

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

## 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.

## 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).

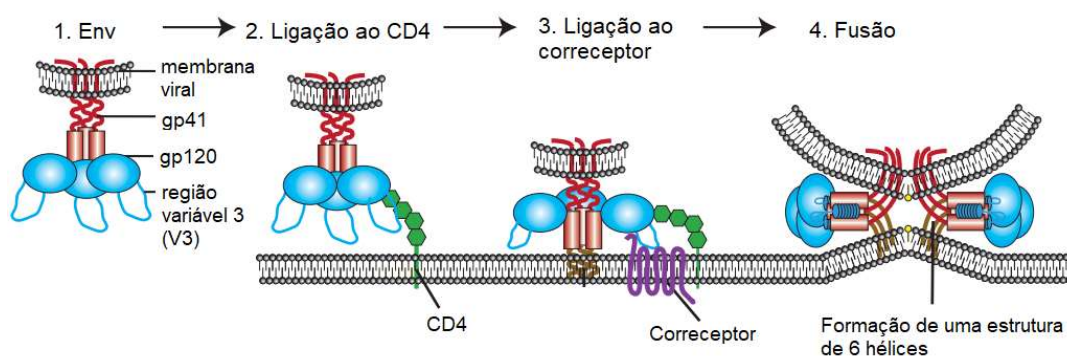
O HIV é um retrovírus do gênero lentivírus que infecta e causa depleção de linfócitos T CD4+, levando a uma imunodeficiência fatal na grande maioria dos indivíduos infectados na ausência de tratamento. A doença causada pelo HIV-1 é conhecida como síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (DEEKS et 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).

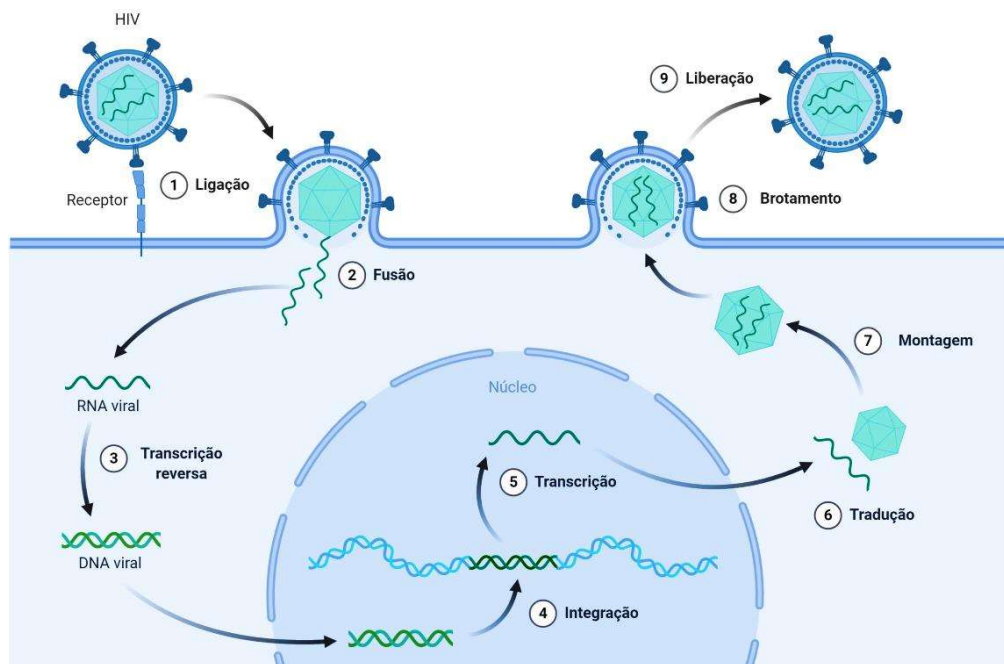
A infecção pelo HIV-1 inicia-se quando a glicoproteína do envelope viral, gp120, se liga ao receptor CD4 da célula alvo (figura 1). A ligação acarreta em uma mudança conformacional da gp120, permitindo a ligação ao correceptor CCR5 ou CXCR4. Em seguida, os domínios da glicoproteína gp41 formam uma estrutura 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 episomal 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**

