

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA

MARIA CLARA MARTINS FERREIRA

Interatoma de Siglec1 após a ligação ao HIV-1

São Paulo

2021

MARIA CLARA MARTINS FERREIRA

Interatoma de Siglec1 após a ligação ao HIV-1

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

Orientadora: Bruna Cunha de Alencar Bargieri.

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo

2021

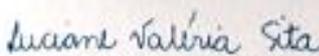


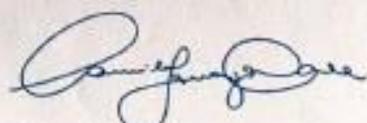
Cidade Universitária "Aramo de Sales Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508-000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **1016/2019** referente ao projeto intitulado: **"Interatoma de Siglec1 após a ligação ao HIV-1"** sob a responsabilidade de **Maria Clara Martins Ferreira** 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, 14 de fevereiro de 2019.


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


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

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.” José de Alencar.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Suzana e Vilmar, meus maiores exemplos de humildade e caráter, por todo amor e sacrifício depositado. Cada passo dessa minha trajetória acadêmica foi dado com o incentivo de vocês e para vocês!

À minha orientadora Bruna, por todos os ensinamentos teórico-práticos dados, por todos os conselhos, por toda confiança e paciência depositada e principalmente, por ter contribuído de forma tão construtiva e empática na minha jornada científica.

À minha irmã Janaína, por toda sua sabedoria, carinho e bondade de irmã mais velha.

À todas minhas amigas e parceiras do Laboratório de Biologia Celular do Sistema Imune: Taís, Tânia e Letícia. Que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando, e me ajudando sempre que precisei, dentro e fora do laboratório.

À minha namorada Michelle, por transformar meus dias em momentos mais felizes.

Ao Laboratório de GlicoProteômica, pelo auxílio nas análises de espectrometria de massas, em especial ao professor Giuseppe e à Verônica.

A todos professores e funcionários do departamento de Imunologia do ICB – USP, por toda dedicação.

À equipe do Hospital Oswaldo Cruz.

À FAPESP, pelo apoio financeiro no projeto (processo nº 2019/01733-8).

A todos os demais que conheci ao longo do mestrado, aos desconhecidos que me ajudaram no dia a dia sem esperar nada em troca.

Muito obrigada!

RESUMO

FERREIRA, Maria Clara Martins. **Interatoma de Siglec1 após a ligação ao HIV-1**. 2021. 87p. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

O HIV-1 tem nos linfócitos T CD4 suas principais células alvo. Entretanto, células da linhagem mieloide também podem se infectar pelo HIV-1 através da interação com receptores CD4, CCR5 e CXCR4. Macrófagos podem sobreviver infectados por longos períodos e apresentam compartimentos contendo vírus (VCCs), onde HIV-1 se acumula e se mantém infeccioso. Por essas razões, macrófagos se apresentam como reservatórios virais em potencial. Por outro lado, células dendríticas (DCs) raramente se infectam pelo HIV-1, mas são capazes de capturar vírus e mantê-los em compartimentos onde não são degradados. São capazes ainda de realizar transferência viral para células T CD4 através do processo de trans-infecção. A captura de HIV-1 por DCs maduras na trans-infecção é mediada por uma proteína de superfície, denominada Siglec1, que se liga ao ácido siálico de gangliosídeos no envelope viral. Siglec1 também é expresso por macrófagos, e sua importância nessas células vem sendo relacionada com a formação de VCCs. Todavia, os mecanismos moleculares de internalização e sinalização envolvendo esta lectina ainda não estão bem elucidados. Ainda não se sabe se existem proteínas que auxiliem Siglec1 nesses processos. Portanto, neste trabalho, tivemos como objetivo a identificação de proteínas com potencial de interação com Siglec1, em DCs e em macrófagos, após incubação com HIV-1. Para isso, foram realizados experimentos de co-imunoprecipitação de Siglec1 a partir de lisado de DCs e macrófagos derivados de monócitos humanos após incubação com partículas semelhante a vírus de HIV-1. As proteínas co-imunoprecipitadas obtidas por espectrometria de massas foram identificadas e após processos de mineração *in silico* dos dados foi possível demonstrar que o citoesqueleto celular e suas proteínas associadas parecem desempenhar importante papel no auxílio ao Siglec1 na captura e internalização do HIV-1. Após análises por espectrometria de massas, algumas dessas proteínas identificadas foram validadas por Western Blotting e microscopia de fluorescência. A compreensão desses mecanismos moleculares envolvidos na interação de Siglec1 com HIV-1 poderá abrir caminho para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas focando na dispersão do vírus pelas DCs e nos reservatórios em macrófagos.

ABSTRACT

FERREIRA, Maria Clara Martins. **Siglec1 interactome after HIV-1 binding**. 2021. 87p. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

HIV-1 has CD4 lymphocytes as its main target cells. However, myeloid cells can also become infected with HIV-1 through interaction with CD4, CCR5 and CXCR4 receptors. Macrophages can survive infected for long periods and present compartments containing viruses (VCCs), where HIV-1 accumulates and remains infectious. For these reasons, macrophages may be potential viral reservoirs. On the other hand, dendritic cells (DCs) rarely become infected with HIV-1, but are able to capture viruses and keep them in compartments where they are not degraded. DCs are also able to perform viral transfer to CD4 T cells through the trans-infection process. The capture of HIV-1 by mature DCs during trans-infection is mediated by a surface protein, Siglec1, which binds to ganglioside sialic acid in the viral envelope. Siglec1 is also expressed by macrophages, and its importance in these cells has been linked to the formation of VCCs. However, the molecular mechanisms of internalization and signaling involving the lectin Siglec1 are still not well understood. It is not yet known if there are proteins that help Siglec1 in these processes. Therefore, in this work, we aimed to identify proteins with potential for interaction with Siglec1, in DCs and macrophages, after incubation with HIV-1. For that, co-immunoprecipitation experiments were performed from lysate of DCs and macrophages derived from human monocytes after incubation with HIV-1 virus-like particles. Co-immunoprecipitated proteins obtained by mass spectrometry were identified and after in silico analysis of the data, it was possible to demonstrate that the cell cytoskeleton and its associated proteins appear to play an important role in helping Siglec1 in the capture and internalization of HIV-1. After mass spectrometry analysis, some of the proteins identified were validated by Western Blotting and fluorescence microscopy. Understanding the molecular mechanisms involved in the interaction of Siglec1 with HIV-1 may pave the way for the development of new therapeutic strategies focusing on the dispersion of the virus by DCs and reservoirs in macrophages.

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
Co-IP	Co-imunoprecipitação
DCs	Células dendríticas
dNTPs	Dideoxynucleotídeos
FT	Flow-through
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HRP	Horseshoe peroxidase
iDCs	Células dendríticas imaturas
IFN	Interferon
IL-4	Interleucina-4
IP	Imunoprecipitação
LPS	Lipopolissacarídeo
M-CSF	Fator estimulante de colônias de macrófagos
mDCs	Células dendríticas mieloides
MDDCs	Células dendríticas derivadas de monócitos
MDMs	Macrófagos derivados de monócitos
MLV	Vírus da leucemia murina
PBMCs	Células mononucleares de sangue periférico
PBS	Tampão fosfato-salino
pDCs	Células dendríticas plasmocitóides
PEI	Polietilenoimina
PFA	Paraformaldeído
RT	Transcriptase reversa
VCCs	Compartimentos contendo vírus
VLPs	Partículas semelhantes a vírus

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Visão geral da entrada do HIV-1.....	15
Figura 2	Ciclo viral do HIV.....	16
Figura 3	Representação gráfica dos VCCs e seus marcadores abrigando o HIV-1 em macrófagos.....	19
Figura 4	Representação gráfica do HIV-1 internalizado em um compartimento contíguo com a membrana plasmática circundado por actina polimerizada em DC madura.....	22
Figura 5	Expressão de Siglecs humanos em monócitos, DCs e macrófagos.....	24
Figura 6	Estrutura química dos gangliosídeos GM1 e GM3.....	25
Figura 7	Estrutura e domínios dos Siglecs encontrados em humanos.....	27
Figura 8	Siglec1 estende seu domínio do conjunto V para além do glicocálice da célula.....	28
Figura 9	O LPS bacteriano é capaz de induzir um aumento na expressão de Siglec1 em DCs.....	29
Figura 10	Desenho esquemático metodológico de diferenciação de PBMCs.....	33
Figura 11	Estratégia de <i>gating</i>	34
Figura 12	Imagem esquemática da incubação das células com VLPs e lise celular.....	37
Figura 13	Desenho esquemático da co-imunoprecipitação.....	38
Figura 14	Membrana de Western Blotting incubada com anti-Siglec1 para teste de extração de CD169 em DCs com diferentes tampões de lise.....	42
Figura 15	Microscopia de fluorescência de células HEK293T transfectadas com pCD169Tomato.....	43

Figura 16	Western blotting da imunoprecipitação de Siglec1 a partir de lisado de HEK293T utilizando o kit Pierce Co-Immunoprecipitation 26149.....	44
Figura 17	Western blotting da imunoprecipitação padronizada de Siglec1 a partir de lisado de HEK293T utilizando o kit Pierce™ Direct Magnetic IP/Co-IP 88828.....	45
Figura 18	Coloração por prata das amostras eluídas padronizadas da co-imunoprecipitação em Siglec1 em lisado de HEK293T.....	46
Figura 19	Citometria de fluxo das MDDCs com e sem LPS para análise de expressão de Siglec1.....	47
Figura 20	Western blotting da imunoprecipitação de Siglec1 a partir do lisado de MDDCs – Doador 1.....	48
Figura 21	Western blotting da imunoprecipitação de Siglec1 a partir do lisado de MDDCs – Doador 2.....	49
Figura 22	Western blotting da imunoprecipitação de Siglec1 a partir do lisado de MDDCs – Doador 3.....	49
Figura 23	Western blotting da imunoprecipitação de Siglec1 a partir do lisado de MDDCs – Doador 4.....	50
Figura 24	Citometria de fluxo de macrófagos com e sem LPS para análise de expressão de Siglec1.....	51
Figura 25	Western blotting da imunoprecipitação de Siglec1 a partir do lisado de macrófagos – Doador 1.....	51
Figura 26	Diagrama de Venn indicando o número de proteínas co-imunoprecipitadas identificadas a partir do software MaxQuant.....	53
Figura 27	Rede de interação das proteínas Siglec1-GSN-POTEJ-LCP1...	60
Figura 28	Western blotting da co-imunoprecipitação de sintenina-1 (A) e L-plastina (B) a partir do lisado de MDDCs.....	62

Figura 29	Microscopia de fluorescência de DCs não pulsadas com VLPs, não tratadas (A) e tratadas com LPS (B) e marcadas com anti-sintentina1 e anti-siglec1.....	64
Figura 30	Microscopia de fluorescência de DCs tratadas com LPS, pulsadas com VLPs GagGFP e marcadas com anti-siglec1.....	65
Figura 31	Microscopia de fluorescência de DCs tratadas com LPS, pulsadas com VLPs GagGFP e marcadas com anti-sintentina1.....	66
Figura 32	Microscopia de fluorescência de DCs não pulsadas com VLPs, não tratadas (A) e tratadas com LPS (B) e marcadas com anti-L-plastina e anti-siglec1.....	68
Figura 33	Microscopia de fluorescência de DCs tratadas com LPS, pulsadas com VLPs GagGFP e marcadas com anti-L-plastina.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Output das análises in sílico de identificação das proteínas co- imunoprecipitadas.....	40
Tabela 2	Proteínas co-imunoprecipitadas selecionadas no doador 1 (DCs).....	54
Tabela 3	Proteínas co-imunoprecipitadas selecionadas no doador 2 (DCs).....	56
Tabela 4	Proteínas co-imunoprecipitadas selecionadas em comum entre os dois doadores (DCs).....	58

SUMÁRIO

1. Introdução	14
1.1 A infecção por HIV-1	14
1.2 Macrófagos e HIV-1	17
1.3 Células dendríticas e HIV-1	20
1.4 Siglec1	24
2. Objetivos	32
2.1 Objetivo geral	32
2.2 Objetivos específicos	32
3. Materiais e métodos	33
3.1 Células	33
3.2 Citometria de fluxo	33
3.3 Produção de VLPs de HIV-1	34
3.4 Transfecção e superexpressão de Siglec1 em HEK293T para padronização de ensaios	35
3.5 Teste de tampões de lise para extração de Siglec-1	35
3.6 Quantificação de proteínas pelo método de Bradford	36
3.7 Incubação de DCs e macrófagos com VLPs de HIV-1 e lise celular	36
3.8 Co-Imunoprecipitação	37
3.9 Western Blotting	38
3.10 Digestão e dessalinização de peptídeos em solução	39
3.11 Plataforma nanoLC Easy-LTQ Orbitrap Velos-ETD e identificação dos peptídeos	39
3.12 Imunofluorescência e microscopia de fluorescência	41
4. Resultados	42
4.1 Teste de tampões de lise	42
4.2 Padronização da co-imunoprecipitação utilizando HEK293T	43
4.3 Co-imunoprecipitação de Siglec1 em células dendríticas derivadas de monócitos (MDDCs)	46
4.4 Co-imunoprecipitação de Siglec1 em macrófagos derivados de monócitos humanos (MDMs)	50
4.5 Identificação e análises in silico das proteínas co-imunoprecipitadas com Siglec1 em DCs	52
4.6 Validação por Western Blotting e microscopia de fluorescência das proteínas co-imunoprecipitadas com Siglec1 em DCs	62
5. Discussão	71
6. Conclusão	78
7. Referências	79

1. Introdução

1.1 A infecção por HIV-1

Durante o começo da década de 1980, quando os primeiros casos de infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) foram observados, o mundo foi confrontado com o início de uma nova pandemia. Desde então, estima-se que esse vírus já tenha infectado mais de 75 milhões de pessoas em todo o mundo, e que atualmente cerca de 37,9 milhões de pessoas estejam vivendo com HIV (UNAIDS).

O HIV é um retrovírus do gênero lentivírus que infecta e causa depleção de linfócitos T CD4+, levando a uma imunodeficiência fatal na grande maioria dos indivíduos infectados na ausência de tratamento. A doença causada pelo HIV-1 é conhecida como síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (DEEKS et al, 2015). Entre os vírus HIV já documentados distinguem-se dois tipos: HIV-1 e HIV-2. O HIV-2 é majoritariamente confinado à África Ocidental e causa uma doença semelhante ao HIV-1, mas a imunodeficiência progride mais lentamente e o HIV-2 é menos transmissível. Em relação ao HIV-1, existem quatro grupos, denominados M, N, O e P, sendo o M responsável pela pandemia global. Visto isso, e dada a maior gravidade da infecção pelo HIV-1, a maioria dos estudos realizados em geral, se concentram mais na infecção por HIV-1 (MAARTENS et al., 2014).

O genoma do HIV-1 é composto por duas cópias de RNA fita simples e está complexado a proteínas do nucleocapsídeo (p7 Gag). Além disso, o genoma do HIV-1 está envolto por um capsídeo formado por proteínas p24 Gag, que por sua vez, está circundado por uma estrutura proteica denominada matriz (p17 Gag). A matriz está ligada a uma membrana lipídica derivada da membrana plasmática da célula hospedeira, na qual se inserem as proteínas do Envelope, gp41 e gp120. Além das proteínas estruturais, dentro do capsídeo também estão presentes proteínas virais necessárias para o ciclo de vida do vírus, como transcriptase reversa (RT), integrase, RNase e protease (LI & DE CLERCQ, 2016).

Para que o HIV-1 infecte uma célula, esta precisa apresentar em sua superfície o receptor CD4 e um correceptor de quimiocina (CCR5 ou CXCR4).

Os linfócitos T CD4 são, portanto, as principais células alvo do HIV. Entretanto, outras células, como macrófagos e células dendríticas (DCs), apresentam os mesmos receptores (ainda que em quantidades mais baixas) e também podem ser infectadas (DEEKS et al., 2015).

A infecção pelo HIV-1 inicia-se quando a glicoproteína do envelope viral, gp120, se liga ao receptor CD4 da célula alvo (figura 1). A ligação acarreta em uma mudança conformacional da gp120, permitindo a ligação ao correceptor CCR5 ou CXCR4. Em seguida, os domínios da glicoproteína gp41 formam uma estrutura que promove a fusão do envelope viral à membrana da célula do hospedeiro (WILEN et al., 2012).

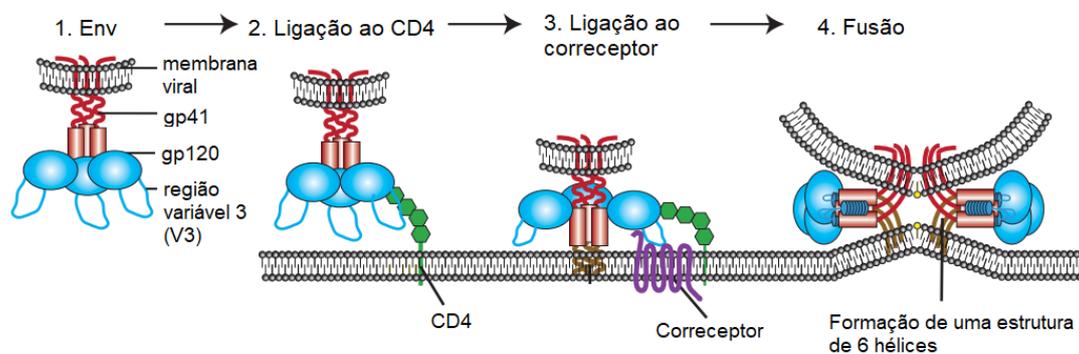


Figura 1. Visão geral da entrada do HIV-1. O envelope viral do HIV, composto pelas subunidades gp120 e gp41 **(1)**, primeiro se liga à célula hospedeira, através do receptor CD4 **(2)**. Isso causa alterações conformacionais no envelope, permitindo a ligação ao correceptor de quimiocina (CCR5 ou CXCR4), mediada pela exposição da região variável 3 (V3) **(3)**. Domínios da gp41 formam então, uma estrutura com seis hélices que promovem a fusão do envelope viral à membrana da célula-alvo **(4)**. Adaptado de: WILEN et al, 2012.

Posteriormente ao processo de fusão do envelope à membrana celular, o capsídeo viral é liberado no citoplasma da célula alvo e o RNA viral é retro transcrito em DNA complementar pela enzima transcriptase reversa. O DNA viral produzido é então inserido no genoma da célula alvo, onde será transcrito e processado. Os RNAs virais são exportados do núcleo para o citoplasma, onde serão traduzidos ou incorporados em novas partículas virais e por fim, as proteínas virais se complexarão de forma a induzir uma curvatura na membrana

celular. A partícula viral é montada e sofre brotamento da célula do hospedeiro (figura 2) (FREED, 2015; SUNDQUIST & KRAUSSLICH, 2012).

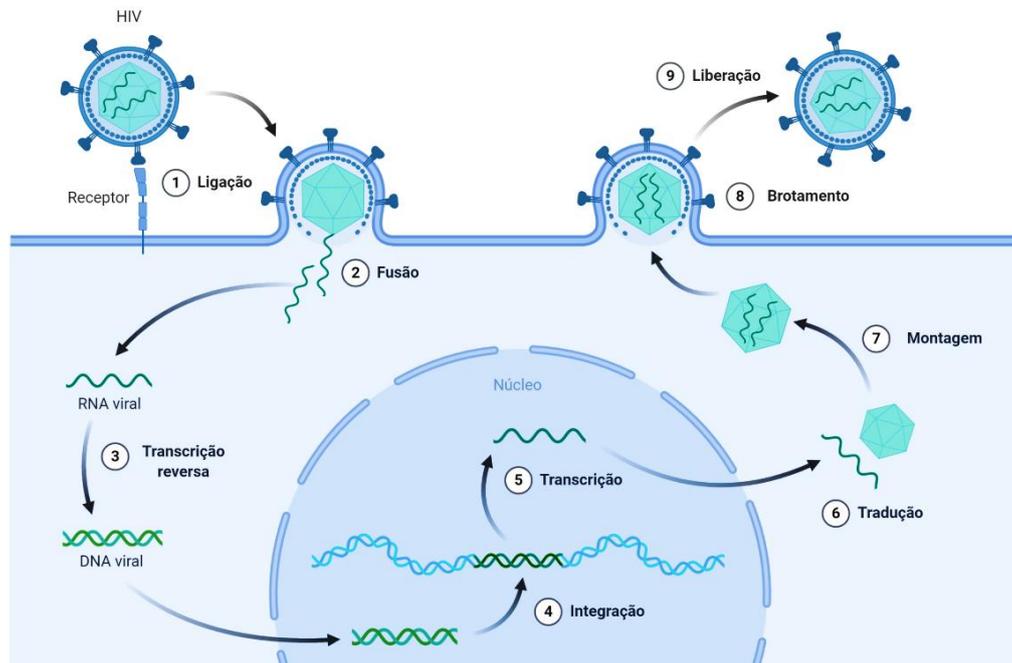


Figura 2. Ciclo viral do HIV-1. **(1)** A infecção pelo HIV-1 se inicia quando a gp120 do envelope viral, se liga ao receptor CD4 da célula alvo. Essa ligação leva a mudanças conformacionais, permitindo a ligação ao correceptor de quimiocina. **(2)** Em seguida, os domínios da glicoproteína gp41 formam uma estrutura que promove a fusão do envelope viral à membrana da célula do hospedeiro. **(3)** Posteriormente, o capsídeo viral é liberado no citoplasma da célula-alvo e o RNA viral é retro transcrito em DNA complementar. **(4)** O DNA viral é então inserido no genoma da célula-alvo, onde será **(5)** transcrito e processado. **(6)** Os RNAs virais são exportados do núcleo para o citoplasma. E por fim, as proteínas virais se complexarão de forma a induzir uma curvatura na membrana celular e a partícula viral é **(7)** montada e sofre **(8)** brotamento.

Todavia, é importante ressaltar que nem todas as partículas virais que fundem com a célula-alvo conseguem sofrer retrotranscrição, assim como nem todo RNA viral será retrotranscrito e nem todo DNA viral que chegará ao núcleo será integrado ao genoma do hospedeiro. Diversos intermediários que não seguem até o final do ciclo viral podem gerar impactos nas células hospedeiras e no curso da infecção, como por exemplo, intermediários RNA-DNA, se não degradados, podem ser reconhecidos por receptores citosólicos e engatilhar uma resposta imune intrínseca (BERGANTZ et al., 2019; HU & HUDGES, 2012).

Além disso, o DNA viral presente no núcleo de forma epissomal pode ser transcrito e dar origem a mRNA, gerando proteínas (MARTINEZ-PICADO et al., 2018). Nesse sentido, de maneira geral, o ciclo viral do HIV é muito mais complexo que o ciclo esquematizado didaticamente na figura 2.

No final da década de 1990, foi colocado em prática o tratamento combinando três drogas antirretrovirais e, em decorrência disso, a morbidade e a mortalidade dos pacientes HIV+ caiu drasticamente (BARRÉ-SINOUSI et al., 2013). Todavia, apesar da melhora na qualidade de vida e na sobrevivência dos indivíduos infectados, o tratamento ainda não é capaz de eliminar a infecção e deve ser mantido por toda a vida do paciente.

Um dos principais obstáculos à cura da infecção pelo HIV-1 são os chamados reservatórios virais. Tais reservatórios são células de longa vida que estão infectadas pelo HIV-1, não são eliminadas, e podem alimentar a recrudescência do vírus (GARCÍA et al., 2018). Apesar de acreditar-se que os linfócitos T CD4 de memória abrigando provírus latente sejam os principais reservatórios virais, é provável que outras células também contribuam como reservatórios (KANDATHIL et al., 2016). Um trabalho recente demonstrou, por exemplo, em modelo de camundongos humanizados, que os macrófagos são capazes de sustentar a infecção mesmo após tratamento antirretroviral (HONEYCUTT et al., 2017). Portanto, o estudo de células que atuam como reservatórios virais se mostra como uma interessante abordagem de pesquisa.

1.2 Macrófagos e HIV-1

O HIV-1 é capaz de atravessar a barreira mucosa, principalmente através de pequenas lesões que ocorrem durante a relação sexual e prejudicam a integridade epitelial. Macrófagos, células dendríticas e células T CD4+ de memória que patrulham a superfície da mucosa são as primeiras células imunes que enfrentam o vírus (KOPPENSTEINER et al., 2012). Além da expressão de uma ampla variedade de receptores para fagocitose em sua superfície celular, os macrófagos também expressam os receptores CD4, CCR5 e CXCR4, tornando-os um dos alvos da infecção pelo HIV-1 (COBOS-JIMÉNEZ et al., 2011).

