



Universidad de Buenos Aires

Facultad de Farmacia y Bioquímica

## **Consecuencias Metabólicas e Inmunológicas de la Inducción de la Actividad de HIF-1 $\alpha$ en Linfocitos T CD4+ Infeccionados con VIH-1**

**Tesista:** Lic. Gabriel Duette

**Director:** Dr. Matías Ostrowski

**Co-director:** Dr. Clovis Palmer

**Consejera de estudios:** Dra. Silvia Hajos

**Lugar de trabajo:** Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA (INBIRS) UBA-

CONICET

---

**Índice**

<b>Índice de Figuras</b> .....	<b>3</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>11</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>12</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>13</b>
Virus de la inmunodeficiencia humana	13
Características generales del VIH-1.	14
Estructura	14
Proteínas virales	16
Ciclo de replicación viral	18
Patogenia	22
Curso natural de la infección	22
Latencia, reservorios y la búsqueda de la cura	24
Inmunometabolismo: rol de HIF-1 $\alpha$	26
Programa metabólico en Linfocitos T	26
Factor Inducible por Hipoxia 1 alfa	29
Vesículas Extracelulares	36
Vesículas Extracelulares e inmunidad	37
Vesículas Extracelulares y Virus	38
<b>Hipótesis y Objetivos</b> .....	<b>42</b>
<b>Materiales y métodos</b> .....	<b>43</b>
Líneas celulares	43
Líneas celulares reportera de la actividad de HIF-1 $\alpha$	44
Células primarias y condiciones de cultivo	44
Plásmidos	45
Preparación de stocks de virus	46
Anticuerpos	51
Vesículas extracelulares (VE)	53
Aislamiento de VE del plasma humano	53
Estimulación con ácidos nucleicos	54
Participantes del Estudio	54
Producción de partículas lentivirales para el silenciamiento de la expresión génica y producción de partículas símil virus.	47

Visualización de VEs por microscopía electrónica de barrido (scanning electron microscopy, SEM)	55
Visualización de VE por microscopía de transmisión (Transmission electron microscopy, TEM)	55
Transducción lentiviral y silenciamiento génico de líneas celulares	48
Infección con VIH-1	46
Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (Real Time-quantitative PCR, RT qPCR)	48
Ensayo de captación de glucosa	49
Cuantificación de ROS mitocondrial	50
Cuantificación de citoquinas en sobrenadantes celulares	50
Marcación de proteínas de superficie e intracelular y citometría de flujo	51
Microscopía de fluorescencia	52
Inmunotransferencia (Western blot)	52
Actividad de lactato deshidrogenasa	50
Medición de acidificación extracelular	50
Detección semicuantitativa de ADN viral	47
Análisis estadístico	55
<b>Resultados</b> .....	<b>57</b>
La expresión y actividad transcripcional de HIF-1 $\alpha$ se inducen tras la infección por VIH-1.	57
La actividad de HIF-1 $\alpha$ promueve la replicación de VIH-1.	68
La activación de la actividad de HIF-1 $\alpha$ por VIH-1 es desencadenada por el ADN viral.	71
La actividad de HIF-1 $\alpha$ inducida por la infección por VIH-1 depende de la producción de ROS mitocondrial.	79
La infección por VIH-1 promueve la liberación de vesículas extracelulares que inducen la actividad de HIF-1 $\alpha$ en células bystander.	84
Las secreción de VE inducidas por VIH-1 (VE <sup>VIH</sup> ) promueven la producción de citoquinas proinflamatorias por células T CD4+ y macrófagos a través de una vía dependiente de HIF-1 $\alpha$	87
La inducción de la actividad de HIF-1 $\alpha$ desencadenada por ácidos nucleicos derivados de VIH-1 es necesaria para la producción de VE <sup>VIH</sup> inflamatorias	91
Las vesículas extracelulares purificadas del plasma de individuos infectados con VIH-1 desencadenan la actividad de HIF-1 $\alpha$ e inflamación mediada por macrófagos	95
<b>Discusión</b> .....	<b>101</b>
<b>Conclusiones y perspectivas</b> .....	<b>110</b>
<b>Agradecimientos</b> .....	<b>112</b>
<b>Bibliografía</b> .....	<b>114</b>

## Índice de figuras

Figura 1. Esquema de la partícula viral madura. ....	15
Figura 2. Genoma proviral y proteínas .....	18
Figura 3. Esquema simplificado del ciclo de replicación del VIH-1. ....	21
Figura 4. Representación esquemática de la historia natural de la infección por VIH-1. ....	23
Figura 5. En células T el programa metabólico utilizado coincide con su demanda funcional. ....	27
Figura 6. Mecanismos de estabilización de HIF-1 $\alpha$ en células inmunes .....	31
Figura 7. HIF-1 $\alpha$ e inmunidad.....	32
Figura 8. Rutas de liberación de Exosomas y Microvesículas.....	37
Figura 9. Diagrama esquemático del procedimiento para aislar VE del plasma humano mediante cromatografía de exclusión por tamaño.....	54
Figura 10. La expresión de HIF-1 $\alpha$ es aumentada en cultivos infectados con VIH-1. ....	58
Figura 11. La infección por VIH-1 promueve la translocación nuclear de HIF-1 $\alpha$ . ....	59
Figura 12. Validación funcional de la línea reportera de la actividad transcripcional de HIF-1 $\alpha$ .....	60
Figura 13. La actividad transcripcional de HIF-1 $\alpha$ es inducida por la infección por VIH-1.....	61
Figura 14. En cultivos infectados con VIH-1 la actividad de HIF-1 $\alpha$ es desencadenada en células productivamente infectadas y en células vecinas no infectadas (bystander). ....	62
Figura 15. La actividad de HIF-1 $\alpha$ es inducida por aislamientos primarios de VIH-1 y por virus con distintos tropismos. ....	63
Figura 16. La infección por VIH-1 induce el aumento de Glicólisis Aeróbica en linfocitos T CD4+. ....	64
Figura 17. Los niveles de HIF-1 $\alpha$ se encuentran aumentados en Linfocitos T CD4+ de pacientes infectados con VIH-1 bajo tratamiento antirretroviral. ....	67
Figura 18. Validación del silenciamiento de la expresión de HIF-1 $\alpha$ mediante transducción con lentivirus.....	68
Figura 19. El silenciamiento de HIF-1 $\alpha$ en células Jurkat afecta drásticamente la infección por VIH-1.	69

Figura 20. El silenciamiento de la expresión de HIF-1 $\alpha$ en Linfocitos T CD4+ primarios afecta drásticamente la infección por VIH-1.....	70
Figura 21. La inducción de la actividad de HIF-1 $\alpha$ mediada por la infección por VIH-1 es independiente de la expresión de Vpr, Nef o Env.....	71
Figura 22. El aumento de la actividad de HIF-1 $\alpha$ mediada por la infección por VIH-1 no es inducida por las proteínas estructurales Gag/Pol y requiere la presencia de ácidos nucleicos en la partícula viral. ..	73
Figura 23. La integración del ADN de VIH-1 generado por la transcripción inversa no es necesaria para la inducción de HIF-1 $\alpha$ .....	74
Figura 24. La inhibición de la transcripción inversa de VIH-1 evita la inducción de la actividad de HIF-1 $\alpha$ .....	75
Figura 25. La generación de ADN viral es suficiente para promover el aumento de la actividad glicolítica en linfocitos T CD4+ infectados con VIH-1 $\Delta$ IN. ....	76
Figura 26. La actividad transcripcional de HIF-1 $\alpha$ es estimulada por el reconocimiento de ADNdc sintético.....	77
Figura 27. El silenciamiento de moléculas involucradas en el reconocimiento de ADN citosólico no inhibe la inducción de la actividad de HIF-1 $\alpha$ promovida por ADN viral o sintético. ....	78
Figura 28. La actividad transcripcional de HIF-1 $\alpha$ es estimulada por ADNdc en células carentes de la vía STING. ....	79
Figura 29. VIH-1 induce la producción de ROS mitocondrial en cultivos infectados de células T CD4+. ..	80
Figura 30. La producción de ROS mitocondrial es estimulada por el reconocimiento de ADNdc sintético.....	81
Figura 31. El aumento de la actividad de HIF-1 $\alpha$ inducida por la infección de VIH-1 es abolida al inhibir la producción de ROSmt.....	82
Figura 32. El aumento de la actividad glicolítica inducido por la infección por VIH-1 es afectado al inhibir la producción de ROSmt.....	83

---

Figura 33. La inducción de la actividad de HIF-1 $\alpha$ en células bystander es mediada por un factor secretado por células T CD4+ infectadas con VIH-1.....	85
Figura 34. La inducción de la actividad de HIF-1 $\alpha$ en células vecinas no infectadas (bystander) es mediada por vesículas extracelulares (VE).....	86
Figura 35. Caracterización de vesículas extracelulares de linfocitos T CD4+ infectados con VIH-1 $\Delta$ IN y no infectados.....	87
Figura 36. La producción de IFN- $\gamma$ en cultivos de células T CD4+ infectados con VIH-1 es dependiente de HIF-1 $\alpha$ .....	88
Figura 37. Representación esquemática del diseño experimental.....	89
Figura 38. Vesículas extracelulares provenientes de cultivos infectados con VIH-1 inducen la secreción de IFN- $\gamma$ en linfocitos T CD4+.....	90
Figura 39. Vesículas extracelulares provenientes de cultivos infectados con VIH-1 inducen la secreción de citoquinas proinflamatorias en macrófagos derivados de monocitos.....	91
Figura 40. Representación esquemática del diseño experimental.....	92
Figura 41. La producción de ROSmt es necesaria para la liberación de VE <sup>VIH</sup> proinflamatorias.....	93
Figura 42. La actividad de HIF-1 $\alpha$ es necesaria para la liberación de VE <sup>VIH</sup> proinflamatorias.....	94
Figura 43. El silenciamiento de la expresión de HIF-1 $\alpha$ en células T CD4 + disminuye la secreción de VE proinflamatorias liberadas por células infectadas con VIH-1.....	95
Figura 44. Caracterización de VE purificadas a partir de plasma humano mediante cromatografía de exclusión por tamaño.....	97
Figura 45. Vesículas extracelulares del plasma de pacientes infectados con VIH-1 bajo tratamiento antirretroviral inducen la secreción de citoquinas en macrófagos.....	98
Figura 46. Vesículas extracelulares del plasma de pacientes infectados con VIH-1 bajo tratamiento antirretroviral inducen el aumento de la actividad de HIF-1 $\alpha$ .....	99
Figura 47. Las VE <sup>VIH</sup> de células T CD4+ infectadas con VIH-1 inducen una respuesta proinflamatoria en células bystanders.....	100

## Abreviaturas

2-NBDG: 2- (N - (7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il) Amino) -2-desoxiglucosa

6-NBDG: 6-N- (7-nitrobenz-2-oxa-1, 3-diazol-4-il) amino) -6 desoxiglucosa

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN copia

ADNdc: ADN doble cadena

APC: Aloficocianina (*Allophycocyanin*)

ARN: Ácido ribonucleico

ARNi: ARN interferente

ARNm: ARN mensajero

ARNsc+: ARN simple cadena con polaridad positiva

ARV: Virus relacionado al SIDA (*AIDS Related Virus*)

ATP: Adenosina trifosfato

AZT: Zidovudina.

BSA: Seroalbumina bovina (*Bovine serum albumin*)

CA: Cápside, proteína p24

CD: Células dendríticas (*dendritic cells*)

CNX: Calnexina

CTL: Linfocitos T citotóxicos CD8+ (*Cytotoxic CD8+ T Lymphocytes*)

DHAP: dihidroxiacetona fosfato

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO: Dimetilsulfóxido

dNTP: didesoxinucleótidos trifosfato

EFV: Efavirenz.

ELISA: Técnica de inmunoabsorción ligado a enzimas (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)

EMVs: Endosomas multivesiculares

EV: *Extracellular vesicles*

FIH: factor inhibidor de HIF

FITC: Isotiocianato de fluoresceína (*Fluorescein isothiocyanate*)

GFP: Green Fluorescent Protein, Proteína verde fluorescente.

Glut1: Transportador de glucosa 1 (*Glucose transporter 1*)

GM-CSF: *Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*

HAART: Tratamiento antirretroviral de alta eficiencia (*Highly Active Antiretroviral Treatment*)

HAV: Virus de la hepatitis A

HBV: Virus de la hepatitis B

HCV: Virus de la Hepatitis C

HIF-1a: Factor Inducible por Hipoxia 1 alfa (*Hypoxia-inducible factor -1 alpha*)

HIF-1b: Factor Inducible por Hipoxia 1 beta (*Hypoxia-inducible factor -1 beta*)

HIF-2a: Factor Inducible por Hipoxia 2 alfa (*Hypoxia-inducible factor -2 alpha*)

HIV: Virus de la Inmunodeficiencia Humana (*Human Immunodeficiency Virus*)

HK: Hexoquinasa

HLA: Antígenos Leucocitarios Humanos (Human Leukocyte Antigen)

HRE: Elemento de respuesta a hipoxia (*Hypoxia response element*)

HSV: Herpes Simple Virus, Virus del Herpes Simple.

HTLV-III: Virus Linfotrópico Humano Tipo III (*Human T Lymphotropic Virus Type III*)

IFM: Intensidad de Fluorescencia Media (*Mean Fluorescence Intensity*)

IFN: Interferón

Ig: Inmunoglobulinas

IL: Interleuquina

IN: Integrasa

JCV: virus John Cunningham (*John Cunningham virus*)

Kb: kilobases

LAV: Virus asociado a linfadenopatía (*Lymphadenopathy Associated Virus*)

LDH: Lactato deshidrogenasa

LPS: Lipopolisacárido

LTR: Repeticiones terminales largas (*Long Terminal Repeats*)

MA: Matriz, proteína p17

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad (*Major Histocompatibility Complex*)

MOI: Multiplicidad de infección (*Multiplicity of Infection*)

MPMV: virus del mono Mason-Pfizer

MVB: cuerpos multivesiculares (multivesicular body)

NAD: Nicotinamida adenina dinucleótido ( *$\beta$ -Nicotinamide adenine dinucleotide*)

NC: Nucleocápside, proteína p7

NF- $\kappa$ B: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas. Factor nuclear  $\kappa$ B (*Nuclear factor  $\kappa$ B*)

NK: Células *Natural Killer*

NVP: Nevirapina

ORF: marco abierto de lectura (*Open Reading Frame*)

OXPPOS: fosforilación oxidativa

PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos (*Pathogen-associated molecular patterns*)

PBMC: Células mononucleares de sangre periférica (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*)

PBS: Solución tamponada de fosfatos (*Phosphate Buffer Saline*)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

PE: Ficoeritrina (*Phycoerythrin*)

PFA: Paraformaldehído (*Paraformaldehyde*)

PHD: Prolilhidroxilasas

PR: Proteasa

RAL: Raltegravir

ROS: especies reactivas del oxígeno (*reactive oxygen species*)

ROSmt: especies reactivas del oxígeno mitocondriales (*mitochondrial reactive oxygen species*)

rpm: Revoluciones por minuto

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute*

RT qPCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real cuantitativa (*Real Time-quantitative PCR*)

RT: Transcriptasa inversa (*Reverse Transcriptase*)

RT-PCR: PCR con transcriptasa reversa (*Reverse Transcription PCR*)

SEM: microscopía electrónica de barrido (*scanning electron microscopy*)

SFB: Suero fetal bovino

shARN: *short hairpin RNA*

SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

SIV: Virus de la inmunodeficiencia de simios (*Simian Immunodeficiency Virus*)

SU: Glicoproteína de superficie gp120

TAR: *Transactivation response element*

TAR: Tratamiento antirretroviral

TCA: ciclo del ácido cítrico

TCR: Receptor de linfocitos T (*T cell receptor*)

TEM: microscopía de transmisión (*Transmission electron microscopy*)

TGF- $\beta$ : factor de crecimiento transformante- $\beta$

Th1/Th17: Respuesta celular T tipo 1 o tipo 17 (*T helper*)

TI: Transcriptasa Inversa

TLR: Receptor tipo Toll (*Toll Like Receptor*)

TM: Glicoproteína transmembrana gp41

TNF: Factor de Necrosis Tumoral (*Tumor necrosis factor*)

Treg: Linfocito T CD4 regulador

VE: Vesículas Extracelulares

VE<sup>VIH</sup>: Vesículas Extracelulares de células infectadas con VIH-1.

VHL: proteína supresora de tumores de Von Hippel-Lindau

VIH-1: Virus de la Inmunodeficiencia Humana Tipo 1

VILs: vesículas intraluminales

VLP: *Virus Like Particle*, Partícula semejante a virus

---

## Resumen

La activación inmune crónica y la inflamación son características de la infección por VIH-1 y una de las principales causas de eventos graves no relacionados con el SIDA en personas infectadas bajo tratamiento antirretroviral (TAR). En este trabajo de tesis, presentamos evidencias de que el ADN citosólico (ADNc) producido durante el ciclo de replicación del VIH-1 en células T CD4+ infectadas aumenta la actividad del Factor Inducible por Hipoxia 1 alfa (HIF-1 $\alpha$ ) que, a su vez, promueve la replicación viral. Además, demostramos que la inducción de HIF-1 $\alpha$  promueve la liberación de vesículas extracelulares (VE) proinflamatorias. Estas VE fomentan la inflamación al inducir la secreción de interferón- $\gamma$  por parte de linfocitos T CD4+ y de IL-6 e IL-1 $\beta$  por macrófagos a través de una vía dependiente de HIF-1 $\alpha$ . Cabe resaltar que las VE obtenidas del plasma de individuos infectados con VIH-1 también inducen la actividad de HIF-1 $\alpha$  e inflamación en macrófagos. En conclusión, este estudio demuestra que HIF-1 $\alpha$  juega un papel crucial en la patogénesis del VIH-1 al promover la replicación viral y la liberación de VE que orquestan respuestas inflamatorias mediadas por linfocitos y macrófagos.

---

## Abstract

Chronic immune activation and inflammation are hallmarks of HIV-1 infection and a major cause of serious non-AIDS events in HIV-1-infected individuals on antiretroviral treatment (ART). Herein, we show that cytosolic double-stranded DNA (dsDNA) generated in infected CD4T cells during the HIV-1 replication cycle promotes the stabilization of the transcription factor hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), which in turn, enhances viral replication. Furthermore, we show that induction of HIF-1 $\alpha$  promotes the release of extracellular vesicles (EVs). These EVs foster inflammation by inducing the secretion of gamma interferon by bystander CD4+ T cells and secretion of interleukin 6 (IL-6) and IL-1 $\beta$  by bystander macrophages through an HIF-1 $\alpha$ -dependent pathway. Remarkably, EVs obtained from plasma samples from HIV-1-infected individuals also induced HIF-1 $\alpha$  activity and inflammation. Overall, this study demonstrates that HIF-1 $\alpha$  plays a crucial role in HIV-1 pathogenesis by promoting viral replication and the release of EVs that orchestrate lymphocyte- and macrophage mediated inflammatory responses.

---

## Introducción

### Virus de la inmunodeficiencia humana

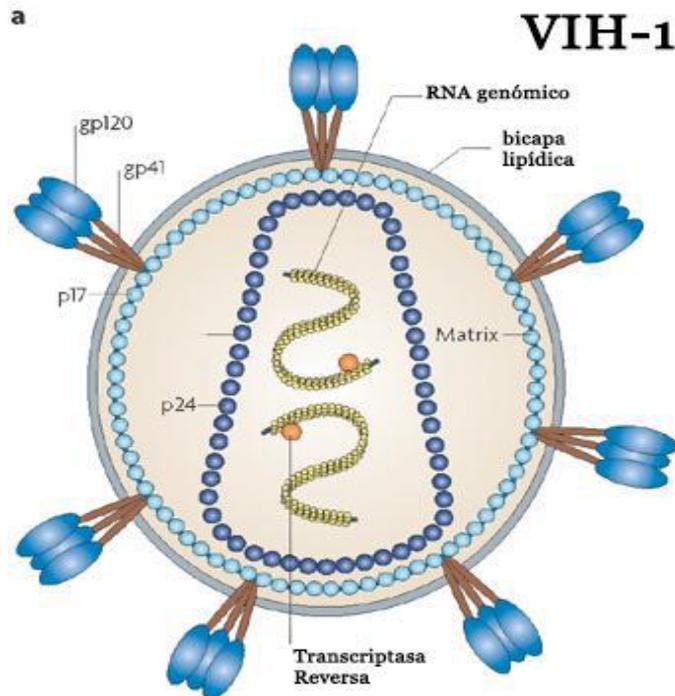
Se estima que aproximadamente un millón de personas mueren por año debido a enfermedades asociadas al Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirido (SIDA) y que 36,7 millones de personas se encuentran infectadas con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) [1]. Los primeros casos de SIDA se diagnosticaron en 1981 cuando el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta (CDC) notificó la aparición de casos de neumonía por *Pneumocystis jirovecii* (previamente *P. carinii*) y de una forma diseminada de sarcoma de Kaposi en jóvenes homosexuales masculinos [2, 3]. A pesar de no haber sido en un principio identificado el agente causante, pronto quedó claro que todos los pacientes sufrían una disminución progresiva de linfocitos T CD4+, y que, como resultado de ello, padecían enfermedades que normalmente eran controladas por el sistema inmune. Dos años más tarde, el trabajo de la Dra. Françoise Barré-Sinoussi y el Dr. Luc Montagnier [4] demostró la etiología viral de esta enfermedad, al haber aislado un virus que en aquel momento fue denominado Virus Asociado a Linfadenopatía (LAV, *Lymphadenopathy Associated Virus*). En paralelo, Robert Gallo aisló un retrovirus citopático con tropismo por células T al que denominó Virus Linfotrópico Humano Tipo III (HTLV-III, *Human T Lymphotropic Virus Type III*) [5, 6]. Posteriormente, Jay Levy [7] obtuvo un aislamiento viral a partir de células sanguíneas provenientes de un paciente con SIDA al cual denominó Virus Relacionado al SIDA (ARV, *AIDS Related Virus*). Estudios posteriores determinaron que los tres aislamientos correspondían al mismo agente viral [8]. En 1986, el Comité Internacional de Taxonomía Viral nombró a este agente Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH, *Human Immunodeficiency Virus*). En 1986, Clavel y colaboradores [9] describieron un tipo distinto de VIH, frecuentemente hallado en ciertas regiones de África Occidental, al que denominaron VIH-2 para distinguirlo del virus original. Los individuos infectados con VIH-2 también desarrollan SIDA, aunque con un período de latencia clínica más prolongado y menor morbilidad [10]. El VIH fue clasificado dentro de la familia *Retroviridae*, género *Lentivirus*, debido a que comparte con los demás retrovirus un genoma integrado por los tres genes clásicos: *gag*, *pol* y *env*.

En las 3 décadas transcurridas desde la descripción de los primeros casos de este síndrome, la pandemia de VIH/SIDA ha afectado a más de 60 millones de personas, convirtiéndose en una de las principales preocupaciones a nivel de salud mundial.

### **Características generales del VIH-1**

#### **Estructura**

La partícula viral madura presenta las características estructurales típicas de los retrovirus. El virión es una partícula esférica con un tamaño aproximado de 100 a 120nm de diámetro envuelta por una bicapa lipídica originada a partir de la membrana de la célula huésped. La membrana de la envoltura viral contiene las glicoproteínas gp41 (TM, transmembrana) y gp120 (SU, superficie) (Figura 1). La gp41 es una proteína transmembrana, mientras que la gp120 se encuentra relacionada a gp41 en la cara externa de la envoltura viral [11]. Ambas proteínas interactúan entre sí de manera no covalente formando trímeros. En asociación con la cara interna de la envoltura se encuentra la Matriz conformada por la proteína p17 (MA, Matriz). La Matriz a su vez contiene a la cápside viral, conformada por la proteína p24 (CA, Cápside). Dentro de la cápside se encuentra el genoma viral constituido por dos hebras de RNA monocatenario asociadas a las proteínas p7 (NC, nucleocápside) y p66 (TI, Transcriptasa inversa). A su vez, la cápside también contiene a las proteínas estructurales p10 (PR, Proteasa), p32 (IN, Integrasa), y las proteínas accesorias Nef, Vif y Vpr [12].



**Figura 1. Esquema de la partícula viral madura.**

El VIH-1 mide aproximadamente 100-120 nm de diámetro y está envuelto por una membrana plasmática derivada del huésped. Los complejos triméricos gp120-gp41 están insertados en la membrana. La glicoproteína transmembrana gp41 y la glicoproteína gp120 de la envoltura externa se asocian de manera no covalente. La cola citoplasmática de gp41 interactúa con la proteína de Matriz p17. La proteína de la cápside, p24, forma el núcleo en forma de cono, que contiene dos copias de ARN de cadena positiva del genoma del VIH-1 que están rodeadas por la proteína Nucleocápside (amarillo). La proteína de la Transcriptasa Inversa también se empaqueta en la partícula. (Adaptado de [13])

## Genoma

El genoma del VIH-1 consta de dos moléculas de ácido ribonucleico de cadena simple con polaridad positiva (ARNsc+), cada una de 9,2 kilobases (Kb). El mismo codifica para 3 genes comunes a todos los retrovirus (*gag*, *pol* y *env*) junto a otros 6 genes que codifican para proteínas reguladoras (*tat* y *rev*) y accesorias (*nef*, *vif*, *vpr* y *vpu*). Una vez integrado al genoma celular, el ADN proviral se encuentra flanqueado por repeticiones terminales largas (LTR, *Long Terminal Repeats*) generadas durante el proceso de transcripción inversa. Los LTR están estructuralmente

divididos en 3 regiones: U3, R y U5, y son los responsables de regular la expresión de los genes virales [12]. En la figura 2 se muestra la organización del genoma proviral y las proteínas que codifica.

### **Proteínas virales**

#### **Proteínas virales derivadas de *pol***

El gen *pol* codifica para las 3 enzimas presentes en todos los retrovirus: la Proteasa (PR), la Transcriptasa Inversa (TI) y la Integrasa (IN), las cuales derivan del procesamiento del precursor poliproteico Gag-Pol (p160). La TI cataliza la conversión del ARN genómico en ADN doble cadena (ADNdc) o ADN proviral, mientras que la IN cataliza la integración del ADN proviral en el genoma de la célula infectada. La PR actúa en las etapas tardías del ensamblaje y durante la brotación cliva a la poliproteína Gag (p55), permitiendo la maduración de la partícula viral [14].

#### **Proteínas virales derivadas de *gag***

Las proteínas estructurales codificadas por el gen *gag* de VIH-1 son generadas a partir del precursor poliproteico Gag (p55), el cual es miristilado postraduccionalmente. La multimerización de Gag ocurre en la membrana plasmática celular y es un paso central en el ensamblado viral. La PR viral se encuentra activa durante el ensamblado y cliva al precursor p55<sub>gag</sub> para generar las proteínas Matriz (MA), Nucleocápside (NC), Cápside (CA), Gag<sub>p6</sub> y dos espaciadores peptídicos p1 y p2. Estas proteínas se ensamblan para formar las distintas capas del virión maduro: MA permanece asociada con la membrana viral interna (Matriz viral) a través de su dominio N-terminal. La unión de MA a la membrana está mediada por la inserción de un grupo miristilado en la bicapa lipídica y por un segmento de residuos básicos que se unen a los fosfolípidos de la membrana celular. CA se ensambla formando una cápside cónica, y el dominio C-terminal de esta proteína interacciona con NC. Esta última envuelve al ARN genómico e interacciona con el mismo,

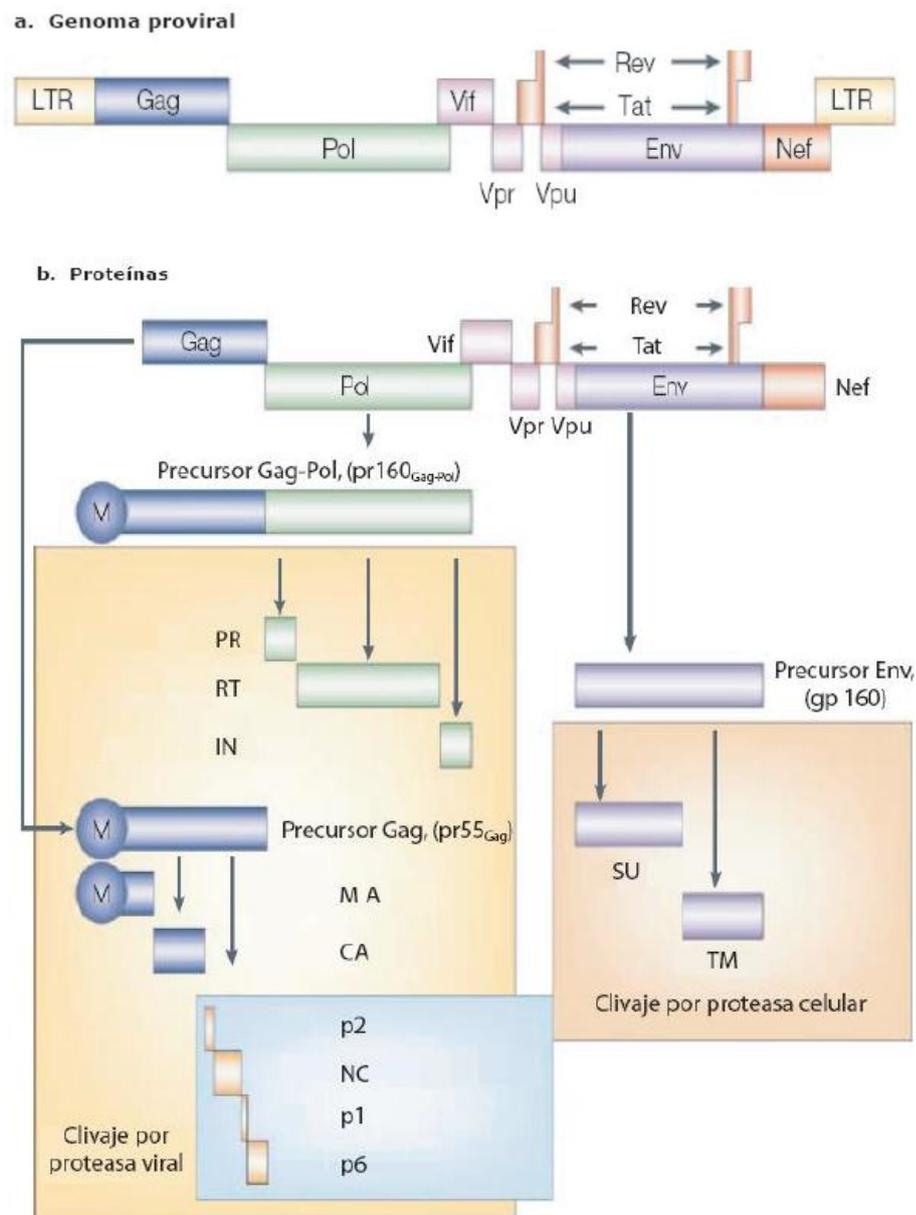
promoviendo la hibridación de las secuencias complementarias. Por último, Gag<sub>p6</sub> recluta la maquinaria celular necesaria para la brotación viral [15].

### **Proteínas virales derivadas de env**

La envoltura viral presenta glicoproteínas cuya función es mediar la adsorción y entrada a la célula blanco. Todos los retrovirus expresan las proteínas de envoltura, SU (gp120) y TM (gp41), que derivan de un precursor común (gp160) y poseen un alto grado de glicosilación. Como la mayoría de las proteínas celulares asociadas a membrana, su llegada a la membrana plasmática se realiza por la vía del retículo endoplasmático (RE)- aparato de Golgi. Los viriones adquieren su envoltura en la brotación y con ella las glicoproteínas [14].

### **Proteínas reguladoras y accesorias**

Además de las proteínas mencionadas, el genoma de VIH-1 codifica para 6 proteínas adicionales: Tat, Rev, Nef, Vif, Vpr y Vpu [16]. Las proteínas Tat y Rev son reguladoras de la transcripción viral. Tat incrementa la transcripción viral al unirse a la secuencia reguladora TAR (*Trans-Activation Responsive Region*) del LTR y la proteína Rev media la exportación de los ARNs virales desde el núcleo hacia el citoplasma a través de su unión a la secuencia reguladora RRE (*Rev Responsive Element*) presente en todos los transcritos virales de ARNm. El transporte de éstos al citoplasma es requerido para la expresión de las proteínas estructurales y producción de ARN genómico. Entre las proteínas accesorias se incluyen Nef, Vif, Vpu y Vpr. Brevemente, Vpu



**Figura 2. Genoma proviral y proteínas**

A) Genoma proviral de VIH-1 (9,2 Kb). Contiene marcos de lectura abiertos (ORFs, *open reading frames*) para 16 proteínas que son sintetizadas a partir de al menos 10 transcritos. B) Proteínas de VIH-1. (Adaptado de [15]).

(*Viral Protein U*) es una pequeña proteína de membrana que induce la degradación del receptor celular CD4, los complejos mayores de histocompatibilidad clase-I y II (MHC-I y II, *major histocompatibility complex class-I and II*) y el factor celular antiviral Bst-2 [16]. Las principales consecuencias de su acción son la reducción de posibilidad de re-infección (por degradación de

CD4), la alteración de los mecanismos de presentación antigénica, y la promoción de la producción y liberación de progenie viral de las células infectadas. Vif (*Virus Infectivity Factor*) es una proteína viral que contrarresta el efecto antirretroviral de la proteína celular APOBEC3G, promoviendo su degradación [16]. A su vez Nef (*Negative Factor*) interfiere con diversas vías de transducción de señales, modula la expresión en membrana del receptor celular CD4, así como de las moléculas del MHC-I y II [16]. Finalmente, Vpr (*Viral Protein R*) tiene múltiples actividades entre las cuales se encuentran: la importación del ADN proviral como un componente del complejo pre-integratorio, la detención del ciclo celular en la transición G2/M, regulación de la apoptosis y transactivación del promotor viral con el consecuente aumento de la replicación viral [16].

### **Ciclo de replicación viral**

#### **Adsorción y entrada**

La entrada del virus a la célula blanco es mediada por la interacción de las glicoproteínas de la superficie de la envoltura viral con dos moléculas en la membrana celular. El receptor es la molécula CD4 que interacciona con la glicoproteína SU, y el correceptor, perteneciente a la familia de los receptores de quimioquinas, interacciona con la glicoproteína TM [17]. Existe un número considerable de proteínas que pueden funcionar como correceptores para el VIH-1, siendo los más importantes los receptores de quimioquinas CCR5 y CXCR4 [18, 19]. Luego de la adsorción de la partícula viral a la superficie celular, se produce la fusión entre la envoltura viral y la membrana de la célula blanco [20]. Posteriormente se produce la liberación de la nucleocápside al citoplasma celular y el desnudamiento (Figura 3).

#### **Transcripción inversa**

Una vez que la nucleocápside viral es liberada al citoplasma, el siguiente paso del ciclo de replicación viral consiste en la transcripción inversa del genoma viral (Figura 3). Este proceso está

catalizado por la enzima viral TI, la cual convierte al genoma viral (ARN) en una molécula de ADN de doble cadena (ADNdc).

### **Importación del genoma viral al núcleo e integración**

Luego de la transcripción inversa, el ADN es translocado al núcleo como parte de un complejo ribonucleoproteico de pre-integración que incluye, además del ADNdc, a las proteínas virales IN, TI, MA y Vpr [21] (Figura 3). Al igual que otros lentivirus, VIH-1 tiene la capacidad de ingresar al núcleo de células que no se encuentran en proceso de división celular, a través de los poros nucleares. Sin embargo, el mecanismo de entrada al núcleo aún no se conoce con claridad [17]. Una vez que el complejo está localizado en el núcleo, la enzima viral IN cataliza la reacción de integración [22].

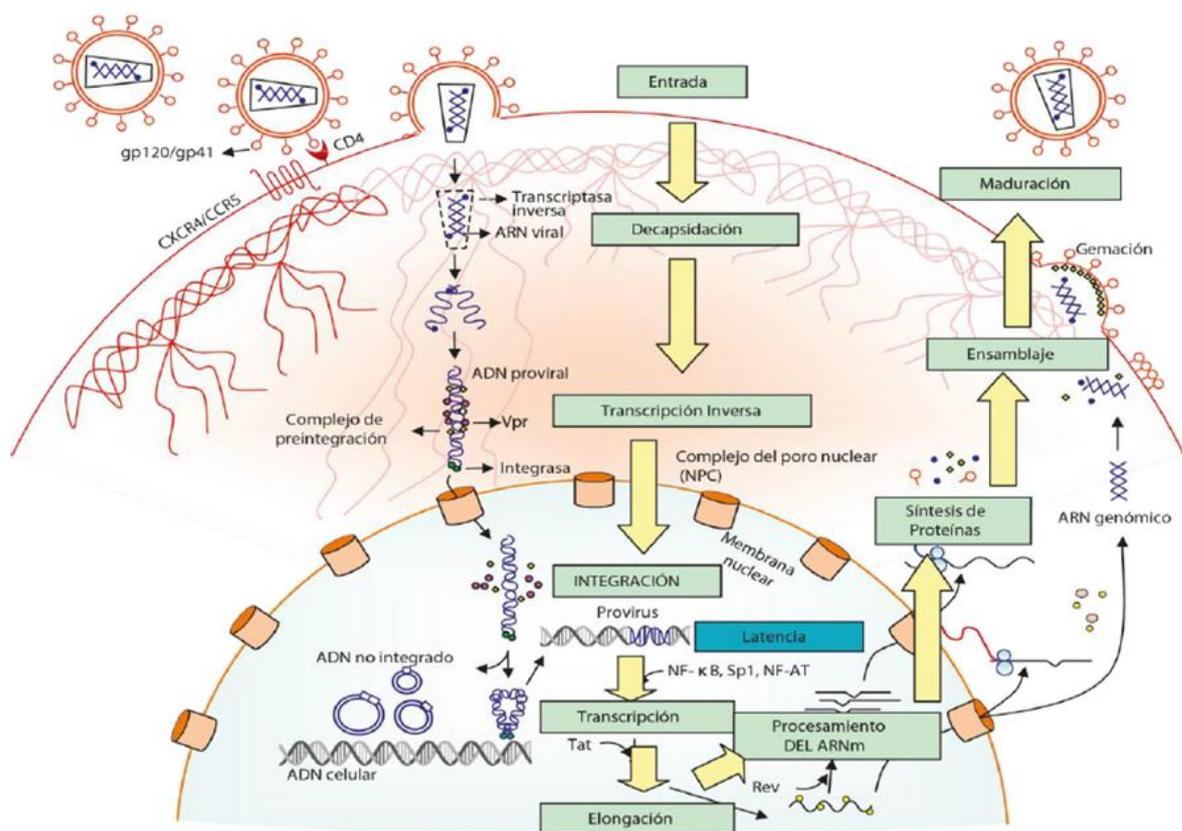
### **Transcripción y regulación post-transcripcional**

La transcripción de los genes virales a partir del provirus ocurre en dos etapas: la etapa temprana involucra la ARN polimerasa tipo II celular (ARNpol-II) y elementos en *cis* localizados en el promotor viral (LTR). La fase tardía involucra un paso de transcripción que se activa desde el LTR luego de la síntesis de la proteína viral Tat. Una vez que se expresa Tat, la transcripción a partir del LTR se incrementa por la unión de esta proteína activadora al elemento TAR (*transactivation response element*) [17]. Durante el proceso de transcripción, se generan 3 clases de ARNm a partir de transcritos de VIH-1: un ARNm de 9 Kb que no sufre *splicing* o proceso de corte y empalme, que codifica para Gag y Gag-Pol y conforma el genoma viral; un segundo ARNm de 4Kb que resulta de un *splicing* simple y que codifica para Vif, Vpr, Vpu y Env; y por último un ARNm de 2 Kb generado mediante *splicing* múltiple y que se traduce en Tat, Rev y Nef. [17](Figura 3).

