



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EVALUACIÓN EXPERIMENTAL DE LA
PROMOCIÓN DE ENTRADA A CICLO CELULAR,
ARRESTO Y MUERTE EN CÉLULAS T CD4⁺ DE
MEMORIA CENTRALES DE PACIENTES CON VIH”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

MÓNICA GUADALUPE DE LEÓN LARA



MÉXICO, CD.MX.

2017



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: JESÚS FERNANDO MONTIEL AGUIRRE**

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

SECRETARIO: **Profesor: HÉCTOR ENRIQUE ESPINOSA ARCINIEGA**

1ER. SUPLENTE: **Profesor: GUSTAVO OLVERA GARCÍA**

2º SUPLENTE: **Profesor: LUZ MARÍA MORA VELANDIA**

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

ASESOR DEL TEMA:

DR. EN C. HÉCTOR ENRIQUE ESPINOSA ARCINIEGA

SUPERVISOR TÉCNICO:

Q.F.B. JESSICA ROMERO RODRÍGUEZ

SUSTENTANTE:

MÓNICA GUADALUPE DE LEÓN LARA

Índice

Abreviaturas	VI
Índice de figuras	VIII
Resumen	IX
1. Introducción	1
1.1. Epidemiología del VIH-1.....	1
1.2. Biología estructural y molecular del VIH-1.....	2
1.2.1. Estructura	2
1.2.2. Ciclo de replicación viral	2
1.3. Poblaciones de células T CD4+ de memoria.....	5
1.3.1. Células T CD4+ de memoria centrales (T _{CM})	5
1.3.2. Células T CD4+ de memoria efectoras (T _{EM})	6
1.4. Ciclo celular	6
1.4.1. Regulación del ciclo celular	8
1.4.1.1. Ciclina A	11
1.4.1.2. Ciclina B	11
1.4.1.3. Arresto en ciclo celular	12
1.5. Inmunopatogénesis del VIH	13
1.5.1. Fase aguda	14
1.5.2. Fase crónica	14
1.5.3. Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).....	15
1.5.4. Activación inmune crónica	16
1.5.5. Implicación de las T _{CM} en la inmunopatogénesis del VIH-1	17
1.6. Modelo de arresto y muerte de las células T _{CM} en la infección por VIH-1	18
2. Justificación	20
3. Hipótesis	20
4. Objetivos	21
4.1. Objetivo general	21
4.2. Objetivos particulares.....	21

5. Diseño del estudio	22
6. Metodología	23
6.1. Obtención de las muestras.....	23
6.2. Extracción de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)	23
6.3. Purificación de T CD4+ de memoria centrales (T _{CM})	24
6.4. Evaluación de la pureza de las células T _{CM}	25
6.5. Estímulo de células con anti-CD3/CD28 agonistas	28
6.6. Determinación de viabilidad	29
6.7. Determinación de ciclinas A y B1	29
6.8. Análisis del ciclo celular y contenido de ADN de la subpoblación de T _{CM}	30
6.9. Análisis estadístico.....	33
7. Resultados	34
7.1. Las células TCM de los pacientes con VIH-1 se acumulan en una población que presenta un contenido de ADN variable.....	34
7.2. La expresión de las ciclinas A y B1 se encuentra alterada en las células TCM de los pacientes VIH+	35
8. Discusión	37
9. Conclusiones	42
10. Anexos	43
10.1. Carta de consentimiento informado.....	43
11. Referencias	51

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxiribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ART	Tratamiento antirretroviral
Cdk	Cinasa dependiente de ciclina
CKIs	Proteínas inhibidoras de Cdk
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
FMO	Fluorescencia menos uno
GALT	Tejido linfoide asociado a intestino
IFN- γ	Interferón gamma
IL	Interleucina
INER	Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
LPS	Lipopolisacárido
PBA	Solución amortiguadora de fosfatos con albúmina
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PFA	Paraformaldehído
PR	Proteasa
RT	Transcriptasa reversa
SFB	Suero fetal bovino
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
T _{CM}	Células T CD4 ⁺ de memoria centrales
TCR	Receptor de células T

T _{EM}	Células T CD4 ⁺ de memoria efectoras
TLR	Receptores tipo Toll
T _{Naive}	Células T vírgenes
VIH-1	Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1
SIV	Virus de la inmunodeficiencia en simios
Vpr	Proteína viral R

Índice de figuras

Figura 1. Ciclo de replicación viral del VIH-1.....	4
Figura 2. División del ciclo celular	8
Figura 3. Expresión de ciclinas durante el ciclo celular.	10
Figura 4. Curso temporal de la infección por VIH-1.....	16
Figura 5. Firma de expresión génica de las T _{CM} de pacientes VIH+.	19
Figura 6. Estrategia de análisis para la determinación de la pureza de las células T _{CM}	27
Figura 7. Enriquecimiento de la subpoblación de células T CD4+ de memoria centrales (T _{CM}).	28
Figura 8. Estrategia de análisis para la evaluación del ciclo celular en las células T _{CM}	32
Figura 9. Delimitación de las fases del ciclo celular.....	33
Figura 10. Frecuencia de células T _{CM} acumuladas en la fracción sub G ₀ /G ₁	34
Figura 11. Proporción de células T _{CM} vivas acumuladas y que expresan la ciclina A.....	36

Resumen

Desde el reconocimiento del VIH como el agente causal del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA), numerosos estudios se han enfocado en comprender la interacción del VIH con el sistema inmunológico de los individuos infectados. Dentro de estas investigaciones, el estudio del papel de la población de células T CD4⁺ de memoria centrales (T_{CM}) ha sido de gran relevancia en el contexto de la infección, debido a que la pérdida de homeostasis en la misma, contribuye a la progresión de la enfermedad al SIDA.

Se realizó la evaluación experimental del modelo de arresto y muerte de las células T_{CM}, propuesto a partir de su firma de expresión génica durante la infección por VIH-1. Se determinó la frecuencia de células T_{CM} en cada fase del ciclo celular después de estimularlas a través del receptor de células T (TCR) en pacientes con infección por VIH-1, y se comparó con individuos VIH-. Se encontró en las células T_{CM} de los pacientes una mayor proporción de células acumuladas en la población sub G₀/G₁ y además una mayor proporción de células acumuladas en la fase G₀/G₁ y en la población sub G₀/G₁, que además expresaban la ciclina A, con respecto a los controles.

Los resultados obtenidos sugieren, junto con el transcriptoma de las células T_{CM}, que estas alteraciones son propias de las células T_{CM} durante la infección por VIH-1.

1. Introducción

El virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) se identificó por primera vez en la década de los ochenta¹⁻³ como el agente causal del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA)^{4,5}. En la actualidad, la epidemia de VIH/SIDA representa uno de los principales problemas de salud mundial debido a las elevadas tasas de morbilidad y mortalidad que presenta⁴.

El VIH-1 pertenece al género *Lentivirus* dentro de la familia *Retroviridae*^{1,6}. Como en todos los retrovirus, el genoma del VIH-1 está codificado por ARN, que es transcrito a ADN por la transcriptasa reversa (RT), una vez que entra a una nueva célula hospedera¹.

La infección por VIH-1 casi invariablemente resulta en un estado progresivo de inmunodeficiencia⁷, asociado al impacto negativo de la interacción del virus sobre las células T CD4⁺, que representan un componente esencial del sistema inmunológico para coordinar tanto las respuestas celulares como las humorales⁸. De hecho, una de las características que distinguen la infección por VIH-1 es la pérdida progresiva de las células T CD4⁺, simultánea a las alteraciones y la pérdida de función de las mismas^{5,9}. Adicionalmente, se ha demostrado que, debido a la estimulación antigénica y a la alteración del metabolismo de proteínas durante el curso de la infección, se presenta una desregulación en el ciclo celular de las células del sistema inmunológico^{8,10}.

1.1. Epidemiología del VIH-1

La infección por VIH-1 sigue siendo una de las amenazas más importantes para la salud pública. Estudios recientes muestran que a la fecha, se presentan nuevos casos de personas infectadas y muertes relacionadas con SIDA, a pesar de los avances en el desarrollo de los tratamientos antirretrovirales (ART)¹¹. De acuerdo con los reportes de ONUSIDA, las poblaciones de riesgo, en las que se presenta la mayor cantidad de casos de infección por VIH-1, son: trabajadoras sexuales, personas que se inyectan drogas, personas

transgénero, prisioneros y hombres que tienen relaciones sexuales con otros hombres; cabe mencionar que dentro de estos grupos existen individuos que desconocen su estado de infección por VIH-1. Esta información también indica que la distribución de las nuevas infecciones entre estos grupos varía de acuerdo a su ubicación geográfica¹².

En el año 2015 se presentaron 36.7 millones de casos de personas que viven con VIH y 1.1 millones de muertes debidas al SIDA en el mundo¹³, mientras que en México, 200 000 personas viven con VIH y 4 000 mueren a causa del SIDA¹⁴.

1.2. Biología estructural y molecular del VIH-1

1.2.1. Estructura

La estructura de un virión maduro comprende una bicapa lipídica a la que se asocian, entre otras, las glicoproteínas estructurales gp120 y gp41; una cápside cónica que envuelve las dos copias idénticas de ARN que constituyen su genoma, además de las enzimas funcionales: proteasa (PR), transcriptasa reversa (RT) e integrasa (IN); así como una nucleocápside que forma complejos estables con el ARN, estabilizándolo^{1,15,16}.

El ARN del VIH-1 contiene los genes *gag*, *pol*, *env*, *nef*, *rev*, *tat*, *vpr*, *vpu* y *vif*, que codifican para las proteínas estructurales y accesorias necesarias para llevar a cabo el ciclo de replicación viral¹⁶.

1.2.2. Ciclo de replicación viral

El ciclo de replicación del VIH-1 se puede dividir en dos fases: la fase temprana que ocurre desde la entrada en la célula hospedera hasta la integración en su genoma, y la fase tardía que incluye procesos como la expresión regulada del genoma proviral, la maduración y la liberación del virus^{1,2}.

El blanco principal del VIH-1 son las células T que expresan la molécula CD4 en la superficie celular (CD4⁺)¹⁷. La entrada del virus a la célula hospedera involucra la fusión de la membrana viral y la membrana celular, por medio de la unión específica de la glicoproteína viral gp120 con la molécula CD4¹. Como consecuencia, se induce la exposición de un nuevo sitio de unión en gp120 capaz de interactuar con los receptores de quimiocinas CCR5 y CXCR4^{1,2}. Esta segunda interacción provoca rearrreglos en la estructura de gp41, que conducen a la inserción del péptido de fusión, lo que favorece la aproximación y la fusión de la membrana de la célula hospedera con la membrana viral, para finalizar el proceso de entrada⁶. Una vez en el interior, mediante la disolución parcial de la cápside, se liberan el ARN y las proteínas PR, IN y RT². En el citoplasma se lleva a cabo la transcripción reversa mediada por RT del ARN viral a ADN complementario (ADNc). Posteriormente, el ADN sintetizado se asocia con algunas de las proteínas virales como la IN y la proteína viral R (Vpr) formando el complejo de preintegración², que es transportado al núcleo para la integración del ADN en el genoma del hospedero, donde permanece como provirus¹⁸.

En la fase tardía del ciclo de replicación viral, después de la integración en el genoma del hospedero, la expresión de factores de transcripción y la proteína transactivadora de la transcripción (Tat) promueven la transcripción del ADN viral, aprovechando la maquinaria transcripcional de la célula^{6,18}. Posteriormente, el ARN mensajero (ARNm) sintetizado, es transportado al citoplasma y se producen entre otras, las proteínas estructurales Gag y Gag-Pol, que son necesarias para el ensamblaje, maduración y liberación de un nuevo virión^{1,2,15,18}. En la **figura 1** se esquematiza la secuencia del ciclo de replicación viral previamente descrita.

La replicación de los genes del VIH-1 está influenciada por el estado de activación de la célula hospedera¹⁸. Las células activadas por el VIH-1, por otros antígenos o mediadores inflamatorios son más susceptibles a la infección; a diferencia de las células vírgenes y de las subpoblaciones de células T de memoria en reposo, en las que la replicación se restringe por

diferentes factores, entre los que destacan una baja o nula expresión del correceptor CCR5, el cual a su vez, limita el número de blancos disponibles para el virus, una capacidad limitada para transportar el complejo de preintegración al núcleo y los factores de restricción retroviral presentes en las células que se encuentran en reposo².

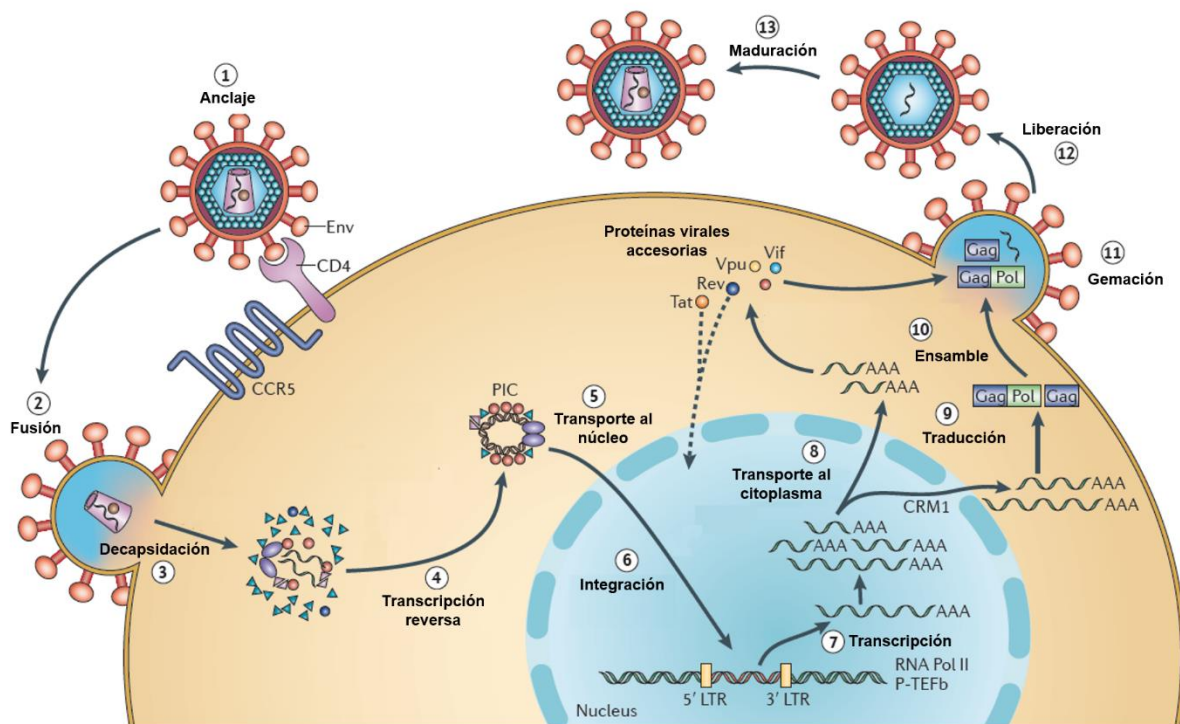


Figura 1. Ciclo de replicación viral del VIH-1. La fase temprana del ciclo de replicación viral involucra los procesos desde el anclaje del virus a la membrana de las células CD4⁺ hasta la integración del genoma viral al ADN del hospedero (pasos 1–6). Posteriormente, en la fase tardía de la infección, se llevan a cabo los procesos que participan en la formación de nuevas partículas virales, desde la transcripción del ADN viral, hasta la liberación de nuevos viriones (pasos 7–13). *(Modificado de Engelman y Cherepanov 2012).*

1.3. Poblaciones de células T CD4⁺ de memoria

La memoria inmunológica resulta de la expansión clonal y la diferenciación de células T antígeno específicas¹⁹. El proceso de formación de células T CD4⁺ de memoria inicia con la presentación de antígenos y su reconocimiento por el receptor de células T (TCR) en las clonas de células vírgenes (T_{Naive})²⁰. El reconocimiento de estas señales provoca la activación y proliferación de esta subpoblación celular, generando células efectoras capaces de migrar a los sitios de inflamación y a los tejidos periféricos^{20,21}. Adicionalmente, esta respuesta da lugar a la generación de las células T de memoria específicas al antígeno que pueden persistir durante meses o años, generando una respuesta inmunológica más rápida y eficiente²¹.