Os macrófagos também podem desempenhar um papel fundamental na disseminação do HIV-1 através da secreção de citocinas e quimiocinas que auxiliam na atração e no recrutamento de células T não infectadas para o local da infecção (FANTUZZI et al., 2003). Isso acelera a infecção pelo HIV-1, não apenas por meio da adição de novos alvos imunológicos, mas também pela capacidade dos macrófagos de serem infectados indiretamente por meio da fagocitose de células T infectadas e em processo de morte celular (GROOT et al., 2011). Além disso, os macrófagos infectados podem espalhar o HIV-1 por meio do contato célula-célula com macrófagos não infectados e células T (GROOT et al., 2008).

As características da infecção pelo HIV-1 em macrófagos diferem do que ocorre em linfócitos T CD4 em alguns aspectos. Por exemplo, enquanto linfócitos T CD4 infectados por HIV-1 vivem cerca de 48h, os macrófagos infectados podem sobreviver por semanas. Além disso, nos linfócitos T CD4, a montagem de novas partículas virais se dá na membrana plasmática, de onde os vírions brotam e já são liberados para o meio. Por outro lado, em macrófagos, a montagem e brotamento de novas partículas virais ocorre na membrana de compartimentos intracelulares contíguos com a membrana plasmática, de maneira que parte dos novos vírions ficam retidos nesses compartimentos e mantêm sua infectividade (RODRIGUES et al., 2017).

Os compartimentos que abrigam o HIV-1 em macrófagos, os chamados compartimentos contendo vírus (VCCs), foram descritos inicialmente como parte do sistema endolisossomal. Mais recentemente, mostrou-se que isso de fato não é verdade: além de não apresentarem marcadores típicos de lisossomos ou outras vesículas, os VCCs não são ácidos, são muito intrincados e contíguos com a membrana plasmática. Evidências suportam a hipótese de que os VCCs se originam do sequestro intracelular de domínios da membrana plasmática. As proteínas de superfície celular encontradas na membrana limitante dos VCCs incluem as tetraspaninas CD81, CD9 e CD53, além de integrinas (CD18) e complexos MHC II (figura 3) (RODRIGUES et al., 2017).

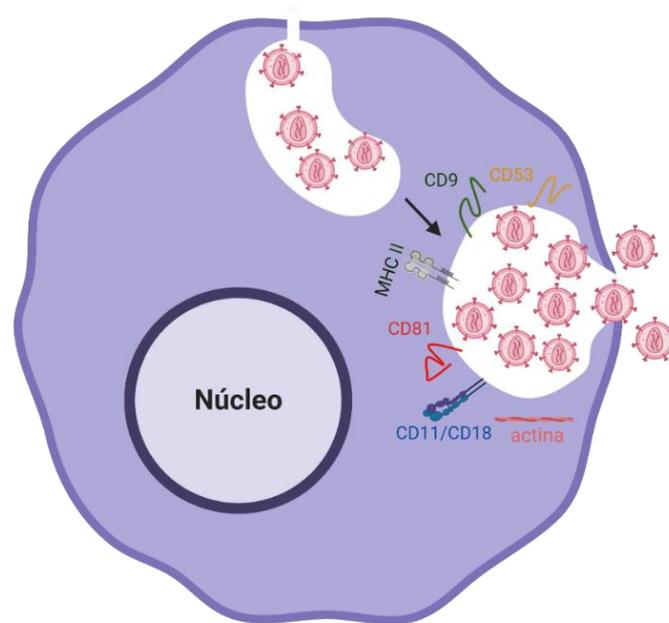


Figura 3. Representação gráfica dos VCCs e seus marcadores abrigando o HIV-1 em macrófagos. Adaptado de: RODRIGUES et al., 2017.

A função fisiológica desses compartimentos, que também estão presentes em células não infectadas, assim como as razões para que a montagem de partículas do HIV-1 ocorra nos mesmos, continuam desconhecidas. Todavia, o citoesqueleto parece desempenhar um papel fundamental na manutenção da integridade dos VCCs. Visto que tais compartimentos são circundados por actina filamentosa e o uso de drogas que interferem na polimerização de actina reduz o número e a complexidade dos VCCs, além de aumentar a quantidade de HIV-1 liberado no sobrenadante (MLCOCHOVA et al., 2013).

Além disso, a membrana limitadora dos VCCs parece fortemente associada à rede de microtúbulos. Um trabalho publicado por Gaudin e colaboradores (2012) relata que interrupção dessa rede pela exposição ao nocodazol leva à relocalização dos VCCs na área perinuclear. O mesmo trabalho mostrou que a depleção de uma cinesina (KIF3A) reduziu a liberação de vírus pelos macrófagos, sugerindo que as cinesinas (motores moleculares associados aos microtúbulos) poderiam estar envolvidas na manutenção do correto posicionamento dos compartimentos e na liberação de seu conteúdo (GAUDIN et al., 2012).

1.3 Células dendríticas e HIV-1

As células dendríticas são as principais células apresentadoras de antígenos e sua função imunológica é essencial para iniciar a imunidade contra vírus invasores. Apesar da atividade imune exercida pelas DCs após a infecção viral, certos vírus exploram a função imune das DCs como uma maneira de colonizar tecidos distantes e disseminar-se de forma sistemática (PEREZ-ZSOLT et al., 2019).

Sua ampla distribuição em estreita proximidade com o epitélio da mucosa as torna um dos os primeiros tipos de células a encontrar o HIV durante a transmissão sexual (MANCHES et al., 2014). Estudos já demonstraram que DCs vaginais e cervicais são capazes de capturar e transportar o HIV-1 da mucosa cervicovaginal, facilitando a infecção de células-alvo (SHEN et al., 2014; TRIFONOVA et. 2018).

De maneira geral, a detecção de patógenos por DCs imaturas (iDCs) nos tecidos da mucosa induz a secreção de citocinas e quimiocinas. Essa resposta inata precoce cria um microambiente inflamatório que estimula a maturação e a migração das DC para os tecidos linfoides secundários. Nas áreas de células T do linfonodo, as DCs maduras apresentam antígenos derivados de patógenos para os linfócitos T. Por esses meios, as DCs coordenam as respostas imunes inatas e adaptativas contra os patógenos invasores e, portanto, têm um papel crítico na limitação das infecções virais. No curso da infecção pelo HIV-1, entretanto, a contribuição das DCs para o estado antiviral pode ser confundida por sua capacidade de facilitar a transmissão do HIV-1 para células T CD4+ e promover a disseminação viral (IZQUIERDO-USEROS et al., 2014).

As DCs podem ser classificadas em migratórias ou residentes. As DCs migratórias estão presentes no sangue e expressam baixos níveis de CD11c e altos níveis de MHC II. Já as DCs residentes são encontradas nos tecidos e expressam altos níveis de CD11c e baixos níveis de MHC II (SATO & FUJITA, 2007). Em relação às DCs teciduais, as células de Langerhans são células capazes degradar o HIV-1 nos grânulos de Birbeck. No entanto, essas células também podem se infectar caso haja a exposição à altas concentrações de HIV-1 (SUGAYA et al., 2004).

Em relação às DCs migratórias, DCs plasmocitóides (pDCs) e mieloides (mDCs) CD141+ parecem apresentar um bloqueio na fusão da partícula viral. Além disso, DCs derivadas de monócitos (MDDCs) e mDCs CD1c+ expressam o fator de restrição SAMHD1, uma fosfohidrolase que mantém os níveis de dideoxynucleotídeos (dNTPs) baixos, bloqueando assim a retrotranscrição (SILVIN et al., 2017; LAHOUASSA et al., 2012). Por outro lado, MDDCs ativadas e mDCs do sangue são capazes de internalizar o vírus HIV-1 sem destruí-lo, e ao interagirem com linfócitos T CD4, liberam esses vírions, facilitando a infecção dos linfócitos através de sinapses infecciosas. Descrito há mais de 20 anos (CAMERON et al., 1992), esse fenômeno foi denominado trans-infecção.

Acredita-se que a trans-infecção tenha um papel importante na disseminação do HIV-1, permitindo que DCs transportem o vírus de tecidos para órgãos linfoides secundários, onde há grandes concentrações de linfócitos T CD4 (KIJEWski & GUMMULURU, 2015). Recentemente, Perez-Zsolt e colaboradores publicaram um estudo relatando que DCs (Siglec1+) da mucosa cervical, obtidas a partir da biópsia de pacientes HIV-1+, abrigavam compartimentos contendo HIV-1, demonstrando que *in vivo*, essas células eram capazes de capturar vírus. No mesmo estudo, também foi demonstrado que *ex vivo*, um ambiente antiviral de IFN-I era capaz de melhorar a captura de HIV-1 pelas DCs e a trans-infecção mediada por Siglec-1 (PEREZ-ZSOLT et al., 2019).

De maneira geral, durante o processo de trans-infecção, o HIV-1 é internalizado em um compartimento de pH neutro e não-degradativo, contíguo com a membrana plasmática, em muitos aspectos semelhante aos VCCs encontrados nos macrófagos. Uma série de marcadores para os VCCs de DCs foi descrita, incluindo as tetraspaninas CD9 e CD81 (GARCIA et al., 2005; GARCIA et al., 2008). Alguns estudos já evidenciaram que tais compartimentos são circundados por actina polimerizada e que sua formação requer o citoesqueleto de actina (figura 4). Além disso, a presença de inibidores da polimerização ou despolimerização de actina prejudicam a formação dos mesmos (YU et al., 2008; YU et al., 2015).

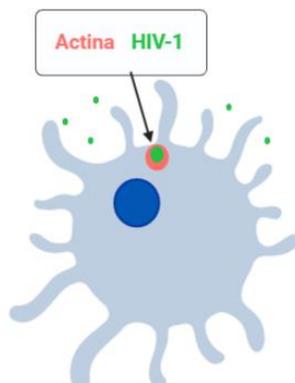


Figura 4. Representação gráfica do HIV-1 internalizado em um compartimento contíguo com a membrana plasmática circundado por actina polimerizada em DC madura. Adaptado de: YU et al., 2008.

Curiosamente, os compartimentos virais se apresentam de forma diferente em DCs imaturas e maduras. Em 2008, Yu e colaboradores publicaram um estudo demonstrando que MDDCs imaturas não estimuladas não sequestram o HIV de forma eficiente para os compartimentos em culturas de curto prazo. Nesse mesmo estudo, eles perceberam que uma hora após a exposição ao HIV, quando mais de 90% do HIV havia sido sequestrado em MDDCs estimuladas por lipopolissacarídeo (LPS), nenhuma concentração aparente de partículas de HIV ocorreu nas MDDCs imaturas. Além disso, os autores também notaram que o HIV é rapidamente degradado em DCs imaturas, mas não em MDDCs maduras (YU et al., 2008).

De maneira geral, os componentes do citoesqueleto desempenham um importante papel na disseminação do HIV-1 pelas DCs e nos processos de trans-infecção. Em 2013, Rodriguez-Plata e colaboradores relataram que a formação da sinapse infecciosa formada entre DCs maduras e as células T CD4+ foi reduzida em 60% quando a interação entre as moléculas de adesão ICAM-1 e LFA-1 foi interrompida (RODRIGUEZ-PLATA et al., 2013).

Já em relação às iDCs e às moléculas do citoesqueleto celular, pode-se destacar, por exemplo, o fato que o HIV-1 é capaz de induzir a formação de extensões de membrana através da ligação de Env a DC-SIGN, acarretando na subsequente ativação da Rho GTPase Cdc42. Abordagens como *knockdown* e inibição farmacológica direcionadas a Cdc42 visam reduzir o número de extensões de membrana e transferência de HIV-1 para células alvo (LEHMANN et al., 2011).

Além disso, os rearranjos do citoesqueleto de actina também desempenham um papel fundamental na transferência do HIV-1 através da sinapse infecciosa. Um estudo de *screening* publicado em 2016, mostrou que a tetraspanina-7 e a dinamina-2 controlam a nucleação e a estabilização cortical de actina para manter o HIV-1 nos dendritos de iDCs, para que haja uma transferência eficiente célula-célula entre iDCs e células T CD4+ quando co-cultivadas e simultaneamente infectadas com HIV-1 (MÉNAGER & LITTMAN, 2016).

Apesar dos trabalhos já publicados na área, os mecanismos moleculares da trans-infecção não foram ainda completamente elucidados. Inicialmente, o receptor DC-SIGN foi identificado como responsável pela internalização do HIV-1 nas células dendríticas (GEIJTENBEEK et al., 2000). DC-SIGN, ou CD209, é uma lectina tipo C que de fato interage com a glicoproteína gp120 do HIV-1. Alguns trabalhos mostraram que a expressão dessa molécula em linhagens celulares (como células B RAJI), lhes confere a capacidade de trans-infecção (GEIJTENBEEK et al., 2000; KWON et al., 2002).

Por outro lado, outros estudos apontaram que a internalização de HIV-1 por DC-SIGN leva à degradação do vírus (SANDERS et al., 2002; IZQUIERDO-USEROS et al., 2007). Mais tarde, alguns trabalhos deixaram claro que DC-SIGN não é essencial para a trans-infecção, e que provavelmente outros receptores estão envolvidos no processo (GUMMULURU et al., 2003; BOGGIANO et al., 2007). Adicionalmente, estudos evidenciaram que DCs maduras apresentavam maior capacidade de trans-infecção que DCs imaturas (MCDONALD et al., 2003; SANDERS et al., 2002), porém a expressão de DC-SIGN costuma ser mais baixa nas DCs maduras, novamente sugerindo que outros receptores provavelmente estavam envolvidos na trans-infecção, principalmente em DCs maduras.

Finalmente, em 2012, Izquierdo-Useros e colaboradores identificaram um receptor que era mais expresso em DCs maduras, e cujo bloqueio reduzia consideravelmente a trans-infecção nessas células: a lectina Siglec1 (IZQUIERDO-USEROS et al., 2012). Mais recentemente, um estudo publicado em 2019 demonstrou que a expressão constitutiva de Siglec-1 também era capaz de conferir suscetibilidade à infecção por HIV-1 em precursores de células dendríticas humanas (pre-DCs). Também foi observado no estudo que pre-DCs infectadas são capazes de produzir novas partículas virais infecciosas que se

acumulam em compartimentos intracelulares similares aos compartimentos contendo vírus dos macrófagos (RUFFIN et al., 2019).

1.4 Siglec1

Siglecs (lectinas do tipo imunoglobulina de ligação ao ácido siálico) são uma família de receptores reguladores expressos principalmente em células derivadas da linhagem hematopoiética e pertencentes à imunidade inata, como monócitos, macrófagos e DCs (figura 5).

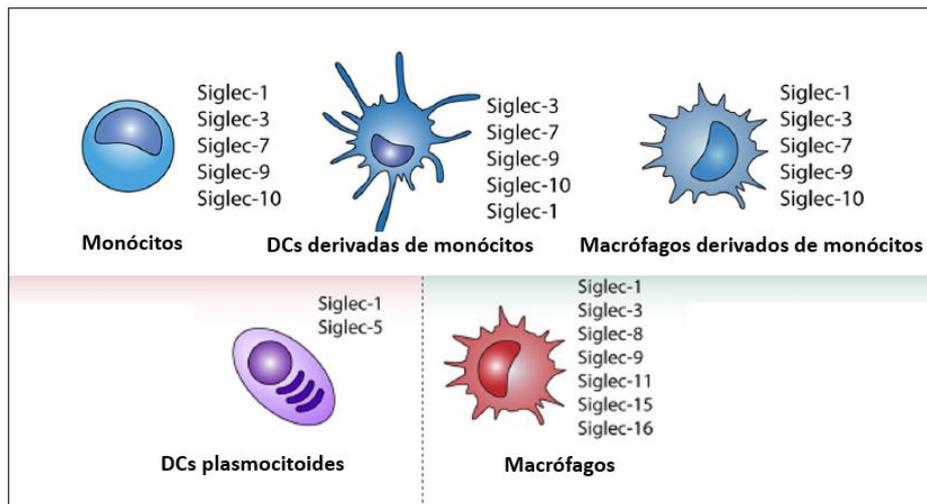


Figura 5. Expressão de Siglecs humanos em monócitos, DCs e macrófagos. Adaptado de: LÜBBERS et al., 2018.

Siglecs também são expressos em neutrófilos, basófilos, eosinófilos e células NK. Em contraste, as células imunes adaptativas, como os linfócitos T, têm níveis superficiais muito baixos ou indetectáveis dessas lectinas tipo I (LÜBBERS et al., 2018; MIKULAK et al., 2017). O envolvimento de Siglecs em resposta ao reconhecimento de resíduos glicanos microbianos foi descrito pela primeira vez como um mecanismo para “amenizar” as respostas imunes do hospedeiro após o encontro com estímulos inflamatórios (JACOBS et al., 2010; MIKULAK et al., 2017). Mais tarde, tornou-se mais evidente que os patógenos aproveitaram o reconhecimento via Siglecs, evoluindo e expressando ácidos siálicos em sua superfície, a fim de escapar das respostas inflamatórias do hospedeiro (CAO & CROCKER, 2011; PILLAI et al., 2012).

Em 2012, Izquierdo-Useros e colaboradores publicaram um estudo buscando identificar em DCs a molécula (dentro da família Siglec) capaz de mediar a captura de HIV-1 e exossomos. Nesse sentido, os autores realizaram análises do transcriptoma de DCs diferencialmente maturadas, com capacidades divergentes de capturar e transmitir HIV-1. Como resultado, Siglec-1 foi o único membro da família Siglec testado que mediou efetivamente a captura do HIV-1, embora todos os Siglecs fossem capazes de interagir com o ácido siálico por meio de seus respectivos domínios do conjunto V (Izquierdo-Useros et al., 2012).

Siglec1, também conhecido como Sialoadesina ou CD169, é uma proteína transmembrana tipo I que possui afinidade por ácido siálico com ligações $\alpha 2-3$ ou $\alpha 2-6$, se ligando a gangliosídeos sialilados, como por exemplo, GM1 e GM3 (IZQUIERDO-USEROS et al., 2014; KLASS & CROCKER, 2012). Todos os gangliosídeos são compostos de uma molécula de ceramida e de uma variedade de grupos principais de carboidratos sialilados (figura 6). Os lipossomas contendo apenas ceramida não são capturados por DCs maduras. Tal fato sugere que o grupo principal de carboidratos sialilados constitui o domínio de reconhecimento molecular.

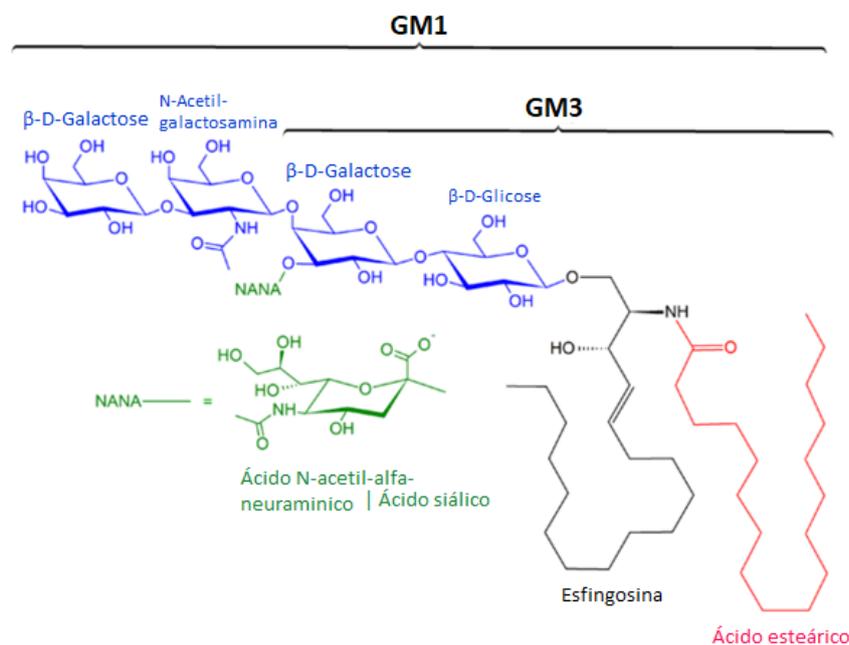


Figura 6. Estrutura química dos gangliosídeos GM1 e GM3.

Em um artigo publicado em 2014 por Izquiero-Useros e colaboradores, os autores relataram que a remoção do ácido siálico da membrana de lipossomas ou de vírus por tratamento com neuraminidase elimina a captura por DCs maduras, indicando que o ácido siálico é necessário para o reconhecimento por DC maduras, embora não seja suficiente (IZQUIERDO-USEROS et al., 2014).

Sabe-se que o HIV-1 brota de compartimentos especializados da membrana celular conhecidos como *lipid rafts*, ou balsas lipídicas. Esses compartimentos contêm combinações de colesterol, esfingomielina, glicosíngolipídios e proteínas da membrana. Nesse sentido, ao brotar, o HIV-1 é envelopado em uma membrana derivada da célula hospedeira que carrega consigo gangliosídeos, principalmente do tipo GM3, permitindo assim sua ligação ao Siglec1 (PURYEAR et al., 2012).

As partículas semelhantes a vírus (VLPs) de HIV seguem a mesma rota de tráfego do tipo selvagem de HIV-1 compartilhando o mesmo padrão molecular que governa a entrada do vírus: gangliosídeos na monocamada externa das membranas de HIV-1 e VLPs, que atuam como fatores de ligação viral, permitindo o reconhecimento e a captura viral em células mieloides via Siglec1 (IZQUIERDO-USEROS et al., 2012). Em um estudo publicado em 2017 por Hammonds e colaboradores, foi demonstrado que a adição exógena de VLPs de HIV-1 a macrófagos derivados de monócitos leva a uma rápida internalização do vírus de uma forma dependente de Siglec1 e de gangliosídeos, e não dependente da presença da glicoproteína do envelope viral (HAMMONDS et al., 2017). Juntos, esses trabalhos indicam que a captura viral via Siglec1 é dependente de gangliosídeos (presentes tanto em HIV-1 infectivos como em VLPs formadas pela proteína Gag de HIV-1) e não dependem de proteínas do envelope ou de outras proteínas acessórias do vírus.

Embora todos os Siglecs tenham potencial de interagir com gangliosídeos sialilados por meio de seus respectivos domínios do conjunto V, o número de domínios C2 do tipo imunoglobulina (Ig) pode influenciar no tipo de ligação dessas lectinas (BORNHÖFFT et al., 2018). Nesse sentido, algumas características distintas ajudam a explicar por que o Siglec1 é o membro da família que medeia efetivamente a captura do HIV-1.

Siglec1 possui uma grande região extracelular que pode ser subdividida em um domínio N-terminal do tipo imunoglobulina do conjunto V, seguido por 16 domínios do tipo Ig do conjunto C2, contando ainda com um domínio transmembranar e uma cauda citoplasmática curta (figura 7). Esses domínios separam o sítio de ligação da superfície celular, estendendo seus domínios para além do glicocálice da célula, estando disponível para interação com ligantes externos (IZQUIERDO-USEROS et al., 2014).

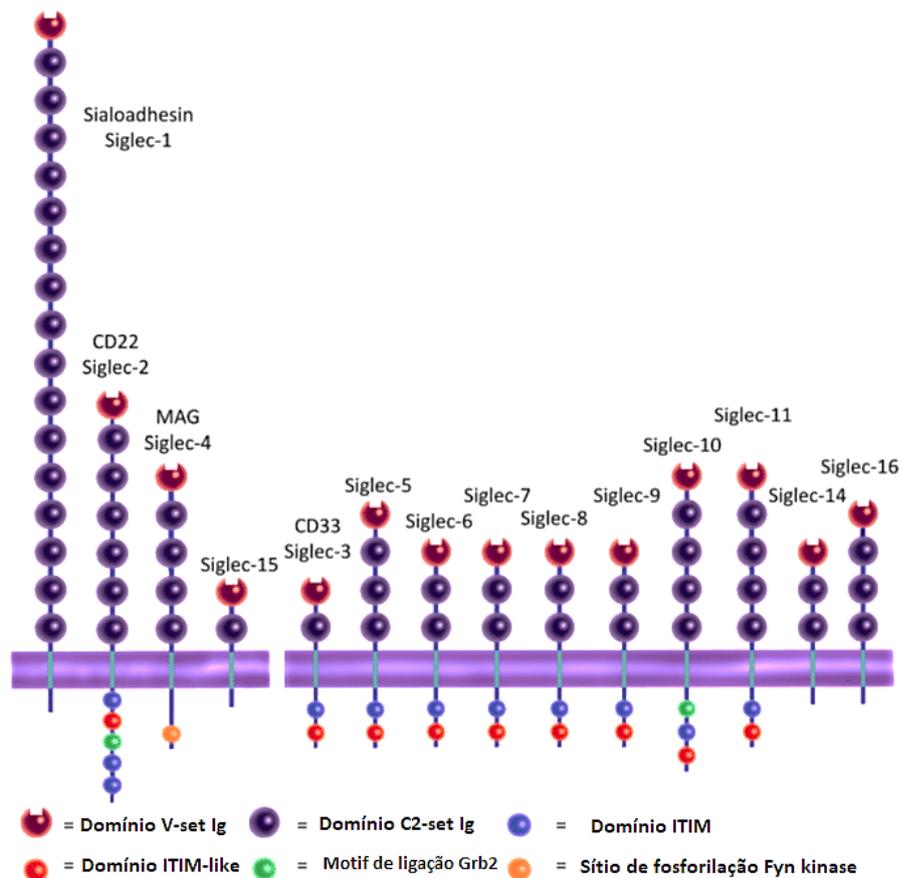


Figura 7. Estrutura e domínios dos Siglecs encontrados em humanos. Adaptado de: DE BAERE, 2012.

