



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Doctorado en Ciencias Biomédicas

Facultad de Medicina

Los linfocitos T CD4⁺ de memoria central de pacientes VIH⁺ tienen una firma de expresión génica que revela un aumento en la entrada a ciclo, arresto en G2/M pero disminución en apoptosis

Tesis

Que para optar por el grado de:

Doctor en Ciencias Biomédicas

Presenta:

Gustavo Olvera García

Tutor. Dr. Héctor Enrique Espinosa Arciniega
Facultad de Medicina

Comité tutor

Dra. Yvonne Rosenstein Azoulay. Instituto de Biotecnología

Dr. Joaquín Zúñiga Ramos. Facultad de Medicina

Ciudad Universitaria, Cd. Mx. febrero 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Reconocimientos

Este trabajo se realizó en colaboración con el Instituto Nacional de Medicina Genómica, el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán y el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas.

El proyecto se realizó con financiamiento del CONACyT (Proyecto número: CB-2010-153527) y durante la realización de este proyecto el sustentante fue becario CONACyT con número de registro 220275.

Agradecimientos

- A la Universidad Nacional Autónoma de México.
 - Al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, CONACYT No. de becario 220275.
 - Al Dr. Enrique Espinosa Arciniega por fungir como tutor principal.
- A la Dra. Yvonne Rosenstein Azoulay y al Dr. Joaquín Zúñiga Ramos por formar parte de mi comité tutorial y por sus valiosas contribuciones para la realización de esta tesis.
- A nuestros colaboradores: Dra Claudia Rangel, Dr. Ivan Imaz Rosshandler, Dr. Joel Vázquez, Dra. Lorena Orozco, Dra. Irma Aguilar, Dr. Santiago Pérez Patrigeon.
- A mis alumnas y amigas del laboratorio Tania Aguilar, Daniela Würsch, Fany Gutiérrez y Daniela Reyes, cuyo trabajo, apoyo y contribuciones hicieron posible este proyecto.

Dedicatorias

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser una de las pocas alternativas que existen en México que aún permiten la movilidad social, el desarrollo académico, y personal de los individuos casi sin distinción.

- A Matías cuya existencia es motivo suficiente para buscar el éxito.
- A Rosario por su constante e incondicional apoyo que hace posible alcanzar nuestras metas.
- A mis padres y hermana por ser partes muy importantes de mis logros.
- A mis amigos del laboratorio por su apoyo académico y anímico, sin este soporte hubiera sido más difícil concluir. Tania, Diana Marisa, Daniela W. Daniela R, Fany, Alfredo, Juan, Jessica Flores, Teresa Santos, Karen Bobadilla., Jessica Romero, Fernanda, Damaris.

Índice

Índice de Figuras y Tablas	7
Abreviaturas y acrónimos	8
Resumen	9
Abstract	11
Introducción	12
Generalidades de la infección por VIH	12
Inmunopatogénesis de la infección por VIH	14
Heterogeneidad de las poblaciones de linfocitos T CD4 ⁺ y su maduración periférica	17
Activación inmune y VIH	22
Linfocitos T CD4 ⁺ de memoria y VIH	25
Hipótesis	30
Objetivo general	30
Objetivos específicos	30
Material y métodos	31
Pacientes y muestras	31
Purificación de subpoblaciones de linfocitos T CD4 ⁺	32
Extracción de RNA y análisis de expresión genética por microarreglos	34
PCR en tiempo real cuantitativo	36
Determinación de la Longitud relativa de telómeros por “FISH-Flow”	38
Determinación de la expresión de ciclina A y B1 y fases de ciclo celular en linfocitos CD4 ⁺ T _{CM} de pacientes VIH ⁺	40
Resultados	42
Los linfocitos CD4 ⁺ T _{CM} de pacientes VIH ⁺ no están más diferenciados que los linfocitos CD4 ⁺ T _{CM} de controles	42
Los linfocitos CD4 ⁺ T _{CM} de pacientes VIH ⁺ tienen una firma de expresión génica distintiva	47
Un grupo de funciones definidas están enriquecidas de manera consistente en la firma génica de los linfocitos CD4 ⁺ T _{CM} de pacientes VIH ⁺	49
Un modelo que explicaría la muerte de los linfocitos CD4 ⁺ T _{CM} en la infección por VIH ⁺	56
Alteración en el ciclo celular y en la expresión de la ciclina A de linfocitos CD4 ⁺ T _{CM} de pacientes VIH ⁺	58
Discusión	61
Conclusiones	67

Referencias	69
Figuras suplementarias	83

Índice de Figuras y Tablas	Página
Figura 1. Número estimado de personas que viven con VIH en 2017.....	12
Figura 2. Representación esquemática del avance de la enfermedad por VIH.....	15
Figura 3. Heterogeneidad de las poblaciones de linfocitos T CD4 y su maduración periférica.....	21
Figura 4. Estrategia de análisis para evaluar pureza en cada una de las subpoblaciones.....	33
Figura 5. Análisis de componentes principales del microarreglo de expresión para cada subpoblación de los linfocitos T.....	42
Figura 6. Expresión diferencial de genes con base en la comparación por pares de subpoblaciones de linfocitos T CD4 ⁺	43
Figura 7. Los linfocitos CD4 ⁺ T _{CM} de pacientes VIH ⁺ no están más diferenciados que los linfocitos CD4 ⁺ T _{CM} de controles.....	46
Figura 8. No existe diferencia en la longitud de los telómeros (RTL) entre T _{CM} de pacientes VIH ⁺ y T _{CM} de controles.....	47
Figura 9. Firma de expresión génica en los linfocitos T _{CM} de pacientes VIH ⁺	49
Tabla 1. Categorías funcionales enriquecidas de acuerdo con la firma de expresión de los linfocitos T _{CM} de pacientes VIH ⁺	51
Figura 10. Expresión de cuatro genes de referencia usados en la validación por RT-qPCR.....	53
Figura 11. El patrón de expresión de los genes provenientes de la firma de expresión analizados por qPCR predice disfunciones en el ciclo.....	54
Figura 12. La expresión de CD38 en las poblaciones de linfocitos T _{CM} corresponden los hallazgos por qPCR.....	55
Figura 13. Ubicación de los genes relacionados con la firma de expresión génica de los linfocitos T _{CM} en pacientes con VIH dentro de las fases de ciclo celular que regulan.....	58
Figura 14. Ciclo celular y expresión de ciclina A y B1.....	60
Figura 15. Modelo de muerte de los linfocitos T _{CM} CD4 ⁺ e inmunosupresión derivada de la infección crónica con VIH.....	68
Figura suplementaria 1. La vía de polarización Th1 está favorecida en linfocitos T _{CM} de pacientes con VIH.....	83
Figura suplementaria 2. Análisis corriente arriba de la firma de expresión génica los linfocitos T _{CM} de pacientes VIH ⁺	84
Tabla suplementaria 1. Validación por RT-PCR de la firma de expresión de los linfocitos T _{CM} en la infección por VIH.....	85

Abreviaturas y acrónimos

AICD	Muerte celular inducida por activación	PE	Ficoeritrina
APC	Alofococianina	PerCp	<i>Peridinin Chlorophyll</i>
CD	“Cluster” de diferenciación	PNA	Ácido Nucleico peptídico
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario	qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
CENSIDA	Centro Nacional para la Prevención y el control del VIH y el sida	RIN	Número de integridad del DNA
Cy	Cianina	RMA	Robust Multiarray Average
DAVID	<i>Data Base for Annotation, Visualization and Integrated Discovery</i>	RNA	Ácido ribonucleico
DC	Célula dendrítica	RT	Retrotranscripción
DNA	Ácido desoxirribonucleico	T _{CM}	Linfocito T de memoria central
FC	Veces de cambio por sus siglas en inglés	TCR	Receptor de célula T
FISH-Flow	Hibridación fluorescente in situ por citometría de flujo	T _E	Linfocito T efector
FITC	Isotiocianato de fluoresceína	T _{EM}	Linfocito T de memoria efectora
GSEA	<i>Gen Set Enrichment Análisis</i>	Tfh	Linfocitos T foliculares
IL	Interleucina	Th	Linfocitos T cooperadores
IPA	<i>Ingenuity Pathway Analysis</i>	TLR	Receptor tipo Toll
Log2	Logaritmo base 2	T _N	Linfocitos T naive
LRT	Longitud relativa de telómeros	Treg	Linfocitos T reguladores
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero	T _{RM}	Linfocitos T residentes de memoria
ONUSIDA	Programa de la Organización de las Naciones Unidas para el VIH/sida	VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica		

Resumen

Los linfocitos T CD4⁺ de memoria central (T_{CM}) juegan un papel homeostático crítico en la infección crónica por VIH, esta población es la encargada de mantener las infecciones oportunistas controladas hasta que alcanzan un umbral mínimo en donde este control se pierde y aparece la fase de SIDA. Nosotros investigamos si los linfocitos T_{CM} de pacientes con VIH tienen un perfil de expresión génica que refleje un impedimento en la proliferación y supervivencia a pesar de su estado activado. En este trabajo analizamos los patrones de expresión de mRNA en linfocitos T naive (T_N), T_{CM} y de memoria efectora (T_{EM}) de donadores sanos y T_N y T_{CM} de pacientes con VIH, usando microarreglos de expresión génica. Los genes expresados diferencialmente definidos por un Log₂ FC $\geq |0.5|$ y un Log (odds) > 0, se usaron en un análisis de enriquecimiento funcional. Los linfocitos T_{CM} de pacientes y controles mostraron una expresión comparable en los genes relacionados con diferenciación, con lo que pudimos descartar una diferenciación más cercana a las células efectoras en los T_{CM} de pacientes VIH⁺. Sin embargo, encontramos 210 genes expresados diferencialmente entre linfocitos T_{CM} de pacientes y controles. La expresión de 75 de estos genes se validó por qPCR e independientemente reprodujo los resultados de los análisis de enriquecimiento funcional encontrados para el total de los genes en la firma de expresión. Estos resultados indicaron una entrada favorecida a las fases de ciclo celular G1 y S (incremento de CCNE1, MKI67, IL12RB2, ADAM9, disminución de FGF9, etc.), y también arresto en G2/M (incremento de CHK1, RBBP8, KIF11, etc.). Inesperadamente, los resultados también mostraron que la apoptosis no está favorecida (incremento de CSTA, NFKBIA, disminución de RNASEL, etc.). Los resultados de enriquecimiento también mostraron un aumento en la actividad de IL-1 β , IFN- γ , TNF y RANTES como

conductores que dirigen las diferencias encontradas entre T_{CM} de pacientes y controles. Estas moléculas son consistentes con el medio inflamatorio demostrado en la infección por VIH. Nuestros hallazgos sustentan un modelo en donde la pérdida progresiva de los linfocitos $CD4^+$ T_{CM} se deriva de un incremento en la entrada al ciclo celular seguida por arresto mitótico lo que conduce a una vía de muerte no apoptótica sin proliferación, lo que contribuiría a la pérdida de la población de T_{CM} en la infección por VIH.

Abstract

Central memory CD4⁺ T cells (T_{CM}) play a critical but transient homeostatic role in chronic HIV infection. We investigated if T_{CM} cells from patients with HIV have a gene expression profile impeding proliferation and survival, despite their activated state. Using gene expression microarrays, we analyzed mRNA expression patterns in naive (T_N), T_{CM} and effector memory CD4 T cells (T_{EM}) from healthy controls, and T_N and T_{CM} cells from patients with HIV. Differentially expressed genes, defined by $\text{Log}_2\text{FC} \geq |0.5|$ and $\text{Log}(\text{odds}) > 0$, were used in pathway enrichment analyses. T_{CM} cells from patients and controls showed comparable expression of differentiation-related genes, ruling out an effector-like differentiation of T_{CM} in HIV infection. However, 210 genes were differentially expressed between patients' and controls' T_{CM} cells. Expression of 75 of these genes was validated by qPCR, and independently reproduced enrichment results from this gene expression signature. These results indicated movement to cell cycle phases G1 and S (increased CCNE1, MKI67, IL12RB2, ADAM9, decreased FGF9, etc.), but also arrest in G2/M (increased CHK1, RBBP8, KIF11, etc.). Unexpectedly, the results also suggested decreased apoptosis (increased CSTA, NFKBIA, decreased RNASEL, etc.). Results also suggested increased IL-1 β , IFN- γ , TNF, and RANTES activity upstream of the T_{CM} signature, consistent with the demonstrated milieu in HIV infection. Our findings support a model where CD4 T_{CM} cell progressive loss in chronic HIV-1 infection is driven by increased cell cycle entry followed by mitotic arrest, leading to a non-apoptotic death pathway without actual proliferation, contributing to T_{CM} cell loss.

Introducción

Generalidades de la infección por VIH

De acuerdo a ONUSIDA, se estima que a nivel mundial 37.9 millones (32.7 – 44 millones) de personas estaban infectadas con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) al final del 2018 y 1.7 millones (1.4 – 2.3 millones) de personas se infectaron en ese año (1) (Figura 1). En el caso de México se estiman cerca de 220 000 (200 000 – 240 000) personas infectadas (2). La infección por este virus constituye una pandemia y por ende un problema de salud pública mundial, por ello, es importante el estudio de los mecanismos de inmunopatogénesis de la infección por VIH, el cual proporcionará información para la creación de nuevas herramientas de pronóstico, tratamiento y prevención de la enfermedad.

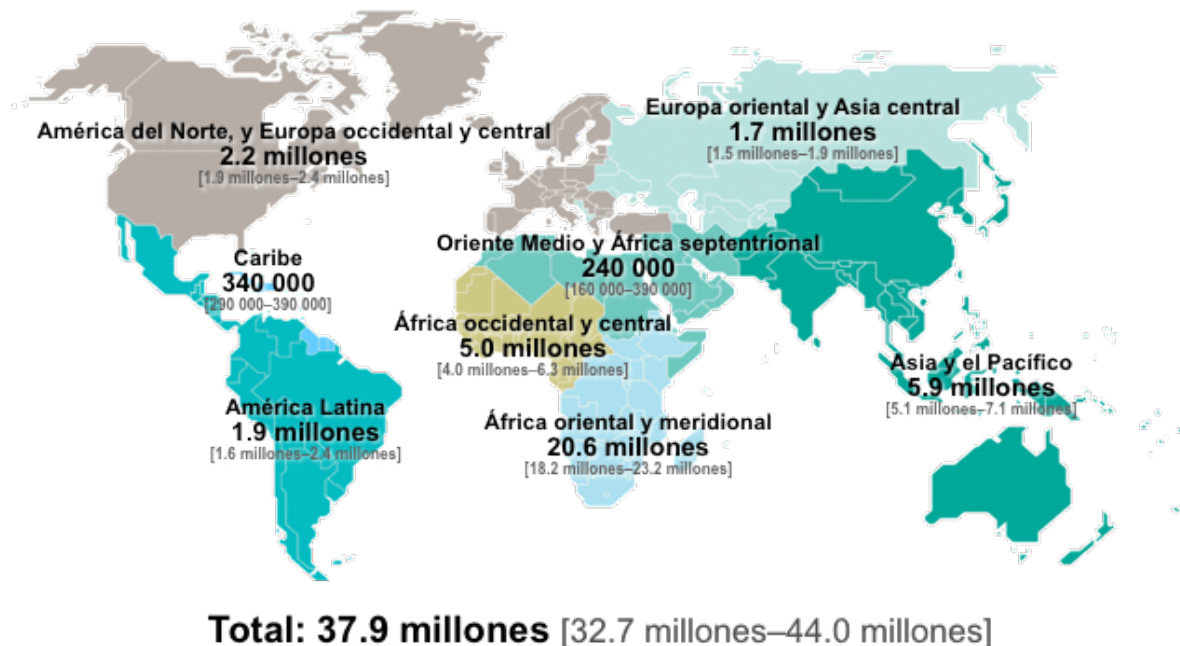


Figura 1. Número estimado de personas que viven con VIH en 2018. Tomada de ONUSIDA – Diapositivas clave sobre epidemiología, Julio 2019

El VIH es un retrovirus del género *Lentiviridae* que, al igual que todos los miembros de la familia Retroviridae, presenta un genoma diploide de RNA y una enzima DNA polimerasa dependiente de RNA y DNA llamada transcriptasa inversa (RT). Su blanco principal son las células que expresan en su superficie la molécula CD4, principalmente los linfocitos T CD4⁺, aunque también puede infectar monocitos, macrófagos, células dendríticas y células de la microglía en el sistema nervioso central (3).

El ciclo de replicación viral inicia con la unión de la glicoproteína gp120 del virus al receptor de membrana celular CD4, la cual promueve un cambio conformacional que expone a la molécula gp41 del virus, la cual a su vez se une al correceptor CCR5. Tanto CD4 como CCR5 están presentes principalmente en los linfocitos T CD4 efectoras, principal población celular afectada por la infección del VIH en sus primeras semanas. A esta unión le sigue la fusión de la membrana viral y la celular (4).

Eventos como la liberación de la cápside al citoplasma, la síntesis del DNA proviral por el complejo de retrotranscripción viral y finalmente la localización del complejo de preintegración en el núcleo y la integración del DNA proviral con el DNA genómico de la célula (3) pueden ocasionar un efecto citopático y, de este modo, destruir a las células blanco. Sin embargo, en forma adicional a la citopaticidad directa, distintas evidencias muestran que deben estar involucrados mecanismos indirectos de patogénesis (5-7). Este trabajo se enfoca a dichos mecanismos indirectos.

El VIH comienza a detectarse en el plasma de los pacientes de cuatro a once días después del establecimiento de la infección (3). A partir de entonces, la replicación persistente del VIH provoca un deterioro progresivo del sistema inmune caracterizado por una reducción gradual del número de linfocitos T CD4⁺ en la sangre, la cual culmina en una inmunodeficiencia grave conocida como sida, caracterizada por múltiples infecciones oportunistas (8).

Inmunopatogénesis de la infección por VIH

La progresión típica de la infección por VIH se divide en tres etapas: aguda, crónica y sida (figura 2). Durante la etapa aguda se pierde, en promedio, el 50% del total de linfocitos T CD4⁺ CCR5⁺ (9). Esta disminución coincide temporalmente con un pico en la replicación viral y está acompañada por un aumento generalizado en la expresión de marcadores de activación inmune como CD38 y HLA-DR en las células T, un aumento de la concentración de citocinas proinflamatorias en el plasma como TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-2, y un aumento en el recambio de las poblaciones de linfocitos T, B y NK (10,11). La fase aguda implica un daño a la superficie de la mucosa gastrointestinal, la cual contiene la mayor cantidad de los linfocitos CCR5⁺, los cuales son más susceptibles a ser infectados por el VIH (12–14).

La aparición de la respuesta inmune antiviral mediada por los linfocitos T CD8⁺ del huésped marca el inicio de la fase crónica. Esta respuesta del huésped para controlar la infección coincide con una caída de la carga viral (número de copias de RNA genómico viral) en la sangre a un nivel conocido como punto de inicio (“set point”) (15,16) y coincide también con el establecimiento de un estado

de activación inmune que se había incrementado desde el inicio de la infección (11,17,18). La pérdida de linfocitos T CD4⁺ circulantes en la fase aguda se revierte solo parcialmente, y continúa lenta pero progresivamente durante la fase crónica, la cual puede durar de dos a ocho años en ausencia de tratamiento antirretroviral (19).

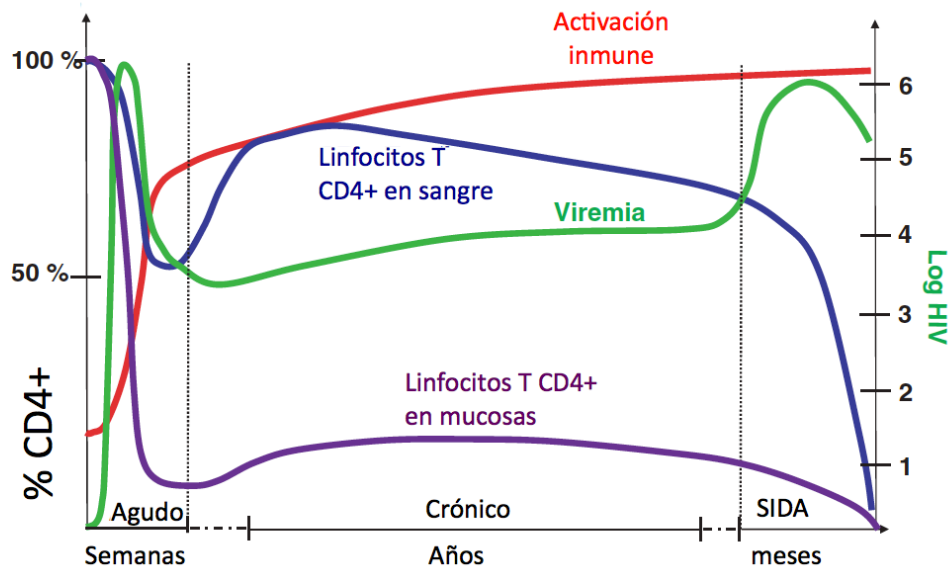


Figura 2. Representación esquemática del avance de la enfermedad por VIH. Durante las primeras semanas después de la infección hay un pico de carga viral que coincide con la disminución de linfocitos T CD4⁺ en circulación periférica y con una disminución drástica de los linfocitos T CD4⁺ en mucosas. Una vez que se establece la respuesta inmune antiviral específica mediada por los linfocitos T CD8⁺, la carga viral plasmática se estabiliza y la cuenta de linfocitos T CD4⁺ de circulación periférica se recupera parcialmente, lo que determina el inicio de la fase crónica de la enfermedad la cual puede durar de 2 a 10 años. La población de linfocitos T CD4⁺ en mucosas nunca se recupera. Finalmente, cuando la cuenta de linfocitos T CD4⁺ es menor a 250 células/ μ L comienza la fase de sida, caracterizada por la aparición de enfermedades oportunistas. Una característica importante en la evolución de la enfermedad es el incremento sostenido de la activación inmune definida como un aumento generalizado en la expresión de marcadores de activación inmune en las células T, un aumento de citocinas proinflamatorias en el plasma y un aumento en el recambio de linfocitos T, B y NK que se ha asociado con disfunciones funcionales en linfocitos T. Figura modificada de Grossman et al, Nat Med, 2006.

La última etapa está definida por la aparición de infecciones oportunistas en los individuos infectados y/o a la disminución en el número de linfocitos T CD4⁺ circulantes por debajo de 200 células/ μ l de sangre. La respuesta inmune suscitada por dichas infecciones oportunistas provee de un ambiente propicio para la transmisión célula-célula del VIH, ya que se incrementa la secreción de citocinas proinflamatorias, las cuales a su vez inducen la transcripción de los genes virales integrados al DNA del hospedero y por ende la replicación viral se da a tasas más elevadas (20–22).

Se ha tratado de explicar por qué esta linfopenia no puede revertirse a lo largo de la infección; sin embargo, no se conocen aún todos los aspectos de cómo el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) ocasiona la pérdida de los linfocitos T CD4⁺. La participación de distintos mecanismos indirectos de inmunopatogénesis es objeto de estudio. Entre los posibles mecanismos indirectos destacan la pérdida de la capacidad regenerativa de los linfocitos T CD4⁺, así como la activación inmune crónica (11,23–25).

Debido a que la infección por VIH afecta de manera diferencial a las subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺, es importante establecer cómo están conformadas estas poblaciones, qué marcadores se usan para distinguirlas, qué funciones generales tienen y cuál es su proceso de diferenciación periférica.

Heterogeneidad de las poblaciones de linfocitos T CD4⁺ y su maduración periférica

Los linfocitos T maduros (naive) salen del timo con un TCR específico y recirculan por órganos linfoides secundarios gracias a la expresión de diversas moléculas de adhesión o receptores de quimiocinas, como CD62L y CCR7, que les confieren dicha capacidad de alojamiento (*homing*). De acuerdo con su grado de diferenciación periférica los linfocitos T han sido clasificados en naive, los cuales no han sido previamente expuestos a su antígeno específico, linfocitos T efectores de vida corta, los cuáles se producen cuando un linfocitos T se activa por el reconocimiento antigénico y prolifera, dando lugar a células con la capacidad de sintetizar citocinas como IL-2, IFN- γ , IL-4 y/o IL-6 que ejercen su actividad en sitios periféricos, y linfocitos T de memoria (26–28).

Los linfocitos T CD4⁺ efectores juegan un papel muy importante en la modulación de las respuestas del sistema inmune innato y adaptativo a través de la secreción de diversas citocinas y mediante la interacción célula-célula (por ejemplo, la interacción mediada por la unión de CD154 expresado por el linfocito T y de CD40, expresado en células dendríticas y linfocitos B). Además de las subpoblaciones de linfocitos T cooperadores 1 (Th1) y T cooperadores 2 (Th2), otros estudios han identificado otras subpoblaciones como los linfocitos T cooperadores 17 (Th17) (29,30), linfocitos T cooperadores foliculares (Tfh)(31), linfocitos T reguladores (Treg)(32) y otros que no se han caracterizado totalmente (33). Adicionalmente, algunas de estas subpoblaciones han mostrado plasticidad, fenómeno que consistente en la capacidad de una célula de cambiar de fenotipo y función (34). La diferenciación a cada una de estas subpoblaciones de células

efectoras depende del microambiente de citocinas y de diversos factores de transcripción (34).

Una de las principales características del sistema inmune adaptativo es la memoria. La descripción original del proceso de diferenciación se fundamenta en que los linfocitos T naive después de un contacto inicial con su antígeno específico proliferan y se diferencian a linfocitos T efectores y linfocitos T de memoria, los cuales son capaces de responder rápidamente y con mayor intensidad a un segundo encuentro con su antígeno específico; sin embargo, a partir del desarrollo de anticuerpos monoclonales específicos para distintos marcadores celulares y con el desarrollo de la citometría de flujo multiparamétrica, se han podido clasificar una cantidad creciente de subpoblaciones que componen estos grupos celulares (35).

Los inmunólogos se han dado a la tarea de clasificar poblaciones celulares con funciones específicas usando la expresión de marcadores fenotípicos (de superficie o intracelulares). Existe una amplia heterogeneidad de poblaciones que expresan distintos marcadores de superficie en los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺; sin embargo, existen patrones comunes que permiten establecer relaciones entre fenotipo y funcionalidad (36).

Sallusto *et al* (26) describieron dos poblaciones de linfocitos T de memoria; los linfocitos T de memoria central (T_{CM}) (CD45RA⁻CCR7⁺CD62L^{+/-}) con capacidad de sintetizar IL-2 y con la capacidad de proliferar después de un estímulo mediado por el TCR; y los linfocitos T de memoria efectora (T_{EM}) (CD45RA⁺CCR7⁻CD62L⁻), que sintetizan menos IL-2 y proliferan menos que los T_{CM} pero tienen la capacidad de sintetizar citocinas efectoras como IL-4, IL-6 o IFN- γ . Sallusto *et al* establecieron

una vía de diferenciación lineal desde linfocitos T naive $\rightarrow T_{CM} \rightarrow T_{EM}$ derivado de estudios de longitud de telómeros y de diferenciación *in vitro e in vivo* (26,37,38).

En 2011 Gattinoni *et al* (39) describieron una subpoblación de linfocitos de memoria con características de célula progenitora, con gran capacidad de autorrenovarse y de dar origen al resto de las poblaciones de memoria. Las características fenotípicas mínimas que describen a los linfocitos T progenitores de memoria (T_{SCM}) son $CD45RA^+CCR7^+CD95^+$ (39), aunque los patrones de expresión con los que fueron descritos son muy extensos.

Existe debate al respecto de la relación que hay entre los T_{SCM} , T_{CM} y los T_{EM} tanto $CD8^+$ como $CD4^+$. En algunos estudios *in vitro* se han podido observar ramificaciones y reversiones que relacionan diversas vías de diferenciación (40,41), sin embargo, hay cada vez más evidencias de diferenciación *in vitro e in vivo* y de estudios con microarreglos que apoyan una diferenciación lineal de las poblaciones de memoria $T_N \rightarrow T_{SCM} \rightarrow T_{CM} \rightarrow T_{EM} \rightarrow T_E$ (26,39,40,42,43).

El uso de los marcadores de superficie CD3, CD4 o CD8, CD45RA, CCR7 y CD95 nos permiten distinguir a los linfocitos T naive, T_{SCM} , T_{CM} y T_{EM} , del mismo modo, la expresión de otros receptores de citocinas permite asociar a los linfocitos T de memoria con sus funciones particulares o compromiso a diferenciarse a ciertas poblaciones funcionales, tal es el caso de CXCR3 que se relaciona con la producción de $IFN-\gamma$ y diferenciación a Th1; de CCR4, que se expresa en células Th2 que producen IL-4; y CCR6, que se expresa en células Th17 productoras de IL-17 (37,44–46).

En general no se tiene claro el linaje de procedencia de las células de memoria a partir de la o las clonas que responden a un estímulo antigénico. Existen

evidencias que apoyan una diferenciación asimétrica en la que las células respondedoras dan lugar a dos tipos de células. Uno de ellos corresponde a los linfocitos T efectores, de vida corta, los cuales entran en una etapa de contracción en la que mueren por apoptosis. El otro tipo de célula es generado en menor proporción y consiste en células con características de memoria (T_{SCM} , T_{CM} o T_{EM}) que permanecen en estado quiescente hasta entrar en contacto nuevamente con su antígeno específico. También se ha sustentado una vía más lineal de generación de las células de memoria, en la que se generan únicamente linfocitos T efectores y después del periodo de contracción algunos de ellos sobreviven y adquieren el fenotipo de memoria (T_{SCM} , T_{CM} o T_{EM}) (41) (Figura 3).

Dentro de este conjunto de poblaciones de células T de memoria no se incluyeron a los linfocitos T CD4 residentes de memoria ($CD4 T_{RM}$) debido a que no hay todavía información suficiente de los mecanismos que conducen la diferenciación de esta población celular, no obstante, recientes estudios han remarcado la importancia de las poblaciones de linfocitos $CD4 T_{RM}$ en pulmones, intestino delgado, piel, y tracto reproductor femenino. Esta población responde rápidamente cuando existe una re-exposición a su antígeno específico y pueden ser más importantes que la respuesta inmune innata para combatir a las infecciones recurrentes (47). En el contexto de VIH no se conoce con detalle la participación de estas las células $CD4 T_{RM}$ en la patogenia de la infección. En el modelo de infección por virus de inmunodeficiencia de simios (SIV) en macacos se ha visto que las células $CD4 T_{RM}$ ($CD69^+$) son blanco del virus desde el inicio de la infección y son rápidamente eliminadas por infección viral directa(48), esto limitaría su participación en la protección contra infecciones oportunistas a lo largo de la infección. Hay evidencias que muestran que tienen un rol como reservorio de

larga vida, especialmente en sitios en dónde la concentración de antiretrovirales no puede alcanzar concentraciones óptimas como en la mucosa cervical de pacientes VIH+(48).