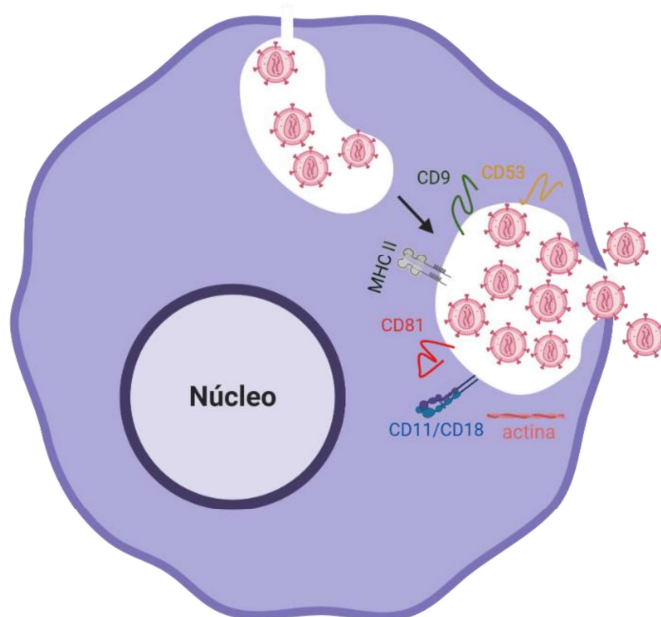
O HIV-1 é capaz de atravessar a barreira mucosa, principalmente através de pequenas lesões que ocorrem durante a relação sexual e prejudicam a integridade epitelial. Macrófagos, células dendríticas e células T CD4+ de memória que patrulham a superfície da mucosa são as primeiras células imunes que enfrentam 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 abrigoando 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).

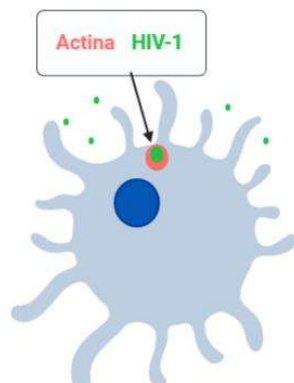
De maneira geral, a detecção de patógenos por DCs imaturas (iDCs) nos tecidos da mucosa induz a secreção de citocinas e quimiocinas. Essa resposta inata precoce cria um microambiente inflamatório que estimula a maturação e a migração das DC para os tecidos linfoides secundários. Nas áreas de células 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).

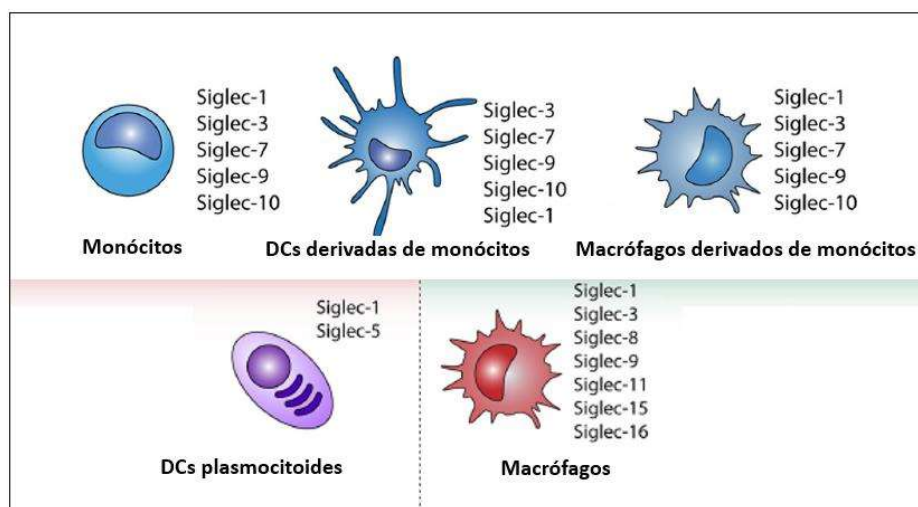
Por outro lado, outros estudos apontaram que a internalização de HIV-1 por DC-SIGN leva à degradação do vírus (SANDERS et al., 2002; IZQUIERDO-USEROS et al., 2007). Mais tarde, alguns trabalhos deixaram claro que DC-SIGN não é essencial para a trans-infecção, e que provavelmente outros receptores estão 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).

