

# UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



*El tratamiento con CRISPR-Cas9 y ARN guías específicos para los genes **NDUFS2**, **MNT**, **MSR1** y **FITM1** mediante CRISPR-Cas9 permiten la reactivación del provirus de VIH-1 en modelos celulares de Microglías y Linfocitos T.*

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Magíster en Bioquímica área de Especialización en Bioquímica Clínica y Memoria para optar al Título de Bioquímico por:

***Valeria Fernanda Olavarría Gutiérrez***

Directores de Tesis: Dr. Fernando Valiente Echeverría y Dra. Chantal L. Márquez

Santiago-CHILE

Octubre 2024

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER**

Se informa a la Dirección de la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

**Valeria Fernanda Olavarría Gutiérrez**

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: Bioquímica Clínica y Título de Bioquímica, en el examen público.

**Director de Tesis:**

**Dr. Fernando Valiente Echeverría**

---

**Directora de Tesis:**

**Dra. Chantal L. Márquez**

---

**Comisión Evaluadora de Tesis:**

**Dr. Mario Chiong**

---

**Dr. Dante Miranda**

---

**Dr. Pablo Ferrer**

---

## **FINANCIAMIENTO**

La presente tesis fue financiada por los siguientes proyectos:

Fondecyt 3200556 (CL-M), 1211547 (FV-E), 1190156 (RSR).

Anillo inflammation in HIV/AIDS ATE220016 (InflammAIDS) (FV-E, RSR).

ANID-ICM ICN2021 045 (FV-E, RSR).

ICGEB Early Career Grant CRP/CHL20-05\_EC (CL-M).

## AGRADECIMIENTOS

En primera instancia quisiera agradecer al Laboratorio de Virología Molecular y Celular por brindarme un espacio para la realización de mi tesis. En particular a mis directores de tesis, Dra. Chantal L. Márquez y Dr. Fernando Valiente Echeverría, por sus enseñanzas, apoyo y confianza en mi trabajo. También a cada persona que es parte del laboratorio por el compañerismo, las risas y buenos momentos. No hubiese logrado llevar a cabo mi tesis sin el apoyo de todos ellos.

A mis padres, Marisol y Vladimiro, por estar conmigo en las buenas y las malas, por confiar en mis capacidades incluso cuando yo no lo hacía. Por brindarme todo el apoyo para continuar mis estudios y enfocarme enteramente en mi carrera, tenerlos cerca siempre me dio la fortaleza para seguir adelante. Sin ellos nada de esto sería posible.

A mi tata Mariano, que pese a que no tenemos un lazo sanguíneo ha estado en cada paso de mi vida alentándome, siguiendo con su compromiso que realizó a mi abuela Ximena quien falleció de cáncer cuando yo tenía 5 años y ha sido una de mis principales razones por las que elegí esta carrera.

A mi familia que pese a la distancia siempre han estado para brindarnos su cariño y amor, hemos pasado por muchos momentos difíciles, pero que nos han unido cada vez más haciendo que nuestro lazo sea aún más fuerte.

A mi segunda familia, los Contreras Henríquez que tampoco tenemos un lazo sanguíneo, pero han sido partícipes de momentos muy importantes en mi vida y se han alegrado de cada uno de mis logros.

A mis amigas del colegio Isidora y Sofía por ser las mejores amigas que la vida me pudo dar, y a mi amigo Cristian que siempre tuvieron una palabra de aliento para continuar cada día, pese a que no coincidían nuestros caminos profesionales.

A los amigos que hice durante la carrera, que, pese a que nuestros caminos se hayan separado, siempre tendrán un lugar importante en mi corazón. A los amigos que siguen conmigo hasta hoy Camila L, Camila G, Mónica, Kevin, Sebastián y Alexander, y que espero sigamos compartiendo nuestras vidas.

A mi pareja Brayan, mi compañero de vida, quien creyó en mis capacidades desde el comienzo, me ha acompañado en todo mi proceso de tesis y ha sido un apoyo incondicional en todo aspecto, alentándome en cada proceso.

Por último, quisiera dedicar un espacio especial a quienes ya no nos acompañan en este plano, a mi abuela Ximena Molina, mi tía Gladys Gutiérrez, mi tío Carlos Escalona, mi bisabuela Alicia Oyanedel, mi tío Juan Morales y mi tía abuela María Urriola.

Todo lo que soy es gracias a ustedes.

# ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>FINANCIAMIENTO</b> .....	<b>3</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>4</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>6</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>7</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>9</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>11</b>
Virus de la inmunodeficiencia humana.....	11
Epidemiología de VIH/SIDA.....	11
Ciclo replicativo de VIH-1.....	13
Latencia de VIH-1.....	15
Estrategias terapéuticas frente a infección latente por VIH-1.....	17
Modelos y estrategias de estudio de latencia por VIH-1.....	17
Antecedentes de la investigación .....	19
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>21</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>21</b>
<b>OBJETIVO ESPECÍFICOS</b> .....	<b>21</b>
Objetivo Específico 1. Validar individualmente 5 genes del hospedero identificados como promotores de la latencia de VIH-1 en el modelo microglial (Hμglia/HIV HC69).....	21
Objetivo Específico 2. Evaluar la contribución de los genes validados en el objetivo 1, en un modelo de latencia de células T (J-Lat 10.6).....	21
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>31</b>
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>45</b>
<b>CONCLUSIÓN</b> .....	<b>52</b>
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>53</b>

## **ABREVIATURAS**

**VIH:** Virus de la inmunodeficiencia humana

**SIDA:** Síndrome de inmunodeficiencia adquirida

**ARNm:** ARN mensajero

**NF- $\kappa$ B:** Factor nuclear kappaB

**GFP:** Proteína fluorescente verde

**CRISPR:** Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas

**Cas9:** Proteína 9 asociada a CRISPR

**sgCtrl:** ARN guía control no específico (no se dirige a ningún gen humano)

**NDUFS2:** proteína hierro-azufre 2 de la NADH deshidrogenasa mitocondrial

**SLC16A7:** Transportador de monocarboxilato 2 o miembro 7 de la familia de transportadores de solutos 16

**FITM1:** Proteína transmembrana 1 inductora de almacenamiento de grasa

**MSR1:** Receptor depurador de macrófagos 1

**MNT:** Proteína de unión a Max

**TSC1:** proteína de la esclerosis tuberosa 1 o también denominada Hamartina

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**ELISA:** Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

**WB:** Western blot

## RESUMEN

El virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) es el agente etiológico del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), considerado una pandemia mundial, millones de personas viven con el virus y ha cobrado alrededor de 40 millones de vidas según lo reportado por la OMS/UNAIDS.

VIH-1 infecta células que poseen el receptor CD4 y un correceptor CCR5 o CXCR4 que interactúan con las glicoproteínas de la envoltura del virión. La interacción permite el ingreso de la cápside viral en la célula, que transita hacia al núcleo, mientras ocurre la retrotranscripción del genoma viral, y posteriormente el denudamiento de la cápside. Gracias a la acción de la proteína viral integrasa, el genoma viral se integra al genoma celular, denominándose provirus, donde luego los procesos de síntesis de proteínas virales y liberación de partículas virales son comandados por la maquinaria celular. Aunque la terapia con antirretrovirales (TAR) ha mejorado la esperanza de vida de los pacientes al inhibir la replicación viral y la progresión de la infección, aún no existe una cura definitiva. Uno de los principales obstáculos en la lucha contra el VIH-1 es la presencia de la **infección latente**.

Las células infectadas de forma latente albergan el ADN proviral de VIH-1 integrado en su genoma de manera inactiva y evitando así su detección por el sistema inmunológico del hospedero. Estas células actúan como reservorios virales, manteniendo la infección a lo largo de la vida del individuo. Diferentes subconjuntos de células **T CD4+ en reposo**, macrófagos y células del sistema nervioso central como células dendríticas y **microglías** constituyen el reservorio latente. Los estudios sobre la infección latente por VIH-1 aún no logran comprender por completo los mecanismos de establecimiento y mantenimiento involucrados en los diversos tipos celulares que componen este reservorio.

Estudios de apagamiento (*knockout* o KO, por sus siglas en inglés) a gran escala se han utilizado ampliamente para identificar factores del hospedero implicados en la latencia de VIH-1. En los últimos años, la técnica que se ha popularizado para realizar *screening* con KO es **CRISPR** de genoma completo. En esta técnica se utiliza un ARN guía (sgRNA) para dirigir una nucleasa

(Cas9) a un gen específico y provocar una ruptura de la doble cadena, la maquinaria celular repara la ruptura provocando mutaciones de inserción o deleción que terminan con un gen no funcional.

En nuestro laboratorio, se realizó un *screening* KO basado en CRISPR-Cas9 en células Hµglia/HIV HC69, un modelo celular de latencia de microglías humanas que permite observar la reactivación del provirus de VIH-1 mediante la expresión de GFP. Se identificaron cientos de genes potenciales promotores de la latencia, de los cuales se seleccionaron 5 para realizar su validación individual. En la presente investigación, se propone que **el apagamiento individual de los genes NDUFS2, SLC16A7, MNT, MSR1 y FITM1 mediante CRISPR-Cas9 permiten la reactivación del provirus de VIH-1 en modelos celulares de Microglías y Linfocitos T.** Para responder a esta hipótesis, se realizó como primer objetivo la validación individual de 5 genes del hospedero identificados como promotores de la latencia de VIH-1 en el modelo microglial (Hµglia/HIV HC69). Para esto, se generaron KO individuales usando la metodología CRISPR-Cas9, y se identificó la reactivación del provirus latente mediante la evaluación de la expresión de GFP por citometría de flujo y la expresión de la proteína Cas9-Flag y GFP a través de *Western blot*. Estos experimentos confirmaron 4 genes como promotores de la latencia en este modelo, NDUFS2, MNT, MSR1 y FITM1. En el segundo objetivo se realizó la evaluación de la contribución de los genes validados en el objetivo 1 en un modelo de latencia de células T clonales (J-Lat 10.6). Este modelo permite también observar la reactivación del provirus de VIH-1 mediante expresión de GFP, por lo que se realizó el mismo procedimiento para la generación de KO individuales en J-Lat 10.6 y se evaluó la reactivación de la latencia mediante la expresión de GFP usando citometría de flujo y la expresión de Cas9-Flag, GFP y de p24 de VIH-1 a través de *Western blot*. Nuestros resultados indican que **el tratamiento con CRISPR-Cas9 y ARN guías específicos para los genes NDUFS2, MNT, MSR1 y FITM1 permite la reactivación del provirus de VIH-1 en modelos celulares de Microglías y Linfocitos T.**

Nuestros hallazgos ofrecen una nueva perspectiva sobre los posibles mecanismos involucrados en la infección latente en microglías y linfocitos T. Teniendo el potencial de respaldar el desarrollo de estrategias terapéuticas innovadoras para combatir el VIH.



## ABSTRACT

The Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1) is the etiological agent of Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS), which is considered a global pandemic. Millions of individuals live with the virus, and it has claimed approximately 40 million lives according to reports from OMS/UNAIDS.

HIV-1 infects cells that express the CD4 receptor and either the CCR5 or CXCR4 co-receptor, which interact with the virion envelope glycoproteins. This interaction facilitates the entry of the viral capsid into the cell, which then translocates to the nucleus while the retrotranscription of the viral genome occurs, followed by the uncoating of the capsid. Through the action of the viral integrase protein, the viral genome integrates into the cellular genome, forming a provirus, where subsequent processes of viral protein synthesis and viral particle release are directed by the cellular machinery. Although antiretroviral therapy (ART) has improved the life expectancy of patients by inhibiting viral replication and disease progression, a definitive cure remains elusive. One of the primary obstacles in the fight against HIV-1 is the presence of **latent infection**.

Latently infected cells harbor the proviral DNA of HIV-1 integrated into their genome in an inactive state, thereby evading detection by the host's immune system. These cells act as viral reservoirs, maintaining the infection throughout the individual's life. Various subsets of resting **CD4+ T cells**, macrophages, and central nervous system cells such as dendritic cells and **microglia** constitute the latent reservoir. Studies on HIV-1 latent infection have yet to fully elucidate the mechanisms of establishment and maintenance involved in the diverse cell types that comprise this reservoir.

Large-scale knockout (KO) studies have been widely utilized to identify host factors implicated in HIV-1 latency. In recent years, the technique that has gained popularity for conducting KO screenings is whole-genome **CRISPR**. This technique employs a guide RNA (sgRNA) to direct a nuclease (Cas9) to a specific gene, inducing a double-strand break, which the cellular machinery repairs, resulting in insertion or deletion mutations that render the gene non-functional.

In our laboratory, a CRISPR-Cas9-based KO screening was conducted in H $\mu$ glia/HIV HC69 cells, a cellular model of human microglial latency that allows for the observation of HIV-1 provirus reactivation through GFP expression. Hundreds of potential latency-promoting genes were identified, of which five were selected for individual validation. This research proposes that **the individual knockout of the genes NDUFS2, SLC16A7, MNT, MSR1, and FITM1 via CRISPR-Cas9 facilitates the reactivation of HIV-1 provirus in microglial and T lymphocyte cellular models.** To address this hypothesis, the first objective was the individual validation of the five host genes identified as promoters of HIV-1 latency in the microglial model (H $\mu$ glia/HIV HC69). Individual KOs were generated using the CRISPR-Cas9 methodology, and the reactivation of latent provirus was assessed by evaluating GFP expression via flow cytometry and the expression of Cas9-Flag and GFP through Western blot. These experiments confirmed four genes as latency promoters in this model: NDUFS2, MNT, MSR1, and FITM1. The second objective involved evaluating the contribution of the validated genes from objective 1 in a model of clonal T cell latency (J-Lat 10.6). This model also allows for the observation of HIV-1 provirus reactivation via GFP expression; thus, the same procedure was performed for generating individual KOs in J-Lat 10.6, and latency reactivation was assessed through GFP expression using flow cytometry and the expression of Cas9-Flag, GFP, and HIV-1 p24 via Western blot. Our results indicate **that treatment with CRISPR-Cas9 and specific guide RNAs for the genes NDUFS2, MNT, MSR1, and FITM1 allows for the reactivation of HIV-1 provirus in microglial and T lymphocyte cellular models.**

Our findings provide a new perspective on the potential mechanisms involved in latent infection in microglia and T lymphocytes, holding the potential to support the development of innovative therapeutic strategies to combat HIV.

# INTRODUCCIÓN

## Virus de la inmunodeficiencia humana

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es el agente etiológico del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), pertenece al género *Lentiviridae*, de la familia de los *Retroviridae*. Se caracteriza por tener un genoma de ARN monocatenario de polaridad positiva, (+)ssARN, que tiene múltiples marcos de lectura, además de una transcriptasa inversa que sintetiza un ADN de doble hebra a partir del ARN, el cual debe integrarse en el genoma celular del hospedero pasando a un estado denominado provirus [1, 2]. Codifica en su genoma proteínas reguladoras y accesorias: Tat, Rev, Vif, Vpr, Vpu y Nef, y tres genes característicos en el siguiente orden: 5'- *gag* - *pol* - *env* -3', donde el gen *gag* codifica las proteínas de la cápside, la nucleocápside y la matriz; *pol* codifica las enzimas transcriptasa inversa, integrasa y proteasas; y *env* codifica el precursor de la proteína de envoltura gp160 que originará proteínas de transmembrana (gp41) y de superficie (gp120).

Los lentivirus que provocan la enfermedad del SIDA en los seres humanos son el VIH-1 y 2, descubiertos en 1983 y 1986, respectivamente [3]. La mayoría de los casos de infección son provocados por VIH-1, el cual además es más agresivo que VIH-2, pese a que en los aspectos clínicos y epidemiológicos comparten gran similitud [3]. SIDA es la fase final de la infección caracterizada por una supresión crónica del sistema inmune debido a la muerte progresiva de los linfocitos T infectados [4].

## Epidemiología de VIH/SIDA

El VIH/SIDA es considerado una pandemia mundial, 39,9 millones de personas vivían con el virus en 2023 y ha cobrado alrededor de 42 millones de vidas desde que fue considerado una pandemia, según lo reportado por la OMS/UNAIDS. A pesar de que desde 2010 las nuevas infecciones por VIH han disminuido en un 32% en todo el mundo [5], la erradicación de la epidemia aún está lejos de alcanzarse. En Chile la situación es diferente, todos los años van en aumento las nuevas infecciones por VIH y se estima que 84 mil personas vivían con el virus en 2021, por lo que aún

sigue siendo un desafío sanitario importante en nuestro país y año a año se implementan campañas para prevenir y detectar la infección viral en la población [6].

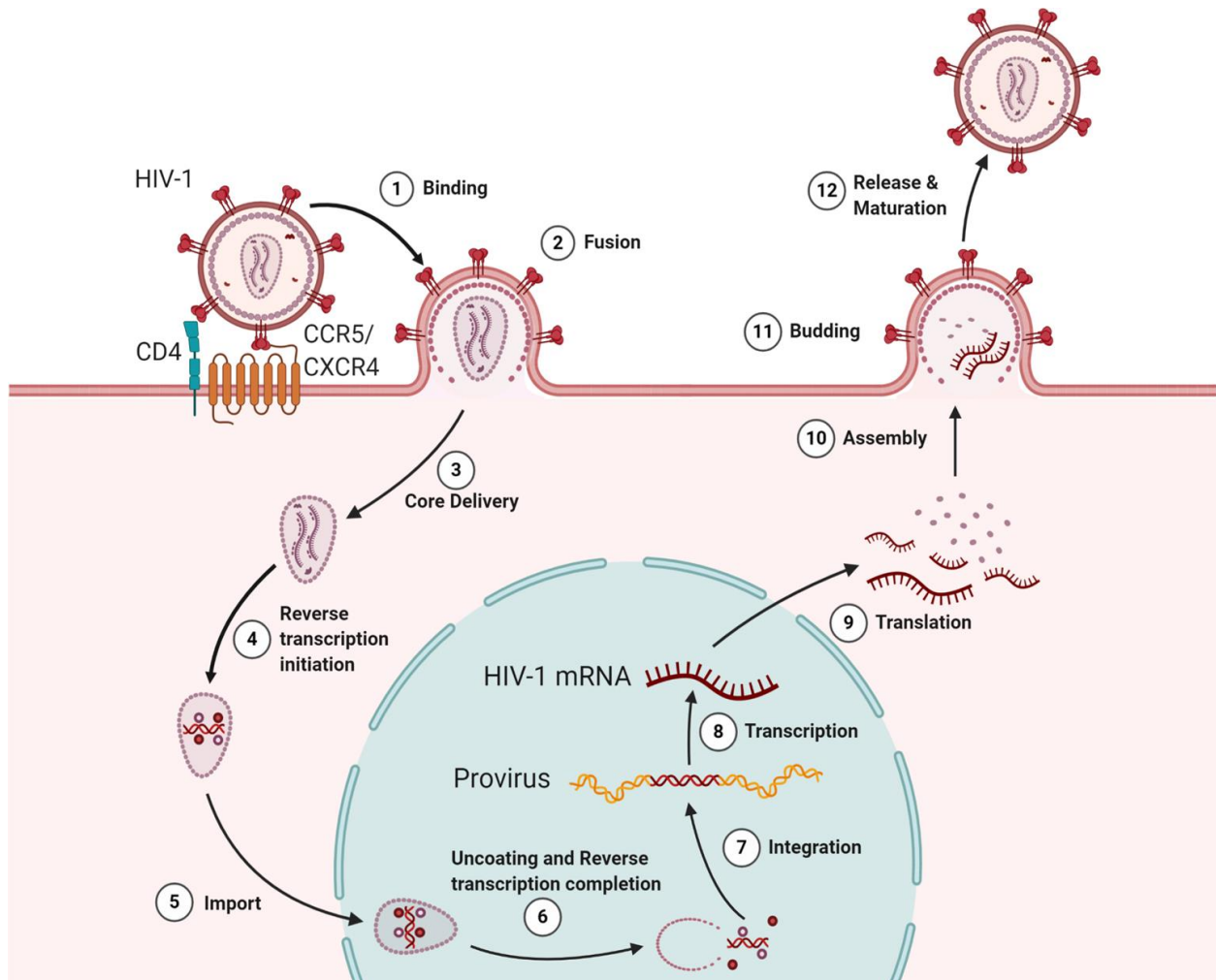
El VIH-1 se transmite por contacto con fluidos contaminados como la sangre, semen, líquido preseminal, secreciones vaginales y/o leche materna, por vía perinatal, por inoculación percutánea, y a través de contacto sexual, siendo la transmisión heterosexual sin protección responsable de casi el 70% de las infecciones por el virus [7]. Infecta a células que poseen el receptor CD4 y los correceptores CCR5 o CXCR4, que interactúan con las glicoproteínas de la envoltura del virión [8], por lo que infecta a linfocitos T CD4+, macrófagos y monocitos [9], células dendríticas [10], plaquetas [11], microglías [12] y astrocitos [13], teniendo un tropismo por células del sistema inmune y del sistema nervioso central, lo que lleva a quienes presentan la infección, a una inmunosupresión y anomalías neuropsiquiátricas [14].