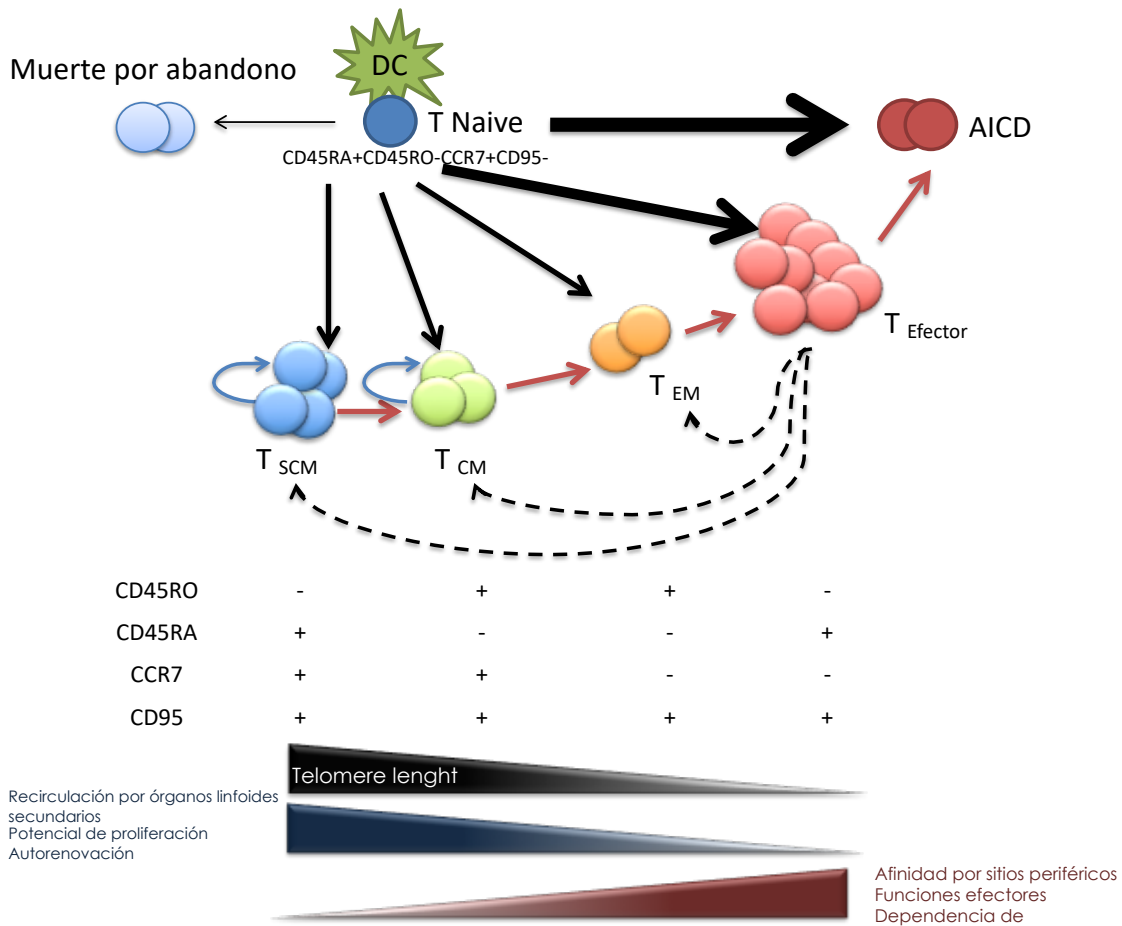


Figura 3. Heterogeneidad de las poblaciones de linfocitos T CD4⁺ y su maduración periférica. Las diferentes subpoblaciones de linfocitos naive, de memoria o efectores pueden identificarse mediante la expresión o ausencia de CD45RA, CD45RO, CCR7, y CD95. Cada una de estas poblaciones tiene características funcionales y fenotípicas que se van perdiendo o ganando gradualmente (en el sentido que se indica con las flechas rojas y que se describen de manera general en la parte inferior de la figura). El grosor de la flecha representa la duración y la intensidad de la señal que recibe el linfocito T. Las líneas punteadas representan el modelo de diferenciación, que establece que durante el periodo de contracción una pequeña población de linfocitos T activados permanecen en estado quiescente como alguna de las poblaciones de linfocitos T de memoria. Las flechas azules indican proliferación inducida por IL-7, IL-15 o ambas. DC, célula dendrítica; AICD, muerte inducida por activación; T_{SCM}, linfocito T troncales de memoria; T_{CM}, de memoria central; T_{EM}, de memoria efectora.

Activación inmune y VIH

El mecanismo por el cual el VIH induce disfunción inmune ha sido ampliamente estudiado desde el descubrimiento del virus. Como se mencionó, los análisis virológicos iniciales demuestran que existen bajos niveles de replicación viral en los individuos infectados, sugiriendo que la actividad citolítica del virus por si sola es incapaz de inducir sida (49–51), por lo que se pensó que factores adicionales, como la activación inmune crónica, deben estar jugando un papel importante en las disfunciones inmunológicas asociadas a la infección por VIH (10).

Desde hace tiempo la activación inmune crónica se ha considerado un mediador central en la patogénesis del VIH, esta hipótesis deriva de los múltiples hallazgos en los que se vincula, de forma correlativa, la activación inmune crónica con el avance de la enfermedad (25,52,53). Con respecto a los linfocitos T de pacientes VIH⁺ la activación inmune crónica se refiere a una frecuencia más alta de expresión de marcadores de activación (CD38 y HLA-DR) en comparación con los linfocitos T de controles VIH⁻ (10,49) así como una mayor frecuencia de proliferación (Ki67 e incorporación de BrdU) (21,54–56), además de altos niveles de apoptosis en células no infectadas (16,55). La proliferación aumentada en células T de pacientes infectados con VIH no está restringida a este tipo celular, también se ha observado en linfocitos B y células asesinas naturales (NK) (25,57).

En la infección patogénica por SIV los macacos Rhesus, que no son hospederos naturales pero que pueden infectarse con SIV, experimentan un rápido aumento en la activación de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, seguido de una depleción rápida de los linfocitos T CD4⁺, progresión a sida y muerte. Por el contrario, el mangabey

ahumado (*Cercocebus atys*) o los monos verdes africanos (*Cercopithecus aethiops*), que son hospederos naturales del SIV, muestran un incremento mínimo en la activación de las células T a pesar de los altos niveles en la replicación viral. En la mayoría de los casos no presentan pérdida drástica de las células CD4⁺ con el tiempo y pocas veces progresan a sida, a pesar de que sí hay replicación viral (58–60). El que la activación inmune crónica diferencie a la infección patogénica de la no patogénica en la infección por el virus de inmunodeficiencia en simios (SIV) es una fuerte evidencia de que la activación inmune crónica es causa, al menos en parte, de la inmunosupresión y el avance a sida.

Otro indicio que soporta la hipótesis de que la activación inmune crónica tiene un papel fundamental en la patogénesis del VIH se encuentra en el hecho de que la expresión de CD38 en linfocitos T CD8⁺, predice el avance de la enfermedad mejor que la cuenta de linfocitos T CD4⁺ y que la carga viral plasmática (61,62). Se ha establecido que el nivel de expresión de CD38 en las células T CD8⁺ alcanza un máximo poco después de la infección aguda y una alta expresión de CD38 en este punto predice una pérdida más rápida de células CD4⁺ independientemente de la carga viral plasmática (17). Adicionalmente, altos niveles de activación en las células T entre individuos seronegativos en alto riesgo de infectarse puede estar asociado con una progresión más rápida de la enfermedad post-infección (63). Se ha observado también en pacientes que mantienen cargas virales indetectables sin tratamiento antiretroviral (controladores elite), que también cursan con altos niveles de CD38 en sus células T lo cual contribuye a la pérdida progresiva de linfocitos T CD4⁺ y posterior inmunosupresión, incluso sin viremia medible (64).

Las causas de esta activación inmune crónica aún son inciertas, pero se considera que es un fenómeno multifactorial. El primero es el efecto directo del VIH sobre los

linfocitos T. El VIH puede directamente influenciar la activación inmune a través de la unión de la proteína de la envoltura gp120/160 a CD4 y/o CCR5 lo que desencadena activación no mediada por TCR (65,66). Un segundo factor capaz de inducir activación inmune sistémica es la respuesta inmune generada por el hospedero hacia el VIH. Esta activación es iniciada por la respuesta inmune innata a través de la estimulación de los receptores tipo Toll (TLRs) 7, 8 y 9 (67–69) y posteriormente por la activación de la respuesta inmune adaptativa, tanto humoral como celular, específica contra el VIH. El papel de la respuesta adaptativa, en particular la respuesta citotóxica de T CD8⁺ es complejo, por una parte su activación es benéfica ya que suprime la replicación viral, sin embargo, se vuelve dañina debido a que la presión del sistema inmune induce la selección de variantes de escape y como consecuencia se mantiene el estado de activación de manera crónica. Por último, recordemos que la infección por VIH causa una drástica pérdida de los T_{EM} residentes de mucosas en las primeras semanas (9), cuya población no se recupera y que está asociada con la translocación de productos bacterianos desde el lumen del intestino hacia la circulación sistémica, estos productos bacterianos son capaces de activar de forma crónica al sistema inmune por la unión a algunos TLR como TLR-2, TLR-4, TLR-5 y TLR-6 (12,14,70). Uno de los productos de translocación bacteriana que se ha encontrado aumentado en pacientes VIH⁺ es el LPS pero es importante mencionar que otros patógenos, principalmente en etapas tardías de la infección pueden estar asociados a la activación inmune (71). Toda esta actividad produce activaciones no mediadas por TCR o BCR en linfocitos T y linfocitos B respectivamente causada por la producción sostenida de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1, entre otras. Es posible que este ambiente de activación crónico induzca la expresión de moléculas

asociadas con la apoptosis (CD95, TRAIL) en la superficie de los linfocitos T haciéndolos más susceptibles a la muerte celular inducida por activación (55,58,67,72).

Linfocitos T CD4⁺ de memoria y VIH

Como mencionamos anteriormente de acuerdo con su grado de diferenciación periférica los linfocitos T CD4⁺ se pueden clasificar como linfocitos T *naive* (vírgenes), linfocitos T efectores de vida corta, y en linfocitos T de memoria (44). Los linfocitos T de memoria se pueden dividir en dos tipos:

1) linfocitos T de memoria central (T_{CM}), células de vida larga que se alojan y recirculan preferentemente por órganos linfoides secundarios y por la sangre, y tienen una gran capacidad de generar una respuesta inmune secundaria por proliferación y diferenciación a células T efectoras de memoria (T_{EM}). Se caracterizan por expresar en su membrana CD45RO y CCR7 entre otras moléculas (26,28). Las células T_{CM} tienen una mejor capacidad de autorrenovarse, mayor supervivencia a largo plazo y la capacidad de establecer respuestas efectoras eficientes después de una transferencia autóloga (73). En el contexto de la infección por el VIH participan en la reconstitución de las células T CD4⁺ de pacientes VIH⁺ bajo tratamiento antirretroviral (74)

2) linfocitos T de memoria efectora (T_{EM}) que se encuentran principalmente en tejidos periféricos (p. ej. mucosas), pierden la expresión de CCR7 y de moléculas coestimuladoras como CD28, tienen gran capacidad de generar una respuesta inmune secundaria ejerciendo directa e inmediatamente su actividad efectora y son en gran medida responsables del control de las infecciones (26–28). Esta última población es la que experimenta una dramática disminución cuantitativa durante

la fase aguda de la infección por VIH ya que al estar en sitios efectores son más propensos a activación ya que expresan también CCR5 (19,75).

Usando la infección de macacos Rhesus (*Macaca mulatta*) con el virus de inmunodeficiencia de simios (SIV), modelo animal de la enfermedad por VIH, se ha demostrado que la proliferación y diferenciación de linfocitos T_{CM} provee de linfocitos T_{EM} a las mucosas (76) lo que sostiene una población residual de células T_{EM} en las mucosas (en gran medida eliminados durante la fase crónica). Este remanente es suficiente para evitar la aparición de enfermedades oportunistas durante la fase crónica de la infección, hasta que esta capacidad regenerativa se pierde (19,77).

Para estudiar cómo ocurre esta pérdida de la homeostasis residual es necesario tomar en cuenta que la pérdida de los linfocitos $T CD4^+$ en individuos infectados no se explica por la infección viral directa ni por la actividad lítica específica de los linfocitos $T CD8^+$ sobre los linfocitos $T CD4^+$, ya que la proporción de los linfocitos $T CD4^+$ infectados alcanza apenas aproximadamente un 0.1% del total de linfocitos $T CD4^+$ (5,75). Esta evidencia, entre otras, indica que existen mecanismos indirectos que destruyen a las células $T CD4^+$ o alteran su función homeostática (70,78). En este sentido, se ha visto que la expresión del marcador de activación CD38, expresado en la superficie de células $T CD8^+$ y $CD4^+$, es un predictor del riesgo de avance a sida (61). La expresión de CD38 se destaca de entre otros marcadores de activación unidos a membrana por su particularmente fuerte capacidad para predecir la progresión de la infección por VIH en muy diversos escenarios y de forma independiente a otras variables .

Se ha observado que los linfocitos T de pacientes VIH⁺ tienen una respuesta proliferativa disminuida después de una activación policlonal, incluso entre aquellos con una cuenta de linfocitos T CD4⁺ conservada (81,82); además de que producen menos IFN- γ e IL-2 (83,84). Se ha observado también que hay una mayor proporción de linfocitos T CD4⁺ de sangre periférica activados en pacientes VIH⁺ en comparación con controles sanos, estas células son identificadas como células en ciclo (Ki67⁺), son principalmente T_{CM} y muestran una activación no mediada por TCR (55). La infección por VIH en ganglios linfáticos también provoca activación de los T_{CM}, junto con una mayor propensión a apoptosis y un incremento en la producción de citocinas (85). La apoptosis que se observa en ganglios ocurre tanto en linfocitos T infectados como en linfocitos T activados no infectados, lo que permite proponer que las células activadas crónicamente pueden presentar alteraciones funcionales. En apoyo a esta idea, recientemente se ha mostrado que en respuesta a infecciones crónicas (como CMV) los T_{CM} expresan marcadores de diferenciación terminal como KLRG1 (killer cell lectin-like receptor G1), un receptor asociado a una pobre respuesta proliferativa y a una producción incrementada de IFN- γ , al mismo tiempo que mantienen algunos marcadores relacionados directamente con proliferación homeostática como IL-7R. Regularmente IL-7R se pierde cuando los linfocitos T se diferencian a células efectoras (45). Es probable que estas características modifiquen la funcionalidad habitual de los T_{CM}.

Complementariamente, los T_{CM} generados a partir de un estímulo antigénico fuerte (como se puede esperar en infección crónica por VIH) se comprometen de forma prematura a una respuesta de tipo Th1 (37,46), con una baja capacidad de proliferación y una mayor producción de IFN- γ (43). Adicionalmente se describió

que los $T_{CM} CD4^+$ tienen aumentada la expresión de PD1 en pacientes infectados con VIH, lo cual puede estar asociado a susceptibilidad a muerte celular (86).

Nosotros hemos abordado la pregunta de cómo la activación crónica afecta la función de los linfocitos T $CD4^+$ de memoria, los cuales presentan un aumento significativo y sostenido en la expresión de marcadores de activación (10,49). Al determinar las diferencias funcionales entre los linfocitos T $CD4^+$ de memoria $CD38^+$ y $CD38^-$ encontramos que las células $T_{CM} CD4^+ CD38^+$, de pacientes VIH⁺, tienen una respuesta a la estimulación policlonal y antígeno-específica dominadas por la producción de IFN- γ y sin inducción de CD40L, y muestran una producción de IL-2 disminuida, comparadas con sus contrapartes $CD38^-$ (87,88). Este patrón funcional se asemeja al de las células T_{EM} y no sería propicio para sus funciones homeostáticas. Esto nos llevó a pensar que en la infección por VIH la activación crónica de las células T_{CM} implica una disminución en su capacidad de proliferar y diferenciarse, así como con una mayor susceptibilidad a la apoptosis inducida por activación.

Tomando en cuenta que en la infección por VIH las células T_{CM} activadas tienen una funcionalidad parecida a la de las células T_{EM} , contraria a su función homeostática, la incapacidad del efecto citopático directo del VIH de explicar por sí solo la evolución de la infección y considerando el papel patogénico de la activación crónica, nos preguntamos si las células T_{CM} de pacientes VIH⁺ tienen un patrón de expresión génica asociado a una mayor activación, de mayor diferenciación, que revele una pérdida en su capacidad de proliferar y reestablecer a la población de linfocitos efectores. Esto constituye nuestra hipótesis central.

Para abordar esta hipótesis realizamos un estudio comparativo de expresión de genoma completo de distintas subpoblaciones de células T CD4⁺ de pacientes VIH⁺ (T_N y T_{CM}) y de controles VIH⁻ (T_N, T_{CM} y T_{EM}) y evaluamos la posibilidad de que las células T_{CM} de pacientes VIH⁺ tuvieran un mayor grado de diferenciación más parecido a las células T_{EM} en comparación con los controles. En el estudio de expresión de genoma completo no incluimos a la población de T_{EM} de pacientes VIH⁺ debido a que por su proporción no fue posible purificar la cantidad de RNA necesaria a partir de la sangre de los pacientes.

Para efectos de esta tesis se usará T_N, T_{CM} y T_{EM} para hablar de las subpoblaciones de memoria, sin especificar que son CD4⁺ a menos de que esté hablando de linfocitos CD8⁺.

Hipótesis

- Los linfocitos $T_{CM} CD4^+$ de pacientes VIH^+ tendrán un patrón de expresión génica más parecido a los $T_{EM} CD4^+$, en comparación con los $T_{CM} CD4^+$ de personas VIH^- (controles) y este patrón estará relacionado con una menor capacidad de proliferación y mayor susceptibilidad a apoptosis.

Objetivo general

- Determinar el perfil de expresión génica de los $T_{CM} CD4^+$ purificados de personas con VIH y de controles con el objetivo de establecer si este perfil de expresión indica un mayor parecido al perfil de expresión de los $T_{EM} CD4^+$, y por lo tanto menor capacidad de proliferación y susceptibilidad a apoptosis, en comparación con los T_{CM} de controles.

Objetivos específicos

- Determinar los patrones de expresión génica de las subpoblaciones T_N , T_{CM} y T_{EM} de controles y pacientes VIH^+ .
- Determinar si los T_{CM} de pacientes VIH^+ tienen una expresión génica que los relacionen con estadios de diferenciación más relacionados con los T_{EM} .
- Determinar la expresión diferencial de genes entre los T_{CM} de pacientes VIH^+ y los T_{CM} de controles sanos.
- Determinar si existe diferencia entre la longitud relativa de telómeros entre los T_{CM} de controles y pacientes VIH^+ por FISH-Flow.
- Determinar mediante análisis de enriquecimiento la predicción funcional usando los genes expresados diferencialmente en los T_{CM} de pacientes VIH^+ y controles, además de validar por RT-qPCR algunos de estos genes.
- Evaluar experimentalmente la progresión del ciclo celular en las células T_{CM} de pacientes VIH^+ y controles a través de la expresión de ciclina A y B1.

Materiales y métodos

Pacientes y muestras

Este proyecto se realizó con las aprobaciones del Comité de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Ciencias Médicas “Salvador Zubirán” y del Comité de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”. Todos los pacientes y controles firmaron consentimiento informado de acuerdo con el Protocolo de Helsinki. Se reclutaron pacientes con infección crónica por VIH sin tratamiento antirretroviral. Para los análisis de expresión de mRNA se reclutaron 9 donadores VIH⁻, y 6 pacientes VIH⁺ en etapa crónica con una cuenta media de linfocitos T CD4⁺ de 480 células/ μ L de sangre (intervalo de 330-757) y una media de carga viral de 121 563 copias de RNA de VIH /ml de plasma (intervalo de 23 883 – 412 584). Entre estos pacientes, específicamente de los que se purificaron linfocitos T_{CM} tuvieron una carga viral de 23883, 81834 y 107732 copias de VIH/mL de sangre y cuentas de linfocitos T CD4⁺ de 439, 473 y 491 células/ μ L de sangre, respectivamente.

Adicionalmente, para determinar la longitud relativa de telómeros de las células T_{CM} se reclutaron 10 controles VIH⁻ y 10 pacientes VIH⁺ con una cuenta media de linfocitos T CD4⁺ de 628 células/ μ L de sangre (intervalo de 194 – 1 128) y una media de carga viral de VIH de 485 882 copias de RNA viral/mL de plasma (intervalo de 3 870 – 3 500 000). Ningún paciente presentaba ninguna infección oportunista o malignidad evidente ni estaba recibiendo fármacos inmunomoduladores. Para la determinación de fases del ciclo celular y expresión de ciclina A y B1 se reclutaron 10 controles VIH⁻ y 9 pacientes VIH⁺ con una cuenta

media de linfocitos T CD4⁺ de 328 células/ μ l de sangre (intervalo de 285–759) y una media de carga viral de VIH de 96,026 copias de RNA viral/mL de plasma (intervalo de 5,520–669,491).

Purificación de subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺

° A partir de 50 a 60 mL de sangre periférica se purificaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC por sus siglas en inglés) por diferencia de densidad en Ficoll (Lymphoprep™, Fresenius Kabi Norge, Oslo, Noruega). Después de recuperar el anillo de PBMC se lavaron dos veces con medio RPMI 1640 (Lonza, Walkersville, MD, USA) y se cuantificaron microscópicamente con colorante vital azul tripano al 0.2% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). A partir de PBMC se purificaron linfocitos T CD4 naive (T_N) (CD4⁺CD45RA⁺CCD7⁺), T_{CM} (CD4⁺CD45RA⁻CCD7⁺) y T_{EM} (CD4⁺CD45RA⁻CCD7⁻) usando sistemas de perlas inmunomagnéticas, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). Brevemente, este método se basa en la captura selectiva de poblaciones de células en columnas con microesferas inmunomagnéticas. Las células T CD8⁺ junto con las células T CD45⁺ (naive) o T CD45RO⁺, según se estén purificando células de memoria o naive son marcadas indirectamente con un coctel de anticuerpos monoclonales conjugados a biotina y microperlas unidas a antibiotina. Posteriormente se realiza una separación magnética (selección negativa) usando una columna de separación (Miltenyi). En esta fracción quedan purificadas las células naive, T_{EM} o memoria total, dependiendo del kit usado. Para la purificación de los T_{CM} se parte la fracción recolectada en el paso anterior con células de memoria total, las células T CD4⁺ de memoria central son marcadas con

CCR7 -PE y con microperlas anti-PE, y se realiza una segunda separación magnética (selección positiva) en una columna de separación (Miltenyi).

La pureza de las subpoblaciones se determinó por citometría de flujo de acuerdo con la expresión de CD4, CD45RA y CCR7 con los siguientes anticuerpos monoclonales conjugados a algún fluorocromo: anti-CD4-APC-Cy7 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), anti-CD45RA-APC (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) y anti-CCR7-PE (Miltenyi Biotec). Las muestras teñidas se analizaron en un citómetro FACSCanto II (BD Biosciences) (Figura 4). Se utilizaron únicamente las poblaciones con al menos 90% de pureza. La expresión de CD38 de membrana se detectó con el anticuerpo monoclonal anti-CD38-biotina (Miltenyi Biotec) y estreptavidina-PerCp-Cy5.5 (Biolegend, California, USA). Cada subpoblación que se purificó provino de un individuo diferente.

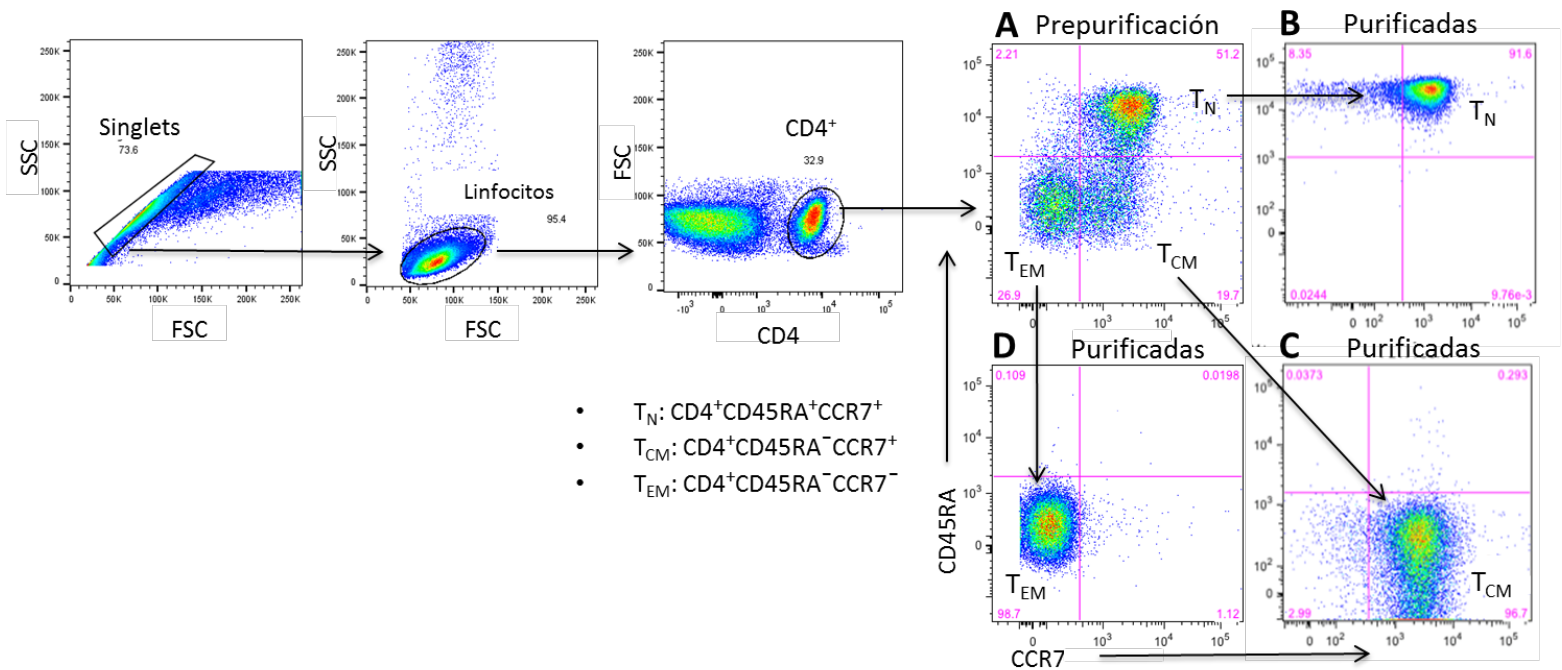


Figura 4. Gráficas representativas de la estrategia de análisis para evaluar pureza en cada una de las subpoblaciones, A) Naive, B) T_{EM} y C) T_{CM} . En todos los casos se realizaron subanálisis a partir de células individuales (singlets) y morfología de linfocitos como se muestran en la Figura 4A. Las figuras B, C y D son graficas provenientes de células purificadas en donde arriba del 98% expresaban $CD4^+$.

Extracción de RNA y análisis de expresión génica por microarreglos

Se purificó RNA total de tres muestras de linfocitos T_N , tres muestras de linfocitos T_{CM} y tres muestras T_{EM} provenientes de individuos no infectados con VIH; así como de tres muestras de linfocitos T_N y tres muestras de linfocitos T_{CM} de individuos VIH⁺. Se utilizaron los sistemas de columnas de gel de sílice RNA *mini kit* de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Qiagen, Limburg, Holanda). Las muestras se lisaron y homogenizaron con el buffer altamente desnaturizante que contiene tiocianato de guanidinio y que a su vez inactiva RNasas, este buffer con altas concentraciones en sales permite que hasta 100 μ g de RNA de una longitud mayor a 200 bases se una a la membrana de sílice RNeasy. Las muestras se agregaron a la columna se centrifugaron y se lavaron 3 veces con el buffer correspondiente. Finalmente, el RNA extraído se eluyó en 30 μ L de agua. La escasez de linfocitos T_{EM} de pacientes VIH⁺ nos impidió obtener suficiente RNA para los ensayos de microarreglos. La integridad de cada muestra de RNA purificado se determinó con *Agilent RNA 6000 Nano Kit en un Agilent 2100 Bioanalyzer* de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Esta aplicación se basa en electroforesis microcapilar que combina chips de microfluidos, separación de las moléculas de RNA por tamaño inducido por voltaje en canales llenos de gel y detección por fluorescencia inducida por láser. Las moléculas de RNA se tiñeron con un intercalante y se detectaron por fluorescencia inducida por láser. Los datos automáticamente se almacenan como electroferogramas. El algoritmo del software utiliza los datos de las señales esperadas en los electroferogramas para el rRNA 28S y 16S para calcular el número de integridad de RNA (RIN). Las categorías de RIN van de 10 (RNA intacto) a 1 (RNA totalmente degradado). La degradación del rRNA se refleja en un corrimiento

continuo hacia fragmentos más cortos de RNA. Se utilizaron solamente las muestras de RNA con un número de integridad de RNA (RIN) ≥ 8 .

A partir de concentraciones equimolares del RNA purificado de cada muestra se sintetizó cDNA y se marcó con biotina utilizando el sistema Affymetrix WT Sense Target labeling assay (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). Este sistema consiste en 1) se remueve la mayoría del rRNA de la muestras para incrementar la sensibilidad; 2) se realiza una amplificación basada en transcripción *in vitro* para completar 1 μ g de RNA inicial; 3) se genera cDNA de una sola cadena con primers aleatorios dUTP; 4) se fragmenta el cDNA resultante a intervalos predefinidos usando los dU incorporados en la retrotranscripción, dando como resultado fragmentos de aproximadamente 50 bases; 5) finalmente los fragmentos se marcan con biotina mediante la actividad de la TdT incorporada en el *DNA labeling reagent*. El cDNA marcado se purificó, fragmentó e hibridó en un arreglo de genes de Affymetrix “GeneChip Human Gene 1.0 ST Array” de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Affymetrix). Este arreglo de genes tiene la capacidad de analizar 28,869 genes humanos con un arreglo de 764, 885 sondas las cuales reconocen distintos exones de cada gen. Los pasos de lavado y tinción con estreptavidina conjugada a PE se realizaron en una estación de fluidos GeneChip 450 (Affymetrix). Los microarreglos (chips) se analizaron en un lector GeneChip scanner 3000 7G (Affymetrix).

Se analizaron 3 muestras independientes de cada subpoblación de linfocitos T_N , T_{CM} y T_{EM} de controles y 3 muestras independientes de cada subpoblación de linfocitos T_N y T_{CM} de pacientes VIH⁺. Los datos se depositaron en el repositorio Gene Expression Omnibus (GEO) con el número de registro GSE73968.

La corrección del fondo y la normalización se realizaron mediante el método Robust Multiarray Average (RMA) (89) usando el paquete Bioconductor (90) de R (91). El análisis de expresión diferencial se realizó por comparación por pares mediante un modelo lineal usando el paquete limma (92) de Bioconductor (90) en R (91). Las listas de genes expresados diferencialmente se generaron con base en niveles de significancia estadística $\text{Log}(\text{odds}) > 0$ (B-value) y cambio de expresión $\log_2 \text{fold-change} (\log_2 FC) \geq |0.5|$. Se realizó en R (91) un análisis de componentes principales con las señales normalizadas de todos los genes en cada microarreglo.

Las listas obtenidas de genes expresados diferencialmente se usaron en un análisis de agrupamiento jerárquico de dos vías no supervisado con el paquete Bioconductor (90) y gplots (93) de R (91). Los diagramas de Venn se realizaron con Venny 2.0.2 (94)

Los análisis de enriquecimiento funcional se realizaron con la *Data Base for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID) (95,96), *Gen Set Enrichment Analysis* (GSEA) (97,98) y *QIAGEN's Ingenuity Pathway Analysis* (IPA, QIAGEN Redwood City, <http://www.ingenuity.com/>).

PCR en tiempo real semicuantitativo

De los genes expresados diferencialmente entre T_{CM} de pacientes y T_{CM} de controles, se analizó la expresión de 91 de los genes más relevantes derivados de los análisis de enriquecimiento funcional, con el objetivo de validar las diferencias observadas por microarreglos. Adicionalmente se analizó la expresión de *B2M*, *GAPDH*, *POLR2A* y *TBP* como genes de referencia. Se utilizó el mismo RNA purificado

que se usó para el análisis por microarreglos. A partir de 100 ng de RNA total se sintetizó cDNA con el Kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania) usando hexámeros aleatorios con las siguientes condiciones de síntesis: 25 °C durante 10 min, 55 °C durante 30 min y 85 °C durante 5 min. El cDNA obtenido se guardó a -20 °C hasta su uso.

El análisis de la expresión de estos genes se realizó a través de un arreglo de PCR con el uso de Evagreen como intercalante de DNA (SsoFast MasterMix, Biorad, California, USA) para detección de productos de PCR y primers específicos para cada gen (DELTAgene Assays, Fluidigm Corporation, San Francisco, CA, USA).