### Ensamblado, maduración y brotación

El último paso del proceso de replicación viral consiste en generar nuevas partículas virales. Para ello, el ARN genómico (transcrito de 9 Kb que no exhibe *splicing*) es transportado a regiones específicas de la membrana plasmática donde se produce la brotación y encapsidado [22]. El ensamblado de la cápside comienza en la cara interna de la membrana plasmática celular promoviendo la multimerización de Gag dando lugar a la estructura esférica que encapsida al ARN genómico, asociado a la NC.

Durante el proceso de brotación, la PR viral cliva los precursores p55 y p160 en sus unidades elementales (Figura 3). En la etapa de maduración, la partícula viral cambia su morfología, adoptando la típica estructura esférica y con su cápside cónica ubicada en el centro de la misma.



**Figura 3. Esquema simplificado del ciclo de replicación del VIH-1.**

La figura ilustra los principales pasos en el ciclo de replicación del VIH-1. (Adaptado de [23]).

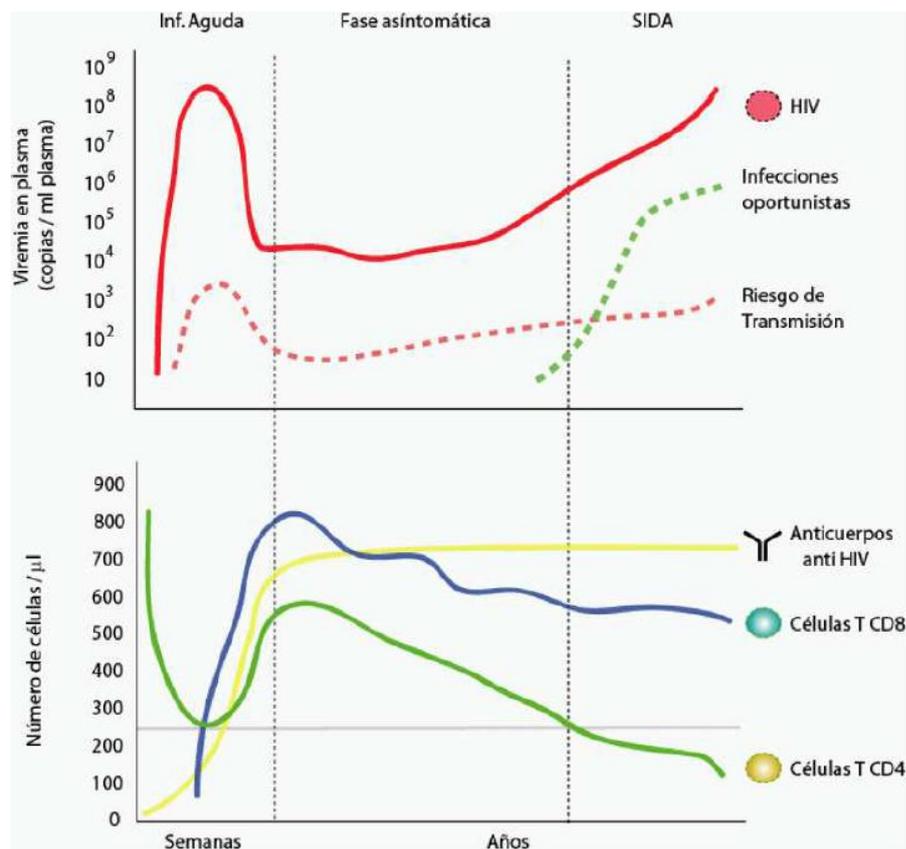
## Patogenia

El VIH es un lentivirus que se ha adaptado a infectar linfocitos T CD4+ humanos y como consecuencia del linfotropismo y la citopatogenicidad del virus, se produce una profunda inmunosupresión en el hospedador, debido tanto a la destrucción de linfocitos CD4+ como a distintos mecanismos de interferencia con el sistema inmunitario. Consecuentemente aumenta de manera considerable el riesgo a sufrir infecciones por gérmenes oportunistas y el desarrollo de tumores [23]. La disminución del número de linfocitos T CD4+ representa una de las consecuencias más importante de la infección por VIH-1. Sin embargo, las causas responsables de este fenómeno no son del todo conocidos. Entre los mecanismos que explican la disminución del número de linfocitos T CD4+, se encuentra la apoptosis inducida por componentes proteicos virales (gp120, Vpr y Tat) [24]. Asimismo, ha sido reportado que la infección abortiva de linfocitos T CD4+ induce el ensamblado del inflamosoma y la muerte por piroptosis [25].

## Curso natural de la infección

La transmisión a través de mucosas (genital o rectal) se inicia con la infección de un pequeño número de linfocitos T de memoria efectores CD4+CCR5+ [26, 27], macrófagos y células dendríticas ubicadas en la lámina propia [28]. Las variantes virales responsables de una nueva infección utilizan el correceptor CCR5, por lo que son denominadas variantes R5. Las células dendríticas residentes no son sólo sensibles a la infección sino que facilitan la diseminación viral [29]. La primera amplificación viral es modesta y ocurre en órganos linfáticos regionales (por ejemplo, nódulos linfáticos drenantes). A partir de allí, los linfocitos T infectados y los viriones libres pasan al torrente sanguíneo, permitiendo la colonización de otros órganos (tracto gastrointestinal, bazo, médula ósea) y la infección masiva de células susceptibles [30]. Esto resulta en un pico de viremia ( $10^6$  a  $10^7$  copias de ARN viral por ml de plasma) que puede coincidir temporalmente con la aparición de síntomas clínicos denominados en conjunto, Síndrome Retroviral Agudo y que incluyen fiebre, linfadenopatías, sudoración nocturna y artralgia, entre otros [31] (Figura 4). El descenso de la viremia y la remisión de los síntomas agudos son

atribuidos a la acción de linfocitos T citotóxicos CD8+ (CTLs, *cytotoxic T lymphocytes*) ya que el número de células T CD8+ específicos aumenta antes de que los anticuerpos neutralizantes puedan ser detectados (Figura 4) [32]. La replicación viral es un proceso dinámico que se mantiene activo a lo largo de toda la infección, incluso en las etapas asintomáticas. En individuos recientemente infectados (aproximadamente 10 a 21 días postinfección), se observa una fuerte disminución del número de células T CD4+CCR5+, activadas y de memoria, en tejidos linfoides asociados a mucosas (Figura 4) [33]. Esta población celular no se recupera con el tiempo, ni con la implementación de tratamiento antirretroviral de alta eficiencia o HAART (*Highly Active Antiretroviral Treatment*), lo que se contrapone a lo observado para las células T CD4+ circulantes en sangre periférica.



**Figura 4. Representación esquemática de la historia natural de la infección por VIH-1.**

Se describen las 3 fases que caracterizan el curso natural de la infección.

### **Latencia, reservorios y la búsqueda de la cura**

Desde los primeros días de la infección por VIH-1, una pequeña fracción de linfocitos T CD4+ de memoria infectados no concretará una infección productiva y regresará a un estado transcripcionalmente inactivo [34]. Este fenómeno por el cual se generan células de vida media larga con ADN proviral integrado se conoce como “Latencia post-integración” y genera el denominado “Reservorio viral” [35]. Este reservorio no puede ser eliminado por la terapia antirretroviral. En efecto, ante la interrupción del HAART el reservorio viral generado en la etapa de la primoinfección comienza a producir nuevas partículas virales, llevando a un rebote en la carga viral. Mientras exista en el individuo infectado un reservorio de ADN proviral capaz de llevar adelante una infección productiva, deberá mantenerse el HAART. Esta es la razón por la cual los pacientes VIH-1+ deben ser medicados de por vida. Los últimos años han estado marcados por un gran auge en la búsqueda de estrategias destinadas a eliminar definitivamente los reservorios virales, intentando conseguir una “cura esterilizante” [36, 37].

La calidad de vida de las personas infectadas ha mejorado drásticamente gracias a los avances en la terapia antirretroviral, prolongando la expectativa de vida de los pacientes, previniendo el desarrollo de enfermedades asociadas al SIDA y reduciendo sustancialmente el riesgo de transmisión del virus. Sin embargo, la probabilidad de padecer enfermedades no relacionadas con el SIDA, como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, neurológicas, renales y óseas, es mayor en individuos infectados con VIH-1 en comparación con individuos sanos [38]. Estas enfermedades están asociadas al hecho de que el tratamiento si bien controla la viremia, no restaura completamente el estado inmunológico de los pacientes infectados, los cuales presentan un estado de activación inmune e inflamación crónica.

Se han propuesto diversas causas que permitirían explicar la inflamación crónica y la activación inmune persistente en los pacientes VIH-1(+): (i) niveles excesivos de productos microbianos translocados, como consecuencia del deterioro del sistema inmune de mucosas (en particular el

intestinal) (ii) niveles excesivos de otros patógenos que causan infecciones crónicas, tales como el CMV y (iii) pérdida de respuestas inmunorreguladoras [39, 40].

La mucosa intestinal contiene una alta concentración de células T CD4+ que expresan CCR5 y son susceptibles al VIH-1. Durante la infección aguda, el virus se propaga rápidamente por todo el tejido linfoide asociado al intestino (GALT), lo que conduce directamente a la pérdida de células T CD4+ e indirectamente a lesiones epiteliales [26, 41, 42]. La pérdida de la integridad de la mucosa da como resultado una exposición sostenida dentro de la mucosa intestinal a productos microbianos proinflamatorios. Con la progresión de la enfermedad, la translocación de productos microbianos y sus efectos inflamatorios se vuelven sistémicos [33, 43-45]. La terapia antirretroviral efectiva puede atemperar este proceso, particularmente si se inicia tempranamente, pero el efecto es incompleto [46-48]. Asimismo, el daño en los órganos linfáticos (principalmente por fibrosis) también es revertido parcialmente con la terapia, lo que resulta en un estado de inmunodeficiencia indefinida, contribuyendo al estado de inflamación crónica [40]. Finalmente, como consecuencia de la activación inmune persistente y la inflamación, los linfocitos T CD4+ y monocitos presentan alteraciones de su funcionalidad, las cuales van acompañadas de un incremento de la glicólisis aeróbica [49, 50]. La caracterización metabólica de células T CD4+ en el contexto de la infección por el VIH-1 es parte de la temática que aborda nuestro grupo de trabajo y será uno de los objetos de estudio en la presente tesis doctoral, por lo que a continuación se procederá a describir la relación existente entre el metabolismo de glucosa y la función efectora celular en el marco de un concepto nuevo y en constante avance denominado inmunometabolismo.

## Inmunometabolismo: rol de HIF-1 $\alpha$

### Programa metabólico en Linfocitos T

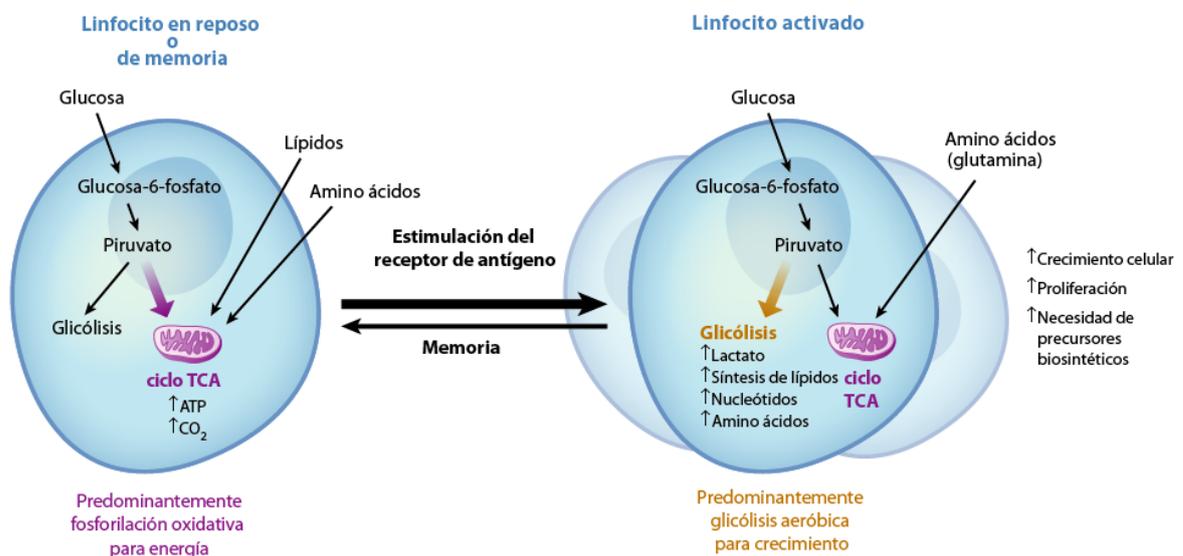
La funcionalidad de las células del sistema inmune, incluyendo a los linfocitos T, se encuentra íntimamente relacionada con el metabolismo celular. La creciente evidencia de que función inmune y metabolismo son procesos indisolubles ha dado origen al concepto de inmunometabolismo.

El estudio del metabolismo celular y la manera en que el mismo se modifica según el estado funcional de las células se inició hace más de medio siglo, gracias a las observaciones de Otto Warburg [51]. Los conocimientos bioquímicos de la época sostenían que la glucosa que ingresaba a la célula era convertida en piruvato para luego ser oxidado mediante la fosforilación oxidativa. En cambio, si la célula no disponía de oxígeno, el piruvato era convertido en ácido láctico, mediante glicólisis anaeróbica, para generar ATP (adenosina trifosfato). Sin embargo, Warburg observó que las células cancerígenas metabolizaban la glucosa mediante glicólisis, incluso en presencia de suficiente oxígeno para llevar a cabo la fosforilación oxidativa [52]. Estos hallazgos fueron controversiales, ya que se creía que las células convertirían piruvato en ácido láctico solamente en ausencia de oxígeno o cuando las mitocondrias estuviesen dañadas. Este fenómeno, observado en células que metabolizaban glucosa mediante glicólisis, incluso en presencia de oxígeno, se denominó glicólisis aeróbica.

Warburg también fue uno de los primeros en estudiar el metabolismo leucocitario y descubrió que lo observado en células cancerígenas, también ocurría en los leucocitos activados: los leucocitos en reposo utilizaban principalmente un metabolismo oxidativo aeróbico, mientras que la estimulación conducía a la glicólisis aeróbica como programa metabólico primario [53].

La similitud metabólica entre células cancerosas y linfocitos activados no es casual. Tanto las células cancerosas como los linfocitos estimulados activan un programa de rápido crecimiento y proliferación, por lo tanto, comparten una demanda metabólica que debe priorizar la rápida biosíntesis de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos por sobre la producción eficiente de ATP. La glicólisis es una secuencia de diez reacciones catalizadas por las enzimas Hexoquinasa, Glucosa-

6-P isomerasa, Fosfofructoquinasa, Aldolasa, Triosa fosfato isomerasa, Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, entre otras. La glucosa metabolizada es convertida en metabolitos intermediarios (fructosa, galactosa, etc) siendo el ácido láctico el producto final. Si bien la glicólisis aeróbica es menos eficiente que la fosforilación oxidativa en términos de generación de energía,(ya que la primera produce solamente 2 moléculas de ATP por molécula de glucosa, contra 32 moléculas de ATP producto de la segunda) el cambio de fosforilación oxidativa a glicólisis se adapta perfectamente a la demanda metabólica que sufren las células en proliferación, ya que mientras el metabolismo oxidativo canaliza el piruvato derivado de la glucosa a la mitocondria para su oxidación hasta dióxido de carbono, la glicólisis aeróbica produce intermediarios metabólicos que pueden usarse como precursores para la síntesis de biomoléculas. Por ejemplo, el fosfato de la dihidroxiacetona (DHAP) es fuente de glicerol que se combina con ácidos grasos para formar lípidos. Por el contrario, la fosforilación oxidativa consume lípidos y aminoácidos para su oxidación [54](Figura 5).



**Figura 5. En células T el programa metabólico utilizado coincide con su demanda funcional.**

Las células T en reposo oxidan el piruvato derivado de glucosa, junto con los lípidos y aminoácidos para producir eficientemente ATP (energía) requerido para la vigilancia inmune. Tras la activación, la oxidación de los lípidos está regulada negativamente, y la glicólisis aeróbica aumenta, con el fin de producir precursores biosintéticos necesarios para el crecimiento y la proliferación celular. Al final de una respuesta inmune, las células que sobreviven para

convertirse en células T de memoria vuelven a la oxidación de lípidos con una mayor capacidad para la generación de energía eficiente. (Adaptado de [55])

Por lo tanto, el balance entre glicólisis y el metabolismo mitocondrial es esencial para permitir que la célula lleve a cabo sus funciones. En este sentido, ha sido demostrado que los distintos perfiles de linfocitos T CD4<sup>+</sup> muestran diferencias metabólicas que pueden reflejar necesidades funcionales específicas [55]. Por ejemplo, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> Th1 y Th17 poseen una actividad glicolítica aumentada. Por el contrario, en los linfocitos Treg predomina la oxidación de lípidos.

Estudios recientes explican cómo es regulado el metabolismo de las células T, y cómo los cambios en el metabolismo afectan la función celular. En particular, las células T en reposo parecen oxidar piruvato junto con lípidos y aminoácidos. Tras la activación, la glicólisis aumenta junto con la oxidación de glutamina. Sin embargo, la oxidación de lípidos disminuye drásticamente y se favorece la síntesis lipídica. Al finalizar la respuesta inmune, la mayoría de las células mueren. Sin embargo, las células que sobreviven para convertirse en células de memoria vuelven a la oxidación de lípidos y a generar energía eficientemente. Estos procesos son transcripcional y postranscripcionalmente controlados. Existen varios reguladores del metabolismo celular, los cuales pueden promover (por ejemplo, mTORC1) o inhibir (por ejemplo, AMPK) la glicólisis aeróbica.

El Factor Inducible por Hipoxia-1 $\alpha$  (*Hypoxia-Inducible Factor 1 alpha*; HIF-1 $\alpha$ ) es un factor de transcripción que desempeña un papel central en la coordinación del metabolismo y la función celular. Si bien, la actividad de HIF-1 $\alpha$  suele ser desencadenada en respuesta a hipoxia, en las células inmunes, HIF-1 $\alpha$  también puede ser activado en condiciones no hipóxicas. Independientemente de la vía de activación, HIF-1 $\alpha$  induce la transcripción de genes que participan en la glicólisis. Esta regulación metabólica es crítica para las funciones efectoras de las células T [56-58]. Cabe destacar que HIF-1 $\alpha$  también puede favorecer directamente la diferenciación de células Th17 a través de la activación transcripcional de ROR $\gamma$ t e inhibiendo el desarrollo de linfocitos Treg uniéndose y promoviendo la degradación de Foxp3 [59].

En la presente tesis doctoral se evaluará la relevancia de este factor de transcripción y el papel que juega en la inmunopatogenia del VIH-1, por lo que a continuación se realizará una descripción más profunda.

### **Factor Inducible por Hipoxia 1 alfa**

Los factores de transcripción inducible por hipoxia (HIF) controlan la respuesta celular a la hipoxia y coordinan un programa transcripcional que asegura la adaptación funcional, metabólica y vascular óptima ante la escasez de O<sub>2</sub>, [60], siendo reguladores clave en varios escenarios, tanto fisiológicos como patológicos. Existen varios reportes que demuestran su participación en procesos tumorales, regulando el crecimiento tumoral, la angiogénesis, y el desarrollo de metástasis [61]. También juega un papel crítico en eventos de isquemia y en la mantención del ciclo celular en células madres hematopoyéticas, entre otros [61, 62]. Si bien al principio las funciones descritas para HIF-1 $\alpha$  estaban asociadas a la disponibilidad de oxígeno, actualmente se sabe que varios estímulos en condiciones de normoxia promueven la actividad de HIF (especialmente en células del sistema inmune), con la consecuente transcripción de los genes que regula.

HIF forma un complejo heterodimérico, que actúa como regulador transcripcional de genes cuyos promotores contienen la secuencia consenso 5'-RCGTG-3', denominada elemento de respuesta a hipoxia (*hypoxia response element*, HRE) [63-65]. El complejo regulador está compuesto por HIF-1 $\beta$ , que se expresa constitutivamente, y una de las isoformas de HIF- $\alpha$ : HIF-1 $\alpha$  o HIF-2 $\alpha$ . Las proteínas adicionales se unen al complejo como coactivadores y contribuyen en la modulación de la transcripción de los genes *diana* [66]. Entre estos genes están las enzimas que controlan los cambios metabólicos necesarios para la adaptación celular óptima a la hipoxia, es decir aquellas enzimas necesarias para llevar a cabo la glicólisis (la Hexoquinasa, la Piruvato deshidrogenasa, la Lactado deshidrogenasa, etc) [60, 61].

Es importante destacar que HIF-1 $\alpha$  se expresa prácticamente en todas las poblaciones celulares, incluyendo aquellas del sistema inmune innato y adaptativo, tales como macrófagos

[67], neutrófilos [68], células dendríticas [69] y linfocitos [70]. El papel que juega HIF-1 $\alpha$  en estas células será discutido más adelante.

### **Vías de estabilización del factor inducible por hipoxia**

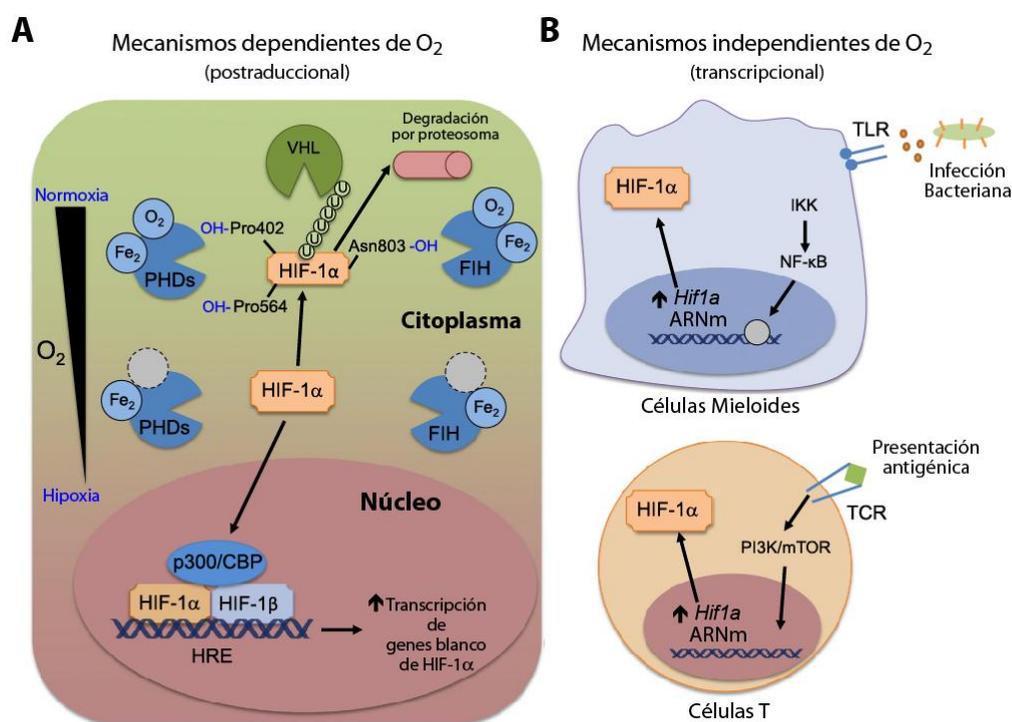
La estabilidad de la subunidad HIF-1 $\alpha$  está regulada principalmente de manera postranscripcional por la disponibilidad de oxígeno a través de las enzimas prolihidroxilasas (PHD) dependientes de hierro. Ante la disponibilidad de oxígeno, las PHD están activas e hidroxilan a HIF-1 $\alpha$ , marcándolo para la degradación proteasomal en un proceso mediado por la ubiquitinación dependiente de la proteína supresora de tumores de Von Hippel-Lindau (VHL). Si la concentración de oxígeno disminuye, las PHD se vuelven inactivas, ya que el O<sub>2</sub> actúa como cofactor de esta enzima, lo que resulta en la acumulación intracelular de HIF-1 $\alpha$ . El factor inhibidor de HIF (FIH) proporciona otro mecanismo de regulación mediante la hidroxilación de residuos de asparaginilo en HIF-1 $\alpha$  bloqueando su interacción con coactivadores como P300, necesarios para formar un complejo transcripcional eficaz [61].

En el contexto inflamatorio, una disminución en la disponibilidad de O<sub>2</sub>, consecuencia del daño vascular y alteraciones en el flujo sanguíneo local provocan una disminución de la hidroxilación de HIF-1 $\alpha$  dependiente de PHD y FIH, lo que permite su estabilización y translocación nuclear (Figura 6A; [61]). Asimismo, la estabilización de HIF-1 $\alpha$  en células inmunes puede ocurrir independientemente de la disponibilidad de oxígeno (Figura 6B). Esto último se discutirá en profundidad a continuación.

### **HIF-1 $\alpha$ e inmunidad**

Como se ha mencionado previamente, un microambiente inflamatorio (caracterizado por una baja disponibilidad de O<sub>2</sub>) puede regular y promover la expresión de HIF-1 $\alpha$  en células mieloides, lo que impulsa un cambio metabólico modulando el consumo de oxígeno y la producción de energía. Estos cambios son necesario para la eliminación de patógenos o células tumorales. Los

macrófagos M1 (los cuales poseen un perfil pro-inflamatorio) cambian su metabolismo aumentando la tasa de glicólisis aeróbica, y utilizando la fosforilación oxidativa en niveles basales, mientras que los macrófagos antiinflamatorios M2 (inducidos por IL-4) tienen una actividad glicolítica moderada pero una mayor actividad oxidativa (Figura 7C, [71]). Estudios previos en ratones, demuestran que la delección de HIF-1 $\alpha$ , específicamente en células mieloides, generan una respuesta inflamatoria defectuosa, asociada a una menor tasa de glicólisis y una menor

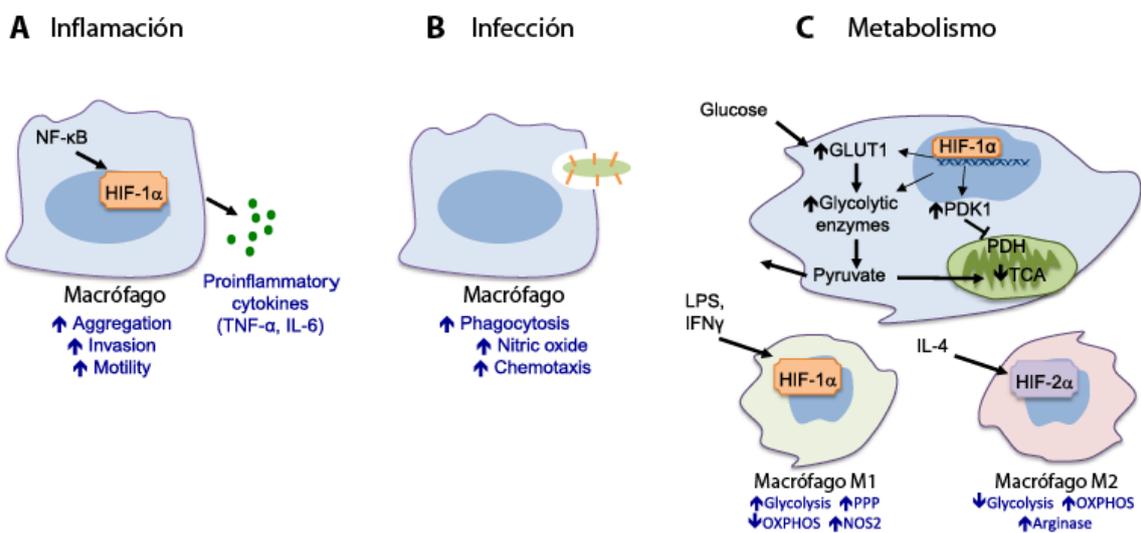


**Figura 6. Mecanismos de estabilización de HIF-1 $\alpha$  en células inmunes**

(A) dependiente de O<sub>2</sub>. Cuando hay oxígeno disponible, HIF-1 $\alpha$  es hidroxilado por PHD, enzimas que dependen del oxígeno y cofactores de hierro. Cuando HIF-1 $\alpha$  es prolil-hidroxilado, se poliubiquitina por VHL, marcándolo para la degradación por proteosoma. FIH hidroxila HIF-1 $\alpha$  en la asparagina 803, que no conduce a la poliubiquitinación, sino que bloquea las interacciones entre HIF-1 $\alpha$  y p300/CBP, un miembro del complejo HIF que actúa como coactivador de la transcripción de los genes blanco. Cuando la tensión de oxígeno disminuye, La actividad de PHD y FIH está inhibida, lo que conduce a la acumulación de HIF-1 $\alpha$ , la translocación nuclear, la heterodimerización con HIF-1 $\beta$  y el reclutamiento de p300/CBP. El complejo transcripcional HIF se une a los elementos de respuesta a la hipoxia (HRE) para controlar la expresión de los genes blanco. (B) O<sub>2</sub> independiente. Los productos bacterianos son reconocidos por TLR expresados en células mieloides, señalizando a través de NF- $\kappa$ B para aumentar la transcripción de *Hif1a*. De manera similar, la activación del TCR tras la presentación del antígeno en linfocitos T conduce a una mayor

transcripción de *Hif1a* y la acumulación de la proteína HIF-1 $\alpha$ , incluso en presencia de oxígeno. Aunque se desconoce el mecanismo de inducción del ARNm de *Hif1a*, la activación de PI3K y mTOR parece estar implicada en la inducción de HIF-1 $\alpha$  mediada por el TCR. (Adaptado de [57])

generación de energía debido a la ausencia de HIF-1 $\alpha$ . Como resultado la agregación, invasión y motilidad de los macrófagos se vieron disminuidas, así como la actividad bactericida de estas células [67]. Notablemente, HIF-1 $\alpha$  en células mieloides contribuye a la inflamación en el tejido sinovial de la artritis reumatoide donde el microambiente es hipóxico [72]. De hecho, la relación entre las respuestas hipóxica e inflamatoria está estrechamente controladas (Figura 7). Sin embargo, también se ha documentado que la expresión de HIF-1 $\alpha$  es aumentada en macrófagos infectados con bacterias, incluso en condiciones de normoxia, regulando la capacidad fagocítica y microbicida de esta célula inmune. (Figura 6 B; [73]).



**Figura 7. HIF-1 $\alpha$  e inmunidad**

(A) Inflamación. HIF-1 $\alpha$  y NF- $\kappa$ B regulan las funciones inflamatorias esenciales en las células mieloides. HIF-1 $\alpha$  aumenta la agregación, invasión y motilidad de los macrófagos e impulsa la expresión de citoquinas proinflamatorias. (B) Infección. HIF-1 $\alpha$  promueve la eliminación de bacterias fagocitadas por macrófagos y favorece la actividad antibacteriana a través de la producción de proteasas, la liberación de óxido nítrico (NO) y TNF- $\alpha$ . (C) Metabolismo. HIF-1 $\alpha$  en las células mieloides aumenta la transcripción de enzimas glicolíticas, lo que resulta en un aumento del consumo de glucosa y la tasa de glicólisis. Es importante destacar que la entrada de piruvato en el ciclo del ácido cítrico (TCA) se

inhibe y es convertido en lactato, que es liberado en el compartimiento extracelular. Esta adaptación metabólica da como resultado una disminución del consumo de  $O_2$  al limitar la tasa de fosforilación oxidativa (OXPHOS). Los macrófagos polarizados M1 y M2 muestran diferentes preferencias metabólicas: mientras que los macrófagos M1 dependen de la glicólisis como fuente de energía, los macrófagos M2 tienen un metabolismo dependiente de OXPHOS. (Adaptado de [57])

Si bien los mecanismos que promueven la expresión y actividad de HIF-1 $\alpha$  ante distintas infecciones bacteriana no son del todo conocidos, se han reportado varios trabajos donde se describen algunos de estos mecanismos. Por ejemplo, se ha descrito que los sideróforos enterobacterianos, que son agentes quelantes de hierro de alta afinidad, pueden conducir a la estabilización de HIF-1 $\alpha$  al limitar la disponibilidad de hierro para la hidroxilación mediada por PHD [74]. A su vez, el lipopolisacárido (LPS), un importante componente de la membrana celular de bacterias Gram negativas, induce la acumulación de proteína HIF-1 $\alpha$  en macrófagos a través del aumento de su expresión transcripcional y traduccional, actuando independientemente de la estabilización inducida por hipoxia [75]. Por otro lado, el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- $\kappa$ B), un actor clave en la regulación de la respuesta inmune a la infección, también es requerido para la expresión transcripcional del ARNm de HIF-1 $\alpha$  inducida por bacterias en macrófagos [76].

Como fue mencionado, HIF-1 $\alpha$  juega un papel fundamental no solamente en la inmunidad innata, sino también en la inmunidad adaptativa. Las células inmunes adaptativas también pueden estabilizar HIF-1 $\alpha$  a través de mecanismos independientes del oxígeno (Figura 6B). La activación del receptor de células T (TCR) induce la acumulación sustancial del ARNm y la proteína de HIF-1 $\alpha$ , especialmente en el linaje de linfocitos proinflamatorio Th17, por un mecanismo dependiente de STAT3, donde la IL-6 y el factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) potencian la expresión del ARNm de HIF-1 $\alpha$  [56, 59, 77-79]. Por el contrario, la estimulación de las células T CD4+ diferenciadas con citoquinas que promueven otros perfiles mostró aumentos mínimos en el ARNm o la proteína de HIF-1 $\alpha$  tras la activación [56, 59]. Las células T CD8+ también estabilizan rápidamente las proteínas HIF-1 $\alpha$  tras la estimulación del TCR *in vitro* en condiciones de normoxia

[80-82]. Por lo tanto, HIF-1 $\alpha$  cumple un rol clave en la integración de señales mediadas por receptores como el TCR y citoquinas, participando en la diferenciación del linaje de células T CD4+, independientemente de la disponibilidad de oxígeno. De forma similar a los macrófagos, la producción de especies reactivas del oxígeno (*reactive oxygen species*, ROS) por las células T activadas [83] puede constituir otro mecanismo de inducción de HIF-1 $\alpha$ . Las especies reactivas de oxígeno pueden conducir a un aumento de la transcripción y la función de HIF-1 $\alpha$  activando su promotor [84] o regulando la función de las hidroxilasas, en especial de la asparaginil hidroxilasa FIH [85].

### **HIF-1 $\alpha$ e infecciones virales**

Diversos virus tienen la capacidad de inducir la actividad de HIF-1 $\alpha$ , favoreciendo al patógeno en lugar de al huésped. En particular, ciertos virus han desarrollado mecanismos para estabilizar HIF-1 $\alpha$  ejerciendo un efecto antiapoptótico que promueve la supervivencia de la célula infectada. Asimismo, la proteína HBx del virus de la hepatitis B aumenta la transactivación de HIF-1 $\alpha$  mejorando su asociación con la proteína de unión al elemento de unión a CREB [86], promoviendo la expresión de genes asociados a angiogénesis en hepatocitos de ratones transgénicos que expresan HBx. El antígeno nuclear asociado a latencia (LANA) del Herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi (KSHV) aumenta la expresión proteica de HIF y su actividad transcripcional en la línea celular PEL (células de linfoma B), siendo necesario para el inicio de la replicación viral en condiciones hipóxicas [87]. Otro mecanismo responsable del aumento de la concentración de HIF-1 $\alpha$ , en células epiteliales, fue descrito para la oncoproteína LMP1 del virus de Epstein-Barr (EBV), la cual aumenta la degradación proteasomal de PHD1 y PHD3 que normalmente marcan HIF-1 $\alpha$  para su degradación [88].

Si bien HIF-1 $\alpha$  es conocido por regular la expresión de genes celulares, también se ha demostrado que su actividad es necesaria para la transcripción génica de algunos virus. En células de la glía, tanto la infección por VIH-1 como por el virus John Cunningham (*John*

*Cunningham virus*, JCV) poliomavirus, HIF-1 $\alpha$  estimula directamente la transcripción de los genes virales al unirse al LTR del VIH-1 [89] o al promotor temprano del JCV poliomavirus [90]. En particular, Deshmane y colaboradores han demostrado que Vpr es la proteína viral del VIH-1 responsable de aumentar la expresión de HIF-1 $\alpha$  mediante la generación de especies reactivas del O<sub>2</sub>. Sin embargo, si el VIH-1 tiene la capacidad de aumentar la expresión y/o actividad de este factor de transcripción no ha sido evaluado en linfocitos T CD4 (el principal blanco celular del VIH-1).