Sendo assim, Siglec1 (com 16 domínios C2 tipo Ig) geralmente se liga a moléculas sialiladas presentes em diferentes ligantes e patógenos como o HIV-1, de modo *trans* em células adjacentes. Outros membros da família Siglec exibem um número menor de domínios do tipo C2, como por exemplo, Siglec-3 e Siglec-15, e acabam interagindo principalmente em modo *cis*, ou seja, com

moléculas sialiladas expostas na membrana da mesma célula (figura 8) (IZQUIERDO-USEROS et al., 2014).

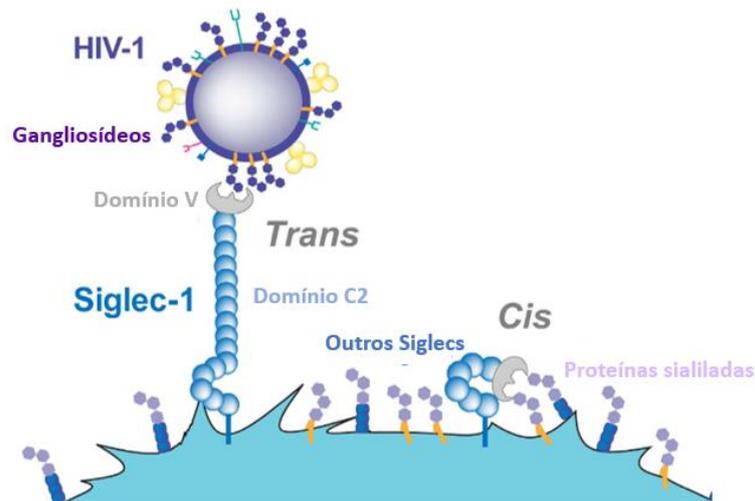


Figura 8. Siglec1 estende seu domínio do conjunto V para além do glicocálce da célula, permitindo o reconhecimento de moléculas sialiladas em diferentes ligantes e patógenos (modo *trans*). Outros Siglecs que exibem menos domínios do tipo C2 interagem principalmente em modo *cis*, com moléculas sialiladas expostas na membrana da mesma célula. Adaptado de: IZQUIERDO-USEROS et al., 2014.

Curiosamente, a cauda curta citoplasmática de Siglec1 contendo 44 aminoácidos não parece conter motivos de sinalização definidos para endocitose ou locais de fosforilação que possam contribuir para o potencial tráfego e internalização de partículas virais (AKIYAMA et al., 2015). Adicionalmente, e ao contrário de outros membros da família de Siglecs, Siglec1 não possui domínios ITIM em sua cauda citoplasmática e nem motivos semelhantes a ITIM (KLAAS & CROCKER, 2012). Ainda assim, o recrutamento de actina observado na trans-infecção sugere que a molécula seja capaz de induzir sinalização, seja diretamente ou por meio de um cofator.

Akiyama e colaboradores em 2015 demonstraram que a formação de VCCs induzida por HIV-1 é restrita a células mielóides e que a cauda citoplasmática de Siglec1 é dispensável para o tráfego e retenção de HIV-1 dentro de VCCs e subsequente trans-infecção para células T CD4+. Neste estudo, também foi sugerido que um co-fator específico de célula mieloide é capaz de interagir com Siglec1 após a captura do vírus, levando à formação de tais compartimentos

(AKIYAMA et al., 2015). Nesse sentido, alguns grupos vem mostrando que o Siglec1 murino é capaz de se associar à molécula transdutora de sinais DAP12 e induzir sinalização via Syk e SHP2 (WU et al. 2016; ZHENG et al. 2015).

A ativação imune sistêmica crônica é uma marca registrada da infecção progressiva pelo HIV-1, e vários fatores pró-inflamatórios podem induzir a expressão de Siglec1 e contribuir para a trans-infecção. Um desses fatores é o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), que é aumentado no plasma de indivíduos infectados pelo HIV-1 devido à translocação bacteriana que ocorre no tecido linfóide associado ao intestino como consequência da ruptura da barreira epitelial intestinal que ocorre logo após a infecção pelo HIV-1 (figura 9) (BRENCHLEY et al., 2006).

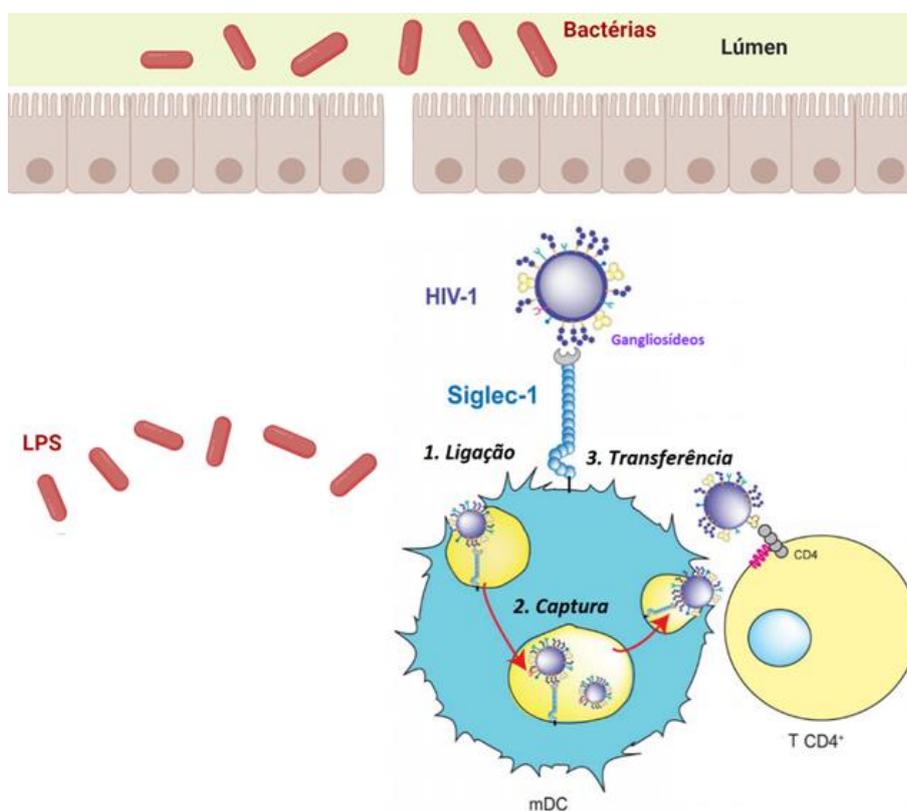


Figura 9. O LPS bacteriano é capaz de induzir um aumento na expressão de Siglec1 em DCs. Com o aumento da expressão, as DCs são capazes de capturar e internalizar vírions a partir de Siglec1 em compartimentos e transferi-los para linfócitos T CD4+. Adaptado de: IZQUIERDO-USEROS et al., 2014.

A capacidade de trans-infecção dos macrófagos é muito inferior à das DCs (PINO et al., 2015). É possível que a internalização por Siglec1 em macrófagos culmine com a degradação do vírus, como sugerido por Pino e colaboradores (2015). Por outro lado, em 2017, Hammonds e colaboradores apresentaram evidências de que Siglec1 pode ser importante na formação de VCCs em macrófagos. Nesse estudo de 2017, os autores demonstraram que a formação do VCC não requer de fato a infecção do macrófago, mas pode ser reproduzida através da adição exógena de VLPs não infecciosas ou vírions infecciosos a culturas de macrófagos. Os autores observaram que a adição exógena de VLPs de HIV-1 levou a uma rápida internalização no VCC de forma dependente de Siglec-1 e gangliosídeos, e independente da presença da glicoproteína do envelope viral. Além disso, também foi possível observar que a depleção de Siglec-1 em macrófagos derivados de monócitos (MDMs) infectados com HIV-1 resultou em uma redução drástica no volume geral do VCC (HAMMONDS et al., 2017).

A importância in vivo de Siglec1 e da trans-infecção na infecção pelo HIV-1 ainda não foi determinada. Em camundongos, o vírus da leucemia murina (MLV, que assim como HIV-1 é um retrovírus) é capturado por macrófagos CD169+ que não são infectados, mas transmitem o MLV para suas células-alvo, os linfócitos B. O mesmo trabalho mostrou que, em camundongos humanizados, o HIV-1 também é capturado por macrófagos CD169+ (SEWALD et al., 2015).

Em contrapartida, Martinez-Picado e colaboradores em 2016 identificaram ao menos dois indivíduos HIV+ com mutações de perda de função no gene que codifica o Siglec1, indicando que a trans-infecção in vivo talvez não seja essencial para o sucesso da infecção pelo HIV-1. Ou que, in vivo, outros receptores também possam contribuir para a trans-infecção (MARTINEZ-PICADO et al., 2016).

Além do vírus HIV, outros patógenos sialilados são capazes de se ligar a Siglec1, assim como a outros Siglecs. Tanto Siglec-1 quanto Siglec-7, por exemplo, podem reconhecer lipooligosacarídeos sialilados de *Campylobacter jejuni* expressando ácido siálico com ligações α 2-3 (HEIKEMA et al., 2010) e α 2-8 (AVRIL et al., 2006), respectivamente. Além de *C.jejuni*, Jones e colaboradores demonstraram em estudo publicado em 2003 que Siglec1 presente em macrófagos é capaz de se ligar à *Neisseria meningitidis*. De forma similar, uma

interação moderada entre *N. meningitidis* e Siglec-5 também foi relatada pelo mesmo grupo (JONES et al. 2003).

Mais recentemente, em 2019, Perez-Zsolt e colaboradores demonstraram que o vírus Ebola, ao ser liberado da membrana das células infectadas, incorpora gangliosídeos GM1 e sua entrada em DCs ativadas requer a lectina Siglec1. O grupo também demonstrou que ao bloquear a função de Siglec1 utilizando anticorpos monoclonais, a captação e a entrada citoplasmática do vírus Ebola eram interrompidas em DC ativadas (PEREZ-ZSOLT et al., 2019).

Todavia, pouco se sabe ainda sobre os mecanismos moleculares envolvidos na internalização e sinalização por Siglec1 ou se há proteínas/cofatores auxiliando Siglec1 nesses processos. O conhecimento envolvido na elucidação desses mecanismos poderá abrir caminho para o desenvolvimento de novas terapias voltadas para o reservatório virais em macrófagos ou para a disseminação do HIV-1 por DCs. Os resultados desse projeto também poderão ser confrontados com a internalização de outros patógenos via Siglec1 e, portanto, fornecer informações ainda mais amplas sobre a biologia desse receptor.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste projeto consiste na identificação de proteínas com possível potencial de interação com Siglec1 em macrófagos e células dendríticas derivados de monócitos humanos após a ligação de partículas semelhantes a vírus (VLPs) de HIV-1.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar proteínas que são co-immunoprecipitadas com Siglec1 quando este está ligado a VLPs de HIV-1, em macrófagos e células dendríticas humanas.
- Validar algumas das proteínas identificadas em comum entre os doadores no processo de captura e internalização das VLPs de HIV-1 e compreender seus papéis biológicos no interatoma da via Siglec1/HIV-1.

3. Materiais e métodos

3.1 Células

Foram utilizadas células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) de doadores humanos saudáveis, obtidas a partir de sobras de aférese de plaquetas. Os doadores assinaram um termo de consentimento para a doação do material. Os PBMCs foram isolados por gradiente de densidade utilizando Ficoll (GE). Os monócitos foram isolados por purificação magnética utilizando *beads* complexadas com anti-CD14 (Miltenyi Biotec) e diferenciados em macrófagos ou células dendríticas. Para diferenciação, monócitos CD14⁺ foram cultivados em RPMI com 10% de soro bovino fetal (Hyclone), 50 unidades/mL de penicilina e 50 µg/mL de estreptomicina (Thermo). Os monócitos foram estimulados com as citocinas IL-4 (40 ng/mL) e de GM-CSF (10 ng/mL) por 5 dias para diferenciação em DCs e com M-CSF (25ng/mL) para diferenciação em macrófagos. No quinto dia, DCs foram ativadas com 100 ng/mL de LPS e macrófagos com 10 ng/mL de LPS por 24h para expressarem maiores quantidades de Siglec1 (figura 10).

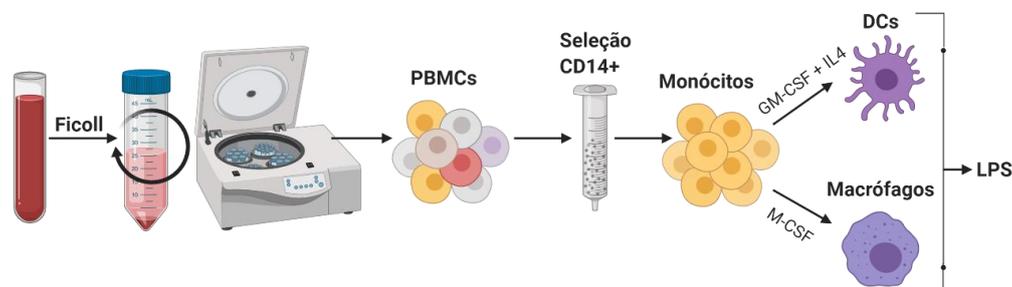


Figura 10. Desenho esquemático metodológico de diferenciação de PBMCs.

3.2 Citometria de fluxo

Alíquotas de células diferenciadas não ativadas e ativadas com LPS foram recolhidas para análises de citometria de fluxo, para visualizar se as células ativadas estavam expressando Siglec1. As células foram lavadas com tampão fosfato-salino (PBS) para retirada do meio, e incubadas por 20 minutos a 4°C com anticorpo anti-Siglec1 Alexa Fluor 647 (BD Bioscience, clone 7-239) e anti-isotipo controle mouse IgG Alexa Fluor (BD Bioscience, clone MOPC-21) diluídos em tampão MACS (PBS, 2% de soro fetal bovino, EDTA 2mM). Após os 20 minutos, as amostras foram lavadas duas vezes em tampão MACS, e fixadas

em paraformaldeído (PFA) 1% para análises de citometria. As células foram adquiridas em um BD FACSCanto e/ou em um citômetro de fluxo BD Accuri. Os resultados foram analisados com o software FlowJo (BD).

Para a estratégia de *gating*, foram feitos inicialmente *gates* em FSC x SSC selecionando as DCs e/ou macrófagos. Em seguida, foram realizados *gates* em FSC-H x FSC-A, para selecionar células isoladas (*single cells*) e por fim, foram selecionadas as células Siglec1 positivas. Os resultados foram apresentados em formato histograma count x APC ou FL4-A, como demonstra o exemplo disponível na figura 11.

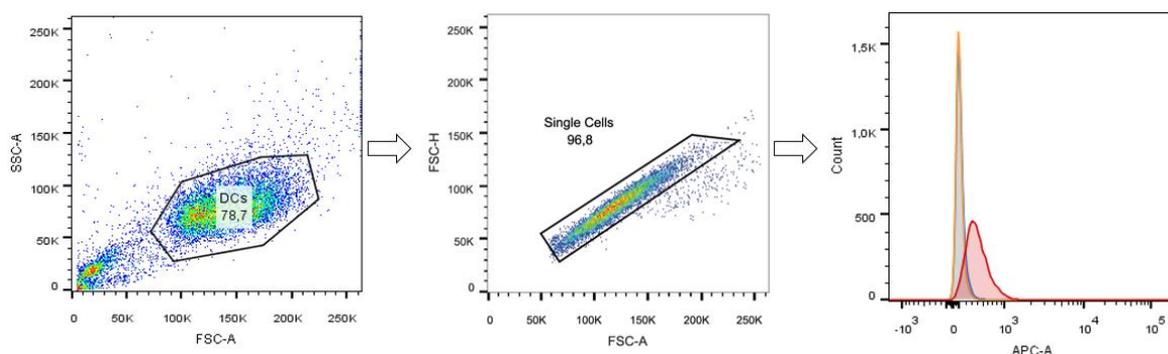


Figura 11. Estratégia de *gating* (doador 4 de DCs). Foram feitos inicialmente *gates* em FSC x SSC selecionando as DCs. Em seguida, foram realizados *gates* em FSC-H x FSC-A, para selecionar células isoladas e por fim, foram selecionadas as células Siglec1+.

3.3 Produção de VLPs de HIV-1

Devido a maior biossegurança e devido ao fato que as proteínas do envelope viral podem se ligar a receptores como DC-SIGN e CD4, direcionando o HIV-1 para outras vias de internalização que não estão no escopo do presente projeto, nós decidimos trabalhar apenas com VLPs de HIV-1.

Para a produção das VLPs de HIV-1, células HEK293T (cerca de 70% de confluência) foram transfectadas em garrafas T150 com meio DMEM completo e com o plasmídeo psPAX2 (80 µg), utilizando polietilenoimina (PEI) (208 µg) como reagente de transfecção. O psPAX2 contém a sequência dos genes Gag, Pol, Rev e Tat do HIV-1 e foi obtido por meio do AIDS Reagent Program, do NIH. O meio foi trocado 8-16h após a transfecção e o sobrenadante recolhido 48h após a transfecção.

O sobrenadante contendo vírus foi centrifugado a 2.500 rpm por 5 minutos para remoção de debris celulares e então filtrado em filtro 0,22 μm . Após, foi realizada outra centrifugação a 10.000 rpm por 2h sobre solução de sacarose 20% em tampão TNE (Tris, NaCl, EDTA). As VLPs presentes no pellet foram ressuspensas em RPMI completo e congeladas a -80°C até sua utilização.

Para experimentos de imunofluorescência, foram produzidas de maneira similar VLPs-GagGFP a partir da transfecção de HEK293T utilizando os plasmídeos psPAX2 e pN1-Gag-GFP (gentilmente cedido pelo Dr. Luis Lamberti) em uma proporção 5:1, respectivamente. Por fim, as VLPs foram quantificadas utilizando o kit de ELISA Innotest HIV antigen (Fujirebio), conforme instruções do fabricante.

3.4 Transfecção e superexpressão de Siglec1 em HEK293T para padronização de ensaios

Para obter-se amostras iniciais com maiores quantidades de Siglec1 com finalidade de padronização, garrafas grandes contendo células HEK293T, com confluência em torno de 70-80%, foram transfectadas com o plasmídeo bicistrônico pCD169IRESTomato (80 μg , gentilmente cedido por Suryaram Gummuluru, Boston University School of Medicine) (AKYIAMA et al., 2015) utilizando PEI (280 μg) como reagente de transfecção. O meio foi trocado 8-16h após a transfecção, e após 48h, as células foram lavadas com PBS e desaderidas com PBS 10mM EDTA das garrafas. Por fim, as células foram lisadas em tampão de lise (50mM de TrisHCl, 5mM de MgCl₂ e 0,5% de NP40). O lisado foi então quantificado por Bradford e utilizado para todos os ensaios de padronização. As HEK293T não foram incubadas com VLPs, pois as padronizações tinham como finalidade apenas a imunoprecipitação de Siglec1.

3.5 Teste de tampões de lise para extração de Siglec-1

Células HEK293T superexpressando Siglec1 foram lisadas para avaliação da extração de Siglec1 por Western Blotting. Foram testados três tampões de lise para extrair o máximo possível de Siglec1, sendo eles:

- I. Tampão 1: TrisHCl 25mM, NaCl 150mM, EDTA 1mM, NP40 1%, glicerol 5% e inibidor de protease.

- II. Tampão 2: TrisHCl 50mM, NaCl 50mM, digitonina 1% e inibidor de protease.
- III. Tampão 3: TrisHCl 50mM, MgCl₂ 5mM, NP40 0,5% e inibidor de protease.

Após 30 minutos de incubação no gelo em tampão de lise, as amostras foram centrifugadas a 12.000 xg por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi salvo para quantificação proteica por Bradford e western blotting.

Tampões com NP40 e digitonina foram escolhidas pois contém detergentes não iônicos mais suaves e são ideais para solubilizar proteínas de membrana. As proteínas retêm seu estado nativo na presença desses detergentes e as interações proteína-proteína podem ser preservadas. Sendo assim, são tampões mais adequados para uso em co-imunoprecipitações.

3.6 Quantificação de proteínas pelo método de Bradford

A dosagem de proteínas do lisado celular foi mensurada utilizando o reagente Coomassie Brilliant Blue (Life Technologies). Para isso, foi realizado uma curva padrão utilizando diluições seriadas de albumina sérica bovina (BSA) em água mili-Q. As amostras diluídas de BSA e de lisado foram incubadas com Coomassie por 10 minutos em uma placa de 96 poços, e lidas em espectrofotômetro a 595 nm.

3.7. Incubação de DCs e macrófagos com VLPs de HIV-1 e lise celular

As células ativadas por 24h com LPS para expressarem grandes quantidades de Siglec1 foram incubadas com VLPs (400 ng de VLPs em 1,5 mL de RPMI por poço) no sexto dia por 1h a 37°C em placas de 6 wells. Foram plaqueadas em torno de 1 milhão de células por poço. Em seguida, as células foram lavadas ao menos 3x em PBS para retirada de VLPs não ligadas e em seguida lisadas em tampão de lise.

Após 30 minutos de incubação no gelo em tampão de lise, as amostras foram centrifugadas a 12.000 xg por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi salvo para quantificação proteica e co-imunoprecipitação (figura 12).

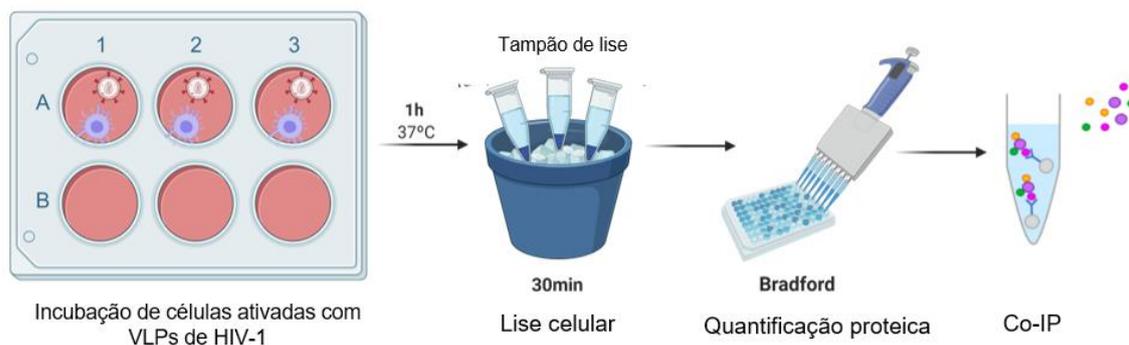


Figura 12. Imagem esquemática da incubação das células com VLPs e lise celular. As células ativadas foram incubadas com VLPs de HIV-1 por 1h a 37°C. Após incubação em tampão de lise, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi salvo para quantificação proteica e co-imunoprecipitação.

3.8 Co-imunoprecipitação (co-IP)

Após quantificação proteica, o lisado foi utilizado para imunoprecipitar Siglec1 e co-imunoprecipitar proteínas que potencialmente interagem com Siglec1. Foram realizados testes de co-IP com o kit Pierce Co-Immunoprecipitation (26149) da Thermo Scientific, utilizando 10 µg de cada anticorpo e 50 µl de resina amino-reativa. Todavia, o kit 26149 não apresentou resultados satisfatórios e a co-imunoprecipitação foi realizada utilizando o kit Pierce™ Direct Magnetic IP/Co-IP (88828) da Thermo Scientific, conforme instruções do fabricante e adaptações de protocolo (figura 13).

O kit 88828 conta com *beads* magnéticas ativadas contendo grupos funcionais de N-hidroxissuccinimida, que reagem com aminas primárias de anticorpos para formar ligações amidas estáveis. Foram utilizados os anticorpos anti-Siglec1 monoclonal clone 7239 (BioLegend, CAT346002) e um anti-isotipo monoclonal IgG1 κ controle (Abcam, ab18443).

O isotipo controle serve como controle negativo para a co-imunoprecipitação, pois não possui especificidade para o alvo, mas corresponde à mesma classe e tipo do anticorpo principal.