Inicialmente se realizó una reacción de preamplificación específica para cada cDNA usando la mezcla maestra 2x TagMan Preamp (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) y 500 nM de una mezcla de primers. La preamplificación se realizó a 95 °C durante 10 min, 14 ciclos a 95 °C durante 15 s y 60°C durante 4 min. Con el objetivo de remover los primers no incorporados se agregaron 8 U de Exonucleasa I (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) y se incubó a 37 °C durante 30 min y 80 °C durante 15 min. Los productos finales se diluyeron 1:5 con buffer TE (usb Corporation, Ohio, USA).

La PCR semicuantitativa se realizó siguiendo el protocolo de Fluidigm Fast Gene Expression Analysis usando EvaGreen en el sistema Biomark. Brevemente: para preparar la mezcla de ensayos, se agregaron 100 µM de cada par de primers, reactivo de carga de ensayos 2X, y buffer TE 1X. Para preparar la mezcla de muestras, se agrega el cDNA (previamente diluido y tratado con Exonucleasa I), mezcla maestra 2X SsoFast (BioRad) y reactivo de carga de muestra con colorante de unión a DNA 20X. La mezcla de ensayos y la mezcla de muestras se cargaron

en un arreglo dinámico de circuitos de fluidos integrado de 96x96 (96.96 Dynamic Array IFC, Fluidigm) usando el IFC controller HX (Fluidigm) y posteriormente el arreglo se transfirió al BioMark (Fluidigm). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 70 °C durante 40 min, 60°C durante 30 s, 95 °C durante 60 s, 30 ciclos a 96 °C durante 5 s y 60 °C durante 20 s. Con el objetivo de evaluar posibles productos de amplificación inespecíficos, se realizó una curva de disociación con un intervalo de temperatura de 60 °C a 95 °C a razón de 1 °C/3 s. Los valores de Ct se obtuvieron con el programa Fluidigm Real-Time PCR Analysis Versión 4.1.3 (Fluidigm). Se consideraron únicamente genes con valores de Ct < 30 y aquellos con una sola curva de disociación. Se utilizó la media geométrica de la expresión de 4 genes de referencia para la normalización de los datos (99). La expresión de cada gen se evaluó con las tres muestras independientes por cada subpoblación y se realizaron 6 réplicas técnicas de cada una. La expresión relativa de cada gen se calculó como $\Delta\Delta Ct$. Se realizó la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y las diferencias entre grupos se analizaron mediante la prueba t de Student. El manejo de datos y los análisis estadísticos se realizaron en la plataforma R (91) con la las librerías Reshape (100) y fBasics (101).

Determinación de la Longitud relativa de telómeros por “FISH-Flow”

Después de purificar a los linfocitos CD4⁺ T_{CM} de pacientes VIH⁺ y controles con el sistema de perlas inmunomagnéticas (Miltenyi), se procedió a determinar la longitud relativa de telómeros (LRT) con el Kit Telomere PNA kit/FITC for Flow Cytometry (Dako, São Paulo, Brazil) siguiendo las instrucciones del fabricante que se describen brevemente a continuación. Se utilizaron timocitos de ratón de 6 semanas como células de referencia. El procedimiento consistió en dos partes: 1)

se realizó un lavado de las células T_{CM} y de los timocitos con medio RPMI 1640 (Lonza, Walkersville, MD, USA), se recuperaron las células y se cuantificaron microscópicamente con colorante vital azul tripano al 0.2% (Sigma-Aldrich) en una cámara de Neubauer. Posteriormente se mezclaron 1x10⁶ células T_{CM} y 1x10⁶ timocitos de ratón, se agregó PBS hasta completar un volumen total de 3 mL y se dividió la mezcla en 4 tubos de microcentrífuga de 1.7 mL en alícuotas de 0.75 mL (5x10⁵ células totales). Los tubos se centrifugaron a 500g durante 5 minutos y se decantó el sobrenadante. Posteriormente en dos de los tubos se agregaron 150 µL de la solución de hibridación (controles sin sonda) y en los otros dos tubos se agregaron 150 µL de la solución de hibridación con la sonda Telomere PNA marcada con FITC, esta sonda se une de manera complementaria a las secuencias teloméricas repetidas TTAGGG . Después de resuspender los paquetes celulares, los 4 tubos se colocaron en una placa de calentamiento previamente calentada a 82 °C durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo los tubos se mezclaron en un vórtex y se dejaron incubando en obscuridad a temperatura ambiente durante toda la noche, con el objetivo de que las sondas hibridarán con las regiones teloméricas.

2) Después de la incubación con la sonda PNA, se realizaron dos lavados con 500 µL de la solución de lavado (Vial 3 diluido 1:10), se mezclaron con un vórtex y se colocaron en una placa de calentamiento, precalentada a 40°C, durante 10 minutos. Posteriormente se centrifugó a 500g durante 10 minutos y se decantó el sobrenadante. Finalmente, se añadió 250 µL de Solución de tinción de DNA (yoduro de propidio diluido 1:10) a cada uno de los 4 tubos. Los paquetes celulares se resuspendieron y se transfirieron a tubos para citometría de flujo. Se dejó incubando en obscuridad a temperatura ambiente durante toda la noche. Las muestras se analizaron por citometría de flujo en un citómetro FACSCanto II (BD).

Determinación de la expresión de ciclina A y B1 y fases de ciclo celular en linfocitos CD4⁺ T_{CM} de pacientes VIH⁺

Después de purificar a los linfocitos T_{CM} CD4⁺ de pacientes VIH⁺ y controles con el sistema de perlas inmunomagnéticas (Miltenyi), se procedió a estimular a las células a través del receptor de células T (TCR) con microesferas magnéticas conjugadas con anticuerpos agonistas anti-CD3/CD28 (Miltenyi Biotec; Auburn, CA, EE. UU) en una proporción de una perla por cada cuatro células durante 6 h a 37°C con 5% de CO₂ en medio RPMI 1640 suplementado. Después de este tiempo las perlas se retiraron con ayuda de un magneto y se lavaron con medio RPMI 1640 a 2000 rpm por 5 min. Las células se resuspendieron en medio RPMI 1640 suplementado para completar 96 h de cultivo. Los T_{CM} se cosecharon en tubos cónicos de 1.5 mL y se lavaron con PBS a 2000 rpm por 5 min, posteriormente se realizaron las tinciones para el análisis del ciclo celular.

Para determinar la viabilidad de las células después de activación e incubación se realizó una tinción para citometría de flujo con LIVE/DEAD® *Fixable Near-IR Dead Cell Stain Kit* (Life Technologies™; Eugene, OR, EE. UU). Las células T_{CM} se resuspendieron en 1 mL de PBS y se agregó 1 µL de LIVE/DEAD®, se incubaron por 30 min a temperatura ambiente protegidos de la luz. Después del tiempo de incubación, se centrifugaron a 2000 rpm por 5 min y se lavaron con PBS. Posteriormente, las células se fijaron con 1 mL de PFA al 1.5% por 10 min a temperatura ambiente y se lavaron con PBA. Para permeabilizar las células se agregó metanol al 100 % con agitación constante y se incubaron por 30 min a -20°C. Finalmente, se lavaron con PBA.

Una vez realizada la fijación y permeabilización de las células, se agregaron 100 μL de PBA y 20 μL de Anticiclina A-PE, Anticiclina B1-FITC o su correspondiente control de isotipo (BD Pharmigen) tanto a las células estimuladas como a las no estimuladas. Se incubaron por 30 min a temperatura ambiente y se lavaron con PBA. Después, se resuspendieron en 500 μL de la misma solución amortiguadora y se transfirieron a tubos de citometría. Por último, para la determinación del contenido de ADN, se agregaron 0.5 μL del compuesto 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI), que actúa asociándose al ADN de doble cadena con mayor afinidad hacia los grupos de adenina-timina. Los datos se adquirieron en un citómetro FACS Aria II (BD, Pharmingen). Los datos se analizaron con el software FlowJo V10.2 (FlowJo, LLC. Ashland, OR, EE. UU).

Resultados

Los linfocitos $T_{CM} CD4^+$ de pacientes VIH^+ no tienen un perfil de expresión parecido a los T_{EM} .

Con el objetivo de establecer si las poblaciones de células que incluimos en el estudio se agrupaban entre si, realizamos un análisis de componentes principales no supervisado (no se incluyó ninguna variable que segregara los datos de algún modo), con el total de datos de expresión génica (764, 885 sondas) para todas las poblaciones celulares e individuos. Este análisis segregó a las muestras por subpoblación y, al mismo tiempo, por estatus de infección (muestras de personas infectadas con VIH y controles sin infección por VIH) (Figura 5). Este resultado indica que la clasificación de poblaciones celulares basada en el fenotipo

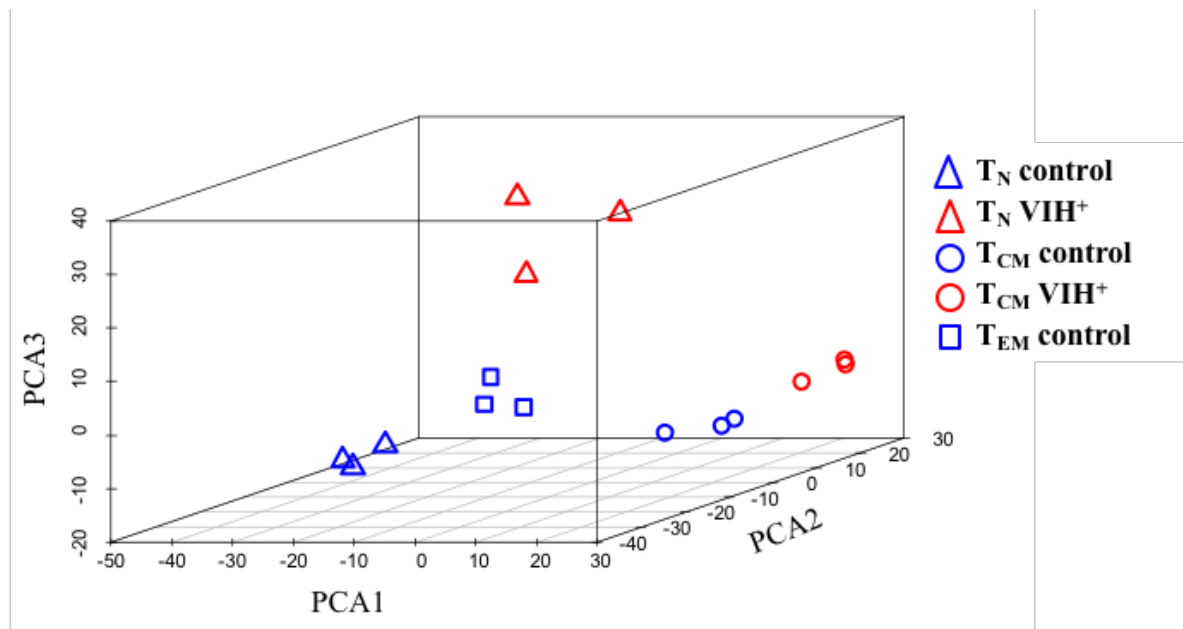


Figura 5. Los estadios de diferenciación de los linfocitos $T CD4^+$ se agrupan con su correspondiente subpoblación y de acuerdo a si están o no infectados por VIH. Análisis de componentes principales de todos los datos resultantes del microarreglo de expresión para cada subpoblación del linfocitos T de pacientes VIH^+ (triángulos y círculos rojos) y controles (triángulos, círculos y cuadrados azules). Se muestran los tres primeros componentes principales que corresponden al 55% de la varianza en una gráfica de tres dimensiones.

(36,44) refleja de manera confiable los patrones de expresión génica, como previamente se reportó (39,42,102), los cuales están alterados por la infección con VIH.

Dado que los linfocitos T_{CM} de pacientes con VIH están expuestos a una activación crónica como lo mencionamos anteriormente, nos preguntamos si la expresión diferencial de genes entre los linfocitos $T_{CD4^+ T_{CM}}$ de pacientes y controles reflejan un estado de más diferenciación de las células de los pacientes hacia un estadio efector (103,104). Tomando como punto de corte el criterio definido en métodos ($\text{Log}_2\text{FC} \geq |0.5|$ y $\text{Log}(\text{odds}) > 0$) buscamos en el transcriptoma completo, todos aquellos genes expresados diferencialmente en las siguientes comparaciones por pares de las subpoblaciones de linfocitos T_{CD4^+} de los controles y pacientes: T_{CM} vs. T_N , T_{EM} vs. T_{CM} , T_{EM} vs. T_N , T_{CM-VIH^+} vs. $T_{CM_{ctrl}}$ y $T_N^{VIH^+}$ vs. T_N_{ctrl} (flechas a, b, c, d y e en la figura 6).

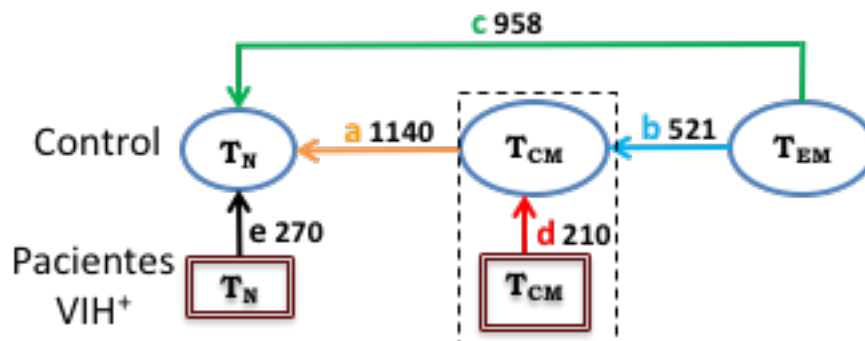


Figura 6. Se muestra el número de genes expresados diferencialmente con base en la comparación por pares de subpoblaciones de linfocitos T_{CD4^+} de pacientes (cuadros rojos) y controles (círculos azules), las flechas de la **a** a la **e** representan cada comparación y los números indican la cantidad de genes expresados diferencialmente en cada comparación. La expresión diferencial se definió como $\text{Log}_2\text{FC} \geq |0.5|$ y $\text{Log}(\text{odds}) > 0$. La dirección de las flechas indica el sentido de la comparación y no la dirección de la diferenciación celular.

Con el objetivo de determinar si los T_{CM} de pacientes con VIH tenían un transcriptoma más relacionado con el transcriptoma de los linfocitos T_{EM} , tomamos

en cuenta los genes expresados diferencialmente (de manera natural) en comparaciones a, b y c de la figura 6, se excluyeron aquellos genes duplicados. Como resultado encontramos 1858 genes expresados diferencialmente, serán referidos subsecuentemente como *genes relacionados con la diferenciación*. Realizamos un análisis de agrupamiento jerárquico no supervisado de dos vías de esos 1858 genes relacionados con la diferenciación (Figura 7A y archivo digital *Additional file 3* del artículo publicado (105) <https://link.springer.com/article/10.1186%2Fs12864-016-3308-8#SupplementaryMaterial>). Los linfocitos T_N y T_{CM} de pacientes se agruparon junto con sus contrapartes de controles (Figura 7A). Las muestras de la misma subpoblación se asignaron a un mismo nodo (círculos verdes 1, 2 y 3 de la Figura 7A), sin importar su estatus de infección con VIH. La expresión de los genes relacionados con diferenciación disminuyen o incrementan progresivamente en un orden lineal de diferenciación (T_N→T_{CM}→T_{EM}), lo que concuerda con reportes previos (39,42,43,102) (Figura 7B). Por ejemplo, se han reportado que *LEF1*, *ACTIN1*, *FOXP1*, *IL6ST* y *CERS6* disminuyen su expresión en linfocitos T_N después del reconocimiento del antígeno y su diferenciación. Nosotros encontramos que estos genes, junto con *TAF4B*, disminuyen su expresión progresivamente cuando organizamos las muestras de acuerdo con el modelo lineal de diferenciación periférica (Figura 7B panel izquierdo). De forma inversa, los transcritos asociados a diferenciación y a funciones efectoras, como *EOMES*, *TBX21* (t-bet), *PRDM1* (Blimp-1) (111,112), *GZMA* y *PRF1* (113,114), gradualmente incrementaron su expresión en el mismo orden (Figura 7B panel derecho). El mismo patrón siguió la expresión de *KLRG1*, un indicador de senescencia replicativa (115,116) (Figura 7B). *TBX21* (t-Bet) fue el único gen con un incremento en la expresión en los linfocitos

T_{CM} de pacientes VIH⁺, comparado con controles (p=0.003). Este aumento, junto con el incremento de la expresión de IL12R e IL18R, sugiere una respuesta favorecida hacia Th1 derivada de la infección con VIH. Una respuesta favorecida a hacia Th1 también fue predicha por el Ingenuity Canonical Pathway Analysis (Anexos, figura suplementaria 1). Esto podría explicar los hallazgos previos de un incremento en la respuesta de IFN-gamma en estas células cuando provienen de pacientes con VIH y expresan CD38, sin necesidad de que las células tuvieran fenotipo efector. De esta manera, podemos concluir que los linfocitos T_{CM} de pacientes no están más diferenciados que sus contrapartes de controles, pero sí polarizadas a funciones Th1.

Finalmente nos preguntamos si los linfocitos T_{CM} de los pacientes tenían una mayor historia replicativa, esto debido al ambiente de activación crónica a la que están expuestos, la cual implicaría un acortamiento de los telómeros. No encontramos ninguna diferencia en la longitud relativa de los telómeros entre los linfocitos T_{CM} de pacientes y controles ($p=0.737$, Figura 8), lo cual concuerda con la ausencia de expresión diferencial de *KLRG1* (115,116), y sugiere que los linfocitos T_{CM} de pacientes VIH⁺ no han pasado por una historia replicativa distinta en comparación con los TCM de controles.

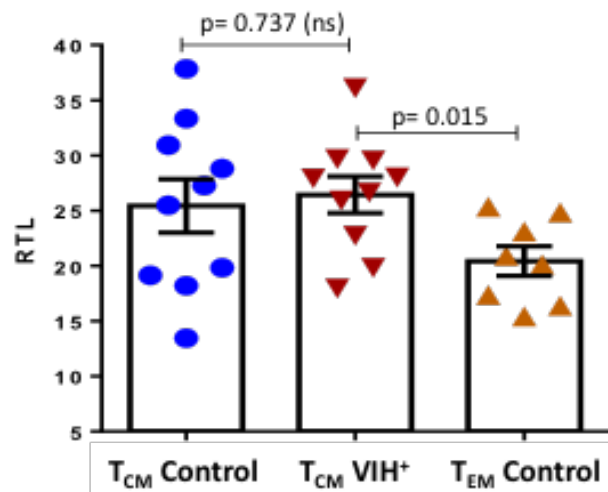


Figura 8. No existe diferencia en la longitud de los telómeros (RTL) entre T_{CM} de pacientes VIH⁺ (triángulos rojos) y T_{CM} de controles (círculos azules). Se utilizó t de Student para comparar los grupos. No había diferencias significativas en las edades de los individuos.

Los linfocitos $CD4^+ T_{CM}$ de pacientes VIH⁺ tienen una firma de expresión génica distintiva comparada con linfocitos $CD4^+ T_{CM}$ de controles

Una vez descartada la posibilidad de que los linfocitos T_{CM} de pacientes VIH⁺ tuvieran una perfil de expresión más relacionado con un fenotipo efector, parecido a los T_{EM} , investigamos si la firma de expresión génica de estas células explicaría la pérdida de su capacidad homeostática. Con base en los criterios definidos en los métodos ($\text{Log}_2\text{FC} \geq |0.5|$ y $\text{Log}(\text{odds}) > 0$), buscamos genes expresados

diferencialmente por los T_{CM} de pacientes VIH⁺ en comparación con los T_{CM} de controles. Encontramos un total de 210 genes expresados de manera diferencial (Figura 6 flecha d). Nos referiremos a esta lista de 210 genes como la firma de expresión génica de los linfocitos T_{CM} en la infección con VIH (Figura 6 flecha d y Figura 9A óvalo rojo y archivo digital *Additional file 2* (105) <https://link.springer.com/article/10.1186%2Fs12864-016-3308-8#SupplementaryMaterial>). Entre estos 210 genes expresados diferencialmente, 137 son exclusivos de la comparación entre T_{CM} de pacientes y controles (Figura 9A cuadro rojo). El análisis de agrupamiento jerárquico no supervisado de dos vías mostró claramente diferencias en la expresión relativa de estos 210 genes (Figura 9B). Es de notar que las réplicas biológicas resultaron muy homogéneas (Figura 9B).

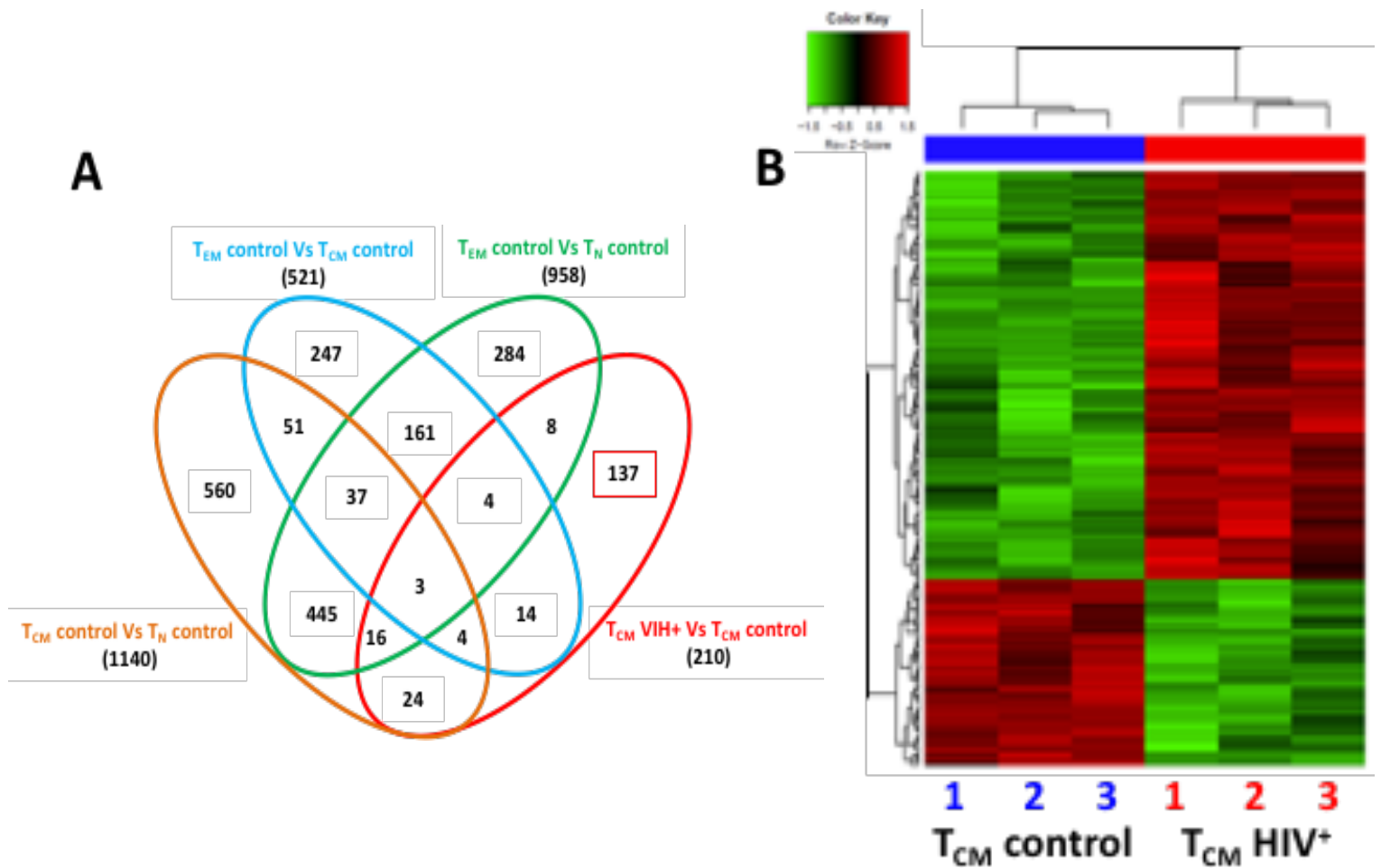


Figura 9. Firma de expresión génica de los linfocitos T_{CM} de pacientes VIH⁺. A) Diagrama de Venn de los genes expresados diferencialmente en cada comparación por pares de poblaciones. Cada óvalo representa la comparación entre dos poblaciones indicadas en la figura. El número de genes encontrados en más de una comparación aparece en las intersecciones. B) Heat map resultante del análisis de agrupamiento jerárquico no supervisado de dos vías de los 210 genes que distinguen a los linfocitos T_{CM} de paciente VIH⁺ (barra roja) de los T_{CM} de controles (barra azul), agrupados en el dendrograma superior. Cada columna representa una muestra independiente (replica biológica) numeradas del 1 al 3. Cada renglón corresponde a un gen diferencialmente expresado.

Un grupo de funciones definidas están enriquecidas de manera consistente en la firma génica de los linfocitos CD4⁺ T_{CM} de pacientes VIH⁺

Analizamos la firma de expresión de los linfocitos T_{CM} de los pacientes VIH⁺ con las herramientas de análisis de enriquecimiento *QIAGEN's Ingenuity Pathway Analysis* (IPA), *Gen Set Enrichment Analysis* (GSEA) y *Data Base for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID). Estos análisis arrojaron

consistentemente cuatro categorías funcionales generales alteradas en los linfocitos T_{CM} de los pacientes VIH⁺: ciclo celular, daño y reparación del DNA, apoptosis y respuestas inmunes (Tabla 1). De manera notable, los 137 genes que distinguen específicamente a los linfocitos T_{CM} de pacientes (Figura 9A ovalo rojo) son suficientes para originar las cuatro categorías funcionales antes mencionadas (tabla 1) cuando los analizamos con DAVID e IPA. Esto sugiere que las funciones enriquecidas dependen sobre todo de la firma de los T_{CM} de pacientes. Con GSEA se obtuvo una extensa lista de funciones inmunes alteradas debido a que este análisis utiliza los datos del microarreglo completo y por lo tanto detecta cambios más modestos cuando los miembros de una función o vía muestran correlación (98) (tabla 1). GSEA identificó la participación de receptores tipo Toll (TLR), interferones tipo I, IL-1, señalización de receptores tipo NOD (NLRs) y activación de NFκB, todos ellos relacionados con un medio inflamatorio. De forma independiente el análisis de *Ingenuity Upstream Regulator* (117) identificó, con las mayores calificaciones Z (*Z-scores*) y los valores p más significativos, a la actividad de IL-1B, TNF, complejo NFκB y CCL5 como moléculas inductoras de los cambios de expresión que forman parte de la firma de los linfocitos T_{CM} de pacientes (Anexos, figura suplementaria 2). Ciclo celular, daño y reparación del DNA y apoptosis (todas ellas funciones fuertemente relacionadas (118,119)) aparecen de forma consistente en el resultado de todas las herramientas de análisis de enriquecimiento (Tabla 1).

Tabla 1. Categorías de funciones enriquecidas de acuerdo a la firma de expresión de los linfocitos T_{CM} VIH⁺

Categoría general	DAVID		GSEA	IPA		
	EASE<0.05	Número de genes	FDR<0.05, p<0.001	p<0.01	Número de genes	Sentido de la predicción
Ciclo celular	cell cycle	15	DNA replication	Proliferation of tumor cell lines	31	Positivo
	cell division	10	cell cycle	proliferation of cells	53	Positivo
	mitosis	9	Mitotic M/G1	cytostasis	6	Positivo
			G1/S transition	cytostasis od tumos cell lines	5	Positivo
			cell cycle check points	interphase of tumor cell lines	11	Positivo
			Cyclin E associated event during G1/S transition	cell survival	28	Positivo
			Assembly of pre-replicative complex	intherphase	13	Positivo
			G0 and early G1	mitosis	10	Negativo
			G2/M check points			
Daño o reparación del DNA	p53 signalling pathway	5	p53 dependent G1 DNA damage response			
	ATM signal pathway	3				
	Cell cycle checkpoints	5				
Apoptosis	Apoptosis	13		Apoptosis of tumor cell lines	32	Negativo
				cell death of cancer cells	6	Negativo
				apoptosis of cervical cancer cell lines	10	Negativo
Respuestas Inmunes			Toll endogenous pathway	synthesis of reactive oxygen species	7	Positivo
			IL1 signaling			
			IFN-alpha/beta signaling			
			Chmokine receptors bind chemokines			
			NOD like receptors signaling			
			NFKB activation by IKKS complex			
			Myd88 cascade			
			TLR4 signaling			
			IL12 pathway			
		FOXO Pathway				

Tabla 1. Categorías funcionales enriquecidas de acuerdo con la expresión diferencial de 210 genes en los linfocitos T_{CM} de pacientes VIH⁺ comparados con los controles. Para las herramientas DAVID e IPA se muestran en una de las columnas el número de genes que soportan cada predicción. EASE score es un valor p modificado de la exacta de Fisher que establece la significancia del enriquecimiento para cada conjunto de genes. FDR: tasa de descubrimientos falsos (por sus siglas en inglés). Para IPA el signo de la predicción indica si la función está favorecida (positiva) o disminuida (negativa).

Muchas de las categorías funcionales en el análisis con GSEA estuvieron cercanamente relacionadas con la transición G0/G1/S y con los puntos de control G2/M. En IPA, la cual pondera la posibilidad y el signo (disminución o aumento de una función) de sus predicciones con una calificación z (z -score), muestra un aumento en proliferación y supervivencia celular, una disminución en apoptosis y muerte celular. En contraste, los resultados de IPA simultáneamente indican un incremento en citostasis, movimiento a interfase y disminución en mitosis (Tabla 1).

Como parte de la validación de los resultados obtenidos por microarreglos, reanalizamos la expresión de mRNA por RT-qPCR para 91 de los genes de la firma de expresión de los linfocitos T_{CM} de pacientes VIH⁺ asociados con las funciones enriquecidas. Como genes de referencia usamos *B2M*, *GAPDH*, *POLR2A* y *TBP*. Este análisis por qPCR validó la expresión de 75 genes (82%) de la firma (Anexo. Tabla suplementaria 1). En cinco de los genes no se logró amplificación y en once no se obtuvo expresión diferencial por qPCR. La expresión de los genes de referencias no mostró diferencias entre las muestras (Figura 10). El análisis con IPA usando solo los 75 genes validados resultó en las mismas funciones y vías enriquecidas que para los datos de microarreglos (Figura 11A, B, C, D y E).