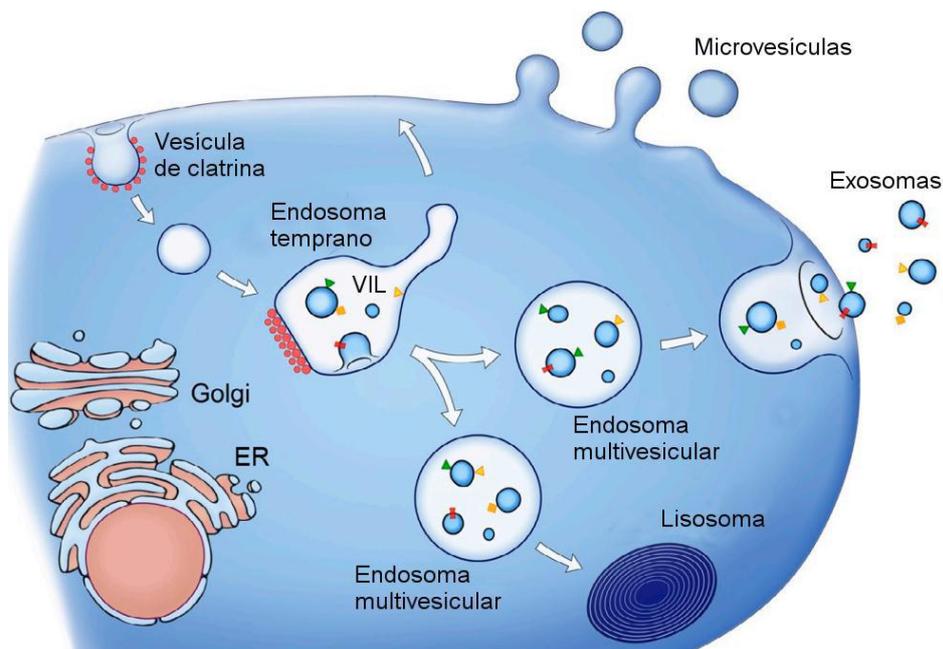
Cabe destacar que, en los trabajos mencionados, son proteínas virales las que regulan la expresión o actividad de HIF-1 $\alpha$ . Sin embargo, existen pocos trabajos que indiquen que un patrón molecular asociado a patógeno (PAMP) viral sea responsable de dicha inducción.

## Vesículas Extracelulares

La comunicación intercelular es un sello distintivo de los organismos multicelulares. Durante muchos años fue considerado que este fenómeno era fundamentalmente mediado por el contacto directo entre células o por moléculas secretadas al espacio extracelular, las cuales luego estimulan receptores en la célula diana modificando su función (por ejemplo, hormonas o citoquinas). Un conjunto importante de trabajos realizados a lo largo de las últimas dos décadas han descrito un tercer mecanismo de comunicación que implica la transferencia de vesículas extracelulares (VEs) entre una célula productora y una célula *diana* [91]. Las VEs consisten en estructuras envueltas en una bicapa lipídica, que ya sea en su interior o en la superficie, contienen proteínas, lípidos, ARNm, micro ARNs y ADN. Estas moléculas pueden estimular receptores en la superficie de la célula blanco o, alternativamente, ser liberadas en el interior de la célula luego de la fusión entre la membrana de la VE y la membrana celular. Desde su descubrimiento, se ha comprobado la presencia de VEs en todos los fluidos biológicos analizados [92].

Si bien existen diversos tipos de VEs, diferenciables principalmente por su ruta de biogénesis y su tamaño, los exosomas y las microvesículas representan los tipos de vesículas más estudiados a la fecha. Los exosomas se caracterizan por medir entre 50 y 150 nm de diámetro y por tener un origen endosomal. Durante la maduración de los endosomas, la membrana limitante de los mismos se invagina hacia la luz, dando origen a una gran cantidad de vesículas intraluminales (VILs) [93]. Por este motivo, los endosomas tardíos son conocidos también como endosomas multivesiculares (EMVs). El transporte de EMVs a la membrana plasmática requiere de su interacción con los microtúbulos y los filamentos de actina. Las proteínas de la familia RabGTPasa regulan estos procesos. Trabajos previos de nuestro grupo demostraron que Rab2b, Rab5a, Rab9a, Rab27a y Rab27b están involucradas [94].

Las microvesículas, en cambio, poseen un diámetro que puede ir de los 100 a los 1000 nm y brotan directamente de la membrana plasmática celular (Figura 8). Las proteínas que regulan la biogénesis de las microvesículas son menos conocidas.



**Figura 8. Rutas de liberación de Exosomas y Microvesículas.**

Las microvesículas brotan directamente de la membrana plasmática. Por el contrario, los exosomas se generan por brotación hacia el interior de los endosomas tempranos y/o multivesiculares y se liberan por fusión de estos últimos con la membrana plasmática. Otro destino de los EMVs es la fusión con los lisosomas resultando en la degradación del contenido (Adaptado de [91])

### Vesículas Extracelulares e inmunidad

Casi todos los tipos celulares, incluyendo células del sistema inmunológico, pueden secretar vesículas extracelulares, cuyo contenido van a impactar en la funcionalidad de las células blanco. Esta propiedad de transmitir “señales” podría ser necesaria para expandir la respuesta inflamatoria. En este sentido, reportes previos muestran que las vesículas extracelulares pueden transferir antígenos, así como también señales que pueden promover la activación de las células receptoras. Por ejemplo, macrófagos que han sido infectados con *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* o *Toxoplasma gondii* liberan vesículas extracelulares que portan antígenos microbianos, así como patrones moleculares asociados a patógenos que promueven una respuesta inflamatoria dependiente del receptor de tipo Toll activado [95]. Por otro lado, las vesículas extracelulares derivadas de mastocitos, las cuales contienen cantidades relativamente altas de la proteína de choque térmico 60 (HSP60) y HSPA8

(también conocida como HSC70), promueven la maduración de células dendríticas (CDs) en ratones [96].

Las interleuquinas son mensajeros químicos solubles, secretados principalmente por leucocitos, para transmitir “señales” a la célula receptora, por lo que no es extraño pensar que estas moléculas utilicen a las VEs como “transportadores” de las mismas. Por ejemplo, la interleuquina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), es una citoquina que carece de la secuencia líder necesaria para la secreción por la vía clásica y es liberada dentro de las vesículas extracelulares secretadas por las CDs y los macrófagos [97, 98]. A diferencia de la IL-1 $\beta$ , otras citoquinas se transportan en la superficie de la vesícula extracelular. Asimismo, miembros de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF), incluido el ligando CD95 (CD95L, también conocido como FASL), el ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL, también conocido como TNFSF10) y el ligando CD40 (CD40L, también conocido como CD154), se transportan en la membrana de las VEs [99]. Las VEs también pueden participar en la función citotóxica de los linfocitos T citotóxicos (CTLs), de células asesinas naturales (NK) y de CD a través de la liberación polarizada de vesículas extracelulares portadoras de CD95L (FASL) [100-103]. Además, las vesículas extracelulares parecen tener un papel en la mediación de enfermedades inflamatorias y autoinmunes; por ejemplo, las vesículas extracelulares en el suero y que derivan de los fibroblastos sinoviales de pacientes con artritis reumatoide tienen niveles más altos de una forma de TNF unida a la membrana, que es un blanco clave en el tratamiento de la artritis reumatoide [104]. Sorprendentemente, estas vesículas extracelulares TNF-positivas hacen que las células T activadas sean resistentes a la apoptosis, lo que podría contribuir a la patogénesis mediada por células T de la artritis reumatoide [105].

### **Vesículas Extracelulares y Virus**

Las VEs cumplen varias funciones en las infecciones virales: i) pueden comunicar células infectadas con células no infectadas, ii) pueden transportar componentes virales o viriones enteros iii) pueden evitar el reconocimiento inmunológico de virus o componentes virales, iiiii) pueden promover una respuesta antiviral [106, 107] [108, 109]. En el caso del VIH-1, la proteína Nef es

transportada en VE circulantes de individuos infectados [110, 111], permitiendo que esta proteína viral cumpla sus funciones biológicas en células no infectadas sin ser expuesta al sistema inmunológico.

Las VEs también pueden afectar la replicación viral. Sin embargo, lo pueden hacer en dos sentidos opuestos [112-114]. Por un lado, las VEs pueden promover la replicación viral [114, 115] o, por el contrario, pueden restringirla al desencadenar la respuesta inmunitaria del huésped. Por ejemplo, células infectadas por el virus del herpes simplex tipo 1 (HSV-1) liberan vesículas extracelulares que transportan factores virales y componentes celulares (como el estimulador de genes de interferón; STING) a células no infectadas, activando la producción de interferón de tipo I e impactando negativamente en la infección de HSV-1 [116].

Debido a su tamaño y composición bioquímica, los virus y las VEs tienen propiedades biofísicas similares. Como fue mencionado, los exosomas tienen un diámetro menor a 100nm y las microvesículas poseen un diámetro de 100-1.000nm. De forma similar, el diámetro de los virus varía desde los 30nm (poliovirus), 120-140nm (herpesvirus) y 200-300nm (poxvirus) [113]. Esta similitud aumenta la dificultad para obtener poblaciones puras de VEs que no estén contaminadas con virus y viceversa.

Otra similitud que comparten virus y VE, es su vía de liberación. Los virus, al igual que las VE, se liberan a través de la membrana plasmática o a través de la vía de los MVB. Por ejemplo, algunos retrovirus, como el VIH-1, se ensamblan en la cara interna de la membrana plasmática, mientras que otros retrovirus, como el virus del mono Mason-Pfizer (MPMV), se ensamblan primero en el citoplasma antes de su transporte a la superficie celular [117, 118]. Algunos virus no están envueltos y no requieren una envoltura para ser infectivos, sin embargo, se pueden incorporar a VE para su liberación. Recientemente se ha demostrado que el virus de la hepatitis A (HAV) se secreta dentro de VE que pueden transportarse potencialmente a células no infectadas [119]. Otros enterovirus pueden empaquetar hasta ~ 20 partículas en una sola vesícula sin matar a la célula huésped [120].

## Vesículas Extracelulares y VIH-1

Dado que vesículas y virus comparten características fisicoquímicas similares, se ha propuesto que durante el ensamblado y la liberación del VIH-1, éste usurpa la maquinaria celular de secreción de exosomas explotando esta vía para la biogénesis de partículas virales [112, 121]. Esta idea es conocida como la “Hipótesis del Exosoma de Troya”, propuesta por el Dr. Stephen Gould [112] en el 2003. Llamativamente, ambas partículas presentan un tamaño aproximado de 100 nm y una composición peculiar con un alto enriquecimiento de las tetraspaninas CD9, CD63, CD81 y CD82, colesterol y esfingolípidos. La secreción de exosomas se produce tras la fusión de la membrana limitante de los endosomas tardíos/cuerpos multivesiculares (*multivesicular body*, MVB) con la membrana plasmática, dando como resultado la liberación extracelular de sus vesículas intraluminales [122]. Paralelamente, estudios de microscopía electrónica demostraron que, en macrófagos, VIH-1 brota en compartimientos intracelulares enriquecidos en CD63 y MHC-II que, al fusionarse con la membrana plasmática, liberan de partículas virales infectivas [123]. Si bien en linfocitos T CD4+ el ensamblado del VIH-1 ocurre en la membrana plasmática, este proceso se lleva a cabo en estructuras conocidas como “dominios similares a endosomas” (*endosome-like domains* en inglés), cuya composición se asemeja a la de los endosomas tardíos [124]. Nuestro grupo de trabajo ha identificado el papel clave de Rab27a en el ensamblado viral. Esta RabGTPasa regula el tráfico de Gag hacia la membrana promoviendo la formación de partículas virales en linfocitos T CD4 y en macrófagos [125].

Cabe destacar que el VIH-1 no solamente altera el tráfico vesicular para la producción de partículas virales, sino también, puede alterar las características de las VEs liberadas por la célula infectada. Se ha mencionado previamente en este manuscrito que VE provenientes de células infectadas con VIH-1 pueden transportar la proteína viral Nef, permitiendo ejercer su función biológica en células no infectadas. También se ha reportado que estas vesículas pueden contener miARNs que influyen en la interacción entre el VIH-1 y el sistema inmunológico. El ARN-TAR derivado del LTR de VIH-1 fue encontrado en forma de pre-miARN en exosomas derivados de células infectadas, y se demostró que estos ARNs podrían inhibir la apoptosis de las células

receptoras al disminuir la expresión de proteínas pro-apoptóticas Bim y Cdk9 [126]. El mismo grupo demostró más tarde que el ARN de TAR en exosomas de células infectadas por VIH-1 fue capaz de modular la expresión génica de citoquinas proinflamatorias, como IL-6 y TNF- $\beta$ , en macrófagos primarios humanos, [127]. Sin embargo, no existen estudios exhaustivos respecto el origen, regulación y funcionalidad de VE en el contexto de la infección y patogenia del VIH-1. La necesidad de comprender con más detalle estos fenómenos motiva su estudio en la presente tesis doctoral.

### Hipótesis y Objetivos

#### **Hipótesis:**

Nuestra hipótesis de trabajo postula que la infección de linfocitos T CD4+ con VIH-1 induce un incremento de la actividad del factor de transcripción HIF-1 $\alpha$ . La activación de la vía de HIF-1 $\alpha$  impacta tanto en la replicación viral como en el metabolismo y la funcionalidad inmune de los linfocitos. Por lo tanto, hipotetizamos que HIF-1 $\alpha$  cumple un papel destacado en la patogénesis de la infección con VIH-1.

#### **Objetivos:**

El objetivo general de este trabajo de tesis es identificar nuevos actores moleculares implicados en la replicación viral y en el desarrollo de inflamación sistémica crónica durante la infección con VIH-1. Para desarrollar el objetivo general se postulan los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar el nivel de actividad de HIF-1 $\alpha$  en linfocitos T CD4+ infectados con VIH-1.
2. Evaluar si la actividad de HIF-1 $\alpha$  tiene influencia en la replicación del VIH-1 en linfocitos T CD4+.
3. Estudiar el papel que desempeña HIF-1 $\alpha$  en la promoción de inflamación durante la infección con VIH-1.

# Materiales y métodos

### Líneas celulares

Las líneas celulares utilizadas fueron: HEK 293T, GHOST X4/ R5, HeLa y Jurkat. Las líneas HEK 293T y GHOST son células de origen epitelial derivadas de riñón humano y osteosarcoma humano, respectivamente. La línea HEK293T presenta una elevada susceptibilidad a la transfección. Las células de la línea GHOST X4/R5 están transducidas establemente con el vector retroviral MV7neo-T4 y co-transfectadas de manera estable con los constructos LTRVIH-2/GFP y CMV IE, que dirigen la expresión de GFP dependiente de VIH-1 y la resistencia a higromicina, respectivamente. Estas células expresan de manera estable el receptor CD4 y los co-receptores CXCR4 y CCR5 que son mantenidos mediante selección con antibióticos [128]. Por lo tanto, la infección viral de estas células puede evaluarse mediante la cuantificación por citometría de flujo (*Flourescence Activated Cell Sorting*, FACS) de células que expresen la proteína fluorescente verde (*Green Fluorescent Protein*, GFP). La línea celular HeLa corresponde a células epiteliales humanas provenientes de un carcinoma cervical. La línea celular Jurkat son células linfoblásticas T CD4+ humanas derivadas de una leucemia linfoide aguda. En este estudio fue utilizado el clon E6.1. Todas las líneas celulares fueron incubadas a 37°C, en atmósfera húmeda y con 5% CO<sub>2</sub>. Las células HEK 293T, HeLa y GHOST X4/ R5 se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle, Gibco® Life Technologies™) suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB, Gibco), 2mM L-glutamina (Gibco), 100U/ml penicilina (Gibco) y 100µg/ml estreptomina (Gibco). El medio de cultivo de las células GHOST contiene además 100µg/ml higromicina (Sigma), 500 µg/ml G418 (Sigma) y 1 µg/ml puromicina (Sigma). La línea Jurkat fue cultivada en RPMI (Gibco) complementado con 10% suero fetal bovino (SFB, Gibco), 2mM L-glutamina (Gibco), 100U/ml penicilina (Gibco) y 100µg/ml estreptomina (Gibco). Todas las líneas usadas en este trabajo fueron obtenidas a través del NIH *AIDS Research and Reference Reagent Program*.

### **Líneas celulares reporteras de la actividad de HIF-1 $\alpha$**

Para evaluar la actividad transcripcional de HIF-1 $\alpha$ , se generaron líneas celulares reporteras estables utilizando el vector 5HRE-hCMV-d2EGFP (HRE-GFP) a través de la electroporación o transfección de células Jurkat, HeLa y HEK 293T. Las células Jurkat ( $5 \times 10^6$  células) se electroporaron con 20  $\mu$ g de ADN a 0,26 V/960  $\mu$ F utilizando el sistema de electroporación Gene Pulser II (Bio-Rad). Luego de la electroporación, las células se resuspendieron en medio RPMI1640 suplementado con 10% de SFB (Gibco) y tres días después, se añadió G418 para la selección de las células que incorporaron el plásmido (Jurkat HRE-GFP). Las células HeLa y HEK 293T se transfectaron con 1  $\mu$ g/ml del vector HRE-GFP utilizando el agente de transfección X-TremeGene (Roche). Las células se cultivaron en DMEM suplementado con 10% de FCS. Tres días después se añadió G418 al cultivo de células HeLa para la selección de células que incorporaron el plásmido. Para seleccionar células que expresan cantidades detectables del reportero GFP, las células se estimularon con CoCl<sub>2</sub> (100  $\mu$ M) durante 24h y las células GFP positivas fueron separadas utilizando un citómetro “*sorter*” BD FACSAria para obtener células Jurkat, HeLa y 293T HRE-GFP.

### **Células primarias y condiciones de cultivo**

Se aislaron células T CD4+ primarias de a partir de sangre de donantes sanos anónimos mediante selección negativa usando el kit de aislamiento de células T CD4+ (MiltenyiBiotec) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células se estimularon con perlas anti-CD3/CD28/CD2 (MiltenyiBiotec) durante dos días en medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 10% de SFB (Gibco) y 10 U/ml de rIL-2. Para los estudios realizados en macrófagos se aislaron monocitos a partir de sangre de donantes sanos anónimos mediante centrifugación diferencial en gradiente de densidad utilizando Ficoll (GE Healthcare) y posteriormente Percoll (GE Healthcare). Los monocitos aislados se plaquearon durante 2h sin suero y posteriormente fueron diferenciados a macrófagos mediante el agregado de 50 ng/ml de GM-CSF (*Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*, MiltenyiBiotec) al medio de cultivo

por 4 días. Para inhibir los distintos pasos del ciclo de replicación viral, se utilizó Enfuvirtide 90mg/ml (Roche), Efavirenz 100nM (Sigma), Nevirapina 1 $\mu$ M (Sigma), Raltegravir 30 $\mu$ M (Sigma) y AZT 10 $\mu$ M (Sigma). Para inhibir la actividad de HIF-1 $\alpha$ , las células se cultivaron con Equinomicina 1nM (Cayman Chemical). Para inhibir la producción de ROS mitocondrial, las células se cultivaron con MitoTEMPO (500  $\mu$ M, Sigma). Los experimentos de *Transwell* se realizaron con membranas con poros de 0,45  $\mu$ M (JetBiofil). Se cocultivaron células CD4+ primarias (5x10<sup>5</sup> células/ml) sin infectar o infectadas con VIH-1 $\Delta$ IN, colocadas en la cámara superior, con células Jurkat HRE-GFP (1,5x10<sup>5</sup> células/ml) colocadas en la cámara inferior. Para inhibir la degradación de HIF-1 $\alpha$  y promover su actividad, se añadió cloruro de cobalto (CoCl<sub>2</sub> 100  $\mu$ M) a los cultivos en los tiempos indicados.

### Plásmidos

Para la producción de *stocks* virales se utilizaron los siguientes plásmidos:

NL4-3-IRES-eGFP, codifica el genoma de VIH-1 completo de la cepa NL4-3 (una cepa de laboratorio utilizada frecuentemente en estudios funcionales de VIH-1) en el vector pBR322. pBR-NL4-3  $\Delta$ Vpu y pBR-NL4-3  $\Delta$ Vpr, fueron amablemente proporcionados por el Dr. F Kirchhoff (Instituto de Virología Molecular, Centro Médico de la Universidad de Ulm, Ulm, Alemania) [129]. pBR- NL4-3  $\Delta$ NEF y pBR- NL4-3  $\Delta$ ENV fueron proporcionados amablemente por el Dr. O. Schwartz (Institut Pasteur, Paris, Francia). pNLX.Luc.R- $\Delta$ IN fue amablemente proporcionado por el Dr. Engelman (D ana-Farber Cancer Institute, Estados Unidos). Aislamientos primarios de VIH-1 pCH077 (CXCR4-trópico), pREJO.c y pTRJO.c (CCR5-trópico) y VIH-1 clones MN (CXCR4-trópico), BaL (CCR5-trópico) y RF (dual-trópico) se obtuvieron del NIH *AIDS Research and Reference Reagent Program*.

Para el estudio de la actividad transcripcional de HIF-1 $\alpha$  se utilizó el plásmido reportero 5HRE-hCMV-d2EGFP (HRE/GFP), el cual fue amablemente proporcionado por Martin Brown y Thomas Foster (Addgene plasmid # 46926).

Los plásmidos para la preparación de lentivirus que expresaban el *small hairpin RNA* (shRNA) o ARN interferente (ARNi) de interés fueron obtenidos de SIGMA (Misión shRNA).

### **Preparación de stocks de virus**

Los stocks virales se produjeron por transfección del vector correspondiente (100 ng/pocillo) en células HEK 293T ( $2,5 \times 10^3$  células por pocillo en placas de 96 pocillos) usando el reactivo de transfección X-treme Gen (Roche). Cuando fuera indicado, las partículas virales fueron pseudotipadas mediante la cotransfección de pVSV-G (10 ng/pocillo). El sobrenadante se recolectó a las 48 y 72h luego de la transfección, se clarificó por centrifugación a 1500 g durante 10 minutos y se congeló a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Alternativamente, se generaron stocks de VIH-1 a partir de líneas celulares infectadas H9 (MN y cepas de RF) y PM1 (BaL), las cuales fueron concentradas y almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **Infección con VIH-1**

Células Jurkat, Jurkat HRE-GFP ( $3 \times 10^4/0,1\text{ml}$ ) o linfocitos T CD4+ purificados ( $1 \times 10^5/0,1\text{ml}$ ) se incubaron (2h) o se espirocularon (2200rpm, 90min,  $37^{\circ}\text{C}$ ) con los stocks virales correspondientes (50ng p24/ml (baja MOI) o 200ng p24/ml (alta MOI)).

Células GHOST (20.000células/pocillo) se incubaron durante dos horas con VIH-1 NL4-3 (30ng), VIH-1 $\Delta$ IN (30 ng) y VEs purificadas de células T CD4 + infectadas con VIH-1  $\Delta$ IN. Después de 24h, el porcentaje de células positivas para GFP se analizó mediante FACS.

Células Jurkat-HRE GFP fueron incubadas con VIH-1 MN o VIH-1 RF a una concentración máxima de 500ng p24/ml y con diluciones seriadas 1:2. La cepa de VIH-1 BaL fue utilizada a una concentración máxima de 250 p24ng/ml y con diluciones seriales 1:2. Virus y células fueron incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 4-6 horas. Las células fueron centrifugadas dos veces a 400 xg durante 5 minutos y lavadas con PBS.

### Detección semicuantitativa de ADN viral

Se determinó la generación de ADN viral en cultivos infectados 8h con VIH-1wt y con VIH-1ΔIN mediante PCR convencional. El ADN se extrajo utilizando el High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras de ADN se sometieron a 30 rondas de amplificación por PCR con cebadores diseñados para amplificar productos intermedios y tardíos de la transcripción inversa. Las secuencias de los cebadores utilizados se describen en la siguiente tabla:

**Tabla 1.** Cebadores utilizados para PCR de productos de la transcripción inversa del VIH-1.

Producto	Cebador	Secuencia (5'-3')
Intermedio	U3-U5 fw	ACACACAAGGCTACTTCCGTGA
	U3-U5 rev	CTGCTAGAGATTTTCCACACTGAC
Tardío	R-Gag fw	GGTCTCTCTGGTTAGACCAGA
	R-Gag rev	ATACTGACGCTCTCGACCCAT

Los productos de PCR se separaron en gel de agarosa al 1% y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio.

### Producción de partículas lentivirales para el silenciamiento de la expresión génica y producción de partículas similar virus.

Para silenciar la expresión de los genes estudiados en el presente trabajo se produjeron partículas lentivirales capaces de inducir la expresión de ARN interferente (ARNi) en la célula transducida. Brevemente, se sembraron  $2,5 \times 10^3$  HEK 293T en una placa de 96 pocillos de fondo plano. 24h más tarde, las células se transfectaron con 100ng de pCMV-dR8.9, 100ng de pLKO.1 que codifica el ARNi indicado y 10 ng de pCMV-VSV-G por pocillo, utilizando el reactivo de transfección X-treme GENE HP DNA (Roche), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Para generar partículas similar virus (*Virus Like Particles*, VLP) las células se transfectaron con 100ng de pCMV-dR8.9 y 10ng de pCMV-VSV-G por pocillo. El medio de cultivo fue reemplazado a

las 24hs posterior a la transfección. Los sobrenadantes que contenían partículas lentivirales fueron recogidos a las 48 y 72hs después de la transfección. Los restos celulares fueron eliminados por centrifugación, y finalmente los stocks fueron alicuotados y almacenados a -80°C.

### **Transducción lentiviral y silenciamiento génico de líneas celulares**

Para silenciar la expresión génica en células T CD4+ primarias, Jurkat o HeLa, se transdujeron un total de  $3 \times 10^4$  células con vectores lentivirales mediante espinoculación (2200 rpm, 90 min, 37°C) en presencia de 8 µg/ml de bromuro de hexadimetrina (polybrene, Sigma). 48hs más tarde, las células transducidas se seleccionaron mediante la adición de 3 µg/ml de puromicina.

### **Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa en tiempo real (*Real Time-quantitative PCR, RT qPCR*)**

Para cuantificar la expresión transcripcional de los genes estudiados se aisló ARN total a partir de los cultivos celulares indicados utilizando RNeasyPlus Mini Kit (Quiagen). Posteriormente se procedió con la transcripción inversa de 1µg del ARN obtenido utilizando la transcriptasa inversa del virus Moloney de leucemia murina (M-MLV *Reverse Transcriptase*. Invitrogen, Life technologies). Para cada reacción de PCR se utilizó 1µl del volumen total de ADNc obtenido (20µl). La reacción de PCR fue llevada a cabo usando *SYBR green* (Applied Biosystems) en el termociclador de tiempo real STEP ONE PLUS; Applied Biosystems. Los valores de corte de ciclo (Ct) se normalizaron respecto a los valores de Ct del gen “*housekeeping*” β-actina. Los cebadores utilizados fueron los siguientes:

**Tabla 2.** Cebadores utilizados para PCR cuantitativa en tiempo real

Gen	Cebador	Secuencia (5'-3')
Actina	$\beta$ -Actina Fw	AGGCATCCTCACCTGAAGT
	$\beta$ -Actina Rev	GCGTACAGGGATAGCACAGC
Hexoquinasa-1	HK1 Fw	TTGGCTGGAGATGGAAAATCACAC
	HK1 Rev	CACACGATTTTGTGGCATTGA
HIF-1 $\alpha$	HIF Fw	TTACAGCAGCCAGACGATCAT
	HIF Rev	ATTGTCTTTTGCTCCATTCCA
cGas	cGas Fw	AAGAAGAAACATGGCGGCTAT
	cGas Rev	CCCAGGTCTTTGCGGTCCC
IFI16	IFI16 Fw	GCCCAGTGATAGTGAAGGTAC
	IFI16 rev	AGAACTGTGTCTGTGTAGCCA
STING	STING Fw	GTTATCAGGCACCCACAGT
	STING rev	GATATCTGCGGCTGATCCTG

### Ensayo de captación de glucosa

Para evaluar niveles de captación de glucosa en cultivos infectados y no infectados se utilizaron los análogos fluorescentes de glucosa, 6-N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il)amino)-6 desoxiglucosa (6-NBDG) (Invitrogen) o 2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il)Amino)-2-Deoxyglucose (2-NBDG) (Cayman chemical). Los ensayos fueron realizados en células T CD4 +, que fueron tratadas durante 30 min con 6-NBDG o 2-NBDG a 37°C en oscuridad, se lavaron con PBS 1X y se analizaron dentro de los 15min luego de la tinción en un citómetro FACSCanto (BD). Cuando fuera indicado, se determinó la concentración de glucosa en el medio de cultivo celular usando el GlucCell™ Glucose Monitoring System de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

### **Actividad de lactato deshidrogenasa**

Para evaluar la actividad de la enzima LDH utilizamos el kit de ensayo de citotoxicidad LDH de Pierce (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se lisaron las células y se midió la reducción dependiente de LDH de la sal de Tetrazolium a Formazan rojo. La lectura se realizó a 490 nm usando un espectrofotómetro de placa.

### **Medición de acidificación extracelular**

Se cuantificó el pH del sobrenadante de células infectadas y no infectadas para obtener una medida indirecta de glicólisis aeróbica. Al 2<sup>do</sup> día post-infección se procedió a la cuantificación de la acidez de los medios de cultivos utilizando un medidor de pH Jenco 6173.

### **Cuantificación de ROS mitocondrial**

Para determinar los niveles de ROS mitocondrial producido por células infectadas y no infectadas, los cultivos fueron teñidos con la sonda específica MitoSOX (5 $\mu$ M, Thermo) durante 10 minutos a 37 ° C en oscuridad. Antes de la adquisición por citometría de flujo, las células se lavaron tres veces con PBS. Las células se adquirieron en un citómetro FACSCanto (BD) y se analizaron usando el software FACSDiva (BD).

### **Estimulación con ácidos nucleicos**

Para evaluar el efecto del ADN doble cadena sobre la actividad de HIF-1 $\alpha$  en las líneas reporteras mencionadas previamente se procedió a la incorporación citosólica del ADN sintético de doble cadena, la cual posee la secuencia repetitiva poli(dA-dT) (Invivogen; 1mg/ml) mediante transfección de HeLa-HRE (7x10<sup>4</sup> células / pocillo en placas de 24 pocillos) y células HEK 293T-HRE usando el reactivo X-Treme Gene HP (Roche).

### **Cuantificación de citoquinas en sobrenadantes celulares**

Las citoquinas IL-2, IL-10, IL-4, IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y IL-17A se cuantificaron simultáneamente, en sobrenadantes de cultivo celular mediante citometría de flujo usando el kit CBA humano Th1 / Th2 / Th17 (BD Biosciences, San Jose, CA, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. La adquisición se realizó con un citómetro de flujo FACSCanto (BD Biosciences, San Jose, CA, EE. UU.) y las muestras se analizaron usando el software FCAP Array v3.0 (Soft Flow Inc., Pecs, Hungría). Cuando se indicara, IFN- $\gamma$ , IL -12, IL-10, IL1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 en sobrenadante de cultivo celular se cuantificaron mediante ELISA de acuerdo con las instrucciones del fabricante (BD Biosciences).

### **Anticuerpos**

Se usaron los siguientes anticuerpos: anti-p24 producido en ratón marcado con FITC y marcado con PE (KC57-FITC o KC57-PE; Beckman Coulter), anti-ratón-Alexa 594 (Jackson Immunoresearch); anti-conejo-HRP (Jackson Immunoresearch); anti-ratón-HRP (Jackson Immunoresearch) anticuerpo anti Glut-1-APC humano (clon MAb1418 (sistemas R&D, EE. UU.)), anti-HIF-1 $\alpha$ -PE producido en ratón (clon 241812; sistemas R&D, EE. UU.), anti CD81 humano producido en ratón (clon J5-81; BD Bioscience), anti-CD9 humano producido en ratón (clon M-L13 ; BD Bioscience), anti-CD63 humano producido en ratón (clon H5C6; BD Bioscience), anti-Calnexina producido en conejo (Abcam) .

### **Marcación de proteínas de superficie e intracelular y citometría de flujo**

Para la tinción de marcadores de superficie las células fueron lavadas una vez en PBS seguido de una incubación durante 30 minutos a 4°C con el anticuerpo correspondiente. Previo a la adquisición por citometría de flujo, las células fueron lavadas dos veces con PBS. Para la tinción intracitoplasmática y nuclear de HIF-1 $\alpha$ , las células se fijaron con PFA al 4%, se lavaron y se

permeabilizaron con metanol durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se lavaron con PBS y se incubaron con el anticuerpo conjugado a PE (R&D) durante 45 minutos a temperatura ambiente en PBS-0,5% de albumina de suero bovino (*Bovine Serum Albumin*, BSA). Las células se adquirieron en un citómetro FACSCanto (BD) y se analizaron usando el *software* FACSDiva (BD).

### **Microscopía de fluorescencia**

Para la visualización de células por microscopía de fluorescencia un total de  $10^5$  células se sembraron en cubreobjetos de vidrio recubiertos con poli-L-lisina durante 30 min, y fueron fijadas en paraformaldehído al 4%. Para eliminar la autofluorescencia emitida por el paraformaldehído se incubaron los preparados con glicina 10mM durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego los preparados fueron lavados con PBS y se continuó con la permeabilización utilizando metanol frío durante 7 minutos. Luego de dos lavados con PBS se incubaron las células con el anticuerpo anti-HIF-1 $\alpha$  (BD) durante 45 min. Luego las células fueron lavadas con PBS y posteriormente incubadas con anticuerpos secundarios de burro anti-ratón marcados con Alexa Flour 594 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.). Los cubreobjetos montados con DAPI Fluoromount-G (SouthernBiotech) se examinaron con un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse Ti-S L100 utilizando un objetivo de inmersión en aceite Plan Acmecromat 60x1,42 NA. Las imágenes se analizaron utilizando el *software* NIS-Element.

### **Inmunotransferencia (*Western blot*)**

La detección de proteínas de extractos celulares se realizó utilizando *buffer* RIPA (Tritón X-100 al 1%, SDS al 0,1%, Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM y desoxicolato de sodio al 0,5%) complementado con un cóctel de antiproteasas (Roche), para la lisis celular. Se eliminaron los núcleos por centrifugación a 15.000g durante 5 min. Se separaron cantidades iguales de extractos de proteína en 4-12% de SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de transferencia de fluoruro

de polivinilideno (Thermo Fisher Scientific) en condiciones no reductoras. Las transferencias se revelaron usando SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific).

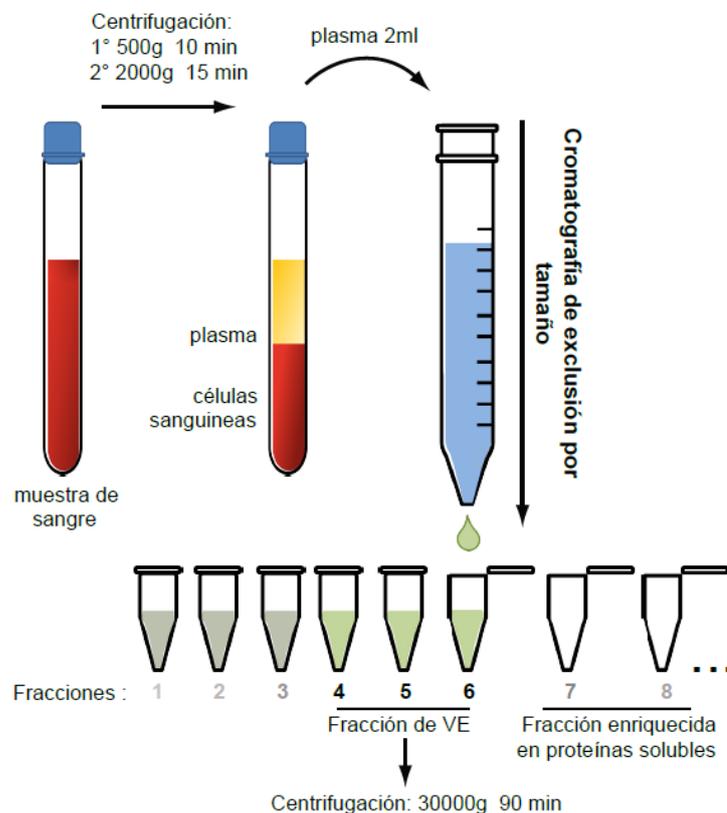
### **Vesículas extracelulares (VE)**

Las células utilizadas para producir VE fueron cultivadas en medio 10% SFB libre de vesículas y expuestas a VE durante 48h. Para obtener medio de cultivo libre de VE se preparó medio RPMI o DMEM suplementado con 30%SFB (3X) y se centrifugó durante 18hs a 100.000g. El pellet generado fue descartado y el sobrenadante libre de VE fue filtrado con filtros de 0,2 $\mu$ M. Las células vivas y muertas, así como los restos celulares, fueron eliminados mediante sucesivas centrifugaciones a 300 g durante 10 min y 2.000 g durante 10 min. Después de cada centrifugación, el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo mientras que los *pellets* generados fueron descartados. Las VE fueron purificadas por centrifugación a 30.000g durante 1,5h y lavadas con 1ml de PBS centrifugando nuevamente a 30.000g durante 1,5 h. Finalmente el *pellet* obtenido fue resuspendido en 50 $\mu$ l de PBS 1X.

