



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ADN Y LA EXPRESIÓN DE  
CICLINAS A<sub>2</sub> Y B<sub>1</sub> EN LINFOCITOS T DE MEMORIA CENTRAL CD4<sup>+</sup> POR  
CITOMETRÍA DE FLUJO MULTIPARAMÉTRICA.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**DANIELA REYES ROMERO**



**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., OCTUBRE 2016**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE: Profesor: ENRIQUE ORTEGA SOTO**

**VOCAL: Profesor: JULIO CÉSAR MARTÍNEZ ÁLVAREZ**

**SECRETARIO: Profesor: GUSTAVO OLVERA GARCÍA**

**1er. SUPLENTE: Profesor: GIBRÁN PÉREZ MONTESINOS**

**2do. SUPLENTE: Profesor: ENRIQUE DE LEÓN LARA**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS “ISMAEL COSÍO  
VILLEGAS”**

**ASESOR DEL TEMA:**

---

**M. EN C. GUSTAVO OLVERA GARCÍA**

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

---

**DR. HÉCTOR ENRIQUE ESPINOSA ARCINIEGA**

**SUSTENTANTE:**

---

**DANIELA REYES ROMERO**

# ÍNDICE

<b>Abreviaturas y acrónimos</b> .....	IV
<b>1. Introducción</b> .....	1
1.1 Generalidades de la infección por VIH.....	1
1.1.1 Epidemiología.....	1
1.1.2 Ciclo de replicación viral.....	2
1.1.3 Historia natural de la infección.....	4
1.2 Linfocitos T CD4 <sup>+</sup> de memoria.....	7
1.2.1 Importancia de los T <sub>CM</sub> en la inmunopatogénesis del VIH.....	8
1.3 Hallazgos previos del grupo.....	10
1.3.1 Firma de expresión génica en T <sub>CM</sub> de pacientes VIH <sup>+</sup> .....	11
1.3.2 Modelo de arresto del ciclo celular en T <sub>CM</sub> de pacientes VIH <sup>+</sup> .....	12
1.4 Ciclo celular.....	13
1.4.1 Contenido de ADN.....	15
1.4.2 Cinasas dependientes de ciclinas y ciclinas.....	16
1.4.3 Ciclina A.....	17
1.4.4 Ciclina B.....	18
1.4.5 Arresto celular.....	19
<b>2. Justificación</b> .....	21
<b>3. Hipótesis</b> .....	21
<b>4. Objetivos</b> .....	22
4.1 Objetivo general.....	22
4.2 Objetivos particulares.....	22

<b>5. Metodología</b> .....	23
5.1 Muestras.....	23
5.2 Purificación de PBMC.....	23
5.3 Purificación de linfocitos T de memoria central CD4 <sup>+</sup> .....	24
5.4 Determinación de la pureza de T <sub>CM</sub> CD4 <sup>+</sup> .....	24
5.5 Compensación.....	25
5.6 Tinción con <i>Celltrace Far Red</i> .....	26
5.7 Estimulación de T <sub>CM</sub> CD4 <sup>+</sup> y cultivo celular.....	26
5.8 Tinción de viabilidad.....	27
5.9 Métodos de fijación.....	27
5.9.1 Fijación con Etanol al 75 %.....	28
5.9.2 Fijación con <i>Cytofix/Cytoperm</i> .....	28
5.9.3 Fijación con paraformaldehído al 1 % y al 1.5 %.....	28
5.10 Métodos de permeabilización.....	29
5.10.1 Permeabilización con TRITON x-100 al 0.25 %.....	29
5.10.2 Permeabilización con Metanol al 100 %.....	29
5.11 Tinción de ciclinas A <sub>2</sub> y B <sub>1</sub> .....	29
5.12 Tinción de ADN.....	30
<b>6. Resultados</b> .....	31
6.1 Evaluación de la pureza de T <sub>CM</sub> CD4 <sup>+</sup> .....	31
6.2 Métodos de fijación y evaluación de contenido de ADN.....	33
6.3 Tinción con anticuerpo anti CD4 previo a la fijación de las células.....	35
6.4 Permeabilización con metanol.....	37
6.5 Estimulación y cultivo celular.....	37
6.6 Determinación del contenido de ADN, ciclina A <sub>2</sub> y ciclina B <sub>1</sub> .....	39
6.7 Titulación del reactivo <i>CellTrace</i> .....	41
6.8 Cinética.....	47

<b>7. Discusión.....</b>	<b>50</b>
<b>8. Conclusiones.....</b>	<b>55</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>56</b>

## Abreviaturas y acrónimos

APC: Aloficocianina

APC-Cy7: Aloficocianina-Cianina 7

mARN: Ácido ribonucleico mensajero

ADN: Ácido desoxirribonucleico

CENSIDA: Centro Nacional para la Prevención y el Control del VIH y el sida

Cdk: Cinasa dependiente de ciclina (por sus siglas en inglés)

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

FMO: Fluorescencia menos uno (por sus siglas en inglés)

GALT: Tejido Linfoide Asociado a Intestino (por sus siglas en inglés)

HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (por sus siglas en inglés)

HLA: Antígeno Leucocitario Humano (por sus siglas en inglés)

IL: Interleucina

IMF: Intensidad Media de Fluorescencia

INER: Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

mM: Milimolar

T<sub>CM</sub>: Linfocitos T de memoria central

T<sub>EM</sub>: Linfocitos T de memoria efectora

TRITON: *t-octylphenoxyethoxyethanol* (por sus siglas en inglés)

ONUSIDA: Organización de las Naciones Unidas para el SIDA

PE: Ficoeritrina (por sus siglas en inglés).

PBMC: Células mononucleares de sangre periférica (por sus siglas en inglés)

PBS: Amortiguador salino-fosfato (por sus siglas en inglés)

PFA: Paraformaldehído

PKC: Proteína cinasa C

PMA: Forbol 12-miristato 13-acetato (por sus siglas en inglés)

rpm: Revoluciones por minuto

SFB: Suero Fetal Bovino

Sida: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida

TCR: Receptor de Célula T (por sus siglas en inglés)

VIH: Virus de Inmunodeficiencia Humana

VIS: Virus de Inmunodeficiencia de Simio



## 1. Introducción

### 1.1 Generalidades de la infección por VIH

Han pasado 30 años desde el descubrimiento e identificación de una familia de retrovirus linfotrópicos humanos mortales, ahora conocidos como virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (1–3) que hoy en día continúa siendo un problema importante de salud en todo el mundo.

El VIH es miembro del género *Lentivirus* en la familia *Retroviridae*. También se le llama retrovirus debido a que su genoma se transcribe de ARN a ADN dentro de la célula, a través la enzima viral transcriptasa reversa. Este ADN entra al núcleo y se integra en el cromosoma celular (4).

El VIH fue descubierto debido a su asociación con el síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (sida) (4). Hay evidencia de que el profundo daño a la respuesta inmune celular debido a la depleción de las células T CD4<sup>+</sup> y a la pérdida de su función, es la causa de la inmunodeficiencia presente en los pacientes (5).

Las células T son una de las poblaciones celulares más importantes debido a su actividad contra patógenos e irónicamente, estas también son las células que hacen al hospedero más vulnerable al VIH (6). Dalglish y colaboradores (7) fueron los primeros en llegar a esta conclusión y proporcionaron evidencia de que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> son blancos del VIH.

#### 1.1.1 Epidemiología

Datos de ONUSIDA revelan que en el mundo se ha detenido y revertido la propagación del VIH. Se ha logrado una reducción de la epidemia. Las nuevas infecciones por el VIH y las muertes relacionadas con el sida han disminuido en gran medida desde el punto máximo de la epidemia. Sin embargo, pese a que las nuevas infecciones por el VIH han disminuido, todavía hay un número inaceptablemente alto de nuevas infecciones por el VIH y de muertes relacionadas con el sida cada año. En 2014, 36,9 millones de personas de todo el mundo vivían con el VIH y el número de personas con el virus sigue aumentando. Alrededor de 2

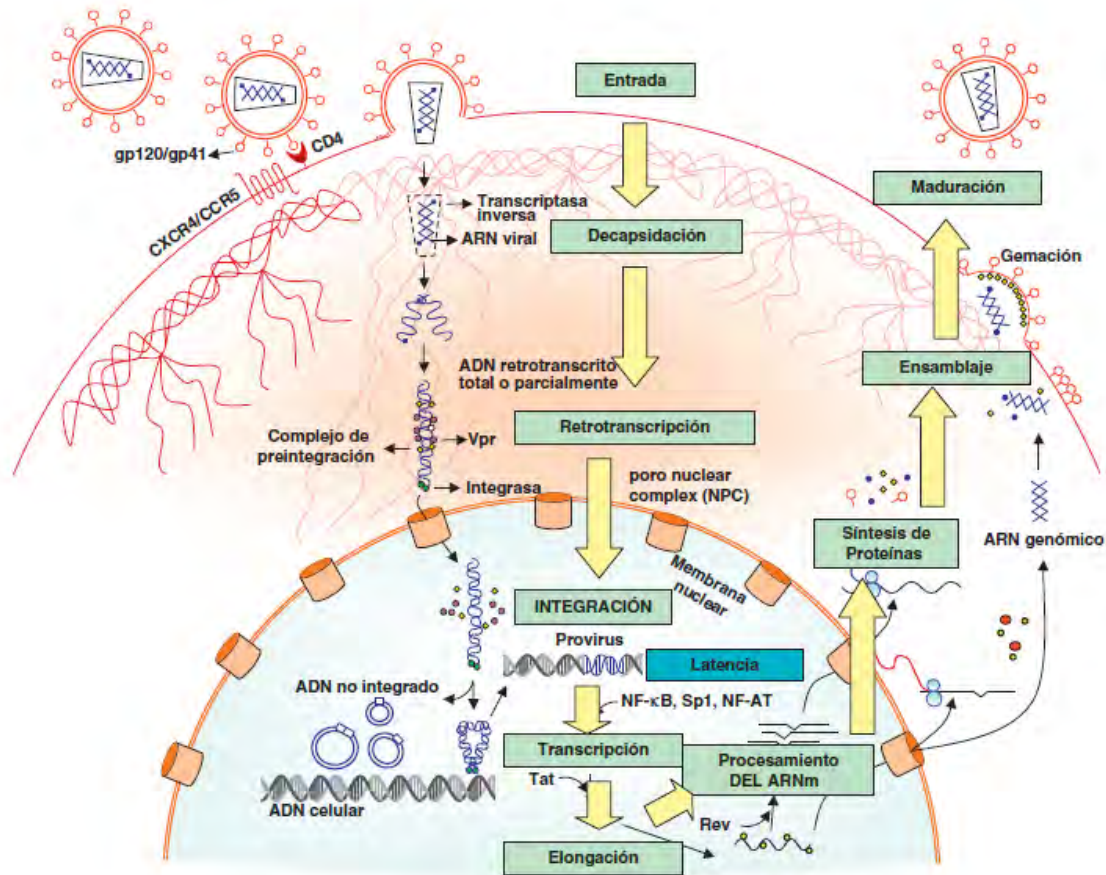
millones de personas se infectaron con el VIH y 1,2 millones de personas murieron de enfermedades relacionadas con el sida (8).

De acuerdo con la tipología de ONUSIDA, México tiene una epidemia concentrada, la cual afecta principalmente a las siguientes poblaciones clave: hombres que tienen sexo con otros hombres, usuarios de drogas inyectadas, trabajadores y trabajadoras del sexo comercial, personas transgénero, transexual y travestis (8).

Según estimaciones conjuntas realizadas por ONUSIDA-CENSIDA, en México existían 180 mil personas viviendo con VIH y sida (rango: 140,000-230,000) a finales del 2013. Es por esto que es necesario investigar la patogénesis de la infección por el VIH que permita el desarrollo de un mejor diagnóstico, un mejor tratamiento o un posible fin a la epidemia por VIH (9).

### 1.1.2 Ciclo de replicación viral

El ciclo de replicación del VIH es complejo y su duración y resultados dependen del tipo de célula y su activación (10). En las primeras etapas, el VIH entra a las células sin causar daños letales inmediatos pero el proceso de entrada puede estimular cascadas de señalización intracelulares, que a su vez pueden facilitar la replicación viral (11,12). Como se muestra en la **Figura 1.1**, las dos moléculas de la envoltura de VIH, la glicoproteína externa (gp120) y la proteína de membrana (gp41), forman los picos de la superficie del virión (13). Durante el proceso de entrada la glicoproteína gp120 ataca a la membrana celular mediante la unión al receptor CD4 (células CD4<sup>+</sup>) (13,14) e induce la unión de la glicoproteína gp120 a los receptores de quimiocinas CCR5 o CXCR4. Esta segunda interacción induce cambios en la estructura de la gp41 que expone en la región N-terminal, un dominio altamente hidrofóbico que se ancla en la membrana plasmática. Esta estructura inestable genera un movimiento de unión de los dominios gp41 y durante este proceso de cierre o plegamiento, la membrana plasmática y viral se aproximan y fusionan. Una vez fusionadas las membranas viral y celular, se produce la internalización de la nucleocápside y la decapsidación del genoma vírico. En este proceso, las proteínas



**Figura 1.1.** Esquema del ciclo de replicación viral del VIH-1. Figura tomada de Alcamí *et al.* 2011 (15).

de la cápside se desensamblan y liberan el genoma viral (15).

El proceso de síntesis de ADN a partir del ARN viral o retrotranscripción es realizado por el complejo enzimático de la transcriptasa reversa. Sin embargo, en un linfocito en reposo la retrotranscripción se produce de forma incompleta y es necesario activar la célula infectada para que finalice, ya que este proceso depende de los niveles de nucleótidos y la acción de factores celulares que se inducen en el curso de los procesos de activación y proliferación celular. Si la activación no se produce, el ARN y el ADN incompletamente retrotranscritos son degradados en un lapso de 3 y 15 días por las nucleasas celulares (16).

Una vez sintetizado, el ADN proviral se acopla a una serie de factores celulares y virales (Vpr) formando el complejo de preintegración. Este complejo es transportado al núcleo donde se integra en el genoma del hospedero, lo que constituye la forma

proviral del VIH. El ADN no integrado representa el 90% del ADN viral existente en linfocitos circulantes y su forma lineal constituye un reservorio susceptible de integración si la célula es adecuadamente activada. En cada célula infectada se integran entre 3 y 4 copias de ADN proviral.

A partir del estado de integración, el VIH puede permanecer latente, replicarse de forma controlada o experimentar una replicación masiva con el consiguiente efecto citopático sobre la célula infectada. A partir del estado de provirus integrado, la replicación del VIH comienza mediante la transcripción del genoma viral (15).

Una vez iniciada la síntesis del ARN viral, la expresión de la proteína viral Tat aumenta la tasa de transcripción del genoma del VIH y permite la elongación completa del ARN viral. Posteriormente las proteínas virales deben ser procesadas antes de ensamblarse para formar las partículas maduras. La maduración final de los viriones y el ensamblaje correcto de las proteínas virales se produce durante la gemación a través de la membrana celular mediante la acción de la proteasa viral que procesa las poliproteínas gag y gag-pol y permite formar partículas virales maduras. Una vez que se produce la gemación de los viriones, estos son liberados al espacio extracelular (15).

### 1.1.3 Historia natural de la infección

El VIH infecta principalmente a las células T CD4<sup>+</sup> de memoria activadas que expresan CCR5 (17,18), eventualmente, la pérdida de estas células culmina en sida, es el sello de la enfermedad por VIH (19–21). En la **Figura 1.2**, se muestra el esquema de la historia natural de la infección del VIH que se describe a continuación.

La carga viral en sangre se detecta a partir de la primera semana de la infección y aumenta exponencialmente, lo que refleja la expansión de la infección por el VIH en ausencia de una respuesta inmunitaria específica frente al virus. Tras el contacto con el VIH, se inicia un período ventana de 4 a 12 semanas, que corresponde a la fase de primoinfección durante la cual no es posible detectar la presencia de una

respuesta humoral ni celular frente al VIH a pesar de existir niveles de viremia muy elevados. En este escenario, el virus se propaga con velocidad a partir de un pequeño número de células infectadas y se produce la destrucción masiva de los linfocitos CD4<sup>+</sup> activados, muy especialmente en el sistema GALT (tejido linfoide asociado a intestino, por sus siglas en inglés). Este acontecimiento probablemente representa un elemento esencial en la patogenia de la infección, ya que la ausencia de recuperación del sistema GALT permite una translocación de productos bacterianos aumentada y sostenida que contribuyen a la activación inmune crónica y la posible senescencia del sistema inmunitario (22–25).

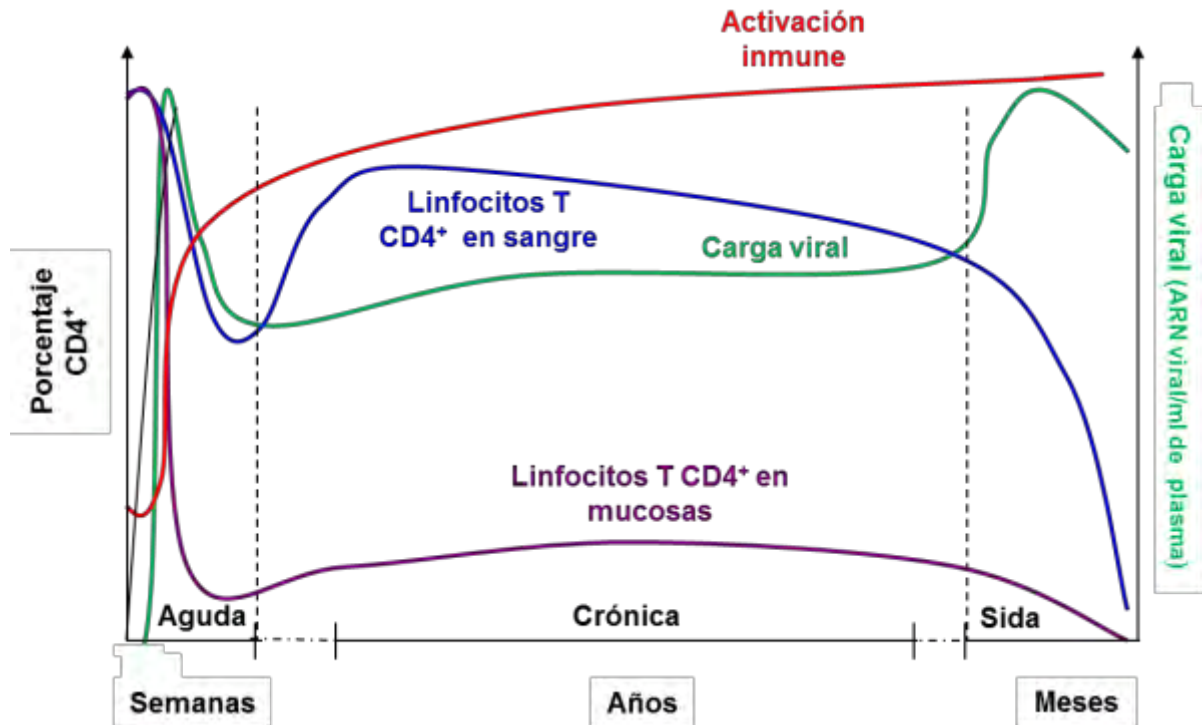
#### -Infección crónica

La respuesta inmunitaria restringida por el sistema HLA (antígeno leucocitario humano, por sus siglas en inglés) se genera aproximadamente a las 12 semanas de la infección y genera, tanto anticuerpos específicos, como linfocitos CD8 con actividad citotóxica frente al VIH. La puesta en marcha de estos mecanismos de inmunidad específica consigue un control casi completo de la replicación viral y provoca una caída brusca de la viremia que alcanza un nivel relativamente estable y que varía en cada paciente. Esta viremia basal oscila entre niveles indetectables y superiores a cientos de miles de copias, un parámetro que refleja el nuevo equilibrio producido entre la replicación viral y el control inmunitario y que representa un marcador pronóstico de la velocidad de evolución a sida (26). La generación de una respuesta inmunitaria específica es, sin embargo, incapaz de erradicar el virus que se ha establecido en distintos reservorios en los que se replica de manera persistente. Se genera, por tanto, una presión inmunológica mantenida frente a la replicación viral que obliga al virus a producir de manera continua variantes de escape a la respuesta inmune que, a su vez, modifica su espectro de actividad para neutralizar las nuevas variantes virales. Esta fase de acción y adaptación por parte del virus y el sistema inmunológico caracteriza la fase crónica de la infección que se mantiene de 6 a 10 años (27). La falta de atenuación de la respuesta refleja, por una parte, la intensidad y la cronicidad de la replicación viral que sigue estimulando persistentemente el sistema inmunitario mediante la generación continua de

variantes de escape y, por otra, la capacidad del sistema inmune para generar nuevos clones celulares y anticuerpos para controlar durante largos periodos la replicación masiva que se produce a lo largo de toda la enfermedad. Sin embargo, durante esta etapa crónica el sistema inmunitario pierde progresivamente su capacidad de control sobre el VIH, las variantes de escape infectan y destruyen linfocitos CD4 y la sobrecarga antigénica proveniente de múltiples fuentes. Esto hace que exista una activación continua del sistema inmunitario, lo que provoca alteraciones en la maduración y activación de linfocitos CD4 y CD8 y un envejecimiento precoz del sistema (15).