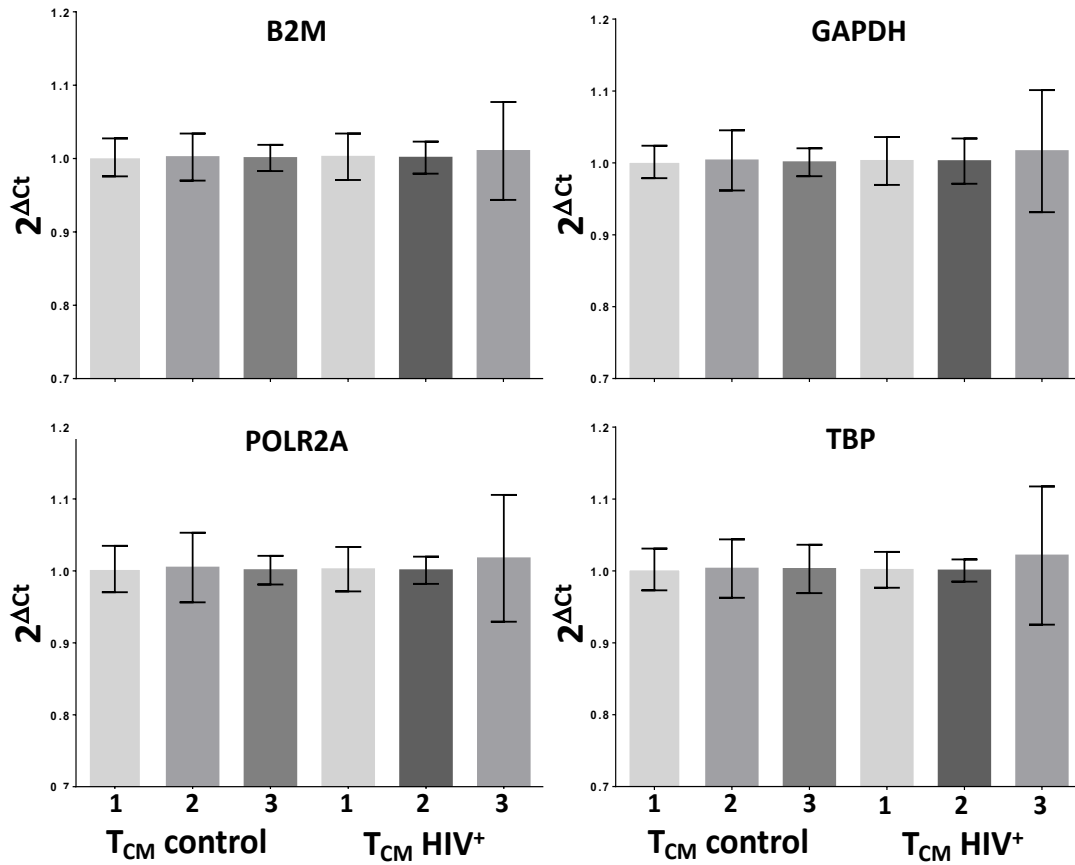


Figura 10. Expresión de cuatro genes de referencia usados en la validación por RT-qPCR. B2M, β -2 microglobulina; GAPDH, gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa; POLR2A, RNA polimerasa II; TBP, proteína de unión a TATA. Los datos de expresión de todos los genes se normalizaron con la media geométrica de la expresión de B2M. La expresión de cada gen se evaluó en seis muestras (marcadas como 1, 2 y 3 en cada grupo) y con 6 réplicas técnicas cada una, las barras representan el valor promedio. Las barras de error corresponden a 1 SEM. No se encontraron diferencias entre grupos al analizar con ANOVA.

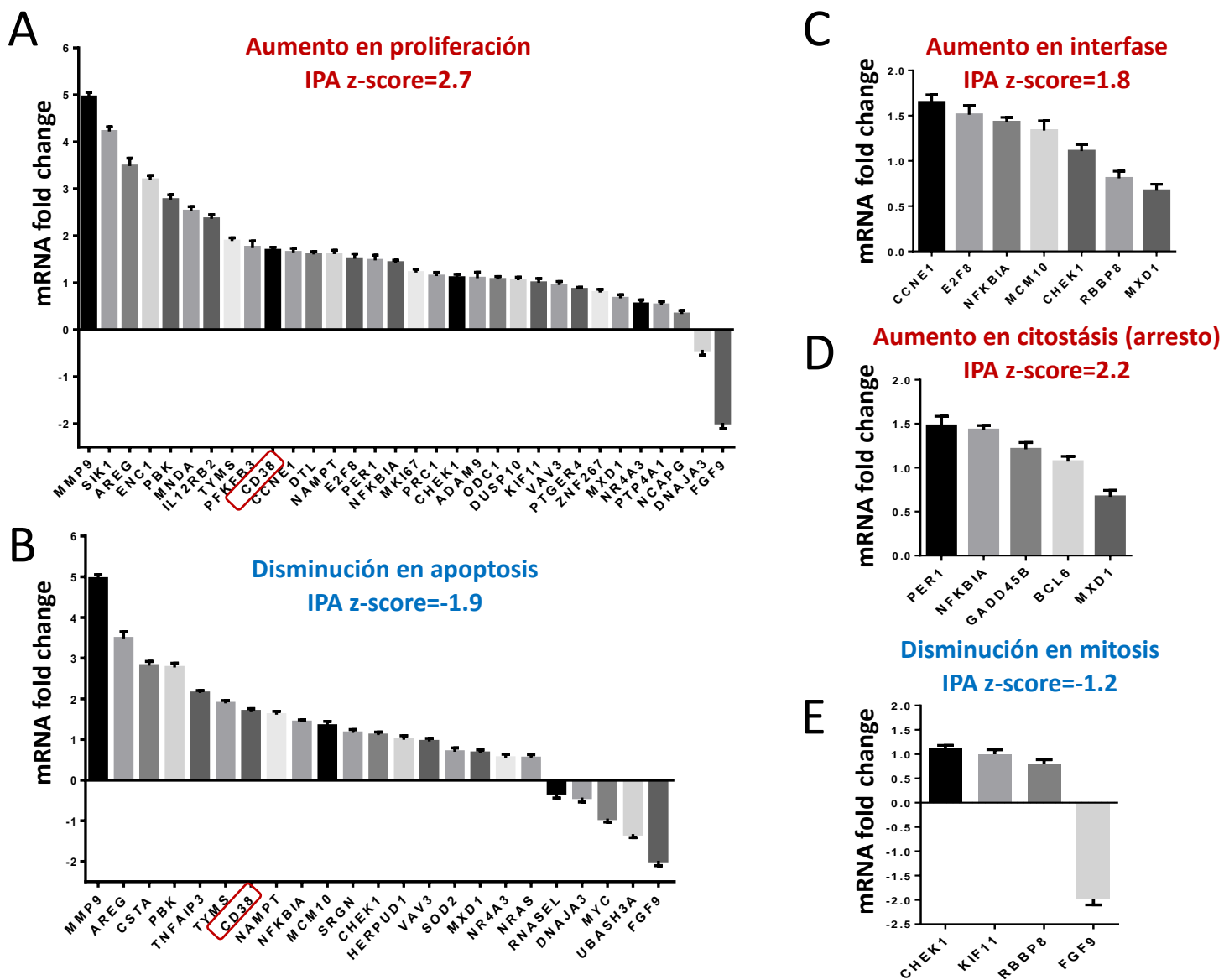


Figura 11. Disfunciones en el ciclo celular son predichas con los genes provenientes de la firma de expresión validados por qPCR. Cada gráfica (de la A a la E) representa la expresión de un grupo de genes validados por qPCR asociados con el incremento de una función (títulos en rojo y z-scores positivos) o con la disminución de una función (títulos en azul y z-scores negativos).

Mientras algunos genes estuvieron relacionados con más de una función, muchos de ellos estuvieron relacionados con una función exclusivamente, estos resultados nos proporcionan mayor certeza en las funciones alteradas que surgieron con los análisis de enriquecimiento (Figura 12). Finalmente, analizamos

por citometría de flujo la expresión de la proteína de superficie CD38 de los linfocitos T_{CM} de los cuales se extrajo el RNA, y encontramos que la expresión de la proteína CD38 fue más frecuente en los linfocitos T_{CM} de pacientes que entre controles, lo cual muestra consistencia con los resultados obtenidos midiendo la expresión del mRNA de CD38 tanto por microarreglos como por qPCR. (Figura 12B y recuadros rojos en Fig. 11A y 11B). La correlación que existe entre la expresión del mensajero y la cantidad de proteína (CD38) aporta evidencia de que las diferencias de expresión encontradas usando mRNA tiene impacto en la cantidad de proteínas que producen las muestras que analizamos.

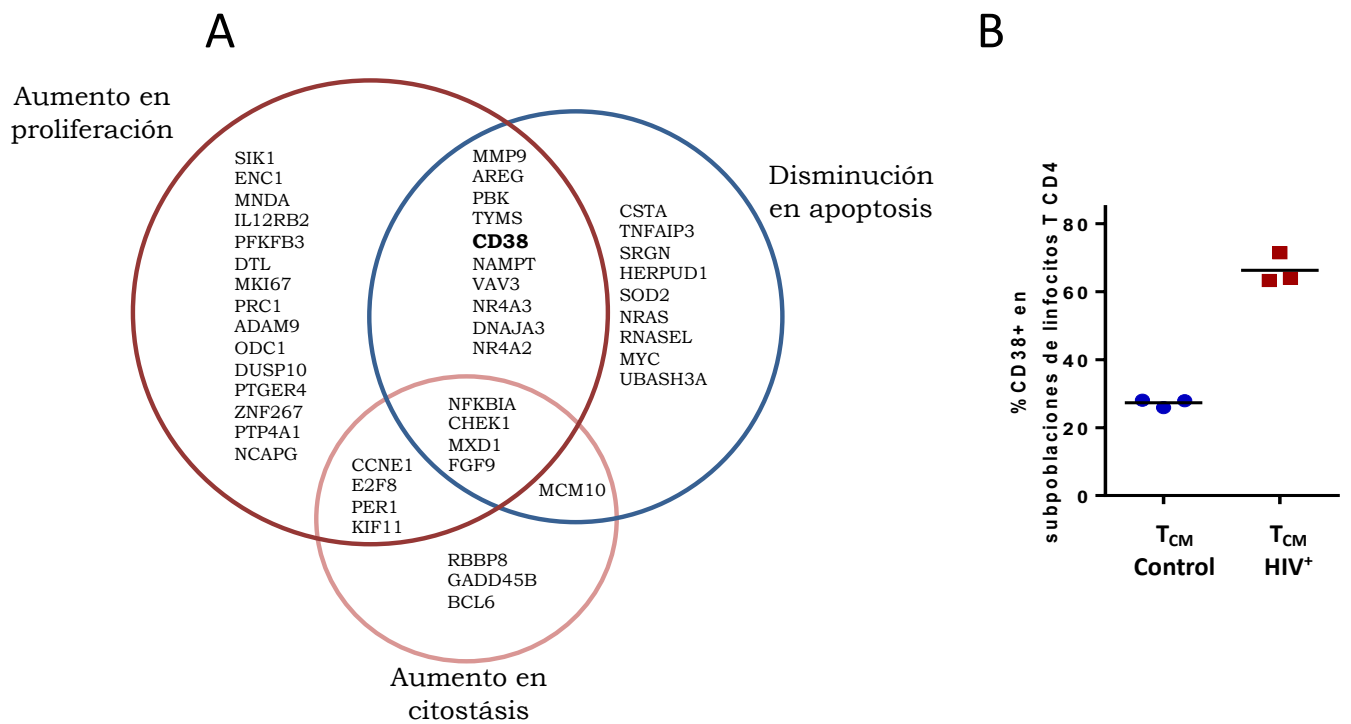


Figura 12. La expresión de CD38 en las poblaciones de linfocitos T_{CM} corresponden los hallazgos por qPCR. A. Diagrama de Venn que representa los grupos de genes expresados diferencialmente correspondientes a las predicciones encontradas por IPA. Las intersecciones corresponden a los genes que aparecen en más de una función predicha. B. Frecuencia de expresión del marcador de superficie CD38 en los linfocitos T_{CM} de los dos grupos medida por citometría de flujo, los cuales están en concordancia con los hallazgos por qPCR (recuadros rojos en Fig. 9A y 9B).

Un modelo que explicaría la muerte de los linfocitos CD4⁺ T_{CM} en la infección por VIH⁺

Debido a que la proliferación y citostasis aumentadas son predicciones aparentemente incompatibles y a que la predicción de disminución de apoptosis no concuerda con la evidencia previa (120–124), tomamos en cuenta que las herramientas de enriquecimiento basan sus predicciones en un amplio grupo de hallazgos previos, que van de los muy particulares a los muy generales, por lo que investigamos si las predicciones estaban basadas en procesos más específicos y si estos procesos eran compatibles. Con este propósito, revisamos las referencias que sostenían las predicciones de IPA. Localizamos los genes en la fase específica del ciclo celular que regulan y encontramos que los genes en todas las predicciones podían ser asignados a fases particulares en el ciclo celular y sin conflictos (Figura 13), con excepción de algunos genes relacionados con proliferación, para los cuales no se encontró asociación conocida con alguna fase del ciclo celular como ENC1, TYMS, PFKFB3, AREG entre otros.

Encontramos que la firma de expresión de los linfocitos T_{CM} en la infección por VIH es compatible con un incremento en la progresión del ciclo celular desde la fase G₀ a la fase S (CCNE1 (125,126), MKI67 (127,128), IL12RB2 (129,130), ADAM9 (131), E2F8 (132), MXD1 (133), MCM10 (134), BCL6 (135–137), pero no con progresión a fases posteriores. Simultáneamente, los patrones de expresión de otros genes sugieren arresto en G₂/M (CHK1 (138), GADD45B (139), PER1 (140), NFKBIA (141), RBBP8 (142), KIF11 (143). Por ejemplo, la acumulación de CCNE1 es necesaria para la transición de G₁ a S, pero su sobreexpresión está asociada con la desestabilización de los cromosomas y daño al DNA (125,126). Sucesivamente,

la expresión de CHK1 se requiere para el arresto en G2 en presencia de daños al DNA (138). Estas observaciones pueden integrarse dentro del ciclo celular e indican un incremento en la entrada al ciclo hasta la fase S seguido de arresto en G2/M. Notablemente, ya que el arresto del ciclo celular conduce a la muerte celular (118,119) resultó inesperado encontrar que los patrones de expresión de CSTA (144), RNASEL (145), NR4A2 (146) y NFKBIA (141) predicen la inhibición de apoptosis mediada por caspas 3 (Figura 13).

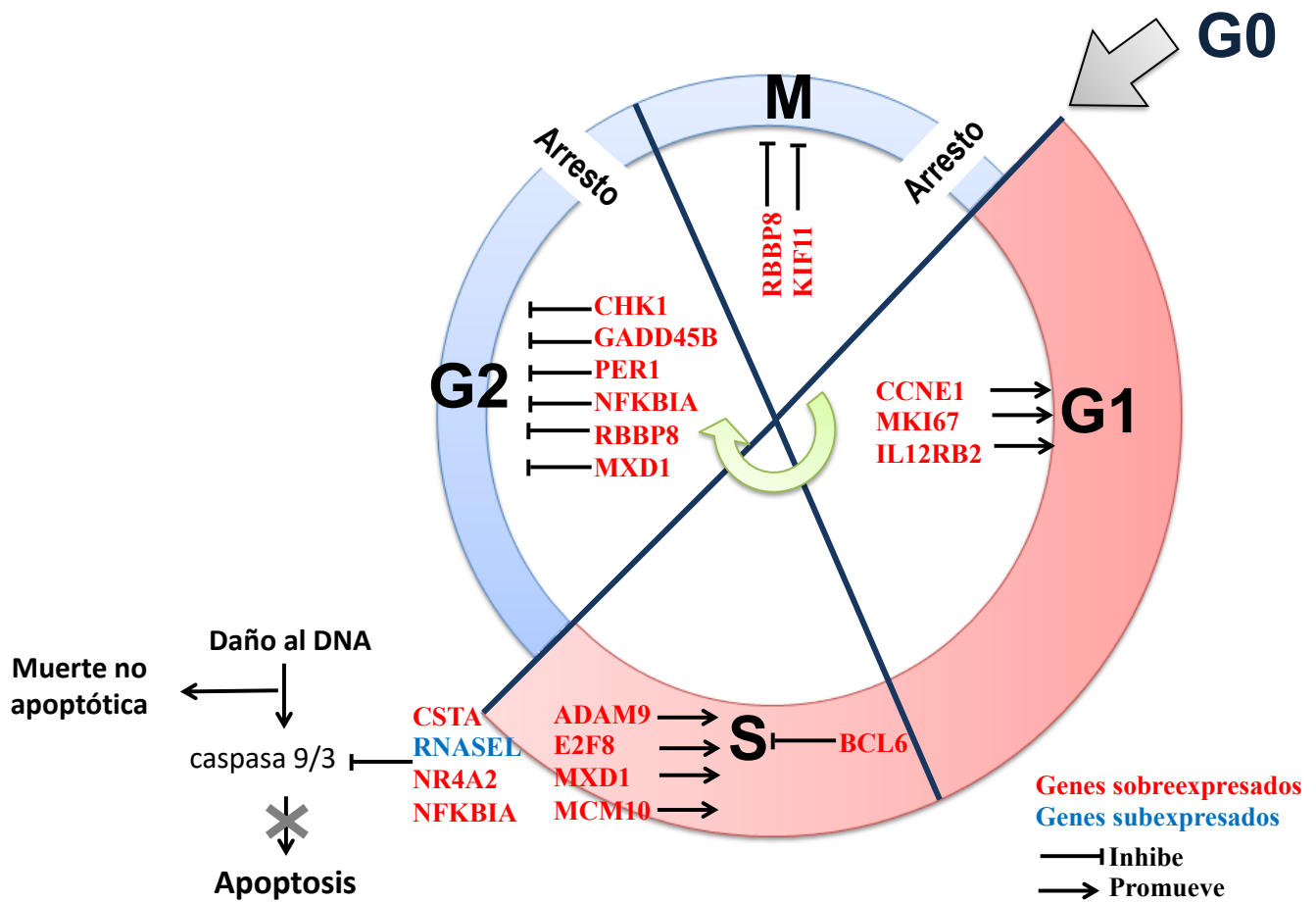


Figura 13. Ubicación de los genes relacionados con la firma de expresión génica de los linfocitos T_{CM} en pacientes con VIH dentro de las fases de ciclo celular que regulan. Estos genes sugieren inducción del progreso del ciclo desde G0 a la fase S, seguido de un arresto en las fases G2/M del ciclo celular, pero con una disminución de la apoptosis.

Alteración en el ciclo celular y en la expresión de la ciclina A de linfocitos CD4⁺ T_{CM} de pacientes VIH⁺

Después de las 96 h de cultivo, realizamos la tinción para la determinar viabilidad, contenido de DNA y expresión de las ciclinas A y B1, en las células T_{CM}, por citometría de flujo. La estrategia de análisis se muestra en la figura 14A a 14E. Para definir las fases del ciclo celular, de acuerdo al contenido de ADN, se utilizaron

como control las células T_{CM} no estimuladas. Se definieron las fases G2/M utilizando el doble de la media geométrica correspondiente a la fase G0/G1 (Figura 14D y 14E). Por otra parte, para delimitar las poblaciones de células que expresaban las ciclinas A o B1, se utilizaron controles de isotipo específicos para cada una (Figura 14D y 14E).

A partir de los resultados obtenidos se observó que la proporción de células T_{CM} vivas, acumuladas en la población sub G0/G1, era mayor en los pacientes VIH⁺, en comparación con los controles VIH⁻ ($p= 0.0434$) (figura 14F). En cuanto a la acumulación de células en las demás fases del ciclo celular, no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos. Se denominó sub G0/G1 a la población de linfocitos T_{CM} vivos con un contenido de DNA por debajo de la zona G0/G1 delimitada por la células sin estimular. Esta región sub G0/G1 puede ser el resultado de DNA degradado y fragmentado en las células.

Con el objetivo de determinar si se produce arresto en la fase G2/M, se determinaron los patrones de expresión de las ciclinas A y B1 en las células T_{CM} de los pacientes y controles,. Se observó la acumulación de células T_{CM} vivas en las poblaciones sub G0/G1 (figura 14G) y G0/G1 (figura 14H) que expresaban la ciclina A, en los pacientes comparados con los controles ($p= 0.0027$ y 0.0434 , respectivamente). El análisis de la expresión de la ciclina B1 se realizó de la misma forma, sin embargo, no se observaron diferencias significativas en su expresión en ninguna fase del ciclo celular. Dado que la expresión de ciclina A está relacionada con el paso de S a G2 estos resultados podrían indicar una mayor probabilidad de arresto en G2.

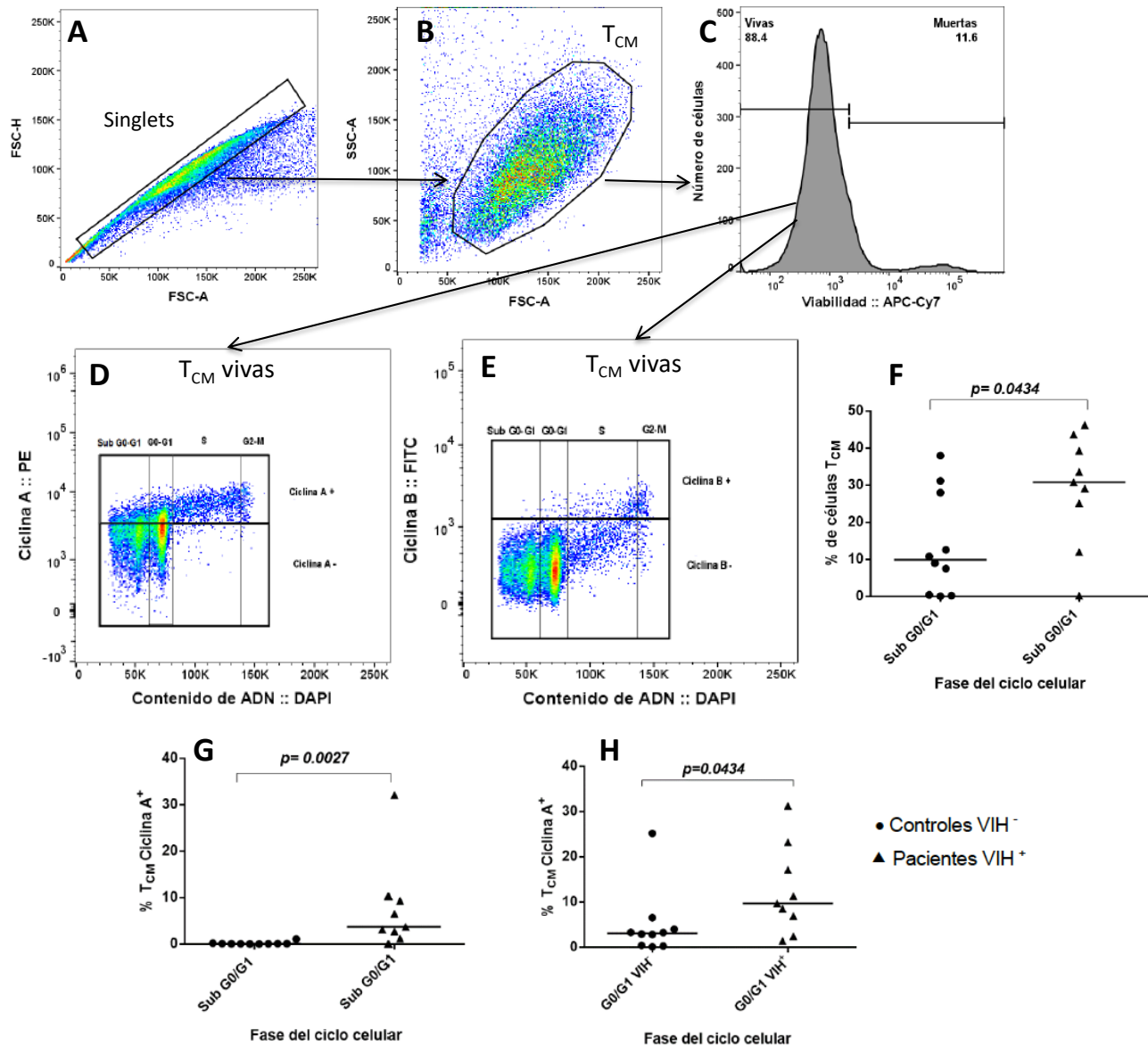


Figura 14. Ciclo celular y expresión de ciclina A y B1. Gráficas representativas de la estrategia de análisis para determinar etapas del ciclo celular y la expresión de ciclinas A y B1. Debido a que son linfocitos purificados y activados todas corresponden a linfocitos T_{CM}. Se seleccionaron células no agrupadas (A), con morfología de linfocitos activados (B), T vivas (C). Las fases del ciclo celular se determinaron por el contenido de DNA (D y E). Las gráficas D y E muestran la expresión de ciclina A y B1 respectivamente, en cada fase del ciclo celular. Se muestra la proporción de linfocitos T acumulados en sub G0/G1 (F), así como la expresión de ciclina A en las células en sub G0/G1 (G) y en G0/G1 (H) en pacientes VIH⁺ (n=9) y controles VIH⁻ (n=10) (F). Las diferencias significativas (p<0.05) se obtuvieron mediante la prueba U de Mann-Whitney.

Discusión

Identificamos y validamos una firma de expresión génica en los linfocitos T_{CM} $CD4^+$ en el contexto de la infección con VIH en su etapa crónica. Esta firma nos condujo a un modelo de muerte en los linfocitos T_{CM} en VIH sustentada por observaciones adicionales y que verifica y caracteriza más detalladamente reportes previos.

Nuestro interés en las alteraciones intrínsecas de los linfocitos T_{CM} $CD4^+$ en pacientes con VIH se originó de estudios que muestran su importancia en la homeostasia de los linfocitos T $CD4^+$ en la infección por VIH (24,46,121,147–149). Nuestros estudios previos en linfocitos T_{CM} activados ($CD38^+$) de pacientes VIH^+ mostraron una respuesta de citocinas sesgada a la producción de $IFN-\gamma$ sin coexpresión de $CD40L$ y con una baja expresión de $IL-2$ (103,104). Dada esta funcionalidad, las T_{CM} parecían estar más relacionadas a un fenotipo efector (26,39,42,43,150). Sin embargo, en este estudio encontramos que el perfil de expresión de los linfocitos T_{CM} es incompatible con una categoría funcional de T_{EM} . Adicionalmente, encontramos que no había disminución en la longitud relativa de los telómeros (RTL) en los linfocitos T_{CM} de los pacientes, lo cual sería esperable en células con una historia replicativa larga (36,44), tal como los linfocitos T_{EM} . Además, la expresión de $KLRG1$, la cual es proporcional a la historia replicativa (115), fue similar en T_{CM} de pacientes y controles pero incrementada considerablemente en linfocitos T_{EM} . Estos hallazgos sostienen que la infección por VIH no está asociada con un fenotipo efector en los linfocitos de pacientes T_{CM} . No obstante, los linfocitos T_{CM} de pacientes muestran un aumento en la expresión de T-bet, un factor de transcripción asociado a la respuesta tipo Th1 (111,151), lo que

sugiere que nuestros hallazgos previos son atribuibles a la polarización Th1 más que a una clásica diferenciación efectora.

La homogeneidad y consistencia de la firma de expresión génica de los linfocitos T_{CM} en la infección con VIH (Figura 9B), contrasta con las grandes diferencias en la carga viral de los pacientes (23883, 81834 y 107732 copias/mL de sangre), esto podría ser importante si consideramos que incluso cambios transitorios en la carga viral puede influir en la expresión génica del total de linfocitos T CD4⁺ (152). Sin embargo, las cuentas de linfocitos T CD4⁺ de pacientes, el mejor predictor de progresión de la enfermedad, son muy cercanas (439, 473 y 491 linfocitos T CD4⁺/mm³ de sangre) y por arriba del umbral de aparición de la mayoría de las infecciones oportunistas (200 células/mm³ de sangre (153)). Esto sugiere que la firma de expresión génica en los linfocitos T_{CM} de pacientes con VIH no depende de la magnitud de la replicación viral durante la fase crónica de la infección, pero podría estar relacionada con los eventos irreversibles de la fase inicial de la infección y/o con la magnitud de la pérdida de los linfocitos T CD4⁺ circulantes en la fase crónica.

Un análisis exhaustivo de las vías enriquecidas en la firma de expresión de los T_{CM} en VIH sugirió incremento en la entrada al ciclo celular y proliferación. Bajo una inspección más detallada, observamos que los genes que predicen proliferación corresponden a funciones corriente arriba de la fase S. De forma inversa, este análisis también predice arresto del ciclo celular debido a funciones que ocurren en la fase G2 o M. Si la entrada a ciclo y el arresto ocurre en la misma célula T_{CM}, el ciclo no implicaría división celular (122), ya que el arresto conduciría a la muerte (154). Adicionalmente, la sobreexpresión de genes relacionados con daño y

reparación al DNA en T_{CM} de pacientes son consistentes con una división fallida después de la fase S.

Nuestro modelo integra observaciones parciales de estudios previos del ciclo celular en la infección con VIH y provee un panorama más amplio del destino de los linfocitos T_{CM}. En estudios previos, los linfocitos T CD4⁺ de pacientes con VIH que *ex vivo* se encontraron en fase S, muchos de ellos T_{CM}, eran más propensos a morir después de un estímulo en comparación con los linfocitos T CD8⁺ (122); sin embargo, en este estudio las células de pacientes no fueron comparadas con las de controles. De manera contrastante, nuestra comparación con células de controles y nuestra caracterización de las subpoblaciones de linfocitos T_{CM} sugieren que la muerte relacionada con el ciclo celular se debe a la infección por VIH e involucra a los linfocitos T_{CM}.

Otro grupo de investigación reportó arresto en la fase G1 basado en la acumulación de células en G1 de entre el total de linfocitos T CD4⁺ (155); sin embargo, ya que los linfocitos T_{CM} comprenden solo alrededor del 25% de los linfocitos T CD4⁺ circulantes (39), es posible que no estuvieran significativamente representados en ese estudio. No obstante, un incremento en la proporción de células Ki67⁺ en fase G1 provee evidencia de que los linfocitos T CD4⁺ con más frecuencia entran a ciclo celular en la infección con VIH, como previamente se demostró (54,156). Ya que las células muertas son rápidamente removidas del torrente sanguíneo (157), es posible que los reportes *ex vivo* en donde se observó células T CD4⁺ en G1 fue el resultado de una remoción rápida de las células que estaban muriendo en fases posteriores. Nuestros hallazgos son consistentes con una entrada promovida al ciclo celular (Figura 13) y como dato nuevo, sugieren que el arresto ocurre en las T_{CM} y en las fases G2 y/o M.

Adicionalmente encontramos que había una mayor acumulación de T_{CM} , con un contenido de DNA denominada sub G0/G1, en los pacientes con infección por VIH, comparados con los controles (Figura 14F). Es posible que este resultado se deba a la expresión diferencial de genes involucrados con desestabilización de cromosomas y daño al DNA, como CCNE1, lo que conduciría al arresto y a la muerte celular como lo sugiere el modelo que aquí proponemos (158).

Las células en sub G0/G1 puede representar diferentes vías de muerte celular que presentan distintos grados de degradación del ADN, así como fragmentos nucleares (159). Esto último explicaría porque en las células de controles también encontramos una población en sub G0/G1, debemos considerar que las condiciones de activación y de cultivo también afectan su crecimiento y sus procesos de supervivencia.

Para determinar la fase del ciclo celular en la que probablemente se produce el arresto celular que se propone en este modelo, se realizó el análisis bivariado del contenido de ADN y la expresión de las ciclinas A y B1 (Figuras 14G y 14H).

En relación con la ciclina A, se presentó una mayor proporción de linfocitos T_{CM} que expresaban ciclina A acumuladas en G0/G1 en pacientes VIH⁺ (Figura 14H). Esto contrasta con estudios previos en los que se encontró una mayor proporción de linfocitos T CD4⁺ activados que expresaban ciclina A en fase S y G2/M en comparación con controles (160). Esta diferencia puede deberse a que la proporción que representan los linfocitos T_{CM} dentro de la población total de linfocitos T CD4⁺ activados es pequeña, por lo que pueden estar reflejando fenómenos independientes.

En nuestro estudio, la acumulación de linfocitos T_{CM} provenientes de pacientes VIH⁺, que expresan en mayor proporción ciclina A en G0/G1 puede interpretarse como linfocitos T_{CM} con alteraciones en la regulación de ciclo celular que las llevarían a arresto y muerte. Este argumento está en concordancia con el incremento de la proporción de linfocitos T_{CM} de pacientes VIH⁺ en la zona Sub G0/G1 (Figura 14G) que sugiere alteraciones en los mecanismos de control y división celular que 1) durante la fase S o G2/M las conduce a pérdida de la integridad del DNA y por lo tanto a muerte o 2) impedirían que las células en G0/G1 progresen a una nueva ronda de división. Sin embargo, si bien estas evidencias concuerdan con el modelo de muerte que proponemos, no son suficientes para confirmar el arresto en el ciclo celular y la vía de muerte de los T_{CM} en la infección por VIH.

Nuestros resultados implican también que la incorporación de análogos de nucleótidos por parte de los T_{CM} de pacientes VIH⁺ podrían reflejar entrada a ciclo pero sin terminar el proceso de división celular (161,162). Se requiere más evidencia para confirmar esta posibilidad. En nuestro modelo, el recambio de linfocitos T_{CM} refleja la muerte y no la proliferación, lo que concuerda con la observación de que los telómeros de los linfocitos T_{CM} no tienen diferentes longitudes entre pacientes y controles.