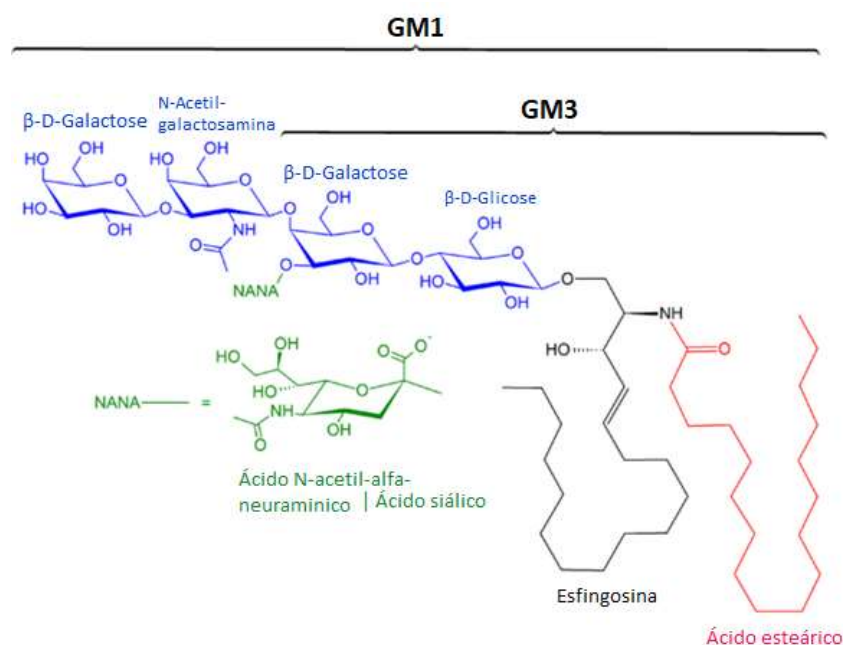


**Figura 5.** Expressão de Siglecs humanos em monócitos, DCs e macrófagos. Adaptado de: LÜBBERS et al., 2018.

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).

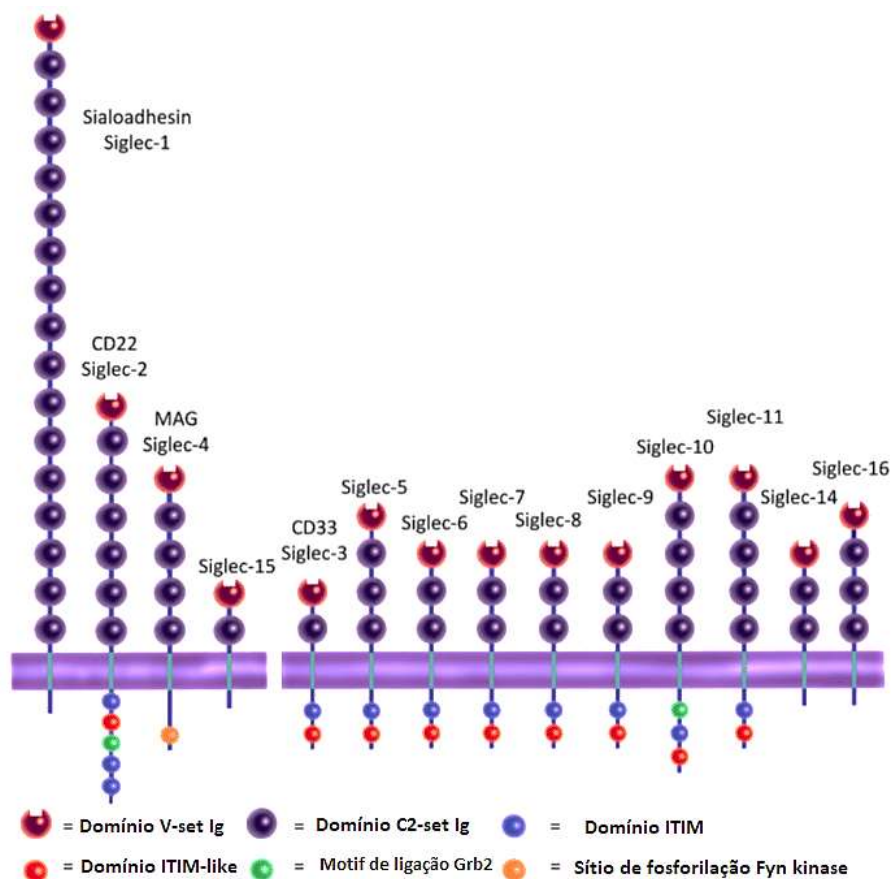
Sabe-se que o HIV-1 brota de compartimentos especializados da membrana celular conhecidos como *lipid rafts*, ou balsas lipídicas. Esses compartimentos contêm combinações de colesterol, esfingomielina, glicosíngolípídios e proteínas da membrana. Nesse sentido, ao brotar, o HIV-1 é envelopado em uma membrana 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.



