

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

**LETÍCIA KOGACHI**

**Envolvimento de miosinas na infecção por HIV-1 de células  
mieloides**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências

São Paulo

2022

**LETÍCIA KOGACHI**

**Envolvimento de miosinas na infecção por HIV-1 de células mieloides**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Imunologia

Orietadora: Profa. Dra. Bruna Cunha de Alencar Bargieri

Versão parcial

São Paulo

2022

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Kogachi, Letícia

Envolvimento de miosinas na infecção por HIV-1 de células mieloides / Letícia Kogachi; orientadora Bruna Cunha de Alencar Bargieri. -- São Paulo, 2022. 87 p.

Dissertação (Mestrado) ) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Miosinas. 2. HIV-1. 3. Citoesqueleto de actina. 4. Células mieloides. I. Alencar Bargieri, Bruna Cunha de, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a):        Letícia Kogachi

Título da Dissertação/Tese: Envolvimento de miosinas na infecção por HIV-1 de células mieloides

Orientador: Bruna Cunha de Alencar Bargieri

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

**Aprovado(a)**

**Reprovado(a)**

Examinador(a):        Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):        Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):        Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente:             Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....



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

## CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **964/2018** referente ao projeto intitulado: "**Envolvimento de miosinas na infecção por HIV-1 em macrófagos**" sob a responsabilidade de **Letícia Kogashi** e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **Bruna Cunha de Alencar Bargieri**, do Departamento de Imunologia, foi analisado pela **CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais e pelo **CEPSH** - Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466/2012.

São Paulo, 20 de junho de 2018.

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**  
Coordenadora CEUA ICB/USP

Profa. Dra. **Camila Squarzonni Dale**  
Coordenadora CEPSH ICB/USP

À minha mãe,

Tudo começa, termina e volta no seu amor.

## **Agradecimentos**

À Prof. Dr. Bruna Cunha de Alencar Bargieri, pela excelente orientação, que aos trancos e barrancos resultou em um trabalho que mesmo incompleto (por enquanto), me dá orgulho. Mas mais profundamente, gostaria de agradecer pela paciência, compreensão e mentoria. Esses anos não foram fáceis ou, no geral, particularmente agradáveis, mas os carregarei para sempre com carinho pela experiência e aprendizado que você proporcionou.

À Taís Matozo, que esteve do meu lado (e cujo lado eu espero ter estado) por todo esse processo. Esse trabalho (e possivelmente o laboratório todo) estaria perdido sem você. Mais do que uma excepcional cientista e colega de trabalho, uma verdadeira amiga. Tem sido um prazer testemunhar seu crescimento, tanto científico quanto pessoal, e espero que a recíproca seja verdadeira.

Ao Caio Loureiro Salgado. Sou mais feliz e triste, apaixonada e desiludida, satisfeita e incomodada, apaziguada e preocupada, enfim, mais viva, com você ao meu lado. Obrigada por todo apoio que você é tão disposto a oferecer, mas relutante em receber. Espero ser um conforto tão grande para você quanto você é para mim.

Às meninas (atuais e passadas) do Laboratório de Biologia Celular do Sistema Imune, Tania Carolina Braga dos Reis, Vitória Pereira da Silva, Maria Clara Martins, Bárbara Armellini. Compartilhar essa experiência com vocês a tornou mais leve.

Aos amigos que fiz no departamento da Imunologia do ICB, Marina, Bárbara, Luísa, Carol, Carlinha, Nágela, Lílian, Marília, Tiago, Nayara, Vinícius, Fernanda, Jaíne, Edi, Dhemerson, Eliza, Isa, Esterzinha, Nath, Anna J, Anna C. As paredes físicas não são páreas para o companheirismo, ajuda e (leve) folga que temos uns com os outros.

À FAPESP, pelo apoio financeiro no projeto geral do laboratório (nº 2014/23225-0).

À CAPES, pelo suporte financeiro nesse projeto de junho de 2018 a março de 2019.

À CNPq, pelo suporte financeiro nesse projeto de abril de 2019 a maio de 2020 (Processo nº 133243/2019-2).

Aos médicos e enfermeiras do Hospital Oswaldo Cruz.

Aos funcionários do ICB, o dia-a-dia no instituto não seria o mesmo sem vocês. Em particular Delman, Jucelino e Ailton da portaria, e Maria Eni da secretaria. Obrigada por irem além.

Ao ICB e à USP, pelo suporte de infraestrutura.

Aos meus amigos da graduação, Hirata, Vinícius, Migotto, Cath, Nadine, Camis, Nandy, Naudron, Flávio, Tiago. A nossa presença na vida um do outro atualmente varia de alguns dos meus amigos mais próximos, a outros que eu nem sei onde estão, mas nessa conclusão de fase, eu me sinto muito grata a quem estava lá no começo.

E em se tratando de começo, à Vivian, Giulia, Fernanda, Juliana, Ono, Rick, Marcos, Suzuki, Hatada, Christie. Meus amigos da escola, que viraram meus amigos da vida, e que atualmente são sinônimos de família para mim.

Aos incríveis professores que eu tive durante a minha vida, em particular o prof. Fernando, a prof. Virgínia, o prof. Durval, a prof. Maria Alice, a prof. Anita e a prof. Claudia do Ensino Médio. Vocês estabeleceram o padrão com quem eu comparo todos os educadores com quem me deparo. Eu sinto que vocês moldaram muito de como eu vejo o mundo e foram fundamentais para amadurecer alguns dos meus melhores aspectos. Eu não sou nada se não gratidão por vocês na minha vida.

E por último e mais importante, à minha mãe, Lu Hsiu Joan. Sem você, nada disso seria possível. Sou eternamente grata, por tudo. Você me demonstra sucessivamente o significado de amor incondicional. Quando eu era pequena, queria ser exatamente igual a você. Para mim, você era perfeita, o melhor exemplo. Hoje eu sou mais alta que você e te provooco por isso. Mas a idade (e a altura) só me permitiram te enxergar melhor como pessoa, em toda sua profundidade. Não tenho mais uma visão idealizada sua, mas isso só aumentou a minha admiração. Continuo tentando ser que nem você, e isso faz de mim uma pessoa melhor. Espero que este trabalho (e eu) te dê orgulho. Te amo.



“The past places no absolute limit on the future.”

Lin-Manuel Miranda e Jeremy McCarter

## Resumo

KOGACHI L. Envolvimento de miosinas na infecção por HIV-1 de células mielóides [dissertação (Mestrado em Imunologia)] – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2022.

O citoesqueleto é composto por 3 famílias de filamentos: actina, microtúbulos e filamentos intermediários, junto com suas proteínas acessórias e de regulação. Miosinas são uma superfamília de proteínas motoras responsáveis pelo movimento actina-dependente, e pouco se sabe sobre a função da grande maioria delas. O HIV é capaz de infectar diversos tipos de células do sistema imune, contanto que elas expressem seu receptor e um de seus correceptores. Foi demonstrado que para completar seu ciclo de infecção, o HIV-1 depende e modula o citoesqueleto em diversos momentos. Entretanto, pouco se sabe sobre o papel de miosinas (principalmente as não-convencionais) na infecção de células mielóides pelo HIV. Neste trabalho, observamos a expressão de 9 tipos de miosina em U937, uma linhagem monocítica. Utilizando shRNA, silenciámos 6 das 9 miosinas até o momento, e as infectamos com um HIV pseudotipado com VSV-G. Quatro das miosinas, IC, IF, X e XVIII A, não apresentaram efeito nos nossos ensaios. Já o silenciamento da miosina IG levou a um aumento na porcentagem de células infectadas, e a proteína colocalizou com o HIV-1 em imunofluorescências de macrófagos derivados de monócitos. O silenciamento da miosina IXB levou a um aumento significativo na fusão viral, na porcentagem de células infectadas e na quantidade de novas partículas virais liberadas. Nossos dados sugerem que mais de uma etapa da infecção, além da fusão viral, são afetadas pelo silenciamento da MyoIXB. O silenciamento dessa miosina levou a alterações no citoesqueleto de actina da célula e no estado de ativação da via da Rho GTPase. O silenciamento da MyoIXB em outros tipos celulares induziu um aumento discreto na porcentagem de células infectadas. Até o momento, o nosso trabalho parece indicar uma possível função protetora das miosinas IG e IXB contra a infecção pelo HIV-1.

**Palavras-chave:** Miosinas. HIV-1. Citoesqueleto de actina. Células mielóides.

## **Abstract**

KOGACHI L. Myosin involvement in HIV-1 infection of myeloid cells [dissertation (Master thesis in Immunology)] – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2022.

The cytoskeleton is made up of 3 filament families: actin, microtubules and intermediate filaments, as well as their accessory and regulatory proteins. Myosins are a superfamily of motor proteins, responsible for actin-dependent movement and little is known about the role of most of them. HIV is able to infect several types of the immune system cells, as long as they express its receptor and one of its coreceptors. It was shown that in order to complete its infection cycle, HIV-1 relies on and modulates the cytoskeleton at several steps. However, the role of myosins (particularly unconventional ones) in HIV infection of myeloid cells is underinvestigated. In this thesis we have reported the expression of 9 myosins in U937, a monocytic cell line. Using shRNA, we have silenced 6 out of the 9 myosins so far and we have infected with an HIV pseudotyped with VSV-G. Four of them, myosins IC, IF, X and XVIIIA, did not have any effect on our assays. Silencing of myosin IG, on the other hand, lead to an increase in the percentage of infected cells, and the protein colocalized with HIV-1 in immunofluorescence images of monocyte derived macrophages. Silencing of myosin IXB lead to a significant increase in virus fusion, in the percentage of infected cells and in the release of newly produced virus particles. Our data suggests that more than one step of the infection, besides fusion, are affected by myosin IXB silencing. Myosin IXB knockdown has resulted in alterations in the actin cytoskeleton and the activation status of the Rho GTPase pathway. When silenced, other cell types had a discreet increase in the percentage of infected cells. So far, our work seems to indicate that myosins IG and IXB may have a protective role against HIV-1 infection.

**Keywords:** Myosins. HIV-1. Actin cytoskeleton. Myeloid cells.

## Lista de Abreviaturas

ADF	<i>Actin Depolymerizing Factor</i>
ADP	Adenosina Difosfato
AIDS	Síndrome Da Imunodeficiência Humana
ARP	<i>Actin Related-Proteins</i>
ATP	Adenosina Trifosfato
AZT	Azidotimidina
BlaM	Enzima Beta Lactamase
CBA	<i>Cytometry Bead Assay</i>
CCR5	C-C receptor de quimiocina tipo 5
cDNA	DNA complementar
Ct	<i>Threshold Cycles</i>
CXCR4	C-X-C Receptor De Quimiocina Tipo 4
DCs	Células Dendríticas
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNM2	Dinamina 2
ELISA	Ensaio De Imunoabsorção Enzimática
ERM	Ezrina, radixina, moesina
ESCRT	<i>Endosomal Sorting Complexes Required For Transport</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i>
GAP	<i>Guanine Activating Proteins</i>
GDI	<i>Guanine Dissociation Inhibitors</i>
GDP	Guanina Difosfato
GEF	<i>Guanine Exchange Factor</i>
GTP	Guanina Trifosfato
HAART	Terapia Antiviral De Alta Atividade
HIV-1	Vírus da Imunodeficiência Humana 1
IPMCs	Compartimentos Intracelulares Conectados À Membrana Plasmática
ISGs	Genes Estimulados Por Interferon
KD	<i>Knockdown</i>
KIF	<i>Kinesin Superfamily Protein</i>
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LIMK	<i>LIM Kinase</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
LRS	<i>Leukocyte Reduction System</i>
MDDC	Células Dendríticas Derivados de Monócitos
mDia	<i>Mammalian Diaphanous Formin Family</i>
MDM	Macrófagos Derivados De Monócitos
MFI	Mediana De Intensidade De Fluorescência
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i>
mRNA	RNA Mensageiro
MYO	Miosina
NI	Não infectada
NM	Não Marcado
NT	Não Tratado
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PCR	Reação Em Cadeia Da Polimerase
PEI	Polietilenoimina

PIC	Complexo De Pré-Integração
PMA	<i>Phorbol Myristate Acetate</i>
PVDF	Fluoreto De Polivinilideno
qPCR	PCR Quantitativo
RhoA	Ras Homolog Family Member A
RNA	Ácido Ribonucleico
ROCK	Rho-Associated Protein Kinase
shRNA	<i>Short-Hairpin RNA</i>
SSC	<i>Side Scatter</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNF-alpha	<i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>
VCCs	Compartimentos Contendo Vírus
WASP	<i>Wiskott–Aldrich Syndrome Protein</i>
WAVE	WASP-Family Verprolin-Homologous Protein
WB	<i>Western Blotting</i>
WT	<i>Wild Type</i>

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	15
1.1 Citoesqueleto .....	15
1.1.1 Proteínas acessórias do citoesqueleto de actina.....	17
1.1.2 Sinalização Rho/Rac/cdc42 e controle da dinâmica do citoesqueleto de actina	18
1.2 Miosinas.....	20
1.2.1 Miosinas em células mieloides.....	22
1.3 HIV-1.....	24
1.3.1 O citoesqueleto durante a infecção pelo HIV – fase inicial.....	26
1.3.2 O citoesqueleto durante a infecção pelo HIV – fase tardia.....	30
1.3.3 O citoesqueleto na transmissão do HIV entre células.....	31
1.3.4 O citoesqueleto na infecção por HIV de outros tipos celulares .....	32
1.4 Justificativa .....	34
2 OBJETIVOS .....	35
2.1 Objetivos específicos.....	35
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.1 Células.....	36
3.1.1 Linhagens e cultivo.....	36
3.1.2 Ativação de U937 com PMA .....	37
3.1.3 Tratamento de U937 com Y-27632 ou BMS-3 .....	37
3.1.4 Diferenciação de Macrófagos e Células Dendríticas Derivados de Monócitos (MDMs e MDDCs).....	37
3.2 Plasmídeos .....	38
3.3 Produção lentiviral .....	39
3.4 Transdução com o vetor lentiviral .....	39
3.5 PCR quantitativo (qPCR) .....	40
3.6 Infecção .....	41
3.7 Ensaio de viabilidade Cell TiterGLo .....	42
3.8 Ensaio de fusão .....	42
3.9 Citometria de fluxo de células.....	43
3.10 CBA ( <i>Cytometry Bead Assay</i> ) para p24.....	43
3.11 Western Blot .....	44
3.12 Imunofluorescência e Microscopia.....	45
3.13 Análise estatística .....	45

6 CONCLUSÕES: .....	47
REFERÊNCIAS .....	48

# 1 INTRODUÇÃO

O citoesqueleto é um importante mediador de processos celulares. Ele é composto por diversas proteínas que estabelecem um balanço dinâmico entre ativadas e inativadas para realizar suas funções. Processos de infecção, principalmente por patógenos intracelulares, frequentemente perturbam esse equilíbrio em seu favor. O HIV (vírus da imunodeficiência humana) é um dos vírus mais estudados atualmente. Em diversos estudos ele é apontado como um modulador dessa dinâmica. Não obstante, existem diversas lacunas na nossa compreensão da relação do HIV e do citoesqueleto.