### **Aislamiento de VE del plasma humano**

Se realizó el aislamiento de VE a partir del plasma humano siguiendo el protocolo publicado por Boing y colaboradores [130] con algunas modificaciones. Brevemente, se recogió sangre completa extraída por venopunción en tubos vacutainer (BD). Se obtuvo plasma rico en plaquetas (PRP) por centrifugación a 300g por 10 minutos. El PRP se complementó con 200nM de PGI<sub>2</sub> para evitar la activación plaquetaria y se centrifugó a 600 g, 10 por minutos para obtener plasma libre de células. Se cargaron 2ml de plasma en una columna de Cromatografía de Exclusión por Tamaño (*Size-exclusion chromatography*, SEC). La construcción de la columna fue realizada utilizando una resina de sefarosa CL-2B (GE Healthcare) y como soportes se utilizaron cartuchos vacíos de 12ml con discos (*frits*) hidrofóbicos de 20mm (Applied Separations). Esta metodología permite separar moléculas “pequeñas” (por ejemplo, proteínas solubles) de grandes complejos moleculares (por ejemplo, agregados proteicos o vesículas extracelulares) en función de su tamaño. La resina crea

una matriz porosa, la cual retiene en sus poros a las moléculas pequeñas (retrasando su elusión), permitiendo el paso de las moléculas de mayor tamaño en primer lugar. Doce fracciones (1ml cada una) se eluyeron usando 0,9% de NaCl-0,38% de citrato sódico (Figura 9). Cada fracción se analizó para detectar la presencia de los marcadores de VE CD63 y CD9 y los componentes solubles IgG y fibrinógeno por inmunotransferencia. Además, la concentración de albúmina se analizó mediante turbidimetría usando un kit comercial (Wiener, Albúmina AA). Finalmente, las fracciones que contenían VE fueron combinadas, concentradas por ultracentrifugación, resuspendidas en PBS y usadas en el mismo día para estudios funcionales.



**Figura 9.** Diagrama esquemático del procedimiento para aislar VE del plasma humano mediante cromatografía de exclusión por tamaño.

### Participantes del Estudio

Los pacientes infectados con VIH-1 fueron reclutados en la Unidad de Enfermedades Infecciosas en el Hospital Alfred en Melbourne, Australia. Se recogieron muestras de sangre de individuos reclutados en Melbourne en tubos anticoagulantes de citrato y se procesaron dentro de

la hora de punción venosa para aislar y criopreservar células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Para aislar VE de plasma, se reclutaron individuos VIH-1 + en el Centro Médico Fundación Huésped en Buenos Aires, Argentina. Se tomaron muestras de sangre en tubos con anticoagulantes y se procesaron dentro de la hora de punción venosa para aislar el plasma para la purificación de VE. Este estudio fue evaluado y aprobado por el comité de Ética Humana de la Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires y por el comité de Bioética de Fundación Huésped. Todos los individuos reclutados firmaron un consentimiento informado aceptando participar en este estudio al momento de su inclusión en el mismo.

### **Visualización de VEs por microscopía electrónica de barrido (*Scanning Electron Microscopy, SEM*)**

Las VE purificadas se fijaron con PFA al 4%, se lavaron una vez en PBS 1x, se resuspendieron en agua destilada y se prepararon para su visualización como se describió previamente [131]. Las muestras se observaron en un microscopio electrónico de barrido FE-SEM (Zeiss, modelo SUPRA 40) en el Centro de Microscopías Avanzadas (CMA, FCEyN-UBA).

### **Visualización de VE por microscopía de transmisión (*Transmission Electron Microscopy, TEM*)**

Las VE purificadas se tiñeron negativamente con acetato de uranilo al 2% como se describió previamente [132]. Las muestras se visualizaron en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss 109T en el Laboratorio Nacional de Investigación y Servicios de Microscopía Electrónica (LANAIS-MIE, UBA-CONICET).

### **Análisis estadístico**

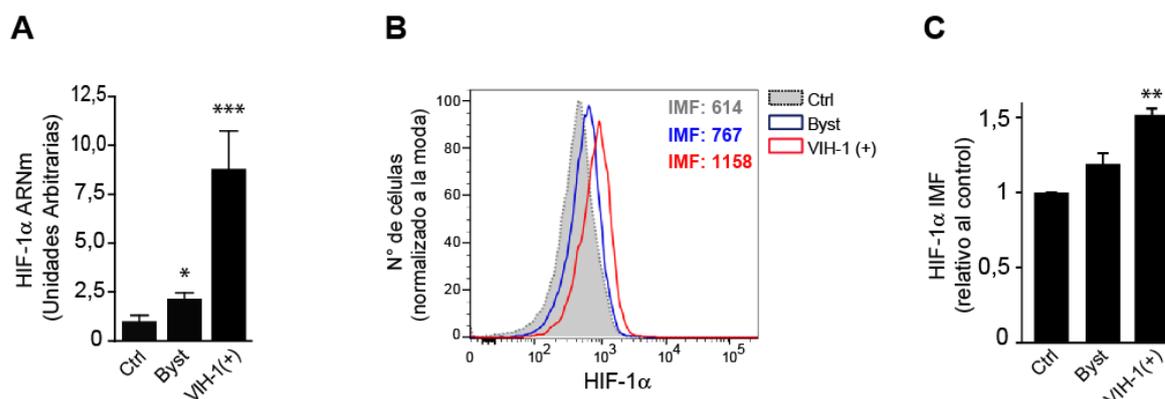
Los datos se analizaron usando Prism (GraphPad software). La normalidad de los datos se probó usando la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Con base en la prueba de normalidad, se utilizó

ANOVA de una vía seguido de la prueba posterior HSD de Tukey o Kruskal-Wallis seguido de la prueba posterior de Dunn para análisis de comparación múltiple.

## Resultados

### **La expresión y actividad transcripcional de HIF-1 $\alpha$ se inducen tras la infección por VIH-1.**

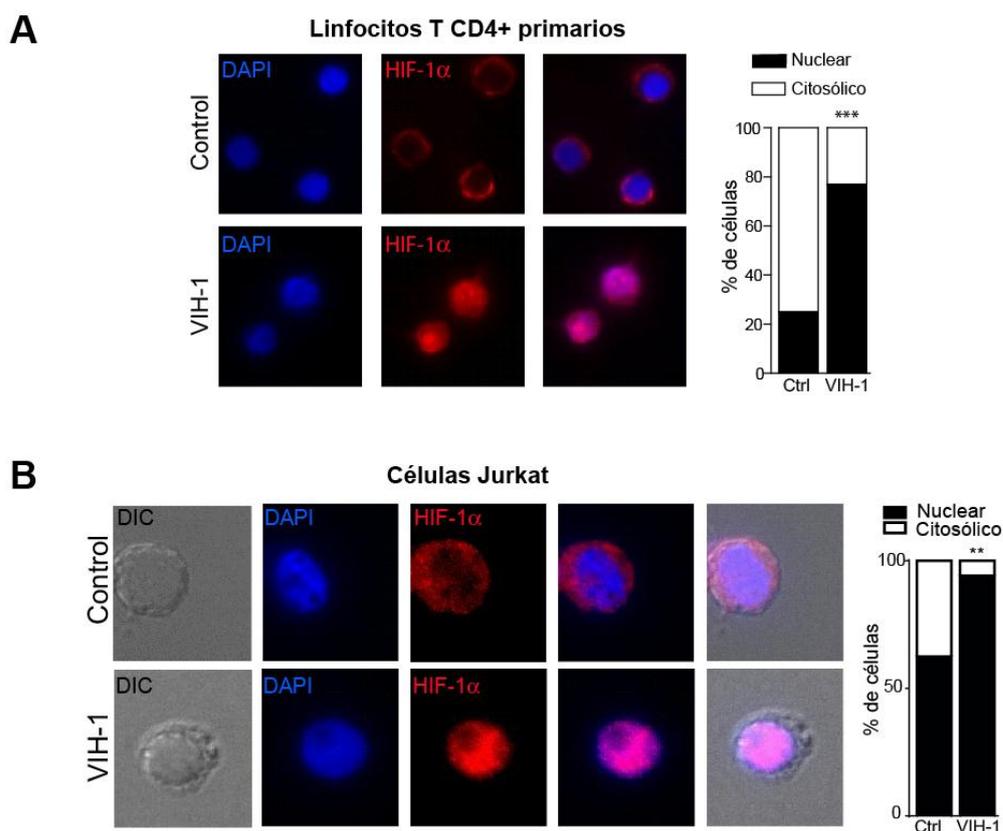
La infección por VIH-1 está asociada a un aumento de la glicólisis aeróbica en células T CD4+, tanto *in vitro* como en pacientes [133] [50]. Sin embargo, se desconocen los estímulos y vías subyacentes a esta alteración metabólica inducida por el virus, así como las consecuencias en términos de la función inmune. Teniendo en cuenta que HIF-1 $\alpha$  desempeña un papel central en el control del metabolismo de glucosa y en la funcionalidad de las células T CD4+, se propuso estudiar si la actividad de HIF-1 $\alpha$  es modulada durante la infección por VIH-1. Para abordar esta interrogante linfocitos T CD4+, fueron aislados de sangre de donantes sanos y posteriormente activados con anticuerpos anti-CD3/CD28/CD2. Luego, las células fueron infectadas con VIH-1-GFP, una construcción viral que permite la identificación de células productivamente infectadas a través de la expresión de GFP. A las 48 h post-infección, las células infectadas con VIH-1 (~ 10%) fueron separadas físicamente de las células no infectadas del mismo cultivo mediante FACS *sorting*, obteniendo dos poblaciones: células infectadas productivamente (GFP+) y células vecinas no infectadas (o *bystander*, GFP-). El análisis de los niveles de ARNm de HIF-1 $\alpha$  (Figura 10 A) reveló que la infección por VIH-1 aumenta la expresión de HIF-1 $\alpha$  en células infectadas productivamente, en comparación con las células no infectadas. A su vez, se observó un aumento modesto pero significativo en la expresión de HIF-1 $\alpha$  en células T CD4+ GFP negativas (Figura 10 A), sugiriendo que en cultivos infectados con VIH-1, HIF-1 $\alpha$  es inducido no solo en células productivamente infectadas sino también en células *bystander*. Se obtuvieron resultados similares cuando los niveles proteicos de HIF-1 $\alpha$  fueron analizados mediante FACS en células T CD4 + infectadas (Figura 10 B y C).



**Figura 10.** La expresión de HIF-1 $\alpha$  es aumentada en cultivos infectados con VIH-1.

A) Los niveles de ARNm de HIF-1 $\alpha$  se determinaron mediante qPCR. (n=3) (B-C) Los niveles de proteína de HIF-1 $\alpha$  en células no infectadas (histograma gris relleno), infectadas con VIH-1 (GFP-positivo, histograma rojo) y células *bystanders* (GFP-negativo, histograma azul) se analizaron mediante tinción intracelular y análisis por citometría de flujo. Se muestran los histogramas de un experimento representativo (B) y los valores relativos (en comparación con la condición control sin infectar) de la Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) obtenida con células de 4 donantes diferentes (C).

Dado que HIF-1 $\alpha$  es un factor de transcripción que para ejercer su función debe translocarse desde el citoplasma al núcleo celular, se procedió a evaluar si su localización subcelular se veía alterada por la infección por VIH-1 en linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Mientras que en las células control sin infectar HIF-1 $\alpha$  mostró una distribución predominantemente citosólica, en cultivos infectados con VIH-1 HIF-1 $\alpha$  fue translocado al núcleo en la mayoría de las células (Figura 11 A). Resultados similares fueron obtenidos en cultivos de células Jurkat (línea celular linfocito T CD4, ampliamente utilizada para estudios *in vitro* con VIH-1) infectados con VIH-1 (Figura 11 B).

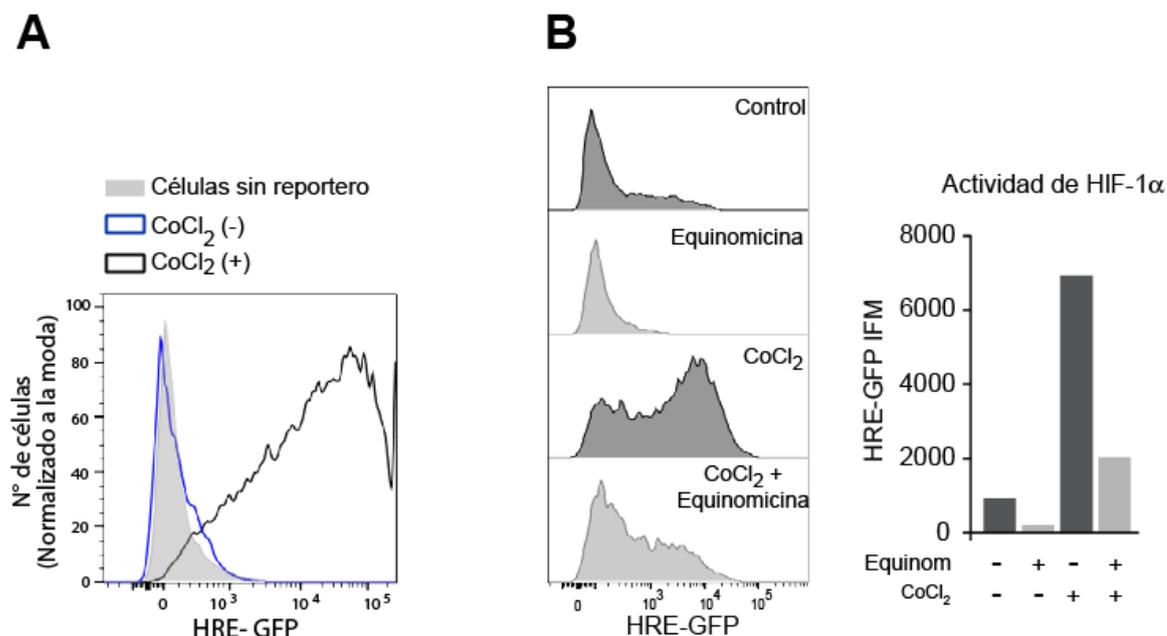


**Figura 11. La infección por VIH-1 promueve la translocación nuclear de HIF-1 $\alpha$ .**

Microscopía de inmunofluorescencia de linfocitos T CD4+ (A) y células Jurkat (B) infectadas con VIH-1 y marcadas con anticuerpos anti-HIF-1 $\alpha$  (rojo) al segundo día post-infección. Los núcleos celulares se tiñeron con DAPI (azul). La cuantificación de la distribución citosólica comparada con la distribución nuclear de HIF-1 $\alpha$  fue evaluada por “observadores ciegos” en 100 células de cada condición. Los datos se expresan como porcentaje en cada categoría.

Para analizar la actividad transcripcional de HIF-1 $\alpha$ , generamos una línea celular reportera mediante electroporación de células Jurkat con un vector que expresa la proteína reportera GFP bajo el control del elemento de respuesta a hipoxia (HRE), cuya secuencia de ADN está presente en la región promotora de los genes diana de HIF-1 $\alpha$  [134]. Dichas células reporteras serán nombradas Jurkat HRE-GFP de ahora en más. Para validar la capacidad de respuesta y la especificidad de línea celular reportera (Figura 12 A y B), células Jurkat HRE-GFP fueron estimuladas con CoCl<sub>2</sub> (100 $\mu$ M), un potente inductor de la actividad de HIF-1 $\alpha$  [135, 136]. De acuerdo con los resultados esperados, el tratamiento con CoCl<sub>2</sub> (un compuesto mimético de

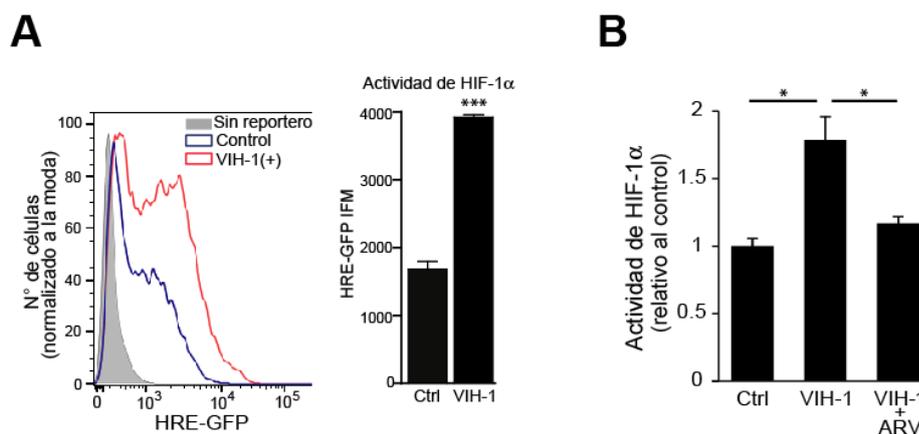
hipoxia) indujo un aumento en la expresión de GFP. A su vez, al utilizar Equinomicina, un inhibidor farmacológico de la actividad de HIF-1 $\alpha$  [137], la respuesta a CoCl<sub>2</sub> fue drásticamente disminuida.



**Figura 12. Validación funcional de la línea reportera de la actividad transcripcional de HIF-1 $\alpha$ .**

A) Expresión de GFP en la línea reportera inducida por la actividad transcripcional de HIF-1 $\alpha$  en presencia de CoCl<sub>2</sub> 100 $\mu$ M. (B) Inhibición de la actividad transcripcional de HIF-1 $\alpha$  utilizando el inhibidor farmacológico Equinomicina.

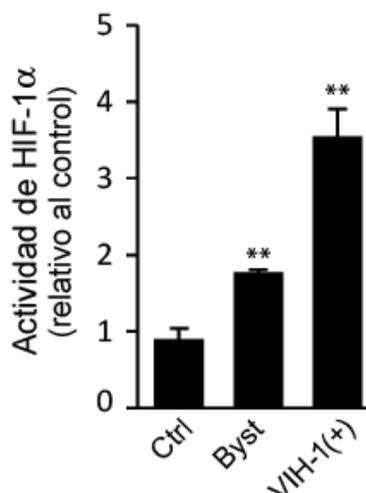
Teniendo en cuenta los resultados mencionados previamente se decidió evaluar si la infección por VIH-1 aumentaría la actividad transcripcional de HIF-1 $\alpha$ . Para ello células Jurkat HRE-GFP fueron infectadas con VIH-1, y al día 2 post-infección la expresión de GFP fue evaluada por citometría de flujo. Como se observa en la Figura 13A la infección con VIH-1 indujo un aumento de la actividad de HIF-1 $\alpha$ . El tratamiento previo de las células con una combinación de fármacos antirretrovirales que interrumpen los primeros pasos del ciclo de replicación viral (entrada viral: Efavirenz, transcripción inversa: Efavirenz) anuló la inducción mediada por VIH-1 de la actividad de HIF-1 $\alpha$  (Figura 13B). Estos resultados indican que la infección por VIH-1 desencadena la actividad de HIF-1 $\alpha$  y descarta que otro factor presente en el stock viral esté induciendo la actividad de este factor de transcripción.



**Figura 13. La actividad transcripcional de HIF-1 $\alpha$  es inducida por la infección por VIH-1.**

A) Histogramas de un experimento representativo (panel izquierdo) y los valores de la Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) de GFP (panel derecho) a las 48hs post-infección. Los valores de fluorescencia correspondientes a las células no infectadas e infectadas con VIH-1 se representan como histogramas azul y rojo, respectivamente. Las células que no expresan el gen reportero se muestran como control negativo (histograma gris relleno). (B) Las células fueron tratadas (1h) con fármacos antirretrovirales (Efurvitida y Efavirenz). Posteriormente a la infección se determinó la actividad de HIF-1 $\alpha$  analizando la expresión del reportero GFP a las 48h. Se muestran los datos agrupados de 3 experimentos independientes.

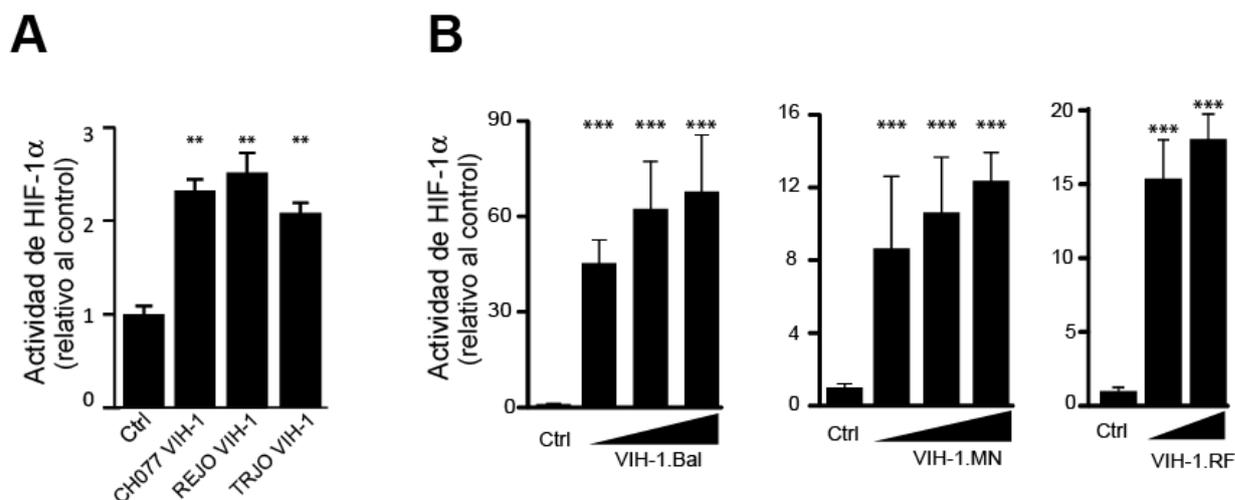
Luego decidimos analizar si el aumento de la actividad de HIF-1 $\alpha$  estaba restringido a las células productivamente infectadas o si también se producía en células vecinas no infectadas (*bystanders*). En concordancia con el aumento del ARNm de HIF-1 $\alpha$  (Figura 10A), la actividad transcripcional de HIF-1 $\alpha$  se indujo principalmente en células productivamente infectadas (revelado por la detección intracelular del antígeno viral p24) pero también hubo un aumento significativo en células *bystander* (Figura 14).



**Figura 14.** En cultivos infectados con VIH-1 la actividad de HIF-1 $\alpha$  es desencadenada en células productivamente infectadas y en células vecinas no infectadas (*bystander*).

Células productivamente infectadas fueron identificadas mediante tinción intracelular del antígeno p24. La expresión de GFP fue analizada en células p24-positivas (infectadas productivamente) o células p24-negativas (células vecinas no infectadas, *bystander*) y fueron comparadas con células control no infectadas. Se muestra un experimento representativo de 4 experimentos independientes.

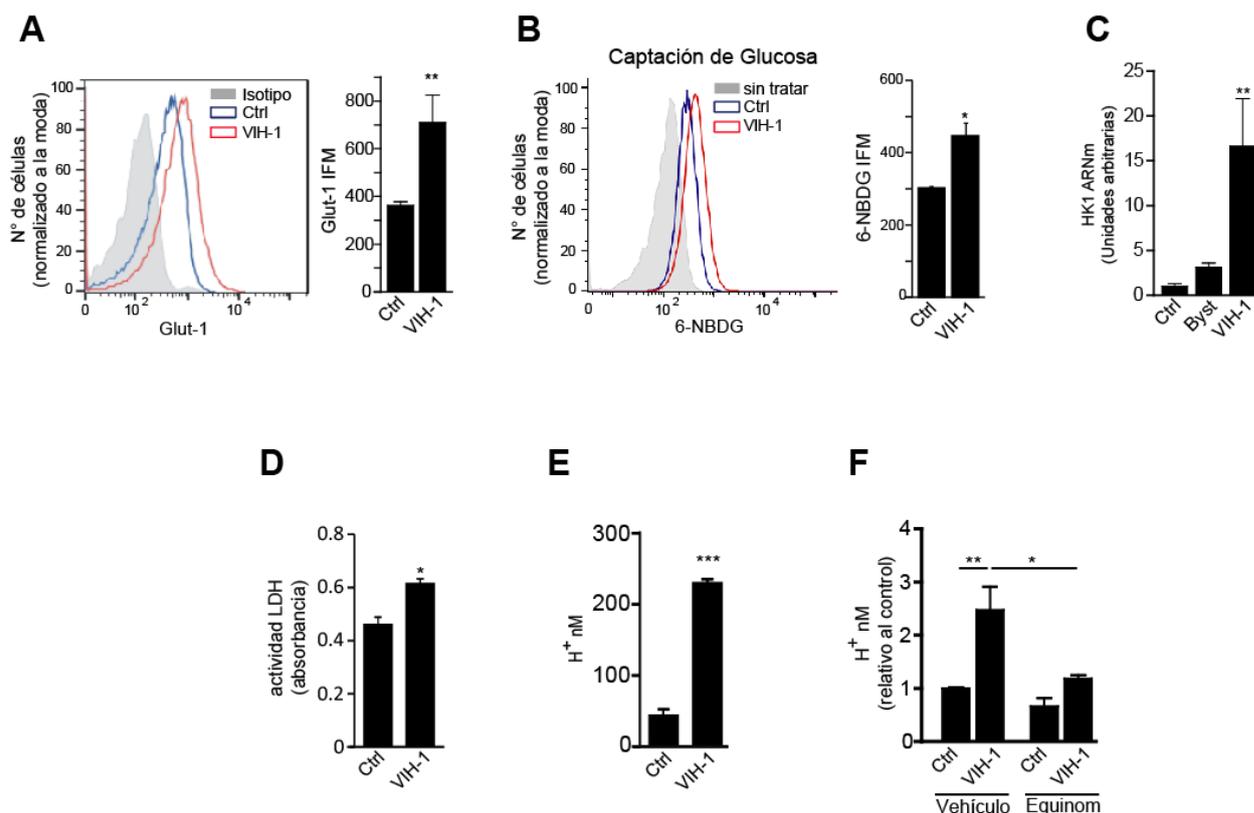
A continuación, se evaluó la capacidad de distintos aislamientos primarios de VIH-1 para inducir la actividad de HIF-1 $\alpha$  en células Jurkat HRE-GFP (Figura 15A). Al igual que la cepa de referencia NL4-3, las cepas de VIH-1 con diferentes tropismos, incluyendo BaL (CCR5-trópico), MN (CXCR4-trópico) y RF (dual-trópico) también desencadenaron la actividad de HIF-1 $\alpha$  de una manera dependiente de la dosis del inóculo (Figura 15B). Estos resultados muestran que la inducción de HIF-1 $\alpha$  desencadenada por la infección con VIH-1 no está restringida a virus con un tropismo determinado o a cepas de laboratorio.



**Figura 15. La actividad de HIF-1 $\alpha$  es inducida por aislamientos primarios de VIH-1 y por virus con distintos tropismos.**

A) Células Jurkat HRE-GFP fueron infectadas con 3 aislamientos primarios de VIH-1. Se muestra los valores relativos de dos experimentos independientes. (B) Células Jurkat HRE-GFP fueron infectadas con las cepas de VIH-1 Bal (CCR5-trópico), MN (CXCR4-trópico) y RF (dual-trópico), y la actividad de HIF-1 $\alpha$  fue evaluada al día 2 post-infección. Se muestran los valores de un experimento representativo (n=2).

Teniendo en cuenta que HIF-1 $\alpha$  es un importante regulador metabólico celular, decidimos confirmar funcionalmente el aumento en la actividad de HIF-1 $\alpha$  durante la infección por VIH-1 mediante el análisis de la actividad glicolítica de las células infectadas. En concordancia con reportes previos [133], se observó que la infección por VIH-1 promovió un aumento en la glicólisis, evidenciado por un aumento de diferentes parámetros. En particular, observamos un aumento en los niveles de: Glut-1, el transportador de glucosa 1 (Figura 16 A); captación de glucosa (figura 16 B); ARNm de hexoquinasa 1 (HK1) (figura 16 C); actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH) (Figura 16 D) y la acidificación extracelular (un indicador de la producción de ácido láctico y glicólisis; Figura 16 E). La inhibición farmacológica de HIF-1 $\alpha$  con Equinomicina, abolió la acidificación del medio de cultivo celular en cultivos infectados, lo que indica que este factor de transcripción juega un papel crítico en la promoción de la actividad glicolítica desencadenada por el VIH-1 (figura 16 F).



**Figura 16. La infección por VIH-1 induce el aumento de Glicólisis Aeróbica en linfocitos T CD4+.**

A) Los niveles superficiales de Glut-1 en células no infectadas (histograma azul) e infectadas con VIH-1 (histograma rojo) se analizaron mediante FACS. El control de isotipo es representado como un histograma gris. Se muestran los histogramas de un experimento representativo y la IFM promedio ( $n=5$ ). (B) Se evaluaron los niveles de captación de glucosa en cultivos no infectados e infectados con VIH-1 utilizando un análogo de glucosa fluorescente (6-NBDG) y posterior análisis por FACS. Se muestran un histograma representativo y la IFM promedio ( $n=3$ ). (C) Células T CD4<sup>+</sup> fueron infectadas con VIH-1-GFP. Al tercer día post- infección las células GFP positivas (productivamente infectadas) y células GFP negativas (*bystander*) fueron separadas por FACS *sorting*. Los niveles de ARNm de la enzima glicolítica HK-1 se determinaron mediante RT qPCR. Los resultados obtenidos se muestran como valores relativos a la condición control (Ctrl=1). (D) La actividad de la enzima LDH se evaluó mediante una reacción enzimática que depende de la cantidad de LDH presente en el lisado celular. Se muestra un experimento representativo ( $n=4$ ). (E) El pH del medio de cultivo de células infectadas y no infectadas se cuantificó como medida indirecta de glicólisis (acidificación debido a la producción de ácido láctico). (F) Linfocitos T CD4<sup>+</sup> no infectados e infectados con VIH-1 fueron incubados en presencia o ausencia de Equinomicina para cuantificar el pH del medio como medida indirecta de glicólisis (acidificación debida a la producción de ácido láctico). Se muestran los datos agrupados de 3 experimentos independientes.

Finalmente, con el objetivo de analizar si el aumento de la expresión de HIF-1 $\alpha$  tiene lugar durante la infección por VIH-1 en pacientes, decidimos analizar los niveles proteicos de HIF-1 $\alpha$  en

---

células T CD4<sup>+</sup> aisladas de pacientes infectados con VIH-1. Un total de 23 pacientes infectados con VIH-1 bajo tratamiento antirretroviral y 6 donantes sanos fueron reclutados. Los valores de edad, sexo y niveles de linfocitos T CD4 circulantes de los pacientes VIH-1 positivos y donantes sanos utilizados para estos estudios se presentan en la Tabla 3. Los niveles celulares de HIF-1 $\alpha$  se determinaron mediante inmunomarcación intracelular seguida del posterior análisis por FACS. Observamos un aumento en los niveles celulares de HIF-1 $\alpha$  en las células T CD4<sup>+</sup> de pacientes infectados por VIH-1 bajo tratamiento con antirretrovirales (Figura 17 A-B). A su vez, los niveles de HIF-1 $\alpha$  en células T CD4<sup>+</sup> de pacientes infectados por VIH-1 exhibieron una correlación positiva con la expresión de Glut-1 en la superficie celular (Figura 17 C). En conjunto, estos resultados muestran que la infección por VIH-1 desencadena la actividad de HIF-1 $\alpha$  *in vitro*, promoviendo la actividad glicolítica de células T y que las células T CD4<sup>+</sup> de pacientes infectados con VIH-1 muestran un aumento en la expresión de HIF-1 $\alpha$  en comparación con individuos sanos.

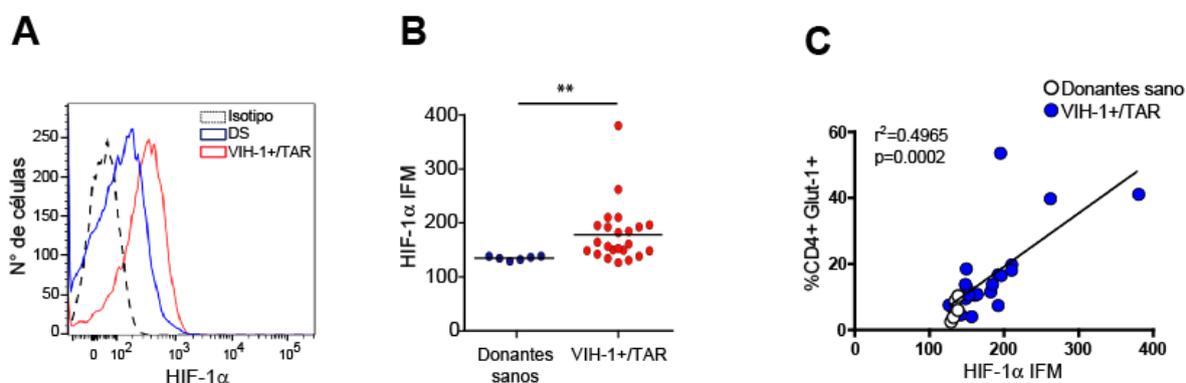
**Tabla 3.** Características clínicas del grupo de estudio

<b>Donantes sanos</b>	<b>Edad</b>	<b>CD4%</b>	<b>N°CD4</b>	<b>Sexo</b>
10010	27	62,4	N.D.	M
1009	82	65,7	N.D.	M
L	55	62	N.D.	F
T	30	54,4	N.D.	M
10006	40	53,1	N.D.	M
10012	65	57,3	N.D.	M

<b>VIH+/cART</b>	<b>Edad</b>	<b>CD4%</b>	<b>N°CD4</b>	<b>Sexo</b>
00010	72	34,7		M
00018	32	37,3		M
00020	51	38,7		M
00021	53	40,3	666	M
00022	63	11,7	296	M
00024	55	20,1	216	M
00027	53	41	728	M
00028	70	52	506	M
00029	60	58	959	M
00030	49	37	917	M
00032	67	36	485	M
00033	66	66	1377	M
00034	53	24	488	M

VIH+/cART	Edad	CD4%	N°CD4	Sexo
00035		49		M
00036		38	1272	M
00037		47	1174	M
00038		46	616	M
00039		55	857	M
00040	45	48	360	M
00041		68	951	M
00008 b	44	44,5		M
00016d			470	M
0001G	39	35,5	550	M

N.D.: No Determinado

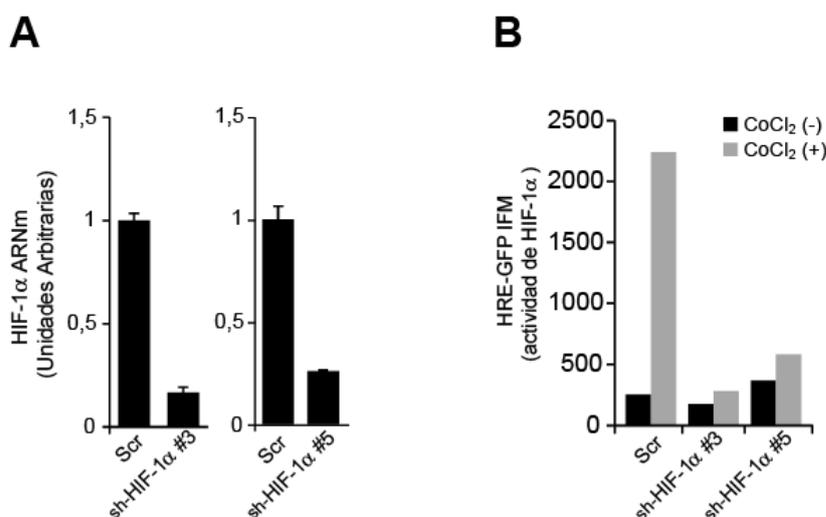


**Figura 17. Los niveles de HIF-1 $\alpha$  se encuentran aumentados en Linfocitos T CD4+ de pacientes infectados con VIH-1 bajo tratamiento antirretroviral.**

(A-B) Los niveles de HIF-1 $\alpha$  en células T CD4+ aisladas de donantes sanos (n=6) e infectados con VIH-1 (n=23) fueron determinados mediante tinción intracelular y posterior análisis por citometría de flujo. Se muestra un histograma representativo (A) y los valores correspondientes a cada individuo (B). (C) Análisis de la correlación entre los niveles de HIF-1 $\alpha$  y la expresión superficial de Glut-1 en células T CD4+ de donantes sanos y pacientes infectados con VIH-1.

### La actividad de HIF-1 $\alpha$ promueve la replicación de VIH-1.

Habiendo demostrado que la infección por VIH-1 estimula la expresión y la actividad de HIF-1 $\alpha$ , se decidió estudiar si este factor de transcripción está involucrado en la promoción de la replicación viral. En primer lugar, la expresión de HIF-1 $\alpha$  fue silenciada mediante la utilización de ARN interferentes (ARNi). Células Jurkat fueron transducidas con lentivirus que codifican para dos *small hairpin RNA* (shRNA) diferentes dirigidos específicamente contra este gen. El silenciamiento se confirmó midiendo la expresión del ARNm de HIF-1 $\alpha$  mediante PCR en tiempo real (Figura 18A). Se comprobó funcionalmente el silenciamiento de HIF-1 $\alpha$  mediante la estimulación de las células silenciadas con CoCl<sub>2</sub>. De acuerdo a lo esperado, la estimulación con CoCl<sub>2</sub> promovió la actividad de HIF-1 $\alpha$  en las células control, pero no en las células silenciadas (Figura 18 B).

