

Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas

Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica



“EXPRESIÓN DE ROR_{yt} Y ROR_{γ} EN DIFERENTES TIPOS CELULARES Y BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE ESTIMULACIÓN”

Tesis presentada por la Bachiller:

Flores Mancilla, Nicol de Jesus

para optar el Título Profesional de

Ingeniera Biotecnóloga

Asesor:

PhD. Vera López, Karin

Co-asesor:

PhD. Ancuta, Petronela

Arequipa - Perú

2021

UNIVERSIDAD CATOLICA SANTA MARIA
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas
y Biotecnológicas
Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica

Expediente N°. **202000004704**

N° Trámite en Fac. **003-2020**

Fecha Recep. Fac. **04-03-2020**

FORMATO ÚNICO PARA TRAMITACIÓN DE TÍTULO PROFESIONAL

DE: **FLORES MANCILLA, Nicol de Jesus**

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE **INGENIERO BIOTECNÓLOGO**

"EXPRESION DE RORyT Y RORy EN DIFERENTES TIPOS DE CELULARES Y BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE ESTIMULACION"

DICTAMINADORES: 1) CORDOVA BARRIOS, Cinthia 2) CARPIO CARPIO, José

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, el Jurado Dictaminador del Plan de Tesis informa que: hechas las observaciones y subsanadas las correcciones; consideramos se encuentra APTO para continuar con el trámite, de acuerdo con el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad

Atentamente

FIRMAS



FECHA 03-06-2020

ASESOR: VERA LOPEZ, Karin

DICTAMEN ASESORÍA: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación como asesora del trabajo de investigación presentado por la recurrente, tengo a bien informar que se ha verificado el cumplimiento de los objetivos y redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes por lo cual considero que se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad

Atentamente

FIRMA



FECHA 22-08-2020

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

1) **CORDOVA BARRIOS, Cinthia** 3) **VALDIVIA CARPIO, Willy**
2) **CARPIO CARPIO, José**

DICTAMEN FINAL: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, hemos procedido a revisar el Borrador de Tesis presentado por la recurrente, y habiéndose cumplido con las correcciones respectivas, consideramos que el presente trabajo de investigación se encuentra APTO para continuar con el trámite, en conformidad al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Atentamente

FIRMAS



FECHA: 22-11-2020

JURADOS: PRESIDENTE
VOCAL
SECRETARIO

FECHA

HORA

LOCAL

FIRMA DEL DECANO

FECHA

Este proyecto de investigación se realizó en el Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), bajo la supervisión de Petronela Ancuta, PhD.



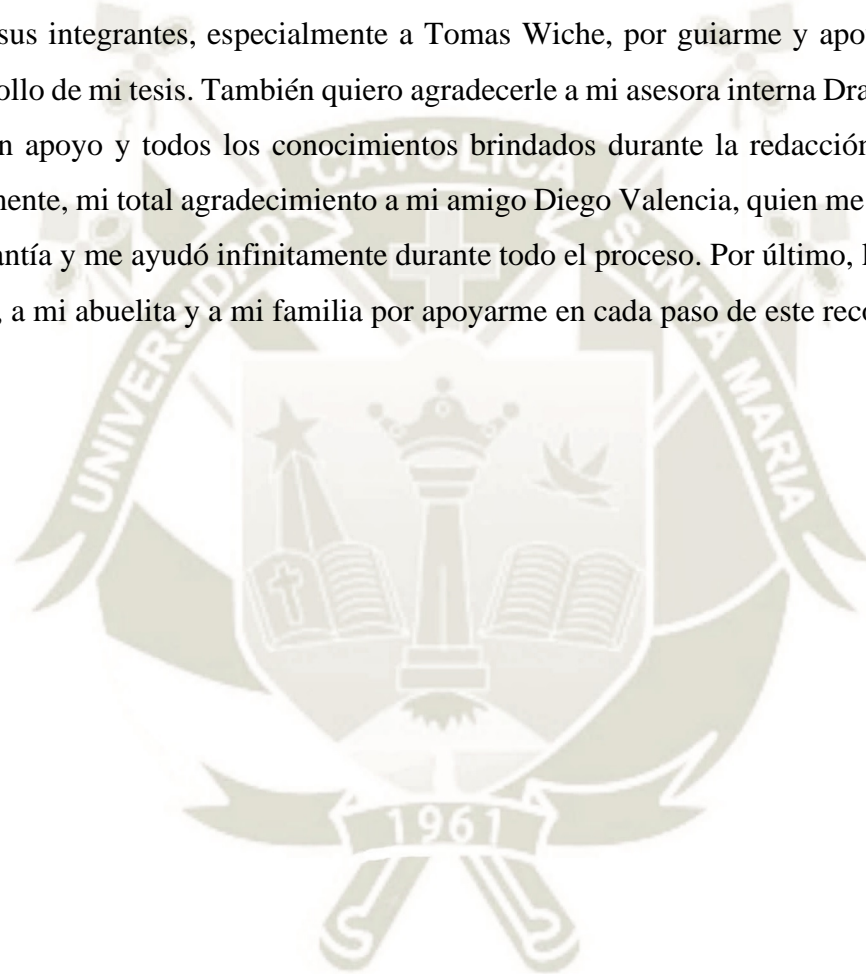
DEDICATORIA

Esta tesis es dedicada a mi mamá y a mi abuelita, cuya confianza en mí es el fundamento de mis acciones.



AGRADECIMIENTOS

Mi completo agradecimiento al Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica (FONDECYT) que brindó el financiamiento para realizar mi pasantía en el CRCHUM (Canadá). Asimismo, agradezco a mi asesora Dra. Petronela Ancuta por permitirme realizar este trabajo de investigación en su laboratorio, así como a todos sus integrantes, especialmente a Tomas Wiche, por guiarme y apoyarme durante el desarrollo de mi tesis. También quiero agradecerle a mi asesora interna Dra. Karin Vera, por su gran apoyo y todos los conocimientos brindados durante la redacción de este trabajo. Igualmente, mi total agradecimiento a mi amigo Diego Valencia, quien me motivó a realizar la pasantía y me ayudó infinitamente durante todo el proceso. Por último, le agradezco a mi mamá, a mi abuelita y a mi familia por apoyarme en cada paso de este recorrido.



ÍNDICE

DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTOS	V
ÍNDICE.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE TABLAS	IX
RESUMEN	X
ABSTRACT	XI
INTRODUCCIÓN.....	1
HIPÓTESIS.....	3
OBJETIVOS	4
GENERAL	4
ESPECÍFICOS	4
CAPÍTULO I	5
1. MARCO TEÓRICO.....	6
1.1. <i>Gen RORC</i>	7
1.1.1. Isoforma ROR γ t.....	7
1.1.2. Isoforma ROR γ	7
2.1. <i>Linfocitos Th17</i>	8
1.1.3. Funciones biológicas.....	9
2.2. <i>Interleucina 17</i>	9
2.3. <i>Virus de inmunodeficiencia humana</i>	10
1.1.4. Epidemiología del VIH y riesgo de transmisión.....	10
1.1.4.1. Patogénesis.....	11
1.1.4.2. Diagnóstico	12
1.1.4.3. Tratamiento	13
2.4. <i>Aislamiento de ácidos nucleicos</i>	14
2.5. <i>Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR)</i>	14
2.6. <i>Electroforesis en gel de agarosa</i>	15

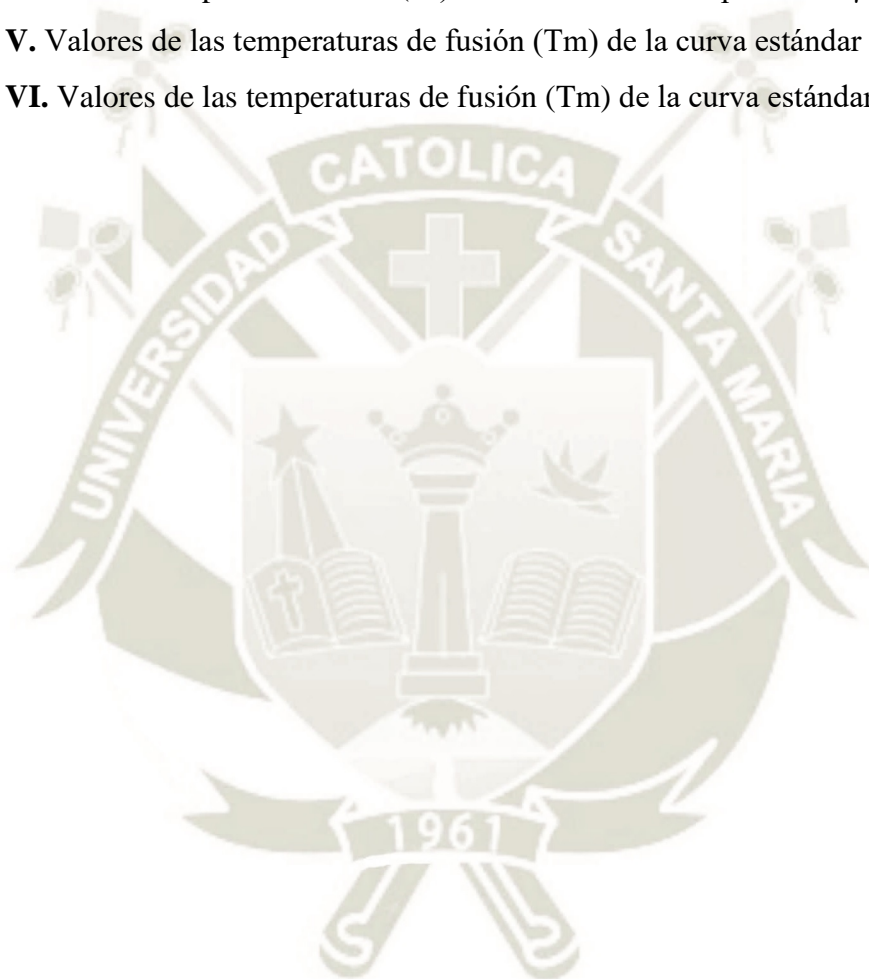
2.7.	<i>Cultivo celular</i>	16
1.1.5.	Aislamiento de células	17
2.8.	<i>Estimulación in vitro de linfocitos T</i>	17
2.9.	<i>Citometría de flujo</i>	18
CAPÍTULO II		20
2.	MATERIALES Y METODOLOGÍA	21
2.1.	<i>Materiales</i>	22
2.1.1.	Muestras y/o Unidades Biológicas.....	22
2.1.2.	Insumos y Reactivos Químicos.....	25
2.1.3.	Equipos e Instrumentación.....	27
2.1.4.	Softwares.....	28
2.2.	<i>Metodología</i>	29
2.2.1.	Descongelamiento de células	29
2.2.2.	Aislamiento de linfocitos T CD4 ⁺ de memoria mediante selección negativa.....	29
2.2.3.	Cultivo celular.....	30
2.2.4.	RT-PCR para la cuantificación de la expresión de RORγt y RORγ	30
2.2.5.	Estimulación celular.....	34
2.2.6.	Análisis por citometría de flujo.....	34
2.2.7.	Análisis estadístico.....	35
CAPÍTULO III		36
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
3.1.	<i>Cuantificación de la expresión de RORγt y RORγ mediante el ensayo RT-PCR</i> ...38	
3.2.	<i>RORγt se expresa preferentemente en células Jurkat y linfocitos T CD4⁺, mientras que RORγ es expresado en células TZM-bl y HT-29</i>	48
3.3.	<i>RORγt, pero no RORγ, es inducible mediante anti-CD3/CD28 en linfocitos T CD4⁺</i>	52
CONCLUSIONES		59
RECOMENDACIONES		60
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Secuencia de primer forward para ROR γ t, primer forward para ROR γ y primer reverse común para ROR γ t/ROR γ	32
Figura 2. Electroforesis de los amplicones ROR γ t y ROR γ a partir de linfocitos T CD4 ⁺ activados y células HT-29	39
Figura 3. Curva estándar para ROR γ t.....	41
Figura 4. Curva estándar para ROR γ	42
Figura 5. Picos de melting de la curva estándar de ROR γ t	44
Figura 6. Picos de melting de la curva estándar de ROR γ	45
Figura 7. Electroforesis de la curva estándar para ROR γ t	47
Figura 8. Electroforesis de la curva estándar para ROR γ	47
Figura 9. Comparación entre la expresión de ROR γ t and ROR γ en los distintos tipos celulares	51
Figura 10. Efecto de la estimulación anti-CD3/CD28 en la expresión de ROR γ t en linfocitos T CD4 ⁺ de memoria.....	53
Figura 11. Efecto de la estimulación anti-CD3/CD28 en la expresión de ROR γ en linfocitos T CD4 ⁺ de memoria.....	53
Figura 12. Efecto de la estimulación anti-CD3/CD28 en la expresión de ROR γ t en células Jurkat	54
Figura 13. Efecto de la estimulación anti-CD3/CD28 en la expresión de ROR γ en células Jurkat	55
Figura 14. Efecto de la estimulación anti-CD3/CD28 en la expresión de ROR γ t en células ACH-2	56
Figura 15. Efecto de la estimulación anti-CD3/CD28 en la expresión de ROR γ en células ACH-2	56
Figura 16. Efecto de diferentes condiciones estimulatorias en la expresión de ROR γ t.....	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Programa utilizado para el ensayo de RT-PCR.	32
Tabla II. Mix utilizado para el ensayo de RT-PCR.....	33
Tabla III. Valores de punto de cruce (Ct) de la curva estándar para ROR γ t.	41
Tabla IV. Valores de punto de cruce (Ct) de la curva estándar para ROR γ	42
Tabla V. Valores de las temperaturas de fusión (Tm) de la curva estándar de ROR γ t.	44
Tabla VI. Valores de las temperaturas de fusión (Tm) de la curva estándar de ROR γ	45



RESUMEN

ROR γ y ROR γ t son isoformas del gen humano *RORC*, difiriendo en el extremo N-terminal. ROR γ se expresa en una amplia variedad de tejidos, como hígado, pulmón y músculo esquelético, entre otros; mientras que, ROR γ t se expresa exclusivamente en ciertas células del sistema inmune. ROR γ t es considerado como el factor de transcripción maestro de los linfocitos Th17. Estos linfocitos son de gran importancia en el estudio del VIH ya que son las primeras células que se infectan luego del ingreso del virus al organismo.

El objetivo del presente trabajo fue cuantificar la expresión de ROR γ y ROR γ t en diferentes tipos celulares utilizados en la investigación del VIH. Se estableció que un ensayo de RT-PCR es adecuado para la cuantificación de ambas isoformas en las células estudiadas. Los resultados mostraron que ROR γ t se expresa de manera preferencial en células Jurkat y en linfocitos T CD4⁺ humanos, mientras que ROR γ lo hace en las células TZM-bl y HT-29.

Adicionalmente, se utilizó el análisis por citometría de flujo para medir la expresión de ROR γ t en linfocitos T CD4⁺ luego de diferentes estimulaciones. El ARNm de ROR γ t es inducible mediante anti-CD3/CD28 en linfocitos T CD4⁺, pero no en células Jurkat ni en células ACH-2. A nivel de proteína, ROR γ t sólo es inducido por anti-CD3/CD28, pero no por PMA/Ionomicina ni IL-2, luego de 24 h de estimulación.

En conclusión, la técnica RT-PCR es un ensayo cuantitativo apropiado para evaluar la expresión en tiempo real de ROR γ t y ROR γ en diferentes tipos celulares, los cuales se utilizan ampliamente en la investigación del VIH, contribuyendo al estudio de la infección y la latencia de dicho virus. Las isoformas ROR γ t y ROR γ presentan una expresión diferencial en células Jurkat y linfocitos T CD4⁺, y en células TZM-bl y HT-29, respectivamente. Asimismo, su expresión varía bajo diferentes condiciones de estimulación. La estimulación del TCR con anti-CD3/CD28 es la más apropiada para estudiar la expresión de ROR γ t, tanto a nivel de ARNm como de proteína, en linfocitos T CD4⁺, ya que induce la expresión de esta isoforma. Por el contrario, ninguna de las estimulaciones evaluadas induce la expresión de ROR γ .

Palabras claves: ROR γ t, ROR γ , linfocitos Th17, VIH, inmunología

ABSTRACT

ROR γ and ROR γ t are isoforms of the human *RORC* gene, differing at the N-terminal region. ROR γ is expressed in a wide variety of tissues, such as liver, lung, skeletal muscle, among others, while ROR γ t is exclusively expressed in certain cells of the immune system. ROR γ t is considered the master transcription factor of Th17 cells. These cells are of great importance in the study of HIV since they are the first cells that become infected after the virus enters the body.

The objective of this work was to quantify the expression of ROR γ and ROR γ t in different cell types used in HIV research. It was established that an RT-PCR assay is suitable for the quantification of both isoforms in the studied cells. Results showed that ROR γ t is preferentially expressed in Jurkat cells and human primary CD4⁺ T cells, while ROR γ does so in TZM-bl and HT-29 cells.

Additionally, flow cytometry analysis was used to measure ROR γ t expression in human primary CD4⁺ T cells after different stimulations. ROR γ t mRNA increases its expression under activation with anti-CD3/CD28 in CD4⁺ T cells, but not in Jurkat cells nor ACH-2 cells. At the protein level, ROR γ t is only inducible by anti-CD3/CD28, but not upon 24 h stimulation with PMA/Ionomycin or IL-2.

In conclusion, the RT-PCR technique is an appropriate quantitative assay to evaluate the real-time expression of ROR γ t and ROR γ in different cell types, which are widely used in HIV research, contributing to the study of infection and latency of said virus. The ROR γ t and ROR γ isoforms show differential expression in Jurkat and CD4⁺ T cells, and TZM-bl and HT-29 cells, respectively. Likewise, its expression varies under different stimulation conditions. TCR stimulation with anti-CD3/CD28 is the most appropriate to study the expression of ROR γ t, both at the mRNA and protein level, in CD4⁺ T cells, since it induces the expression of this isoform. On the contrary, none of the stimulations evaluated induces the expression of ROR γ .

Key words: ROR γ t, ROR γ , Th17 cells, HIV, immunology

INTRODUCCIÓN

El gen humano RORC, ubicado en el cromosoma 1, codifica dos isoformas: ROR γ t y ROR γ , las cuales difieren en su extremo N-terminal, específicamente en el dominio A/B. ROR γ se expresa en tejidos como el hígado, músculo esquelético y riñón, mientras que la expresión de ROR γ t es exclusiva de células linfoides¹⁻⁴. ROR γ t es el factor de transcripción maestro de los linfocitos Th17, controlando la expresión de un cierto número de genes en estas células^{5,6}, regulando su diferenciación y la producción de IL-17⁷. Además, es esencial para el desarrollo de los tejidos linfáticos secundarios, como los nódulos linfáticos y las placas de Peyer⁸, y en la regulación de la timopoiesis^{9,10}.