## 1.1 Citoesqueleto

O citoesqueleto é responsável por inúmeras funções imprescindíveis para a vida celular, incluindo manutenção do formato das células, pela sua dinâmica organização intracelular, locomoção, interações célula-célula e célula-ambiente. Para cumprir essas funções, o citoesqueleto é composto por 3 famílias de filamentos de proteínas: actina, microtúbulos e filamentos intermediários. Esses filamentos são formados através da polimerização de monômeros respectivos a cada uma das famílias. Uma variedade de fatores controla a dinâmica do citoesqueleto e suas funções; desde a concentração de monômeros livres, a cascatas de sinalização e proteínas acessórias, até interações entre as diferentes famílias (ALBERTS et al., 2017; PIMM; HENTY-RIDILLA, 2021; VAN BODEGRAVEN; ETIENNE-MANNEVILLE, 2020).

Microtúbulos são estruturas rígidas e tubulares que ajudam a definir o formato celular, participam do transporte intracelular, e formam o fuso mitótico, cílios e flagelos. São formados por protofilamentos compostos de diversos heterodímeros de  $\alpha$  e  $\beta$ -tubulina, ligados na mesma conformação cabeça-cauda. Dessa forma, os microtúbulos são polarizados, e a extremidade (+)  $\beta$  cresce mais rapidamente do que a (-)  $\alpha$ . Cada subunidade do heterodímero é associada à sua própria molécula de GTP, mas somente a  $\beta$ -tubulina hidrolisa o nucleotídeo durante a polimerização. Os



microtúbulos não começam a polimerizar espontaneamente e em seus filamentos se observa o fenômeno de instabilidade dinâmica, onde as extremidades dos filamentos transitam aleatoriamente entre diminuindo (catástrofe) e crescendo (resgate). Por isso microtúbulos dependem de diversas proteínas acessórias para regular sua organização intracelular. (revisado por ALBERTS et al, 2017; GOODSON; JONASSON, 2018).

Os filamentos intermediários abrangem famílias de proteínas bastante diversas e com funções e localizações distintas, compondo o envelope nuclear, queratina em células epiteliais, neurofilamentos em axônios e outros. Todos os filamentos intermediários possuem domínios cabeça (N-terminal) e cauda (C-terminal) variados, mais um domínio central conservado  $\alpha$ -hélice, que é o sítio de ligação das proteínas para formação de dímeros. Dois dímeros se associam para formação de protofilamentos apolares, que por sua vez se alinham formando uma unidade do filamento intermediário. A ligação das unidades resulta em filamentos bastante flexíveis, porém resistentes, que auxiliam a célula a manter seu formato e se locomover, ao mesmo tempo que proporcionam resistência a estresses mecânicos. Os filamentos intermediários não se associam a nucleotídeos e sua polimerização e despolimerização é influenciada pela fosforilação de suas proteínas, que altera a carga elétrica dos domínios cabeça ou cauda, tornando-as mais solúveis ou estabilizando-as (revisado por ALBERTS et al, 2017; NISHIMURA; KASAHARA; INAGAKI, 2019).

O citoesqueleto de actina é fundamental para o estabelecimento do formato da célula e para sua locomoção, mas também participa ativamente da divisão celular. Os filamentos helicoidais de actina (actina F) são compostos por subunidades denominadas actina globular ou actina G. A dinâmica de polimerização e despolimerização dos filamentos depende da disponibilidade de monômeros e da ação e competição de diversas proteínas de ligação à actina (BURKE et al., 2014; JEGOU; ROMET-LEMONNE, 2019).

O começo da polimerização de um filamento de actina, chamado nucleação, é lento devido à alta instabilidade dos dímeros, que diminui significativamente quando passam ao formato de trímeros. Quando um trímero é formado, ele age como um núcleo onde outros monômeros se associam com mais facilidade, resultando em um

aumento da progressão de alongamento do filamento, até que se atinja um platô no qual a taxa de polimerização e despolimerização são equivalentes (WEGNER; ENGEL, 1975).

A Actina G é assimétrica, e as subunidades se associam sempre na mesma direção, formando um filamento polarizado, onde a extremidade (+) (também chamada de pena - barbed) alonga até 10 vezes mais rápido do que a extremidade (-) (também chamada de ponta - arrow) devido a interações eletrostáticas (SEPT; ELCOCK; McCAMMON, 1999). A actina globular também é associada a uma molécula de ATP (adenosina trifosfato), que é hidrolisada mais rapidamente após a polimerização. A actina-ADP (adenosina difosfato) resultante apresenta uma taxa de dissociação maior do que a actina-ATP (HOLMES et al., 1990; POLLARD, 1986). Quando a concentração de monômeros livres é intermediária entre a concentração crítica (concentração de monômeros onde a associação de novas subunidades é igual a desassociação) da actina-ATP e a concentração crítica da actina-ADP, esses fatores acabam levando a um efeito chamado rolamento (treadmilling), onde a extremidade (+) tem uma adição de monômeros ATP na mesma taxa que a extremidade (-) tem uma perda de monômeros ADP, e o comprimento do filamento permanece o mesmo, porém cada monômero se desloca continuamente, como em uma esteira rolante. Esse fenômeno é fundamental para os movimentos gerados pelo citoesqueleto de actina (NEUHAUS et al., 1983; PANTALONI; CLAINCHE; CARLIER, 2001).

### **1.1.1 Proteínas acessórias do citoesqueleto de actina**

Diversas proteínas acessórias influenciam a dinâmica do citoesqueleto (WINDER; AYSCOUGH, 2005). Algumas se ligam aos monômeros de actina, regulando sua disponibilidade e habilidade de se associar aos filamentos. Timosinas, por exemplo, sequestram a actina globular e impedem sua polimerização, mas ao mesmo tempo garantem que haja um reservatório de actina G disponível (SUN; YIN, 2007). Profilinas competem com as timosinas pela actina globular, mas ao contrário delas não impedem a adição dos monômeros à extremidade (+) dos filamentos. Embora a ligação de profilinas à actina G iniba a nucleação, sua presença acelera a rotatividade de filamentos de actina pois catalisa a troca do ADP para ATP de

subunidades que se dissociam dos filamentos (BLANCHOIN; POLLARD, 1998; PANTALONI; CARLIER, 1993; POLLARD; BLANCHOIN; MULLINS, 2000). Existem também proteínas acessórias que agem facilitando a nucleação. Forminas são tipos de proteínas que medeiam a nucleação de filamentos e, na presença de complexos de profilina-actina G, catalisam a adição de novas unidades ao filamento significativamente mais rápido do que a polimerização de monômeros livres (KOVAR et al., 2006). Já o complexo protéico Arp2/3 apresenta a habilidade de se ligar às laterais de filamentos já formados, e quando ativado promove a nucleação, gerando ramificações a partir do filamento mãe (POLLARD, 2007).

Proteínas de capeamento são capazes de se ligar a extremidades dos filamentos de actina, aumentando sua estabilidade ao diminuir sua despolimerização e impedir o acréscimo de novas subunidades (EDWARDS et al., 2014). Outras proteínas, como as tropomiosinas, estabilizam filamentos de actina se associando ao longo da sua lateral. Isso é fundamental para filamentos de actina de longa duração, como os presentes em células musculares ou em fibras de estresse (MANSTEIN et al., 2020). Uma consequência da ligação de proteínas estabilizadoras é que elas dificultam ou até mesmo impedem a ligação de proteínas de clivagem, que catalisam a quebra de ligações no mesmo; como as proteínas da família gelsolina, que se ligam a filamentos de actina e os partem em pedaços menores, capeando a extremidade (+) (HARRIS; WEEDS, 1984; HEIDINGS et al., 2020); e as proteínas ADF(*actin depolymerizing factor*)/cofilina, que se ligam lateralmente aos filamentos de actina e catalisam a quebra do lado (-) do ponto onde se associaram, liberando os fragmentos resultantes (TANAKA et al., 2018).

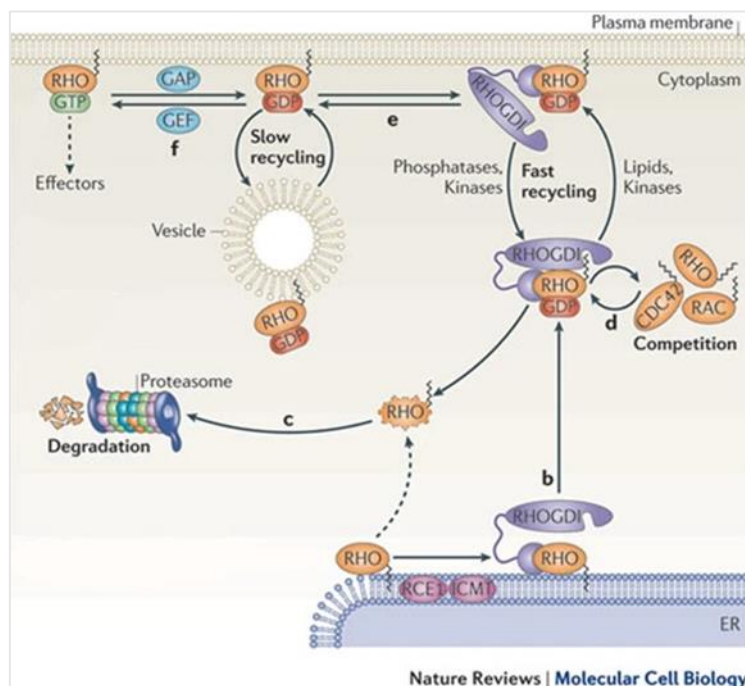
Proteínas acessórias também auxiliam na formação de estruturas mais complexas de filamentos de actina, ligando-os paralelamente (como fimbrinas e  $\alpha$ -actininas), ou em teias/géis, como as filaminas. Outras ainda servem para ancorar os filamentos na membrana plasmática, como é o caso das proteínas da família ERM (ezrina, radixina e moesina) (BLANCHOIN et al., 2014).

### **1.1.2 Sinalização Rho/Rac/cdc42 e controle da dinâmica do citoesqueleto de actina**

A sinalização celular controla a dinâmica do citoesqueleto, determinando se as proteínas acessórias necessárias para a polimerização e despolimerização estão ativadas ou não. GTPases da família Rho (*Ras homolog*) são um dos principais reguladores das dinâmicas do citoesqueleto; suas principais proteínas, RhoA, Rac1 e Cdc42 ciclam entre ativadas (quando associadas a GTP – guanina trifosfato) e desativadas (com GDP – guanina difosfato), controlando uma cascata de sinalização que traduz estímulos em rearranjos do citoesqueleto (HALL, 1998; TAKAI et al., 1995).

Rho GTPases normalmente se encontram associadas à membrana plasmática, e são ativadas por RhoGEFs (*guanine nucleotide exchange factors*), que estimulam a troca de GDP por GTP, e desativadas por RhoGAPs (*GTPase activating protein*), que facilitam a hidrólise do nucleotídeo. Existem ainda RhoGDIs (*guanine dissociation inhibitors*), que se ligam à forma inativa associada à GDP e a mantém nesse estado, mas também a extraem da membrana plasmática e a mantêm no citosol, fora do alcance de RhoGEFs (**Figura 1**) (MØLLER; KLIP; SYLOW, 2019).

**Figura 1 - Regulação da Rho por RhoGEFs, RhoGAPs e RhoGDIs**

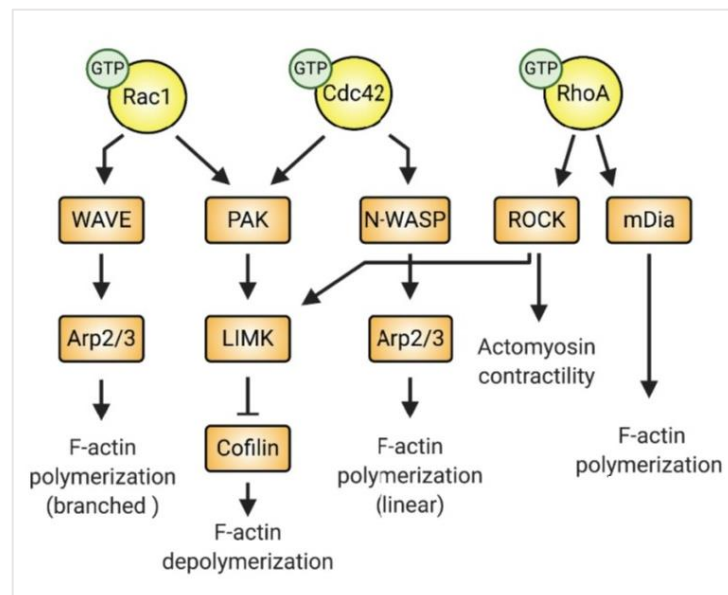


Adaptado de Garcia-Mata, Boulter e Burrige, Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2011.

No contexto do citoesqueleto de actina, tanto Rac1 quanto Cdc42 são capazes de ativar proteínas das famílias WAVE (*WASP-Family Verprolin-Homologous Protein*) e WASP (*Wiskott–Aldrich Syndrome Protein*), respectivamente, que por sua vez ativam Arp2/3, promovendo nucleação e ramificação do citoesqueleto de actina.

Também ativam uma cascata de quinases que resulta na inativação de cofilinas através da fosforilação por LIMK (LIM quinase), impedindo sua ação de clivagem. Já a RhoA (*Ras Homolog Family Member A*) é capaz de ativar diretamente a formina mDia (*mammalian diaphanous formin family*), promovendo nucleação e alongamento dos filamentos de actina. Por meio da ativação de ROCK (*Rho-associated protein kinase*), RhoA também fosforila LIMK (o que leva à fosforilação e consequente inativação de cofilinas) e a fosfatase da cadeia leve de miosina, inativando-a (o que resulta em maior fosforilação da cadeia leve de miosinas, culminando na maior formação de complexos de actomiosina (**Figura 2**) (JAFFE; HALL, 2005; BROS et al., 2019).

**Figura 2 - Sinalização por Rho GTPases regulam o citoesqueleto de actina**



Adaptado de Duman et al., Small GTPases, 2021.