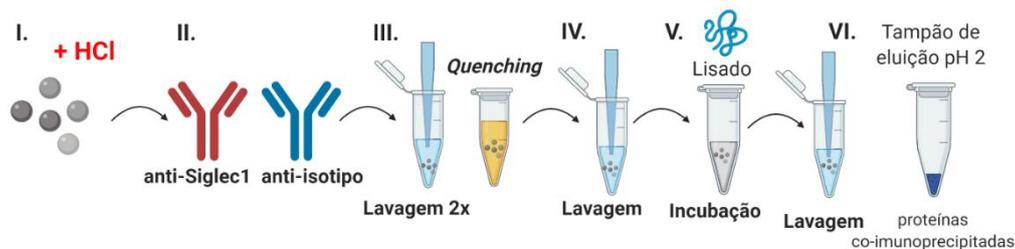


Figura 13. Desenho esquemático da co-imunoprecipitação baseada em *beads* magnéticas. **I.** As *beads* são lavadas em HCl 1mM gelado. **II.** Os anticorpos são acoplados às *beads* por 1h. **III.** As *beads* são lavadas 2x com tampão de eluição e incubadas com tampão de *Quenching* por 1h. **IV.** As *beads* são lavadas com tampão de borato modificado e com tampão de lavagem. **V.** O lisado é incubado com as *beads* acopladas aos anticorpos por 2 horas. **VI.** Por fim, as *beads* são lavadas com tampão de lavagem, água ultrapura e os antígenos eluídos em tampão de eluição pH 2.

3.9 Western Blotting

A técnica de Western Blotting foi utilizada para validar a presença de Siglec1 e outras proteínas de interesse nas amostras eluídas da co-IP. Sendo assim, as amostras foram desnaturadas a 95°C por 5 minutos em tampão Laemelli (Thermo Fisher) contendo 10% de β -mercaptoetanol. As proteínas foram aplicadas em gel pronto mini-protean TGX™ 4-15% (Biorad, 456-1083) e submetidas à eletroforese. A transferência das proteínas do gel para membrana PVDF foi feita na Trans-Blot Cell (Biorad) com tampão de transferência (Tris-Glicina-Metanol) a uma corrente de 30V overnight (transferência molhada) ou na Trans-Blot Turbo (Biorad) com tampão de transferência (Tris-Glicina-Metanol) a 25V por 30 minutos (transferência *semi-dry*).

A membrana foi bloqueada em solução salina tamponada com Tris (TBS) 5% leite em pó por 1 hora e posteriormente incubada com anticorpo primário de interesse por 2 horas a temperatura ambiente, lavada com TBS acrescido de tween 20 (TBST) e incubada por mais 2 horas com anticorpos secundários *horseradish peroxidase* (HRP) específicos. As imagens da membrana foram adquiridas a partir do substrato Clarity Max Western ECL (Biorad), utilizando a plataforma IMAGEQUANT LAS 4000 (GE Healthcare).

Para as análises de Western Blotting, foram usados os anticorpos primários: anti-Siglec1 (Santa Cruz Biotechnology, sc53442), anti-Sintena1 (Thermo Fisher, PA528826) e anti-L-plastina (Thermo Fisher, MA534819). E

como secundários: anti-mouse IgG HRP (Thermo Fisher, 62-6520) e anti-rabbit IgG HRP (Thermo Fisher, A16096).

3.10 Digestão e dessalinização de peptídeos em solução

As amostras co-imunoprecipitadas encontravam-se em solução em tampão de eluição (glicina pH 2), e neutralizadas em tampão de neutralização (Tris pH 9). Tais amostras foram quantificadas utilizando o fluorômetro Qubit (Thermo Fisher). Para o processo de digestão, foi adicionado bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3) e as pontes dissulfeto foram reduzidas utilizando DTT 10 mM durante 45 minutos a 30°C. As cisteínas reduzidas foram alquiladas com iodoacetamida 40mM em NH_4HCO_3 por 30 minutos no escuro a temperatura ambiente. Foi adicionado DTT a uma concentração final de 5mM e incubado por mais 15 minutos a 30°C. Após, foi adicionado tampão de digestão contendo tripsina e as amostras foram incubadas overnight a 30°C. A digestão foi parada adicionando ácido trifluoroacético, e os peptídeos foram dessalinizados utilizando Stage Tips C18 (Sigma).

3.11 Plataforma nanoLC Easy-LTQ Orbitrap Velos-ETD e identificação dos peptídeos

As amostras digeridas e dessalinizadas foram enviadas para o serviço de espectrometria de massas do Centro de Facilidades de Apoio a Pesquisa (CEFAP) USP para a identificação das proteínas co-imunoprecipitadas. As amostras de peptídeos foram ressuspendidas em ácido fórmico 0,1% antes das análises utilizando um sistema EASY-nLC™ 1200 de nano-fluxo acoplado a espectrômetro de massas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Scientific).

Os peptídeos foram carregados em uma coluna de armadilha Acclaim PepMap C18 (Thermo Germany) (2 cm x 100 μm de diâmetro interno; 5 μm) e separados em uma coluna Acclaim PepMap C18 (15 cm x 75 μm de diâmetro interno; 3 μm), e um gradiente de 100% de fase móvel A (0,1% AF) a 34% de fase B (0,1% AF, 95% ACN) durante 30 min, 34% -95% por 10 min e 5 min a 95%, a uma taxa de fluxo constante de 250 nL/min. O espectrômetro de massas foi operado em modo iônico positivo com aquisição dependente de dados.

A varredura completa foi adquirida no Orbitrap com uma resolução de 60.000 FWHM na faixa de massa de 400-1600 m/z com tempo máximo de

injeção de 50ms. Os íons peptídicos foram selecionados utilizando o quadrupolo com uma janela de isolamento de 1,2 e fragmentados com CID MS/MS usando uma energia de colisão normalizada de 30. A aquisição dependente de dados com um tempo de ciclo de 1 segundo foi utilizada para selecionar os íons precursores para fragmentação.

As proteínas foram identificadas pelo software MaxQuant. Tal software inclui o mecanismo de pesquisa Andromeda, bem como o aplicativo visualizador para inspeção de dados brutos e resultados de identificação e quantificação. Para análise estatística, o MaxQuant conta com o framework Perseus. Para a identificação de proteínas, foi utilizado um banco de proteínas revisado concatenado de *Homo sapiens* e HIV-1 (Uniprot).

As análises *in silico* realizadas contra o banco de dados concatenado do Uniprot geraram como *output* diversas informações a respeito dos peptídeos identificados, como por exemplo:

Tabela 1. *Output* das análises *in silico* de identificação das proteínas co-imunoprecipitadas

Output	Descrição
ID_Uniprot	Identificação de acesso na base de dados do Uniprot
Protein	Nome da proteína identificada
Gene	Gene correspondente
kDa	Peso molecular em kDa
Subcellular localization	Localização subcelular da proteína

Além disso, também foi realizada uma exploração dos dados no que diz respeito a contaminação. Nesse sentido, os peptídeos selecionados foram carregados contra um repositório de contaminantes para dados de espectrometria de massas de purificação por afinidade, denominado CRAPome (disponível em <https://www.crapome.org/>). O parâmetro Max SC obtido pelas análises do CRAPome refere-se ao número máximo de contagens espectrais nas quais um produto de um gene foi identificado em todos os experimentos

disponíveis no CRAPome. Sendo assim, quanto maior o Max SC, maior a chance de ser um contaminante naquela amostra.

É válido ressaltar que o *output* de algumas tabelas disponíveis no tópico “resultados e discussão” com as proteínas identificadas foi mantido em inglês para uma melhor visualização dos resultados, visto que nem todas as proteínas identificadas, de maneira geral, tem uma tradução para o português padronizada.

3.12 Imunofluorescência e microscopia de fluorescência

Após a identificação por espectrometria de massas das proteínas co-imunoprecipitadas com Siglec1, foram selecionadas algumas proteínas de interesse para validação por microscopia de fluorescência. Para a etapa de marcação para imunofluorescência, DCs foram previamente incubadas com VLPs GagGFP (cerca de 100.000 células para 100ng de VLPs GagGFP por poço) por 2h a 37°C em placas de 96 poços. Após a incubação, as DCs (pulsadas ou não com VLPs) foram lavadas com PBS, ressuspensas e colocadas sobre lamínulas tratadas previamente com poli-L-lisina e incubadas à 37°C por 10 minutos. Após aderirem às lamínulas, as células foram fixadas em PFA 4% por 30 minutos, lavadas com PBS e tratadas por 20 minutos com BSA/Saponina.

Posteriormente, as lamínulas com DCs foram incubadas com anticorpos primários de interesse por 1h à temperatura ambiente. Após lavagens com BSA/Saponina, foi realizada uma incubação de 1h à temperatura ambiente com os respectivos anticorpos secundários. Por fim, as lamínulas foram lavadas com BSA/Saponina e colocadas sobre lâminas de vidro usando meio de montagem Vectashield com DAPI (Vectorlabs). As amostras foram analisadas em microscópio de fluorescência AxioVert A1 Carl Zeiss, com software Zen 2 (Blue Edition).

Para marcação por imfluorescência, utilizamos os anticorpos anti-Siglec1 (Santa Cruz Biotechnology, sc53442), anti-sintenina1 (Thermo Fisher, PA528826) e anti-L-plastina (Thermo Fisher, MA534819).

4. Resultados

4.1 Teste de tampões de lise

Foram testados três tampões de lise a fim de descobrir qual formulação se mostrava a mais adequada para extrair a maior quantidade de Siglec1. Para tal teste, DCs diferenciadas e ativadas foram divididas igualmente em três grupos (600.000 células por grupo), a partir de três tampões de lise diferentes, conforme especificado no tópico “Incubação de DCs e macrófagos com VLPs de HIV-1 e lise celular”, citado anteriormente na metodologia.

Todas as DCs foram incubadas com a mesma quantidade (80 μ L) de tampão de lise acrescida de inibidor de protease por 30 minutos no gelo. Após, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi salvo para dosagem de proteínas por Bradford. A quantidade de proteínas totais obtidas a partir dos diferentes tampões mostrou-se similar: o tampão 1 apresentou uma quantidade final proteica de 0,36 mg, o tampão 2 de 0,16 mg e o tampão 3 de 0,32 mg. As concentrações foram normalizadas e aplicadas na mesma quantidade no gel para visualização por Western Blotting. A membrana foi incubada com um anticorpo primário anti-Siglec1 e um secundário anti-mouse HRP para detecção dos níveis de Siglec1 nas amostras de lisado de DCs.

Foi possível observar por Western Blotting que os tampões de lise extraíram diferentes quantidades de Siglec1 (figura 14). Em suma, o tampão 3 (TrisHCl 50mM, MgCl₂ 5mM e 0,5% de NP40) foi o tampão que melhor extraiu Siglec1 das DCs e, portanto, foi o tampão escolhido para lise de todas as amostras deste trabalho.



Figura 14. Membrana de Western Blotting incubada com anti-Siglec1 para teste de extração de CD169 em DCs com diferentes tampões de lise. **1.** Tampão com TrisHCl 25 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1mM, 1% NP40 e 5% de glicerol. **2.** Tampão com TrisHCl 50mM, NaCl 50mM e 1% digitonina. **3.** Tampão com TrisHCl 50mM, MgCl₂ 5mM e 0,5% NP40.

4.2 Padronização da co-imunoprecipitação utilizando HEK293T

Devido ao fato das células primárias mieloides demorarem um tempo considerável (em torno de uma semana) para estarem diferenciadas e ativadas, e também devido ao fato que são necessárias grandes quantidades de células primárias para se obter uma concentração adequada de Siglec1 para a co-IP, as padronizações iniciais do protocolo de imunoprecipitação foram feitas a partir de lisado de HEK293T superexpressando Siglec1 a partir da adição exógena (transfecção) do plasmídeo bicistrônico pCD169Tomato. O pCD169Tomato expressa uma proteína fluorescente repórter (tdTomato) em paralelo ao Siglec1, de modo que as células transfectadas podem ser detectadas em microscopia de fluorescência. Dessa forma, antes da obtenção do lisado, confirmamos por microscopia de fluorescência que as células HEK293T estavam expressando a proteína fluorescente tdTomato e, portanto, Siglec1 (figura 15).

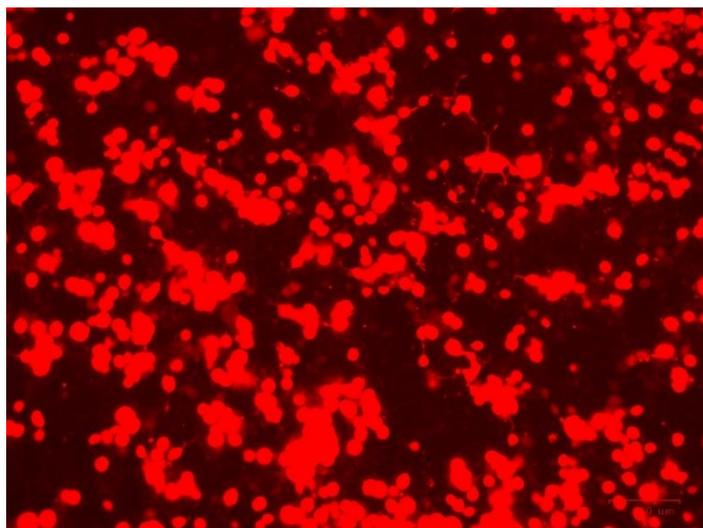


Figura 15. Microscopia de fluorescência de células HEK293T transfectadas com pCD169Tomato.

Após a confirmação de expressão por microscopia de fluorescência, o lisado proteico de HEK293T foi utilizado para imunoprecipitação de Siglec1. Inicialmente, testamos o kit Pierce Co-Immunoprecipitation (26149) da Thermo Scientific. Esse kit conta com um sistema de colunas e uma resina amino-reativa, denominada resina AminoLink Plus. Essa resina é utilizada para o acoplamento de anticorpos. Nesse caso, dos anticorpos anti-Siglec1 e anti-isotipo controle. Utilizamos 1,5 mg/mL de lisado em um volume total de 400 μ l e realizamos a

imunoprecipitação seguindo instruções de protocolo do kit Pierce Co-Immunoprecipitation (26149).

Como é possível observar na figura 16, o protocolo de imunoprecipitação não funcionou de maneira eficiente. A banda correspondente à amostra eluída previamente incubada com resina acoplada com anti-Siglec1 na co-IP se mostrou muito fraca. Visivelmente, a maior parte de Siglec1 presente no lisado não conseguiu ligar-se à resina. Concentrando-se, portanto, no *flow-through*.

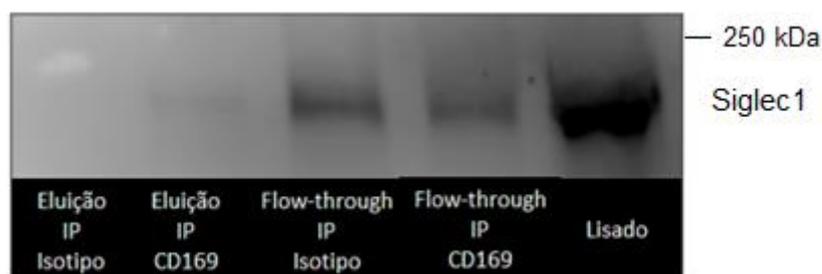


Figura 16. Western blotting da imunoprecipitação de Siglec1 a partir de lisado de HEK293T utilizando o kit Pierce Co-Immunoprecipitation 26149 (Thermo Scientific). A membrana foi incubada com anti-Siglec1.

Com o propósito de melhorar a eficiência do processo e a quantidade de Siglec1 ligado à resina, foram feitas mais algumas tentativas de imunoprecipitação com kit de co-IP 26149 (Thermo Scientific) com novas adaptações de protocolo. Foram feitos diversos testes modificando a quantidade de resina e de anticorpo, diálise do anticorpo e mudanças no tempo de acoplamento, porém sem sucesso (dados não mostrados). Como a eficiência do processo não melhorou, optamos por mudar o kit de co-imunoprecipitação.

Novos testes de padronização foram feitos utilizando o kit Pierce™ Direct Magnetic IP/Co-IP (88828) da Thermo Fisher Scientific. Enquanto o kit anterior possuía um sistema de colunas e resina amino-reativa, o kit Pierce™ Direct Magnetic IP/Co-IP conta com *beads* magnéticas ativadas que reagem com aminas primárias de anticorpos.

Seguindo instruções de protocolo do novo kit, testamos a utilização de 5 µg de anticorpo e 25 µl de *beads* por amostra, mantendo a concentração proteica de lisado de HEK padronizada anteriormente. Todavia, essa concentração de anticorpo não foi suficiente para melhorar a imunoprecipitação de Siglec1. Sendo

assim, repetimos a IP dobrando a quantidade de anticorpo (10 μ g cada) e mantendo 25 μ l de *beads* por amostra.

Com a nova abordagem, apesar de haver uma parte de anticorpo que não conseguiu se ligar às *beads*, como é possível notar nas amostras de *flow-through* (FT) dos anticorpos, finalmente, foi possível obter uma quantidade boa e considerável de Siglec1 imunoprecipitado (figura 17).

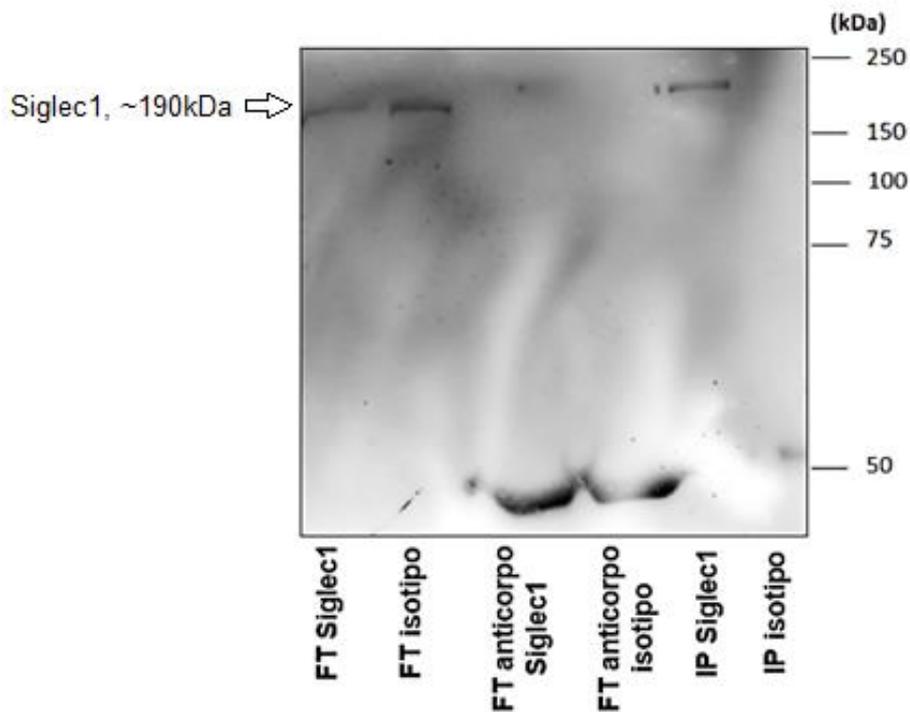


Figura 17. Western blotting da imunoprecipitação padronizada de Siglec1 a partir de lisado de HEK293T utilizando o kit Pierce™ Direct Magnetic IP/Co-IP 88828 (Thermo Scientific). A membrana foi incubada com anti-Siglec1.

Após a padronização das condições de IP de Siglec1 em lisado de HEK, foi realizada uma coloração por prata em gel de poliacrilamida para visualizar se nas amostras eluídas vieram proteínas co-imunoprecipitadas com Siglec1 (figura 18).

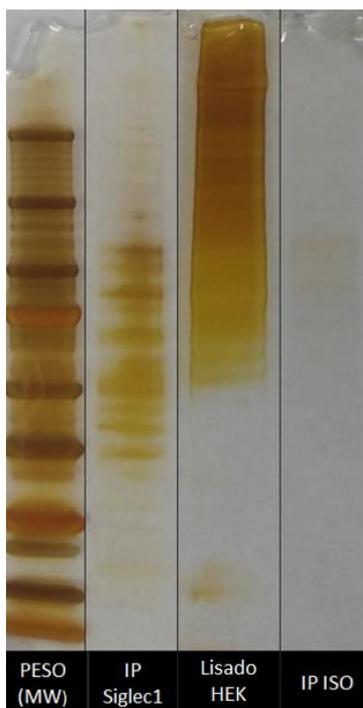


Figura 18. Coloração por prata das amostras eluídas padronizadas da co-imunoprecipitação com Siglec1 em lisado de HEK293T.

Foi possível confirmar pela coloração por prata que vieram proteínas eluídas além de Siglec1 na amostra previamente acoplada com anti-CD169, e uma quantidade bem menor de proteínas na amostra com anti-isotipo. Isso demonstra que além da imunoprecipitação de Siglec1, o protocolo de co-imunoprecipitação de outras proteínas também funcionou.

4.3 Co-imunoprecipitação de Siglec1 em células dendríticas derivadas de monócitos (MDDCs)

Visto que MDDCs maduras expressam mais Siglec1 e são melhores em trans-infecção que MDDCs imaturas, utilizamos o fator pró-inflamatório LPS para geração de MDDCs maduras. Nesse sentido, a fim de confirmar que o tratamento com LPS funcionou nas DCs de quatro doadores humanos e que, portanto, temos quantidades de Siglec1 suficiente para a imunoprecipitação, submetemos as células, com LPS (100ng/mL) e sem LPS, à citometria de fluxo (figura 19).

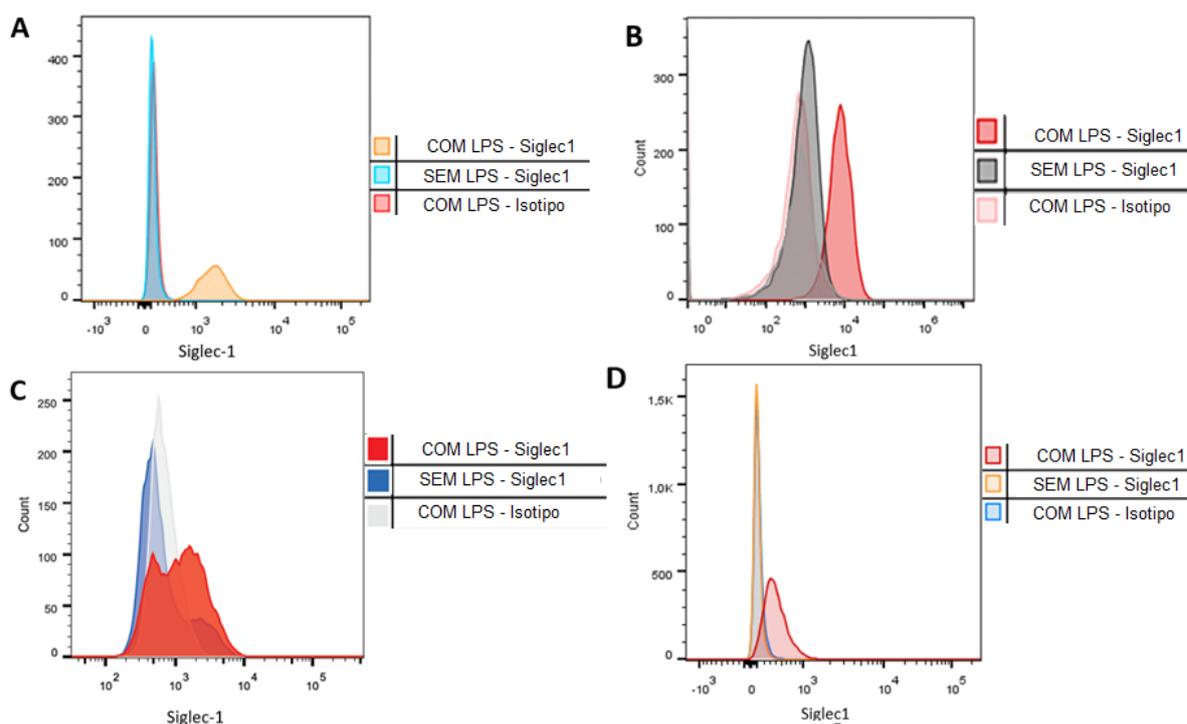


Figura 19. Citometria de fluxo das MDDCs com e sem LPS para análise de expressão de Siglec1. **(A)** doador 1, **(B)** doador 2, **(C)** doador 3 e **(D)** doador 4.

A figura 19 confirma que a ativação *in vitro* com LPS induziu o aumento de expressão de Siglec1 em células dendríticas. Sendo assim, as MDDCs ativadas de quatro doadores foram utilizadas para a incubação com as VLPs de HIV-1 por 1h. O protocolo de incubação de DCs com as VLPs de HIV-1 foi baseado em experimentos padronizados previamente no nosso laboratório e com base em alguns estudos já publicados na literatura.

Subsequente à lise, a co-IP foi realizada com o kit Pierce™ Direct Magnetic IP/Co-IP (88828) da Thermo, seguindo algumas adaptações já estabelecidas na padronização com HEK293T. Contudo, dessa vez, dobramos a quantidade de *beads* para 50 μ l, de anticorpo para 20 μ g e utilizamos o lisado em uma concentração de 2 mg/mL para o volume final de 400 μ L por amostra.

Apesar da imunoprecipitação de Siglec1 ter funcionado nas MDDCs do doador 1, visto que a banda correspondente à Siglec1 (~190kDa) não apareceu no grupo isotipo controle, curiosamente apareceram diversas outras bandas inespecíficas no Western Blotting em ambos os grupos (figura 20).