El tratamiento disponible actualmente contra la infección por VIH-1 es la terapia con antirretrovirales (TAR) que inhibe la replicación viral y la progresión de la infección [15]. En la actualidad, existen 50 medicamentos que se encuentran aprobados por la FDA que actúan en distintas fases del ciclo viral [16]. El uso combinado de tres o más de estos medicamentos, lo que se conoce como terapia antirretroviral combinada (TARC o TARGA), ha sido considerablemente más eficaz que el uso individual de alguno de ellos y ha aumentado la esperanza de vida de los pacientes en un 90%, lo que ha convertido el SIDA de un diagnóstico mortal a una enfermedad de manejo crónico [17]. Pese al éxito que tiene este tipo de tratamiento, el SIDA sigue siendo una infección incurable, esto debido a la persistencia del provirus de forma latente a la que somete a los tipos celulares que infecta, lo que hace que sean insensibles a los fármacos de por vida [18]. Se necesita de la erradicación completa de las células infectadas, tanto las que tienen replicación activa como las con infección latente, así como también comprender mejor cómo se regula el establecimiento, mantenimiento y reactivación de la latencia de VIH en todos los tipos celulares que son reservorios fisiológicamente relevantes para desarrollar una estrategia de erradicación del VIH.

## Ciclo replicativo de VIH-1

La primera etapa del ciclo viral corresponde al establecimiento de la infección en la célula hospedera. La unión entre gp120, glicoproteína expuesta en la superficie de la envoltura del VIH, y el receptor celular promueve la fusión de la membrana viral con la membrana celular permitiendo la internalización de la cápside [1]. Mientras la cápside transita por el citoplasma de la célula hospedera, comienza la transcripción inversa del ARN viral para sintetizar ADN de doble cadena. Durante este proceso se acoplan a una serie de proteínas y varios componentes virales, entre ellos la integrasa, formando el complejo de preintegración (PIC) [19, 20]. La cápside completa o parte de ella ingresa al núcleo a través de los poros nucleares donde interactúa con CPSF6 transportando el complejo a “motas nucleares” en las cuales se produce la integración del ADN viral gracias a la integrasa [20]. Con el provirus integrado en el genoma celular comienza la fase tardía del ciclo de replicación viral que incluye la transcripción y el procesamiento del ARN viral, la traducción y modificación de proteínas virales, y la posterior liberación de viriones por gemación a través de la membrana plasmática celular [21]. La transcripción del provirus comienza en la región de repetición terminal larga (LTR) 5' por acción de la ARN polimerasa II de la célula hospedera. El ARN mensajero (ARNm) sintetizado sufre patrones complejos de empalme, ya que presenta marcos de lectura superpuestos, formando principalmente 3 tipos de transcritos (completamente procesados de 2 kb, parcialmente procesados de 4 kb y sin procesar de 9 kb) [21]. En la primera etapa de la replicación, se traduce principalmente el transcrito de 2 kb que produce las proteínas reguladoras Tat, Nef y Rev. Estas proteínas potencian la transcripción de todos los tipos de transcritos, exportación nuclear y traducción de transcritos virales empalmados y no empalmados para sintetizar el nuevo ARN viral y sus proteínas, por lo que estas proteínas dan indicio de una transcripción viral temprana [21]. Los transcritos de 4 kb son traducidos para generar las proteínas Env, Vpu, Vpr y Vif, mientras que el transcrito de 9 kb produce las poli-proteínas Gag y Gag-Pol y además corresponde al genoma viral completo. El ensamblaje de las partículas virales tiene lugar en la membrana plasmática de la célula hospedera, donde se acumulan las proteínas estructurales Gag y Gag-Pol dirigiendo el empaquetamiento del resto de las proteínas virales junto a las dos copias de ARNm no empalmado que dará origen al genoma viral [22, 23]. Al momento de ser liberadas, deben pasar por un proceso de maduración para ser infectivas, esto ocurre a través del procesamiento proteolítico de Gag y Pol por la enzima proteasa viral [24] (Figura 1). Al finalizar

el proceso de maduración, pueden propagarse e infectar otras células, la célula infectada productora del virus termina muriendo debido a los efectos citopáticos virales y a la respuesta inmune del organismo.



**Figura 1.** Ciclo replicativo de VIH-1 obtenido de Ramdas et al. (2020) [25]. La infección comienza cuando la glicoproteína de la envoltura se une al receptor CD4 y a los correceptores que atraviesan la membrana (CXCR4/CCR5) (paso 1), lo que facilita la entrada y la fusión de la partícula viral en la célula diana (paso 2). Después de la entrega del núcleo (paso 3), comienza la transcripción inversa en el citoplasma (paso 4) y el núcleo se importa al núcleo (paso 5). Después de la importación nuclear, se completa la desprotección y la transcripción inversa (paso 6) y la integrasa viral facilita la integración del genoma viral en el cromosoma del huésped (paso 7). La transcripción proviral (paso 8) produce ARN virales que se exportan al citoplasma para la producción de proteínas virales (paso 9). El ARN viral de longitud de genoma y las proteínas virales se ensamblan para empaquetarse en viriones para la gemación (pasos 10 y 11). Después de la gemación, la progenie del virus se libera y madura para convertirse en un virión infeccioso (paso 12).

## Latencia de VIH-1

Bajo ciertas circunstancias el virus en vez de replicar y producir nuevas partículas virales establece una infección latente donde no hay expresión génica. Las células infectadas de forma latente no sintetizan proteínas ni partículas virales, permaneciendo invisibles al sistema inmune del hospedero, por lo que el virus no puede ser eliminado de la célula [26]. El mecanismo de establecimiento de células con provirus latentes no se conoce por completo, pero se han propuesto varios modelos. Uno de ellos indica que la latencia viral podría establecerse a través de un mecanismo en el que las células T CD4+ infectadas con VIH-1 que presentan replicación viral activa, por ciertas circunstancias, vuelve a un estado de reposo no permisivo para la expresión de genes virales [27]. Según un segundo modelo, la latencia ocurriría inmediatamente luego de la infección, donde la infección de célula promueve que esta entre en un estado de memoria en reposo G<sub>0</sub> [27]. Otro modelo sugiere que la latencia se establece a través de la infección directa de células T CD4+ de memoria en reposo [28]. Un estudio realizado por Chávez *et al.* ha demostrado que estos tres escenarios podrían producir una infección latente por VIH, pero el más probable de establecer la latencia es aquel que se establece en las células T CD4+ en reposo, mientras que la infección productiva es más probable que ocurra en las células activadas [9].

Diferentes subconjuntos de células T CD4+ en reposo constituyen el reservorio latente, entre ellas las células T de memoria central (TCM), que es el principal reservorio [29], las células T naive (Tn) [29] y células de memoria transitoria [29], y todas son capaces de producir virus competente para la replicación tras la reversión de la latencia. Además, también se han descrito otras células que constituyen reservorios latentes de VIH, incluyendo las células T gamma delta ( $\gamma\delta$ ) periféricas [29, 31] y células del sistema nervioso central como macrófagos, células dendríticas y microglías [32, 33]. La infección latente en estas células puede desencadenar numerosas alteraciones en la señalización celular y disfunciones metabólicas, conduciendo a una inflamación persistente y un envejecimiento inmunitario prematuro en pacientes en tratamiento [34, 35].

Aún no hay claridad sobre qué determina el destino de una célula cuando es infectada; si producirán nuevas partículas virales o si pasarán a ser un reservorio latente del virus. Tampoco existen marcadores de latencia celular específicos que permitan atacar y eliminar los reservorios

en sujetos con VIH que estén controlados por TAR [36]. La mayoría de los mecanismos de establecimiento y mantenimiento de la latencia que se han estudiado actúan a nivel transcripcional [37]. Se asocia a la latencia de VIH-1 con una escasa disponibilidad de factores activadores de la transcripción, entre ellos el factor nuclear kappaB (NF-κB), el factor nuclear de células T activadas (NFAT), el transductor de señal y activador de la transcripción 5 (STAT5) debido a su secuestro citoplasmático [38, 39] y un bajo nivel de expresión del transactivador viral Tat [40]. Además, se encuentra una disponibilidad limitada del factor de transcripción celular P-TEFb debido a que es secuestrado por el complejo 7SK snRNP [41]. P-TEFb es un complejo compuesto por ciclina T1, CDK9 y la proteína 4 con bromodominio (BRD4), el que se asocia con Tat para promover la elongación de la transcripción. Para esto se requiere de la fosforilación de CDK9 [42], la cuál se ve disminuida en las células T CD4+ en reposo que presentan VIH-1 latente [43]. También existe un proceso de inhibición de la elongación de la transcripción de VIH-1 que está regulada por la unión de factores negativos como el factor de elongación negativo (NELF) y el factor 5,6-dicloro-1-beta-d-ribofuranosil-benzimidazol inductor de sensibilidad (DSIF) a la ARN polimerasa II, provocando la replicación abortiva de VIH-1 [44, 45]. Los microARN celulares (miARN) enriquecidos en las células T CD4+ en reposo también estarían implicados en la inhibición de la producción de partículas virales de VIH-1 en este tipo celular, ya que se dirigen al ARNm 3' de VIH [46]. Se ha señalado que el lugar de integración del virus en el genoma también influye en la expresión viral de VIH-1. Su integración se favorece en secuencias palindrómicas débiles dentro de unidades de transcripción activas [47], pero también pueden integrarse en sitios de baja expresión, en la heterocromatina o en regiones intergénicas, cerca de un promotor fuerte, en orientación opuesta a un gen de la célula hospedera o río abajo de un gen de alta expresión [48, 49]. Además, se ha evidenciado que la cromatina y la arquitectura de los nucleosomas influyen en la transcripción de los provirus [50]. La hipoacetilación de histonas está asociada a un entorno represivo de la heterocromatina y a la latencia de VIH [51]. En cambio, la metilación de histonas se relaciona tanto con la represión como con la activación de la transcripción, dependiendo del lugar y el grado de metilación [51]. A pesar de todos los datos disponibles, el mecanismo molecular de la latencia de VIH sigue siendo parcialmente conocido, especialmente el mecanismo que en distintos tipos celulares que actúan como reservorios virales. La identificación de factores del hospedero implicados en la regulación de la latencia en los diferentes reservorios celulares, en



especial aquellos genes o vías moleculares compartidas en los distintos tipos, aumentará las posibilidades de encontrar una cura definitiva.

### **Estrategias terapéuticas frente a infección latente por VIH-1**

Los esfuerzos para encontrar una cura contra el reservorio viral se han centrado en dos estrategias terapéuticas diferentes: "*shock and kill*" y "*block and lock*" [52]. La estrategia "*shock and kill*" se basa en el uso de agentes de reversión de la latencia (ARL o LRA por sus siglas en inglés) que reactivan el provirus de VIH-1 desde el estado de latencia (fase de "*shock*"), mientras que se mantiene el tratamiento con TAR para prevenir nuevos eventos de infección [53]. Esto permite que ocurra la fase de "*kill*" donde las células infectadas que se encontraban con provirus latentes morirían a causa de los efectos citopáticos virales o de los mecanismos efectores citolíticos del hospedero después de la reactivación viral. Por el contrario, el enfoque "*block and lock*" propone una terapia de por vida dirigida a inhibir completamente la reactivación de la transcripción, induciendo un profundo estado de latencia del provirus con agentes promotores de la latencia (APL o LPA por sus siglas en inglés) [52, 54]. Esta estrategia busca finalmente afectar tanto las etapas de reintegración como las de postintegración, haciendo que el provirus se integre preferentemente en sitios de transcripción activa o dirigir a sitios de integración resistentes a la reactivación, conduciendo a un reservorio profundamente silenciado, incluso luego de suspensión del tratamiento con TARC [55, 56]. A pesar de la diversidad de LRAs y LPAs, y la cantidad de estudios para la comprensión de la latencia de VIH-1, han tenido un rendimiento muy bajo en el control de los reservorios de VIH-1 en ensayos clínicos [57], esto porque pueden presentar una potencia deficiente en la reversión/fortalecimiento de la latencia, toxicidad asociada a los fármacos o incapacidad para reactivar/inhibir eficazmente los distintos reservorios latentes.

### **Modelos y estrategias de estudio de latencia por VIH-1**

Debido a las dificultades que existen en el estudio *in vivo* de los mecanismos moleculares de latencia de VIH-1 en los distintos tipos de reservorio celulares, se han desarrollado varios modelos

de latencia *in vitro* y *ex vivo* [26, 58]. Durante muchos años se han utilizado líneas celulares inmortalizadas *in vitro* que albergan provirus competentes para la replicación, como los modelos U1 [59], ACH-2 [60] y J1.1 [61]. Sin embargo, no todas estas líneas pueden representar plenamente el auténtico estado latente de VIH, ya que las mutaciones observadas en las secuencias reguladoras sugieren que son transcripcionalmente incompetentes en lugar de verdaderamente latentes. Líneas celulares reporteras *in vitro* de monocitos [62], células T [62, 63] y microglía [64] que albergan provirus de VIH-1 que además expresan la proteína fluorescente verde (GFP) cuando el provirus se reactiva, se han utilizado ampliamente. En su mayoría contienen el provirus en genes activos de la célula, de forma similar a lo que ocurre en las células T CD4+ latentes primarias, y demuestran revertir la latencia en condiciones similares a las células con infección latente *in vivo*.

También se han desarrollado modelos *ex vivo* basados en células T CD4+ primarias en reposo con el objetivo de representar plenamente la latencia de VIH-1. Para esto, las células T CD4+ aisladas se infectan en estado de reposo o se infectan en estado activo para luego devolverlas al estado de reposo tras la infección [26]. Estos modelos todavía no pueden recapitular de forma consistente la latencia en diferentes modelos y/o en células aisladas de pacientes infectados, por lo que estudios futuros que utilicen dos o más modelos para complementarse entre sí podrían retratar con mayor precisión todos los tipos de células que pertenecen al reservorio latente de los pacientes.

Los estudios de apagamiento (KO) a gran escala se han utilizado ampliamente para identificar factores del hospedero implicados en la replicación de VIH-1 [65-68], permitiendo la identificación de nuevas vías moleculares que pueden usarse como blancos de nuevas terapias. Sin embargo, entre los diversos estudios hay poca concordancia, lo que sugiere una alta tasa de falsos positivos, baja reproducibilidad y diferencias entre modelos de latencia utilizados. La mayoría de los estudios publicados utiliza ARN de interferencia (ARNi) para inhibir la expresión génica, aunque esta técnica presenta problemas de sensibilidad [69]. En los últimos años la técnica que se ha popularizado para realizar *screening* con apagamiento es CRISPR de genoma completo, debido a su alta eficiencia y fiabilidad en la generación de ellos [70-72]. Esta nueva metodología utiliza un ARN guía (sgRNA) para dirigir una nucleasa (Cas9) a un gen específico y provocar una ruptura de la doble cadena. La reparación de la ruptura del ADN por parte de la maquinaria celular suele

provocar mutaciones de inserción o delección que terminan con un gen no funcional, haciendo que la transcripción del gen no se lleve a cabo o que no se produzca una proteína funcional [73].

A la fecha, se han publicado más de una decena de estudios de pérdida de función en busca de factores del hospedero asociados a la latencia de VIH-1. Cinco de ellos utilizan la técnica de silenciamiento con shRNA/siRNA [74-78], uno utiliza una técnica de mutagénesis por inserción [79] y los otros once utilizan la tecnología CRISPR [80-90]. De estos estudios, sólo el realizado por Besnard *et al.*, identificó genes que aumentan y suprimen la reactivación del provirus de VIH-1 [74], mientras que los demás estudios se centran en factores del hospedero que promueven la latencia. Además, sólo un estudio realizó su investigación en un tipo de reservorio distinto de las células T CD4+, donde utilizaron un modelo de células microgliales de rata humanizadas, lo que puede no representar en su totalidad lo que ocurre en el reservorio microglial humano de VIH-1 [76]. Los estudios que realizaron un *screening* CRISPR, todos utilizados distintos modelos de células T CD4+ con infección latente por VIH-1, donde tres de estos trabajos utilizan la metodología de interferencia CRISPR, que realiza un KO de un gen sin realizar un corte en el ADN [83, 85, 90]. El estudio más reciente, realizó una nueva estrategia de detección de CRISPR de la latencia, denominado “Latency HIV-CRISPR”, que induce el empaquetamiento del gen al que está dirigido el sgRNA codificado en genomas de VIH-CRISPR en partículas de virus reactivas, así identifican los genes candidatos involucrados en el mantenimiento de la latencia de VIH-1 [89]. A pesar de la cantidad de estudios de CRISPR de genoma completo, se siguen descubriendo nuevos factores del hospedero relacionados con la latencia de VIH-1 y se sigue en búsqueda de otros factores para lograr identificar las vías moleculares claves que regulan la latencia del virus, pero es especialmente necesario que se realice en otros tipos de reservorio latente.

### **Antecedentes de la investigación**

En el laboratorio la Dra. Chantal L. Márquez, en marco de su proyecto postdoctoral realizó un *screening* KO basado en CRISPR de genoma completo en células Hµglia/HIV HC69, un modelo celular de latencia de microglías humanas que expresa GFP tras la reactivación del provirus. Para

esto se utilizó una librería que contiene más de 71 mil sgRNAs con el fin de identificar genes del hospedero que, al ser reprimidos, promueven la reactivación del provirus desde la latencia. Este *screening* identificó cientos de reguladores potenciales de la latencia, de los cuales se seleccionaron 60 de ellos que se encontraban más enriquecidos, se compartían entre réplicas y se encontraban enriquecidos en otros *screening* de la literatura. En esta propuesta de trabajo de tesis de magíster, se llevó a cabo la validación individual en células H $\mu$ Glia/HIV HC69 de cinco de los genes obtenidos del *screening*, NDUFS2, SLC16A7, MNT, MSR1 y FITM1 utilizando el sistema CRISPR-Cas9 (Tabla 1).

Proteína (ID)	Enriquecido en réplica(s)	Función (según GENECARD)
MNT (GC17M002384)	1 y 2	Se une al ADN como un heterodímero con MAX y reprime la transcripción.
SLC16A7 (GC12P059596)	1	Cataliza el transporte de monocarboxilatos ligado a protones y tiene la mayor afinidad por el piruvato.
NDUFS2 (GC01P161197)	2	Subunidad central de la cadena respiratoria de la membrana mitocondrial NADH deshidrogenasa (complejo I).
FITM1 (GC14P048000)	2	Pertenece a una familia de proteínas involucradas en el almacenamiento de grasa.
MSR1 (GC08M016107)	3	Receptores depuradores de macrófagos de clase A, que incluyen tres tipos diferentes (1, 2, 3) generados por corte y empalme alternativo de este gen.