Os diversos membros dessas cascatas de sinalização que também podem ser ativados ou desativados permitem uma regulação muito fina das alterações geradas mediante a quaisquer estímulos, o que é necessário para a realização das inúmeras funções do citoesqueleto de actina a partir do pool de monômeros disponível na célula.

## 1.2 Miosinas

As miosinas são uma superfamília de proteínas motoras responsáveis pelo movimento actina-dependente através da hidrólise de ATP. São responsáveis pela contração de filamentos de actina em células musculares, pela formação de fibras de tração (que sustentam mecanicamente a célula); do anel contrátil que participa da fase final do ciclo celular, auxiliando na citocinese; pela organização intracelular (incluindo a formação de protuberâncias como microvilosidades, estereocílios e cálice fagocítico); pelo transporte e distribuição de organelas; participam da endocitose; e possivelmente apresentam muitas outras funções, já que o papel da maioria das miosinas ainda não foi bem elucidado (revisado por ALBERTS et al., 2017).

As miosinas são compostas por cadeias pesadas que se dividem em três domínios: “a cabeça”, um domínio globular motor N-terminal, que se liga à rede de actina e ao ATP e que é capaz de hidrolisá-lo, utilizando a energia proveniente para gerar movimento; “o pescoço”, que serve como domínio regulatório onde se ligam as cadeias leves de miosina (proteínas da família calmodulina); e a “cauda”, domínio C-terminal que se divide em proximal (em espiral, que medeia a dimerização da cadeia pesada) e distal (onde se liga a molécula-alvo) (**Figura 3**) (KNEUSSEL; WAGNER, 2013; ALBERTS et al., 2017).

**Figura 3 - Representação da sequência de domínios estruturais da cadeia pesada da miosina Va**

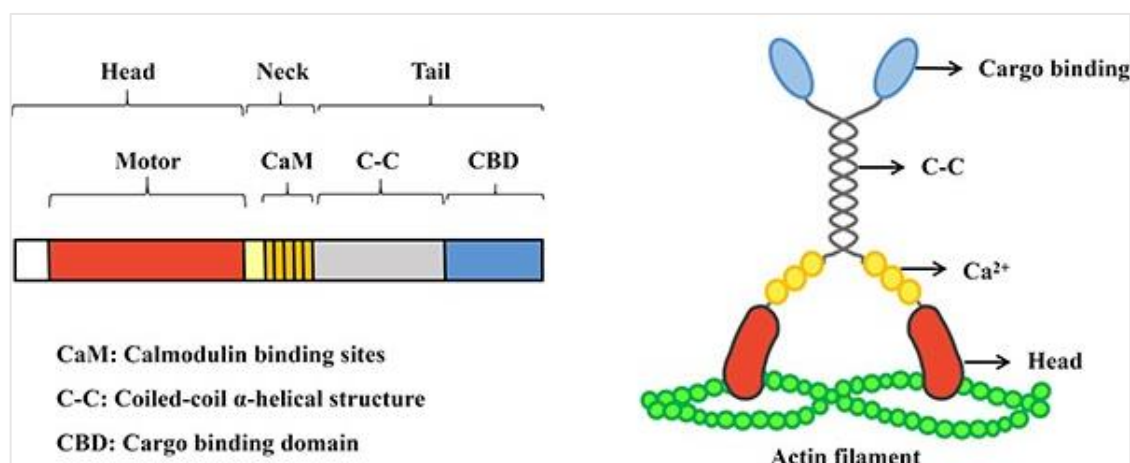


Figura 3. O domínio motor é mostrado em vermelho, o domínio regulatório (pescoço) está em amarelo e o domínio caudal, subdividido em regiões proximal e distal estão indicados em cinza e azul, respectivamente, com o filamento de actina mostrado em verde. Adaptado de Li et al., *Oncotarget*, 2017.

A cabeça da miosina sem um nucleotídeo apresenta uma grande afinidade aos filamentos de actina, que é diminuída após uma mudança conformacional gerada pela

ligação com ATP, promovendo sua desassociação. A hidrólise da molécula gera a energia necessária para uma mudança de conformação na miosina que resulta na “braçada de recuperação” (*recovery stroke*), onde a cabeça (agora associada a ADP e um fosfato inorgânico - Pi) e o pescoço da miosina se deslocam como uma alavanca. A miosina associada a ADP + Pi volta a apresentar afinidade aumentada ao filamento e a ligação da cabeça à actina libera o fosfato, revertendo a mudança conformacional de volta a original e aumento ainda maior da afinidade, na “braçada forte” (*power stroke*). A volta da conformação original libera a molécula de ADP, restando apenas a miosina ligada ao filamento, recomeçando o ciclo (KODERA; ANDO, 2014).

A miosina mais notoriamente conhecida é a tipo II (cujos estudos são facilitados pela existência de um inibidor específico, a blebistatina), que medeia a contração muscular, mas existem pelo menos 37 famílias distintas dentro da superfamília das miosinas, com aproximadamente 40 genes de miosinas encontrados no genoma humano (KNEUSSEL; WAGNER, 2013). As funções dessas miosinas não-convencionais são muito menos conhecidas.

### 1.2.1 Miosinas em células mielóides

Em células mielóides de camundongos, observou-se a expressão de 11 genes de miosinas: *MYO1C*, *MYO1E*, *MYO1F*, *MYO1G*, *MYH9* (miosina tipo II), *MYO5A*, *MYO7A*, *MYO9A*, *MYO9B*, *MYO10* e *MYO18A* (MARAVILLAS-MONTERO; SANTOS-ARGUMEDO, 2012). A expressão de miosinas em humanos foi averiguada somente por Maliga e colaboradores (2013). Em monócitos primários obtidos de PBMCs, o trabalho descreveu a expressão de *MYO1C*, *MYO1E*, *MYO1F*, *MYO1G*, *MYH9*, *MYH10*, *MYH14*, *MYO3A*, *MYO5A*, *MYO6*, *MYO7A*, *MYO7B*, *MYO9A*, *MYO9B*, *MYO10*, *MYO18A* e *MYO19*.

As miosinas tipo I se dividem em 8 genes e suas correspondentes proteínas miosinas IA-H em humanos, que são diferencialmente expressas nos diversos tecidos. As miosinas dessa família se concentram na membrana plasmática e ao redor de organelas, e participam da regulação da tensão da membrana, da adesão celular, da dinâmica dos filamentos de actina, do tráfico intracelular, do ancoramento de proteínas

e filamentos de actina à membrana e das deformações de membrana (revisado por MCINTOSH; OSTAP, 2016).

As miosinas tipo II, junto com os filamentos de actina, compõem as principais proteínas contráteis dos tecidos musculares. Em mamíferos, existem três classes da miosina tipo II que não participam da contração, denominadas miosinas II não musculares (Non-muscle myosins II - NM II). As classes são determinadas pelo gene da cadeia pesada *MYH9*, *MYH10* e *MYH14*, que resultam nas classes NM IIA, NM IIB e NM IIC, respectivamente. As NM II regulam a formação de protusões denominadas lamellum (localizadas logo atrás do lamelipódio, que participam da migração celular), determinam a polaridade da célula em migração, participam da adesão mediada por integrina e regulam adesão, polarização e morfogênese de células epiteliais (revisado por VICENTE-MANZANARES et al, 2009).

As miosinas tipo V em humanos se dividem em três classes, miosinas VA-C, com expressão diferenciada nos diversos tecidos. São motores processadores com o domínio “pescoço” mais comprido, o que permite que deem vários “passos” mais longos antes de se desassociarem dos filamentos de actina, sendo assim ótimos transportadores de organelas, vesículas secretadas, carga membranosa, mRNA (RNA mensageiro), lipídeos e vesículas proteicas (revisado por TRYBUS, 2008).

As miosinas tipo VII em vertebrados se apresentam em duas classes, miosinas VIIA e B, que possivelmente participam tanto da geração de tensão, especialmente na membrana plasmática, quanto da movimentação de carga, dependendo da concentração de ATP disponível (revisado por EL-AMRAOUI; BAHLOUL; PETIT, 2008).

As miosinas tipo IX se dividem em duas classes em vertebrados, a miosina IXA e B, que são expressas diferencialmente, sendo que a miosina IXA se concentra principalmente no cérebro e a IXB nas células hematopoiéticas. As miosinas tipo IX apresentam uma região RhoGAP no domínio caudal, que se liga à proteína Rho de modo fraco e transiente. Isso sugere que essas miosinas tenham uma função de feedback no controle da organização da actina. Isso condiz com a observação de que a miosina IXB se acumula em regiões de alto turnover de filamentos de actina, como filopódios e lamelipódios (revisado por BÄHLER, 2008).



As miosinas tipo X são ubiquamente expressas nos tecidos de vertebrados, localizando-se principalmente em locais de reorganização dinâmica de actina, como a ponta de filopódios e as beiradas de lamelipódios. Participam da formação, extensão de filopódios e do sensoramento realizado por esses. São capazes de se movimentar em maços de filamentos de actina, trocando de filamentos adjacentes uns aos outros, e de juntar filamentos de actina na periferia celular (SUN et al, 2010).

As miosinas tipo XVIII apresentam duas classes, A e B, sendo que a A apresenta duas isoformas,  $\alpha$  e  $\beta$ . A isoforma  $\alpha$  apresenta um domínio KE e um domínio PDZ, que podem participar em ligação a microtúbulos e interações proteína-proteína. A regulação da expressão entre isoformas pode ser importante para a diferenciação de macrófagos (MARAVILLAS-MONTERO e SANTOS-ARGUMEDO, 2012).

Além disso, as miosinas I, II, V, X e XVIII também estão presentes no núcleo, assim como a actina, onde regulam a cromatina, modulam RNA (ácido ribonucleico) polimerase e participam do metabolismo de complexos ribonucleo-proteicos. As miosinas nucleares tipo I são mais bem estudadas e participam na compartimentalização funcional do núcleo, medeiam movimentação dos cromossomos, regulam a cromatina e estão acopladas a RNA polimerases I e II (revisado por DE LANEROLLE, 2012; SARSHAD; PERCIPALLE, 2014).

Patógenos intracelulares como vírus aproveitam processos fisiológicos da célula para completar seu ciclo de infecção. Muitos o fazem através da cooptação do citoesqueleto, até interferindo com a regulação da dinâmica do mesmo para benefício próprio. Neste trabalho estudamos a relação do vírus da imunodeficiência humana, o HIV, com o citoesqueleto – e particularmente, com miosinas.

### **1.3 HIV-1**

Estima-se que, desde o início da sua epidemia, o HIV-1 tenha infectado cerca de 79,3 milhões de pessoas ao redor do mundo. Em 2020, aproximadamente 37,7 milhões de pessoas estavam vivendo com o vírus, dentre as quais 1,5 milhões representavam novas infecções (JOINT UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS, 2021). No Brasil em 2020 foram diagnosticadas 32,7 mil novas infecções

por HIV e reportados aproximadamente 10,4 mil óbitos por doenças relacionadas à AIDS (síndrome da imunodeficiência adquirida). Embora seja reportado uma diminuição geral dos casos de AIDS pelo país, é importante lembrar que existe um problema de subnotificação de casos, devido à dificuldade de acesso aos sistemas de saúde, que foi exacerbado nesses últimos anos de pandemia da COVID-19 (MINISTÉRIO DA SAÚDE - Secretaria de Vigilância em Saúde - Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/Aids e das Hepatites Virais, 2021).

O HIV-1 infecta células do sistema imunológico, induzindo sua depleção e uma consequente deficiência desse sistema. Quando não tratada, a infecção pelo HIV-1 é fatal na grande maioria dos casos. A introdução da terapia antirretroviral de alta atividade (HAART) no final do século XX permitiu um drástico aumento de sobrevivência de pessoas HIV+, impedindo a deterioração do sistema imune que eventualmente leva à AIDS. Entretanto, ainda são observadas ativação imune e inflamação sistêmica mais elevadas nos pacientes HIV+ em relação a populações HIV-. Mesmo que os níveis dessas alterações sejam mais baixos do que aqueles em pessoas HIV+ sem tratamento, essa elevação foi associada a diversas comorbidades (como doenças cardiovasculares, câncer, diabetes tipo 2, osteoporose e doenças neurocognitivas) que mantêm até hoje uma diferença de expectativa de vida entre as populações HIV+ e HIV- (revisado por HILEMAN e FUNDERBURG, 2017).

O HIV-1 é um lentivírus da família Retroviridae, seu genoma é composto de duas cópias de RNA fita simples positivas e é retrotranscrito em DNA e então integrado no genoma da célula hospedeira, passando a se denominar provírus (revisado por NISOLE; SAÏB, 2004). O genoma do HIV codifica proteínas estruturais, regulatórias e acessórias. Dentre as proteínas estruturais estão as codificadas pelo gene Env, as pelo gene Gag e as pelo gene Pol. O gene Env codifica uma proteína única de 160kD (gp160) que é posteriormente clivada nas proteínas do envelope gp41 e gp120. O gene Gag expressa a proteína precursora p55 que após o início do brotamento é clivada em p17 (que compõe a matriz do vírus), p24 (o capsídeo), p9 (o nucleocapsídeo) e p6. O gene Pol codifica as enzimas protease (p10), transcriptase reversa (p51), RNase H (p15) e integrase (p32). As proteínas regulatórias do HIV-1 incluem Tat, e Rev, e as proteínas acessórias, Nef, Vif, Vpr e Vpu (BLOOD et al., 2016).

