



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“Determinación simultánea de arresto en ciclo celular y dos vías de muerte celular programada en células T CD4+ de memoria centrales por citometría de flujo multiparamétrica”.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

JESSICA ROMERO RODRÍGUEZ



Ciudad de México.

AÑO 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: ENRIQUE ORTEGA SOTO
VOCAL : Profesor: SAMUEL CANIZALES QUINTEROS
SECRETARIO: Profesor: HÉCTOR ENRIQUE ESPINOSA ARCINIEGA
1er. SUPLENTE: Profesor: GUSTAVO OLVERA GARCÍA
2° SUPLENTE: Profesor: ENRIQUE DE LEON LARA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS “ISMAEL COSÍO VILLEGAS”

ASESOR DEL TEMA:

SUPERVISOR TÉCNICO:

HÉCTOR ENRIQUE ESPINOSA ARCINIEGA

DÁMARIS ROMERO RODRÍGUEZ

SUSTENTANTE:

JESSICA ROMERO RODRÍGUEZ

Contenido

Resumen.....	5
1. Introducción.....	6
1.1 Importancia del VIH en México	6
1.2 VIH como agente etiológico.....	6
1.3 Ciclo de replicación viral	7
1.4 Mecanismos indirectos de la patogénesis por VIH	11
1.5 Fases de la infección por VIH	13
1.5 Linfocitos TCD ₄ ⁺ de memoria centrales y su implicación en la infección por VIH.....	15
2. Objetivo general	18
2.1 Objetivos particulares	18
3. Hipótesis	19
4. Metodología.....	19
4.1 Muestras	19
4.2 Obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMC'S)	19
4.3 Estimulación de PBMC'S vía TCR con un anticuerpo agonista anti CD3 unido a una fase sólida	20
4.4 Ciclo celular en PBMC'S con Vibrant DyeCycle	20
4.5 Ciclo celular en células Jurkat con Vibrant DyeCycle	21
4.6 Ciclo celular en células Jurkat con yoduro de propidio (PI).....	21
4.7 Determinación de viabilidad, ciclo celular y caspasas activadas en PBMC'S	22
4.8 Determinación del orden de las tinciones: viabilidad, caspasas activadas y ciclo celular en PBMC'S	22
4.9 Purificación de células T CD4 ⁺ de memoria centrales por sorting.....	23
4.10 Purificación de células T CD4 ⁺ de memoria centrales por columna.....	25
4.11 Estimulación de células T con perlas inmunomagnéticas anti CD3/CD28	25
5. Resultados.....	26
5.1 Ciclo celular en PBMC'S con Vibrant DyeCycle (1µl).....	26
5.2 Ciclo celular en células Jurkat (Vibrant DyeCycle vs P.I).....	26
5.3 Efectividad del kit para la determinación de caspasas activadas.....	30
5.4 Prueba de compatibilidad entre la tinción de viabilidad y caspasas activadas	30
5.5 Compatibilidad entre las tinciones de viabilidad y ciclo celular.....	32
5.6 Viabilidad ciclo celular caspasas	33
5.7 Resultados sorting	36

5.8 Resultados post- sorting	37
5.9 Purificación por columna.....	38
5.10 Viabilidad, caspasas, ciclo celular	40
Caspasa 1	41
Caspasa 3.....	42
6. Discusión de resultados	45
7. Conclusión.....	48
Bibliografía	50

Abreviaturas

AIC: Activación inmune crónica

CA: Nucleocápside

CENSIDA: Centro Nacional para la Prevención y el control del VIH y el SIDA

CMV: Citomegalovirus

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EtOH: Etanol

LPS: Lipopolisacárido

LTRs: Repeticiones terminales largas

PBMC'S: Células mononucleares de sangre periférica

PBS: Buffer de fosfatos

PI: Yoduro de propidio

RNA: Ácido ribonucleico

mRNA: RNA mensajero

RT: Transcriptasa reversa

RTC: Complejo de transcriptasa reversa

SFB: Suero fetal bovino

SIDA: Síndrome de inmunodeficiencia humana

SIV: Virus de la inmunodeficiencia del simio

TCR: Receptor de células T

TLR: Receptores tipo Toll

T_{MC}: Células T CD4+ de memoria centrales

T_{ME}: Células T CD4+ de memoria efectora

tRNA: RNA de transferencia

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

Resumen

Introducción: Las células T CD4+ de memoria centrales son particularmente importantes en los pacientes infectados por VIH, pues éstas se encargan de reabastecer a los linfocitos T CD4+ de memoria efectora durante la fase crónica de la enfermedad, ya que las células de memoria sufren una pérdida considerable durante la fase aguda. Por mucho tiempo se ha asociado a la apoptosis, mediada por caspasa 3 activada, como la principal vía de muerte celular asociada a la población de linfocitos T CD4+ en la infección por VIH, sin embargo los resultados de un trabajo previo por nuestro grupo de investigación indican que, de acuerdo con la firma de expresión génica, una porción de las células de memoria centrales mueren por un mecanismo distinto al de apoptosis. Algunos estudios *in vitro* en linfocitos T CD4+ han sugerido que una fracción de estas células puede estar muriendo por piroptosis, una vía de muerte celular programada mediada por caspasa 1 activada. Por otro lado, la entrada a ciclo celular de estas células estaría promovida, pero no conllevaría a proliferación debido a un arresto en el ciclo celular (probablemente en las fases G2/M).

Objetivos: Implementar una tinción que permita la determinación simultánea de viabilidad, fases del ciclo celular, en células TCD4+ de memoria centrales, mediante citometría de flujo. A fin de emplearla posteriormente en pacientes VIH+ y controles.

Método: Se realizaron múltiples ensayos para determinar el orden específico de las tinciones, de tal forma que se lograra realizar simultáneamente la determinación de viabilidad, fases de ciclo celular y caspasas 3 y 1 activadas en la misma célula. Una vez determinado el orden adecuado, se determinó el método más eficaz para la purificación de linfocitos T CD4+ de memoria centrales (sorting o purificación por columna). Finalmente se realizó la tinción en la subpoblación de interés.

Resultados: El orden que permite la determinación simultánea de las variables de interés fue: en primer lugar viabilidad, seguida de caspasas activadas 3 o 1 y finalmente ciclo celular. El método más eficaz para la purificación de células T CD4+ de memoria centrales fue la purificación por columna, dado que se obtienen porcentajes de pureza superiores al 90% y el tiempo requerido para dicho procedimiento es menor respecto al sorting.

Fue posible realizar la determinación simultánea de viabilidad, fases del ciclo celular y caspasas 3 y 1 activadas en linfocitos T CD4+ de memoria centrales.

Conclusiones: Se logró estandarizar una metodología que permite la determinación simultánea de viabilidad, ciclo celular y apoptosis o piroptosis en células T CD4+ de memoria centrales.

El método desarrollado es confiable, sensible y reproducible, por lo que podrá ser empleado para el análisis de células T_{CM} de pacientes VIH+ y controles.

1. Introducción

1.1 Importancia del VIH en México

Actualmente el VIH sigue siendo uno de los principales problemas de salud tanto a nivel mundial¹ como a nivel nacional; de ahí la importancia de su estudio. De acuerdo al centro Nacional para la Prevención y el control del VIH y el sida (CENSIDA), en el 2015 se diagnosticaron 3, 867 casos de infección por VIH y 3, 407 casos de SIDA en México, con una incidencia notablemente mayor en el sexo masculino respecto al sexo femenino; cada año el SIDA cobra miles de vidas en nuestro país (en el 2013 se registraron 4, 971 defunciones)².

Si bien es cierto que su prevalencia es baja y ha tendido a estabilizarse en los últimos diez años, es necesario intensificar las acciones de detección oportuna, pues se ha estimado que del total de personas infectadas el 50% de las personas no lo saben, lo que implica un riesgo potencial para sus parejas sexuales, alrededor del 95.1% de los casos se producen por vía sexual, el 2.9% por vía sanguínea y el 2% por vía perinatal. El grupo de edad que presenta más casos de VIH y SIDA comprende de 20 a 24 años de edad con un total de 946 casos reportados en 2015².

1.2 VIH como agente etiológico

Se sugiere que la epidemia del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) surgió tras una infección zoonótica con el virus de la inmunodeficiencia del simio (SIV) de los simios de África. El VIH-1 fue transmitido por los simios y el VIH-2 por los monos mangabey ahumados³. De acuerdo a su variación genética, se ha clasificado al VIH-1 en cuatro grupos: M, N, O y P. De éstos, la presencia de los grupos N, O y P³ se limita al oeste de África. En lo que al grupo M respecta, este es el responsable de la pandemia global de VIH y consta de cinco subtipos de virus genéticamente distintos (A-D, F-H, J y K). La notable diversidad genética del VIH-1 se atribuye principalmente a los errores cometidos por la transcriptasa reversa, durante el ciclo de replicación del virus. El VIH-2 se restringe al oeste de África, ocasiona una enfermedad similar al VIH-1 con la diferencia de que la inmunodeficiencia progresa de forma más lenta además de que es menos transmisible que el VIH-1⁴.

Como ya se ha mencionado, el VIH-1 es el principal responsable de la pandemia mundial; es por ello que en lo subsiguiente nos limitaremos a hacer referencia exclusivamente a este tipo de VIH. El VIH pertenece al género *Lentivirus* de la familia *Retroviridae*. Su genoma está conformado por dos cadenas sencillas de RNA de polaridad positiva (+), tiene un tamaño total de 9.75 kb⁵ y contiene dos repeticiones terminales largas (LTRs) en los extremos 5'-Cap y 3'-Poly A, respectivamente. Estas regiones tienen gran importancia en el ciclo de replicación viral. El genoma contiene nueve genes estructurales: *gag*, *gag-pol*, *env*, *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* y *vpu*⁵.

El VIH presenta una bicapa lipídica como envoltura y su genoma se encuentra rodeado por una nucleocápside cónica, la cual está formada por estructuras hexaméricas ensambladas entre sí, cada una de las cuales está formada por aproximadamente 1,000-1,500 proteínas de nucleocápside (CA)⁶.

1.3 Ciclo de replicación viral

El blanco principal del virus de la inmunodeficiencia humana son las células TCD4⁺ de memoria efectoras. La entrada del virus a la célula es mediada por su unión al receptor CD4 y los receptores de quimiocinas CCR5 o CXCR4, de tal forma que todas las células que producen el receptor CD4 y uno de los correceptores son susceptibles a la infección por el virus^{7,8} incluidos macrófagos y células dendríticas.

El ciclo de replicación del HIV comienza cuando gp120, glicoproteína de la envoltura viral, se une al receptor CD4 localizado en la superficie de las células CD4⁺. Esta unión ocasiona un cambio conformacional en gp120 que origina un segundo punto de unión con uno de los correceptores de la célula hospedera. Cuando comienza la unión de gp120 con CCR5, la unión gp120-CD4 se vuelve inestable y se origina un complejo más fuerte gp120-CCR5/CD4, la formación de este complejo desencadena el replegamiento de la proteína transmembranal gp41 (proteína viral). Después de ser activada, gp41 expone el extremo amino terminal de la secuencia conocida como péptido de fusión. El cambio conformacional de gp41 y la interacción del péptido de fusión con la membrana celular son cambios que desencadenan los procesos de aproximación y fusión de las membranas vírica y celular, dicho acontecimiento culmina con la entrada del virus a la célula⁹.

Transcripción reversa

Para replicar su material genético y traducir sus proteínas, el virus debe integrarse al genoma de la célula hospedera para poder hacer uso de la maquinaria celular, en un proceso conocido como integración. Puesto que el material genético del VIH es una cadena sencilla de RNA, es necesario que, previo a la integración, ocurra una transcripción de RNA a DNA de cadena doble. Este proceso es conocido como **transcripción reversa** y es mediado por la proteína viral **transcriptasa reversa (RT)**, por sus siglas en inglés), la cual cumple dos funciones enzimáticas: polimerasa y RNAsa H, ambas funciones cooperan para generar DNA de doble cadena a partir del RNA viral ¹⁰.

Una vez que el virus ha entrado a la célula, los viriones sufren una alteración estructural que da lugar a una larga estructura de ribonucleoproteína, llamada complejo de transcripción inversa (RTC), dicha alteración ocurre en el citoplasma de la célula. Para comenzar la síntesis de cDNA, la transcripción reversa requiere de un RNA de transferencia unido al sitio de unión del *primer* (PBS), este tRNA funge como *primer* (iniciador) para iniciar el proceso de retrotranscripción; en el caso del VIH-1 se trata del tRNA (Lys)¹¹. La transcriptasa inversa se une al tRNA y elonga una cadena corta de DNA, tomando como templado RNA de cadena positiva (5'-3'), lo que permite copiar el extremo 5' del genoma viral. La síntesis de DNA de cadena negativa (3'-5') genera un híbrido DNA/RNA que es sustrato de la RNAsa H; la RNAsa H degrada la cadena de RNA dejando a la cadena de DNA recién sintetizada como una cadena negativa. El hecho de que las secuencias en los extremos 5' y 3' sean idénticas (LTRs), permite que la cadena de DNA recién sintetizada se hibride con la secuencia LTR en el extremo 3' de alguna de la dos cadenas de RNA. Este paso es llamado "primer salto". A esta hibridación le sigue la síntesis de la cadena, a lo largo del RNA viral. A medida que procede la síntesis de DNA, la RNAsa H degrada la cadena de RNA.

En la mayoría de los retrovirus, la RNAsa H remueve totalmente el tRNA, el HIV es la excepción; la RNAsa H escinde uno de los nucleótidos de la unión RNA/DNA, dejando un ribo-A en el extremo 3' de la cadena negativa de DNA, este paso antecede al "segundo salto"; la eliminación del primer tRNA expone una porción sencilla de la cadena de DNA positiva, que justamente es idéntica al sitio de unión del primer. La exposición del extremo 3' de la cadena positiva de DNA permite que la región 5' de la cadena negativa sea transferida a la cadena positiva. Una vez que ocurre la segunda transferencia, ambas cadenas, tanto la positiva como la negativa, se extienden hasta que todo el DNA es de doble cadena, originando así un DNA que tiene las mismas secuencias en ambos extremos (estas regiones son conocidas como **repeticiones terminales largas** o **LTRs**, por sus siglas en inglés). El DNA originado por retrotranscripción es más largo que el genoma que lo originó, permitiendo que el genoma proviral, una vez que ha sido integrado, sirva como molde para que las nuevas copias del genoma viral (y el RNA mensajero), puedan ser copiadas¹².

Una vez que la retrotranscripción se ha completado, el DNA proviral es transportado al núcleo de la célula, donde la proteína viral integrasa (gp32) cataliza la integración del genoma proviral. Las enzimas de la célula hospedera completan el proceso de integración, mediante el proceso de reparación de cadena simple para rellenar los huecos en el extremo del DNA viral que no se une (extremo -5'), lo que resulta en el establecimiento del provirus estable. Después de la integración, la transcripción inicia a partir de la región U3 localizada corriente arriba de las LTR's y los mRNA's virales se producen como una variedad de especies empalmadas alternativamente y los mRNA's sirven como molde para la producción de proteínas. Aquellos que poseen una longitud genómica, son integrados en partículas virales.¹³

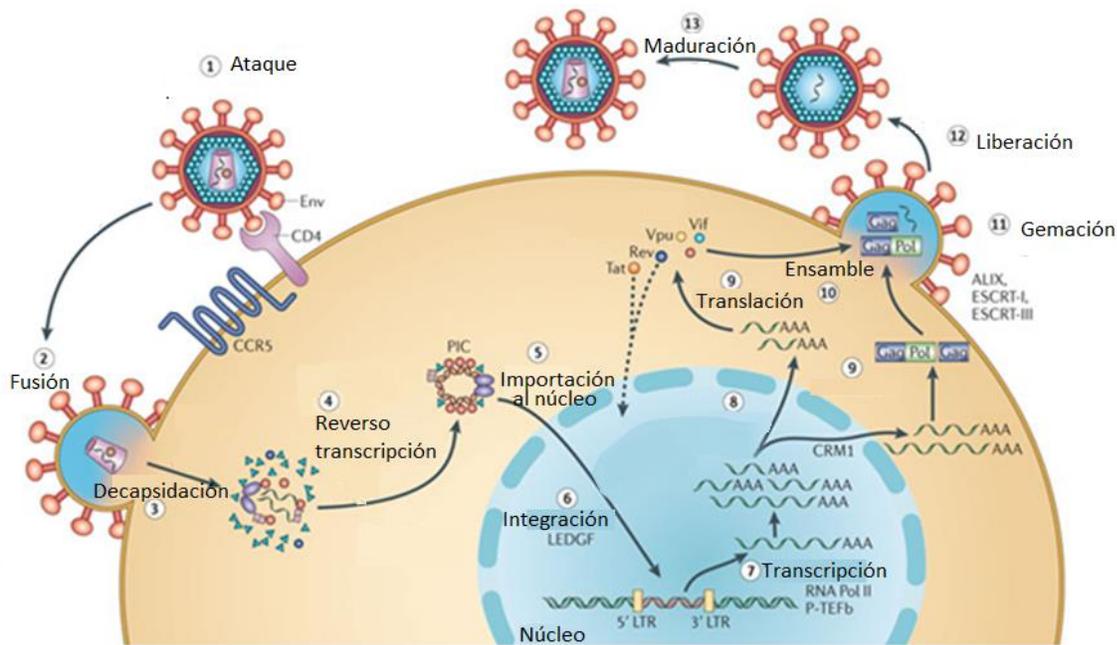


Figura 1. Esquema del ciclo de replicación del VIH. La infección comienza cuando la glicoproteína gp120 (Env) se une al receptor CD4 y al correceptor CCR5 (paso 1), lo que da lugar a la fusión de la membrana viral y celular que a su vez permiten la entrada de la partícula viral a la célula (paso 2). La remoción de la nucleocápside (paso 3) facilita la retrotranscripción (paso 4), lo que a su vez origina el complejo pre-integración (PIC). Después de la importación al núcleo de la célula (paso 5), PIC se asocia con la integrasa para orquestar la formación del provirus integrado, con ayuda de las proteínas de unión a cromatina del hospedero (lens epithelium-derived growth factor; LEDGF) (paso 6). La transcripción proviral (paso 7) mediada por la RNA polimerasa II del hospedero (RNA Pol II) y la transcripción positiva del factor de elongación b (P-TEFb); los mRNAs más grandes requieren exportación dependiente de energía para dejar el núcleo, a través de las proteínas CRM1 del huésped (paso 8). Los mRNAs de polaridad positiva se emplean como plantados para la síntesis de proteínas (paso 9), aquellos que poseen una longitud genómica y tienen una polaridad negativa son incorporados en partículas virales con componentes proteicos (paso 10). Finalmente, la gemación de las partículas virales (paso 11) y la liberación de las mismas (paso 12), es mediada por ESCRT (endosomal sorting complex required for transport, por sus siglas en inglés), el ciclo del VIH culmina cuando la proteasa madura, para dar origen a una partícula viral infecciosa (paso 13). Tomado de Engelman et al, Nat Reviews, 2012⁹.