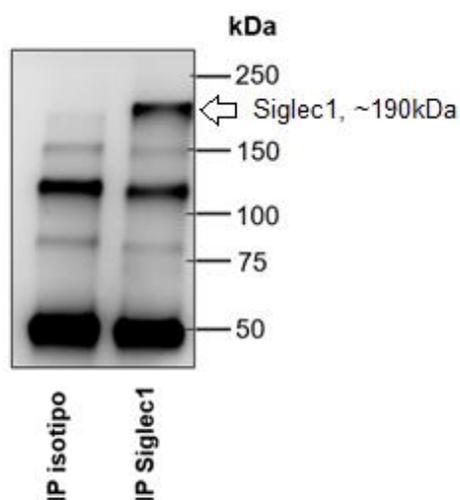


Figura 20. Western blotting da imunoprecipitação de Siglec1 a partir do lisado de MDDCs – Doador 1. A membrana foi incubada com anti-Siglec1.

Não foi possível identificar quais eram as proteínas inespecíficas em questão, e nem o porquê de terem aparecido na membrana de Western Blotting que foi incubada apenas com anticorpo primário específico para Siglec1 e o respectivo anticorpo secundário. O aparecimento dessas bandas pode estar relacionado ao fato que a quantidade de *beads* e anticorpos para a co-IP foi dobrada em relação ao protocolo padrão, todavia, as lavagens não foram aumentadas. De acordo com Grant e colaboradores (2019), em alguns processos de co-IP, se as condições de lavagem não forem rigorosas o suficiente, pode ser que não haja a remoção completa de proteínas altamente abundantes e/ou "pegajosas".

Na tentativa de eliminar essas bandas indesejadas, repetimos a co-IP com o segundo doador (figura 21) reduzindo pela metade a quantidade de *beads* e anticorpo por microtubo eppendorf. Utilizamos 25 μ L de *beads* e 10 μ g de anticorpo por tubo, resultando em total de quatro microtubos eppendorfs (2 para o grupo isotipo e 2 para o grupo Siglec1). Apenas ao final do processo, na etapa de eluição, as amostras foram unificadas em apenas um tubo, respeitando a questão dos grupos correspondentes.

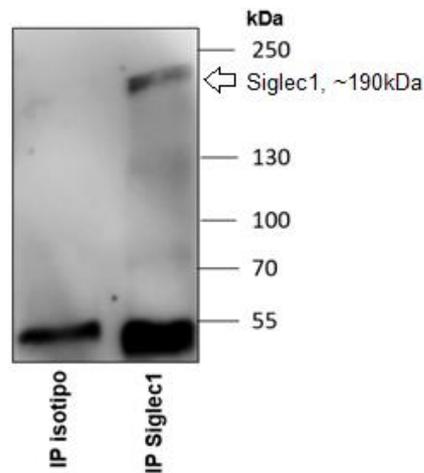


Figura 21. Western blotting da imunoprecipitação de Siglec1 a partir do lisado de MDDCs – Doador 2. A membrana foi incubada com anti-Siglec1.

Como é possível observar na figura 21, essas adaptações no protocolo reduziram consideravelmente as bandas inespecíficas. Todavia, a banda em torno de 50 kDa continuou a aparecer no Western Blotting. Tal banda provavelmente é o anticorpo (cadeia pesada) acoplado utilizado na co-IP que acabou sendo eluído junto com Siglec1. Infelizmente, não conseguimos retirar o anticorpo da amostra eluída.

O processo de co-IP foi repetido para os doadores 3 e 4 de DCs seguindo as mesmas adaptações de protocolo do doador 2. Como é possível observar no Western Blotting das figuras 22 e 23, os doadores apresentaram um padrão de bandas similar ao doador 2, e conseguindo também imunoprecipitar Siglec1 de forma satisfatória.

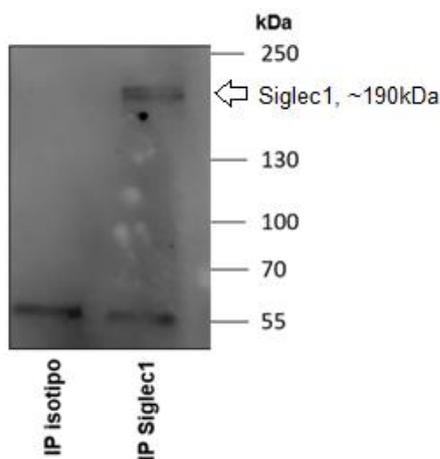


Figura 22. Western blotting da imunoprecipitação de Siglec1 a partir do lisado de MDDCs – Doador 3. A membrana foi incubada com anti-Siglec1.

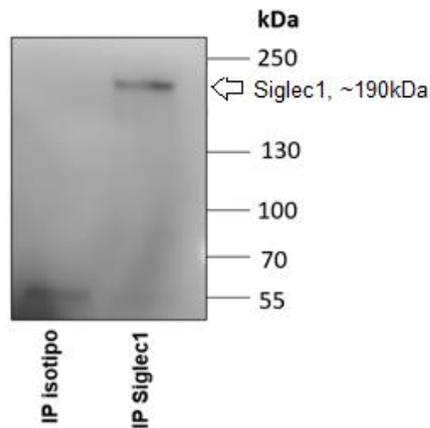


Figura 23. Western blotting da imunoprecipitação de Siglec1 a partir do lisado de MDDCs – Doador 4. A membrana foi incubada com anti-Siglec1.

4.4 Co-imunoprecipitação de Siglec1 em macrófagos derivados de monócitos humanos (MDMs)

Também realizamos uma co-IP em macrófagos derivados de monócitos humanos, porém neste caso, em apenas um doador humano. Vale ressaltar que neste caso, utilizamos amostras biológicas de um doador novo, independente dos doadores das DCs. Futuramente, serão realizados mais doadores em macrófagos para embasar os resultados encontrados até então.

Sendo assim, inicialmente, após diferenciação celular e para garantir um aumento de expressão de Siglec1, submetemos os macrófagos do doador ao tratamento com LPS 10ng/mL. A concentração de LPS utilizadas em macrófagos (10ng/mL) é inferior à concentração de LPS utilizada em DCs (100ng/mL), pois os macrófagos acabam morrendo com concentrações mais elevadas de LPS. Nesse sentido, após ativação dos macrófagos, submetemos as células à citometria de fluxo (figura 24).

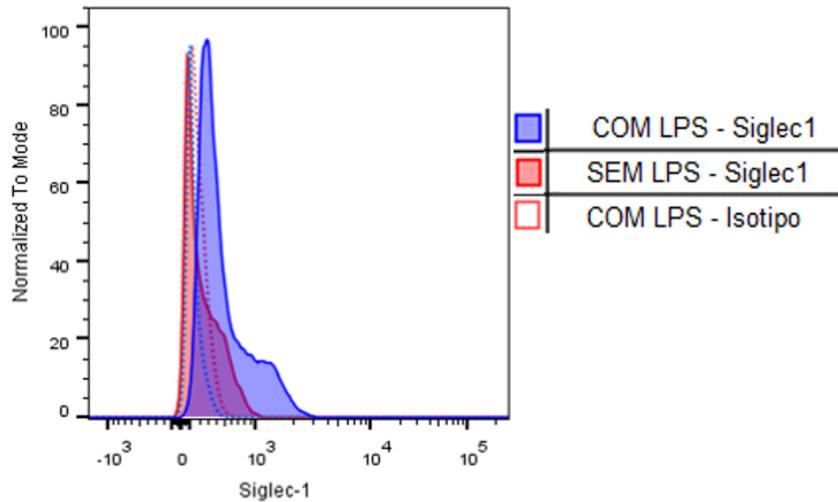


Figura 24. Citometria de fluxo de macrófagos com e sem LPS para análise de expressão de Siglec1 – Doador 1.

Subsequente à lise, a co-IP foi realizada com lisado de macrófagos, e seguindo as adaptações anteriores: 50 μ l de beads por grupo (25 μ l por tubo) e 20 μ g de anticorpo por grupo (10 μ g por tubo). A imunoprecipitação de Siglec1 também funcionou de forma eficiente em macrófagos, assim como em DCs, visto que a banda de ~190kDa apareceu apenas no grupo incubado previamente com anti-Siglec1 no processo de co-IP (figura 25).

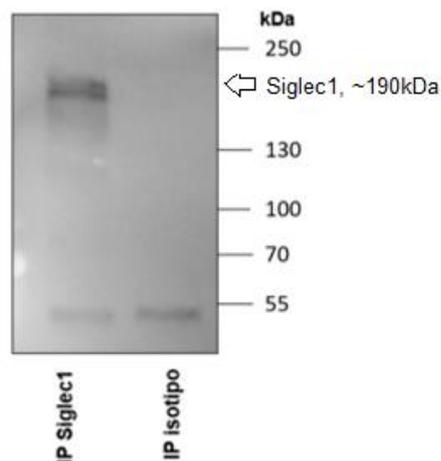


Figura 25. Western blotting da imunoprecipitação de Siglec1 a partir do lisado de macrófagos – Doador 1. A membrana foi incubada com anti-Siglec1.

4.5 Identificação e análises in silico das proteínas co- imunoprecipitadas com Siglec1 em DCs

As amostras dos doadores 1 e 2 de DCs após digestão e dessalinização foram carregadas no sistema EASY-nLC™ 1200 de nano-fluxo acoplado a espectrômetro de massas LTQ-Orbitrap Velos. Os peptídeos co-
imunoprecipitados foram identificados utilizando o software MaxQuant a partir dos dados brutos obtidos pela espectrometria de massas. Até o presente momento, ainda não foi possível enviar as amostras referentes ao terceiro e quarto doador de DCs e ao doador de macrófagos para o serviço de espectrometria de massas, devido à interrupção forçada das atividades ao longo do ano de 2020 em consequência da pandemia de COVID-19. Pretendemos realizar as análises proteômicas desses doadores em breve.

Sendo assim, após análises iniciais dos dois primeiros doadores de DCs, foram identificadas em torno de 900 proteínas humanas em cada um dos quatro grupos: Isotipo doador 1, isotipo doador 2, Siglec1 doador 1 e Siglec1 doador 2. Não foi possível identificar proteínas específicas de HIV-1 em nenhum dos grupos. Pode ser que o grande volume e a grande abundância de proteínas humanas tenha mascarado as proteínas virais. Ou ainda que a quantidade de VLPs utilizadas na incubação não tenha sido suficiente para as proteínas virais serem detectadas na espectrometria de massas. Além disso, há possibilidade das ligações VLP-Siglec1 terem sido perdidas durante as lavagens do processo de co-IP.

As análises in silico iniciais forneceram também um grande volume de informações em relação a parâmetros, tais como número de peptídeos únicos, score, intensidade, *ms/ms count*, tipo de identificação, entre outros. Nesse sentido, foi necessária a aplicação de alguns filtros para uma análise mais refinada das proteínas. Dessa forma, o parâmetro escolhido para a mineração dos dados foi o parâmetro *ms/ms count* normalizado. O *ms/ms count* informa quantos espectros foram identificados para tal peptídeo naquela amostra.

Foi estabelecido um valor de corte de $3 \times$ *ms/ms count* da razão grupo Siglec1/grupo isotipo. Ou seja, foram selecionadas as proteínas do doador 1 identificadas no grupo Siglec1 que apresentavam um valor de *ms/ms count* normalizado no mínimo três vezes maior em relação ao grupo isotipo do doador 1. O mesmo processo foi repetido para o doador 2. As proteínas presentes no

grupo Siglec1 que não foram identificadas no grupo isotipo (*ms/ms count* nulo) do respectivo doador também foram selecionadas.

Sendo assim, após a etapa de mineração e filtragem dos dados, 44 proteínas foram selecionadas no doador 1 e 15 proteínas no doador 2. Além disso, foram identificadas 5 proteínas em comum entre os dois doadores (figura 26). Isto é, essas 5 proteínas estavam presentes no grupo Siglec1 do doador 1 e 2 e não estavam presentes nos grupos isotipo ou estavam presentes com um valor de *ms/ms count* normalizado três vezes menor.

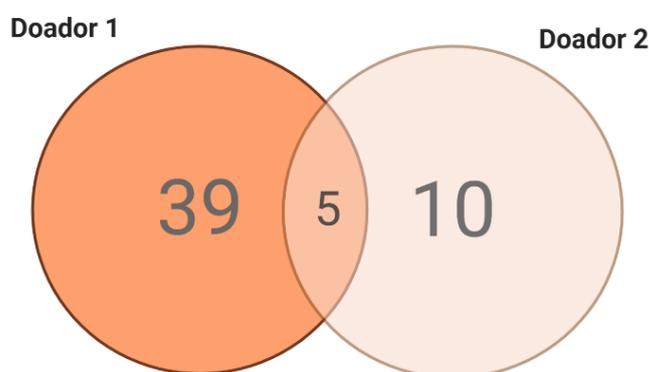


Figura 26. Diagrama de Venn indicando o número de proteínas co-imunoprecipitadas identificadas a partir do software MaxQuant e selecionadas in silico dos dois doadores. Valor de corte: 3x *ms/ms count* da razão grupo Siglec1/grupo isotipo.

Como é possível observar no diagrama de Venn da figura 26, mais proteínas foram selecionadas no doador 1 em comparação ao doador 2. Todavia, já eram esperadas diferenças no contexto proteômico entre os dois doadores, devido à grande variabilidade do perfil proteico entre células primárias de doadores humanos.

As 44 proteínas selecionadas referentes ao doador 1 estão disponíveis na tabela 2 abaixo, contendo informações referentes à proteína identificada, seu gene correspondente, o peso molecular em kDa, sua localização subcelular e o parâmetro de contaminante do CRAPome Max SC. A descrição do *output* dos softwares também pode ser encontrada na tabela 1 disponível na metodologia.

Tabela 2. Proteínas co-imunoprecipitadas selecionadas no doador 1 (DCs).

Protein	Gene	kDa	Subcellular localization	Max SC
Sialoadhesin	SIGLEC1	182,62	cell membrane	1
Myosin-2c	MYH14	227,87	cytoskeleton	30
3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	ACAA2	41,924	Mitochondria	12
60S ribosomal protein L35	RPL35	14,551	Nucleus	56
Septin-7	SEPTIN7	50,679	cytoskeleton, cytoplasm	18
Transmembrane glycoprotein NMB	GNMB	63,922	cell membrane, endosome	1
Nicotinamide phosphoribosyltransferase	NAMPT	55,52	Nucleus	10
Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2	GNB2	37,331	perinuclear region	21
Protein FAM98B	FAM98B	45,547	Nucleus	9
COMM domain-containing protein 3	COMMD3	22,151	nucleus, cytoplasm	-
Ferritin heavy chain	FTH1	21,225	Cytoplasm, extracellular	-
RNA-binding protein 3	RBM3	17,17	nucleus, cytoplasm, dendrite	23
POTE ankyrin domain family member J	POTEJ	117,39	extracellular space	-
DnaJ homolog subfamily C member 3	DNAJC3	57,579	endoplasmatic reticulum	1
HLA class II histocompatibility antigen, DRB1 beta chain	HLA-DRB1	29,966	cell membrane	-
RuvB-like 2	RUVBL2	51,156	nucleus, cytoplasm	93
DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB3	POLR2C	31,441	Nucleus	10
Probable serine carboxypeptidase CPVL	CPVL	54,163	extracellular space	8
Plastin-2	LCP1	70,288	ruffle membrane, cytoskeleton	19
Syntenin-1	SDCBP	32,444	cytoplasm, cell membrane, cytoskeleton	4

Transcription elongation factor SPT4	SUPT4H1	13,193	nucleus	6
Centrosomal protein of 170 kDa	CEP170	175,29	cytoskeleton	34
E3 ubiquitin-protein ligase ZFP91	ZFP91	63,444	nucleus	2
3-5 exoribonuclease 1	ERI1	40,063	nucleus	2
Interactor protein for cytohesin exchange factors 1	IPCEF1	48,992	plasma membrane	-
Nucleolin	NCL	76,613	nucleus	99
Transcription factor BTF3	BTF3	22,168	Nucleus, cytoplasm	6
Protein PTHB1	BBS9	99,279	plasma membrane	-
Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM50	TIMM50	39,646	nucleus, mitochondria	45
Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3	SNRPD3	13,916	nucleus	152
Condensin complex subunit 3	NCAPG	114,33	nucleus, cytoplasm	18
Transcription factor A, mitochondrial	TFAM	29,096	Mitochondria	7
Alpha-enolase	ENO1	47,168	nucleus, cell membrane	163
WW domain-binding protein 11	WBP11	69,997	nucleus, cytoplasm	25
Protein S100-A11	S100A11	11,74	nucleus, cytoplasm	9
Cathepsin G	CTSG	28,837	nucleus, membrane	1
RalBP1-associated Eps domain-containing protein 1	REPS1	86,661	Cytoplasm	9
Phosphoglycerate kinase 1	PGK1	44,614	Cytoplasm	52
Dynein light chain roadblock-type 1	DYNLRB1	10,921	Cytoskeleton	5
High mobility group protein B1	HMGB1	24,893	nucleus, cytoplasm, extracellular	21
Brain acid soluble protein 1	BASP1	22,693	plasma membrane	35
DNA-binding protein RFX5	RFX5	65,322	Nucleus	3
Annexin A5	ANXA5	35,936	Cytoplasm	25
CGG triplet repeat-binding protein 1	CGGBP1	18,82	Nucleus	3

Como é possível observar na tabela 2, foram identificadas proteínas de diferentes localizações subcelulares, incluindo proteínas transmembranas, como por exemplo, a glicoproteína transmembrana NMB. É válido lembrar que Siglec1

também é uma proteína transmembrana tipo I. Ainda em relação à localização celular das proteínas identificadas, as proteínas com os maiores valores de Max SC tiveram sua localização relacionada ao núcleo celular, tais como: a proteína RuvBL2 (Max SC 93), nucleolina (Max SC 99), a ribonucleoproteína nuclear pequena Sm D3 (Max SC 152) e a proteína alfa-enolase (Max SC 163). Tais proteínas possuem maiores chances de serem contaminantes no processo de co-imunoprecipitação.

Além disso, diversas proteínas identificadas no doador 1 apresentaram funções correlacionadas ao citoesqueleto celular, entre elas: miosina 2c (MYH14), septina-7 (SEPTIN7), plastina-2 (LCP1), sintenina-1 (SDCBP), POTE anquirina membro da família de domínio J (POTEJ) e a proteína de bloqueio de cadeia leve dineína tipo 1 (DYNLRB1). Cabe lembrar que os componentes do citoesqueleto desempenham um papel importante na infecção pelo HIV-1, visto que o HIV-1 depende de diversas maquinarias da célula hospedeira para o sucesso de sua infecção.

Em relação ao doador 2, 15 proteínas foram co-imunoprecipitadas e selecionadas (tabela 3), sendo 10 dessas proteínas diferentes das identificadas no doador 1.

Tabela 3. Proteínas co-imunoprecipitadas selecionadas no doador 2.

Protein	Gene	kDa	Subcellular localization	Max SC
Sialoadhesin	SIGLEC1	182,62	cell membrane	1
POTE ankyrin domain family member J	POTEJ	117,39	extracellular space	-
Testin	TES	47,996	cytosol	5
General transcription factor IIF subunit 2	GTF2F2	28,38	nucleus	12
DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB3	POLR2C	31,441	nucleus	10
Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1	SNRPD1	13,281	nucleus	63
Protein diaphanous homolog 1	DIAPH1	141,35	nucleus, cytoskeleton, cell membrane	9

Protein kinase C delta	PRKCD	77,504	nucleus, cell membrane, cytosol	-
ADP-ribosylation factor-like protein 8B	ARL8B	21,539	cytoskeleton, endosome membrane	3
Ribose-phosphate pyrophosphokinase 1	PRPS1	34,834	cytosol	54
Syntenin-1	SDCBP	32,444	cytosol, cell membrane, cytoskeleton	4
1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase delta-3	PLCD3	89,257	cytosol	1
Plastin-2	LCP1	70,288	ruffle membrane, cytoskeleton	19
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	ATP1A1	112,89	cell membrane	96
7SK snRNA methylphosphate capping enzyme	MEPCE	74,354	-	5

Em relação às proteínas identificadas correspondentes ao doador 2, apenas a proteína ATP1A1 (subunidade alfa-1 da ATPase transportadora de sódio/potássio) apresentou um valor de Max SC mais elevado (Max SC 96). Possivelmente essa amostra sofreu menos influência de proteínas contaminantes.

Duas novas proteínas com sua função relacionada ao citoesqueleto apareceram neste doador e não apareceram no doador 1, sendo elas: a proteína testin e a proteína DIAPH1 (proteína diáfano homóloga 1). Com esses resultados, fica evidente que a modulação do citoesqueleto parece estar intimamente ligada ao auxílio nos mecanismos de captura e internalização de HIV-1 por Siglec1. Curiosamente, após a realização das análises *in silico* de ontologia gênica (GO, do inglês *Gene Ontology*), algumas proteínas das 5 identificadas em comum entre os dois doadores, também apresentaram funções biológicas correlacionadas ao citoesqueleto celular, como mostra a tabela 4.

Tabela 4. Proteínas co-imunoprecipitadas selecionadas em comum entre os dois doadores (DCs).

Protein	Gene	Biological process (GO)	Normalized Siglec1/Isotype ratio (donor 1)	Normalized Siglec1/Isotype ratio (donor 2)
Sialoadhesin	SIGLEC1	cell-cell adhesion, cell-matrix adhesion, endocytosis, inflammatory response	Only in Siglec1 group	Only in Siglec1 group
POTE ankyrin domain family member J	POTEJ	-	3	3,015089
Plastin-2	LCP1	actin filament bundle assembly, actin filament network formation, cell migration, regulation of intracellular protein transport	6,932246561	3,015089
Syntenin-1	SDCBP	actin cytoskeleton organization, chemical synaptic transmission, ephrin receptor signaling pathway, intracellular signal transduction, protein targeting to membrane, positive regulation of exosomal secretion	3,961283749	3,015089
DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB3	POL2RC	7-methylguanosine mRNA capping, mRNA splicing, via spliceosome, positive regulation of viral transcription, regulation of gene silencing by miRNA, transcription elongation from RNA polymerase II promoter	Only in Siglec1 group	4,020119

Não foram identificadas funções moleculares e biológicas a partir das análises de *Gene Ontology* para a proteína POTEJ, identificada em comum entre os doadores. De fato, há poucos trabalhos disponíveis relatando o papel fisiológico dessa proteína. Sabe-se que estruturalmente, as proteínas POTE contêm uma região N-terminal rica em cisteína, repetições centrais de anquirina

e uma região C-terminal contendo domínio α -hélice tipo *coiled coil* de espectrinas (BARGER et al., 2018). As repetições de anquirina são módulos repetidos em conjunto de cerca de 33 aminoácidos cada, que medeiam interações proteína-proteína. Já as espectrinas, são constituintes do citoesqueleto que estão ancorados na membrana plasmática por meio de complexos de proteínas que incluem as anquirinas (BERA et al., 2004).

Um fato interessante é que a plastina-2 (mais conhecida como L-plastina ou LCP1), também identificada na tabela 4, parece ter conexão com a proteína POTEJ, visto que as plastinas se ligam à actina-F através de dois domínios de ligação à actina, que consistem cada um em dois domínios de homologia à calponina, colocando as plastinas na família α -actinina (MORLEY, 2012). Outros membros da família α -actinina incluem as espectrinas, citadas anteriormente.

A L-plastina é uma proteína específica de leucócitos que cruza os filamentos de actina em feixes apertados, regulando a estabilidade de estruturas baseadas em actina, como podossomos e lamelipódios (MORLEY, 2012). Já foi demonstrado que a regulação da atividade da L-plastina ocorre tanto pela ligação do cálcio quanto pela fosforilação da serina. A L-plastina é fosforilada principalmente no resíduo serina 5, após uma variedade de estímulos, incluindo o LPS e PMA (HAGI et al., 2006; MORLEY, 2012). Como já se sabe, o LPS é um importante fator pró-inflamatório presente na infecção por HIV-1 e relacionado com a indução da expressão de Siglec1.

Além disso, de maneira interessante, a L-plastina já foi identificada como uma das proteínas presentes em maior abundância no conteúdo proteico de macrófagos derivados de monócitos humanos infectados com HIV-1_{ADA} em estudo conduzido por Carlson e colaboradores em 2004 (CARLSON et al., 2004).

Para entender melhor a rede de interação proteína-proteína entre POTEJ, L-plastina e Siglec1, foi realizada uma análise *in silico* inserindo as proteínas em questão na base de dados STRING (disponível em: <https://string-db.org/>). Após a análise, foi possível observar que há uma relação de interação entre essas três proteínas (figura 27) de acordo com as interações disponíveis na base de dados STRING (interações conhecidas, preditas e outras).