Los linfocitos Th17 son una población de células T caracterizadas por la producción de interleucina (IL)-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22^{11,12}. El rol principal de estos linfocitos en un estado estable es mantener la homeostasis y proteger la superficie de barrera del intestino, en dónde están constitutivamente presentes¹³. Brindan inmunidad en las superficies mucosas^{14,15} pero también están relacionados con el desarrollo de enfermedades autoinmunes¹⁶. Las bacterias filamentosas segmentadas promueven la diferenciación de los linfocitos Th17¹⁷. Estas células median la defensa contra las bacterias y hongos oportunistas^{18,19}, y también inducen la expresión de anticuerpos IgA y de deaminasa de citidina inducida por activación (AID) en las placas de Peyer²⁰. Sin embargo, la acción de los linfocitos Th17 también puede resultar en patología, debido a su expresión de citocinas inflamatorias²¹.

Los linfocitos Th17 son la principal fuente de IL-17 en el intestino²². IL-17 e IL-22 inducen las lectinas antimicrobianas de tipo-C REG3 β y REG3 γ ²³. IL-17 también tiene un rol en la estimulación y regulación de las proteínas de unión estrecha en células epiteliales, las cuales mantienen la integridad de las superficies de barrera^{24,25}. El reclutamiento de neutrófilos mediado por IL-17 es de gran importancia en la defensa contra infecciones de origen bacteriano y fúngico en sitios mucosos y en órganos de barrera como el intestino, pulmones y la cavidad oral²⁶.

El agotamiento masivo de linfocitos Th17 en el tracto gastrointestinal durante la infección con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH)/virus de inmunodeficiencia de los simios (VIS) está asociado con translocación microbiana desde el intestino, lo cual lleva a la activación inmune crónica y al progreso de la enfermedad²⁷⁻³⁰. Estas células son las primeras en ser infectadas durante la transmisión del VIS³¹. Además, se ha demostrado que los linfocitos Th17 son preferentemente infectados y agotados en el tracto gastrointestinal de las personas infectadas con VIH³²⁻³⁴, y significativamente agotados en sangre periférica³⁴⁻³⁶. También ha sido reportado que los linfocitos Th17 de larga vida pueden contribuir a la persistencia de los reservorios de VIH³⁷⁻⁴⁰. Juegan un rol tanto benéfico como patogénico durante la infección por este virus³⁹. Por todo esto, las células del linaje Th17 y su factor de transcripción maestro ROR γ t son de gran importancia en el estudio del VIH⁴¹.

Al final del 2018, 37.9 millones de personas alrededor del mundo vivían con VIH/SIDA, 770 000 personas murieron de enfermedades relacionadas al VIH y 23.3 millones de personas recibieron terapia antirretroviral^{42,43}. De acuerdo con el Centro para la Prevención y Control de Enfermedades (CDC), la terapia antirretroviral (TAR) es la combinación de drogas utilizadas para tratar el VIH. TAR no es una cura, pero reduce la carga viral en personas infectadas con VIH, ralentiza el progreso de la enfermedad y disminuye la posibilidad de transmitir el virus. Algunos efectos secundarios comunes de la TAR incluyen náusea, vómito, diarrea, dificultad para dormir, dolor de cabeza, mareo, fatiga y dolor⁴⁴.

En el presente trabajo, se investigó la expresión de ROR γ t y ROR γ en linfocitos T CD4⁺ de memoria, células Jurkat, células ACH-2, células TZM-bl, células HT-29, macrófagos y monocitos, a la vez que se evaluó el efecto de las condiciones estimuladoras anti-CD3/CD28, PMA/Ionomicina 162 nM, PMA/Ionomicina 25 nM o IL-2 en la expresión de ambas isoformas.

HIPÓTESIS

Dado que ROR γ t y ROR γ se expresan de manera diferente en las células y tejidos humanos, es posible que dichas isoformas tengan una expresión preferencial en ciertos tipos y líneas celulares utilizados en el estudio del VIH.



OBJETIVOS

GENERAL

Estudiar la expresión de ROR γ t y ROR γ en diferentes tipos celulares y bajo diferentes condiciones de estimulación.

ESPECÍFICOS

1. Establecer un ensayo cuantitativo de RT-PCR para la determinación de la expresión de ROR γ t y ROR γ en forma de ARNm.
2. Evaluar la expresión de ROR γ t y ROR γ en diferentes tipos y líneas celulares usados en el estudio de la infección por VIH, como linfocitos T CD4⁺ de memoria, células Jurkat, células ACH-2, células TZM-bl, células HT-29, macrófagos y monocitos.
3. Evaluar cuáles ensayos de estimulación *in vitro* serían ideales para investigar la expresión de ROR γ t y ROR γ .

CAPÍTULO I





1. MARCO TEÓRICO

1.1. Gen RORC

El gen del receptor huérfano C relacionado con el receptor de ácido retinoico (*RORC*), es un miembro de la familia de receptores nucleares ROR, junto a los genes *ROR α* y *ROR β* . El gen *RORC* está formado por 11 exones y 10 intrones. Codifica dos isoformas: *ROR γ t* y *ROR γ* , las cuales se generan mediante el uso de diferentes promotores o mediante el splicing alternativo de una misma cadena de pre-ARNm ².

1.1.1. Isoforma *ROR γ t*

ROR γ t es un factor de transcripción codificado por el gen *RORC*. Está conformado por 4 dominios: un dominio N-terminal (A/B), un dominio que se une a ADN (DBD), un dominio bisagra y un dominio C-terminal que se une al ligando (LBD). *ROR γ* y *ROR γ t* difieren en su dominio N-terminal. *ROR γ t* es expresado en timocitos, linfocitos Th17 y Tc17, linfocitos T $\gamma\delta$, células ILC3, células inductoras del tejido linfoide (LTi) y células NK CD3⁻ NKp46⁺. Es el factor de transcripción maestro de los linfocitos Th17 ⁴⁵, siendo inducido en linfocitos T CD4⁺ activados en presencia de IL-1 β , IL-6, IL-23 y TGF β ⁶. *ROR γ t* coordina la diferenciación de los linfocitos Th17, induciendo la transcripción de IL-17A y IL-17F en linfocitos T CD4⁺ ⁴⁵. La isoforma *ROR γ t* tiene un rol clave en el desarrollo de los nódulos linfáticos y de las placas de Peyer, así como en la generación y supervivencia de células LTi fetales ^{8,46}. Además, la expresión de *ROR γ t* es incrementada en timocitos CD4⁺CD8⁺ para mejorar su supervivencia ⁴⁷.

1.1.2. Isoforma *ROR γ*

ROR γ es un receptor nuclear codificado por el gen *RORC*. *ROR γ* es expresado en una variedad de tejidos como hígado, tejido adiposo, músculo esquelético, riñón, páncreas, cerebro, corazón, pulmones, piel y timo ^{1,3,6,48,49}. Regula la glucogénesis hepática, la adipogénesis, la sensibilidad a insulina y la expresión rítmica circadiana de genes metabólicos ⁵⁰. Es un activador crucial del programa de biosíntesis de

colesterol ⁵¹. Adicionalmente, se ha sugerido que ROR γ regula la transición mesenquimal epitelial de hepatocitos en el contexto de fibrosis hepática ⁵².

2.1. Linfocitos Th17

En 2005, los linfocitos T helper 17 (Th17) fueron identificados como un nuevo subconjunto de linfocitos T, diferente a los linfocitos Th1 y Th2 ^{11,12}. Se diferencian en la presencia de las citocinas IL-1 β , IL-6 y IL-23 ^{53,54}. Están caracterizados por su habilidad de unir la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa en la superficie de las membranas epiteliales y mucosas. Producen citocinas específicas como IL-17A/F, IL-21, IL-22 y IL-26, las cuales cumplen con el rol de mantener las funciones de barrera de las células epiteliales ²¹.

Los linfocitos Th17 ocasionan el reclutamiento de neutrófilos y macrófagos que contribuyen a la defensa de la mucosa, especialmente en la presencia de bacterias y hongos, pero también en respuesta al VIH-1, el subtipo más común del virus ³⁹. Las funciones de estas células son reguladas por un complejo sistema de moléculas y factores de transcripción, resaltando a ROR γ t como el factor de transcripción maestro ⁵⁵. La expresión de ROR γ t es necesaria ⁴⁵ pero no suficiente para el compromiso hacia el linaje Th17. Factores relacionados a permitir el acceso hacia la cromatina también son requeridos para el desarrollo del programa de diferenciación de los linfocitos Th17 ⁵⁶.

Los linfocitos Th17 son un subtipo de linfocitos T CD4⁺ que se localizan en sitios de la mucosa en donde ocurre la transmisión del VIH. Estas células son sitios principales en donde se da la replicación y persistencia del virus ⁵⁵. Durante la infección por VIH/VIS, hay un agotamiento masivo de linfocitos Th17 en el tracto gastrointestinal, lo cual contribuye a la patogénesis del VIH/VIS y a la translocación microbiana desde el intestino ³⁴⁻³⁶. La translocación microbiana lleva a una activación inmune crónica y al progreso de la enfermedad, tanto en modelos primates como en humanos ²⁷⁻³⁰. A pesar que los linfocitos Th17 juegan un papel clave en el

mantenimiento de la integridad de la barrera de superficie en el intestino, el VIH utiliza sus características de larga vida para persistir y diseminarse ^{37,38}.

1.1.3. Funciones biológicas

Los linfocitos Th17 forman parte en ciertos procesos inflamatorios y también se encargan de mantener la homeostasis y promover la inmunidad de la barrera intestinal. Los linfocitos Th17 residentes en los tejidos y encargados de la homeostasis muestran baja plasticidad ante citocinas inflamatorias, a diferencia de los linfocitos Th17 inducidos por infección, los cuales exhiben una mayor plasticidad ante un perfil proinflamatorio de citocinas similar a Th1, en respuesta a patógenos bacterianos. Los linfocitos Th17 homeostáticos cuentan con un potencial de expansión limitado y un metabolismo parecido al de células de memoria en reposo. Protegen las superficies de barrera y no forman parte de respuestas inflamatorias, mientras que, los linfocitos Th17 inducidos por infección producen respuestas inflamatorias fuertes ⁵⁷. Los linfocitos Th17 juegan un rol importante en la respuesta inmune contra bacterias y hongos en sitios de la mucosa como intestinos, pulmones y la cavidad oral. Bajo condiciones no patológicas, el número de estas células es reducido ³⁹. Asimismo, los linfocitos Th17 pueden convertirse en linfocitos T regulatorios durante la resolución de una infección ⁵⁸.

2.2. Interleucina 17

La primera interleucina 17 (IL-17) humana descubierta fue clonada en 1995, y se demostró que mediaba múltiples efectos inflamatorios y hematopoyéticos en células estromales ⁵⁹⁻⁶¹. IL-17 es una citocina comúnmente producida durante infecciones virales, con la capacidad de aumentar la respuesta proinflamatoria en células humanas. IL-17 estimula a células epiteliales, estromales y endoteliales para que induzcan la atracción de células del sistema inmune a su lugar de acción, especialmente neutrófilos ^{62,63}, y es importante para el desarrollo de eficientes respuestas antivirales de memoria ⁶⁴.

Existen seis isoformas de IL-17: IL-17A (conocida como IL-17), B, C, D, E y F. Tanto IL-17A y IL-17F son producidas por los linfocitos Th17, mientras que las otras isoformas son producidas por fuentes celulares distintas a linfocitos T⁶⁵. IL-17A y IL-17F existen como homodímeros de IL-17A (más eficientes en inducir la producción de quimiocinas), heterodímeros de IL-17A-F u homodímeros de IL-17F (menos eficientes en inducir la producción de quimiocinas)⁶⁶. IL-17A y IL-17F también inducen la producción de factores granulopoyéticos⁶⁷⁻⁷⁰.

2.3. Virus de inmunodeficiencia humana

El virus de inmunodeficiencia humana (VIH) es el agente responsable del desarrollo del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Originalmente identificado en 1983⁷¹⁻⁷³, el VIH es un retrovirus, miembro del género *Lentivirus* y parte de la familia *Retroviridae*. Posee un núcleo cilíndrico denso rodeado por una envoltura lipídica. Las proteínas estructurales del núcleo son codificadas por el gen gag. En el interior de la partícula viral, hay enzimas clave requeridas para la replicación, como la transcriptasa reversa y la integrasa. El genoma proviral del VIH tiene una longitud de 10 kb y contiene segmentos regulatorios para la replicación (LTR), genes que codifican para las proteínas del núcleo (gen gag), la transcriptasa reversa (gen pol) y glicoproteínas de la envoltura (gen env)^{74,75}.

1.1.4. Epidemiología del VIH y riesgo de transmisión

La incidencia del VIH fue de 0.25 por 1000 personas no infectadas, en el año 2017. En total alrededor del mundo, hubo aproximadamente 1.8 millones de nuevas infecciones por VIH durante ese año⁷⁶. Al final del 2018, 37.9 millones de personas vivían con VIH/SIDA alrededor del mundo, 770 000 personas murieron de enfermedades relacionadas al VIH y 23.3 millones de personas recibieron TAR^{42,43}.

El VIH puede ser transmitido mediante ciertos fluidos corporales, como sangre, semen, fluido preseminal, fluidos rectales y vaginales y leche materna. Si estos fluidos entran en contacto con una membrana mucosa o tejido dañado, o si son

directamente inyectados en el torrente sanguíneo, la transmisión se producirá ^{77,78}. La carga viral, es decir el número de copias de ARN de VIH por mililitro, es el factor más importante que incrementa el riesgo de transmisión sexual ⁷⁹. Otros factores asociados con el aumento del riesgo de transmisión sexual del VIH son úlceras genitales, infección por herpes simple tipo 2, vaginosis bacteriana, embarazo y coito anal receptivo ⁸⁰.

1.1.4.1. Patogénesis

El objetivo principal del VIH son los linfocitos T CD4⁺ activados. El virus ingresa a la célula mediante la interacción de sus glicoproteínas (gp) de envoltura, compuestas de tres heterodímeros de gp120 y gp41, con el receptor CD4 y los correceptores de quimiocinas CCR5 o CXCR4, lo cual conduce a la fusión de membrana. Otras células que expresen CD4 y los correceptores mencionados también pueden ser infectadas, incluyendo linfocitos T de memoria central, linfocitos T de memoria de transición, linfocitos T helper foliculares, linfocitos T regulatorios, linfocitos de tipo Th1, linfocitos de tipo Th2 y linfocitos de tipo Th17 ⁸¹.

Recientemente, se ha reportado que los astrocitos también pueden ser infectados por VIH ⁸². En algunos casos, se da una infección independiente de CD4 ^{83,84}. Luego de la transmisión inicial, hay un rápido incremento de la replicación del virus y la inducción de moléculas proinflamatorias. Luego, la carga viral decrece hasta un valor fijo, gracias a las respuestas inmunes del hospedero. La respuesta específica mediada por linfocitos CD8⁺ toma lugar poco después de la infección ⁸⁰.

El agotamiento progresivo de los linfocitos T CD8⁺ específicos para VIH ocurre en la mayoría de individuos, ocasionando la pérdida de su función efectora ⁸⁵. Alrededor de 3 meses después de la transmisión, surgen los anticuerpos neutralizantes. La respuesta innata es mayormente mediada por las células natural killer. La disminución progresiva de los linfocitos T CD4⁺, lo cuales son principalmente eliminados mediante infección directa, es la marca representativa de la infección por VIH. El agotamiento masivo de los linfocitos T CD4⁺, especialmente de los

linfocitos Th17, en el tracto gastrointestinal provoca un daño en la inmunidad de esta región y deteriora la defensa contra bacterias ⁸⁶. Con el paso del tiempo y sin un tratamiento apropiado, el VIH disminuye el número de linfocitos T CD4⁺, afectando significativamente el sistema inmune. Esto causa el desarrollo de infecciones oportunistas y de diferentes tipos de cáncer ⁷⁵.

El ciclo de replicación del VIH comienza con la unión al receptor CD4 y a los correceptores CCR5 o CXCR4, seguido por la fusión con la membrana celular de la hospedera. En el interior de la célula hospedera, la cápside viral es descubierta, y el ARN y las proteínas del VIH son liberadas. La transcriptasa reversa viral convierte el ARN del VIH en ADN, el cual se desplaza hacia el interior del núcleo y se integra en el ADN de la hospedera. El ARN y proteínas virales son formados y desplazados hacia la superficie celular en donde se ensamblan en un nuevo virus inmaduro. Los nuevos virus son liberados y posteriormente convertidos en su forma madura infecciosa ⁸⁷.

1.1.4.2. Diagnóstico

La mayoría de personas que se infectan con VIH suelen presentar fiebre, dolor de garganta, inflamación de los ganglios linfáticos, erupciones cutáneas, pérdida de peso, trastornos del tracto gastrointestinal y dolor en las articulaciones ⁸⁸⁻⁹¹. Durante las primeras semanas de la infección, los niveles de anticuerpos contra el virus no son lo suficientemente altos como para ser detectados por el ensayo de ELISA e inmunoblot, a diferencia de los niveles de ARN de VIH, los cuales son fácilmente detectable en plasma ⁸⁶. Los test de diagnóstico más empleados incluyen ensayos para detectar ARN de VIH, antígeno p24 e inmunoensayos enzimáticos capaces de detectar anticuerpos IgM ⁹². Un diagnóstico temprano de la enfermedad evita la transmisión del VIH y permite que el paciente comience el tratamiento antirretroviral lo antes posible ⁹³.

La infección primaria de VIH-1 está asociada a los niveles más altos de ARN viral en plasma, lo cual hace la detección inicial más sencilla. Los ensayos utilizados en

esta fase inicial deben ser altamente sensibles para poder detectar el material genético del VIH. Uno de estos ensayos es la RT-PCR, la cual ha sido demostrada como una técnica confiable para la detección de este virus ⁹⁴. Para la cuantificación del VIH integrado y total se utilizan primers *Alu*, repetición terminal larga (LTR) y *Gag* ^{95,96}.

1.1.4.3. Tratamiento

La infección por VIH no tiene cura, pero sí un tratamiento que permite controlar la replicación del virus y disminuir su concentración a niveles indetectables, disminuyendo el riesgo de transmisión y previniendo el desarrollo de SIDA. Este tratamiento se conoce como terapia antirretroviral, la cual debe ser aplicada al paciente durante toda su vida. A pesar del éxito de este tratamiento, existen obstáculos como la falta de adherencia, la resistencia a las drogas antirretrovirales y la toxicidad de dichas drogas, por lo que la búsqueda de una cura definitiva para el VIH es una prioridad.