Las células T CD4⁺ de memoria se pueden clasificar en dos subpoblaciones: células T CD4⁺ de memoria efectoras (T_{EM}) y células T CD4⁺ de memoria centrales (T_{CM}), que poseen características fenotípicas y funcionales distintas²²; y por lo tanto son afectadas de manera diferente durante la infección por VIH-1.

1.3.1. Células T CD4⁺ de memoria centrales (T_{CM})

Las células de memoria centrales (T_{CM}) circulan en los tejidos linfoides secundarios, a través de la sangre y el sistema linfático²². Expresan de manera constitutiva los receptores de superficie CCR7 y CD62L, que son necesarios para su migración y alojamiento en los órganos linfoides secundarios; es posible distinguir las T_{CM} de las células T_{Naive} mediante la expresión de las isoformas de la molécula CD45: CD45RA o CD45RO (fenotipo CD45RA⁻, CCR7⁺; en el caso de las células T_{CM})^{19,21}.

Las células T_{CM} tienen una capacidad regenerativa mayor que las células T_{EM} y una gran sensibilidad a la estimulación antigénica. Después de ser estimuladas, las T_{CM} producen IL-2 y después de proliferar, se diferencian eficientemente a células efectoras de memoria, que pueden producir grandes cantidades de IFN- γ o IL-4¹⁹⁻²³.

1.3.2. Células T CD4⁺ de memoria efectoras (T_{EM})

Las células de memoria efectoras (T_{EM}) pierden la expresión constitutiva de los receptores CCR7 y CD62L, y expresan receptores de quimiocinas, como CCR5, y moléculas de adhesión, que permiten la migración a los tejidos extralinfoides y sitios de inflamación, como la lámina propia y el epitelio de la mucosa intestinal y genital; y son capaces de ejercer una respuesta efectora inmediata¹⁹⁻²². Por otra parte, también se pueden reconocer por la expresión de la isoforma CD45RA de la molécula CD45 (fenotipo CD45RA⁺, CCR7⁻)²¹. Estas células tienen un potencial de expansión limitado en comparación con las T_{CM} y las células T_{Naive}^{19,22}.

Debido a que la mayoría de las T_{EM} y las células activadas que expresan el receptor de quimiocinas CCR5 se localizan en la mucosa, representan el blanco principal del VIH-1 durante la fase aguda de la infección; esto tiene como consecuencia una depleción masiva de esta subpoblación²², que es acompañada por un incremento en la proliferación de las T_{CM} que, según estudios realizados en macacos Rhesus como modelo animal, provee de nuevas células de memoria efectoras los sitios extralinfoides²⁴.

1.4. Ciclo celular

El ciclo celular es un proceso complejo involucrado en el crecimiento, la proliferación celular y el desarrollo de los organismos²⁵. La división celular en condiciones normales consiste en dos procesos consecutivos, caracterizados principalmente por la replicación del ADN y la segregación de los cromosomas replicados en dos células hijas²⁶. Se pueden presentar alteraciones en los mecanismos de regulación del ciclo celular, que resultan en la muerte celular programada o una proliferación descontrolada^{27,28}.

El ciclo celular se puede dividir morfológicamente en la interfase, que comprende las fases G₁, S y G₂; y la fase M, que representa el proceso de división nuclear^{25,28} (**figura 2**). Durante la interfase, G₁ y G₂ constituyen los puntos de control, en donde se asegura que los eventos en el ciclo celular

ocurran en una secuencia adecuada para preservar de manera precisa la transmisión del material genético²⁹.

Durante el primer intervalo, G₁, la célula se prepara para la síntesis del ADN, esta etapa puede variar dependiendo de las señales extracelulares, que incluyen factores de crecimiento, mitógenos, nutrientes y señales de células adyacentes³⁰; si las señales no son favorables, la célula puede entrar en un estado especializado de reposo conocido como G₀, en el que las células no se encuentran en el ciclo, pero tienen el potencial de dividirse, una vez que el microambiente es propicio^{29,31}. Una vez que atraviesa la fase G₁, la célula está comprometida a continuar con el ciclo celular, independientemente de las señales extracelulares^{27,32}. Durante la fase S se lleva a cabo la replicación del ADN y, por lo tanto, el contenido de ADN se puede identificar entre 2N y 4N³¹. En el intervalo G₂, la célula se prepara para para la mitosis, se trata de un periodo de crecimiento en donde se produce una reorganización nuclear y la acumulación de las proteínas necesarias para la mitosis. En esta fase se detectan daños en el ADN y se retrasa el inicio de la fase M, para permitir la reparación^{33,34}.

La fase M del ciclo celular involucra los procesos de la mitosis, en donde ocurre la segregación de las cromátides hermanas y la división nuclear; y la citocinesis, que divide el citoplasma para crear dos células hijas. En la mitosis se pueden identificar cinco etapas que ocurren en un estricto orden secuencial: profase, prometafase, metafase, anafase y telofase. Durante la profase, los cromosomas replicados, cada uno formado por dos cromátides hermanas, se condensan y fuera del núcleo comienza a formarse el huso mitótico. La prometafase inicia con la ruptura de la envoltura nuclear. De esta manera, los cromosomas pueden asociarse a los microtúbulos del huso mitótico. En la metafase, los cromosomas se alinean sobre el ecuador, entre los polos del huso. Posteriormente, en la anafase, las cromátides hermanas se separan hacia los polos del huso mitótico, formando los cromosomas hijos. En la telofase, ambos grupos de cromosomas llegan a los polos y se forma una nueva envoltura nuclear alrededor de cada conjunto de cromosomas, lo que

completa la formación de dos nuevos núcleos y marca el final de la mitosis. Finalmente, durante la citocinesis, el citoplasma se divide, dando lugar a dos células hijas, cada una con un núcleo idéntico³⁵.

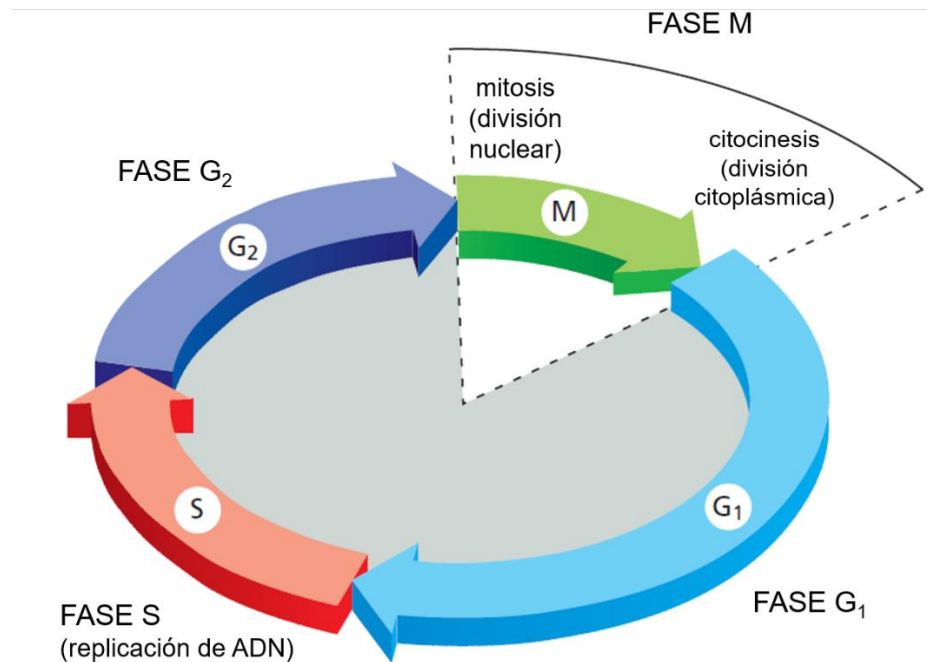


Figura 2. División del ciclo celular. El ciclo celular se divide en dos principales eventos: (1) la interfase, que comprende los intervalos G₁, G₂ y la fase S en donde tiene lugar la replicación del ADN; y (2) la fase M, en donde se lleva a cabo la división nuclear y celular. *(Modificado de Alberts, 2015).*

1.4.1. Regulación del ciclo celular

Si una célula se encuentra en división, los puntos de control determinan la progresión del ciclo en tres principales transiciones: (1) en la fase tardía de G₁, en donde la célula es comprometida a entrar al ciclo celular, (2) la transición de la fase G₂ a la fase M (G₂/M) que incluye los eventos tempranos de la mitosis, hasta la alineación de los cromosomas en el huso mitótico en la metafase, y (3) la transición de la metafase a la anafase para completar la mitosis³⁵.

Los componentes principales de este sistema de control son las serina/treonina cinasas dependientes de ciclina (Cdk), que al asociarse con sus proteínas de unión, las ciclinas, ejercen su actividad enzimática en diferentes puntos del ciclo celular³⁶.

Se han identificado al menos 11 Cdk en las células de mamíferos, sin embargo, sólo algunas están involucradas en el control del ciclo celular; se activan al formar complejos con ciclinas específicas (ciclina-Cdk) (**Tabla 1**). Esta activación tiene como consecuencia cambios cíclicos en la fosforilación de proteínas intracelulares que regulan los eventos en el ciclo celular. Durante la progresión del ciclo celular, los niveles de expresión de las ciclinas varían en cada fase (**figura 3**), en contraste con los niveles de las Cdk, que se mantienen constantes³⁷. En general, las ciclinas que participan en una fase específica del ciclo celular se degradan una vez que la célula entra a la siguiente fase²⁵.

Tabla 1. Clasificación de las ciclinas.

Cdk	Ciclina de unión	Fase del ciclo en la que actúa
Cdk4, Cdk6	Ciclina D	G ₁
Cdk2	Ciclina E	G ₁ /S
Cdk2, Cdk1	Ciclina A	S
Cdk1	Ciclina B	M

Durante la fase temprana de G₁, el sustrato principal de los complejos ciclina D-Cdk4/6 es la proteína retinoblastoma (pRb), que regula de manera negativa la actividad de factores de transcripción como E2F; al ser fosforilada por dichos complejos enzimáticos, se inactiva y permite la progresión dentro de la fase G₁. En la transición de la fase G₁ a la fase S (G₁/S), la actividad del complejo ciclina E-Cdk2 es indispensable para que la célula pueda entrar a la fase S y continuar el proceso

de división. Durante la fase S, el complejo ciclina A-Cdk2 participa en la fosforilación de proteínas involucradas en la replicación del ADN, los niveles de este complejo permanecen elevados hasta el inicio de la mitosis. Posteriormente, en la transición G₂/M, la ciclina A también forma complejos con la Cdk1 (Ciclina A-Cdk1) y su actividad es requerida para el inicio de la profase. Finalmente, el complejo ciclina B-Cdk1 participa para concluir la mitosis^{29,35,38}. La actividad de los complejos ciclina-Cdk se regula por controles negativos que tienen la función de detener la progresión del ciclo celular, ya sea en condiciones normales o cuando se presentan alteraciones como daños al ADN³⁸.

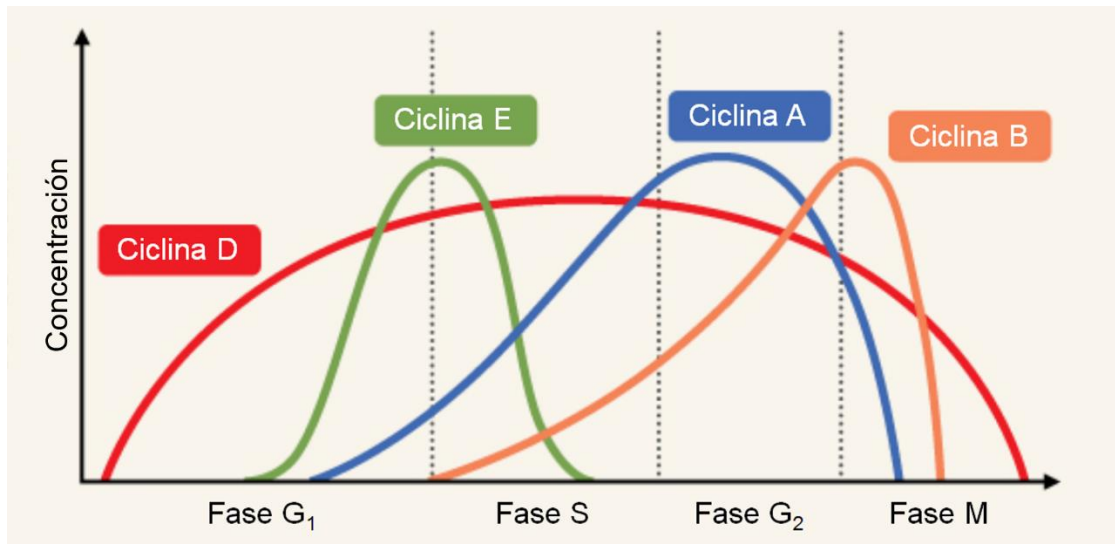


Figura 3. Expresión de ciclinas durante el ciclo celular. El nivel de expresión de las principales ciclinas involucradas en la división celular cambia durante todo el ciclo. Las ciclinas se acumulan en las fases anteriores a las que ejercen su función, ya que la concentración de las ciclinas determina el momento en que se formen los complejos ciclina-Cdk. **(modificado de Avissar, et al, 2016).**

Los estudios realizados mediante citometría de flujo multiparamétrica permiten determinar la distribución de las células en el ciclo celular; es decir,

mediante la determinación del contenido de ADN y la expresión de los diferentes tipos de ciclinas, es posible conocer, entre otros parámetros, la fase del ciclo celular en la que se encuentran las células y también si se presentaron alteraciones en el ciclo celular, que se pueden manifestar como la expresión de ciclinas específicas en una fase diferente del ciclo, por ejemplo³⁹.

1.4.1.1. Ciclina A

Existen dos tipos de ciclina A en las células de los mamíferos: la ciclina A₁ y A₂. La ciclina A₁ se expresa únicamente durante la mitosis y está involucrada en los procesos de la embriogénesis temprana. Por otra parte, la ciclina A₂ está presente en todas las células somáticas proliferantes. Una de las características importantes de esta ciclina es que puede asociarse con las proteínas Cdk2 y Cdk1, lo que permite su participación en los procesos de replicación y transcripción del ADN en la fase S, así como la transición G₂/M⁴⁰.

La ciclina A₂ comienza a acumularse durante la fase G₁ tardía y se degrada en la prometafase⁴⁰ (**figura 3**). La síntesis de la ciclina A₂ es controlada principalmente a nivel transcripcional, mientras que su degradación se lleva a cabo por proteólisis mediante ubiquitinación⁴¹.

1.4.1.2. Ciclina B

Las ciclinas de tipo B representan componentes esenciales de la mitosis. Se han identificado tres tipos de ciclina B (B₁, B₂ y B₃). Las ciclinas B₁ y B₂ se expresan en las células proliferantes; sin embargo, se localizan en sitios diferentes dentro de la célula. La ciclina B₁ se encuentra asociada con los microtúbulos y se desplaza hacia el núcleo durante la mitosis. Por otra parte, la ciclina B₂ se asocia con el aparato de Golgi y con membranas intracelulares. En cuanto a la ciclina B₃, se sabe que tiene un papel importante en el desarrollo de las células germinales. La actividad de la ciclina B₁ y la formación del complejo con la Cdk1, también conocido como factor promotor de la mitosis (MPF), es indispensable para la entrada a la mitosis^{38,40}.