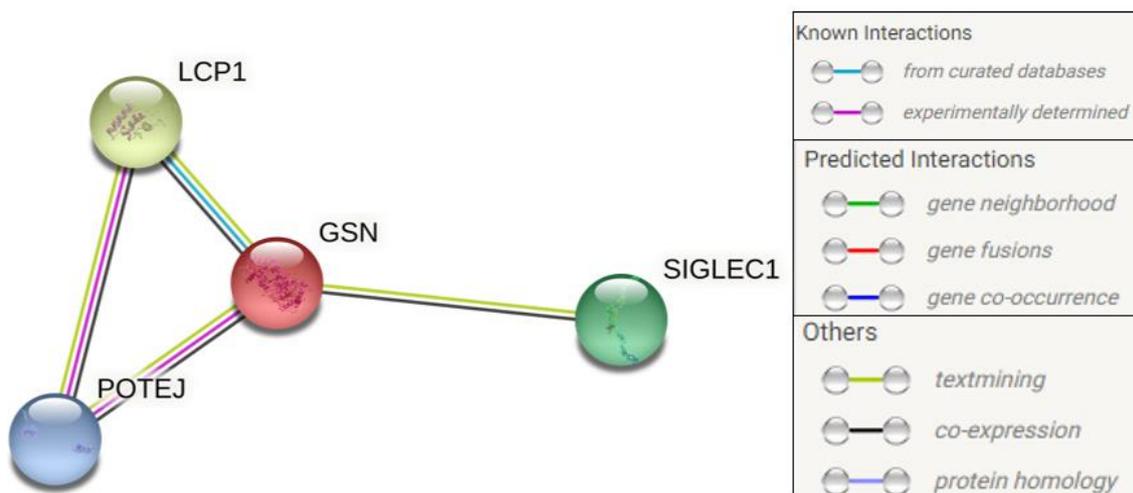


Figura 27. Rede de interação das proteínas Siglec1-GSN-POTEJ-LCP1. GSN: Gelsolina. LCP1: L-plastina. Dados obtidos do banco de dados STRING.

Entretanto, após as análises *in silico* via STRING, uma nova proteína surgiu na rede interação Siglec1-Plastina2-POTEJ: a proteína gelsolina. A gelsolina pertence a uma superfamília de proteínas de ligação à actina e essa proteína é capaz de “cortar” grandes filamentos de actina, promovendo a reorganização do citoesqueleto de actina e alterando a morfologia da membrana plasmática para gerar filópodes móveis e lamelipódios.

Um fato interessante é que a gelsolina apareceu como uma das proteínas mais abundantes nos dois doadores de DCs nas proteínas co-imunoprecipitadas identificadas na espectrometria de massas. Apesar do parâmetro intensidade ter apresentado diferenças (maiores intensidades no grupo Siglec1 dos dois doadores em relação ao grupo isotipo), a gelsolina não foi selecionada pois não entrou no filtro do *ms/ms count* normalizado, pois apresentou valores de *ms/ms count* semelhantes entre os grupos isotipo e Siglec1.

Além das proteínas POTEJ e plastina-2, também foram selecionadas nos doadores 1 e 2 as proteínas sintenina-1 (SDCBP) e a RNA polimerase II direcionada a DNA subunidade RPB3 (POL2RC).

A sintenina-1 é uma proteína adaptadora envolvida em diversos processos celulares que requerem polarização (SALA-VALDÉS et al., 2012). Essa proteína foi originalmente descrita devido a sua associação a sindecanos (GROOTJANS et al., 1997). Estruturalmente, a sintenina-1 contém uma região N-terminal reguladora e dois domínios PDZ em tandem. A região N-terminal é

composta por dois domínios baseados em tirosina: um domínio ITIM e um domínio ITAM. Os domínios PDZ estão envolvidos na formação de complexos macromoleculares que frequentemente ligam proteínas transmembranares ao citoesqueleto de actina, mediando sua distribuição subcelular polarizada e agrupada (GORDÓN-ALONSO et al., 2012).

Essa função de molécula adaptadora da sintetina-1 é uma característica extremamente interessante para o contexto deste trabalho, visto que a cauda curta citoplasmática de Siglec1 não parece conter motivos de sinalização definidos para endocitose ou locais de fosforilação que possam contribuir para o potencial tráfico e internalização de partículas virais (AKIYAMA et al., 2015), e não parece possuir domínios ITIM. Mesmo assim, o recrutamento de actina observado na trans-infecção nas DCs sugere que a molécula seja capaz de induzir sinalização, seja diretamente ou por meio de um cofator.

Através de seus domínios PDZ, a sintetina-1 também se liga e interage diretamente com a tetraspanina CD63 (LATYSHEVA et al., 2006). Como visto anteriormente, Siglec1 parece ser importante na formação de VCCs em macrófagos e nas estruturas semelhantes a VCCs em DCs, e esses compartimentos apresentam alguns marcadores como por exemplo, tetraspaninas (figura 3). Além disso, Gordón-Alonso e colaboradores em 2012 publicaram um trabalho demonstrando que a regulação negativa da expressão da sintetina-1 reduz a polimerização da actina-F em resposta ao HIV-1 (GORDÓN-ALONSO et al., 2012).

A última proteína identificada co-imunoprecipitada em comum entre os dois doadores foi a RNA polimerase II direcionada a DNA subunidade RPB3. Não é possível ainda inferir seu papel na questão HIV-1/Siglec1, visto que essa RNA polimerase está correlacionada com diversas funções importantes basais de maneira geral. Ao pesquisar essa proteína na base de dados do *Reactome* (<https://reactome.org/>), diversos *pathways* parecem estar envolvidos com o HIV-1, entretanto mais estudos e experimentos precisam ser realizados para maior elucidação do papel dessa e das outras proteínas citadas neste estudo.

4.6 Validação por Western Blotting e microscopia de fluorescência das proteínas co-imunoprecipitadas com Siglec1 em DCs

Apesar de 5 proteínas terem sido selecionadas em comum entre os dois doadores em DCs utilizando o filtro de *ms/ms count normalizado*, selecionamos apenas as proteínas sintenina-1 e L-plastina para validação por Western Blotting (figura 28), pois tais proteínas apresentaram funções biológicas mais interessantes para o escopo do trabalho. Para essa validação, utilizamos amostras obtidas da co-imunoprecipitação do doador 4 de DCs.

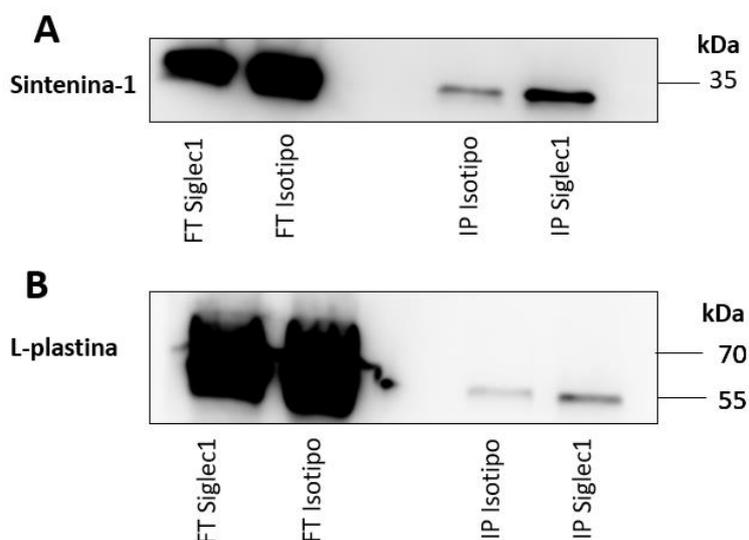


Figura 28. Western blotting da co-imunoprecipitação de sintenina-1 (A) e L-plastina (B) a partir do lisado de MDDCs. As membranas foram incubadas com anti-sintenina1 (A) e anti-L-plastina (B).

A figura 28 demonstra que apesar das bandas referentes às proteínas sintenina-1 (fig. 28A) e L-plastina (fig. 28B) terem aparecido no grupo isotipo, houve um aumento proteico visível dessas proteínas nas amostras do grupo Siglec1. Nesse sentido, realizamos uma quantificação da intensidade dessas bandas (via parâmetro área de pixels) no software ImageJ, e como resultado obtemos os seguintes valores da razão IP Siglec1/IP isotipo: 3,10 para as bandas da membrana incubada com anti-sintenina1 e 3,20 para a membrana incubada com anti-L-plastina. Esses resultados ajudam a reforçar os dados obtidos pela espectrometria de massas de que essas proteínas co-imunoprecipitam com Siglec1, apesar dessas possíveis interações não serem extremamente específicas em ambos os casos.

Apesar da literatura indicar que DAP12 talvez interaja com Siglec1 murino, ao realizarmos análises por Western Blotting com as amostras de MDDCs obtidas pela co-IP, não foi possível encontrar DAP12 co-imunoprecipitada com Siglec1 (dados não mostrados). Entretanto, o experimento só foi feito uma vez e precisa ser repetido para confirmação. Além disso, realizamos as mesmas análises incubando a membrana com anti-CD81, por ser uma proteína sabidamente presente no compartimento contendo vírus que colocaliza com o Siglec1. Mas CD81 também não co-imunoprecipitou (dados não mostrados).

Para um maior entendimento das localizações subcelulares das proteínas sintenina-1 e L-plastina, realizamos uma análise por microscopia de fluorescência. Para tal, foram utilizadas DCs não tratadas e tratadas com LPS, pulsadas ou não com VLPs GagGFP.

Na figura 29 abaixo, temos fotos adquiridas por microscopia de fluorescência de DCs que não foram incubadas com VLPs GagGFP, marcadas por imunofluorescência com anti-sintenina1 e anti-siglec1. É possível observar nessa figura, que houve diferença de expressão de Siglec1 entre as DCs não tratadas (figura 29A) e tratadas com LPS (figura 29B), confirmando dessa vez por microscopia que o LPS foi capaz de induzir o aumento de expressão de Siglec1 em DCs.

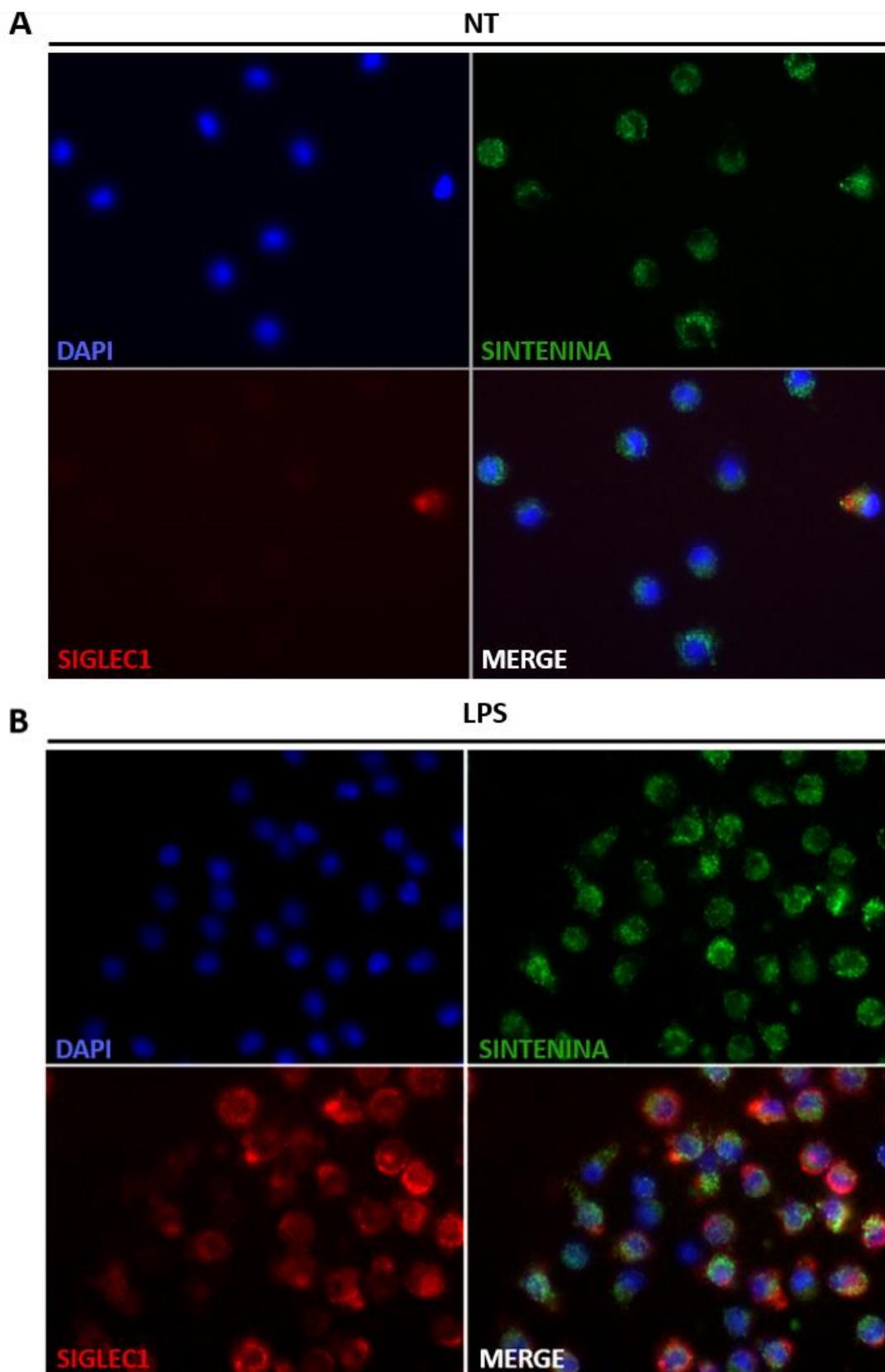


Figura 29. Microscopia de fluorescência de DCs não pulsadas com VLPs, não tratadas (A) e tratadas com LPS (B) e marcadas com anti-sintenina1 e anti-siglec1. Aumento de 63x.

A localização da sintonina-1 não parece estar condicionada a apenas uma localização específica subcelular, parece estar dispersa na membrana e no citosol (figura 29), confirmando os dados de localização disponíveis nas tabelas 2 e 3. Não é possível inferir com precisão se há algum tipo de colocalização com Siglec1 nesse caso. Para uma melhor visualização, precisaríamos realizar análises por microscopia confocal. Além disso, há presença de Siglec1 dispersa por toda a membrana celular, visto que sem a presença do HIV-1, não há acúmulo específico de Siglec1.

A fim de demonstrar que VLPs de HIV-1 são capazes de levar à formação de compartimentos contendo vírus via Siglec1 em DCs ativadas com LPS e com isso, validar nosso modelo proposto, adquirimos a imagem por microscopia de fluorescência de DCs ativadas previamente incubadas por 2h com VLPs GagGFP marcadas com anti-siglec1 (figura 30).

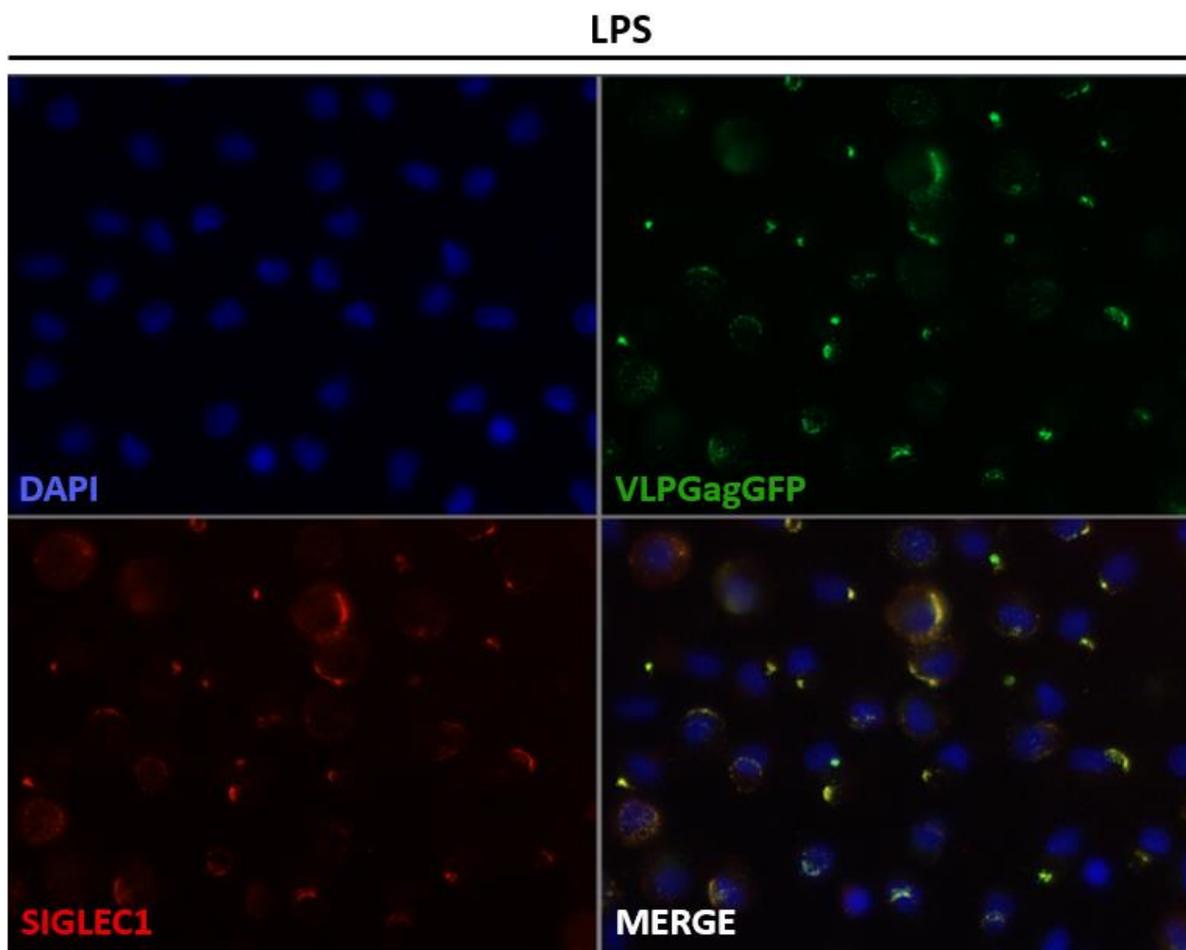


Figura 30. Microscopia de fluorescência de DCs tratadas com LPS, pulsadas com VLPs GagGFP e marcadas com anti-siglec1. Aumento de 63x.

Como é possível observar na figura 30, Siglec1 foi capaz de capturar as VLPs GagGFP via gangliosídeos presentes na membrana dessas partículas e formar os compartimentos contendo vírus em DCs ativadas com LPS. Além disso, também é possível visualizar que houve um acúmulo de Siglec1 na região dos compartimentos e colocalização com as VLPs GagGFP. Esse resultado vai de encontro com alguns outros resultados já publicados na literatura, que demonstram que Siglec1 se acumula nos locais de acúmulo viral de HIV-1 (HAMMONDS et al., 2017; IZQUIERDO-USEROS et al., 2012).

Também realizamos análises de microscopia nas mesmas condições (DCs tratadas com LPS incubadas com VLPs GagGFP), marcando as células por imunofluorescência com um anti-sintenina1 (figura 31), com objetivo de visualizar se a sintenina-1 apresentava comportamento semelhante ao Siglec1 de acúmulo ou se estaria próxima das regiões dos compartimentos contendo vírus.

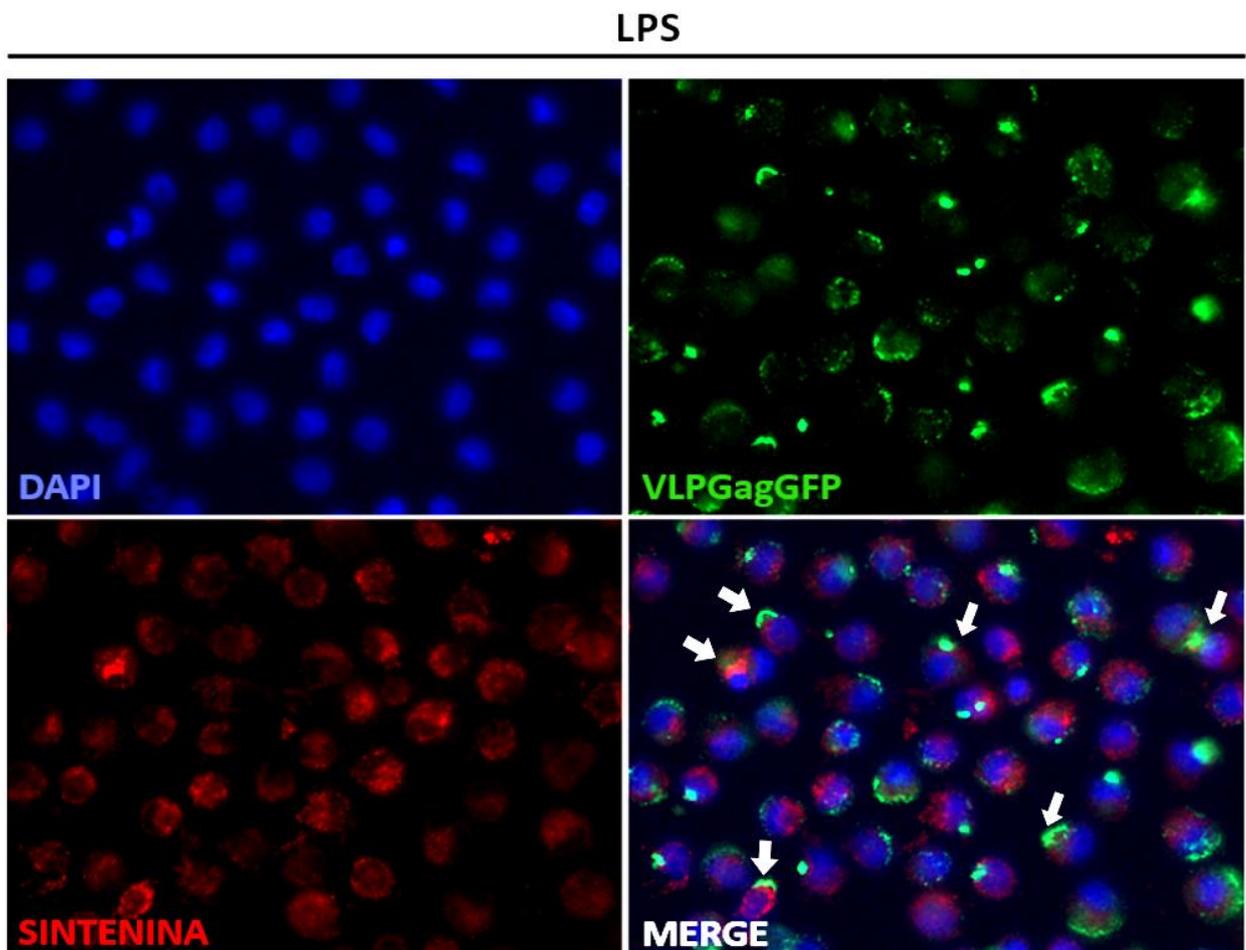


Figura 31. Microscopia de fluorescência de DCs tratadas com LPS, pulsadas com VLPs GagGFP e marcadas com anti-sintenina1. Aumento de 63x.

Todavia, ao observarmos a figura 31, podemos perceber que a sintenina1 não apresentou um padrão de colocalização tão satisfatório com as VLPs GagGFP e nem se acumulou de maneira similar ao Siglec1 nos compartimentos contendo vírus em DCs ativadas. Apesar disso, em algumas células, foi possível notar que a sintenina-1 se apresentou próxima aos compartimentos.

É provável que a sintenina-1 se ligue a diferentes moléculas no momento de captura do vírus, desempenhando diversos papéis, incluindo por exemplo, ligação de proteínas transmembranares ao citoesqueleto de actina.

Além da sintenina-1, também realizamos microscopia de fluorescência para analisar a localização subcelular da proteína L-plastina. Na figura 32 abaixo, temos imagens adquiridas de DCs não tratadas (figura 32A) e tratadas com LPS (figura 32B) que não foram incubadas com VLPs, marcadas com anti-L-plastina e anti-siglec1.

De maneira geral, a L-plastina parece estar dispersa na membrana plasmática das DCs não tratadas. Todavia, é possível observar que a ativação das DCs por meio do LPS aparentemente modificou o fenótipo das DCs e a dispersão da L-plastina pelo citoesqueleto nessas células (figura 32B).