Hasta aquí se ha hecho una pequeña revisión respecto al ciclo de replicación del VIH, sin embargo sólo una pequeña fracción de las células que son depletadas durante la infección se encuentran infectadas, es decir, el ciclo replicativo del VIH no explica, por sí mismo, la pérdida de células T CD4+ . Se ha investigado mecanismos indirectos de la patogénesis por VIH asociados a la depleción celular y son precisamente estos mecanismos la base de los trabajos de investigación en nuestro grupo de investigación. A continuación se abordan algunos aspectos de dichos mecanismos y su implicación en la patogénesis por VIH.

1.4 Mecanismos indirectos de la patogénesis por VIH

Si bien es cierto que una fracción de las células T CD4+ muere debido al efecto citopático mediado por el virus, existe una pérdida considerable de células no infectadas durante la fase crónica de la infección, lo que sugiere una muerte mediada por un mecanismo distinto al efecto citopático del virus o la eliminación de las células infectadas por linfocitos T CD8+ citotóxicos, pues sólo una pequeña fracción de las células se encuentran infectadas (aproximadamente el 0.1%)^{14,15}. Se ha observado que, en macacos infectados con el SIV y en humanos VIH+, la mayoría de las células CD4+ apoptóticas son células “bystander” en relación con las células directamente infectadas¹⁶.

La fase crónica de la infección se caracteriza, entre otras cosas, por una activación masiva y sostenida de las células T CD4+ y CD8+; sin embargo, esta activación se reduce durante el tratamiento con terapia antiretroviral, no obstante nunca llega a niveles normales. Se ha demostrado que existen niveles anormales de células activadas en pacientes que han experimentado disminución en la carga viral mediada por terapia antirretroviral a largo plazo y que el grado de activación se asocia con un aumento en las células CD4+ asociado al tratamiento^{17,18}.

Sorpresivamente el número de linfocitos T CD4+ activados y los marcadores de proliferación correlacionan mejor que la carga viral con el grado de reducción en el recuento de células T CD4+ en pacientes VIH¹⁹. Estos estudios, aunados a los desarrollados en primates, en los que se ha observado que el SIV es capaz de inducir una activación excesiva en los linfocitos T CD4+ de las especies susceptibles a SIDA (macaco Rherus), no así en su hospedero natural (mangabey ahumado), sugieren que la activación inmune crónica (AIC) juega un papel preponderante en la disminución progresiva de los linfocitos T CD4+²⁰.

Las razones por las que la AIC ocasiona desregulación de la homeostasis de los linfocitos T aún no se comprenden por completo, pero se han propuesto diversos mecanismos: El incremento en la activación inmune puede ser un efecto directo de la interacción de las células del sistema inmune con el VIH, el VIH no sólo se une a los receptores de células T (TCR) o a las inmunoglobulinas localizadas en la superficie de las células B, también se puede unir a los receptores de patrones de reconocimiento TLR (Toll Like Receptor) 7 y 9^{21,22}. Estos receptores pueden desencadenar la migración de células presentadoras hacia los órganos linfoides secundarios, además son capaces de ocasionar un incremento en la expresión de moléculas coestimuladoras para la respuesta inmune (CD80/86)²³.

Algunos estudios han encontrado que la AIC se debe a un efecto secundario, la profunda disminución de células T CD4+ de memoria en mucosas, ocasiona la translocación de antígenos inmunogénicos del intestino (LPS) y una respuesta sistémica²⁴. En este caso la AIC puede tener efectos en la tasa de división de las células y en la tasa de mortalidad de las mismas; ocasionando diversas alteraciones tales como: alteración en el ambiente de citocinas y en los patrones de recirculación, promoción de las células en división hacia senescencia a través de la estimulación repetida o aumento en la susceptibilidad a sufrir muerte celular inducida por activación²⁵.

Adicionalmente, las infecciones oportunistas en estados avanzados de la infección pueden contribuir a la AIC, a través de la estimulación de un gran número de células;

sin embargo durante la fase aguda también se pueden presentar infecciones oportunistas²⁶. Una gran parte de los pacientes infectados por VIH presentan otras infecciones virales latentes, tal es el caso del citomegalovirus (CMV) y el virus de Epstein-Barr. De esta manera las infecciones oportunistas pueden contribuir a mantener un estado de activación inmune durante el curso de la enfermedad^{27,28}.

En conclusión, son múltiples los factores que pueden contribuir a un estado de activación inmune crónica, la cual correlaciona con la destrucción de las células T CD4+, incluso más que la carga viral, lo cual podría estar indicando que la activación refleja o participa en un mecanismo indirecto de inmunopatogénesis de la enfermedad por VIH

1.5 Fases de la infección por VIH

El avance de la infección por VIH consta de tres fases, las cuales se describen a continuación. Las tres fases, se ejemplifican en la figura 2.

Infección aguda

La infección primaria por el VIH-1 es el período después de que ha ocurrido la infección, pero antes del desarrollo de anticuerpos detectables contra el VIH-1. Durante esta ventana, el virus se replica rápidamente. La duración de este periodo es de unas pocas semanas o meses. La gravedad de la enfermedad difiere en cada paciente; sin embargo, es sabido que cerca del 50% de los pacientes no presentan síntomas²⁹. Algunos pacientes pueden presentar una sintomatología similar a la gripe (fiebre, dolor de cabeza y erupción cutánea). Estos síntomas son característicos del síndrome retroviral agudo³⁰.

La infección aguda se caracteriza por una elevada carga viral en la sangre acompañada de una pérdida dramática y selectiva de células T CD4+ de memoria, predominantemente en mucosas. Estudios que emplearon el virus de la inmunodeficiencia del simio (SVI) como modelo, sugieren que estas células son el principal blanco del virus, debido a la presencia del correceptor viral CCR5, sin embargo, el mecanismo que ocasiona la pérdida de células de memoria aún es desconocido^{31,32}.

Fase crónica o asintomática

Durante esta fase de la enfermedad la respuesta inmunitaria controla la enfermedad aguda y restituye parcialmente la cuenta de células T CD4⁺; a pesar de que persiste una elevada capacidad replicativa viral, la carga viral muestra una disminución marcada, debido a la actividad de las células T CD8⁺ específicas, principalmente. Si bien es cierto que la disminución de células T CD4⁺ en esta fase no es tan abrupta como en la fase aguda, existe una pérdida continua de dicha población durante esta etapa, cuya duración varía entre 7 y 10 años³³

SIDA

Finalmente se presenta la fase de SIDA, caracterizada por una disminución acelerada en la cuenta de linfocitos T CD4⁺ a una cifra crítica por abajo de 200 células/ μ l y un aumento en la carga viral. En este punto se pierde la inmunidad celular y aparecen infecciones por microorganismos oportunistas, lo cual caracteriza a esta fase de la infección³⁴.

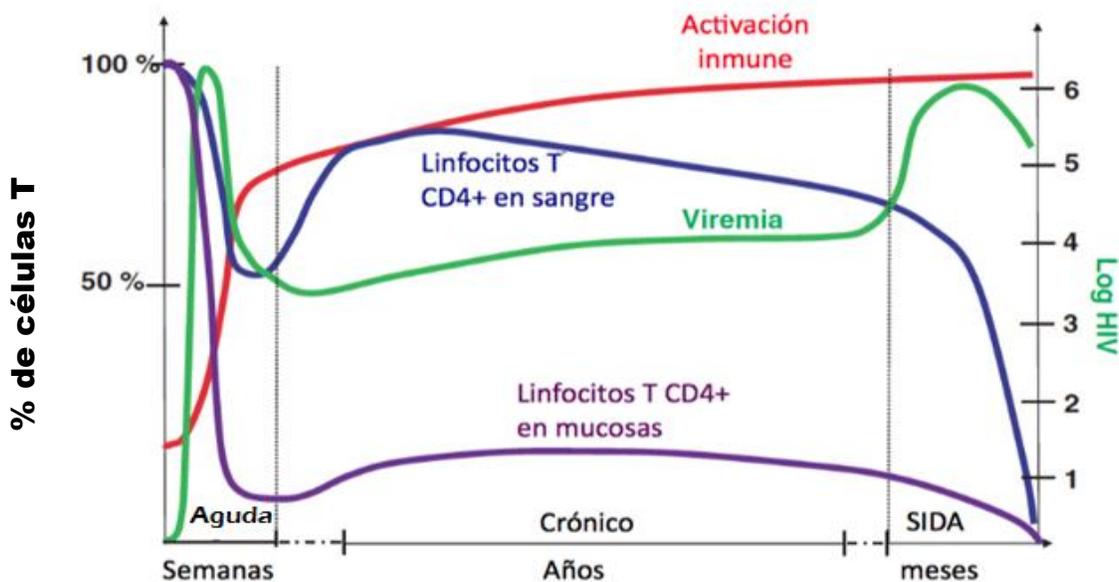


Figura 2. Fases de la infección por VIH. En la fase aguda de la infección, las células T CD4⁺ en mucosas (en morado) se pierden rápidamente, la viremia (verde) se eleva al máximo y el conteo de células T CD4⁺ en sangre declina abruptamente al inicio, debido a que son capturados en los tejidos linfoides, pero después los niveles se incrementan hasta un nivel

moderadamente inferior al normal. Cuando se establece la activación inmune, mediada por linfocitos citotóxicos TCD8⁺, la carga viral se estabiliza y la cuenta de células T CD4⁺ en sangre aumenta, estos eventos marcan el avance a la fase crónica de la infección, durante esta fase, cuya duración oscila entre 2 y 10 años, las células T CD4⁺ en mucosas muestran un comportamiento estable, si bien nunca se recuperan. Hacia el final de la fase crónica, se observa una disminución abrupta de linfocitos T CD4⁺ en sangre por debajo de 250 células / μ L y la carga viral aumenta, lo que marca el avance a SIDA que se caracteriza por la presencia de enfermedades oportunistas. Adaptación de *Grossman et al, Nat Med*³⁴.

1.5 Linfocitos TCD₄⁺ de memoria centrales y su implicación en la infección por VIH

De acuerdo a la exposición que han tenido a un antígeno y a su grado de diferenciación, los linfocitos T pueden ser clasificados como células *naive*, las cuales no han sido expuestas previamente a un antígeno y células de memoria, que ya se han enfrentado a este. Dentro de las células de memoria, es posible distinguir dos poblaciones con características fenotípicas y funcionales distintas: las células de memoria centrales (CD45RA⁻, CCR7⁺; T_{MC}), las cuales son células de larga vida que pueden alojarse en órganos linfoides secundarios y recircular en la sangre, y, por otro lado, las células de memoria efectora (CD45RA⁻, CCR7⁻; T_{ME}), que se localizan principalmente en tejidos periféricos como epitelios y mucosas. Se caracterizan por no expresar en su superficie la molécula CCR7, receptor asociado a la habilidad para alojarse en órganos linfoides. Estudios en ratón y humanos, han mostrado que las células de memoria efectoras muestran una limitada capacidad regenerativa; es decir, su progenie producida bajo estimulación y reestimulación es pequeña y se agota rápidamente³⁴.

Como ya se ha mencionado, CCR5 es correceptor para el VIH y media su entrada a la célula, por lo que las células de memoria efectoras son el blanco predilecto de este virus; razón por la cual durante la fase aguda de la infección, las células T_{ME} sufren una abrupta depleción. Estudios en macacos Rhesus infectados con el virus de inmunodeficiencia de simios (SIV), modelo animal de la infección por VIH, han sugerido que la recuperación parcial de dicha población, durante la fase crónica de la enfermedad, se debe en gran medida a la

capacidad que poseen las células T_{MC} para diferenciarse a un fenotipo efector $CCR7^-$ y proveer a las mucosas de células efectoras que son su progenie¹¹. Al avanzar a la fase crónica de la enfermedad, las células de memoria son incapaces de sostener esta función homeostática de la población de memoria efectora.

La pérdida de la capacidad homeostática de las células T de memoria centrales se ha atribuido a su muerte³⁵ debido a infección por viriones; sin embargo, no se pueden descartar mecanismos indirectos, como ya se mencionó. Considerando que solo una pequeña proporción de los linfocitos $TCD4^+$ son infectados por el VIH (0.1%) y que el aumento en las tasas de apoptosis no se limitan a las célula infectadas^{36, 37} es posible considerar que existen mecanismos indirectos que afectan la sobrevivencia de las células T $CD4^+$ ³⁸. Se ha propuesto que la destrucción de los linfocitos T puede estar mediada por mecanismos de activación inmune crónica³⁹, pues se ha observado que la expresión de CD38, marcador de activación en células T es un fuerte predictor del avance de la infección por VIH⁴⁰.

Un estudio de nuestro grupo⁴⁵ que comparó la expresión del genoma completo de distintas subpoblaciones de diferenciación de linfocitos T $CD4^+$ (células naive, células de memoria centrales y de memoria efectoras) de controles sin infección por VIH y pacientes infectados por VIH (células naive, células centrales de memoria) sugiere que la pérdida de estas células se debe a que está promovida la entrada de las células T_{MC} a ciclo celular, seguida de un arresto en las fases G2/M del ciclo celular lo que las conduce a muerte^{41,42}. Además, los resultados sugieren que, de acuerdo con la firma de expresión génica, la muerte de las células T_{MC} podría ocurrir por un mecanismo distinto al de apoptosis, vía de muerte celular asociada a las células infectadas por el VIH⁴³. Este modelo de muerte de las células T_{MC} se muestra en la figura 3.

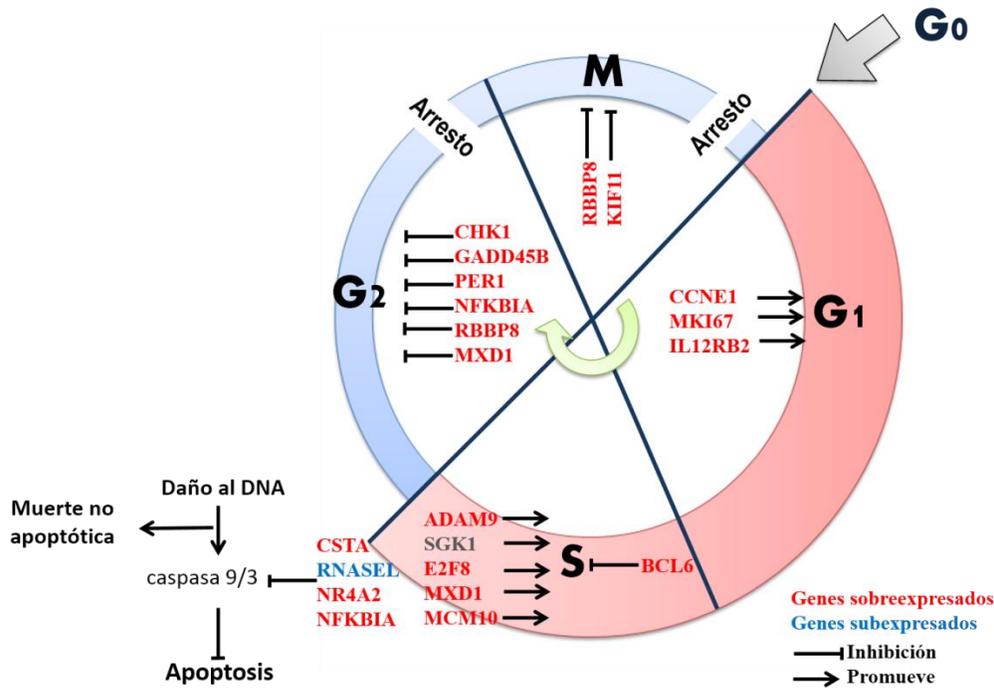


Figura 3. Modelo de ciclo celular en células T_{CM}: La firma de expresión génica de los linfocitos T de memoria centrales de pacientes VIH⁺ predice la promoción del ciclo celular de la fase G₀ a S, pero la sobreexpresiones de un conjunto de genes como CHK1 y RBPB8 se asocian a arresto en las fases G₂ y M del ciclo celular. Además, la expresión diferencial de los genes CESTA, ARNSEL y NR4AC predicen una muerte celular por vías diferentes de la apoptosis canónica. Adaptación de Olvera et al. CROI 2016⁴⁴

Doitsh y colaboradores⁴⁵ han explorado (in vitro), dos vías que ocasionan la muerte celular de las células TCD4⁺ en la infección por VIH, ellos proponen que sólo una pequeña proporción de las células CD4⁺ infectadas (5%), mueren por apoptosis, la cual es mediada por caspasa 3 activada. La muerte del 95% de células restante, ocurre por un tipo de muerte celular mediado por Caspasa 1 activada, denominada piroptosis⁴⁵. Adicionalmente, los resultados del trabajo previo en nuestro grupo de trabajo mostraron señalización de respuestas inmunes relacionadas con un medio inflamatorio (señalización por interferón tipo 1, señalización por IL-1, señalización por receptores tipo NOD y activación de NFkB).Partiendo de este hallazgo; se propone que la muerte de las células T CD4⁺ de memoria centrales puede estar mediada por piroptosis.