Estudios previos han reportado incremento en la apoptosis en los linfocitos T CD4⁺ totales (122,163,164) y en T_{CM} de pacientes con HIV (55,122), lo cual es una explicación de la pérdida de la población de linfocitos T CD4⁺ en la infección crónica (165). Estos y otros estudios (120–124) infieren la presencia de apoptosis por la unión de Anexina V a células viables, sin embargo, ha sido demostrado que la unión de Anexina V puede incrementarse en otras vías de muerte celular (166–

169). Nosotros encontramos que la infección con VIH altera la expresión de un considerable número de genes que indican que la apoptosis no estaría favorecida. Una posible explicación de esta discordancia con estudios previos podría ser que diferentes vías de muerte pueden coexistir con la muerte de los linfocitos T_{CM} mediada por caspasa-3 en la infección con VIH, como han sugerido otros estudios (166,170). También, la población de linfocitos T_{CM} es heterogénea (37,46) y las células en apoptosis pudieron no estar reflejadas en datos de microarreglos. De esta manera, proponemos que una vía alternativa de muerte celular programada puede estar involucrada en la muerte de los linfocitos T_{CM} después del arresto del ciclo celular. Una vía alternativa factible es la piroptosis, una muerte celular programada de tipo inflamatorio derivada de señales proinflamatorias, tal como LPS bacteriano e IL-1 β (171). Se ha sugerido que esta vía en previos reportes (170,172) y concuerda con la presencia en sangre de iniciadores de la piroptosis como lipopolisacáridos bacterianos (LPS) (14) e IL-1 β (173) en la infección con VIH. Adicionalmente se ha encontrada aumentada la concentración de IL-18 en la sangre de pacientes con VIH, una citocina liberada durante la piroptosis, (174).

Podría argumentarse que un modelo basado en la presencia de mRNA sin demostrar la presencia de las proteínas (175) no es contundente, sin embargo, existen estudios y reevaluaciones recientes en donde encontraron que los cambios en mRNA explicaron del 87 al 92% de cambios correspondientes en proteínas (176,177), como se encontró en células dendríticas de ratón en su respuesta a lipopolisacárido (178). Adicionalmente, 81% de los niveles de proteínas fueron explicados por los niveles de mRNA en un estudio a gran escala de análisis de proteoma y mRNA en células NIH3T3 (179). De esta manera, consideramos que

tenemos evidencia suficiente para proponer un modelo de muerte de los linfocitos T_{CM} en la infección por VIH.

Conclusiones

Los linfocitos $T_{CM} CD4^+$ de pacientes VIH⁺ no tienen un perfil de expresión que los acerque a un perfil relacionado con los T_{EM} . Los linfocitos T_{CM} de pacientes VIH⁺ mantienen un patrón de expresión génica que los agrupa de junto con los T_{CM} de controles, por lo que sus alteraciones funcionales no están relacionadas con un estado de diferenciación modificado.

Proponemos un modelo de muerte de los linfocitos $T_{CM} CD4^+$ en infección crónica por VIH basado en la firma de expresión génica característica de esta subpoblación. De acuerdo con este modelo la pérdida de los linfocitos $T_{CM} CD4^+$ en la infección por VIH puede estar conducida por un incremento en la entrada a ciclo celular, seguido por un arresto en G2/M, lo que conduciría a muerte no apoptótica (Figura 15).

Sugerimos piroptosis como una alternativa viable; sin embargo, se requiere evidencias experimentales adicionales que validen el proceso involucrado en este modelo.

Referencias

1. Fact Sheet-World AIDS Day 2018 [Internet]. UNAIDS. 2019 [cited 2019 Aug 5]. Available from: <http://www.unaids.org>
2. CENSIDA. Día Mundial del sida México, 2017. CENSIDA; 2017.
3. Levy JA. El VIH y la patogénesis del SIDA. Fondo De Cultura Economica USA; 2008. 770 p.
4. Chan DC, Kim PS. HIV entry and its inhibition. *Cell*. 1998 May 29;93(5):681–4.
5. Rodríguez B, Sethi AK, Cheruvu VK, Mackay W, Bosch RJ, Kitahata M, et al. Predictive value of plasma HIV RNA level on rate of CD4 T-cell decline in untreated HIV infection. *JAMA J Am Med Assoc*. 2006 Sep 27;296(12):1498–506.
6. Funk GA, Oxenius A, Fischer M, Opravil M, Joos B, Flepp M, et al. HIV replication elicits little cytopathic effects in vivo: analysis of surrogate markers for virus production, cytotoxic T cell response and infected cell death. *J Med Virol*. 2006 Sep;78(9):1141–6.
7. Taddeo B, Nickoloff BJ, Foreman KE. Caspase inhibitor blocks human immunodeficiency virus 1-induced T-cell death without enhancement of HIV-1 replication and dimethyl sulfoxide increases HIV-1 replication without influencing T-cell survival. *Arch Pathol Lab Med*. 2000 Feb;124(2):240–5.
8. Fauci AS, Pantaleo G, Stanley S, Weissman D. Immunopathogenic mechanisms of HIV infection. *Ann Intern Med*. 1996 Apr 1;124(7):654–63.
9. 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.
10. Giorgi JV, Liu Z, Hultin LE, Cumberland WG, Hennessey K, Detels R. Elevated levels of CD38+ CD8+ T cells in HIV infection add to the prognostic value of low CD4+ T cell levels: results of 6 years of follow-up. The Los Angeles Center, Multicenter AIDS Cohort Study. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 1993 Aug;6(8):904–12.
11. Lawn SD, Butera ST, Folks TM. Contribution of immune activation to the pathogenesis and transmission of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clin Microbiol Rev*. 2001 Oct;14(4):753–77, table of contents.
12. Brenchley JM, Price DA, Douek DC. HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe? *Nat Immunol*. 2006 Mar;7(3):235–9.
13. Douek D. HIV disease progression: immune activation, microbes, and a leaky gut. *Top HIV Med Publ Int AIDS Soc USA*. 2007 Sep;15(4):114–7.

14. Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med*. 2006 Dec;12(12):1365–71.
15. Pantaleo G, Graziosi C, Fauci AS. New concepts in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med*. 1993 Feb 4;328(5):327–35.
16. Douek DC, Roederer M, Koup RA. Emerging concepts in the immunopathogenesis of AIDS. *Annu Rev Med*. 2009;60:471–84.
17. Deeks SG, Kitchen CMR, Liu L, Guo H, Gascon R, Narváez AB, et al. Immune activation set point during early HIV infection predicts subsequent CD4+ T-cell changes independent of viral load. *Blood*. 2004 Aug 15;104(4):942–7.
18. Maenetje P, Riou C, Casazza JP, Ambrozak D, Hill B, Gray G, et al. A steady state of CD4+ T cell memory maturation and activation is established during primary subtype C HIV-1 infection. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2010 May 1;184(9):4926–35.
19. 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.
20. Martín JC, Bandrés JC. Cells of the monocyte-macrophage lineage and pathogenesis of HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999. 1999 Dec 15;22(5):413–29.
21. Douek DC, Betts MR, Hill BJ, Little SJ, Lempicki R, Metcalf JA, et al. Evidence for increased T cell turnover and decreased thymic output in HIV infection. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2001 Dec 1;167(11):6663–8.
22. Biancotto A, Iglehart SJ, Vanpouille C, Condack CE, Lisco A, Ruecker E, et al. HIV-1 induced activation of CD4+ T cells creates new targets for HIV-1 infection in human lymphoid tissue ex vivo. *Blood*. 2008 Jan 15;111(2):699–704.
23. Picker LJ. Immunopathogenesis of acute AIDS virus infection. *Curr Opin Immunol*. 2006 Aug;18(4):399–405.
24. Okoye AA, Picker LJ. CD4(+) T-cell depletion in HIV infection: mechanisms of immunological failure. *Immunol Rev*. 2013 Jul;254(1):54–64.
25. Sodora DL, Silvestri G. Immune activation and AIDS pathogenesis. *AIDS Lond Engl*. 2008 Feb 19;22(4):439–46.
26. 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.
27. Lanzavecchia A, Sallusto F. Understanding the generation and function of memory T cell subsets. *Curr Opin Immunol*. 2005 Jun;17(3):326–32.

28. 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.
29. Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, Maggi L, Liotta F, Mazzinghi B, et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med.* 2007 Aug 6;204(8):1849–61.
30. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:485–517.
31. Ma CS, Deenick EK, Batten M, Tangye SG. The origins, function, and regulation of T follicular helper cells. *J Exp Med.* 2012 Jul 2;209(7):1241–53.
32. Feuerer M, Hill JA, Mathis D, Benoist C. Foxp3⁺ regulatory T cells: differentiation, specification, subphenotypes. *Nat Immunol.* 2009 Jul;10(7):689–95.
33. Staudt V, Bothur E, Klein M, Lingnau K, Reuter S, Grebe N, et al. Interferon-regulatory factor 4 is essential for the developmental program of T helper 9 cells. *Immunity.* 2010 Aug 27;33(2):192–202.
34. Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. CD4⁺T cells: differentiation and functions. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:925135.
35. Chattopadhyay PK, Roederer M. Good cell, bad cell: flow cytometry reveals T-cell subsets important in HIV disease. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol.* 2010 Jul;77(7):614–22.
36. Appay V, van Lier RAW, Sallusto F, Roederer M. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol.* 2008 Nov;73(11):975–83.
37. Lozza L, Rivino L, Guarda G, Jarrossay D, Rinaldi A, Bertoni F, et al. The strength of T cell stimulation determines IL-7 responsiveness, secondary expansion, and lineage commitment of primed human CD4⁺IL-7Rhi T cells. *Eur J Immunol.* 2008 Jan;38(1):30–9.
38. Geginat J, Sallusto F, Lanzavecchia A. Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naive, central memory, and effector memory CD4⁺ T cells. *J Exp Med.* 2001 Dec 17;194(12):1711–9.
39. Gattinoni L, Lugli E, Ji Y, Pos Z, Paulos CM, Quigley MF, et al. A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nat Med.* 2011 Oct;17(10):1290–7.
40. Sallusto F, Lanzavecchia A. Memory in disguise. *Nat Med.* 2011 Oct 11;17(10):1182–3.
41. Pepper M, Jenkins MK. Origins of CD4⁺ effector and central memory T cells. *Nat Immunol.* 2011 Jun;12(6):467–71.
42. Willinger T, Freeman T, Hasegawa H, McMichael AJ, Callan MFC. Molecular signatures distinguish human central memory from effector memory CD8 T cell subsets. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2005 Nov 1;175(9):5895–903.

43. Schwendemann J, Choi C, Schirmacher V, Beckhove P. Dynamic differentiation of activated human peripheral blood CD8+ and CD4+ effector memory T cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2005 Aug 1;175(3):1433–9.
44. Mahnke YD, Brodie TM, Sallusto F, Roederer M, Lugli E. The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets. *Eur J Immunol*. 2013 Nov;43(11):2797–809.
45. Stubbe M, Vanderheyde N, Pircher H, Goldman M, Marchant A. Characterization of a subset of antigen-specific human central memory CD4+ T lymphocytes producing effector cytokines. *Eur J Immunol*. 2008 Jan;38(1):273–82.
46. Rivino L, Messi M, Jarrossay D, Lanzavecchia A, Sallusto F, Geginat J. Chemokine receptor expression identifies Pre-T helper (Th)1, Pre-Th2, and nonpolarized cells among human CD4+ central memory T cells. *J Exp Med*. 2004 Sep 20;200(6):725–35.
47. Nguyen QP, Deng TZ, Witherden DA, Goldrath AW. Origins of CD4+ circulating and tissue-resident memory T-cells. *Immunology*. 2019;157(1):3–12.
48. Cantero-Pérez J, Grau-Expósito J, Serra-Peinado C, Rosero DA, Luque-Ballesteros L, Astorga-Gamaza A, et al. Resident memory T cells are a cellular reservoir for HIV in the cervical mucosa. *Nat Commun*. 2019 Oct 18;10(1):1–16.
49. Kestens L, Vanham G, Vereecken C, Vandembrouae M, Vercauteren G, Colebunders RL, et al. Selective increase of activation antigens HLA-DR and CD38 on CD4+ CD45RO+ T lymphocytes during HIV-1 infection. *Clin Exp Immunol*. 1994 Mar;95(3):436–41.
50. Rodríguez B, Sethi AK, Cheruvu VK, Mackay W, Bosch RJ, Kitahata M, et al. Predictive value of plasma HIV RNA level on rate of CD4 T-cell decline in untreated HIV infection. *JAMA J Am Med Assoc*. 2006 Sep 27;296(12):1498–506.
51. 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.
52. Hunt PW. Role of immune activation in HIV pathogenesis. *Curr HIV/AIDS Rep*. 2007 Feb;4(1):42–7.
53. Ascher MS, Sheppard HW. AIDS as immune system activation: a model for pathogenesis. *Clin Exp Immunol*. 1988 Aug;73(2):165–7.
54. Sousa AE, Carneiro J, Meier-Schellersheim M, Grossman Z, Victorino RMM. CD4 T cell depletion is linked directly to immune activation in the pathogenesis of HIV-1 and HIV-2 but only indirectly to the viral load. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2002 Sep 15;169(6):3400–6.
55. Sieg SF, Rodriguez B, Asaad R, Jiang W, Bazdar DA, Lederman MM. Peripheral S-phase T cells in HIV disease have a central memory phenotype and rarely have evidence of recent T cell receptor engagement. *J Infect Dis*. 2005 Jul 1;192(1):62–70.
56. Hazenberg MD, Stuart JW, Otto SA, Borleffs JC, Boucher CA, de Boer RJ, et al. T-cell division in human immunodeficiency virus (HIV)-1 infection is mainly due to immune activation: a

- longitudinal analysis in patients before and during highly active antiretroviral therapy (HAART). *Blood*. 2000 Jan 1;95(1):249–55.
57. Mohri H, Bonhoeffer S, Monard S, Perelson AS, Ho DD. Rapid turnover of T lymphocytes in SIV-infected rhesus macaques. *Science*. 1998 Feb 20;279(5354):1223–7.
 58. Silvestri G, Sodora DL, Koup RA, Paiardini M, O’Neil SP, McClure HM, et al. Nonpathogenic SIV infection of sooty mangabeys is characterized by limited bystander immunopathology despite chronic high-level viremia. *Immunity*. 2003 Mar;18(3):441–52.
 59. Milush JM, Reeves JD, Gordon SN, Zhou D, Muthukumar A, Kosub DA, et al. Virally induced CD4+ T cell depletion is not sufficient to induce AIDS in a natural host. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2007 Sep 1;179(5):3047–56.
 60. Sumpter B, Dunham R, Gordon S, Engram J, Hennessy M, Kinter A, et al. Correlates of preserved CD4(+) T cell homeostasis during natural, nonpathogenic simian immunodeficiency virus infection of sooty mangabeys: implications for AIDS pathogenesis. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2007 Feb 1;178(3):1680–91.
 61. Giorgi JV, Lyles RH, Matud JL, Yamashita TE, Mellors JW, Hultin LE, et al. Predictive value of immunologic and virologic markers after long or short duration of HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr 1999*. 2002 Apr 1;29(4):346–55.
 62. Giorgi JV, Hultin LE, McKeating JA, Johnson TD, Owens B, Jacobson LP, et al. Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage. *J Infect Dis*. 1999 Apr;179(4):859–70.
 63. Hazenberg MD, Otto SA, van Benthem BHB, Roos MTL, Coutinho RA, Lange JMA, et al. Persistent immune activation in HIV-1 infection is associated with progression to AIDS. *AIDS Lond Engl*. 2003 Sep 5;17(13):1881–8.
 64. Hunt PW, Brenchley J, Sinclair E, McCune JM, Roland M, Page-Shafer K, et al. Relationship between T cell activation and CD4+ T cell count in HIV-seropositive individuals with undetectable plasma HIV RNA levels in the absence of therapy. *J Infect Dis*. 2008 Jan 1;197(1):126–33.
 65. Sailaja G, Skountzou I, Quan F-S, Compans RW, Kang S-M. Human immunodeficiency virus-like particles activate multiple types of immune cells. *Virology*. 2007 Jun 5;362(2):331–41.
 66. Schindler M, Münch J, Kutsch O, Li H, Santiago ML, Bibollet-Ruche F, et al. Nef-mediated suppression of T cell activation was lost in a lentiviral lineage that gave rise to HIV-1. *Cell*. 2006 Jun 16;125(6):1055–67.
 67. Fonteneau J-F, Larsson M, Beignon A-S, McKenna K, Dasilva I, Amara A, et al. Human immunodeficiency virus type 1 activates plasmacytoid dendritic cells and concomitantly induces the bystander maturation of myeloid dendritic cells. *J Virol*. 2004 May;78(10):5223–32.

68. Beignon A-S, McKenna K, Skoberne M, Manches O, DaSilva I, Kavanagh DG, et al. Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor-viral RNA interactions. *J Clin Invest*. 2005 Nov;115(11):3265–75.
69. Mogensen TH, Melchjorsen J, Larsen CS, Paludan SR. Innate immune recognition and activation during HIV infection. *Retrovirology*. 2010 Jun 22;7:54.
70. Funderburg N, Luciano AA, Jiang W, Rodriguez B, Sieg SF, Lederman MM. Toll-like receptor ligands induce human T cell activation and death, a model for HIV pathogenesis. *PLoS One*. 2008;3(4):e1915.
71. Báfica A, Scanga CA, Schito M, Chaussabel D, Sher A. Influence of coinfecting pathogens on HIV expression: evidence for a role of Toll-like receptors. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2004 Jun 15;172(12):7229–34.
72. Murali-Krishna K, Altman JD, Suresh M, Sourdive DJ, Zajac AJ, Miller JD, et al. Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity*. 1998 Feb;8(2):177–87.
73. Wang A, Chandran S, Shah SA, Chiu Y, Paria BC, Aghamolla T, et al. The stoichiometric production of IL-2 and IFN- γ mRNA defines memory T cells that can self-renew after adoptive transfer in humans. *Sci Transl Med*. 2012 Aug 29;4(149):149ra120.
74. Hua W, Jiao Y, Zhang H, Zhang T, Chen D, Zhang Y, et al. Central memory CD4 cells are an early indicator of immune reconstitution in HIV/AIDS patients with anti-retroviral treatment. *Immunol Invest*. 2012;41(1):1–14.
75. Douek DC, Picker LJ, Koup RA. T cell dynamics in HIV-1 infection. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:265–304.
76. Picker LJ, Hagen SI, Lum R, Reed-Inderbitzin EF, Daly LM, Sylwester AW, et al. Insufficient production and tissue delivery of CD4+ memory T cells in rapidly progressive simian immunodeficiency virus infection. *J Exp Med*. 2004 Nov 15;200(10):1299–314.
77. 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.
78. Sodora DL, Silvestri G. Immune activation and AIDS pathogenesis. *AIDS Lond Engl*. 2008 Feb 19;22(4):439–46.
79. Karim R, Mack WJ, Stiller T, Operskalski E, Frederick T, Landay A, et al. Association of HIV clinical disease progression with profiles of early immune activation: results from a cluster analysis approach. *AIDS Lond Engl*. 2013 Jun 1;27(9):1473–81.
80. Bofill M, Mocroft A, Lipman M, Medina E, Borthwick NJ, Sabin CA, et al. Increased numbers of primed activated CD8+CD38+CD45RO+ T cells predict the decline of CD4+ T cells in HIV-1-infected patients. *AIDS Lond Engl*. 1996 Jul;10(8):827–34.

81. Miedema F, Petit AJ, Terpstra FG, Schattenkerk JK, de Wolf F, Al BJ, et al. Immunological abnormalities in human immunodeficiency virus (HIV)-infected asymptomatic homosexual men. HIV affects the immune system before CD4+ T helper cell depletion occurs. *J Clin Invest.* 1988 Dec;82(6):1908–14.
82. Sieg SF, Harding CV, Lederman MM. HIV-1 infection impairs cell cycle progression of CD4(+) T cells without affecting early activation responses. *J Clin Invest.* 2001 Sep;108(5):757–64.
83. Sieg SF, Bazdar DA, Harding CV, Lederman MM. Differential expression of interleukin-2 and gamma interferon in human immunodeficiency virus disease. *J Virol.* 2001 Oct;75(20):9983–5.
84. McCloskey TW, Haridas V, Pontrelli L, Pahwa S. Response to superantigen stimulation in peripheral blood mononuclear cells from children perinatally infected with human immunodeficiency virus and receiving highly active antiretroviral therapy. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2004 Sep;11(5):957–62.
85. Biancotto A, Grivel J-C, Iglehart SJ, Vanpouille C, Lisco A, Sieg SF, et al. Abnormal activation and cytokine spectra in lymph nodes of people chronically infected with HIV-1. *Blood.* 2007 May 15;109(10):4272–9.
86. Cockerham L, Jain V, Sinclair E, Glidden D, Hartogenesis W, Hatano H, et al. Programmed death-1 expression on CD4+ and CD8+ T cells in treated and untreated HIV disease. *Aids.* 2014 Jul 31;28(12):1749–58.
87. Espinosa E, Ormsby CE, Reyes-Terán G, Asaad R, Sieg SF, Lederman MM. Dissociation of CD154 and cytokine expression patterns in CD38+ CD4+ memory T cells in chronic HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr 1999.* 2010 Dec;55(4):439–45.
88. Olvera-García G, Espinosa E, Sieg SF, Lederman MM. Cytomegalovirus-specific responses of CD38+ memory T cells are skewed towards IFN- γ and dissociated from CD154 in HIV-1 infection. *AIDS Lond Engl.* 2014 Jan 28;28(3):311–6.
89. Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, et al. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostat Oxf Engl.* 2003 Apr;4(2):249–64.
90. Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, et al. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.* 2004;5(10):R80.
91. R Core Team. R: The R Project for Statistical Computing [Internet]. Available from: <https://www.r-project.org/>
92. Smyth GK. limma: Linear Models for Microarray Data. In: Gentleman R, Carey VJ, Huber W, Irizarry RA, Dudoit S, editors. *Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor* [Internet]. Springer New York; 2005 [cited 2014 Jul 1]. p. 397–420. (Statistics for Biology and Health). Available from: http://link.springer.com/chapter/10.1007/0-387-29362-0_23

93. Warnes GR, Bolker B, Bonebakke L, Gentleman R. gplots: Various R Programming Tools for Plotting Data [Internet]. 2015. Available from: <http://cran.r-project.org/web/packages/gplots/index.html>
94. Oliveros, J.C. Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams. [Internet]. Venny 2.0.2. 2007. Available from: <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>
95. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc.* 2009;4(1):44–57.
96. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res.* 2009 Jan;37(1):1–13.
97. Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson K-F, Subramanian A, Sihag S, Lehar J, et al. PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet.* 2003 Jul;34(3):267–73.
98. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Oct 25;102(43):15545–50.
99. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002 Jun 18;3(7):RESEARCH0034.
100. Hadley Wickham. Reshaping Data with the reshape Package - paper. *J Stat Softw* [Internet]. 2007 Nov;21(12). Available from: <http://www.jstatsoft.org/v21/i12/paper>
101. Team RC, Wuertz D, Setz T, Chalabi Y. fBasics: Rmetrics - Markets and Basic Statistics [Internet]. 2014 [cited 2015 Jul 31]. Available from: <https://cran.r-project.org/web/packages/fBasics/index.html>
102. Riou C, Yassine-Diab B, Van grevenynghe J, Somogyi R, Greller LD, Gagnon D, et al. Convergence of TCR and cytokine signaling leads to FOXO3a phosphorylation and drives the survival of CD4+ central memory T cells. *J Exp Med.* 2007 Jan 22;204(1):79–91.
103. Espinosa E, Ormsby CE, Reyes-Terán G, Asaad R, Sieg SF, Lederman MM. Dissociation of CD154 and cytokine expression patterns in CD38+ CD4+ memory T cells in chronic HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr 1999.* 2010 Dec;55(4):439–45.
104. Olvera-García G, Espinosa E, Sieg SF, Lederman MM. Cytomegalovirus-specific responses of CD38+ memory T cells are skewed towards IFN- γ and dissociated from CD154 in HIV-1 infection. *AIDS Lond Engl.* 2014 Jan 28;28(3):311–6.
105. Olvera-García G, Aguilar-García T, Gutiérrez-Jasso F, Imaz-Rosshandler I, Rangel-Escareño C, Orozco L, et al. A transcriptome-based model of central memory CD4 T cell death in HIV infection. *BMC Genomics.* 2016 Dec 1;17(1):956.

106. Willinger T, Freeman T, Herbert M, Hasegawa H, McMichael AJ, Callan MFC. Human naive CD8 T cells down-regulate expression of the WNT pathway transcription factors lymphoid enhancer binding factor 1 and transcription factor 7 (T cell factor-1) following antigen encounter in vitro and in vivo. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2006 Feb 1;176(3):1439–46.
107. Babich A, Burkhardt JK. Coordinate control of cytoskeletal remodeling and calcium mobilization during T-cell activation. *Immunol Rev*. 2013 Nov;256(1):80–94.
108. Feng X, Wang H, Takata H, Day TJ, Willen J, Hu H. Transcription factor Foxp1 exerts essential cell-intrinsic regulation of the quiescence of naive T cells. *Nat Immunol*. 2011 Jun;12(6):544–50.
109. Nagashima H, Okuyama Y, Asao A, Kawabe T, Yamaki S, Nakano H, et al. The adaptor TRAF5 limits the differentiation of inflammatory CD4+ T cells by antagonizing signaling via the receptor for IL-6. *Nat Immunol*. 2014 May;15(5):449–56.
110. Ogretmen B, Hannun YA. Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. *Nat Rev Cancer*. 2004 Aug;4(8):604–16.
111. Knox JJ, Cosma GL, Betts MR, McLane LM. Characterization of T-bet and eomes in peripheral human immune cells. *Front Immunol*. 2014;5:217.
112. Crotty S, Johnston RJ, Schoenberger SP. Effectors and memories: Bcl-6 and Blimp-1 in T and B lymphocyte differentiation. *Nat Immunol*. 2010 Feb;11(2):114–20.
113. Haabeth OAW, Tveita AA, Fauskanger M, Schjesvold F, Lørvik KB, Hofgaard PO, et al. How Do CD4(+) T Cells Detect and Eliminate Tumor Cells That Either Lack or Express MHC Class II Molecules? *Front Immunol*. 2014;5:174.
114. Marshall NB, Swain SL. Cytotoxic CD4 T Cells in Antiviral Immunity. *BioMed Res Int*. 2011 Nov 22;2011:e954602.
115. Marcolino I, Przybylski GK, Koschella M, Schmidt CA, Voehringer D, Schlesier M, et al. Frequent expression of the natural killer cell receptor KLRG1 in human cord blood T cells: correlation with replicative history. *Eur J Immunol*. 2004 Oct;34(10):2672–80.
116. Henson SM, Akbar AN. KLRG1—more than a marker for T cell senescence. *Age*. 2009 Dec;31(4):285–91.
117. Krämer A, Green J, Pollard J, Tugendreich S. Causal analysis approaches in Ingenuity Pathway Analysis. *Bioinforma Oxf Engl*. 2014 Feb 15;30(4):523–30.
118. Heijink AM, Krajewska M, van Vugt MATM. The DNA damage response during mitosis. *Mutat Res*. 2013 Oct;750(1–2):45–55.
119. Topham CH, Taylor SS. Mitosis and apoptosis: how is the balance set? *Curr Opin Cell Biol*. 2013 diciembre;25(6):780–5.

120. Kovacs JA, Lempicki RA, Sidorov IA, Adelsberger JW, Herpin B, Metcalf JA, et al. Identification of dynamically distinct subpopulations of T lymphocytes that are differentially affected by HIV. *J Exp Med*. 2001 Dec 17;194(12):1731–41.
121. van Grevenynghe J, Procopio FA, He Z, Chomont N, Riou C, Zhang Y, et al. Transcription factor FOXO3a controls the persistence of memory CD4(+) T cells during HIV infection. *Nat Med*. 2008 Mar;14(3):266–74.
122. Sieg SF, Bazdar DA, Lederman MM. S-phase entry leads to cell death in circulating T cells from HIV-infected persons. *J Leukoc Biol*. 2008 Jun;83(6):1382–7.
123. Derks RA, Beaman KD. Regeneration and tolerance factor prevents bystander T-cell death associated with human immunodeficiency virus infection. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2004 Sep;11(5):835–40.
124. Shmagel KV, Saidakova EV, Korolevskaya LB, Shmagel NG, Chereshev VA, Anthony DD, et al. Influence of hepatitis C virus coinfection on CD4⁺ T cells of HIV-infected patients receiving HAART. *AIDS Lond Engl*. 2014 Oct 23;28(16):2381–8.
125. Honda R, Lowe ED, Dubinina E, Skamnaki V, Cook A, Brown NR, et al. The structure of cyclin E1/CDK2: implications for CDK2 activation and CDK2-independent roles. *EMBO J*. 2005 Feb 9;24(3):452–63.
126. Lu X, Liu J, Legerski RJ. Cyclin E Is Stabilized in Response to Replication Fork Barriers Leading to Prolonged S Phase Arrest. *J Biol Chem*. 2009 Dec 18;284(51):35325–37.
127. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1984 Oct;133(4):1710–5.
128. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*. 2000 Mar;182(3):311–22.
129. Presky DH, Yang H, Minetti LJ, Chua AO, Nabavi N, Wu CY, et al. A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two beta-type cytokine receptor subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Nov 26;93(24):14002–7.
130. Jones ML, Young JM, Huang QR, Puls RL, Webber CA, Benson EM. Interleukin 12-augmented T cell proliferation of peripheral blood mononuclear cells from HIV-seropositive individuals is associated with interleukin 12 receptor beta 2 upregulation. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2003 Apr;19(4):283–92.
131. Liu C-M, Hsieh C-L, He Y-C, Lo S-J, Liang J-A, Hsieh T-F, et al. In vivo targeting of ADAM9 gene expression using lentivirus-delivered shRNA suppresses prostate cancer growth by regulating REG4 dependent cell cycle progression. *PLoS One*. 2013;8(1):e53795.
132. Deng Q, Wang Q, Zong W-Y, Zheng D-L, Wen Y-X, Wang K-S, et al. E2F8 contributes to human hepatocellular carcinoma via regulating cell proliferation. *Cancer Res*. 2010 Jan 15;70(2):782–91.

133. Delpuech O, Griffiths B, East P, Essafi A, Lam EW-F, Burgering B, et al. Induction of Mxi1-SR alpha by FOXO3a contributes to repression of Myc-dependent gene expression. *Mol Cell Biol.* 2007 Jul;27(13):4917–30.
134. Chattopadhyay S, Bielinsky A-K. Human Mcm10 regulates the catalytic subunit of DNA polymerase-alpha and prevents DNA damage during replication. *Mol Biol Cell.* 2007 Oct;18(10):4085–95.
135. Albagli O, Lantoine D, Quief S, Quignon F, Englert C, Kerckaert JP, et al. Overexpressed BCL6 (LAZ3) oncoprotein triggers apoptosis, delays S phase progression and associates with replication foci. *Oncogene.* 1999 Sep 9;18(36):5063–75.
136. Ichii H, Sakamoto A, Arima M, Hatano M, Kuroda Y, Tokuhisa T. Bcl6 is essential for the generation of long-term memory CD4+ T cells. *Int Immunol.* 2007 Apr 1;19(4):427–33.
137. Basso K, Dalla-Favera R. BCL6: master regulator of the germinal center reaction and key oncogene in B cell lymphomagenesis. *Adv Immunol.* 2010;105:193–210.
138. 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):913–24.
139. Maaser K, Borlak J. A genome-wide expression analysis identifies a network of EpCAM-induced cell cycle regulators. *Br J Cancer.* 2008 Nov 4;99(10):1635–43.
140. 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.
141. 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 IkkappaBalpha super-repressor and parthenolide. *Oncogene.* 2000 Aug 24;19(36):4159–69.
142. 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.
143. Mountain V, Simerly C, Howard L, Ando A, Schatten G, Compton DA. The kinesin-related protein, HSET, opposes the activity of Eg5 and cross-links microtubules in the mammalian mitotic spindle. *J Cell Biol.* 1999 Oct 18;147(2):351–66.
144. Takahashi H, Komatsu N, Ibe M, Ishida-Yamamoto A, Hashimoto Y, Iizuka H. Cystatin A suppresses ultraviolet B-induced apoptosis of keratinocytes. *J Dermatol Sci.* 2007 Jun;46(3):179–87.
145. Malathi K, Paranjape JM, Ganapathi R, Silverman RH. HPC1/RNASEL mediates apoptosis of prostate cancer cells treated with 2',5'-oligoadenylates, topoisomerase I inhibitors, and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Cancer Res.* 2004 Dec 15;64(24):9144–51.