### 1.3.1 O citoesqueleto durante a infecção pelo HIV – fase inicial

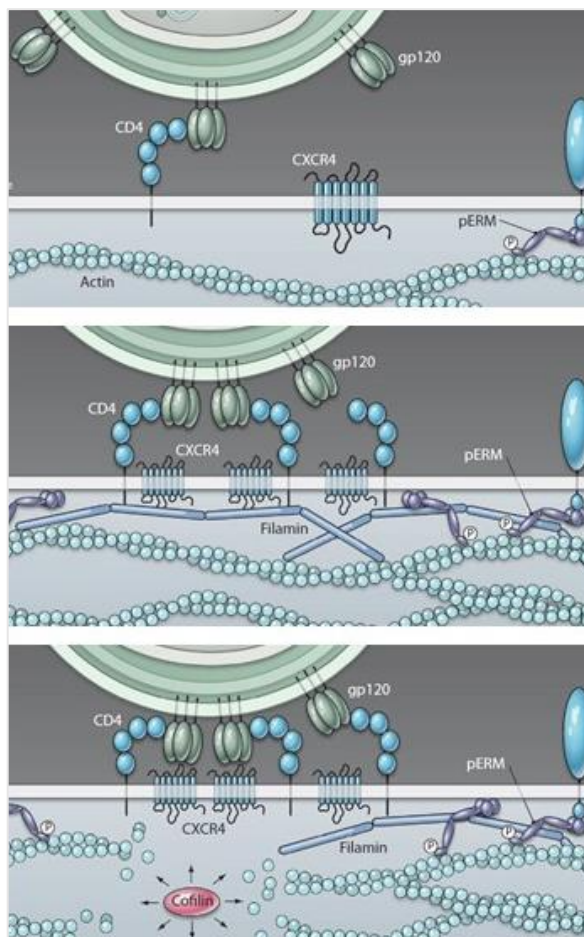
A infecção pelo HIV-1 começa quando a proteína gp120 interage com o receptor CD4, o que leva a uma mudança de conformação na proteína viral que permite sua ligação ao correceptor CXCR4 ou CCR5. A ligação ao correceptor expõe a gp41, que, hidrofóbica, se insere na membrana plasmática da célula alvo e fornece a força final para a fusão das membranas e liberação do capsídeo viral no citoplasma (WILEN; TILTON; DOMS, 2012). Durante seu ciclo de infecção, o HIV-1 modula e se aproveita das funções do citoesqueleto. Nessa primeira fase da infecção pelo HIV-1, existem evidências da participação do citoesqueleto em diversos momentos. Primeiramente, foi demonstrado que a interação da gp120 com CD4 resultava na ativação de RhoA e Rac, que, através da ativação da LIMK, inativava a cofilina de maneira transitória, permitindo a polimerização e rearranjo dos filamentos de actina (**Figura 4**). Isso diminuía a reciclagem de CXCR4 e induzia a sua aglomeração com o receptor, que se encontrava ligado ao citoesqueleto por intermédio da proteína filamina. Esta concentração de receptores e correceptores é entendida como necessária para a fusão, que requer diversas gp120 para ocorrer. A colocalização era significativamente reduzida quando as células eram tratadas com a droga citocalasina D, que capeia a extremidade + dos filamentos de actina e inibe sua polimerização (IYENGAR; HILDRETH; SCHWARTZ, 1998; JIMÉNEZ-BARANDA et al., 2007; LAYNE et al., 1990; VORSTER et al., 2011).

Além disso, a ligação de gp120 aos receptores CD4 em linfócitos levou à ativação por fosforilação das proteínas ERM (ezrina, radixina, moesina), responsáveis pela ligação de proteínas associadas à membrana plasmática ao citoesqueleto de actina. O silenciamento de uma delas, a moesina, impediu a reorganização dos filamentos e, desse modo, a entrada do vírus (**Figura 4**) (BARRERO-VILLAR et al, 2009).

A ligação de proteínas do envelope ao correceptor CCR5 demonstrou ativar a Rho GTPase Rac, cuja cascata de sinalização resulta na ativação de proteínas da família WAVE, e, conseqüentemente, da proteína acessória nucleadora Arp2/3,

promovendo a polimerização ramificada de filamentos de actina cortical (HARMON; CAMPBELL; RATNER, 2010)

**Figura 4 - A ligação do gp120 do HIV-1 aos receptores e correceptores gera uma série de mudanças no citoesqueleto cortical**



Adaptado de Liu, Belkina e Shaw, *Science Signaling*, 2009

Foi observado que o HIV-1, assim como outros retrovírus, pode surfar a superfície de filopódios da célula HEK293 (*human embryonic kidney cells*) modificada para expressar CD4 e CXCR4, até atingir um sítio mais favorável à fusão, e que esse movimento era actina- e miosina II-dependente (LEHMANN et al., 2005).

Apesar da polimerização ter sido demonstrada como necessária para a ligação estável do envelope viral aos seus receptores, o citoesqueleto de actina cortical e suas proteínas acessórias também são uma barreira física para a fusão. Foi demonstrado que a interação da gp120 com o correceptor CXCR4 leva a uma cascata de sinalização que volta a ativar a cofilina, permitindo a clivagem dos filamentos de actina, e assim, a liberação do capsídeo no citoplasma (**Figura 4**) (YODER et al., 2008). Na mesma linha deste último estudo, Zhang et al. (1999) mostraram que a porção

citoplasmática da gp41 que se insere na célula durante a fusão interage com a RhoGEF p115 (específica para ativação de RhoA), inibindo sua atividade, e que mutações nessa parte da gp41 prejudicaram a infecção pelo HIV-1 em linhagens de células T. Esses dados indicam que ativação da via da Rho (e consequente inativação da cofilina) na segunda metade da fusão do HIV-1 desfavorecem a entrada do vírus.

Uma das funções reportadas da proteína acessória Nef é de aumentar a infectividade do HIV-1, e a região da proteína responsável pela sua interação com uma RhoGEF é necessária para essa função. Campbell, Nunez e Hope (2004) demonstraram que a falta de uma Nef funcional era compensada por alterações no citoesqueleto pelas drogas citocalasina, latrunculina (que se liga às subunidades de actina) ou jasplakinolide (que estabiliza os filamentos de actina existentes e promove nucleação de novos filamentos em massas desorganizadas), ou pela pseudotipagem do HIV com o envelope de um vírus que entra na célula pela via endocítica; indicando que este papel da Nef é nessa fase inicial da infecção, após a fusão do vírus, quando o capsídeo e as Nefs empacotadas são liberados no citoplasma.

O capsídeo é uma estrutura cônica composta por p24 e contém as duas cópias de RNA genômico viral, mais proteínas do nucleocapsídeo, transcriptase reversa, integrase e proteínas acessórias. O capsídeo é responsável por manter o RNA próximo da transcriptase reversa e por proteger o genoma viral de fatores celulares. Além disso, também permite a infecção de células que não estão em divisão. Entretanto, para a entrada do DNA (ácido desoxirribonucleico) no núcleo da célula, é preciso que o capsídeo se desfaça, pelo menos parcialmente (CAMPBELL; HOPE, 2015).

A transcrição reversa é iniciada utilizando o tRNA Lys3 humano como primer na região 5' do RNA genômico. O DNA sintetizado é transferido para a região 3' do RNA e o resto da fita é retrotranscrita. Em seguida o restante da fita de RNA genômico é degradada pela RNase H, com exceção de uma região resistente, que acaba exercendo a mesma função de Lys3 para a síntese do DNA senso (HU; HUGHES, 2012). Uma vez sintetizado, o cDNA (DNA complementar) continua associado às proteínas virais, formando o PIC (complexo de pré-integração). O PIC é ativamente transportado para dentro do núcleo através dos complexos de poros nucleares mediante interação com importinas (JAYAPPA; AO; YAO, 2012) e o cDNA é integrado no genoma pela integrase (CRAIGIE, 2012). Essa dinâmica de desnudamento do

capsídeo enquanto o vírus realiza transcrição reversa de seu genoma e migra pelo citoplasma até o núcleo ainda não foi bem elucidada, sendo a ordem desses acontecimentos ponto de debate até hoje (CAMPBELL; HOPE, 2015).

O papel do citoesqueleto nesta parte da fase de transporte do capsídeo ainda não está tão bem elucidado, mas, embora existam evidências para a participação do citoesqueleto de actina, o transporte de maior distância da superfície celular até o núcleo parece ser predominantemente executado por microtúbulos. Após a entrada, foi demonstrado por imunoprecipitação que a proteína p17 da matriz do vírus interage com o citoesqueleto de actina e proteínas do capsídeo com tubulina (BUKRINSKAYA et al., 1998). Foi observado por microscopia que o HIV com Vpr marcada (a proteína Vpr permanece associada em toda a fase inicial da infecção do HIV, desde a fusão, o complexo de retrotranscrição, até o PIC) é transportado através do citoplasma tanto por filamentos de actina quanto por microtúbulos. O movimento observado pelo citoesqueleto de tubulina era de longo alcance, enquanto o pelo de actina era curto e errático, e o deslocamento viral só foi completamente impedido quando foram utilizados inibidores para as duas famílias de filamentos (MCDONALD et al., 2002).

Para se locomover ao longo dos microtúbulos estabilizados, foi observado que o HIV-1 não se liga diretamente aos filamentos, mas sim a proteínas adaptadoras das proteínas motoras dos microtúbulos, cinesinas e dineínas (DHARAN et al., 2017; MALIKOV et al., 2014).

Algumas proteínas associadas ao citoesqueleto de actina também interagem com os microtúbulos. As forminas Dia1 e 2 foram responsáveis por estabilização dos microtúbulos induzida pela infecção por HIV em diversos tipos celulares, além de promoverem o desempacotamento do capsídeo in vitro (DELANEY et al., 2017). A necessidade de microtúbulos estáveis para o HIV-1 é corroborada pela observação de que outra proteína do citoesqueleto de actina, a moesina, diminui a estabilidade dos filamentos e sua superexpressão tem um efeito protetor contra a infecção, enquanto seu silenciamento a exacerba (NAGHAVI et al., 2006).

O uso de inibidores do citoesqueleto de actina 1 hora após a infecção levou a um acúmulo de partículas virais na região perinuclear de células HeLa modificadas para expressar CD4, sugerindo que a entrada no núcleo poderia ser actina-dependente (ARHEL et al., 2006).

Não foram observadas evidências da participação do citoesqueleto no transporte do PIC através da membrana nuclear até a integração de seu genoma no da célula infectada, mas é possível que o citoesqueleto regule a disponibilidade de fatores de transcrição importantes para o processo. A presença de actina no núcleo e a observação de que Tat afeta sua polimerização quando expressa no citoplasma constituem pontos que podem indicar uma possível função ainda não descoberta para o citoesqueleto nesse momento da infecção (STOLP; FACKLER, 2011).

A integração do genoma viral é considerada o final da fase inicial do ciclo de infecção pelo HIV-1. Uma vez integrado, a região LTR (*long terminal repeats*) na porção 5' serve como promotora da transcrição mediada por RNA polimerase II. Entretanto, a atividade basal da RNA polimerase II é extremamente baixa e requer a expressão da proteína Tat para o aumento da sua atividade. Dessa forma é possível o alongamento da transcrição do DNA viral (revisado por CLARK; NAVA; CAPUTI, 2017).

### **1.3.2 O citoesqueleto durante a infecção pelo HIV – fase tardia**

Uma vez expressas, as proteínas precursoras estruturais e de enzimas Gag e Gag-Pol, ainda não clivadas, são direcionadas para a membrana plasmática, onde a Gag é multimerizada e o RNA viral genômico não-spliceado é recrutado. O domínio p6 então recruta a maquinaria ESCRT (*endosomal sorting complexes required for transport*), o que culmina na fissão da membrana plasmática e no brotamento do vírion. Após o brotamento, a protease presente em Gag-Pol cliva as proteínas precursoras, gerando partículas virais maduras (revisado por FREED, 2015).

Apesar das proteínas produzidas precisarem atingir a membrana plasmática, esse percurso até o momento não tem muitas evidências concretas da participação do citoesqueleto. Embora tenha se observado que Gag colocaliza com os filamentos de actina e talvez utilize a cinesina KIF4, Fackler e Kräusslich (2006) discutem em sua revisão que os métodos de detecção utilizados não teriam como estar observando proteínas recém-sintetizadas, e poderiam estar mostrando populações de proteínas que haviam sido internalizadas e recicladas para a membrana celular. O uso de drogas também gerou resultados controversos, com a utilização da citocalasina D em alguns

casos tendo efeito inibitório na produção viral e em outros casos, não tendo efeito algum. Já o uso da droga mycalolide B (que despolimeriza os filamentos de actina e se liga a actina globular) impediu que proteínas virais alcançassem a membrana plasmática (STELLA; TURVILLE, 2018).

Ademais, apesar de ter sido reportada a associação de sítios de brotamento do vírus com filamentos de actina, um estudo (RAHMAN et al., 2014) utilizando técnicas de imageamento de vírus isolados produzidos em HeLa não observou recrutamento específico de actina para os sítios, e o uso de lancuntrulina não afetou a montagem de novos vírions na membrana. Ainda é possível que haja uma função para a actina na fase tardia da infecção pelo HIV, já que no estudo por Stella e Turville (2018), a perturbação do citoesqueleto pode ter gerado efeitos na infectividade do vírus produzido, uma vez que o sobrenadante das células não foi analisado

### 1.3.3 O citoesqueleto na transmissão do HIV entre células

Além de participar do ciclo de infecção celular, o citoesqueleto também pode participar da transmissão viral. A infecção por vírus-livre representa apenas uma parcela das infecções por HIV-1 e uma quantidade significativa de células se infecta por transmissão célula-célula (revisado por BRACQ et al., 2018). A célula infectada interage com a célula-alvo principalmente por sinapses virais ou pontes citoplasmáticas – protruções da membrana – entre a célula infectada e a não-infectada (revisado por LEHMANN; NIKOLIC; PIGUET, 2011).

As sinapses virais são estruturas formadas por proteínas virais e moléculas de adesão da célula infectada, e por receptores/correceptores do HIV-1 e moléculas de adesão na célula-alvo. Essas moléculas são recrutadas e polarizadas na região de contato entre célula infectada e célula-alvo por meio da rede de actina. No caso da célula infectada, observa-se que o acúmulo de Gag e Env no sítio de interação é reduzido pela inibição da dinâmica do citoesqueleto de actina. No caso da célula-alvo, os processos de concentração de receptores e correceptores virais ocorrem assim como em infecções de vírus livre (**Figura 5**) (JOLLY; MITAR; SATTENTAU, 2007). Já as pontes, que podem ser de natureza filopodial ou de túneis de nanotúbulos, contêm



actina em sua estrutura e podem existir em paralelo às transmissões por sinapse ou evoluir para elas (SHERER et al, 2007, EUGENIN; GASKILL; BERMAN, 2009).

#### **1.3.4 O citoesqueleto na infecção por HIV de outros tipos celulares**

O HIV-1 apresenta alto tropismo para linfócitos T CD4+, devido a sua quantidade e presença de receptores e correceptores necessários. Entre outros efeitos, a infecção pelo HIV-1 induz a morte desses linfócitos, levando ao quadro de imunodeficiência denominado AIDS (revisado por BARRÉ-SINOUSI; ROSS; DELFRAISSY, 2013). Entretanto, outras células do sistema imune, como monócitos, macrófagos e células dendríticas, também apresentam os receptores virais (mesmo que em menores níveis), e também podem participar do ciclo de infecção do vírus no hospedeiro e nas transmissões célula-célula (BLOOD, 2016).

Atualmente se acredita que o principal empecilho para eliminação completa do HIV-1 em indivíduos infectados sejam células conhecidas como reservatórios virais. Os reservatórios são células onde o vírus fica latente e que podem gerar novas partículas infecciosas quando o tratamento cessa. Enquanto um dos reservatórios mais estudados é a célula T CD4+ de memória, discute-se que diversas outras células possivelmente também apresentem essa capacidade. O estudo da infecção pelo HIV-1 em seus diversos alvos e suas especificidades é, portanto, fundamental (KANDATHIL; SUGAWARA; BALAGOPAL, 2016).