La ciclina B₁ se sintetiza y acumula en complejos inactivos con la Cdk1 desde la fase S y alcanza un nivel máximo en la transición G₂/M⁴². Cuando el complejo ciclina B₁-Cdk1 se activa, cataliza la fosforilación de diferentes sustratos necesarios para permitir el inicio de los eventos de la mitosis que incluyen la ruptura de la envoltura nuclear, la separación de los centrosomas, el ensamblaje del huso mitótico y la condensación de los cromosomas. Para permitir la continuación de la mitosis y la salida del ciclo celular, el complejo ciclina B₁-Cdk se inactiva por medio de la degradación de la ciclina B₁ antes del inicio de la anafase, de la misma forma que la ciclina A^{42,43}

1.4.1.3. Arresto en ciclo celular

Cuando se presentan daños en el ADN o una replicación incompleta, la célula detiene el proceso de división produciendo arresto en los puntos de control (G₁ y G₂/M). El arresto en la fase G₁ permite la reparación del ADN antes de la replicación en la fase S, mientras que el arresto en G₂ da lugar a la reparación de los daños antes de la separación de los cromosomas en la mitosis^{25,44}.

Uno de los principales mecanismos mediante los cuales se produce el arresto en la fase G₂, es la inactivación del complejo ciclina B₁-Cdk1. Los complejos ciclina B₁-Cdk1 se pueden inactivar por la disminución en la síntesis o el aumento en la degradación de las ciclinas, a través de la fosforilación de sitios específicos en la Cdk1 y por medio de la acción de las proteínas inhibidoras de Cdk (CKIs)^{29,38}.

Una gran variedad de patógenos, principalmente los virus, son capaces de alterar el ciclo celular. La mayoría de los virus de ADN, algunos virus de ARN y los retrovirus, pueden afectar el sistema de regulación del ciclo celular. Los virus son capaces de contrarrestar los puntos de control durante la división celular, tanto en la transición G₁/S como en G₂/M, e involucran reguladores del ciclo celular como la proteína p53 y pRb²⁵(Schafer, 1998)²⁵. Una gran parte de las alteraciones que se producen está relacionada con la inducción del ciclo

celular; sin embargo, en algunos casos, estas aberraciones están asociadas con arresto en el ciclo celular, quiescencia y latencia viral²⁵.

En el caso de los lentivirus como el VIH-1 y el virus de la inmunodeficiencia en simios (SIV), se ha demostrado que el arresto en las células infectadas, se puede producir por la acción de las proteínas virales Nef (en la fase G₁) y Vpr (en la fase G₂)²⁵. El arresto producido por la proteína Vpr se encuentra acompañado por una disminución de la actividad del complejo ciclina B₁-Cdk, lo que tiene un efecto citostático que permite una replicación viral óptima^{8,45}.

Una de las causas por las que el VIH-1 produce un estado de activación persistente de las células T CD4⁺, es la pérdida de control en la regulación del ciclo celular y la proliferación⁴². Sin embargo, la pérdida considerable de células no infectadas durante la fase crónica de la infección, sugiere que la depleción no se debe únicamente al efecto citopático del virus^{46,47}. Cabe señalar que sólo una proporción (0.01-1%) de células T CD4⁺ se encuentra infectada^{9,48}.

1.5. Inmunopatogénesis del VIH

La característica distintiva de la infección por VIH-1 es la destrucción progresiva de las células T CD4⁺ y la subsecuente pérdida de competencia inmunológica, que eventualmente resulta en el SIDA^{9,49}. Las células T CD4⁺ pueden ser eliminadas mediante la infección directa, como se mencionó previamente, o por efectos colaterales, debidos a la activación inmune crónica, inflamación, a la proliferación y senescencia^{9,17,50}.

De acuerdo a la interacción del VIH-1 con las células del hospedero, se pueden distinguir tres fases en el curso de la infección, en la mayoría de los individuos que no reciben tratamiento antirretroviral (ART): (1) fase aguda, (2) fase crónica y (3) síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

1.5.1. Fase aguda

La exposición al VIH-1 se presenta inicialmente a través de la mucosa, el principal sitio de replicación viral es el tejido linfoide asociado a intestino (GALT). Las células T_{EM} son el blanco de infección viral durante la fase aguda de la infección debido a su expresión del receptor de quimiocinas CCR5^{9,51}. En efecto, el microambiente en la mucosa intestinal promueve la infección y favorece la propagación del virus. La infección aguda, tanto por VIH-1 como SIV, se presenta durante las primeras 6-12 semanas a partir del establecimiento de la infección. En este periodo se presenta una replicación viral intensiva y es posible detectar los valores más elevados de carga viral en el plasma, acompañado por la eliminación masiva de aproximadamente 80% de las células T_{EM} en la mucosa intestinal. Aunque la proporción de células que expresan CCR5 en sangre periférica es menor que en las mucosas, también se presenta una eliminación selectiva de las mismas^{22,51-53} (**figura 4**). La pérdida inicial de esta población de células T CD4+ se puede explicar por el efecto citopático directo del virus y por la destrucción mediada por las células T CD8+^{9,51,53}.

En algunos casos se presenta el síndrome retroviral agudo, en donde se manifiestan signos clínicos no específicos de la infección, que pueden incluir fiebre, erupciones cutáneas, dolor de cabeza y faringitis; por lo que la mayoría de los individuos infectados desconoce su estado⁵⁴. Sumado a lo anterior, el riesgo de transmisión en esta fase es muy elevado; estudios demuestran que el 50% de las nuevas infecciones se debe al contagio por individuos recién infectados⁵².

1.5.2. Fase crónica

En la fase crónica o asintomática de la infección, la carga viral en el plasma disminuye entre 100-1000 veces, debido a que la replicación viral se encuentra limitada por la respuesta inmune adaptativa, tanto celular como humoral del hospedero, principalmente por la acción de las células T citotóxicas CD8+ y de

los anticuerpos neutralizantes específicos contra el VIH-1. Por otra parte, se sugiere que la reducción en la carga viral también es provocada por la disminución de la disponibilidad de las células T CD4⁺ activadas para su infección. Es preciso señalar que la replicación viral no se suprime por completo y comienza a aumentar lentamente durante el curso de la fase crónica de la infección^{9,55}.

Al comienzo de esta fase, es posible detectar un aumento en la cuenta de células T CD4⁺ en sangre periférica y niveles elevados de activación de las células T cooperadoras y citotóxicas. La depleción masiva de las células durante la fase aguda es seguida por un incremento significativo en la proliferación y diferenciación de las T_{CM}, que regenera parcialmente la subpoblación de T_{EM} en los sitios efectores y previene el inicio de la inmunodeficiencia. Sin embargo, estudios en macacos Rhesus demuestran que este proceso regenerativo no restaura completamente la inmunidad, ya que, debido a la activación persistente, estas nuevas células T_{EM} son inestables y de vida media corta^{5,22,56} y, como consecuencia, disminuyen lentamente durante un periodo de aproximadamente 10 años, antes del inicio del SIDA⁹(**figura 4**).

1.5.3. Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA)

El desarrollo del SIDA se define por la disminución de la cuenta de células T CD4⁺ totales en la sangre a cuentas menores de 200 células/ μ L^{9,57}. En esta etapa de la infección el número de células T CD4⁺ no puede ser mantenido, ya que se presenta una pérdida irreversible de la capacidad regenerativa de las subpoblaciones de células T CD4; como consecuencia de la relación entre la replicación viral y la activación inmune crónica^{22,58} (**figura 4**).

El deterioro progresivo de la inmunidad celular aumenta la susceptibilidad del organismo a las infecciones por microorganismos oportunistas como *Pneumocystis carinii*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Cryptococcus neoformans*,

Toxoplasma gondii, *Candida albicans* y algunos virus como citomegalovirus y adenovirus; además de algunos tipos de cáncer, como el sarcoma de Kaposi⁵.

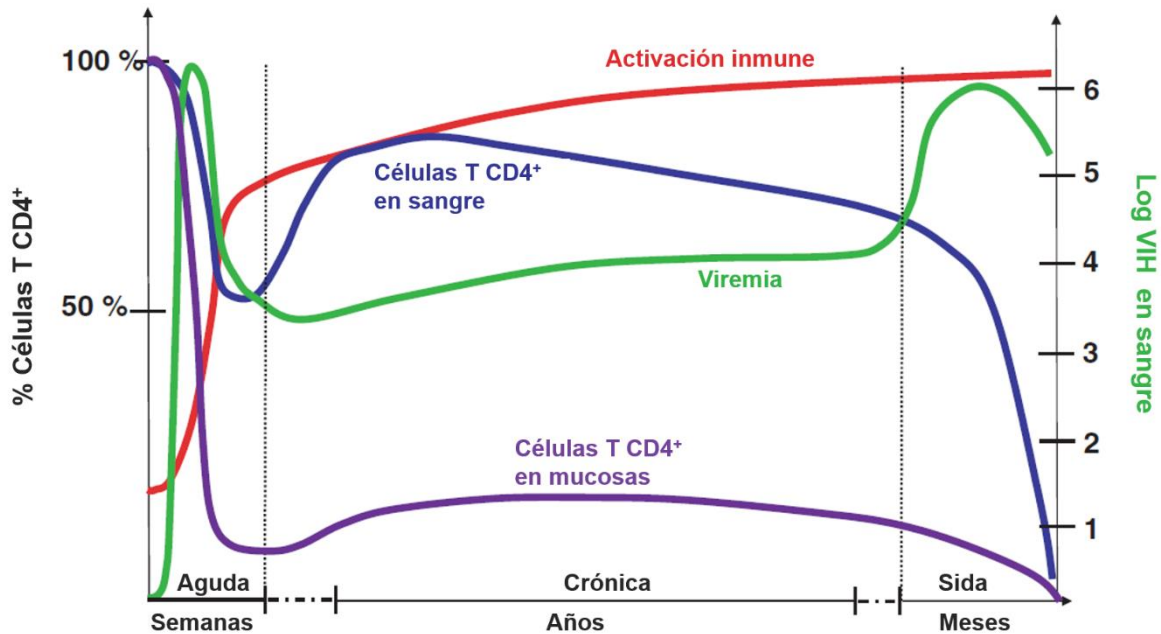


Figura 4. Curso temporal de la infección por VIH-1. En la fase aguda de la infección se presenta la depleción masiva de las células T CD4⁺ en las mucosas (morado) y se detecta una disminución de las mismas en la sangre (azul), mientras que la viremia (verde) alcanza un pico máximo. Cuando se establece la respuesta inmune adaptativa, la cuenta de células T CD4⁺ en la sangre y en las mucosas aumentan a niveles inferiores a los normales. Conforme progresa la infección, como consecuencia de la activación inmune crónica y del deterioro del sistema inmunológico, se presenta una disminución de las células T CD4⁺ totales y un aumento de la carga viral, que dan lugar al SIDA. **(Modificado de Grossman, et al, 2006).**

1.5.4. Activación inmune crónica

En humanos y macacos, la depleción en las mucosas es seguida por el inicio de una activación inmune generalizada que se manifiesta durante la fase crónica de la infección, y se caracteriza por un incremento en la producción de

citocinas inflamatorias, un aumento en la diferenciación y proliferación de las células T; y un aumento en la frecuencia de células T CD4⁺ y CD8⁺ que expresan marcadores de activación (como HLA-DR y CD38)^{22,58,59}. Sorprendentemente, este aumento en la entrada al ciclo celular es, en ocasiones, interrumpido ya que se activan los diferentes mecanismos de muerte celular⁶⁰. Diferentes estudios demuestran que esta activación, más que representar una respuesta homeostática, resulta perjudicial durante el curso de la infección, por esta razón, puede ser utilizado como un fuerte predictor independiente de la progresión de la enfermedad y la magnitud en la que se pierden las células T CD4⁺ ^{50,61}.

Existen diferentes factores que pueden contribuir a la activación inmune crónica durante las infecciones por VIH-1 y SIV, entre ellos se encuentran: (1) El efecto del virus en las células T CD4⁺ que puede activarlas a través de la unión de sus proteínas de la envoltura con los receptores CD4 y CCR5, (2) la respuesta inmune específica contra el VIH-1 y (3) la inducción de la activación inmune a nivel sistémico, iniciada a partir de la respuesta inmune innata que involucra el reconocimiento de patrones moleculares por medio de los receptores tipo Toll (TLR); por ejemplo, la translocación de productos microbianos, como el lipopolisacárido (LPS) del lumen intestinal hacia la circulación, en donde pueden activar el sistema inmunológico mediante la unión a los TLR⁵⁵. Esta activación puede ser de las células T no infectadas y células B debido al aumento en la producción de citocinas inflamatorias, como respuesta a la replicación viral^{22,50,62}.

1.5.5. Implicación de las T_{CM} en la inmunopatogénesis del VIH-1

Como se describió previamente, la destrucción masiva de las células T CD4⁺, principalmente las T_{EM}, inicia un estado de activación persistente que tiene como consecuencia un incremento sustancial en la actividad proliferativa de la subpoblación de las células T_{CM} capaz de proveer suficientes T_{EM} a los sitios efectores y mantener la competencia inmunológica. Sin embargo, se ha demostrado que en la infección por SIV en macacos Rhesus, las nuevas

células T_{EM} que se producen son de vida media corta, comparadas con las células producidas durante una respuesta homeostática en individuos no infectados^{56,63,64}. Conforme progresa la infección, esta capacidad regenerativa se degrada probablemente por fallas en las funciones homeostáticas de las células T_{CM}, ya que, aunque se presentan niveles elevados de proliferación, no son suficientes para mantener las T_{EM} en mucosas, resultando ser uno de los mecanismos que contribuye a la inmunodeficiencia^{22,24}

1.6. Modelo de arresto y muerte de las células T_{CM} en la infección por VIH-1

Como se describió previamente, la homeostasis de las T_{CM} es considerada como un factor clave para el mantenimiento de la competencia inmunológica durante la fase asintomática de la infección, y las fallas homeostáticas en esta subpoblación celular, contribuyen a la progresión de la infección hacia el SIDA^{47,56,65}.

Por esta razón, en nuestro grupo de trabajo, se realizó un estudio comparativo del transcriptoma de las T_{CM} de pacientes VIH⁺ y de controles sin infección, con el objetivo de determinar si las T_{CM} de los pacientes tienen un perfil de expresión génica consistente con la activación y simultáneamente con capacidades alteradas de proliferación y supervivencia⁴⁷. El estudio consistió en la búsqueda patrones de expresión de genes expresados diferencialmente por las subpoblaciones de células T CD4⁺ de controles (T_N, T_{CM} y T_{EM}) y pacientes (T_N y T_{CM}). Se encontraron 210 genes expresados diferencialmente, que distinguen particularmente a las células T_{CM} de los pacientes con VIH-1 y están relacionados con el ciclo celular, daño y reparación del ADN, apoptosis y con la respuesta inmune.

El análisis de la firma de expresión génica de las T_{CM} sugiere un aumento en la promoción de entrada a ciclo celular y proliferación hasta la fase S, seguido de arresto en la fase G₂ o M, que las conduce a la muerte. Adicionalmente, en este modelo, se propone un tipo de muerte celular diferente

a apoptosis, involucrado en la muerte celular después del arresto en el ciclo celular (**figura 5**). Por otra parte, la firma de expresión de las células T_{Naive}, si bien indica daño al ADN, no predice citostasis ni arresto (datos sin publicar).

Para demostrar que los genes relacionados con la modulación del ciclo celular, encontrados a partir del análisis de la firma de expresión génica de las T_{CM}, es consistente con capacidades alteradas de proliferación, en este trabajo, se realizó la evaluación funcional *in vitro* de este modelo en las células T CD4⁺ de memoria centrales de pacientes con infección por VIH-1.