146. Ke N, Claassen G, Yu D-H, Albers A, Fan W, Tan P, et al. Nuclear hormone receptor NR4A2 is involved in cell transformation and apoptosis. *Cancer Res.* 2004 Nov 15;64(22):8208–12.
147. Bai F, Tincati C, Merlini E, Pacioni C, Sinigaglia E, Carpani G, et al. Reduced Central Memory CD4+ T Cells and Increased T-Cell Activation Characterise Treatment-Naive Patients Newly Diagnosed at Late Stage of HIV Infection. *AIDS Res Treat.* 2012;2012:314849.
148. Zhang X, Chang Li X, Xiao X, Sun R, Tian Z, Wei H. CD4(+)CD62L(+) central memory T cells can be converted to Foxp3(+) T cells. *PLoS One.* 2013;8(10):e77322.
149. Potter SJ, Lacabaratz C, Lambotte O, Perez-Patrigeon S, Vingert B, Sinet M, et al. Preserved central memory and activated effector memory CD4+ T-cell subsets in human immunodeficiency virus controllers: an ANRS EP36 study. *J Virol.* 2007 Dec;81(24):13904–15.
150. Graef P, Buchholz VR, Stemberger C, Flossdorf M, Henkel L, Schiemann M, et al. Serial transfer of single-cell-derived immunocompetence reveals stemness of CD8(+) central memory T cells. *Immunity.* 2014 Jul 17;41(1):116–26.
151. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell.* 2000 Mar 17;100(6):655–69.
152. Wu JQ, Wang B, Saksena NK. Transitory viremic surges in a human immunodeficiency virus-positive elite controller can shift the cellular transcriptome profile: a word of caution for microarray studies. *J Virol.* 2008 Oct;82(20):10326–7.
153. Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1-Infected Adults and Adolescents [Internet]. 2015 [cited 2015 Dec 30]. Available from: <http://www.aidsinfo.nih.gov/ContentFiles/AdultandAdolescentGL.pdf>
154. Clarke PR, Allan LA. Cell-cycle control in the face of damage--a matter of life or death. *Trends Cell Biol.* 2009 Mar;19(3):89–98.
155. Combadère B, Blanc C, Li T, Carcelain G, Delaugerre C, Calvez V, et al. CD4+Ki67+ lymphocytes in HIV-infected patients are effector T cells accumulated in the G1 phase of the cell cycle. *Eur J Immunol.* 2000 Dec;30(12):3598–603.
156. Gordon SN, Cervasi B, Odorizzi P, Silverman R, Aberra F, Ginsberg G, et al. Disruption of intestinal CD4+ T cell homeostasis is a key marker of systemic CD4+ T cell activation in HIV-infected individuals. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2010 Nov 1;185(9):5169–79.
157. Wickman G, Julian L, Olson MF. How apoptotic cells aid in the removal of their own cold dead bodies. *Cell Death Differ.* 2012 May;19(5):735–42.
158. Olvera-García G, Aguilar-García T, Gutiérrez-Jasso F, Imaz-Rosshandler I, Rangel-Escareño C, Orozco L, et al. A transcriptome-based model of central memory CD4 T cell death in HIV infection. *BMC Genomics [Internet].* 2016 Dec [cited 2017 Jun 2];17(1). Available from: <http://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-016-3308-8>

159. Riccardi C, Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc.* 2006;1(3):1458–61.
160. Chronic CD4+ T-cell activation and depletion in human immunodeficiency virus type 1 infection: type I interferon-mediated disruption of T-cell dyna... - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2018 Oct 10]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18077723>
161. Koning FA, Otto SA, Hazenberg MD, Dekker L, Prins M, Miedema F, et al. Low-level CD4+ T cell activation is associated with low susceptibility to HIV-1 infection. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2005 Nov 1;175(9):6117–22.
162. Srinivasula S, Lempicki RA, Adelsberger JW, Huang C-Y, Roark J, Lee PI, et al. Differential effects of HIV viral load and CD4 count on proliferation of naive and memory CD4 and CD8 T lymphocytes. *Blood.* 2011 Jul 14;118(2):262–70.
163. Herbeuval J-P, Hardy AW, Boasso A, Anderson SA, Dolan MJ, Dy M, et al. Regulation of TNF-related apoptosis-inducing ligand on primary CD4+ T cells by HIV-1: role of type I IFN-producing plasmacytoid dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Sep 27;102(39):13974–9.
164. Bousheri S, Burke C, Ssewanyana I, Harrigan R, Martin J, Hunt P, et al. Infection with different hiv subtypes is associated with CD4 activation-associated dysfunction and apoptosis. *J Acquir Immune Defic Syndr 1999.* 2009 Dec;52(5):548–52.
165. Pitrak DL, Novak RM, Estes R, Tschampa J, Abaya CD, Martinson J, et al. Short communication: Apoptosis pathways in HIV-1-infected patients before and after highly active antiretroviral therapy: relevance to immune recovery. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2015 Feb;31(2):208–16.
166. Miao EA, Rajan JV, Aderem A. Caspase-1-induced pyroptotic cell death. *Immunol Rev.* 2011 Sep 1;243(1):206–14.
167. Elliott JI, Surprenant A, Marelli-Berg FM, Cooper JC, Cassady-Cain RL, Wooding C, et al. Membrane phosphatidylserine distribution as a non-apoptotic signalling mechanism in lymphocytes. *Nat Cell Biol.* 2005 Aug;7(8):808–16.
168. Segawa K, Suzuki J, Nagata S. Constitutive exposure of phosphatidylserine on viable cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Nov 29;108(48):19246–51.
169. Fuchs Y, Steller H. Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015 Jun;16(6):329–44.
170. Song J, Jiao Y, Zhang T, Zhang Y, Huang X, Li H, et al. Longitudinal changes in plasma Caspase-1 and Caspase-3 during the first 2 years of HIV-1 infection in CD4Low and CD4High patient groups. *PLoS One.* 2015;10(3):e0121011.
171. Croker BA, O'Donnell JA, Gerlic M. Pyroptotic death storms and cytopenia. *Curr Opin Immunol.* 2014 Feb;26:128–37.

172. Doitsh G, Galloway NLK, Geng X, Yang Z, Monroe KM, Zepeda O, et al. Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. *Nature*. 2014 Jan 23;505(7484):509–14.
173. Shive CL, Mudd JC, Funderburg NT, Sieg SF, Kyi B, Bazdar DA, et al. Inflammatory cytokines drive CD4+ T-cell cycling and impaired responsiveness to interleukin 7: implications for immune failure in HIV disease. *J Infect Dis*. 2014 Aug 15;210(4):619–29.
174. Ahmad R, Sindhu STA, Toma E, Morisset R, Ahmad A. Elevated levels of circulating interleukin-18 in human immunodeficiency virus-infected individuals: role of peripheral blood mononuclear cells and implications for AIDS pathogenesis. *J Virol*. 2002 Dec;76(24):12448–56.
175. Ghazalpour A, Bennett B, Petyuk VA, Orozco L, Hagopian R, Mungrue IN, et al. Comparative analysis of proteome and transcriptome variation in mouse. *PLoS Genet*. 2011 Jun;7(6):e1001393.
176. Li JJ, Biggin MD. Gene expression. Statistics requantitates the central dogma. *Science*. 2015 Mar 6;347(6226):1066–7.
177. Battle A, Khan Z, Wang SH, Mitrano A, Ford MJ, Pritchard JK, et al. Genomic variation. Impact of regulatory variation from RNA to protein. *Science*. 2015 Feb 6;347(6222):664–7.
178. Jovanovic M, Rooney MS, Mertins P, Przybylski D, Chevrier N, Satija R, et al. Immunogenetics. Dynamic profiling of the protein life cycle in response to pathogens. *Science*. 2015 Mar 6;347(6226):1259038.
179. Li JJ, Bickel PJ, Biggin MD. System wide analyses have underestimated protein abundances and the importance of transcription in mammals. *PeerJ* [Internet]. 2014 Feb 27 [cited 2015 Mar 9];2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3940484/>

Figuras suplementarias

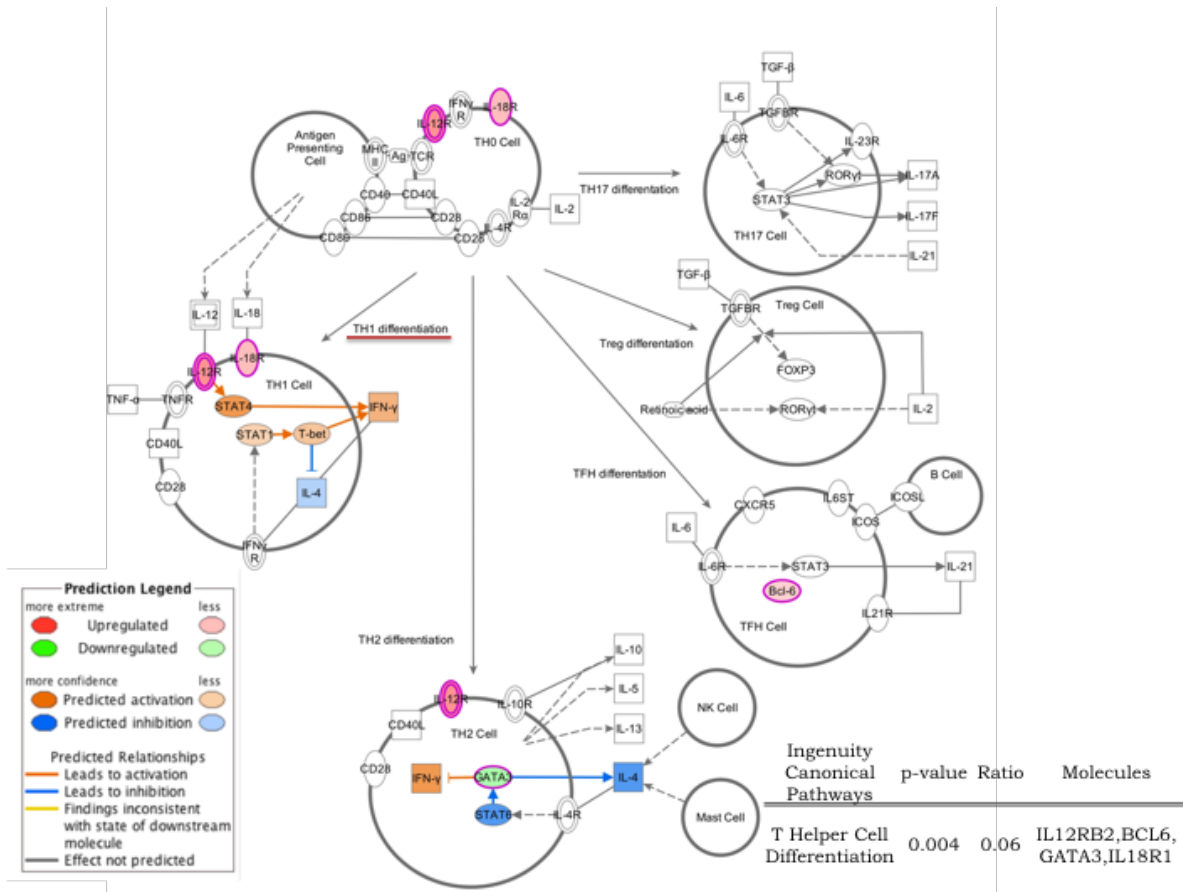


Figura suplementaria 1. La vía de polarización Th1 está favorecida en linfocitos T_{CM} de pacientes con VIH. La firma de expresión de los linfocitos T_{CM} de pacientes VIH+ es consistente con una polarización Th1, de acuerdo con el *Ingenuity Canonical Pathway analysis*.

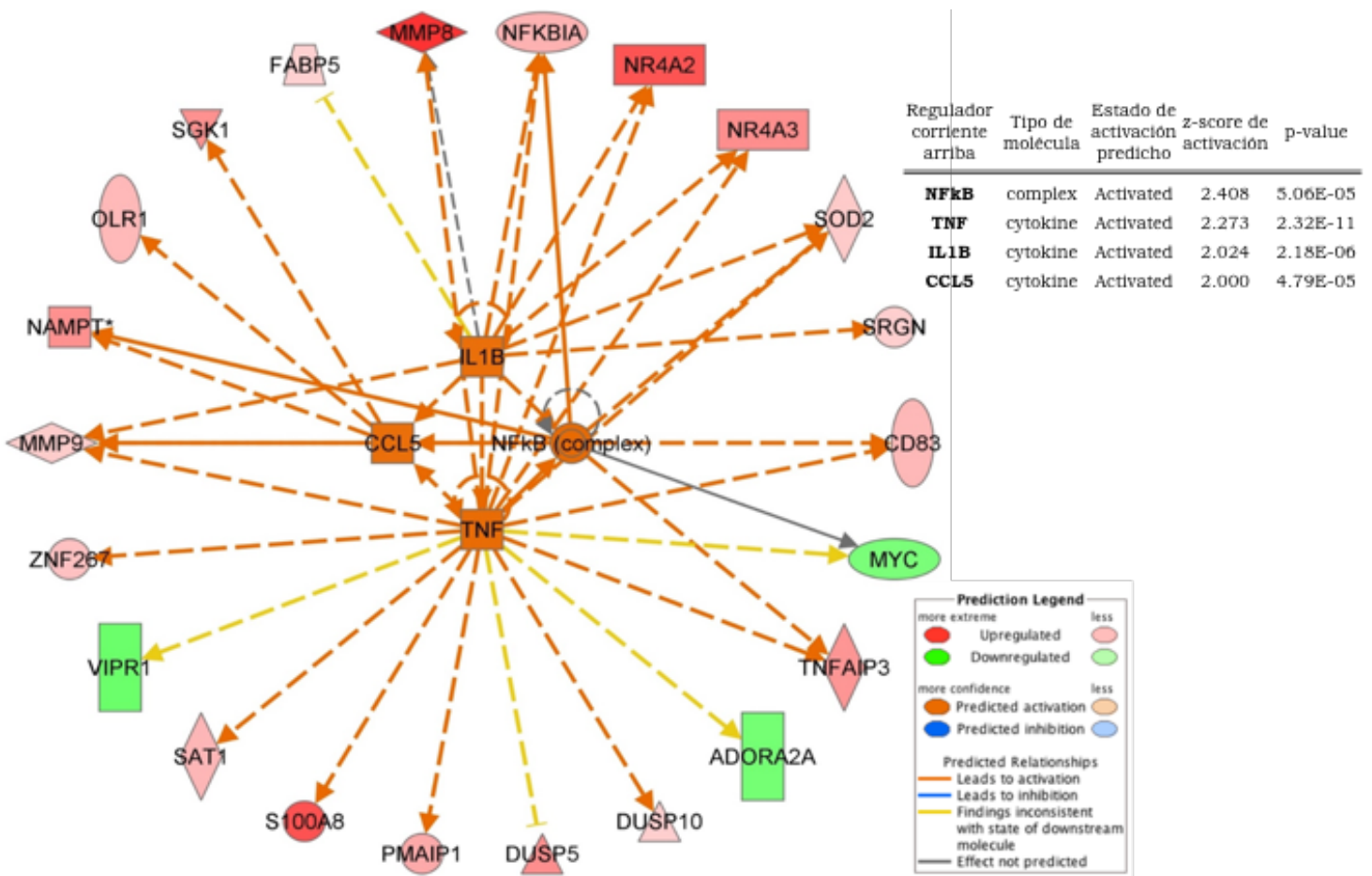


Figura suplementaria 2. Análisis corriente arriba de la firma de expresión génica los linfocitos T_{CM} de pacientes VIH⁺. Moléculas corriente arriba relacionadas con la firma de expresión e genes en los linfocitos T_{CM} de pacientes con VIH están asociadas con las vías de señalización inflamatoria a través de CCL5, IL1B, TNF- α y NFkB. Estas moléculas corriente arriba tuvieron el más alto z-score con IPA.

Tabla suplementaria 1. Validación por RT-PCR de la firma de expresión de los linfocitos T_{CM} en la infección por VIH

Gen	$\Delta\Delta Ct$ (T _{CM} de pacientes HIV+ menos T _{CM} de controles)	P-value (t-test)	Microarreglo Log ₂ FC
1 <i>MMP9</i>	4.960	1.2E-10	0.769
2 <i>SIK1</i>	4.219	1.1E-26	1.517
3 <i>MMP8</i>	3.622	1.0E-14	3.130
4 <i>AREG</i>	3.486	8.6E-15	2.437
5 <i>LTF</i>	3.484	1.2E-11	1.517
6 <i>OLR1</i>	3.480	5.8E-13	1.067
7 <i>RGS1</i>	3.330	1.1E-22	2.065
8 <i>S100A12</i>	3.264	9.9E-11	2.525
9 <i>ENC1</i>	3.190	6.8E-20	1.081
10 <i>S100A8</i>	3.112	5.0E-12	2.630
11 <i>CSTA</i>	2.810	2.2E-06	0.737
12 <i>PBK</i>	2.770	1.8E-07	0.617
13 <i>SKA3</i>	2.770	6.4E-04	1.102
14 <i>PMAIP1</i>	2.640	3.1E-13	1.291
15 <i>MNDA</i>	2.525	2.5E-12	1.489
16 <i>IL12RB2</i>	2.364	4.8E-17	1.722
17 <i>CD83</i>	2.200	6.9E-17	1.076
18 <i>TNFAIP3</i>	2.141	1.5E-20	1.606
19 <i>TYMS</i>	1.889	2.5E-13	1.162
20 <i>PFKFB3</i>	1.756	2.5E-11	1.234
21 <i>BUB1B</i>	1.750	1.5E-07	1.052
22 <i>CLC</i>	1.740	4.8E-09	1.237
23 <i>PELI1</i>	1.697	1.3E-09	1.624
24 <i>CD38</i>	1.688	7.8E-15	1.138
25 <i>CCNE1</i>	1.648	3.2E-16	1.238
26 <i>DTL</i>	1.610	6.7E-09	0.834
27 <i>NAMPT</i>	1.610	3.6E-16	1.673
28 <i>E2F8</i>	1.510	9.9E-11	0.892
29 <i>PER1</i>	1.475	1.2E-11	1.312
30 <i>SLC2A3</i>	1.462	5.5E-12	0.848
31 <i>NFKBIA</i>	1.429	2.4E-20	1.168
32 <i>SAT1</i>	1.403	7.3E-15	1.112
33 <i>MCM10</i>	1.340	4.2E-08	0.604
34 <i>MAP3K8</i>	1.300	3.9E-10	0.643
35 <i>MKI67</i>	1.220	9.7E-09	1.214
36 <i>GADD45B</i>	1.208	1.1E-13	0.615

Gen	$\Delta\Delta C_t$ (T_{CM} de pacientes HIV* menos T_{CM} de controles)	P-value (t-test)	Microarreglo $\log_2 FC$
37 <i>ZBTB10</i>	1.171	3.5E-13	0.581
38 <i>SRGN</i>	1.162	2.1E-12	0.741
39 <i>PRC1</i>	1.150	1.1E-12	0.863
40 <i>CHEK1</i>	1.110	5.3E-13	0.905
41 <i>ADAM9</i>	1.090	3.5E-08	1.238
42 <i>DUSP5</i>	1.078	6.3E-09	1.734
43 <i>BCL6</i>	1.070	1.2E-11	0.737
44 <i>ODC1</i>	1.069	1.5E-14	0.968
45 <i>DUSP10</i>	1.060	2.4E-12	0.748
46 <i>KIF11</i>	0.994	4.3E-09	0.950
47 <i>HERPUD1</i>	0.992	2.0E-09	0.629
48 <i>VAV3</i>	0.950	1.4E-11	1.031
49 <i>CD55</i>	0.926	1.5E-09	0.787
50 <i>NEIL3</i>	0.900	4.3E-08	0.807
51 <i>PTGER4</i>	0.861	1.3E-13	0.674
52 <i>RBBP8</i>	0.800	1.0E-08	1.001
53 <i>ZNF267</i>	0.791	1.3E-10	0.944
54 <i>RBM7</i>	0.743	7.1E-07	0.753
55 <i>PLK4</i>	0.720	4.6E-06	0.941
56 <i>SOD2</i>	0.696	9.7E-07	0.813
57 <i>MXD1</i>	0.670	1.4E-08	0.710
58 <i>ETF1</i>	0.641	1.7E-07	0.819
59 <i>NR4A3</i>	0.551	2.0E-03	1.722
60 <i>NRAS</i>	0.542	3.9E-06	0.539
61 <i>PTP4A1</i>	0.529	2.9E-05	0.520
62 <i>NCAPG</i>	0.334	1.6E-02	0.886
63 <i>P2RY10</i>	0.268	6.7E-03	0.570
64 <i>RNASEL</i>	-0.318	2.5E-02	-0.772
65 <i>DNAJA3</i>	-0.428	2.1E-03	-0.618
66 <i>ADCY3</i>	-0.560	1.5E-06	-0.612
67 <i>GATA3</i>	-0.793	3.4E-09	-0.574
68 <i>MYC</i>	-0.946	4.0E-10	-0.666
69 <i>ADORA2A</i>	-1.248	7.1E-09	-0.701
70 <i>MED11</i>	-1.310	6.8E-12	-0.933
71 <i>UBASH3A</i>	-1.328	2.5E-13	-0.929
72 <i>HSPB1</i>	-1.439	1.9E-09	-1.026
73 <i>FGF9</i>	-1.980	1.7E-14	-0.601
74 <i>CCR8</i>	-2.500	2.5E-15	-1.130
75 <i>NR4A2</i>	Upregulated*		2.615

Gen	$\Delta\Delta Ct$ (T_{CM} de pacientes HIV+ menos T_{CM} de controles)	P-value (t-test)	Microarreglo Log ₂ FC
76 <i>KIF18A</i>	0.290	NS	0.597
77 <i>TOP2A</i>	0.239	NS	1.325
78 <i>TNFRSF10D</i>	0.151	NS	-0.901
79 <i>TAF1D</i>	0.135	NS	0.325
80 <i>FAM103A1</i>	0.120	NS	0.646
81 <i>MINPP1</i>	0.098	NS	-0.799
82 <i>TTK</i>	0.090	NS	0.870
83 <i>HRH2</i>	0.072	NS	-0.834
84 <i>FABP5</i>	0.060	NS	0.705
85 <i>AKTIP</i>	-0.007	NS	-0.716
86 <i>MIR223</i>	-0.044	NS	1.040
87 <i>VIPR1</i>	NA		-0.744
88 <i>FCAR</i>	NA		1.263
89 <i>ID3</i>	NA		-0.728
90 <i>MED31</i>	NA		-0.595
91 <i>SGK1</i>	NA		1.676


* El aumento de la expresión se infirió a partir de la usencia de un valor de $\Delta\Delta Ct$, basado en la amplificación en las células de los pacientes ($\Delta Ct=6.5$), pero sin amplificación en las células de controles. NS: No significativa. NA: no amplificación

RESEARCH ARTICLE

Open Access



A transcriptome-based model of central memory CD4 T cell death in HIV infection

Gustavo Olvera-García¹, Tania Aguilar-García¹, Fany Gutiérrez-Jasso¹, Iván Imaz-Rosshandler², Claudia Rangel-Escareño², Lorena Orozco³, Irma Aguilar-Delfín³, Joel A. Vázquez-Pérez⁴, Joaquín Zúñiga¹, Santiago Pérez-Patrigéon⁵ and Enrique Espinosa^{1*} 

Abstract

Background: Human central memory CD4 T cells are characterized by their capacity of proliferation and differentiation into effector memory CD4 T cells. Homeostasis of central memory CD4 T cells is considered a key factor sustaining the asymptomatic stage of Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1) infection, while progression to acquired immunodeficiency syndrome is imputed to central memory CD4 T cells homeostatic failure. We investigated if central memory CD4 T cells from patients with HIV-1 infection have a gene expression profile impeding proliferation and survival, despite their activated state.

Methods: Using gene expression microarrays, we analyzed mRNA expression patterns in naive, central memory, and effector memory CD4 T cells from healthy controls, and naive and central memory CD4 T cells from patients with HIV-1 infection. Differentially expressed genes, defined by Log₂ Fold Change (FC) ≥ |0.5| and Log (odds) > 0, were used in pathway enrichment analyses.

Results: Central memory CD4 T cells from patients and controls showed comparable expression of differentiation-related genes, ruling out an effector-like differentiation of central memory CD4 T cells in HIV infection. However, 210 genes were differentially expressed in central memory CD4 T cells from patients compared with those from controls. Expression of 75 of these genes was validated by semi quantitative RT-PCR, and independently reproduced enrichment results from this gene expression signature. The results of functional enrichment analysis indicated movement to cell cycle phases G1 and S (increased CCNE1, MKI67, IL12RB2, ADAM9, decreased FGF9, etc.), but also arrest in G2/M (increased CHK1, RBBP8, KIF11, etc.). Unexpectedly, the results also suggested decreased apoptosis (increased CSTA, NFKBIA, decreased RNASEL, etc.). Results also suggested increased IL-1β, IFN-γ, TNF, and RANTES (CCR5) activity upstream of the central memory CD4 T cells signature, consistent with the demonstrated milieu in HIV infection.

Conclusions: Our findings support a model where progressive loss of central memory CD4 T cells in chronic HIV-1 infection is driven by increased cell cycle entry followed by mitotic arrest, leading to a non-apoptotic death pathway without actual proliferation, possibly contributing to increased turnover.

Keywords: HIV, Immunologic Memory, Cell Cycle, Cell Death, CD4-Positive T-Lymphocytes, Transcriptome, Homeostasis

* Correspondence: espinosa@iner.gob.mx;
hector.enrique.espinosa@gmail.com

¹Department of Research in Immunology, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, Calzada de Tlalpan 4502, Mexico City, Mexico

Full list of author information is available at the end of the article



Background

Acute HIV infection depletes mucosal CD4 T cells, mainly effector memory (T_{EM}) cells, rapidly and profoundly [1–3]. The ensuing chronic phase is largely asymptomatic, even though mucosal tissues are not replenished with T_{EM} cells [4]. Simian immunodeficiency virus (SIV) infection of rhesus macaques (an animal model of human HIV disease) shows that opportunistic control infection in the chronic phase is mediated by remnant mucosal T_{EM} cells supplied by the differentiation of central memory (T_{CM}) cells in lymph nodes [5, 6]. Additionally, human T_{CM} cells are also characterized by their capacity of proliferation and differentiation into T_{EM} cells [7, 8]. Thus, homeostasis of T_{CM} cells is considered a key factor sustaining the asymptomatic stage of HIV infection, while progression to acquired immunodeficiency syndrome is attributed to homeostatic failure of T_{CM} cells [5, 6, 9–12].

It is unclear how this homeostatic equilibrium is lost during chronic infection. CD4 T cell maturation subpopulations (T_N , T_{CM} , and T_{EM}) [7] are differentially affected by HIV infection [13, 14]; with T_{EM} cells being HIV's main target [15]. T_{CM} cells can be infected in a lower proportion by HIV, which has led to propose that direct virion-mediated cytopathicity could gradually eliminate them, leading to poor homeostatic activity [6]. Nevertheless, direct cytopathicity by HIV [16] cannot completely explain CD4 T cell depletion during chronic infection [17–20], which suggests the participation of indirect pathogenic mechanisms, particularly chronic activation [12, 21]. Additionally, CD4 T cells from patients with HIV could be intrinsically altered, as suggested by the limited proportion of HIV-infected patients recovering their pre-infection CD4 T cells counts under virus-controlling antiretroviral therapy [22]. In this regard, we have found intrinsic dysfunctions in activated T_{CM} cells from HIV-infected patients, as a lowered IL-2 response and CD40L induction after T cell receptor (TCR)-mediated stimulation [23, 24], which could decrease their proliferative, differentiation, and survival capacities.

In order to determine if circulating T_{CM} cells from HIV-infected patients have a transcriptome consistent with activation, but simultaneously with altered capacities to divide and survive, we compared the *ex-vivo* messenger Ribonucleic acid (mRNA) whole-genome expression patterns of CD4 T naive (T_N) and T_{CM} cells from HIV⁺ patients with T_N , T_{CM} , and T_{EM} cells from healthy controls. We found a T_{CM} cell signature in HIV-1 infection suggesting that the loss of this subpopulation may be driven by increased cell cycle entry followed by mitotic arrest possibly leading to cell death in a non-senescent or effector-like state.

Methods

Participants

This study was approved by the boards of Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas (reference number B29-11), and Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (reference number 1403). All patients signed written informed consent according with the Helsinki Protocol. Blood samples were obtained from 9 HIV⁻ controls, and 6 HIV⁺ patients. Patients had median 480 CD4 T cells/ μ L blood (range 330–757), and median 121 563 HIV-ribonucleic acid (RNA) copies/mL-blood (23 883–41 2584). Among them, patients providing T_{CM} cells had viral loads of 23 883, 81 834 and 107 732 HIV RNA copies/mL-blood, and CD4 T cell counts of 439, 473 and 491 CD4 T cells/ μ L blood, respectively. Relative telomere length was determined in samples from ten additional HIV⁻ controls, and ten additional HIV⁺-patients with median 628 CD4 T cells/ μ L-blood (194–1 128) and median 485 882 HIV-RNA copies/mL-blood (3 870–3 500 000). Patients were antiretroviral therapy-naive, free of opportunistic infections and malignancies, and were not taking any immunomodulatory drugs.

Isolation of CD4 T cell subpopulations

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were purified from 50 to 60 mL of peripheral blood by sedimentation on Lymphoprep (Fresenius Kabi Norge, Oslo, Norway). CD4 T_N (CD45RA⁺ CCR7⁺), T_{CM} (CD45RA⁻ CCR7⁺) and T_{EM} (CD45RA⁻ CCR7⁻) cells were purified from PBMCs using immunomagnetic beads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany).

Subpopulation purity was determined according to the expression of CD4, CD45RA and CCR7, using anti-CD4-APC-Cy7, anti-CD45RA-APC (BD Biosciences, San José, CA, USA), and anti-CCR7-PE (Miltenyi Biotec) fluorochrome-conjugated antibodies (See Additional file 1). Cells were analyzed in a FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences). Cells with purity >90% were used. Membrane CD38 was detected with an anti-CD38-biotin (Miltenyi Biotec) plus streptavidin PerCp-Cy5.5 (Biolegend, San Diego, CA, USA).

RNA extraction and microarray analysis

Total RNA was obtained from three T_N , three T_{CM} , and three T_{EM} CD4 T cell samples from healthy controls, and three T_N and three T_{CM} CD4 T cell samples from HIV⁺ patients, using RNeasy Mini Kit (Qiagen, Venlo, Netherlands). Each RNA sample proceeded from a different subject. Scarcity of patients' T_{EM} cells precluded obtaining sufficient RNA.

Microarray gene expression analysis used equimolar concentrations of total RNA from T cell subpopulations.

Complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) synthesis, amplification, and gene expression profiling were performed according to the manufacturer's instructions (Affymetrix WT Sense Target labeling assay manual, California, USA). Labeled DNA was added to hybridization cocktail and injected into the array (GeneChip Human Gene 1.0 ST Array, Affymetrix). Washing and staining steps were performed in the GeneChip Fluidics Station 450 (Affymetrix). Probe arrays were scanned using a GeneChip Scanner 3000 7G (Affymetrix). Data were deposited in GEO, series record GSE73968.

Background correction and normalization were performed with Robust Multiarray Average Method (RMA) [25] using Bioconductor package [26] of R [27]. A Principal component analysis (PCA) of normalized signals from all genes in each microarray was performed using R [27].