Células dendríticas (DCs) são uma das primeiras células do sistema imune que se deparam com o vírus nas mucosas, mas somente 1% dessas células são efetivamente infectadas pelo HIV (SMED-SÖRENSEN et al., 2005) Mesmo quando não infectadas, as células dendríticas internalizam o vírus, em alguns casos resultando no processamento e apresentação antigênica, em outros, num efeito “cavalo de tróia”, onde DCs transportam o vírus internalizado até linfonodos cheios de linfócitos T CD4+ e potencializam sua infecção por sinapses virais ou trans-infecção (MARTÍN-MORENO; MUÑOZ-FERNÁNDEZ, 2019).

Em células dendríticas, o citoesqueleto de actina demonstrou ser importante para impedir o processamento antigênico. Ménager e Littman (2016) demonstraram

que a tetraspanina TSPAN7 e a dinamina (DNM2) promovem nucleação e estabilização dos filamentos de actina por Arp2/3, limitando a endocitose dos vírus HIV-1 e os mantendo em dendritos ricos em actina, que os transferem eficientemente para linfócitos. Também reportaram que a inibição da miosina não-muscular tipo 2 aumentava a transferência, ou a recuperava em DCs onde TSPAN7 ou DNM2 haviam sido silenciadas.

Monócitos são células mieloides que se encontram principalmente em circulação, até migrarem para os tecidos onde se diferenciam em macrófagos. Embora expressem o receptor CD4 e o correceptor CCR5 em baixos níveis, alguns estudos observaram um reservatório de monócitos infectados in vivo (NEAL et al., 1995; STANLEY et al., 1992). Outros estudos, porém, não obtiveram os mesmos resultados (DURAND et al., 2012; LUCA et al., 1993). Especula-se que essas células participem no transporte do vírus para compartimentos como o cérebro. Uma vez no cérebro, se diferenciam em macrófagos, gerando distúrbios neurológicos associados ao HIV (HAND) pela formação de células gigantes multinucleadas (KUMAR et al, 2018).

Os macrófagos podem ser produtivamente infectados, mas são mais resistentes aos efeitos citopáticos do que os linfócitos T, o que permite que permaneçam vivos por longos períodos de tempo, carregando vírus infectivos (BENAROCH et al, 2010, TAN; SATTENTAU, 2013). Além disso, foi demonstrado em camundongos humanizados que macrófagos são capazes de manter a replicação e a transmissão viral, de forma persistente, na ausência de linfócitos T CD4+, mesmo sob tratamento antirretroviral (HONEYCUTT et al, 2017). Isso, combinado com sua capacidade de transmitir HIV-1 célula-a-célula (GROOT; WELSCH; SATTENTAU, 2008), faz dos macrófagos potenciais reservatórios virais que ocultariam o patógeno durante tratamentos.

Em macrófagos, a montagem de partículas virais se dá principalmente dentro de compartimentos intracelulares conectados à membrana plasmática – chamados de VCCs (compartimentos contendo vírus) ou IPMCs (compartimentos intracelulares conectados à membrana plasmática). Esse fato contrasta com o que ocorre em linfócitos, nos quais a montagem ocorre na membrana plasmática (revisado por RODRIGUES et al, 2017). Esses complexos compartimentos também são encontrados em células não infectadas, indicando que possuem outras funções e que seriam recrutados pelos vírus em formação (MLCOCHOVA; PELCHEN-MATTHEWS;

MARSH, 2013). Enquanto inicialmente se especulava serem de natureza endocítica ou derivada do complexo de Golgi, foi observado que esses vacúolos são separados da via endocítica, e melhor caracterizados como compartimentos intracelulares, ligados entre si e à membrana plasmática por microcanais (WELSCH et al, 2011). Diferentemente de endossomos, IPMCs possuem pH neutro, o que possibilita a permanência do HIV-1 dentro dos compartimentos sem perda de infectividade (JOUVE et al, 2007). Além disso, apresentam áreas elétron-densas com proteínas de adesão, próximas a filamentos do citoesqueleto. Tratamento de macrófagos com inibidor de polimerização da actina não somente desestabilizou os IPMCs, resultando em diversos compartimentos menores espalhados pela célula, como aumentou a liberação de partículas virais maduras para o meio (MLCOCHOVA; PELCHEN-MATTHEWS; MARSH, 2013).

#### **1.4 Justificativa**

Tendo em vista as evidências apresentadas da importância do citoesqueleto como mediador de processos celulares e de infecção (sendo que o HIV-1 foi diversas vezes demonstrado como um modulador dessa dinâmica), e da escassez de informações disponíveis sobre o papel das miosinas não-convencionais nesse contexto, nosso trabalho propõe explorar a função das miosinas preditas de expressão em células mieloides na infecção pelo HIV-1.

## **2 OBJETIVOS**

Nosso objetivo principal foi investigar o papel das miosinas não-convencionais na infecção de células da linhagem monocítica U937 por HIV-1.

### **2.1 Objetivos específicos**

- a) avaliar a expressão de miosinas no modelo celular;
- b) diferenciar macrófagos derivados de U937;
- c) silenciar miosinas expressas com shRNA;
- d) averiguar se o silenciamento das miosinas afeta a infecção pelo HIV-1;
- e) determinar em qual ponto do ciclo de infecção o silenciamento das miosinas que afetaram a infecção pelo HIV;
- f) explorar especificidades das miosinas que afetarem a infecção pelo HIV para tentar isolar o mecanismo.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi isentado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais e pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, mas os potenciais doadores humanos foram providenciados com o TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido) do projeto do laboratório antes que recolhêssemos a câmara LRS.

### 3.1 Células

Todas as células utilizadas nesse trabalho e no laboratório são periodicamente testadas para contaminação com micoplasma por PCR com os primers F: 5'-GGCCAATGGGTGAGTAACACG-3' e R: 5'-CGGATAACGCTTGCGACCTATG-3' com DreamTaq Green PCR Master Mix da Thermo Fisher (K1081) com o programa 5min 94°C; (1min 94°C; 1min 60°C; 1min30s 72°C)x30 ciclos; 5min 72°C.

#### 3.1.1 Linhagens e cultivo

Foram usadas as linhagens HEK293T, Ghost CCR5+ CXCR4+ (X4/R5), Jurkat E6.1 e U937. As HEK293T foram gentilmente cedidas pelo Professor Enrique Mario Boccardo Pierulivo da Universidade de São Paulo. As linhagens Ghost e Jurkat foram obtidas do NIH HIV Reagent Program. As U937 foram gentilmente cedidas pela Professora Juliana Terzi Maricato da Escola Paulista de Medicina-Universidade Federal de São Paulo.

As linhagens HEK293T e Ghost foram mantidas em DMEM (Gibco) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco), 60 µg/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina (Thermo Fisher). As Jurkat e U937 foram mantidas em RPMI (Gibco) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco) e 60 µg/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina (Thermo Fisher).

### 3.1.2 Ativação de U937 com PMA

Plaqueamos 100.000 U937 por poço de placa de 96 poços em RPMI (Gibco) 10% SFB (Gibco) Pen/Strep (Thermo Fisher) no qual foram acrescentados 10nM, 20nM ou 30nM de PMA da Sigma (P8139) por 24, 48 ou 72 horas e então lavados com PBS 1x (NaCl, KCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>).

### 3.1.3 Tratamento de U937 com Y-27632 ou BMS-3

Plaqueamos 100.000 U937 por poço de placa de 96 poços em RPMI (Gibco) 10% SFB (Gibco) Pen/Strep (Thermo Fisher) no qual foram acrescentados 30,75nM, 61,5nM ou 123nM de BMS-3 da Cayman Chemical Company (19421) ou 2,5µM, 5µM ou 10µM de Y-27632 da Cayman Chemical Company (10005583) por 24 horas e então lavados com PBS 1x.

### 3.1.4 Diferenciação de Macrófagos e Células Dendríticas Derivados de Monócitos (MDMs e MDDCs)

Câmaras LRS (*leukocyte reduction system*) obtidas como resíduo excedente de aférese de plaquetas de doadores saudáveis, foram submetidas à separação por Ficoll (GE Healthcare) para obtenção de PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*). As PBMCs foram incubadas com *beads* magnéticas acopladas a anticorpos anti-CD14 (Miltenyi) e depois submetidas à separação magnética para enriquecimento da população de células CD14+. Para diferenciação de MDMs,  $0,5 \times 10^6$  monócitos CD14+ foram cultivados em RPMI (Gibco) com 10% de soro bovino fetal (Hyclone), e Pen/Strep (Thermo Fisher) em placas de 24 poços não-tratadas para cultura com 25ng/ml de M-CSF (Miltenyi) por 7 dias. Para diferenciação de MDDCs,  $5 \times 10^6$  monócitos CD14+ foram cultivados em RPMI (Gibco) com 10% de soro bovino fetal (Hyclone), e Pen/Strep (Thermo Fisher) em placas de Petri com 40ng/ml de IL-4 (Miltenyi) e 10ng/ml de GM-CSF (Miltenyi) por 5 dias.

## 3.2 Plasmídeos

Os plasmídeos pNL(AD8), pNL4-3, pNL4-3.IRES.GFP, pVSV-G (glicoproteína do vírus da estomatite vesicular), pSIV3+, e psPAX-2 (plasmídeo lentiviral empacotador de segunda geração) foram adquiridos do NIH AIDS *Reagent Program*. Sequências Mission específicas de shRNA (*short hairpin RNA*) para cada gene ou controle universal (shScramble) foram adquiridas da Sigma Aldrich.

Os plasmídeos foram replicados através da transformação de bactérias STBL-3 selecionadas em placas de LB ágar (triptona, extrato de levedura, NaCl e ágar bacteriológico) com ampicilina (Sigma) a 100µg/ml. Uma colônia foi expandida em meio TB (triptona, extrato de levedura e glicerol) com ampicilina (Sigma) a 100µg/ml e purificada com o kit Plasmid DNA Purification da Macherey-Nagel (740410).

**Tabela 1 – Sequências de shRNA utilizadas para silenciamento gênico**

shRNA	Sequência 5'-3'
shMYO1C #1	CCGGCCCTTCTTTCTGCCTTAAGAACTCGAGTTCTTAAGGCA GAAAGAAGGGTTTTG
shMYO1C #2	CCGGGCCCGTCCAGTATTTCAACAACCTCGAGTTGTTGAAATACTGGACGGGCTTTTTG
shMYO1C #3	CCGGGCAGAGGATTGATTACGCCAACTCGAGTTGGCGTAATCAATCCTCTGCTTTTTG
shMYO1C #4	CCGGTGTAGCTCAAAGAAATCCCATTCTCGAGAATGGGATTCTTTGAGCTACATTTTTG
shMYO1C #5	CCGGCCCATTATGAGCCAGTGCTTTCTCGAGAAAGCACTGGCTCATAATGGGTTTTG
shMYO1F #1	CCGGCGTCTTCAAGACCCGAGTTTGTCTCGAGACAAACTCGGTCTTGAAGACGTTTTTTG
shMYO1F #2	CCGGGCCAAAATTCCTGCAGAGGTATCTCGAGATACCTCTGCAGGAATTTGGCTTTTTTG
shMYO1F #3	CCGGGAGCGAAAGTTCGATGGCTTTCTCGAGAAAGCCATCGAACTTTCGCTCTTTTTTG
shMYO1F #4	CCGGGTGGATGACATGGTGTCTTCTCGAGAAGAAAGCACCATGTCATCCACTTTTTTG
shMYO1F #5	CCGGGCTCTGTGCTCATCTCTGTAACCTCGAGTTACAGAGATGAGCACAGAGCTTTTTTG
shMYO1G #1	CCGGGCTCAGCGACTAAAGACACTTCTCGAGAAAGTGTCTTTAGTCGCTGAGCTTTTTTG
shMYO1G #2	CCGGCCTGTTTGCTCAGCGACTAAACTCGAGTTTAGTCGCTGAGCAAACAGGTTTTTTG
shMYO1G #3	CCGGGCAGCTATTCATCCAGCTCATCTCGAGATGAGCTGGATGAATAGCTGCTTTTTTG
shMYO1G #4	CCGGTGTCTCTGCCACTGACAATCCTCGAGGATTGTGAGTGGCAGAGGACATTTTTTG
shMYO1G #5	CCGGACCATCACTGACCGAATCTTCTCGAGGAAAGATTCCGGTCAAGTATGTTTTTTTTG
shMYO9B #1	CCGGGCCCAATTGAGAGCTTGTATCTCGAGATAAA CAAGCTCTCAATGGGCTTTTT
shMYO9B #2	CCGGGCACGTCAAGTCCAGAACAACTCGAGTTGTTCTGGAAC TTGACGTGCTTTTT
shMYO9B #3	CCGGGCCCAATTGAGAGCTTGTATCTCGAGATAAA CAAGCTCTCAATGGGCTTTTTG
shMYO9B #4	CCGGACGTGGTTTACGTAAC TTA ACTCGAGTTAAAGTTACGTAAACCACGTTTTTTG
shMYO9B #5	CCGGGCACGTCAAGTCCAGAACAACTCGAGTTGTTCTGGAAC TTGACGTGCTTTTTG
shMYO10 #1	CCGGCCAGCTTATCAAACAGACCAACTCGAGTTGGTCTGTTTGATAAGCTGGTTTTTG
shMYO10 #2	CCGGCCCAGATGAGAAGATA TTTCAACTCGAGTTGAATACTTCTCATCTGGGTTTTTG
shMYO10 #3	CCGGGATAGGACTTTCCACCTGATTCTCGAGAA TCAGGTGGAAAGTCCTATCTTTTTG
shMYO10 #4	CCGGCCAAGTCTTTCTTCGAGAATCTCGAGATTCTCGAAGAAA GACCTTGGTTTTTG
shMYO10 #5	CCGGGATAGGACTTTCCACCTGATTCTCGAGAATCAGGTGGAAAGTCCTATCTTTTTG
shMYO18A #1	CCGGGCTTCTGATGATGGCAGCTTACTCGAGTAAGCTGCCATCATCA GAAGCTTTTTG
shMYO18A #2	CCGGGCTGAACTACACCAAGCAGAACTCGAGTTCTGCTTGGTGTAGTT CAGCTTTTTG
shMYO18A #3	CCGGCGGAAGGAGAAGAAGGAGAACTCGAGTTCTCCTTCTTCTCCTTCCGTTTTTG
shMYO18A #4	CCGGCGAATTGATGAAGAAGCACAACCTCGAGTTGTGCTTCTTCA TCAATTCGTTTTTG
shMYO18A #5	CCGGCGATGCACTGAAGAAGCAGATCTCGAGATCTGCTTCTT CAGTGCATCGTTTTTG

### 3.3 Produção lentiviral

Para a produção de vetores lentivirais codificando shRNAs, HEK293T foram transferidas um dia antes da transfecção para garrafas T75 ou T150 em quantidade suficiente para atingir cerca de 75% de confluência após 24h. No dia da transfecção, um total de 40µg ou 80µg (respectivamente para cada tamanho de garrafa) de DNA plasmidial foi incubado com 2,6x a quantidade de DNA (208µg) de polietilenoimina (PEI linear PM 25.000, Polysciences Inc.) em 2ml de solução de NaCl 150mM por 20 minutos. O meio das células HEK293T foi trocado, adicionando 9 ou 18ml de DMEM completo e, em seguida, o NaCl mais DNA e PEI. Os plasmídeos utilizados foram: plasmídeo codificando o shRNA, psPAX-2 e pVSV-G, na proporção de 1:0,75:0,6µg.