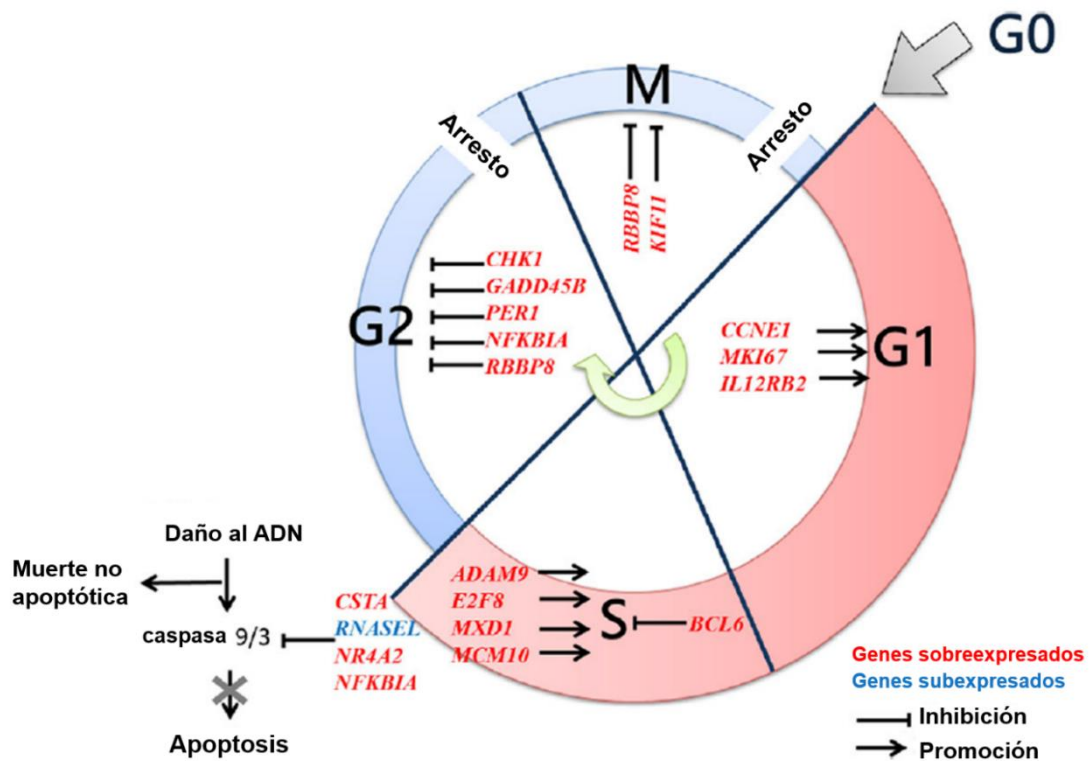


Figura 5. Firma de expresión génica de las T_{CM} de pacientes VIH+. Estos genes sugieren la promoción de entrada a ciclo celular desde la fase G₀ hasta la fase S, seguida de arresto en las fases G₂ o M; y predice una disminución en la apoptosis. (*Modificado de Olvera-García et al., 2016*).

2. Justificación

Durante la infección por VIH, las células T_{CM} son de gran importancia para el mantenimiento del repertorio de células T_{EM} durante la fase asintomática de la infección, logrando un control de la enfermedad. Sin embargo, las fallas en las funciones de las células T_{CM} pueden contribuir al desarrollo del SIDA. Por ello, es de nuestro interés el estudio de las células T_{CM} .

El análisis del transcriptoma de las células T_{CM} predice que durante la infección por VIH-1 se presenta un aumento en la promoción de entrada a ciclo celular hasta la fase S seguida de arresto en la fase G_2 o M. En este estudio se realizó la verificación experimental de este modelo, para confirmar que, en efecto, estas alteraciones se producen en las células T_{CM} de pacientes VIH⁺.

3. Hipótesis

De acuerdo a nuestro modelo de arresto y muerte de las células T_{CM} en la infección por VIH-1, incrementará la entrada a ciclo celular en respuesta a su estimulación por el TCR, no obstante, se presentará el arresto en la fase G_2 o M.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Evaluar experimentalmente si en las células T_{CM} de pacientes VIH⁺ se presenta la entrada a ciclo celular, seguida de arresto en las fases G₂ o M, después de ser estimuladas a través del TCR.

4.2. Objetivos particulares

- Extraer células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y purificar células T CD4⁺ de memoria centrales (T_{CM}) de pacientes y controles.
- Estimular las células T_{CM} a través del receptor de células T (TCR) con los anticuerpos agonistas anti-CD3/CD28, para inducir su activación y proliferación.
- Determinar la fase del ciclo celular en la que se encuentran las células T_{CM} de acuerdo a su contenido de ADN, después de ser estimuladas.
- Determinar la expresión de las ciclinas A y B₁.
- Contrastar los parámetros determinados con el modelo de arresto en las células T_{CM} durante la infección por VIH-1.

5. Diseño del estudio

Se realizó un estudio observacional, transversal y explicativo de casos y controles en el que se incluyeron 19 voluntarios en dos grupos de estudio. El primer grupo corresponde a un total de diez donadores sin infección por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) y clínicamente sanos (VIH⁻); y el segundo grupo corresponde a nueve voluntarios con diagnóstico reciente de VIH-1 (VIH⁺) que no recibían tratamiento antirretroviral y que decidieron participar en el estudio firmando la carta de consentimiento informado correspondiente (**Anexo 1**). Los pacientes tenían una mediana de 328 células T CD4⁺/mL de sangre (intervalo 285–759) y una mediana de 96,026 copias de RNA viral/mL de sangre (intervalo 5,520–669,491).

Con la finalidad de evaluar la propensión al arresto, se comparó el contenido de ADN y la expresión de las ciclinas A y B₁ en la subpoblación de células T CD4⁺ de memoria centrales (T_{CM}) de pacientes y controles, después de ser estimuladas a través del receptor de células T.

Las muestras de los pacientes que no presentaran la cantidad de células suficientes y los datos clínicos necesarios para su análisis fueron descartadas del estudio.

6. Metodología

6.1. Obtención de las muestras

Las muestras de los donadores sanos VIH⁻, se obtuvieron de concentrados leucocitarios del banco de sangre del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER).

En cuanto a las muestras de los pacientes VIH⁺, se tomaron 60 mililitros de sangre periférica por punción venosa en tubos con heparina de sodio, se juntó el volumen de cada tubo y se centrifugaron a 2000 rpm por 20 min a 18°C en una centrífuga Beckman GPKR (Beckman Coulter®; Brea, CA, EE. UU) para obtener el paquete celular del cual se tomaron las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) para el experimento.

6.2. Extracción de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

A partir de una dilución 1:2 de las muestras de los voluntarios VIH⁺ y VIH⁻ se extrajeron las PBMC por gradiente de densidad en ficoll (Lymphoprep™. Axis-Shield; Oslo, NO). Una vez obtenidas las PBMC, se lavaron con solución amortiguadora de fosfatos 1X libre de pirógenos (PBS) (Corning; Corning, NY, EE. UU) a 200 g por 15 min. Posteriormente se agregaron 10 mL solución amortiguadora de lisis de eritrocitos (NH₄Cl 150 mM, KHCO₃ 10 mM, EDTA 0.1 mM) por 10 min, después se realizó un segundo lavado con PBS 1X y se separó el número de células requeridas para el cultivo (3×10^5 células), para la purificación de las T_{CM} (150×10^6 células), y aquellas con las que se evaluó la pureza (1.0×10^6 células), por medio de un hematocitómetro de Neubauer (Marienfeld Superior; Lauda-Königshofen, DE) y el colorante vital azul tripano.

Las PBMC necesarias para el cultivo se resuspendieron en medio RPMI 1640 (Corning; Corning, NY, EE. UU) suplementado con suero fetal bovino descomplementado al 10% (SFB), penicilina/estreptomicina 100U/μL y 2 mM de L-Glutamina; en el volumen final requerido (250μL/ 0.1×10^6 células). Después, se sembraron 0.1×10^6 células por pozo, en una placa de 96 pozos

de fondo redondo (Costar[®], Corning; Corning, NY, EE. UU) y se agregaron 100 U/ μ L de IL-2 a cada pozo. Las células se cultivaron durante 96 horas a 37°C en contacto con 5% de CO₂ y se les cambió el medio cada 48 h.

6.3. Purificación de T CD4⁺ de memoria centrales (T_{CM})

Para la purificación de las células T_{CM}, se utilizó el sistema de microesferas magnéticas *CD4+ Central Memory T Cell Isolation Kit* (Miltenyi Biotec. Auburn, CA, EE. UU). Primero se realizó una selección negativa de las células CD8⁻, CD14⁻, CD15⁻, CD16⁻, CD19⁻, CD25⁻, CD36⁻, CD45RA⁻, CD56⁻, CD123⁻, TCR γ/δ ⁻, CD235⁻, posteriormente se realizó una selección positiva de las células T CD4⁺ de memoria centrales, por la expresión del receptor de quimiocinas CCR7 en la membrana de las mismas, de acuerdo con las instrucciones descritas por el fabricante. Brevemente, las PBMC separadas para la purificación se resuspendieron en solución amortiguadora Miltenyi (PBS, EDTA 2 mM y SFB al 0.5%) y se marcaron con el coctel de anticuerpos monoclonales conjugados con biotina (para la selección negativa) y se incubaron por 10 min a 4 °C. Después, se agregaron microesferas conjugadas con anticuerpos monoclonales anti-biotina y se incubaron por 15 min más a 4°C, se lavaron con solución amortiguadora Miltenyi a 300 g por 10 min, para después realizar la separación magnética por columna (*LS columns*, Miltenyi Biotec; Auburn, CA, EE. UU) en un magneto Quadro MACS (Miltenyi Biotec; Auburn, CA, EE. UU) y se lavaron nuevamente.

Para la selección positiva de las T_{CM}, las células recuperadas, se resuspendieron en solución amortiguadora Miltenyi y se marcaron magnéticamente con el anticuerpo monoclonal anti-CCR7 conjugado con R-ficoeritrina (PE) por 10 min a 4 °C, se lavaron y se agregaron microesferas conjugadas con anticuerpos anti-PE, se incubaron por 15 min más a 4 °C y se lavaron con la solución amortiguadora.

Finalmente se obtuvo una alícuota con el número de T_{CM} necesarias para el cultivo (al menos 0.5 x 10⁶ células) y la evaluación de la pureza (0.05 x 10⁶ células).

Las T_{CM} para el cultivo, se resuspendieron en medio RPMI 1640 suplementado (250µL/ 1 x 10⁵ células) y se sembraron en la placa de 96 pozos y se agregaron 100 U/µL de IL-2 a cada pozo, de la misma manera que las PBMC.

6.4. Evaluación de la pureza de las células T_{CM}

Para la evaluación del ciclo celular en este experimento, se requirió que la subpoblación de células purificadas estuviera enriquecida con al menos 85% de células T_{CM}. Por esta razón, se evaluó la pureza de las células obtenidas, mediante una tinción para citometría de flujo. Los anticuerpos monoclonales utilizados para esta determinación se presentan en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Anticuerpos monoclonales utilizados para la determinación de la pureza de las T_{CM} mediante citometría de flujo multiparamétrica.

Anticuerpo	Fluorocromo	Marca	Clona	Lote
Anti-CD4	APC-Cy7	BD Pharmingen™	RPA-T4	2300903
Anti-CCR7	PE	Miltenyi Biotec	REA108	5160825045
Anti-CD45RA	APC	BD Pharmingen™	HI100	4016511
Anti-CD38	Biotina	Miltenyi Biotec	IB6	5140306024

**APC-Cy7 alofocianina Cianina 7, PE ficoeritrina, APC alofocianina*

Se tomaron, para cada tubo de la tinción, 2.5 x 10⁵ PBMC y 5 x 10⁴ T_{CM}, se resuspendieron en PBA y se agregaron los anticuerpos de acuerdo a la **Tabla 3**, se incubaron por 20 min a 4°C. Posteriormente se lavaron con 2 mL de PBA a 2000 rpm por 3 min y se resuspendieron en 200 µL de paraformaldehído al 1% (PFA). A los tubos que lo requerían, se agregaron 50 µL de la solución de estreptavidina conjugada con ficoeritrina Texas rojo (PE-Texas Red Streptavidin) / proteína clorófila peridina Cianina 5.5 (PerCP-Cy

5.5 Streptavidin) diluida 1:100 y se incubaron por 20 min a 4°C, se lavaron y se resuspendieron en 200 µL de PFA.

Para delimitar las poblaciones celulares, se utilizaron tubos de fluorescencia menos uno (FMO), que contienen todos los anticuerpos utilizados en la tinción con excepción de el anticuerpo para el que se requiere delimitar la población celular⁶⁶.

Tabla 3. Panel de anticuerpos y volúmenes utilizados para la determinación de pureza de las T_{CM}.

Tubo	PBA (µL)	Volumen de anticuerpo (µL)				Estreptavidina 1:100 (µL)
		CD4	CD38	CD45RA	CCR7	
FMO CCR7	23	2	10	15	---	50
FMO CD38	28	2	---	15	5	---
Tubo de tinción (PBMC)	18	2	10	15	5	50
Tubo de tinción (T _{CM})	18	2	10	15	5	50
Sin teñir	50	---	---	---	---	---

Los eventos se adquirieron en el citómetro de flujo FACSAria II (BD[®]. San Jose, CA, EE. UU) en la Unidad de Citometría del INER.

Para el análisis de la pureza se utilizó el software FlowJo[®] versión 10.2 (FlowJo, LLC. Ashland, OR, EE. UU). La estrategia de análisis se muestra en la **figura 6**: Se seleccionaron las células no agrupadas (**figura 6a**); a partir de estas, se delimitó la población de células que presentó una complejidad y tamaño característico de células T (**figura 6b**), de estas células, se seleccionaron las positivas para el marcador CD4 (**figura 6c**); finalmente, se tomaron las células positivas para el marcador CCR7 y negativas para CD45RA (**figura 6d**). Se presentó un enriquecimiento mayor al 85% de esta población celular (intervalo 86.8- 98.7%) (**figura 7**).

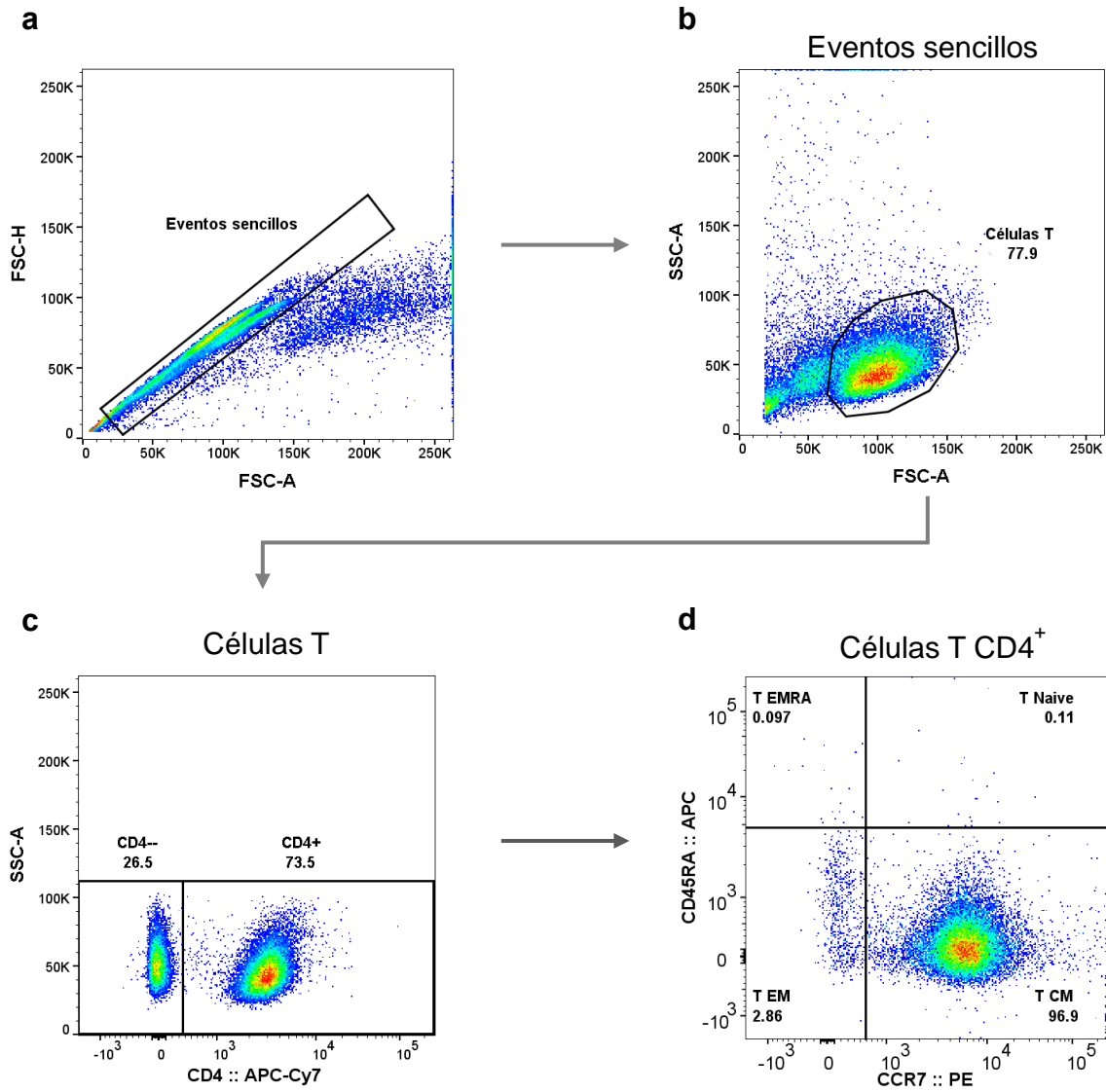


Figura 6. Estrategia de análisis para la determinación de la pureza de las células T_{CM}. Gráficas de puntos representativas de un paciente con infección por VIH-1. Se adquirieron 20 000 eventos CCR7⁺, CD45RA⁻. (a) selección de células no agrupadas, (b) región de células T, de acuerdo a su tamaño y complejidad, (c) selección de células T de acuerdo a la expresión de la molécula CD4, (d) separación de subpoblaciones de células T CD4⁺, basada en la expresión de CCR7 y CD45RA: Células TNaive, células T de memoria centrales y efectoras (T_{CM} y T_{EM}, respectivamente) y células T terminalmente diferenciadas.