Una de las principales causas que impiden la cura del VIH es la latencia, que es la persistencia del ADN viral integrado en las células del hospedero. El material genético del virus tiene la capacidad de replicarse, pero es transcripcionalmente silencioso. Actualmente se estudian estrategias que permitan revertir la latencia del virus y eliminar las células infectadas de forma latente. Un enfoque alternativo es suprimir de manera irreversible la transcripción del VIH latente, de esa manera el virus no se replicará aun el tratamiento antirretroviral se interrumpa ⁹⁷.

Cuando el TAR se detiene, la concentración viral en plasma aumenta ^{98,99}. Esto ocurre debido al ADN proviral integrado en el genoma de células infectadas en reposo y de larga vida que no presentan antígenos de VIH ¹⁰⁰. En el interior de estas células, llamadas reservorios latentes, el material genético del virus es transcripcionalmente silencioso, pero mantiene la capacidad de producir partículas virales si es inducido en la ausencia de TAR. Un reservorio latente puede ser establecido cuando linfocitos T CD4⁺ activados regresan a un estado de reposo, luego de ser infectados pero antes de producir suficientes partículas virales para

causar muerte celular ¹⁰¹. Sin embargo, otros estudios sugieren que la infección de una población de linfocitos T CD4⁺ en reposo es posible ^{102,103}. La mayoría de reservorios de VIH residen en los linfocitos T CD4⁺ de memoria central ¹⁰⁴, sin embargo, la identificación de reservorios en otros tipos celulares es clave para el desarrollo de mejores estrategias de cura.

2.4. Aislamiento de ácidos nucleicos

El aislamiento de ácidos nucleicos es el procedimiento por el cual el ADN y/o ARN son separados de los otros compuestos celulares. Los ácidos nucleicos son componentes fundamentales en las técnicas moleculares actuales, por lo que durante su aislamiento se busca obtener una alta calidad y cantidad, dependiendo de los procesos posteriores a los cuales serán sometidos ¹⁰⁵. Existen cuatro etapas básicas para el aislamiento de ácidos nucleicos: lisis, unir, lavar y eluir. La lisis es la etapa en donde se rompe la estructura celular para liberar el ADN y/o ARN. A continuación, se procede con la etapa de unión de los ácidos nucleicos a un portador o matriz. Luego, se emplea la etapa de lavado para eliminar restos celulares, materiales insolubles y cualquier material no deseado. Finalmente, los ácidos nucleicos purificados son disueltos en un buffer de elución ¹⁰⁶.

En la actualidad, hay diferentes métodos especializados para extraer ADN o ARN. Generalmente, se dividen en métodos basados en soluciones y métodos basados en columnas. La mayoría de ellos se encuentran disponibles como kits comerciales que facilitan el proceso de extracción ^{107,108}.

2.5. Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR)

La RT-PCR es una técnica molecular que combina una transcripción reversa con una amplificación mediante PCR en tiempo real, con el objetivo de generar ADNc a partir de ARNm. Una secuencia de ARN actúa como el molde para la transcriptasa reversa, mientras que el ADNc resultante sirve como molde para la PCR ¹⁰⁹. La ventaja más resaltante de la RT-PCR es su sensibilidad, ya que requiere una cantidad

relativamente pequeña de muestra para el análisis ¹¹⁰. Esta técnica es comúnmente utilizada para caracterizar la expresión de genes en diferentes células y tejidos, siendo considerada como “gold standard” y empleada para la validación de resultados ^{111,112}. La RT-PCR también permite la detección de polimorfismos de nucleótido único y variaciones genéticas ^{113,114}.

Las aplicaciones de la RT-PCR en la ciencias médicas han revolucionado el diagnóstico de enfermedades, mediante la detección de amplificación en tiempo real. Además, el uso de la RT-PCR en combinación con otras técnicas moleculares hace posible el monitoreo de las intervenciones terapéuticas y de las respuestas individuales a los fármacos ¹¹⁵. Por otro lado, gran parte de la investigación que emplea RT-PCR se realiza para la detección y cuantificación de virus en muestras humanas ¹¹⁶⁻¹¹⁸.

La técnica de RT-PCR está conformada por dos etapas. En la primera etapa, el ARN es convertido en ADNc mediante el uso de una ADN polimerasa dependiente de ARN (transcriptasa reversa); en la segunda etapa, el ADNc es amplificado mediante una ADN polimerasa termoestable. La adquisición de la muestra y la purificación de ARN representan los pasos iniciales en todo ensayo de RT-PCR, y la calidad del molde es un determinante crítico en la reproductibilidad de los resultados ¹¹⁹. Para los estudios de expresión de genes, la transcripción inversa debe realizarse con reactivos de alta pureza y en varios replicados ya que esta etapa puede introducir variabilidad en la replicación del molde ¹¹⁹.

2.6. Electroforesis en gel de agarosa

La técnica de electroforesis ya sea con gel de agarosa o de poliacrilamida, se emplea para la separación, análisis, identificación y purificación de fragmentos de ADN. La electroforesis es sencilla y rápida de realizar. La ubicación de las bandas de ADN en el gel se determinan mediante el uso de bajas concentraciones de agentes intercalantes fluorescentes y luz ultravioleta ¹²⁰. La separación de los ácidos nucleicos se realiza aprovechando la carga negativa de la cadena principal de fosfato.

Las moléculas de ADN y ARN tienen una carga negativa neta, la cual se distribuye uniformemente en toda su longitud, por lo que se desplazarán a través de la matriz en un campo eléctrico hacia el polo positivo ^{121,122}.

La elección entre agarosa y poliacrilamida se basa principalmente en el tamaño de los fragmentos a separar, ya que los geles de poliacrilamida son más efectivos para separar fragmentos pequeños de ADN (5-500 pb), mientras que los geles de agarosa poseen un poder de resolución menor pero un rango de separación más amplio ¹²⁰. La agarosa es un polímero lineal compuesto de residuos de D-galactosa y L-galactosa unidos por enlaces glicosídicos α -(1→3) and β -(1→4). Las cadenas de agarosa forman fibras helicoidales que se unen para formar estructuras más complejas ¹²². La agarosa que se vende comercialmente contiene alrededor de 800 residuos de galactosa por cadena ¹²³.

2.7. Cultivo celular

El cultivo celular es una técnica establecida y una herramienta fundamental en la biología y en medicina ¹²⁴, que permite el estudio del metabolismo y fisiología celular ¹²⁵. Las células son cultivadas en un microambiente artificial para estudiar su comportamiento sin la influencia de las variaciones sistemáticas presentes *in vivo*, sin embargo, este ambiente artificial debe replicar las condiciones *in vivo*, permitiendo la supervivencia y la proliferación de las células ¹²⁵. El cultivo celular requiere el uso de buenas prácticas de selección de medios de cultivo, manejo de células, detección y mitigación de contaminantes, criopreservación y descongelamiento de células, entre otras ¹²⁶.

El medio de cultivo celular es una compleja mezcla de nutrientes y factores de crecimiento que junto con el ambiente físico permiten el crecimiento celular. Los requerimientos nutricionales difieren de acuerdo con cada tipo celular. Un aditivo usual en el medio de cultivo es el suero animal, necesario para la adhesión y crecimiento de las células ¹²⁶. Otros suplementos adicionales son las hormonas, los factores de crecimiento, glucosa y antibióticos ¹²⁵.

Las ventajas del cultivo celular es que permite el control de los factores fisicoquímicos, como pH, temperatura, presión osmótica y concentración de O₂ y CO₂. Además, los experimentos pueden ser llevados a cabo con volúmenes reducidos, lo cual disminuye los costos ¹²⁵. Sin embargo, las técnicas de cultivo necesitan ser realizadas bajo condiciones estrictas de asepsia, debido a que bacterias, hongos y levaduras crecen más rápido que las células de mamíferos. Por otro lado, existe el riesgo de un crecimiento excesivo de células no diferenciadas que produce la pérdida de las características fenotípicas del tejido del cual las células fueron aisladas ¹²⁵.

1.1.5. Aislamiento de células

Si las células pueden ser aisladas de un tejido, es posible establecer un cultivo celular por un periodo de días o semanas. Las células pueden ser obtenidas a partir de tejidos saludables, si los procedimientos clínicos y las consideraciones éticas lo permiten, y a partir de tejidos enfermos removidos durante una cirugía ¹²⁵. El aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) es usualmente realizado mediante centrifugación por gradiente de densidad con Ficoll-Paque ¹²⁷.

La clasificación de células activadas magnéticamente (MACS) es una técnica que se utiliza actualmente para el aislamiento y purificación celular, mediante el empleo de partículas magnéticas. Estas partículas están compuestas por polisacáridos y óxido de hierro, y están conjugadas a anticuerpos. La técnica requiere una columna de separación rellena con una matriz de acero ferromagnético, necesaria para retener a las células marcadas con los anticuerpos y las partículas magnéticas ¹²⁸.

2.8. Estimulación *in vitro* de linfocitos T

La estimulación *in vitro* es una herramienta que permite la proliferación, la expresión de receptores y la producción de citocinas de los linfocitos T para facilitar su estudio. Una de las maneras de lograr una estimulación *in vitro* de estas células es mediante

anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 para estimular a los linfocitos T de una manera que imite la estimulación mediada por las células presentadoras de antígenos ^{129,130}. Otra técnica de estimulación es mediante el empleo de forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), el cual estimula a los linfocitos T mediante la activación directa de la proteína quinasa C ¹²⁹.

2.9. Citometría de flujo

La citometría de flujo es una herramienta poderosa que permite el análisis de múltiples parámetros celulares ¹³¹. Los equipos utilizados para realizar esta técnica se conocen como citómetros de flujo, los cuales emplean láseres para producir señales de luz dispersa y fluorescente ¹³². Dichas señales son leídas por detectores y luego convertidas en señales electrónicas que son analizadas por una computadora y escritas en un archivo de datos. De acuerdo a esto, las células analizadas pueden ser evaluadas y/o purificadas en base a sus características de dispersión de luz o fluorescencia ¹³³.

Mediante la citometría de flujo, las células son analizadas una a una al pasar por uno o varios láseres, mientras están suspendidas en solución ¹³⁴. La luz dispersada es medida en dos diferentes direcciones: la dispersión frontal (FSC) y la dispersión lateral (SSC). La FSC indica el tamaño relativo de la célula y la SSC indica la complejidad interna o granularidad. La fluorescencia se utiliza para medir la expresión de proteínas celulares ¹³³.

Los citómetros de flujo tradicionales están conformados por sistemas de fluidos, óptica y electrónica. El sistema de fluidos consiste en un fluido presurizado que lleva y enfoca la muestra en el punto de intercepción del láser, en dónde se analizarán las células ¹³³. El sistema de óptica consiste en los láseres y los instrumentos de colección que generan las señales de luz visible y fluorescente usadas para el análisis de la muestra ¹³². Una serie de filtros dirigen la luz fluorescente hacia detectores específicos para que cada fluorocromo se pueda medir de manera individual.

Finalmente, el sistema de electrónica produce las señales digitales a partir de los detectores ^{133,134}.

La citometría de flujo es aplicada en diferentes campos de estudio, como por ejemplo, en la inmunología, en donde permite el fenotipado de células inmunes, mediante el marcaje con anticuerpos conjugados con fluorocromos; así mismo, se puede medir la producción de citocinas como respuesta a un antígeno específico o a una estimulación, se puede analizar la proliferación celular y la apoptosis. Por otro lado, en el área de la biología molecular la citometría de flujo es utilizada para el análisis de proteínas fluorescentes, que son indicadores de la expresión de un gen de interés, el análisis del ciclo celular y el estudio de vías de señalización ¹³³. Del mismo modo, se puede emplear la citometría de flujo para la selección y purificación de células que serán usadas en experimentos posteriores ¹³⁴. Actualmente, la citometría de flujo también está siendo aplicada en microbiología ¹³⁵.

CAPÍTULO II





2. MATERIALES Y METODOLOGÍA

2.1. Materiales

2.1.1. Muestras y/o Unidades Biológicas

Ubicación geográfica: El presente proyecto se llevó a cabo en el Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montreal, Canadá.

Se utilizaron las siguientes líneas celulares:

- Células Jurkat (ATCC® TIB-152™): Son una línea celular inmortalizada de linfocitos T, usualmente utilizada para el estudio de múltiples eventos en la biología de los linfocitos T ¹³⁶, incluyendo el estudio del ciclo de infección del VIH ^{137,138}. Tanto la línea celular Jurkat como sus diferentes subclones han contribuido en el estudio de la infección por VIH, permitiendo la identificación y estudio del receptor y correceptores del virus ^{139,140}. Del mismo modo, las células Jurkat han sido utilizadas para el estudio de la latencia del VIH ¹⁴¹⁻¹⁴³. Las células Jurkat expresan las moléculas CD4 ¹⁴⁴, CCR5 ¹⁴⁵ y CXCR4 ¹⁴⁶.
- Células ACH-2 (NIH Catalog Number: 349): Clones de linfocitos T CD4⁻, CD5⁺, Leu-1⁺, receptor de transferrina⁺ que contienen una copia proviral integrada de VIH-1 LAV latente. Esta línea celular se emplea como modelo para la infección y latencia del VIH, siendo inducible para producir virus mediante diferentes estímulos ¹⁴⁷⁻¹⁴⁹.
- Células TZM-bl (NIH Catalog Number: 8129): Línea celular indicadora utilizada para el análisis cuantitativo de VIH, mediante el uso de los reporteros β -gal y luciferasa; es una célula HeLa modificada para expresar CD4 y CCR5 de manera estable ¹⁵⁰. Es una línea celular adherente que no necesita de requerimientos especiales para su cultivo. Se utiliza para evaluar anticuerpos neutralizantes contra el VIH-1 ¹⁵¹.

- Células HT-29 (ATCC® HTB-38™): Línea celular obtenida a partir de adenocarcinoma de colon humano ¹⁵². Es utilizada en el estudio del cáncer de colon humano, la digestión y biodisponibilidad de alimentos, gracias a que expresa características de células intestinales maduras. Estas células también se emplean en el estudio de la inmunidad intestinal en respuesta a la infección, supervivencia, adhesión e invasión de microorganismos ¹⁵³⁻¹⁵⁵.

Y los siguientes subtipos celulares:

- Linfocitos T CD4⁺ de memoria: Subtipo de linfocitos T generado en respuesta a un antígeno, el cual, en caso de ser reintroducido, provocará una reacción rápida por parte de los linfocitos T de memoria. Estas células brindan una defensa eficaz contra microorganismos patógenos frecuentes que pueden encontrarse en el ambiente. Además, se caracterizan por ser capaces de sobrevivir en estado quiescente luego de la eliminación del antígeno y por poseer respuestas inmunes más rápidas y potentes que los linfocitos T naive ^{156,157}.

Después de la inmunización, los linfocitos T CD4⁺ vírgenes experimentan proliferación y diferenciación en linfocitos T helper funcionales, a través de un proceso que envuelve la interacción entre citocinas específicas y proteínas de señalización celular, así como la modulación de factores de transcripción ¹⁵⁸⁻¹⁶⁰. Luego de la eliminación del antígeno, la mayoría de los linfocitos T efectores mueren y solo una pequeña fracción de ellos se convierten en linfocitos de memoria de larga vida ¹⁶¹. Los linfocitos T CD4⁺ de memoria son identificados en base a la expresión de CCR7: ya sea linfocitos T efectores de memoria (TEM) CCR7⁻ o linfocitos T de memoria central (TCM) CCR7⁺ ¹⁶². Los linfocitos TCM humanos son capaces de extravasación y migración hacia órganos linfoides secundarios, mientras que los linfocitos TEM humanos pueden migrar hacia tejidos no-linfoides inflamados ^{163,164}. Los linfocitos TEM pueden ser adicionalmente identificados mediante la expresión de receptores de quimiocinas característicos ¹⁶⁵.

- **Macrófagos:** Células mieloides especializadas en detectar, fagocitar y eliminar microorganismos patógenos. También actúan presentando antígenos a los linfocitos T e iniciando el proceso inflamatorio, mediante la liberación de citocinas. Los macrófagos se originan a partir de precursores embrionarios y monocitos circulantes que ingresan a diferentes tejidos, lo cual causa un alto grado de heterogeneidad en la población de macrófagos. Circulan prácticamente todos los tejidos, buscando y eliminando patógenos o células muertas ¹⁶⁶⁻¹⁶⁹. Los macrófagos derivados de monocitos están restringidos a tejidos específicos como el intestino, la dermis y el corazón ¹⁷⁰. Los macrófagos que surgen de precursores embrionarios toman residencia en tejidos antes del nacimiento y se mantienen allí durante la adultez, coexistiendo con los macrófagos derivados de monocitos ¹⁷¹. Los macrófagos desempeñan un rol en la transmisión y latencia del VIH, ya que son reservorios del virus ¹⁷².
- **Monocitos:** Se generan en la médula ósea y circulan en la sangre. Producen moléculas efectoras como citocinas, mieloperoxidasas y superóxidos, siendo fundamentales en la respuesta inflamatoria y se diferencian en macrófagos o células dendríticas. Los monocitos expresan diversos receptores que les permite monitorear los cambios de su ambiente; dichos cambios influenciarán en su diferenciación ¹⁷³. Están conformados por dos subtipos principales, los cuales varían en fenotipo, morfología, tamaño, granularidad, perfil genético y función ¹⁷⁴. La expresión de proteínas de membrana CD14 y CD16 permiten la identificación de estos subtipos: monocitos clásicos (CD14⁺⁺ CD16⁻) y no clásicos (CD14⁺ CD16⁺⁺). Un subtipo extravasa y genera macrófagos, mientras que el otro subtipo se diferencia en células dendríticas bajo condiciones inflamatorias, respectivamente ¹⁷⁵. Al igual que los macrófagos, los monocitos también son reservorios de VIH y desempeñan un rol importante en la patogénesis del virus ¹⁷².