#### -Sida

Los estadios finales de la enfermedad se caracterizan clínicamente por la aparición de infecciones oportunistas, desde el punto de vista inmunológico por el descenso del número de linfocitos CD4 (menos de 200 células/ $\mu$ l de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> totales (28)) y virológicamente por la elevación de la carga viral. Esta replicación acelerada permite una mayor generación de mutantes, lo que a su vez aumenta las posibilidades de evasión viral y la selección de variantes más citopáticas. En esta etapa se observa un deterioro de la respuesta humoral y celular frente al VIH: disminuyen los niveles de anticuerpos y la actividad citotóxica y el número de linfocitos CD8. El paciente alcanza así el punto crítico de deterioro inmunológico que permite la aparición de enfermedades oportunistas y originan el sida (15).



**Figura 1.2.** Esquema de la historia natural de la infección por VIH. Figura modificada de Grossman *et al.* 2006 (29).

## 1.2 Linfocitos T CD4<sup>+</sup> de memoria

La memoria es el sello distintivo del sistema inmune adquirido, es el resultado de la expansión clonal y diferenciación de linfocitos específicos al antígeno que en última instancia persisten por periodos prolongados (30).

Las subpoblaciones de células T pueden definirse por su especificidad, fenotipo, grado de maduración, localización o funciones que realizan después de la estimulación, y cualquiera de estos parámetros pueden ser afectados por la infección del VIH (27).

Existen dos categorías principales de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>: células vírgenes al antígeno (*naive*) y expuestas al antígeno (de memoria). Las células T de memoria son una población fenotípicamente heterogénea que puede dividirse a grandes rasgos en dos grupos: *i*) Células T de memoria central (T<sub>CM</sub>) que circulan dentro del tejido linfóide secundario a través de la sangre y los canales linfáticos, expresan CCR7 y CD62L, los cuales permiten el tráfico al tejido linfóide y la recirculación

(31,32). Y *ii*) células T de memoria efectora ( $T_{EM}$ ) que migran de los tejidos linfoides secundarios hacia sitios efectores extralinfoides, tales como el intestino, la lámina propia y el epitelio (33). Estas últimas células carecen de la expresión de CCR7 y CD62L, pueden responder activamente al antígeno (por ejemplo VIH) y volverse células efectoras; estas células después de ser activadas pueden sobrevivir alrededor de una semana. (4).

Las células  $T_{CM}$  producen rápidamente citocinas por exposición al antígeno, como IL-2 (34). Reducen su expresión de CCR7, proliferan y transitan a los órganos periféricos volviéndose células  $T_{EM}$ . Las células  $T_{EM}$  permanecen en el sitio de la infección microbiana. Al responder al antígeno, las células  $T_{EM}$  son activadas y se convierten en células efectoras que evolucionan a células efectoras de vida corta (35) y producen IFN- $\gamma$  o IL-4 (30). Las células  $T_{EM}$  tienen una capacidad replicativa limitada, mientras que las células vírgenes y las  $T_{CM}$  viven más tiempo y son capaces de tener más ciclos replicativos (4).

Uno de los descubrimientos críticos en la investigación de la patogénesis del sida fue la demostración de que la entrada del VIH depende no solo de la expresión de un receptor primario, CD4, también de la expresión de correceptores. Estos correceptores, que mostraron ser los receptores de quimiocinas, típicamente CCR5 o CXCR4, se expresan diferencialmente en las células T  $CD4^+$  (36,37).

A pesar de que el VIH ataca y destruye a las células T  $CD4^+$ , la fisiopatología de la lenta depleción progresiva mediada por el VIH trópico a CCR5 involucra una interacción compleja entre la destrucción de las células T  $CD4^+$  (muerte directa de las células por la infección viral y la muerte indirecta relacionada con activación crónica no específica a VIH) y la regeneración, iniciada por mecanismos homeostáticos y de activación inmune (29).

### 1.2.1 Importancia de los $T_{CM}$ en la inmunopatogénesis del VIH

La depleción de las células T  $CD4^+$  en la infección por el VIH puede ser considerada como un proceso de tres etapas: *i*) la profunda destrucción inicial de los objetivos virales CCR5<sup>+</sup> (células  $T_{EM}$   $CD4^+$ ), *ii*) mantenimiento del remanente de células  $T_{EM}$

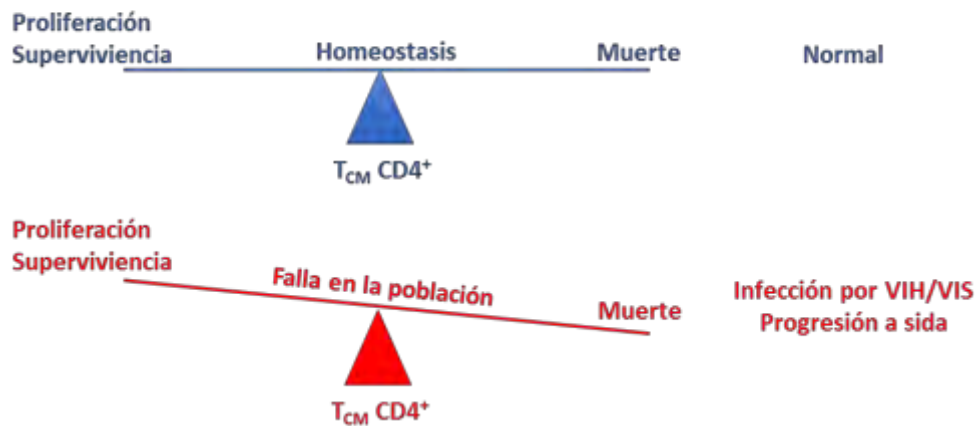


CD4<sup>+</sup> a partir de precursores T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup>, y *iii*) la progresiva falla homeostática de las células T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup> que decaen conduciendo a insuficiencia de las células T CD4<sup>+</sup> efectoras que finalmente se manifiesta en sida.

En la infección con el VIS (virus de inmunodeficiencia del simio) la depleción masiva de las células T CD4<sup>+</sup> efectoras es seguida por un incremento en la proliferación de las células T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup> y la producción de T<sub>EM</sub> CD4<sup>+</sup> que regenera parcialmente los compartimentos depletados en las mucosas y previenen el temprano inicio de la deficiencia inmune. Sin embargo, este proceso regenerativo no restaura completamente la inmunidad y no es estable a través del tiempo. La proliferación homeostática de las células T en RMs (macacos Rhesus, por sus siglas en inglés) sanos no infectados producen células predominantemente de vida larga, en contraste, la regeneración de células T CD4<sup>+</sup> en la infección por VIS conduce a activación inmune que produce células de vida corta (29). Extraordinariamente son necesarios altos niveles de proliferación para mantener los compartimentos de memoria efectora incluso en niveles subnormales y no todas las subpoblaciones de las células CD4<sup>+</sup> funcionalmente importantes se regeneran en el mismo grado (5).

El equilibrio casi estable entre la destrucción de células T CD4<sup>+</sup> por activación inmune crónica no específica de VIH y por citopaticidad directa, así como los esfuerzos del hospedero para regenerar estas poblaciones, parece degradarse con el tiempo. Las células T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup> disminuyen, resultando en una reducida capacidad regenerativa. De hecho, la falla progresiva de la homeostasis en las células T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup> y la consecuente incapacidad para mantener la producción de células T<sub>EM</sub> CD4<sup>+</sup> parece jugar un papel principal en la progresión de la enfermedad y en la aparición de la inmunodeficiencia en la infección por VIH (38) (**Figura 1.3**). Los mecanismos responsables de la inestabilidad del compartimento de las T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup> en la infección progresiva por el VIH/VIS trópico a CCR5 aún no están completamente definidos.

## Dinámica de la población $T_{CM} CD4^+$



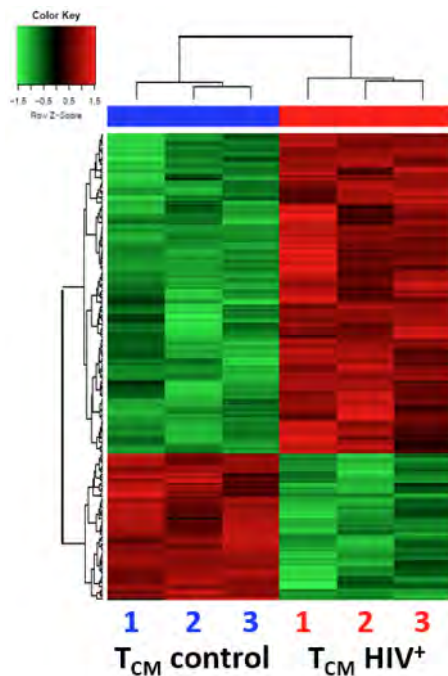
**Figura 1.3.** Dinámica de la población de células  $T_{CM} CD4^+$  en condiciones normales y en la infección del VIH/VIS. Figura modificada de Okoye *et al.* 2013 (5).

### 1.3 Hallazgos previos del grupo

En nuestro equipo de trabajo nos preguntamos cómo es que las células  $T_{CM} CD4^+$  de los pacientes VIH<sup>+</sup> pierden la capacidad de reabastecer el repertorio de células T de memoria (tanto  $T_{EM}$  como las propias  $T_{CM}$ ) que culmina en la aparición de sida. Se sabe que el porcentaje de células T  $CD4^+$  infectadas por el virus es sumamente bajo (menor al 1%) en comparación con el total de células T  $CD4^+$ , es evidente que el efecto citopático del virus no explica la linfopenia que los pacientes cursan en etapas avanzadas de la infección. Es por esto que en trabajos previos del grupo se han estudiado mecanismos de patogénesis independientes a la citopaticidad directa del VIH. En estos trabajos previos hemos encontrado que las células  $T_{CM} CD4^+$  de pacientes VIH<sup>+</sup> tienen una firma de expresión génica que las distingue de las células  $T_{CM}$  de controles sanos, este conjunto de genes diferencialmente expresados en los  $T_{CM}$  están relacionados con la progresión del ciclo celular hasta la fase S, no obstante, se relacionan también con arresto celular en las fases G2/M, lo que provocaría muerte celular (39).

### 1.3.1 Firma de expresión génica en T<sub>CM</sub> de pacientes VIH<sup>+</sup>

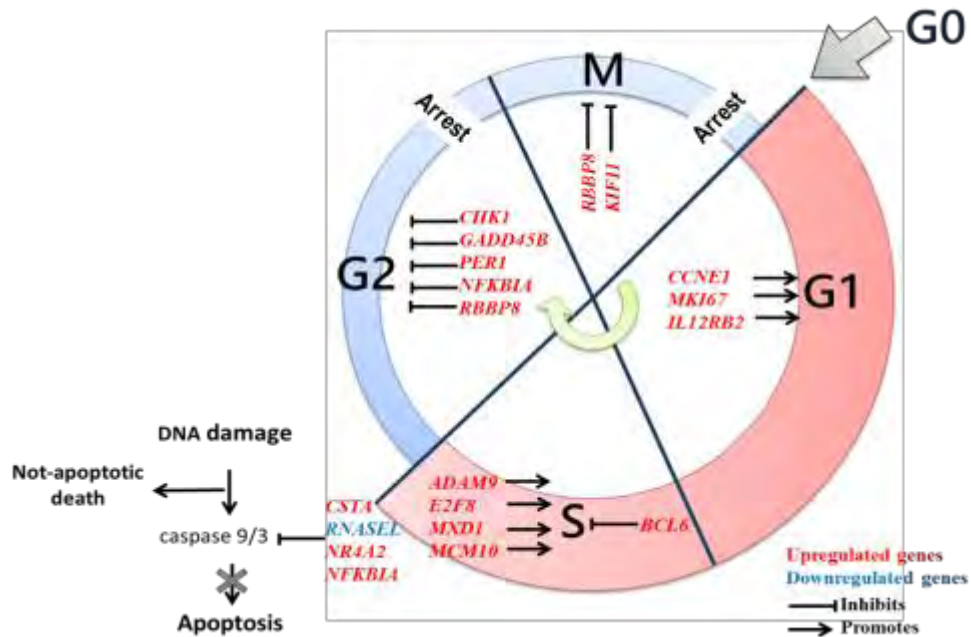
Para saber si las células T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup> de pacientes VIH<sup>+</sup> tienen un patrón de expresión génica asociado a una mayor activación, que revele una pérdida en su capacidad de proliferar y diferenciarse, se realizó un estudio comparativo del transcriptoma de las subpoblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> T<sub>CM</sub> de controles, y células T<sub>CM</sub> de pacientes VIH<sup>+</sup> en fase crónica con diagnóstico reciente. En este estudio se encontraron 210 genes diferencialmente expresados que distinguen claramente a las células T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup> de pacientes VIH<sup>+</sup> de las T<sub>CM</sub> de controles VIH<sup>-</sup> (**Figura 1.4**) (39).



**Figura 1.4.** “Heatmap” que muestra un análisis de agrupamiento jerárquico no supervisado de dos vías de los 210 genes diferencialmente expresados que distinguen a los T<sub>CM</sub> de pacientes VIH<sup>+</sup> (barras rojas) de las T<sub>CM</sub> de controles (barras azules).

### 1.3.2 Modelo de arresto del ciclo celular en T<sub>CM</sub> de pacientes VIH<sup>+</sup>

Para saber el significado biológico que tenían los genes diferencialmente expresados vistos por medio del análisis de mRNA, se utilizaron paquetes bioinformáticos en los que destacaron procesos como daño o reparación del ADN, ciclo celular, apoptosis y respuestas inmunes, todas ellas altamente relacionadas. Se observaron resultados que muestran un incremento en proliferación, supervivencia celular y una disminución en apoptosis y muerte celular. Al mismo tiempo estos resultados mostraron un incremento en citostasis e interfase y una disminución en mitosis. Dichos hallazgos parecen contradictorios, sin embargo, es posible pensar que existe un incremento en la entrada a ciclo celular solo hasta cierta fase y un arresto posterior. Para probar que estos hallazgos no son contradictorios, se realizó el análisis de los genes involucrados en la modulación del ciclo celular. Se encontró que los genes en la firma de expresión de las células T<sub>CM</sub> de pacientes VIH<sup>+</sup> revelan un aumento en el progreso en el ciclo celular de G<sub>0</sub> a G<sub>1</sub> y S, pero también arresto en G<sub>2</sub> y M, sin embargo, es necesario saber si este arresto del ciclo celular encontrado por análisis de transcriptomas puede ser corroborado por estudios de función celular (**Figura 1.5**) (39).



**Figura 1.5.** Genes involucrados en el ciclo celular de las células T<sub>CM</sub> CD<sub>4</sub><sup>+</sup> de pacientes VIH<sup>+</sup>. En el modelo se representa la progresión del ciclo hasta la fase S que no concluye en proliferación sino en arresto celular en las fases G<sub>2</sub>-M, así como la expresión de genes implicados en un tipo de muerte no apoptótica. Figura tomada de Olvera *et al.* (39).

## 1.4 Ciclo celular

El ciclo celular desempeña un papel fundamental en el desarrollo, desde la fertilización del óvulo hasta el organismo adulto. Este papel clave también se lleva a cabo en condiciones patológicas, porque la desregulación del ciclo celular está asociada con la proliferación celular aberrante y con cáncer (40).

Clásicamente el ciclo celular se divide en cuatro fases: G1, S, G2 y M (41) (**Figura 1.6**). El ciclo celular inicia cuando una nueva célula hija se forma por mitosis y división citoplasmática. Termina cuando la célula se divide, es decir, la mitosis, la división del citoplasma y la interfase constituyen una vuelta al ciclo.

Durante la interfase la célula aumenta su masa, duplica aproximadamente la cantidad de componentes del citoplasma y duplica su ADN. En la mayoría de ellas la interfase es la etapa más larga del ciclo. Se divide en tres etapas:

G1: Intervalo ("Gap") de crecimiento y funcionamiento celular antes que empiece a replicarse el ADN.

S: Tiempo de "síntesis" (replicación del ADN).

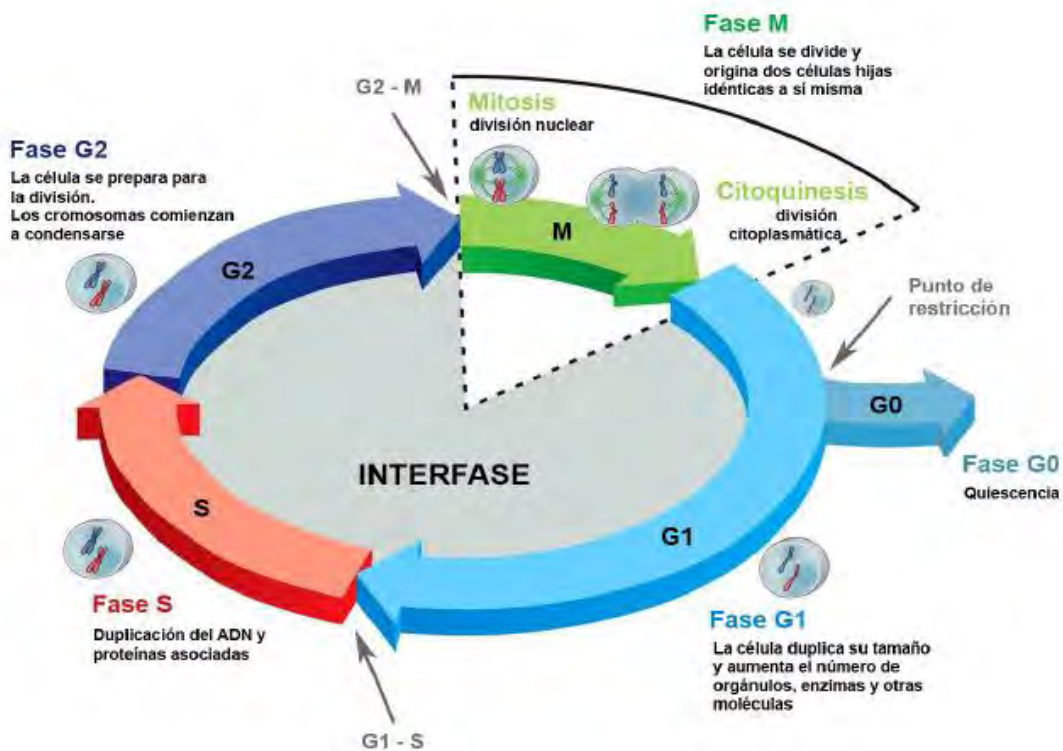
G2: Segundo intervalo (Gap) después de la replicación, cuando la célula se prepara para dividirse.

La mayor parte de las células del cuerpo humano se mantienen en la etapa G1 mientras elaboran proteínas, carbohidratos y lípidos. Las células destinadas a dividirse entran en la etapa S cuando copian su ADN, lo mismo que las proteínas unidas a ellas. Durante la etapa G2 producen proteínas que impulsarán la mitosis (42). Una vez iniciada la etapa S, la replicación del ADN se efectúa con rapidez y finaliza antes de que la célula se prepare para dividirse.

La mitosis comienza después de la etapa G2 y se encarga de conservar la cantidad de cromosomas de la célula madre. El ser humano posee 46 cromosomas. Antes de la mitosis los cromosomas del núcleo celular se duplican, así que constan de dos cromátidas hermanas (42).

La mitosis tiene cuatro etapas: profase, metafase, anafase y telofase. En la profase los cromosomas se condensan en forma de bastón y los microtúbulos dan origen a un huso acromático. La cubierta nuclear se divide. En la metafase todos los cromosomas duplicados quedan alineados en un punto medio entre los polos del huso como su ecuador. En la anafase los microtúbulos separan las cromátidas hermanas de los cromosomas hacia los polos opuestos del huso. En la telofase se forma otra cubierta nuclear alrededor de los dos grupos de cromosomas descondensados. Las vesículas procedentes de la antigua cubierta nuclear se fusionan formando vacuolas de membrana alrededor de cada grupo. Las vacuolas se unen unas con otras hasta que una nueva cubierta nuclear engloba los grupos y así se forman dos núcleos. Posteriormente ocurre la citocinesis que es un mecanismo individual que divide el citoplasma en dos células hijas, cada una con su núcleo (42).

Cuando las células cesan de proliferar, ya sea debido a señales antimitogénicas o por la ausencia de señales mitogénicas, egresan del ciclo y entran en el estado de no división quiescente que se conoce como G0 (43).



**Figura 1.6.** Esquema del ciclo celular. El ciclo celular consta de 4 fases: G1, S, G2 y M. Figura modificada de Hochegger *et al.* 2008 (44).

### 1.4.1 Contenido de ADN

Ploidia es el término genético del número básico de juegos de cromosomas en el núcleo de una célula. Las células que tienen un múltiplo entero del juego básico de cromosomas son euploides. La mayoría de las células humanas son euploides y tienen 46 cromosomas o dos juegos de 23 cromosomas (un juego de la madre y otro del padre), conocidos como diploides. Los gametos humanos tienen un juego de 23 cromosomas, no apareados y también son “euploides” o más comúnmente conocidos como haploides. Curiosamente los eritrocitos maduros en mamíferos no tienen cromosomas (45). Las células que no tienen un múltiplo completo del juego básico de cromosomas son aneuploides, lo que significa que no son euploides.