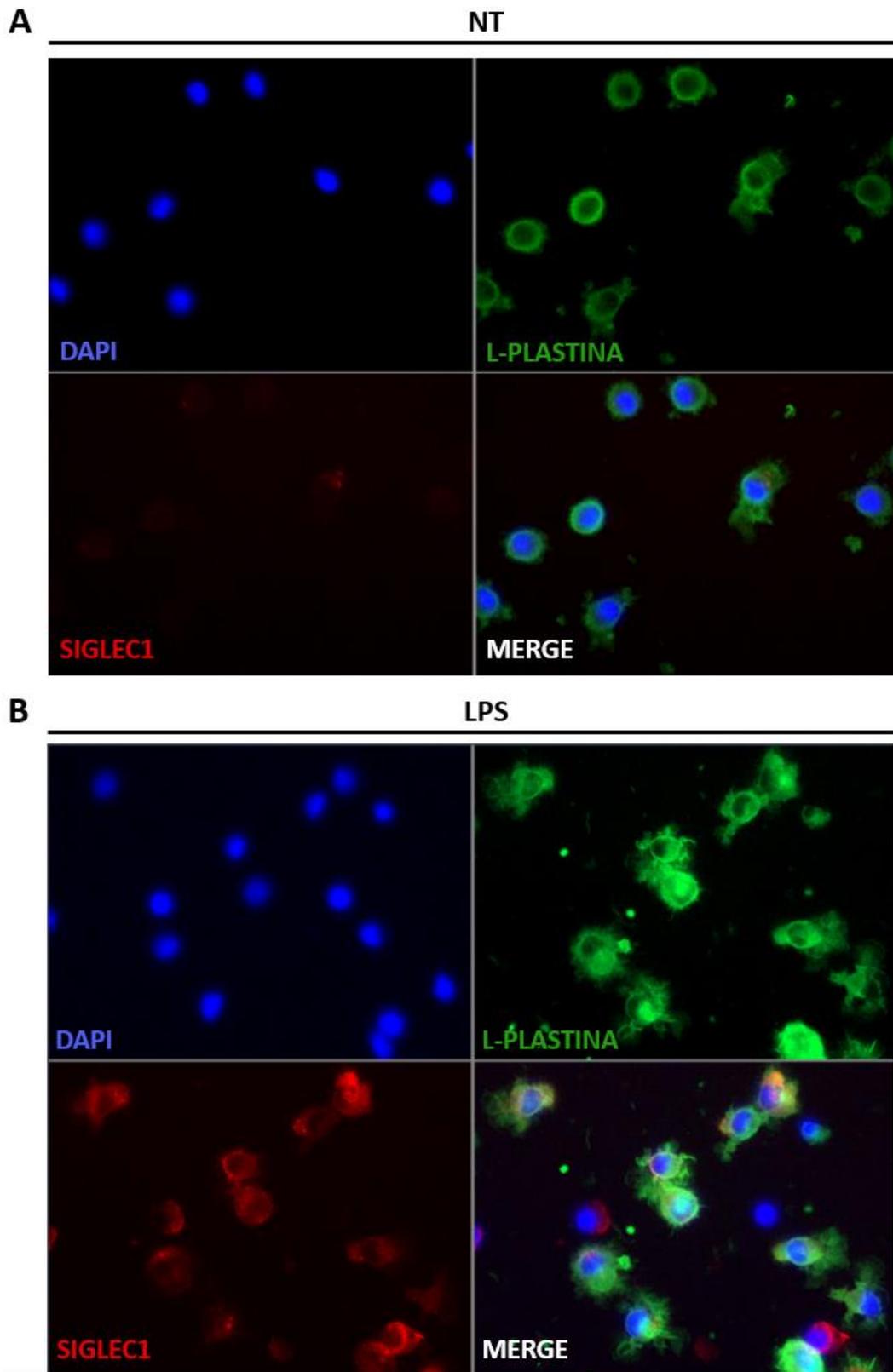


Figura 32. Microscopia de fluorescência de DCs não pulsadas com VLPs, não tratadas (A) e tratadas com LPS (B) e marcadas com anti-L-plastina e anti-siglec1. Aumento de 63x.

Cabe ressaltar que a L-plastina é fosforilada principalmente no resíduo serina 5, após uma variedade de estímulos, incluindo estímulo por LPS (HAGI et al., 2006). Um estudo publicado em 2014 por Gröbner e colaboradores demonstrou que após a exposição ao LPS, DCs tiveram seus níveis citosólicos de Ca^{2+} aumentados. O mesmo estudo também apontou que o Ca^{2+} elevado, por sua vez, causou um amplo rearranjo citoesquelético à base de actina, incluindo a perda de podossomos, facilitando a conversão de DCs em um fenótipo mais migratório, com crescimento de lamelipódios na parte frontal e inchaço gradual celular (GRÖBER et al, 2014).

Por fim, realizamos a marcação por imunofluorescência de L-plastina de DCs ativadas incubadas com VLPs GagGFP (figura 33).

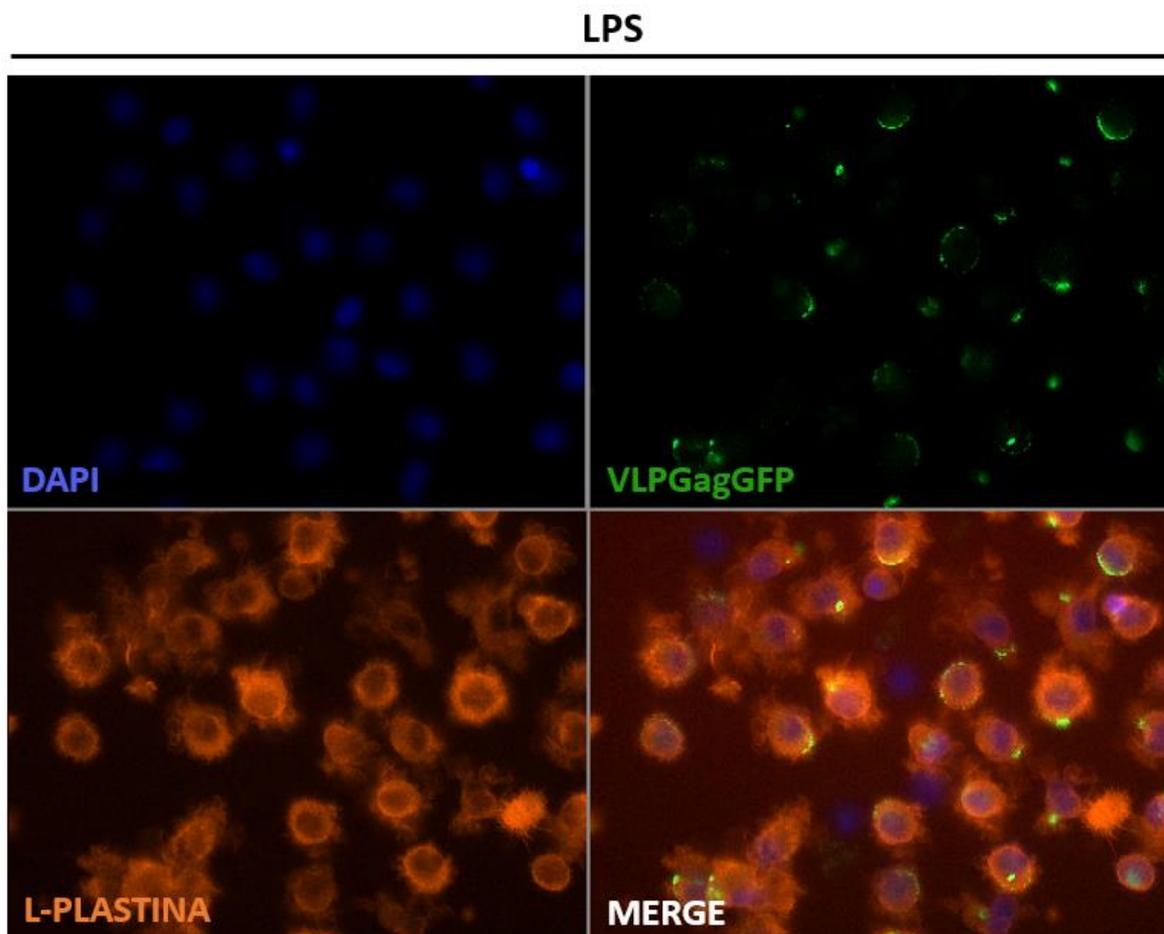


Figura 33. Microscopia de fluorescência de DCs tratadas com LPS, pulsadas com VLPs GagGFP e marcadas com anti-L-plastina. Aumento de 63x.

Como é possível observar na figura 33, a L-plastina também não apresentou comportamento de acúmulo específico nos compartimentos contendo as VLPs de HIV-1, assim como foi observado com a sintenina-1. Apesar disso, a L-plastina parece estar localizada nas mesmas regiões dos compartimentos. Sabe-se que os compartimentos contendo vírus em DCs maduras são circundados por actina polimerizada e que a função da L-plastina está intimamente relacionada com a regulação da estabilidade de estruturas baseadas em actina.

Nesse sentido, apesar de não estar bem elucidado se a sintenina-1 ou a L-plastina de fato interagem fisicamente com Siglec1 ou se há alguma interação indireta entre essas moléculas através de uma rede complexa proteica, os resultados obtidos até o momento, demonstram que a via de captura/internalização de VLPs de HIV-1 por Siglec1 está intimamente relacionada ao citoesqueleto celular e redes de actina.

5. Discussão

Com resultados obtidos neste trabalho, a partir da identificação por espectrometria de massas de proteínas co-imunoprecipitadas com Siglec1 e seleção através de dados de *ms/ms count*, fica evidente que a modulação do citoesqueleto celular parece estar intimamente ligada ao auxílio nos mecanismos de captura e internalização de HIV-1 por Siglec1 em células mieloides. De maneira geral, os componentes do citoesqueleto desempenham um papel importante na infecção pelo HIV-1, visto que o HIV-1 depende de diversas maquinarias da célula hospedeira para o sucesso de sua infecção. Enquanto algumas proteínas do HIV parecem capazes de se ligar aos filamentos de actina diretamente, a subversão do citoesqueleto ocorre indiretamente, explorando o poder das proteínas reguladoras da actina, que são modificadas em vários níveis (STELLA & TURVILLE, 2018).

A subversão do citoesqueleto de actina do hospedeiro é essencial para o estabelecimento e disseminação da infecção pelo HIV-1. Uma grande variedade de moléculas pertencentes ao sistema de microfilamentos, incluindo filamentos de actina e proteínas de ligação à actina, bem como os microtúbulos, tem um papel fundamental na polarização celular, nos movimentos celulares e no tráfego citoplasmático de moléculas (MATARRESE & MARLONI, 2005). O HIV-1 utiliza ainda, os microtúbulos e as redes de actina para sua locomoção dentro da célula (MCDONALD et al., 2002).

Recentemente, Dupont e colaboradores (2020) demonstraram o interferon- λ associado à tuberculose induz Siglec-1 em nanotubos de tunelamento e favorece a disseminação do HIV-1 em macrófagos. Nesse mesmo trabalho, os autores também relatam que a depleção de Siglec-1 diminui o comprimento do nanotubo de tunelamento, diminui a captura do HIV-1 e a transferência de célula para célula e anula a exacerbação da infecção pelo HIV-1 induzida por *Mycobacterium tuberculosis* (DUPONT et al., 2020).

É válido destacar também que em DCs, o vírus HIV-1 é internalizado em um compartimento em muitos aspectos semelhante aos VCCs de macrófagos, circundado por actina polimerizada, e que a presença de inibidores da polimerização ou despolimerização de actina prejudicam a formação do mesmo (YU et al., 2008; FELTS et al., 2010; YU ET AL., 2015).

A proteína DYNLRB1 identificada e selecionada após filtragem no doador 1 (tabela 2), por exemplo, atua como um dos vários componentes acessórios não catalíticos do complexo citoplasmático da dineína 1. A dineína citoplasmática 1 atua como um motor da motilidade retrógrada intracelular de vesículas e organelas ao longo dos microtúbulos (HÖÖK & VALLEE, 2006). Além do transporte, as dineínas também são necessárias para o *uncoating* do capsídeo viral de HIV-1 (PAWLICA & BERTHOUX, 2014).

Outra proteína interessante identificada no doador 1 (tabela 2), refere-se à septina-7. Essa proteína possui atividade de GTPase e tem suas funções relacionadas à organização do citoesqueleto e da membrana celular, divisão celular e interações hospedeiro/patógeno. Em um trabalho publicado em 2014 por Traikov e colaboradores, foi demonstrado que os complexos SEPTIN6 e SEPTIN7 se ligam à actina-F e regulam o *sorting* de proteínas durante a biogênese de corpos multivesiculares. Esses complexos se ligam ao complexo adaptador AP-3 (TRAIKOV et al., 2013). Dong e colaboradores (2005) publicaram um estudo demonstrando que a Gag de HIV-1 interage diretamente com a subunidade delta do complexo AP-3 e essa interação desempenha um papel funcional importante na montagem das partículas (DONG et al., 2005).

A proteína GNB2 selecionada no doador 1 também é uma proteína com atividade de GTPase. Interessantemente, na sessão correlacionada à sua função no Uniprot (disponível em <https://www.uniprot.org/uniprot/P62879>), a GNB2 mostra-se como uma proteína de ligação a nucleotídeos de guanina (proteína G) envolvida na modulação e transdução de sinal em vários sistemas de sinalização transmembranar.

Dois novas proteínas com sua função relacionada ao citoesqueleto apareceram no doador 2 de DCs (tabela 3) e não apareceram no doador 1, sendo elas: a proteína testin e a proteína diáfano homóloga 1 (DIAPH1). A proteína testin, localizada no citoplasma celular, aparenta desempenhar funções envolvidas com adesão celular, disseminação celular e reorganização do citoesqueleto de actina (COUTTS et al., 2003). Já a proteína DIAPH1, localizada principalmente na membrana celular e no citoplasma, tem como funções moleculares: ligação à actina, ligação à Rho GTPases e ligação a receptores de sinalização. Essa característica de ligação à Rho GTPases é uma função molecular interessante, pois a montagem e regulação do citoesqueleto de actina

é feita por proteínas acessórias que auxiliam na montagem e desmontagem das estruturas, em especial as GTPases da família Rho, Rac e Cdc42 (CROISÉ et al., 2014).

Em relação às proteínas identificadas em comum entre os dois doadores de DCs (tabela 4), foi possível estabelecer uma rede de interação proteica in silico via String entre as proteínas Siglec1, POTEJ e L-plastina (figura 27). Apesar dessas possíveis interações ainda não estarem bem elucidadas no contexto envolvendo captura do HIV-1 via Siglec1, a análise via String propõe uma proteína adicional, que talvez também esteja envolvida nesta rede: a proteína gelsolina. Apesar da gelsolina não ter sido selecionada pelo filtro de *ms/ms count normalizado*, essa proteína aparece identificada em abundância (alto score) nas amostras que foram co-imunoprecipitadas com anticorpo anti-Siglec1 no processo de co-IP.

Em um trabalho em 2013 por García-Expósito e colaboradores, os autores descobriram que a superexpressão de gelsolina intracelular funcional ou o silenciamento específico da expressão de gelsolina endógena restringe a infecção de HIV-1, alterando as quantidades de F-actina cortical e perturbando a dinâmica da F-actina. Nesse mesmo trabalho, García-Expósito e colaboradores também propõe que a gelsolina pode atuar como um fator capaz de limitar a infecção por HIV-1, agindo na etapa de pré-fusão, alterando a estabilidade e dinâmica do citoesqueleto de actina cortical em linfócitos permissivos (GARCÍA-EXPÓSITO et al., 2013).

Não foi possível identificar por análises de *Gene Ontology* funções biológicas e/ou moleculares (tabela 4) para a proteína POTEJ. Todavia, já foi sugerido que proteínas da família POTE podem estar envolvidas na transmissão de sinais através da membrana plasmática, devido a presença de motivos de repetição de anquirina e o domínio tipo espectrina em uma única proteína (HAHN et al., 2006).

Já em relação à L-plastina, é possível que seu papel na via Siglec1 e HIV-1 esteja relacionado à sua função de regulação da estabilidade de estruturas baseadas em actina, como podossomos e lamelipódios. Em um estudo publicado em 2007, Ciborowski e colaboradores usaram eletroforese unidimensional e cromatografia líquida com espectrometria de massa em tandem para analisar o secretoma de macrófagos derivados de monócitos

humanos infectados com HIV-1, na tentativa de compreender melhor a influência do HIV nas funções dos macrófagos. Interessantemente, nesse trabalho, foi demonstrado que o conteúdo de L-plastina, encontrava-se regulado positivamente e de maneira significativa nos fluidos (secretoma) de macrófagos derivados de monócitos humanos infectados com HIV-1 (CIBOROWSKI et al., 2007). Em outro estudo conduzido em 2004, Carlson e colaboradores avaliaram o conteúdo proteico de macrófagos derivados de monócitos humanos infectados com HIV-1_{ADA}, a partir de microsequenciamento de proteína de lisado de célula inteira. E curiosamente, nesse estudo, a L-plastina apareceu entre as proteínas selecionadas em maior abundância (CARLSON et al., 2004).

Além de Siglec1, POTEJ e L-plastina, foram selecionadas em comum entre os dois doadores de DCs as proteínas sintenina-1 e RNA polimerase II direcionada a DNA subunidade RPB3 (tabela 4). A sintenina-1 é uma proteína adaptadora envolvida em diversos processos celulares que requerem polarização, sendo vital para a geração de estruturas de actina polarizadas, como por exemplo, zona de contato com APCs (SALA-VALDÉS et al., 2012). Essa proteína foi originalmente descrita devido a sua associação a sindecanos. Em um trabalho publicado em 1997 foi proposto que a sintenina pode associar-se aos domínios citoplasmáticos dos sindecanos e pode funcionar como uma molécula adaptadora que vincula processos de reconhecimento suportados por sindecanos a sistemas de transdução de sinal intracelular (GROOTJANS et al., 1997).

De maneira geral, os domínios PDZ da sintenina-1 interagem com sequências curtas de aminoácidos na extremidade C-terminal de proteínas da membrana plasmática, como é o caso de sindecanos (GROOTJANS et al., 1997), por exemplo. Os sindecanos são uma família de proteoglicanos transmembranares com capacidade de interagir com uma variedade de ligantes por meio de suas proteínas principais e cadeias de heparano-sulfato (AFRATIS et al., 2017; COUCHMAN, 2003). Em 2007, De Witte e colaboradores publicaram um estudo identificando o sindecano-3 como um receptor de ligação do HIV-1 em DCs. Nesse trabalho, os autores relatam que o sindecano-3 captura o HIV-1 através da interação com a glicoproteína gp120 do envelope viral e é capaz de estabilizar o vírus capturado, aumentando a infecção por DC em *cis* e promovendo a transmissão para células T. Além disso, eles demonstram que a

remoção de heparano-sulfato da superfície celular pela heparinase III ou pelo silenciamento do sindecano-3 por siRNA inibe parcialmente a transmissão do HIV-1 por DCs, e que a neutralização do sindecano-3 e de DC-SIGN anula a captura do HIV-1 e a transmissão subsequente (DE WITTE et al., 2007).

Apesar de nenhum sindecano ter sido identificado na espectrometria de massas nas amostras de proteínas co-immunoprecipitadas, é possível que não haja necessariamente interação direta entre Siglec1 e sindecanos, visto que as vias de captura do HIV-1 por Siglec1 e sindecanos podem ser diferentes. Todavia, pode-se supor que talvez a sintenina-1 seja capaz de interagir com ambas as moléculas em diferentes processos de captura do HIV-1, ou que esteja envolvida em algum momento na rede de interações proteicas.

Através de seus domínios PDZ, a sintenina-1 também se liga e interage diretamente com a tetraspanina CD63 (LATYSHEVA et al., 2006). Em 2007, Deneka e colaboradores publicaram um estudo demonstrando que a infecção pelo HIV-1 recruta a tetraspanina CD63 para os VCCs CD81/CD9/CD53-positivos em macrófagos derivados de monócitos (DENEKA et al., 2007).

A sintenina-1 possui distribuição citosólica, sendo enriquecida em vesículas e estruturas de actina-F. O recrutamento de sintenina-1 para a membrana plasmática pode ser regulado por meio da sua interação mediada por PDZ com o segundo mensageiro lipídico fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP₂) (ZIMMERMANN, 2006). A produção de PIP₂ é induzida, por exemplo, após a ligação do HIV-1 à célula do hospedeiro, essa geração de PIP₂ pode coordenar alterações em série no citoesqueleto de actina que permitem a regulação da infecção pelo HIV-1 (ROCHA-PERUGINI, 2014).

Em 2012, Gordón-Alonso e colaboradores publicaram um trabalho demonstrando que a sintenina-1 é recrutada para a membrana plasmática durante a etapa de ligação do HIV-1 e se associa ao receptor CD4 em linfócitos T. Nesse estudo também foi demonstrado que a superexpressão de sintenina-1 inibe a produção de HIV-1 e a fusão celular mediada pelo vírus, enquanto a depleção de sintenina-1 aumenta especificamente a entrada de HIV-1. Isto ocorre provavelmente pois a regulação negativa da expressão da sintenina-1 reduz a polimerização da F-actina em resposta ao HIV-1. Por fim, os autores relatam que depois que o vírus entra na célula alvo, a polarização da sintenina-1 em direção ao nucleocapsídeo viral é perdida, sugerindo um papel regulador

espaço-temporal da sintenina-1 na remodelação da actina, na produção de PIP₂ e na dinâmica da entrada do HIV-1 (GORDÓN-ALONSO et al., 2012). De maneira interessante, surgiram proteínas selecionadas relacionadas ao metabolismo de PIP₂ no doador 2 (tabela 3), como por exemplo, a proteína 1-fosfatidilinositol-4,5-bifosfato fosfodiesterase delta-3.

A validação por Western Blotting das proteínas sintenina-1 e L-plastina ajudou a reforçar os dados obtidos pela espectrometria de massas de que essas proteínas co-imunoprecipitam com Siglec1, apesar dessas possíveis interações não serem extremamente específicas em ambos os casos. É possível que tanto a sintenina-1 como a L-plastina sejam capazes de interagir diretamente com Siglec1, entretanto, também é possível que ambas as proteínas interajam com outras moléculas que estejam ligadas ao Siglec1.

Além disso, pode ser que não haja interação física as proteínas, mas que a sintenina-1 e/ou a L-plastina estejam em locais próximos aos compartimentos contendo vírus que são formados após a captura do HIV-1 via Siglec1 em DCs ativadas, desempenhando papéis biológicos em relação ao citoesqueleto celular. Como por exemplo, há possibilidade da sintenina-1 desempenhar função biológica envolvida com a formação de complexos macromoleculares que ligam proteínas transmembranares (como é o caso do Siglec1) ao citoesqueleto de actina, vinculando processos de reconhecimento a sistemas de transdução de sinal intracelular, através de seus domínios PDZ. Ou ainda, no caso da L-plastina, é possível que a mesma regule a estabilidade de estruturas baseadas em actina, como lamelipódios, envolvidos na formação da sinapse virológica, por exemplo. Nesse sentido, visando compreender melhor a localização subcelular da sintenina-1 e L-plastina, realizamos análises de microscopia de fluorescência.

Na figura 31, foi possível observar que a sintenina1 não acumulou de maneira similar ao Siglec1 nos compartimentos contendo VLPs de HIV-1 em DCs ativadas com LPS. Apesar disso, em algumas células, foi possível perceber que a sintenina-1 se encontrou próxima dos compartimentos. É válido ressaltar que no trabalho publicado por Gordón-Alonso e colaboradores (2012), os autores relatam que depois que o HIV-1 entra na célula alvo (linfócito T CD4), a polarização da sintenina-1 em direção ao nucleocápsideo viral é perdida, sugerindo um papel regulador espaço-temporal da sintenina-1 na remodelação

da actina, na produção de PIP₂ e na dinâmica da entrada do HIV-1 (GORDÓN-ALONSO et al., 2012). Apesar da diferença entre os modelos celulares (linfócitos T CD4 e DCs), também não podemos descartar a hipótese de que haja mudanças na localização subcelular da sintenina-1 durante o decorrer do tempo do processo de captura e internalização viral do HIV-1 via Siglec1 em DCs ativadas. Também ainda não foi possível elucidar o quão rápida é essa mudança de localização em DCs. Nesse sentido, seria necessário testar futuramente, diferentes tempos de incubação das DCs com VLPs de HIV-1 para uma melhor compreensão desses processos.

Nas análises de microscopia de fluorescência da L-plastina, foi possível observar que a ativação das DCs por meio do LPS aparentemente modificou o fenótipo das DCs e a dispersão da L-plastina pelo citoesqueleto nessas células (figuras 32 e 33). Nesse sentido, cabe ressaltar, que a L-plastina é fosforilada principalmente no resíduo serina 5, após uma variedade de estímulos, incluindo estímulo por LPS (HAGI et al., 2006). Janji e colaboradores publicaram em 2006 um trabalho demonstrando que a fosforilação em Ser5 aumenta a atividade de ligação de F-actina da L-plastina e promove seu direcionamento para locais de montagem de actina. Nesse trabalho, os autores relatam que a substituição de Ser5Ala em células Vero reduz a capacidade da L-plastina de se localizar com as protusões de membrana ricas em actina periférica. Por outro lado, uma variante Ser5Glu mimetizando um estado constitutivamente fosforilado, leva a um acúmulo em regiões ricas em actina e promove a formação de *microspikes* de F-actina nas células (JANJI et al., 2006).