2.1.2. Insumos y Reactivos Químicos

Reactivo	Marca	Uso
Memory CD4 ⁺ T Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec	Selección negativa de linfocitos T CD4 ⁺ de memoria
RNeasy Plus Mini Kit	Qiagen Inc.	Purificación de ARN
Primers forward y reverse para ROR γ t y ROR γ	Integrated DNA Technologies Inc.	RT-PCR para ROR γ t y ROR γ
RT-PCR Master Mix	Qiagen Inc.	RT-PCR para ROR γ t y ROR γ
Agarosa	Thermo Fisher Scientific	Electroforesis en gel de agarosa
Marcadores de peso molecular	Invitrogen - Thermo Fisher Scientific	Electroforesis en gel de agarosa
Loading buffer	Thermo Fisher Scientific	Electroforesis en gel de agarosa
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen Inc.	Extracción de ADN a partir de gel de agarosa
Medio de cultivo celular RPMI	Gibco - Thermo Fisher Scientific	Cultivo celular
Medio de cultivo celular DMEM	Gibco - Thermo Fisher Scientific	Cultivo celular
Suero fetal bovino (FBS)	Sigma-Aldrich, Inc.	Cultivo celular
Penicilina/Estreptomicina (Pen/Strep)	Sigma-Aldrich, Inc.	Cultivo celular
Suero de ternero recién nacido (NBCS)	Gibco - Thermo Fisher Scientific	Cultivo celular
Buffer fosfato salino (PBS)	Gibco - Thermo Fisher Scientific	Selección negativa de linfocitos T CD4 ⁺ de memoria, estimulación

		celular y marcaje de superficie e intracelular
Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)	Sigma-Aldrich, Inc.	Selección negativa de linfocitos T CD4 ⁺ de memoria y marcaje intracelular y de superficie
Anticuerpos CD3 y CD28 antibodies	Invitrogen - Thermo Fisher Scientific	Estimulación celular
Forbol 12-miristato 13-acetato (PMA)	Sigma-Aldrich, Inc.	Estimulación celular
Ionicina	Sigma-Aldrich, Inc.	Estimulación celular
Interleucina-2 (IL-2)	Sigma-Aldrich, Inc.	Estimulación celular
Anticuerpos conjugados con fluorocromos CD3-Pacific-blue, CCR6-PE, RORγt-Alexa-Fluor647	BD Biosciences	Citometría de flujo
Live/Dead Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit	Invitrogen	Citometría de flujo
eBioscience Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set	Invitrogen - Thermo Fisher Scientific	Marcaje intracelular

2.1.3. Equipos e Instrumentación

Equipo	Marca	Uso
LightCycler 480 Instrument II	Roche Molecular Systems, Inc.	RT-PCR para ROR γ t y ROR γ
Cámara de electroforesis	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Electroforesis en gel de agarosa
Fuente de poder para electroforesis	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Electroforesis en gel de agarosa
Citómetro de flujo BD LSRFortessa	BD Biosciences	Citometría de flujo
NanoPhotometer Pearl	Implen	Cuantificación de ARN
Centrífuga	Marshall Scientific	Cultivo celular, selección negativa de linfocitos T CD4 ⁺ de memoria y marcaje intracelular y de superficie
ChemiDoc Imaging System	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Análisis de electroforesis en gel de agarosa
Contador celular	Kova International, Inc.	Conteo celular

2.1.4. Softwares

Software	Marca	Uso
LightCycler 480 Software	Roche Molecular Systems, Inc.	Configuración, adquisición de datos y análisis de RT-PCR
BD FACSDiva	BD Biosciences	Configuración, adquisición de datos y análisis de citometría de flujo
FlowJo	Tree Star, Inc.	Análisis de citometría de flujo
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, Inc.	Análisis estadístico

2.2. Metodología

2.2.1. Descongelamiento de células

Células mononucleares de sangre periférica (PBMC) fueron descongeladas utilizando suero de ternero recién nacido (NBCS) (5 ml por vial de PBMC) y medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (50 ml por vial de PBMC). Las células fueron centrifugadas 5 min a 1500 rpm, resuspendidas en medio RPMI suplementado (RPMI + 10% FBS + 1% Pen/Strep) y contadas en contador celular (Kova International, Inc., Estados Unidos).

2.2.2. Aislamiento de linfocitos T CD4⁺ de memoria mediante selección negativa

El aislamiento de los linfocitos T CD4⁺ de memoria fue realizado utilizando el Memory CD4⁺ T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec, Alemania), de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las células fueron resuspendidas en una solución de buffer fosfato salino (PBS), 0.5% NCBS y EDTA 2nM (buffer MACS) (2 μ l/10⁶ células) e incubadas con la mezcla de anticuerpos conjugados con biotina (1 μ l/10⁶ cells), por 10 min a 4 °C. En dicha mezcla se encontraban anticuerpos monoclonales contra CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD45RA, CD56, CD123, TCR γ/δ y glicoforina A. A continuación, se añadió buffer (3 μ l/10⁶ células) y las partículas magnéticas anti-biotina (2 μ l/10⁶ células), incubándose por 15 min a 4 °C. El sobrenadante fue aspirado completamente luego que las células fueron lavadas y centrifugadas a 1500 rpm por 5 min. Las columnas compuestas de esferas magnéticas fueron colocadas en un campo magnético adecuado y enjuagadas con la cantidad apropiada de buffer. La suspensión celular fue filtrada a través de las columnas. Todo el efluente fue recolectado. Luego de la filtración, las células colectadas fueron contadas y resuspendidas en medio RPMI suplementado a una concentración de 10⁶ células/500 μ l de medio.

2.2.3. Cultivo celular

Las células fueron incubadas durante 1 min a 37 °C y luego colocadas en medio de cultivo celular (1 vial de células en 30 ml de medio). Las células Jurkat y ACH-2 fueron cultivadas en medio RPMI suplementado, mientras que las células T2M-bl fueron cultivadas en medio DMEM suplementado (DMEM + 10% FBS + 1% Pen/Strep). Las células fueron lavadas y centrifugadas (1500 rpm por 5 min) dos veces antes de ser transferidas (10 ml de células no-adherentes; 5 ml de células adherentes) a frascos de cultivo con un área de superficie de 25 cm². Fueron incubadas a 37 °C por 24 h. Se realizó un pasaje celular antes de la estimulación.

2.2.4. RT-PCR para la cuantificación de la expresión de ROR γ t y ROR γ

El ARN total fue aislado utilizando el RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen Inc., Alemania), siguiendo las indicaciones del fabricante. Las células fueron lisadas y homogeneizadas con buffer RLT Plus más β -mercaptoetanol (10 μ l de β -mercaptoetanol por 1 ml de buffer RLT Plus) y vórtex por 30 s. El lisado fue transferido a una columna de centrifugación eliminadora de ADNg. Luego de la centrifugación (30 s a $\geq 10,000$ rpm), 1 volumen (350 μ l) de etanol 70% fue añadido al filtrado y esta mezcla fue transferida a una columna de centrifugación RNeasy. El filtrado fue descartado luego de la centrifugación (15 s a $\geq 10,000$ rpm). Se añadió 700 μ l de buffer RW1 a la columna y el filtrado fue nuevamente descartado luego de la centrifugación (15 s a $\geq 10,000$ rpm). Se agregó 500 μ l de buffer RPE a la columna; luego de la centrifugación (15 s a $\geq 10,000$ rpm), el filtrado fue descartado. Por segunda vez, se añadió 500 μ l de buffer RPE a la columna RNeasy, se centrifugó por 2 min a $\geq 10,000$ rpm. A continuación, la columna se centrifugó nuevamente (1 min a máxima velocidad) para secarla. Finalmente, a la columna de centrifugación se le añadió 30 μ l de agua libre de RNasas para eluir el ARN, centrifugando por 1 min a $\geq 10,000$ rpm.

La PCR con transcriptasa reversa (RT-PCR) se realizó en un LightCycler 480 Instrument II (Roche Molecular Systems, Inc., USA), utilizando el primer forward

CTG CTG AGA AGG ACA GGG AG para ROR γ t, el primer forward CAC AGA GAC AGC ACC GAG C para ROR γ y el primer reverse común AGT TCT GCT GAC GGG TGC para ROR γ t/ROR γ ¹⁷⁶ (**Figura 1**). El ARN ribosomal 28S fue usado como gen de referencia para la cuantificación relativa. El programa utilizado es el mostrado en la **Tabla I** y la preparación del mix para RT-PCR se encuentra indicada en la **Tabla II**.



ROR_{yt} – tamaño del producto RT-PCR: 202 pb

1 agtccagaagcactgggggagagagctaggtgcagagcttcaggctgaggcgctgctgagagggcctcgccccgcctctg
Primer forward ROR_{yt}
 81 ccgccagctgcacccactcctggaccaccccctgctgagaaggacagggagccaaggccggcagagccaaggctcagtc
 161 atgagaacacaaattgaagtgatcccttgcaaaatctgtggggacaagtcgtctgggatccactacggggttatcacctg
Primer reverse común
 241 tgaggggtgcaagggcttcttcgccggagccagcgctgtaacgcggcctactcctgcacccgtcagcagaactgccccca
 321 tcgaccgcaccagccgaaaccgatgccagcactgccgcctgcagaaatgcctggcgctgggcatgtcccagagatgctgtc

ROR_γ – tamaño del producto RT-PCR: 204 pb

Primer forward ROR_γ
 1 agccagggcagccaggacggcaccaagggagctgccccatggacagggcccacagagacagcaccgagcctcacgggag
 81 ctgctggctgcaaagaagaccacacctcaciaaattgaagtgatcccttgcaaaatctgtggggacaagtcgtctgggat
 161 ccactacggggttatcacctgtgaggggtgcaagggcttcttcgccggagccagcgctgtaacgcggcctactcctgca
Primer reverse común
 241 cccgtcagcagaactgccccatcgaccgcaccagccgaaaccgatgccagcactgccgcctgcagaaatgcctggcgctg
 321 ggcatgtcccagagatgctgtcaagttcggccgatgtccaagaagcagagggacagcctgcatgcagaagtgcagaaaca

Figura 1. Secuencia de primer forward para ROR_{yt}, primer forward para ROR_γ y primer reverse común para ROR_{yt}/ROR_γ, y tamaño de los amplicones ROR_{yt} y ROR_γ.

Tabla I. Programa utilizado para el ensayo de RT-PCR.

RT (transcripción reversa)	30 min a 50 °C
Activación de ADN polimerasa	15 min a 95 °C
Ciclos	45 ciclos, cada uno a 94 °C por 10 s, 61 °C por 10 s y 72 °C por 10 s
Melting	1 ciclo a 95 °C por 5 s y 60 °C por 1 min

Tabla II. Mix utilizado para el ensayo de RT-PCR.

Reactivos	Volumen por reacción (µl)
SybrGreen PCR Master Mix	10
Primer Forward	1
Primer Reverse	1
Enzima RT	2
Volumen total de mix	14
Volumen de muestra	6
Volumen final	20

2.2.5. Estimulación celular

Las células Jurkat, ACH-2 y T2M-bl fueron cultivadas en placas de 48 pozos (2×10^6 células/pozo/ml) en presencia de anticuerpos CD3 inmovilizados y anticuerpos CD28 solubles ($1 \mu\text{g/ml}$), PMA/Ionomicina 162 nM ($1 \mu\text{g/ml}$), PMA/ Ionomicina 25 nM ($1 \mu\text{g/ml}$) o IL-2 (5 ng/ml). Para la estimulación con anti-CD3/CD28, la placa fue recubierta con una solución de anti-CD3 en PBS estéril (0.5 ml/pozo) e incubada a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 2 h. Antes de añadir las células, la solución de anti-CD3 fue removida y los pozos fueron enjuagados con PBS estéril. La suspensión celular y anti-CD28 soluble fueron agregados a la placa. El tiempo de incubación fue de 5 h o 24 h. Para las otras estrategias de estimulación, el tiempo de estimulación fue de 24 h.

2.2.6. Análisis por citometría de flujo

Se utilizaron los siguientes anticuerpos conjugados con fluorocromos para el análisis por citometría de flujo: CD3-Pacific-blue, CCR6-PE y ROR γ t-Alexa-Fluor647 (BD Biosciences, USA). Se usó el Live/Dead Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit (Invitrogen, Estados Unidos) para excluir las células muertas. Las células fueron analizadas mediante citometría de flujo policromática. Los datos se adquirieron en el citómetro de flujo BD LSRFortessa (BD Biosciences) y se analizaron con los softwares BD-Diva (BD Biosciences) y FlowJo (Tree Star, Inc., USA).

El marcaje de superficie se realizó como sigue: las células fueron resuspendidas con buffer FACS (PBS, NBCS 2%, EDTA 1 nM , azida de sodio 0.1%) y luego mezcladas con los anticuerpos CD3-Pacific-blue y CCR6-PE ($1 \text{ ul per } 10^6 \text{ cells}$) e incubadas por 30 min a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. La mezcla de células y anticuerpos fue lavada con buffer FACS. El sobrenadante fue descartado luego de la centrifugación (3 min a 1500 rpm). Se realizó un segundo lavado con buffer FACS y centrifugación por 3 min a 1500 rpm. Se descartó el sobrenadante y las células fueron incubadas con formaldehído durante 30 min a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, y luego lavadas dos veces con PBS por 3 min a 1500 rpm. Por último, las células fueron resuspendidas con buffer FACS.

La expresión intracelular de ROR γ t se cuantificó mediante citometría de flujo luego del marcaje con el anticuerpo apropiado, utilizando el eBioscience Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set (Invitrogen – Thermo Fisher Scientific, USA), siguiendo las indicaciones del fabricante. Las células fueron lavadas dos veces con buffer de marcaje a 1500 rpm por 3 min, resuspendidas con la solución de trabajo de fijación/permeabilización, incubadas a 4 °C durante 30 min en la oscuridad y luego centrifugadas a 1500 rpm por 3 min. Las células fueron lavadas dos veces con buffer de permeabilización 1X a 1500 rpm por 3 min. A continuación, fueron resuspendidas con buffer de permeabilización 1X y el anticuerpo ROR γ t-Alexa647 (2 μ l por 10⁶ células), incubándose en la oscuridad a temperatura ambiente por al menos 30 min. Finalmente, las células fueron lavadas con buffer de permeabilización 1X, resuspendidas con buffer de marcaje y conservadas a 4 °C.

2.2.7. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos fueron realizados usando el software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., USA). Se aplicaron las pruebas de comparación múltiple de Friedman con Dunn para determinar la significación estadística de las diferencias entre los múltiples subconjuntos coincidentes de células.

CAPÍTULO III





3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Cuantificación de la expresión de ROR γ t y ROR γ mediante el ensayo RT-PCR

El objetivo de este experimento fue obtener suficiente cantidad de ROR γ t y ROR γ para elaborar curvas estándar de RT-PCR para ambas isoformas. De esta manera, se permitiría la cuantificación de la concentración de ROR γ t y ROR γ en diferentes células mediante ensayos de RT-PCR.

Se realizó una electroforesis (agarosa 1.5%, 120 V, 40 min) de los productos obtenidos de una RT-PCR, en donde se amplificaron los amplicones de ROR γ t y ROR γ a partir de linfocitos T CD4⁺ activados y células HT-29, respectivamente. La **Figura 2** muestra los resultados de la electroforesis, los cuales fueron visualizados mediante el ChemiDoc XRS+ System (Bio-Rad). En el carril 1, se observa la banda correspondiente a ROR γ t a partir de linfocitos T CD4⁺ activados; del mismo modo que, en el carril 8, se observa la banda correspondiente a ROR γ a partir de células HT-29. Ambas bandas presentan un peso molecular similar: 202 pb para el amplicón de ROR γ t y 204 pb para el amplicón de ROR γ . Adicionalmente, en la muestra de células HT-29 no fue detectada ninguna banda correspondiente a ROR γ t, lo cual concuerda con que ROR γ t se expresa exclusivamente en células del sistema inmune, como ha sido reportado anteriormente ^{1,8,46,177}. Por otro lado, en la muestra de linfocitos T CD4⁺ se observa una banda perteneciente al amplicón ROR γ . Ruan *et al.* (2011) han reportado acerca de la expresión de ROR γ en linfocitos T ⁴⁹, sin embargo, su expresión se da principalmente en músculo esquelético, hígado y piel ^{1,3,6,48,49}.

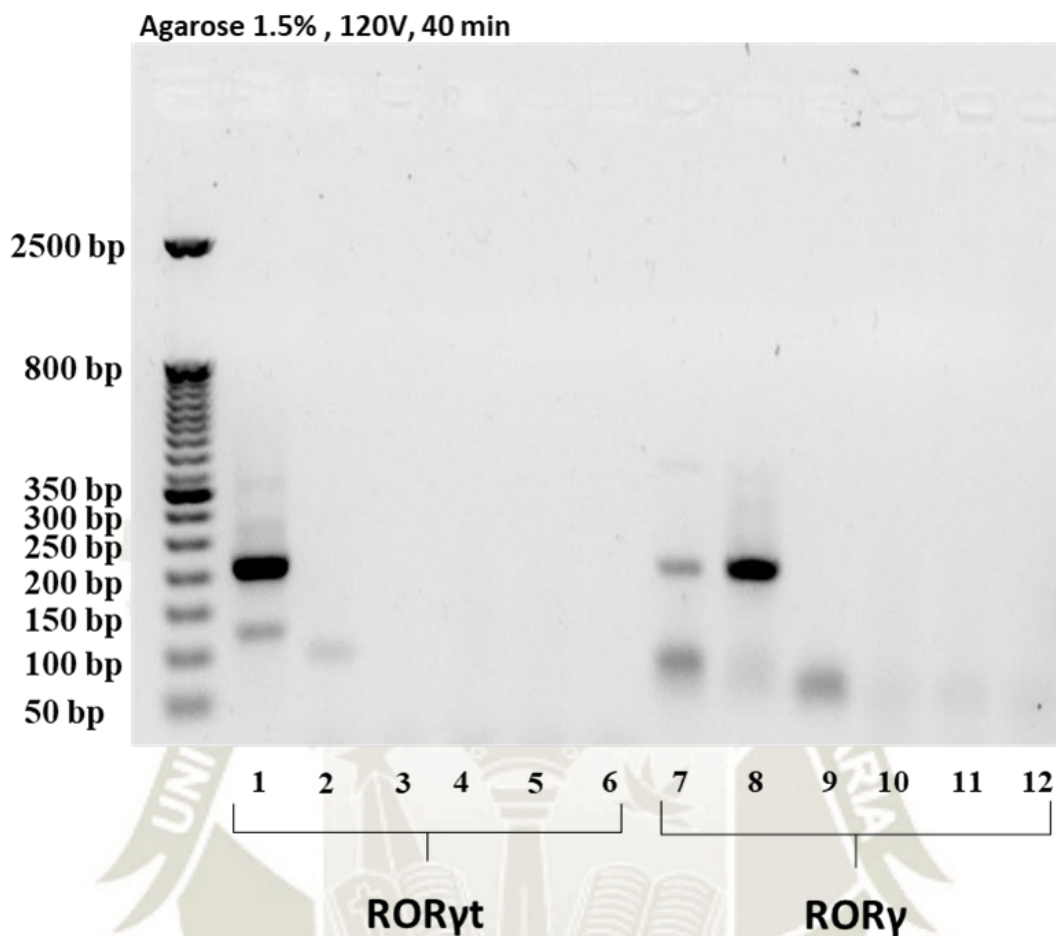


Figura 2. Electroforesis de los amplicones ROR γ t y ROR γ a partir de linfocitos T CD4⁺ activados y células HT-29. En la siguiente figura se observan en los carriles 1 y 7: linfocitos T CD4⁺ activados; carriles 2 y 8: células HT-29; carriles 3 y 9: H₂O libre de nucleasas (control negativo para la muestra); carriles 4 y 10: control RT para linfocitos T CD4⁺ activados; carriles 5 y 11: control RT para células HT-29; carriles 6 y 12: control RT para H₂O libre de nucleasas.