Con el fin de comprobar dicha hipótesis respecto a la muerte celular asociada a la depleción de los linfocitos T_{MC} , por una vía distinta a la de apoptosis, se estandarizó una tinción para determinar de forma simultánea, viabilidad de las células, presencia de las caspasas activadas 3 ó 1, y ciclo celular, para su posterior implementación en muestras controles y pacientes VIH⁺, en un estudio comparativo.

2. Objetivo general

Implementar una tinción que permita el análisis simultáneo de la viabilidad, la presencia en diferentes fases de ciclo celular y la activación de las Caspasa 3 y 1, en células TCD4⁺ de memoria centrales, mediante citometría de flujo, para su posterior aplicación en la búsqueda de evidencias independientes del modelo de muerte por promoción a ciclo, arresto y muerte no apoptótica usando muestras de pacientes VIH⁺ y controles.

2.1 Objetivos particulares

- Purificar células T CD4⁺ de memoria centrales a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC'S).
- Estimulación de células T CD4⁺ de memoria centrales vía su receptor de células T (TCR), para inducir su entrada a ciclo con subsecuente proliferación o arresto y muerte.
- Determinar el método más adecuado para el análisis de ciclo celular en células T CD4⁺ de memoria centrales.
- Probar la eficacia y especificidad de los Kits FAM-DEVD-FMK y FAM-YVAD-FMK empleados para la determinación de Caspasa 3 ó 1, en las células de interés, así como su compatibilidad con las demás determinaciones simultáneas.
- Evaluar el orden específico en el que deben ser realizadas las distintas manipulaciones experimentales para poder determinar simultáneamente ciclo celular, activación de caspasas 3 y 1 y viabilidad.

3. Hipótesis

El éxito del uso simultáneo de las tinciones para determinar ciclo celular, viabilidad y Caspasa 3 ó 1 activadas en células TCD4⁺ de memoria centrales, dependerá del orden específico en que se realicen dichas tinciones.

4. Metodología

4.1 Muestras

Para la obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMC'S) se emplearon concentrados leucocitarios de donadores sanos, no infectados por VIH, Hepatitis B o Tripanosoma cruzi, provenientes del Banco de Sangre del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas (INER). La ausencia de infección por VIH es verificada mediante ELISA y Western blot, según lo estipula la Norma Oficial Mexicana NOM-010-SSAS2-1993 (Norma para la prevención y control de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana).

4.2 Obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMC'S).

Se obtuvieron PBMC'S a partir de 30 mL de un concentrado leucocitario, mediante un gradiente de densidad en ficoll (Lymphoprep marca Axil-Shield). Posteriormente se realizó un lavado con amortiguador de fosfatos 1X (Hyclone; PBS). Tras el primer lavado, se añadió solución amortiguadora de lisis de eritrocitos (NH₄Cl 150 nM, KHCO₃ 10nM y EDTA 0.1 mM) y se realizó un segundo lavado. Para determinar el número de células extraídas, se realizó el conteo microscópico en cámara de Neubauer, empleando el colorante vital azul tripano (Lonza) al 30%.

Tras la extracción, las células se cultivaron durante 24 horas (37°C, 5% CO₂ y 85% de humedad) en medio completo (RPMI 1640 Lonza, suplementado con SFB al 10%, penicilina/estreptomicina 100 U/mL y L-glutamina 540 µg/mL).

4.3 Estimulación de PBMC'S vía TCR con un anticuerpo agonista antiCD3 unido a una fase sólida

Quinientas mil PBMC'S/pozo se sembraron en una placa de 96 pozos previamente sensibilizada con un anticuerpo monoclonal agonista anti-CD3 (Biolegend, San Diego) a una concentración de 5 µg/mL (1,5 horas, 37°C, 5%CO₂ Y 85% de humedad). Las células se cultivaron por un periodo de 4 días a 37°C, con 5% CO₂ y 85% de humedad.

Adicionalmente se probó un estímulo vía TCR mediante perlas magnéticas cubiertas con anticuerpos anti CD3/CD28, pues este método no requiere una sensibilización previa, lo que representa una ventaja en cuanto al tiempo. La estimulación con perlas magnéticas se probó en células de memoria centrales y la metodología se describe a detalle más adelante.

4.4 Ciclo celular en PBMC'S con Vibrant DyeCycle

Las células estimuladas se sacaron de cultivo y se lavaron con PBS. Se procedió a realizar la tinción para la determinación de ciclo celular mediante el reactivo Vibrant DyeCycle por contenido de ADN, de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Invitrogen). El reactivo es un colorante selectivo para ADN, emite una señal proporcional al contenido de DNA. Se sabe que la distribución del ADN cambia en cada una de las fases del ciclo celular, en la fase GO/G1 cada célula contiene un par de cromosomas, en la fase S el contenido de DNA es variable y en la fase G2/M dos pares de cromosomas, con base en este principio este reactivo produce un histograma de frecuencias que revela las distintas fases del ciclo.

Las células se leyeron en un citómetro FACS Aria II con un láser para detectar la señal del Vibrant DyeCycle.

4.5 Ciclo celular en células Jurkat con Vibrant DyeCycle

Un millón de células Jurkat se cultivaron en un frasco T25 con medio completo, durante 6 días, a 37°C, con 5% CO₂ y 85% de humedad.

A los 6 días, las células se sacaron de cultivo y se lavaron con PBS, después de lo cual se hizo la tinción con Vibrant DyeCycle (Invitrogen, California, USA) para la determinación de ciclo celular. Además de la concentración recomendada por el fabricante (1 µL), se probaron dos concentraciones mayores (2 y 5 µL).

Las células se analizaron en un citómetro FAC´S ARIA II.

Debido a que las fases de ciclo celular (observadas con las distintas concentraciones del reactivo Vibrant DyeCycle, no eran definidas), fue necesario examinar otro reactivo que permite determinar las fases del ciclo celular, el reactivo que se probó para dicho fin fue PI.

4.6 Ciclo celular en células Jurkat con yoduro de propidio (PI)

Un millón de células Jurkat se cultivaron, como se describió con anterioridad. A los 6 días de cultivo, las células se lavaron con buffer de fosfatos y se trataron como se describe a continuación:

Tinción con PI, sin permeabilización: Las células Jurkat se tiñeron con PI (SIGMA-ALDRICH, St. Louis Missouri, USA) a una concentración de 50µg/ml, por un lapso de 30 minutos a temperatura ambiente.

Tinción con PI previa permeabilización con EtOH: Las células Jurkat previamente lavadas, se fijaron con etanol (SIGMA-ALDRICH) al 70% por un lapso de 2 horas a 4°C. Tras el periodo de fijación, las células se lavaron con buffer de fosfatos y tiñeron con PI (50µg/ml), durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Al término de la tinción, las células se leyeron en un citómetro FACS CANTO II.

4.7 Determinación de viabilidad, ciclo celular y caspasas activadas en PBMC'S

Un millón de PBMC'S se estimularon según el método descrito (ver página 14), al término las células se lavaron con buffer de fosfatos y se procedió a realizar las tinciones correspondientes, como se describe a continuación:

Viabilidad → ciclo celular → Caspasa 3 activada: 500,000 células se tiñeron con el reactivo Live/Dead para determinar viabilidad, de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Invitrogen), posteriormente se realizó un lavado con buffer de fosfatos. A continuación las células se permeabilizaron con EtOH al 70% por un lapso de 2 horas a 4°C, al término de este tiempo, las células se lavaron con buffer de fosfatos y se realizó la tinción con PI (50µg/ml), incubando durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Al finalizar el periodo de incubación para PI, se realizó un lavado con buffer de fosfatos y se procedió a realizar la tinción con el reactivo FAM-FLICA FAM-DEVD-FMK, siguiendo las indicaciones del proveedor (ImmunoChemistry Technologies, Minnessota, USA). Las caspasas activas 3 y 7 tienen una alta afinidad por la secuencia del péptido D-E-V-D, de esta manera el reactivo FAM-DEVD-FMK permite detectar a las caspasas 3 y 7 **activadas**. La adición de cetona de fluorometilo resulta en un enlace irreversible y la inactivación permanente de la enzima proteasa de cisteína.

Viabilidad → ciclo celular → Caspasa 1 activada: Para esta tinción se procedió tal y como se describió en el apartado anterior, con la excepción de que se empleó el reactivo FAM-YVAD-FMK, para la determinación de Caspasa 1 activada. En este caso la caspasa 1 activada muestra afinidad por la secuencia Y-V-A-D así el reactivo FAM-YVAD-FMK permite la detección de esta caspasa.

Nota: La determinación de ambas caspasas no se puede realizar de forma simultánea, debido a que ambos reactivos están acoplados al mismo fluorocromo (isotiocianato de fluoresceína).

4.8 Determinación del orden de las tinciones: viabilidad, caspasas activadas y ciclo celular en PBMC'S

Quinientasmil PBMC'S se estimularon como ya se ha descrito, al término del periodo de cultivo las células se lavaron con buffer de fosfatos y se procedió a realizar las tinciones correspondientes.

Viabilidad/ Caspasas activadas/ ciclo celular: Las tinciones se realizaron como se describió previamente, sin embargo, en esta ocasión se cambió el orden de las tinciones para ciclo celular y caspasas, primero se realizó la tinción para caspasas seguida de la tinción para ciclo celular.

Las tinciones para Caspasa 3 y 1 se realizaron por separado, dada la consideración previa.

Una vez que se comprobó la posibilidad de realizar las tinciones de interés de forma simultánea, se procedió a evaluar el método más eficaz para la purificación de células T CD4+ de memoria centrales, para evaluar dicha tinción en estas células.

4.9 Purificación de células T CD4+ de memoria centrales por sorting.

Previo al sorting, las células se sacaron de cultivo y se lavaron con solución de fosfatos; se realizó el conteo microscópico de las mismas. Las células se colocaron en tubos de citometría y se tiñeron según lo indicado en la **tabla 1**. Se incubó por un lapso de 30 min, sobre hielo.

Tabla 1

Tubo	Número de células	CD4 APC-Cy7	CD38 PercpCy5.5	CD45RA APC	CCR7 Pe
FMO CCR7	1X 10 ⁶	✓	✓	✓	----
FMO CD45RA	1X 10 ⁶	✓	✓	----	✓
FMO CD38	1X 10 ⁶	✓	----	✓	✓
Todos los colores	20X 10 ⁶	✓	✓	✓	✓
Sin teñir	1X 10 ⁶	----	----	----	----

Para realizar la compensación, se emplearon perlas de compensación de ratón (compbeads Ms, BD Biosciences) tal y como se muestra en la **tabla 2**.

Tabla 2

Tubo	CD4 APC-Cy7	CD38 PercpCy5.5	CD45RA APC	CCR7 Pe
Compensación CD4 APC-Cy7	✓	----	----	----
Compensación CD38 PercpCy5.5	----	✓	----	----
Compensación CD45RA APC	----	----	✓	----
Compensación CCR7 Pe	----	----	----	✓

Posteriormente se analizó en un citómetro FACS ARIA II, y se procedió a la separación de la población de interés (CD4⁺, CCR7⁺, CD45RA⁻) por sorting.

4.10 Purificación de células T CD4⁺ de memoria centrales por columna

Ciento ochenta millones de PBMC'S se dejaron en cultivo un día previo a la purificación. Las células se sacaron de cultivo, se contaron (para este fin se empleó el colorante vital, azul tripano). 150×10^6 PBMC'S se lavaron PBS, posteriormente se procedió a la tinción para la separación magnética de las células mediante el kit de purificación de células T CD4⁺ de memoria centrales, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (CD4⁺ Central Memory T cell isolation kit, Miltenyi Biotec). Este kit se basa en la unión inmunomagnética de las células según sus receptores de superficie, en un primer paso ocurre una selección negativa de las células T CD4⁺ naive y aquellas células que carecen del receptor CD4, en el segundo paso las células T CD4⁺ de memoria centrales se seleccionan positivamente con base en la expresión de CCR7.

4.11 Estimulación de células T con perlas inmunomagnéticas anti CD3/CD28

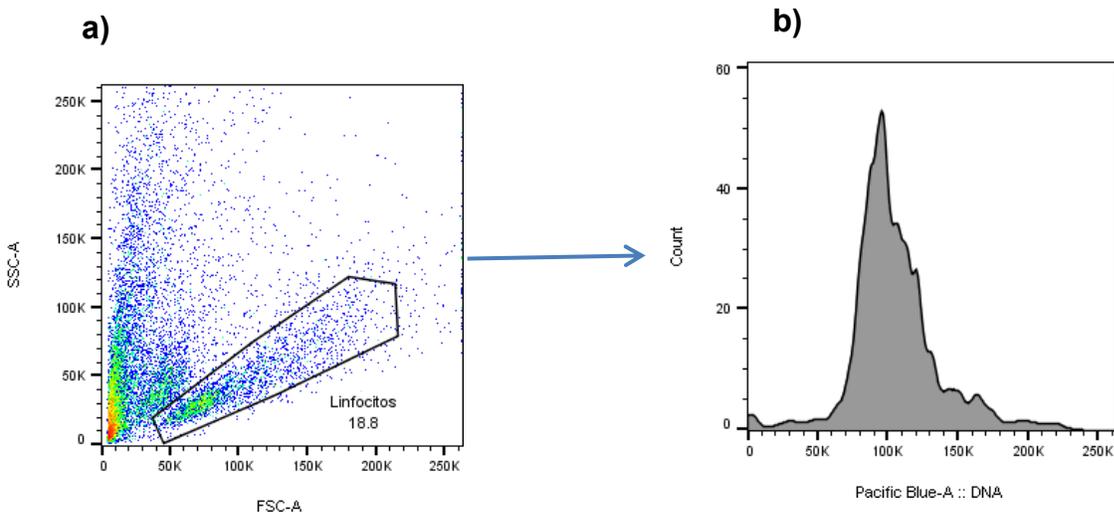
Una vez purificadas (por columna), las células T CD4⁺ de memoria centrales se sembraron 500,000 células/ pozo, en una placa de 96 pozos en medio completo. Las células se estimularon con perlas anti CD3/CD28 (en una relación de 4 células por perla, por un lapso de 4.5 días). Tras este periodo, las perlas se retiraron magnéticamente y las células se mantuvieron en cultivo 1.5 días más, en medio completo adicionado con IL-2 a una concentración de 100 unidades/mL.

A los 6 días de cultivo, las células se sacaron de cultivo y se lavaron con buffer de fosfatos, posteriormente se procedió a realizar la tinción para determinar viabilidad, ciclo celular y la presencia de caspasas 3 ó 1 activadas, de forma simultánea. Según la estandarización de dicha tinción, realizada en PBMC'S, el orden que se siguió fue: viabilidad, presencia de caspasas avivadas y finalmente ciclo celular (para esta tinción se empleó PI).

5. Resultados

5.1 Ciclo celular en PBMC'S con Vibrant DyeCycle (1µl)

Para verificar la eficacia del reactivo Vibrant DyeCycle se emplearon PBMC'S teñidas con 1µl de dicho reactivo (fig.4), sin embargo no se logró observar cada una de las fases del ciclo celular.



Morfología- linfocitos

Se observa la población de linfocitos, de acuerdo a su tamaño y granularidad.

Ciclo celular en PBMC'S

En el histograma para ciclo celular, no se logran distinguir con claridad cada una de las fases del ciclo.

Figura 4. Estrategia de análisis. En las células con morfología típica de linfocitos (a) se determinó ciclo celular, con el reactivo Vibrant DyeCycle, como se puede observar en la imagen b) las fases del ciclo celular no son definidas.