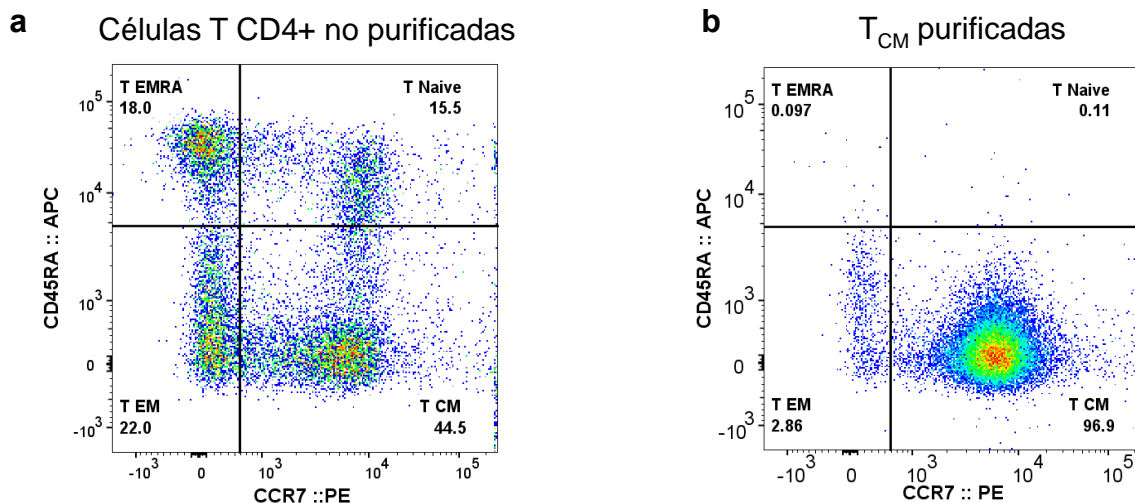


Figura 7. Enriquecimiento de la subpoblación de células T CD4+ de memoria centrales (T_{CM}). Graficas de puntos representativas de un paciente con infección por VIH-1 (**a**) antes de la purificación de las células T_{CM} a partir de PBMC, y (**b**) después de la purificación. El enriquecimiento de la población de células CCR7⁺, CD45RA⁻ es mayor de 85% (intervalo 86.8-98.7).

6.5. Estímulo de células con anti-CD3/CD28 agonistas

Las PBMC y las T_{CM} se estimularon a través del receptor de células T (TCR) con los anticuerpos agonistas anti-CD3 y anti-CD28.

Se agregaron microesferas magnéticas cargadas con los anticuerpos agonistas anti-CD3/CD28 (Miltenyi Biotec; Auburn, CA, EE. UU) a tres pozos de las PBMC y tres pozos de las T_{CM} en una proporción de una microesfera por cada cuatro células durante 6 h 37°C con 5% de CO₂. Después de este tiempo, las microesferas se retiraron con ayuda de un magneto y se lavaron con medio RPMI 1640 a 2000 rpm por 5 min y se resuspendieron en medio RPMI 1640 suplementado (250µL/ 0.1 x 10⁶ células). Finalmente, se sembraron en el pozo correspondiente.

Después de las 96 h de cultivo, todas las PBMC y T_{CM} se cosecharon en tubos cónicos de 1.5 mL y se lavaron con PBS a 2000 rpm por 5 min,

inmediatamente después, se realizaron las tinciones para el análisis del ciclo celular.

6.6.Determinación de viabilidad

Para determinar si las células que se analizarían eran viables, se realizó una tinción para citometría de flujo con LIVE/DEAD[®] *Fixable Near-IR Dead Cell Stain Kit* (Life Technologies[™]; Eugene, OR, EE. UU). Este reactivo es capaz de unirse de forma covalente a las aminos libres. Si la membrana de las células está comprometida, el colorante puede reaccionar con las aminos libres tanto en el interior como en el exterior; mientras que en las células viables la unión del colorante con las aminos libres sólo se limita a la superficie celular. Como resultado se puede observar una diferencia en la intensidad de fluorescencia que permite diferenciarlas.

Los tubos de las 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 y protegidos de la luz. Después del tiempo de incubación, se centrifugaron a 2000 rpm por 5 min y se lavaron con PBS.

Una vez realizada la tinción de viabilidad, las células se fijaron con 1 mL de PFA al 1.5% por 10 min a temperatura ambiente y se lavaron con PBA. Después, se agregó metanol al 100 % con agitación constante, para permeabilizar las células y se incubaron por 30 min a -20°C. Finalmente, se lavaron con PBA para poder continuar con las tinciones correspondientes.

6.7.Determinación de ciclinas A y B₁

Una vez realizada la fijación y permeabilización de las células, se agregaron 100 µL de PBA y 20 µL de cada uno de los anticuerpos monoclonales que se presentan en la **Tabla 4**, a los tubos que corresponden a las células estimuladas, no estimuladas y el control de isotipo. Se incubaron por 30 min a temperatura ambiente y se lavaron con PBA. Después, se

resuspendieron en 500 μ L de la misma solución amortiguadora y se transfirieron a tubos de citometría (BD Falcon™. Bedford, MA, EE. UU).

Tabla 4. Anticuerpos monoclonales utilizados para la evaluación de la expresión de las ciclinas mediante citometría de flujo multiparamétrica.

Anticuerpo	Fluorocromo	Marca	Clona	Lote
Anti-ciclina A	PE	BD Pharmingen™	BF683	5075776
Anti- ciclina B ₁	FITC	BD Pharmingen™	GNS-1	5028917
Control de isotipo (ciclina A)	PE	BD Pharmingen™	IgE-3	5075776
Control de isotipo (ciclina B ₁)	FITC	BD Pharmingen™	MOPC-21	5028917

*PE ficoeritrina, FITC isocianato de fluoresceína

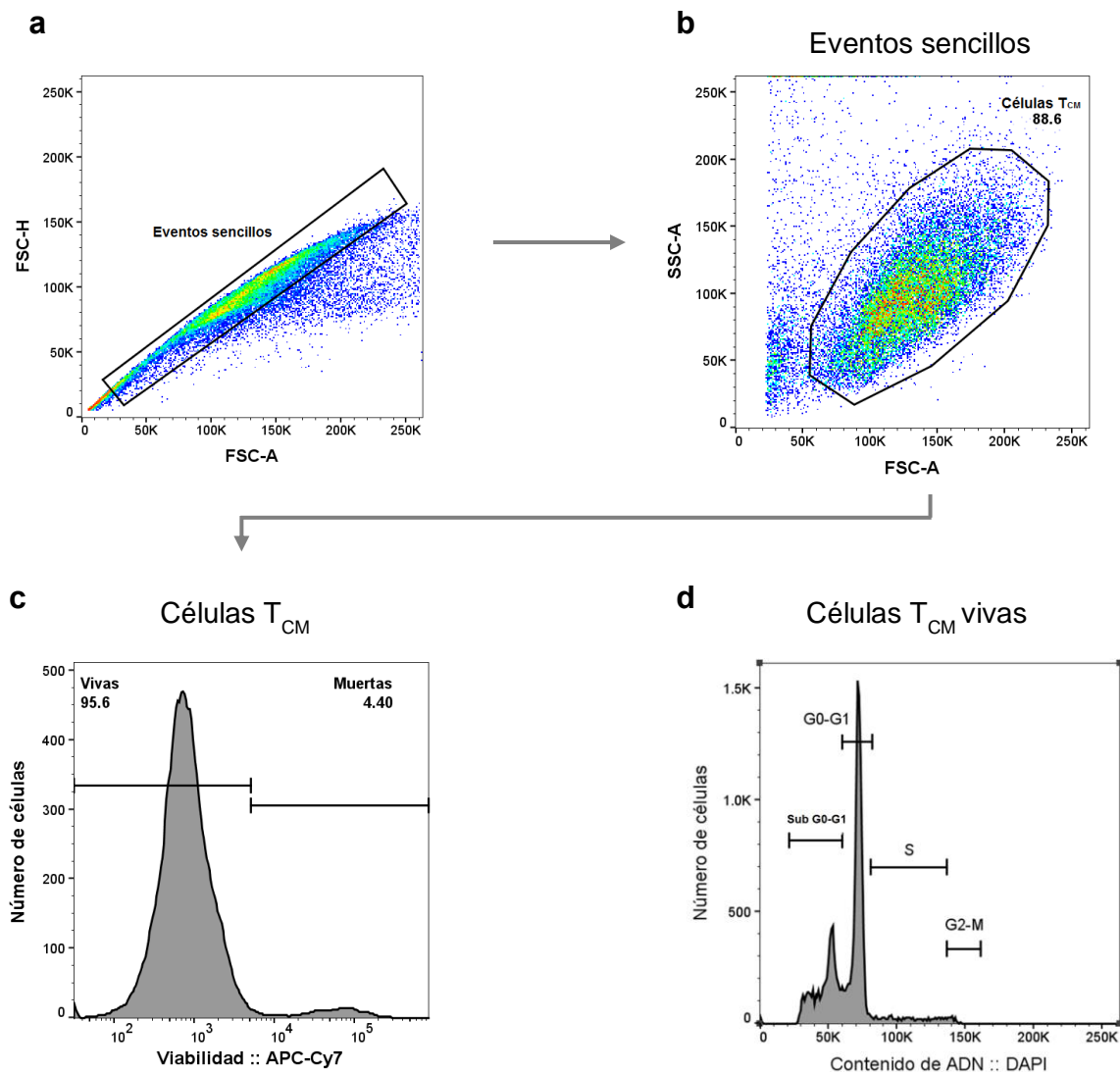
Por último, para la determinación del contenido de ADN, a todos los tubos con células T_{CM} se agregaron 0.5 μ L del compuesto fluorescente 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI), que actúa asociándose al ADN de doble cadena con mayor afinidad hacia los grupos de adenina-timina.

6.8. Análisis del ciclo celular y contenido de ADN de la subpoblación de T_{CM}

Para el análisis del ciclo celular se utilizó el software FlowJo® versión 10.2. La estrategia de análisis se muestra en la **figura 8**: a partir de los eventos sencillos (**figura 8a**), se realizó la selección de la subpoblación de células T_{CM} de acuerdo a su tamaño y complejidad; ya que se trata de células estimuladas, se presentan incluidas en dicha selección células que presentan mayor tamaño y complejidad (**figura 8b**), posteriormente, debido a que es de nuestro interés realizar la evaluación funcional del modelo de arresto en células T_{CM} vivas, se delimitó dicha población (**figura 8c**). A partir de las células T_{CM} vivas, se realizó la evaluación del ciclo celular (**figura 8d**) y la expresión de ciclinas A y B₁ (**figura 8e y 8f**).

Para definir las fases del ciclo celular, de acuerdo al contenido de ADN, se utilizaron como control, las células T_{CM} no estimuladas; se delimitaron las

primeras fases del ciclo celular (G_0/G_1) con el mismo contenido de ADN como una sola población, posteriormente se definieron las fases G_2/M utilizando el doble de la media geométrica correspondiente a la fase G_0/G_1 ; la fase S, se seleccionó la población que comprende del final de la fase G_0/G_1 hasta el inicio de la fase G_2/M ; en cuanto a las células que presentaron un contenido de ADN variable, menor que las células diploides (sub G_0/G_1), se seleccionó la población previa a la definida como G_0/G_1 . (**figura 9**). Por otra parte, para delimitar las poblaciones de células que expresaban las ciclinas A o B₁, se utilizaron controles de isotipo; estas son inmunoglobulinas que se unen al mismo isotipo del anticuerpo de interés para determinar uniones inespecíficas (**tabla 4**).



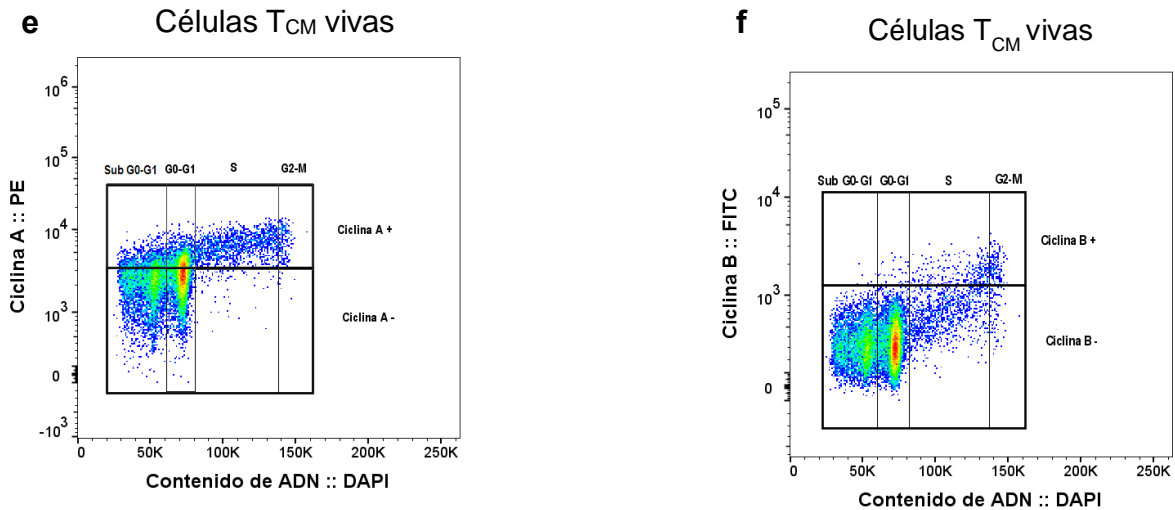


Figura 8. Estrategia de análisis para la evaluación del ciclo celular en las células T_{CM} . Gráficas de un paciente con infección por VIH-1. Se adquirieron 17 500 eventos de células T_{CM} vivas. (a) selección de células no agrupadas, (b) selección de la región correspondiente a las células T_{CM} , de acuerdo con su tamaño y complejidad, (c) delimitación de la población de células vivas, (d) definición de las fases del ciclo celular en las células T_{CM} vivas, por medio del histograma de contenido de ADN, (e y f) graficas de puntos que muestran a las células T_{CM} vivas, que expresan la ciclina A y B_1 , respectivamente, en cada fase del ciclo celular.