Para se espalhar, o HIV-1 tira proveito das particularidades e funções específicas das células do sistema imunológico. A subversão da comunicação intercelular permite melhorar a replicação do HIV-1 através de uma multiplicidade de estruturas intercelulares e projeções de membrana, como filopódios, nanotubos de tunelamento, ou estruturas tipo lamelipódios envolvidos na formação da sinapse virológica (BRACQ et al., 2018).

Todos esses dados e resultados propõe uma compreensão inicial da via de captura de HIV-1 por Siglec1 e suas possíveis redes de interações associadas.

6. Conclusão

Em suma, a co-imunoprecipitação de proteínas que possivelmente estejam envolvidas na rede de interação com Siglec1 em DCs derivadas de monócitos humanos de dois doadores gerou um grande volume de dados, cerca de 900 proteínas totais em cada grupo de amostra analisado, demonstrando que houve também ligações inespecíficas no processo de co-IP. A utilização de um controle isotipo foi de extrema importância, pois auxiliou no processo de mineração dos dados. Além disso, devido à grande variedade de parâmetros obtidos nas análises *in silico*, foi necessária a escolha de alguns parâmetros específicos para a filtragem das proteínas. As 5 proteínas selecionadas após a filtragem, obtidas a partir de dois doadores de DCs, sugerem que o citoesqueleto celular e as moléculas adaptadoras e de ligação parecem ter um importante papel nos processos de captura, internalização e sinalização de HIV-1 por Siglec1.

Além da identificação e obtenção da lista das proteínas co-imunoprecipitadas por espectrometria de massas, foi possível validar biologicamente por Western blotting e microscopia de fluorescência as proteínas sintenina-1 e L-plastina. Tais proteínas foram identificadas em comum entre os dois primeiros doadores de DCs. Os resultados de validação por Western Blotting dessas proteínas puderam auxiliar na confirmação dos resultados obtidos pela espectrometria de massas.

Contudo, houve também diversas proteínas identificadas que apareceram em apenas um doador, por isso foi necessário a realização da co-IP em mais dois doadores de DCs, totalizando 4 doadores de DCs. Todavia, ainda não foi possível obter até a presente data, os resultados da espectrometria de massas de todos os doadores. Além disso, realizamos a co-IP em macrófagos derivados de monócitos para futuramente, compararmos o contexto proteômico com as DCs. Nesse sentido, mais estudos e pesquisas serão necessários para a compreensão do interatoma Siglec-1/HIV-1 em células mieloides humanas. Como por exemplo, experimentos de genética reversa, inibindo a expressão da sintenina-1 ou da L-plastina, para avaliar o papel de tais proteínas na internalização de HIV-1.

7. Referências

- AFRATIS, N. A.; NIKITOVIC, D.; MULTHAUPT, H. A. B.; et al. Syndecans – key regulators of cell signaling and biological functions. **FEBS Journal**, 2017.
- AKIYAMA, H.; RAMIREZ, N. G. P.; GUDHETI, M. V.; GUMMULURU, S. CD169-Mediated Trafficking of HIV to Plasma Membrane Invaginations in Dendritic Cells Attenuates Efficacy of Anti-gp120 Broadly Neutralizing Antibodies. **PLoS Pathogens**, 2015.
- AVRIL, T.; WAGNER, E. R.; WILLISON, H. J.; CROCKER, P. R. Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin 7 mediates selective recognition of sialylated glycans expressed on *Campylobacter jejuni* lipooligosaccharides. **Infection and Immunity**, 2006.
- BARGER, C. J.; ZHANG, W.; SHARMA, A.; et al. Expression of the POTE gene family in human ovarian cancer. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2018.
- BARRÉ-SINOUSSE, F.; ROSS, A. L.; DELFRAISSY, J. F. Past, present and future: 30 years of HIV research. **Nature Reviews Microbiology**, 2013.
- BERA, T. K.; HUYNH, N.; MAEDA, H.; et al. Five POTE paralogs and their splice variants are expressed in human prostate and encode proteins of different lengths. **Gene**, 2004.
- BERGANTZ L, SUBRA F, DEPREZ E, DELELIS O, RICHETTA C. Interplay between Intrinsic and Innate Immunity during HIV Infection. **Cells**. 2019.
- BOGGIANO, C.; MANEL, N.; LITTMAN, D. R. Dendritic Cell-Mediated trans-Enhancement of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infectivity Is Independent of DC-SIGN. **Journal of Virology**, 2007.
- BORNHÖFFT, K. F.; GOLDAMMER, T.; REBL, A.; GALUSKA, S. P. Siglecs: A journey through the evolution of sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins. **Developmental and Comparative Immunology**, 2018.
- BRACQ, L.; XIE, M.; BENICHOUS, S.; BOUCHET, J. Mechanisms for cell-to-cell transmission of HIV-1. **Frontiers in Immunology**, 2018.
- BROWN, A.; GARTNER, S.; KAWANO, T.; BENOIT, N.; CHENG-MAYER, C. HLA-A2 down-regulation on primary human macrophages infected with an M-tropic EGFP-tagged HIV-1 reporter virus. **Journal of Leukocyte Biology**, 2005.

- BRENCHLEY, J.M.; PRICE, D.A.; SCHACKER, T.W. et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. **Nat Med**, 2006.
- CAMERON, P. U.; FREUDENTHAL, P. S.; BARKER, J. M.; et al. Dendritic cells exposed to human immunodeficiency virus type-1 transmit a vigorous cytopathic infection to CD4+ T cells. **Science**, 1992.
- CAO, H.; CROCKER, P. R. Evolution of CD33-related siglecs: Regulating host immune functions and escaping pathogen exploitation? **Immunology**, 2011.
- CARLSON, K. A.; CIBOROWSKI, P.; SCHELLPEPER, C. N.; et al. Proteomic fingerprinting of HIV-1-infected human monocyte-derived macrophages: A preliminary report. **Journal of Neuroimmunology. Anais...** , 2004.
- CHANG, Y. C.; NIZET, V. The interplay between Siglecs and sialylated pathogens. **Glycobiology**, 2014.
- CIBOROWSKI, P.; KADIU, I.; ROZEK, W.; et al. Investigating the human immunodeficiency virus type 1-infected monocyte-derived macrophage secretome. **Virology**, 2007.
- COBOS-JIMÉNEZ, V.; BOOIMAN, T.; HAMANN, J.; KOOTSTRA, N. A. Macrophages and HIV-1. **Current Opinion in HIV and AIDS**, 2011. COBOS-JIMÉNEZ, V.; BOOIMAN, T.; HAMANN, J.; KOOTSTRA, N. A. Macrophages and HIV-1. **Current Opinion in HIV and AIDS**, 2011.
- COUCHMAN, J. R. Syndecans: Proteoglycan regulators of cell-surface microdomains? **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 2003.
- COUTTS, A. S.; MACKENZIE, E.; GRIFFITH, E.; BLACK, D. M. TES is a novel focal adhesion protein with a role in cell spreading. **Journal of Cell Science**, 2003.
- CROISÉ, P.; EESTAY-AAHUMADA, C.; GASMAN, S.; ORY, S. Rho GTPases, phosphoinositides, and actin: A tripartite framework for efficient vesicular trafficking. **Small GTPases**, 2014.
- DEEKS, S. G.; OVERBAUGH, J.; PHILLIPS, A.; BUCHBINDER, S. HIV infection. **Nature Reviews Disease Primers**, 2015.
- DENEKA, M.; PELCHEN-MATTHEWS, A.; BYLAND, R.; RUIZ-MATEOS, E.; MARSH, M. In macrophages, HIV-1 assembles into an intracellular plasma membrane domain containing the tetraspanins CD81, CD9, and CD53. **Journal of Cell Biology**, 2007.

- DE WITTE, L.; BOBARDT, M.; CHATTERJI, U.; et al. Syndecan-3 is a dendritic cell-specific attachment receptor for HIV-1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2007.
- DONG, X.; LI, H.; DERDOWSKI, A.; et al. AP-3 directs the intracellular trafficking of HIV-1 gag and plays a key role in particle assembly. **Cell**, 2005.
- EVANS, J. G.; CORREIA, I.; KRASAVINA, O.; WATSON, N.; MATSUDAIRA, P. Macrophage podosomes assemble at the leading lamella by growth and fragmentation. **Journal of Cell Biology**, 2003.
- DUPONT, M.; SOURIANT, S.; BALBOA, L.; et al. Tuberculosis-associated IFN- λ induces Siglec-1 on tunneling nanotubes and favors HIV-1 spread in macrophages. **eLife**, 2020.
- FANTUZZI, L.; BELARDELLI, F.; GESSANI, S. Monocyte/macrophage-derived CC chemokines and their modulation by HIV-1 and cytokines: A complex network of interactions influencing viral replication and AIDS pathogenesis. **Journal of Leukocyte Biology**, 2003.
- FELTS, R. L.; NARAYAN, K.; ESTES, J. D.; et al. 3D visualization of HIV transfer at the virological synapse between dendritic cells and T cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2010.
- FREED, E. O. HIV-1 assembly, release and maturation. **Nature Reviews Microbiology**, 2015.
- GARCIA, E.; NIKOLIC, D. S.; PIGUET, V. HIV-1 replication in dendritic cells occurs through a tetraspanin-containing compartment enriched in AP-3. **Traffic**, 2008.
- GARCIA, E.; PION, M.; PELCHEN-MATTHEWS, A.; et al. HIV-1 trafficking to the dendritic cell-T-cell infectious synapse uses a pathway of tetraspanin sorting to the immunological synapse. **Traffic**, 2005.
- GARCÍA, M.; BUZÓN, M. J.; BENITO, J. M.; RALLÓN, N. Peering into the HIV reservoir. **Reviews in Medical Virology**, 2018.
- GEIJTENBEEK, T. B. H.; KWON, D. S.; TORENSMA, R.; et al. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. **Cell**, 2000.
- GARCÍA-EXPÓSITO, L.; ZIGLIO, S.; BARROSO-GONZÁLEZ, J.; et al. Gelsolin activity controls efficient early HIV-1 infection. **Retrovirology**, 2013.

- GAUDIN, R; DE ALENCAR, BC; JOUVE, M; BERRE, S; LE BOUDER, E; SCHINDLER, M et al. Critical role for the kinesin KIF3A in the HIV life cycle in primary human macrophages. **J Cell Biol**, 2012.
- GORDÓN-ALONSO, M.; ROCHA-PERUGINI, V.; ÁLVAREZ, S.; et al. The PDZ-adaptor protein syntenin-1 regulates HIV-1 entry. **Molecular Biology of the Cell**, 2012.
- GRANT, M. K. O.; SHAPIRO, S. L.; ASHE, K. H.; LIU, P.; ZAHS, K. R. A Cautionary Tale: Endogenous Biotinylated Proteins and Exogenously-Introduced Protein A Cause Antibody-Independent Artefacts in Western Blot Studies of Brain-Derived Proteins. **Biological Procedures Online**, 2019.
- GRÖBNER, S.; LUKOWSKI, R.; AUTENRIETH, I. B.; RUTH, P. Lipopolysaccharide induces cell volume increase and migration of dendritic cells. **Microbiology and Immunology**, 2014.
- GROOT, F.; RUSSELL, R. A.; BAXTER, A. E.; et al. Efficient macrophage infection by phagocytosis of dying HIV-1 -infected CD4+T cells. **Retrovirology**, 2011.
- GROOT, F.; WELSCH, S.; SATTENTAU, Q. J. Efficient HIV-1 transmission from macrophages to T cells across transient virological synapses. **Blood**, 2008.
- GUMMULURU, S.; ROGEL, M.; STAMATATOS, L.; EMERMAN, M. Binding of Human Immunodeficiency Virus Type 1 to Immature Dendritic Cells Can Occur Independently of DC-SIGN and Mannose Binding C-Type Lectin Receptors via a Cholesterol-Dependent Pathway. **Journal of Virology**, 2003.
- HAGI, A.; HIRATA, H.; SHINOMIYA, H. Analysis of a bacterial lipopolysaccharide-activated serine kinase that phosphorylates p65/L-plastin in macrophages. **Microbiology and Immunology**, v. 50, n. 4, p. 331–335, 2006.
- HAHN, Y.; BERA, T. K.; PASTAN, I. H.; LEE, B. Duplication and extensive remodeling shaped POTE family genes encoding proteins containing ankyrin repeat and coiled coil domains. **Gene**, 2006.
- HAMMONDS, J. E.; BEEMAN, N.; DING, L.; et al. Siglec-1 initiates formation of the virus-containing compartment and enhances macrophage-to-T cell transmission of HIV-1. **PLoS Pathogens**, 2017.
- HEIKEMA, A. P.; BERGMAN, M. P.; RICHARDS, H.; et al. Characterization of the specific interaction between sialoadhesin and sialylated *Campylobacter jejuni* lipooligosaccharides. **Infection and Immunity**, 2010.

HONEYCUTT, J. B.; THAYER, W. O.; BAKER, C. E.; et al. HIV persistence in tissue macrophages of humanized myeloid-only mice during antiretroviral therapy. **Nature Medicine**, 2017.

HÖÖK, P.; VALLEE, R. B. The dynein family at a glance. **Journal of Cell Science**, 2006. HYUN, J. Y.; REUTER, M. A.; MCDONALD, D. HIV traffics through a specialized, surface-accessible intracellular compartment during trans-infection of T cells by mature dendritic cells. **PLoS Pathogens**, 2008.

HU WS, HUGHES SH. HIV-1 REVERSE TRANSCRIPTION. **Cold Spring Harb Perspect Med**. 2012.

IZQUIERDO-USEROS, N.; LORIZATE, M.; MCLAREN, P. J.; et al. HIV-1 Capture and Transmission by Dendritic Cells: The Role of Viral Glycolipids and the Cellular Receptor Siglec-1. **PLoS Pathogens**, 2014.

IZQUIERDO-USEROS, N.; LORIZATE, M.; PUERTAS, M. C.; et al. Siglec-1 Is a Novel Dendritic Cell Receptor That Mediates HIV-1 Trans-Infection Through Recognition of Viral Membrane Gangliosides. **PLoS Biology**, 2012.

JACOBS, T.; ERDMANN, H.; FLEISCHER, B. Molecular interaction of Siglecs (sialic acid-binding Ig-like lectins) with sialylated ligands on *Trypanosoma cruzi*. **European Journal of Cell Biology**, 2010.

JANJI, B.; GIGANTI, A.; DE CORTE, V.; et al. Phosphorylation on Ser5 increases the F-actin-binding activity of L-plastin and promotes its targeting to sites of actin assembly in cells. **Journal of Cell Science**, 2006.

KANDATHIL, A. J.; SUGAWARA, S.; BALAGOPAL, A. Are T cells the only HIV-1 reservoir. **Retrovirology**, 2016.

KIJEWSKI, S. D. G.; GUMMULURU, S. A mechanistic overview of dendritic cell-mediated HIV-1 trans infection: The story so far. **Future Virology**, 2015.

KLAAS, M.; CROCKER, P. R. Sialoadhesin in recognition of self and non-self. *Seminars in Immunopathology*. **Anais...** , 2012.

KLAAS, M.; OETKE, C.; LEWIS, L. E.; et al. Sialoadhesin Promotes Rapid Proinflammatory and Type I IFN Responses to a Sialylated Pathogen, *Campylobacter jejuni* . **The Journal of Immunology**, 2012.

KOPPENSTEINER, H.; BRACK-WERNER, R.; SCHINDLER, M. Macrophages and their relevance in Human Immunodeficiency Virus Type I infection. **Retrovirology**, 2012.

KOPPENSTEINER, H.; BRACK-WERNER, R.; SCHINDLER, M. Macrophages and their relevance in Human Immunodeficiency Virus Type I infection. **Retrovirology**, 2012.

KWON, D. S.; GREGORIO, G.; BITTON, N.; HENDRICKSON, W. A.; LITTMAN, D. R. DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection. **Immunity**, 2002.

LAHOUESSA, H.; DADDACHA, W.; HOFMANN, H.; et al. SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates. **Nature Immunology**, 2012.

LATYSHEVA, N.; MURATOV, G.; RAJESH, S.; et al. Syntenin-1 Is a New Component of Tetraspanin-Enriched Microdomains: Mechanisms and Consequences of the Interaction of Syntenin-1 with CD63. **Molecular and Cellular Biology**, 2006.

LEHMANN, M.; NIKOLIC, D.S.; PIGUET, V. How HIV-1 takes advantage of the cytoskeleton during replication and cell-to-cell transmission. **Viruses**, 2011.

LI, G.; DE CLERCQ, E. HIV Genome-Wide Protein Associations: a Review of 30 Years of Research. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 2016.

LUBBEN, N. B.; SAHLENDER, D. A.; MOTLEY, A. M.; et al. HIV-1 Nef-induced down-regulation of MHC class I requires AP-1 and clathrin but not PACS-1 and is impeded by AP-2. **Molecular Biology of the Cell**, 2007.

LÜBBERS, J.; RODRÍGUEZ, E.; VAN KOOYK, Y. Modulation of Immune Tolerance via Siglec-Sialic Acid Interactions. **Frontiers in immunology**, 2018.

MAARTENS, G.; CELUM, C.; LEWIN, S. R. HIV infection: Epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. *The Lancet*. **Anais...**, 2014.

MANCHES, O.; FRLETA, D.; BHARDWAJ, N. Dendritic cells in progression and pathology of HIV infection. **Trends in Immunology**, 2014.

MARTINEZ-PICADO, J.; MCLAREN, P. J.; ERKIZIA, I.; et al. Identification of siglec-1 null individuals infected with HIV-1. **Nature Communications**, 2016.

MARTINEZ-PICADO J, ZURAKOWSKI R, BUZÓN MJ, STEVENSON M. Episomal HIV-1 DNA and its relationship to other markers of HIV-1 persistence. **Retrovirology**. 2018.

MATARRESE, P.; MALORNI, W. Human immunodeficiency virus (HIV)-1 proteins and cytoskeleton: Partners in viral life and host cell death. **Cell Death and Differentiation**, v. 12, p. 932–941, 2005.

- MCDONALD, D.; VODICKA, M. A.; LUCERO, G.; et al. Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells. **Journal of Cell Biology**, 2002.
- MCDONALD, D.; WU, L.; BOHKS, S. M.; et al. Recruitment of HIV and its receptors to dendritic cell-T cell junctions. **Science**, 2003.
- MÉNAGER, MM.; LITTMAN, DR. Actin Dynamics Regulates Dendritic Cell-Mediated Transfer of HIV-1 to T Cells. **Cell**, 2016
- MIKULAK, J.; DI VITO, C.; ZAGHI, E.; MAVILIO, D. Host immune responses in HIV-1 infection: The emerging pathogenic role of siglecs and their clinical correlates. **Frontiers in Immunology**, 2017.
- MLCOCHOVA, P.; PELCHEN-MATTHEWS, A.; MARSH, M. Organization and regulation of intracellular plasma membrane-connected HIV-1 assembly compartments in macrophages. **BMC Biology**, 2013.
- MONTEIRO, V. G.; LOBATO, C. S. S.; SILVA, A. R.; et al. Increased association of Trypanosoma cruzi with sialoadhesin positive mice macrophages. **Parasitology Research**, 2005.
- MORLEY, S. C. The actin-bundling protein L-plastin: A critical regulator of immune cell function. **International Journal of Cell Biology**, 2012.
- NAUWYNCK, Hans. **Novel insights in the physiological function of sialoadhesin as a downregulator of macrophage phagocytosis and its ...** **Novel insights in the physiological function of sialoadhesin as a**. Tese PhD. 2012.
- PEREZ-ZSOLT, D.; ERKIZIA, I.; PINO, M.; et al. Anti-Siglec-1 antibodies block Ebola viral uptake and decrease cytoplasmic viral entry. **Nature Microbiology**, 2019.
- PEREZ-ZSOLT, D.; MARTINEZ-PICADO, J.; IZQUIERDO-USEROS, N. When Dendritic Cells Go Viral: The Role of Siglec-1 in Host Defense and Dissemination of Enveloped Viruses. **Viruses**, 2019.
- PILLAI, S.; NETRAVALI, I. A.; CARIAPPA, A.; MATTOO, H. Siglecs and immune regulation. **Annual Review of Immunology**, 2012.
- PINO, M.; ERKIZIA, I.; BENET, S.; et al. HIV-1 immune activation induces Siglec-1 expression and enhances viral trans-infection in blood and tissue myeloid cells. **Retrovirology**, 2015.
- PURYEAR, W. B.; YU, X.; RAMIREZ, N. P.; REINHARD, B. M.; GUMMULURU, S. HIV-1 incorporation of host-cell-derived glycosphingolipid GM3 allows for

capture by mature dendritic cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2012.

ROCHA-PERUGINI, V.; GORDON-ALONSO, M.; SÁNCHEZ-MADRID, F. PIP2: Choreographer of actin-adaptor proteins in the HIV-1 dance. **Trends in Microbiology**, 2014.

RODRIGUES, V.; RUFFIN, N.; SAN-ROMAN, M.; BENARROCH, P. Myeloid cell interaction with HIV: A complex relationship. **Frontiers in Immunology**, 2017.

RODRIGUEZ-PLATA, M.T.; PUIGDOMÈNECH, I.; IZQUIERDO-USEROS, N. et al. The infectious synapse formed between mature dendritic cells and CD4⁺T cells is independent of the presence of the HIV-1 envelope glycoprotein. **Retrovirology**, 2013.

ROY, S.; MANDAL, C. Leishmania donovani Utilize Sialic Acids for Binding and Phagocytosis in the Macrophages through Selective Utilization of Siglecs and Impair the Innate Immune Arm. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2016.

RUFFIN, N; GEA-MALLORQUÍ, E; BROUILLER, F; JOUVE, M; SILVIN, A; SEE, P; DUTERTRE, CA; GINHOUX, F; BENARROCH, P. Constitutive Siglec-1 expression confers susceptibility to HIV-1 infection of human dendritic cell precursors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2019.

SALA-VALDÉS, M.; GORDÓN-ALONSO, M.; TEJERA, E.; et al. Association of syntenin-1 with M-RIP polarizes Rac-1 activation during chemotaxis and immune interactions. **Journal of Cell Science**, 2012.

SANDERS, R. W.; DE JONG, E. C.; BALDWIN, C. E.; et al. Differential Transmission of Human Immunodeficiency Virus Type 1 by Distinct Subsets of Effector Dendritic Cells. **Journal of Virology**, 2002.

SATO, KATSUAKI; FUJITA, SHIGEHARU. Dendritic cells-nature and classification. **Allergology International**, 2007.

SEWALD, X.; LADINSKY, M. S.; UCHIL, P. D.; et al. Retroviruses use CD169-mediated trans-infection of permissive lymphocytes to establish infection. **Science**, 2015.

SHEN R, KAPPES JC, SMYTHIES LE, RICHTER HE, NOVAK L, SMITH PD. Vaginal myeloid dendritic cells transmit founder HIV-1. **Journal of Virology**, 2014.

SILVIN, A.; YU, C. I.; LAHAYE, X.; et al. Constitutive resistance to viral infection in human CD141+ dendritic cells. **Science Immunology**, 2017.

STELLA, A. O.; TURVILLE, S. All-round manipulation of the actin cytoskeleton by HIV. **Viruses**, 2018.

STEVENSON, M. Role of myeloid cells in HIV-1-host interplay. **Journal of NeuroVirology**, 2015.

SUGAYA, Makoto et al. HIV-infected Langerhans cells preferentially transmit virus to proliferating autologous CD4+ memory T cells located within Langerhans cell-T cell clusters. **The Journal of Immunology**, 2004.

SUNDQUIST, W. I.; KRÄUSSLICH, H. G. HIV-1 assembly, budding, and maturation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, 2012.

TRAIKOV, S.; STANGE, C.; WASSMER, T.; et al. Septin6 and septin7 GTP binding proteins regulate AP-3- and ESCRT-dependent multivesicular body biogenesis. **PLoS ONE**, 2014.

TRIFONOVA RT, BOLLMAN B, BARTENEVA NS, LIEBERMAN J. Myeloid cells in intact human cervical explants capture HIV and can transmit It to CD4 T Cells. **Frontiers in Immunology**, 2018.

WILEN, C. B.; TILTON, J. C.; DOMS, R. W. HIV: Cell binding and entry. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, 2012.

WU, Y.; LAN, C.; REN, D.; CHEN, G. Y. Induction of siglec-1 by endotoxin tolerance suppresses the innate immune response by promoting TGF- β 1 production. **Journal of Biological Chemistry**, 2016.

YU, X.; XU, F.; RAMIREZ, N. G. P.; et al. Dressing up nanoparticles: A membrane wrap to induce formation of the virological synapse. **ACS Nano**, 2015.

ZHENG, Q.; HOU, J.; ZHOU, Y.; et al. Siglec1 suppresses antiviral innate immune response by inducing TBK1 degradation via the ubiquitin ligase TRIM27. **Cell Research**, 2015.

ZIMMERMANN, P. The prevalence and significance of PDZ domain-phosphoinositide interactions. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, 2006.