**Tabla 1.** Proteínas candidatas promotoras de la latencia de VIH-1 obtenidas en réplicas de *screening* CRISPR-Cas9 en H $\mu$ Glia/HIV HC69 realizado por Dra. Chantal L. Márquez

Luego, los genes que se validaron en el modelo de microglías humanas se evaluaron en otros tipos de reservorios latentes con el fin de identificar factores que podrían reactivar universalmente la latencia proviral de VIH-1. Este enfoque permitirá descubrir una posible vía molecular clave que regule la mantención de la latencia de VIH en diferentes tipos de células identificadas como reservorio que son fisiológicamente relevantes y proporcionará una base científica para nuevas oportunidades de intervención terapéutica.

## **HIPÓTESIS**

El apagamiento individual de los genes NDUFS2, SLC16A7, MNT, MSR1 y FITM1 mediante CRISPR-Cas9 permiten la reactivación del provirus de VIH-1 en modelos celulares de Microglías y Linfocitos T.

## **OBJETIVO GENERAL**

Validar la identificación de genes que promueven la latencia de VIH-1 mediante su silenciamiento usando CRISPR/Cas9 en modelos de latencia clonales en microglías y linfocitos T CD4+.

## **OBJETIVO ESPECÍFICOS**

**Objetivo Específico 1. Validar individualmente 5 genes del hospedero identificados como promotores de la latencia de VIH-1 en el modelo microglial (Hμglia/HIV HC69).**

Para validar los genes del hospedero identificados en el *screening* CRISPR realizado en el laboratorio, se utilizó la metodología CRISPR-Cas9 para apagarlos individualmente y confirmar su efecto en la reactivación proviral de VIH-1. La validación se llevó a cabo en el mismo modelo de latencia del VIH utilizado en el *screening* realizado por la Dra. Chantal L. Márquez, Hμglia/HIV HC69, el cual permite observar la reactivación del provirus mediante la expresión de la proteína fluorescente verde (GFP) que fue determinada por citometría de flujo. Además, se verificó la expresión de Cas9 mediante *Western blot* contra el tag Flag que se encuentra acoplado a Cas9.

**Objetivo Específico 2. Evaluar la contribución de los genes validados en el objetivo 1, en un modelo de latencia de células T (J-Lat 10.6).**

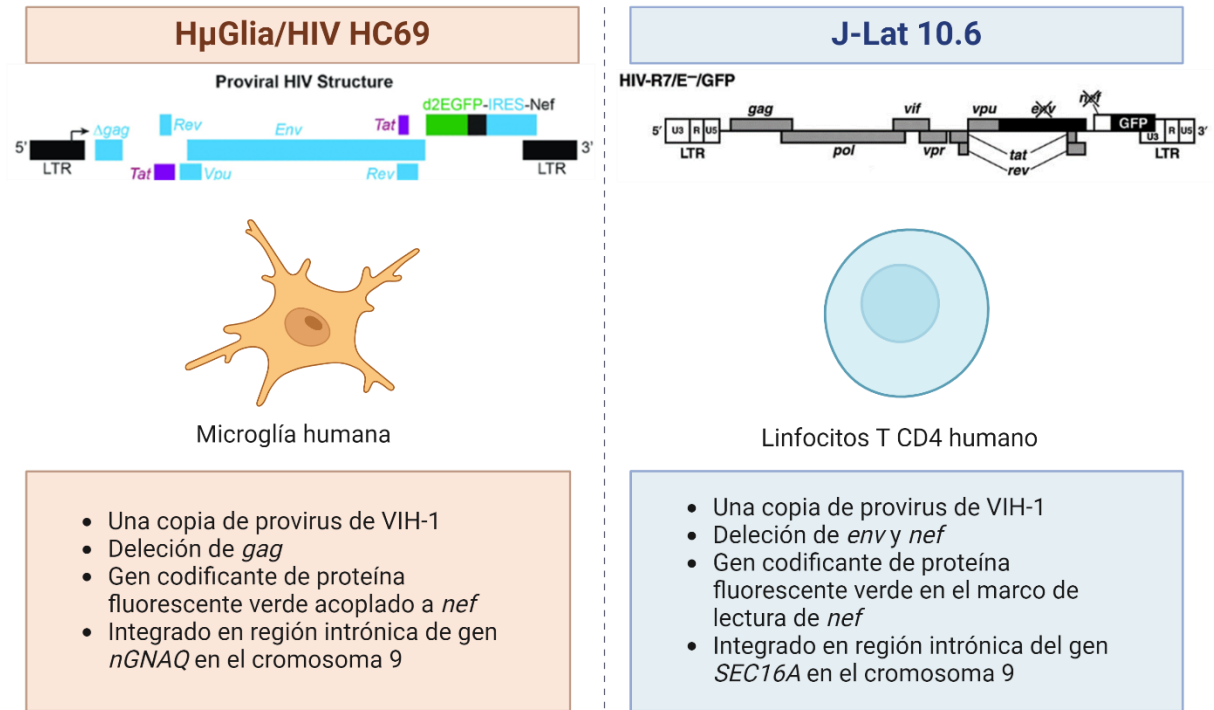
Para determinar si los genes identificados con influencia validada en la reactivación del provirus VIH-1 latente en el reservorio celular de microglías humanas, contribuyen también en la latencia del VIH-1 de células T, se estudió el efecto de su apagamiento individual por CRISPR-Cas9 en células J-Lat 10.6, modelo que permite también observar la reactivación del provirus mediante la expresión de GFP por citometría de flujo. Además, se verificó la expresión de Cas9 mediante *Western blot* contra el tag Flag, y se verificó la expresión de la proteína viral p24 mediante la misma técnica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Líneas Celulares y condiciones de cultivo:** Como modelo celular productor de partículas pseudotipadas se utilizó la línea celular HEK 293. Las células se mantuvieron en medio DMEM alto en glucosa (Cytiva SH30243.02) con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Sigma-Aldrich F0926), 1% de antibiótico-antimicótico (Sigma-Aldrich A5955) y 2 mM de L-glutamina (Gibco A29168-01).

Como modelo de estudio *in vitro* de microglías humanas que presentan infección latente de VIH-1 se utilizó la línea celular H $\mu$ Glia/HIV HC69, células que en su genoma poseen una copia de provirus de VIH-1 que posee delección en el gen *gag* y acoplado al gen *nef* posee el gen que codifica a la proteína fluorescente verde (GFP) (Figura 1) [92]. Las células se mantuvieron en medio DMEM/F12 (Gibco11320) con 1% de SFB (Sigma-Aldrich F0926), 1% de antibiótico-antimicótico (Sigma-Aldrich A5955), 1% de suplemento N2 (Gibco 17502) y 0,1% de dexametasona (DEXA) agregado al cultivo celular.

Como modelo de estudio *in vitro* de linfocitos T CD4+ humano que presentan infección latente de VIH-1 se utilizó la línea celular J-Lat 10.6, células que, en su genoma, poseen una copia de provirus de VIH-1 que posee delección en el gen *env* y en el gen *nef*, donde en lugar de este último, posee el gen que codifica a GFP (Figura 1) [63]. Las células se mantuvieron en medio RPMI-1640 (Cytiva SH30255.02) con 10% de SFB (Sigma-Aldrich F0926), 1% de antibiótico-antimicótico (Sigma-Aldrich A5955) y 2 mM de L-glutamina (Gibco A29168-01).



**Figura 1.** Esquema comparativo de modelos de latencia de VIH-1 microglia HuGlia/HIV HC69 a la izquierda, creado por Alvarez-Carbonell et al. [92] y modelo de latencia de linfocitos T J-Lat 10.6 a la derecha, creado por Jordan et al. [63], con respecto al genoma del provirus de VIH-1 que poseen integrado en el genoma celular.

**Generación de plásmidos con sgRNA:** Para poder llevar a cabo el apagamiento de los genes *NDUFS2*, *SLC16A7*, *MNT*, *MSR1* y *FITM1* se utilizó como vector principal el plásmido LentiCRISPR-v2 (Addgene plasmid #52961). El vector LentiCRISPR v2 fue digerido por la enzima *BsmBI* v2 (NEB R0739) por 3 horas a 55°C. El vector digerido fue purificado luego con el kit de extracción Wizard SV Gel and PCR clean-up System (Promega A9281). Se realizó la hibridación del par de oligos de cada gen (Tabla 2) a una concentración de 100 μM usando 500 mM de NaCl, 100 mM de Tris-HCl pH 7,9, 100 mM de MgCl<sub>2</sub> y 10 mM de DTT en el termociclador Veriti incubando a 95°C durante 15s y luego disminuir la temperatura a 20°C con una rampa de 0,5°C/s. Se realizó la ligación de los oligos hibridados en el plásmido digerido usando la enzima T4 ADN ligasa en un termociclador incubando durante 30 min a temperatura ambiente. Se transformaron bacterias *Escherichia coli* TURBO competentes con el producto de ligación y se esparcieron sobre una placa de agar LB para la selección con ampicilina.



GEN	secuencia sgRNA forward	secuencia sgRNA reverse
TSC1	5'-GTCCCGCACACCCAGCATGG-3'	5'-CCATGCTGGGTGTGCGGGAC-3'
NDUFS2	5'-GGAGTAAGATGGCGGCGCTG-3'	5'-CAGCGCCGCCATCTTACTCC-3'
SLC16A7	5'-GAATAAATACGGCAGCCGGC-3'	5'-GCCGGCTGCCGTATTTATTC-3'
MNT	5'-TGAACAGAAGAAGAGGCCCG-3'	5'-CGGGCCTCTTCTTCTGTTC-3'
MSR1	5'-TGAGAACTGCAAACACGAGG-3'	5'-CCTCGTGTTTGCAGTTCTCA-3'
FITM1	5'-GGCTGGCGAAGATAGTCCGA-3'	5'-TGGAGGAAGTCTTTCCCATC-3'

**Tabla 2.** Tabla de genes a trabajar con su respectivo ARN guía a utilizar en el sistema CRISPR/Cas9.

Se verificaron las colonias a través de PCR utilizando una ADN polimerasa comercial GoTaq G2 (Promega M7841) y los siguientes primers:

v2.1-F1: GAGGGCCTATTTCCCATGATTC

v2.1-R1: GTTGCGAAAAAGAACGTTACGG

Aquellas colonias que dieron positivo se crecieron en medio Luria-Bertani (LB, Apex 11-118) y luego se realizó una purificación de ADN por miniprep sin columna. El producto obtenido de la purificación sin columna se diluyó hasta obtener 40 ng/μL en agua ultrapura y junto a los primers se enviaron a secuenciación por el método de Sanger, servicio realizado por el Centro de Secuenciación Automática de ADN de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Las secuencias obtenidas se visualizaron con el programa Geneious (<https://www.geneious.com/>), donde se verificó que se haya insertado correctamente la secuencia del sgRNA en el plásmido. Cuando se confirmó la presencia de los sgRNAs por secuenciación, se realizó la purificación del ADN plásmidos por miniprep utilizando el kit E.Z.N.A. (Omega Bio-tek D6945).

**Transfección:** Para producir partículas virales pseudotipadas, se realizó una co-transfección de tres plásmidos en la línea celular HEK 293 en placas de 10-cm. 24 horas previas a la transfección se sembraron 3 millones de células HEK 293 con 10 mL de medio suplementado. Se utilizaron 4 μg de pVSV-g (Addgene plasmid # 138479), 7 μg de psPAX2 (Addgene plasmid # 12260) y 7 μg del plásmido generado de LentiCRISPR-v2 con el sgRNA correspondiente a cada gen que se

realizará KO, por lo tanto se tienen 7 co-transfecciones diferentes, 5 correspondientes a los genes a realizar el KO, un control positivo de la literatura, correspondiente a un gen identificado por promover la latencia de VIH-1 TSC1; y un control con un sgRNA utilizando el plásmido LentiCRISPRv2-sgCtrl (Addgene plasmid # 209750). Luego de 5 horas, se descartó el medio y se agregó medio fresco a las placas. Después del transcurso de 72 horas de la transfección, se recolectó el sobrenadante de cada placa y se centrifugó a 5000 rpm por 10 minutos para eliminar el debris celular. El sobrenadante se almacenó a 4°C para su cuantificación y posterior uso.

**ELISA VIH-p24 in-house:** Para cuantificar la proteína p24 presente en las partículas pseudotipadas, utilizamos el protocolo compartido por Gummuluru Lab (Boston, Estados Unidos). Se prepararon placas de 96 pocillos de fondo y bordes transparentes (Thermo Scientific #442404) con 100 µL de HIV-Immunoglobulin en una dilución 1:2626 con PBS 1X (NIH HIV Reagent Program Cat# 3957, RRID:AB\_2890264) y se incubó a 37°C por 16 horas aproximadamente en agitación. Luego, se descartó el volumen de los pocillos y se agregaron 200 µL de solución de bloqueo (PBS 1X con 5% de SFB) a cada pocillo y se incubó a 37°C por 2 horas en agitación. Mientras, se preparó la curva estándar utilizando “p24 *standard*” de kit ELISA comercial que se encuentra a 5000 pg/mL realizando 6 diluciones seriadas con solución de dilución (PBS 1X con 10% SFB y 0,5% Tritón X-100). Para las muestras también se prepararon diluciones de las partículas seriadas (1:250, 1:500 y 1:1000) con la misma solución de dilución. Pasadas las 2 horas, se descartó el volumen de los pocillos, se realizó un lavado con 200 µL de solución de lavado (PBS 1X con 0,2% Tween-20), para luego agregar 100 µL de la curva de calibración y de las muestras incubando la placa a 37°C por 2 horas en agitación. Posteriormente, se descartó el volumen, se realizaron 2 lavados con 200 µL de solución de lavado y se incubó con 100 µL de p24 mAb del hibridoma mouse preparado a una dilución de 1:20 con solución de dilución a 37°C por 1 hora en agitación. Después de esto se descartó el volumen de los pocillos, se realizaron 2 lavados con solución de lavado y se incubaron los pocillos con 100 µL de goat anti-mouse IgG (Fc specific)– Peroxidase antibody (Sigma-Aldrich A2554) en una dilución 1:70000 a 37°C por 1 hora en agitación. Al término de la incubación, se descartó el volumen de los pocillos, se realizaron dos lavados con 200 µL de solución de lavado y se agregaron 100 µL de mix de solución de sustrato para ELISA (Thermo Scientific #34021) incubando a temperatura ambiente por 30 minutos en oscuridad esperando un cambio de coloración hacia el azul. Finalmente, para detener la reacción

se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de solución STOP (1M de ácido sulfúrico  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) a cada pocillo, mezclando bien hasta que cambie el color de azul a amarillo homogéneo. Se registró la absorbancia a 450 nm/650 nm en el equipo Synergy HTX multi-mode reader.

**Análisis de resultados ELISA VIH-p24:** Para obtener la concentración de p24 de las partículas pseudotipadas de cada condición, se utilizó una curva de estándar de “p24 *standard*” de kit ELISA comercial, que se incubó en la placa junto con las muestras. Se registró la absorbancia de los puntos de la curva para obtener la ecuación de la línea de tendencia y un  $R^2$  mayor e igual a 0,95. Luego, los valores obtenidos de absorbancia para las diluciones de las muestras de partículas pseudotipadas se interpolaron en la curva para obtener la concentración de las diluciones, para luego multiplicarlo por el factor de dilución correspondiente (1:250, 1:500 o 1:1000) y obtener un promedio de la concentración de la muestra.

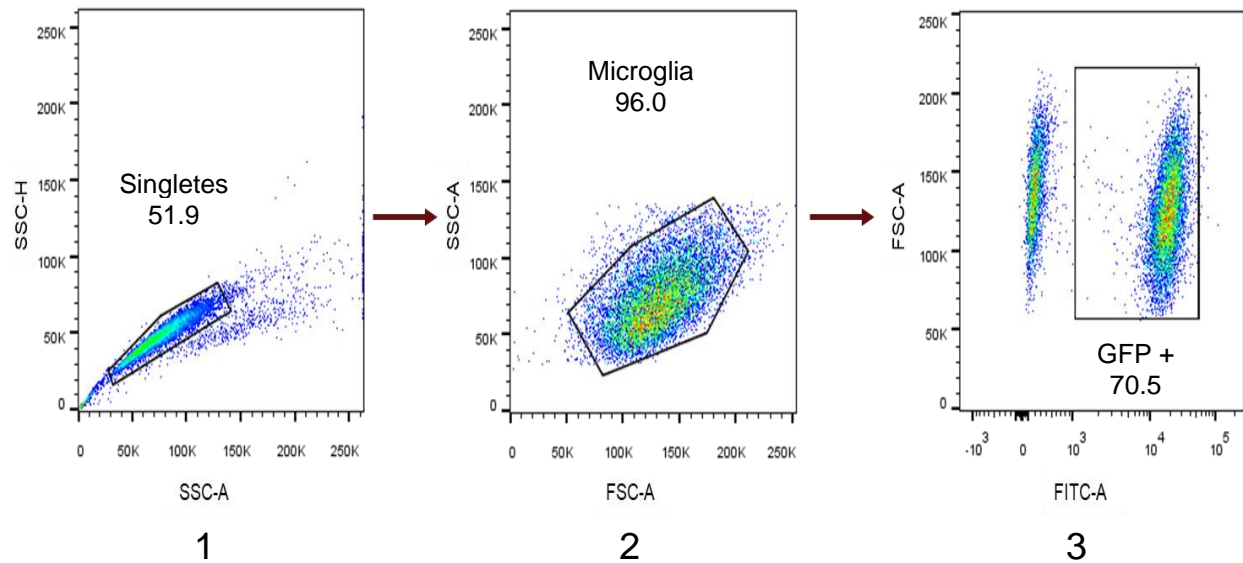
**Transducción:** Se sembraron 300 mil células H $\mu$ Glia/HIV HC69 en placas de 6 pocillos para realizar la transducción con partículas pseudotipadas a la mañana siguiente con 250 ng de concentración de p24, para asegurar el tratamiento con las mismas concentraciones de partículas pseudotipadas para cada condición de KO. En este sistema, se tiene como control del sistema de transducción el tratamiento con partículas pseudotipadas con sgCtrl y como control positivo se trataron las células con el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) a una concentración de 10 ng/mL, el cual se ha comprobado que reactiva el provirus latente en este modelo celular [91]. El tratamiento se realizó por 48 horas en incubador de  $\text{CO}_2$  a 37°C. Luego de ello se prepararon las muestras recolectando las células utilizando incubación con 0,25% de tripsina 2,21 mM (Corning 25-053-CI) a 37°C por 5 minutos, dejando 1:3 de ellas para análisis por citometría de flujo y 2:3 para análisis por *Western blot*.

Para la transducción de células J-Lat 10.6, se sembraron placas de 6 pocillos con 500 mil células para realizar la transducción con partículas pseudotipadas al día siguiente con 250 ng de concentración de p24, al igual que en el modelo anterior. Se utilizaron los mismos controles, tanto del sistema de transducción con partículas pseudotipadas con sgCtrl, como el control positivo de la reactivación TNF- $\alpha$  a 10 ng/mL, el cual se ha comprobado en este modelo que reactiva el provirus latente [62]. El tratamiento se realizó por 48 horas en incubador de  $\text{CO}_2$  a 37°C, luego de

ello se prepararon las muestras recolectando las células, dejando 1:3 de ellas para análisis por citometría de flujo y 2:3 para análisis por *Western blot*.