La aneuploidía puede ser descrita como cromosomas ganados o perdidos. Esto es distinto de la poliploidía, en la cual las células contienen más de dos juegos completos de cromosomas, pero siempre contienen un múltiplo exacto del número haploide. La mayoría de los embriones humanos que tienen un cromosoma extra o la falta de él, no sobreviven a la gestación (46) pero en algunos, por ejemplo, se produce síndrome de *Down* que se da cuando el cromosoma 21 se encuentra repetido tres veces en todas las células. La aneuploidía es el sello distintivo de las células cancerosas en general (45).

El análisis de ácidos nucleicos es una aplicación común de la citometría de flujo. La medida del contenido de ADN permite el estudio de poblaciones en varias fases del ciclo celular así como el análisis de la ploidía del ADN. En una población dada, las células están distribuidas en tres fases principales del ciclo celular: fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (un juego de pares de cromosomas por célula), fase S (síntesis con cantidad variable de ADN) y fase G<sub>2</sub>/M (dos juegos de pares de cromosomas por célula, previo a la división celular). Los análisis de citometría de flujo de las poblaciones teñidas son usados para producir un histograma de frecuencias donde se muestran las diferentes fases del ciclo (47,48).

#### 1.4.2 Cinasas dependientes de ciclinas y ciclinas

La división celular es un proceso altamente regulado y las células de los organismos vivos requieren dividirse para producir células hijas. La capacidad de las células para dividirse se atribuye principalmente a la presencia de dos clases de moléculas, las cinasas dependientes de ciclinas (Cdks) que son una familia de cinasas serina/treonina, y sus proteínas de unión, ciclinas (49).

En mamíferos, las cinasas dependientes de ciclinas (Cdks) regulan el orden correcto de las fases del ciclo celular (50). Una Cdk es activa como una proteína cinasa únicamente cuando forma un complejo con su subunidad reguladora, la ciclina (51).

El descubrimiento de aproximadamente 20 proteínas relacionadas con Cdks condujo al concepto en el que en las células eucariotas superiores los eventos del ciclo celular ocurren por combinaciones complejas de Cdks (Cdk1, Cdk2, Cdk3, Cdk5, Cdk4, Cdk6, Cdk7, Cdk8 y así sucesivamente) y ciclinas (A1, A2, B1, B2, B3, C, D1, D2, D3, E1, E2, F y así sucesivamente) en diferentes fases del ciclo celular que a su vez proporcionan un control adicional para la maquinaria del ciclo celular. Desde un principio se propuso que las ciclinas confieren especificidad de la cinasa al sustrato, y regulación (activación, inactivación, localización, unión de subunidades y otros) a los complejos de Cdk/ciclina. De acuerdo con esta hipótesis, se llevó a cabo una amplia investigación en células eucariotas y se estableció el modelo clásico de la regulación del ciclo celular (52). Sin embargo se han propuesto varios modelos para dar cuenta de la dinámica de las fases específicas del ciclo celular en mamíferos, tal como la fase G1 (53) y la transición G1/S (54), por la existencia de un punto de restricción en G1 que define un punto de no retorno a partir del cual las células no necesitan la presencia de factores de crecimiento (FC) para completar el ciclo (55), para la transición de G2/M (56) o para la salida de mitosis (57). Por lo tanto, el complejo ciclina D/Cdk4-6 y el complejo ciclina E/Cdk2 promueven la progresión en G1 y provocan la transición G1/S; la activación del complejo ciclina A/Cdk2 asegura la progresión en S y G2, mientras que el pico de la actividad del complejo ciclina B/Cdk1 provoca la progresión a mitosis (51).



Cuatro clases principales de ciclinas fueron descubiertas en células de mamíferos: ciclinas tipo D, E, A y B, que muestran patrones de localización dinámicos. En las células de mamíferos, la ciclina B reside principalmente en el citoplasma, mientras que la ciclinas A, D y E son nucleares (58–60).

En células de mamíferos, la ciclina A se acumula en la fase tardía de G1 y es degradada antes de la metafase. Por otra parte, la ciclina B es degradada en la anafase. Es por esto que dichas ciclinas desempeñan un papel central en el control de la mitosis y son conocidas como ciclinas mitóticas (61). Su expresión periódica durante el ciclo celular las convierte en un marcador de la fase en la que se encuentran las células, es decir, fase G2 o M. Esto es importante para nosotros, ya que como se mencionó antes, en hallazgos previos del grupo de trabajo, se encontró que las células T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup> de pacientes VIH<sup>+</sup> podrían estar arrestadas en las fases G2/M. Por lo que a continuación se hablará más a detalle de las ciclinas A y B.

### 1.4.3 Ciclina A

En células de mamíferos hay dos tipos de ciclina A: ciclina A<sub>1</sub> y ciclina A<sub>2</sub> (62). La ciclina A<sub>2</sub> es sintetizada al inicio de la síntesis del ADN así como durante la transición de G2/M en células somáticas (63). Por otro lado, la ciclina A<sub>1</sub> solo se expresa durante la meiosis, en embriones muy tempranos, y en algunas células tumorales. La única función esencial de la ciclina A<sub>1</sub> en ratones parece ser en la espermatogénesis (64), por lo que nos centraremos solo en la ciclina A<sub>2</sub>.

Usualmente se encuentra asociada a proliferación celular y a menudo se encuentran expresados altos niveles en cánceres humanos (65). Debido a que es un regulador esencial de la división celular, comúnmente es utilizada como un marcador de proliferación celular (62).

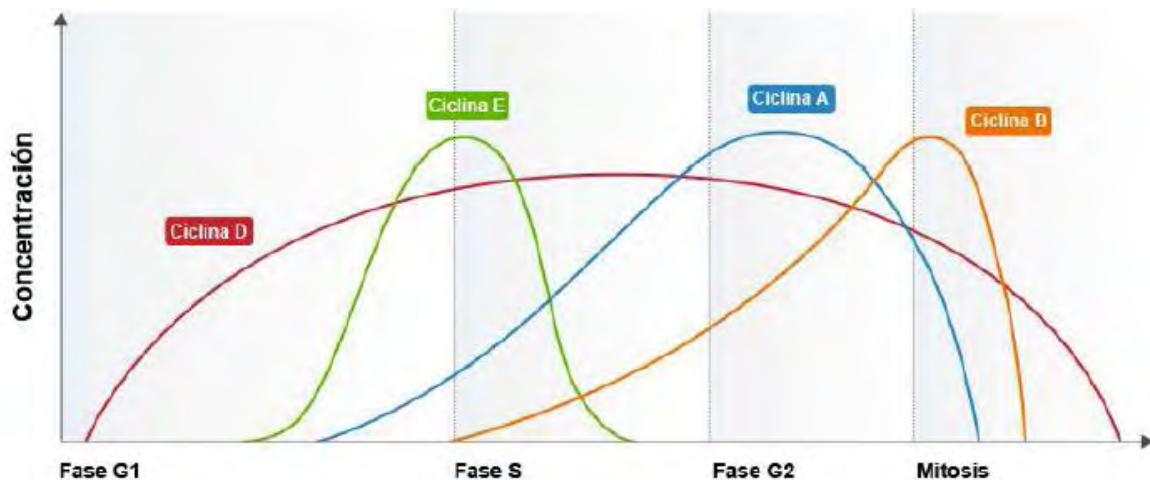
Una de las características cruciales de las ciclinas mitóticas es su periodicidad. La ciclina A comienza a acumularse durante la fase G1 tardía y continúa a través de la fase S y de la fase G2 (**Figura 1.7**) (61). Imágenes de células vivas que contienen ciclina A<sub>2</sub> verde fluorescente muestran que la ciclina A<sub>2</sub> en humanos comienza a ser

degradada en la prometafase temprana y es degradada por completo en la metafase (66,67).

#### 1.4.4 Ciclina B

En células de mamíferos hay tres tipos de ciclina B (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y B<sub>3</sub>) (61). La ciclina B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> se coexpresan en la mayoría de las células en división pero están localizadas diferencialmente dentro de la célula (68), mientras que la ciclina B<sub>1</sub> colocaliza con microtúbulos, la ciclina B<sub>2</sub> está asociada con el aparato de Golgi (61). La ciclina B<sub>3</sub> es degradada poco después que la ciclina B<sub>1</sub> pero su expresión se restringe a células germinales en desarrollo y en los testículos en adultos (69).

El complejo ciclina B<sub>1</sub>-Cdk1 es clave para la entrada a la fase mitótica (70). Un gran número de proteínas son fosforiladas por el complejo ciclina B<sub>1</sub>-Cdk1 previo a la entrada mitótica que inician los eventos mitóticos, incluyendo ruptura de la envoltura nuclear, separación del centrosoma, formación del huso, condensación de los cromosomas y fragmentación del aparato de Golgi (71). Se requiere de la inactivación de la actividad de la cinasa Cdk1 por la degradación de la ciclina B<sub>1</sub> para la salida de la mitosis y la replicación del ADN en el siguiente ciclo celular (Figura 1.7).



**Figura 1.7.** Expresión de las cuatro principales ciclinas a lo largo del ciclo celular. Figura modificada de Bardin *et al.* 2001 (72).

La manifestación de la actividad de la cinasa Cdk1 requiere la formación del complejo ciclina B1-Cdk1, la actividad de Cdk1 se ve afectada por los niveles de la ciclina B<sub>1</sub>, su proteína de unión. Los niveles de proteína de la ciclina B<sub>1</sub> oscilan durante la progresión del ciclo celular, debido a la variación en los niveles de transcripción y degradación de la ciclina B<sub>1</sub>. Es decir, la ciclina B<sub>1</sub> aparece por primera vez en la fase S, después se acumula durante la fase G<sub>2</sub> y la mitosis y desaparece justo antes del inicio de la anafase (73).

Debido a que el ciclo celular es un proceso muy regulado cabe destacar que en células cancerígenas los niveles de ciclina B<sub>1</sub> a menudo están fuera de control y se encuentra en niveles altos (73).

#### 1.4.5 Arresto celular

En el contexto de la infección por VIH, se sabe que los virus mantienen una relación con los mecanismos regulatorios del ciclo celular. De hecho, se estima que el 20 % de los cánceres humanos surgen de la infección con los virus de ADN o ARN (74).

Una característica importante de muchas infecciones virales es la subversión del ciclo celular del hospedero. A menudo esto es evidente como una estimulación de la entrada a la fase S en células que podrían de otra manera estar en G<sub>1</sub> o G<sub>0</sub>. Sin embargo cada vez es más evidente que la frontera G<sub>1</sub>/S no es la única transición blanco de los virus y que muchos son capaces de inducir arresto del ciclo celular en G<sub>2</sub>/M. En algunos casos las bases moleculares para arresto en G<sub>2</sub>/M son conocidas, mientras que para otras, las vías específicas involucradas siguen sin estar claras. En la mayoría de los casos, aún no está bien entendida la función que esta modulación del ciclo celular puede desempeñar en el ciclo de vida de los virus (75).

En presencia de daño en el ADN o replicación incompleta, la célula impide la entrada a mitosis. Las vías que monitorean e inducen arresto en G<sub>2</sub> bajo estas condiciones son ejemplos de *checkpoints* y dan como resultado la activación de cinasas que a su vez impiden la activación del complejo Cdk1-ciclina B<sub>1</sub>. Adicionalmente para mantener inactivos los complejos Cdk1-ciclina B<sub>1</sub>, los *checkpoints* también pueden

prevenir su acumulación nuclear. Después de la inducción inicial del arresto en G2, el arresto puede ser mantenido a través de la activación de otras vías que normalmente son reguladas por p53 (75).

Como ya se mencionó, una variedad de virus han sido asociados con arresto en G2/M, incluyendo virus de ADN, virus de ARN y retrovirus pero los mecanismos por los cuales se logra el arresto son muy diversos. Aunque en muchos casos los mecanismos no están completamente caracterizados, se han hecho observaciones que implican vías particulares. La inhibición de la actividad cinasa de Cdk1-ciclina B<sub>1</sub>, inhibición de la acumulación nuclear de los complejos Cdk1-ciclina B<sub>1</sub> y la inhibición de la salida mitótica son ejemplos de estas vías (75).

En el caso del VIH existe evidencia de que componentes específicos del virus sintetizados al interior de la célula producen arresto del ciclo celular (76,77), sin embargo, como se mencionó anteriormente, la cantidad de células infectadas es muy pequeña por lo que la actividad directa del virus o sus proteínas en células infectadas no explicaría las diferencias transcripcionales que se observaron en las T<sub>CM</sub> de pacientes VIH<sup>+</sup>.

Debido a que en el trabajo previo del grupo se describió que la sobreexpresión de genes como RBBP, NFKBIA, PER1, CHEK1, GADD45B, entre otros, está asociada con arresto del ciclo celular en las fases G2/M (78–82) el principal objetivo de este trabajo consistió en establecer una metodología que nos permita comprobar si existe arresto de las células T<sub>CM</sub> en fase G2 y/o M en el contexto de la infección por VIH.

## **2 Justificación**

Nos interesa estudiar a las células T de memoria central ( $T_{CM}$ )  $CD4^+$  debido a que existen evidencias de que esta subpoblación es la que mantiene el repertorio de células de memoria y mantiene el estado asintomático del paciente en la fase crónica de la infección. En hallazgos previos del grupo se observó, mediante un estudio de transcriptoma, que hay una firma de expresión génica en los linfocitos  $T_{CM}$  de los pacientes  $VIH^+$  en la etapa crónica de la infección que los distingue de los linfocitos  $T_{CM}$  de donadores  $VIH^-$ . Esta firma sugiere un aumento en la entrada a ciclo celular y avance hasta la fase S que continúa con arresto del ciclo celular en la fase G2-M. Es por esto que es necesaria la estandarización de la tinción de citometría de flujo para determinar el contenido de ADN en los linfocitos  $T_{CM}$  de pacientes  $VIH^+$  y donadores  $VIH^-$  y evaluar la expresión de las ciclinas A2 y B1 en las diferentes fases del ciclo celular con el objetivo de verificar arresto del ciclo celular en esta subpoblación de linfocitos en el contexto de la infección por VIH.

## **3 Hipótesis**

Debido a que la tinción simultánea de viabilidad, contenido de DNA y ciclinas o rastreador de proliferación requiere de condiciones de fijación y permeabilización particulares (que permitan el acceso al núcleo), la estandarización de estos procedimientos será indispensable para generar una metodología que nos permitirá evaluar, por citometría de flujo multiparamétrica, arresto de las células  $T_{CM}$   $CD4^+$  en las fases G2/M del ciclo celular.

## 4 Objetivos

### 4.2 Objetivo general

Estandarizar la tinción de citometría de flujo que nos permita evaluar la viabilidad, el contenido de ADN, la expresión de las ciclinas A<sub>2</sub> y B<sub>1</sub> y las rondas de proliferación en linfocitos T de memoria central CD4<sup>+</sup>.

### 4.3 Objetivos particulares

- Determinar el método de fijación y permeabilización de las células que nos permitan evaluar las variables de interés por citometría de flujo.
- Determinar la concentración adecuada del reactivo *celltrace* para evaluar las rondas de proliferación celular.
- Determinar las condiciones de estímulo y de cultivo celular que nos permitan evaluar entrada y arresto del ciclo celular.

## 5 Metodología

### 5.2 Muestras

Los experimentos se realizaron de muestras provenientes de paquetes leucocitarios de donadores sanos VIH<sup>-</sup> del banco de sangre del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER).

### 5.3 Purificación de PBMC

A partir de 30 ml del concentrado leucocitario se purificaron las células mononucleares de sangre periférica (PBMC por sus siglas en inglés) por gradiente de densidad (Ficoll-Paque, Lymphoprep™, Oslo, Noruega). Después de obtener el anillo leucocitario se realizó un lavado con 50 ml de amortiguador salino de fosfatos 1X (PBS) (Thermo Scientific, Logan, Utah, USA) a 1500 rpm durante 15 minutos. Se lisaron los glóbulos rojos residuales con buffer de lisis (150 mM NH<sub>4</sub>Cl [Reactivos Química Meyer, D.F., México], 10 mM KHCO<sub>3</sub> [Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA] y 0.1 mM EDTA [Sigma-Aldrich,]) durante diez minutos a temperatura ambiente, posteriormente se realizó un lavado con PBS 1X (Thermo Scientific) y las células fueron resuspendidas en medio completo RPMI-1640 (Lonza, Walkersville, MD USA) que contiene 10 % de suero fetal bovino descomplementado (SFB) (Thermo Scientific), 100 U/ml de penicilina, 0.1 mg/ml de estreptomina, 2 mM de L-glutamina (Lonza) y 5 mM de HEPES (Sigma Life Science, St. Louis, MO, USA). Para su conteo microscópico se utilizó una cámara de *neubauer* (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Alemania) usando el colorante vital azul de tripano (Lonza). Las PBMC fueron colocadas en cajas de cultivo celular de 50 ml. Por cada millón de células se colocó 1 ml de medio completo RPMI-1640 (Lonza), se mantuvieron en cultivo durante la noche a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub> y 80 % de humedad.

#### 5.4 Purificación de linfocitos T de memoria central CD4<sup>+</sup>

A partir de las PBMC se purificaron linfocitos T de memoria central (T<sub>CM</sub>) CD4<sup>+</sup> por medio del sistema de columnas MACS de Miltenyi (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA) que se basa en el marcado magnético indirecto de las T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup>. La purificación se realiza en dos pasos, el primero consiste en la depleción de las células que no expresan CD4 en su membrana y en las células T *naive*, marcándolas magnéticamente de forma indirecta con un *cocktail* de anticuerpos monoconales (anti CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD25, CD36, CD45RA, CD56 y CD123) conjugados con biotina y microperlas magnéticas antibiotina. Finalmente la separación magnética se realiza en una columna LS (Miltenyi Biotec) unida a un magneto QuadroMACS (Miltenyi Biotec), donde las células marcadas quedan magnéticamente unidas a la columna. Debido a que las T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup> expresan la molécula CCR7 en su membrana, en el segundo paso se marcan magnéticamente de forma indirecta con un anticuerpo anti-CD197 (CCR7) (Miltenyi Biotec) conjugado con PE y microperlas anti PE (Miltenyi Biotec), las células se pasan por una columna MS (Miltenyi Biotec) unida a un magneto MiniMACS (Miltenyi Biotec) en donde las T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup> son seleccionadas positivamente en esta columna. Al retirar la columna del magneto las células que están retenidas en la columna eluyen con ayuda de un émbolo, esta es la fracción purificada de células T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup>. Posteriormente se realiza el conteo microscópico con azul de tripano (Lonza) en la cámara de *neubauer* (Marienfield).

#### 5.5 Determinación de la pureza de T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup>

Dado que en los experimentos realizados se requiere de una pureza mayor o igual al 90 % de los linfocitos T<sub>CM</sub> purificados, se realizó una tinción para citometría de flujo para verificar que se cumpliera esta condición.

Se colocaron un millón de PBMC en tubos de citometría de flujo (BD Falcon, Durman, NC, USA) y un tubo con 100,000 T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup> para evaluar la pureza. Se realizó un lavado con 2 ml de PBA (buffer salino de fosfatos que contiene 1 % de



albúmina sérica bovina [Carbiochem, La Jolla, CA, USA] y 0.1 % de azida de sodio [Reactivos Química Meyer]) y se centrifugó a 2000 rpm a 4°C durante 3 min.

Se colocaron anticuerpos monoclonales dirigidos contra las moléculas de superficie CD4 conjugado al fluorocromo APC-Cy7 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), CCR7 (Miltenyi Biotec) conjugado al fluorocromo PE y CD45RA (BD) conjugado o al fluorocromo APC; los anticuerpos se dejaron incubar durante 20 minutos a 4 °C protegidos de la luz. Después se realizó un lavado con PBA, se decantó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 200 µl de PBA.

Para establecer los límites entre las poblaciones de interés, se empleó un tubo FMO (fluorescencia menos uno por sus siglas en inglés) de CCR7. Los FMO son células teñidas con todos los anticuerpos utilizados excepto el anticuerpo para el cual se desea establecer el límite entre una población positiva y negativa del marcador celular de interés.

Ya que las células por sí mismas son autofluorescentes, es decir, presentan fluorescencia de manera natural, fue necesario tener un tubo de PBMC sin teñir con la finalidad de que la fluorescencia natural de esta muestra control fuera diferenciada de la fluorescencia que emiten las células teñidas.

## 5.6 Compensación

Es necesario establecer parámetros de compensación con objetivo de eliminar el traslape parcial de los espectros de emisión de los fluorocromos acoplados a cada anticuerpo, por lo que se realizaron tres tubos monotñidos con cada fluorocromo (APC-Cy7, APC y PE) más una gota de perlas de compensación (BD) que tienen acoplados anticuerpos dirigidos contra la cadena ligera  $\kappa$  de las inmunoglobulinas provenientes de ratón que da una señal con cualquier anticuerpo de ratón que posea la cadena ligera  $\kappa$ .

Las muestras fueron adquiridas en el citómetro de flujo FACSCanto II (BD, San Jose, CA, USA) del INER y los datos obtenidos fueron analizados con el *software FlowJo* versión 10.0.

### 5.7 Tinción con *Celltrace Far Red*

Para tener evidencia de la proliferación de las células, una vez purificadas las T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup> se realizó la tinción con *CellTrace™ Far Red* (Invitrogen, Eugene, OR, USA) que difunde fácilmente dentro de las células y se une covalentemente a aminos intracelulares.

La solución *stock* de *CellTrace* (Invitrogen) se preparó añadiendo 20 µl de DMSO (Invitrogen) al vial y se mezcló en el vórtex. Esta solución se preparó inmediatamente previo a su uso.