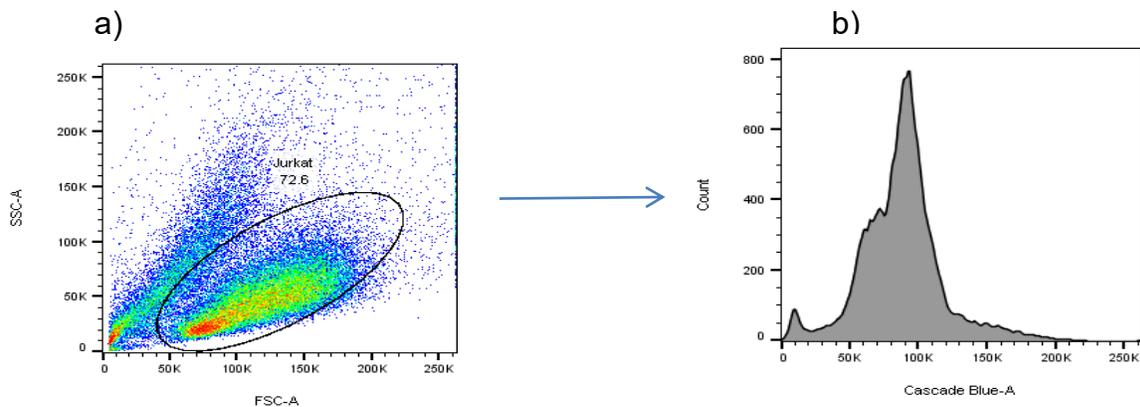
5.2 Ciclo celular en células Jurkat (Vibrant DyeCycle vs P.I)

Debido a que no se logró observar las fases de ciclo celular empleando 1µl (concentración recomendada por el fabricante) del reactivo Vibrant DyeCycle en PBMC'S, se probó dicho reactivo en células Jurkat, debido a las características proliferativas de dicha línea celular.

Además, de acuerdo con el fabricante, el reactivo fue estandarizado empleando este tipo de células. Adicionalmente se probaron dos concentraciones más altas de Vibrant DyeCycle (3 y 5 μ l). En ninguna de las concentraciones se logró observar cada una de las fases del ciclo celular, de forma definida.

Por otro lado se empleó PI dadas las características que posee como intercalante de DNA⁴⁶, para este caso se probaron dos condiciones, en una de ellas las células se fijaron con etanol al 70% mientras que en el otro caso las células no se fijaron (**Fig.5**), en las imágenes para ciclo celular con PI se puede apreciar cada una de las fases del ciclo celular tanto en las células fijadas como en aquellas que no lo fueron; sin embargo, las fases son más definidas en las células tratadas con etanol.

Dados estos resultados, se optó por usar PI para la determinación de ciclo celular, previa fijación con etanol al 70%.



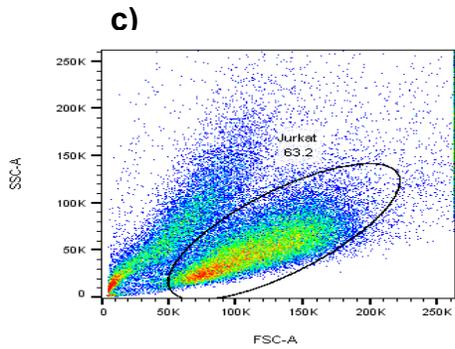
Morfología en células Jurkat

De acuerdo a su tamaño y complejidad, se ha seleccionado la población de células Jurkat. Pase 1

Ciclo celular

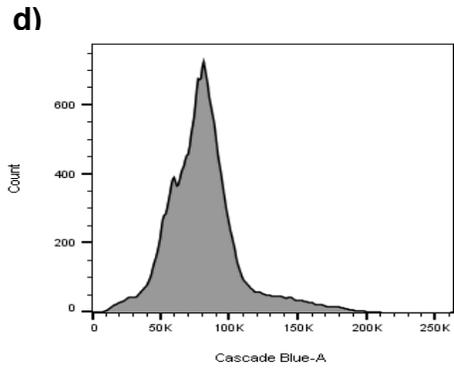
1 mL de Vibrant DyeCycle

Se observa que el histograma de ciclo celular carece de claridad. No se definen las fases del ciclo, a pesar de tratarse de una línea celular.



Morfología en células Jurkat

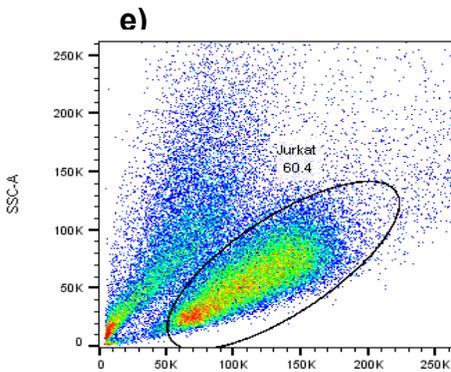
Poblaciones de células Jurkat, según su tamaño y complejidad. Pase 1



Ciclo celular

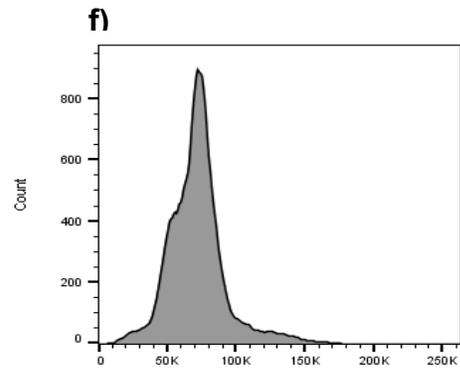
2 µL de Vibrant DyeCycle

Se aprecia que a pesar de incrementar el volumen de Vibrant DyeCycle el histograma de ciclo celular aún carece de claridad.



Morfología de células Jurkat

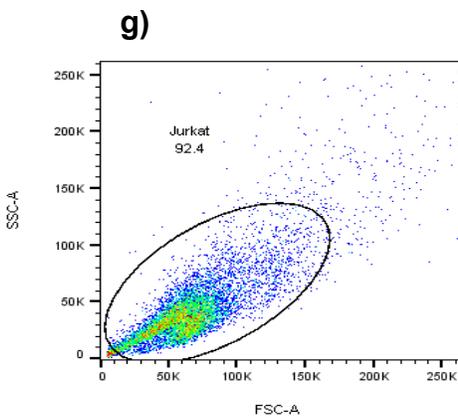
Población de células Jurkat. Pase 1



Ciclo celular

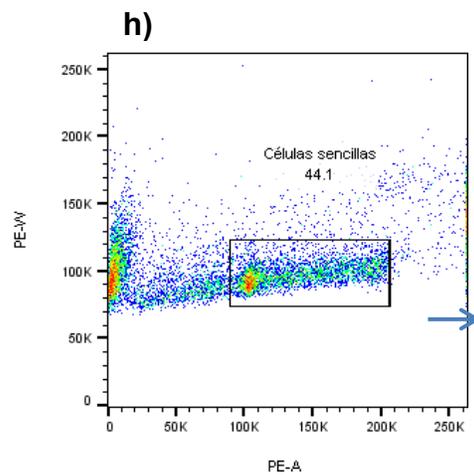
5 µL Vibrant DyeCycle

Las fases del ciclo celular carecen de definición a pesar de emplear una concentración mayor de Vibrant DyeCycle.



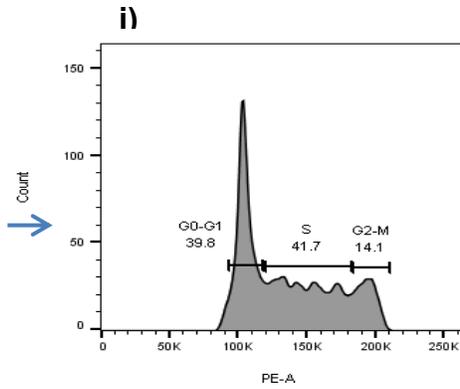
Morfología de células Jurkat

Población de células Jurkat. Segundo Pase 1.

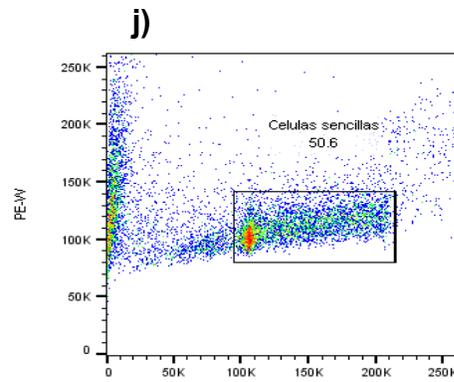


Células Sencillas

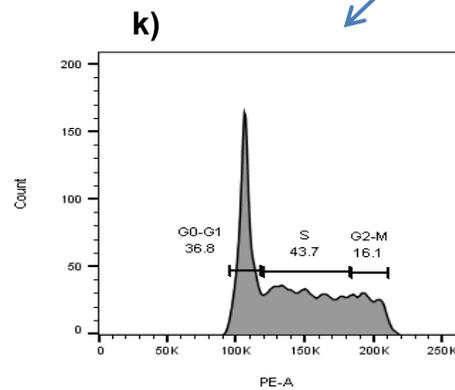
En la imagen se muestra la selección de las células Jurkat no agrupadas.



Ciclo celular en células Jurkat fijadas con etanol.
Se puede observar cada una de las fases del ciclo celular en células sencillas, fijadas con etanol.



Células sencillas
Se muestran células Jurkat no agrupadas.



Ciclo celular en células Jurkat Sin fijación con etanol.
Se observa con claridad cada una de las fases del ciclo celular en células Jurkat no agrupadas, previa fijación con etanol.

Figura 5. Estrategia de análisis: Las células con morfología típica de la línea celular Jurkat (imagen a,c,e) se seleccionaron para la visualización de las fases de ciclo celular, mediante el reactivo Vibrant DyeCycle, se probaron tres concentraciones de dicho reactivo 1 μ l (b), 3 μ l (d) y 5 μ l (f), al igual que lo observado en PBMC'S las fases del ciclo celular carecen de definición, aún en la concentración más alta. En la imagen g se muestra la morfología típica de células Jurkat, a partir de ésta se tomaron las células no agrupadas (h y j); en las imágenes i y k se puede apreciar cada una de las fases de ciclo celular en células fijadas con etanol (i) y en células sin previa fijación (k).

5.3 Efectividad del kit para la determinación de caspasas activadas

Con la finalidad de comprobar la eficacia del kit para la determinación de caspasas activadas, se empleó nigericina, un inductor de piroptosis (mediada por caspasa 1 activada) como control positivo⁴⁵. 500,00 PBMC'S fueron sometidas a un estímulo con nigericina (10 μ M) por un lapso de 12 horas. Como se aprecia en la **figura 6**, el reactivo es capaz de detectar la presencia de caspasa 1 activada, en las células que han muerto por piroptosis.

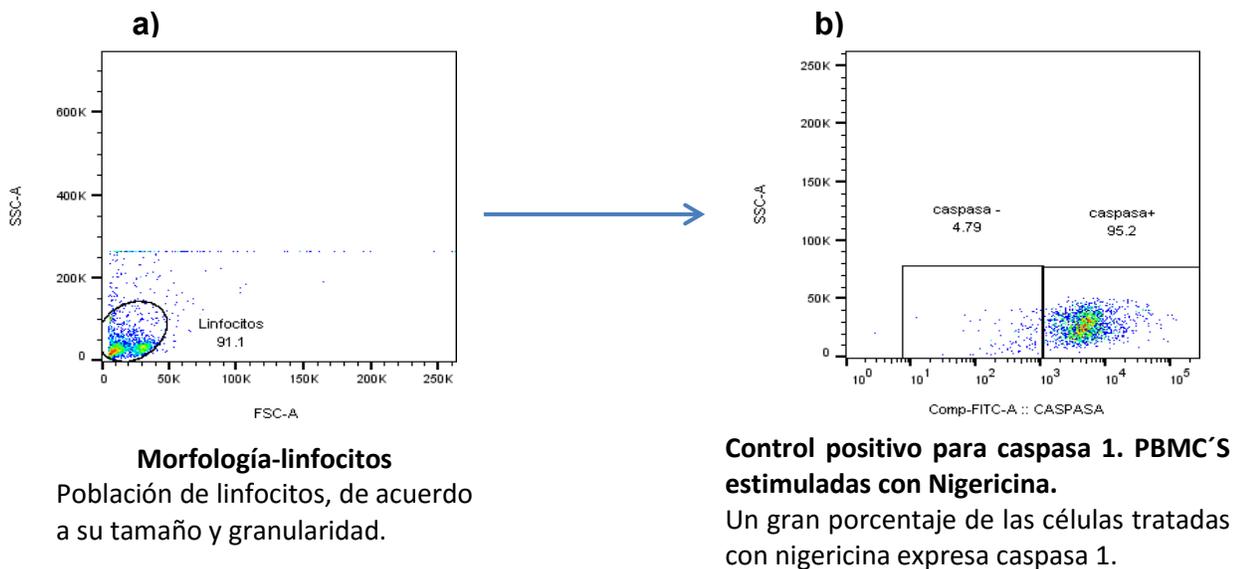
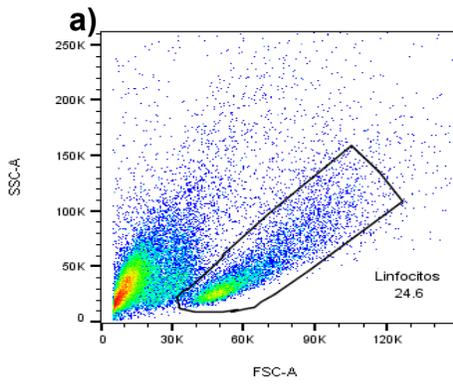


Figura 6. En la imagen **b** se muestra el porcentaje de células con morfología de linfocitos (**a**), que expresan Caspasa 1 activada (95.2%) así como aquellos que no expresan dicha proteína (4.79%).

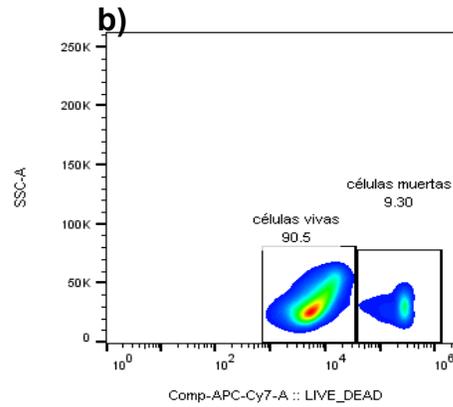
5.4 Prueba de compatibilidad entre la tinción de viabilidad y caspasas activadas

Para implementar la tinción simultánea, de las variables de interés, fue preciso comprobar la compatibilidad de las tinciones, en la **figura 7** se aprecia que la tinción de viabilidad (realizada previo a la tinción para caspasas) no interfiere con la tinción para la determinación de caspasas activadas y viceversa, lo que denota la compatibilidad de las tinciones.



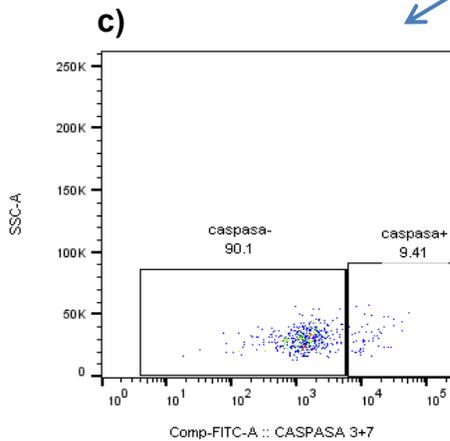
Morfología- linfocitos

Se ha seleccionado a la población de linfocitos de acuerdo a su morfología.



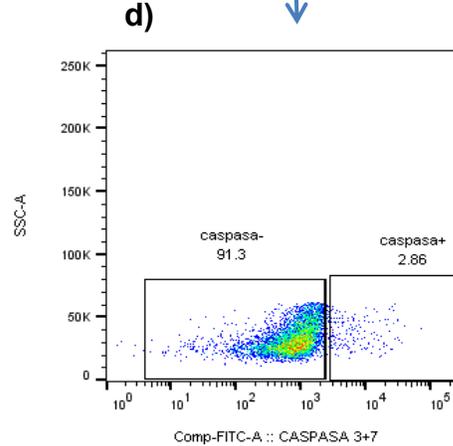
Viabilidad celular

Se observan que hay una mayor proporción de células vivas, respecto a las muertas.



Caspasa 3,7 activadas en células muertas.

Se puede observar que sólo una pequeña proporción de las células muertas expresan caspasa 3,7.



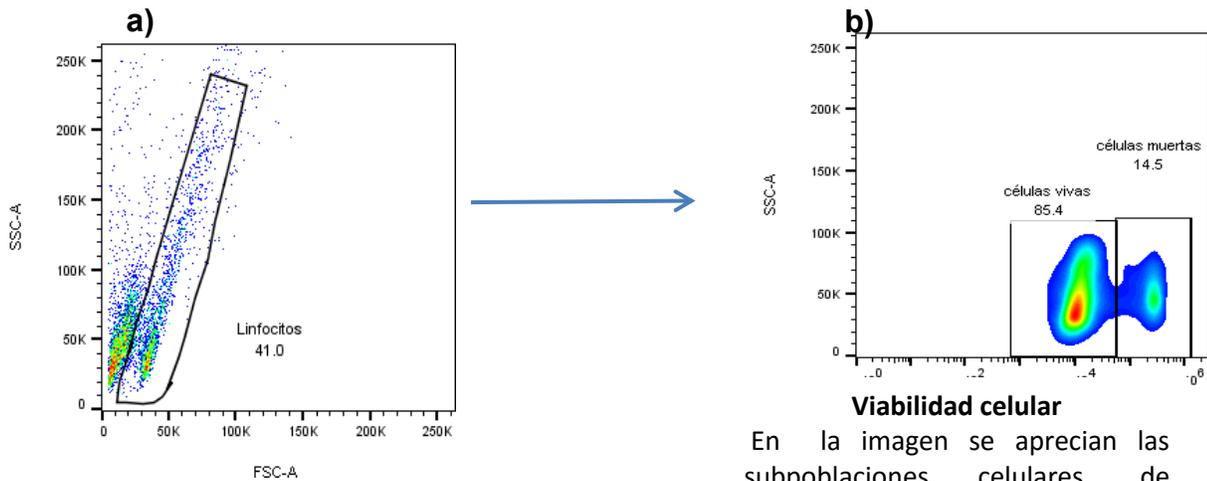
Caspasa 3,7 activadas en células vivas.