**Análisis de muestras por citometría de flujo:** Para la citometría de flujo, se toman 500 uL de las muestras se recolectaron en tubos de 1,5 mL, se centrifugaron a 300 g por 5 minutos a temperatura ambiente, luego se descartó el medio y se fijaron con 300 µL de paraformaldehído (PFA) al 4% incubándolo por 15 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugaron los tubos a 300 g por 5 minutos a temperatura ambiente, se eliminó el sobrenadante, se agregaron 200 µL de PBS 1X y se resuspendió el pellet para ser analizado. Si el análisis en el equipo se realizaba al día siguiente se guardaron los tubos a 4°C para luego pasarlo a tubos de 5 mL de poliestireno de fondo redondo (Falcon 352052). Los datos de las muestras fueron adquiridos en los equipos LSRFortessa X-20 y FACSCantoA del Laboratorio MED.UCHILE-FACS servicio realizado por REDECA de la Facultad de Medicina. Para la última repetición experimental del objetivo 2, en el modelo J-Lat 10.6, se incubaron las muestras con el marcador de ácidos nucleicos Helix NP Blue (BioLegend 425305) para observar la viabilidad celular del tratamiento de las muestras detectado como “Pacific Blue”.

Los datos obtenidos por los citómetros de flujo se analizaron en el programa FlowJo V10, primero se realizó el *gating*, para lo que se utilizó la siguiente estrategia (Figura 2). Se seleccionó la población de singletes por los parámetros de Side scatter (SSC) altura vs área seleccionando aquellos puntos que se mantenían en la pendiente de la recta lineal. Luego, se realizó la selección de población de células, ya sea microglías o linfocitos T, por los parámetros de Forward y Side scatter (FSC-A vs SSC-A), y seleccionando la población con el tamaño correspondiente a las células que se estaban analizando. Finalmente se analizaron las células que presentaban GFP, se usó un detector de fluorescencia que determinaba esta señal como si fuese isotiocianato de fluoresceína (FITC), por lo tanto, en el gráfico se comparó FITC vs el parámetro FSC-A, la selección se estableció con respecto al fenómeno observado en el control positivo de la reactivación, donde se lograron diferenciar ambas poblaciones (GFP + y GFP -).



**Figura 2.** Esquema de análisis de resultados de citometría de flujo en el programa FlowJo V2, ejemplificando con células H $\mu$ Glia/HIV HC69 tratadas con 10 ng/mL de TNF- $\alpha$  (control positivo de reactivación). 1) Selección de población de singletes. 2) Selección de población de microglías por tamaño. 3) Selección de población GFP +

**Análisis de muestras por Western blot:** Para el *Western blot*, se tomó 1 mL de las muestras en tubos de 1,5 mL, se centrifugaron a 300 g por 5 minutos a temperatura ambiente, se descartó el medio y se lavó el pellet con 200  $\mu$ L de PBS 1X. Se volvió a centrifugar a 300 g por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se incubó el pellet con 100  $\mu$ L de buffer de lisis con inhibidor de proteasas por 20 minutos a 4°C. Luego de esto, se centrifugaron las muestras a 5.000 rpm por 5 min a 4°C, se recolectó el sobrenadante en un nuevo tubo y el pellet se descartó. Las muestras se almacenaron a -20°C.

Se cuantificó la concentración de proteínas en las muestras por método Bradford, utilizando una curva estándar con albúmina de suero bovino (BSA). La absorbancia se midió en el equipo Synergy HTX multi-mode reader. La interpolación de la absorbancia de las muestras se realizó en el programa “Hojas de cálculo” de Google para obtener su concentración y preparar las muestras con 30  $\mu$ g de proteína en solución de buffer Laemmli incubando con 10 minutos a 95°C para desnaturalizar las proteínas.

Las muestras se cargaron en geles en gradiente de acrilamida y bisacrilamida (Biorad 1610148) (5% - 15%) y en geles de 8% de poliacrilamida y se realizó la electroforesis a 120 V constante por

2 horas aproximadamente y transferencia a membrana de nitrocelulosa. La membrana fue bloqueada con solución de bloqueo en base a caseína (Biorad 1706404) al 5% por 1 hora a temperatura ambiente, se realizaron lavados con el buffer TBS-T 1X (TBS y 1% Tween 20), y luego se incubó con el anticuerpo primario correspondiente toda la noche en agitación a 4°C. Los anticuerpos secundarios anti-rabbit (dilución 1:5000, Santa Cruz sc-516248) y anti-mouse (dilución 1:5000, Santa Cruz sc-2354) se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente. Se detectó la quimioluminiscencia mediante el reactivo Immobilon (Milipore WBKLS0500) en el equipo Alliance Q9 Advanced. El programa Alliance Imager permitió visualizar la marca del anticuerpo mediante el detector de quimioluminiscencia incorporado en el equipo, el cuál captura una imagen de la membrana incubada con los anticuerpos. Se realizó el mismo procedimiento para cada anticuerpo específico de la Tabla 3 y se armó la figura final para cada repetición experimental.

La tabla a continuación muestra las especificaciones de los anticuerpos utilizados para el *Western blot*:

Blanco	Código fabricante	Reactividad	Peso Molecular (kDa)	Dilución
Proteína fluorescente verde (GFP)	Santa Cruz, sc-9996	Mouse	27	1:3000
Flag	Sigma, f7425	Rabbit	151	1:3000
p24 de VIH-1	NIH HIV Reagent Program Cat# 3537)	Mouse	24	1:3000
GAPDH-HRP	Santa cruz, sc-47724 HRP	Rat	37	1:1000

**Tabla 3.** Anticuerpos primarios para *Western blot*.

### **Análisis estadísticos:**

Los datos de citometría de flujo obtenidos por el programa FlowJo, para al menos tres experimentos independientes de cada modelo, se representaron gráficamente como promedio  $\pm$  SEM. La distribución de normalidad se evaluó mediante la prueba de Shapiro-Wilk, mientras que la significancia estadística ( $p \leq 0.005$ ) se determinó realizando un t-test pareado y paramétrico. El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism 8.

## RESULTADOS

**Objetivo específico 1: Validar individualmente 5 genes del hospedero identificados como promotores de la latencia de VIH-1 en el modelo microglial (H $\mu$ glia/HIV HC69).**

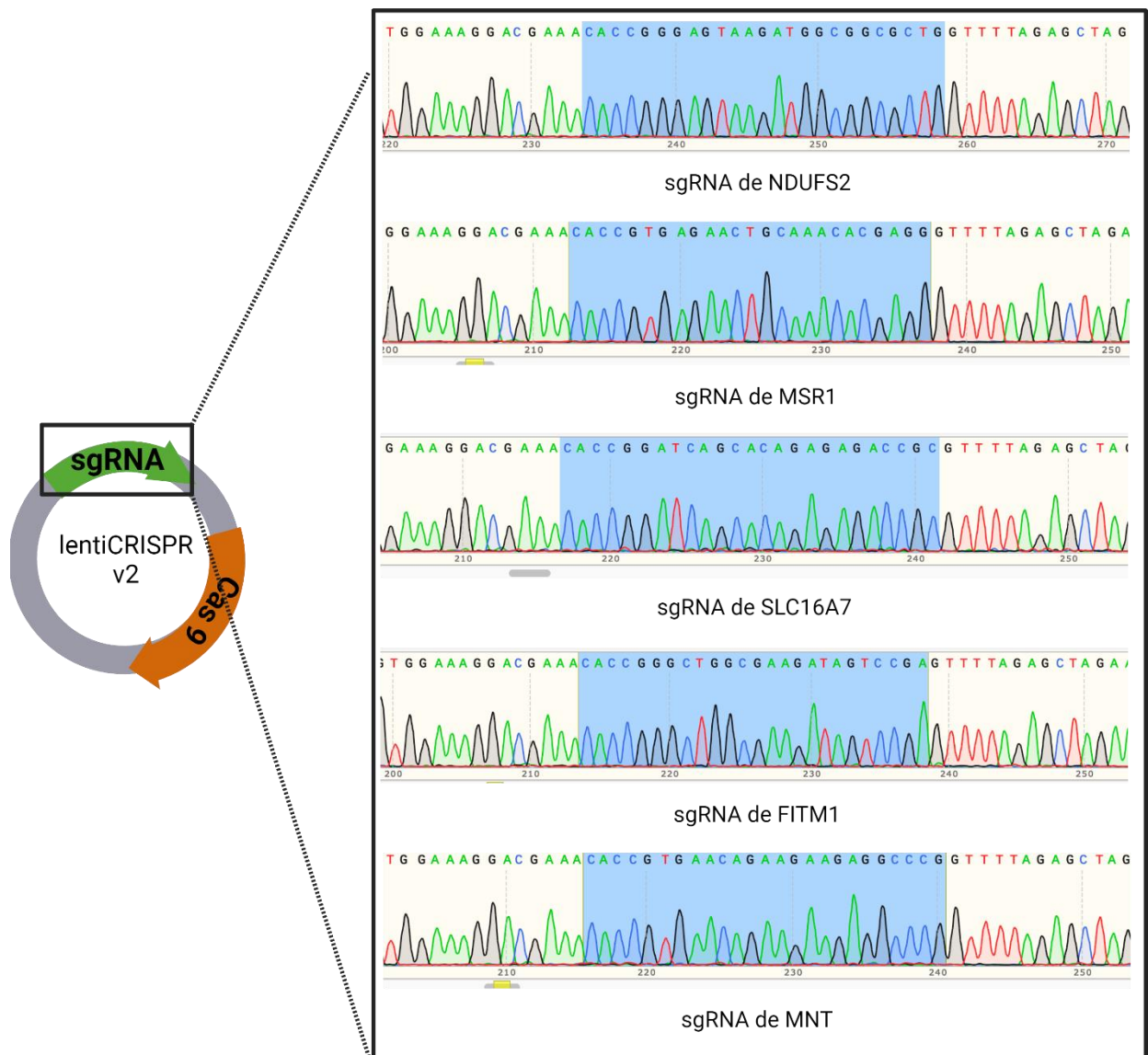
### *Actividad 1. Generación de plásmidos.*

Se realizó la generación plásmidos que contienen el sistema CRISPR-Cas9 con los ARN guías específico para cada gen a realizar el apagamiento (NDUFS2, SLC16A7, MNT, MSR1 y FITM1). Además, TSC1 fue utilizado como control positivo de este sistema, debido a que se ha confirmado como promotor de la latencia en modelos celulares de linfocitos T y de monocitos [80] (Tabla 4). Primero se realizó la digestión del plásmido Lenti-CRISPR v2 con la enzima BsmBI-v1. Una vez obtenido el vector linealizado, se realizó la ligación con el ARN guía correspondiente. El plásmido obtenido se transformó en bacterias *Escherichia coli* competentes, se realizó un PCR de colonias positivas y se secuenció. Los resultados de la secuenciación demuestran la presencia del ARN guía (Figura 3), por lo tanto, los plásmidos diseñados son competentes para llevar a cabo la siguiente actividad de generación de partículas pseudotipadas.

GEN	secuencia sgRNA forward	secuencia sgRNA reverse
TSC1	5'-GTCCCGCACACCCAGCATGG-3'	5'-CCATGCTGGGTGTGCGGGAC-3'
NDUFS2	5'-GGAGTAAGATGGCGGCGCTG-3'	5'-CAGCGCCGCCATCTTACTCC-3'
SLC16A7	5'-GAATAAATACGGCAGCCGGC-3'	5'-GCCGGCTGCCGTATTTATTC-3'
MNT	5'-TGAACAGAAGAAGAGGCCCG-3'	5'-CGGGCCTCTTCTTCTGTTCA-3'
MSR1	5'-TGAGAACTGCAAACACGAGG-3'	5'-CCTCGTGTTTGCAGTTCTCA-3'
FITM1	5'-GGCTGGCGAAGATAGTCCGA-3'	5'-TGGAGGAAGTCTTCCCATC-3'

**Tabla 4.** Tabla de genes a trabajar con su respectivo ARN guía a utilizar en el sistema CRISPR/Cas9.

Luego de obtener los resultados de la secuenciación, se realizó la purificación de plásmidos por la técnica miniprep con el kit E.Z.N.A. (Omega BioTek).



**Figura 3.** Electroferograma de la secuenciación de Sanger de plásmidos Lenti-CRISPR v2 ligado con el sgRNA específico, donde se observa en el recuadro azul la secuencia de ARN guía para cada gen objetivo a realizar el apagamiento. Visualización obtenida en el programa Geneious.

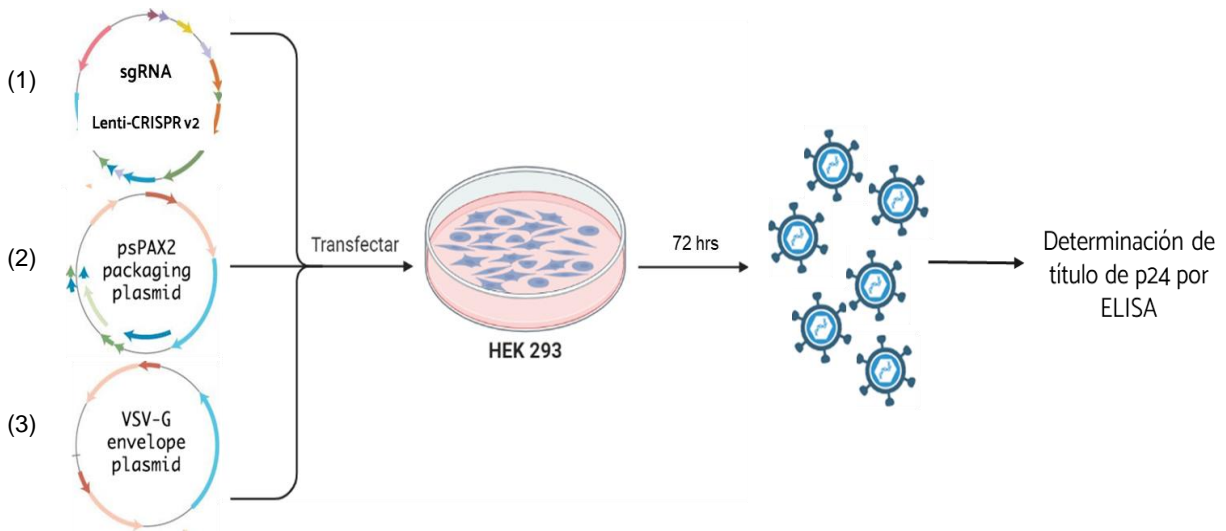
### **Actividad 2.** Generación de partículas pseudotipadas.

Se llevó a cabo la co-transfección de tres plásmidos en el modelo celular HEK 293; (Figura 4, 1) el plásmido Lenti-CRISPRv2 con la secuencia del ARN guía incorporado de manera individual obtenida en la actividad anterior, (Figura 4, 2) el plásmido psPAX2 que expresa un empaquetador lentiviral, y (Figura 4, 3) el plásmido VSV-g que codifica la proteína G del virus de estomatitis



vesicular, el cual permite el ensamblaje de las partículas pseudotipadas. La transfección se realizó a través de la incubación de los plásmidos con polietilenimina (PEI) que condensa el ADN plasmidial en partículas cargadas positivamente, permitiendo su ingreso a las células por endocitosis [91]. Además, se utilizó el sistema Lenti-CRISPRv2 con una secuencia de ARN guía no específica como control del sistema de transducción, por lo tanto, no reconoce ninguna secuencia en el genoma humano, denominado LentiCRISPRv2-sgCtrl (Addgene plasmid # 125836).

Luego de 72 horas, se realizó la recolección de las partículas pseudotipadas que se encuentran en el sobrenadante de la transfección, para finalmente realizar la cuantificación de las partículas obtenidas, a partir de un ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) determinando el título de la proteína p24 presente en el sobrenadante.

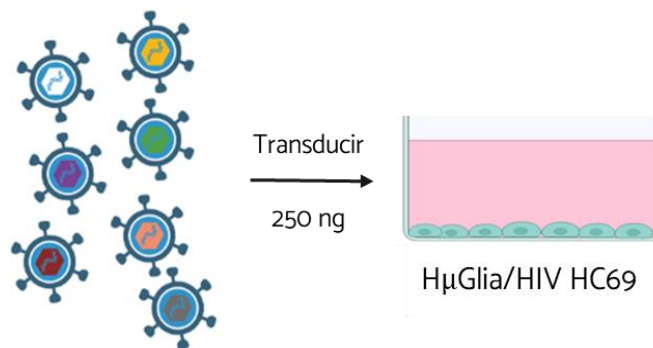


**Figura 4.** Esquema representativo de la metodología utilizada en la actividad 2 del objetivo específico 1.

### **Actividad 3.** Generación de apagamientos individuales por CRISPR-Cas9

Después de obtener la concentración de p24 de las partículas pseudotipadas, se realizó la transducción para generar el apagamiento de genes de manera individual en las células H $\mu$ Glia/HIV HC69, modelo de microglia que poseen un provirus latente de VIH-1 integrado en su

genoma, y que al reactivarse el ciclo replicativo viral, expresa la proteína fluorescente verde (GFP) acoplada a la proteína *nef*, además presenta delección en el gen *gag* (Figura 5) [92]. Para ello, se llevó a cabo la transducción con 250 ng de p24 en las partículas pseudotipadas por cada 300 mil células. En este sistema se tiene como control del sistema la transducción con partículas pseudotipadas con la secuencia de ARN guía no específico y como control positivo se trataron las células con el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) a una concentración de 10 ng/mL, el cual se ha comprobado que reactiva el provirus latente en este modelo celular [92].