Para a produção de HIV-1, as HEK293T em garrafas T150 foram transfectadas com 80µg de pNLAD8 (plasmídeo codificando um genoma completo de HIV-1, com envelope CCR5-trópico), pNL43 (HIV-1 CXCR4-trópico) ou pNL43.IRES.GFP (CXCR4-trópico, expressando GFP em mRNA bicistrônico com o gene da Nef). Quando necessário, foram acrescentados 8µg de pVSV-G.

De oito a dezesseis horas depois das transfecções, o meio de cultura foi trocado e as células foram incubadas por mais 48h. Após a incubação, o sobrenadante foi recolhido e filtrado em filtros de 0,2µm (Corning).

Para a purificação das partículas virais, o sobrenadante foi centrifugado a 10.000x g sobre uma camada de 20% de sacarose em tampão TNE (tris, NaCl, EDTA) por 2 horas e armazenado a -80°C para posterior transdução ou infecção.

### 3.4 Transdução com o vetor lentiviral

Em U937 e Jurkat foram adicionados 10µl do vetor lentiviral a 100.000 células por poço de placa de 24 poços. Depois de 2 dias, foram acrescentados 1µg/ml de puromicina (Sigma).



Em MDDCs, foram adicionados 70µl do SIV-VLP (que contém Vpx) e 100µl do vetor lentiviral carregando o shRNA. Depois de 2 dias, foi acrescentado 1µg/ml de puromicina.

### 3.5 PCR quantitativo (qPCR)

U937 e jurkat tiveram o RNA extraído com TRIzol Reagent (Ambion) para a lise celular, 0,1mL de clorofórmio (Merck Millipore) para a separação de fase, 0,25mL de isopropanol (Sigma) para a precipitação e 1mL de etanol (Sigma) 70% para a lavagem. As MDDCs tiveram o RNA extraído com o kit NucleoSpin RNA da Macherey-Nagel (740955) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA foi retrotranscrito com *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied biosystems) seguindo as instruções do fabricante.

Para a avaliação da expressão de miosinas, o cDNA foi submetido ao real-time PCR com Taqman Master Mix (Thermo) e sondas e primers específicos Taqman adquiridos da Thermo Fisher para as 11 miosinas, genes *housekeeping* (B2M), ou RSAD-2.

**Tabela 2 – Primers utilizados no qPCR da expressão de miosinas**

Gene	Referência
MYO1C	Hs00300761_m1
MYO1E	Hs00192232_m1
MYO1F	Hs00300741_m1
MYO1G	Hs01070818_m1
MYH9	Hs00159522_m1
MYO5A	Hs00165309_m1
MYO7A	Hs00934542_m1
MYO9A	Hs01003056_m1
MYO9B	Hs00188109_m1
MYO10	Hs01586613_m1
MYO18A	Hs00373018_m1
RSAD-2	Hs00369813_m1
B2M	Hs00187842_m1

Para avaliar a expressão de ISGs e fatores de restrição, o cDNA de U937 foi submetido ao real time PCR com *SYBR Green PCR Master Mix* da Applied biosystems (4309155) para os 9 genes, com HPRT como gene *housekeeping*.

Para a quantificação de *Late RT* em diferentes time points, 100.000 U937 foram plaqueadas em uma placa de 96 poços com o HIV NL4-3 IRES-GFP VSV-G por 4 horas a 4°C a um MOI (multiplicidade de infecção) de 0,05 para sincronizar a infecção e então transferidas para a estufa. O DNA das células foi extraído com o kit *NucleoSpin Tissue* da Macherey-Nagel (740952) 30 minutos, 2 horas ou 24 horas depois. O DNA foi submetido ao real time PCR com *SYBR Green PCR Master Mix* com os primers para *Late RT* F: 5'-GCATGGAATGGATGACCCTGAGA-3' e R: 5'-CGTCGAGAGATCTCCTCTGGCTTTA-3', com b-globina como gene *housekeeping*, F: 5'-CCCTTGACCCAGAGGTTCT-3' e R: 5'-CGAGCACTTTCTTGCCATGA-3'.

A análise foi feita a partir do  $\Delta$ CT do gene de interesse em relação ao gene *housekeeping* (B2M) ou  $\Delta\Delta$ CT da amostra de interesse em relação à amostra controle. Para o cálculo do  $\Delta$ CT, utilizou-se a fórmula:  $2^{-(CT \text{ do gene de interesse} - CT \text{ do gene housekeeping})}$ , e para o do  $\Delta\Delta$ CT:  $2^{-[(CT \text{ do gene de interesse da amostra} - CT \text{ do gene housekeeping da amostra}) - (CT \text{ do gene de interesse do controle} - CT \text{ do gene housekeeping do controle})]}$ .

### 3.6 Infecção

O HIV-1 produzido em HEK293T foi titulado em Ghost X4R5, que apresentam o gene GFP sob o controle do promotor viral LTR. Assim, através de uma curva de porcentagem de células GFP positivas, obtivemos uma estimativa de unidades infectivas (UI)/ml que utilizamos para o cálculo de multiplicidade de infecção (MOI), isto é, quantas unidades infectivas para cada célula.

Para avaliar a infecção de U937, plaqueamos 100.000 células por poço de placa de 96 poços em 100µl de RPMI completo e infectamos com NL4-3 IRES-GFP ou NL4-3 IRES-GFP VSV-G a diversos MOI. Após 4 horas, dobramos o volume do meio. Vinte e quatro horas depois lavamos as células 3 vezes com PBS 1x e ressuspendemos as células em RPMI completo. Incubamos por mais 24h, então congelamos o sobrenadante no -80°C e utilizamos as células para ensaio de viabilidade e citometria.

Para avaliar a infecção de Jurkat, plaqueamos 100.000 células por poço de placa de 96 poços em 100µl de RPMI completo e infectamos com NL4-3 a um MOI de

0,1. Após 4 horas, dobramos o volume do meio. Vinte e quatro horas depois lavamos as células 3 vezes com PBS 1x e ressuspendemos as células em RPMI completo. Incubamos por mais 24h, então congelamos o sobrenadante no  $-80^{\circ}\text{C}$  e utilizamos as células para ensaio de viabilidade e citometria.

Para a infecção de MDDCs, plaqueamos 100.000 células dendríticas por poço de placa de 96 poços em RPMI completo e infectamos com NLAD8 a um MOI de 2 acompanhado de 30 $\mu\text{l}$  de SIV-VLP. Após 48 horas, marcamos as células para a citometria.

Nesses ensaios de infecção, como um controle adicional de infecção, em alguns poços do controle scramble foi acrescentado 25 $\mu\text{M}$  de AZT (Azidotimidina) junto ao HIV.

### **3.7 Ensaio de viabilidade Cell TiterGLO**

Recolhemos 20 $\mu\text{l}$  de U937 ou Jurkat infectadas, adicionamos a 30 $\mu\text{l}$  de meio RPMI completo e acrescentamos 50 $\mu\text{l}$  de *Cell TiterGlo Reagent* (Promega). Lemos a luminescência em um SpectraMax M3 (Molecular Devices).

### **3.8 Ensaio de fusão**

Para o ensaio de fusão, 100.000 U937 foram plaqueadas por poço de uma placa de 96 poços fundo V em meio RPMI completo e infectamos com NL4-3 BlaM-Vpr VSV-G a um MOI de 0,05. Incubamos as células por 2 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  e então lavamos uma vez com PBS 1x. Ressuspendemos as células na solução de CCF4-AM e as incubamos por 1 hora à temperatura ambiente protegidas da luz. Recolhemos as células e as lavamos uma vez com o meio de revelação. Ressuspendemos as células em meio de revelação e as incubamos por 16 horas à temperatura ambiente protegidas da luz. As células foram lavadas e marcadas com Live/Dead (Thermo Fisher, L10120), e então as fixamos em PFA 1%. Avaliamos a fusão por citometria.

### 3.9 Citometria de fluxo de células

U937 foram incubadas por 20 minutos a 4°C com os anticorpos para imunofenotipagem anti-CD4 (555348), o anti-CD184 (CXCR4, 555974) e o anti-CD195 (CCR5, 555992), todos adquiridos da Beckton Dickson Bioscience (BD Bioscience), diluídos em tampão MACS (PBS, 2% soro fetal bovino, 2mM EDTA), lavados duas vezes em tampão MACS, e fixados em PFA 1% por 15 minutos à temperatura ambiente.

Para a avaliação da infecção, células foram incubadas com o marcador de viabilidade celular Live/Dead (Thermo Fisher, L10120) diluído em tampão MACS por 15 minutos a 4°C, lavados duas vezes em tampão MACS, e fixados em PFA 1% por 10 minutos à temperatura ambiente. No caso da infecção com NL43 (sem GFP), as células foram então permeabilizadas em solução BSA/saponina (PBS, 0,2% BSA, 0,05% saponina) por 15 minutos a 4°C, incubadas com anti-HIV KC57-FITC (Beckman Coulter, 6604665) por 20 minutos a 4°C, lavadas com tampão BSA/saponina, fixadas em PFA 1% novamente.

Para a marcação com faloidina da invitrogen (MAN0001777), as U937 foram fixadas com PFA1% por 10 minutos à temperatura ambiente, permeabilizadas com BSA/saponina por 15 minutos a 4°C, lavadas 2 vezes com BSA/saponina, incubadas com a faloidina diluída em BSA/saponina por 20 minutos a 4°C, lavada mais 2 vezes e fixada com PFA 1% por 10 minutos a temperatura ambiente.

As células marcadas foram submetidas ao FACSCanto ou Accuri (BD) ou Attune (Thermo Fisher). A análise dos resultados foi feita no software FlowJo X.

### 3.10 CBA (*Cytometry Bead Assay*) para p24

Quantificamos a p24 presente no sobrenadante, produzida por U937 infectadas, usando um imunoenensaio baseado em *beads*, que foi feito no laboratório

usando functional beads A4 (BD) e o anti-p24 183-H12-5C obtido do NIH AIDS *Reagent Program*. O sobrenadante foi incubado com tampão de lise (0,1% BSA, 0,02% Tween20 e 1% NP40) e então com as *beads* conjugadas a anti-p24 em tampão TB (0,1% BSA e 0,02% Tween20). Foi então acrescentado o anticorpo de detecção KC57-RD1 da Beckman Coulter (6604667), lavado 2 vezes e as *beads* foram adquiridas no Accuri (BD).

### 3.11 Western Blot

As U937 foram plaqueadas com 100.000 células por poço de uma placa de 96 poços em meio RPMI completo e incubadas ou não com NL4-3 IRES-GFP VSV-G por 4 horas a 4°C a um MOI de 0,05 para sincronizar a infecção e então transferidas para a estufa por 30 minutos. As células foram então lisadas em tampão de lise (50mM Tris, 5mM MgCl<sub>4</sub> e 0,5% IGPAL) contendo inibidor de protease da Thermo Fisher 1x e inibidor de fosfatase da Thermo Fisher 1x por 30 minutos no gelo e centrifugadas a 14.000x g por 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido e a concentração proteica foi mensurada com Comassie (Bradford) *Protein Assay Kit* (Thermo).

Cinquenta e cinco microgramas de proteína de cada amostra foram desnaturadas a 95°C por 5 minutos em tampão Laemelli (Thermo) contendo 10% de β-mercaptoetanol (Sigma, M3148). As proteínas foram aplicadas em gel 7,5% de poliacrilamida e submetidas à eletroforese por 1 hora a 200V. A transferência das proteínas do gel para membrana PVDF (fluoreto de polivinilideno) foi feita no Trans-Blot Turbo (Biorad) com tampão de transferência (Tris-Glicina-Metanol) a 25V por 5 minutos. A membrana foi bloqueada em solução de 5% de leite por 2 horas e em seguida incubada com anticorpo anti-p-cofilina da Santa Cruz Biotechnology (sc-271921) ou anti-GAPDH da abcam (mAbcam 9484) por 2 horas à temperatura ambiente, lavada e incubada por mais 1 hora com o anticorpo secundário anti-mouse HRP da Thermo Fisher (62-6520). Após 5 minutos de incubação com substrato *enhanced chemiluminescent* (ECL clarity max – Biorad, 1705062), as imagens da membrana foram adquiridas com IMAGEQUANT LAS 4000 (GE Healthcare). A quantificação das bandas foi feita pelo software ImageJ.

### 3.12 Imunofluorescência e Microscopia

Para averiguar a localização da miosina IG relativa ao vírus, MDMs foram diferenciados em lamínulas e infectados ou não com NL4-3 VSV-G MOI 0,5 por 5 dias. As lamínulas foram lavadas 1 vez com PBS 1x e fixadas em PFA 4% por 20 minutos. Após fixação, as lamínulas foram lavadas, tratadas por 20 minutos com BSA/Saponina para permeabilização, e marcadas com anticorpos primários anti-HIV KC57-FITC da Beckman Coulter (6604665) e anti-miosina IG da Rockland (600-401-959) diluídos em BSA/Saponina por 1h à temperatura ambiente. Após lavagens, as lamínulas foram incubadas com os anticorpos secundários anti-Rabbit IgG (A10042) e anti-mouse IgG (A21202) da Thermo Fisher por 1h à temperatura ambiente, lavadas e montadas sobre lâminas de vidro usando meio de montagem Vectashield com DAPI (Vectorlabs). As imagens foram obtidas com microscópio de epifluorescência Zeiss AxioVert.A1 ou Confocal Zeiss LSM 780-NLO (CEFAP – ICB/USP).