Para la titulación del reactivo *CellTrace* (Invitrogen) se probaron volúmenes de 0.25, 0.5, 1, 3 y 5 µl de la solución *stock* de *CellTrace* (Invitrogen) por cada ml de la suspensión celular. Se resuspendieron 200 000 células T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup> en 1 ml de PBS 1X (Thermo Scientific) y se incubaron por 20 minutos a temperatura ambiente en agitación (120 rpm), protegido de la luz. Transcurrido ese tiempo se añadieron 5 ml de PBA (sin azida de sodio) y se incubaron durante 5 minutos. Después las células se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos. Se decantó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en medio completo RPMI-1640 (Lonza) para su cultivo.

### 5.8 Estimulación de T<sub>CM</sub> CD4 y cultivo celular

Una vez realizada la tinción con *CellTrace* (Invitrogen), se colocaron 200 000 T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup> con 200 µl de medio completo RPMI-1640 (Lonza) por pozo, en una placa de 96 pozos (BD) y se añadió un estímulo policlonal vía TCR con el kit *Treg expansion Kit* (Miltenyi Biotec) que contiene microperlas con anti-CD3 y anti-CD28. El estímulo se colocó en una proporción de 1 perla por 4 células. Los linfocitos T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup> se dejaron en cultivo con el estímulo durante 6 horas a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub> y 80 % de humedad.

Después del tiempo de incubación se retiró el estímulo como se describe a continuación: las células se cosecharon de cada pozo y se transfirieron a un tubo de citometría (BD Falcon), posteriormente el tubo se colocó en un magneto durante 5 minutos para permitir que las perlas se quedaran en la pared del tubo, la

suspensión de células se retiró con una micropipeta y se colocaron en otro tubo de citometría. Este paso se realizó una vez más. Las células se lavaron con medio completo RPMI-1640 (Lonza) y se colocaron nuevamente en una placa de 96 pozos en presencia de 100 U/ml de IL-2 (BioLegend, San Diego, CA, USA). Las células se dejaron en cultivo con las condiciones que ya se mencionaron durante 6 días, y se cambió el medio completo RPMI-1640 (Lonza) cada 2 días en presencia de 100 U/ml de IL-2 (BioLegend).

Después de que las T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup> estuvieron en cultivo durante 6 días, se colocaron 200,000 células por cada tubo de citometría (BD Falcon) y se lavaron con medio completo RPMI-1640 (Lonza) y se realizó un segundo lavado con PBS 1X (Thermo Scientific).

#### 5.9 Tinción de viabilidad

A cada tubo con 200 000 células se le agregó el reactivo *Live/Dead near-IR fluorescent* (Invitrogen, Eugene, OR, USA) para evaluar la viabilidad de las células por citometría de flujo. Esta tinción se basa en la unión del colorante fluorescente con las aminas libres en la membrana celular, en el caso de las células vivas, y con las aminas extracelulares e intracelulares en el caso de las células muertas, por lo que estas células presentan una mayor fluorescencia a diferencia de las células vivas. Previo a la tinción, el vial de *Live/Dead* (Invitrogen) se reconstituyó con 50 µl de DMSO (Invitrogen). Una vez reconstituido se agregó 1 µl de *Live/Dead* (Invitrogen) por tubo y se resuspendieron las células en 1 ml de PBS 1X (Thermo Scientific), se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz. Después de la incubación las células se centrifugaron a 2000 rpm durante 3 minutos y posteriormente se llevó a cabo la fijación de las células.

#### 5.10 Métodos de fijación

Durante la estandarización de la tinción de citometría de flujo se realizaron diferentes métodos de fijación que se describen a continuación.

### 5.10.1 Fijación con Etanol al 75 %

La preparación del etanol al 75 % se realizó el mismo día de su uso. Se utilizó etanol grado reactivo (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) y se diluyó con agua destilada.

Se agregó gota a gota 1 ml de etanol al 75 % frío en agitación suave a cada tubo de citometría (BD Falcon) y se dejó incubar durante 2 horas a -20 °C. Después de fijar las células, se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 minutos, se decantó el etanol y se realizó un lavado con PBA durante 5 minutos a 2000 rpm.

Este método de fijación se basa en la acción que tienen los alcoholes para desnaturalizar las proteínas, exponiendo sus grupos hidrofóbicos internos por lo que altera la estructura terciaria de las proteínas así como su solubilidad (83).

### 5.10.2 Fijación con *Cytofix/Cytoperm*

El reactivo *Cytofix/Cytoperm*<sup>™</sup> (BD, San Diego, CA, USA) es una solución de saponina y paraformaldehído que permite fijar y permeabilizar las células.

Se agregaron 250 µl de *Cytofix/Cytoperm* (BD) a cada tubo de citometría (BD Falcon) y se dejó incubar durante 20 minutos a 4 °C, posteriormente las células se lavaron con 1 ml de *Perm Wash Buffer* 1X a 2000 rpm durante 3 minutos. El *Perm Wash Buffer* 1X se preparó a partir del *Perm Wash Buffer* 10X (BD) diluyendo con agua destilada.

### 5.10.3 Fijación con paraformaldehído al 1 % y al 1.5 %

El paraformaldehído (PFA) al 1 o al 1.5 % se preparó a partir del reactivo formaldehído al 37 % (Avantor Performance Materials, Edo. Mex., México) y se diluyó con PBS 1X (Thermo Scientific). Se agregó 1 ml de PFA al 1 % o 1.5 % y se incubó por 10 minutos a 4 °C.

Después de fijar las células se centrifugaron a 2000 rpm durante 3 minutos, se decantó el PFA y se realizó un lavado con PBA durante 5 minutos a 2000 rpm.

El paraformaldehído debe su capacidad fijadora gracias a que forma un polímero que se une a las proteínas, particularmente con los residuos de lisina (83).

## 5.11 Métodos de permeabilización

Para evaluar el contenido de ADN y la expresión de las ciclinas A<sub>2</sub> y B<sub>1</sub> fue necesario realizar tinciones intracelulares por lo que se probaron dos métodos de permeabilización.

### 5.11.1 Permeabilización con TRITON x-100 al 0.25 %

El TRITON x-100 al 0.25% se hizo en PBA. Se añadieron 500 µl de tritón al 0.25 % a cada tubo de citometría (BD Falcon), se agitaron en vórtex y se incubaron 5 minutos a 4 °C. Después se realizó un lavado con 2 ml de PBA a 200 g durante 10 minutos.

### 5.11.2 Permeabilización con Metanol al 100 %

Se agregó gota a gota en agitación suave, 1 ml de Metanol (Golden Bell Reactivos, D.F., México) grado reactivo frío a cada tubo de citometría (BD Falcon), se dejó incubar durante 30 minutos a -20 °C. Transcurrido el tiempo de incubación se centrifugaron las células a 2000 rpm durante 10 minutos, posteriormente se realizó un lavado con PBA a 2000 rpm durante 5 minutos.

## 5.12 Tinción de ciclinas A<sub>2</sub> y B<sub>1</sub>

Una vez que las células se encontraban fijadas y permeabilizadas se añadieron 20 µl de los anticuerpos anti-ciclina A<sub>2</sub> y 20 µl de anti-ciclina B<sub>1</sub> (BD Pharmingen) conjugadas a PE y FITC, respectivamente, más 100 µl de PBA. En otro tubo se añadieron 20 µl de cada uno de los controles de isotipos de los anticuerpos anti-ciclinas con el fin de descartar uniones inespecíficas. Se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente protegidos de la luz. Después se realizó un lavado con 2 ml de PBA durante 3 minutos a 2000 rpm y se descartó el sobrenadante.

### 5.13 Tinción de ADN

Se añadieron 0.5 µl del intercalante de ADN *Fx Cycle Violet Stain* (Invitrogen) más 500 µl de PBA, se mezcló suavemente y se dejó incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz. Transcurrido ese tiempo las muestras se adquirieron en el citómetro de flujo FACS Aria (BD, San Jose, CA, USA) del INER y los datos obtenidos se analizaron con el *software FlowJo* versión 10.0.

La compensación se realizó con tubos monotefidos para cada uno de los fluorocromos empleados: los isotipos de PE y FITC se agregaron en tubos independientes junto con perlas de compensación (BD) y el reactivo *Live/Dead Near IR* (Invitrogen) se agregó junto con perlas de compensación (Invitrogen). También se emplearon células monotefidas con del intercalante de ADN *Fx Cycle Violet Stain* (Invitrogen) y *CellTrace* (Invitrogen) con este fin.

Después de encontrar las condiciones adecuadas de fijación, permeabilización y estímulo, la cinética de la expresión de ciclinas, así como la medición de proliferación se realizó por triplicado. Lo que se muestra a continuación son datos representativos.

## 6 Resultados

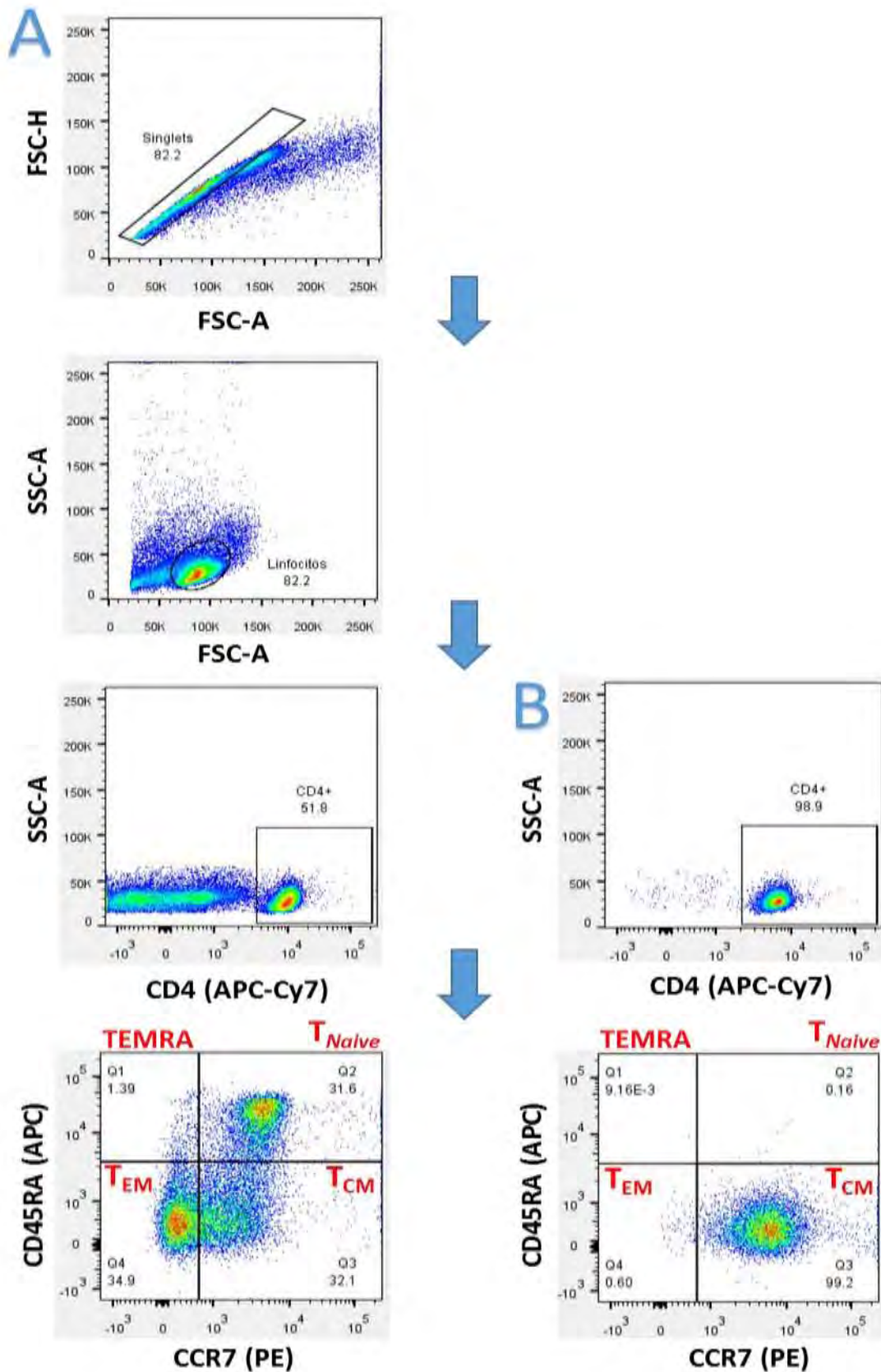
### 6.1 Evaluación de la pureza de T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup>

Para evaluar la pureza de los T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup> se realizaron tinciones de citometría de flujo y se añadieron anticuerpos conjugados a un fluorocromo. En la **tabla 1** se muestra el panel utilizado para la tinción de citometría de flujo.

Molécula detectada	Fluorocromo acoplado
CD4	APC-Cy7
CD45RA	APC
CCR7	PE

**Tabla 1.** Anticuerpos monoclonales conjugados a fluorocromo para la determinación de pureza de T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup>.

En la **Figura 6.1A** se observa la estrategia de análisis utilizada para evaluar la pureza obtenida de los T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup> a partir de PBMCs. Primero se realizó la selección o *gate* para observar los *singlets*, es decir, las células que pasan de manera individual por el láser del citómetro, así nos aseguramos de analizar células individuales y no aglomerados de células. Una vez seleccionada la población de *singlets* se realizó el *gate* en células con morfología de linfocitos, posteriormente se seleccionaron solo los linfocitos CD4<sup>+</sup> y debido a que los T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup> expresan en su membrana la molécula CCR7 y no expresan CD45RA, con ayuda de anticuerpos monoclonales dirigidos contra dichas moléculas, se realizó el *gate* correspondiente para diferenciar a los T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup> de otras poblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> como linfocitos T terminalmente diferenciados (T<sub>EMRA</sub>), linfocitos T de memoria efectora (T<sub>EM</sub>) y linfocitos T *naive*. En la **Figura 6.1B** se puede ver que la población celular purificada corresponde a los linfocitos CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>-</sup> CCR7<sup>+</sup> características que describen a los linfocitos T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup>.



**Figura 6.1.** Evaluación de la pureza de  $T_{CM}$   $CD4^+$  a partir de PBMC. (A) Tinción en PBMCs para establecer los límites para de las poblaciones CCR7 y CD45RA positivas y negativas con ayuda de los FMOs para dichas moléculas. (B) Tinción en  $T_{CM}$   $CD4^+$  purificados.

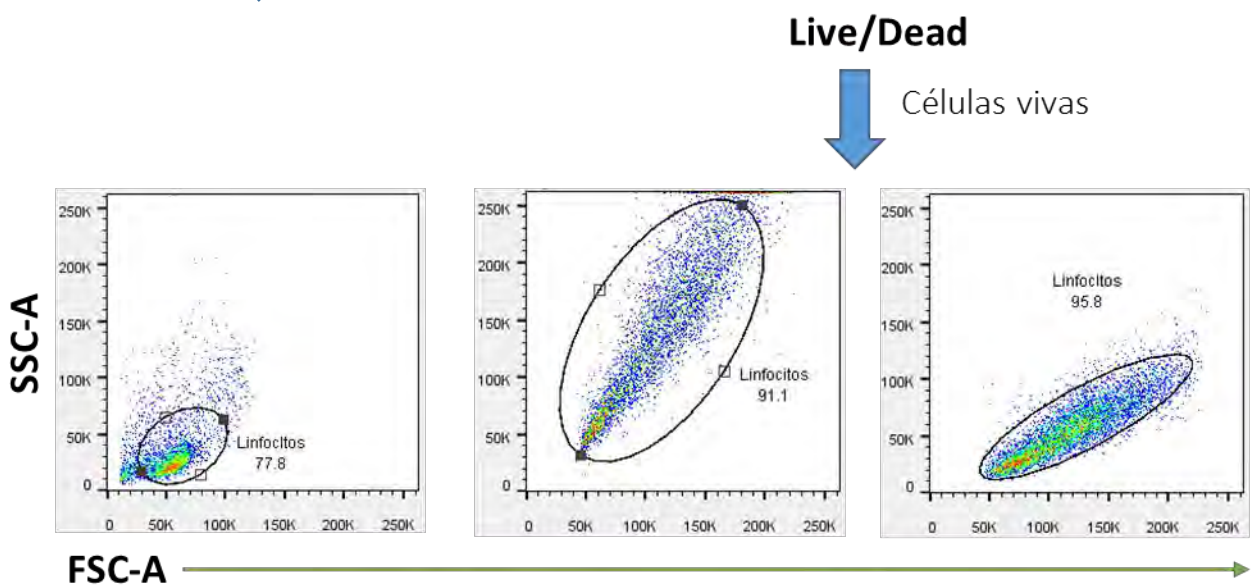
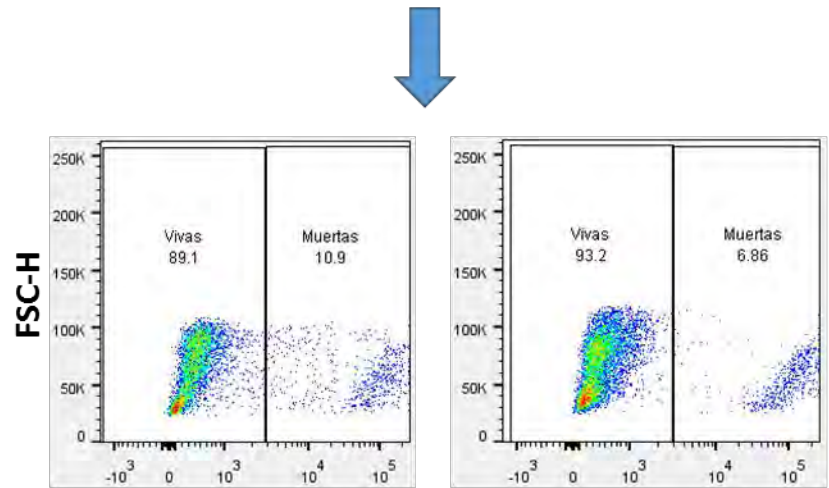
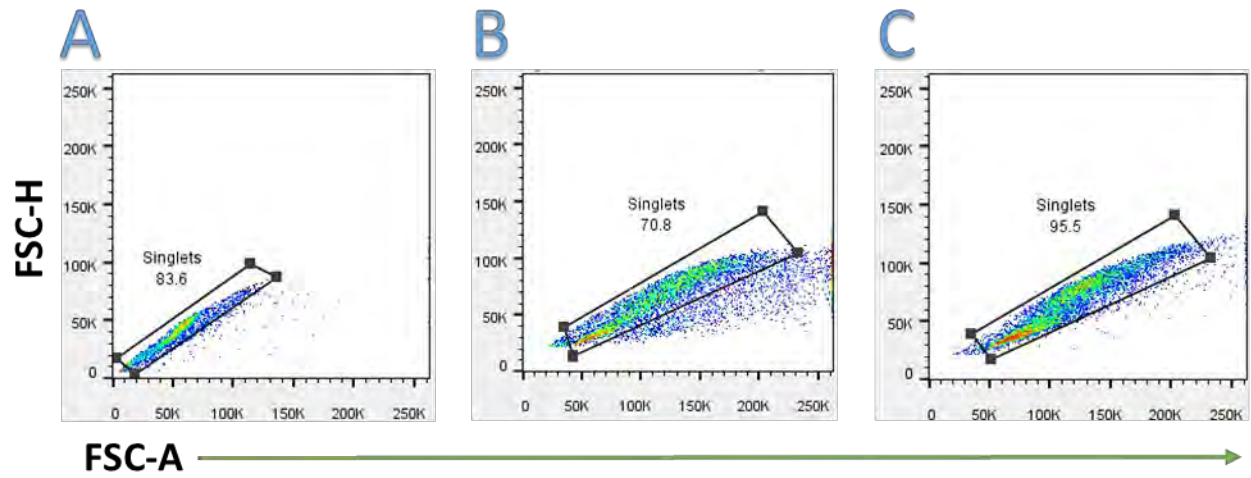


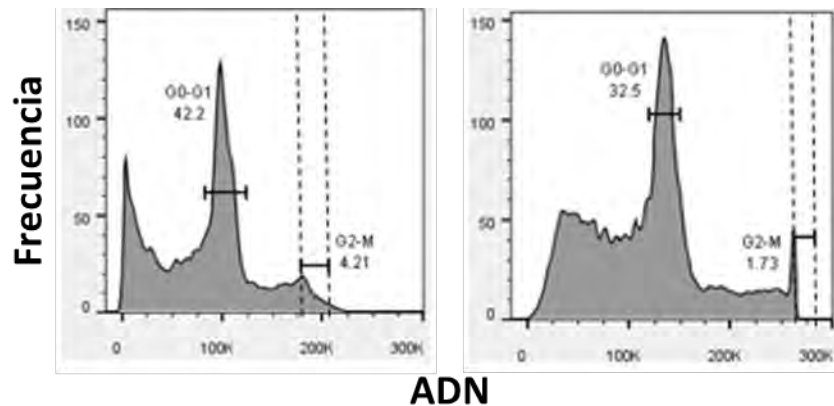
## 6.2 Métodos de fijación y evaluación de contenido de ADN

Evaluamos diferentes métodos de fijación de las células con el fin de poder discernir fácilmente la morfología de linfocitos y a partir de ello poder evaluar el contenido de ADN y la expresión de ciclinas en nuestras células de interés. Fue necesario probar distintos métodos de fijación debido a que con el primer método de fijación que se probó, además de no poder distinguir con facilidad la población de linfocitos, no logramos observar la expresión de ciclinas.

