2 years), DNA/RNA extraction (8 years).

Immunology:

Human peripheral blood collection (4 years), monocyte-derived Dendritic cells based immunotherapy (3 years), ELISA (5 years), HIV-1 proliferation in heterologous cell culture (3 years), flow cytometry (1 year), Neutrophils – Phagocytosis/NETs protocols (6 months), Sepsis model (by cecal ligation puncture – CLP) in mice (2 months).

Complementary education

- 2015 Training with neutrophil extracellular traps formation under statin treatment in a mouse model. Trainee at Laboratory of Inflammation and Pain under supervision by PhD Fernando de Queiroz Cunha (2 months)
University of São Paulo - USP, Ribeirão Preto (SP), Brazil .
- 2014 Immunogenetic profile of *BST2* gene single nucleotide polymorphisms in adult patients with AIDS. Trainee at Immunogenetics Laboratory under supervision by PhD José Artur Bogo Chies (6 months)
Federal University of Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre (RS), Brazil.
- 2010-2011 Training with monocyte-derived dendritic cell pulsed with HIV-1 and *in vitro* proliferation of HIV-1 in heterologous cell culture . Trainee at Laboratory of Dermatology and Immunodeficiencies, LIM-56 under supervision by PhD Maria Notomi Sato and PhD Alessandra Pontillo (5 months).
University of São Paulo - USP, São Paulo (SP), Brazil.
- 2010 Continuing Education in XV Summer course in Genetics. (80 hours).
University of São Paulo - USP, Ribeirão Preto (SP), Brazil .

- 2010** Short Term Course in I Workshop in Technologic platforms. (4 hours).
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, CPQAM/FIOCRUZ, Brazil
- 2009** Continuing Education in II Winter Course in Genetics. (40 hours).
Federal University of Paraná, UFPR, Curitiba, Brazil.
- 2008** Short Term Course in 5º Biosafety course. (15 hours).
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, CPQAM/FIOCRUZ, Brazil.

Congress

1. CEZAR, NJB, LYRA, R, BALBINO, VQ, SILVA, RS, MARANHÃO, RMA, KAMADA, A. J., CAMPOS, A. V., MAURICIO-DA-SILVA, L
Detecção das mutações do gene TCF7L2 relacionadas com Diabetes Mellitus tipo II no distrito de Jericó, Triunfo, Pernambuco In: 55º Congresso Brasileiro de Genética, 2009, Águas de Lindóia.
Abstract from 55º Congresso Brasileiro de Genética. , 2009.
2. SERAFIM-SILVA, S. P., COELHO, A. V. C., KAMADA, A. J., Fonseca, A.M.S, CAVALVCANTI, C.A.J., CROVELLA, S., ARRAES, L. C.
HLA-G 3 -UTR HAPLOTYPES AND HIV VERTICAL TRANSMISSION IN BRAZILIAN CHILDREN In: VIII SIMPÓSIO DE PESQUISA EM AIDS - SIMPAIDS, 2009, Rio de Janeiro.
Abstract from VIII SIMPAIDS- AIDS Symposium. , 2009.
3. KAMADA, A. J., PONTILLO, A., CAMPOS, A. V., BRANDAO, L. A. C., GUIMARAES, R. L., ARAÚJO, J, CROVELLA, S.
NALP3 gene polymorphism involved in type 1 diabetes In: 55º Congresso Brasileiro de Genética, 2009, Águas de Lindóia.
Abstract from 55º Congresso Brasileiro de Genética. , 2009.
4. KAMADA, A. J., CAMPOS, A. V., BRANDAO, L. A. C., GUIMARAES, R. L., SOUZA, P. R. E., ARRAES, L. C., LIMA FILHO, J.L, SEGAT, L., CROVELLA, S.
POLIMORFISMOS DE GENES ANTIMICROBIANOS NA SUSCEPTIBILIDADE À TRANSMISSÃO VERTICAL DO HIV-1 In: II Curso de Inverno de Genética, 2009, Curitiba.
II Curso de Inverno de Genética - UFPR. , 2009.
5. CAMPOS, A. V., KAMADA, A. J., BRANDAO, L. A. C., GUIMARAES, R. L., LOUREIRO, P, SOUZA, P. R. E., CROVELLA, S., ARRAES, L. C.
Polimorfismos funcionais do gene MBL2 e susceptibilidade à infecção pelo HTLV-1 In: 55º Congresso Brasileiro de Genética, 2009, Águas de Lindóia.
Abstract from 54º Congresso Brasileiro de Genética. , 2008.
6. KAMADA, A. J., ANTUNES, M. M. C., SILVA, G. A. P., COELHO, A. V. C., CARVALHO, J. R. L., RODRIGUES, F. F., SILVA, S. S., ZANIN, V., BRANDAO, L. A. C., GUIMARAES, R. L., SOUZA, P. R. E., ARRAES, L. C., CROVELLA, S.
Associação de polimorfismos do gene MBL2 na susceptibilidade à doença celíaca In: 54º Congresso Brasileiro de Genética, 2008, Salvador-BA.
Resumos do 54º Congresso Brasileiro de Genética. , 2008.