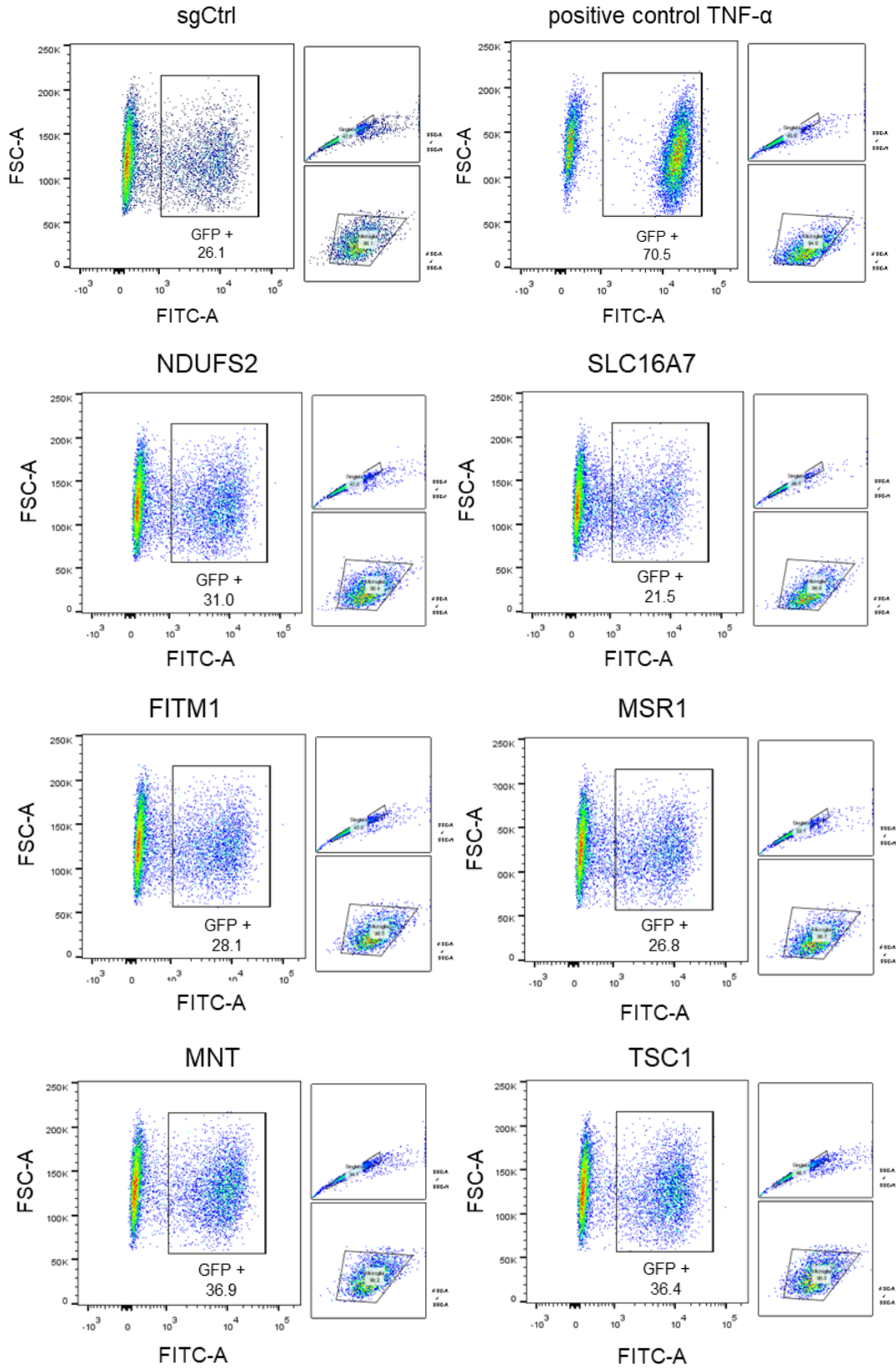


**Figura 5.** Esquema representativo de la metodología realizada en la actividad 3 del objetivo específico 1.

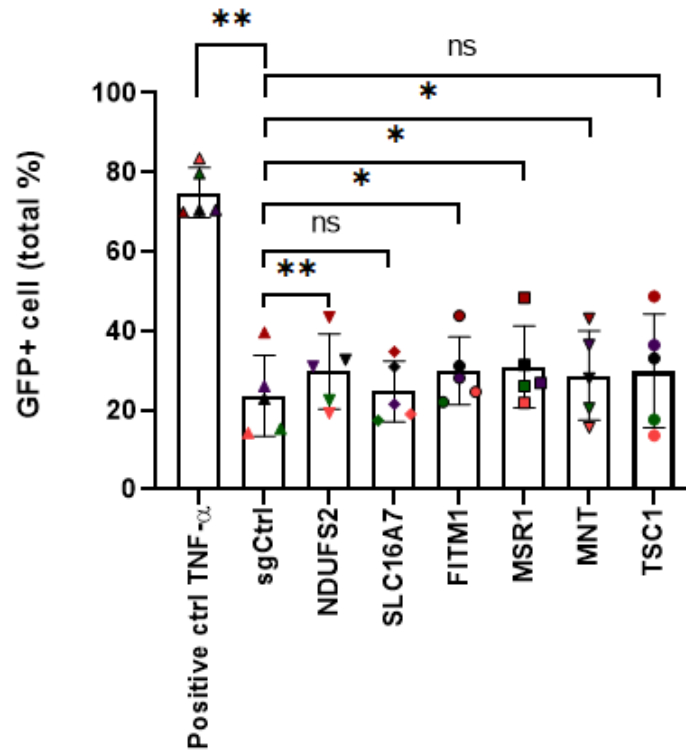
#### **Actividad 4.** Evaluación de reactivación del provirus por citometría de flujo y Western blot

Luego de 48 horas de la transducción, se realizó la recolección y preparación de las muestras para analizar mediante citometría de flujo el porcentaje de población celular que presenta GFP de al menos 10.000 células transducidas utilizando los equipos LSRFortessa X-20 o FACSCantoA del Laboratorio MED.UCHILE-FACS. Los datos obtenidos de los citómetros de flujo se analizaron en el programa FlowJo V10 obteniendo el gráfico de los parámetros FITC y el parámetro de tamaño FSC-A. En la Figura 6 se observa cómo se realizó la selección de la población GFP + para una repetición experimental. Los datos de las repeticiones experimentales se graficaron con el programa GraphPad Prism 8 (Figura 7), donde se observa que en el control positivo de reactivación con TNF- $\alpha$  cerca del 75% de la población celular presenta la proteína GFP, mientras que en la condición de control negativo (sgCtrl) se tiene cerca de un 20%, por lo que este porcentaje se considera como los niveles basales de la proteína en el modelo. Como muestra la Figura 7, cuatro

de las cinco condiciones de apagamiento individual muestran un promedio de GFP+ sobre el control sgCtrl, aunque ninguno produce un nivel de reactivación cercano al control positivo. El análisis de significancia por la prueba *t-student* sugiere que el tratamiento con CRISPR-Cas9 y ARN guías específicos para los genes NDUFS2, FITM1, MSR1 y MNT tienen un efecto significativo sobre la reactivación proviral de VIH-1 en el modelo HμGlia /HIV HC69, mientras que de los genes SLC16A7 y TSC1, no tiene un efecto significativo sobre la reactivación proviral en este modelo de latencia.



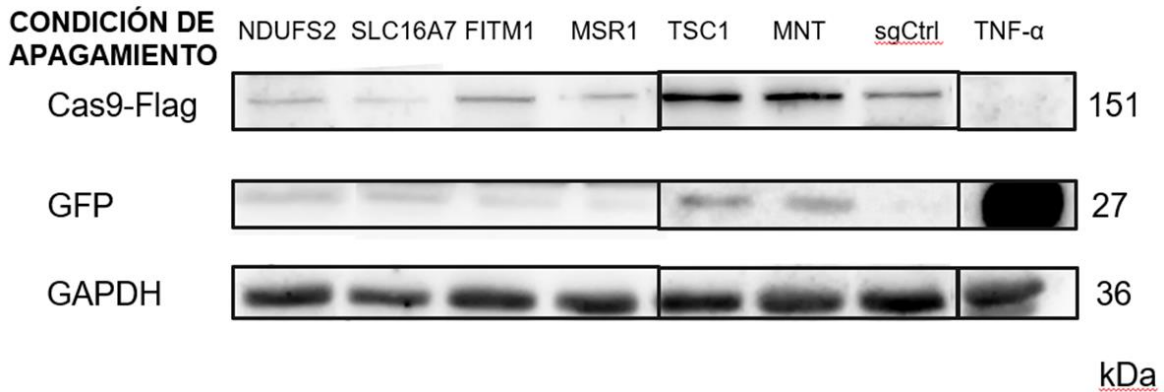
**Figura 6.** Selección de población GFP + para cada condición de apagamiento genético realizado en el modelo H $\mu$ Glia/HIV HC69 repetición experimental 3. En la parte superior se observa selección de la población GFP + de los controles sgCtrl y tratamiento con TNF- $\alpha$ . Para cada condición se observan tres gráficos: en grande se observa el gráfico de FITC-A vs FSC-A con la población GFP + marcada en el recuadro, al costado de este gráfico se observa en la parte superior la selección de población de singletes de las muestras, y en la parte inferior la posterior selección de la población de microglías. Los datos se obtuvieron en el programa FlowJo V10.



**Figura 7.** Resultados del análisis de las muestras por citometría de flujo obtenidos luego de 48 horas post-transducción. Porcentaje de células GFP + (eje y) en cada una de las condiciones evaluadas (eje X). Cada símbolo hace referencia al resultado obtenido para cada repetición experimental y el color del símbolo representa los resultados obtenidos en una misma repetición experimental. Los valores muestran el promedio  $\pm$  SEM. La distribución de normalidad se evaluó mediante la prueba de Shapiro-Wilk, mientras que la significancia estadística ( $p \leq 0.005$ ) se determinó realizando un t-test pareado y paramétrico. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  n=5.

Posteriormente, se observó los niveles de las proteínas Cas9-Flag y GFP mediante *Western blot* para cada una de las condiciones (Figura 8). De acuerdo con los resultados obtenidos, es posible determinar que el sistema de CRISPR-Cas9 se logró incorporar en las células H $\mu$ Glia/HIV HC69 para cada una de las condiciones, incluyendo la condición control sgCtrl, debido a los niveles de Cas9-Flag, mientras que en el control positivo de la reactivación TNF- $\alpha$  no se observó. Se observó

un aumento de los niveles de GFP para cada una de las condiciones, siendo más importante en el control de reactivación TNF- $\alpha$  y menos abundante en el control sgCtrl. Se utilizó como control de carga los niveles de la proteína GAPDH, ya que sus niveles son constitutivos en este modelo.



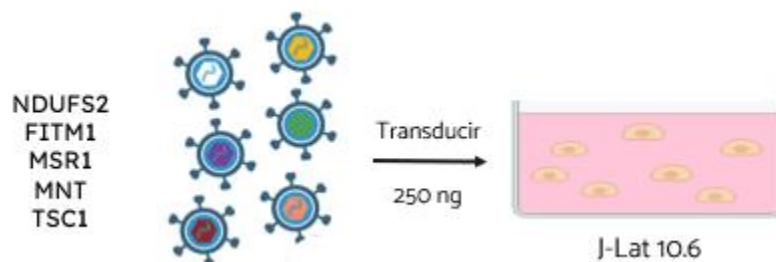
**Figura 8.** Análisis cualitativo de los niveles de las proteínas Cas9-Flag y la proteína GFP mediante la técnica *Western blot* para cada una de las condiciones experimentales realizadas en el modelo H $\mu$ Glia/HIV HC69. GAPDH se utilizó como control de carga. Las líneas entre carriles representan cortes realizados de la misma membrana. n = 3

**Objetivo específico 2. Evaluar la contribución de los genes validados en el objetivo 1, en un modelo de latencia de células T (J-Lat 10.6).**

Para la realización del objetivo específico 2, se evaluó la contribución de los genes NDUFS2, FITM1, MSR1 y MNT, en un modelo de latencia de células T. Estos genes fueron validados en el objetivo específico 1 y el tratamiento con CRISPR-Cas9 y ARN guía específico para estos genes tuvo un efecto significativo en la reactivación del provirus de VIH-1 en el modelo H $\mu$ Glia/HIV HC69. El apagamiento del gen TSC1, es utilizado nuevamente en este objetivo específico como control positivo del sistema, debido a que se ha confirmado como promotor de la latencia en modelos celulares de linfocitos T y de monocitos [80], pese a que en el objetivo específico anterior el apagamiento no tuvo un efecto significativo en la reactivación del provirus de VIH-1.

**Actividad 1. Generación de apagamientos individuales por CRISPR-Cas9**

Se realizó el mismo procedimiento de generación de partículas pseudotipadas co-transfectando los tres plásmidos Lenti-CRISPR v2 con la secuencia del ARN guía incorporado, el plásmido VSV-g y el plásmido psPAX2 y se cuantificó la concentración de p24 en las partículas pseudotipadas por ELISA. Para generar el apagamiento de los genes NDUFS2, FITM1, MSR1, MNT y TSC1, se llevó a cabo la transducción de las células J-Lat 10.6 (Figura 9). Este modelo de células T posee un provirus de VIH-1 integrado en su genoma que se encuentra en latencia, al reactivarse el ciclo replicativo viral, expresa la proteína fluorescente verde (GFP) y además presenta delección de los genes *nef* y *env* [63]. Para ello, se llevó a cabo la transducción con 250 ng de p24 en las partículas pseudotipadas por cada 300 mil células. En este sistema se tiene como control del sistema la transducción con las partículas pseudotipadas con la secuencia de ARN guía no específico y como control positivo se trataron las células con el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) a una concentración de 10 ng/mL, el cual se ha comprobado que reactiva el provirus latente en este modelo celular [63].



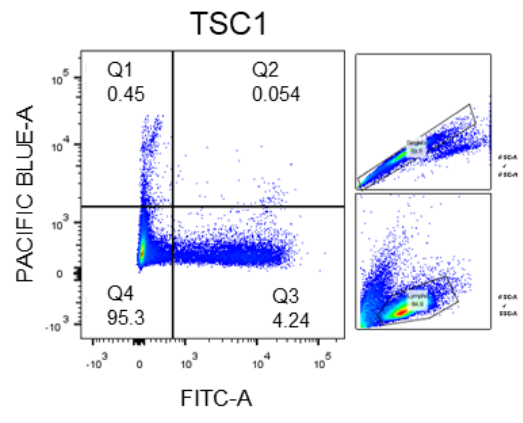
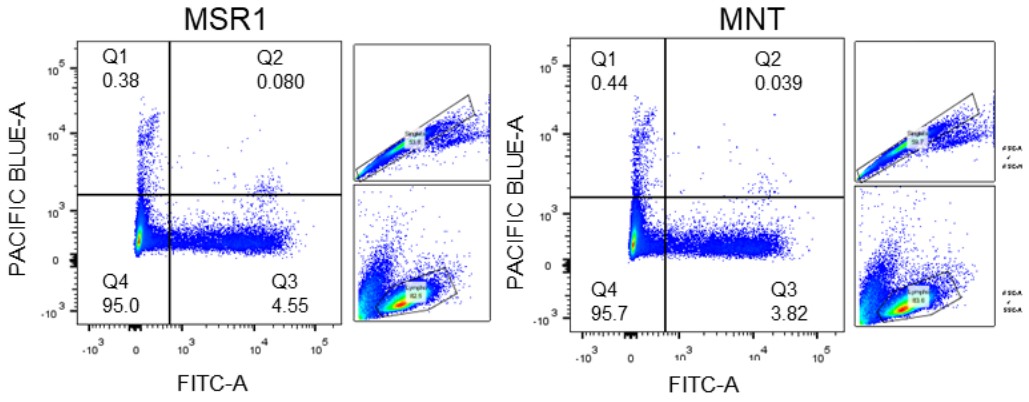
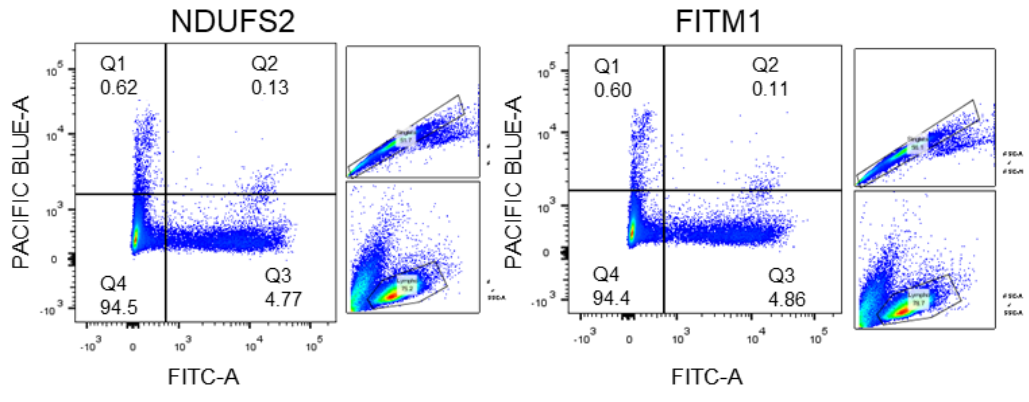
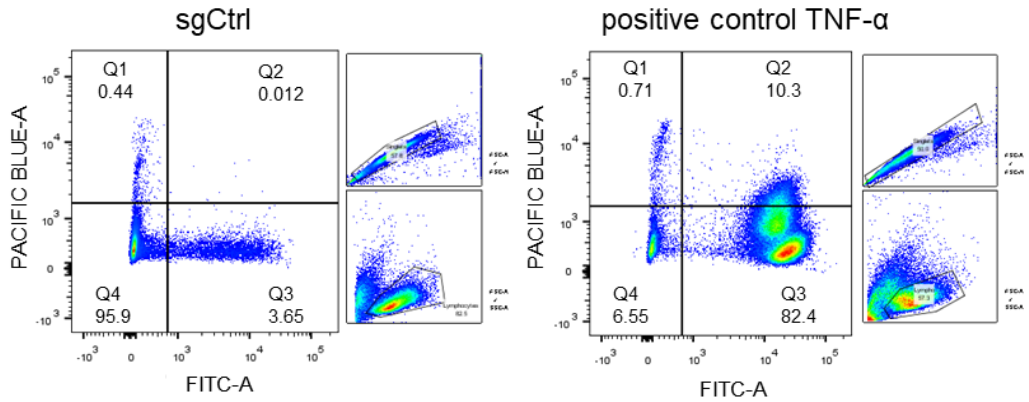
**Figura 9.** Esquema representativo de la metodología utilizada para desarrollar la actividad 1 del objetivo específico 2.

### **Actividad 2.** Evaluación de reactivación del provirus por citometría de flujo y Western blot

Luego de 48 horas post-transducción del modelo de J-Lat 10.6, se realizó la preparación de las muestras para analizar mediante citometría de flujo el porcentaje de población celular que presentan GFP, de al menos 10.000 células transducidas utilizando el LSRFortessa X-20 y FACSCantoA en el Laboratorio MED.UCHILE-FACS. Los datos obtenidos de los citómetros de flujo se analizaron en el programa FlowJo V10 obteniendo el gráfico de los parámetros FITC y el parámetro de tamaño FSC-A. En la Figura 10 se observa cómo se realizó la selección de la población GFP + para una repetición experimental, donde se agregó una tinción de ácidos

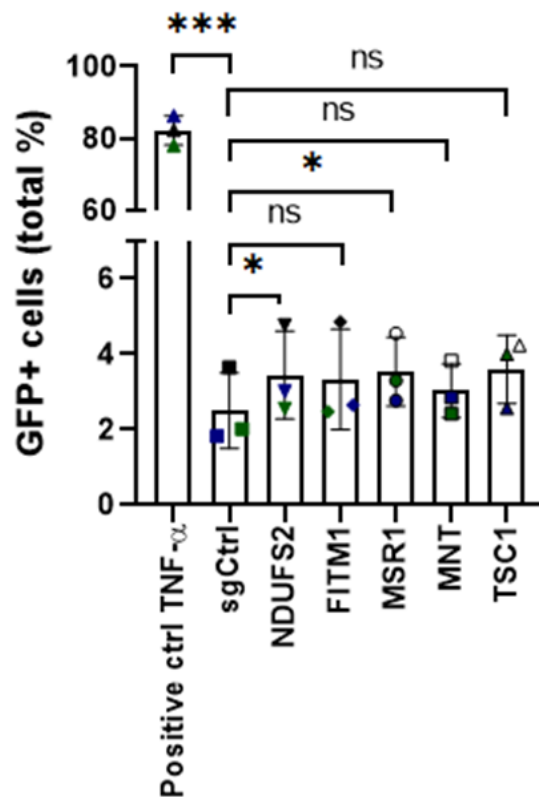
nucléicos Helix NP Blue para observar la viabilidad celular por lo que la selección de la población GFP + se identificó en FITC +, Pacific Blue -, es decir el cuadrante inferior derecho. En todas las condiciones se observó que una pequeña parte de la población GFP + se aleja de la línea horizontal, tendiendo a subir a la vertical, por lo que se sugiere que aquellas células tratadas y reactivadas se encuentran en proceso de muerte celular. Donde más se aprecia este fenómeno es con el tratamiento con TNF- $\alpha$ , que se observan dos poblaciones, una GFP + y otra población que tiene agregada en sus células la tinción de ácidos nucleicos (Figura 10).





**Figura 10.** Selección de población GFP + para cada condición de apagamiento genético realizada en el modelo J-Lat 10.6. En la parte superior se observa selección de la población GFP + de los controles sgCtrl y tratamiento con TNF- $\alpha$ . Para cada condición se observan tres gráficos: en grande se observa el gráfico de FITC-A vs Pacific Blue que permite determinar la población de células vivas que presentan GFP en Q3, la población de células vivas que no presentan GFP en Q4, la población de células muertas que no presentan GFP en Q1 y la población de células muertas que presentan GFP en Q2; al costado de este gráfico se observa en la parte superior la selección de población de singletes de las muestras; y en la parte inferior la posterior selección de la población de linfocitos T. Los datos se obtuvieron en el programa FlowJo V10.