El amplicón de ROR γ t proveniente de linfocitos T CD4⁺ activados y el amplicón de ROR γ proveniente de células HT-29, fueron purificados a partir del gel de electroforesis con el QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Alemania). El ADN complementario (ADNc) extraído se cuantificó con un NanoPhotometer Pearl (Implen, Alemania).

La cantidad de material genético obtenido de esta primera amplificación fue muy bajo ($<1 \text{ ng}/\mu\text{l}$; el NanoPhotometer no fue capaz de cuantificarlo), lo que no permitió continuar con el siguiente paso del experimento ya que la cantidad de ROR γ t y ROR γ era muy bajo para realizar las soluciones necesarias para la curva estándar para el ensayo de RT-PCR, por lo que se realizó una segunda PCR del ADNc purificado, con el fin de obtener una mayor concentración de los amplicones de ROR γ t y ROR γ . Luego de la segunda amplificación, se realizó una electroforesis (agarosa 1.5%, 120 V, 40 min), se purificó el ADNc a partir del gel y se cuantificó la concentración por espectrofotometría, obteniendo $7.5 \text{ ng}/\mu\text{l}$ del amplicón ROR γ t y $8 \text{ ng}/\mu\text{l}$ del amplicón ROR γ .

A partir de estos stocks de ROR γ t y ROR γ , se prepararon diluciones seriadas para obtener estándares de ROR γ t y ROR γ . Se prepararon alícuotas de $100 \text{ pg}/\mu\text{l}$, a partir de las cuales se realizaron diluciones de $100 \text{ fg}/\mu\text{l}$, $10 \text{ fg}/\mu\text{l}$, $1 \text{ fg}/\mu\text{l}$, $0.1 \text{ fg}/\mu\text{l}$, $0.01 \text{ fg}/\mu\text{l}$ y $0.001 \text{ fg}/\mu\text{l}$. De cada una de estas diluciones se tomó $2 \mu\text{l}$ por reacción, obteniéndose una cantidad final de 200 fg , 20 fg , 2 fg , 0.2 fg , 0.02 fg y 0.002 fg de ADNc en cada reacción. Las reacciones fueron llevadas a cabo en triplicado. Se realizó una RT-PCR utilizando el LightCycler 480 Instrument II (Roche Life Science), con los primers ($0.5 \mu\text{M}/\text{reacción}$) (**Figura 1**) y el programa (**Tabla I**) ya mencionados, para obtener las curvas estándar de ROR γ t (**Figura 3**) y ROR γ (**Figura 4**). En la curva de amplificación de ROR γ t, los puntos de cruce (Ct) promedio fueron de 19.11 hasta 37.72 (**Tabla III**), mientras que en la curva de amplificación de ROR γ los Cp promedio fueron de 18.07 hasta 34.02 (**Tabla IV**).

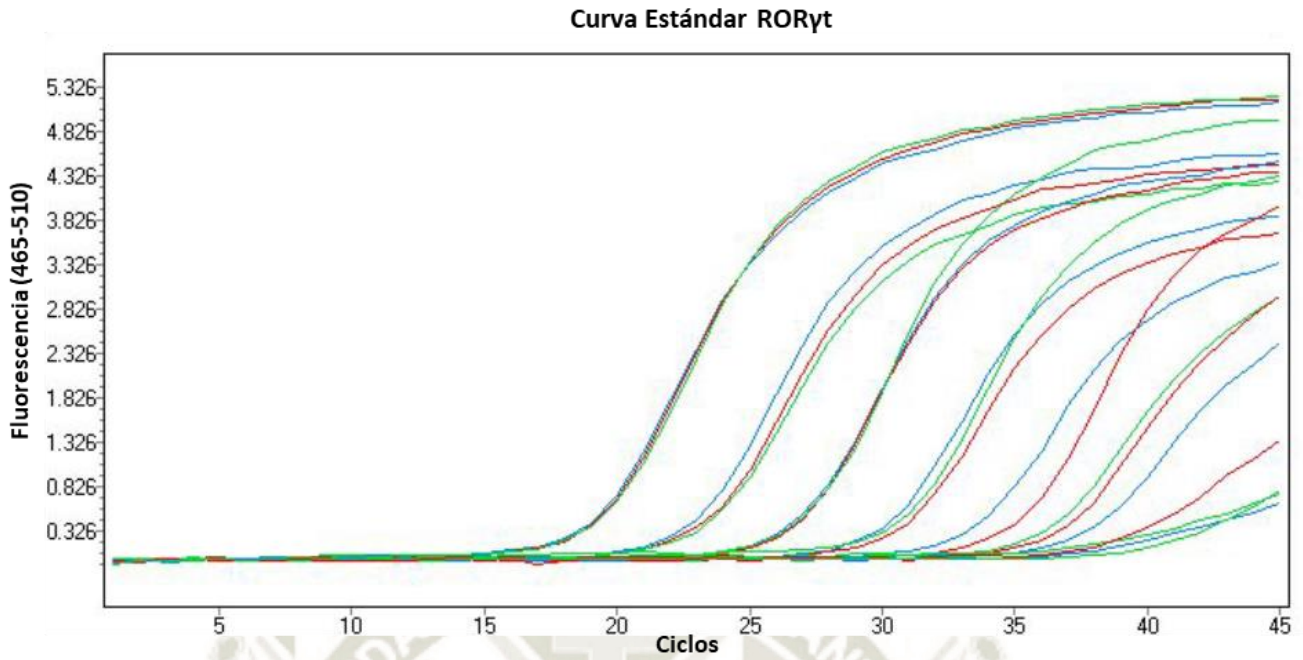


Figura 3. Curva estándar para RORyt. Se prepararon diluciones seriadas para obtener estándares de ADNc de RORyt. En la siguiente figura se muestra el gráfico de amplificación de cada uno de los estándares de RORyt.

Tabla III. Valores de punto de cruce (Ct) de la curva estándar para RORyt.

Muestra	RORyt				
	Ct1	Ct2	Ct3	Promedio Ct	Std* Ct
200 fg	18.95	19.11	19.28	19.11	0.16
20 fg	22.69	23.13	23.20	23.01	0.28
2 fg	26.61	26.6	26.94	26.72	0.20
0.2 fg	29.90	30.55	30.67	30.38	0.42
0.02 fg	33.16	34.98	35.98	34.70	1.43
0.002 fg	37.34	36.53	39.28	37.72	1.41
H ₂ O	37.51	39.23	40.00	38.91	1.27

*Std: Desviación estándar

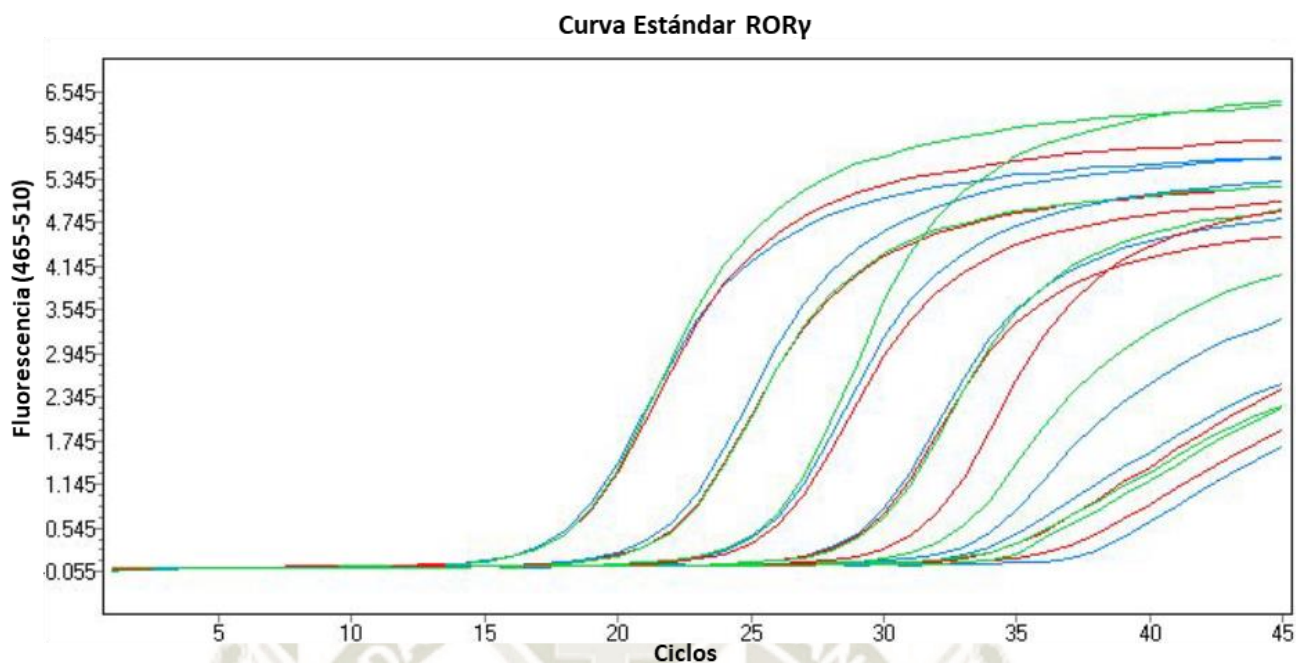


Figura 4. Curva estándar para ROR γ . Al igual que para la curva anterior, se prepararon diluciones seriadas para obtener estándares de ADNc de ROR γ . En la siguiente se muestra el gráfico de amplificación de cada uno de los estándares de ROR γ .

Tabla IV. Valores de punto de cruce (Ct) de la curva estándar para ROR γ .

Muestra	ROR γ				
	Ct1	Ct2	Ct3	Promedio Ct	Std* Ct
200 fg	17.83	18.16	18.24	18.07	0.21
20 fg	21.62	21.75	21.83	21.73	0.10
2 fg	25.30	25.51	25.58	25.46	0.15
0.2 fg	28.88	28.93	29.24	29.02	0.20
0.02 fg	33.09	31.09	32.07	32.08	1.00
0.002 fg	33.52	34.39	34.16	34.02	0.45
H2O	37.32	36.45	34.63	36.13	1.37

*Std: Desviación estándar

La especificidad de los productos fue evaluada mediante el análisis de la curvas de melting. Este análisis permite la identificación de un producto de RT-PCR por medio de su temperatura de fusión. En las **Figura 5** y **Figura 6**, se observa un pico en $T_m=85$, lo cual significa que solo el producto de interés fue amplificado, ROR γ_t y ROR γ , respectivamente. En la **Figura 5**, hay otros picos en $T_m=76-78$, lo cuales corresponden a dímeros de primers en la reacción blanco y en uno de los triplicados de 0.002 fg. En la **Figura 6**, también se observan picos en $T_m=76-79$, correspondientes a dímeros de primers en la reacción blanco, en todos los triplicados de 0.002 fg y en dos triplicados de la reacción de 0.02 fg. Las temperaturas de fusión para ambas curvas estándar son mostradas en **Tabla V** y **Tabla VI**.



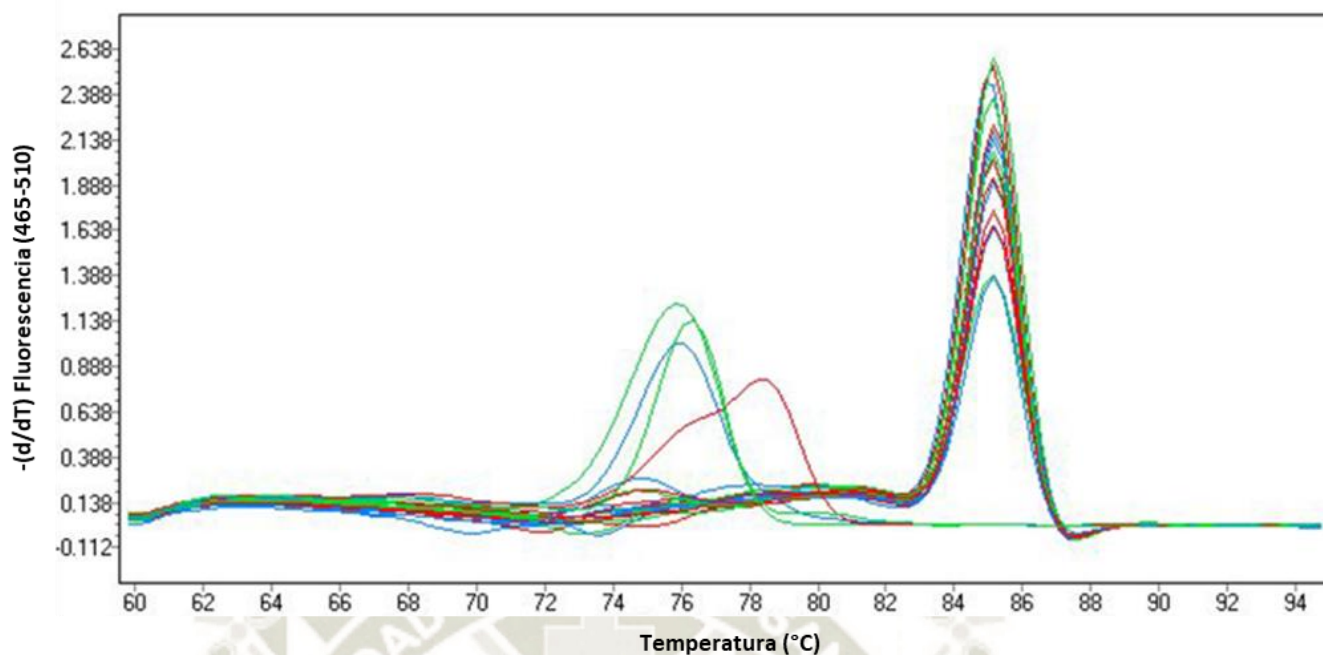


Figura 5. Picos de melting de la curva estándar de ROR γ t. Luego del ensayo de RT-PCR con los primers para ROR γ t, un análisis de curvas de melting fue realizado para determinar la presencia e identidad de los productos de la RT-PCR, así como de dímeros de primers. Se muestra la curva de melting de cada estándar de ROR γ t.

Tabla V. Valores de las temperaturas de fusión (T_m) de la curva estándar de ROR γ t.

Muestra	ROR γ t					
	Pico 1			Pico 2		
	T_{m1}	T_{m2}	T_{m3}	T_{m1}	T_{m2}	T_{m3}
200 fg	84.97	85.07	85.15	-	-	-
20 fg	85.14	85.15	85.08	-	-	-
2 fg	85.14	85.12	85.09	-	-	-
0.2 fg	85.16	85.15	85.13	-	-	-
0.02 fg	85.13	85.11	85.13	-	-	-
0.002 fg	85.12	85.16	75.86	-	-	-
H ₂ O	75.95	78.00	76.26	-	-	-

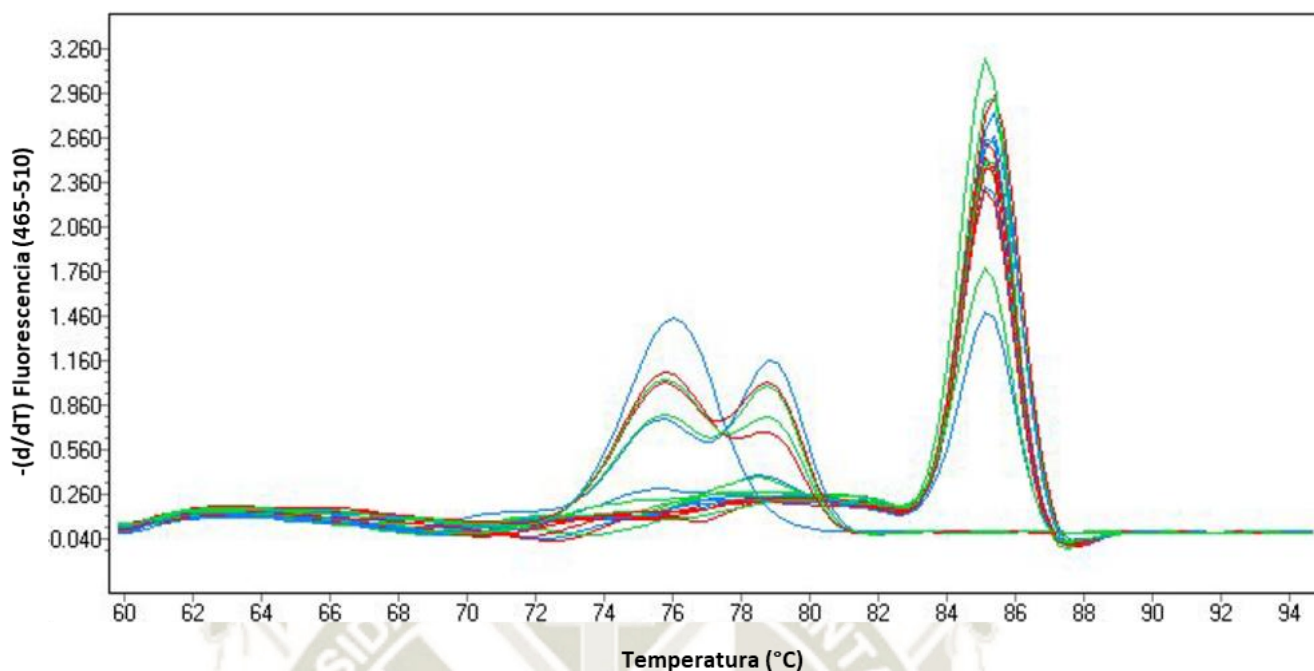


Figura 6. Picos de melting de la curva estándar de ROR γ . Luego del ensayo de RT-PCR con los primers para ROR γ , un análisis de curvas de melting fue realizado para determinar la presencia e identidad de los productos de la RT-PCR, así como de dímeros de primers. Se muestra la curva de melting de cada estándar de ROR γ .

Tabla VI. Valores de las temperaturas de fusión (T_m) de la curva estándar de ROR γ .

RORγ						
	Pico 1			Pico 2		
Muestra	T_{m1}	T_{m2}	T_{m3}	T_{m1}	T_{m2}	T_{m3}
200 fg	85.34	85.37	85.29	-	-	-
20 fg	85.34	85.20	85.18	-	-	-
2 fg	85.23	85.15	85.16	-	-	-
0.2 fg	85.19	85.18	85.23	-	-	-
0.02 fg	78.04	85.24	78.26	85.18	-	85.11
0.002 fg	75.75	75.83	75.78	78.94	78.83	78.82
H ₂ O	75.98	75.87	75.86	-	-	-

Los productos de la RT-PCR fueron confirmados mediante electroforesis, en donde bandas con el tamaño adecuado son mostradas. El análisis por electroforesis demostró la amplificación de los productos buscados y la ausencia de contaminación. Sin embargo, las bandas correspondientes a 0.002 fg de ROR γ t muestran una amplificación considerablemente menor con respecto a las otras cantidades (**Figura 7**); similarmente, la banda de 0.002 fg de ROR γ no mostró amplificación (**Figura 8**). En la **Figura 7**, el carril 13 es diferente de los carriles 11 y 12, lo cual significa que el tercer triplicado de 0.02 fg es incorrecto. Lo mismo ocurre con el tercer triplicado de 0.002 fg porque no hay nada en el carril 16, mientras que en los carriles 14 y 15 está la banda correspondiente al amplicón. Las bandas pálidas en los carriles 13-19 son dímeros de primers. En la **Figura 8**, las réplicas en los carriles 11 y 13 son diferentes del replicado en el carril 12, lo cual indica que los triplicados para 0.02 fg no se realizaron bien. Las bandas pálidas en los carriles 11 y 13-19 son dímeros de primers.