Se muestra la proporción de células vivas que expresan caspasa 3,7. Sólo una pequeña proporción de las células está programada para morir por apoptosis.

Figura 7. Se determinó la viabilidad (b) de las células con morfología típica de linfocitos (a); para cada una de las subpoblaciones de la imagen b podemos distinguir la expresión de caspasa 3 y 7 activadas (imagen c y d respectivamente).

5.5 Compatibilidad entre las tinciones de viabilidad y ciclo celular

Una vez comprobada la compatibilidad entre la tinción de viabilidad y caspasas activadas, se prosiguió a la determinación de la compatibilidad entre la determinación de ciclo celular y viabilidad, en la **figura 8** se puede apreciar que no hay interferencia entre ambas tinciones, es decir: la determinación de ciclo celular así como la de caspasas activadas, son compatibles con la tinción para viabilidad celular.

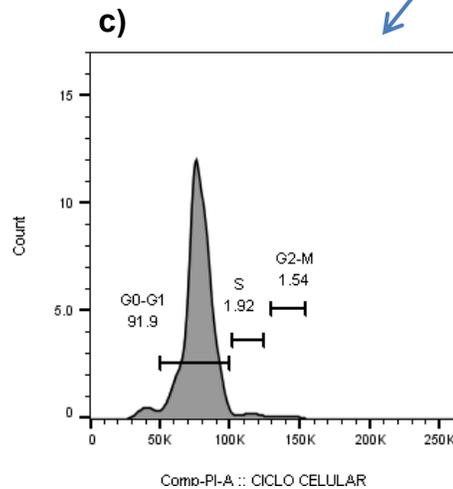


Morfología- linfocitos

Población de linfocitos según su morfología.

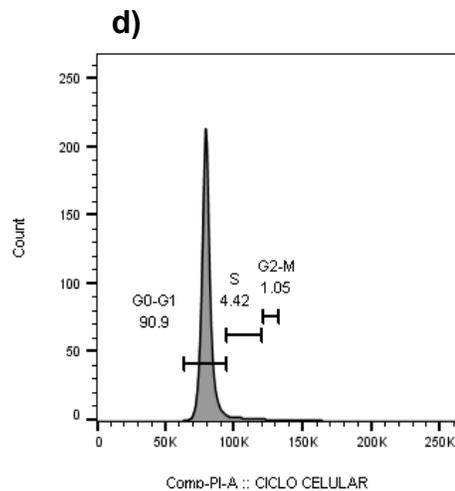
Viabilidad celular

En la imagen se aprecian las subpoblaciones celulares, de acuerdo a su viabilidad.



Células muertas- ciclo celular

En la imagen se aprecia cada una de las fases del ciclo celular. La mayoría de las células se encuentran en la fase G0-G1.



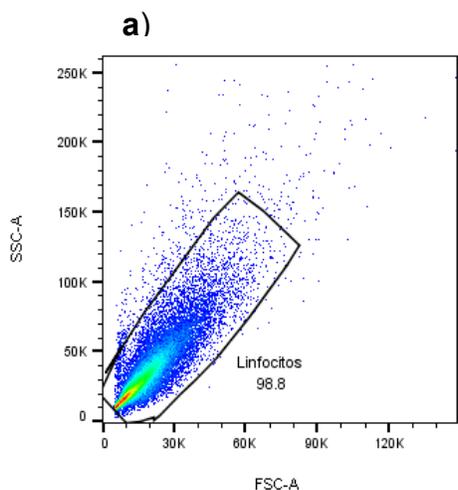
Células vivas- ciclo celular

Gran parte de las células vivas se encuentran en la fase G0-G1 del ciclo celular.

Figura 8: Se determinó la viabilidad (**b**) de las células con morfología típica de linfocitos (**a**); para cada una de las subpoblaciones de la imagen **b** podemos observar el histograma para ciclo celular (en **c** células vivas y en **d** células muertas). Con esta tinción se demuestra la compatibilidad de la tinción de viabilidad y ciclo celular (empleando PI). A pesar de que sólo se aprecia la fase G0-G1 del ciclo celular, la imagen es muy definida.

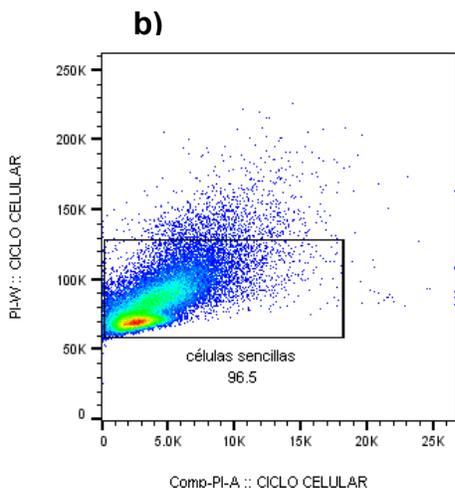
5.6 Viabilidad → ciclo celular → caspasas

Una vez que se estableció la compatibilidad entre las tinciones, se optó por hacer la determinación simultánea de las tinciones de acuerdo con el siguiente orden: viabilidad seguida de ciclo celular y finalmente determinación de caspasas activadas. Cabe mencionar que dicha determinación se realizó en PBMC'S; en la **figura 9** se observa que la determinación de viabilidad y caspasas activadas fueron exitosas, no así para el caso de ciclo celular, en el que no se aprecian las fases del ciclo. Las observaciones ya mencionadas llevaron a la conclusión de una evidente interferencia entre las tinciones, probablemente asociada al orden en que éstas se realizaron.



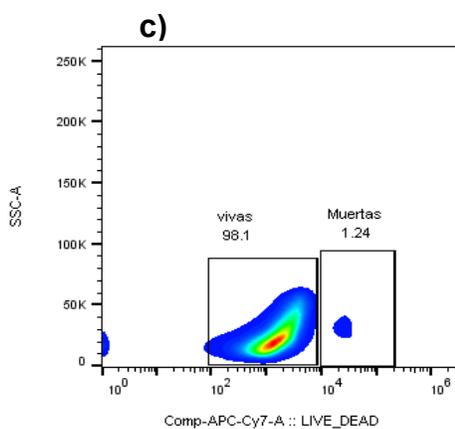
Morfología- linfocitos

Se ha seleccionado la población de linfocitos según su morfología.



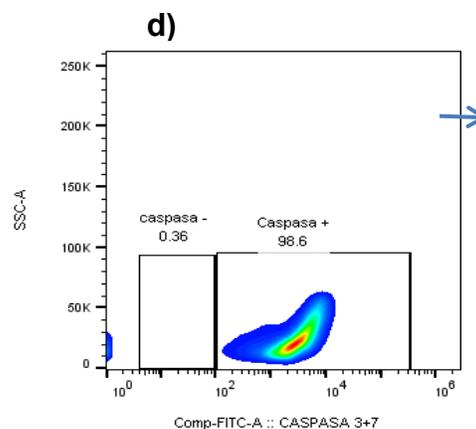
Células sencillas

Selección de las células no agrupadas.



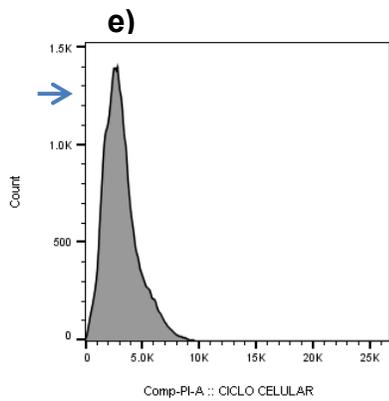
Viabilidad celular

Se aprecia que prácticamente todas las células adquiridas se encontraban vivas.



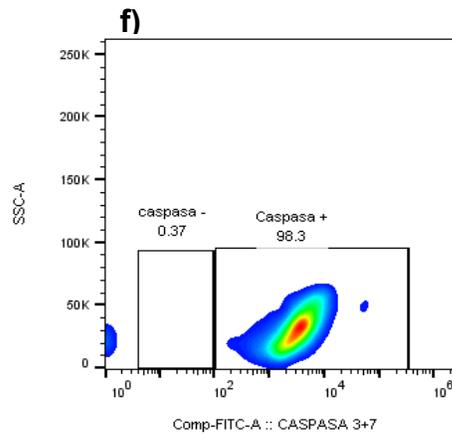
Caspasas 3,7 activadas en células vivas

A pesar de que las células vivas son la población mayoritaria, un gran porcentaje de estas están programadas para morir por apoptosis.



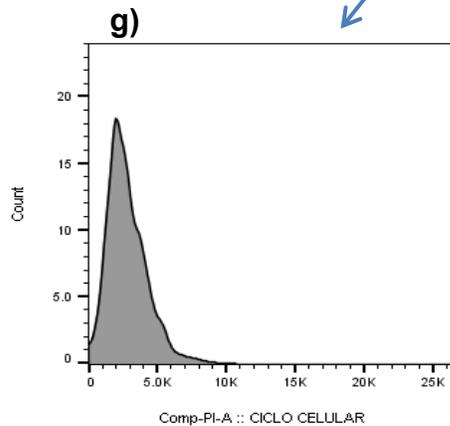
Células vivas- ciclo celular

Se observa que gran parte de las células vivas se encuentran en la fase G0-G1 del ciclo celular.



Caspasa 3,7 activadas en células muertas

Un gran porcentaje de las células murió por apoptosis.



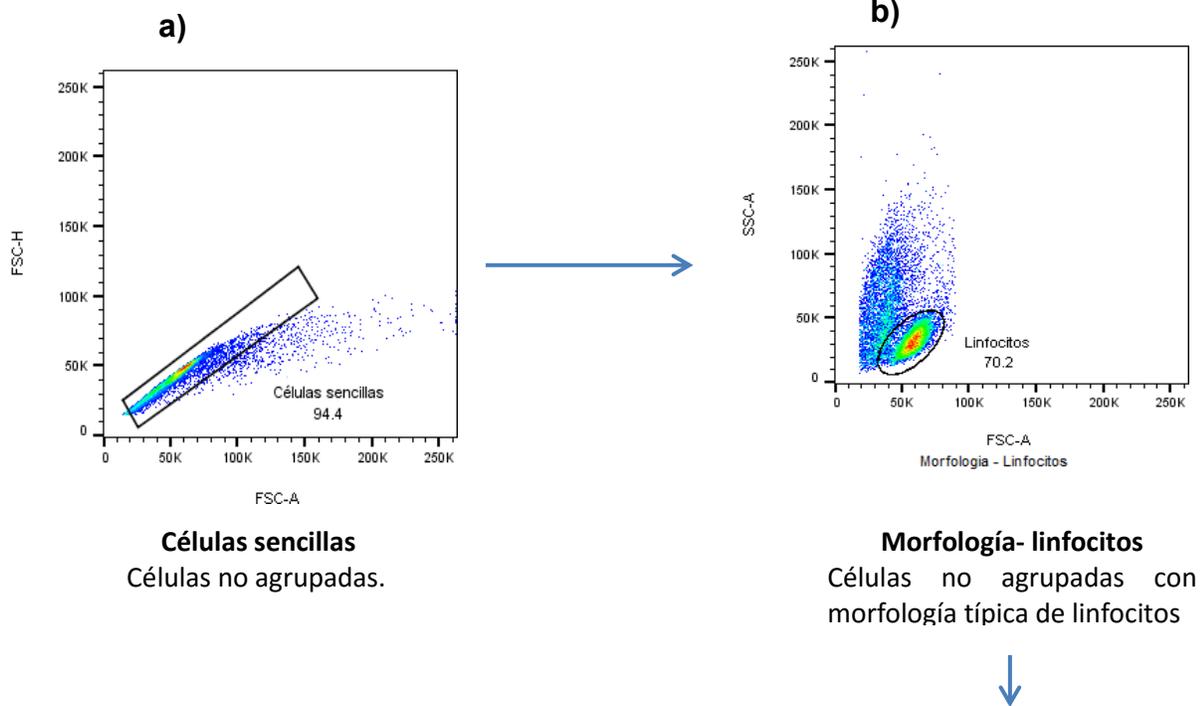
Células muertas- ciclo celular

Las células muertas se encontraban mayoritariamente en la fase G0-G1 del ciclo celular.

Figura 9. Estrategia de análisis. A partir de células no agrupadas (b) con morfología de linfocitos (a), se determinó la viabilidad celular (c) y a partir de cada una de las subpoblaciones (células vivas y muertas) se observó la presencia de las caspasas 3,7 activadas (d, e) así como las fases de ciclo celular (f y g). En lo que respecta a las imágenes de ciclo celular, no se observan las fases del ciclo, lo cual no es atribuible al reactivo empleado (PI), y por lo tanto se asocia al orden en que se realizaron las tinciones.

5.7 Resultados sorting

Sí bien, aún no se establecía el orden que permitiría la implementación simultánea de las tres tinciones, era necesario además, determinar la metodología más adecuada, en cuanto a eficacia y pureza, para la separación de las células de interés (linfocitos TCD4⁺ de memoria centrales). Uno de los métodos mejor establecidos en el grupo de trabajo, para la separación celular, es sorting por citometría de flujo, pues permite la purificación de poblaciones celulares con porcentajes de pureza superiores al 90%. En la **figura 11** se aprecia la estrategia de gating empleada para acotar a la población de interés.



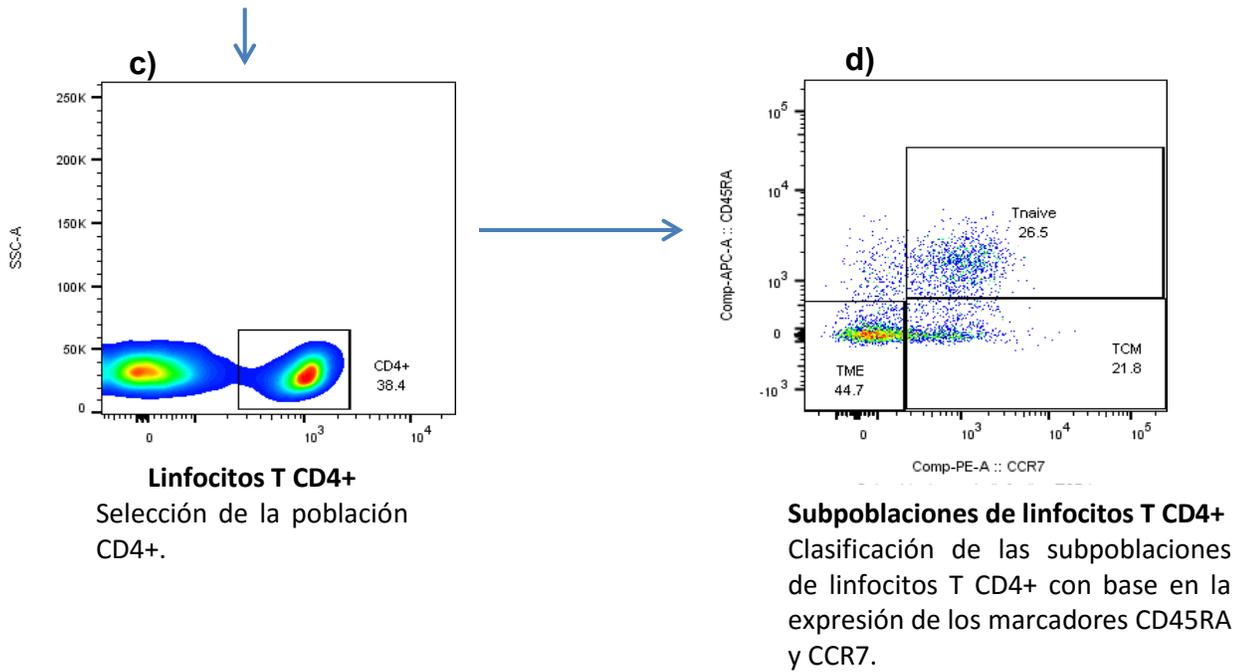
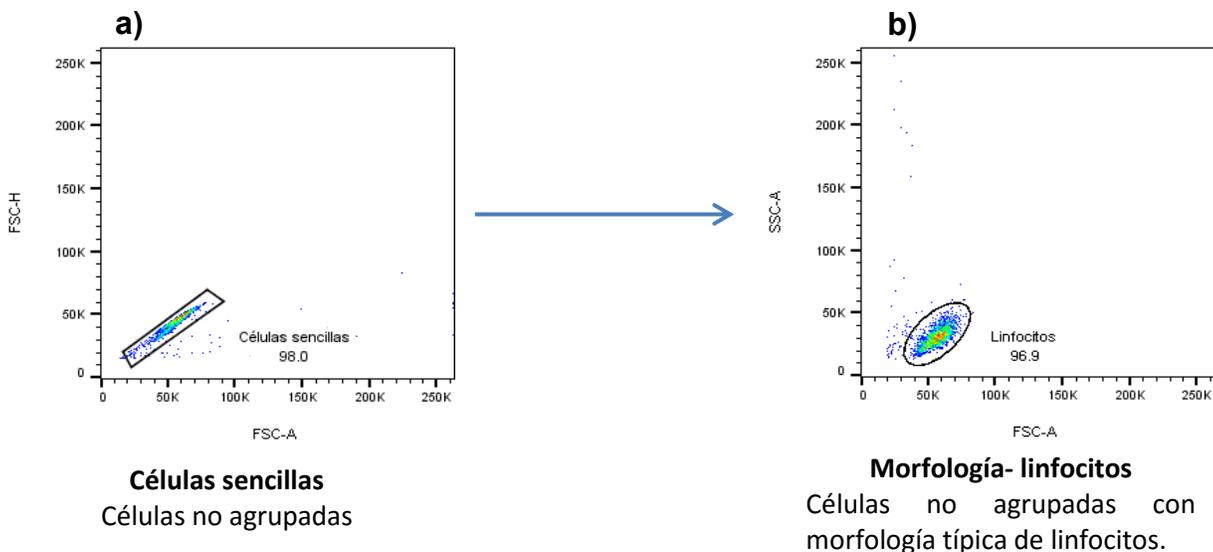


Figura 11. Estrategia de gating. A partir de células no agrupadas (a) se seleccionaron aquellas que muestran morfología típica de linfocitos (b) y a partir de esta población se seleccionaron aquellas células que expresan el marcador CD4 (c), esta última población se puede clasificar en subpoblación de memoria, con base en la expresión de los marcadores CD45RA y CCR7 (d).