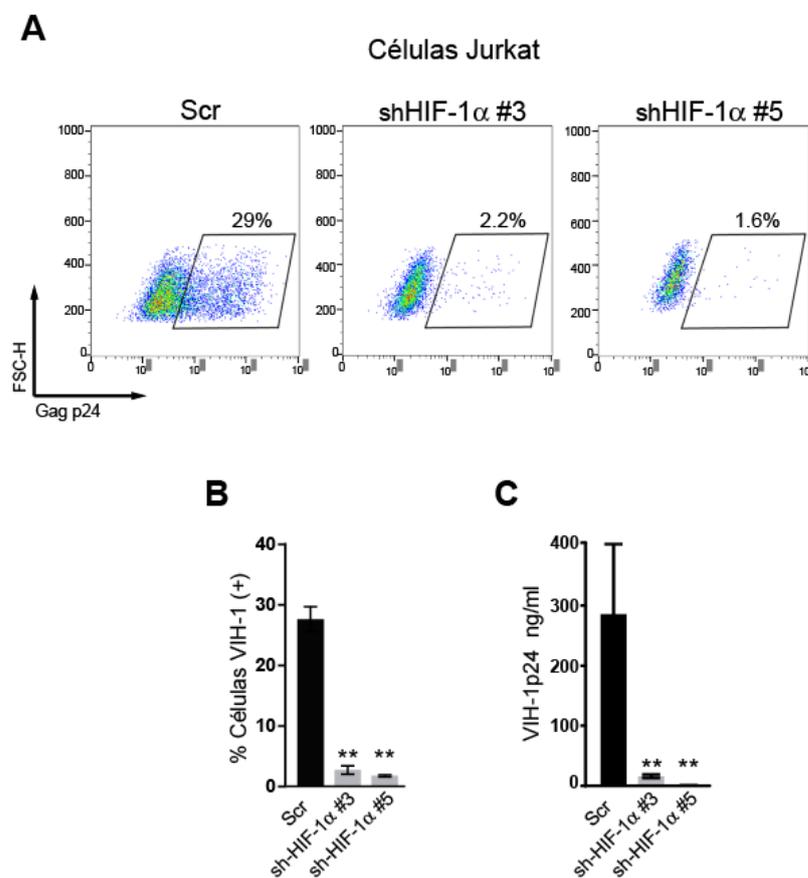


**Figura 18. Validación del silenciamiento de la expresión de HIF-1 $\alpha$  mediante transducción con lentivirus.**

(A) La expresión del ARNm de HIF-1 $\alpha$  en células T CD4+ silenciadas mediante transducción lentiviral con dos shARN específicos fue evaluada por RT qPCR. Como control se utilizaron células T CD4+ transducidas con un lentivirus que expresa la secuencia de un ARNi re-arreglado sin un blanco génico específico (*Scramble*, Scr). (B) El silenciamiento fue validado funcionalmente analizando la actividad de HIF-1 $\alpha$  en las células reporteras Jurkat HRE-GFP tratadas con CoCl<sub>2</sub>.

Luego se procedió a la infección con VIH-1 de las células control y células silenciadas para HIF-1 $\alpha$ . Al tercer día post infección el porcentaje de células infectadas fue evaluado por citometría de flujo (Figura 19 A-B) y la liberación de partículas virales fue medida por ELISA a través de la

cuantificación del antígeno viral p24. Se observó que la replicación viral fue drásticamente inhibida en las células silenciadas, sugiriendo que HIF-1 $\alpha$  es requerido para la replicación del VIH-1 (Figura 19 C).

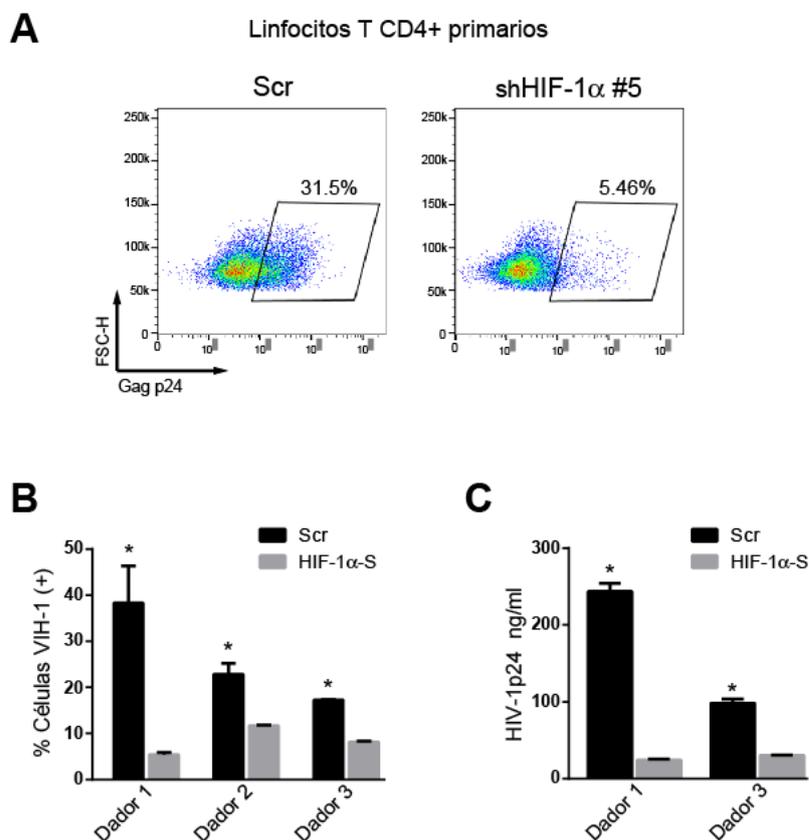


**Figura 19.** El silenciamiento de HIF-1 $\alpha$  en células Jurkat afecta drásticamente la infección por VIH-1.

Células Jurkat fueron silenciadas para HIF-1 $\alpha$  por transducción lentiviral usando dos ARNi distintos y posteriormente fueron infectadas con VIH-1. Al 3<sup>er</sup> día post infección se evaluó la detección del antígeno p24 a nivel citoplasmático (% de infección) y en sobrenadante (liberación de partículas virales) mediante marcación intracelular y ELISA, respectivamente. (A) Gráfico de citometría representativo. (B) Porcentaje de células Jurkat infectadas al día 3 post-infección. (C) Análisis de la producción viral en sobrenadantes de células Jurkat mediante ELISA. Se muestran los datos de un experimento representativo (n=2).

Para confirmar estas observaciones en un modelo de mayor relevancia fisiológica, la expresión de HIF-1 $\alpha$  fue silenciada en células T CD4<sup>+</sup> primarias. De manera similar a lo observado mediante la utilización de la línea celular Jurkat, luego de la infección con VIH-1, tanto el porcentaje de células infectadas (Figuras 20 A-B) como la cantidad de p24 liberada en el sobrenadante del

cultivo celular (Figura 20C) fue significativamente menor en linfocitos T CD4+ silenciados para HIF-1 $\alpha$ , en comparación con células control.



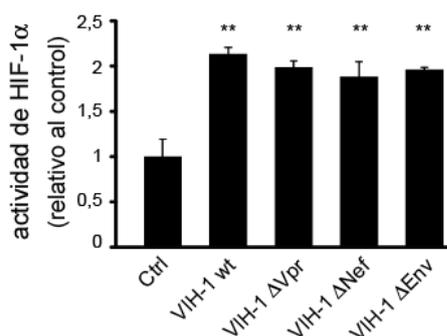
**Figura 20. El silenciamiento de la expresión de HIF-1 $\alpha$  en Linfocitos T CD4+ primarios afecta drásticamente la infección por VIH-1.**

Linfocitos T CD4+ fueron silenciados para HIF-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ -s) y posteriormente infectados con VIH-1. Al 3er día post infección se evaluó la detección del antígeno p24 a nivel citoplasmático (porcentaje de infección) y en sobrenadante (liberación de partículas virales) mediante marcación intracelular y ELISA, respectivamente. (A) Gráfico de citometría representativo. (B) Porcentajes de linfocitos T CD4+ infectados de 3 dadores de sangre independientes al día 3 post-infección. (C) Análisis de la producción viral en sobrenadantes de linfocitos T CD4+ de 2 donantes mediante ELISA.

En conjunto, estos resultados indican que HIF-1 $\alpha$  es requerido para la replicación de VIH-1.

### La inducción de la actividad de HIF-1 $\alpha$ por VIH-1 es desencadenada por el ADN viral.

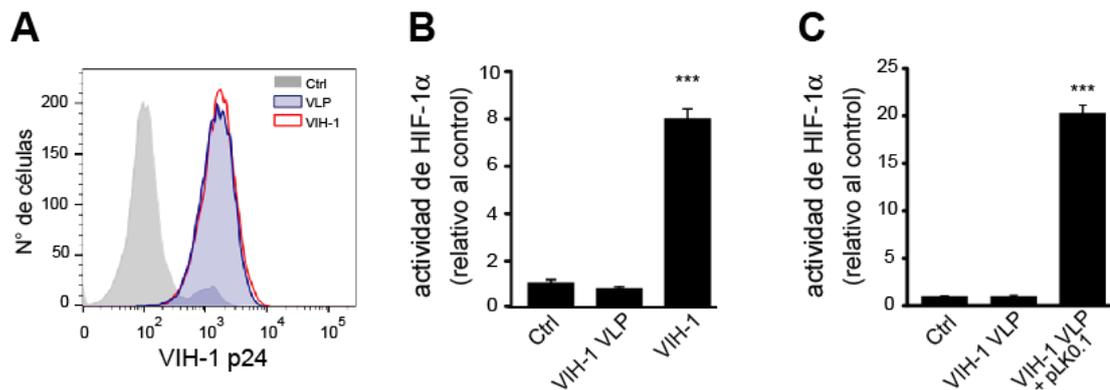
Los resultados presentados en las secciones precedentes indican que la infección por VIH-1 aumenta la actividad transcripcional de HIF-1 $\alpha$  en condiciones no hipóxicas (Figura 10). Por lo tanto, hipotetizamos que un componente viral debía ser responsable de desencadenar la actividad de HIF-1 $\alpha$  en células T CD4+ infectadas con VIH-1 en condiciones de normoxia. Para evaluar esta hipótesis, se analizó el papel de aquellas proteínas virales que habían sido previamente implicadas en la modulación de diferentes vías de señalización celular. Para ello, células Jurkat HRE-GFP fueron infectadas con partículas de VIH-1 que no expresan las proteínas vírales Vpr (la cual fue reportada como capaz de inducir la transcripción de HIF-1 $\alpha$  en una línea celular de microglía humana [89] y en una línea celular de macrófagos [138]), Nef o Env. La deficiencia de cualquiera de las tres proteínas virales no afectó la capacidad del VIH-1 para inducir la actividad de HIF-1 $\alpha$  (Figura 21), descartando su participación en la inducción de la actividad de este factor de transcripción en células T CD4+ infectadas.



**Figura 21. La inducción de la actividad de HIF-1 $\alpha$  mediada por la infección por VIH-1 es independiente de la expresión de Vpr, Nef o Env.**

Células Jurkat HRE-GFP fueron infectadas con VIH-1 $\Delta$ Vpr, VIH-1 $\Delta$ Nef y VIH-1 $\Delta$ Env y posteriormente se evaluó la actividad de HIF-1 $\alpha$  por citometría de flujo al día 2 post-infección. Como controles positivos y negativos se utilizaron células infectadas con VIH-1wt o células sin infectar, respectivamente. Se muestran los datos de un experimento representativo (n=4).

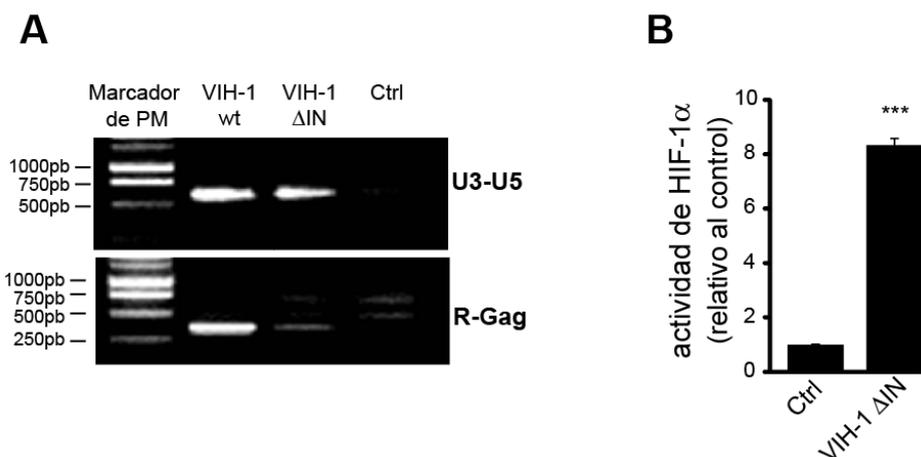
Para determinar si la entrada viral, las proteínas estructurales del VIH-1 o los ácidos nucleicos virales estaban involucrados en el desencadenamiento de la actividad de HIF-1 $\alpha$ , se produjeron partículas símil virus (*Virus Like Particles*, VLP) de VIH-1 "vacías" (sin ARN viral). Estas VLPs se produjeron mediante la expresión de Gag/Pol en células 293T, junto con el plásmido que codifica la proteína VSV-G, que se usó para pseudotipar las VLPs y permitir su unión y entrada a la célula blanco. Las células reporteras Jurkat HRE-GFP fueron espinoculadas a una alta m.o.i. para asegurar la entrada de una cantidad significativa de estas partículas no replicativas. Como control positivo, se infectaron células con VIH-1wt. La captación de VLPs y partículas de VIH-1 fue similar (Figura 22 A). Sin embargo, las VLPs "vacías" no activaron la vía de HIF-1 $\alpha$  (Figura 22 B), lo que sugiere que: a) la entrada viral no es suficiente para inducir la actividad de HIF-1 $\alpha$  y, b) se requieren ácidos nucleicos virales. Para confirmar el requerimiento de ácidos nucleicos virales, producimos VLPs de VIH-1 que, en lugar de contener el genoma viral, portaban el ARN derivado de pLK0.1, un vector lentiviral para la expresión de shARN [139]. El ARN transportado por estas VLPs puede transcribirse de forma inversa en la célula receptora, generando ADNc que no codifica ninguna proteína viral. Mientras que las VLPs vacías no modificaron la actividad de la línea reportera, las VLPs que contenían ARN indujeron la actividad transcripcional de HIF-1 $\alpha$  (Figura 22 C). Estos resultados sugieren que la presencia de ARN viral o la generación de ADN es requerida para la inducción de la actividad de HIF-1 $\alpha$ .



**Figura 22.** El aumento de la actividad de HIF-1 $\alpha$  mediada por la infección por VIH-1 no es inducida por las proteínas estructurales Gag/Pol y requiere la presencia de ácidos nucleicos en la partícula viral.

Células reporteras Jurkat HRE-GFP fueron infectadas mediante espiroculación con VLPs derivadas de VIH-1 o con VIH-1wt. (A) La entrada de las partículas virales fue evaluada inmediatamente después de la espiroculación mediante detección de p24 intracelular por citometría de flujo. (B) La expresión del reportero GFP se determinó mediante citometría de flujo. Se muestran los datos de un experimento representativo (n=4). (C) Células Jurkat HRE-GFP fueron infectadas con VLPs derivadas de VIH-1 (vacío) o con VLPs derivados de VIH-1 que contenían ARN derivado del vector pLk0.1. Como control se usaron células sin infectar. Se muestran los datos de un experimento representativos (n=3)

Para evaluar si la integración del ADN viral es requerida para aumentar la actividad transcripcional de HIF-1 $\alpha$ , células Jurkat HRE-GFP fueron infectadas con VIH-1 con una delección para el gen de la integrasa (VIH-1 $\Delta$ IN). Este virus mutante es capaz de producir ADNc viral, aunque con una eficacia menor (Figura 23A), pero no puede avanzar con el ciclo de replicación viral [140, 141]. La fuerte inducción de la expresión de GFP por el VIH-1 mutante para el gen de la Integrasa (Figura 23B) indica que la integración del genoma viral no es necesaria para inducir la actividad transcripcional HIF-1 $\alpha$  y apoya aún más la noción de que los ácidos nucleicos virales son el componente viral responsable de este efecto.

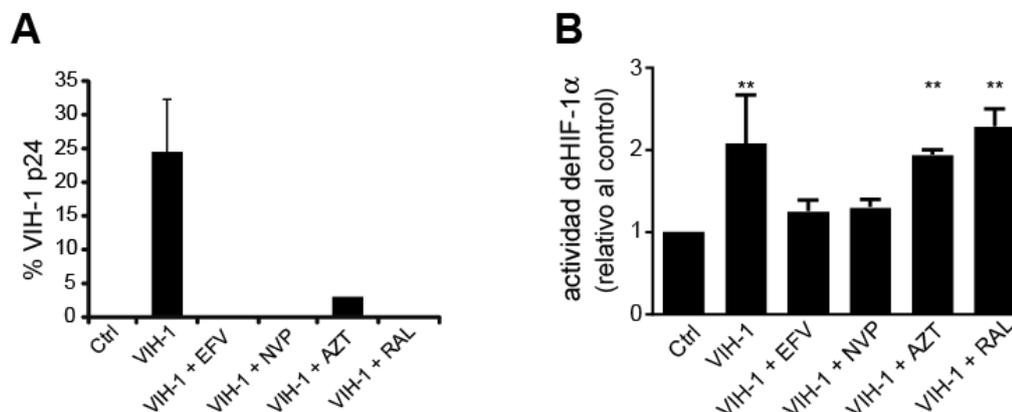


**Figura 23.** La integración del ADN de VIH-1 generado por la transcripción inversa no es necesaria para la inducción de HIF-1 $\alpha$ .

(A) Células Jurkat fueron infectadas con VIH-1wt o con VIH-1 $\Delta$ IN durante 8h y la producción de ADN viral se cuantificó por PCR utilizando dos pares de cebadores específicos para la amplificación de dos fragmentos del LTR de VIH-1. Los cebadores fueron diseñados para detectar productos intermedios (U3-U5) y tardíos (R-gag) de la transcripción inversa. Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa al 1% y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. (B) Células reporteras fueron infectadas con un VIH-1 mutante que no expresa la integrasa viral (VIH-1 $\Delta$ IN). Células sin infectar fueron usadas como control. Se muestra un experimento representativo (n=5).

Para evaluar si el ARN viral entrante o el ADNc producto de la transcripción inversa fueron responsables de la inducción de la actividad de HIF-1 $\alpha$ , se infectó la línea celular reportera con VIH-1wt en presencia de varios agentes antirretrovirales. Se usaron tres inhibidores de la transcriptasa inversa, Efavirenz (EFV), Nevirapina (NVP) y Azidotimidina (AZT). Tanto el EFV como la NVP son inhibidores alostéricos de la transcriptasa inversa que bloquean la actividad de la enzima y previene la formación de ADNc [142]. Por el contrario, el AZT es un inhibidor nucleosídico de la transcriptasa inversa que permite la acumulación de transcritos cortos de ADN [142, 143]. Además, se utilizó raltegravir (RAL), un inhibidor de la integrasa. Como se esperaba, todas las drogas inhibieron la replicación del VIH-1 (figura 24A). Cabe destacar que el tratamiento con RAL y AZT no bloqueó el aumento de la actividad de HIF-1 $\alpha$  inducido por la infección por VIH-1, mientras que el tratamiento con EFV y NVP inhibió drásticamente la inducción de HIF-1 $\alpha$  mediada por VIH-1 (Figura 24B). Estos resultados sugieren que el ADN generado durante la replicación del VIH-1 es un factor clave para desencadenar la vía de señalización de HIF-1 $\alpha$ . Los

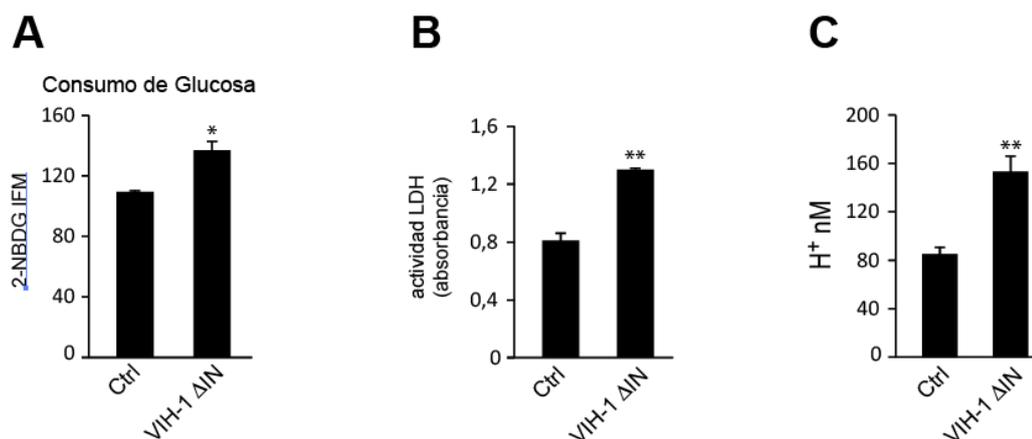
resultados presentados arriba indican que la integración del ADN de VIH-1 (y, por lo tanto, la replicación) no es necesaria para activar la actividad de HIF-1 $\alpha$  en las células T CD4 +.



**Figura 24. La inhibición de la transcripción inversa de VIH-1 evita la inducción de la actividad de HIF-1 $\alpha$ .**

(A) Células Jurkat fueron infectadas con VIH-1 para medir la eficacia de los fármacos antirretrovirales (EFV, NVP, RAL o AZT). La inhibición de la replicación de VIH-1 se confirmó mediante marcación de p24 intracelular y análisis mediante FACS al día 2 post-infección (B) Células Jurkat HRE-GFP fueron infectadas con VIH-1 en ausencia o presencia de EFV, NVP, AZT o RAL y la actividad de HIF-1 $\alpha$  fue evaluada al 2<sup>do</sup> día post-infección mediante FACS. Se muestran los datos agrupados de 3 experimentos independientes.

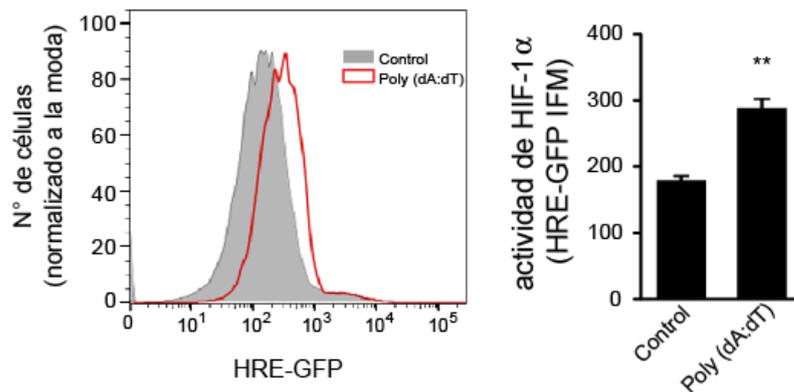
Los resultados observados en la figura 16 muestran que la infección por VIH-1 es capaz de inducir un aumento en la glicólisis aeróbica de cultivos infectados, siendo esto dependiente de la actividad de HIF-1 $\alpha$ . A su vez, demostramos que no es necesaria la integración del genoma viral para la activación de la vía de HIF-1 $\alpha$ . Teniendo en cuenta esto último, nos preguntamos si el VIH-1 $\Delta$ IN además de inducir la actividad de HIF-1 $\alpha$ , puede promover glicólisis en cultivos infectados. Para evaluar esta interrogante, células T CD4+ fueron infectadas con el virus mutante y la actividad glicolítica fue analizada al segundo día post-infección. Los datos obtenidos mostraron que la infección con este mutante viral indujo un aumento en la captación de glucosa (Figura 25 5A), la actividad LDH (Figura 25 B) y la acidificación extracelular (Figura 25 C).



**Figura 25. La generación de ADN viral es suficiente para promover el aumento de la actividad glicolítica en linfocitos T CD4+ infectados con VIH-1ΔIN.**

(A) Se evaluaron los niveles de captación de glucosa en cultivos no infectados e infectados con VIH-1ΔIN utilizando un análogo de glucosa fluorescente (2-NBDG) y posterior análisis por FACS. Se muestran un histograma representativo y el promedio de la IFM (n=3). (B) La actividad de la enzima LDH se evaluó luego de lisar las células mediante espectrofotometría. Se muestra un experimento representativo (n=4). (C) El pH del medio de cultivo de células infectadas y no infectadas se determinó como medida indirecta de glicólisis (acidificación debido a la producción de ácido láctico).

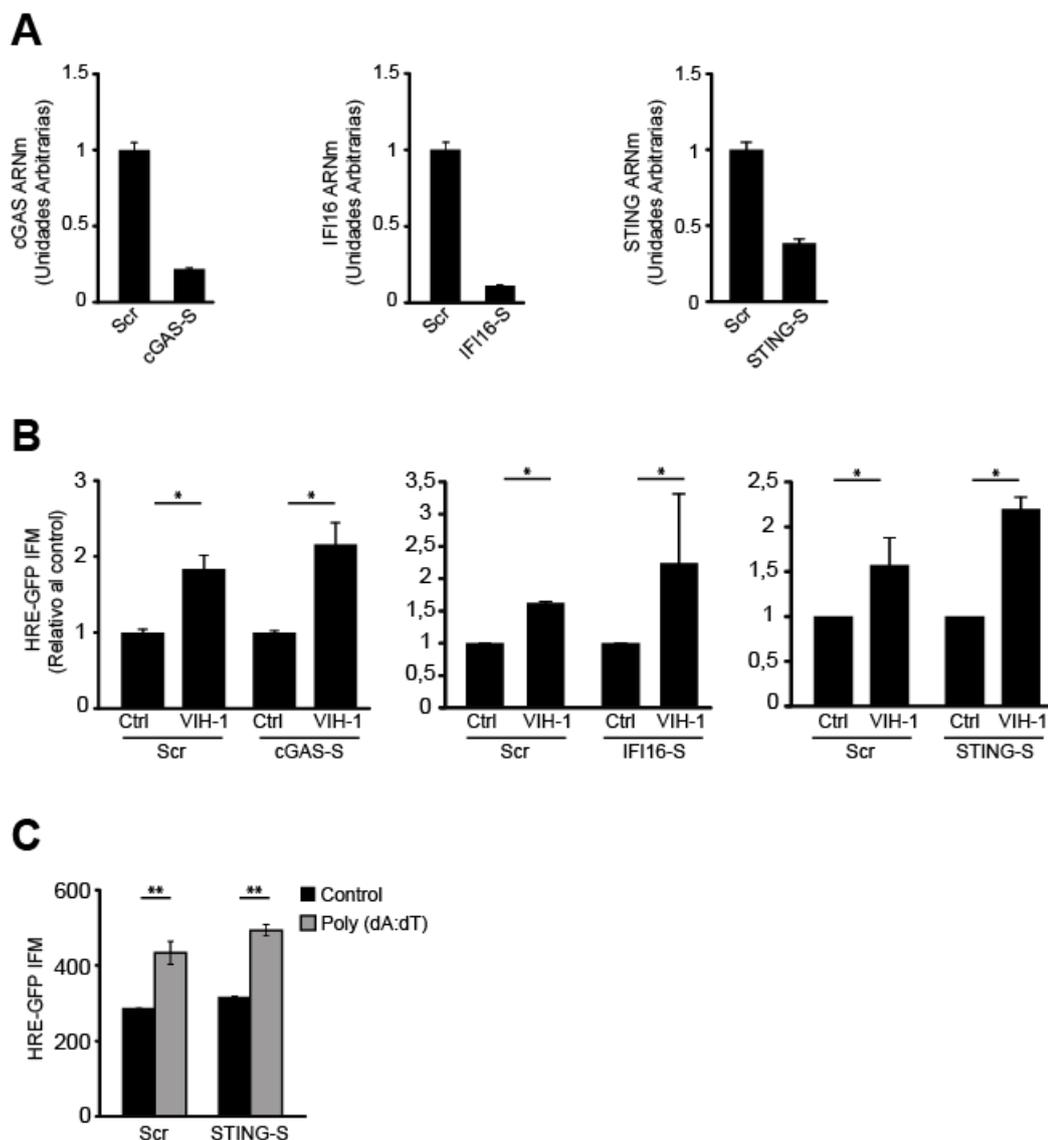
Teniendo en cuenta los datos obtenidos previamente, se decidió evaluar si la inducción de la actividad de HIF-1 $\alpha$  mediada por la presencia de ADN citosólico es un fenómeno que ocurre específicamente durante la infección por VIH-1 o es un fenómeno más general de respuesta a la presencia de cualquier ADN en el citosol. Para responder a esta pregunta, se transfectaron células HeLa con el plásmido reportero de la actividad de HIF-1 $\alpha$  para generar la línea reportera HeLa HRE-GFP. Estas células fueron transfectadas con poli(dA:dT) (un análogo sintético de ADN bicatenario (ADNdc)). La transfección con el análogo de ADNdc indujo la actividad de HIF-1 $\alpha$  (Figura 26), lo que sugiere que el ADNdc citosólico es capaz de desencadenar la actividad de HIF-1 $\alpha$  independientemente de su secuencia y origen.



**Figura 26. La actividad transcripcional de HIF-1 $\alpha$  es estimulada por el reconocimiento de ADNd sintético.**

Las células reporteras HeLa HRE-GFP fueron transfectadas con poli(dA:dT) y la expresión de GFP fue determinada al día 2 posterior a la transfección por citometría de flujo. Como control negativo se utilizaron células expuestas al reactivo de transfección sin ADN. Se muestran histogramas representativos (izquierda) y los valores de IFM (derecha) de la expresión del reportero GFP de un experimento representativo (n=3).

Dado que células del sistema inmunitario están dotadas de distintos sensores que reconocen ADN citoplasmático, se decidió estudiar si moléculas que intervienen en la vía de detección de ADN citosólico estaban involucradas en los fenómenos observados previamente. Sorprendentemente, el silenciamiento de cGAS, IFI16 y STING (tres moléculas clave en la vía de detección de ADN citosólico) no inhibió la inducción de la actividad de HIF-1 $\alpha$  mediada por VIH-1 (Figura 27 A-B). En el mismo sentido, la transfección con poli (dA:dT) de células HeLa silenciadas para STING promovió la actividad de HIF-1 $\alpha$  (Figura 27 C).

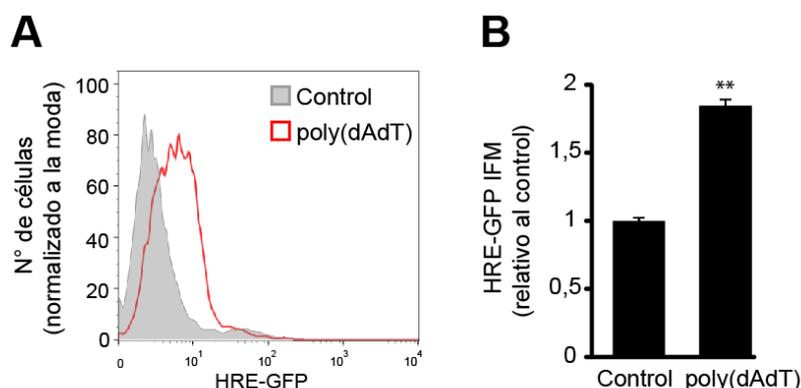


**Figura 27. El silenciamiento de moléculas involucradas en el reconocimiento de ADN citosólico no inhibe la inducción de la actividad de HIF-1 $\alpha$  promovida por ADN viral o sintético.**

A) La expresión de cGAS, IFI16 y STING fue silenciada en las células Jurkat HRE-GFP. La eficacia del silenciamiento se evaluó mediante qPCR. (B) Células Jurkat HRE-GFP silenciadas para cGAS, IFI16 y STING fueron infectadas con VIH-1 y la actividad transcripcional de HIF-1 $\alpha$  se determinó mediante análisis de la expresión de GFP. (C) La expresión de STING se silenció en células HeLa HRE-GFP que posteriormente fueron estimuladas con poli(dA:dT). La actividad transcripcional de HIF-1 $\alpha$  se determinó mediante análisis de la expresión de GFP al 2<sup>do</sup> día post tratamiento.

Finalmente, se decidió utilizar células que carecen de la vía STING endógena para confirmar si esta vía es necesaria para inducir la actividad de HIF-1 $\alpha$ . Para ello células HEK 293T que previamente fueron transfectadas con el plásmido reportero HRE-GFP, fueron tratadas con poli

(dA:dT). A pesar del hecho de que estas células tienen la vía de detección de ADN citosólico defectuosa, la actividad de HIF-1 $\alpha$  fue incrementada ante la transfección del ADN (Figura 28 A-B).



**Figura 28. La actividad transcripcional de HIF-1 $\alpha$  es estimulada por ADNdC en células carentes de la vía STING.**

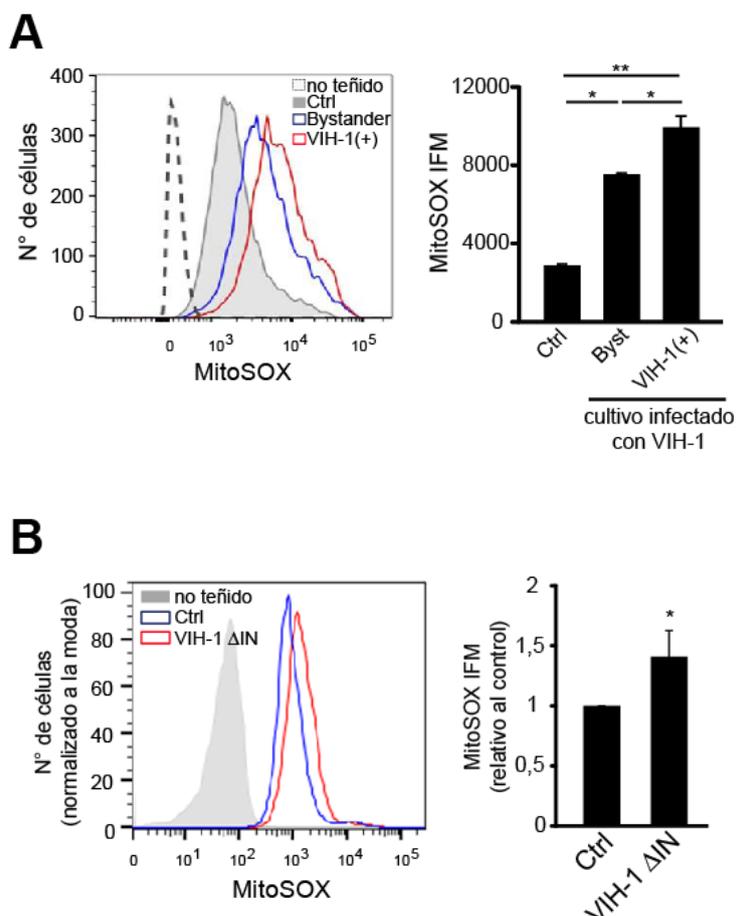
(A) Células reporteras HEK 293T HRE-GFP se transfectaron con poli(dA:dT). Las células expuestas al reactivo de transfección sin ADN fueron usadas como control negativo. Histograma representativo de la expresión del reportero GFP. (B) Se muestran los datos agrupados de 2 experimentos independientes.

En conjunto, estos resultados sugieren que el ADN transcrito producido durante el ciclo de replicación de VIH-1 promueve la actividad transcripcional de HIF-1 $\alpha$  por una vía independiente de cGAS/IFI16/STING, lo que resulta en un aumento de la actividad glicolítica de las células T CD4 +.

### **La actividad de HIF-1 $\alpha$ inducida por la infección por VIH-1 depende de la producción de ROS mitocondrial.**

Estudios previos demostraron que los patrones moleculares asociados a patógenos microbianos (PAMP) son capaces de desencadenar la producción de especies reactivas del oxígeno mitocondrial (ROSmt) al estimular la señalización a través de diferentes receptores tipo Toll [144]. Para obtener una mayor comprensión del mecanismo subyacente a la inducción de HIF-1 $\alpha$  durante la infección por VIH-1, se evaluó la hipótesis de que VIH-1 desencadena la actividad de HIF-1 $\alpha$  mediante la inducción de ROSmt. En primer lugar, evaluamos la producción de ROSmt

mediante el uso de la sonda MitoSOX, que detecta específicamente el anión superóxido mitocondrial y el posterior análisis mediante citometría de flujo. Observamos que tanto las células infectadas como las células vecinas no infectadas mostraron un aumento considerable en el contenido de anión superóxido mitocondrial (Figura 29A). La infección de células Jurkat con el mutante VIH-1 $\Delta$ IN también indujo un aumento en la producción de ROSmt, lo que indica que la integración viral no es necesaria para inducir este efecto (Figura 29B).

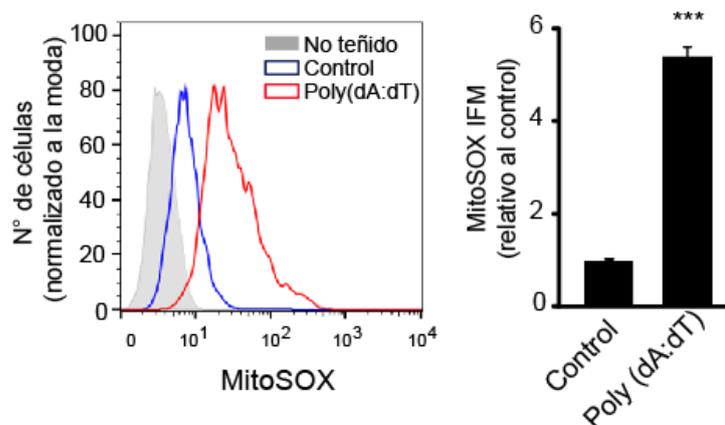


**Figura 29. VIH-1 induce la producción de ROS mitocondrial en cultivos infectados de células T CD4+.**

(A) La producción de ROSmt en células T CD4+ primarias infectadas con VIH-1 GFP se determinó utilizando MitoSOX al día 2 post-infección. Se muestran histogramas de un experimento representativo (izquierda) de células no infectadas (histograma gris), células *bystander* (histograma azul), infectadas con VIH-1 (histograma rojo) y el control no marcado (histograma gris punteado). Los valores de IFM de un experimento representativo son mostrados a la derecha (n = 3).

(B) La producción de ROSmt se midió en células Jurkat no infectadas e infectadas con VIH-1 $\Delta$ IN a las 24hs post-infección. Se muestra un histograma representativo (Izquierda) y datos agrupados de 3 experimentos independientes (Derecha).