En la **Figura 6.2** se muestra la estrategia de análisis que se siguió para evaluar la morfología y el contenido de ADN en las células. En la **Figura 6.2A** se muestran PBMCs fijadas con PFA al 1 % como control positivo ya que es el método que utilizamos comúnmente para teñir las células en tinciones para citometría de flujo. En las **Figuras 6.2B** y **6.2C** se muestran poblaciones de la línea celular premonocítica humana THP<sub>1</sub> (ATCC TIB-202) fijadas con etanol al 75 % y *Cytofix/Cytoperm* (BD) respectivamente. Este experimento se realizó con una línea celular para corroborar que se puede determinar el contenido de ADN en las diferentes fases del ciclo celular.

En las células fijadas con PFA al 1 % (**Fig. 6.2A**) podemos observar que la población de linfocitos es muy clara y se puede definir con facilidad. Sin embargo para las células fijadas con etanol al 75 % (**Fig. 6.2B**) y con *Cytofix/Cytoperm* (**Fig. 6.2C**), las poblaciones de células se ven muy diferentes entre sí y tienen propiedades morfológicas heterogéneas. También se puede observar en los histogramas que el reactivo que nos indica contenido de ADN se une a los ácidos nucleicos, sin embargo, se observan histogramas atípicos antes del pico que corresponde a la fase G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> y el pico que correspondería a la fase G<sub>2</sub>/M no se encuentra en el doble de la IMF (Intensidad media de fluorescencia) del pico de G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>. Estos resultados nos indican que estas técnicas de fijación y permeabilización alteran mucho la morfología de las células y nos son óptimas para observar el contenido de ADN.





**Figura 6.2.** Métodos de fijación. A) Células fijadas con PFA 1 % utilizadas como control positivo. B) Células fijadas con etanol al 75 %. C) Células fijadas con *Cytofix/Cytoperm*.

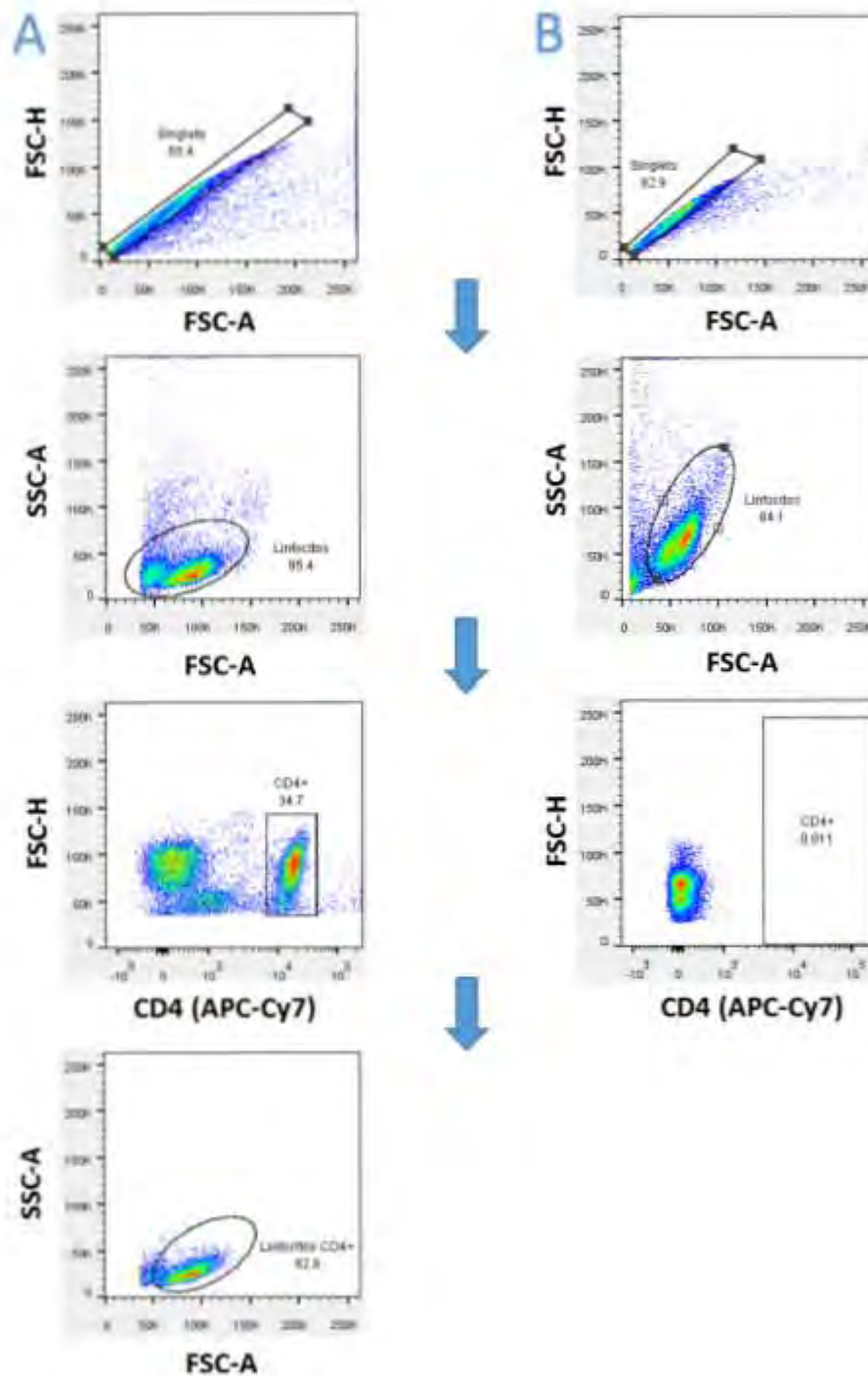
### 6.3 Tinción con anticuerpo anti CD4 previo a la fijación de las células

Debido a que los métodos de fijación y permeabilización de los experimentos anteriores alteraban mucho la morfología de las células y no pudimos observar con claridad la población de linfocitos, realizamos una tinción con el anticuerpo monoclonal anti CD4 (BD) conjugado al fluorocromo APC-Cy7 para asegurarnos de seleccionar la población adecuada de linfocitos.

En la **Figura 6.3A** se observan PBMCs que fueron teñidas con un anticuerpo anti-CD4 conjugado con APC-Cy7 y posteriormente fijadas con PFA al 1 %. En el *gate* correspondiente a morfología se observan diferentes poblaciones muy pegadas entre sí. Al hacer el *gate* para seleccionar a las células CD4<sup>+</sup> observamos que al seleccionarlas, sus características de morfología corresponden a una población bien definida. De esta manera podemos tener la seguridad de que estamos seleccionando la población que nos interesa.

En las PBMCs fijadas con etanol al 75 % (**Figura 6.3B**) se observa una población más heterogénea de linfocitos, como ya lo habíamos visto previamente. Al realizar la tinción con el anticuerpo anti CD4 observamos que por el método de fijación la tinción extracelular con CD4 no resiste y no podemos asegurar que la población que vemos de linfocitos antes de realizar el *gate* para seleccionar linfocitos CD4<sup>+</sup> es la población que nos interesa.

Debido a que el objetivo de este experimento era discernir la población de linfocitos, no se realizó la tinción para determinar contenido de ADN.



**Figura 6.3.** Estrategia de análisis para discernir la población de linfocitos. A) Células teñidas con el anticuerpo monoclonal anti CD4 (BD) y posteriormente fijadas con PFA al 1 % (control positivo). B) Células teñidas con el anticuerpo monoclonal anti CD4 (BD) y posteriormente fijadas con etanol al 75 %.

#### 6.4 Permeabilización con metanol

Debido a que no pudimos diferenciar con facilidad la población de linfocitos, probamos un nuevo método de fijación de las células sugerido en la bibliografía, PFA al 1.5 %, seguido de metanol grado reactivo como método de permeabilización.

Utilizamos PFA al 1 % para fijar a las células (control positivo) (**Figura 6.4A**). Las células que fueron fijadas con etanol al 75 % tuvieron una morfología de linfocitos poco clara. A pesar de esto, por la morfología observada en experimentos anteriores colocamos el *gate* en esa posición (**Figura 6.4B**). Con esta población celular el contenido de ADN, en el pico de la fase G0-G1, se puede observar claramente aunque con mayor dispersión en comparación con las células fijadas con PFA al 1.5 %.

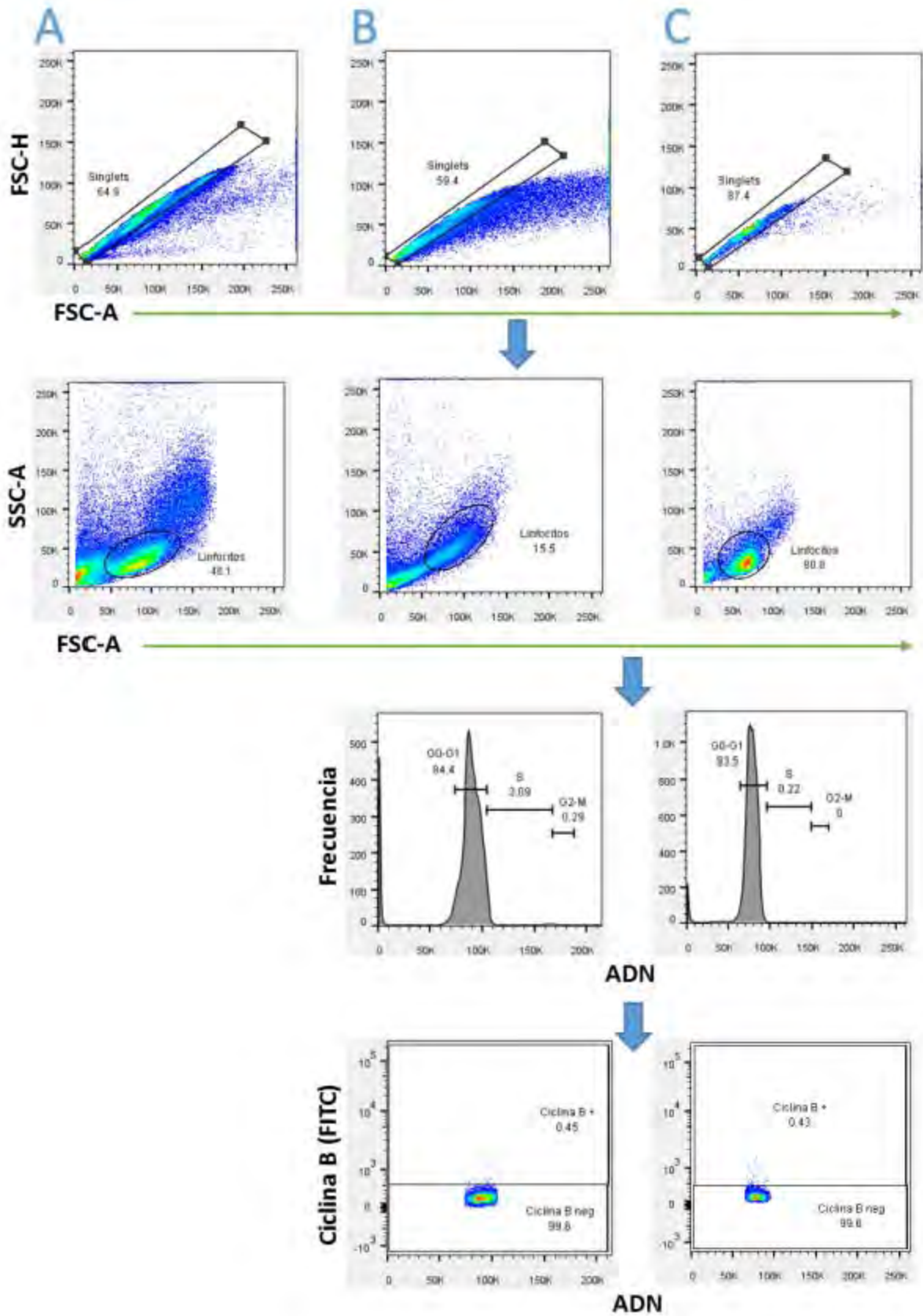
En las células fijadas con PFA al 1.5 % se observa una morfología de linfocitos muy bien definida del mismo modo que el pico de la fase G0-G1 al evaluar el contenido de ADN. Con ambos métodos de fijación se observa la baja expresión de la ciclina B<sub>1</sub> en la fase G0-G1.

Con los resultados mostrados decidimos que el mejor método de fijación para las células es con PFA al 1.5 % y como método de permeabilización metanol al 100 %.

#### 6.5 Estimulación y cultivo celular

Debido a que en la determinación del contenido de ADN solo observamos el pico correspondiente a la fase G0-G1 se añadió un estímulo policlonal con el kit *Treg expansion Kit* (Miltenyi Biotec), que contiene microperlas con anti-CD3 y anti-CD28, durante 48 horas en presencia de IL-2. Utilizamos un estímulo fuerte con el fin de asegurarnos que las células proliferaran y así poder observar todas las fases del ciclo celular. En esta serie de experimentos utilizamos linfocitos T<sub>CM</sub> purificados.

En los T<sub>CM</sub> estimulados (**Figura 6.5B**) se observa un cambio en la morfología en comparación con los T<sub>CM</sub> sin estímulo (**Figura 6.5A**). Considerando lo anterior es



**Figura 6.4.** Diferentes métodos de fijación y permeabilización con metanol. A) PBMCs fijadas con PFA al 1 %. B) PBMCs fijadas con etanol al 75 %. C) PBMCs fijadas con PFA al 1.5 %. Todas las células fueron permeabilizadas con metanol. El límite entre la población positiva y negativa para la expresión de Ciclina B se estableció con el control de isotipo anti-ciclina B<sub>1</sub>.

evidente que al activar las células por medio de un estímulo policlonal se induce la proliferación y es posible observar todas las fases del ciclo en comparación con las células sin estímulo las cuales se encuentran en fase de reposo.

Adicionalmente, en las células estimuladas y no estimuladas se observa que la expresión de la ciclina B<sub>1</sub> va aumentando en cada fase del ciclo celular sin embargo la proporción de células es mucho menor en las células sin estímulo debido a que hay menos células en las fases S y G<sub>2</sub>-M (**Figura 6.5C**).

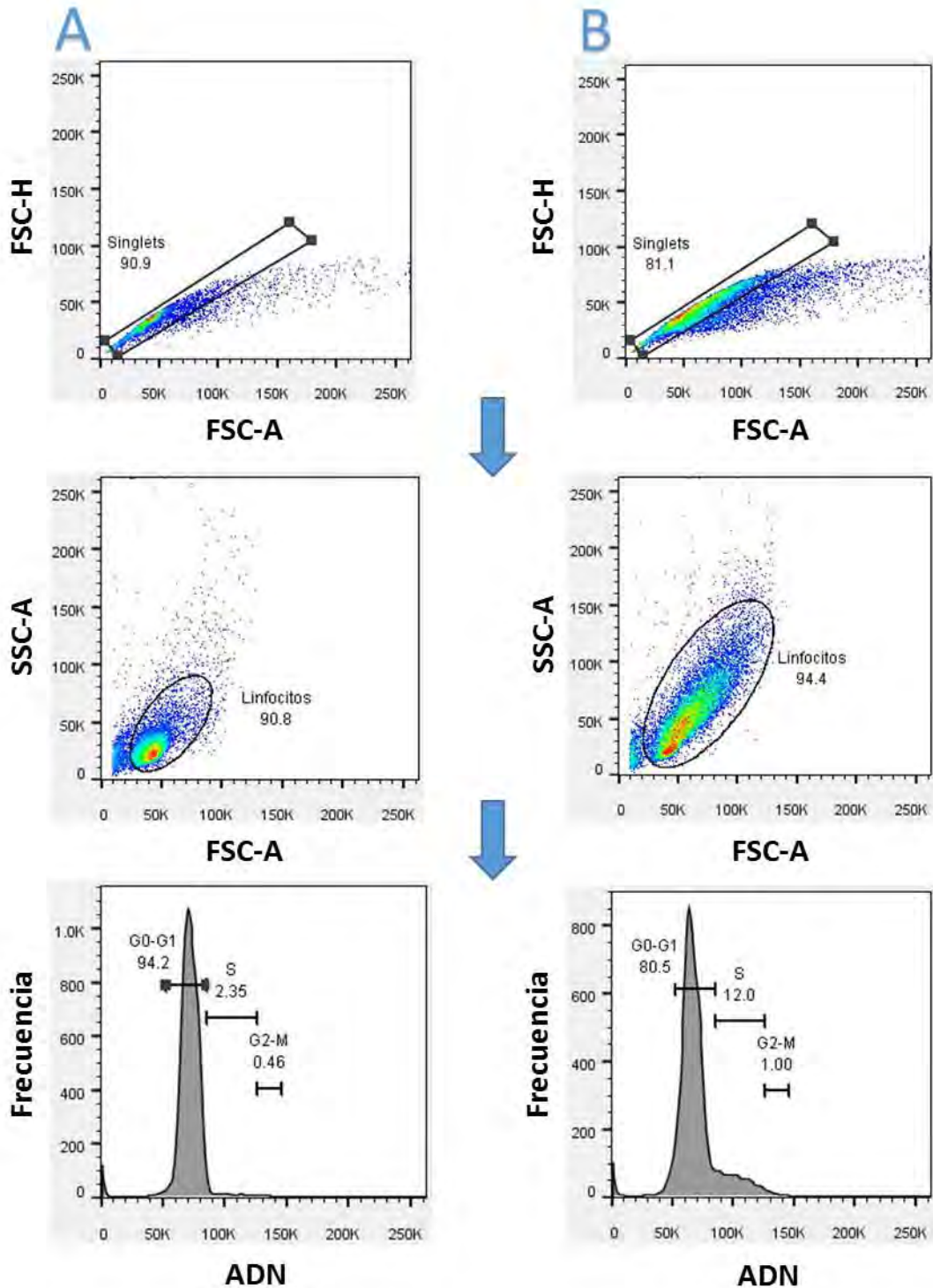
Existe la posibilidad de que el estímulo estuvo presente por muchas horas y esto *per se* podría inducir muerte celular y tanto las células de donadores como de pacientes podrían proliferar demasiado, debido al estímulo tan fuerte. Por lo que una vez que se probó que con células estimuladas se podían observar todas las fases del ciclo celular, se estableció una nueva condición de estímulo basados en trabajos previos del grupo, en la que las células se dejaron durante 6 horas con las microperlas con anti-CD3 y anti-CD28, para posteriormente cultivarlas durante 6 días en presencia de IL-2. Siendo estas nuestras condiciones finales de estimulación y cultivo celular.

#### 6.6 Determinación del contenido de ADN, ciclina A<sub>2</sub> y ciclina B<sub>1</sub>

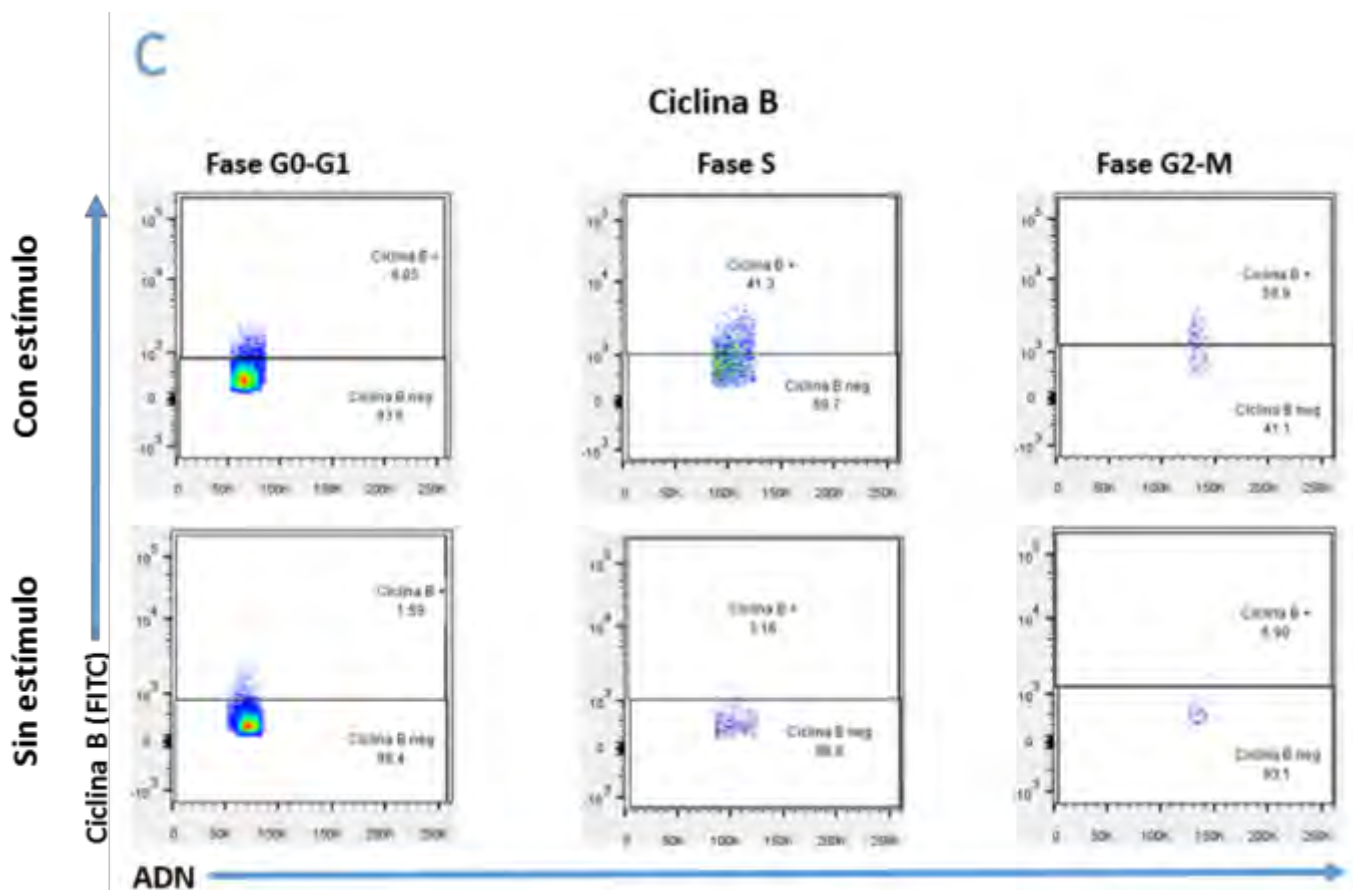
Con el objetivo de medir el contenido de DNA y la inducción de ciclina A<sub>2</sub> y B<sub>1</sub>, los T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup> se estimularon a través de TCR con un estímulo policlonal (*Treg expansion Kit* Miltenyi Biotec) durante 6 horas y dejando en cultivo durante 6 días en presencia de IL-2.