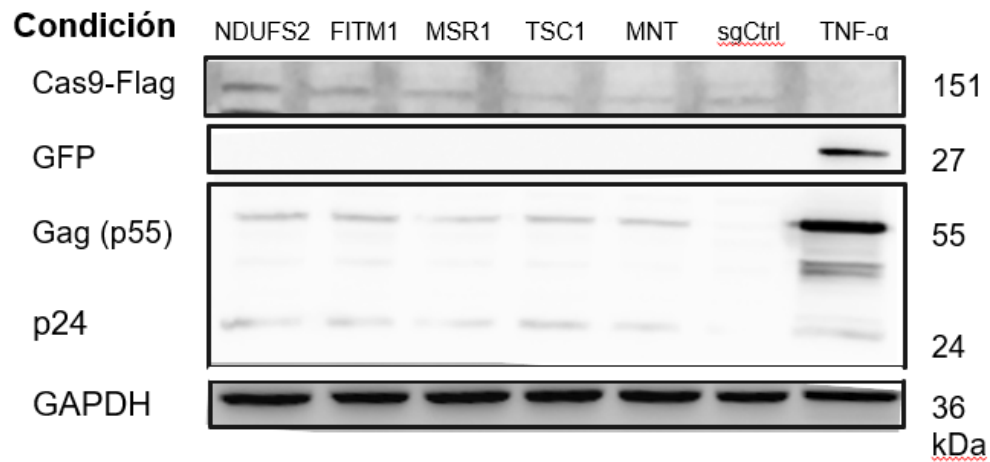
Los datos de las repeticiones experimentales se tabularon y se construyó un gráfico en el programa GraphPad Prism 8 (Figura 11). Se observó que el porcentaje de células GFP + frente al estímulo con TNF- $\alpha$  en el modelo J-Lat 10.6 fue de aproximadamente 82%, lo cual coincidió con lo obtenido en la literatura [63] y los datos obtenidos anteriormente en el laboratorio, mientras que el porcentaje de GFP + en el control negativo sgCtrl fue de aproximadamente 2% (Figura 11). De los datos y el análisis de significancia por la prueba t sugieren que el tratamiento con CRISPR-Cas9 y ARN guías específicos para los genes NDUFS2 y MSR1 tuvo un efecto significativo sobre la reactivación proviral de VIH-1 en el modelo J-Lat 10.6, mientras que para los genes FITM1, MNT y TSC1, este último considerado como control positivo de la literatura, no tuvo un efecto significativo sobre la reactivación proviral en este modelo de latencia.



**Figura 11.** Resultados del análisis de las muestras por citometría de flujo obtenidos luego de 48 horas post-transducción de células J-Lat 10.6. Porcentaje de células GFP + en cada una de las condiciones evaluadas. Los valores muestran el promedio  $\pm$  SEM. La distribución de normalidad se evaluó mediante la prueba de Shapiro-Wilk, mientras que la significancia estadística ( $p \leq 0.005$ ) se determinó realizando un t-test pareado y paramétrico. \* $p < 0.05$ ,  $n = 3$ .

Posteriormente, se determinó los niveles de las proteínas Cas9-Flag, GFP y p24 de VIH-1 mediante *Western blot* para cada una de las condiciones (Figura 12). De acuerdo con los resultados obtenidos, fue posible determinar que el sistema de CRISPR-Cas9 se logró incorporar en las células J-Lat 10.6 para cada una de las condiciones, incluyendo la condición control sgCtrl, debido a la presencia de Cas9-Flag, mientras que en el control positivo de la reactivación TNF- $\alpha$  no se observó. La presencia de GFP se observó sólo en el control positivo. En cuanto a los niveles de la proteína estructural p24 de VIH-1, se observó aumento de los niveles de la proteína en cada una de las condiciones, siendo la condición sgCtrl donde menos aumentaron los niveles y en el control de reactivación TNF- $\alpha$  donde más se aumentaron los niveles. En cuanto a lo que ocurre en las condiciones de apagamiento, se observa la presencia de p24 en cada una. Debido a que la expresión de la proteína p24 está asociada a la expresión de la población de ARN mensajero no procesado

de VIH-1, se puede determinar cómo indicador de transcripción tardía del provirus de VIH-1, lo que tiene mayor relevancia que la expresión de GFP.



**Figura 12.** Inmunoblot de las proteínas Cas9-Flag, GFP y p24 de VIH-1 mediante la técnica *Western blot* para cada una de las condiciones experimentales realizadas en el modelo J-Lat 10.6. GAPDH se utilizó como control de carga.

n = 1

## DISCUSIÓN

El VIH-1/SIDA, una pandemia global que ha cobrado la vida de millones de personas, sigue siendo uno de los desafíos más apremiantes en la salud pública. Aunque la terapia con antirretrovirales (TAR) ha mejorado la esperanza de vida de los pacientes, aún no existe una cura definitiva. Uno de los principales obstáculos en la lucha contra VIH-1 es la presencia de la infección latente. Las células infectadas de forma latente albergan el ADN proviral de VIH-1 integrado en su genoma, pero no son activas replicativamente, evitando ser detectadas por el sistema inmunológico del hospedero. Estas células actúan como reservorios virales, manteniendo la infección a lo largo de la vida del individuo. En determinadas condiciones, la replicación viral se reactiva, generando partículas virales capaces de infectar nuevas células.

Dentro de las distintas células que forman parte del reservorio latente de VIH-1, las de interés para esta investigación son las microglías [33], principal reservorio del virus en el sistema nervioso central [93]. Estas son células del sistema inmunológico innato del cerebro que pueden generar respuestas inmunológicas que poseen una larga vida media [94]. Al ser infectadas por VIH-1 inducen neuroinflamación, aceleran el envejecimiento cerebral y promueven el trastorno neurocognitivo asociado al VIH-1 (HAND) [95]. El virus infecta principalmente a linfocitos T CD4+, por lo que también estas forman parte del reservorio latente de VIH-1 [29-31], siendo el tipo celular más estudiado en relación con la latencia de VIH-1. Comprender los mecanismos de latencia del VIH en microglías y linfocitos T CD4+ es fundamental para poder desarrollar estrategias que permitan eliminar o controlar la infección de forma más efectiva.

El modelo de estudio de microglías humanas utilizado en esta investigación fueron la H $\mu$ Glia/HIV HC69, el único modelo de microglía con latencia de VIH-1 disponible. Presenta una copia del provirus de VIH-1 integrado en su genoma, aunque este tiene una delección en el gen *gag* imposibilitando la detección de p24. Sin embargo, posee el gen que codifica a GFP acoplado al gen *nef*, lo que permite observar la reactivación del provirus de VIH-1 mediante la expresión de GFP [92]. Si bien es un modelo celular que posee varios beneficios para el estudio sobre latencia por VIH-1 en microglías humanas, también tiene deficiencias, como por ejemplo las condiciones de cultivo deben ser muy rigurosas. Usan un medio con 1% SFB, bajo en glucosa y en presencia

de 0,1% de dexametasona (DEXA), debido a que estas células poseen una alta tasa reactivación espontánea de VIH-1, presentando un aumento del nivel basal de expresión del VIH en el cultivo si no se encuentran en condiciones de medio controlado [96]. Además, la infección de la microglía por el VIH está fuertemente asociada con una alta producción de citocinas, particularmente TNF- $\alpha$  [97, 98]. El estudio de Alvarez-Carbonell *et al.* corrobora que, en este modelo, el fenómeno también ocurre si no se encuentra en el medio la presencia de DEXA, llegando a una activación basal de alrededor de un 20% [96]. Dentro del diseño experimental, no se agregó DEXA en el medio al momento de sembrar las células en placas para tratar con las distintas condiciones, lo que demuestra lo observado por citometría de flujo en la condición control de transducción con sgCtrl, donde hay un 20% de población GFP+ en la condición (Figura 6 y 7), pudiendo generar un apantallamiento del efecto que se espera ver producto de la condición apagamiento de los genes. Además, al poseer una delección en el gen *gag*, solo se puede observar de forma indirecta la reactivación, mediante la expresión de GFP acoplado al gen *nef*, que es transcrito en la primera fase de la transcripción [21], por lo que la expresión de GFP está asociada a momentos tempranos de la reactivación proviral, que podría o no llevar a la transcripción del resto de poblaciones de transcritos.

En cuanto al modelo de linfocitos T humanos utilizado en esta investigación se usaron las J-Lat 10.6, uno de los clones J-Lat desarrollado por Jordan *et al.* Estas células poseen una copia del provirus de VIH-1 integrado en su genoma en una zona específica que lo diferencia de los demás clones, posee delección del gen *env* y el gen *nef*, donde este último es reemplazado por el gen que codifica a GFP, por lo tanto, posee características similares al modelo de microglías humanas, es incompetente para la replicación y permite observar la reactivación del provirus de VIH-1 mediante la expresión de GFP [63]. A comparación del modelo anterior, no posee grandes dificultades en el manejo del cultivo celular, pero de igual forma una parte de la población celular expresa GFP espontáneamente [63]. En esta investigación se observó por citometría de flujo que en la condición control de transducción con sgCtrl hay un aproximado de 2% de población GFP + (Figura 10 y 11). En comparación con los demás clones J-Lat desarrollados, el clon 10.6 presenta una fuerte reactivación del provirus de VIH-1 al tratamiento con TNF- $\alpha$  [63], lo cual fue observado en los resultados obtenidos en esta investigación. Como esta línea celular es clonal en su sitio de integración del virus y deriva de células leucémicas con perfiles de transcripción y activación

alterados, el entorno celular difiere del de los modelos primarios de células T CD4+ de latencia del VIH-1.

Los candidatos promotores de la latencia analizados en esta investigación, NDUFS2, SLC16A7, MNT, MSR1 y FITM1, no han sido asociados con anterioridad a la latencia de VIH-1 y fueron seleccionados dentro de los cientos de genes enriquecidos obtenidos en el *screening* de CRISPR-Cas9 realizado por la Dra. Chantal L. Márquez.

NDUFS2 es la proteína hierro-azufre 2 de la NADH deshidrogenasa mitocondrial, que es una subunidad central de la cadena respiratoria de membrana mitocondrial NADH deshidrogenasa (complejo I), una ubiquinona oxidoreductasa que es responsable de transferir electrones del NADH a la cadena respiratoria esencial para actividad catalítica del complejo I [99, 100]. El estudio realizado por Dunham-Snary *et al.* demostró que NDUFS2 es un componente crítico sensible al redox de la vía de detección de oxígeno en la vasculatura pulmonar que desempeña un papel clave en la detección aguda de oxígeno pulmonar y la vasoconstricción pulmonar hipóxica [101]. El estudio realizado por Cabello-Rivera *et al.* demostró que la producción de ATP y la proliferación de células madre neurales se redujeron fuertemente en un modelo de ratón *knock-out* condicional con expresión reducida de NDUFS2 en células madre neuronales y gliales radiales [102], demostrando un papel importante en el SNC. Además, se ha descrito que al realizar una mutación de NDUFS2 mediada por CRISPR/Cas9 en células HEK293 durante 72 horas, se eleva notablemente la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) [103], lo que podría generar estrés oxidativo en las células que expresan en menor cantidad NDUFS2, fenómeno que se ha estudiado a la infección latente por VIH-1 en linfocitos T CD4+ como posible estrategia de tratamiento “*shock and kill*”, destinado a reactivar el provirus de VIH-1 y su posterior eliminación por citopatogenicidad o por el sistema inmunológico [104]. En nuestra investigación se observó que al realizar un tratamiento con un ARN guía específico para el gen NDUFS2 mediante CRISPR-Cas9 en el modelo H $\mu$ Glia/HIV HC69 y tiene un efecto significativo en la reactivación del provirus VIH-1 (Figura 7). Para el modelo J-Lat 10.6 se pudo observar expresión de proteína p24 por lo que se determina que también tiene un efecto positivo en la reactivación del provirus (Figura 12). Puede deberse a que este apagamiento de NDUFS2 eleva la producción de ROS en las células, que pueden modular la actividad de NF- $\kappa$ B [105], favoreciendo de esta manera la reactivación.

Además, se ha descrito que el tratamiento con DEXA a ratas con lesión cerebral traumática altera la expresión de proteínas, como por ejemplo aumentando los niveles de NDUFS2 en el hipocampo [106], por lo que en condiciones de cultivo del modelo de microglías humanas se debería esperar que el tratamiento con DEXA también tenga este efecto, es decir, que se encuentre aumentado los niveles de NDUFS2, y que al realizar el apagamiento de NDUFS2 se aumente la producción de ROS, modulando la actividad de NF- $\kappa$ B. Entonces el fenómeno observado puede que no tenga relación con que NDUFS2 esté promoviendo la latencia, pero el reprimir su expresión podría reactivar el provirus de VIH-1.

SLC16A7, también denominado transportador de monocarboxilato 2 (MCT2), se ubica en la membrana plasmática y facilita el transporte unidireccional de monocarboxilatos a través de la membrana plasmática mediante enlaces protónicos, principalmente lactato, piruvato y cuerpos cetónicos, siendo el lactato el sustrato más relevante [107]. Los monocarboxilatos transportados por esta proteína son importantes para satisfacer las demandas energéticas del SNC [108]. Se presenta una expresión moderada a baja en el cerebro y los leucocitos [109]. Moreira *et al.* han demostrado la expresión de MCT2 en microglías humanas activadas [110]. Se ha descrito que el lactato, responsable de la acidificación extracelular, y el piruvato pueden incluso aumentar en algunos tipos de células infectadas por VIH-1 de forma latente, debido a la activación simultánea de otras vías metabólicas, evadiendo la vía glucolítica temprana [111]. Dentro de las interacciones que se han estudiado entre MCT2 con otras proteínas se encuentra basigina (BSG o CD147) que ha sido descrita que, en otros transportadores de monocarboxilatos (MCT) como MCT1, MCT3 y MCT4, se encuentran estrechamente relacionados [107]. Se ha descrito que CD147 es un facilitador de la infección por VIH-1, ya que interactúa con ciclofilina A (CyPA o PPIA) [112], una proteína intracelular que ayuda al plegamiento de proteínas y funciona como chaperona de varios procesos celulares [113] y que se incorpora a las partículas del virus durante su morfogénesis [114], por lo que esta interacción de BSG y CyPA, promovería el ingreso de la partícula viral a la célula hospedera [112]. Para MCT2 se ha descrito que posee preferencia a unión a embigina por sobre BSG, por lo que no se encontrarían estrechamente relacionadas [107]. Por lo tanto, no existen antecedentes que indiquen que SLC16A7 está involucrada en la latencia de VIH-1, y en nuestra investigación tampoco se logró observar un efecto significativo en la reactivación



del provirus de VIH-1 en el modelo H $\mu$ Glia/HIV HC69 al realizar un tratamiento con un ARN guía específico para el gen SLC16A7 mediante CRISPR-Cas9 (Figura 7).

MNT es una proteína que se identificó por su interacción con la proteína MAX, actuando en conjunto como factor de transcripción [115]. Al igual que MYC, heterodimeriza con la proteína MAX y se une a secuencias Ebox, pero mientras que MYC-MAX normalmente aumenta la transcripción, MNT-MAX parece reprimir la transcripción [115, 116]. Se han descrito cuatro motivos Ebox en el LTR de VIH-1, dos se encuentran 11 pares de bases (pb) aguas arriba y 6 pb aguas abajo de la secuencia TATA [117, 118], siendo posibles sitios de unión de los heterodímeros MNT-MAX, los que podrían explicar una modulación de la replicación viral, e incluso el establecimiento y mantenimiento de la latencia en las células infectadas por VIH-1 [119]. En nuestra investigación se observó un efecto significativo en la reactivación del provirus de VIH-1 en el modelo H $\mu$ Glia/HIV HC69 al realizar un tratamiento con un ARN guía específico para el gen MNT (Figura 7). Para el modelo J-Lat 10.6 se pudo observar expresión de proteína p24 por lo que se determina que también tiene un efecto positivo en la reactivación del provirus (Figura 12). que podría estar ocurriendo por el mecanismo descrito del heterodímero de MNT-MAX, es decir, no hay represión de la transcripción ya que falta este complejo. Además, se podría estudiar si favoreciendo la unión de MYC-MAX en las Ebox presentes en los LTR de VIH-1, se podría simular o potenciar el efecto del apagamiento de MNT en el modelo de microglías, demostrando de esa manera que la expresión de MNT mantiene la latencia.

MSR1 es el receptor depurador de macrófagos 1 también denominado como CD204, fue descrito como mediador de captación y degradación de la lipoproteína de baja densidad acetilada (acetil-LDL) [120]. El gen codifica los receptores carroñeros de macrófagos de clase A (SR-A) en sus tres isoformas diferentes dadas por empalme alternativo: SR-AI, SR-AII y SR-AIII, siendo el 1 y el 2 las isoformas predominantes [121]. Esta proteína tiene ubicación transmembrana y debe homotrimerizar para cumplir su función [122]. Posee una diversidad de ligandos tanto endógenos como exógenos [123]. Dentro de los ligandos endógenos se puede destacar apolipoproteína E (ApoE) [124]. Se expresa en gran medida en macrófagos, pero también se expresa en microglías y en linfocitos T pero en menor proporción [125]. Se ha descrito a ApoE4 como un inhibidor inducible por VIH-1 de la producción viral e infectividad en macrófagos, que se debe a la

degradación de Env, por lo que la infección por VIH-1 aumenta los niveles de ApoE en macrófagos y a su vez ApoE inhibe la producción viral [126]. Khan *et al.* describen en su estudio que las isoformas de ApoE similares a HDL en el cerebro ejercen efectos restrictivos sobre la transactivación LTR inducida por la proteína viral Tat de VIH-1, así impidiendo la transcripción de las proteínas virales y la producción de partículas virales de VIH-1 en las células [127], pudiendo dilucidar lo que sucede en una infección latente. Sabiendo estos antecedentes y juntando los resultados obtenidos en nuestra investigación, donde se observa que el apagamiento del gen MSR1 en los modelos de H $\mu$ Glia/HIV HC69 y J-Lat 10.6 posee en efecto significativo en la reactivación del provirus de VIH-1 (Figura 7 y 11), se propone que el camino por el cual mantiene la latencia de VIH-1 sería a través de su interacción con las isoformas de ApoE, aunque se requieren más estudios para lograr dilucidar el mecanismo.

FITM1 es una proteína que pertenece a las proteínas transmembrana inductoras de almacenamiento de grasa (FITM) que residen en el retículo endoplasmático [128]. Se ha descrito que median la formación de gotas lipídicas y además participa en el metabolismo de los lípidos y protege contra el estrés celular [129, 130]. Está regulado por un grupo de factores de transcripción los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR) [131]. No hay estudios que relacionen FITM1 y la infección por VIH-1, pero se ha descrito que otras proteínas que están bajo el control de los PPAR se han relacionado con VIH: Perilipina 2 (PLIN2) al inhibirse mediante shRNA inhibe la replicación del VIH-1 en células T Jurkat cultivadas [132]. Dentro de los resultados de nuestra investigación se observó un efecto significativo en la reactivación del provirus de VIH-1 en el modelo de H $\mu$ Glia/HIV HC69 (Figura 7), y J-Lat 10.6 mediante la expresión de niveles de p24 (Figura 12) pero dado los antecedentes que se tienen no es posible asociar una vía molecular por la cual ocurre este fenómeno, requiriéndose de mayor investigación al respecto.