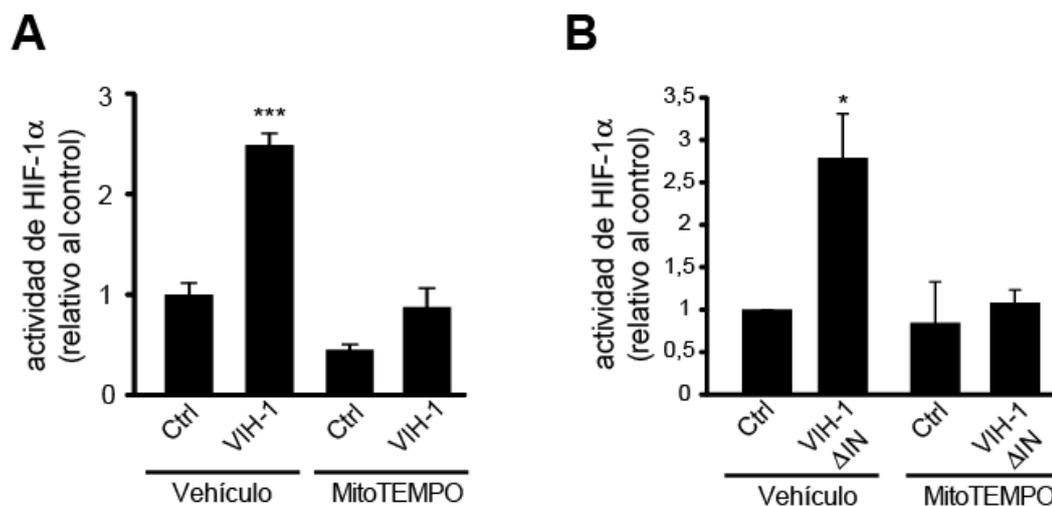
Para determinar si el ADN citosólico fue el responsable de activar la producción de ROSmt, se transfectó la línea celular HeLa con poli (dA:dT) y el contenido de ROSmt fue analizado. Curiosamente, este fragmento de ADNdc fue capaz de desencadenar la producción de ROSmt (Figura 30) lo que sugiere que el ADNdc viral generado durante la replicación del VIH-1 es el principal estímulo para la inducción de este compuesto oxidativo en las mitocondrias.



**Figura 30. La producción de ROS mitocondrial es estimulada por el reconocimiento de ADNdc sintético.**

Células HeLa fueron transfectadas con poli(dA:dT) y fueron incubadas con MitoSOX a las 24h post-transfección para evaluar la producción de ROSmt. Células expuestas al reactivo de transfección sin ADN fueron usadas como control negativo. Se muestra un histograma representativo (Izquierda) y datos agrupados de 3 experimentos independientes (Derecha).

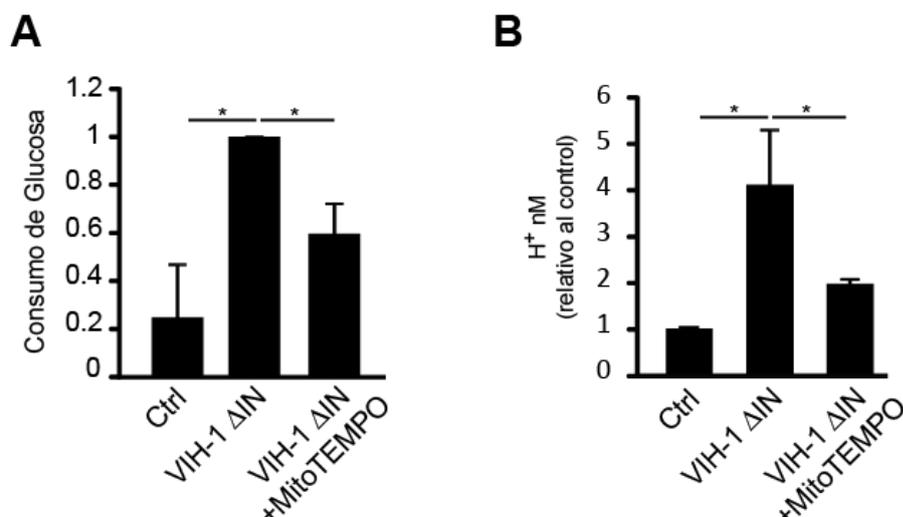
Habiendo demostrado que la infección de linfocitos T CD4+ por VIH-1 induce la producción de ROSmt, luego decidimos evaluar si el ROSmt era responsable de desencadenar la actividad de HIF-1 $\alpha$ . Para ello, se infectó la línea celular reportera Jurkat HRE-GRP y luego de la infección se añadió MitoTEMPO (un inhibidor específico de ROSmt) al cultivo. La adición de MitoTEMPO a células infectadas con VIH-1wt (Figura 31A) o VIH-1 $\Delta$ IN (Figura 31B) abolió la inducción de la actividad de HIF-1 $\alpha$  desencadenada por la infección, pero no afectó el porcentaje de células infectadas (~ 46 % en todas las condiciones).



**Figura 31. El aumento de la actividad de HIF-1 $\alpha$  inducida por la infección de VIH-1 es abolida al inhibir la producción de ROSmt.**

Para evaluar la contribución del ROSmt en la promoción de la actividad de HIF-1 $\alpha$ , células Jurkat HRE-GFP fueron infectadas con VIH-1 (A) o VIH-1 $\Delta$ IN (B) incubadas en presencia o ausencia de MitoTEMPO (500 $\mu$ M). Dos días después de la infección, la expresión de GFP se determinó mediante citometría de flujo. Se muestran los datos agrupados de 3 experimentos independientes.

Como se esperaba a partir de los resultados presentados anteriormente, la inhibición del ROSmt y, por consiguiente, la inducción de la actividad de HIF-1 $\alpha$  por la adición de MitoTEMPO, previno el aumento de la actividad glicolítica desencadenada por la infección con VIH-1 integrasa deficiente (Figuras 32 A-B)



**Figura 32.** El aumento de la actividad glicolítica inducido por la infección por VIH-1 es afectado al inhibir la producción de ROSmt.

Células T CD4<sup>+</sup> primarias fueron infectadas con VIH-1ΔIN e incubadas en presencia o ausencia de MitoTEMPO (500μM). Al tercer día posterior a la infección se midió el consumo de glucosa (A) y se procedió a la cuantificación del pH (B) como un indicador de glicólisis. Se muestran los datos agrupados de 3 experimentos independientes.

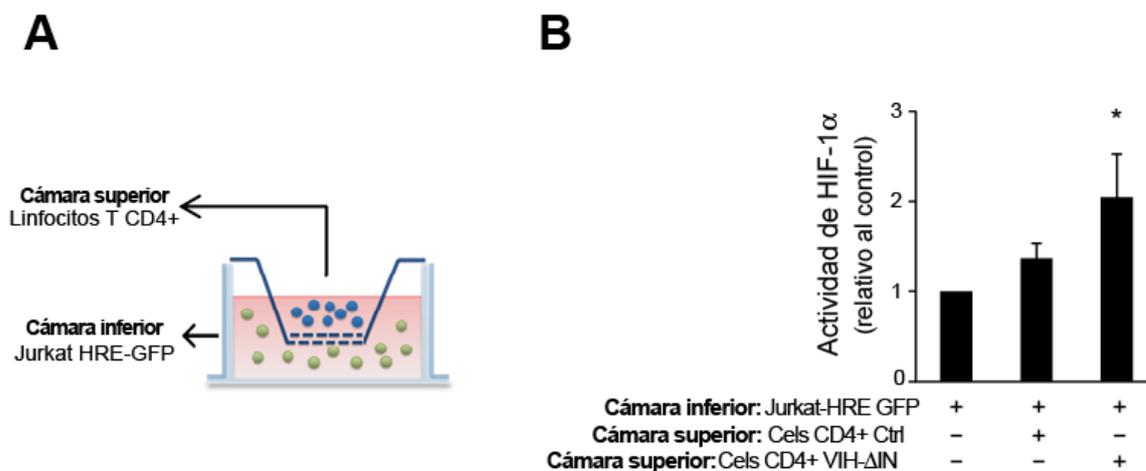
Los resultados presentados en la primera parte de esta tesis doctoral indican que la infección por VIH-1 induce un aumento de la producción de ROSmt, regulando la actividad de HIF-1α y promoviendo a su vez un aumento en los niveles de glicólisis aeróbica en cultivos infectados. Nuestros resultados también demuestran que la actividad de este factor de transcripción es necesaria para una eficiente infección por VIH-1.

Cabe destacar que los resultados presentados en las figuras 10, 14 y 17 sugieren que la infección por VIH-1 induce la actividad de HIF-1α en células productivamente infectadas, pero también en células no infectadas. Teniendo en cuenta que las alteraciones inmunológicas observadas en pacientes infectados por VIH-1 se dan principalmente en células no infectadas a continuación se procederá a estudiar si los resultados observados en células “*bystanders*” poseen relevancia a nivel inmunológico, explicando en parte lo observado en pacientes VIH-1+.

---

**La infección por VIH-1 promueve la liberación de vesículas extracelulares que inducen la actividad de HIF-1 $\alpha$  en células *bystander*.**

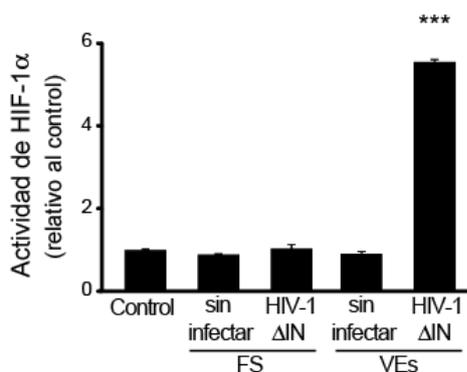
Los resultados presentados en las figuras 10, 14 y 17 sugieren que la infección por VIH-1 induce la actividad de HIF-1 $\alpha$  en células productivamente infectadas, pero también en células no infectadas. Para lograr un mayor entendimiento del mecanismo que subyace a la inducción del efecto en células no infectadas, se procedió a evaluar la inducción de HIF-1 $\alpha$  en células Jurkat reporteras en cocultivo con células T CD4 + primarias infectadas con VIH-1 $\Delta$ IN separadas por una cámara *transwell* (0,4  $\mu$ m). El tamaño de este poro impide el contacto célula-célula, pero permite el paso de factores solubles y vesículas extracelulares (VE) (Figura 33 A). Las infecciones se realizaron con VIH-1 $\Delta$ IN porque este mutante viral es capaz de inducir la actividad de HIF-1 $\alpha$  en las células infectadas (ver Figura 23) pero no produce progenie viral [141]. La inducción de la actividad de HIF-1 $\alpha$  en las células reporteras, incluso cuando están separadas por un *transwell* (Figura 33B), indicó que las células T CD4+ infectadas con VIH-1 $\Delta$ IN producen un factor secretado que es capaz de inducir la actividad de HIF-1 $\alpha$  en células vecinas no infectadas.



**Figura 33. La inducción de la actividad de HIF-1 $\alpha$  en células bystander es mediada por un factor secretado por células T CD4+ infectadas con VIH-1.**

(A) Esquema del ensayo de transwell:  $5 \times 10^5$  células T CD4+ infectadas con VIH-1 $\Delta$ IN o células controles no infectadas se colocaron en la cámara superior de un transwell (0,45 $\mu$ m) y se cocultivaron con células Jurkat HRE-GFP (cámara inferior,  $2 \times 10^5$  células). (B) La expresión de GFP de las células reporteras fue evaluada a las 48h mediante citometría de flujo. Análisis de datos agrupados de 2 experimentos independientes.

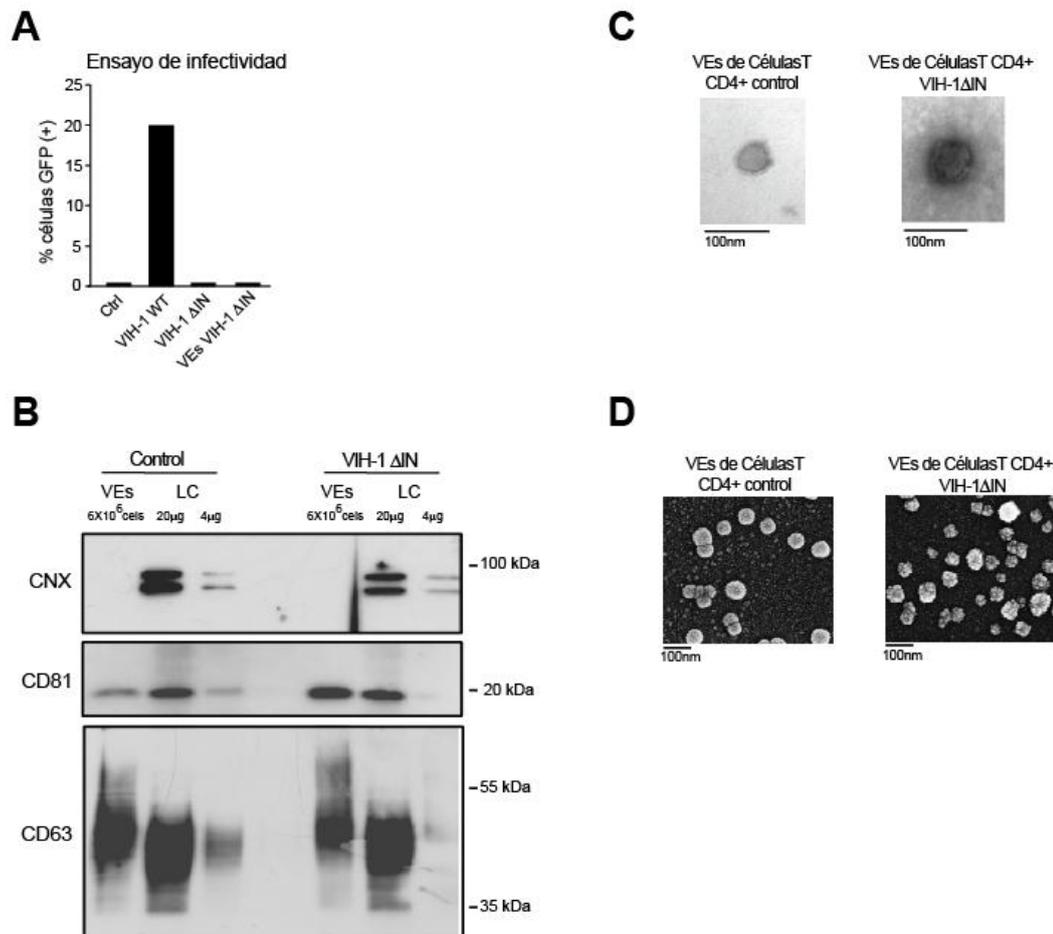
Luego, se evaluó si el efecto fue mediado por un factor soluble o por vesículas extracelulares. La separación de VIH-1 y VE es extremadamente difícil, ya que comparten la mayoría de las propiedades fisicoquímicas tales como tamaño, forma, densidad, etc [112]. Por lo tanto, la utilización del mutante deficiente en Integrasa hace que este virus sea particularmente adecuado para estudiar VE producidas por células infectadas por VIH-1. Infectamos las células T CD4+ con VIH-1 $\Delta$ IN y 48 horas más tarde los sobrenadantes de los cultivos celulares se centrifugaron de manera diferencial para eliminar células y restos celulares, obteniendo una fracción libre de VE, y otra fracción enriquecida en VE (VE<sup>VIH</sup>). Como control se utilizaron VE y medio condicionado libre de VE de células T CD4+ no infectadas. El sobrenadante libre de VE (fracción soluble: FS), tanto de células infectadas con VIH-1 $\Delta$ IN o células T CD4+ sin infectar no indujeron la actividad de HIF-1 $\alpha$ , descartando la contribución de factores solubles en este fenómeno (Figura 34). Por el contrario, las VE<sup>VIH</sup> purificadas a partir de cultivos infectados con VIH-1 $\Delta$ IN indujeron fuertemente la actividad de HIF-1 $\alpha$  en las células reporteras (Figura 34).



**Figura 34. La inducción de la actividad de HIF-1 $\alpha$  en células vecinas no infectadas (*bystander*) es mediada por vesículas extracelulares (VE).**

La fracción soluble (FS) y VEs de sobrenadantes de cultivos celulares de células T CD4+ primarias infectadas con VIH-1 $\Delta$ IN y no infectadas se separaron al día 2 post-infección mediante centrifugación diferencial. Luego, células Jurkat HRE-GFP fueron incubadas durante 48h con la FS o con VEs aisladas. La IFM de GFP se determinó mediante citometría de flujo. Se muestra el análisis de un experimento representativo (n=4).

Confirmamos la ausencia de virus infeccioso en los preparados obtenidos de VE<sup>VIH</sup> al incubar las VEs purificadas con células GHOST, una línea celular reportera que al ser infectada con VIH-1 expresa la proteína reportera GFP (Figura 35 A). Habiendo descartado la presencia de virus infeccioso, las preparaciones de VE se caracterizaron a través de la detección por inmunoblot de marcadores canónicos de VE, como ser CD63 y CD81 (Figura 35 B). Calnexina es un marcador del retículo endoplásmico (RE), ausente en VE, por lo que fue utilizado como marcador de exclusión. Como se esperaba, calnexina fue detectada en lisados celulares, pero no en los preparados de VE (Figura 35 B). La visualización de VE mediante microscopía electrónica de transmisión (*transmission electron microscopy*, TEM) (Figura 35 C) y microscopía de barrido (*scanning electron microscopy*, SEM) (Figura 35 D) reveló que las VEs secretadas por las células T CD4+ infectadas con VIH-1 $\Delta$ IN y no infectadas tenían forma circular y un diámetro que variaba de 50 a 200nm. En conjunto, estos resultados indican que la infección con VIH-1 $\Delta$ IN induce la secreción de VE que bioquímica y morfológicamente son similares a las producidas por células no infectadas y sugieren que las vesículas producidas en ambas condiciones son funcionalmente diferentes.



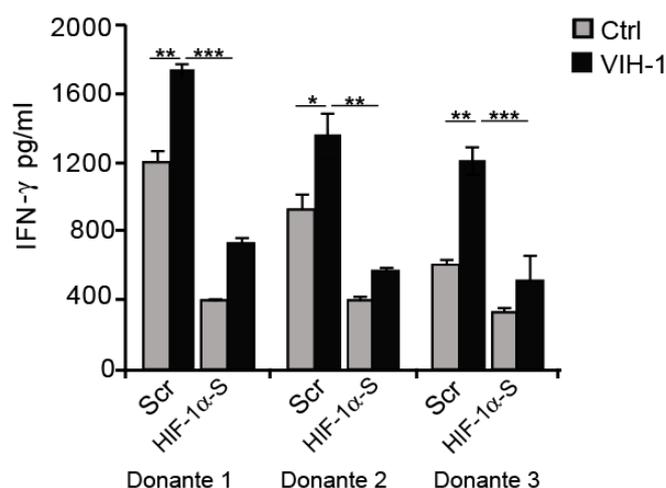
**Figura 35. Caracterización de vesículas extracelulares de linfocitos T CD4+ infectados con VIH-1ΔIN y no infectados.**

(A) Se confirmó la ausencia de virus en preparados de VEs de células T CD4+ infectadas con VIH-1ΔIN utilizando la línea celular reportera GHOST. Como controles se utilizaron células infectadas con VIH-1wt, VIH-1ΔIN y células sin infectar. El porcentaje de células positivas para GFP se evaluó a las 24hs post-infección. por citometría de flujo. (B-D) Caracterización de las VE liberadas por células T CD4 + infectadas con VIH-1ΔIN y no infectadas. (B) La presencia de CD63, CD81 (marcadores canónicos de VE) y Calnexina (CNX, marcador del RE) en preparados de VE aisladas y en los lisados celulares (C) se determinó mediante *western blot*. (C-D) Las VE fueron visualizadas por TEM (C) y SEM (D).

### La secreción de VE inducidas por VIH-1 (VE<sup>VIH</sup>) promueven la producción de citoquinas proinflamatorias por células T CD4+ y macrófagos a través de una vía dependiente de HIF-1α

Considerando que HIF-1α desempeña un papel crítico en el desarrollo de respuestas inmunitarias inflamatorias [57], decidimos silenciar la expresión de HIF-1α en células T CD4 +

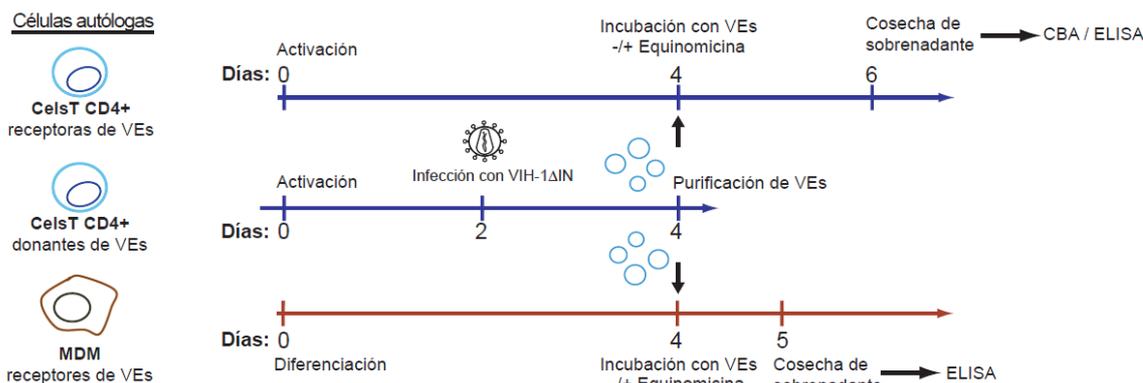
primarias. Luego, las células fueron infectadas con VIH-1 para medir la producción de la citoquina proinflamatoria IFN- $\gamma$  mediante ELISA. Observamos que las células silenciadas para HIF-1 $\alpha$  produjeron significativamente menos interferón en comparación con las células control, lo que demuestra que este factor de transcripción juega un papel directo en la inflamación mediada por células T CD4+ (Figura 36).



**Figura 36.** La producción de IFN- $\gamma$  en cultivos de células T CD4+ infectados con VIH-1 es dependiente de HIF-1 $\alpha$ .

Linfocitos T CD4+ primarios fueron silenciados para HIF-1 $\alpha$ , e infectados con VIH-1. La producción de IFN- $\gamma$  fue determinada por ELISA al día 3 post-infección. Se muestran los resultados obtenidos de tres experimentos independientes usando células de tres donantes sanos.

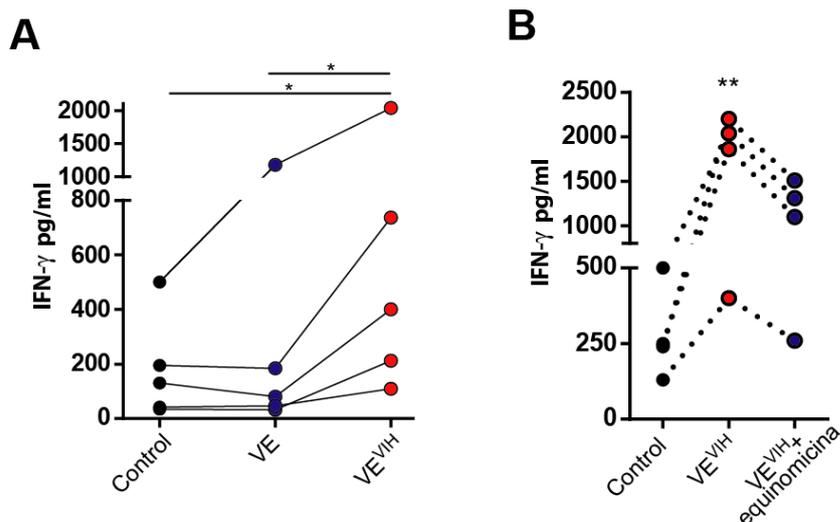
A continuación, se evaluó si las VE<sup>VIH</sup> producidas por linfocitos T CD4+ infectados con VIH-1 $\Delta$ IN inducía la secreción de citoquinas proinflamatorias en células T CD4+ no infectadas. Células T CD4+ no infectadas fueron activadas y a las 48h se añadieron VE o VE<sup>VIH</sup> al medio de cultivo (Figura 37).



**Figura 37. Representación esquemática del diseño experimental.**

Linfocitos T CD4+ o macrófagos derivados de monocitos fueron expuestos a VE o VE<sup>VIH</sup> de células T CD4+ autólogas. La secreción de citoquinas se cuantificó mediante ELISA o CBA.

La producción de IL-17A, IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, TNF $\alpha$ , IL-6 e IL-10 se evaluó al día dos posterior al agregado de vesículas. Sorprendentemente, se observó que las células T CD4+ incubadas con VE<sup>VIH</sup> secretaban cantidades considerablemente más altas de IFN- $\gamma$ , en comparación con las células incubadas con VE producidas por los linfocitos T CD4+ no infectadas (Figura 38A). Además, se observó que las VE<sup>VIH</sup> estimularon la producción de IL-17A en algunos donantes, pero de manera no consistente (no mostrado). Cabe resaltar que, al inhibir con Echinomycin la actividad de HIF-1 $\alpha$  en las células T CD4+ receptoras de VE, la inducción de la secreción de IFN- $\gamma$  mediada por VE<sup>VIH</sup> se redujo significativamente (Figura 38B). Esta observación sugiere que las VE<sup>VIH</sup> aumentan la cantidad de IFN- $\gamma$  secretado por células *bystander* mediante una vía dependiente de la actividad de HIF-1 $\alpha$ .



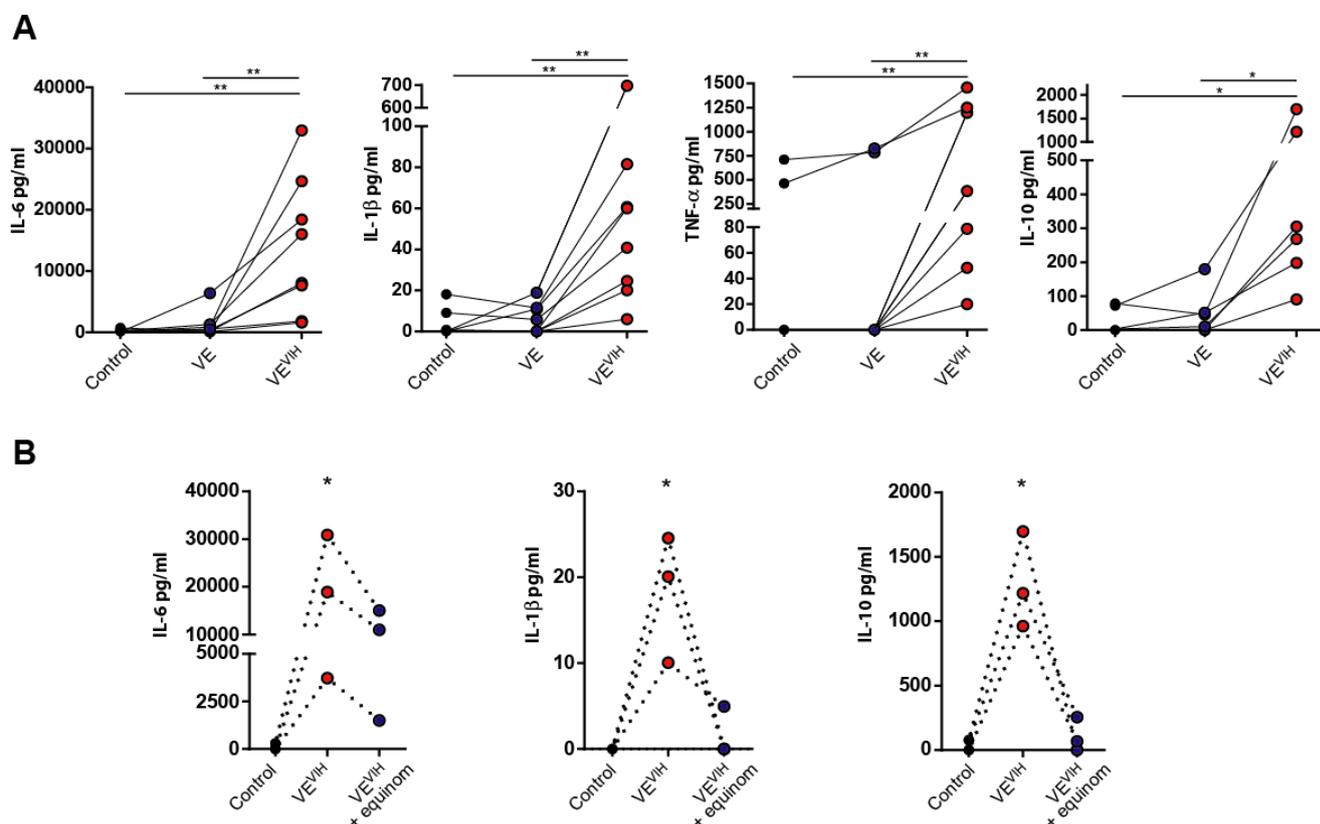
**Figura 38. Vesículas extracelulares provenientes de cultivos infectados con VIH-1 inducen la secreción de IFN- $\gamma$  en linfocitos T CD4+.**

Linfocitos T CD4+ autólogos fueron expuestos a VE aisladas de cultivos de células T CD4+ infectadas con VIH-1 $\Delta$ IN (VE<sup>VIH</sup>) o VE provenientes de células T CD4+ no infectadas. (A) La secreción de IFN- $\gamma$  fue determinada a las 48h de incubación mediante ELISA (B) Se midió la producción de IFN- $\gamma$  en cultivos de células tratadas con VE o VE<sup>VIH</sup> en presencia o ausencia de Equinomicina (1nM) mediante ELISA.

Además de la disfunción de las células T, otra característica distintiva de la infección por VIH-1 es la inflamación crónica mediada por los macrófagos, asociada con el desarrollo de enfermedades no relacionadas con el SIDA. Por lo tanto, se decidió evaluar si las VE<sup>VIH</sup> eran capaces de promover la producción de citoquinas en macrófagos de una manera dependiente de HIF-1 $\alpha$ .

Los monocitos se diferenciaron a macrófagos y al día 4, se añadieron VE<sup>VIH</sup> o VE producidas por células T CD4 + autólogas al medio de cultivo. Se observó que las VE<sup>VIH</sup>, pero no VEs controles, promovieron la secreción de las citoquinas proinflamatorias IL-6, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  (Figura 39A) pero no IL-12 (no mostrado). La secreción de estas citoquinas inflamatorias estuvo acompañada por la secreción de IL-10 (Figura 39A). La inhibición farmacológica de la actividad de HIF-1 $\alpha$  en macrófagos redujo significativamente la secreción de IL-6 y suprimió la secreción de IL-1 $\beta$  e IL-10 (Figura 39B). La secreción de TNF- $\alpha$  por células en las que la actividad de HIF-1 $\alpha$  se inhibió farmacológicamente no mostró resultados consistentes (no mostrado). Estos resultados indican

que las VE<sup>VIH</sup> liberadas por las células T CD4<sup>+</sup> tienen la capacidad de promover la secreción de diferentes citoquinas pro-inflamatorias, mediante vías dependientes e independiente de la actividad de HIF-1 $\alpha$ .



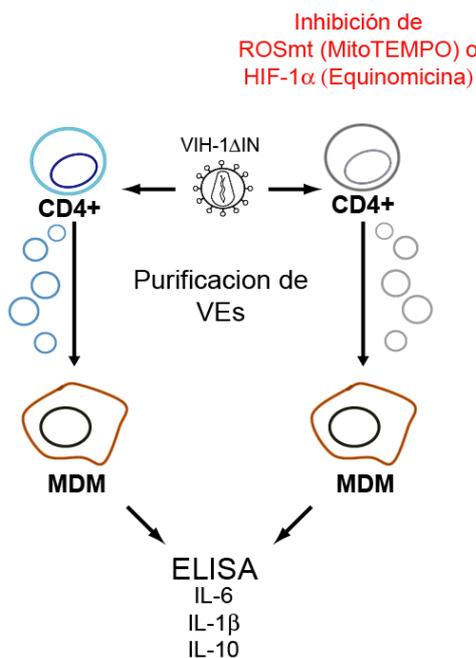
**Figura 39. Vesículas extracelulares provenientes de cultivos infectados con VIH-1 inducen la secreción de citoquinas proinflamatorias en macrófagos derivados de monocitos.**

(A) Macrófagos fueron expuestos a VE aisladas de cultivos de células T CD4<sup>+</sup> autólogas infectadas con VIH-1 $\Delta$ IN (VE<sup>VIH</sup>) o VE provenientes de células T CD4<sup>+</sup> no infectadas y posteriormente se midió la secreción de IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-10 a las 24h de incubación mediante ELISA. (B) La producción de IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-10 en cultivos de células tratadas con VE o VE<sup>VIH</sup> en presencia o ausencia de Equinomicina (1nM) se determinó mediante ELISA.

### La inducción de la actividad de HIF-1 $\alpha$ desencadenada por ácidos nucleicos derivados de VIH-1 es necesaria para la producción de VE<sup>VIH</sup> inflamatorias

A continuación, se decidió determinar si la actividad de HIF-1 $\alpha$  es necesaria para la producción de VE<sup>VIH</sup> con actividad proinflamatoria. Teniendo en cuenta que la actividad de HIF-1 $\alpha$  se induce

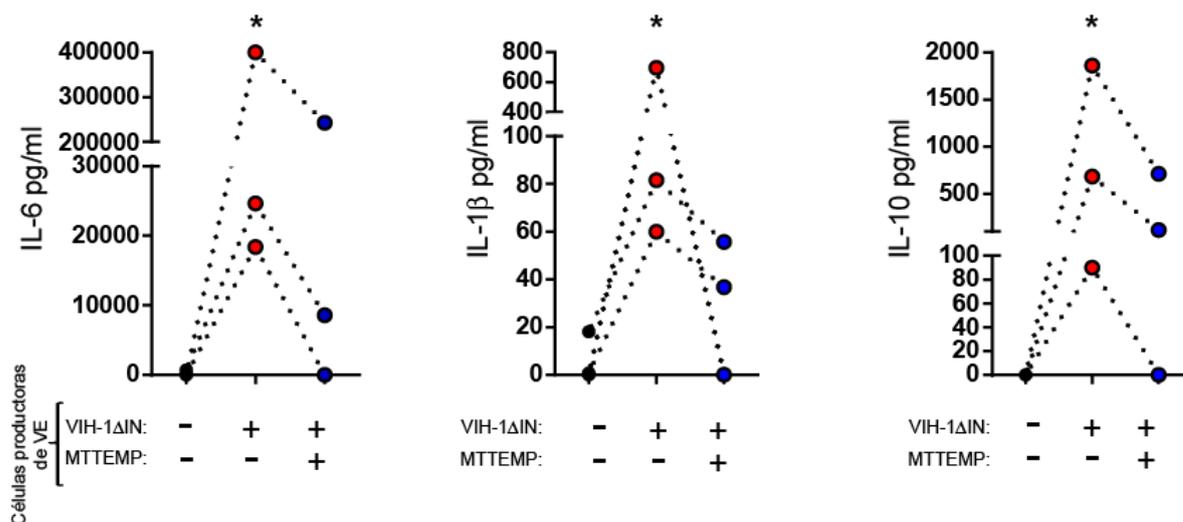
de manera dependiente del ROSmt, células T CD4+ infectadas con VIH-1ΔIN fueron tratadas con MitoTEMPO para reducir la generación de ROSmt. Las VE purificadas del sobrenadante de células T CD4+ tratadas con MitoTEMPO se añadieron luego a cultivos de macrófagos y la producción de citoquinas fue analizada 48 horas después (Figura 40).



**Figura 40. Representación esquemática del diseño experimental.**

La producción de ROSmt y la actividad de HIF-1α en linfocitos T CD4+ fueron inhibidas utilizando MitoTEMPO o Equinomicina, respectivamente, en cultivos previamente infectados con VIH-1ΔIN. Al día 2 post-infección, VE y VE<sup>VIH</sup> fueron aisladas y añadidas a macrófagos autólogos. La secreción de citoquinas se cuantificó mediante ELISA al día siguiente.

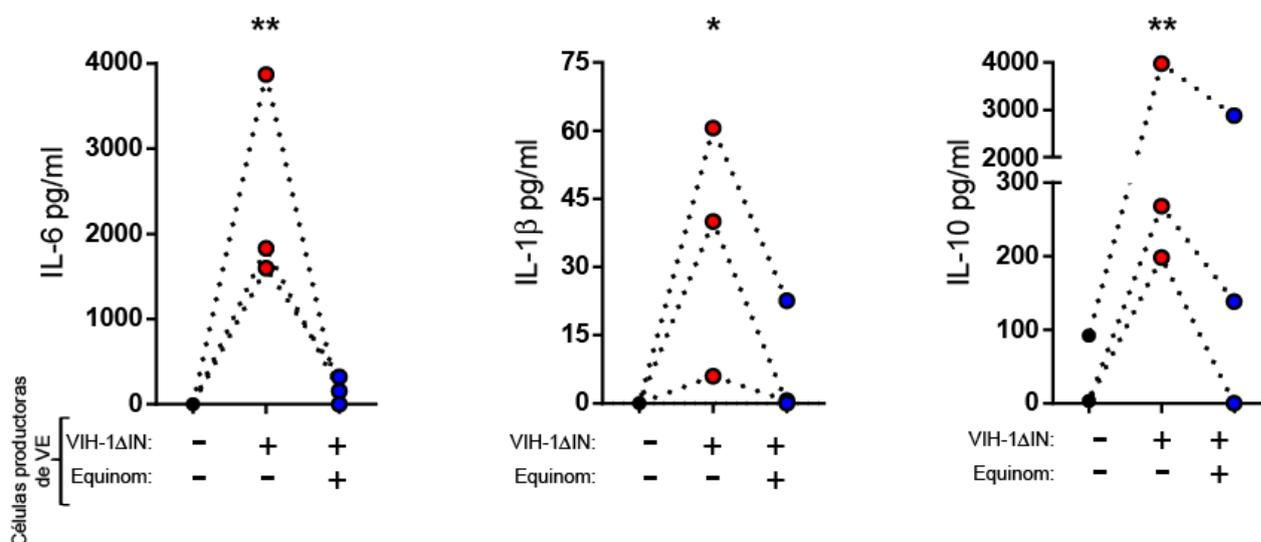
La producción de IL-6, IL-1β e IL-10 (Figura 41) fue inhibida significativamente cuando las células productoras de VEs fueron tratadas con MitoTEMPO, lo que sugiere que la producción mitocondrial de ROS en células T CD4+ es necesaria para la producción de VEs proinflamatoria.



**Figura 41. La producción de ROSmt es necesaria para la liberación de VE<sup>VIIH</sup> proinflamatorias.**

Células T CD4+ primarias fueron infectadas o no con VIH-1ΔIN y posteriormente fueron tratadas con MitoTEMPO (500μM). Como control negativo se utilizaron células sin infectar. Las vesículas extracelulares fueron purificadas al día 2 post-infección, y luego se añadieron a cultivos de macrófagos autólogos. La producción de IL6, IL-1β e IL-10 se midió a las 24 horas mediante ELISA.