Para averiguar o estado do citoesqueleto em U937, lamínulas foram tratadas com Poly-Lysina da Sigma-Aldrich (P4832), lavadas e secadas. 500.000 células foram aderidas às lamínulas e fixadas em PFA 4% por 20 minutos. Após fixação, as lamínulas foram lavadas, tratadas por 20 minutos com BSA/Saponina para permeabilização, e marcadas com anticorpos primários anti-MYO9B da Proteintech (12432-1-AP) e anti-acetil-alfa-tubulina da invitrogen (6-11B-1) e com faloidina, diluídos em BSA/Saponina por 1h à temperatura ambiente. Após lavagens, as lamínulas foram incubadas com os anticorpos secundários anti-mouse IgG (A21202) e anti-rabbit IgG (A10042), ambos da Thermo Fisher, por 1h à temperatura ambiente, lavadas e montadas sobre lâminas de vidro usando meio de montagem Vectashield com DAPI (Vectorlabs). As imagens foram obtidas com microscópio de epifluorescência Zeiss AxioVert.A1 e as medianas de fluorescência foram calculadas pelo software ImageJ.

### 3.13 Análise estatística

Os gráficos e as análises estatísticas foram feitos no software GraphPad Prism 7. Na quantificação de *Late RT* DNA (Figura 17) foi realizado uma ANOVA de 2 fatores clássica com o teste de múltiplas comparações de Dunnett. Na quantificação das medianas de fluorescência (Figura 20A) foi realizado um teste Kruskal-Wallis (análise de variância de 1 fator não paramétrico) com o teste de múltiplas comparações de Dunn. Na quantificação da faloidina por citometria (Figura 20B) foi realizado um teste Friedman (análise de variância de 1 fator não paramétrico vinculado) com o teste de múltiplas comparações de Dunn. E na análise do efeito das drogas na faloidina e na infecção (Figura 21) foi realizado uma ANOVA de 2 fatores clássica com o teste de múltiplas comparações de Dunnett. Independente do teste valor de  $\alpha$  foi 0,05 e \* indica que o valor de p foi menor que 0,05, \*\* p foi menor que 0,01, \*\*\* p foi menor que 0,005 e \*\*\*\* p foi menor que 0,001.

## 6 CONCLUSÕES:

- a) o silenciamento das miosinas IC, IF, X e XVIII A não afetou a infecção por HIV-1 dentro dos protocolos utilizados neste trabalho;
- b) o silenciamento da miosina IG aumentou a porcentagem de células infectadas por HIV-1 e a localização da proteína próxima a compartimentos Gag+ em MDMs infectados sugere que ela pode participar da regulação dinâmica destes compartimentos;
- c) o silenciamento da miosina IXB aumentou a infecção por HIV-1 em todos os ensaios desse trabalho; o mecanismo provavelmente se deve ao domínio RhoGAP e à sua função como regulador de RhoA.

Acreditamos que nosso trabalho é relevante por atribuir a proteínas do citoesqueleto uma função restritiva para a replicação do HIV, e possivelmente de outros vírus, que não havia sido explorada a fundo anteriormente.



## REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. et al. Citoesqueleto. Em: ALBERTS, Bruce et al. **Biologia Molecular da Célula**. Porto Alegre: Artmed. 6. ed., cap. 16, p. 889-962, 2017.
- ARHEL, N. et al. Quantitative four-dimensional tracking of cytoplasmic and nuclear HIV-1 complexes. **Nature methods**, v. 3, n. 10, p. 817-824, 2006.
- ÅSJÖ, B. et al. Susceptibility to infection by the human immunodeficiency virus (HIV) correlates with T4 expression in a parental monocytoid cell line and its subclones. **Virology**, v. 157, n. 2, p. 359-365, 1987.
- BÄHLER, M. Class IX myosins. **Myosins**. Springer, Dordrecht, 2008. p. 391-401.
- BARRERO-VILLAR, M. et al. Moesin is required for HIV-1-induced CD4-CXCR4 interaction, F-actin redistribution, membrane fusion and viral infection in lymphocytes. **Journal of cell science**, v. 122, n. 1, p. 103-113, 2009.
- BARRÉ-SINOUSSE, F.; ROSS, A. L.; DELFRAISSY, J. F. Past, present and future: 30 years of HIV research. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 12, p. 877-883, 2013.
- BENAROCH, P. et al. HIV-1 assembly in macrophages. **Retrovirology**, v. 7, n. 1, p. 1-10, 2010.
- BLANCHOIN, L. et al. Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. **Physiological reviews**, v. 94, n. 1, p. 235-263, 2014.
- BLANCHOIN, L.; POLLARD, T. D. Interaction of actin monomers with Acanthamoeba Actophorin (ADF/cofilin) and profilin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 39, p. 25106-25111, 1998.
- BLOOD, German Advisory Committee et al. Human immunodeficiency virus (HIV). **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, v. 43, n. 3, p. 203, 2016.
- BRACQ, L. et al. Mechanisms for cell-to-cell transmission of HIV-1. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 260, 2018.
- BROS, M. et al. RhoA as a key regulator of innate and adaptive immunity. **Cells**, v. 8, n. 7, p. 733, 2019.
- BUKRINSKAYA, A. et al. Establishment of a functional human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcription complex involves the cytoskeleton. **The Journal of experimental medicine**, v. 188, n. 11, p. 2113-2125, 1998.

- BURKE, T. A. et al. Homeostatic actin cytoskeleton networks are regulated by assembly factor competition for monomers. **Current Biology**, v. 24, n. 5, p. 579-585, 2014.
- CAMPBELL, E. M.; HOPE, T. J. HIV-1 capsid: the multifaceted key player in HIV-1 infection. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 8, p. 471-483, 2015.
- CAMPBELL, E. M.; NUNEZ, R.; HOPE, T. J. Disruption of the actin cytoskeleton can complement the ability of Nef to enhance human immunodeficiency virus type 1 infectivity. **Journal of virology**, v. 78, n. 11, p. 5745-5755, 2004.
- CAVROIS, M.; DE NORONHA, C.; GREENE, W. C. A sensitive and specific enzyme-based assay detecting HIV-1 virion fusion in primary T lymphocytes. **Nature biotechnology**, v. 20, n. 11, p. 1151-1154, 2002.
- CHEN, Y. et al. HIV-1 Tat regulates occludin and A $\beta$  transfer receptor expression in brain endothelial cells via Rho/ROCK signaling pathway. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.
- CLARK, E.; NAVA, B.; CAPUTI, M. Tat is a multifunctional viral protein that modulates cellular gene expression and functions. **Oncotarget**, v. 8, n. 16, p. 27569, 2017.
- COOMER, C. A. et al. Single-cell glycolytic activity regulates membrane tension and HIV-1 fusion. **PLoS pathogens**, v. 16, n. 2, p. e1008359, 2020.
- COONEY, R. et al. Association between genetic variants in myosin IXB and Crohn's disease. **Inflammatory bowel diseases**, v. 15, n. 7, p. 1014-1021, 2009.
- CRAIGIE, R. The molecular biology of HIV integrase. **Future virology**, v. 7, n. 7, p. 679-686, 2012.
- CRONIN, J.; ZHANG, X. Y.; REISER, J. Altering the tropism of lentiviral vectors through pseudotyping. **Current gene therapy**, v. 5, n. 4, p. 387-398, 2005.
- DE LANEROLLE, P. Nuclear actin and myosins at a glance. **Journal of cell science**, v. 125, n. 21, p. 4945-4949, 2012.
- DEBELEC-BUTUNER, B. et al. Inflammation-mediated abrogation of androgen signaling: an in vitro model of prostate cell inflammation. **Molecular carcinogenesis**, v. 53, n. 2, p. 85-97, 2014.
- DELANEY, M. K. et al. Distinct functions of diaphanous-related formins regulate HIV-1 uncoating and transport. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 33, p. E6932-E6941, 2017.

- DHARAN, A. et al. Bicaudal D2 facilitates the cytoplasmic trafficking and nuclear import of HIV-1 genomes during infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 50, p. E10707-E10716, 2017.
- DJAKBAROVA, U. et al. Dynamic interplay between cell membrane tension and clathrin-mediated endocytosis. **Biology of the Cell**, v. 113, n. 8, p. 344-373, 2021.
- DUMAN, J. G. et al. Rac-maninoff and Rho-vel: the symphony of Rho-GTPase signaling at excitatory synapses. **Small GTPases**, p. 1-34, 2021.
- DURAND, C. M. et al. HIV-1 DNA is detected in bone marrow populations containing CD4+ T cells but is not found in purified CD34+ hematopoietic progenitor cells in most patients on antiretroviral therapy. **Journal of Infectious Diseases**, v. 205, n. 6, p. 1014-1018, 2012.
- EDWARDS, M. et al. Capping protein regulators fine-tune actin assembly dynamics. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 15, n. 10, p. 677-689, 2014.
- EL-AMRAOUI, Aziz; BAHLOUL, Amel; PETIT, Christine. Myosin vii. **Myosins**. Springer, Dordrecht, 2008. p. 353-373.
- EUGENIN, E. A.; GASKILL, P. J.; BERMAN, J. W. Tunneling nanotubes (TNT) are induced by HIV-infection of macrophages: a potential mechanism for intercellular HIV trafficking. **Cellular immunology**, v. 254, n. 2, p. 142-148, 2009.
- FACKLER, O. T.; KRÄUSSLICH, H. G. Interactions of human retroviruses with the host cell cytoskeleton. **Current opinion in microbiology**, v. 9, n. 4, p. 409-415, 2006.
- FERREIRA, S. M. et al. ARHGAP21 prevents abnormal insulin release through actin rearrangement in pancreatic islets from neonatal mice. **Life sciences**, v. 127, p. 53-58, 2015.
- FREED, E. O. HIV-1 assembly, release and maturation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 8, p. 484-496, 2015.
- FREY, S. et al. Temperature dependence of cell-cell fusion induced by the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. **Journal of virology**, v. 69, n. 3, p. 1462-1472, 1995.
- GARCIA-MATA, R.; BOULTER, E.; BURRIDGE, K. The 'invisible hand': regulation of RHO GTPases by RHOGDIs. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 12, n. 8, p. 493-504, 2011.
- GÉRARD, A. et al. Detection of rare antigen-presenting cells through T cell-intrinsic meandering motility, mediated by Myo1g. **Cell**, v. 158, n. 3, p. 492-505, 2014.

- GHOSH, M. et al. Cofilin promotes actin polymerization and defines the direction of cell motility. **Science**, v. 304, n. 5671, p. 743-746, 2004.
- GOODSON, H. V.; JONASSON, E. M. Microtubules and microtubule-associated proteins. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 10, n. 6, p. a022608, 2018.
- GOUJON, C.; MALIM, M. H. Characterization of the alpha interferon-induced postentry block to HIV-1 infection in primary human macrophages and T cells. **Journal of virology**, v. 84, n. 18, p. 9254-9266, 2010.
- GRAZIANO, F. et al. Extracellular ATP induces the rapid release of HIV-1 from virus containing compartments of human macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 25, p. E3265-E3273, 2015.
- GROOT, F.; WELSCH, S.; SATTENTAU, Q. J. Efficient HIV-1 transmission from macrophages to T cells across transient virological synapses. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 111, n. 9, p. 4660-4663, 2008.
- GUO, J. et al. Spinoculation triggers dynamic actin and cofilin activity that facilitates HIV-1 infection of transformed and resting CD4 T cells. **Journal of virology**, v. 85, n. 19, p. 9824-9833, 2011.
- HALL, A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. **Science**, v. 279, n. 5350, p. 509-514, 1998.
- HANLEY, P. J. et al. Motorized RhoGAP myosin IXb (Myo9b) controls cell shape and motility. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 27, p. 12145-12150, 2010.
- HARMON, B.; CAMPBELL, N.; RATNER, L. Role of Abl kinase and the Wave2 signaling complex in HIV-1 entry at a post-hemifusion step. **PLoS pathogens**, v. 6, n. 6, p. e1000956, 2010.
- HARRIS, H. E.; WEEDS, A. G. Plasma gelsolin caps and severs actin filaments. **FEBS letters**, v. 177, n. 2, p. 184-188, 1984.
- HEIDINGS, J. B. et al. Gelsolin-mediated actin filament severing in crowded environments. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 532, n. 4, p. 548-554, 2020.
- HEMKEMEYER, S. A. et al. Local Myo9b RhoGAP activity regulates cell motility. **Journal of Biological Chemistry**, v. 296, 2021.

- HILEMAN, C. O.; FUNDERBURG, N. T. Inflammation, immune activation, and antiretroviral therapy in HIV. **Current HIV/AIDS Reports**, v. 14, n. 3, p. 93-100, 2017.
- HOLMES, K. C. et al. Atomic model of the actin filament. **Nature**, v. 347, n. 6288, p. 44-49, 1990.
- HONEYCUTT, J. B. et al. HIV persistence in tissue macrophages of humanized myeloid-only mice during antiretroviral therapy. **Nature medicine**, v. 23, n. 5, p. 638-643, 2017.
- HU, W. S.; HUGHES, S. H. HIV-1 reverse transcription. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 2, n. 10, p. a006882, 2012.
- IYENGAR, S.; HILDRETH, J. E. K.; SCHWARTZ, D. H. Actin-dependent receptor colocalization required for human immunodeficiency virus entry into host cells. **Journal of virology**, v. 72, n. 6, p. 5251-5255, 1998.
- JAFFE, A. B.; HALL, A. Rho GTPases: biochemistry and biology. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 21, p. 247-269, 2005.
- JAYAPPA, K. D.; AO, Z.; YAO, X. The HIV-1 passage from cytoplasm to nucleus: the process involving a complex exchange between the components of HIV-1 and cellular machinery to access nucleus and successful integration. *International journal of biochemistry and molecular biology*, v. 3, n. 1, p. 70, 2012.
- JEGOU, A.; ROMET-LEMONNE, G. The many implications of actin filament helicity. **Seminars in Cell & Developmental Biology**. Academic Press, v. 102, p. 65-72, june 2020.
- JIMÉNEZ-BARANDA, S. et al. Filamin-A regulates actin-dependent clustering of HIV receptors. **Nature cell biology**, v. 9, n. 7, p. 838-846, 2007.
- JOINT UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS. Global AIDS Update 2021. Geneva: UNAIDS, 2021 [Online]. Acessado em 2022. Disponível em: [https://www.unaids.org/sites/default/files/media\\_asset/2021-global-aids-update\\_en.pdf](https://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/2021-global-aids-update_en.pdf)
- JOLLY, C.; MITAR, I.; SATTENTAU, Q. J. Requirement for an intact T-cell actin and tubulin cytoskeleton for efficient assembly and spread of human immunodeficiency virus type 1. **Journal of virology**, v. 81, n. 11, p. 5547-5560, 2007.
- JOUVE, M. et al. HIV-1 buds and accumulates in “nonacidic” endosomes of macrophages. **Cell host & microbe**, v. 2, n. 2, p. 85-95, 2007.