TSC1 es una proteína citoplasmática también denominada hamartina que interactúa con TSC2 y TBC1D7 en el citoplasma para conformar un complejo que reprime el crecimiento celular al inhibir la activación de mTORC1 a través de GTPasa RHEB, por lo que desempeñan variadas funciones fisiológicas [133]. La pérdida de TSC1 en las células T da como resultado un mayor tamaño celular, un ciclo celular aberrante y las actividades altas de mTORC1, lo que finalmente conduce

a la muerte celular apoptótica [134, 135], por lo que nos indica que es una proteína fundamental en estas células. Jin *et al.* han descrito que TSC1 es un gen que mantiene la latencia de VIH-1 en líneas celulares de linfocitos T y monocitos regulando negativamente la vía AKT-mTORC1 [80], por lo que se esperaba que al realizar el apagamiento del gen TSC1 en el modelo de linfocitos T J-Lat 10.6, lo cual pudimos determinar mediante la expresión de p24 (Figura 12). Pese a que el sitio de integración del provirus del modelo utilizado por Jin *et al.* y el modelo J-Lat 10.6 es diferente. TSC1 no se ha descrito como un gen que se exprese en microglías, lo que podría explicar la falta de efecto significativo en la reactivación del provirus de VIH-1 en el modelo H $\mu$ Glia/HIV HC69 (Figura 7). Esta diferencia de reactivación en ambos modelos puede deberse a marcadores epigenéticos distintos en estos tipos celulares, provienen de células de distinta progenie, donde las microglías provienen de progenitores mieloides tempranos en el saco vitelino embrionario; mientras que los linfocitos provienen de progenitores linfoides de la hematopoyesis hepática [136].

El método de CRISPR-Cas9 utilizado para llevar a cabo el apagamiento de genes específicos, requiere de la verificación del apagamiento del gen, que no se llevó a cabo en esta investigación, por lo tanto, los resultados observados solo nos permiten dilucidar lo que ocurre al realizar el tratamiento de ARNs guías específicos para cada gen y el sistema de CRISPR-Cas9. Se requiere la realización de verificación del apagamiento para poder afirmar la hipótesis. Además, es importante recalcar que no se realizó una selección de las células que hayan incorporado el sistema de CRISPR-Cas9, por lo que no podemos determinar el porcentaje de células que se han modificado con el tratamiento pudiendo, observarse cambios modestos en el tratamiento con las condiciones de tratamiento con CRISPR-Cas9 y los ARN guías específicos para cada gen.

Al realizar un *screening* de CRISPR de genoma completo ha permitido el estudio de la latencia de VIH-1 en distintas líneas celulares, identificando posibles candidatos de genes involucrados en la latencia de VIH-1 [80-90]. Es una de las técnicas más eficientes de pérdida de función [80], pero presenta desafíos como en la especificidad de los ARN guía. Puede no ser perfecta la especificidad de los ARN guía seleccionados en las librerías que estudian miles de ARN guías dirigidos a miles de genes. Los problemas de especificidad llevan a cortes por Cas9 en secuencias genómicas similares, pero no idénticas al objetivo, pudiendo obtener resultados falsos positivos. Es por esto que es crucial realizar la validación individual de cada gen, que se puede llevar a cabo mediante

silenciamiento de la proteína o apagamiento del gen. Para nuestra investigación se llevó a cabo el apagamiento de los genes seleccionados mediante CRISPR-Cas9, utilizando un ARN guía para cada uno de los genes, obteniendo los resultados anteriormente descritos. Para demostrar la implicancia de aquellos genes que, al realizar el apagamiento, reactivan el provirus de VIH-1, es necesario: verificar por *Western blot* la disminución de la síntesis de cada proteína con su anticuerpo específico; aumentar la cantidad de ARN guía dirigidos a cada gen, para aumentar la especificidad del apagamiento; realizar líneas KO clonales para cada proteína; probar el uso de alguna droga que permita inhibir la expresión de las proteínas, buscando obtener una posible estrategia “*shock and kill*”; u observar el efecto de la sobreexpresión de la proteína, buscando obtener una posible estrategia “*block and lock*”.

## CONCLUSIÓN

En conjunto, los resultados obtenidos en esta investigación, podemos determinar que el tratamiento con CRISPR-Cas9 y ARN guías específicos para los genes NDUFS2, MNT, MSR1 y FITM1 permite la reactivación del provirus de VIH-1 en modelos celulares de Microglías y Linfocitos T

No es posible proponer un mecanismo de establecimiento de la latencia, pero si permiten proponer nuevos mecanismos de reactivación del provirus de VIH-1 en un modelo celular de microglías humanas y que se comparten en el modelo de linfocitos T.

Nuestros hallazgos ofrecen una nueva perspectiva sobre los posibles mecanismos involucrados en la infección latente en microglías y linfocitos T. Teniendo el potencial de respaldar el desarrollo de estrategias terapéuticas innovadoras para combatir el VIH.

## REFERENCIAS

- [1] Avendaño Carvajal, L., Ferrés Garrido, M., Luchsinger Farías, V. y Spencer O., E. (2018). Virología clínica. Páginas: 273, 274, 277 - 288. Disponible en <http://bibliografias.uchile.cl/1980>
- [2] Haseltine WA. Molecular biology of the human immunodeficiency virus type 1. FASEB J. 1991;5(10):2349-2360. doi:10.1096/fasebj.5.10.1829694
- [3] Lamotte Castillo José Antonio. Infección por VIH/sida en el mundo actual. MEDISAN. 2014 Jul;18(7):993-1013. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1029-30192014000700015&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30192014000700015&lng=es)
- [4] Kaplan JE, Benson C, Holmes KK, *et al.* Guidelines for prevention and treatment of opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents: recommendations from CDC, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America. MMWR Recomm Rep. 2009;58(RR-4):1-207; quiz CE1-4. Disponible en: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr58e324a1.htm>
- [5] Global HIV & AIDS statistics — Fact sheet. Unaids.org. Disponible en: <https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>
- [6] Chile. (2021). Unaids.org. Recuperado el 25 de enero de 2023, de <https://www.unaids.org/es/regionscountries/countries/chile>
- [7] Shaw GM, Hunter E. HIV transmission. Cold Spring Harb Perspect Med. 2012;2(11):a006965–a006965. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a006965>
- [8] Klatzmann D, Barré-Sinoussi F, Nugeyre MT, *et al.* Selective tropism of lymphadenopathy associated virus (LAV) for helper-inducer T lymphocytes. Science. 1984;225(4657):59-63. doi:10.1126/science.6328660
- [9] Chavez L, Calvanese V, Verdin E. HIV Latency Is Established Directly and Early in Both Resting and Activated Primary CD4 T Cells. PLoS Pathog. 2015;11(6):e1004955. Published 2015 Jun 11. doi:10.1371/journal.ppat.1004955
- [10] Smed-Sörensen A, Loré K, Vasudevan J, *et al.* Differential susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection of myeloid and plasmacytoid dendritic cells. J Virol. 2005;79(14):8861-8869. doi:10.1128/JVI.79.14.8861-8869.2005

- [11] Lee TH, Stromberg RR, Heitman JW, et al. Distribution of HIV type 1 (HIV-1) in blood components: detection and significance of high levels of HIV-1 associated with platelets. *Transfusion*. 1998;38(6):580-588. doi:10.1046/j.1537-2995.1998.38698326338.x
- [12] Castellano P, Prevedel L, Eugenin EA. HIV-infected macrophages and microglia that survive acute infection become viral reservoirs by a mechanism involving Bim. *Sci Rep*. 2017;7(1):12866. Published 2017 Oct 9. doi:10.1038/s41598-017-12758-w
- [13] Churchill MJ, Wesselingh SL, Cowley D, et al. Extensive astrocyte infection is prominent in human immunodeficiency virus-associated dementia. *Ann Neurol*. 2009;66(2):253-258. doi:10.1002/ana.21697
- [14] Ho DD, Pomerantz RJ, Kaplan JC. Pathogenesis of infection with human immunodeficiency virus. *N Engl J Med*. 1987;317(5):278-286. doi:10.1056/NEJM198707303170505
- [15] Khanal S, Schank M, El Gazzar M, et al. HIV-1 Latency and Viral Reservoirs: Existing Reversal Approaches and Potential Technologies, Targets, and Pathways Involved in HIV Latency Studies. *Cells*. 2021;10(2):475. Published 2021 Feb 23. doi:10.3390/cells10020475
- [16] Medicamentos contra el VIH autorizados por la FDA. Nih.gov. Recuperado el 23 de febrero de 2023, de <https://hivinfo.nih.gov/es/understanding-hiv/fact-sheets/medicamentos-contra-el-vih-autorizados-por-la-fda>
- [17] Wandeler G, Johnson LF, Egger M. Trends in life expectancy of HIV-positive adults on antiretroviral therapy across the globe: comparisons with general population. *Curr Opin HIV AIDS*. 2016;11(5):492-500. doi:10.1097/COH.0000000000000298
- [18] Chun TW, Stuyver L, Mizell SB, et al. Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(24):13193-13197. doi:10.1073/pnas.94.24.13193
- [19] Miller MD, Farnet CM, Bushman FD. Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *J Virol*. 1997;71(7):5382-5390. doi:10.1128/JVI.71.7.5382-5390.1997
- [20] Müller TG, Zila V, Müller B, Kräusslich HG. Nuclear Capsid Uncoating and Reverse Transcription of HIV-1. *Annu Rev Virol*. 2022;9(1):261-284. doi:10.1146/annurev-virology-020922-110929
- [21] Ferguson MR, Rojo DR, von Lindern JJ, O'Brien WA. HIV-1 replication cycle. *Clin Lab Med*. 2002;22(3):611-635. doi:10.1016/s0272-2712(02)00015-x

- [22] Ivanchenko S, Godinez WJ, Lampe M, *et al.* Dynamics of HIV-1 assembly and release. *PLoS Pathog.* 2009;5(11):e1000652. doi:10.1371/journal.ppat.1000652
- [23] Lingappa JR, Reed JC, Tanaka M, *et al.* How HIV-1 Gag assembles in cells: Putting together pieces of the puzzle. *Virus Res.* 2014;193:89-107. doi:10.1016/j.virusres.2014.07.001
- [24] Kohl NE, Emini EA, Schleif WA, *et al.* Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85(13):4686-4690. doi:10.1073/pnas.85.13.4686.
- [25] Ramdas P, Sahu AK, Mishra T, Bhardwaj V, Chande A. From Entry to Egress: Strategic Exploitation of the Cellular Processes by HIV-1. *Front Microbiol.* 2020 Dec 4;11:559792. doi: 10.3389/fmicb.2020.559792.
- [26] Zhang L, Lewin SR. HIV vaccines and cure: The path towards finding an effective cure and vaccine. Singapore: Springer Singapore; 2018.
- [27] Shen A, Siliciano JD, Pierson TC, *et al.* Establishment of latent HIV-1 infection of resting CD4(+) T lymphocytes does not require inactivation of Vpr. *Virology.* 2000;278(1):227-233. doi:10.1006/viro.2000.0650
- [28] Unutmaz D, Kewal Ramani VN, Marmon S, Littman DR. Cytokine signals are sufficient for HIV-1 infection of resting human T lymphocytes. *J Exp Med.* 1999;189(11):1735-1746. doi:10.1084/jem.189.11.1735
- [29] Soriano-Sarabia N, Bateson RE, Dahl NP, *et al.* Quantitation of replication-competent HIV-1 in populations of resting CD4+ T cells. *J Virol.* 2014;88(24):14070-14077. doi:10.1128/JVI.01900-14
- [30] Zerbato JM, McMahon DK, Sobolewski MD, *et al.* Naive CD4+ T Cells Harbor a Large Inducible Reservoir of Latent, Replication-competent Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Clin Infect Dis.* 2019;69(11):1919-1925. doi:10.1093/cid/ciz108
- [31] Ait-Ammar A, Kula A, Darcis G, *et al.* Current Status of Latency Reversing Agents Facing the Heterogeneity of HIV-1 Cellular and Tissue Reservoirs. *Front Microbiol.* 2020;10:3060. Published 2020 Jan 24. doi:10.3389/fmicb.2019.03060
- [32] Kumar A, Abbas W, Herbein G. HIV-1 latency in monocytes/macrophages. *Viruses.* 2014;6(4):1837-1860. Published 2014 Apr 22. doi:10.3390/v6041837

- [33] Castellano P, Prevedel L, Eugenin EA. HIV-infected macrophages and microglia that survive acute infection become viral reservoirs by a mechanism involving Bim. *Sci Rep.* 2017;7(1):12866. Published 2017 Oct 9. doi:10.1038/s41598-017-12758-w
- [34] Zhao J, Nguyen LNT, Nguyen LN, *et al.* ATM Deficiency Accelerates DNA Damage, Telomere Erosion, and Premature T Cell Aging in HIV-Infected Individuals on Antiretroviral Therapy. *Front Immunol.* 2019;10:2531. Published 2019 Nov 5. doi:10.3389/fimmu.2019.02531
- [35] Khanal S, Tang Q, Cao D, *et al.* Telomere and ATM Dynamics in CD4 T-Cell Depletion in Active and Virus-Suppressed HIV Infections. *J Virol.* 2020;94(22):e01061-20. Published 2020 Oct 27. doi:10.1128/JVI.01061-20
- [36] Darcis G, Berkhout B, Pasternak AO. The Quest for Cellular Markers of HIV Reservoirs: Any Color You Like. *Front Immunol.* 2019;10:2251. Published 2019 Sep 20. doi:10.3389/fimmu.2019.02251
- [37] Mbonye U, Karn J. The Molecular Basis for Human Immunodeficiency Virus Latency. *Annu Rev Virol.* 2017;4(1):261-285. doi:10.1146/annurev-virology-101416-041646
- [38] Della Chiara G, Crotti A, Liboi E, *et al.* Negative regulation of HIV-1 transcription by a heterodimeric NF- $\kappa$ B1/p50 and C-terminally truncated STAT5 complex. *J Mol Biol.* 2011;410(5):933-943. doi:10.1016/j.jmb.2011.03.044
- [39] Bosque A, Nilson KA, Macedo AB, *et al.* Benzotriazoles Reactivate Latent HIV-1 through Inactivation of STAT5 SUMOylation. *Cell Rep.* 2017;18(5):1324-1334. doi:10.1016/j.celrep.2017.01.022
- [40] Weinberger, L. S., Burnett, J. C., Toettcher, J. E., *et al* (2005). Stochastic gene expression in a lentiviral positive-feedback loop: HIV-1 Tat fluctuations drive phenotypic diversity. *Cell*, 122(2), 169–182. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.06.006>
- [41] Yang Z, Zhu Q, Luo K, Zhou Q. The 7SK small nuclear RNA inhibits the CDK9/cyclin T1 kinase to control transcription. *Nature.* 2001;414(6861):317-322. doi:10.1038/35104575
- [42] Ramakrishnan R, Dow EC, Rice AP. Characterization of Cdk9 T-loop phosphorylation in resting and activated CD4(+) T lymphocytes. *J Leukoc Biol.* 2009;86(6):1345-1350. doi:10.1189/jlb.0509309



- [43] Budhiraja S, Famiglietti M, Bosque A, *et al.* Cyclin T1 and CDK9 T-loop phosphorylation are downregulated during establishment of HIV-1 latency in primary resting memory CD4+ T cells. *J Virol.* 2013;87(2):1211-1220. doi:10.1128/JVI.02413-12
- [44] Jadowsky JK, Wong JY, Graham AC, *et al.* Negative elongation factor is required for the maintenance of proviral latency but does not induce promoter-proximal pausing of RNA polymerase II on the HIV long terminal repeat. *Mol Cell Biol.* 2014;34(11):1911-1928. doi:10.1128/MCB.01013-13
- [45] Yamaguchi Y, Takagi T, Wada T, *et al.* NELF, a multisubunit complex containing RD, cooperates with DSIF to repress RNA polymerase II elongation. *Cell.* 1999;97(1):41-51. doi:10.1016/s0092-8674(00)80713-8
- [46] Huang J, Wang F, Argyris E, *et al.* Cellular microRNAs contribute to HIV-1 latency in resting primary CD4+ T lymphocytes. *Nat Med.* 2007;13(10):1241-1247. doi:10.1038/nm1639
- [47] Schröder AR, Shinn P, Chen H, *et al.* HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell.* 2002;110(4):521-529. doi:10.1016/s0092-8674(02)00864-4
- [48] Lusic M, Siliciano RF. Nuclear landscape of HIV-1 infection and integration [published correction appears in *Nat Rev Microbiol.* 2017 Feb 27;:]. *Nat Rev Microbiol.* 2017;15(2):69-82. doi:10.1038/nrmicro.2016.162
- [49] Lewinski MK, Bisgrove D, Shinn P, *et al.* Genome-wide analysis of chromosomal features repressing human immunodeficiency virus transcription. *J Virol.* 2005;79(11):6610-6619. doi:10.1128/JVI.79.11.6610-6619.2005
- [50] Verdin E, Paras P Jr, Van Lint C. Chromatin disruption in the promoter of human immunodeficiency virus type 1 during transcriptional activation [published correction appears in *EMBO J* 1993 Dec;12(12):4900]. *EMBO J.* 1993;12(8):3249-3259. doi:10.1002/j.1460-2075.1993.tb05994.x
- [51] Colin L, Van Lint C. Molecular control of HIV-1 postintegration latency: implications for the development of new therapeutic strategies. *Retrovirology.* 2009;6:111. Published 2009 Dec 4. doi:10.1186/1742-4690-6-111
- [52] Jean MJ, Fiches G, Hayashi T, Zhu J. Current Strategies for Elimination of HIV-1 Latent Reservoirs Using Chemical Compounds Targeting Host and Viral Factors. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2019;35(1):1-24. doi:10.1089/AID.2018.0153

- [53] Sengupta S, Siliciano RF. Targeting the Latent Reservoir for HIV-1. *Immunity*. 2018;48(5):872-895. doi:10.1016/j.immuni.2018.04.030
- [54] Kessing CF, Nixon CC, Li C, *et al*. In Vivo Suppression of HIV Rebound by Didehydro-Cortistatin A, a "Block-and-Lock" Strategy for HIV-1 Treatment. *Cell Rep*. 2017;21(3):600-611. doi:10.1016/j.celrep.2017.09.080
- [55] Christ F, Shaw S, Demeulemeester J, *et al*. Small-molecule inhibitors of the LEDGF/p75 binding site of integrase block HIV replication and modulate integrase multimerization. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(8):4365-4374. doi:10.1128/AAC.00717-12
- [56] Kessl JJ, Jena N, Koh Y, *et al*. Multimode, cooperative mechanism of action of allosteric HIV-1 integrase inhibitors. *J Biol Chem*. 2012;287(20):16801-16811. doi:10.1074/jbc.M112.354373
- [57] Delagrèverie HM, Delaugerre C, Lewin SR, *et al*. Ongoing Clinical Trials of Human Immunodeficiency Virus Latency-Reversing and Immunomodulatory Agents. *Open Forum Infect Dis*. 2016;3(4):ofw189. Published 2016 Oct 7. doi:10.1093/ofid/ofw189
- [58] Symons J, Chopra A, Malatinkova E, *et al*. HIV integration sites in latently infected cell lines: evidence of ongoing replication [published correction appears in *Retrovirology*. 2017 Mar 27;14 (1):23]. *Retrovirology*. 2017;14(1):2. Published 2017 Jan 13. doi:10.1186/s12977-016-0325-2
- [59] Folks TM, Justement J, Kinter A, *et al*. Cytokine-induced expression of HIV-1 in a chronically infected promonocyte cell line. *Science*. 1987;238(4828):800-802. doi:10.1126/science.3313729
- [60] Folks TM, Clouse KA, Justement J, *et al*. Tumor necrosis factor alpha induces expression of human immunodeficiency virus in a chronically infected T-cell clone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(7):2365-2368. doi:10.1073/pnas.86.7.2365
- [61] Perez VL, Rowe T, Justement JS, *et al*. An HIV-1-infected T cell clone defective in IL-2 production and Ca<sup>2+</sup> mobilization after CD3 stimulation. *J Immunol*. 1991;147(9):3145-3148.
- [62] Kutsch O, Benveniste EN, Shaw GM, Levy DN. Direct and quantitative single-cell analysis of human immunodeficiency virus type 1 reactivation from latency. *J Virol*. 2002;76(17):8776-8786. doi:10.1128/jvi.76.17.8776-8786.2002