Modeling gene expression was performed using linear models of Limma package [28]. The B-statistic was used as significant measure to define differentially expressed genes. This statistic is computed as the posterior odds of differential expression. It is reformulated in terms of a moderated t-statistic in which posterior residual standard deviations are used in place of ordinary standard deviations. Essentially, the B-statistic compromises between individual gene variance estimates and a single variance estimate for all genes. The probabilities are transformed to a scale that goes from $-\text{Inf}$ to Inf using log odds. The B-statistic is analogous to the adjusted p -value, which addresses statistical significance for multiple comparisons. Here, genes with Log₂ Fold Change (FC) $\geq |0.5|$ and Log odds > 0 were considered as differentially expressed. Limma statistics such as adjusted p -value and the B statistic can be seen in Additional file 2. FDR Benjamini Hochberg multiple testing correction [29] was applied to control the number of false positives. Both B statistic and adjusted p -value showed consistency across differentially expressed genes. Unsupervised 2-way hierarchical clustering analysis of gene expression data was performed using Euclidian distance and average linkage with *gplots* [30] of R [27]. Venn diagrams were made with Venny 2.0.2 [31].

Functional enrichment analyses were performed with Data Base for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) [32, 33], Gen Set Enrichment Analysis (GSEA) [34] and Ingenuity Pathway Analysis (IPA, QIAGEN Redwood City, CA, USA). DAVID uses a Fisher Exact test in order to determine gene-enrichment in annotation terms. A gene set is enriched when the proportion of genes in a list that falls into an annotation term differs from the background model. The EASE score is a modified Fisher exact p -value. Basically, if n is the number of genes in the list that falls into a given annotation term, $n-1$ is used to compute the p -value [32,

33]. Gene set enrichment methods also implement strategies for addressing the issue of multiple testing hypotheses. GSEA uses a ranking procedure to produce a gene list from the full expression matrix. This is done by computing an Enrichment Score (ES(S)). It controls the ratio of false positives to the total number of gene sets attaining a fixed level of significance using FDR [34]. IPA assesses enrichment (i. e. biological functions that could be increased or decreased given the observed gene expression patterns) using a Fisher exact p -value. Additionally, it computes a Z score that allows inferring upstream transcriptional regulators and expectable enriched functions, based on statistical significance by comparing the match between observed and predicted up/down regulation patterns. The null model is referred as activation Z-score [35]. Predicted regulation patterns are based on previously reported causal relationships between relevant genes and functions [35].

Semi-quantitative real-time PCR

We used *B2M*, *GAPDH*, *POLR2A*, and *TBP* as reference genes to normalize expression. RNA proceeded from the samples used for microarray analysis. cDNA was synthesized from ~ 100 ng total RNA with Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany), using random hexamers and performing one cycle of 10 min 25 °C; 30 min 55 °C, and 5 min 85 °C. cDNA was stored at -20 °C until use. PCR amplifications were performed by high-throughput gene expression analysis using DNA binding dye Evagreen (SsoFast MasterMix, Biorad, California, USA) for product detection, and specific primers for each gene (DELTAgene Assays, Fluidigm Corporation, California, USA). Specific target pre-amplification of each cDNA and a cleanup step were performed as described elsewhere [36].

We performed semiquantitative RT-PCR using Fast Gene Expression Analysis with EvaGreen (Biorad), following the Biomark System Protocol (Fluidigm Corporation, California, USA). Assay mixes (100 μM of each pair of primers, 2X Assay Loading Reagent, and 1X TE buffer), sample mixes (pre-amplified cDNA, 2X SsoFast MasterMix (BioRad), and 20X DNA Binding Dye Sample Loading Reagent (Fluidigm), were loaded into a 96.96 Dynamic Array (Fluidigm), using the IFC Controller HX (Fluidigm), and were then transferred to a BioMark HD device (Fluidigm) for the PCR cycles (40 min 70 °C, 30s 60 °C; 60s 95 °C, then 30 cycles of 5 s 96 °C, 60s 60 °C). Melting curves were determined at the 60 to 95 °C rise, with a temperature change rate of 1 °C/3 s. Ct values were obtained with Fluidigm Real-Time PCR Analysis Version 4.1.3 software (Fluidigm).

Only Ct values < 30 and amplicons with only 1 melting curve were used. Geometric means of four reference

genes were used to normalize expression data [37]. Relative expression was calculated as $\Delta\Delta Ct$. Expression of each gene was determined with six technical replicates per sample. Normality was verified using Kolmogorov-Smirnov test, which quantifies the distance between the empirical distribution of the sample and the cumulative distribution of the reference distribution, which in this case is assumed to be normal. Group differences were analyzed with Student's *t* test. Data management and statistics were done with Reshape [38] and fBasics [39] packages of R [27].

Relative telomere length

Telomere PNA kit/FITC (Dako, São Paulo, Brazil) was used following the manufacturer's instructions, including thymocytes from 6-week old mice as reference for normalization. Briefly, samples were prepared by mixing 10^6 mouse thymocytes and 10^6 T_{CM} cells. The mixture was distributed into four tubes. 150 μ l of FITC-labeled peptide nucleic acid (PNA) probe solution was added into two tubes while 150 μ l of unlabeled PNA probe solution was added into the other two. Samples were hybridized in a pre-warmed heating block (TB2 Thermoblock, Biometra, Göttingen, Germany) set at 82 °C, 10 min, and left overnight at room temperature. Samples were washed twice. Between washing steps, samples were heated to 40 °C in a pre-warmed TB2 Thermoblock (Biometra) for 10 min. Samples were resuspended in 250 μ l of DNA staining solution (1X), and stored overnight at 4 °C, away of light. Then, samples were analyzed by flow cytometry in a FACSCanto II (BD Biosciences).

Results

T_{CM} cells from HIV⁺ patients are not more differentiated and are not more senescent

Unsupervised principal component analysis of normalized whole genome expression data segregated samples of each maturation subpopulation, and further separated samples originating from persons with HIV and samples from controls (Fig. 1a). Thus, phenotype-based classification of differentiation subpopulations [7, 8] reliably reflected distinct gene expression programs, as previously reported [40–42], which were altered by HIV infection.

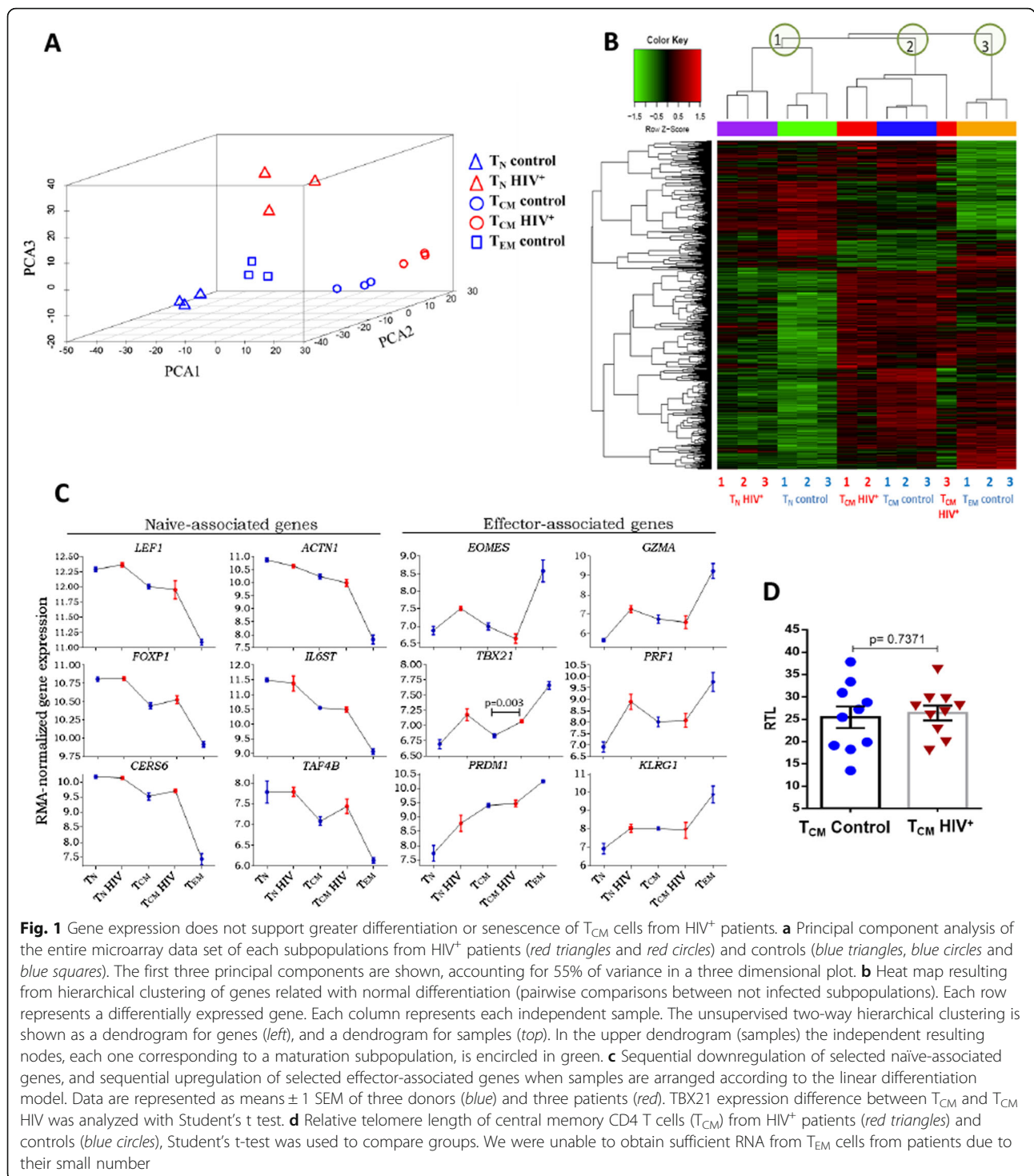
We asked if differential gene expression by patients' and controls' T_{CM} cells reflected greater differentiation of patients' cells (towards effector stages) [23, 24]. Using the criteria defined in methods ($\text{Log}_2\text{FC} \geq |0.5|$ and $\text{Log}(\text{odds}) > 0$) we looked in the whole transcriptome for all differentially expressed genes in the following pair-wise comparisons of CD4 T cell subpopulations from controls: T_{CM} vs. T_N , T_{EM} vs. T_{CM} , and T_{EM} vs. T_N (arrows a, b and c in Fig. 2a). The resulting 1858 differentially expressed genes are subsequently referred to as

differentiation-related genes (corresponding to subpopulations in distinct stages of differentiation). We performed an unsupervised 2-way hierarchical clustering analysis of these 1858 differentiation-related genes (Fig. 1b, and Additional file 3). T_N and T_{CM} cells from patients grouped with their counterparts from controls (Fig. 1b). Samples of a same subpopulation were assigned to a same node (green circles 1, 2, and 3 on Fig. 1b), regardless of their HIV status. The expression of the differentiation-related genes progressively decreased or increased in the order of linear differentiation ($T_N \rightarrow T_{CM} \rightarrow T_{EM}$), agreeing with previous reports [40–43] (Fig. 1c). For instance, *LEF1*, *ACTN1*, *FOXPI*, *IL6ST* and *CERS6* reportedly undergoing down-regulation in naive T cells after antigen recognition and differentiation [44–48], along with *TAF4B*, appeared progressively down regulated when samples were ordered according to the linear model of peripheral differentiation (Fig. 1c, left panel). These changes agree with previous reports [42]. Conversely, differentiation and effector function-associated transcripts, like *EOMES*, *TBX21* (t-bet), *PRDM1* (Blimp-1) [49, 50], *GZMA* and *PRF1* [51, 52], were gradually increased in the same order (Fig. 1c right panel). A same pattern was followed by the expression of *KLRG1*, an indicator of replicative senescence [53, 54] (Fig. 1c). *TBX21* (t-bet) was the only gene with increased expression in T_{CM} cells from patients, compared with controls ($p = 0.003$), which, along with the increased expression of *IL12R α* and *IL18R α* , suggests a Th1-skewed response driven by HIV infection. A Th1-skewed response was also predicted by Ingenuity Canonical Pathway analysis (See Additional file 4). Thus, T_{CM} cells from patients did not seem to be more differentiated than their counterparts from controls, but appeared polarized to Th1 functions.

We then asked if patients' T_{CM} cells had a longer replicative history, which would entail a shortening of telomeres. We did not find any difference in relative telomere length between T_{CM} cells from patients and controls ($p = 0.737$, Fig. 1d), agreeing with *KLRG1* expression [53, 54], and suggesting that they are not in a more senescent state.

T_{CM} gene expression signature in HIV infection

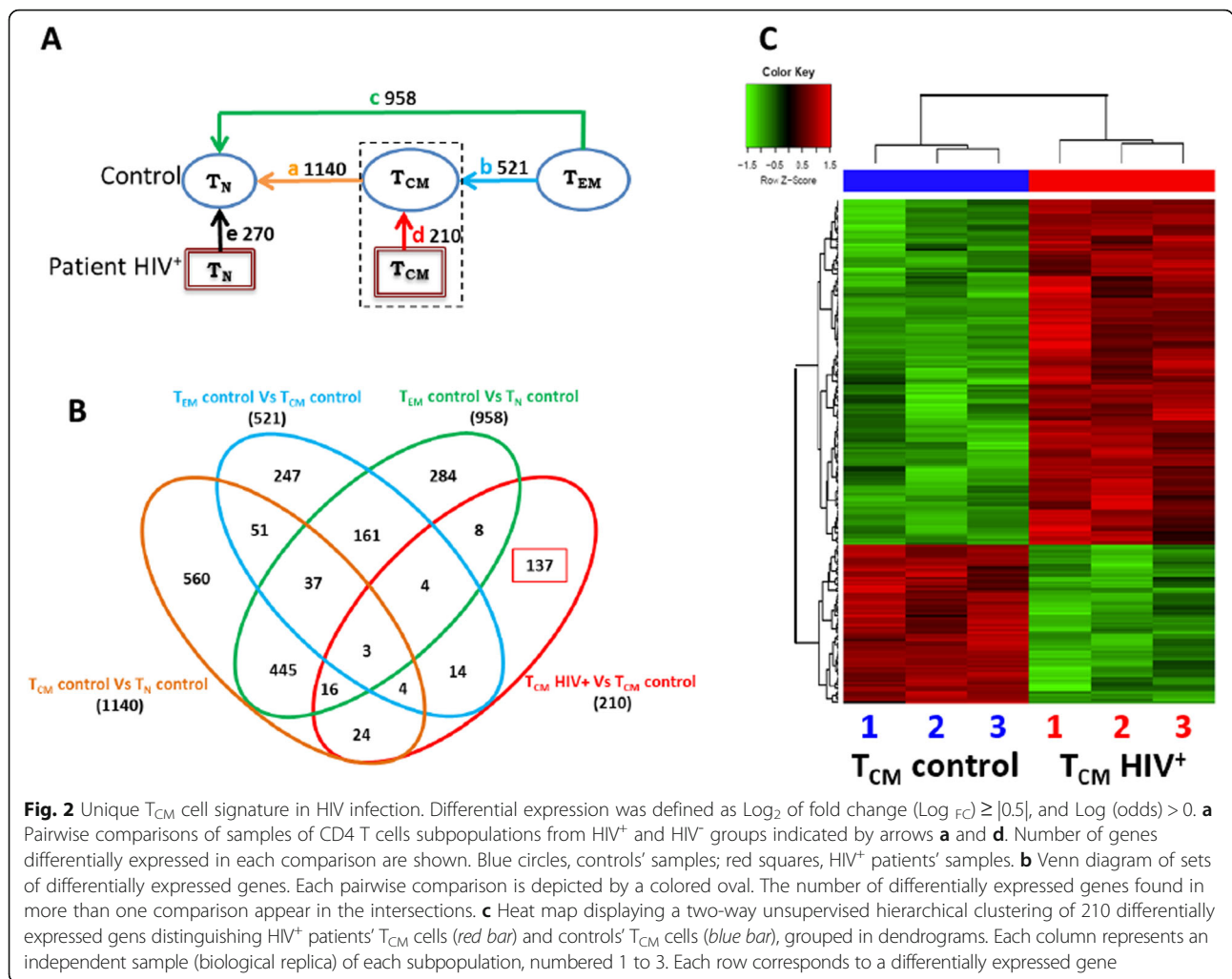
Having ruled out a greater differentiation of patients' T_{CM} cells, we investigated if the gene expression signature of these cells revealed a functional state that could explain loss of homeostatic capacity. Using the criteria defined in methods ($\text{Log}_2\text{FC} \geq |0.5|$ and $\text{Log}(\text{odds}) > 0$), we looked for genes that were differentially expressed by T_{CM} cells from HIV⁺ patient and T_{CM} from controls. We found a total of 210 differentially expressed genes. We refer to this 210-gene list as the gene expression signature of T_{CM} cells in HIV infection (See Fig. 2a



arrow d, b red oval and Additional file 2). This gene expression signature was obtained from the transcriptome independently of the list of 1858 differentiation-related genes. Among these 210 differentially expressed genes, 137 were absent in all other pairwise comparison (Fig. 2a, b). Hierarchical clustering analysis showed clear and consistent differences in the

relative expression of these 210 genes between patients and controls (Fig. 2c). Of note, biological replicates were very homogeneous.

We analyzed the HIV T_{CM} signature with the enrichment analysis tools IPA, GSEA, and DAVID. These different analyses consistently yielded four general functional categories that were modified in T_{CM} cells



from patients: cell cycle, DNA damage and repair, apoptosis, and immune responses (Table 1). Notably, the 137 genes uniquely distinguishing T_{CM} cells from patients and controls (Fig. 2b red oval) sufficed to yield the same four functional categories when analyzed with DAVID and IPA. This suggests that the enriched functions largely depend on the T_{CM} cell signature. GSEA rendered a larger set of altered immune functions, likely because it uses data from the entire microarray, and because it detects more modest changes when the members of a function or pathway show a strong correlation [34] (Table 1). GSEA identified Toll-like receptors (TLR), type I interferons, IL1, and NLRs signaling, plus NF κ B activation, all of them related to an inflammatory milieu. Independently, Ingenuity Upstream Regulator Analysis [35] assigned the greatest z-scores and the most significant *p*-values to the activity of IL-1B, TNF, NF κ B complex, and CCL5, as possible upstream molecules eliciting the expression changes constituting the T_{CM} signature (See Additional file 5, upstream analysis). Cell cycle, DNA damage and repair, and apoptosis (greatly

related functions [55, 56]) appeared consistently in the output of all enrichment analysis tools (Table 1). There were several functional categories closely related with G0/G1/S transition and G2/M checkpoints in the output of GSEA analysis. IPA, which weighs its predictions, displayed increased proliferation and cell survival, decreased apoptosis and decreased cell death. In contrast, IPA's output simultaneously indicated an increase in cytotaxis, movement to interphase, and a decrease in mitosis (Table 1).

We re-analyzed mRNA expression by RT-PCR of 91 genes of the HIV T_{CM} signature that were associated with enriched functions, and *B2M*, *GAPDH*, *POLR2A*, and *TBP* as reference genes. This analysis validated 75 genes (82%) of the signature (See Additional file 6). Five genes failed amplification, and 11 were not differentially expressed when assessed by RT-PCR. The expression of reference genes did not differ between samples (See Additional file 7). An analysis with IPA using only the 75 validated genes yielded the same enriched functions and pathways as microarray data (Fig. 3a, b, c,

Table 1 Enriched categories of functions according to TCM gene expression signature in HIV infection

General category	DAVID		GSEA		IPA	
	EASE < 0.05	Number of genes	FDR < 0.05, $p < 0.001$	$p < 0.01$	Number of genes	Prediction sense
Cell cycle	Cell cycle	15	DNA replication	Proliferation of tumor cell lines	31	Positive
	Cell division	10	Cell cycle	Proliferation of cells	53	Positive
	mitosis	9	Mitotic M/G1	Cytostasis	6	Positive
			G1/S transition	Cytostasis of tumor cell lines	5	Positive
			Cell cycle check points	Interphase of tumor cell lines	11	Positive
			Cyclin E associated event during G1/S transition	Cell survival	28	Positive
			Assembly of pre-replicative complex	Interphase	13	Positive
			G0 and early G1	Mitosis	10	Negative
		G2/M check points				
DNA damage or repair	p53 signaling pathway	5	p53 dependent G1 DNA damage response			
	ATM signal pathway	3				
	Cell cycle checkpoints	5				
Apoptosis	Apoptosis	13		Apoptosis of tumor cell lines	32	Negative
				Cell death of cancer cells	6	Negative
				Apoptosis of cervical cancer cell lines	10	Negative
Immune responses			Toll endogenous pathway	Synthesis of reactive oxygen species	7	Positive
			IL1 signaling			
			IFN-alpha/beta signaling			
			Chemokine receptors bind chemokines			
			NOD like receptors signaling			
			NFKB activation by IKKS complex			
			Myd88 cascade			
			TLR4 signaling			
			IL12 pathway			
			FOXO Pathway			

Enriched categories of functions according to differential expression of 210 genes in T_{CM} cells from HIV⁺ patients and controls. DAVID and IPA tools show in a column the number of genes supporting each prediction. EASE Score is the *P*-Value of a modified Fisher Exact test of the significance of gene enrichment in a gen-set. FDR: False discovery rate. In IPA, the sign indicates if the function would be up-regulated (positive) or down-regulated (negative)

d, e, and Additional file 8). While some genes were related with more than one function, many were related exclusively with one function (Fig. 3f), supporting an unambiguous prediction. Finally, analyzing the T_{CM} cells used for microarray and RT-PCR analyses, we found that surface expression of the CD38 protein was more frequent among T_{CM} cells from patients than among those from controls, consistent with mRNA results (Fig. 3g).

A model of T_{CM} cell death in HIV infection

Since the predictions of increased proliferation and increased cytotostasis were incompatible, and the prediction of reduced apoptosis did not agree with previous evidence [13, 57–60], we took into account that enrichment tools base their predictions on a broad set of previous findings, ranging from very particular to very general ones. Accordingly, we investigated if the predictions were based on more demarcated processes, and if these

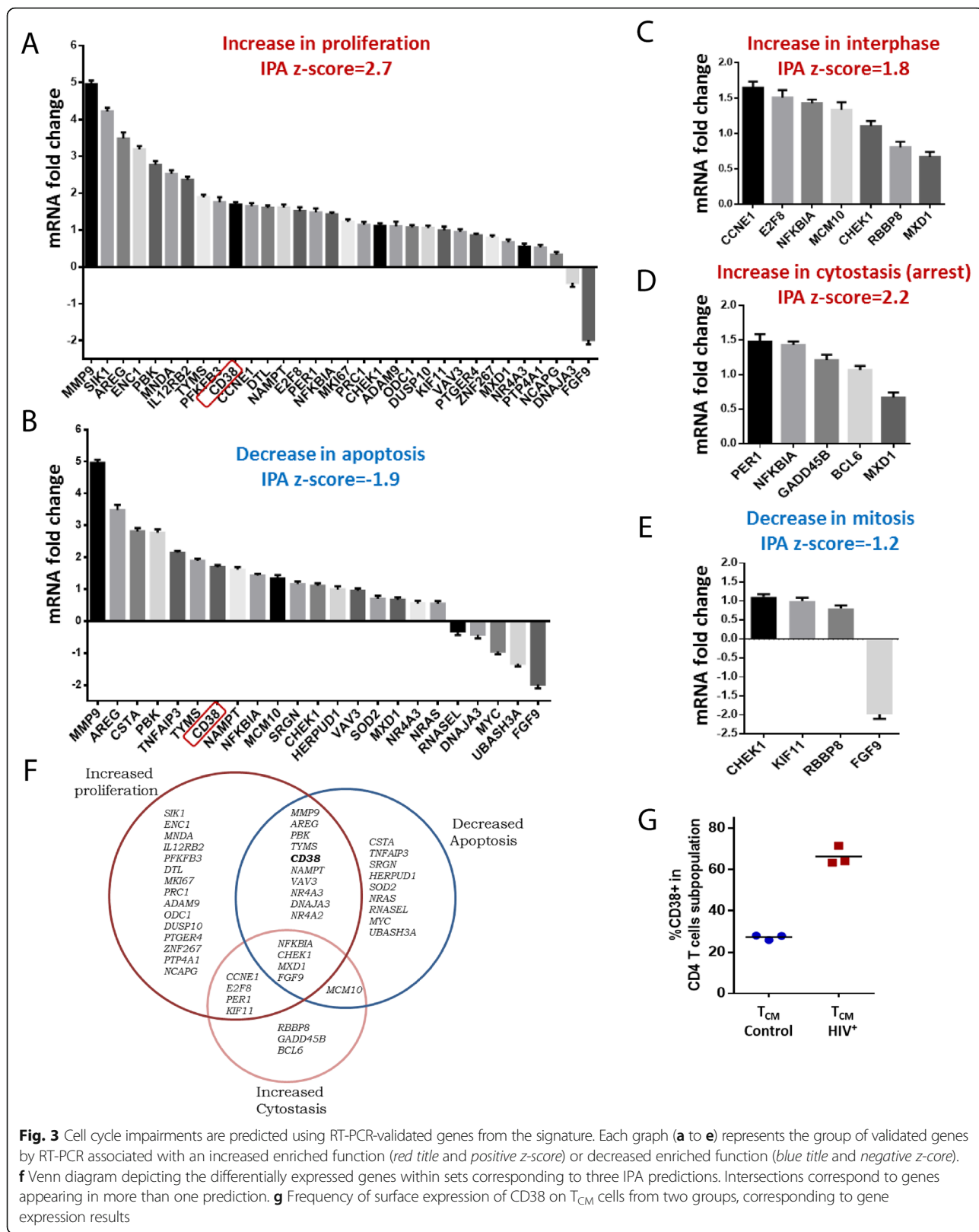


Fig. 3 Cell cycle impairments are predicted using RT-PCR-validated genes from the signature. Each graph (a to e) represents the group of validated genes by RT-PCR associated with an increased enriched function (red title and positive z-score) or decreased enriched function (blue title and negative z-core). f Venn diagram depicting the differentially expressed genes within sets corresponding to three IPA predictions. Intersections correspond to genes appearing in more than one prediction. g Frequency of surface expression of CD38 on T_{CM} cells from two groups, corresponding to gene expression results

processes were compatible. With this purpose, we reviewed the references supporting IPA predictions, allocating the indicated genes to the cell cycle phase that they regulated. We found that genes in all the predictions could be assigned to particular phases in the cell cycle, and implied no conflicts (Fig. 4), with the exception of some proliferation-predicting genes, which did not relate with cell cycle in the supporting evidence.

The HIV T_{CM} signature is compatible with an enhanced progression from G0 to S phase (CCNE1 [61, 62], MKI67 [63, 64], IL12RB2 [65, 66], ADAM9 [67], E2F8 [68], MXD1 [69], MCM10 [70], BCL6 [71–73]), but not with progression to later stages. Simultaneously, the expression patterns of other genes suggest arrest in G2/M (CHK1 [74], GADD45B [75], PER1 [76], NFKBIA [77], RBBP8 [78], KIF11 [79]). For instance, accumulation of *CCNE1* is necessary for G1 → S transition, but its overexpression is associated with chromosome destabilization and DNA damage [61, 62]. In turn, CHK1 expression is required for cycle arrest in G2 following DNA damage [74]. These observations suggest that the cell processes expected from the HIV T_{CM} signature can be integrated within the cell cycle, and they indicate increased cycling up to S phase, followed by arrest in G2/M. Remarkably, since cycle arrest leads to cell death [55, 56], it was unexpected to find that the expression patterns of *CSTA* [80], *RNASEL* [81], *NR4A2* [82] and *NFKBIA* [77] predicted an inhibition of caspase-3 mediated apoptosis (Fig. 4).

Discussion

We identified and validated a gene expression signature of T_{CM} cells in the context of chronic HIV infection that led us to a model of T_{CM} cell death in HIV

infection, also supported by additional observations and previous reports.

It could be argued that a model based on mRNA presence, but not demonstrating the presence of encoded proteins [83], is unfounded. In this regard, recent studies and reassessments found that mRNA changes explained 87 to 92% of corresponding protein changes [84, 85], as found in mouse dendritic cells responding to lipopolysaccharide [86]. Further, 81% of protein levels were explained by mRNA levels using a large scale proteome and mRNA analysis in NIH3T3 cells [87]. Therefore, we consider that we have evidence to propose a model of T_{CM} cell death in HIV infection.

Our interest in intrinsic T_{CM} cell alterations in patients with HIV originated from studies showing their importance in CD4 T cell homeostasis under HIV infection [10, 12, 57, 88–90]. Our previous studies on activated (CD38⁺) T_{CM} cells, particularly those from HIV-infected patients, showed IFN- γ -skewed cytokine responses that were un-connected to CD40L induction, along with a lowered IL-2 production [23, 24]. Given this functionality, T_{CM} cells seemed differentiated towards an effector fate [40, 42, 43, 91, 92]. However, in the present study we found that T_{CM} cells' gene expression profile was incompatible with the T_{EM} maturation category. Additionally, we found no decrease in relative telomere length (RTL) of patients' T_{CM} cells, which is expectable of cells with a longer replicative history [7, 8], such as T_{EM}^- cells. Moreover, *KLRG1* expression, which is proportional to replicative history [53], was similar in T_{CM} cells from patients and controls, but greatly increased in more differentiated T_{EM} cells. These findings support that HIV infection was not associated with an

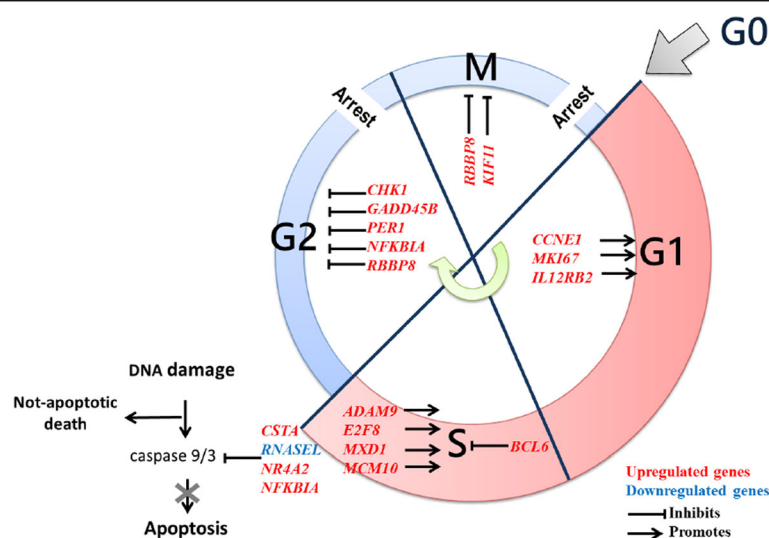


Fig. 4 Allocation of HIV-related T_{CM} signature genes in the cell cycle phases they regulate. These genes suggest a promoted progress from G0 to S, followed by arrest in G2/M cell cycle phases, and decreased apoptosis

enhanced T_{CM} cell differentiation. Nevertheless, T_{CM} patients' cells showed an increased expression of the Th1-associated transcription factor T-bet [49, 93], suggesting that our previous findings were attributable to Th1 polarization rather than differentiation.

The homogeneity and consistency of the T_{CM} signature in HIV infection (Fig. 2c) contrasts with the great differences between patients' viral loads (23883, 81834 and 107732 HIV RNA copies/mL-blood). This may seem more important considering that even transient changes in viral load can greatly influence gene expression in total CD4 T cells [94]. However, patients' CD4 T cell counts, the strongest predictor of subsequent disease progression [95] are close (439, 473 and 491 CD4 T cells/mm³ blood, respectively), and lie above the threshold for the occurrence of most opportunistic infections (200 cells/mm³ blood [95]). This could suggest that the T_{CM} gene expression signature is not dependent of the magnitude of viral replication during the chronic phase of infection, but it could rather be related with irreversible events from the initial phase of infection and/or with the magnitude of circulating CD4 T cell loss in the chronic phase.