5.8 Resultados post- sorting

Después de la purificación, se evaluó la pureza de la población que como se observa en la **figura 12**, resultó ser de un 96.2 %.



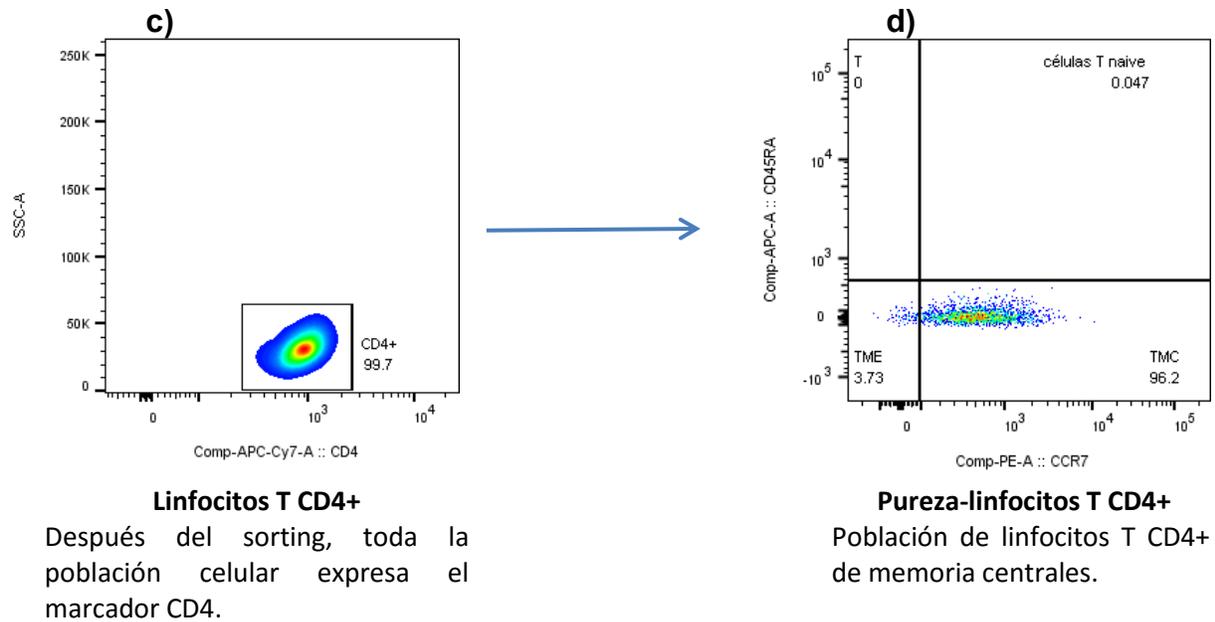


Figura 12. Estrategia de gating post-sorting. De las células no agrupadas (a) con morfología típica de linfocitos (b), un 99.7% fueron positivas para el marcador CD4 (c), de esta subpoblación el 96.2% se clasifican como células de memoria centrales (CD45RA⁺, CCR7⁺).

5.9 Purificación por columna

Si bien es cierto que, el sorting representa una gran herramienta para la purificación de la población de interés, debido al alto porcentaje de pureza de las células, presenta la desventaja de ser un método tardado. Dada la situación antes descrita, se optó por implementar una herramienta distinta para la purificación. Las células de memoria centrales se purificaron mediante separación inmunomagnética con un Kit diseñado específicamente para dicho fin. En la **figura 13** se puede observar que la purificación fue muy eficiente, obteniendo una pureza del 96.2 % al igual que en la purificación por sorting además de que experimentalmente es un método más rápido.

Como ya se ha destacado, la purificación por columna es el método más eficaz para la separación de las células de interés, por lo que se implementó en las purificaciones subsiguientes

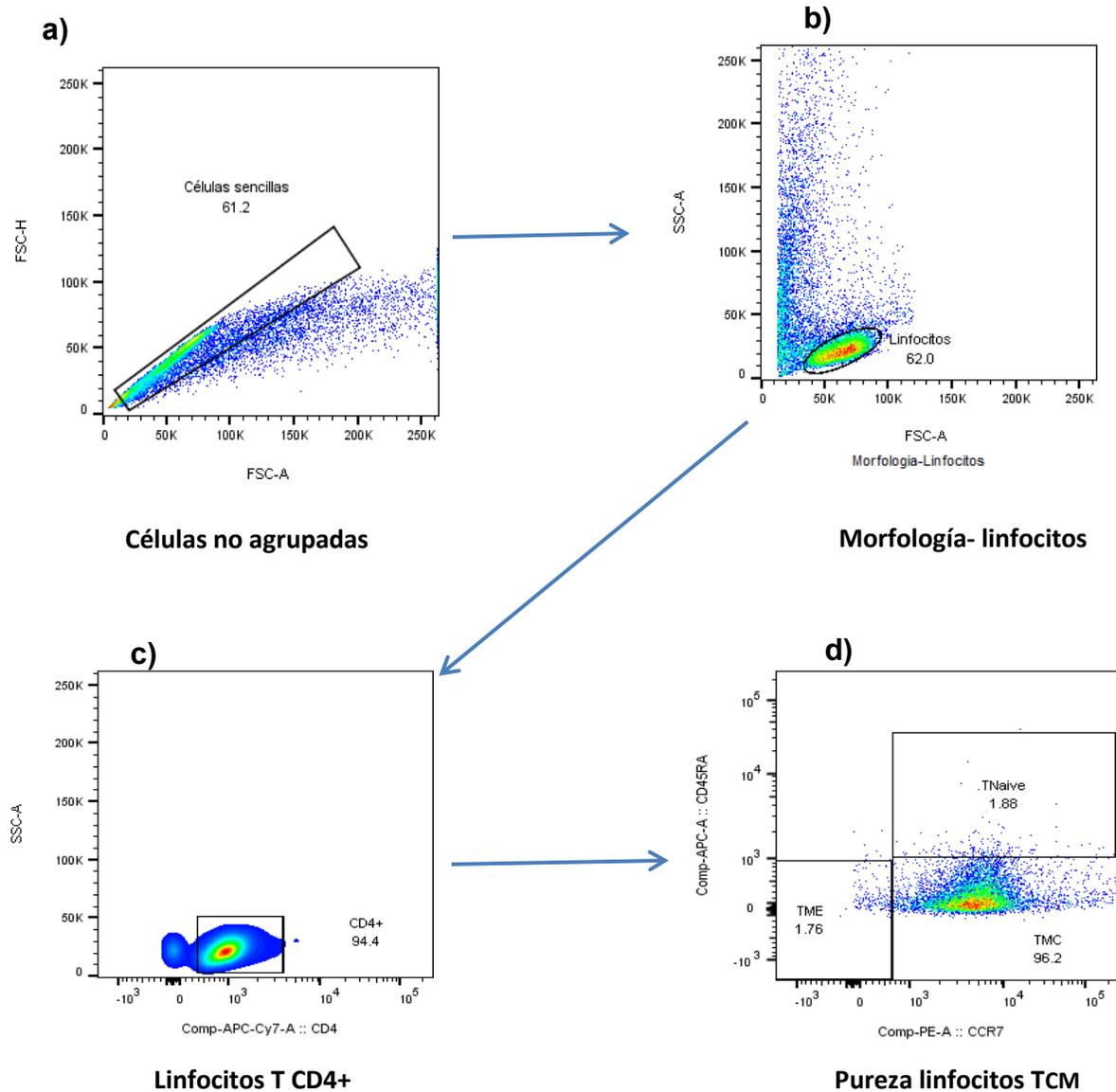


Figura 13: Estrategia de gating. A partir de células no agrupadas (a) se seleccionaron aquellas que muestran morfología típica de linfocitos (b) y a partir de esta población se seleccionaron aquellas células que expresan el marcador CD4 (c), a partir de ésta población se puede identificar a las células T de memoria centrales, por la coexpresión de los

marcadores CD45RA y CCR7. Como se aprecia en la imagen (d) las células de memoria centrales representan el 96.2% de la población.

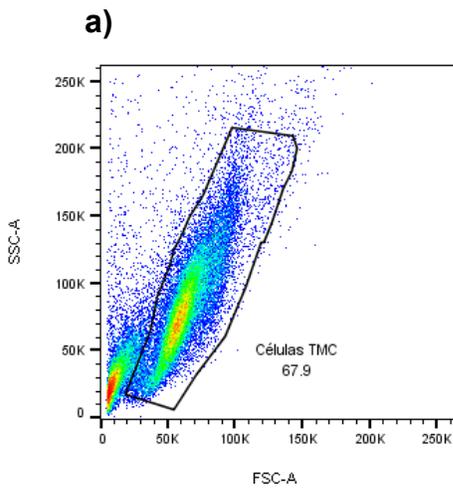
5.10 Viabilidad, caspasas, ciclo celular

Una vez establecido el método de purificación para las células T CD4⁺ de memoria centrales, se prosiguió a determinar el orden específico que permitiría el análisis simultáneo de las variables de interés, en esta ocasión se empleó el siguiente orden para las tinciones: en primer lugar viabilidad, posteriormente la determinación de caspasas activadas y finalmente ciclo celular, en esta ocasión se emplearon linfocitos de memoria centrales.

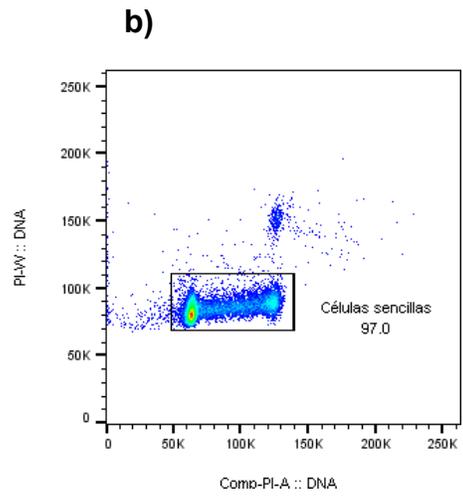
En la **figuras 14 y 15** se puede apreciar que, el orden en el que se realizó las tinciones fue determinante para la compatibilidad de todas ellas, en este caso se logra visualizar cada una de las fases del ciclo celular, la viabilidad celular y la presencia de caspasas activadas.

El éxito de la tinción permite determinar la presencia de caspasas activadas tanto en células vivas (que están destinadas a morir) como en células muertas, además de identificar la fase del ciclo celular en la que se encuentran las células vivas o en la que se encontraban las células previo a su muerte.

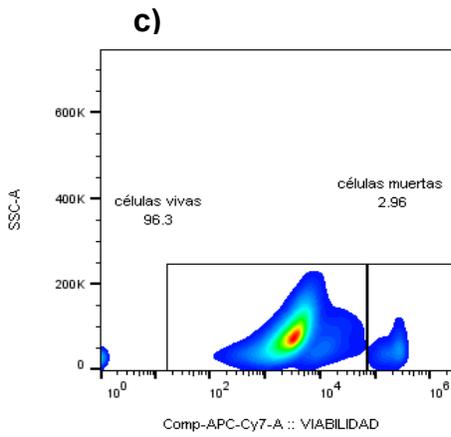
Caspasa 1



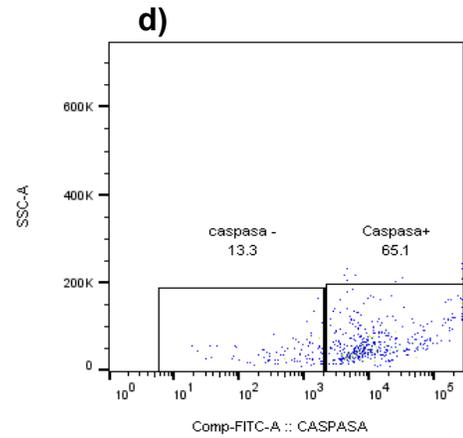
Morfología- células TCM



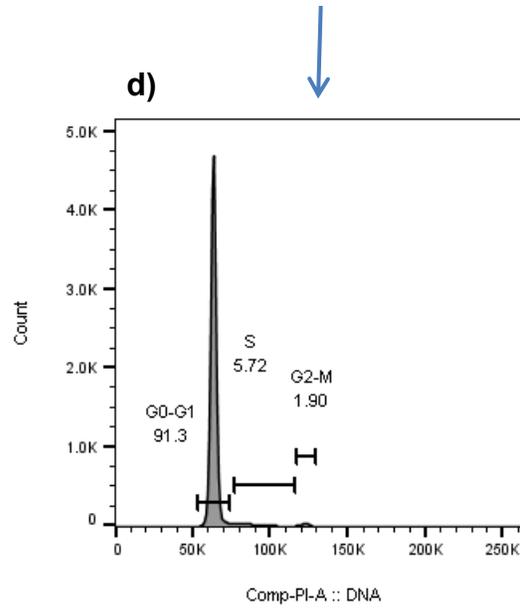
Células sencillas



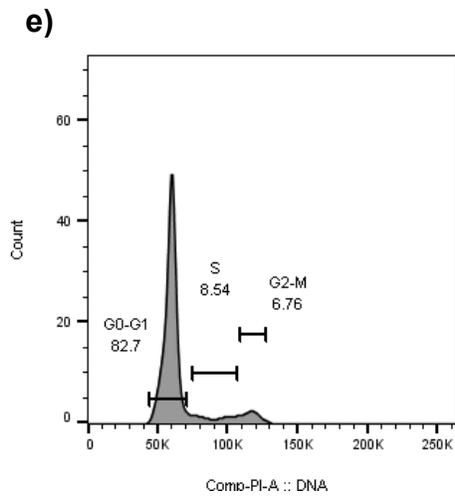
Viabilidad celular



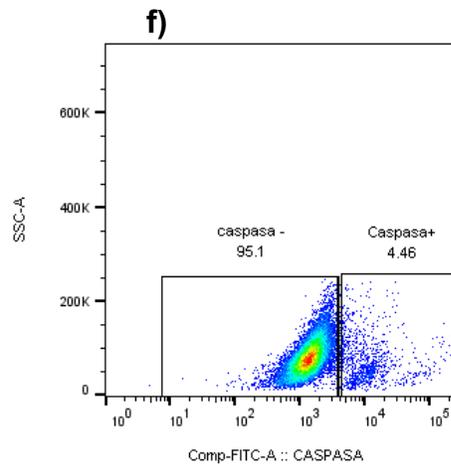
Caspasa 1 activada en células muertas



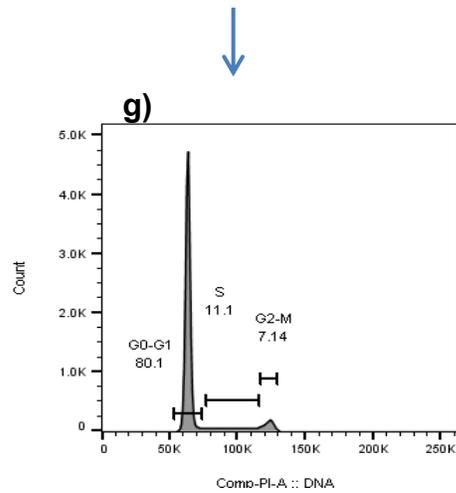
Células vivas- ciclo celular



Células muertas- ciclo celular



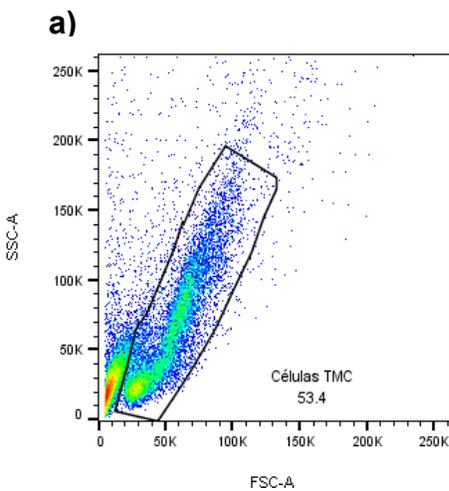
Caspasa 1 activada en células vivas



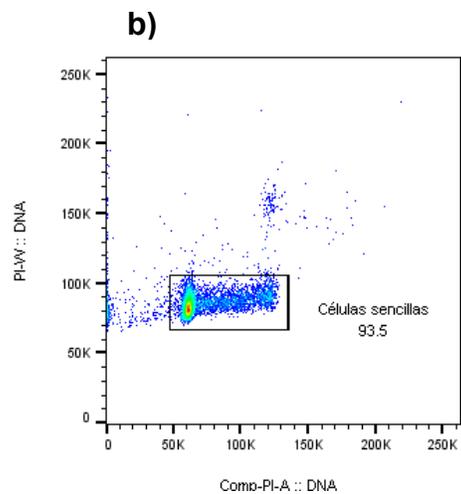
Células vivas- ciclo celular

Figura 14: A partir de células T_{CM} (a) no agrupadas (b) se determinó la viabilidad celular, se encontró que el porcentaje de viabilidad fue del 96.3 % (c). Se realizó la determinación de caspasa 1 activada tanto en células muertas (d) como en células vivas (f). De igual forma, se evaluaron las fases del ciclo celular en células muertas (e) y en células vivas (g).