- [63] Jordan A, Bisgrove D, Verdin E. HIV reproducibly establishes a latent infection after acute infection of T cells in vitro. *EMBO J*. 2003;22(8):1868-1877. doi:10.1093/emboj/cdg188
- [64] Wires ES, Alvarez D, Dobrowolski C, *et al*. Methamphetamine activates nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- $\kappa$ B) and induces human immunodeficiency virus (HIV) transcription in human microglial cells. *J Neurovirol*. 2012;18(5):400-410. doi:10.1007/s13365-012-0103-4
- [65] Brass AL, Dykxhoorn DM, Benita Y, *et al*. Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. *Science*. 2008;319(5865):921-926. doi:10.1126/science.1152725
- [66] Nguyen DG, Yin H, Zhou Y, Wolff KC, *et al*. Identification of novel therapeutic targets for HIV infection through functional genomic cDNA screening. *Virology*. 2007;362(1):16-25. doi:10.1016/j.virol.2006.11.036
- [67] König R, Zhou Y, Elleder D, *et al*. Global analysis of host-pathogen interactions that regulate early-stage HIV-1 replication. *Cell*. 2008;135(1):49-60. doi:10.1016/j.cell.2008.07.032
- [68] Zhou H, Xu M, Huang Q, *et al*. Genome-scale RNAi screen for host factors required for HIV replication. *Cell Host Microbe*. 2008;4(5):495-504. doi:10.1016/j.chom.2008.10.004
- [69] Echeverri CJ, Beachy PA, Baum B, *et al*. Minimizing the risk of reporting false positives in large-scale RNAi screens. *Nat Methods*. 2006;3(10):777-779. doi:10.1038/nmeth1006-777
- [70] Wang T, Wei JJ, Sabatini DM, Lander ES. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science*. 2014;343(6166):80-84. doi:10.1126/science.1246981
- [71] Kweon J, Kim Y. High-throughput genetic screens using CRISPR-Cas9 system. *Arch Pharm Res*. 2018;41(9):875-884. doi:10.1007/s12272-018-1029-z
- [72] Xiao Q, Guo D, Chen S. Application of CRISPR/Cas9-Based Gene Editing in HIV-1/AIDS Therapy. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019;9:69. Published 2019 Mar 22. doi:10.3389/fcimb.2019.00069
- [73] Cong L, Ran FA, Cox D, *et al*. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 2013;339(6121):819-823. doi:10.1126/science.1231143
- [74] Besnard E, Hakre S, Kampmann M, *et al*. The mTOR Complex Controls HIV Latency. *Cell Host Microbe*. 2016;20(6):785-797. doi:10.1016/j.chom.2016.11.001

- [75] Boehm D, Jeng M, Camus G, *et al.* SMYD2-Mediated Histone Methylation Contributes to HIV-1 Latency. *Cell Host Microbe.* 2017;21(5):569-579.e6. doi:10.1016/j.chom.2017.04.011
- [76] Llewellyn GN, Alvarez-Carbonell D, Chateau M, *et al.* HIV-1 infection of microglial cells in a reconstituted humanized mouse model and identification of compounds that selectively reverse HIV latency. *J Neurovirol.* 2018;24(2):192-203. doi:10.1007/s13365-017-0604-2
- [77] Das B, Dobrowolski C, Luttge B, *et al.* Estrogen receptor-1 is a key regulator of HIV-1 latency that imparts gender-specific restrictions on the latent reservoir. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(33):E7795-E7804. doi:10.1073/pnas.1803468115
- [78] Ma X, Yang T, Luo Y, *et al.* TRIM28 promotes HIV-1 latency by SUMOylating CDK9 and inhibiting P-TEFb. *Elife.* 2019;8:e42426. Published 2019 Jan 17. doi:10.7554/eLife.42426
- [79] Röling M, Mollapour Sisakht M, Ne E, *et al.* A Two-Color Haploid Genetic Screen Identifies Novel Host Factors Involved in HIV-1 Latency. *mBio.* 2021;12(6):e0298021. doi:10.1128/mBio.02980-21
- [80] Jin S, Liao Q, Chen J, *et al.* TSC1 and DEPDC5 regulate HIV-1 latency through the mTOR signaling pathway. *Emerg Microbes Infect.* 2018;7(1):138. Published 2018 Aug 8. doi:10.1038/s41426-018-0139-5
- [81] Park RJ, Wang T, Koundakjian D, *et al.* A genome-wide CRISPR screen identifies a restricted set of HIV host dependency factors. *Nat Genet.* 2017;49(2):193-203. doi:10.1038/ng.3741
- [82] Huang H, Kong W, Jean M, *et al.* A CRISPR/Cas9 screen identifies the histone demethylase MINA53 as a novel HIV-1 latency-promoting gene (LPG). *Nucleic Acids Res.* 2019;47(14):7333-7347. doi:10.1093/nar/gkz493
- [83] Li Z, Wu J, Chavez L, *et al.* Reiterative Enrichment and Authentication of CRISPRi Targets (REACT) identifies the proteasome as a key contributor to HIV-1 latency. *PLoS Pathog.* 2019;15(1):e1007498. Published 2019 Jan 15. doi:10.1371/journal.ppat.1007498
- [84] Krasnopolsky S, Kuzmina A, Taube R. Genome-wide CRISPR knockout screen identifies ZNF304 as a silencer of HIV transcription that promotes viral latency. *PLoS Pathog.* 2020;16(9):e1008834. Published 2020 Sep 21. doi:10.1371/journal.ppat.1008834
- [85] Li Z, Hajian C, Greene WC. Identification of unrecognized host factors promoting HIV-1 latency. *PLoS Pathog.* 2020;16(12):e1009055. Published 2020 Dec 3. doi:10.1371/journal.ppat.1009055

- [86] Rathore A, Iketani S, Wang P, *et al.* CRISPR-based gene knockout screens reveal deubiquitinases involved in HIV-1 latency in two Jurkat cell models. *Sci Rep.* 2020;10(1):5350. Published 2020 Mar 24. doi:10.1038/s41598-020-62375-3
- [87] Yang X, Wang Y, Lu P, *et al.* PEBP1 suppresses HIV transcription and induces latency by inactivating MAPK/NF- $\kappa$ B signaling. *EMBO Rep.* 2020;21(11):e49305. doi:10.15252/embr.201949305
- [88] Yang X, Zhao X, Zhu Y, *et al.* FBXO34 promotes latent HIV-1 activation by post-transcriptional modulation. *Emerg Microbes Infect.* 2022;11(1):2785-2799. doi:10.1080/22221751.2022.2140605
- [89] Hsieh E, Janssens DH, Paddison PJ, *et al.* A modular CRISPR screen identifies individual and combination pathways contributing to HIV-1 latency. *PLoS Pathog.* 2023;19(1):e1011101. Published 2023 Jan 27. doi:10.1371/journal.ppat.1011101
- [90] Pedersen SF, Collora JA, Kim RN, *et al.* Inhibition of a Chromatin and Transcription Modulator, SLTM, Increases HIV-1 Reactivation Identified by a CRISPR Inhibition Screen. *J Virol.* 2022;96(13):e0057722. doi:10.1128/jvi.00577-22
- [91] Rudolph, C *et al.* "In vivo gene delivery to the lung using polyethylenimine and fractured polyamidoamine dendrimers." *The journal of gene medicine* vol. 2,4 (2000): 269-78. doi:10.1002/1521-2254(200007/08)2:4<269::AID-JGM112>3.0.CO;2-F
- [92] Alvarez-Carbonell D, Garcia-Mesa Y, Milne S, *et al.* Toll-like receptor 3 activation selectively reverses HIV latency in microglial cells. *Retrovirology.* 2017;14(1):9. Published 2017 Feb 6. doi:10.1186/s12977-017-0335-8
- [93] Wallet, C., De Rovere, M., Van Assche, J., *et al* (2019). Microglial Cells: The Main HIV-1 Reservoir in the Brain. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 9, 362. doi: 10.3389/fcimb.2019.00362
- [94] Doyle, K. P., & Buckwalter, M. S. (2020). Immunological mechanisms in poststroke dementia. *Current opinion in neurology*, 33(1), 30–36. doi: 10.1097/WCO.0000000000000783
- [95] Mitra P, Sharman T. HIV Neurocognitive Disorders. [Updated 2022 Oct 20]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555954/>

- [96] Alvarez-Carbonell, D., Ye, F., Ramanath, N., *et al* (2019). The Glucocorticoid Receptor Is a Critical Regulator of HIV Latency in Human Microglial Cells. *Journal of neuroimmune pharmacology: the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, 14(1), 94–109. doi: 10.1007/s11481-018-9798-1
- [97] Wilt, S.G., Zhou, J.M., Wesselingh, S., Kufta, C.V., Dubois-Dalcq, M. (1995). Tumor Necrosis Factor Alpha Derived from Human Microglia Enhances HIV-1 Replication and is Toxic for Rat Oligodendrocytes in Vitro. In: Major, E.O., Levy, J.A., Schoenberg, D. (eds) *Technical Advances in AIDS Research in the Human Nervous System*. Springer, Boston, MA. doi: 10.1007/978-1-4615-1949-2\_12
- [98] Verma, A. S., Singh, U. P., Dwivedi, P. D., & Singh, A. (2010). Contribution of CNS cells in NeuroAIDS. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 2(4), 300–306. doi: 10.4103/0975-7406.72129
- [99] Fernández-Agüera, M. C., Gao, L., González-Rodríguez, P., *et al* (2015). Oxygen Sensing by Arterial Chemoreceptors Depends on Mitochondrial Complex I Signaling. *Cell metabolism*, 22(5), 825–837. doi: 10.1016/j.cmet.2015.09.004
- [100] Wolin, M. S., Alruwaili, N., & Kandhi, S. (2019). Studies on Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction Detect a Novel Role for the Mitochondrial Complex I Subunit Ndufs2 in Controlling Peroxide Generation for Oxygen-Sensing. *Circulation research*, 124(12), 1683–1685. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.119.315137
- [101] Dunham-Snary, K. J., Wu, D., Potus, F., Sykes, E. A., *et al* (2019). Ndufs2, a Core Subunit of Mitochondrial Complex I, Is Essential for Acute Oxygen-Sensing and Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction. *Circulation research*, 124(12), 1727–1746. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.118.314284
- [102] Cabello-Rivera, Daniel *et al*. “Mitochondrial Complex I Function Is Essential for Neural Stem/Progenitor Cells Proliferation and Differentiation.” *Frontiers in neuroscience* vol. 13 664. 26 Jun. 2019, doi:10.3389/fnins.2019.00664
- [103] Bandara AB, Drake JC, James CC, Smyth JW, Brown DA. Complex I protein NDUFS2 is vital for growth, ROS generation, membrane integrity, apoptosis, and mitochondrial energetics. *Mitochondrion*. 2021 May;58:160-168. doi: 10.1016/j.mito.2021.03.003. Epub 2021 Mar 18. PMID: 33744462; PMCID: PMC8113094.

- [104] Yang Q, Feng F, Li P, *et al.* Arsenic Trioxide Impacts Viral Latency and Delays Viral Rebound after Termination of ART in Chronically SIV-Infected Macaques. *Adv Sci (Weinh)*. 2019 May 7;6(13):1900319. doi: 10.1002/advs.201900319.
- [105] Oliveira-Marques, V., Marinho, H. S., Cyrne, L., & Antunes, F. (2009). Role of hydrogen peroxide in NF-kappaB activation: from inducer to modulator. *Antioxidants & redox signaling*, 11(9), 2223–2243. doi: 10.1089/ars.2009.2601
- [106] Niu, F., Zhang, B., Feng, J., *et al* (2021). Protein profiling identified mitochondrial dysfunction and synaptic abnormalities after dexamethasone intervention in rats with traumatic brain injury. *Neural regeneration research*, 16(12), 2438–2445. doi: 10.4103/1673-5374.313047
- [107] Halestrap A. P. (2013). The SLC16 gene family - structure, role and regulation in health and disease. *Molecular aspects of medicine*, 34(2-3), 337–349. doi: 10.1016/j.mam.2012.05.003
- [108] Cotto, B., Natarajaneenivasan, K., & Langford, D. (2019). HIV-1 infection alters energy metabolism in the brain: Contributions to HIV-associated neurocognitive disorders. *Progress in neurobiology*, 181, 101616. doi: 10.1016/j.pneurobio.2019.101616
- [109] Lin, R. Y., Vera, J. C., Chaganti, R. S., & Golde, D. W. (1998). Human monocarboxylate transporter 2 (MCT2) is a high affinity pyruvate transporter. *The Journal of biological chemistry*, 273(44), 28959–28965. doi: 10.1074/jbc.273.44.28959
- [110] Moreira, T. J., Pierre, K., Maekawa, F., *et al* (2009). Enhanced cerebral expression of MCT1 and MCT2 in a rat ischemia model occurs in activated microglial cells. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 29(7), 1273–1283. doi: 10.1038/jcbfm.2009.50
- [111] Shytaj IL, Procopio FA, Tarek M, *et al.* Glycolysis downregulation is a hallmark of HIV-1 latency and sensitizes infected cells to oxidative stress. *EMBO Mol Med*. 2021 Aug 9;13(8):e13901. doi: 10.15252/emmm.202013901.
- [112] Pushkarsky, T., Zybarth, G., Dubrovsky, L., *et al* (2001). CD147 facilitates HIV-1 infection by interacting with virus-associated cyclophilin A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(11), 6360–6365. doi: 10.1073/pnas.111583198
- [113] Göthel, S. F., & Marahiel, M. A. (1999). Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 55(3), 423–436. doi: 10.1007/s000180050299

- [114] Luban, J., Bossolt, K. L., Franke, E. K., *et al* (1993). Human immunodeficiency virus type 1 Gag protein binds to cyclophilins A and B. *Cell*, 73(6), 1067–1078. doi: 10.1016/0092-8674(93)90637-6
- [115] Hurlin, P. J., Quéva, C., & Eisenman, R. N. (1997). Mnt, a novel Max-interacting protein is coexpressed with Myc in proliferating cells and mediates repression at Myc binding sites. *Genes & development*, 11(1), 44–58. doi: 10.1101/gad.11.1.44
- [116] Meroni, G., Reymond, A., Alcalay, M., *et al* (1997). Rox, a novel bHLHZip protein expressed in quiescent cells that heterodimerizes with Max, binds a non-canonical E box and acts as a transcriptional repressor. *The EMBO journal*, 16(10), 2892–2906. doi: 10.1093/emboj/16.10.2892
- [117] Ou, S. H., Garcia-Martínez, L. F., Paulssen, E. J., & Gaynor, R. B. (1994). Role of flanking E box motifs in human immunodeficiency virus type 1 TATA element function. *Journal of virology*, 68(11), 7188–7199. doi: 10.1128/JVI.68.11.7188-7199.1994
- [118] Zhang, Y., Doyle, K., & Bina, M. (1992). Interactions of HTF4 with E-box motifs in the long terminal repeat of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of virology*, 66(9), 5631–5634. doi: 10.1128/JVI.66.9.5631-5634.1992
- [119] Terme, JM., Calvignac, S., Duc Dodon, M. *et al*. E box motifs as mediators of proviral latency of human retroviruses. *Retrovirology* 6, 81 (2009). doi: 10.1186/1742-4690-6-81
- [120] Goldstein, J. L., Ho, Y. K., Basu, S. K., & Brown, M. S. (1979). Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(1), 333–337. doi: 10.1073/pnas.76.1.333
- [121] Kodama, T., Freeman, M., Rohrer, L., *et al* (1990). Type I macrophage scavenger receptor contains alpha-helical and collagen-like coiled coils. *Nature*, 343(6258), 531–535. doi: 10.1038/343531a0
- [122] Kelley, J. L., Ozment, T. R., Li, C., Schweitzer, J. B., & Williams, D. L. (2014). Scavenger receptor-A (CD204): a two-edged sword in health and disease. *Critical reviews in immunology*, 34(3), 241–261. doi: 10.1615/critrevimmunol.2014010267
- [123] Krieger, M., Acton, S., Ashkenas, J., *et al* (1993). Molecular flypaper, host defense, and atherosclerosis. Structure, binding properties, and functions of macrophage scavenger receptors. *The Journal of biological chemistry*, 268(7), 4569–4572.



- [124] Neyen, C., Plüddemann, A., Roversi, P., *et al* (2009). Macrophage scavenger receptor A mediates adhesion to apolipoproteins A-I and E. *Biochemistry*, 48(50), 11858–11871. doi: 10.1021/bi9013769
- [125] Gudgeon, J., Marín-Rubio, J. L., & Trost, M. (2022). The role of macrophage scavenger receptor 1 (MSR1) in inflammatory disorders and cancer. *Frontiers in immunology*, 13, 1012002. doi: 10.3389/fimmu.2022.1012002
- [126] Siddiqui R, Suzu S, Ueno M, *et al*. Apolipoprotein E is an HIV-1-inducible inhibitor of viral production and infectivity in macrophages. *PLoS Pathog*. 2018 Nov 29;14(11):e1007372. doi: 10.1371/journal.ppat.1007372.
- [127] Khan N, Datta G, Geiger JD, Chen X. Apolipoprotein E isoform dependently affects Tat-mediated HIV-1 LTR transactivation. *J Neuroinflammation*. 2018 Mar 20;15(1):91. doi: 10.1186/s12974-018-1129-1.
- [128] Kadereit, B., Kumar, P., Wang, W. J., *et al* (2008). Evolutionarily conserved gene family important for fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(1), 94–99. doi: 10.1073/pnas.0708579105
- [129] Moir, R. D., Gross, D. A., Silver, D. L., & Willis, I. M. (2012). SCS3 and YFT2 link transcription of phospholipid biosynthetic genes to ER stress and the UPR. *PLoS genetics*, 8(8), e1002890. doi: 10.1371/journal.pgen.1002890
- [130] de la Rosa Rodriguez, M. A., & Kersten, S. (2017). Regulation of lipid droplet-associated proteins by peroxisome proliferator-activated receptors. *Biochimica et biophysica acta. Molecular and cell biology of lipids*, 1862(10 Pt B), 1212–1220. doi: 10.1016/j.bbalip.2017.07.007
- [131] Kadereit, B., Kumar, P., Wang, W. J., *et al* (2008). Evolutionarily conserved gene family important for fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(1), 94–99.
- [132] Yeung, M. L., Houzet, L., Yedavalli, V. S., & Jeang, K. T. (2009). A genome-wide short hairpin RNA screening of jurkat T-cells for human proteins contributing to productive HIV-1 replication. *The Journal of biological chemistry*, 284(29), 19463–19473. doi: 10.1074/jbc.M109.010033
- [133] Dibble, C. C., Elis, W., Menon, S., *et al* (2012). TBC1D7 is a third subunit of the TSC1-TSC2 complex upstream of mTORC1. *Molecular cell*, 47(4), 535–546. doi: 10.1016/j.molcel.2012.06.009

- [134] Wu, Q., Liu, Y., Chen, C., *et al* (2011). The tuberous sclerosis complex-mammalian target of rapamycin pathway maintains the quiescence and survival of naive T cells. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.:1950), 187(3), 1106–1112. doi: 10.4049/jimmunol.1003968
- [135] Dibble, C. C., Elis, W., Menon, S., *et al* (2012). TBC1D7 is a third subunit of the TSC1-TSC2 complex upstream of mTORC1. *Molecular cell*, 47(4), 535–546. doi: 10.1016/j.molcel.2012.06.009
- [136] Pavón Romero, Lenin, et al. *Inmunología [electronic resource]: molecular, celular y traslacional*. 1. ed., Wolters Kluwer, 2016.