- KAMEOKA, M. et al. High susceptibility of U937-derived subclones to infection with human immunodeficiency virus type 1 is correlated with virus-induced cell differentiation and superoxide generation. **Immunopharmacology**, v. 30, n. 1, p. 89-101, 1995.
- KANDATHIL, A. J.; SUGAWARA, S.; BALAGOPAL, A. Are T cells the only HIV-1 reservoir?. **Retrovirology**, v. 13, n. 1, p. 1-10, 2016.
- KITANO, K. et al. Differentiating agents facilitate infection of myeloid leukemia cell lines by monocyctotropic HIV-1 strains. **Blood**, v. 76, n. 10, p. 1980-1988, 1990.
- KNEUSSEL, M.; WAGNER, W. Myosin motors at neuronal synapses: drivers of membrane transport and actin dynamics. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 14, n. 4, p. 233-247, 2013.
- KODERA, N.; ANDO, T. The path to visualization of walking myosin V by high-speed atomic force microscopy. **Biophysical reviews**, v. 6, n. 3, p. 237-260, 2014.
- KOVAR, D. R. et al. Control of the assembly of ATP-and ADP-actin by formins and profilin. **Cell**, v. 124, n. 2, p. 423-435, 2006.
- KUMAR, S. et al. Global perspective of novel therapeutic strategies for the management of neuroAIDS. **Biomolecular Concepts**, v. 9, n. 1, p. 33-42, 2018.
- LAYNE, S. P. et al. HIV requires multiple gp120 molecules for CD4-mediated infection. **Nature**, v. 346, n. 6281, p. 277-279, 1990.
- LEHMANN, M. J. et al. Actin-and myosin-driven movement of viruses along filopodia precedes their entry into cells. **The Journal of cell biology**, v. 170, n. 2, p. 317-325, 2005.
- LEHMANN, M.; NIKOLIC, D. S.; PIGUET, V. How HIV-1 takes advantage of the cytoskeleton during replication and cell-to-cell transmission. **Viruses**, v. 3, n. 9, p. 1757-1776, 2011.
- LI, Y. R. et al. Myosin Va plays essential roles in maintaining normal mitosis, enhancing tumor cell motility and viability. **Oncotarget**, v. 8, n. 33, p. 54654, 2017.
- LIU, Y.; BELKINA, N. V.; SHAW, S. HIV infection of T cells: actin-in and actin-out. **Science signaling**, v. 2, n. 66, p. pe23-pe23, 2009.
- LUCA, A. D. et al. Haemopoietic CD34+ progenitor cells are not infected by HIV-1 in vivo but show impaired clonogenesis. **British journal of haematology**, v. 85, n. 1, p. 20-24, 1993.

- LUCERA, M. B. et al. HIV signaling through CD4 and CCR5 activates Rho family GTPases that are required for optimal infection of primary CD4<sup>+</sup> T cells. **Retrovirology**, v. 14, n. 1, p. 1-13, 2017.
- MALIGA, Z. et al. A genomic toolkit to investigate kinesin and myosin motor function in cells. **Nature cell biology**, v. 15, n. 3, p. 325-334, 2013.
- MALIGA, Z. et al. A genomic toolkit to investigate kinesin and myosin motor function in cells. **Nature cell biology**, v. 15, n. 3, p. 325-334, 2013.
- MALIKOV, V. et al. HIV-1 capsids bind and exploit the kinesin-1 adaptor FEZ1 for inward movement to the nucleus. **Nature communications**, v. 6, n. 1, p. 1-13, 2015.
- MANSTEIN, D. J. et al. Actin–tropomyosin distribution in non-muscle cells. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v. 41, n. 1, p. 11-22, 2020.
- MARAVILLAS-MONTERO, J. L.; SANTOS-ARGUMEDO, L. The myosin family: unconventional roles of actin-dependent molecular motors in immune cells. **Journal of leukocyte biology**, v. 91, n. 1, p. 35-46, 2012.
- MARTÍN-MORENO, A.; MUÑOZ-FERNÁNDEZ, M. A. Dendritic cells, the double agent in the war against HIV-1. **Frontiers in Immunology**, p. 2485, 2019.
- MCDONALD, D. et al. Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells. **The Journal of cell biology**, v. 159, n. 3, p. 441-452, 2002.
- MCINTOSH, B. B.; OSTAP, E. M. Myosin-I molecular motors at a glance. **Journal of cell science**, v. 129, n. 14, p. 2689-2695, 2016.
- MÉNAGER, M. M.; LITTMAN, D. R. Actin dynamics regulates dendritic cell-mediated transfer of HIV-1 to T cells. **Cell**, v. 164, n. 4, p. 695-709, 2016.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE – SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE – DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA, PREVENÇÃO E CONTROLE DAS INFECÇÕES SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEIS, DO HIV/AIDS E DAS HEPATITES VIRAIS. Boletim epidemiológico HIV AIDS 2021. Brasília: Ministério da Saúde, 2018 [Online]. Acessado em 2022. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2021/boletim-epidemiologico-hivaids-2021>
- MLCOCHOVA, P.; PELCHEN-MATTHEWS, A.; MARSH, M. Organization and regulation of intracellular plasma membrane-connected HIV-1 assembly compartments in macrophages. **BMC biology**, v. 11, n. 1, p. 1-16, 2013.
- MOALLI, F. et al. The Rho regulator Myosin IXb enables nonlymphoid tissue seeding of protective CD8<sup>+</sup> T cells. **Journal of experimental medicine**, v. 215, n. 7, p. 1869-1890, 2018.

- MØLLER, L. L. V.; KLIP, A.; SYLOW, L. Rho GTPases—Emerging Regulators of Glucose Homeostasis and Metabolic Health. **Cells**, v. 8, n. 5, p. 434, 2019.
- MONSUUR, A. J. et al. Myosin IXB variant increases the risk of celiac disease and points toward a primary intestinal barrier defect. **Nature genetics**, v. 37, n. 12, p. 1341-1344, 2005.
- MORIUCHI, H. et al. Promonocytic U937 subclones expressing CD4 and CXCR4 are resistant to infection with and cell-to-cell fusion by T-cell-tropic human immunodeficiency virus type 1. **Journal of virology**, v. 71, n. 12, p. 9664-9671, 1997.
- NAGHAVI, M. H. et al. Moesin regulates stable microtubule formation and limits retroviral infection in cultured cells. **The EMBO journal**, v. 26, n. 1, p. 41-52, 2007.
- NEAL, T. F. et al. CD34+ progenitor cells from asymptomatic patients are not a major reservoir for human immunodeficiency virus-1. *Blood*, 86:1749–56, 1995.
- NEUHAUS, J. et al. Treadmilling of actin. **Journal of Muscle Research & Cell Motility**, v. 4, n. 5, p. 507-527, 1983.
- NIKOLIC, J. et al. Structural basis for the recognition of LDL-receptor family members by VSV glycoprotein. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2018.
- NISHIMURA, Y.; KASAHARA, K.; INAGAKI, M. Intermediate filaments and IF-associated proteins: from cell architecture to cell proliferation. **Proceedings of the Japan Academy, Series B**, v. 95, n. 8, p. 479-493, 2019.
- NISOLE, S.; SAÏB, A. Early steps of retrovirus replicative cycle. **Retrovirology**, v. 1, n. 1, p. 9, 2004.
- OLETY, B. et al. Myosin 1G (Myo1G) is a haematopoietic specific myosin that localises to the plasma membrane and regulates cell elasticity. **FEBS letters**, v. 584, n. 3, p. 493-499, 2010.
- PANTALONI, D.; CARLIER, M. How profilin promotes actin filament assembly in the presence of thymosin  $\beta$ 4. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 1007-1014, 1993.
- PANTALONI, D.; CLAINCHE, C. L.; CARLIER, M. Mechanism of actin-based motility. **Science**, v. 292, n. 5521, p. 1502-1506, 2001.
- PAUZA, C. D.; PRICE, T. M. Human immunodeficiency virus infection of T cells and monocytes proceeds via receptor-mediated endocytosis. **The Journal of cell biology**, v. 107, n. 3, p. 959-968, 1988.
- PIMM, M. L.; HENTY-RIDILLA, J. L. New twists in actin–microtubule interactions. **Molecular Biology of the Cell**, v. 32, n. 3, p. 211-217, 2021.



- POLLARD, T. D. Rate constants for the reactions of ATP-and ADP-actin with the ends of actin filaments. **The Journal of cell biology**, v. 103, n. 6, p. 2747-2754, 1986.
- POLLARD, T. D. Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. **Annual review of biophysics and biomolecular structure**, v. 36, p. 451-477, 2007.
- POLLARD, T. D.; BLANCHOIN, L.; MULLINS, R. D. Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. **Annual review of biophysics and biomolecular structure**, v. 29, n. 1, p. 545-576, 2000.
- RAHMAN, S. A. et al. Investigating the role of F-actin in human immunodeficiency virus assembly by live-cell microscopy. **Journal of virology**, v. 88, n. 14, p. 7904-7914, 2014.
- RODRIGUES, V. et al. Myeloid cell interaction with HIV: a complex relationship. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 1698, 2017.
- SABO, Y. et al. HIV-1 induces the formation of stable microtubules to enhance early infection. **Cell host & microbe**, v. 14, n. 5, p. 535-546, 2013.
- SARSHAD, A. A.; PERCIPALLE, P. New insight into role of myosin motors for activation of RNA polymerases. **International review of cell and molecular biology**, v. 311, p. 183-230, 2014.
- SEPT, D.; ELCOCK, A. H.; MCCAMMON, J. A. Computer simulations of actin polymerization can explain the barbed-pointed end asymmetry. **Journal of molecular biology**, v. 294, n. 5, p. 1181-1189, 1999.
- SHERER, Nathan M. et al. Retroviruses can establish filopodial bridges for efficient cell-to-cell transmission. **Nature cell biology**, v. 9, n. 3, p. 310-315, 2007.
- SMED-SÖRENSEN, A. et al. Differential susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection of myeloid and plasmacytoid dendritic cells. **Journal of virology**, v. 79, n. 14, p. 8861-8869, 2005.
- STANLEY, S. K. et al. CD34+ bone marrow cells are infected with HIV in a subset of seropositive individuals. **The Journal of Immunology**, v. 149, n. 2, p. 689-697, 1992.
- STELLA, A. O.; TURVILLE, S. All-round manipulation of the actin cytoskeleton by HIV. **Viruses**, v. 10, n. 2, p. 63, 2018.
- STOLP, B.; FACKLER, O. T. How HIV takes advantage of the cytoskeleton in entry and replication. **Viruses**, v. 3, n. 4, p. 293-311, 2011.

- SUN, H. Q.; YIN, H. L. The  $\beta$ -thymosin enigma. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1112, n. 1, p. 45-55, 2007.
- SUN, Y. et al. Single-molecule stepping and structural dynamics of myosin X. **Nature structural & molecular biology**, v. 17, n. 4, p. 485-491, 2010.
- TAKAI, Y. et al. Rho as a regulator of the cytoskeleton. **Trends in biochemical sciences**, v. 20, n. 6, p. 227-231, 1995.
- TAN, J.; SATTENTAU, Q. J. The HIV-1-containing macrophage compartment: a perfect cellular niche?. **Trends in microbiology**, v. 21, n. 8, p. 405-412, 2013.
- TANAKA, K. et al. Structural basis for cofilin binding and actin filament disassembly. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2018.
- THURSTON, S. F. et al. The ability to induce microtubule acetylation is a general feature of formin proteins. **PloS one**, v. 7, n. 10, p. e48041, 2012.
- TRYBUS, K. M. Myosin V from head to tail. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 9, p. 1378-1389, 2008.
- VAN BODEGRAVEN, A. A. et al. Genetic variation in myosin IXB is associated with ulcerative colitis. **Gastroenterology**, v. 131, n. 6, p. 1768-1774, 2006.
- VAN BODEGRAVEN, E. J.; ETIENNE-MANNEVILLE, S. Intermediate filaments against actomyosin: the david and goliath of cell migration. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 66, p. 79-88, 2020.
- VICENTE-MANZANARES, M. et al. Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 10, n. 11, p. 778-790, 2009.
- VORSTER, P. J. et al. LIM kinase 1 modulates cortical actin and CXCR4 cycling and is activated by HIV-1 to initiate viral infection. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 14, p. 12554-12564, 2011.
- WATANABE, T. et al. The hematopoietic cell-specific Rho GTPase inhibitor ARHGDI/D4GDI limits HIV type 1 replication. **AIDS research and human retroviruses**, v. 28, n. 8, p. 913-922, 2012.
- WEGNER, A.; ENGEL, J. Kinetics of the cooperative association of actin to actin filament. **Biophysical chemistry**, v. 3, n. 3, p. 215-225, 1975.
- WELSCH, S. et al. Architecture and regulation of the HIV-1 assembly and holding compartment in macrophages. **Journal of virology**, v. 85, n. 15, p. 7922-7927, 2011.

- WINDER, S. J.; AYSCOUGH, K. R. Actin-binding proteins. **Journal of cell science**, v. 118, n. 4, p. 651-654, 2005.
- XU, Y. et al. Dendritic cell motility and T cell activation requires regulation of Rho-cofilin signaling by the Rho-GTPase activating protein myosin IXb. **The Journal of Immunology**, v. 192, n. 8, p. 3559-3568, 2014.
- YANG, S. T.; KIESSLING, V.; TAMM, L. K. Line tension at lipid phase boundaries as driving force for HIV fusion peptide-mediated fusion. **Nature communications**, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2016.
- YODER, A. et al. HIV envelope-CXCR4 signaling activates cofilin to overcome cortical actin restriction in resting CD4 T cells. **Cell**, v. 134, n. 5, p. 782-792, 2008.
- ZENG, R. Z. et al. The Correlation Between MYO9B Gene Polymorphism and Inflammatory Bowel Disease in the Guangxi Zhuang Population. **International Journal of General Medicine**, v. 14, p. 9163, 2021.
- ZHANG, H. et al. Functional interaction between the cytoplasmic leucine-zipper domain of HIV-1 gp41 and p115-RhoGEF. **Current Biology**, v. 9, n. 21, p. 1271-S2, 1999.
- ZHONG, Y. et al. HIV-1 Tat triggers nuclear localization of ZO-1 via Rho signaling and cAMP response element-binding protein activation. **Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 1, p. 143-150, 2012.