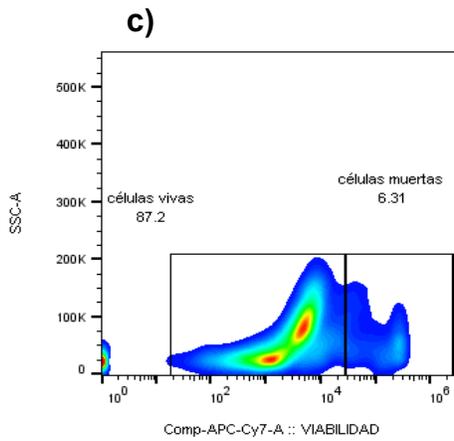
Caspasa 3



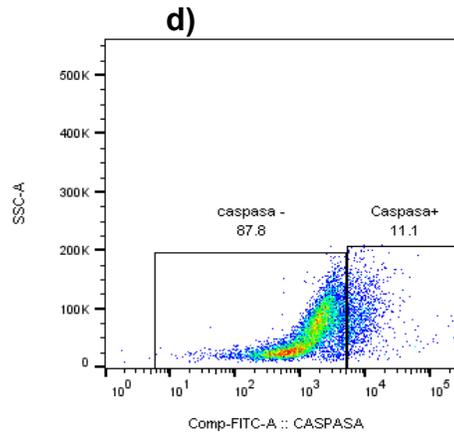
Morfología – células TCM



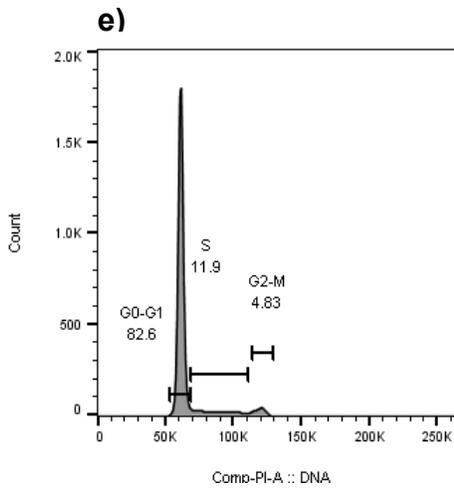
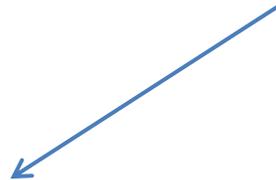
Células sencillas



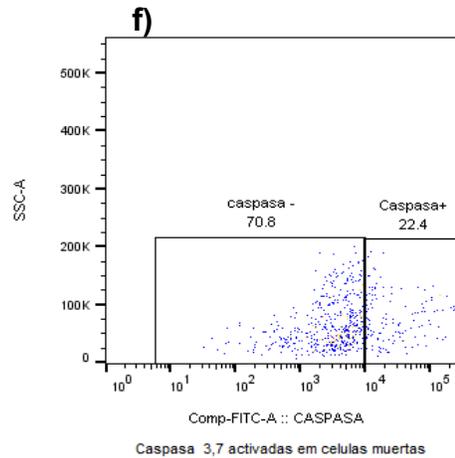
Viabilidad celular



Caspasa 3,7 activadas en células vivas

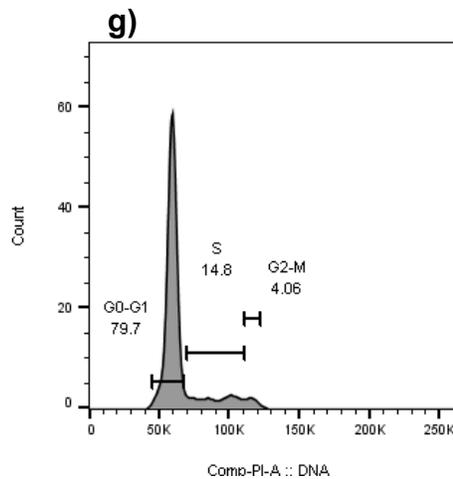


Células vivas- ciclo celular



Caspasa 3,7 activadas en células muertas





Células muertas ciclo celular

Figura 14: A partir de células T_{CM} (a) no agrupadas (b) se determinó la viabilidad celular, se encontró que el porcentaje de viabilidad fue del 87.2% (c). Se realizó la determinación de caspasa 1 activada tanto en células vivas (d) como en células muertas (f). De igual forma, se evaluaron las fases del ciclo celular en células vivas (e) y en células muertas (g).

6. Discusión de resultados

El interés de realizar de forma simultánea la determinación de viabilidad, caspasas activadas y fases del ciclo celular surge de la necesidad de contestar la interrogante: ¿Cómo están muriendo las células TCD4⁺ de memoria centrales de los pacientes VIH⁺? La tinción de viabilidad permite identificar si las células se encontraban vivas o muertas en el momento del análisis, mientras que la identificación de las caspasas 3 o 1 proporciona información sobre el tipo de proceso que está mediando la muerte celular; la presencia de caspasa 3,7 se asocia a apoptosis en tanto que la piroptosis es mediada por la caspasa 1 activada; un aumento en el porcentaje de células localizadas en determinada fase del ciclo celular, se puede asociar a arresto celular en dicha fase; el contenido de DNA determinado por citometría de flujo se define como ploidía del ADN o índice de ADN (DI), en células euploides (no tumorales) la fase G0/G1 tienen un DI=1, las células en G2/M tienen un DI=2, mientras que las células en fase S se caracterizan por $1 < DI < 2^{47}$.

Durante mucho tiempo se ha empleado la unión de anexina V junto con la tinción vital con PI para distinguir entre células vivas, apoptóticas y muertas, con base en la permeabilidad de la membrana celular⁴⁷. Las células vivas presentan una membrana intacta que impide la entrada de PI, mientras que las células apoptóticas y necróticas muestran cambios en la permeabilidad de la membrana. En células apoptóticas tardías el incremento en la permeabilidad de los poros nucleares permite que incluso grandes complejos proteicos ingresen al núcleo⁴⁸. De esta manera el yoduro de propidio puede ingresar en las células apoptóticas y necróticas e intercalarse en el DNA, en tanto que la anexina V se une específicamente a fosfatidilserina en una reacción dependiente de calcio. La fosfatidilserina es un fosfolípido que se localiza en el interior de la bicapa lipídica, sin embargo cuando se desencadena el proceso de apoptosis ésta migra a la capa externa de dicha membrana⁴⁹.

Recientemente se ha demostrado que este método genera un número significativo de falsos positivos⁵⁰; además es de nuestro particular interés determinar el tipo específico de muerte asociado a la muerte de las células TCD4+ de memoria centrales. Estas razones nos llevaron a buscar un método alternativo para la determinación diferencial de apoptosis y piroptosis. Las caspasas se expresan constitutivamente como precursores, mismos que son activados por procesamientos proteolíticos. El modelo actual toma en cuenta que las caspasas se activan en una cascada proteolítica que incluye caspasas iniciadoras y efectoras, activadoras e inhibidoras. Mientras que las caspasas efectoras son específicas para cada vía de muerte celular, las caspasas iniciadoras son compartidas⁵¹.

La vía de apoptosis es iniciada por la escisión de la caspasa 8 o 9⁵². En el caso de la piroptosis, ésta es dependiente de la caspasa efectora 1 que es capaz de transformar a la pro IL-1 β y pro IL-18 en sus formas maduras (IL-1 β e IL-18, potentes mediadores de inflamación)^{53,54,55}, ocasiona lisis celular y con ello la liberación del contenido intracelular originando un ambiente inflamatorio.⁵⁶ Es preciso aclarar que la caspasa 1 no está involucrada en el proceso de apoptosis, y ninguna de las caspasas apoptóticas están involucradas en la vía de la piroptosis⁵⁶. Las consideraciones antes descritas nos permiten aseverar que, ésta determinación es una alternativa al método convencional (Anexina V y PI) que evitará resultados falsos positivos.

Una duda razonable que surge al instante es, los reactivos empleados para la determinación de caspasas activadas son realmente específicos para cada una de ellas. Esta duda se ha aclarado en otros trabajos en los que se emplearon estaurosporina como inductor de apoptosis y nigericina para inducir piroptosis, posteriormente determinaron la presencia de ambas caspasas activadas, encontraron que la caspasa 3 activada se observa en mayor proporción en las células tratadas con estaurosporina. De forma análoga, en las células tratadas con nigericina se observó una mayor proporción en la expresión de caspasa 1 activada respecto a la caspasa 3⁴⁵.

En lo que respecta a Vibrant DyeCycle (reactivo empleado para determinar ciclo celular), desconocemos las causas de su ineficacia para la visualización de las fases de ciclo celular en nuestro modelo experimental; sin embargo, PI resultó ser una excelente opción para este fin. Como se observa en la figura 5i y 5k este reactivo permite la visualización clara de cada una de las fases del ciclo celular. Cabe aclarar que en la tinción para la determinación de ciclo celular con PI, se emplea RNasa pues el yoduro de propidio es capaz de intercalarse también en el RNA⁵⁷. El uso de células Jurkat para la estandarización de PI se justifica por el hecho de que al ser una línea celular, poseen una alta capacidad proliferativa. Además se han reportado estudios en los que se emplea esta línea celular en ensayos de arresto en ciclo celular, rastreándolo con PI⁵⁸. Como ya se ha mencionado, la membrana de las células vivas impide el paso de PI hacia el interior de la célula, por lo que es necesario realizar un tratamiento a las células previo a la tinción de PI. Dentro de los reactivos empleados comúnmente para fijar células se encuentran el metanol (0.5-1 %), el paraformaldehído (0.25%) y etanol (70-80%)⁵⁹.

Nosotros empleamos metanol y etanol al 70% y encontramos que la mejor opción para los fines de este estudio, era emplear etanol al 70%. Una vez estandarizada la tinción de PI en Jurkat, fue necesario estandarizar dicha tinción en PBMC'S, debido a que las células Jurkat presentan una ploidía heterogénea⁶⁰.

El orden adecuado para cada una de las tinciones resultó ser crítico y se determinó bajo las siguientes consideraciones: el principio del reactivo empleado para determinar viabilidad (Live/dead) es su unión a grupos amino libres, en la superficie de células vivas y en el interior de las células cuya membrana ha sido dañada. El reactivo empleado para la

determinación de apoptosis (caspasa 3) o piroptosis (caspasa 1), se une específicamente al sitio activo de cada una de las caspasas activadas al interior de la célula. El PI se une al DNA localizado en el interior de la célula.

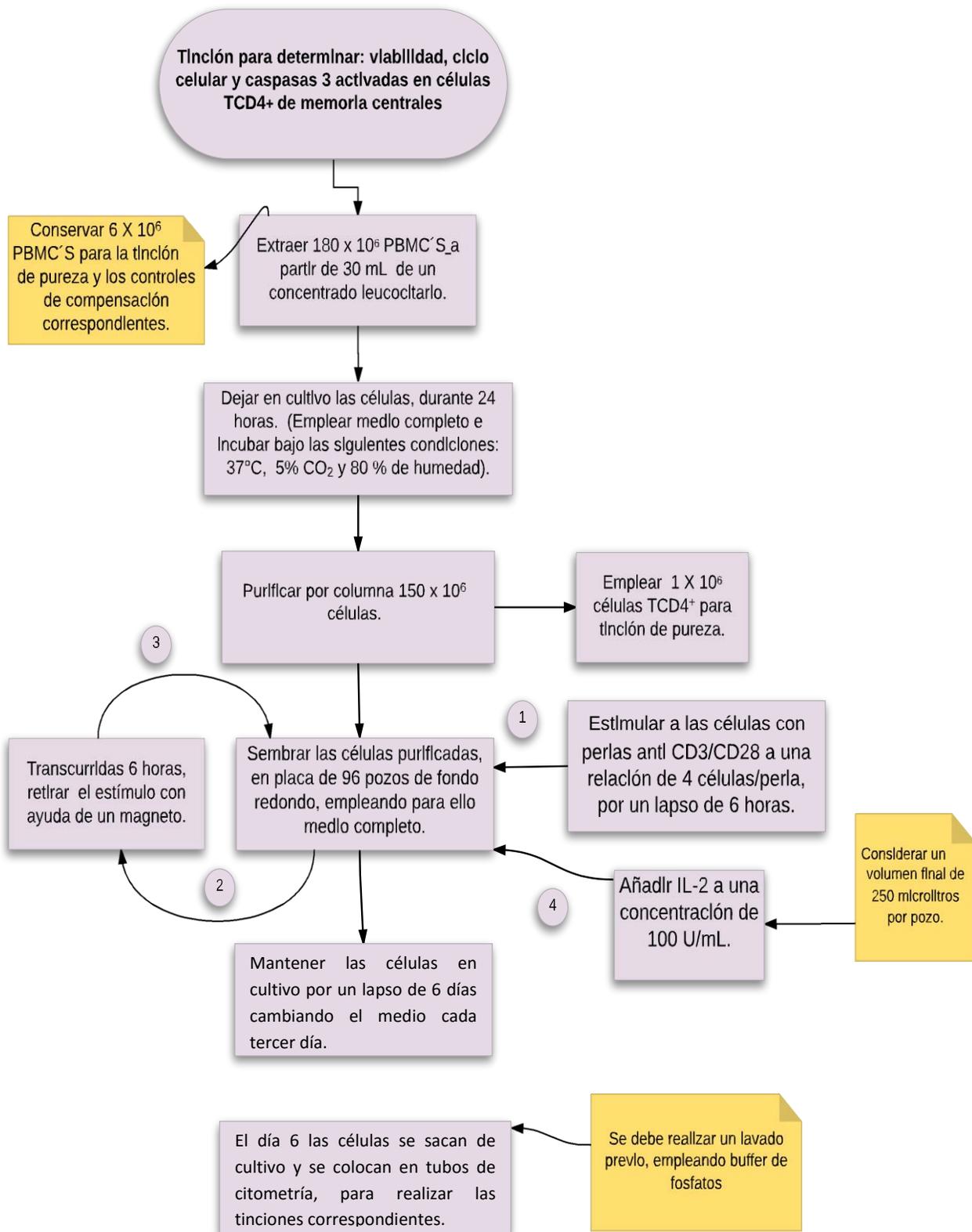
Una vez aclarado el principio de cada uno de los reactivos, se puede notar que el orden efectivo para las tinciones es realizar en primer lugar la tinción extracelular (viabilidad), seguida de las tinciones intracelulares (caspasas activadas y ciclo celular). En el primer ensayo que se realizó se empleó el siguiente orden: tinción de viabilidad, seguida de ciclo celular y finalmente la determinación para caspasas (Fig.9), se observó que esta secuencia impedía la visualización de las fases de ciclo celular, una probable explicación de ello es que la incubación para caspasas se realizó a 37°C, lo que pudo ocasionar la degradación del yoduro de propidio.