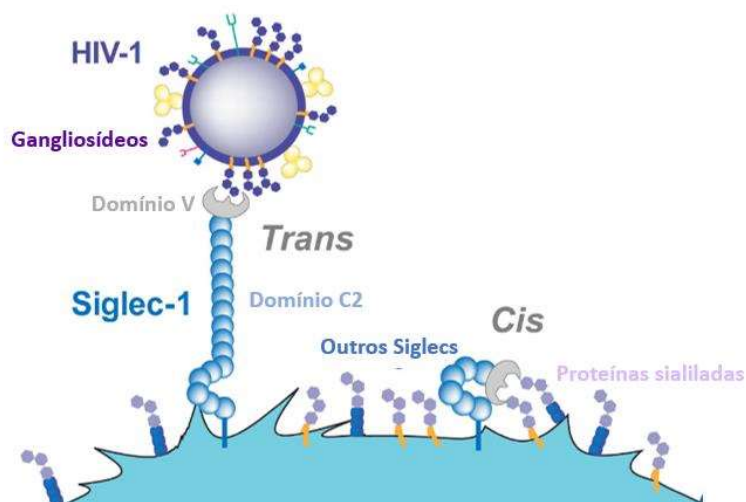
Siglec1 possui uma grande região extracelular que pode ser subdividida em um domínio N-terminal do tipo imunoglobulina do conjunto V, seguido por 16 domínios do tipo Ig do conjunto C2, contando ainda com um domínio transmembranar e uma cauda citoplasmática curta (figura 7). Esses domínios separam o sítio 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).



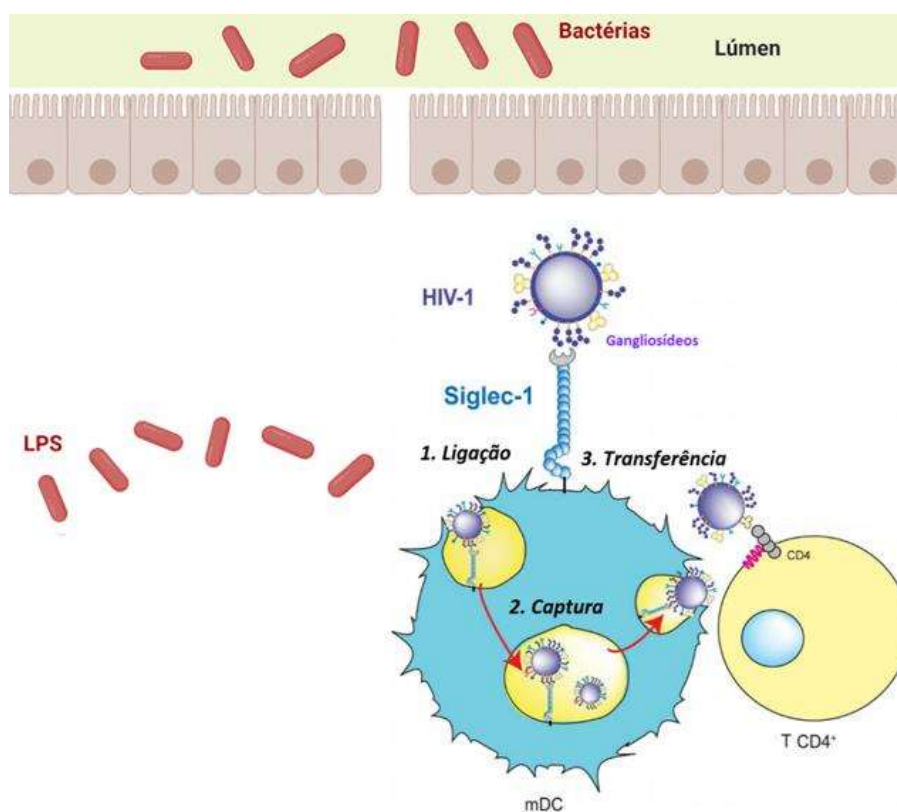
**Figura 8.** Siglec1 estende seu domínio do conjunto V para além do glicocálce da célula, permitindo o reconhecimento de moléculas sialiladas em diferentes ligantes e patógenos (modo *trans*). Outros Siglecs que exibem menos domínios do tipo C2 interagem principalmente em modo *cis*, com moléculas sialiladas 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  $\alpha$ 2-3 (HEIKEMA et al., 2010) e  $\alpha$ 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.

## 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-I 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.
- LAHOUASSA, 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<sup>+</sup>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- $\beta$ 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.