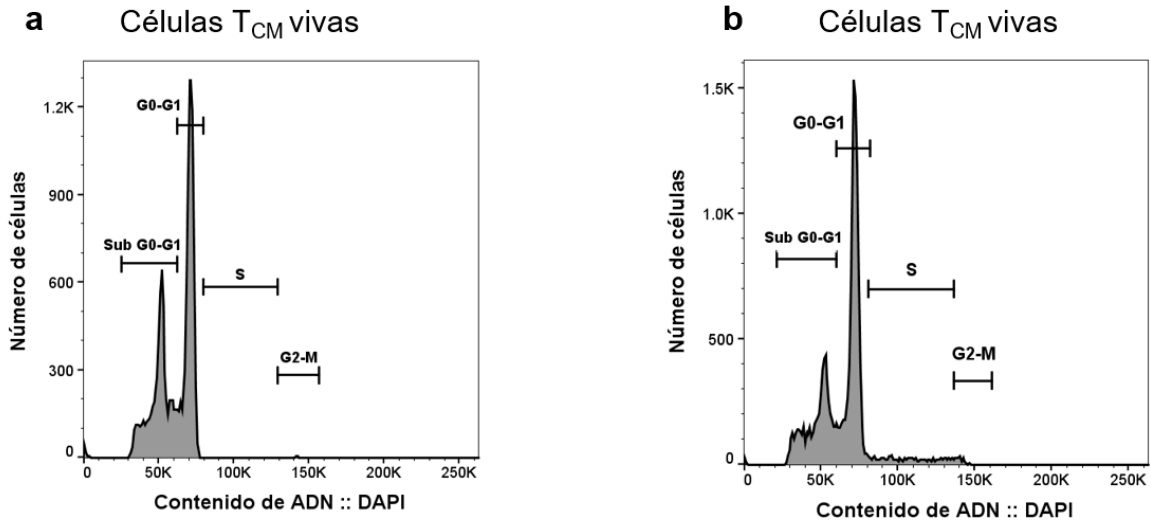


Figura 9. Delimitación de las fases del ciclo celular. Se utilizaron células T_{CM} no estimuladas (a), para definir cada fase del ciclo celular. Se definió el pico que contiene la mayor cantidad de células como la fase G_0/G_1 , posteriormente, se utilizó el doble de la media geométrica de la primera fase, para definir la población correspondiente a G_2/M ; para delimitar la fase S, se tomó la población que comprende del inicio de la primera y la última fase; finalmente, se seleccionó la fracción sub G_0/G_1 , de células con un contenido menor de ADN que las células diploides. (b) Se muestra la delimitación de las fases del ciclo celular en células estimuladas.

6.9. Análisis estadístico

Se evaluó si se presentaron diferencias significativas en el contenido de ADN y la expresión de las ciclinas A y B_1 entre los grupos de voluntarios VIH^+ y VIH^- , mediante la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney, considerando como significativo un valor $p < 0.05$. El análisis se realizó con el software GraphPad Prism[®] versión 6.0 (GraphPad Software Inc; San Diego CA. EE. UU).

7. Resultados

En el presente estudio se incluyeron donadores sanos VIH⁻ (n=10) y pacientes con infección por VIH-1 (n=9) que cumplieron con los criterios de inclusión (**Anexo 1**).

7.1. Las células T_{CM} de los pacientes con VIH-1 se acumulan en una población que presenta un contenido de ADN variable

Se observó que la proporción de células T_{CM} vivas acumuladas en la fracción sub G₀/G₁ era mayor en los pacientes VIH⁺ (30.8%), en comparación con los controles VIH⁻ (9.9%; $p = 0.0434$) (**figura 10a**). En cuanto a la acumulación de células en las fases del ciclo celular, no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos (**figura 10b**).

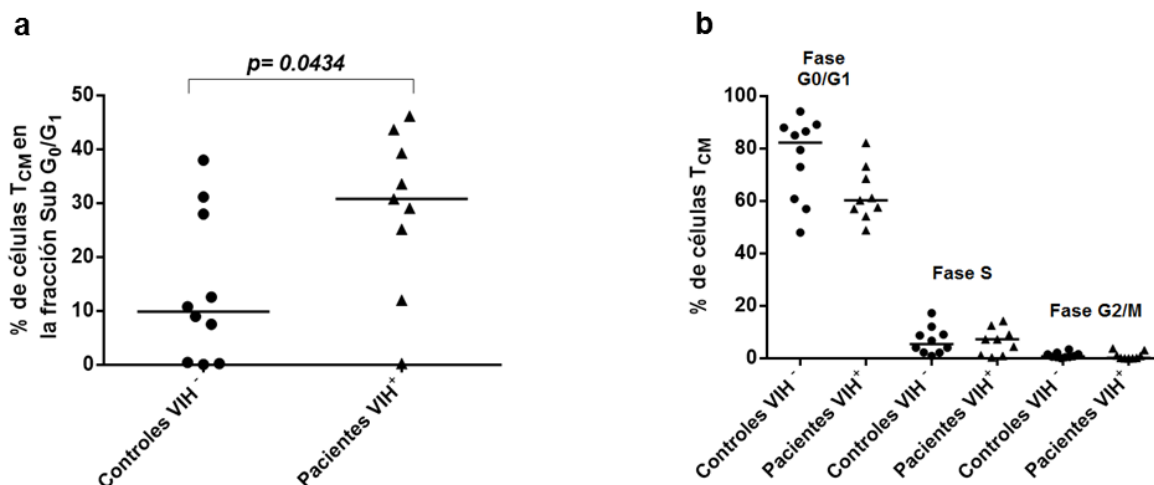


Figura 10. Frecuencia de células T_{CM} acumuladas en la fracción sub G₀/G₁. (a) Proporción de las células T_{CM} vivas acumuladas en la fracción sub G₀/G₁, identificadas por su contenido de ADN variable (**figura 9**), en pacientes con infección por VIH-1 (n=9) y controles VIH⁻ (n=10). (b) Frecuencia de células T_{CM} en las fases del ciclo celular. La barra horizontal corresponde a la mediana de cada grupo. Las diferencias significativas se analizaron mediante la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney ($p < 0.05$).

7.2. La expresión de las ciclinas A y B₁ se encuentra alterada en las células T_{CM} de los pacientes VIH⁺

Habiendo visto que las células T_{CM} de los pacientes se acumularon de manera anormal en la fracción sub G₀/G₁, se comparó la expresión de las ciclinas A y B₁ en las células T_{CM} de pacientes y controles.

Se observó una acumulación de células T_{CM} vivas en la fracción sub G₀/G₁ y en la fase G₀/G₁ y que, además, expresaban la ciclina A, en los pacientes (3.7 y 9.8%, respectivamente), comparados con los controles (0.1 y 3.1%; $p=0.0027$ y 0.0434 , respectivamente) (**figura 11**); en cuanto a las células que expresaron la ciclina A en las fases restantes del ciclo celular, no se presentaron diferencias significativas. El análisis de la expresión de la ciclina B₁ se realizó de la misma forma que para la ciclina A, aunque no se observaron diferencias significativas de su expresión en ninguna fase del ciclo celular.

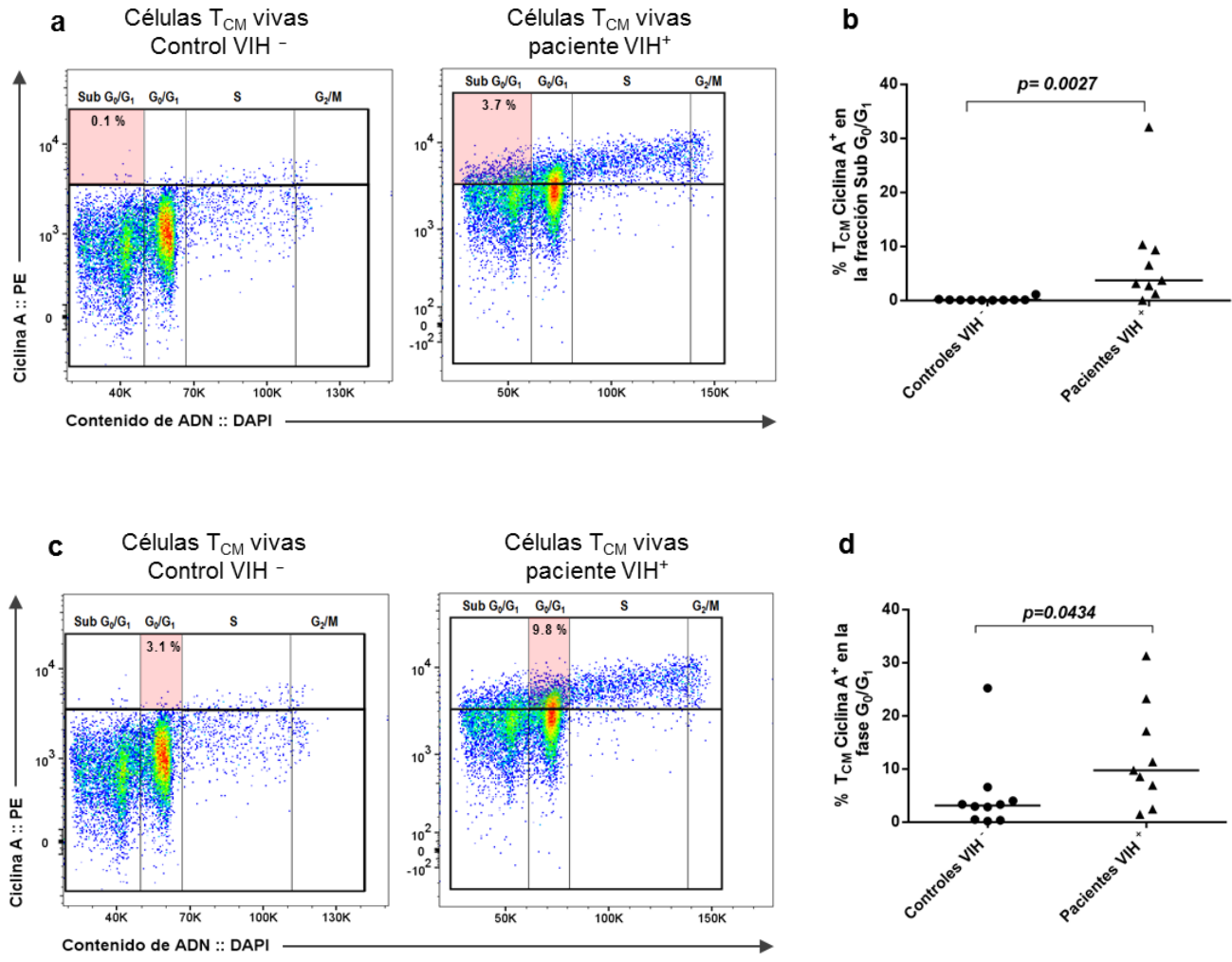


Figura 11. Proporción de células T_{CM} vivas acumuladas y que expresan la ciclina A. (a) Gráficas de puntos de células T_{CM} de pacientes y controles que se encuentran en la fracción sub G₀/G₁ y que expresan la ciclina A (sombreado en rojo). (b) Frecuencia de células T_{CM} de pacientes y controles que expresan la ciclina A en la fracción sub G₀/G₁ (p=0.0027) (c) Gráfica de puntos células T_{CM} de pacientes y controles que se encuentran en la fase G₀/G₁ del ciclo celular y que expresan la ciclina A (sombreado en rojo). (d) Frecuencia de células T_{CM} de pacientes y controles que expresan la ciclina A en la en la en la en la fase G₀/G₁ del ciclo celular (p=0.0434). Las diferencias significativas se encontraron utilizando la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney.

8. Discusión

Se verificó experimentalmente el modelo de arresto y muerte de las células T_{CM} , determinado a partir de su firma de expresión génica en la infección por VIH-1, en trabajos previos de grupo⁴⁷. El modelo predice un aumento en la promoción de entrada al ciclo celular, hasta la fase S, seguido de arresto en la fase G_2 o M, que las conduce a la muerte⁴⁷. En concreto, se realizó el análisis experimental del ciclo celular y la expresión de las ciclinas A o B_1 , para determinar si se presentaba un aumento en la promoción de entrada a ciclo celular y la fase en la que se produce el arresto.

Para asegurar que los parámetros determinados correspondieran a la subpoblación de células T_{CM} , estas se purificaron, de manera que hubiera un enriquecimiento de al menos 85% de las mismas (**figura 7**). Se estimularon a través del TCR con coestimulación a través de CD28 en presencia de IL-2. Esta estimulación enciende un mecanismo de activación más fisiológico, en comparación con otras moléculas mitogénicas; además de que mantiene las capacidades funcionales de las células⁶⁷.

De acuerdo con numerosos estudios, entre los cambios fisiopatológicos que se presentan durante la infección por VIH-1, es la inducción de un estado hiperproliferativo en las células $T^{24,68,69}$. En estudios realizados por Sedaghat y colaboradores en células T $CD4^+$ totales activadas ($CD25^+$) recién extraídas de pacientes y controles, se determinó que las células de los pacientes se acumularon en mayor proporción después de la fase G_0/G_1 del ciclo celular que las de los controles⁷⁰. Nuestros resultados en contraste con los reportados previamente, muestran que las células T_{CM} de los pacientes no presentan diferencias significativas en cuanto a su acumulación en cada fase del ciclo celular con respecto a las de los controles (**figura 10b**). Esta diferencia se puede deber a que, comparado con el estudio de Sedaghat *et al*, en donde se analizó la población de células T $CD4$ totales, nuestros resultados se obtuvieron al evaluar la subpoblación de células T_{CM} después de ser estimuladas *in vitro* a través del TCR; por lo que se puede inferir que las

poblaciones de células T CD4⁺ son afectadas de manera diferente durante la infección por VIH-1, y que el efecto observado en este estudio puede ser propio de las células T_{CM}; sin embargo, es necesario realizar la evaluación de cada población de células T CD4⁺ para comprender de los mecanismos que pueden estar involucrados en la progresión hacia el SIDA.

Una razón más que puede explicar que no se presentaran diferencias en la acumulación de células T_{CM} entre los pacientes y controles en este estudio, es la manera en que las células se activaron. De acuerdo con Jiang *et al*, durante la infección por VIH-1 se presentan niveles elevados de proliferación de las células T CD4⁺ de memoria. Por medio de la expresión de marcadores intracelulares y de superficie (OX40, CD40L, CD38 y PD-1) se encontró que los ligandos de TLR y las citocinas inflamatorias tienen una mayor contribución en la activación de estas células, en comparación con la expansión a través del receptor de células T⁶⁹. Por otra parte, Sieg y colaboradores encontraron que durante la infección por VIH-1 se presentaba un incremento en la frecuencia de células T_{CM} que se encontraban en la fase S del ciclo celular, no obstante, las fallas en la expresión de los marcadores CD69 y CD25 sugieren que la activación de las células T_{CM} se debía a los mediadores inflamatorios presentes, no así por la estimulación del TCR⁷¹. Por lo tanto, de la misma manera que en los estudios anteriores, nuestros resultados sugieren una alteración de las células T_{CM} en la respuesta a la estimulación por el TCR, por lo que se puede afirmar que el aumento en la proliferación es una alteración intrínseca posiblemente debida al ambiente inflamatorio y no por el efecto citopático directo del virus.

Si bien se encontró que hubo un incremento en la frecuencia de las células T_{CM} tanto de pacientes VIH⁺ como de controles en la fracción sub G₀/G₁, como resultado de la estimulación *in vitro*, esta acumulación fue mayor en las células de pacientes (30.8%) que en las de controles (9.9%; $p= 0.0434$) (**figura 10a**). Las células en la fracción sub G₀/G₁ son heterogéneas. Su contenido de ADN puede deberse a distintos grados de degradación del ADN, a la presencia de fragmentos nucleares, a cromosomas o núcleos con una cantidad normal de

ADN, pero con una estructura diferente en la cromatina, como es el caso de células en proceso de diferenciación⁷². Nuestros resultados sugieren la presencia de daños en el ADN, ya que, de acuerdo al transcriptoma de las células T_{CM} en la infección por VIH-1, la sobreexpresión de algunos genes involucrados en la progresión del ciclo celular, como *CCNE1*, están asociados con la desestabilización de los cromosomas y daño al ADN, el cual a su vez conduce al arresto celular y, por lo tanto, a la muerte⁴⁷.

Para determinar la fase del ciclo celular en la que se produce el arresto, se realizó el análisis simultáneo del contenido de ADN y la expresión de las ciclinas A y B₁.