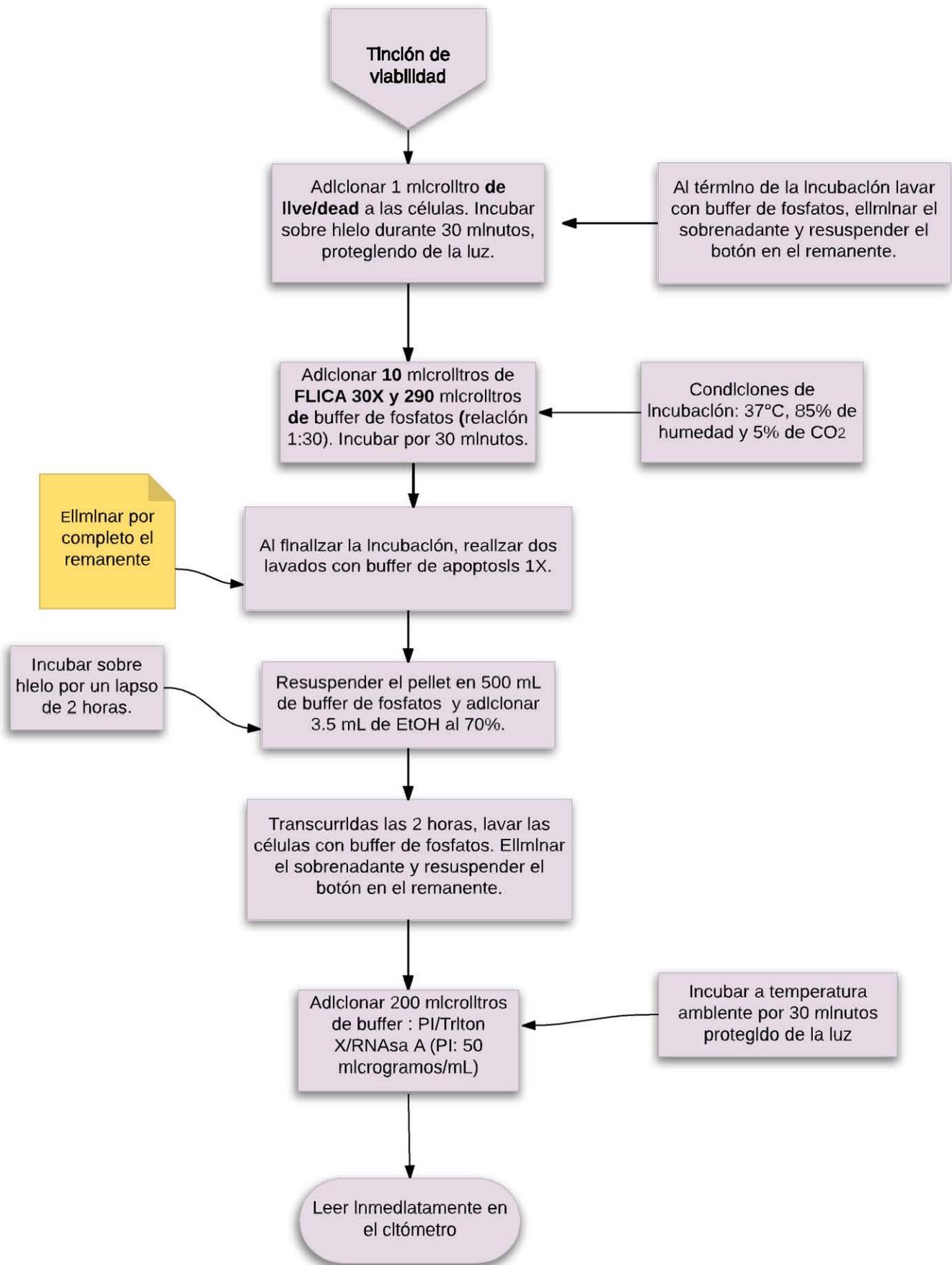
Se optó por invertir el orden de las tinciones para caspasas activadas y ciclo celular (Fig. 14 y 15), este cambio solucionó el inconveniente presentado con anterioridad. Esto comprueba la hipótesis planteada, pues se demostró que en efecto, el orden de las tinciones es determinante para el éxito de la tinción múltiple.

7. Conclusión

Se logró estandarizar una metodología que permite la determinación simultánea de viabilidad, ciclo celular y apoptosis o piroptosis en células T CD4+ de memoria centrales. El método desarrollado es confiable, sensible y reproducible, por lo que podrá ser empleado para el análisis de células T_{CM} de pacientes VIH+, en un estudio que pretende abordar una vía de muerte celular distinta a la apoptosis y su implicación en la pérdida de las células T_{CM} en la infección por VIH.

A continuación se muestra un esquema general de la metodología desarrollada.





Bibliografía

-
- ¹ “OMS | VIH/SIDA,” accessed March 29, 2016, http://www.who.int/topics/hiv_aids/es/.
- ² “[Http://www.censida.salud.gob.mx/](http://www.censida.salud.gob.mx/)”.
- ³ Zandrea Ambrose and Christopher Aiken, “HIV-1 Uncoating: Connection to Nuclear Entry and Regulation by Host Proteins,” *Virology* 0 (April 2014): 371–79, doi:10.1016/j.virol.2014.02.004.
- ⁴ Gary Maartens, Connie Celum, and Sharon R Lewin, “HIV Infection: Epidemiology, Pathogenesis, Treatment, and Prevention,” *The Lancet* 384, no. 9939 (n.d.): 258–71, doi:10.1016/S0140-6736(14)60164-1.
- ⁵ http://viralzone.expasy.org/all_by_species/5183.html. accessed February 18, 2016
- ⁶ John A G Briggs et al., “The Stoichiometry of Gag Protein in HIV-1,” *Nature Structural & Molecular Biology* 11, no. 7 (July 2004): 672–75, doi:10.1038/nsmb785.
- ⁷ Afam A. Okoye and Louis J. Picker, “CD4(+) T-Cell Depletion in HIV Infection: Mechanisms of Immunological Failure,” *Immunological Reviews* 254, no. 1 (July 2013): 54–64, doi:10.1111/imr.12066.
- ⁸ Louis J Picker et al., “Insufficient Production and Tissue Delivery of CD4(+)Memory T Cells in Rapidly Progressive Simian Immunodeficiency Virus Infection,” *The Journal of Experimental Medicine* 200, no. 10 (November 15, 2004): 1299–1314.
- ⁹ Alan Engelman and Peter Cherepanov, “The Structural Biology of HIV-1: Mechanistic and Therapeutic Insights,” *Nature Reviews. Microbiology* 10, no. 4 (March 16, 2012): 279–90, doi:10.1038/nrmicro2747.
- ¹¹ Lawrence Kleiman, “tRNA(Lys3): The Primer tRNA for Reverse Transcription in HIV-1,” *IUBMB Life* 53, no. 2 (February 2002): 107–14, doi:10.1080/15216540211469.
- ¹² Stefan G Sarafianos et al., “Structure and Function of HIV-1 Reverse Transcriptase: Molecular Mechanisms of Polymerization and Inhibition,” *Journal of Molecular Biology* 385, no. 3 (January 23, 2009): 693–713, doi:10.1016/j.jmb.2008.10.071.
- ¹³ Engelman and Cherepanov, “The Structural Biology of HIV-1: Mechanistic and Therapeutic Insights.”
- ¹⁴ Benigno Rodríguez et al., “Predictive Value of Plasma HIV RNA Level on Rate of CD4 T-Cell Decline in Untreated HIV Infection,” *JAMA* 296, no. 12 (September 27, 2006): 1498–1506, doi:10.1001/jama.296.12.1498.
- ¹⁵ Daniel C. Douek, Louis J. Picker, and Richard A. Koup, “T Cell Dynamics in HIV-1 Infection,” *Annual Review of Immunology* 21 (2003): 265–304, doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.141053.
- ¹⁶ T. H. Finkel et al., “Apoptosis Occurs Predominantly in Bystander Cells and Not in Productively Infected Cells of HIV- and SIV-Infected Lymph Nodes,” *Nature Medicine* 1, no. 2 (February 1995): 129–34, doi:10.1038/nm0295-129.
- ¹⁷ W. van Raamsdonk et al., “Quantitative Cytochemical Analysis of Cytochrome Oxidase and Succinate Dehydrogenase Activity in Spinal Neurons,” *Acta Histochemica* 81, no. 2 (1987): 129–41, doi:10.1016/S0065-1281(87)80001-6.

-
- ¹⁸ Peter W. Hunt et al., "T Cell Activation Is Associated with Lower CD4⁺ T Cell Gains in Human Immunodeficiency Virus–Infected Patients with Sustained Viral Suppression during Antiretroviral Therapy," *The Journal of Infectious Diseases* 187, no. 10 (May 15, 2003): 1534–43, doi:10.1086/374786.
- ¹⁹ Ana E. Sousa et al., "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," *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 169, no. 6 (September 15, 2002): 3400–3406.
- ²⁰ S. R. Broussard et al., "Simian Immunodeficiency Virus Replicates to High Levels in Naturally Infected African Green Monkeys without Inducing Immunologic or Neurologic Disease," *Journal of Virology* 75, no. 5 (March 2001): 2262–75, doi:10.1128/JVI.75.5.2262-2275.2001.
- ²¹ Anne-Sophie Beignon et al., "Endocytosis of HIV-1 Activates Plasmacytoid Dendritic Cells via Toll-like Receptor-Viral RNA Interactions," *The Journal of Clinical Investigation* 115, no. 11 (November 2005): 3265–75, doi:10.1172/JCI26032.
- ²² Angela Meier et al., "MyD88-Dependent Immune Activation Mediated by Human Immunodeficiency Virus Type 1-Encoded Toll-like Receptor Ligands," *Journal of Virology* 81, no. 15 (August 2007): 8180–91, doi:10.1128/JVI.00421-07.
- ²³ Teja Celhar et al., "TLR7 and TLR9 Ligands Regulate Antigen Presentation by Macrophages," *International Immunology*, November 13, 2015, doi:10.1093/intimm/dxv066.
- ²⁴ Jason M. Brechley, David A. Price, and Daniel C. Douek, "HIV Disease: Fallout from a Mucosal Catastrophe?," *Nature Immunology* 7, no. 3 (March 2006): 235–39, doi:10.1038/ni1316.
- ²⁵ Andrew Yates et al., "Understanding the Slow Depletion of Memory CD4⁺ T Cells in HIV Infection," *PLoS Medicine* 4, no. 5 (May 2007): e177, doi:10.1371/journal.pmed.0040177.
- ²⁶ Mirko Paiardini and Michaela Müller-Trutwin, "HIV-Associated Chronic Immune Activation," *Immunological Reviews* 254, no. 1 (July 2013): 78–101, doi:10.1111/imr.12079.
- ²⁷ Z. Liu et al., "Elevated CD38 Antigen Expression on CD8⁺ T Cells Is a Stronger Marker for the Risk of Chronic HIV Disease Progression to AIDS and Death in the Multicenter AIDS Cohort Study than CD4⁺ Cell Count, Soluble Immune Activation Markers, or Combinations of HLA-DR and CD38 Expression," *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology: Official Publication of the International Retrovirology Association* 16, no. 2 (October 1, 1997): 83–92.
- ²⁸ Jean-Marc Doisne et al., "CD8⁺ T Cells Specific for EBV, Cytomegalovirus, and Influenza Virus Are Activated during Primary HIV Infection," *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 173, no. 4 (August 15, 2004): 2410–18.
- ²⁹ Teri Shors, *Virus: estudio molecular con orientación clínica* (Ed. Médica Panamericana, 2009).
- ³⁰ Robert J. Macneal and James G. H. Dinulos, "Acute Retroviral Syndrome," *Dermatologic Clinics* 24, no. 4 (October 2006): 431–38, v, doi:10.1016/j.det.2006.06.001.
- ³¹ Joseph J. Mattapallil et al., "Massive Infection and Loss of Memory CD4⁺ T Cells in Multiple Tissues during Acute SIV Infection," *Nature* 434, no. 7037 (April 28, 2005): 1093–97, doi:10.1038/nature03501.
- ³² Ashley T. Haase, "Perils at Mucosal Front Lines for HIV and SIV and Their Hosts," *Nature Reviews. Immunology* 5, no. 10 (October 2005): 783–92, doi:10.1038/nri1705.
- ³³ I. C. Shaw and M. I. Graham, "Mesna--a Short Review," *Cancer Treatment Reviews* 14, no. 2 (June 1987): 67–86.

-
- ³⁴ Zvi Grossman et al., "Pathogenesis of HIV Infection: What the Virus Spares Is as Important as What It Destroys," *Nature Medicine* 12, no. 3 (March 2006): 289–95, doi:10.1038/nm1380.
- ³⁵ Afam A. Okoye et al., "Naive T Cells Are Dispensable for Memory CD4+ T Cell Homeostasis in Progressive Simian Immunodeficiency Virus Infection," *The Journal of Experimental Medicine* 209, no. 4 (April 9, 2012): 641–51, doi:10.1084/jem.20112071.
- ³⁶ Gilad Doitsh et al., "Abortive HIV Infection Mediates CD4 T Cell Depletion and Inflammation in Human Lymphoid Tissue," *Cell* 143, no. 5 (November 24, 2010): 789–801, doi:10.1016/j.cell.2010.11.001.
- ³⁷ Frank Miedema et al., "Immune Activation and Collateral Damage in AIDS Pathogenesis," *Frontiers in Immunology* 4 (2013): 298, doi:10.3389/fimmu.2013.00298.
- ³⁸ J. M. McCune, "The Dynamics of CD4+ T-Cell Depletion in HIV Disease," *Nature* 410, no. 6831 (April 19, 2001): 974–79, doi:10.1038/35073648.
- ³⁹ Benigno Rodríguez et al., "Predictive Value of Plasma HIV RNA Level on Rate of CD4 T-Cell Decline in Untreated HIV Infection," *JAMA* 296, no. 12 (September 27, 2006): 1498–1506, doi:10.1001/jama.296.12.1498.
- ⁴⁰ Enrique Espinosa et al., "Dissociation of CD154 and Cytokine Expression Patterns in CD38(+) CD4(+) Memory T Cells in Chronic HIV-1 Infection," *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999)* 55, no. 4 (December 2010): 439–45, doi:10.1097/QAI.0b013e3181ef991d.
- ⁴¹ Zhibin Liang et al., "HIV-1 Vpr Protein Activates the NF-κB Pathway to Promote G2/M Cell Cycle Arrest," *Virologica Sinica* 30, no. 6 (December 2015).
- ⁴² Christelle Brégnard, Moncef Benkirane, and Nadine Laguette, "DNA Damage Repair Machinery and HIV Escape from Innate Immune Sensing," *Frontiers in Microbiology* 5 (2014): 176
- ⁴³ "Immunologia Janeway 7ed.pdf," *Google Docs*, accessed March 3, 2016.
- ⁴⁴ Gustavo Olvera et al., "A Model of CD4 TCM Cell Death in HIV Infection Based on a Gene Expression Signature," *CROI* 2016 .
- ⁴⁵ Gilad Doitsh et al., "Cell Death by Pyroptosis Drives CD4 T-Cell Depletion in HIV-1 Infection," *Nature* 505, no. 7484 (January 23, 2014): 509–14, doi:10.1038/nature 12940.
- ⁴⁶ Zbigniew Darzynkiewicz, "Critical Aspects in Analysis of Cellular DNA Content," in *Current Protocols in Cytometry*, ed. J. Paul Robinson et al. (Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2010), <http://doi.wiley.com/10.1002/0471142956.cy0702s52>.
- ⁴⁷ I. Vermes, C. Haanen, and C. Reutelingsperger, "Flow Cytometry of Apoptotic Cell Death," *Journal of Immunological Methods* 243, no. 1–2 (September 21, 2000): 167–90.
- ⁴⁸ Aja M. Rieger et al., "Conventional Apoptosis Assays Using Propidium Iodide Generate a Significant Number of False Positives That Prevent Accurate Assessment of Cell Death," *Journal of Immunological Methods* 358, no. 1–2 (June 30, 2010): 81–92, doi:10.1016/j.jim.2010.03.019.
- ⁴⁹ Heidi Kenis et al., "Cell Surface-Expressed Phosphatidylserine and Annexin A5 Open a Novel Portal of Cell Entry," *Journal of Biological Chemistry* 279, no. 50 (December 10, 2004): 52623–29, doi:10.1074/jbc.M409009200.

-
- ⁵⁰ Rieger et al., "Conventional Apoptosis Assays Using Propidium Iodide Generate a Significant Number of False Positives That Prevent Accurate Assessment of Cell Death."
- ⁵¹ Susan Elmore, "Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death," *Toxicologic Pathology* 35, no. 4 (June 2007): 495–516, doi:10.1080/01926230701320337.
- ⁵² L. Faleiro and Y. Lazebnik, "Caspases Disrupt the Nuclear-Cytoplasmic Barrier," *The Journal of Cell Biology* 151, no. 5 (November 27, 2000): 951–59.
- ⁵³ Edward A. Miao, Jayant V. Rajan, and Alan Aderem, "Caspase-1-Induced Pyroptotic Cell Death: Caspase-1-Induced Pyroptotic Cell Death," *Immunological Reviews* 243, no. 1 (September 2011): 206–14, doi:10.1111.
- ⁵⁴ Tessa Bergsbaken, Susan L. Fink, and Brad T. Cookson, "Pyroptosis: Host Cell Death and Inflammation," *Nature Reviews. Microbiology* 7, no. 2 (February 2009): 99–109, doi:10.1038/nrmicro2070.
- ⁵⁵ Howard Y. Chang and Xiaolu Yang, "Proteases for Cell Suicide: Functions and Regulation of Caspases," *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64, no. 4 (December 2000): 821–46.
- ⁵⁶ Bergsbaken, Fink, and Cookson, "Pyroptosis."
- ⁵⁷ A. D. Deitch, H. Law, and R. deVere White, "A Stable Propidium Iodide Staining Procedure for Flow Cytometry," *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society* 30, no. 9 (September 1982): 967–72.
- ⁵⁸ Lamiae Belayachi et al., "Retama Monosperma N-Hexane Extract Induces Cell Cycle Arrest and Extrinsic Pathway-Dependent Apoptosis in Jurkat Cells," *BMC Complementary and Alternative Medicine* 14 (2014): 38–38, doi:10.1186/1472-6882-14-38.
- ⁵⁹ I. Schmid, C. H. Uittenbogaart, and J. V. Giorgi, "A Gentle Fixation and Permeabilization Method for Combined Cell Surface and Intracellular Staining with Improved Precision in DNA Quantification," *Cytometry* 12, no. 3 (1991): 279–85, doi:10.1002/cyto.990120312.
- ⁶⁰ K. A. LaGree et al., "The Human Jurkat (FHCRC-11) Cell Line Is Heterogeneous in Ploidy and Cell Size and Releases Detergent-Soluble DNA," *Experimental Hematology* 16, no. 8 (September 1988): 686–90.