El ensayo de RT-PCR es una técnica precisa y sensible para la cuantificación en tiempo real de la expresión de genes ¹⁷⁸⁻¹⁸⁰. Cleret-Buhot et al. (2015) reportaron el uso de RT-PCR con SYBR Green para la cuantificación exitosa de la expresión de diferentes genes, siendo RORC uno de ellos ¹⁸¹. Del mismo modo, DaFonseca et al. (2015) emplearon el ensayo de RT-PCR para cuantificar la expresión relativa de RORC en linfocitos Th17, utilizando ARNr 28S como gen normalizador ⁹⁶. Los resultados del presente trabajo indican que el ensayo permite cuantificar cantidades de hasta 0.02 fg de ARNm de ROR γ t y ROR γ .

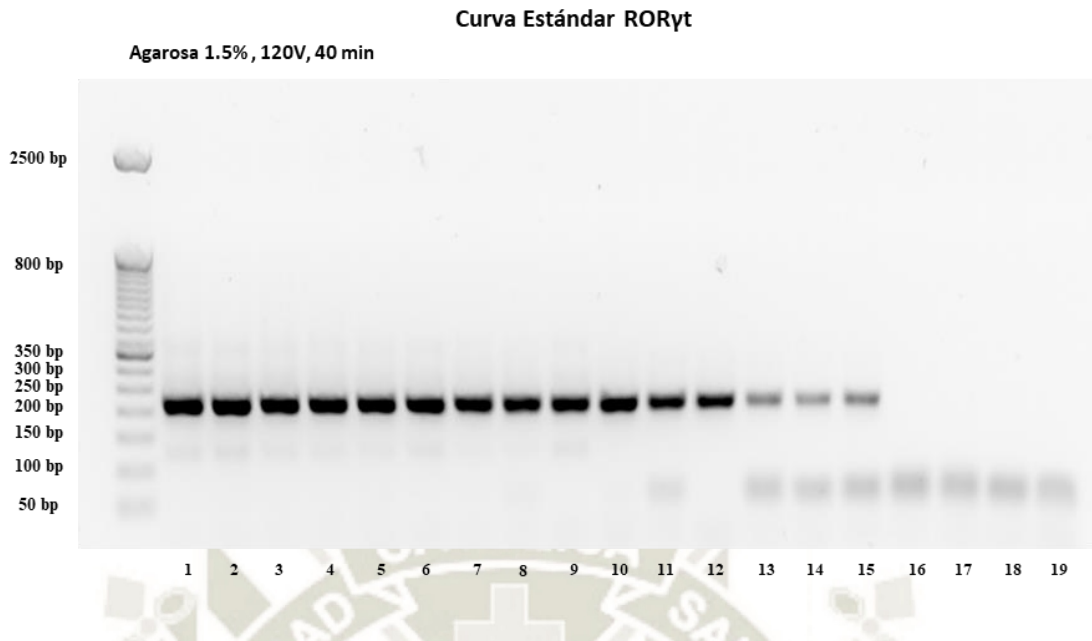


Figura 7. Electroforesis de la curva estándar para RORyt. En la siguiente figura se observan en el carril 1: estándar de 200 fg; carriles 2 a 4: estándar de 20 fg; carriles 5 a 7: estándar de 2 fg; carriles 8 a 10: estándar de 0,2 fg; carriles 11 a 13: estándar de 0,02 fg; carriles 14 a 16: estándar de 0.002 fg; carriles 17 a 19: H₂O libre de nucleasas (control negativo para la muestra).

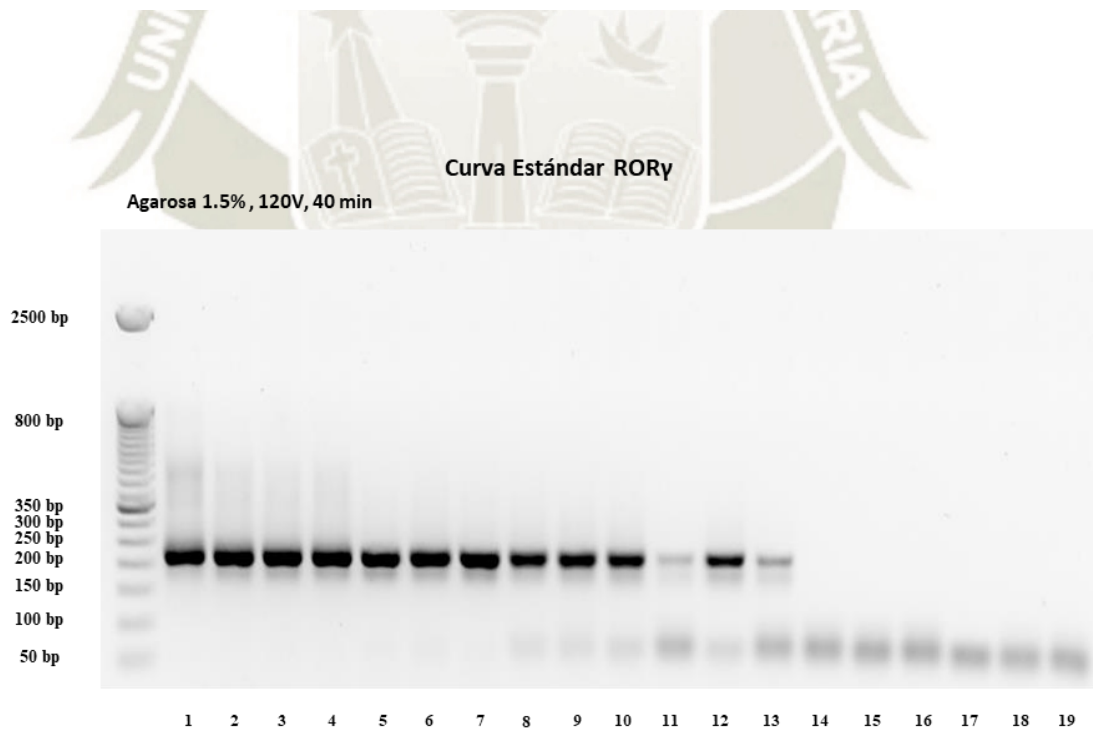


Figura 8. Electroforesis de la curva estándar para RORγ. En la siguiente figura se observan en el carril 1: estándar de 200 fg; carriles 2 a 4: estándar de 20 fg; carriles 5 a 7: estándar de 2 fg; carriles 8 a 10: estándar de 0,2 fg; carriles 11 a 13: estándar de 0,02 fg; carriles 14 a 16: estándar de 0.002 fg; carriles 17 a 19: H₂O libre de nucleasas (control negativo para la muestra).

3.2. ROR γ t se expresa preferentemente en células Jurkat y linfocitos T CD4⁺, mientras que ROR γ es expresado en células TZM-bl y HT-29

A continuación, se evaluó la expresión de ROR γ t y ROR γ en diferentes tipos celulares, utilizando el ensayo cuantitativo de RT-PCR. Para ello, se pusieron en cultivo las líneas celulares Jurkat, ACH-2 y TZM-bl. Las células Jurkat y ACH-2 se cultivaron en medio RPMI suplementado, mientras que las células TZM-bl se cultivaron en medio DMEM suplementado. Simultáneamente, se realizó el aislamiento de linfocitos T CD4⁺ de memoria a partir de donantes humanos sanos ($n = 4$), usando el Memory CD4⁺ T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec, Alemania). Se aisló y cuantificó el ARN total de las líneas celulares utilizadas y de los linfocitos T CD4⁺ de memoria.

Para cuantificar la expresión de ROR γ t y ROR γ se realizó una RT-PCR con los mismos primers y el mismo programa descritos antes para las curvas estándar. La especificidad de los productos fue comprobada mediante el análisis de las curvas de melting. Se cuantificó ROR γ t y ROR γ en linfocitos humanos T CD4⁺ de memoria, macrófagos, monocitos y en líneas celulares Jurkat, ACH-2, TZM-bl y HT-29. Para la cuantificación de ROR γ t y ROR γ en macrófagos, monocitos y células HT-29, se utilizó ARN previamente aislado en el laboratorio. Los resultados mostrados en la **Figura 9** comparan la expresión de ROR γ t y ROR γ , mostrando la expresión preferencial de ROR γ t en las células Jurkat y en los linfocitos T CD4⁺, y la expresión preferencial de ROR γ en las células TZM-bl y HT-29. No esperaba que las dos isoformas fueran mutuamente excluyentes, pero sí esperaba la expresión exclusiva de ROR γ t en los linfocitos T.

Las células Jurkat fueron las que mostraron la mayor expresión absoluta y relativa de ROR γ t. Los linfocitos T CD4⁺ presentaron una expresión absoluta de ROR γ t menor que las células Jurkat, pero mayor que las otras células evaluadas, mientras que la expresión relativa fue menor que en células Jurkat y monocitos **Figura 9**. Como se esperaba, los linfocitos T CD4⁺ presentaron una considerable expresión de ROR γ t. No es extraño que las células Jurkat expresen ROR γ t, debido a su naturaleza de linfocito T. Ratajewski et al. (2012) y Li et al. (2016) reportaron que las células

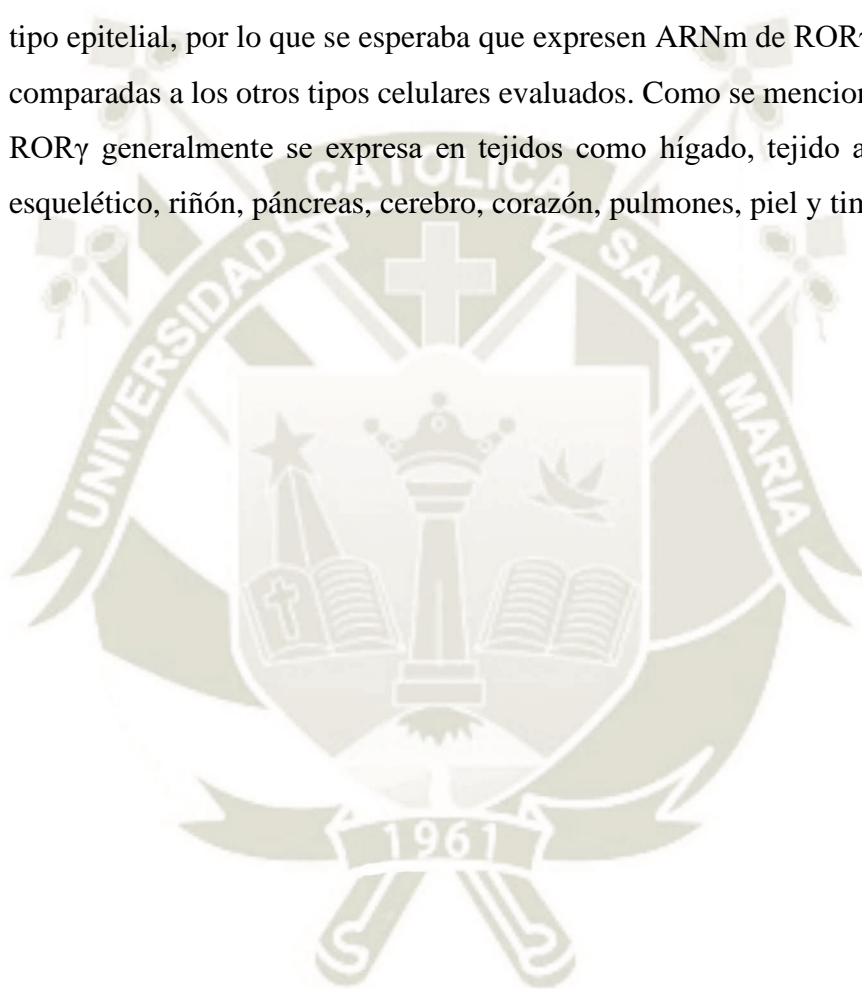
Jurkat expresan ROR γ t a nivel de ARN ¹⁷⁶ y de proteína ¹⁸², respectivamente. Asimismo, Ratajewski et al. (2012) compararon la expresión de ROR γ t y ROR γ en células Jurkat, HeLa y HepG2, encontrándose que las células Jurkat expresaban mayor cantidad de ROR γ t que las células HeLa y HepG2, las cuales son derivadas de carcinomas; por el contrario, dichas células expresaron niveles muchos más altos de ROR γ en comparación a las células Jurkat ¹⁷⁶. Sin embargo, como demostraron Manel et al. (2008), solo la expresión de ROR γ t no es suficiente para la diferenciación en linfocitos Th17, sino que se requiere de otros factores como TGF- β , IL-1 β y IL-6, IL-21 o IL-23 para inducir la expresión de IL-17 ¹⁸³. Adicionalmente, como se mencionó antes, existen otros tipos de células que expresan ROR γ t, como los linfocitos T $\gamma\delta$, las células ILC3, las células LTi y las células NK CD3-NKp46⁺, lo cual indica que la presencia de ROR γ t no es exclusiva de los linfocitos Th17.

Es sorprendente que las células Jurkat expresen más ROR γ t que los linfocitos primarios T CD4⁺. Pero, debido a que entre los linfocitos T CD4⁺ de memoria existen varios subtipos de células que no expresan ROR γ t, es posible que el nivel general de la expresión de ROR γ t se vea diluida en comparación a la expresión en células Jurkat. Por otro lado, las células ACH-2 son linfocitos T también, pero ellas no expresan tanto ROR γ t como las células Jurkat o los linfocitos T CD4⁺. Es posible que dados los múltiples sitios únicos de integración del VIH en las células ACH-2 ¹⁴⁸ reportados por Symons et al. (2017), la expresión de ROR γ t se vea inhibida en estas células.

Los monocitos mostraron una expresión relativa de ROR γ t mayor que los linfocitos T CD4⁺ de memoria. La expresión relativa de ROR γ t en monocitos fue medida en relación con el ARNr 28S. Quizás la expresión del ARNr 28S es menor en monocitos que en las otras células evaluadas, y por ello la expresión relativa de ROR γ t parece ser mayor. El control endógeno debe tener un nivel de expresión consistente en todos los tipos de células. De lo contrario, cada tipo celular requiere un gen housekeeping de referencia. Cuando los genes de referencia no muestran la constancia de expresión esperada, se pueden obtener resultados inconsistentes. Como se mencionó anteriormente, DaFonseca et al. (2015) emplearon ARNr 28S como gen de

referencia, pero en linfocitos T⁹⁶. Igualmente, se ha reportado el uso de ARNr 28S como gen de referencia en otros tipos celulares^{184,185}, pero no en monocitos.

ROR γ fue expresado en mayor medida en las células TZM-bl. Las células HT-29 mostraron una expresión absoluta de ROR γ menor que las células TZM-bl, pero mayor que las otras células, y una expresión relativa menor que en células TZM-bl y monocitos **Figura 9**. Tanto las células TZM-bl como las células HT-29 son de tipo epitelial, por lo que se esperaba que expresen ARNm de ROR γ en mayor nivel, comparadas a los otros tipos celulares evaluados. Como se mencionó anteriormente, ROR γ generalmente se expresa en tejidos como hígado, tejido adiposo, músculo esquelético, riñón, páncreas, cerebro, corazón, pulmones, piel y timo.



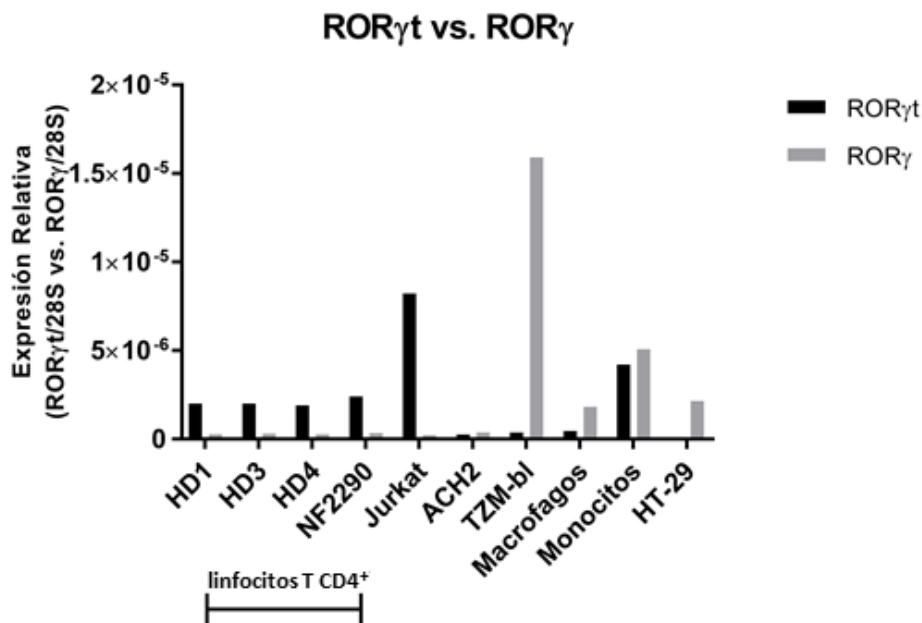
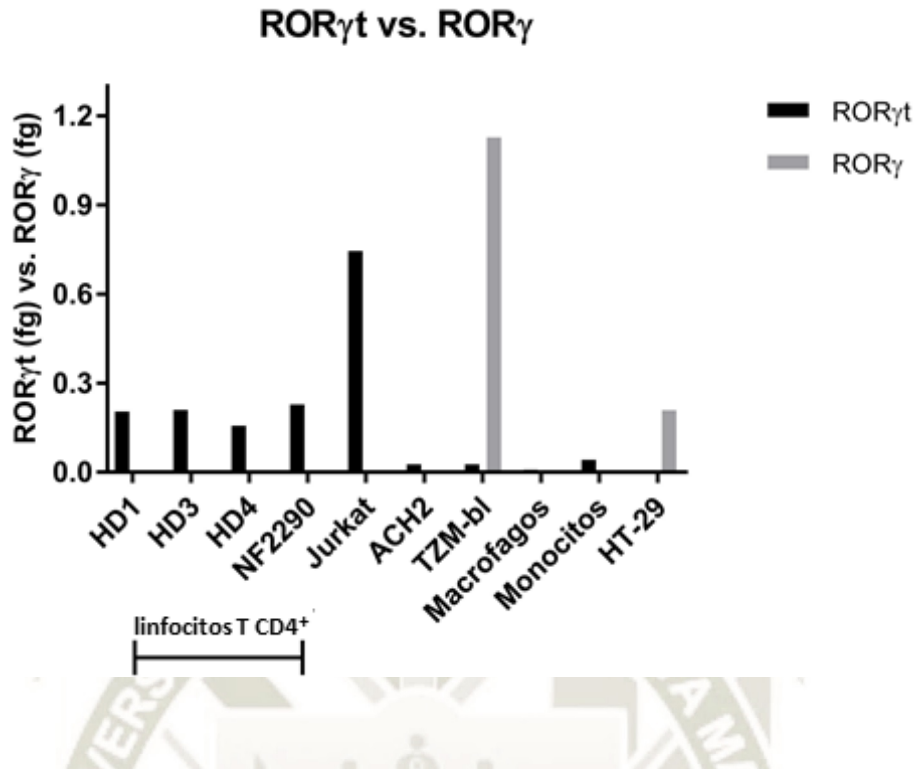


Figura 9. Comparación entre la expresión de ROR γ t and ROR γ en los distintos tipos celulares. El ARN total fue aislado a partir de linfocitos T CD4⁺, células Jurkat, células ACH-2, células TZM-bl, células HT-29, macrófagos y monocitos. La expresión de ROR γ t y ROR γ fue cuantificada mediante RT-PCR, utilizando los primers adecuados. En la figura se muestran la expresión absoluta y relativa de ambas isoformas.