Los histogramas del contenido de ADN para T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup> estimuladas (**Figura 6.6B**) y no estimuladas (**Figura 6.6A**), son similares. La mayor proporción de células se encuentran en la fase G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> en ambas condiciones. En las células sin estímulo hay un mayor porcentaje de células en la fase S de en comparación con las células estimuladas y este comportamiento se invierte en la fase G<sub>2</sub>-M, es decir, hay un mayor porcentaje en esta fase en las células estimuladas en comparación con las

células sin estímulo, es posible que esto se deba a que las células estimuladas después de este tiempo de cultivo hayan regresado a la fase G0-G1.





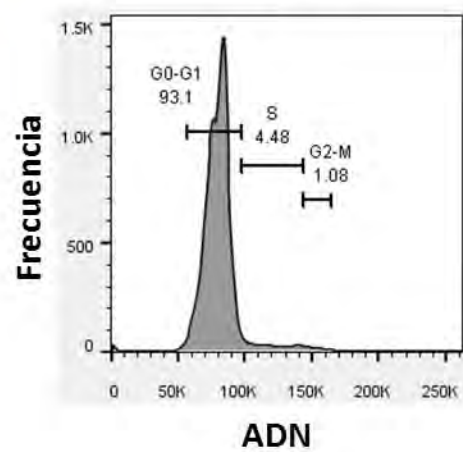
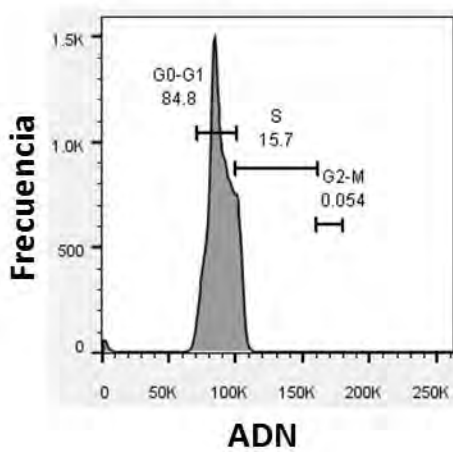
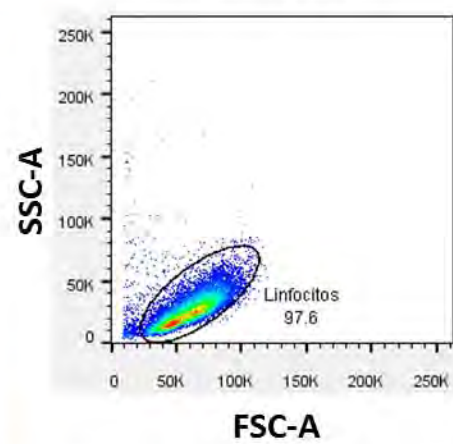
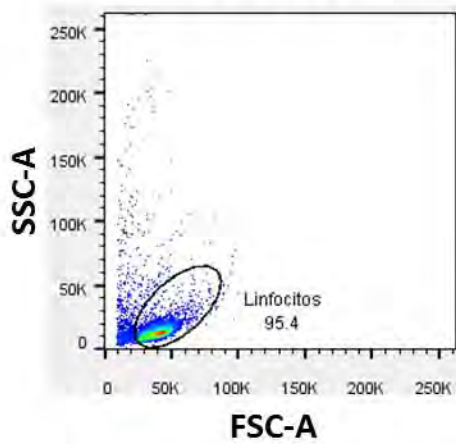
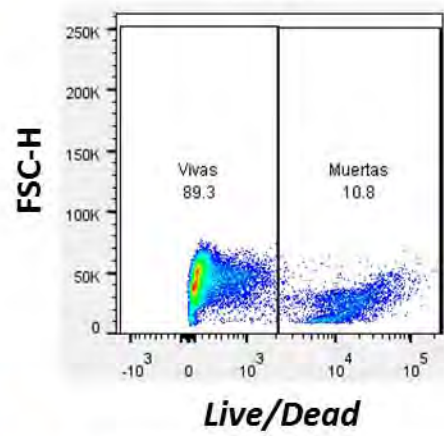
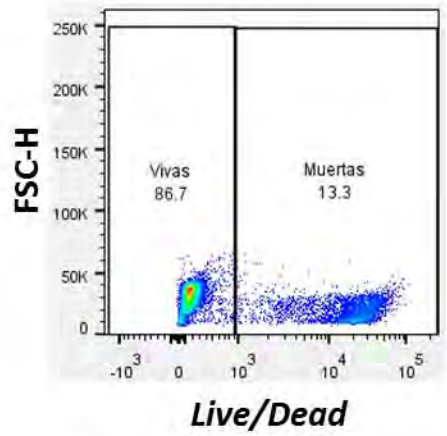
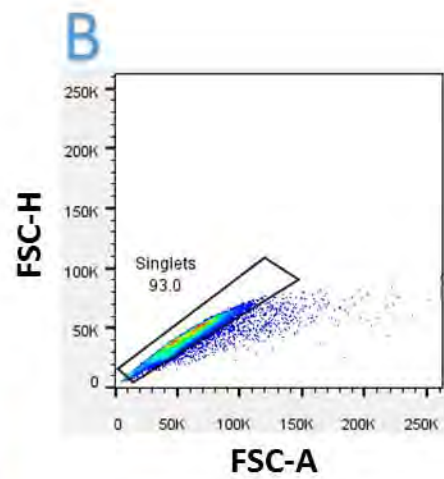
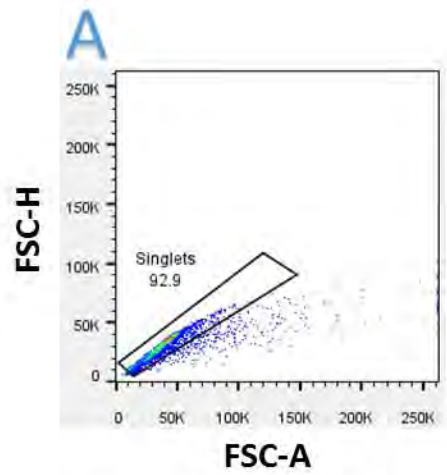


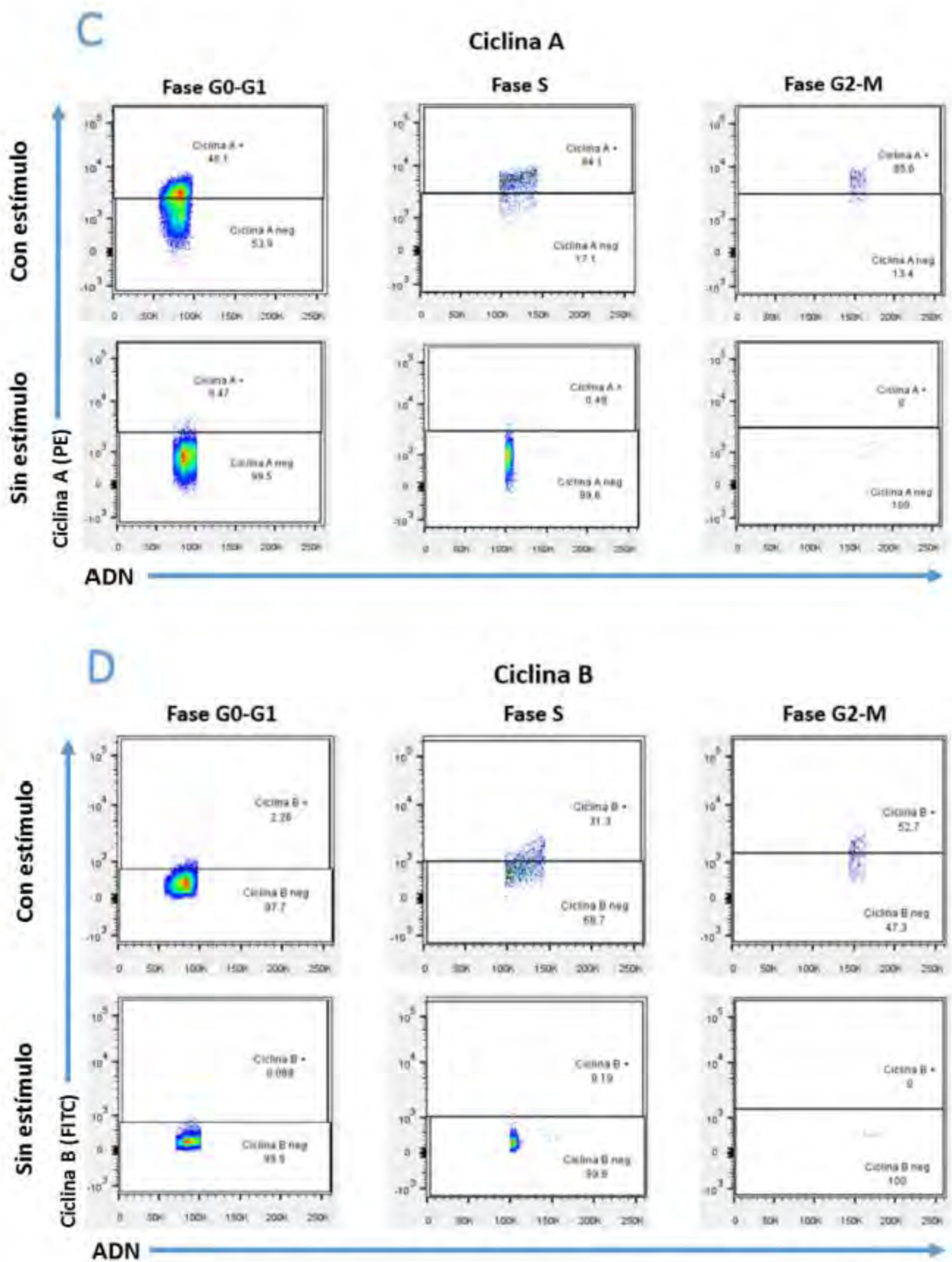
**Figura 6.5.** Determinación del contenido de ADN y ciclina B1 en T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup>. A) T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup> sin estímulo. B) T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup> activadas con un estímulo vía TCR. C) Expresión de ciclina B1 en las diferentes fases del ciclo celular, en células con y sin estímulo.

En la **Figura 6.6C** se observa que a medida que el ciclo celular avanza, la expresión de la ciclina A2 en los T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup> aumenta, a diferencia de los T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup> sin estímulo en los que la expresión de la ciclina A2 es casi nula. Se observa el mismo comportamiento para la expresión de la ciclina B1 (**Figura 6.6D**). Estos marcadores (ciclina A2 y B1) sugieren que las células con estímulo proliferaron a diferencia de las células que no recibieron un estímulo.

### 6.7 Titulación del reactivo *CellTrace*

El reactivo *CellTrace* (Invitrogen) se utilizó para tener evidencia de que las células completan la división celular. En la **Figura 6.7** se observa la estrategia de análisis que se siguió para observar la proliferación celular. Primero se evaluaron *singlets* y debido a que nos interesan únicamente las células vivas utilizamos el reactivo





**Figura 6.6.** Determinación del contenido de ADN, ciclina A2 y ciclina B1. A) T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup> sin estímulo. B) T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup> activadas con un estímulo. C) Expresión de la ciclina A2 en T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup>. D) Expresión de la ciclina B1 T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup>.

*live/dead* (Invitrogen) con el que establecimos los límites de las células vivas y muertas.

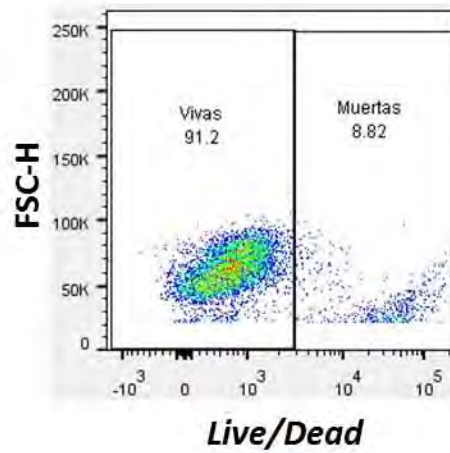
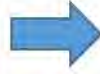
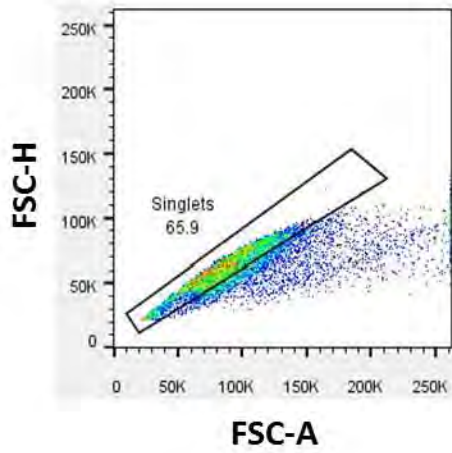
A partir de las células vivas evaluamos morfología de linfocitos y utilizando la herramienta de histograma evaluamos la proliferación de las células.

En la **Figura 6.7A** se muestra el histograma para las células que no fueron teñidas con *CellTrace* (Invitrogen) para obtener la posición de la señal negativa.

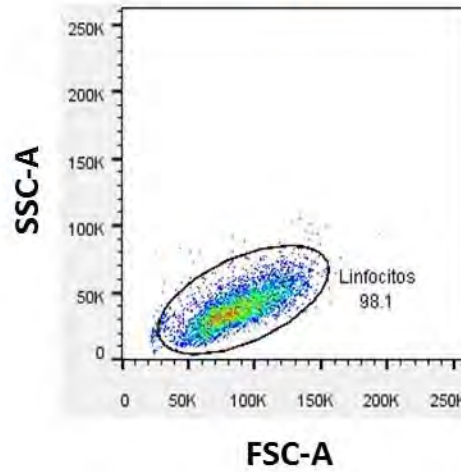
Con el fin de establecer la concentración adecuada para observar la proliferación celular de las células se realizó la titulación del reactivo *CellTrace* (Invitrogen). En la **Figura 6.7B** se observan células T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup> que no fueron estimuladas y se evaluaron diferentes concentraciones de *CellTrace* (Invitrogen) para determinar con cuál se aprecia mejor la señal positiva basal o sin ninguna ronda de proliferación.

Para células sin estímulo (**Fig. 6.7B**) se observa que la concentración de 1 µl/ml es la concentración en la que el pico de la señal positiva está completo a diferencia de las concentraciones de 3 y 5 µl/ml en donde la señal es muy intensa y recorrida hacia la derecha, por lo que la señal llega al límite superior de detección del citómetro. Por otro lado, se observa que para las concentraciones menores a 1 µl/ml, en las células sin estímulo, los picos son similares al pico correspondiente a 1 µl/ml de reactivo pero recorridos a la izquierda, a menores intensidades de fluorescencia de la gráfica, lo que podría disminuir la capacidad de detección de las rondas de replicación.

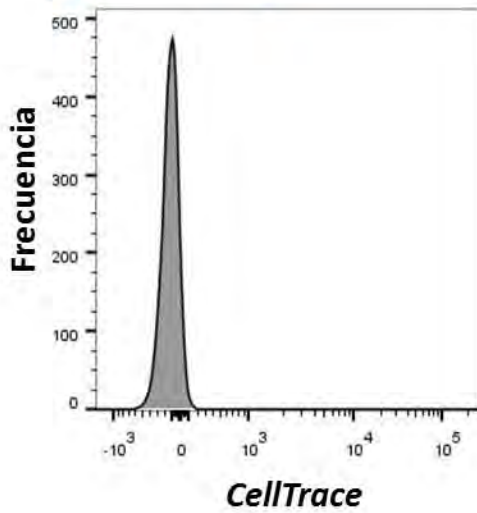
En la **Figura 6.7C** se observan células estimuladas en las que se probaron 0.25, 0.5 y 1 µl/ml. Para el pico de 1 µl/ml se puede apreciar cómo el reactivo se diluye debido a la proliferación de las células activadas. También se observa que con concentraciones menores a 1 µl/ml el reactivo se diluye mucho y los picos se recorren hacia la izquierda, en el caso de la concentración de 0.25 µl/ml el pico se traslapa con la señal negativa, por lo tanto estas últimas concentraciones no serían confiables para determinar las rondas de proliferación, siendo 1 µl/ml la concentración con la que obtenemos mayor resolución y por lo tanto la más adecuada en nuestro sistema.

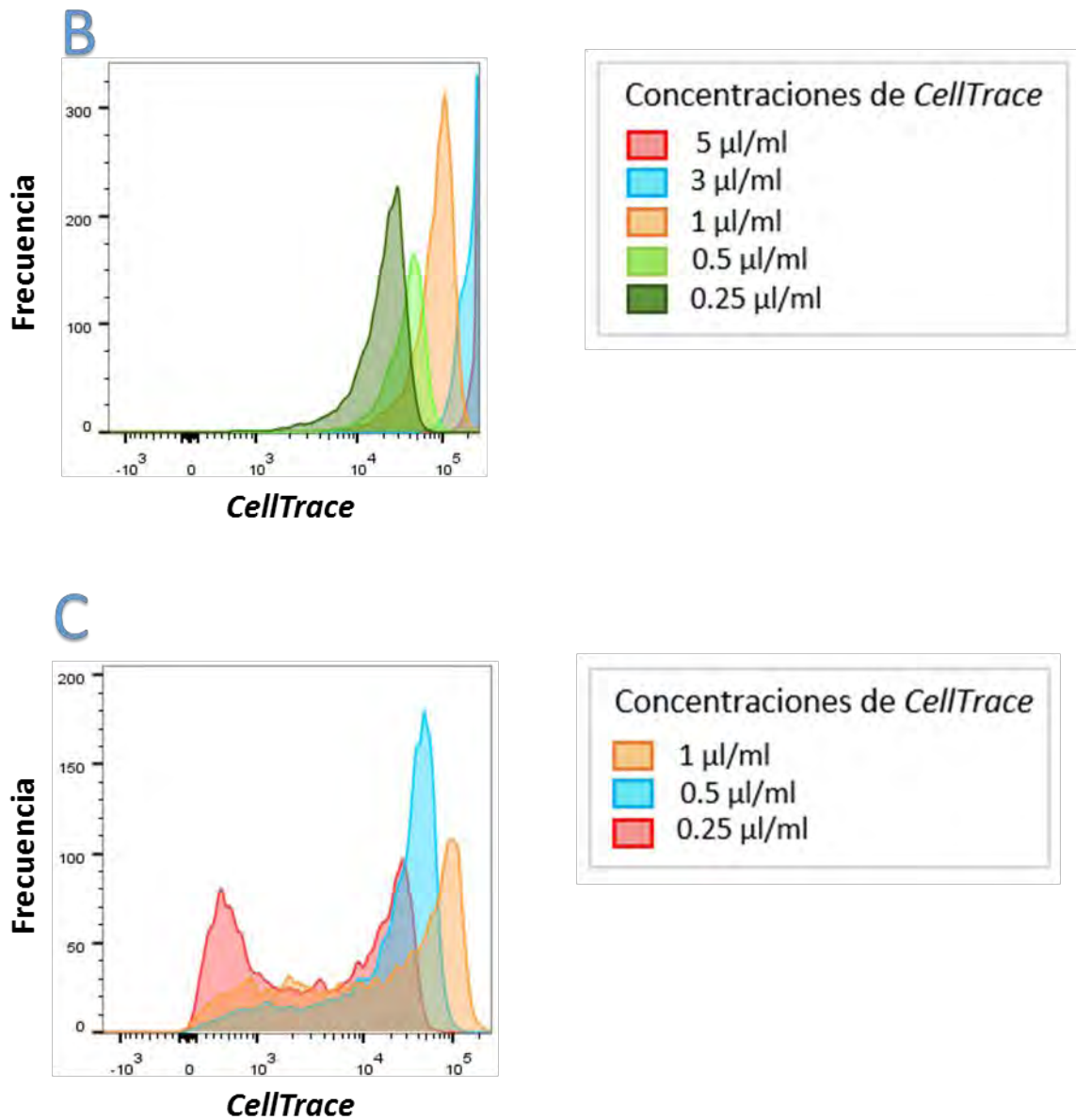


Células vivas



A





**Figura 6.7.** Titulación del reactivo *CellTrace*. A) T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup> sin teñir (señal negativa). B) Titulación de *CellTrace* en T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup> sin estímulo. Las concentraciones evaluadas fueron 0.25, 0.5, 1, 3 y 5 µl/ml del reactivo *CellTrace*. C) Titulación de *CellTrace* en T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup> con estímulo.