Al comparar la expresión de la ciclina A en las células T_{CM} de los pacientes VIH⁺ y controles, sólo se presentó una mayor proporción de células vivas que expresaban ciclina A, acumuladas en G₀/G₁ (**figura 11c y 11d**), no así en las fases S y G₂/M del ciclo celular. En contraste con nuestros resultados, los estudios de Sedaghat y colaboradores de las alteraciones en la expresión de la ciclina A en células T CD4⁺ activadas fisiológicamente mostraron que había una mayor proporción de células, que expresaban la ciclina A en las fases del ciclo celular posteriores a G₀/G₁. Esta diferencia con los resultados obtenidos, puede deberse a que, de acuerdo con el transcriptoma de las células T_{CM} durante la infección por VIH⁴⁷, se presenta un aumento en la promoción de entrada a ciclo celular; debido a que la ciclina A comienza a expresarse en la fase G₁ tardía, no se podría asegurar si su sobreexpresión en esta fase corresponde al arresto en el ciclo celular o bien, a otras alteraciones en la regulación del ciclo celular⁷³.

Otro de los hallazgos obtenidos a partir del análisis comparativo de la expresión de la ciclina A en las células T_{CM} de los pacientes y controles, es la presencia de una mayor proporción de células T_{CM} vivas que expresan la ciclina A en la fracción sub G₀/G₁ en los pacientes VIH⁺, a diferencia de los controles sin infección (**figura 11a**). Como se describió previamente, la acumulación de células que poseen un contenido de ADN menor que las células diploides

(fracción sub G_0/G_1), sugiere la presencia de alteraciones en los mecanismos de control y división celular durante la fase S del ciclo, que las conduce a la muerte. Agregando la expresión de la ciclina A, se puede afirmar que las células T_{CM} acumuladas en la fracción sub G_0/G_1 , entraron al ciclo celular, sin embargo, no fueron capaces de completar el proceso de división debido a la presencia de daño al ADN. De acuerdo con el modelo a evaluar, el arresto en el ciclo celular puede ocurrir durante la fase G_2 o la fase M ⁴⁷; sin embargo, con los resultados obtenidos al analizar el contenido de ADN y la expresión de la ciclina A, no es posible discriminar la fase en la que ocurre el arresto, debido a que esta proteína, además de formar complejos enzimáticos con la proteína Cdk2, lo hace con la Cdk1, que participa en la progresión del ciclo celular desde la fase G_1 tardía, hasta el inicio de la fase M.

Investigaciones de Galati y Cannavo *et al*, acerca de la relación de la infección por VIH-1 con los mediadores del ciclo celular, las ciclinas, sugieren que la expresión y la unión prematura de las ciclinas A y B_1 con la proteína Cdk1 y el incremento en la actividad del complejo ciclina B_1 -Cdk1, contribuye a que se presenten fallas en la coordinación de los eventos durante la mitosis, que conduce a las células a una *catástrofe mitótica* y a una consecuente muerte celular^{8,74}. De acuerdo con Piedimonte *et al*, los niveles de expresión de la ciclina B_1 se encuentran incrementados en las células T en reposo y se mantiene su expresión no programada durante todo el ciclo celular, debido principalmente, a una alteración en el mecanismo de degradación de las ciclinas, que indica, una desregulación compleja del control del ciclo celular⁸. Sumado a estos hallazgos, de acuerdo con la firma de expresión génica de las células T_{CM} durante la infección por VIH-1, existe una sobreexpresión del gen *CCNB2*⁴⁷, que codifica para la proteína ciclina B_2 , que pertenece también a las ciclinas de tipo B y contribuye, junto con la ciclina B_1 , a la asociación de las estructuras mitóticas durante la fase G_2/M . Sorprendentemente, en los resultados obtenidos en este estudio se encontró que no había diferencias significativas entre los pacientes VIH^+ y los controles VIH^- , en la proporción de

células T_{CM} vivas, acumuladas en cada fase del ciclo celular, que además expresaban la ciclina B₁.

Como se mencionó anteriormente, la infección por VIH-1 induce un estado general de activación inmune, asociado a una continua estimulación antigénica y a una estimulación inespecífica por citocinas proinflamatorias y ligandos de TLR durante la fase crónica de la infección, que conduce a una alteración en la proliferación y un aumento en la susceptibilidad de las células T a la muerte. El origen de estas alteraciones, probablemente, involucra la desregulación del ciclo celular^{8,42}.

Los resultados obtenidos en este estudio, junto con el transcriptoma de las células T_{CM}⁴⁷ sugieren una alteración propia de esta subpoblación de células T CD4⁺ en la infección por VIH-1. En efecto, estudios del transcriptoma de las células T_{Naive} (datos sin publicar), así como en estudios previos de Okoye y colaboradores en macacos Rhesus con la infección por SIV⁶⁵, demuestran alteraciones distintas a las que presenta la población de células T_{CM}.

9. Conclusiones

Se validó experimentalmente el modelo de arresto y muerte de las células T_{CM} en la infección por VIH-1. Las células T_{CM} de los pacientes muestran un aumento en la promoción de entrada a ciclo celular y un posible arresto en las fases G_2 o M , como lo predice su firma de expresión génica durante la infección. Esto indica que las poblaciones de células T_{CD4^+} son afectadas de manera diferente y que estas alteraciones pueden ser propias de la subpoblación de células T_{CM} .

Debido a la importancia de las células T_{CM} en el mantenimiento del repertorio de células T_{EM} durante la fase crónica de la infección, los resultados obtenidos en este estudio podrán apoyar la búsqueda de los posibles mecanismos que influyen en la falla de las funciones homeostáticas de esta población, que dan lugar al inicio del SIDA. Asimismo, estos resultados podrán contribuir al desarrollo de tratamientos que restablezcan las funciones de las células T_{CM} .

10. Anexos

10.1. Carta de consentimiento informado

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
Ismael Cosío Villegas



Carta de Consentimiento Informado

Título del estudio: Estudio del papel de la activación inmune crónica en la pérdida de células T CD4⁺ durante la infección por VIH usando las células T CD4⁺ de memoria centrales como modelo.

INFORMACIÓN GENERAL ACERCA DE ESTA FORMA

Usted puede ser elegible para tomar parte en un estudio de investigación. Este formulario le dará información importante sobre la razón por la que este estudio se está realizando, lo que ocurrirá durante el estudio, los riesgos y posibles beneficios. **Por favor, lea atentamente.** Después de terminar, hable con el investigador y haga las preguntas necesarias. Puede ser que también quiera hablar con su familia, amigos, su médico de atención primaria u otro proveedor de atención médica sobre la posibilidad de unirse a este estudio. Si usted decide tomar parte en el estudio, se le pedirá que firme este formulario y se le dará una copia del formulario firmado para que lo conserve.

INFORMACIÓN GENERAL ACERCA DEL ESTUDIO Y LOS INVESTIGADORES

Patrocinadores: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)

Investigadores Responsables:

Dr. en C. Héctor Enrique Espinosa Arciniega

Laboratorio de Inmunología Integrativa, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas

Teléfono celular: 044 55 .54 08 76 61

PROPÓSITO DEL ESTUDIO

¿Por qué se está realizando este estudio?

En este estudio se observarán las células de la sangre de personas que viven con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y se compararán con células de personas no infectadas por el VIH, para entender cómo la infección por VIH disminuye la cantidad y las funciones de las células T CD4⁺, las cuales intervienen en la defensa contra microorganismos que causan enfermedades.

Consentimiento informado, página 1 de 3

Calzada de Tlalpan 4 502, Colonia Sección XVI,
14000, Tlalpan, Ciudad de México MEXICO
Teléfono: +52 (55) 5487 1700

**Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
Ismael Cosío Villegas**



INFORMACIÓN ACERCA DE LOS PARTICIPANTES

¿Por qué me piden que tome parte en este estudio?

Usted está siendo invitado a participar en este estudio ya sea porque a) **tiene infección por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1)**, o b) porque **no tiene la infección por VIH y se considera voluntario sano**, y cumple con las características de estado de salud requeridas por este estudio. A este estudio se invitarán pacientes con VIH del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas que no estén en este momento bajo tratamiento antirretroviral.

¿Cuántos voluntarios esperan reclutar este estudio?

Se espera reclutar 29 voluntarios con VIH y 29 voluntarios no infectados.

¿Puedo abandonar este estudio en cualquier momento?

Usted puede abandonar el estudio en cualquier momento. Si usted decide detener su participación en el estudio, primero hable con alguno de los investigadores del equipo y con su médico. Esta decisión no altera ninguna relación de usted o algún pariente suyo con las instituciones involucradas ni sus opciones de atención médica.

Si decido no tomar parte en este estudio ¿qué otras opciones tengo?

Si usted decide no participar en este estudio puede continuar con el seguimiento médico habitual. Usted siempre tiene la opción de no participar en este estudio.

¿Cuánto tiempo estaré en este estudio?

Este estudio requiere que usted asista un solo día a las instalaciones para realizar una toma de muestra.

INFORMACIÓN ACERCA DE LOS PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO

¿Exactamente qué se me realizará en este estudio? ¿Qué tipo de procedimientos de investigación me realizarán si estoy de acuerdo en unirme a este estudio?

Si acepta participar, el único procedimiento que se le realizará será tomar una muestra de sangre, punzando su antebrazo con una aguja y extrayendo aproximadamente 60 mL de sangre. La muestra será tomada en las instalaciones del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. Esta sangre

**Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
Ismael Cosío Villegas**



será utilizada para experimentos del presente proyecto de investigación. También los datos sobre su estado de salud serán usados en el presente estudio. No se le aplicará ningún fármaco como parte de este estudio.

Después de la obtención de la muestra de sangre, las muestras serán utilizadas en su totalidad para la obtención de plasma y células mononucleares de sangre periférica. Las muestras se usarán para los objetivos establecidos en este estudio de investigación. Los sobrantes se desecharán de acuerdo a los lineamientos de seguridad biológica vigentes. No se guardarán alícuotas adicionales.

INFORMACIÓN ACERCA DE LOS RIESGOS Y BENEFICIOS

¿Qué riesgos enfrente en este estudio?

Al tomar la muestra de sangre existe la posibilidad de que experimente dolor en el antebrazo por la punción. Después de este procedimiento debe tener mantener su brazo sin movimientos bruscos durante aproximadamente 5 minutos para dejar que se forme un coágulo, por lo que su brazo estará inhabilitado por este corto tiempo, lo que puede generar incomodidad. En raras ocasiones se forman pequeños derrames de sangre (moretones) que no ocasionan ningún problema y que generalmente desaparecen en una o dos semanas. Otro efecto posible, del procedimiento es la infección en el sitio de la punción, aunque esta complicación es extremadamente rara debido a las técnicas de asepsia que se realizan antes de cada extracción de sangre y al empleo de material estéril y desechable.

¿Qué se hará para protegerme de estos riesgos?

Se cuenta con personal encargado de la toma de muestra altamente calificado. Se usarán las instalaciones y el material más adecuado para este procedimiento, por lo que los riesgos e incomodidades se reducen al mínimo.

Mientras participo en este estudio, ¿puedo participar en algún otro?

¿Actualmente está usted participando en algún otro estudio de investigación?

Sí No

Si la respuesta es sí, por favor indique cuál:

**Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
Ismael Cosío Villegas**



Se le protegerá de posibles efectos adversos derivado de la única toma de muestra que requiere este estudio. Recuerde que la toma de muestra de sangre es el único procedimiento que se requiere. Se tomará en cuenta para su inclusión en este o en si otro estudio si estuviese recibiendo algún fármaco incompatible con este estudio o si la única toma de muestra requerida para un estudio afecte su participación en el otro.

¿Cómo puedo beneficiarme si tomo parte en este estudio? ¿Cómo pueden beneficiarse otros?
Usted no recibirá ninguna remuneración económica por participar en este estudio. Si se verifica nuestra hipótesis sobre las células T CD4 de memoria centrales, el conocimiento generado podría ser de importancia para entender cómo se pierden las células T CD4 durante la infección no tratada por VIH, lo que podría beneficiar a otros en el futuro.

INFORMACIÓN ACERCA DE LA TERMINACIÓN DEL ESTUDIO

Si quiero dejar de tomar parte en este estudio, ¿qué debo hacer?

Usted puede abandonar el estudio en cualquier momento. Si usted decide detener su participación en el estudio, exprese su deseo de detener la toma de muestra de sangre o su deseo de que no se utilice su sangre o los datos obtenidos de ella. Usted puede hablar con el investigador responsable para aclarar sus dudas. Esta decisión no altera ninguna relación de usted o algún pariente suyo con las instituciones involucradas.

¿Existe la posibilidad de sufrir algún daño si decido abandonar el estudio antes de que concluya?

Debido a que la participación en este estudio consiste en una única toma de muestra de sangre, su decisión de abandonar el estudio no deriva en ningún daño. Si la muestra le está siendo tomada y usted decide abandonar el estudio los riesgos se limitan a los asociados a la punción del brazo.

¿Los investigadores pueden descartarme del estudio aunque desee continuar?

El investigador puede decidir descartarlo de este estudio si considera que es lo mejor para su bienestar, si usted no se apega a las instrucciones o por otras razones que el investigador considere importantes.

**Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
Ismael Cosío Villegas**



INFORMACIÓN ACERCA DE LOS COSTOS

Si decido entrar a este estudio, ¿tendrá algún costo para mí?

No. Todos los gastos de este estudio serán cubiertos por un fondo para proyectos de investigación del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y por el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas.

¿Recibiré algún pago por participar en este estudio?

No podemos ofrecerle ningún pago por participar en este estudio.

¿Quién obtendrá ganancias o beneficios de los resultados del estudio?

Nadie obtendrá ganancias económicas con los resultados de este estudio. Los únicos beneficios obtenidos serán científicos, ya que los resultados nos ayudaran a comprender mejor cómo es que el VIH causa enfermedad.

ACERCA DE LA CONFIDENCIALIDAD

¿Cómo será protegida mi privacidad?

Todos los resultados de las investigaciones realizadas serán archivados confidencialmente mediante claves alfanuméricas para su identificación. El acceso a su expediente estará restringido a su médico y a los investigadores encargados de este estudio, ellos no pueden difundir su identidad ni ningún otro tipo de información acerca de usted sin su consentimiento.

¿Qué información sobre mí puede ser vista por otras personas y por qué? ¿Quiénes podrían tener acceso a dicha información?

Los registros médicos donde usted puede ser identificado y el consentimiento informado, autorizado por usted con su firma, podrían ser requeridos y copiados para una evaluación de la conducción e integridad ética del estudio realizada por el Comité de Ciencia y Bioética en Investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Villegas".

**Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
Ismael Cosío Villegas**



¿Qué sucederá con la información acerca de mí después del estudio o si decido abandonar el estudio antes de que concluya?

Su identidad y sus datos personales siempre serán confidenciales. La información obtenida de sus muestras sólo podrá ser utilizada en este estudio a menos de que el Comité de Ética en Investigación autorice su uso en otro estudio. Esta información permanecerá bajo resguardo indefinidamente y sólo podrá salir de resguardo para ser destruida.

INFORMACIÓN DE CONTACTO

¿A quién puedo preguntar acerca de este estudio?

Al investigador responsable, quien estará dispuesto a contestar cualquier duda que pudiera surgir acerca de su participación en este estudio.

Dr. Héctor Enrique Espinosa Arciniega
Investigador en Ciencias Médicas D
Laboratorio de Inmunología Integrativa,
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Villegas"
Calzada de Tlalpan 4502, Colonia Sección XVI,
14080 Tlalpan, D.F.
Hector.enrique.espinosa@gmail.com
Tel. celular: 55-5408 7661

¿A quién puedo contactar para preguntar sobre mis derechos como sujeto de investigación?

Al Comité de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, Calzada de Tlalpan 4 502, Colonia Sección XVI, 14080 Tlalpan, Ciudad de México.

¿A quién puedo contactar si considero que la participación en este estudio me ha provocado algún daño?

Al Comité de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, encargado de vigilar la investigación en el Instituto. , que se encuentra en Calzada de Tlalpan 4 502, Colonia Sección XVI, 14080 Tlalpan, D.F. México. Tel. 54870900, extensión 5254.