3.3. ROR γ t, pero no ROR γ , es inducible mediante anti-CD3/CD28 en linfocitos T CD4⁺

Para evaluar el efecto de distintas condiciones estimuladoras en la expresión de ROR γ t y ROR γ , se estimuló linfocitos T CD4⁺ de memoria, células Jurkat y células ACH-2 con anti-CD3/CD28 durante 5 h. Se extrajo y cuantificó el ARN total de las células. A continuación, se realizó una RT-PCR para cuantificar la expresión de ambas isoformas en las células *ex vivo*, estimuladas y sin estimular. Se empleó ARNr 28S como gen de referencia para la cuantificación relativa. Todos los resultados fueron normalizados a la cantidad relativa expresada por las células *ex vivo*.

Los resultados indicaron que la estimulación con anti-CD3/CD28 durante 5 h induce la expresión, tanto absoluta como relativa, de ROR γ t en linfocitos T CD4⁺ (**Figura 10**), pero no induce la expresión de ROR γ (**Figura 11**). El incremento de ARNm de ROR γ t después de la diferenciación de linfocitos primarios T CD4⁺ de ratón en linfocitos Th17 ha sido anteriormente reportado por Li et al. (2016)¹⁸². Feske et al. (2007) mostraron que la estimulación del receptor de linfocitos T (TCR) induce la entrada de Ca²⁺ por medio de los canales de Ca²⁺ activados por la liberación de Ca²⁺ (CRAC). El incremento de Ca²⁺ intracelular produce la activación del factor nuclear de linfocitos T activados (NFAT), el cual regula regiones promotoras en el núcleo¹⁸⁶. Adicionalmente, Kim et al. (2014) reportaron que Orail, una proteína de canal CRAC, juega un papel fundamental en la regulación de la expresión de ROR γ t en la diferenciación Th17, a través de la vía de señalización Ca²⁺-NFAT. La inhibición de la actividad de los canales CRAC, así como el bloqueo de la translocación de NFAT, reduce la expresión de ROR γ t en linfocitos T que se encuentran bajo condiciones de polarización Th17¹⁸⁷. En consecuencia, es esperado que la estimulación del TCR con anti-CD3/CD28 induzca la expresión de ROR γ t en linfocitos T CD4⁺, debido a la vía de señalización Ca²⁺-NFAT desencadenada por esta estimulación. Yahia-Cherbal et al. (2019) reportaron en uno de sus experimentos que la estimulación mediante TCR de los linfocitos T CD4⁺ indujo la expresión de ROR γ t a nivel de ARNm¹⁸⁸. Del mismo modo, Fernandes et al. (2017) mostraron que los linfocitos Th17 estimulados con anti-CD3/CD28 durante 3 días presentan una expresión relativa mayor de ARN de ROR, en comparación a los linfocitos no estimulados¹⁸⁹.

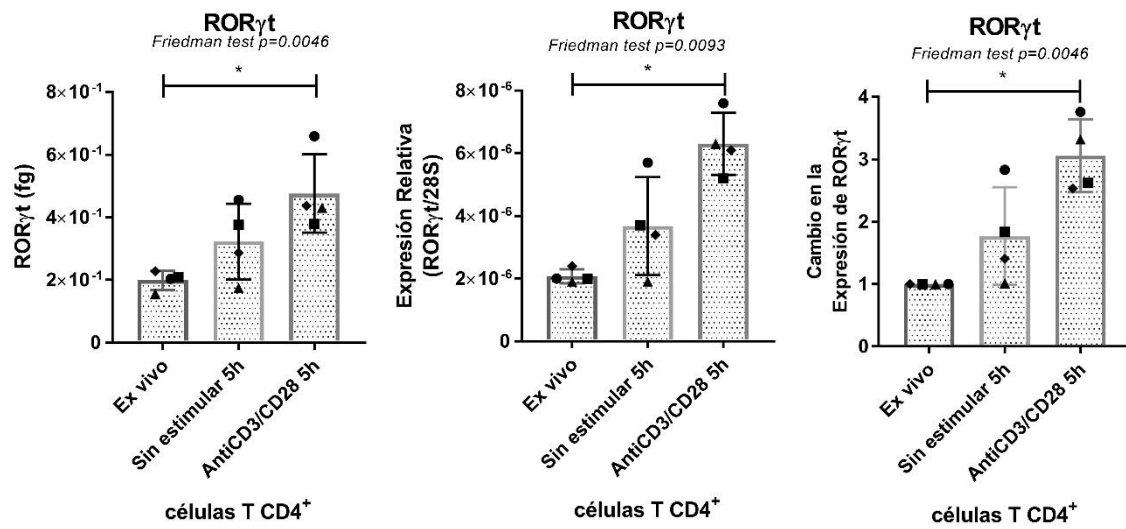


Figura 10. Efecto de la estimulación anti-CD3/CD28 en la expresión de ROR γ t en linfocitos T CD4⁺ de memoria de donantes sanos (n=4). Indicados en los gráficos están los valores P de las pruebas de comparación múltiple de Friedman y Dunn (*, $P<0.05$; **, $P<0.01$; ***, $P<0.001$). El cambio en la expresión fue calculado comparando con la expresión relativa de ROR γ t en los linfocitos T CD4⁺ *ex vivo*.

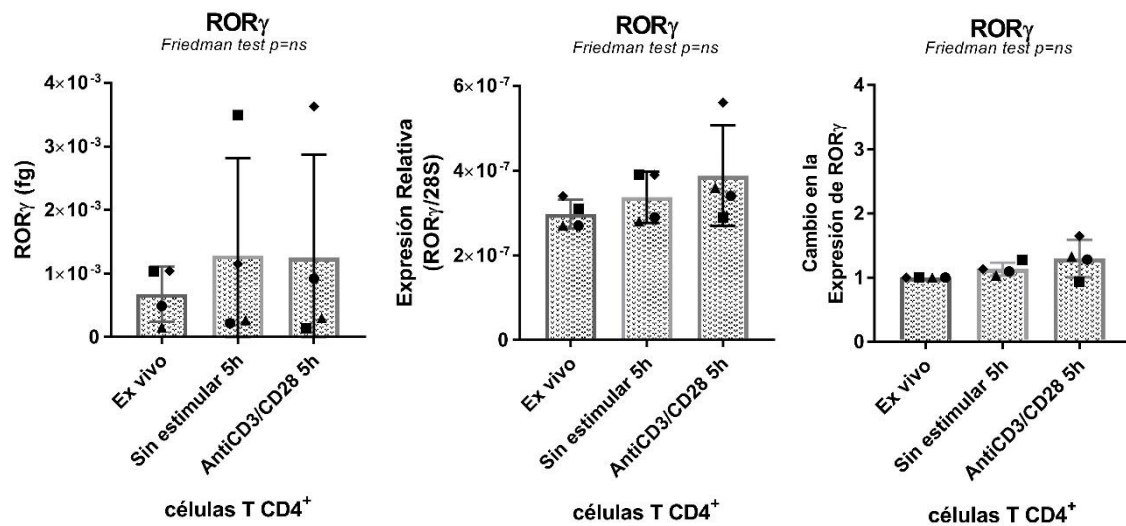


Figura 11. Efecto de la estimulación anti-CD3/CD28 en la expresión de ROR γ en linfocitos T CD4⁺ de memoria de donantes sanos (n=4). Indicados en los gráficos están los valores P de las pruebas de comparación múltiple de Friedman y Dunn (*, $P<0.05$; **, $P<0.01$; ***, $P<0.001$). El cambio en la expresión fue calculado comparando con la expresión relativa de ROR γ en los linfocitos T CD4⁺ *ex vivo*.

Por otro lado, la expresión absoluta de ROR γ t en células Jurkat disminuye luego de la estimulación (**Figura 12**), mientras que la expresión relativa de la otra isoforma incrementa luego de 5 h de reposo, más no luego de la estimulación con anti-CD3/CD28 (**Figura 13**). Ha sido descrito por Gioia et al. (2018) que la línea celular Jurkat ha mostrado varias deficiencias de expresión, relacionadas a mutaciones dañinas que están involucradas en la señalización del receptor de linfocitos T ¹⁹⁰. Además, Bartelt et al. (2009) reportaron que las células Jurkat muestran un flujo exagerado de Ca²⁺ al momento de la inducción del TCR ¹⁹¹. Estas diferencias de señalización de TCR pueden contribuir a la disminución de la expresión de ROR γ t en células Jurkat tras la estimulación del TCR.

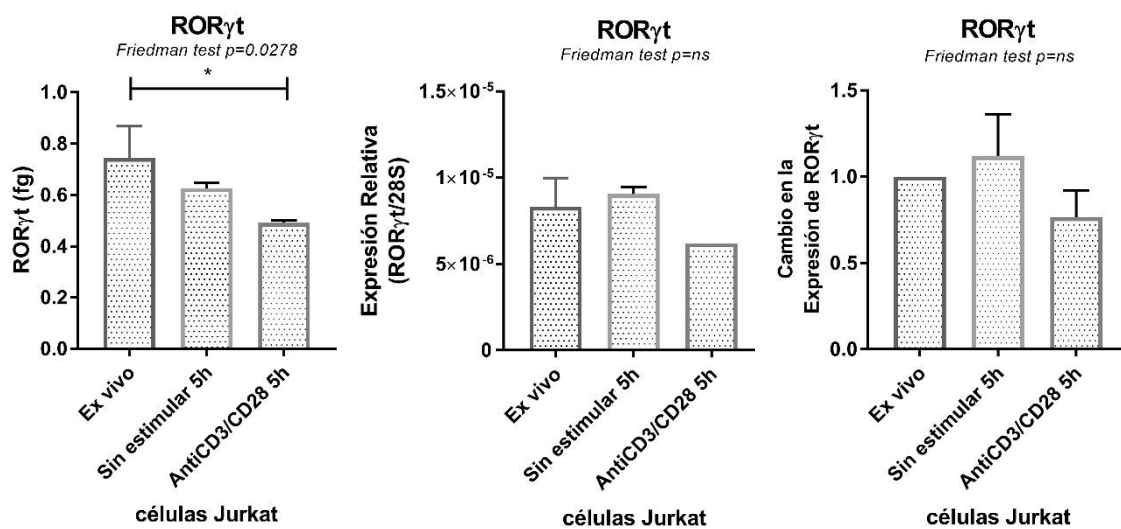


Figura 12. Efecto de la estimulación anti-CD3/CD28 en la expresión de ROR γ t en células Jurkat. Se cuantificó la expresión de ROR γ t mediante RT-PCR. Indicados en los gráficos están los valores P de las pruebas de comparación múltiple de Friedman y Dunn (*, P<0.05; **, P<0.01; ***, P<0.001). El cambio en la expresión fue calculado comparando con la expresión relativa de ROR γ t en las células Jurkat *ex vivo*.

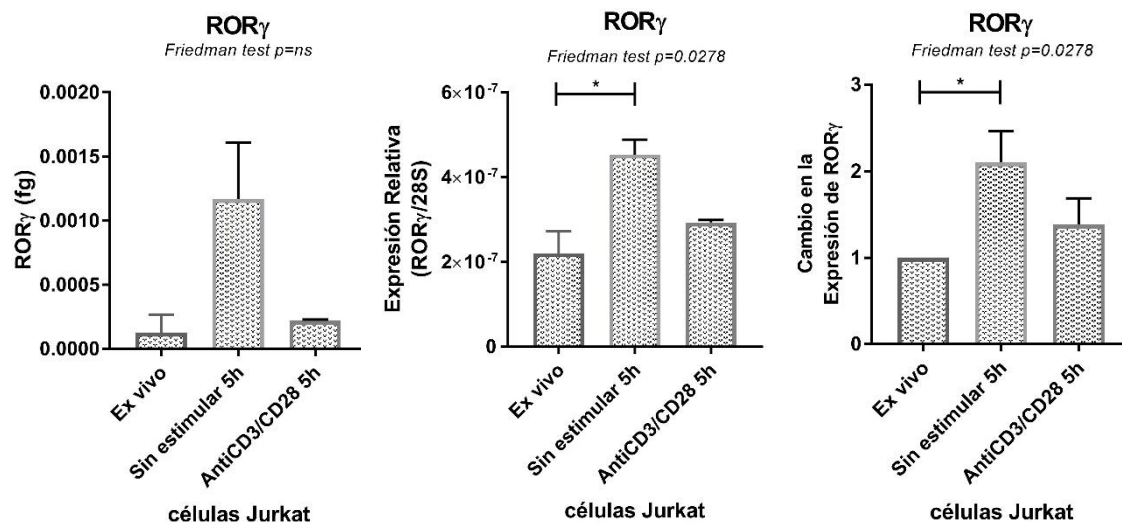


Figura 13. Efecto de la estimulación anti-CD3/CD28 en la expresión de ROR γ en células Jurkat. Se cuantificó la expresión de ROR γ mediante RT-PCR. Indicados en los gráficos están los valores P de las pruebas de comparación múltiple de Friedman y Dunn (*, $P<0.05$; **, $P<0.01$; ***, $P<0.001$). El cambio en la expresión fue calculado comparando con la expresión relativa de ROR γ en las células Jurkat *ex vivo*.

Tanto la expresión de ROR γ t (**Figura 14**) como de ROR γ (**Figura 15**) en las células ACH-2 no mostró cambios luego de la estimulación. Como ya se mencionó, es posible que la expresión de ROR γ t sea inhibida debido a los múltiples sitios únicos de integración del VIH en células ACH-2. De acuerdo con los resultados mostrados en la **Figura 9**, las células ACH-2 no expresan una cantidad significativa de ROR γ t ni de ROR γ , y tampoco está modulada por la estimulación de TCR probada aquí.

Posteriormente, se evaluó el cambio en la expresión de la proteína ROR γ t y la proteína receptora CCR6 en linfocitos T CD4⁺ de memoria. Se realizó un marcaje de superficie y un marcaje intracelular para CCR6 y para ROR γ t, respectivamente. Las células fueron previamente estimuladas durante 24 h con anti-CD3/CD28, PMA/Ionomicina 162 nM, PMA/Ionomicina 25 nM o IL-2. Se analizaron las células mediante citometría de flujo policromática, utilizando los anticuerpos conjugados CD3-Pacific-blue, CCR6-PE y ROR γ t-Alexa-Fluor647.

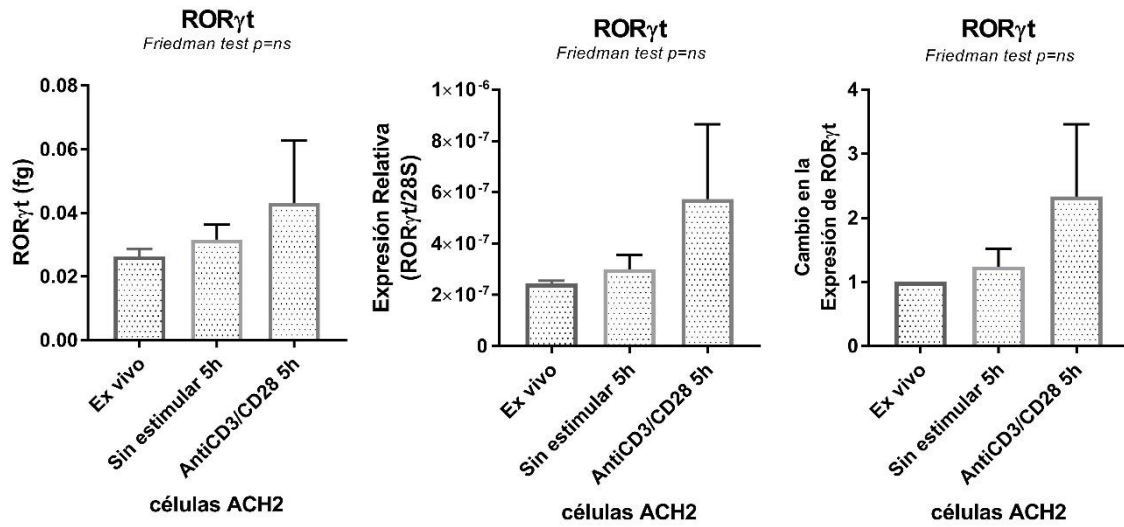


Figura 14. Efecto de la estimulación anti-CD3/CD28 en la expresión de ROR γ t en células ACH-2. Se cuantificó la expresión de ROR γ t mediante RT-PCR. Indicados en los gráficos están los valores P de las pruebas de comparación múltiple de Friedman y Dunn (*, $P<0.05$; **, $P<0.01$; ***, $P<0.001$). El cambio en la expresión fue calculado comparando con la expresión relativa de ROR γ t en las células ACH-2 *ex vivo*.