A thorough pathway enrichment analysis of the HIV T_{CM} signature suggested enhanced cell cycle entry and proliferation. Under closer inspection, however, we observed that proliferation-predicting genes corresponded to functions upstream of S phase. Conversely, this analysis also predicted cell cycle arrest due to functions occurring in G2 or M. If cell cycle promotion and arrest occur in a same T_{CM} cell, cycling would not imply cell division [58], since G2/M arrest would lead to death [96]. Additionally, overexpression of DNA damage and repair-related genes by patients' T_{CM} cells are consistent with a failed division after S phase.

Our model could integrate partial observations from previous studies on cell cycle in HIV infection, providing a wider view of the fate of T_{CM} cells. In a previous study, CD4 T cells from patients with HIV that were *ex vivo* in S phase (mostly T_{CM}) would die after *in vitro* stimulation more frequently than CD8 T cells [58]. However, patients' cells were not compared with CD4 T cells from HIV⁻ controls. Contrastingly, our comparison with cells from controls, and our characterization of CD4 T cell subpopulations, suggested that cycle-related death was due to HIV infection, and involved predominantly T_{CM} cells.

Another group reported arrest in G1 based on the accumulation of cycling cells in G1 among total circulating CD4 T cells [97]. However, since T_{CM} cells comprise only about 25% of circulating CD4 T cells [42], they were possibly not well represented in that study. Nevertheless, an increased proportion of Ki67⁺ cells in the G1 phase provided evidence that CD4 T cells more frequently

entered cell cycle in HIV infection, as previously demonstrated [98, 99]. Since dead cells are readily removed from blood [100], it is possible that the reported *ex vivo* increase of CD4 T cells in G1 was the result of rapid removal from blood of cells that died in a further phase. Our findings were consistent with a promoted entry into cell cycle (Fig. 4), and notably, they suggested that arrest occurred in the later phases G2 and/or M.

Our results could imply that incorporation of nucleotide analogues by T_{CM} cells from patients with HIV could reflect entrance to a fatal cycle, rather than proliferation [101, 102]. Evidence of division and viability will be required to dismiss this possibility. In our model, T_{CM} cell turnover reflects to some extent, death, and not actual proliferation. Accordingly, we found no difference in telomere length between T_{CM} cells from controls and patients.

An analogous implication pertains to apoptosis. Previous studies have reported increased apoptosis in total [58, 103, 104] and in T_{CM} [58, 105] CD4 T cells from patients with HIV, which is an explanation of CD4 T cell loss in chronic infection [106]. These and other studies [13, 57–60] inferred apoptosis by demonstrating Annexin V binding to viable cells; however, it has been demonstrated that Annexin V binding can be increased in other cell death pathways [107–110]. In this regard, we found that HIV infection altered the expression of a considerable number of genes that indicated that apoptosis would not be favored. A possible explanation of this discordance with previous studies could be that different cell death pathways may coexist with caspase 3-mediated T_{CM} cell death in HIV infection, as suggested by other studies [107, 111]. Also, T_{CM} subpopulation is heterogeneous [10, 112], and cells under apoptosis might not be reflected in microarray data. Therefore, we propose that an additional programmed cell death pathway may be involved in T_{CM} cell death after cell cycle arrest. A likely pathway is pyroptosis, an inflammatory programmed cell death pathway driven by pro-inflammatory signals, such as bacterial lipopolysaccharide and IL-1 β [113]. This pathway has been suggested by previous reports [111, 114], and agrees with the presence in blood of triggers of pyroptosis as bacterial lipopolysaccharide (LPS) [115] and IL-1 β [116] in HIV infection. Additionally, increased concentrations of IL-18, a cytokine liberated during pyroptosis, has been found in the blood of patients with HIV [117].

Conclusions

In summary, we propose a model of CD4 T_{CM} cell death in chronic HIV infection based on a gene expression signature unique to this subpopulation. According to it,

CD4 T_{CM} cell loss in HIV infection may be driven in vivo by increased cell cycle entry followed by G2/M arrest, possibly leading to a non-apoptotic cell death, arguably pyroptosis. Further experimental work is required to validate the processes involved in this model.

Additional files

Additional file 1: CD4 T cell subpopulations were separated with at least 90% purity. Dot plots showing the sequential gating strategy used to analyze the frequency of CD4 T cell subpopulations. (PDF 173 kb)

Additional file 2: CD4 T_{CM} cell signature in HIV infection. Table that lists the genes that were differentially expressed by T_{CM} cells from patients with HIV, constituting the HIV T_{CM} signature. (XLS 56 kb)

Additional file 3: RMA-normalized gene expression of differentiation-related genes. Table that lists differentiation-related genes and their normalized expression values in each CD4 T cell subpopulation sample. (XLS 631 kb)

Additional file 4: Th1 polarization pathway enriched in the T_{CM} from HIV infection. Diagram displaying Th1 polarization pathway enriched in the T_{CM} cell signature in HIV infection. (PDF 366 kb)

Additional file 5: Upstream analysis of gene expression signature in T_{CM} from HIV infection. Diagram displaying the upstream analysis of molecules related with gene expression signature in T_{CM} from HIV infection. (PDF 807 kb)

Additional file 6: RT-PCR validation of T_{CM} cell signature in HIV infection. Table that lists the results of RT-PCR validation of 91 genes of T_{CM} cell signature in HIV infection. (XLS 40 kb)

Additional file 7: Expression of four reference genes used in validation by RT-PCR. Figure that shows the expression of four reference genes used in validation by RT-PCR. (PDF 130 kb)

Additional file 8: Ingenuity functional prediction analysis of the signature of T_{CM} cells in HIV infection. Tables that show the five functions reported by ingenuity functional prediction analysis (IPA) of RT-PCR validated genes of the T_{CM} cell signature in HIV infection. (PDF 166 kb)

Abbreviations

cdNA: Complementary DNA; DAVID: Data Base for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery; DNA: Deoxyribonucleic acid; FC: Fold change; FDR: False discovery rate; GSEA: Gen Set Enrichment Analysis; HIV: Human Immunodeficiency Virus; IFN: Interferon; IL: Interleukin; IPA: Ingenuity Pathway Analysis; LPS: Lipopolysaccharide; mRNA: Messenger Ribonucleic Acid; NLRs: NOD - like receptors; PBMCs: Peripheral blood mononuclear cells; PCA: Principal component analysis; PCR: Polymerase chain reaction; PNA: Peptide nucleic acid; RANTES: Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted. Also CCR5; RMA: Robust Multiarray Average Method; RNA: Ribonucleic acid; RT-PCR: Real time polymerase chain reaction; SIV: Simian immunodeficiency virus; T_{CM}: Central memory CD4 T cells; TCR: T cell receptor; T_{EM}: Effector memory CD4 T cells; TLR: Toll - like receptor; T_N: Naive CD4 T cells; TNF: Tumor necrosis factor

Acknowledgments

Gustavo Olvera-García is a doctoral student at Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowship number 220275 from CONACYT, Mexico. We gratefully thank Audelia Alanís-Vega from INCMNSZ for availability of samples. This work was financed by CONACYT, Mexico, grant CB-2010-153527.

Funding

This work was financed by CONACYT, Mexico grant CB-2010-153527. CONACYT did not intervene in design of the study, sample collection, experimentation, analysis, and interpretation of data, nor in the writing of the manuscript.

Availability of data and materials

The data sets supporting the conclusions of this article are deposited in Gene Expression Omnibus (GEO), series record GSE73968 at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE73968>

Authors' contributions

GO-G, Conception and design, experimental work, data collection, analysis and interpretation, manuscript writing. TA-GT, Experimental work, data collection, analysis and interpretation. FG-J, Experimental work, data collection, analysis and interpretation. IL-R, Bioinformatics analysis of raw microarray data and bioinformatics guidance, critical review of the article, manuscript writing. CR-E, Bioinformatics analysis of raw microarray data and bioinformatics guidance, critical review of the article. LO, Conception and design, critical review of the article. IA-D, Conception and design, critical review of the article. JAV-P, guidance in PCR by high-throughput gene expression, critical review of the article. JZ, Conception and design, critical review of the article. SP-P, Conception and design, patient recruitment, critical review of the article. EE, Conception and design, data analysis and interpretation, manuscript writing. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Consent for publication

No personal data from participants are displayed in this work.

Ethics approval and consent to participate

This study was approved by the ethics review boards of Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas (B29-11) and Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (1403). All patients signed written informed consent according with the Helsinki Protocol.

Author details

¹Department of Research in Immunology, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, Calzada de Tlalpan 4502, Mexico City, Mexico. ²Computational Genomics Department, Instituto Nacional de Medicina Genómica, Periferico Sur 4809, Mexico City, Mexico. ³Laboratory of Immunogenomics and Metabolic Diseases, Instituto Nacional de Medicina Genómica, Periferico Sur 4809, Mexico City, Mexico. ⁴Department of Virology, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, Calzada de Tlalpan 4502, Mexico City, Mexico. ⁵Infectious Immunopathogenesis Laboratory, Department of Infectious Diseases, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Avenida Vasco de Quiroga 15, Mexico City, Mexico.

Received: 11 June 2016 Accepted: 17 November 2016

Published online: 22 November 2016

References

- Lu X, Li Z, Li Q, Jiao Y, Ji Y, Zhang H, et al. Preferential loss of gut-homing α4β7 CD4(+) T cells and their circulating functional subsets in acute HIV-1 infection. *Cell Mol Immunol.* 2015;13:776-84.
- Lim SG, Condez A, Lee CA, Johnson MA, Elia C, Poulter LW. Loss of mucosal CD4 lymphocytes is an early feature of HIV infection. *Clin Exp Immunol.* 1993;92:448-54.
- Guadalupe M, Reay E, Sankaran S, Prindiville T, Flamm J, McNeil A, et al. Severe CD4+ T-cell depletion in gut lymphoid tissue during primary human immunodeficiency virus type 1 infection and substantial delay in restoration following highly active antiretroviral therapy. *J Virol.* 2003;77:11708-17.
- 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;200:749-59.
- Picker LJ, Hagen SI, Lum R, Reed-Inderbitzin EF, Daly LM, Sylwester AW, et al. Insufficient production and tissue delivery of CD4+ memory T cells in rapidly progressive simian immunodeficiency virus infection. *J Exp Med.* 2004;200:1299-314.
- 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;204:2171-85.
- Mahnke YD, Brodie TM, Sallusto F, Roederer M, Lugli E. The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets. *Eur J Immunol.* 2013;43:2797-809.

8. Appay V, van Lier RAW, Sallusto F, Roederer M. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol.* 2008;73:975–83.
9. Okoye AA, Rohankhedkar M, Abana C, Pattenn A, Reyes M, Pexton C, et al. Naive T cells are dispensable for memory CD4+ T cell homeostasis in progressive simian immunodeficiency virus infection. *J Exp Med.* 2012;209:641–51.
10. Rivino L, Messi M, Jarrossay D, Lanzavecchia A, Sallusto F, Geginat J. Chemokine receptor expression identifies Pre-T helper (Th)1, Pre-Th2, and nonpolarized cells among human CD4+ central memory T cells. *J Exp Med.* 2004;200:725–35.
11. Wang A, Chandran S, Shah SA, Chiu Y, Paria BC, Aghamolla T, et al. The stoichiometric production of IL-2 and IFN- γ mRNA defines memory T cells that can self-renew after adoptive transfer in humans. *Sci Transl Med.* 2012;4:149ra120.
12. Bai F, Tincati C, Merlini E, Pacioni C, Sinigaglia E, Carpani G, et al. Reduced central memory CD4+ T cells and increased T-cell activation characterise treatment-naïve patients newly diagnosed at late stage of HIV infection. *AIDS Res Treat.* 2012;2012:314849.
13. Kovacs JA, Lempicki RA, Sidorov IA, Adelsberger JW, Herpin B, Metcalf JA, et al. Identification of dynamically distinct subpopulations of T lymphocytes that are differentially affected by HIV. *J Exp Med.* 2001;194:1731–41.
14. Feinberg MB, McCune JM, Miedema F, Moore JP, Schuitemaker H. HIV tropism and CD4+ T-cell depletion. *Nat Med.* 2002;8:537.
15. 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;12:289–95.
16. Alimonti JB, Ball TB, Fowke KR. Mechanisms of CD4+ T lymphocyte cell death in human immunodeficiency virus infection and AIDS. *J Gen Virol.* 2003;84:1649–61.
17. Anderson RW, Ascher MS, Sheppard HW. Direct HIV cytopathicity cannot account for CD4 decline in AIDS in the presence of homeostasis: a worst-case dynamic analysis. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol Off Publ Int Retrovirol Assoc.* 1998;17:245–52.
18. Rodríguez B, Sethi AK, Cheruvu VK, Mackay W, Bosch RJ, Kitahata M, et al. Predictive value of plasma HIV RNA level on rate of CD4 T-cell decline in untreated HIV infection. *JAMA J Am Med Assoc.* 2006;296:1498–506.
19. Funk GA, Oxenius A, Fischer M, Opravil M, Joos B, Flepp M, et al. HIV replication elicits little cytopathic effects in vivo: analysis of surrogate markers for virus production, cytotoxic T cell response and infected cell death. *J Med Virol.* 2006;78:1141–6.
20. Taddeo B, Nickoloff BJ, Foreman KE. Caspase inhibitor blocks human immunodeficiency virus 1-induced T-cell death without enhancement of HIV-1 replication and dimethyl sulfoxide increases HIV-1 replication without influencing T-cell survival. *Arch Pathol Lab Med.* 2000;124:240–5.
21. Douek D. HIV disease progression: immune activation, microbes, and a leaky gut. *Top HIV Med Publ Int AIDS Soc USA.* 2007;15:114–7.
22. Hua W, Jiao Y, Zhang H, Zhang T, Chen D, Zhang Y, et al. Central memory CD4 cells are an early indicator of immune reconstitution in HIV/AIDS patients with anti-retroviral treatment. *Immunol Invest.* 2012;41:1–14.
23. Espinosa E, Ormsby CE, Reyes-Terán G, Asaad R, Sieg SF, Lederman MM. Dissociation of CD154 and cytokine expression patterns in CD38+ CD4+ memory T cells in chronic HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2010;55:439–45.
24. Olvera-García G, Espinosa E, Sieg SF, Lederman MM. Cytomegalovirus-specific responses of CD38+ memory T cells are skewed towards IFN- γ and dissociated from CD154 in HIV-1 infection. *AIDS Lond Engl.* 2014;28:311–6.
25. Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, et al. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Bioinform Oxf Engl.* 2003;4:249–64.
26. Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, et al. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.* 2004;5:R80.
27. R Core Team, R: A Language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2013 [Internet]. Available from: <https://www.r-project.org/>.
28. Smyth GK. *limma: Linear Models for Microarray Data*. In: Gentleman R, Carey VJ, Huber W, Irizarry RA, Dudoit S, editors. *Bioinforma. Comput. Biol. Solut. Using R Bioconductor* [Internet]. Springer New York; 2005 [cited 2014 Jul 1]. p. 397–420. Available from: http://link.springer.com/chapter/10.1007/0-387-29362-0_23.
29. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Ser B Methodol.* 1995;57:289–300.
30. Warnes GR, Bolker B, Bonebakke L, Gentleman R. *gplots: Various R Programming Tools for Plotting Data* [Internet]. 2015. Available from: <http://cran.r-project.org/web/packages/gplots/index.html>.
31. Oliveros, J.C. *Venny*. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams. [Internet]. Venny 202. 2007. Available from: <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>.
32. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc.* 2009;4:44–57.
33. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res.* 2009;37:1–13.
34. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:15545–50.
35. Krämer A, Green J, Pollard J, Tugendreich S. Causal analysis approaches in Ingenuity Pathway Analysis. *Bioinforma Oxf Engl.* 2014;30:523–30.
36. Vega-Sanchez R, Arenas-Hernandez M, Vazquez-Perez JA, Moreno-Valencia Y, Gomez-Lopez N. Evaluation of reference genes for expression studies in leukocytes from term human pregnancy. *Placenta.* 2015;36:240–5.
37. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002;3:RESEARCH0034.
38. Hadley Wickham. *Reshaping Data with the reshape Package* - paper. *J Stat Softw.* [Internet]. 2007;21. Available from: <http://www.jstatsoft.org/v21/i12/paper>.
39. Team RC, Wuertz D, Setz T, Chalabi Y. *fBasics: Rmetrics - Markets and Basic Statistics* [Internet]. 2014 [cited 2015 Jul 31]. Available from: <https://cran.r-project.org/web/packages/fBasics/index.html>.
40. Willinger T, Freeman T, Hasegawa H, McMichael AJ, Callan MFC. Molecular signatures distinguish human central memory from effector memory CD8 T cell subsets. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2005;175:5895–903.
41. Riou C, Yassine-Diab B, Van Grevenynghe J, Somogyi R, Greller LD, Gagnon D, et al. Convergence of TCR and cytokine signaling leads to FOXO3a phosphorylation and drives the survival of CD4+ central memory T cells. *J Exp Med.* 2007;204:79–91.
42. Gattinoni L, Lugli E, Ji Y, Pos Z, Paulos CM, Quigley MF, et al. A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nat Med.* 2011;17:1290–7.
43. Schwendemann J, Choi C, Schirrmacher V, Beckhove P. Dynamic differentiation of activated human peripheral blood CD8+ and CD4+ effector memory T cells. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2005;175:1433–9.
44. Willinger T, Freeman T, Herbert M, Hasegawa H, McMichael AJ, Callan MFC. Human naive CD8 T cells down-regulate expression of the WNT pathway transcription factors lymphoid enhancer binding factor 1 and transcription factor 7 (T cell factor-1) following antigen encounter in vitro and in vivo. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2006;176:1439–46.
45. Babich A, Burkhardt JK. Coordinate control of cytoskeletal remodeling and calcium mobilization during T-cell activation. *Immunol Rev.* 2013;256:80–94.
46. Feng X, Wang H, Takata H, Day TJ, Willen J, Hu H. Transcription factor Foxp1 exerts essential cell-intrinsic regulation of the quiescence of naive T cells. *Nat Immunol.* 2011;12:544–50.
47. Nagashima H, Okuyama Y, Asao A, Kawabe T, Yamaki S, Nakano H, et al. The adaptor TRAF5 limits the differentiation of inflammatory CD4+ T cells by antagonizing signaling via the receptor for IL-6. *Nat Immunol.* 2014;15:449–56.
48. Ogretmen B, Hannun YA. Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. *Nat Rev Cancer.* 2004;4:604–16.
49. Knox JJ, Cosma GL, Betts MR, McLane LM. Characterization of T-bet and eomes in peripheral human immune cells. *Front Immunol.* 2014;5:217.
50. Crotty S, Johnston RJ, Schoenberger SP. Effectors and memories: Bcl-6 and Blimp-1 in T and B lymphocyte differentiation. *Nat Immunol.* 2010;11:114–20.
51. Haabeth OAW, Tveita AA, Fauskanger M, Schjesvold F, Lovrik KB, Hofgaard PO, et al. How do CD4(+) T cells detect and eliminate tumor cells that either lack or express MHC Class II molecules? *Front Immunol.* 2014;5:174.
52. Marshall NB, Swain SL. Cytotoxic CD4 T Cells in antiviral immunity. *BioMed Res Int.* 2011;2011:e954602.
53. Marcolino I, Przybylski GK, Koschella M, Schmidt CA, Voehringer D, Schlesier M, et al. Frequent expression of the natural killer cell receptor KLRG1 in

- human cord blood T cells: correlation with replicative history. *Eur J Immunol.* 2004;34:2672–80.
54. Henson SM, Akbar AN. KLRG1—more than a marker for T cell senescence. *AGE.* 2009;31:285–91.
 55. Heijink AM, Krajewska M, van Vugt MATM. The DNA damage response during mitosis. *Mutat Res.* 2013;750:45–55.
 56. Topham CH, Taylor SS. Mitosis and apoptosis: how is the balance set? *Curr Opin Cell Biol.* 2013;25:780–5.
 57. van Grevenynghe J, Procopio FA, He Z, Chomont N, Riou C, Zhang Y, et al. Transcription factor FOXO3a controls the persistence of memory CD4(+) T cells during HIV infection. *Nat Med.* 2008;14:266–74.
 58. Sieg SF, Bazdar DA, Lederman MM. S-phase entry leads to cell death in circulating T cells from HIV-infected persons. *J Leukoc Biol.* 2008;83:1382–7.
 59. Derks RA, Beaman KD. Regeneration and tolerance factor prevents bystander T-cell death associated with human immunodeficiency virus infection. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2004;11:835–40.
 60. Shmagel KV, Saidakova EV, Korolevskaya LB, Shmagel NG, Chereshev VA, Anthony DD, et al. Influence of hepatitis C virus coinfection on CD4⁺ T cells of HIV-infected patients receiving HAART. *AIDS Lond Engl.* 2014;28:2381–8.
 61. Honda R, Lowe ED, Dubinina E, Skamnaki V, Cook A, Brown NR, et al. The structure of cyclin E1/CDK2: implications for CDK2 activation and CDK2-independent roles. *EMBO J.* 2005;24:452–63.
 62. Lu X, Liu J, Legerski RJ. Cyclin E is stabilized in response to replication fork barriers leading to prolonged S phase arrest. *J Biol Chem.* 2009;284:35325–37.
 63. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1984;133:1710–5.
 64. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000;182:311–22.
 65. Presky DH, Yang H, Minetti LJ, Chua AO, Nabavi N, Wu CY, et al. A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two beta-type cytokine receptor subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:14002–7.
 66. Jones ML, Young JM, Huang QR, Puls RL, Webber CA, Benson EM. Interleukin 12-augmented T cell proliferation of peripheral blood mononuclear cells from HIV-seropositive individuals is associated with interleukin 12 receptor beta 2 upregulation. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2003;19:283–92.
 67. Liu C-M, Hsieh C-L, He Y-C, Lo S-J, Liang J-A, Hsieh T-F, et al. In vivo targeting of ADAM9 gene expression using lentivirus-delivered shRNA suppresses prostate cancer growth by regulating REG4 dependent cell cycle progression. *PLoS One.* 2013;8:e53795.
 68. Deng Q, Wang Q, Zong W-Y, Zheng D-L, Wen Y-X, Wang K-S, et al. E2F8 contributes to human hepatocellular carcinoma via regulating cell proliferation. *Cancer Res.* 2010;70:782–91.
 69. Delpuech O, Griffiths B, East P, Essafi A, Lam EW-F, Burgering B, et al. Induction of Mxi1-SR alpha by FOXO3a contributes to repression of Myc-dependent gene expression. *Mol Cell Biol.* 2007;27:4917–30.
 70. Chattopadhyay S, Bielinsky A-K. Human Mcm10 regulates the catalytic subunit of DNA polymerase-alpha and prevents DNA damage during replication. *Mol Biol Cell.* 2007;18:4085–95.
 71. Albagli O, Lantoin D, Quief S, Quignon F, Englert C, Kerckaert JP, et al. Overexpressed BCL6 (LAZ3) oncoprotein triggers apoptosis, delays S phase progression and associates with replication foci. *Oncogene.* 1999;18:5063–75.
 72. Ichii H, Sakamoto A, Arima M, Hatano M, Kuroda Y, Tokuhsa T. Bcl6 is essential for the generation of long-term memory CD4+ T cells. *Int Immunol.* 2007;19:427–33.
 73. Basso K, Dalla-Favera R. BCL6: master regulator of the germinal center reaction and key oncogene in B cell lymphomagenesis. *Adv Immunol.* 2010;105:193–210.
 74. 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;154:913–24.
 75. Maaser K, Borlak J. A genome-wide expression analysis identifies a network of EpCAM-induced cell cycle regulators. *Br J Cancer.* 2008;99:1635–43.
 76. 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;22:375–82.
 77. 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;19:4159–69.
 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;197:869–76.
 79. Mountain V, Simerly C, Howard L, Ando A, Schatten G, Compton DA. The kinesin-related protein, HSET, opposes the activity of Eg5 and cross-links microtubules in the mammalian mitotic spindle. *J Cell Biol.* 1999;147:351–66.
 80. Takahashi H, Komatsu N, Ibe M, Ishida-Yamamoto A, Hashimoto Y, Iizuka H. Cystatin A suppresses ultraviolet B-induced apoptosis of keratinocytes. *J Dermatol Sci.* 2007;46:179–87.
 81. Malathi K, Paranjape JM, Ganapathi R, Silverman RH. HPC1/RNASEL mediates apoptosis of prostate cancer cells treated with 2',5'-oligoadenylates, topoisomerase I inhibitors, and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Cancer Res.* 2004;64:9144–51.
 82. Ke N, Claassen G, Yu D-H, Albers A, Fan W, Tan P, et al. Nuclear hormone receptor NR4A2 is involved in cell transformation and apoptosis. *Cancer Res.* 2004;64:8208–12.
 83. Ghazalpour A, Bennett B, Petyuk VA, Orozco L, Hagopian R, Mungrue IN, et al. Comparative analysis of proteome and transcriptome variation in mouse. *PLoS Genet.* 2011;7:e1001393.
 84. Li JJ, Biggin MD. Gene expression. Statistics requantitates the central dogma. *Science.* 2015;347:1066–7.
 85. Battle A, Khan Z, Wang SH, Mitrano A, Ford MJ, Pritchard JK, et al. Genomic variation. Impact of regulatory variation from RNA to protein. *Science.* 2015;347:664–7.
 86. Jovanovic M, Rooney MS, Mertins P, Przybylski D, Chevrier N, Satija R, et al. Immunogenetics. Dynamic profiling of the protein life cycle in response to pathogens. *Science.* 2015;347:1259038.
 87. Li JJ, Bickel PJ, Biggin MD. System wide analyses have underestimated protein abundances and the importance of transcription in mammals. *Peer J [Internet].* 2014 [cited 2015 Mar 9];2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3940484/>.
 88. Zhang X, Chang Li X, Xiao X, Sun R, Tian Z, Wei H. CD4(+)CD62L(+) central memory T cells can be converted to Foxp3(+) T cells. *PLoS One.* 2013;8:e77322.
 89. Okoye AA, Picker LJ. CD4(+) T-cell depletion in HIV infection: mechanisms of immunological failure. *Immunol Rev.* 2013;254:54–64.
 90. Potter SJ, Lacabaratz C, Lambotte O, Perez-Patrigeon S, Vingert B, Sinet M, et al. Preserved central memory and activated effector memory CD4+ T-cell subsets in human immunodeficiency virus controllers: an ANRS EP36 study. *J Virol.* 2007;81:13904–15.
 91. 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;401:708–12.
 92. Graef P, Buchholz VR, Stemberger C, Flossdorf M, Henkel L, Schiemann M, et al. Serial transfer of single-cell-derived immunocompetence reveals stemness of CD8(+) central memory T cells. *Immunity.* 2014;41:116–26.
 93. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell.* 2000;100:655–69.
 94. Wu JQ, Wang B, Saksena NK. Transitory viremic surges in a human immunodeficiency virus-positive elite controller can shift the cellular transcriptome profile: a word of caution for microarray studies. *J Virol.* 2008;82:10326–7.
 95. Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. Department of Health and Human Services. Available at <http://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/lvguidelines/AdultandAdolescentGL.pdf>. Section Accessed 18 Nov 2016.
 96. Clarke PR, Allan LA. Cell-cycle control in the face of damage—a matter of life or death. *Trends Cell Biol.* 2009;19:89–98.
 97. Combadère B, Blanc C, Li T, Carcelain G, Delaugerre C, Calvez V, et al. CD4 + Ki67+ lymphocytes in HIV-infected patients are effector T cells accumulated in the G1 phase of the cell cycle. *Eur J Immunol.* 2000;30:3598–603.
 98. Sousa AE, Carneiro J, Meier-Schellersheim M, Grossman Z, Victorino RM. CD4 T cell depletion is linked directly to immune activation in the pathogenesis of HIV-1 and HIV-2 but only indirectly to the viral load. *J Immunol.* 2002;169:3400–6.
 99. Gordon SN, Cervasi B, Odorizzi P, Silverman R, Abera F, Ginsberg G, et al. Disruption of intestinal CD4+ T cell homeostasis is a key marker of systemic CD4 + T cell activation in HIV-infected individuals. *J Immunol.* 2010;185:5169–79.
 100. Wickman G, Julian L, Olson MF. How apoptotic cells aid in the removal of their own cold dead bodies. *Cell Death Differ.* 2012;19:735–42.

101. Koning FA, Otto SA, Hazenberg MD, Dekker L, Prins M, Miedema F, et al. Low-level CD4+ T cell activation is associated with low susceptibility to HIV-1 infection. *J Immunol.* 2005;175:6117–22.
102. Srinivasula S, Lempicki RA, Adelsberger JW, Huang C-Y, Roark J, Lee PI, et al. Differential effects of HIV viral load and CD4 count on proliferation of naive and memory CD4 and CD8 T lymphocytes. *Blood.* 2011;118:262–70.
103. Herbeuval J-P, Hardy AW, Boasso A, Anderson SA, Dolan MJ, Dy M, et al. Regulation of TNF-related apoptosis-inducing ligand on primary CD4+ T cells by HIV-1: role of type I IFN-producing plasmacytoid dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:13974–9.
104. Bousheri S, Burke C, Ssewanyana I, Harrigan R, Martin J, Hunt P, et al. Infection with different hiv subtypes is associated with CD4 activation-associated dysfunction and apoptosis. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2009;52:548–52.
105. Sieg SF, Rodriguez B, Asaad R, Jiang W, Bazdar DA, Lederman MM. Peripheral S-phase T cells in HIV disease have a central memory phenotype and rarely have evidence of recent T cell receptor engagement. *J Infect Dis.* 2005;192:62–70.
106. Pitrak DL, Novak RM, Estes R, Tschampa J, Abaya CD, Martinson J, et al. Short communication: apoptosis pathways in HIV-1-infected patients before and after highly active antiretroviral therapy: relevance to immune recovery. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2015;31:208–16.
107. Miao EA, Rajan JV, Aderem A. Caspase-1-induced pyroptotic cell death. *Immunol Rev.* 2011;243:206–14.
108. Elliott JI, Surprenant A, Marelli-Berg FM, Cooper JC, Cassady-Cain RL, Wooding C, et al. Membrane phosphatidylserine distribution as a non-apoptotic signalling mechanism in lymphocytes. *Nat Cell Biol.* 2005;7:808–16.
109. Segawa K, Suzuki J, Nagata S. Constitutive exposure of phosphatidylserine on viable cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108:19246–51.
110. Fuchs Y, Steller H. Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015;16:329–44.
111. Song J, Jiao Y, Zhang T, Zhang Y, Huang X, Li H, et al. Longitudinal changes in plasma Caspase-1 and Caspase-3 during the first 2 years of HIV-1 infection in CD4Low and CD4High patient groups. *PLoS One.* 2015;10: e0121011.
112. Lozza L, Rivino L, Guarda G, Jarrossay D, Rinaldi A, Bertoni F, et al. The strength of T cell stimulation determines IL-7 responsiveness, secondary expansion, and lineage commitment of primed human CD4 + IL-7Rhi T cells. *Eur J Immunol.* 2008;38:30–9.
113. Croker BA, O'Donnell JA, Gerlic M. Pyroptotic death storms and cytopenia. *Curr Opin Immunol.* 2014;26:128–37.
114. Doitsh G, Galloway NLK, Geng X, Yang Z, Monroe KM, Zepeda O, et al. Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. *Nature.* 2014;505:509–14.
115. Brechley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med.* 2006;12:1365–71.
116. Shive CL, Mudd JC, Funderburg NT, Sieg SF, Kyi B, Bazdar DA, et al. Inflammatory cytokines drive CD4+ T-cell cycling and impaired responsiveness to interleukin 7: implications for immune failure in HIV disease. *J Infect Dis.* 2014;210:619–29.
117. Ahmad R, Sindhu STA, Toma E, Morisset R, Ahmad A. Elevated levels of circulating interleukin-18 in human immunodeficiency virus-infected individuals: role of peripheral blood mononuclear cells and implications for AIDS pathogenesis. *J Virol.* 2002;76:12448–56.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