## 6.8 Cinética

Para asegurarnos de que la tinción se realizara en el momento adecuado, es decir, que a los 6 días posteriores a la estimulación los T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup> hayan pasado por todas las fases del ciclo celular, se realizó una cinética a diferentes tiempos de cultivo después del estímulo.

La tinción se realizó a los 2, 3, 4 y 6 días posteriores a la estimulación de los T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup>. Para las células sin estímulo la tinción se realizó a los mismos tiempos.

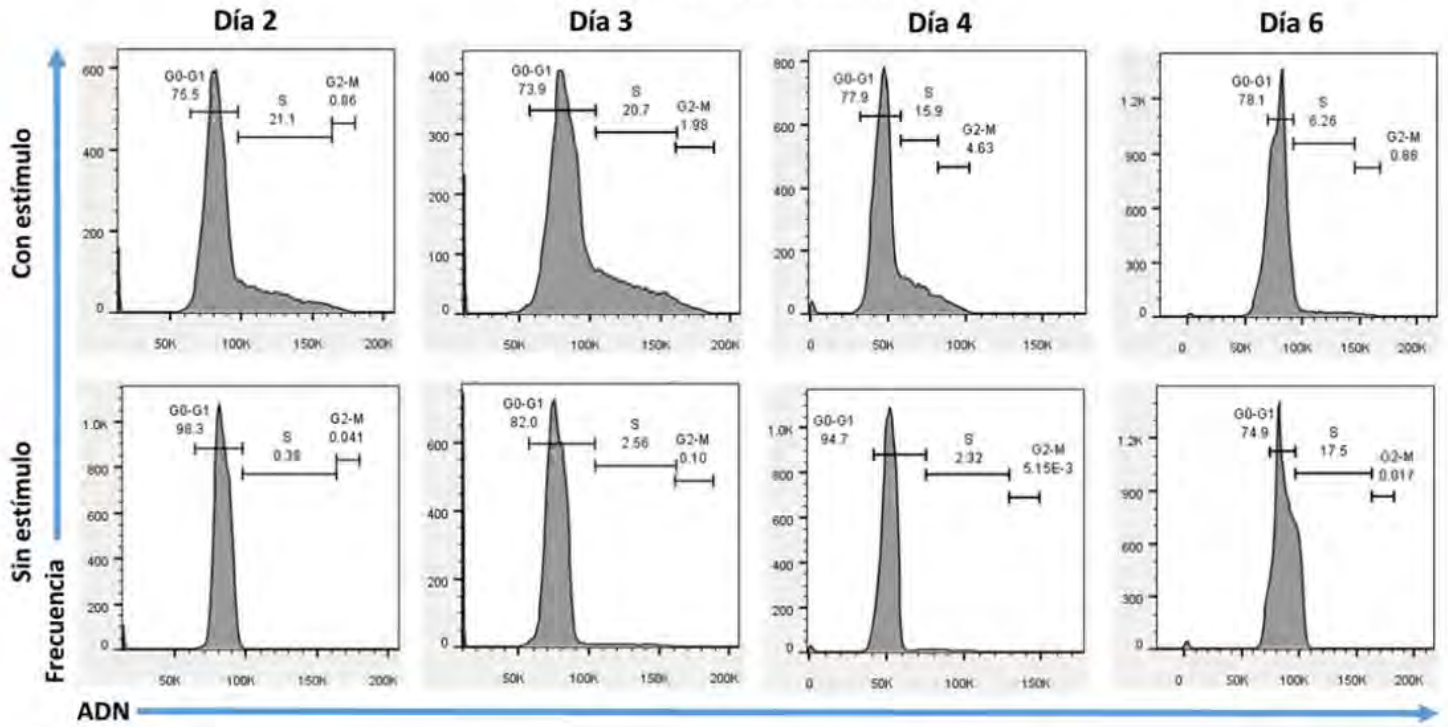
Para las células sin estímulo se observa que hasta el día 4 las células no entran a ciclo celular, es decir, se encuentran en fase G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>, hay un porcentaje muy bajo de células en fase S. En el día 6 de cultivo se observa un porcentaje mayor de células en fase S. Sin embargo las células sin estimular nunca llegan hasta la fase G<sub>2</sub>-M (**Figura 6.8A**). Esto coincide con la expresión prácticamente del cero por ciento tanto de la ciclina A<sub>2</sub> como de la ciclina B<sub>1</sub> en el día 6 de cultivo (**Figura 6.8B y 6.8C**, respectivamente).

En la **figura 6.8A** se puede observar que las células con estímulo desde el día 2 de cultivo tienen un porcentaje considerable de células en la fase S. Al día 3 se comienzan a observar células en la fase G<sub>2</sub>-M. Al día 4 se observa el porcentaje máximo de células en la fase G<sub>2</sub>-M y al día 6 la mayoría de las células se encuentra nuevamente en la fase G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>, un porcentaje muy bajo se encuentra en la fase S y prácticamente ninguna célula en G<sub>2</sub>-M. Simultáneamente la expresión de ciclinas A<sub>2</sub> y B<sub>1</sub> aumenta en cada fase del ciclo celular al día 6 (**Figura 6.8B y 6.8C**, respectivamente).

Derivado de estos resultados podemos decir que el mejor tiempo de cultivo para demostrar un posible arresto celular en las fases G<sub>2</sub>/M en pacientes VIH<sup>+</sup> es en el día 6.

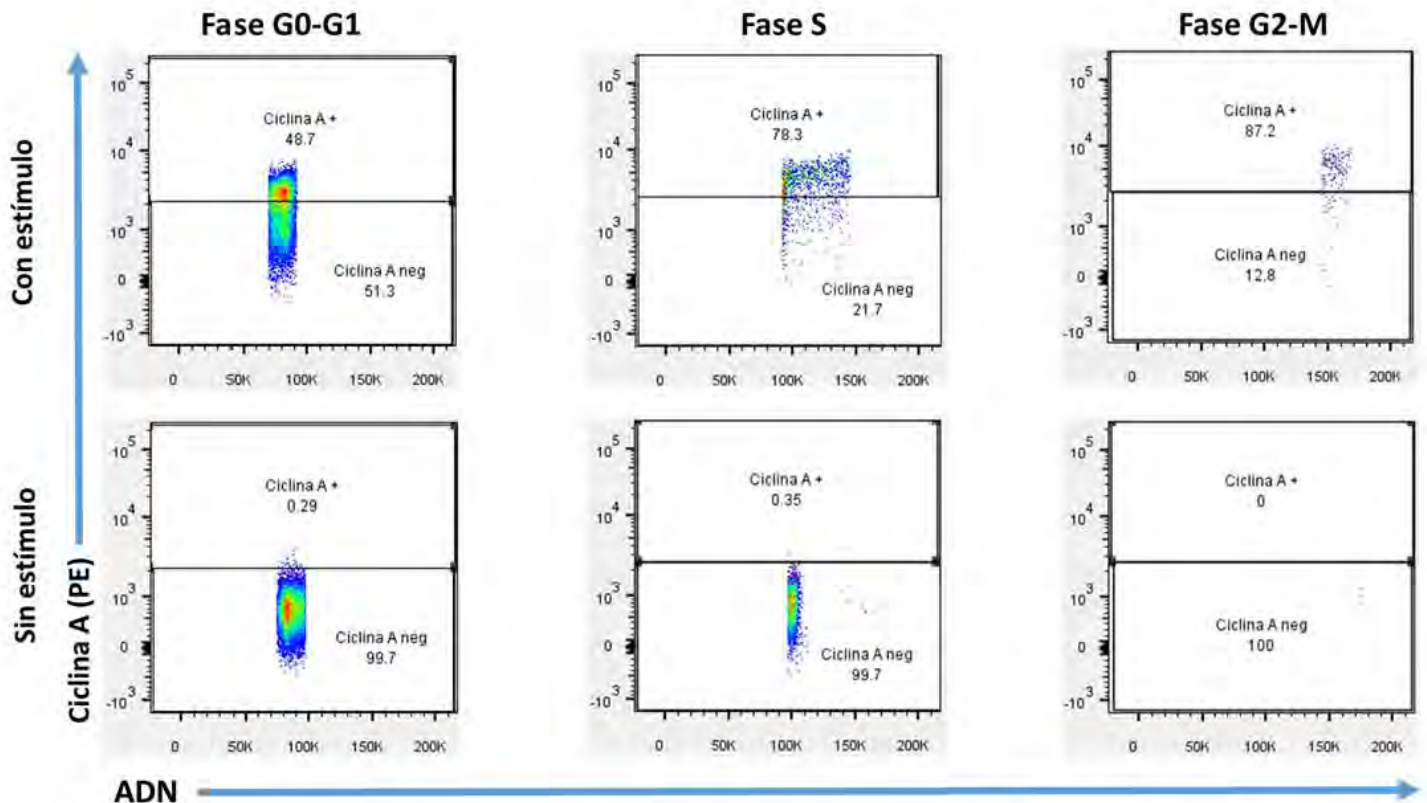
**A**

**Tiempo de cultivo**

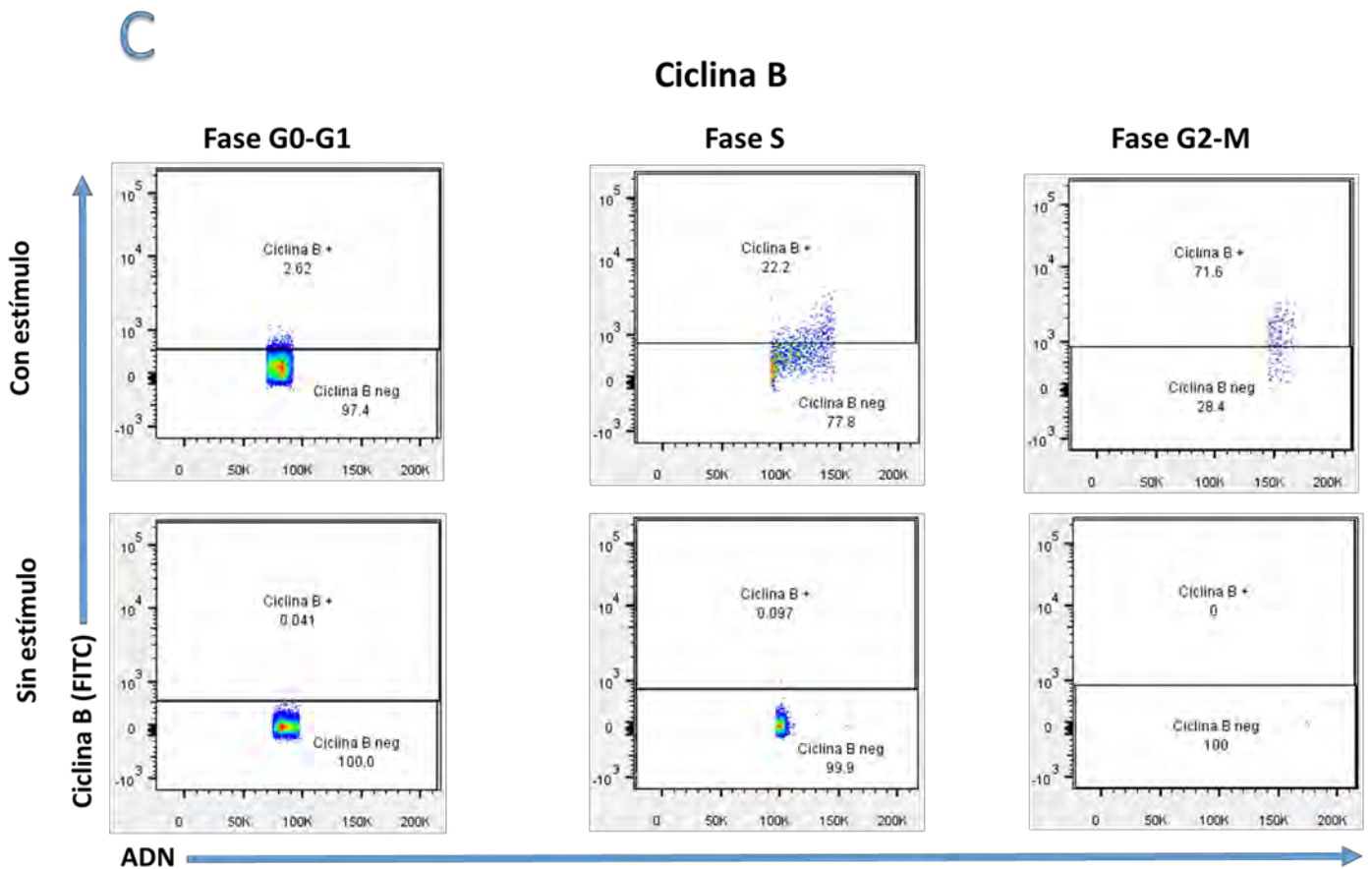


**B**

**Ciclina A**







**Figura 6.8.** Cinética A) Evaluación del contenido de ADN en T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup> en los diferentes tiempos de cultivo. B) Expresión de la ciclina A2 en T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup> en el día 6. C) Expresión de la ciclina B1 en T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup> en el día 6.

## 7 Discusión

La importancia de la estandarización de una técnica radica en asegurar que los resultados que se obtienen en un estudio son confiables, ya que durante el proceso de estandarización se establecen las condiciones óptimas para evaluar las variables en un estudio, en nuestro caso, un estudio comparativo de pacientes VIH<sup>+</sup> y controles. Con la estandarización podemos asegurar que, si hay diferencias significativas de las variables evaluadas entre pacientes y controles, no estarán sesgadas por algún error en la metodología, ya que podemos confiar en las diferencias significativas que pudieran existir.

Debido a que nuestra pregunta central de investigación es demostrar cómo es que mueren las células T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup> de pacientes VIH<sup>+</sup>, y tomando en cuenta que en los hallazgos previos del grupo de trabajo se encontró que estas células tienen una firma de expresión génica que sugiere un aumento en la entrada a ciclo celular y avance hasta la fase S, que continúa con arresto del ciclo celular en la fase G2-M, en comparación de las células T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup> de controles VIH<sup>-</sup> (39), en este trabajo se estandarizó la metodología para evaluar viabilidad, morfología, contenido de ADN, proliferación y expresión de ciclinas A<sub>2</sub> y B<sub>1</sub> en las diferentes fases del ciclo celular en células T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup>. Esta determinación simultánea se hizo con el fin de probar que las células se encuentran vivas en el momento de la determinación ya que las células muertas cambian su inmunofenotipo (47); asegurar que la población evaluada son linfocitos y poder observar en dicha población las diferentes fases del ciclo celular así como demostrar que están proliferando. Con ayuda de la expresión de las ciclinas A<sub>2</sub> y B<sub>1</sub>, que son indicadores de la fase del ciclo, podemos determinar la fase del ciclo en la que se encuentran las células, es decir, en fase G2 o M, en la que de acuerdo a nuestra hipótesis podría haber un arresto de las células T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup> de pacientes VIH<sup>+</sup>.

En nuestros experimentos requerimos una pureza mayor al 90 % de las células T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup> para tener la confianza de que los fenómenos que observemos en los parámetros que evaluamos estén restringidos a las células T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup> y que no estén

ocurriendo en otras subpoblaciones. Es por esto que en todos los experimentos de purificación de la subpoblación de células T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup> realizamos una tinción para verificar que la pureza que requerimos se cumpla.

Lo primero que evaluamos fue el contenido de ADN y debido a que la fijación y permeabilización de las células puede influir en la tinción, también evaluamos estas condiciones. Para probar que el reactivo *FxCycle Violet* (Invitrogen) funciona bajo nuestras condiciones de trabajo, determinamos el contenido de ADN en la línea celular premonocítica humana THP<sub>1</sub> (ATCC TIB-202), ya que las líneas celulares tienen la característica de proliferar todo el tiempo, y con esto aseguramos ver las diferentes fases del ciclo celular. Se observa que los histogramas del contenido de ADN en las **Figuras 6.2B** y **6.2C** tienen una forma atípica antes del pico en G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> que se debe a que las células de tumores malignos son aneuploides (84). Pero a pesar de esto comprobamos que el reactivo funciona.

Es importante destacar que el criterio que seguimos para establecer los *gates* en las fases del ciclo celular fue asignarle la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> al primer pico de células. Para determinar el *gate* de la fase G<sub>2</sub>/M obtuvimos la IMF de la primer fase y la multiplicamos por dos, ya que en G<sub>2</sub>/M las células tienen el doble de ADN de lo que tienen las células en las primeras fases del ciclo celular (42).

En estos experimentos observamos que la morfología de los linfocitos cambia entre un método de fijación y otro, por lo que en los siguientes experimentos nos enfocamos en la fijación y permeabilización de las células para asegurar la morfología de las células y de seleccionar correctamente a la población de linfocitos, nuestra población de interés.

Realizamos una tinción con un anticuerpo anti CD4 conjugado a un fluorocromo y con el fin de asegurar que la población seleccionada fueran los linfocitos. En la **Figura 6.3A** se observó que las células teñidas con anti CD4 y posteriormente fijadas con PFA al 1 % mantienen la tinción con anti CD4, a diferencia de las células fijadas con etanol al 75 % en las que la tinción extracelular con CD4 no resiste. Lo que nos hizo pensar que no solo la fijación de las células afectaba la morfología,

sino también la permeabilización. Hasta ahora la permeabilización se había realizado con TRITON x-100 al 0.25 %.

En la literatura encontramos que el PFA al 1.5 % y el metanol al 100 % fijan y permeabilizan, respectivamente, de manera óptima en tinciones intracelulares de fosfoproteínas (85), por lo que probamos estos reactivos con los que obtuvimos una morfología muy clara de los linfocitos y el pico de la fase G0/G1 en el histograma de frecuencia del contenido de ADN (**Figura 6.4 B**).

Para demostrar en qué fase del ciclo celular se encuentran las células, además de analizar el contenido de ADN, es importante determinar la expresión de las ciclinas A2 y B1, ya que debido a que se expresan transitoriamente durante el crecimiento normal de las células en puntos específicos en el ciclo celular, su presencia en las células proporciona un marcador de una fase del ciclo celular en particular, esto junto con el análisis de contenido de ADN permite establecer con gran exactitud puntos de arresto celular en el ciclo (47). En la **Figura 6.4** se observa que la expresión de las ciclinas A2 y B1 es casi nula en condiciones basales. Este resultado y el hecho de que no observáramos todas las fases del ciclo celular por el contenido de DNA, se debe a que las células normalmente no se encuentran todo el tiempo en ciclo (86), por lo anterior fue necesario adicionar un estímulo para inducir su entrada al ciclo y observar todas las fases.

Para asegurarnos de que el estímulo fuera lo suficientemente fuerte y que las células proliferaran, se añadió un estímulo policlonal vía TCR con microperlas con anti-CD3 y anti-CD28, durante 48 horas en presencia de IL-2.

El kit *Treg expansion Kit* (Miltenyi Biotec) que utilizamos contiene perlas con antibiotina y anticuerpos biotinilados dirigidos contra las moléculas de superficie CD3 y CD28. Estas perlas son usadas para imitar la presentación del antígeno y activa a las células T (87). La transducción de señales por el TCR, después del estímulo con los anticuerpos agonistas anti-CD3 y anti-CD28, vincula el reconocimiento del antígeno con las respuestas funcionales. El reconocimiento antigénico inicia una secuencia de señales bioquímicas en las células T que da lugar a la activación transcripcional de determinados genes y a la entrada de las células

en el ciclo celular. CD28 es una molécula coestimuladora y las señales mediadas por ella aumentan la producción de citocinas, incluida la IL-2 que es el factor de crecimiento autócrino de la célula T (88) .

Por otra parte, el forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), también estimula a las células T. Lo hace a través de la activación directa de la PKC (proteína cinasa C) (89). Sin embargo, la estimulación con este agente lleva a una rápida regulación negativa en la expresión de CD4 en la membrana (90). El estimular a linfocitos T con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas provee un mecanismo más parecido al fisiológico que los tradicionalmente usados como PMA-ionomicina. Es por esto que elegimos el estímulo vía TCR.

Tuvimos un control con células sin estímulo en las que vimos que no hay entrada a ciclo celular (**Figura 6.5A**). Esto lo pudimos corroborar al ver que la expresión de las ciclinas A<sub>2</sub> y B<sub>1</sub> es muy baja, en comparación de la expresión en células que fueron estimuladas y que sí entraron a ciclo (**Figura 6.6C**, **Figura 6.6D**).

Nosotros utilizamos a las ciclinas A<sub>2</sub> y B<sub>1</sub> ya que por su periodicidad en el ciclo celular (61) son una herramienta muy útil para saber en qué fase del ciclo se encontrarán las células T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup> de pacientes VIH<sup>+</sup>, nuestra hipótesis es que estarán arrestadas en G<sub>2</sub>/M y en ese caso habría acumulación de ciclinas en dichas fases. Pero la expresión de las ciclinas, no es evidencia suficiente para probar que las células completan la división celular, solo es un marcador con el que podemos saber en qué fase del ciclo celular se encuentran las células (91).