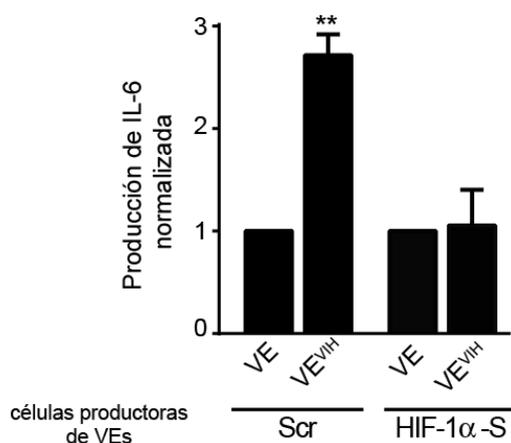
Para confirmar la participación de HIF-1α en la generación de VE proinflamatorias, las células T CD4+ infectadas con VIH-1ΔIN fueron tratadas con Equinomicina (Figura 40). Dos días después de la infección y la adición del inhibidor farmacológico, las VE<sup>VIIH</sup> fueron purificadas y posteriormente añadidas a cultivos de macrófagos. VE<sup>VIIH</sup> de células T CD4+ expuestas al vehículo desencadenaron la secreción de IL-6, IL-1β e IL-10. La inhibición de la actividad de HIF-1α en las células productoras de VE mediante el tratamiento con Equinomicina disminuyó significativamente la secreción de las citoquinas estudiadas (Figura 42).



**Figura 42. La actividad de HIF-1 $\alpha$  es necesaria para la liberación de VE<sup>VIH</sup> proinflamatorias.**

Células T CD4+ primarias fueron infectadas con VIH-1 $\Delta$ IN en presencia o no de Equinomicina (1nM). Como control negativo se utilizaron células sin infectar. Las vesículas extracelulares fueron purificadas 2<sup>do</sup> día post-infección y luego se añadieron a cultivos de macrófagos autólogos. La producción de IL6, IL-1 $\beta$  e IL-10 se midió a las 24 horas mediante ELISA.

Para confirmar los datos obtenidos previamente, se midió la producción de IL-6 de macrófagos expuestos a VE<sup>VIH</sup> producidas por células silenciadas para HIF-1 $\alpha$ . Los resultados obtenidos demostraron que la actividad de este factor de transcripción en las células T CD4+ es necesaria para la producción de VE proinflamatorias (Figura 43). En conjunto, nuestros resultados muestran que la actividad proinflamatoria las VE<sup>VIH</sup> es dependiente de HIF-1 $\alpha$ , tanto en las células productoras de VE como en las células receptoras de VE, estableciendo un novedoso vínculo entre infección por VIH-1, inducción de la actividad de HIF-1 $\alpha$  e inflamación mediada por VE.



**Figura 43. El silenciamiento de la expresión de HIF-1 $\alpha$  en células T CD4 + disminuye la secreción de VE proinflamatorias liberadas por células infectadas con VIH-1.**

Linfocitos T CD4+ fueron silenciados para HIF-1 $\alpha$  mediante transducción lentiviral y posteriormente infectados con VIH-1 $\Delta$ IN. Al 2<sup>do</sup> día post-infección las VE liberadas por células infectadas y no infectadas fueron purificadas y añadidas a cultivos de macrófagos autólogos. La producción de IL-6 por macrófagos expuestos a VE y VE<sup>VIH</sup> fue determinada al día siguiente por ELISA.

#### **Las vesículas extracelulares purificadas del plasma de individuos infectados con VIH-1 desencadenan la actividad de HIF-1 $\alpha$ e inflamación mediada por macrófagos**

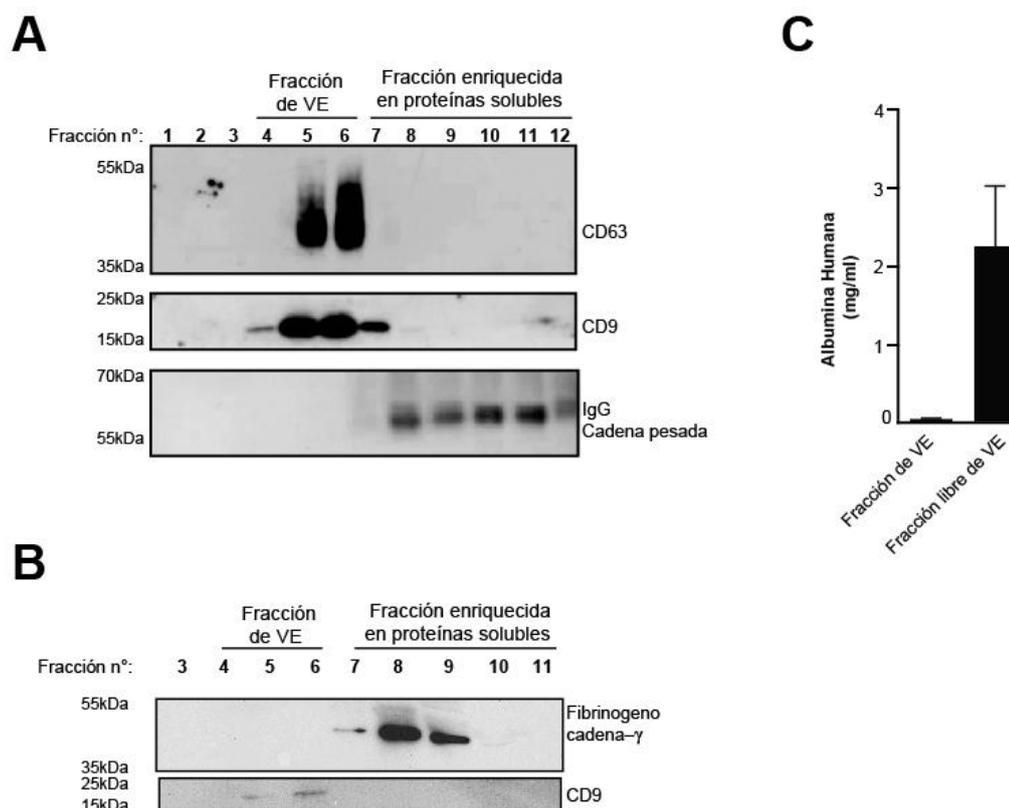
Con el fin de obtener una mayor comprensión de la relevancia fisiológica de los hallazgos obtenidos, se decidió aislar y analizar la función de las VE presentes en el plasma de individuos infectados con VIH-1. Las características de los pacientes analizados se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla 4.** Características clínicas del grupo de estudio.

<b>VIH+/cART</b>	<b>Edad</b>	<b>CD4%</b>	<b>N°CD4</b>	<b>Sexo</b>
00060	41	28	814	F
00061	35	43	1082	M
00062		16	495	
00063		40	540	
00072		33	524	
00073	28	44	863	F
00074	41	37	838	F
00078	24	34	712	M
00090	30	27	1028	M
00096	36			F
00097	21	26	674	M

El aislamiento de las vesículas extracelulares del plasma presenta ciertas dificultades debido a la presencia de proteínas y lipoproteínas. El aislamiento de las vesículas mediante centrifugación diferencial o ultracentrifugación con gradiente de densidad da como resultado el aislamiento de vesículas junto con contaminantes como los agregados de proteínas o la separación incompleta de las vesículas de las lipoproteínas. Teniendo en cuenta lo mencionado, las VE presentes en el plasma de individuos VIH-negativos y VIH-positivos fueron aisladas por cromatografía de exclusión por tamaño (*size-exclusion chromatography*, SEC) como es descrito en la sección “materiales y métodos” (Figura 9). Este protocolo permite obtener VE sin los contaminantes mencionados. Una vez procesadas las muestras mediante SEC, la presencia de VE en cada fracción se determinó por inmunoblot mediante la detección de los marcadores CD63 y CD9. La eficacia del proceso de purificación se comprobó analizando la presencia de componentes solubles del plasma. Las fracciones 4, 5 y 6 mostraron un enriquecimiento de los marcadores

CD63 y CD9 (Figura 44A). En cambio, estas fracciones fueron negativas para la presencia de las proteínas solubles IgG (Figura 44 A), fibrinógeno (Figura 44 B) y albúmina (Figura 44C). Por lo tanto, las fracciones enriquecidas en VE fueron agrupadas para ser utilizadas posteriormente en estudios funcionales.

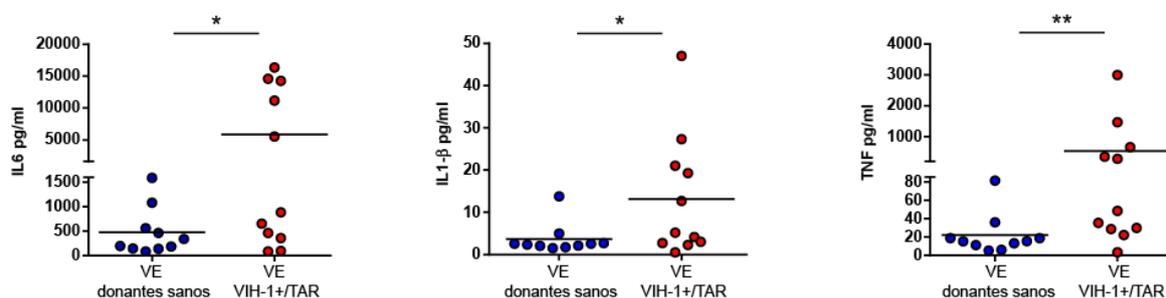


**Figura 44. Caracterización de VE purificadas a partir de plasma humano mediante cromatografía de exclusión por tamaño.**

(A-B) *Western blot* de las primeras 12 fracciones obtenidas a partir de cromatografía de exclusión por tamaño. Se identificaron las fracciones enriquecidas en VE a través de la presencia de los marcadores canónicos CD63 y CD9. Para evaluar la pureza de las fracciones obtenidas se determinó la presencia de las proteínas solubles del plasma IgG (A) y Fibrinógeno (B), las cuales fueron excluidas de las fracciones ricas en VE. (C) La pureza de las fracciones obtenidas se confirmó a través de la cuantificación de albúmina humana en las fracciones agrupadas de VE (fracciones 4-6) y en las fracciones libres de VE (fracciones 7-12).

Teniendo en cuenta que las partículas virales circulantes en plasma de individuos infectados con VIH-1 podrían co-purificar con las VE, decidimos utilizar suero de individuos bajo tratamiento antirretroviral (ARV) y con carga viral indetectable. Para analizar la actividad proinflamatoria de las

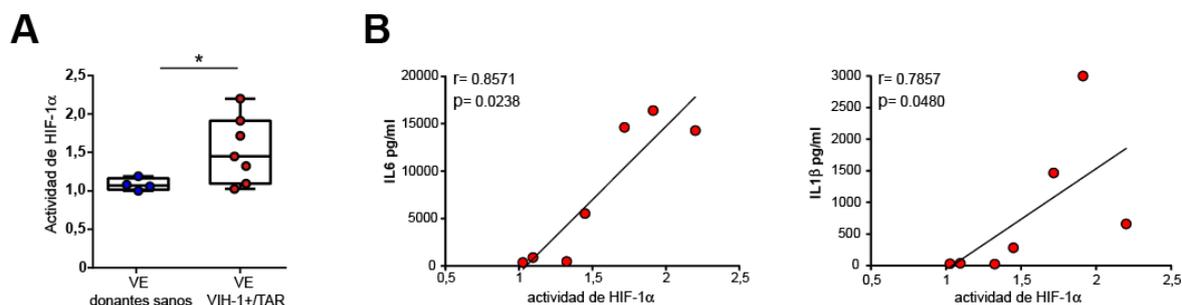
VE derivadas del plasma, las vesículas aisladas se incubaron con macrófagos durante 48h y la producción de citoquinas proinflamatorias se evaluó utilizando el kit comercial CBA. Se observó que las VEs de individuos infectados con VIH-1 indujeron un aumento significativo de la secreción de IL-6, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  (Figura 45), en comparación con las vesículas provenientes de donantes sanos. Estos resultados indican que durante la infección por VIH-1, las VE presentes en el plasma pueden desencadenar inflamación en macrófagos.



**Figura 45. Vesículas extracelulares del plasma de pacientes infectados con VIH-1 bajo tratamiento antirretroviral inducen la secreción de citoquinas en macrófagos.**

Vesículas extracelulares aisladas del plasma de donantes sanos o de individuos VIH-1+ fueron agregadas a macrófagos derivados de monocitos y la producción de las citoquinas proinflamatorias IL-6, IL1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  fue analizada mediante ELISA al día 2 después de la adición de las VEs.

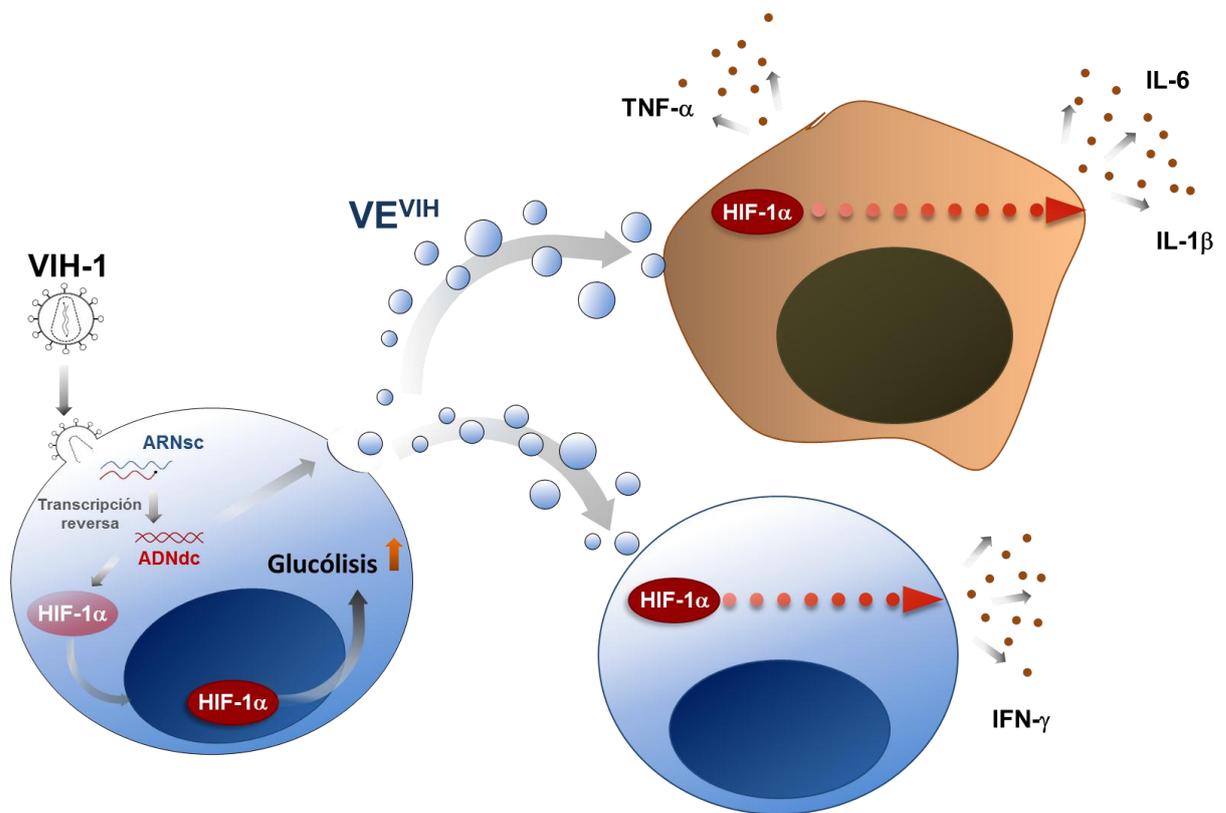
Teniendo en cuenta que la actividad proinflamatoria de las VEs producidas por células T CD4+ infectadas con VIH-1 *in vitro* depende de la inducción de la actividad de HIF-1 $\alpha$  en los macrófagos, se analizó la capacidad de las VE presentes en el plasma de individuos infectados con VIH-1 para activar la vía de HIF-1 $\alpha$  en la línea celular reportera HeLa-HRE GFP. Se observó que, al igual que las VEs producidas *in vitro* por células T CD4+ infectadas con VIH-1, las VEs aisladas del plasma de individuos infectados con VIH-1 desencadenaron la actividad de HIF-1 $\alpha$  (Figura 46 A). Además, los niveles de inducción de la actividad de HIF-1 $\alpha$  correlacionaron positivamente con la secreción de IL-6 e IL-1 $\beta$  (Figura 46 B), lo que sugiere que la inducción de la actividad de HIF-1 $\alpha$  por las VEs del plasma está asociada con la producción de estas citoquinas inflamatorias.



**Figura 46. Vesículas extracelulares del plasma de pacientes infectados con VIH-1 bajo tratamiento antirretroviral inducen el aumento de la actividad de HIF-1 $\alpha$ .**

(A) La capacidad de las VE aisladas del plasma de pacientes VIH-1+ y de donantes sanos para estimular la actividad de HIF-1 $\alpha$  se analizó utilizando la línea celular reportera HeLa HRE-GFP. Las VEs aisladas del plasma de individuos infectados con VIH-1 y donantes sanos fueron agregadas a la línea celular reportera y a las 48h la expresión de GFP dependiente de HIF-1 $\alpha$  se analizó por citometría de flujo. (B) Análisis de la correlación entre la capacidad de las VEs de pacientes VIH+ de promover la actividad de HIF-1 $\alpha$  y su capacidad de inducir la secreción de IL-6 e IL-1 $\beta$  en macrófagos.

En conjunto, los resultados obtenidos en la presente tesis demuestran que al inducir la producción de ROS mitocondrial, la infección por VIH-1 aumenta la actividad de HIF-1 $\alpha$ . La actividad aumentada de este factor de transcripción promueve la replicación viral y la liberación de VE<sup>VIH</sup> proinflamatorias, que a su vez estimulan la secreción de citoquinas inflamatorias por parte de macrófagos y células T CD4+ no infectadas (Figura 47).



**Figura 47. Las VE<sup>VIH</sup> de células T CD4+ infectadas con VIH-1 inducen una respuesta proinflamatoria en células *bystanders*.**

La detección de ácidos nucleicos derivados de VIH-1 desencadena la actividad de HIF-1 $\alpha$  y la liberación de VE inducidas por VIH-1 (VE<sup>VIH</sup>). A su vez, la absorción de VE<sup>VIH</sup> por parte de las células T CD4+ y los macrófagos, desencadena la secreción de IFN- $\gamma$  o IL-1 $\beta$  e IL-6 dependiente de HIF-1 $\alpha$ , respectivamente. Por lo tanto, este modelo propone que tanto HIF-1 $\alpha$  como VE<sup>VIH</sup> juegan un papel crítico en la promoción de la disfunción inmune y la inflamación durante la infección por VIH-1.

---

## Discusión

La infección por VIH-1 causa la depleción progresiva de linfocitos T CD4+, la cual, en ausencia de tratamiento, avanza hasta el desarrollo del Síndrome de Inmunodeficiencia Humana (SIDA). Si bien el estadio de SIDA representa una condición mortal, un conjunto creciente de fármacos antirretrovirales han permitido modificar el curso de la infección por VIH-1, permitiendo el control de la replicación viral de forma tal que la carga viral permanece en niveles indetectables y el número de linfocitos T CD4+ circulantes se acerca a los valores normales observados en individuos sanos. Por lo tanto, la terapia actual logra evitar el avance de la enfermedad al estadio de inmunodeficiencia, convirtiendo a la infección por VIH-1 en una patología crónica. Sin embargo, el tratamiento no permite erradicar el virus en su totalidad. En efecto, desde etapas tempranas de la infección, se establecen reservorios virales en diferentes células del sistema inmune, principalmente en linfocitos T CD4+ de memoria [34]. La presencia de estos reservorios determina que los pacientes deban permanecer bajo tratamiento antirretroviral de por vida, dado que si el mismo es interrumpido, la viremia aumenta rápidamente, alcanzando altos títulos.

En comparación con individuos sanos, los pacientes infectados con VIH-1, aún aquellos bajo tratamiento efectivo, presentan un aumento en la expresión de marcadores de activación inmune, y en particular de marcadores de inflamación. Se considera que la inflamación persistente en estos pacientes representa la base patogénica de un conjunto de enfermedades no relacionadas al SIDA, tales como cáncer, enfermedades cardiovasculares, neurológicas, óseas, hepáticas y renales [40, 145]. Este conjunto de enfermedades es significativamente más prevalente en pacientes infectados con VIH-1 que en el resto de la población. En este contexto, comprender los mecanismos responsables de la inflamación y activación inmune persistente resulta de suma importancia para la identificación de nuevos blancos terapéuticos que permitan contrarrestar estas patologías de base inflamatoria. Desde esta perspectiva, en la presente tesis doctoral se ha estudiado el papel que el Factor Inducible por Hipoxia 1-alfa y las vesículas extracelulares juegan

---

en el desarrollo de inflamación y en la activación inmune crónica en el contexto de la infección por VIH-1.

Los resultados de esta tesis doctoral se pueden resumir en tres conjuntos de datos principales. Primero, se demostró que los ácidos nucleicos virales, en particular el ADNdc generado durante la replicación del VIH-1, inducen la estimulación de la actividad de HIF-1 $\alpha$  dependiente de ROS mitocondrial en células T CD4+, promoviendo de esta manera la replicación del VIH-1. En segundo lugar, se observó que la inducción de HIF-1 $\alpha$  inducida por la infección por VIH-1 promueve la liberación de VEs con propiedades proinflamatorias. En tercer lugar, mostramos que las VEs aisladas del plasma de individuos VIH-1(+) bajo tratamiento antirretroviral, al interactuar con macrófagos, desencadenan la actividad de HIF-1 $\alpha$  y la producción de citoquinas proinflamatorias *ex vivo*. En conjunto, estos resultados posicionan a HIF-1 $\alpha$  y VE como actores clave en la patogénesis de la inflamación asociada a la infección por VIH-1.

El control de la actividad de HIF-1 $\alpha$  en células T CD4+ es un proceso complejo con numerosas instancias de regulación. Condiciones de hipoxia, la estimulación del TCR y ciertas citoquinas pueden desencadenar la actividad de este factor de transcripción [146]. Además, ha sido sugerido que el ROSmt generado durante la activación de células T también podría promover la estabilización y la actividad de HIF-1 $\alpha$ . Llamativamente, nuestros resultados contrastan con reportes previos que muestran que la proteína accesoria viral Vpr es responsable de desencadenar la expresión de HIF-1 $\alpha$  en células humanas microgliales [147]. Esta observación sugiere que los mecanismos responsables de desencadenar la actividad transcripcional de HIF-1 $\alpha$  durante la infección por VIH-1 dependen del tipo celular que se analiza. También hemos evaluado el papel de las proteínas virales Env y Nef, las cuales fueron reportadas por alterar distintas vías de señalización en células T CD4 [148, 149]. Sin embargo, ninguna de ellas intervino en la inducción de la actividad de HIF-1 $\alpha$ . El mismo resultado fue obtenido al evaluar si las proteínas estructurales (derivadas de Gag-Pol) participan en la activación de esta vía. Confirmamos que las proteínas accesorias y las proteínas estructurales expresadas por VIH-1 no participan en la activación de la vía de HIF-1 $\alpha$  al utilizar mutantes virales deficientes para dichas proteínas. Este

conjunto de resultados nos condujo a evaluar si un PAMP viral fue responsable de activar la vía de HIF-1 $\alpha$  en estas células. Si bien no existen reportes que describan que HIF-1 $\alpha$  pueda ser activado por PAMPs virales en linfocitos T CD4, trabajos previos indican que distintas moléculas de origen bacteriano pueden promover la expresión y actividad de HIF-1 $\alpha$  en macrófagos, ya sea como consecuencia de la activación de estas células o por acción directa del componente bacteriano estudiado (por ejemplo, por acción de sideróforos enterobacterianos) [74, 75]. Nuestros resultados demuestran que la presencia del ADN viral es suficiente para aumentar la actividad transcripcional de HIF-1 $\alpha$ , lo que sugiere que algún sensor podría detectarlo como un PAMP viral para activar una vía inflamatoria dependiente de HIF-1 $\alpha$ . Sorprendentemente, cuando transfectamos ADN exógeno sintético en la línea reportera HeLa-HRE, ésta mostró un aumento en la actividad transcripcional de HIF-1 $\alpha$ , sugiriendo que la detección de ADN y la consecuente activación de esta vía es un fenómeno no restrictivo a los ácidos nucleicos del VIH-1. A pesar de que fueron silenciados los dos sensores de ADNdc citosólico descritos en células T CD4+ en respuesta a la infección por VIH-1 (cGAS e IFI16) [150, 151], así como de la molécula integradora de la señalización a través de estos receptores, STING, la inducción de la actividad de HIF-1 $\alpha$  en respuesta a la infección por VIH-1 (y al ADNdc sintético) no fue alterada por el silenciamiento. Estas observaciones abren la posibilidad de que otro sensor de ADN citosólico sea responsable de detectar el ADNdc viral. Alternativamente, existe la posibilidad de que otra vía de detección, como la vía mediada por TLR, sea responsable de detectar el ADNdc generado durante la infección por VIH-1. En este sentido, Hong y colaboradores han demostrado que la estimulación de células T98G (una línea celular de glioblastoma) con análogos de ácidos nucleicos virales promueven la expresión transcripcional y traduccional de HIF-1 $\alpha$  [152], sin embargo, no describen el sensor encargado de promover la expresión de este factor de transcripción. Finalmente, a pesar de que el tratamiento con Efavirenz y Nevirapina, dos inhibidores de la TI viral, inhibe significativamente la inducción de HIF-1 $\alpha$  mediada por VIH-1, no podemos descartar por completo que el ARN viral contribuya a la promoción de la actividad de HIF-1 $\alpha$ .

A pesar de no haber identificado el sensor responsable de detectar el ADN viral, en este trabajo hemos podido avanzar en la comprensión del mecanismo por el cual este ácido nucleico induciría la actividad transcripcional de HIF-1 $\alpha$ . El ROS mitocondrial tiene la capacidad de promover la expresión y actividad de HIF-1 $\alpha$  [83], por lo que evaluamos si estas especies reactivas del O<sub>2</sub> participaban en los fenómenos descritos. Nuestros resultados demostraron que tanto el ADNc del VIH-1 como la transfección con el análogo de ADN viral poli(dA:dT) fueron capaces de estimular la producción de ROSmt, siendo este último necesario para activar la vía de HIF-1 $\alpha$ . Esto fue comprobado al abolir la inducción de HIF-1 $\alpha$  mediada por VIH-1 al utilizar un *scavenger* específico que inhibe la producción de ROSmt (MitoTempo). Las especies reactivas del O<sub>2</sub>, intervienen en varios procesos actuando como mensajeros intracelulares, siendo el ROSmt importante para mediar la activación de distintas moléculas asociadas a la mitocondria, por ejemplo las MAVS (*mitochondria-associated viral sensor*) [153]. Por lo tanto, postulamos que la detección citoplasmática de ADN viral y la producción de ROSmt podrían formar parte de un programa necesario para iniciar una respuesta antiviral. Esta hipótesis es lo suficientemente interesante para ser abordada en futuros estudios de nuestro grupo. Cabe destacar que se ha reportado previamente que células T CD4+ de pacientes infectados y células infectadas productivamente con VIH-1 poseen una mayor producción de ROS [154].

En esta tesis doctoral demostramos que, al inducir la producción de ROS mitocondrial, el ADNc citosólico generado durante la replicación del VIH-1 estimula la actividad de HIF-1 $\alpha$  en células T CD4+. Una de las consecuencias del incremento de la actividad de HIF-1 $\alpha$  es el de la promoción de la glicólisis aeróbica en los cultivos de células infectadas. Estos resultados son concordantes con reportes previos de nuestro grupo que muestran que pacientes infectados con VIH-1 poseen una mayor proporción de linfocitos T CD4+ Glut1+, y a su vez estas células poseen un metabolismo glicolítico aumentado [50]. Por otro lado, Hegedus y colaboradores reportaron que el VIH-1 induce el aumento de la glicólisis en linfocitos T CD4+ primarios, lo cual es necesario para una mayor producción de partículas virales *in vitro* [133]. En base a nuestros resultados y a bibliografía previa que demuestra que en otras infecciones virales el incremento de la glicólisis

aeróbica es necesaria para la biosíntesis de moléculas utilizadas para la producción de progenie viral [155, 156], postulamos que el requerimiento de HIF-1 $\alpha$  para la replicación del VIH-1 podría ser consecuencia de su actividad como regulador metabólico celular. Una opción alternativa es que este factor de transcripción promueve la transcripción de genes virales o factores celulares necesarios para la replicación viral. En este sentido, Deshmane y colaboradores han demostrado que en células humana microgliales [147] HIF-1 $\alpha$  puede unirse al LTR de VIH-1 promoviendo la transactivación y transcripción de genes virales. Independientemente de cuál sea el mecanismo por el cual HIF-1 $\alpha$  favorece la replicación viral, el incremento de la actividad de este factor de transcripción permitiría explicar, al menos parcialmente, los desórdenes metabólicos observados en células inmunes de pacientes infectados con VIH-1 [50, 133].

Otro resultado central de esta tesis, es la demostración de que el incremento de la actividad de HIF-1 $\alpha$  en células T CD4+ promueve la secreción de VE proinflamatorias. Estas VE inducidas por la infección viral son capaces de estimular la activación de HIF-1 $\alpha$  tanto en macrófagos como linfocitos T CD4+ no infectados. El aumento de la actividad de HIF-1 $\alpha$  en las células receptoras de VEs se asocia, a su vez, a un incremento en la actividad inflamatoria de estas células. Por lo tanto, **proponemos que HIF-1 $\alpha$  induce la formación de VEs que propagan estímulos inflamatorios desde células infectadas a otras células no infectadas del sistema inmune.** En este sentido, y otorgando mayor relevancia fisiológica a nuestros resultados, presentamos datos que muestran que las células T CD4+ aisladas de sangre de individuos infectados con VIH-1, expresan niveles elevados de HIF-1 $\alpha$ , en comparación con individuos sanos. Además, demostramos que las VEs aisladas del plasma de individuos infectados con VIH-1 desencadenan la actividad transcripcional de HIF-1 $\alpha$  en las células receptoras y, lo que es más importante, inducen la secreción de citoquinas proinflamatorias por parte de los macrófagos expuestos. Aunque el origen de las VEs del plasma con actividad pro-inflamatoria no fue determinado, es posible pensar que las células T CD4+ formarían parte de la población celular productora de VEs inflamatorias.

Las VEs pueden mediar diferentes tipos de procesos de comunicación intercelular al mediar la transferencia de ácidos nucleicos, lípidos y proteínas de una célula a otra [157]. Teniendo en

cuenta esta gran variedad de biomoléculas que las VE pueden transportar y “entregar” a la célula receptora, son varios los mecanismos que podrían participar en la inducción de la actividad de HIF-1 $\alpha$  en las células receptoras de vesículas proveniente de pacientes infectados o de células infectadas. En este sentido, una opción es que las VE transporten HIF-1 $\alpha$  en su interior y lo liberen en la célula aceptora, tal como ha sido descrito en células epiteliales que sobreexpresan el oncogén LMP1 [158]. Alternativamente, teniendo en cuenta que ha sido reportado que varios ARNm capaces de ser transducidos son empaquetados en VE [159], postulamos la posibilidad de que las VEs transporten y liberen en el citosol de la célula blanco el ARNm de HIF-1 $\alpha$ . Otra explicación alternativa es que las VEs transporten miARNs que regulen la expresión de HIF-1 $\alpha$  (por ejemplo miR-135 y miR-21[160] o de otros genes que regulan HIF-1 $\alpha$ , tal como ha sido descrito para miARNs secretados por células presentes en un microambiente hipóxico, [161]. Finalmente, las VEs podrían mediar la transferencia de ADNdc entre células [162].

La mayoría de los estudios mencionados arriba fueron realizados en células tumorales. Considerando que las células inmunes activadas comparten características metabólicas con células cancerosas, consideramos que es probable que algunos de estos mecanismos participen en la inducción de la actividad de HIF-1 $\alpha$  mediada por VEs secretadas por linfocitos T CD4+ infectados. Una perspectiva que surge a partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo es la de identificar qué componente/es presentes en las VEs serían responsables del aumento de la actividad de HIF-1 $\alpha$ . En este sentido, nuestro grupo de trabajo ha iniciado el análisis de la composición proteica y de miARNs en VEs purificadas del plasma de dadores sanos y dadores VIH-1(+). Estos estudios en curso permitirán comprender las bases mecánísticas de la inducción de HIF-1 $\alpha$  mediada por VE secretadas en el contexto de la infección por VIH-1.

Como fue mencionado, nuestros resultados no solo demuestran que VE<sup>VIH</sup> pueden inducir la actividad de HIF-1 $\alpha$  en las células blanco, sino que también presentamos evidencias de que la actividad de HIF-1 $\alpha$  en los linfocitos T CD4 infectados estimula la secreción de VE<sup>VIH</sup>. Estudios previos realizados en células tumorales han demostrado que en condiciones hipóxicas, HIF-1 $\alpha$  puede estimular la liberación de VE con actividad pro tumoral [163]. En efecto, en células de

cáncer de mama humano, HIF-1 $\alpha$  induce la secreción de VE dependientemente de Rab22. Estas VE, a su vez, promueven la formación de focos adherentes, invasión y metástasis [164]. Por lo tanto, estos estudios demuestran que un microambiente hipóxico, típicamente asociado a tumores, puede inducir la producción y modular la funcionalidad de exosomas y otras VE. En sintonía con estas observaciones, nuestros resultados muestran que la inducción de la actividad de HIF-1 $\alpha$  por el ADNdc derivado de VIH-1 promueve la producción de VEs con una notoria actividad proinflamatoria. A su vez, demostramos que la actividad de HIF-1 $\alpha$  es dependiente de ROSmt, por lo que la inhibición farmacológica de esta especie reactiva de O<sub>2</sub>, o la inhibición de HIF-1 $\alpha$  en células T CD4+ infectadas, abolió la producción de VE capaces de promover la secreción de citoquinas proinflamatorias en macrófagos. En conjunto, nuestros datos podrían indicar que en respuesta a una infección viral, los linfocitos T CD4 producen ROSmt que, a su vez, induciría la actividad de HIF-1 $\alpha$  con la consecuente liberación de VE con capacidad proinflamatoria, transmitiendo un “mensaje de alerta” a células no infectadas. Así como la actividad de HIF-1 $\alpha$  es necesaria para la producción de VE pro-inflamatoria, la inducción de la actividad de HIF-1 $\alpha$  en las células receptoras de VE es necesaria para la secreción de citoquinas proinflamatorias. De hecho, la inhibición farmacológica de la actividad de HIF-1 $\alpha$  en las células receptoras de VE<sup>VIH</sup> abrogó la secreción de IFN- $\gamma$  por parte de las células T CD4+ y de IL-1 $\beta$  e IL-6 por parte de los macrófagos. Por lo tanto, **proponemos que la inducción de la actividad de HIF-1 $\alpha$  en macrófagos *bystanders* mediada por VE durante el curso de la infección por VIH-1 podría desempeñar un papel relevante en la respuesta inflamatoria crónica sostenida y en las complicaciones no relacionadas con el SIDA de individuos VIH-1+.**

Nuestros resultados demostrando el papel crítico de HIF-1 $\alpha$  en la producción de citoquinas pro-inflamatorias por parte de macrófagos son consistentes con reportes previos que posicionan a HIF-1 $\alpha$  como un elemento clave en la respuesta inmune ante patógenos [165]. HIF-1 $\alpha$  es requerido para la destrucción de los patógenos fagocitados [166], y para la producción de citoquinas, quimioquinas y moléculas antimicrobianas [76, 167, 168]. Por lo tanto, en el contexto de una infección, los genes blanco de HIF-1 $\alpha$  en macrófagos se pueden dividir en dos categorías:

i) genes involucrados en la producción de mediadores solubles que reclutan y activan otras poblaciones de células inmunitarias; ii) genes que participan en la regulación de la actividad microbicida. En este trabajo mostramos que las VE<sup>VIH</sup> estarían implicadas en la modulación genes de la primera categoría. Si las VE<sup>VIH</sup> pueden modular la actividad microbicida de macrófagos expuestos a éstas, es una pregunta relevante que está siendo abordada actualmente por nuestro grupo.

En conjunto, los datos obtenidos indican que el ADNdc generado por la infección por VIH-1 es responsable de desencadenar la respuesta mediada por ROSmt/HIF-1 $\alpha$ /VE. Un conjunto de evidencias nos permitió situar al ADNdc como disparador de esta respuesta celular. De manera resumida, la actividad de HIF-1 $\alpha$  es promovida por: i) VLPs derivadas de VIH-1 que portan ARN capaz de transcribirse de forma inversa, pero no por VLPs desprovistas de ácidos nucleicos; ii) la infección de un virus mutante que no expresa la integrasa (VIH-1 $\Delta$ IN), por lo que puede transcribir de forma inversa el ARN viral pero no produce progenie viral; iii) la transfección con ADNdc sintético poli(dA:dT). Además, demostramos que los inhibidores de la TI, Efavirenz y Nevirapina, anulan la respuesta inducida por la infección, lo que respalda aún más la idea de que el ADN transcrito de forma inversa es el principal desencadenante de la actividad de HIF-1 $\alpha$ . Una pregunta que no pudo dilucidarse en esta tesis, es la referente a cuál es la vía responsable de detectar el ADN generado en las células infectadas. Sin duda, esta pregunta amerita ser investigada.