Estoy de acuerdo en contestar el cuestionario anexo, con el que se pretende evaluar si están claros todos los puntos importantes de esta carta de consentimiento informado.

Nombre: _____

Fecha: _____

Consentimiento informado, página 6 de 8

Calzada de Tlalpan 4 502, Colonia Sección XVI,
.14000, Tlalpan, Ciudad de México MEXICO
Teléfono: +52 (55) 5487 1700

**Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
Ismael Cosío Villegas**



	SI	NO
1. Comprendo que mi participación es completamente voluntaria y que si lo decido puedo no participar, retirarme o discontinuar mi participación de este estudio en cualquier momento sin que esto afecte mi tratamiento ni mi relación con el personal que participa en el protocolo.	_____	_____
2. Sé que para la participación en este protocolo es necesario la toma de una muestra de 60 mL de sangre (aprox. 10 tubos) en una ocasión.	_____	_____
3. En el caso de los voluntarios infectados por VIH. Estoy consciente de que ni el INCMNSZ ni el INER se hará responsable de los costos de los medicamentos contra VIH (tratamiento antirretroviral), los fármacos contra enfermedades oportunistas, ni por los procedimientos alternativos o adicionales que no tengan que ver con la investigación.	_____	_____
4. En el caso de los voluntarios sanos. Estoy consciente de que el INER no se hará responsable de los procedimientos alternativos o adicionales que no tengan que ver con la investigación.	_____	_____
5. Sé que mi identidad no formará parte de los resultados de este estudio para ser publicados en el medio científico y académico especializado y que toda la información generada a partir de mis muestras de sangre serán confidenciales.	_____	_____
6. Estoy satisfecho con las explicaciones de los procedimientos y resolvieron todas mis dudas para la participación en este protocolo.	_____	_____

Firma del paciente: _____

Firma y nombre del que aplicó el cuestionario: _____

Consentimiento informado, página 7 de 8



Calzada de Tlalpan 4 502, Colonia Sección XVI,
14000, Tlalpan, Ciudad de México MEXICO
Teléfono: (52) (55) 5487 1700

**Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
Ismael Cosío Villegas**



Tengo el documento *Hoja de Consentimiento Informado*. Me han explicado los métodos y procedimientos que me realizarán en este estudio. He hablado directamente con _____

_____, quien ha respondido a mi satisfacción todas mis preguntas respecto a este estudio. Todas mis dudas han sido aclaradas. En particular, se me ha informado y acepto donar 60 mililitros de mi sangre para que se estudien las células en ella. Sé también que mis células podrían ser estudiadas nuevamente en el futuro en el marco de este proyecto de investigación sobre la infección por VIH.

Doy mi consentimiento de participación en esta investigación como **voluntario VIH*** o como **voluntario sano** y sé bien que puedo cancelarla o retirarme en cualquier momento si yo lo deseo. Sé que esto no tendría repercusiones en mi atención como paciente o en la atención de algún familiar de este Instituto.

Recibo una copia firmada y fechada de este consentimiento.

Al firmar este consentimiento, no renuncio a ninguno de mis derechos legales como paciente en un estudio de investigación.

<u>NOMBRE COMPLETO</u>	<u>FIRMA</u>	<u>FECHA</u>	<u>Parentesco con el participante</u>	<u>Dirección</u>
			<u>NO APLICA</u>	_____
Persona participante en el estudio	_____	_____		_____
Testigo 1	_____	_____		_____
Testigo 2	_____	_____		_____
Profesional de la salud que realizó la discusión de este documento	_____	_____		_____
Dr. Héctor Enrique Espinosa Arciniega	_____	_____		_____



11. Referencias

1. Turner, B. G. & Summers, M. F. Structural biology of HIV. *J. Mol. Biol.* **285**, 1–32 (1999).
2. Coiras, M., López-Huertas, M. R., Pérez-Olmeda, M. & Alcamí, J. Understanding HIV-1 latency provides clues for the eradication of long-term reservoirs. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 798–812 (2009).
3. Mohan, T., Bhatnagar, S., Gupta, D. L. & Rao, D. N. Current understanding of HIV-1 and T-cell adaptive immunity: progress to date. *Microb. Pathog.* **73**, 60–69 (2014).
4. Sharp, P. M. & Hahn, B. H. Origins of HIV and the AIDS Pandemic. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **1**, a006841–a006841 (2011).
5. Okoye, A. A. & Picker, L. J. CD4(+) T-cell depletion in HIV infection: mechanisms of immunological failure. *Immunol. Rev.* **254**, 54–64 (2013).
6. Engelman, A. & Cherepanov, P. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**, 279–290 (2012).
7. Chowdhury, A. & Silvestri, G. Host-pathogen interaction in HIV infection. *Curr. Opin. Immunol.* **25**, 463–469 (2013).
8. Galati, D. & Bocchino, M. New insights on the perturbations of T cell cycle during HIV infection. *Curr. Med. Chem.* **14**, 1920–1924 (2007).
9. Douek, D. C., Picker, L. J. & Koup, R. A. T cell dynamics in HIV-1 infection. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 265–304 (2003).
10. Sieg, S. F., Harding, C. V. & Lederman, M. M. HIV-1 infection impairs cell cycle progression of CD4+ T cells without affecting early activation responses. *J. Clin. Invest.* **108**, 757–764 (2001).
11. Piot, P. *et al.* Defeating AIDS—advancing global health. *The Lancet* **386**, 171–218 (2015).

12. Global AIDS Update 2016 | UNAIDS. Available at:
<http://www.unaids.org/en/resources/documents/2016/Global-AIDS-update-2016>.
(Accessed: 27th February 2017)
13. AIDSinfo | UNAIDS. Available at: <http://aidsinfo.unaids.org/>. (Accessed: 27th February 2017)
14. México | ONUSIDA. Available at:
<http://www.unaids.org/es/regionscountries/countries/mexico/>. (Accessed: 27th June 2016)
15. Ganser-Pornillos, B. K., Yeager, M. & Sundquist, W. I. The structural biology of HIV assembly. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **18**, 203–217 (2008).
16. The Structural Biology of HIV. Available at:
<http://cdn.rcsb.org/pdb101/learn/resources/structural-biology-of-hiv/index.html>.
(Accessed: 27th February 2017)
17. Maartens, G., Celum, C. & Lewin, S. R. HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. *Lancet Lond. Engl.* **384**, 258–271 (2014).
18. Lawn, S. D., Butera, S. T. & Folks, T. M. Contribution of immune activation to the pathogenesis and transmission of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**, 753–777, table of contents (2001).
19. Sallusto, F., Geginat, J. & Lanzavecchia, A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 745–763 (2004).
20. Pepper, M. & Jenkins, M. K. Origins of CD4(+) effector and central memory T cells. *Nat. Immunol.* **12**, 467–471 (2011).
21. Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M. & Lanzavecchia, A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* **401**, 708–712 (1999).

22. Grossman, Z., Meier-Schellersheim, M., Paul, W. E. & Picker, L. J. Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys. *Nat. Med.* **12**, 289–295 (2006).
23. Chattopadhyay, P. K. & Roederer, M. Immunophenotyping of T Cell Subpopulations in HIV Disease. in *Current Protocols in Immunology* (eds. Coligan, J. E., Kruisbeek, A. M., Margulies, D. H., Shevach, E. M. & Strober, W.) (John Wiley & Sons, Inc., 2005).
24. Okoye, A. *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.* **204**, 2171–2185 (2007).
25. Schafer, K. A. The cell cycle: a review. *Vet. Pathol.* **35**, 461–478 (1998).
26. Bendris, N., Lemmers, B. & Blanchard, J. M. Cell cycle, cytoskeleton dynamics and beyond: the many functions of cyclins and CDK inhibitors. *Cell Cycle Georget. Tex* **14**, 1786–1798 (2015).
27. Gérard, C. & Goldbeter, A. Dynamics of the mammalian cell cycle in physiological and pathological conditions. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* **8**, 140–156 (2016).
28. Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R. & Berneman, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* **36**, 131–149 (2003).
29. Park, M. S. & Koff, A. Overview of the Cell Cycle. in *Current Protocols in Cell Biology* (eds. Bonifacino, J. S., Dasso, M., Harford, J. B., Lippincott-Schwartz, J. & Yamada, K. M.) (John Wiley & Sons, Inc., 2001).
30. Morgan, D. O. *The cell cycle: principles of control*. (Published by New Science Press in association with Oxford University Press ; Distributed inside North America by Sinauer Associates, Publishers, 2007).
31. Amini, S., Khalili, K. & Sawaya, B. E. Effect of HIV-1 Vpr on cell cycle regulators. *DNA Cell Biol.* **23**, 249–260 (2004).

32. Novák, B. & Tyson, J. J. A model for restriction point control of the mammalian cell cycle. *J. Theor. Biol.* **230**, 563–579 (2004).
33. Johnson, D. G. & Walker, C. L. CYCLINS AND CELL CYCLE CHECKPOINTS. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **39**, 295–312 (1999).
34. Kastan, M. B. & Bartek, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* **432**, 316–323 (2004).
35. Alberts, B. *Molecular biology of the cell*. (Garland Science, Taylor and Francis Group, 2015).
36. Blagosklonny, M. V. Cell senescence and hypermitogenic arrest. *EMBO Rep.* **4**, 358–362 (2003).
37. Senderowicz, A. M. Cyclin-dependent kinases as targets for cancer therapy. *Cancer Chemother. Biol. Response Modif.* **20**, 169–196 (2002).
38. Satyanarayana, A. & Kaldis, P. Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. *Oncogene* **28**, 2925–2939 (2009).
39. Darzynkiewicz, Z., Gong, J., Juan, G., Ardelet, B. & Traganos, F. Cytometry of cyclin proteins. *Cytometry* **25**, 1–13 (1996).
40. Fung, T. K. & Poon, R. Y. C. A roller coaster ride with the mitotic cyclins. *Semin. Cell Dev. Biol.* **16**, 335–342 (2005).
41. Yam, C. H., Fung, T. K. & Poon, R. Y. C. Cyclin A in cell cycle control and cancer. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **59**, 1317–1326 (2002).
42. Piedimonte, G. *et al.* Unscheduled cyclin B expression and p34 cdc2 activation in T lymphocytes from HIV-infected patients. *AIDS Lond. Engl.* **13**, 1159–1164 (1999).
43. Nakayama, Y. & Yamaguchi, N. Role of Cyclin B1 Levels in DNA Damage and DNA Damage-Induced Senescence. in *International Review of Cell and Molecular Biology* **305**, 303–337 (Elsevier, 2013).

44. Davy, C. & Doorbar, J. G2/M cell cycle arrest in the life cycle of viruses. *Virology* **368**, 219–226 (2007).
45. Andersen, J. L., Le Rouzic, E. & Planelles, V. HIV-1 Vpr: mechanisms of G2 arrest and apoptosis. *Exp. Mol. Pathol.* **85**, 2–10 (2008).
46. Yates, A., Stark, J., Klein, N., Antia, R. & Callard, R. Understanding the Slow Depletion of Memory CD4+ T Cells in HIV Infection. *PLoS Med.* **4**, e177 (2007).
47. Olvera-García, G. *et al.* A transcriptome-based model of central memory CD4 T cell death in HIV infection. *BMC Genomics* **17**, 956 (2016).
48. Brinchmann, J. E., Albert, J. & Vartdal, F. Few infected CD4+ T cells but a high proportion of replication-competent provirus copies in asymptomatic human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* **65**, 2019–2023 (1991).
49. Stevenson, M. HIV-1 pathogenesis. *Nat. Med.* **9**, 853–860 (2003).
50. Sodora, D. L. & Silvestri, G. Immune activation and AIDS pathogenesis: *AIDS* **22**, 439–446 (2008).
51. Mehandru, S. *et al.* Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *J. Exp. Med.* **200**, 761–770 (2004).
52. Yerly, S. & Hirschel, B. Diagnosing acute HIV infection. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **10**, 31–41 (2012).
53. Mattapallil, J. J. *et al.* Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection. *Nature* **434**, 1093–1097 (2005).
54. Clark, S. J. & Shaw, G. M. The acute retroviral syndrome and the pathogenesis of HIV-1 infection. *Semin. Immunol.* **5**, 149–155 (1993).
55. Marchetti, G., Tincati, C. & Silvestri, G. Microbial Translocation in the Pathogenesis of HIV Infection and AIDS. *Clin. Microbiol. Rev.* **26**, 2–18 (2013).

56. Picker, L. J. *et al.* Insufficient production and tissue delivery of CD4⁺ memory T cells in rapidly progressive simian immunodeficiency virus infection. *J. Exp. Med.* **200**, 1299–1314 (2004).
57. Monaco, C. L. *et al.* Altered Virome and Bacterial Microbiome in Human Immunodeficiency Virus-Associated Acquired Immunodeficiency Syndrome. *Cell Host Microbe* **19**, 311–322 (2016).
58. Douek, D. C., Roederer, M. & Koup, R. A. Emerging concepts in the immunopathogenesis of AIDS. *Annu. Rev. Med.* **60**, 471–484 (2009).
59. Hazenberg, M. D. *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* **95**, 249–255 (2000).
60. Patki, A. H., Zielske, S. P., Sieg, S. F. & Lederman, M. M. Preferential S Phase Entry and Apoptosis of CD4⁺ T Lymphocytes of HIV-1-Infected Patients after in Vitro Cultivation. *Clin. Immunol.* **97**, 241–247 (2000).
61. Deeks, S. G. Immune activation set point during early HIV infection predicts subsequent CD4⁺ T-cell changes independent of viral load. *Blood* **104**, 942–947 (2004).
62. Bafica, A., Scanga, C. A., Schito, M., Chaussabel, D. & Sher, A. Influence of Coinfecting Pathogens on HIV Expression: Evidence for a Role of Toll-Like Receptors. *J. Immunol.* **172**, 7229–7234 (2004).
63. Hellerstein, M. K. *et al.* Subpopulations of long-lived and short-lived T cells in advanced HIV-1 infection. *J. Clin. Invest.* **112**, 956–966 (2003).
64. Brenchley, J. M. *et al.* CD4⁺ T Cell Depletion during all Stages of HIV Disease Occurs Predominantly in the Gastrointestinal Tract. *J. Exp. Med.* **200**, 749–759 (2004).

65. Okoye, A. A. *et al.* Naive T cells are dispensable for memory CD4+ T cell homeostasis in progressive simian immunodeficiency virus infection. *J. Exp. Med.* **209**, 641–651 (2012).
66. Maecker, H. T. & Trotter, J. Flow cytometry controls, instrument setup, and the determination of positivity. *Cytometry A* **69A**, 1037–1042 (2006).
67. Trickett, A. & Kwan, Y. L. T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads. *J. Immunol. Methods* **275**, 251–255 (2003).
68. Silvestri, G. & Feinberg, M. B. Turnover of lymphocytes and conceptual paradigms in HIV infection. *J. Clin. Invest.* **112**, 821–824 (2003).
69. Jiang, W. *et al.* Cycling Memory CD4+ T Cells in HIV Disease Have a Diverse T Cell Receptor Repertoire and a Phenotype Consistent with Bystander Activation. *J. Virol.* **88**, 5369–5380 (2014).
70. Sedaghat, A. R. *et al.* Chronic CD4+ T-cell activation and depletion in human immunodeficiency virus type 1 infection: type I interferon-mediated disruption of T-cell dynamics. *J. Virol.* **82**, 1870–1883 (2008).
71. Sieg, S. F. *et al.* 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.* **192**, 62–70 (2005).
72. Riccardi, C. & Nicoletti, I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat. Protoc.* **1**, 1458–1461 (2006).
73. Mrena, J. *et al.* Prognostic significance of cyclin A in gastric cancer. *Int. J. Cancer* **119**, 1897–1901 (2006).
74. Cannavo', G. Abnormal intracellular kinetics of cell-cycle-dependent proteins in lymphocytes from patients infected with human immunodeficiency virus: a novel biologic link between immune activation, accelerated T-cell turnover, and high levels of apoptosis. *Blood* **97**, 1756–1764 (2001).