Teniendo en cuenta que la mayoría de las T<sub>CM</sub> tienen una gran actividad proliferativa, y que para corroborar su posible arresto en pacientes VIH<sup>+</sup> es necesario tener evidencia de que las células que entran al ciclo completan la división celular. Para tener evidencia de esto utilizamos el reactivo *CellTrace* que es un rastreador de proliferación celular. Este reactivo fluorescente atraviesa fácilmente la membrana plasmática y se une covalentemente a las aminos libres en el interior de la célula después de su hidrólisis, con cada generación de células el reactivo se diluye y es posible observar más de seis generaciones de células proliferantes (92). Llegamos a la conclusión de que la concentración más adecuada del reactivo es de

1  $\mu\text{l/ml}$  y de acuerdo con nuestra hipótesis esperamos que en caso de que las células  $T_{CM} CD4^+$  de pacientes  $VIH^+$  se encuentren arrestadas en G2/M, no proliferarán, por lo tanto no observaremos la dilución del reactivo *CellTrace* a diferencia de las células  $T_{CM} CD4^+$  de los controles. Adicionalmente podremos determinar el contenido de ADN y la expresión de ciclinas con lo que corroboraremos un arresto de las células  $T_{CM} CD4^+$  de pacientes  $VIH^+$ .

Una vez que comprobamos que las células con estímulo entraban a ciclo, decidimos que el estímulo se dejaría solo 6 horas y posteriormente las células serían cultivadas en presencia de IL-2 durante 6 días, esto se hizo para evitar que tanto las células de donadores como las de pacientes  $VIH^+$  proliferen de forma aumentada por un estímulo tan fuerte (48 horas). Con esto también evitamos que se presente muerte celular inducida por activación (86).

Para comprobar que el tiempo de cultivo es el adecuado para realizar la tinción de las células, realizamos la tinción a diferentes tiempos de cultivo en donde nos centramos en ver cómo se va modificando el histograma del contenido de ADN con el paso de los días, ya que para sustentar que las células  $T_{CM} CD4^+$  de pacientes se encuentran arrestadas en G2/M, es necesario probar que el tiempo de cultivo es suficiente para que pasen por todas las fases del ciclo celular.

Como ya se mencionó, las células que no fueron estimuladas no entran a ciclo celular (**Figura 6.8**), esto se corrobora al observar que no hay expresión de ciclinas en estas células (**Figura 6.8B-6.8C**). Por otra parte, las células estimuladas llegan a su máximo porcentaje de células en G2/M en el día 4 de cultivo celular (**Figura 6.8A**). Es razonable pensar que este tiempo de cultivo sería el más apropiado para realizar la tinción de las células  $T_{CM} CD4^+$ , sin embargo, al observar que al día 6 muy probablemente las células han concluido el ciclo celular y regresado a la fase G0/G1 y pensando que en las  $T_{CM} CD4^+$  de pacientes habrá un arresto, el mejor día para realizar la tinción es en el día 6, ya que tendremos evidencia de que si las células “normales” al día 6 ya no se encuentran en fase G2/M y en pacientes las células siguen en estas fases, será evidente que hay un arresto, siempre y cuando

sea corroborado con la expresión de ciclinas mitóticas y del rastreador de proliferación.

El objetivo de este trabajo fue estandarizar la metodología para determinar el contenido de ADN y la expresión ciclinas A<sub>2</sub> y B<sub>1</sub>, en células T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup> de pacientes VIH<sup>+</sup>. En este trabajo nos enfocamos en establecer una metodología que nos permita demostrar arresto en el ciclo celular de las T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup> de pacientes, como lo planteamos en nuestra hipótesis.

Como ya se mencionó, en hallazgos previos del grupo se encontró que las células T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup> de los pacientes VIH<sup>+</sup> tienen una firma de expresión génica que las diferencia de las células T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup> de los controles, en las que estas células tienen sobre expresados genes asociados a la promoción de entrada a ciclo y avance hasta fase S, la cual es seguida por arresto G2/M y este arresto a su vez es seguido por muerte por una vía diferente a la apoptosis mediada por caspasas 9 y 3 (39). Tomando en cuenta este antecedente, y retomando nuestra pregunta central de cómo es que las células T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup> de pacientes VIH<sup>+</sup> mueren, es fundamental realizar, adicionalmente a este trabajo, un estudio que revele el tipo de muerte por el cual estas células están muriendo después del arresto en el ciclo celular.

## **8 Conclusiones**

Se logró estandarizar la metodología para evaluar las variables que nos confirmen el arresto de las células T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup> de pacientes VIH<sup>+</sup> en las fases G2/M del ciclo celular.

Con la confirmación del arresto de las células T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup> de pacientes VIH<sup>+</sup> a diferencia de las células de controles, seguida de la determinación del tipo de muerte de estas células, se tendría conocimiento de porqué se pierde la homeostasis de las células T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup> y porqué se pierde el periodo asintomático de la infección que lleva a los pacientes a desarrollar sida.

## Referencias

1. Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). 1983. *Rev Investig Clínica Organo Hosp Enfermedades Nutr.* 2004 Apr;56(2):126–9.
2. Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, Shearer GM, Kaplan M, Haynes BF, et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science.* 1984 May 4;224(4648):500–3.
3. Levy JA, Hoffman AD, Kramer SM, Landis JA, Shimabukuro JM, Oshiro LS. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science.* 1984 Aug 24;225(4664):840–2.
4. Levy JA. *El VIH y la patogénesis del SIDA.* Fondo De Cultura Economica USA; 2008. 770 p.
5. Okoye AA, Picker LJ. CD4(+) T-cell depletion in HIV infection: mechanisms of immunological failure. *Immunol Rev.* 2013 Jul;254(1):54–64.
6. Vajpayee M, Negi N, Kurapati S. The enduring tale of T cells in HIV immunopathogenesis. *Indian J Med Res.* 2013 Nov;138(5):682–99.
7. Dalgleish AG, Beverley PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature.* 1984 Jan 20;312(5996):763–7.
8. ONUSIDA [Internet]. [cited 2016 Jun 2]. Available from: <http://www.unaids.org/es>
9. [www.censida.salud.gob.mx/](http://www.censida.salud.gob.mx/)
10. Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE, editors. *Retroviruses* [Internet]. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997 [cited 2016 May 31]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19376/>
11. Balabanian K, Harriague J, Décricion C, Lagane B, Shorte S, Baleux F, et al. CXCR4-tropic HIV-1 envelope glycoprotein functions as a viral chemokine in unstimulated primary CD4+ T lymphocytes. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2004 Dec 15;173(12):7150–60.
12. Cicala C, Arthos J, Selig SM, Dennis G, Hosack DA, Van Ryk D, et al. HIV envelope induces a cascade of cell signals in non-proliferating target cells that favor virus replication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Jul 9;99(14):9380–5.
13. Ray N, Doms RW. HIV-1 coreceptors and their inhibitors. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2006;303:97–120.



14. Eckert DM, Kim PS. Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. *Annu Rev Biochem.* 2001;70:777–810.
15. Alcamí J, Coiras M. [Immunopathogenesis of HIV infection]. *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica.* 2011 Mar;29(3):216–26.
16. Coiras M, López-Huertas MR, Pérez-Olmeda M, Alcamí J. Understanding HIV-1 latency provides clues for the eradication of long-term reservoirs. *Nat Rev Microbiol.* 2009 Nov;7(11):798–812.
17. Zack JA, Arrigo SJ, Weitsman SR, Go AS, Haislip A, Chen IS. HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: molecular analysis reveals a labile, latent viral structure. *Cell.* 1990 Apr 20;61(2):213–22.
18. Bukrinsky MI, Stanwick TL, Dempsey MP, Stevenson M. Quiescent T lymphocytes as an inducible virus reservoir in HIV-1 infection. *Science.* 1991 Oct 18;254(5030):423–7.
19. Fauci AS. The human immunodeficiency virus: infectivity and mechanisms of pathogenesis. *Science.* 1988 Feb 5;239(4840):617–22.
20. Fauci AS. Multifactorial nature of human immunodeficiency virus disease: implications for therapy. *Science.* 1993 Nov 12;262(5136):1011–8.
21. Pantaleo G, Graziosi C, Fauci AS. Virologic and immunologic events in primary HIV infection. *Springer Semin Immunopathol.* 1997;18(3):257–66.
22. Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, Horowitz A, Hurley A, Hogan C, 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 Sep 20;200(6):761–70.
23. Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, Price DA, Taylor JH, Beilman GJ, et al. CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp Med.* 2004 Sep 20;200(6):749–59.
24. Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, Jean-Pierre P, Manuelli V, Lopez P, et al. Lack of mucosal immune reconstitution during prolonged treatment of acute and early HIV-1 infection. *PLoS Med.* 2006 Dec;3(12):e484.
25. Brenchley JM, Price DA, Douek DC. HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe? *Nat Immunol.* 2006 Mar;7(3):235–9.
26. Mellors JW, Rinaldo CR, Gupta P, White RM, Todd JA, Kingsley LA. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science.* 1996 May 24;272(5265):1167–70.

27. Douek DC, Roederer M, Koup RA. Emerging concepts in the immunopathogenesis of AIDS. *Annu Rev Med.* 2009;60:471–84.
28. Haase AT. Population biology of HIV-1 infection: viral and CD4+ T cell demographics and dynamics in lymphatic tissues. *Annu Rev Immunol.* 1999;17:625–56.
29. Grossman Z, Meier-Schellersheim M, Paul WE, Picker LJ. Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys. *Nat Med.* 2006 Mar;12(3):289–95.
30. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:745–63.
31. Bromley SK, Thomas SY, Luster AD. Chemokine receptor CCR7 guides T cell exit from peripheral tissues and entry into afferent lymphatics. *Nat Immunol.* 2005 Sep;6(9):895–901.
32. Debes GF, Arnold CN, Young AJ, Krautwald S, Lipp M, Hay JB, et al. Chemokine receptor CCR7 required for T lymphocyte exit from peripheral tissues. *Nat Immunol.* 2005 Sep;6(9):889–94.
33. Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature.* 1999 Oct 14;401(6754):708–12.
34. Pepper M, Jenkins MK. Origins of CD4(+) effector and central memory T cells. *Nat Immunol.* 2011 Jun;12(6):467–71.
35. Foulds KE, Wu C, Seder RA. Th1 memory: implications for vaccine development. *Immunol Rev.* 2006 Jun;211:58–66.
36. Grivel JC, Penn ML, Eckstein DA, Schramm B, Speck RF, Abbey NW, et al. Human immunodeficiency virus type 1 coreceptor preferences determine target T-cell depletion and cellular tropism in human lymphoid tissue. *J Virol.* 2000 Jun;74(11):5347–51.
37. Doms RW. Chemokine receptors and HIV entry. *AIDS Lond Engl.* 2001 Feb;15 Suppl 1:S34–5.
38. Okoye A, Meier-Schellersheim M, Brenchley JM, Hagen SI, Walker JM, Rohankhedkar M, et al. Progressive CD4+ central memory T cell decline results in CD4+ effector memory insufficiency and overt disease in chronic SIV infection. *J Exp Med.* 2007 Sep 3;204(9):2171–85.
38. Olvera-García G, Aguilar-García T, Gutiérrez-Jasso F, Imaz-Rosshandler I, Rangel-Escareño C, Orozco L, Aguilar-Delfin I, Vázquez-Pérez J, Zúñiga J,

- Pérez-Patrigeon J, Espinosa E. A transcriptome-based model of central memory CD4 T cell death in HIV infection. Submitted.
40. Gérard C, Goldbeter A. Dynamics of the mammalian cell cycle in physiological and pathological conditions: Dynamics of the mammalian cell cycle. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2016 Mar;8(2):140–56.
  41. Almeida A. Regulation of APC/C-Cdh1 and its function in neuronal survival. *Mol Neurobiol*. 2012 Dec;46(3):547–54.
  42. Starr C, Taggart R, Evers C, Starr L. *Biology: The Unity and Diversity of Life*. Cengage Learning; 2011. 1045 p.
  43. Hochegger H, Takeda S, Hunt T. Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all? *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Nov;9(11):910–6.
  44. Lukas J, Bartek J. Cell division: the heart of the cycle. *Nature*. 2004 Dec 2;432(7017):564–7.
  45. Garner D. Clinical application of DNA ploidy to cervical cancer screening: A review. *World J Clin Oncol*. 2014 Dec 10;5(5):931–65.
  46. Zasadil LM, Britigan EMC, Weaver BA. 2n or not 2n: Aneuploidy, polyploidy and chromosomal instability in primary and tumor cells. *Semin Cell Dev Biol*. 2013 Apr;24(4):370–9.
  47. Darzynkiewicz Z. Nucleic Acid Analysis. In: Robinson JP, Darzynkiewicz Z, Dobrucki J, Hyun WC, Nolan JP, Orfao A, et al., editors. *Current Protocols in Cytometry* [Internet]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2010 [cited 2016 May 11]. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/0471142956.cy0700s54>
  48. Juan G, Darzynkiewicz Z. Detection of mitotic cells. *Curr Protoc Cytom*. 2004;7–24.
  49. Morgan DO. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1997;13:261–91.
  50. Morgan DO. Principles of CDK regulation. *Nature*. 1995 Mar 9;374(6518):131–4.
  51. Santamaría D, Barrière C, Cerqueira A, Hunt S, Tardy C, Newton K, et al. Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature*. 2007 Aug 16;448(7155):811–5.
  52. Satyanarayana A, Kaldis P. Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. *Oncogene*. 2009;28(33):2925–39.

53. Pfeuty B. Strategic cell-cycle regulatory features that provide mammalian cells with tunable G1 length and reversible G1 arrest. *PloS One*. 2012;7(4):e35291.
54. Qu Z, Weiss JN, MacLellan WR. Regulation of the mammalian cell cycle: a model of the G1-to-S transition. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003 Feb;284(2):C349–64.
55. Novák B, Tyson JJ. A model for restriction point control of the mammalian cell cycle. *J Theor Biol*. 2004 Oct 21;230(4):563–79.
56. Aguda BD. A quantitative analysis of the kinetics of the G(2) DNA damage checkpoint system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Sep 28;96(20):11352–7.
57. He E, Kapuy O, Oliveira RA, Uhlmann F, Tyson JJ, Novák B. System-level feedbacks make the anaphase switch irreversible. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Jun 14;108(24):10016–21.
58. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*. 1999 Jun 15;13(12):1501–12.
59. Pines J, Hunter T. The differential localization of human cyclins A and B is due to a cytoplasmic retention signal in cyclin B. *EMBO J*. 1994 Aug 15;13(16):3772–81.
60. Ohtsubo M, Theodoras AM, Schumacher J, Roberts JM, Pagano M. Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol Cell Biol*. 1995 May;15(5):2612–24.
61. Fung TK, Poon RYC. A roller coaster ride with the mitotic cyclins. *Semin Cell Dev Biol*. 2005 Jun;16(3):335–42.
62. Loukil A. Cyclin A2: At the crossroads of cell cycle and cell invasion. *World J Biol Chem*. 2015;6(4):346.
63. Blanchard J-M. Cyclin A2 transcriptional regulation: modulation of cell cycle control at the G1/S transition by peripheral cues. *Biochem Pharmacol*. 2000;60(8):1179–84.
64. Liu D, Matzuk MM, Sung WK, Guo Q, Wang P, Wolgemuth DJ. Cyclin A1 is required for meiosis in the male mouse. *Nat Genet*. 1998 Dec;20(4):377–80.
65. Bendris N, Loukil A, Cheung C, Arsic N, Rebouissou C, Hipskind R, et al. Cyclin A2: a genuine cell cycle regulator? *Biomol Concepts*. 2012 Dec;3(6):535–43.
66. Den Elzen N, Pines J. Cyclin A is destroyed in prometaphase and can delay chromosome alignment and anaphase. *J Cell Biol*. 2001 Apr 2;153(1):121–36.

67. Geley S, Kramer E, Gieffers C, Gannon J, Peters JM, Hunt T. Anaphase-promoting complex/cyclosome-dependent proteolysis of human cyclin A starts at the beginning of mitosis and is not subject to the spindle assembly checkpoint. *J Cell Biol.* 2001 Apr 2;153(1):137–48.
68. Jackman M, Firth M, Pines J. Human cyclins B1 and B2 are localized to strikingly different structures: B1 to microtubules, B2 primarily to the Golgi apparatus. *EMBO J.* 1995 Apr 18;14(8):1646–54.
69. Nguyen TB, Manova K, Capodiecì P, Lindon C, Bottega S, Wang X-Y, et al. Characterization and expression of mammalian cyclin b3, a prepachytene meiotic cyclin. *J Biol Chem.* 2002 Nov 1;277(44):41960–9.
70. Nigg EA. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Jan;2(1):21–32.
71. Heald R, McKeon F. Mutations of phosphorylation sites in lamin A that prevent nuclear lamina disassembly in mitosis. *Cell.* 1990 May 18;61(4):579–89.
72. Bardin AJ, Amon A. Men and sin: what's the difference? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Nov;2(11):815–26.
73. Nakayama Y, Yamaguchi N. Role of Cyclin B1 Levels in DNA Damage and DNA Damage-Induced Senescence. In: *International Review of Cell and Molecular Biology* [Internet]. Elsevier; 2013 [cited 2016 May 11]. p. 303–37. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012407695200007X>
74. Brégnard C, Benkirane M, Laguette N. DNA damage repair machinery and HIV escape from innate immune sensing. *Front Microbiol.* 2014;5:176.
75. Davy C, Doorbar J. G2/M cell cycle arrest in the life cycle of viruses. *Virology.* 2007 Nov 25;368(2):219–26.
76. Liang Z, Liu R, Lin Y, Liang C, Tan J, Qiao W. HIV-1 Vpr protein activates the NF- $\kappa$ B pathway to promote G2/M cell cycle arrest. *Virol Sin.* 2015 Dec;30(6):441–8.
77. Murakami T, Aida Y. Visualizing Vpr-induced G2 arrest and apoptosis. *PLoS One.* 2014;9(1):e86840.
78. Kousholt AN, Fugger K, Hoffmann S, Larsen BD, Menzel T, Sartori AA, et al. CtIP-dependent DNA resection is required for DNA damage checkpoint maintenance but not initiation. *J Cell Biol.* 2012 Jun 25;197(7):869–76.
79. Patel NM, Nozaki S, Shortle NH, Bhat-Nakshatri P, Newton TR, Rice S, et al. Paclitaxel sensitivity of breast cancer cells with constitutively active NF-

- kappaB is enhanced by IkappaBalpha super-repressor and parthenolide. *Oncogene*. 2000 Aug 24;19(36):4159–69.
80. Gery S, Komatsu N, Baldjyan L, Yu A, Koo D, Koeffler HP. The circadian gene *per1* plays an important role in cell growth and DNA damage control in human cancer cells. *Mol Cell*. 2006 May 5;22(3):375–82.
  81. Maaser K, Borlak J. A genome-wide expression analysis identifies a network of EpCAM-induced cell cycle regulators. *Br J Cancer*. 2008 Nov 18;99(10):1635–43.
  82. Feijoo C, Hall-Jackson C, Wu R, Jenkins D, Leitch J, Gilbert DM, et al. Activation of mammalian Chk1 during DNA replication arrest: a role for Chk1 in the intra-S phase checkpoint monitoring replication origin firing. *J Cell Biol*. 2001 Sep 3;154(5):913–23.
  83. Carson FL, Cappellano CH. *Histotechnology: a self-instructional text*. [Chicago]: ASCP Press; 2009.
  84. Darzynkiewicz Z, Juan G. Overview of nucleic acid analysis. *Curr Protoc Cytom*. 2001;7–1.
  85. Krutzik PO, Nolan GP. Intracellular phospho-protein staining techniques for flow cytometry: monitoring single cell signaling events. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol*. 2003 Oct;55(2):61–70.
  86. Hamilton SE, Jameson SC. CD8 T cell quiescence revisited. *Trends Immunol*. 2012 May;33(5):224–30.
  87. Treg Expansion Kit, human - Miltenyi Biotec [Internet]. [cited 2016 Jun 24]. Available from: <http://www.miltenyibiotec.com/en/products-and-services/macscell-culture-and-stimulation/stimulation-reagents/stimulation-based-on-macsibead-particles/treg-expansion-kit-human.aspx>
  78. Abbas A, K. (2004). *Inmunología Celular y Molecular*. España: McGraw-Hill - Interamericana de España
  89. Kay JE. Mechanisms of T lymphocyte activation. *Immunol Lett*. 1991 Jul;29(1-2):51–4.
  90. Petersen CM, Christensen EI, Andresen BS, Møller BK. Internalization, lysosomal degradation and new synthesis of surface membrane CD4 in phorbol ester-activated T-lymphocytes and U-937 cells. *Exp Cell Res*. 1992 Jul;201(1):160–73.
  91. Juan G, Darzynkiewicz Z. Bivariate analysis of DNA content and expression of cyclin proteins. *Curr Protoc Cytom*. 2001;7–9.

92. CellTrace Far Red Cell Proliferation Kit, for flow cytometry - Thermo Fisher Scientific [Internet]. [cited 2016 Jun 5]. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C34564>