Comprender las causas que expliquen los elevados niveles de marcadores de inflamación sistémica en individuos VIH-1(+) resulta de máxima relevancia, dado que diversos estudios indican que los mismos son predictores de morbilidad y mortalidad [40, 169, 170], cumpliendo la inflamación un importante papel en la patogénesis de esta infección. En este sentido, ha sido reportado que los pacientes infectados con VIH-1 presentan niveles aumentados de LPS circulante y que este PAMP bacteriano es responsable de activar monocitos y macrófagos, contribuyendo así a la inflamación crónica [43]. En línea con estudios que buscan otros elementos implicados en la inflamación crónica durante la infección con VIH-1, los resultados presentados en este trabajo demuestran un papel fundamental y novedoso del ADNdc viral, del ROSmt y de HIF-

1 $\alpha$ . Sorprendentemente, se observó la presencia de VE proinflamatorias en el plasma de pacientes infectados con VIH-1 a pesar de estar sometidos eficazmente al tratamiento antirretroviral. Estas VE podrían ser responsables de sostener los niveles elevados de HIF-1 $\alpha$  observados en las células T CD4 + circulantes.

Informes recientes han demostrado que, incluso en pacientes en los que la carga viral es indetectable, la replicación activa del VIH-1 tiene lugar en órganos linfoides secundarios [171]. Aunque desconocemos la causa responsable de los niveles elevados de HIF-1 $\alpha$  en células T CD4+ de pacientes VIH-1(+) bajo tratamiento ARV, una explicación posible es que la replicación persistente de VIH-1 durante el tratamiento sea suficiente para sostener los niveles elevados de HIF-1 $\alpha$  en células T CD4+ y de VEs proinflamatorias a lo largo del tiempo. Independientemente de cuál sea la razón por la que la actividad de HIF-1 $\alpha$  persiste en el tiempo, nuestros resultados convierten a HIF-1 $\alpha$  en un atractivo blanco terapéutico. Hoy en día se están realizando grandes esfuerzos para inhibir la actividad de este factor de transcripción para combatir enfermedades como el cáncer. Explorar el efecto de estos inhibidores en pacientes infectados con VIH-1 y con altos niveles de inflamación podría ser una alternativa interesante.

En conclusión, la presente tesis muestra que HIF-1 $\alpha$  participan activamente en la patogénesis del VIH-1. En primer lugar, a través de la promoción de la replicación viral y en segundo lugar fomentando una respuesta inflamatoria en linfocitos T CD4+ y macrófagos no infectados. Nuestros resultados nos acercan al mecanismo por el cual esto ocurre. Hemos podido demostrar que el ADN viral induce la actividad de HIF-1 $\alpha$  a través de la producción de ROSmt, y a su vez, promueve la liberación de VEs. Estas VE a su vez inducen la secreción de citoquinas proinflamatorias luego de su interacción con linfocitos T CD4+ y con macrófagos no infectados, pudiendo participar en la inflamación crónica observada en pacientes. El hecho de que VEs de pacientes infectados posean propiedades similares fortalece esta idea. La modulación de la producción de ROSmt o de la actividad de HIF-1 $\alpha$  en individuos infectados con VIH-1 tratados con ARVs podría representar una estrategia terapéutica para contrarrestar la inflamación durante la infección por VIH-1, reduciendo así el riesgo de desarrollar eventos graves no relacionados con el SIDA.

### Conclusiones y perspectivas

Los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral permitieron identificar el papel de HIF-1 $\alpha$  en dos aspectos principales de la patogenia del VIH-1:

- 1- Como un factor necesario para la replicación viral.
- 2- Como promotor de inflamación.

Si bien se caracterizó el papel de HIF-1 $\alpha$  en la promoción de inflamación a través de la generación de vesículas extracelulares por parte de células infectadas, el contenido de las vesículas responsable de inducir inflamación no fue analizado, siendo un interrogante que amerita ser abordado. En este sentido, proponemos investigar la composición de las VE pro-inflamatorias, así como también iniciar estudios destinados a identificar en la célula receptora (macrófagos y linfocitos T CD4+ por ejemplo) el sensor que reconocería ese elemento proinflamatorio contenida en las vesículas liberadas. Teniendo en cuenta lo antedicho se proponen las siguientes perspectivas:

- 1- Caracterizar la composición bioquímica, en particular los miARNs y proteínas, de las vesículas liberadas por células infectadas con VIH-1 y vesículas presentes en el plasma de pacientes infectados. Estos estudios se realizarán en colaboración con dos grupos referentes en la temática a nivel internacional: el contenido de miARN se analizará en el laboratorio del Dr. Witwer (Universidad de Johns Hopkins, EEUU), y las proteínas en el grupo liderado por la Dra. Thery (Instituto Curie, Francia).
- 2- Identificar en las células receptoras de VEs cuáles son los sensores que participan en la detección de los PAMPs presentes en las VEs liberadas por células infectadas y/o por las VE del plasma. Para ello se silenciarán distintos RRP (por ejemplo, TLRs, IFI16, RIG-1, etc) por transducción lentiviral en Macrófagos expuestos a VE.

Los resultados de esta tesis de doctorado fueron presentados en congresos nacionales e internacionales, incluyendo una presentación oral en el congreso internacional de SIDA (9th IAS Conference on HIV Science-2017) y fueron publicados en:

Duette G, Pereyra Gerber P, Rubione J, Perez PS, Landay AL, Crowe SM, Liao Z, Witwer KW, Holgado MP, Salido J, Geffner J, Sued O, Palmer CS, Ostrowski M. **Induction of HIF-1 $\alpha$  by HIV-1 Infection in CD4+ T Cells Promotes Viral Replication and Drives Extracellular Vesicle-Mediated Inflammation.** MBio. 2018 Sep 11;9(5). pii: e00757-18. doi: 10.1128/mBio.00757-18 [172].

### Agradecimientos

La vida puede resumirse como la sumatoria de momentos y afortunadamente atesoro varios en recuerdos colmados de alegría. Éste es uno de ellos. Todo lo que uno construye es gracias al aporte de la gente que nos rodea, por lo que me siento sumamente agradecido de estar unido a seres queridos que me ayudaron a construir este feliz momento. Sería muy injusto jerarquizar el orden de las personas que nombro en esta sección, por lo que simplemente voy a empezar a nombrarlas sin ningún orden premeditado:

**A mi familia toda.** No podría terminar de plasmar en palabras todo lo que ellos significan para mí, y lo que hicieron por mí para que hoy pueda cumplir uno de mis objetivos (sueños) más importantes de vida. Tal vez sin terminar de entender a éste “bicho raro” que decidió elegir un camino poco convencional y comprendido solamente por aquellos que tienen la suerte de hacer lo que aman. Mamá, Viejo, Tincho, Abuela, José, tía Elva... todos, infinitamente gracias!!!

A los maestros que me mostraron el camino que ellos transitaron al hacer ciencia, enseñándome a crear el propio. Entre ellos principalmente quiero agradecerle **Mati**, porque sos (y serás) el mentor que me mostró lo apasionante que es hacer investigación, representando la figura del científico que uno sueña ser, sin olvidar la parte humana ayudándome cada vez que lo necesité. Gracias por el valioso tiempo que invertiste en mi formación y por confiar en mí!!! Como parte de mi agradecimiento, te dedico esta tesis que considero es producto de una interacción sinérgica entre ambos.

Entre mis maestros no quiero dejar de mencionar **al Tano**, y a **Mauri** que me enseñaron a dar mis primeros pasos como científico.

A mis compañeros de grupo, que en realidad no son compañeros, porque se convirtieron en amigos. Gracias **Juli** y **Pehuén!!!** Por hacer que el ir a “trabajar” sea placentero, y por ayudarme tan desinteresadamente día a día. Creo que no hace falta mencionar que voy a extrañar

muchísimo el tener una vecina de oficina como la que tengo. Gracias Pau, Alan y Albert por ayudarme y acompañarme en esta última etapa.

A **Horacio** por abrirme las puertas del “CNRS” hace ya 8 años, y permitirme desarrollar esta tesis en un lugar tan especial.

A todo el INBIRS. Gracias amigos por crear momentos inolvidables dentro y fuera de nuestro querido instituto!! Gracias a los que están hoy y los que han pasado por el labo dejando su huella para siempre. Disculpen por no nombrarlos, pero afortunadamente son muchos, y realmente los aprecio como para pecar olvidándome de nombrar a alguno. De igual forma, me gustaría mencionar particularmente a dos personas: al **Pola** y a **Marianito**, porque tal vez ellos no sean consiente de lo importante que fue su ayuda en un momento muy difícil de mi vida, debiéndoles el estar hoy acá, escribiendo los agradecimientos de una tesis doctoral.

A vos **Pi!!!** Que sos la compañera que afortunadamente la vida me regaló, la compañera que me aguantó en los momentos buenos, pero también en los momentos más difíciles, haciendo que la carga no sea tan pesada. Gracias por ayudarme a transitar este camino y acompañarme en el camino lleno de incertidumbres que se nos está mostrando. Merci!!

**GRACIAS!!!**

---

**Bibliografía**

1. UNAIDS, *Global AIDS Update*. 2016.
2. Centers for Disease, C., *Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men--New York City and California*. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 1981. **30**(25): p. 305-8.
3. Hymes, K.B., et al., *Kaposi's sarcoma in homosexual men-a report of eight cases*. Lancet, 1981. **2**(8247): p. 598-600.
4. Barre-Sinoussi, F., et al., *Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)*. Science, 1983. **220**(4599): p. 868-71.
5. Gallo, R.C., et al., *Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS*. Science, 1984. **224**(4648): p. 500-3.
6. Gallo, R.C., et al., *Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS)*. Science, 1983. **220**(4599): p. 865-7.
7. Levy, J.A., et al., *Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS*. Science, 1984. **225**(4664): p. 840-2.
8. Ratner, L., R.C. Gallo, and F. Wong-Staal, *HTLV-III, LAV, ARV are variants of same AIDS virus*. Nature, 1985. **313**(6004): p. 636-7.
9. Clavel, F., et al., *Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS*. Science, 1986. **233**(4761): p. 343-6.
10. Kong, L.I., et al., *West African HIV-2-related human retrovirus with attenuated cytopathicity*. Science, 1988. **240**(4858): p. 1525-9.
11. Pancera, M., et al., *Structure of HIV-1 gp120 with gp41-interactive region reveals layered envelope architecture and basis of conformational mobility*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(3): p. 1166-71.
12. Hoffman, R., Kamps, HIV Medicine, 2006.
13. Karlsson Hedestam, G.B., et al., *The challenges of eliciting neutralizing antibodies to HIV-1 and to influenza virus*. Nat Rev Microbiol, 2008. **6**(2): p. 143-55.
14. Coffin, J.M., S.H. Hughes, and H.E. Varmus, *The Interactions of Retroviruses and their Hosts*. 1997.
15. Peterlin, B.M. and D. Trono, *Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(2): p. 97-107.
16. Li, L., et al., *Roles of HIV-1 auxiliary proteins in viral pathogenesis and host-pathogen interactions*. Cell Res, 2005. **15**(11-12): p. 923-34.
17. Lever, A.M. and K.T. Jeang, *Replication of human immunodeficiency virus type 1 from entry to exit*. Int J Hematol, 2006. **84**(1): p. 23-30.
18. Choe, H., et al., *The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates*. Cell, 1996. **85**(7): p. 1135-48.
19. Dragic, T., et al., *HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5*. Nature, 1996. **381**(6584): p. 667-73.
20. Chan, D.C. and P.S. Kim, *HIV entry and its inhibition*. Cell, 1998. **93**(5): p. 681-4.
21. Sherman, M.P. and W.C. Greene, *Slipping through the door: HIV entry into the nucleus*. Microbes Infect, 2002. **4**(1): p. 67-73.
22. Flint SJ, E.L., Krug RM, Racaniello RM, Skalka AM, *Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis and Control*. ASM Press, 2004.

23. Alcami, J. and M. Coiras, [*Immunopathogenesis of HIV infection*]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2011. **29**(3): p. 216-26.
24. Gil, J., M. Bermejo, and J. Alcami, *HIV and apoptosis: a complex interaction between cell death and virus survival*. *Prog Mol Subcell Biol*, 2004. **36**: p. 117-49.
25. Doitsh, G., et al., *Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection*. *Nature*, 2014. **505**(7484): p. 509-14.
26. Li, Q., et al., *Peak SIV replication in resting memory CD4+ T cells depletes gut lamina propria CD4+ T cells*. *Nature*, 2005. **434**(7037): p. 1148-52.
27. Zhang, Z., et al., *Sexual transmission and propagation of SIV and HIV in resting and activated CD4+ T cells*. *Science*, 1999. **286**(5443): p. 1353-7.
28. Haase, A.T., *Perils at mucosal front lines for HIV and SIV and their hosts*. *Nat Rev Immunol*, 2005. **5**(10): p. 783-92.
29. Hu, J., M.B. Gardner, and C.J. Miller, *Simian immunodeficiency virus rapidly penetrates the cervicovaginal mucosa after intravaginal inoculation and infects intraepithelial dendritic cells*. *J Virol*, 2000. **74**(13): p. 6087-95.
30. Miller, C.J., et al., *Propagation and dissemination of infection after vaginal transmission of simian immunodeficiency virus*. *J Virol*, 2005. **79**(14): p. 9217-27.
31. Cohen MS, A.J., Swanstrom R *Acute HIV Infection: Implications for HIV Spread, Disease Progression, and Vaccine Development*. . *HIV Molecular Immunology* 2005.
32. Hel, Z., J.R. McGhee, and J. Mestecky, *HIV infection: first battle decides the war*. *Trends Immunol*, 2006. **27**(6): p. 274-81.
33. Mehandru, S., et al., *Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract*. *J Exp Med*, 2004. **200**(6): p. 761-70.
34. Chun, T.W., et al., *Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4(+) T cells during primary HIV-1 infection*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(15): p. 8869-73.
35. Ruelas, D.S. and W.C. Greene, *An integrated overview of HIV-1 latency*. *Cell*, 2013. **155**(3): p. 519-29.
36. Margolis, D.M., et al., *Latency reversal and viral clearance to cure HIV-1*. *Science*, 2016. **353**(6297): p. aaf6517.
37. Deeks, S.G., *HIV: Shock and kill*. *Nature*, 2012. **487**(7408): p. 439-40.
38. Deeks, S.G., et al., *Trends in multidrug treatment failure and subsequent mortality among antiretroviral therapy-experienced patients with HIV infection in North America*. *Clin Infect Dis*, 2009. **49**(10): p. 1582-90.
39. Deeks, S.G., *HIV infection, inflammation, immunosenescence, and aging*. *Annu Rev Med*, 2011. **62**: p. 141-55.
40. Deeks, S.G., R. Tracy, and D.C. Douek, *Systemic effects of inflammation on health during chronic HIV infection*. *Immunity*, 2013. **39**(4): p. 633-45.
41. Brenchley, J.M., et al., *CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract*. *J Exp Med*, 2004. **200**(6): p. 749-59.
42. Macal, M., et al., *Effective CD4+ T-cell restoration in gut-associated lymphoid tissue of HIV-infected patients is associated with enhanced Th17 cells and polyfunctional HIV-specific T-cell responses*. *Mucosal Immunol*, 2008. **1**(6): p. 475-88.
43. Brenchley, J.M., et al., *Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection*. *Nat Med*, 2006. **12**(12): p. 1365-71.
44. Burdo, T.H., et al., *Soluble CD163 made by monocyte/macrophages is a novel marker of HIV activity in early and chronic infection prior to and after anti-retroviral therapy*. *J Infect Dis*, 2011. **204**(1): p. 154-63.
45. Hunt, P.W., *HIV and inflammation: mechanisms and consequences*. *Curr HIV/AIDS Rep*, 2012. **9**(2): p. 139-47.

46. Jiang, X., et al., *Dynamics of an HIV-1 therapy model of fighting a virus with another virus*. J Biol Dyn, 2009. **3**(4): p. 387-409.
47. Mavigner, M., et al., *Altered CD4+ T cell homing to the gut impairs mucosal immune reconstitution in treated HIV-infected individuals*. J Clin Invest, 2012. **122**(1): p. 62-9.
48. Mehandru, S., et al., *Lack of mucosal immune reconstitution during prolonged treatment of acute and early HIV-1 infection*. PLoS Med, 2006. **3**(12): p. e484.
49. Palmer, C.S., et al., *Glucose Metabolism in T Cells and Monocytes: New Perspectives in HIV Pathogenesis*. EBioMedicine, 2016. **6**: p. 31-41.
50. Palmer, C.S., et al., *Increased glucose metabolic activity is associated with CD4+ T-cell activation and depletion during chronic HIV infection*. AIDS, 2014. **28**(3): p. 297-309.
51. Warburg, O., *On the origin of cancer cells*. Science, 1956. **123**(3191): p. 309-14.
52. Koppenol, W.H., P.L. Bounds, and C.V. Dang, *Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(5): p. 325-37.
53. Warburg, O., K. Gawehn, and A.W. Geissler, *[Metabolism of leukocytes]*. Z Naturforsch B, 1958. **13B**(8): p. 515-6.
54. Nelson, D., and Cox, M., *Lehninger Principles of Biochemistry (4th Ed.)*. 2006.
55. MacIver, N.J., R.D. Michalek, and J.C. Rathmell, *Metabolic regulation of T lymphocytes*. Annu Rev Immunol, 2013. **31**: p. 259-83.
56. Shi, L.Z., et al., *HIF1alpha-dependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of TH17 and Treg cells*. J Exp Med, 2011. **208**(7): p. 1367-76.
57. Palazon, A., et al., *HIF transcription factors, inflammation, and immunity*. Immunity, 2014. **41**(4): p. 518-28.
58. Frauwirth, K.A. and C.B. Thompson, *Regulation of T lymphocyte metabolism*. J Immunol, 2004. **172**(8): p. 4661-5.
59. Dang, E.V., et al., *Control of T(H)17/T(reg) balance by hypoxia-inducible factor 1*. Cell, 2011. **146**(5): p. 772-84.
60. Semenza, G.L., *Regulation of metabolism by hypoxia-inducible factor 1*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2011. **76**: p. 347-53.
61. Semenza, G.L., *Oxygen sensing, hypoxia-inducible factors, and disease pathophysiology*. Annu Rev Pathol, 2014. **9**: p. 47-71.
62. Takubo, K., et al., *Regulation of the HIF-1alpha level is essential for hematopoietic stem cells*. Cell Stem Cell, 2010. **7**(3): p. 391-402.
63. Semenza, G.L., et al., *Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1*. J Biol Chem, 1996. **271**(51): p. 32529-37.
64. Wang, G.L., et al., *Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O2 tension*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(12): p. 5510-4.
65. Wenger, R.H., D.P. Stiehl, and G. Camenisch, *Integration of oxygen signaling at the consensus HRE*. Sci STKE, 2005. **2005**(306): p. re12.
66. Arany, Z., et al., *An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(23): p. 12969-73.
67. Cramer, T., et al., *HIF-1alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation*. Cell, 2003. **112**(5): p. 645-57.
68. Walmsley, S.R., et al., *Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1alpha-dependent NF-kappaB activity*. J Exp Med, 2005. **201**(1): p. 105-15.
69. Jantsch, J., et al., *Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 alpha modulate lipopolysaccharide-induced dendritic cell activation and function*. J Immunol, 2008. **180**(7): p. 4697-705.

70. McNamee, E.N., et al., *Hypoxia and hypoxia-inducible factors as regulators of T cell development, differentiation, and function*. Immunol Res, 2013. **55**(1-3): p. 58-70.
71. Haschemi, A., et al., *The sedoheptulose kinase CARKL directs macrophage polarization through control of glucose metabolism*. Cell Metab, 2012. **15**(6): p. 813-26.
72. Konisti, S., S. Kiriakidis, and E.M. Paleolog, *Hypoxia--a key regulator of angiogenesis and inflammation in rheumatoid arthritis*. Nat Rev Rheumatol, 2012. **8**(3): p. 153-62.
73. Peyssonnaud, C., et al., *HIF-1alpha expression regulates the bactericidal capacity of phagocytes*. J Clin Invest, 2005. **115**(7): p. 1806-15.
74. Hartmann, H., et al., *Hypoxia-independent activation of HIF-1 by enterobacteriaceae and their siderophores*. Gastroenterology, 2008. **134**(3): p. 756-67.
75. Blouin, C.C., et al., *Hypoxic gene activation by lipopolysaccharide in macrophages: implication of hypoxia-inducible factor 1alpha*. Blood, 2004. **103**(3): p. 1124-30.
76. Rius, J., et al., *NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha*. Nature, 2008. **453**(7196): p. 807-11.
77. Ikejiri, A., et al., *Dynamic regulation of Th17 differentiation by oxygen concentrations*. Int Immunol, 2012. **24**(3): p. 137-46.
78. Nakamura, H., et al., *TCR engagement increases hypoxia-inducible factor-1 alpha protein synthesis via rapamycin-sensitive pathway under hypoxic conditions in human peripheral T cells*. J Immunol, 2005. **174**(12): p. 7592-9.
79. Wang, H., et al., *Negative regulation of Hif1a expression and TH17 differentiation by the hypoxia-regulated microRNA miR-210*. Nat Immunol, 2014. **15**(4): p. 393-401.
80. Doedens, A.L., et al., *Hypoxia-inducible factors enhance the effector responses of CD8(+) T cells to persistent antigen*. Nat Immunol, 2013. **14**(11): p. 1173-82.
81. Finlay, D.K., et al., *PDK1 regulation of mTOR and hypoxia-inducible factor 1 integrate metabolism and migration of CD8+ T cells*. J Exp Med, 2012. **209**(13): p. 2441-53.
82. Wang, Y., et al., *Targeting HIF1alpha eliminates cancer stem cells in hematological malignancies*. Cell Stem Cell, 2011. **8**(4): p. 399-411.
83. Sena, L.A., et al., *Mitochondria are required for antigen-specific T cell activation through reactive oxygen species signaling*. Immunity, 2013. **38**(2): p. 225-36.
84. Bonello, S., et al., *Reactive oxygen species activate the HIF-1alpha promoter via a functional NFkappaB site*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(4): p. 755-61.
85. Masson, N., et al., *The FIH hydroxylase is a cellular peroxide sensor that modulates HIF transcriptional activity*. EMBO Rep, 2012. **13**(3): p. 251-7.
86. Yoo, Y.G., et al., *Hepatitis B virus X protein enhances transcriptional activity of hypoxia-inducible factor-1alpha through activation of mitogen-activated protein kinase pathway*. J Biol Chem, 2003. **278**(40): p. 39076-84.
87. Cai, Q., et al., *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latent protein LANA interacts with HIF-1 alpha to upregulate RTA expression during hypoxia: Latency control under low oxygen conditions*. J Virol, 2006. **80**(16): p. 7965-75.
88. Kondo, S., et al., *EBV latent membrane protein 1 up-regulates hypoxia-inducible factor 1alpha through Siah1-mediated down-regulation of prolyl hydroxylases 1 and 3 in nasopharyngeal epithelial cells*. Cancer Res, 2006. **66**(20): p. 9870-7.
89. Deshmane, S.L., et al., *Activation of the oxidative stress pathway by HIV-1 Vpr leads to induction of hypoxia-inducible factor 1alpha expression*. J Biol Chem, 2009. **284**(17): p. 11364-73.
90. Pina-Oviedo, S., K. Khalili, and L. Del Valle, *Hypoxia inducible factor-1 alpha activation of the JCV promoter: role in the pathogenesis of progressive multifocal leukoencephalopathy*. Acta Neuropathol, 2009. **118**(2): p. 235-47.
91. Raposo, G. and W. Stoorvogel, *Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends*. J Cell Biol, 2013. **200**(4): p. 373-83.

92. Yanez-Mo, M., et al., *Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions*. J Extracell Vesicles, 2015. **4**: p. 27066.
93. Huotari, J. and A. Helenius, *Endosome maturation*. EMBO J, 2011. **30**(17): p. 3481-500.
94. Ostrowski, M., et al., *Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway*. Nat Cell Biol, 2010. **12**(1): p. 19-30; sup pp 1-13.
95. Bhatnagar, S., et al., *Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response in vitro and in vivo*. Blood, 2007. **110**(9): p. 3234-44.
96. Skokos, D., et al., *Mast cell-derived exosomes induce phenotypic and functional maturation of dendritic cells and elicit specific immune responses in vivo*. J Immunol, 2003. **170**(6): p. 3037-45.
97. MacKenzie, A., et al., *Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding*. Immunity, 2001. **15**(5): p. 825-35.
98. Pizzirani, C., et al., *Stimulation of P2 receptors causes release of IL-1beta-loaded microvesicles from human dendritic cells*. Blood, 2007. **109**(9): p. 3856-64.
99. Robbins, P.D. and A.E. Morelli, *Regulation of immune responses by extracellular vesicles*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(3): p. 195-208.
100. Peters, P.J., et al., *Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes*. J Exp Med, 1991. **173**(5): p. 1099-109.
101. Monleon, I., et al., *Differential secretion of Fas ligand- or APO2 ligand/TNF-related apoptosis-inducing ligand-carrying microvesicles during activation-induced death of human T cells*. J Immunol, 2001. **167**(12): p. 6736-44.
102. Zuccato, E., et al., *Sorting of Fas ligand to secretory lysosomes is regulated by mono-ubiquitylation and phosphorylation*. J Cell Sci, 2007. **120**(Pt 1): p. 191-9.
103. Munich, S., et al., *Dendritic cell exosomes directly kill tumor cells and activate natural killer cells via TNF superfamily ligands*. Oncoimmunology, 2012. **1**(7): p. 1074-1083.
104. Zhang, H., et al., *New insight into the structures and formation of anthocyanic vacuolar inclusions in flower petals*. BMC Plant Biol, 2006. **6**: p. 29.
105. Anderson, H.C., D. Mulhall, and R. Garimella, *Role of extracellular membrane vesicles in the pathogenesis of various diseases, including cancer, renal diseases, atherosclerosis, and arthritis*. Lab Invest, 2010. **90**(11): p. 1549-57.
106. Chugh, P.E., et al., *Systemically circulating viral and tumor-derived microRNAs in KSHV-associated malignancies*. PLoS Pathog, 2013. **9**(7): p. e1003484.
107. Cliffe, A.R., A.A. Nash, and B.M. Dutia, *Selective uptake of small RNA molecules in the virion of murine gammaherpesvirus 68*. J Virol, 2009. **83**(5): p. 2321-6.
108. Amen, M.A. and A. Griffiths, *Packaging of Non-Coding RNAs into Herpesvirus Virions: Comparisons to Coding RNAs*. Front Genet, 2011. **2**: p. 81.
109. Meckes, D.G., Jr., et al., *Human tumor virus utilizes exosomes for intercellular communication*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(47): p. 20370-5.
110. Lee, J.H., et al., *HIV-Nef and ADAM17-Containing Plasma Extracellular Vesicles Induce and Correlate with Immune Pathogenesis in Chronic HIV Infection*. EBioMedicine, 2016. **6**: p. 103-113.
111. Raymond, A.D., et al., *HIV Type 1 Nef is released from infected cells in CD45(+) microvesicles and is present in the plasma of HIV-infected individuals*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2011. **27**(2): p. 167-78.
112. Gould, S.J., A.M. Booth, and J.E. Hildreth, *The Trojan exosome hypothesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(19): p. 10592-7.
113. Meckes, D.G., Jr. and N. Raab-Traub, *Microvesicles and viral infection*. J Virol, 2011. **85**(24): p. 12844-54.

114. Longatti, A., *The Dual Role of Exosomes in Hepatitis A and C Virus Transmission and Viral Immune Activation*. *Viruses*, 2015. **7**(12): p. 6707-15.
115. Arenaccio, C., et al., *Exosomes from human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected cells license quiescent CD4+ T lymphocytes to replicate HIV-1 through a Nef- and ADAM17-dependent mechanism*. *J Virol*, 2014. **88**(19): p. 11529-39.
116. Deschamps, T. and M. Kalamvoki, *Extracellular Vesicles Released by Herpes Simplex Virus 1-Infected Cells Block Virus Replication in Recipient Cells in a STING-Dependent Manner*. *J Virol*, 2018. **92**(18).
117. Freed, E.O., *HIV-1 assembly, release and maturation*. *Nat Rev Microbiol*, 2015. **13**(8): p. 484-96.
118. Pitchai, F.N.N., et al., *Expression, purification, and characterization of biologically active full-length Mason-Pfizer monkey virus (MPMV) Pr78(Gag)*. *Sci Rep*, 2018. **8**(1): p. 11793.
119. Hirai-Yuki, A., et al., *Biliary Secretion of Quasi-Enveloped Human Hepatitis A Virus*. *MBio*, 2016. **7**(6).
120. Chen, Y.H., et al., *Phosphatidylserine vesicles enable efficient en bloc transmission of enteroviruses*. *Cell*, 2015. **160**(4): p. 619-630.
121. Grigorov, B., et al., *A role for CD81 on the late steps of HIV-1 replication in a chronically infected T cell line*. *Retrovirology*, 2009. **6**: p. 28.
122. Thery, C., L. Zitvogel, and S. Amigorena, *Exosomes: composition, biogenesis and function*. *Nat Rev Immunol*, 2002. **2**(8): p. 569-79.
123. Raposo, G., et al., *Human macrophages accumulate HIV-1 particles in MHC II compartments*. *Traffic*, 2002. **3**(10): p. 718-29.
124. Booth, A.M., et al., *Exosomes and HIV Gag bud from endosome-like domains of the T cell plasma membrane*. *J Cell Biol*, 2006. **172**(6): p. 923-35.
125. Gerber, P.P., et al., *Rab27a controls HIV-1 assembly by regulating plasma membrane levels of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*. *J Cell Biol*, 2015. **209**(3): p. 435-52.
126. Narayanan, A., et al., *Exosomes derived from HIV-1-infected cells contain trans-activation response element RNA*. *J Biol Chem*, 2013. **288**(27): p. 20014-33.
127. Sampey, G.C., et al., *Exosomes from HIV-1-infected Cells Stimulate Production of Pro-inflammatory Cytokines through Trans-activating Response (TAR) RNA*. *J Biol Chem*, 2016. **291**(3): p. 1251-66.
128. Morner, A., et al., *Primary human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) isolates, like HIV-1 isolates, frequently use CCR5 but show promiscuity in coreceptor usage*. *J Virol*, 1999. **73**(3): p. 2343-9.
129. Schindler, M., J. Munch, and F. Kirchhoff, *Human immunodeficiency virus type 1 inhibits DNA damage-triggered apoptosis by a Nef-independent mechanism*. *J Virol*, 2005. **79**(9): p. 5489-98.
130. Boing, A.N., et al., *Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography*. *J Extracell Vesicles*, 2014. **3**.
131. Wu, Y., W. Deng, and D.J. Klinke, 2nd, *Exosomes: improved methods to characterize their morphology, RNA content, and surface protein biomarkers*. *Analyst*, 2015. **140**(19): p. 6631-42.
132. Raposo, G., et al., *B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles*. *J Exp Med*, 1996. **183**(3): p. 1161-72.
133. Hegedus, A., M. Kavanagh Williamson, and H. Huthoff, *HIV-1 pathogenicity and virion production are dependent on the metabolic phenotype of activated CD4+ T cells*. *Retrovirology*, 2014. **11**: p. 98.
134. Vordermark, D., T. Shibata, and J.M. Brown, *Green fluorescent protein is a suitable reporter of tumor hypoxia despite an oxygen requirement for chromophore formation*. *Neoplasia*, 2001. **3**(6): p. 527-34.

135. Yuan, Y., et al., *Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor-alpha and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor-alpha*. J Biol Chem, 2003. **278**(18): p. 15911-6.
136. Rath, G., et al., *HIF-1 Alpha and Placental Growth Factor in Pregnancies Complicated With Preeclampsia: A Qualitative and Quantitative Analysis*. J Clin Lab Anal, 2016. **30**(1): p. 75-83.
137. Kong, D., et al., *Echinomycin, a small-molecule inhibitor of hypoxia-inducible factor-1 DNA-binding activity*. Cancer Res, 2005. **65**(19): p. 9047-55.
138. Barrero, C.A., et al., *HIV-1 Vpr modulates macrophage metabolic pathways: a SILAC-based quantitative analysis*. PLoS One, 2013. **8**(7): p. e68376.
139. Stewart, S.A., et al., *Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells*. RNA, 2003. **9**(4): p. 493-501.
140. Wu, X., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 integrase protein promotes reverse transcription through specific interactions with the nucleoprotein reverse transcription complex*. J Virol, 1999. **73**(3): p. 2126-35.
141. Engelman, A., et al., *Multiple effects of mutations in human immunodeficiency virus type 1 integrase on viral replication*. J Virol, 1995. **69**(5): p. 2729-36.
142. Doitsh, G., et al., *Abortive HIV infection mediates CD4 T cell depletion and inflammation in human lymphoid tissue*. Cell, 2010. **143**(5): p. 789-801.
143. Quan, Y., et al., *Reverse transcriptase inhibitors can selectively block the synthesis of differently sized viral DNA transcripts in cells acutely infected with human immunodeficiency virus type 1*. J Virol, 1999. **73**(8): p. 6700-7.
144. West, A.P., et al., *TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS*. Nature, 2011. **472**(7344): p. 476-80.
145. Appay, V., et al., *Accelerated immune senescence and HIV-1 infection*. Exp Gerontol, 2007. **42**(5): p. 432-7.
146. Bollinger, T., et al., *Transcription regulates HIF-1alpha expression in CD4(+) T cells*. Immunol Cell Biol, 2016. **94**(1): p. 109-13.
147. Deshmane, S.L., et al., *Regulation of the HIV-1 promoter by HIF-1alpha and Vpr proteins*. Virol J, 2011. **8**: p. 477.
148. Len, A.C.L., et al., *HIV-1 Activates T Cell Signaling Independently of Antigen to Drive Viral Spread*. Cell Rep, 2017. **18**(4): p. 1062-1074.
149. Saxena, S.K., et al., *Modulation of HIV pathogenesis and T-cell signaling by HIV-1 Nef*. Future Virol, 2012. **7**(6): p. 609-620.
150. Monroe, K.M., et al., *IFI16 DNA sensor is required for death of lymphoid CD4 T cells abortively infected with HIV*. Science, 2014. **343**(6169): p. 428-32.
151. Herzner, A.M., et al., *Sequence-specific activation of the DNA sensor cGAS by Y-form DNA structures as found in primary HIV-1 cDNA*. Nat Immunol, 2015. **16**(10): p. 1025-33.
152. Hong, S.W., et al., *HIF-1alpha-dependent gene expression program during the nucleic acid-triggered antiviral innate immune responses*. Mol Cells, 2009. **27**(2): p. 243-50.
153. Arnoult, D., et al., *The role of mitochondria in cellular defense against microbial infection*. Semin Immunol, 2009. **21**(4): p. 223-32.
154. Perl, A. and K. Banki, *Genetic and metabolic control of the mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen intermediate production in HIV disease*. Antioxid Redox Signal, 2000. **2**(3): p. 551-73.
155. Abrantes, J.L., et al., *Herpes simplex type 1 activates glycolysis through engagement of the enzyme 6-phosphofructo-1-kinase (PFK-1)*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1822**(8): p. 1198-206.
156. Yu, L., et al., *Oncogenic virus-induced aerobic glycolysis and tumorigenesis*. J Cancer, 2018. **9**(20): p. 3699-3706.

157. They, C., M. Ostrowski, and E. Segura, *Membrane vesicles as conveyors of immune responses*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(8): p. 581-93.
158. Aga, M., et al., *Exosomal HIF1alpha supports invasive potential of nasopharyngeal carcinoma-associated LMP1-positive exosomes*. Oncogene, 2014. **33**(37): p. 4613-22.
159. Batagov, A.O. and I.V. Kurochkin, *Exosomes secreted by human cells transport largely mRNA fragments that are enriched in the 3'-untranslated regions*. Biol Direct, 2013. **8**: p. 12.
160. Serocki, M., et al., *miRNAs regulate the HIF switch during hypoxia: a novel therapeutic target*. Angiogenesis, 2018. **21**(2): p. 183-202.
161. Umezumi, T., et al., *Exosomal miR-135b shed from hypoxic multiple myeloma cells enhances angiogenesis by targeting factor-inhibiting HIF-1*. Blood, 2014. **124**(25): p. 3748-57.
162. Cai, J., et al., *Extracellular vesicle-mediated transfer of donor genomic DNA to recipient cells is a novel mechanism for genetic influence between cells*. J Mol Cell Biol, 2013. **5**(4): p. 227-38.
163. King, H.W., M.Z. Michael, and J.M. Gleadle, *Hypoxic enhancement of exosome release by breast cancer cells*. BMC Cancer, 2012. **12**: p. 421.
164. Wang, T., et al., *Hypoxia-inducible factors and RAB22A mediate formation of microvesicles that stimulate breast cancer invasion and metastasis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(31): p. E3234-42.
165. Cheng, S.C., et al., *mTOR- and HIF-1alpha-mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity*. Science, 2014. **345**(6204): p. 1250684.
166. Nizet, V. and R.S. Johnson, *Interdependence of hypoxic and innate immune responses*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(9): p. 609-17.
167. Elks, P.M., et al., *Hypoxia inducible factor signaling modulates susceptibility to mycobacterial infection via a nitric oxide dependent mechanism*. PLoS Pathog, 2013. **9**(12): p. e1003789.
168. Zhu, G., et al., *HIF-alpha/MIF and NF-kappaB/IL-6 axes contribute to the recruitment of CD11b+Gr-1+ myeloid cells in hypoxic microenvironment of HNSCC*. Neoplasia, 2014. **16**(2): p. 168-79.
169. Burdo, T.H., et al., *Soluble CD163, a novel marker of activated macrophages, is elevated and associated with noncalcified coronary plaque in HIV-infected patients*. J Infect Dis, 2011. **204**(8): p. 1227-36.
170. Tenorio, A.R., et al., *Soluble markers of inflammation and coagulation but not T-cell activation predict non-AIDS-defining morbid events during suppressive antiretroviral treatment*. J Infect Dis, 2014. **210**(8): p. 1248-59.
171. Martinez-Picado, J. and S.G. Deeks, *Persistent HIV-1 replication during antiretroviral therapy*. Curr Opin HIV AIDS, 2016. **11**(4): p. 417-23.
172. Duette, G., et al., *Induction of HIF-1alpha by HIV-1 Infection in CD4(+) T Cells Promotes Viral Replication and Drives Extracellular Vesicle-Mediated Inflammation*. MBio, 2018. **9**(5).