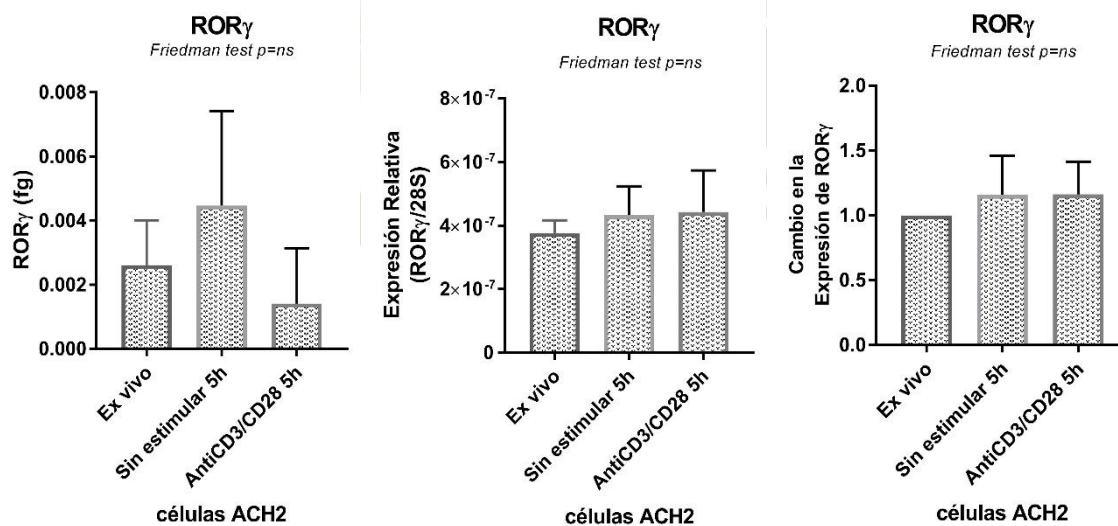


Figura 15. Efecto de la estimulación anti-CD3/CD28 en la expresión de ROR γ en células ACH-2. Se cuantificó la expresión de ROR γ mediante RT-PCR. Indicados en los gráficos están los valores P de las pruebas de comparación múltiple de Friedman y Dunn (*, $P<0.05$; **, $P<0.01$; ***, $P<0.001$). El cambio en la expresión fue calculado comparando con la expresión relativa de ROR γ en las células ACH-2 *ex vivo*.

Los resultados muestran que la expresión de ROR γ t en linfocitos T CD4⁺ aumenta sólo después de la estimulación con anti-CD3/CD28, pero no con PMA/Ionomicina o IL-2 (**Figura 16a y b**). Por el contrario, la expresión de CCR6 no es inducida por anti-CD3/CD28 ni IL-2, sino que disminuye bajo la estimulación de ambas concentraciones de PMA/Ionomicina (**Figura 16a**). CCR6 es un marcador de los linfocitos Th17 humanos ¹⁹². Los linfocitos T CD4⁺ que expresan ROR γ t y CCR6 han sido identificados como las primeras células en ser infectadas durante la transmisión de VIS ³¹. Los linfocitos Th17 CCR6⁺ son altamente permisivos al VIH ^{193,194} y contribuyen a la persistencia del virus durante la TAR ^{37,195}. Por ello la importancia de evaluar también la expresión de CCR6.

La fuerza de la estimulación de los linfocitos T es un factor importante para la diferenciación de Th17. Una estimulación de baja fuerza conduce a un mayor porcentaje de linfocitos T productores de IL-17, en comparación con una estimulación de alta fuerza. Estas células productoras de IL-17 están caracterizadas por la expresión de ROR γ t. Además, ha sido reportado que la estimulación de linfocitos T CD4⁺ con PMA/Ionomicina sin una estimulación previa con anti-CD3/CD28, resulta en un bajo porcentaje de células productoras de IL-17. Purvis et al. (2010) han sugerido que la estimulación de baja fuerza promueve preferentemente la expresión de ROR γ t y la producción de IL-17 en linfocitos T de memoria ¹⁹⁶. Sin embargo, Bouguermouth et al. (2009) reportaron que CD28 no modula la expresión de IL-17 en linfocitos T CD4⁺ de memoria ¹⁹⁷.

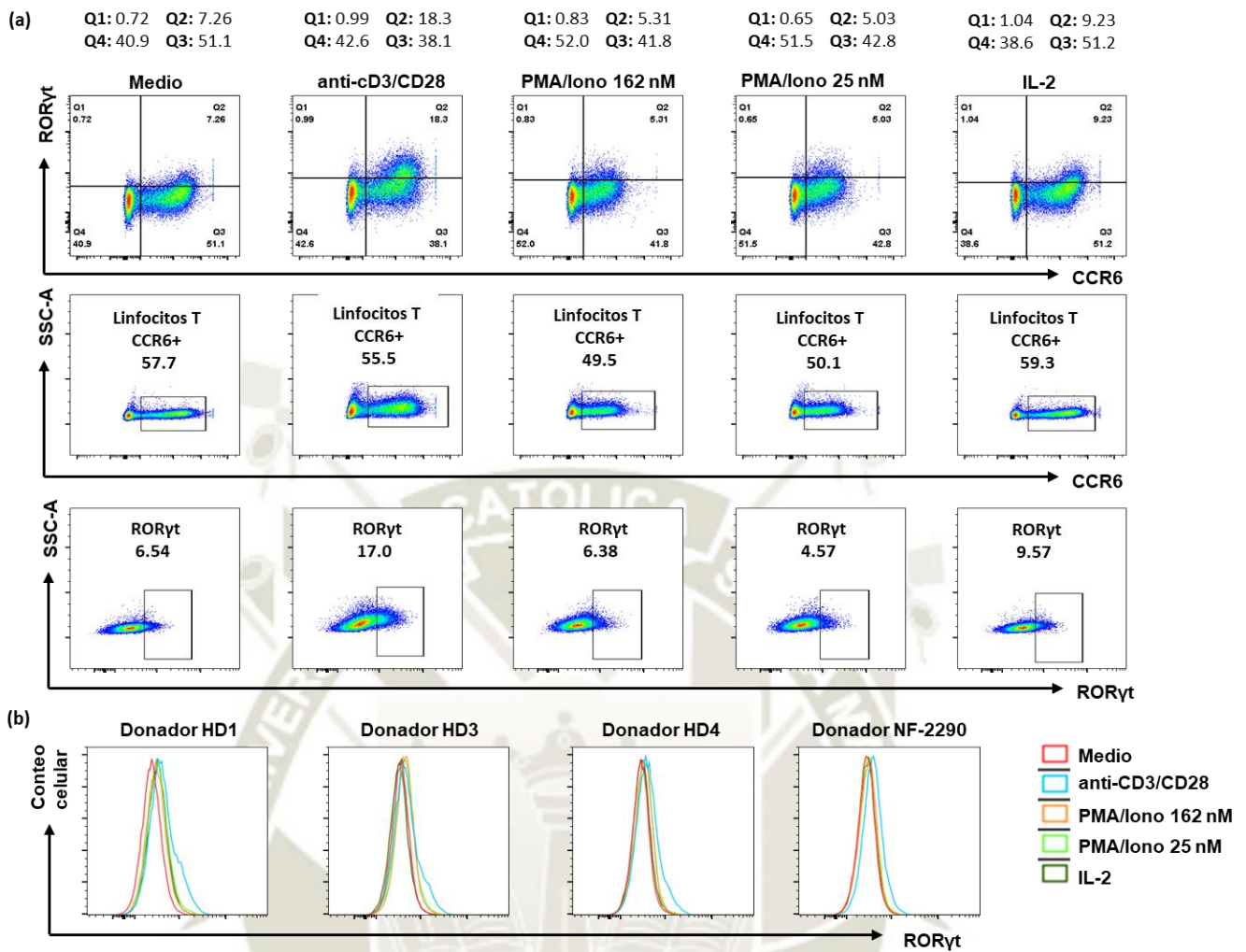


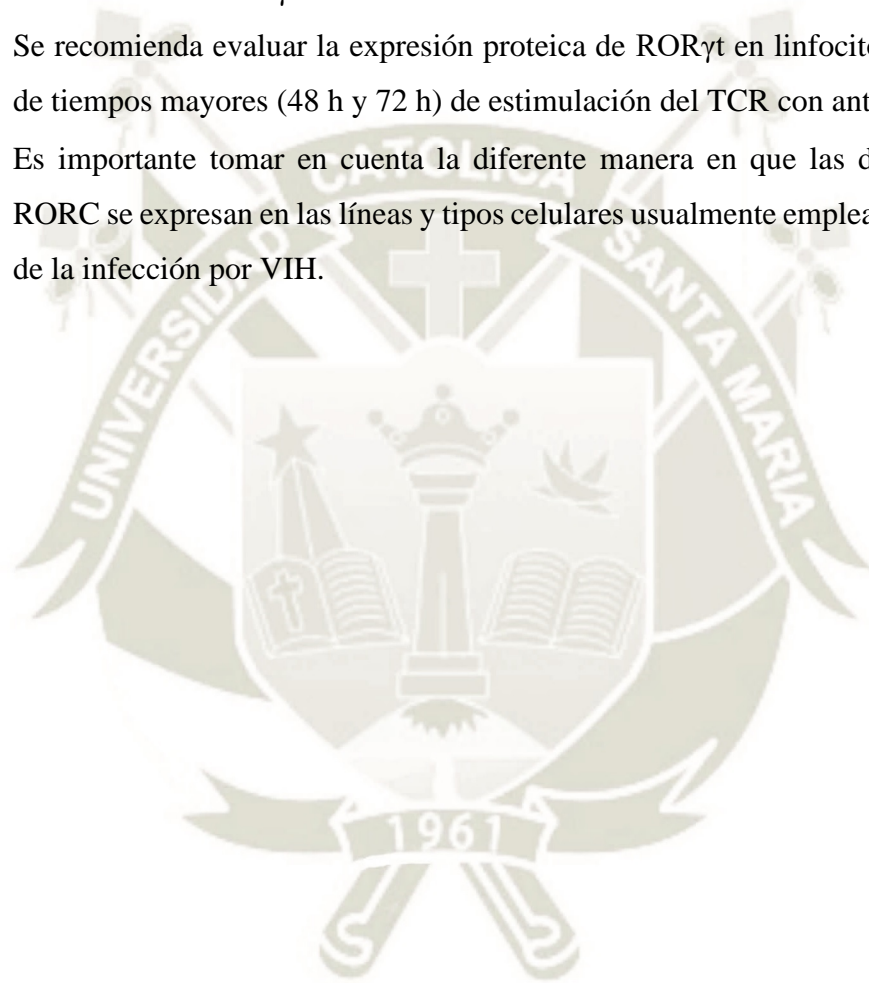
Figura 16. Efecto de diferentes condiciones estimuladoras en la expresión de ROR γ t. Las células se analizaron mediante citometría de flujo policromática. En la figura se muestran los efectos de las condiciones estimuladoras en la expresión de CCR6 (a) y ROR γ t (a y b).

CONCLUSIONES

1. Las isoformas ROR γ t y ROR γ presentan una expresión diferencial en células largamente empleadas en el estudio del VIH. Asimismo, dicha expresión varía bajo diferentes condiciones de estimulación.
2. La técnica RT-PCR es un ensayo cuantitativo apropiado para evaluar la expresión en tiempo real de ROR γ t y ROR γ en linfocitos T CD4⁺ de memoria, células Jurkat, células ACH-2, células TZM-bl, células HT-29, macrófagos y monocitos.
3. Por su parte, ROR γ t es expresado preferentemente en células Jurkat y linfocitos T CD4⁺, mientras que ROR γ es expresado en células TZM-bl y HT-29. El ARNm de ROR γ t es inducible mediante anti-CD3/CD28 en linfocitos T CD4⁺, pero no en células Jurkat ni en células ACH-2. A nivel de proteína, ROR γ t sólo es inducido por anti-CD3/CD28, pero no por PMA/Ionomicina ni IL-2, luego de 24 h de estimulación.
4. La estimulación del TCR con anti-CD3/CD28 es la más apropiada para estudiar la expresión de ROR γ t, tanto a nivel de ARNm como de proteína, en linfocitos T CD4⁺, ya que induce la expresión de esta isoforma. Por el contrario, ninguna de las estimulaciones evaluadas induce la expresión de ROR γ .

RECOMENDACIONES

- Se recomienda continuar con esta línea de investigación ya que ROR γ t es el factor de transcripción maestro de los linfocitos Th17, los cuales juegan un papel crítico en la infección por VIH. ROR γ también necesita ser evaluado, debido a su similitud estructural con ROR γ t.
- Se recomienda evaluar la expresión proteica de ROR γ t en linfocitos T CD4⁺ luego de tiempos mayores (48 h y 72 h) de estimulación del TCR con anti-CD3/CD28.
- Es importante tomar en cuenta la diferente manera en que las dos isoformas de RORC se expresan en las líneas y tipos celulares usualmente empleados en el estudio de la infección por VIH.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 He, Y.-W., Deftos, M. L., Ojala, E. W. & Bevan, M. J. ROR γ t, a novel isoform of an orphan receptor, negatively regulates Fas ligand expression and IL-2 production in T cells. *Immunity* **9**, 797-806, doi:[https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80645-7](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80645-7) (1998).
- 2 Medvedev, A., Chistokhina, A., Hirose, T. & Jetten, A. M. Genomic structure and chromosomal mapping of the nuclear orphan receptor ROR γ (RORC) gene. *Genomics* **46**, 93-102, doi:<https://doi.org/10.1006/geno.1997.4980> (1997).
- 3 Hirose, T., Smith, R. J. & Jetten, A. M. ROR- γ : the third member of ROR/RZR orphan receptor subfamily that is highly expressed in skeletal muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **205**, 1976-1983 (1994).
- 4 Ortiz, M. A., Piedrafita, F. J., Pfahl, M. & Maki, R. TOR: a new orphan receptor expressed in the thymus that can modulate retinoid and thyroid hormone signals. *Molecular Endocrinology* **9**, 1679-1691 (1995).
- 5 Withers, D. R. *et al.* Transient inhibition of ROR- γ t therapeutically limits intestinal inflammation by reducing TH 17 cells and preserving group 3 innate lymphoid cells. *Nature Medicine* **22**, 319 (2016).
- 6 Castro, G. *et al.* ROR γ t and ROR α signature genes in human Th17 cells. *PLoS ONE* **12** (2017).
- 7 Yang, X. O. *et al.* T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR α and ROR γ . *Immunity* **28**, 29-39 (2008).
- 8 Eberl, G. & Littman, D. R. The role of the nuclear hormone receptor ROR γ in the development of lymph nodes and Peyer's patches. *Immunological Reviews* **195**, 81-90, doi:[10.1034/j.1600-065x.2003.00074.x](https://doi.org/10.1034/j.1600-065x.2003.00074.x) (2003).
- 9 Kurebayashi, S. *et al.* Retinoid-related orphan receptor gamma (ROR γ) is essential for lymphoid organogenesis and controls apoptosis during thymopoiesis. *PNAS* **97**, 10132-10137, doi:[10.1073/pnas.97.18.10132](https://doi.org/10.1073/pnas.97.18.10132) (2000).
- 10 Chen, Z., Laurence, A. & O'Shea, J. J. Signal transduction pathways and transcriptional regulation in the control of Th17 differentiation. *Semin Immunol* **19**, 400-408, doi:[10.1016/j.smim.2007.10.015](https://doi.org/10.1016/j.smim.2007.10.015) (2007).

- 11 Harrington, L. E. *et al.* Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature Immunology* **6**, 1123-1132, doi:10.1038/ni1254 (2005).
- 12 Park, H. *et al.* A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nature Immunology* **6**, 1133-1141, doi:10.1038/ni1261 (2005).
- 13 Huber, S., Gagliani, N. & Flavell, R. A. Life, death, and miracles: Th17 cells in the intestine. *European journal of immunology* **42**, 2238-2245, doi:10.1002/eji.201242619 (2012).
- 14 Eberl, G. ROR γ t, a multitask nuclear receptor at mucosal surfaces. *Mucosal Immunology* **10**, 27-34 (2017).
- 15 Weaver, C. T., Elson, C. O., Fouser, L. A. & Kolls, J. K. The Th17 pathway and inflammatory diseases of the intestines, lungs, and skin. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* **8**, 477-512 (2013).
- 16 Rutz, S., Eidenschenk, C., Kiefer, J. R. & Ouyang, W. Post-translational regulation of ROR γ t—A therapeutic target for the modulation of interleukin-17-mediated responses in autoimmune diseases. *Cytokine & Growth Factor Reviews* **30**, 1-17 (2016).
- 17 Ivanov, II *et al.* Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. *Cell Host & Microbe* **4**, 337-349, doi:10.1016/j.chom.2008.09.009 (2008).
- 18 Hernández-Santos, N. *et al.* Th17 cells confer long-term adaptive immunity to oral mucosal *Candida albicans* infections. *Mucosal Immunology* **6**, 900-910, doi:10.1038/mi.2012.128 (2013).
- 19 Chen, K. & Kolls, J. K. T cell-mediated host immune defenses in the lung. *Annual review of immunology* **31**, 605-633, doi:10.1146/annurev-immunol-032712-100019 (2013).
- 20 Hirota, K. *et al.* Plasticity of Th17 cells in Peyer's patches is responsible for the induction of T cell-dependent IgA responses. *Nature Immunology* **14**, 372-379, doi:10.1038/ni.2552 (2013).
- 21 Stockinger, B. & Omenetti, S. The dichotomous nature of T helper 17 cells. *Nature Reviews Immunology* **17**, 535-544, doi:10.1038/nri.2017.50 (2017).

- 22 Hirota, K. *et al.* Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. *Nature Immunology* **12**, 255-263, doi:10.1038/ni.1993 (2011).
- 23 Kolls, J. K., McCray, P. B., Jr. & Chan, Y. R. Cytokine-mediated regulation of antimicrobial proteins. *Nature Reviews Immunology* **8**, 829-835, doi:10.1038/nri2433 (2008).
- 24 Kinugasa, T., Sakaguchi, T., Gu, X. & Reinecker, H. C. Claudins regulate the intestinal barrier in response to immune mediators. *Gastroenterology* **118**, 1001-1011, doi:10.1016/s0016-5085(00)70351-9 (2000).
- 25 Lee, J. S. *et al.* Interleukin-23-independent IL-17 production regulates intestinal epithelial permeability. *Immunity* **43**, 727-738, doi:10.1016/j.immuni.2015.09.003 (2015).
- 26 Conti, H. R. & Gaffen, S. L. IL-17-mediated immunity to the opportunistic fungal pathogen *Candida albicans*. *Journal of immunology* **195**, 780-788, doi:10.4049/jimmunol.1500909 (2015).
- 27 Ancuta, P., Monteiro, P. & Sekaly, R. P. Th17 lineage commitment and HIV-1 pathogenesis. *Current Opinion in HIV and AIDS* **5**, 158-165, doi:10.1097/COH.0b013e3283364733 (2010).
- 28 Sandler, N. G. & Douek, D. C. Microbial translocation in HIV infection: causes, consequences and treatment opportunities. *Nature Reviews Microbiology* **10**, 655-666, doi:10.1038/nrmicro2848 (2012).
- 29 Bixler, S. L. & Mattapallil, J. J. Loss and dysregulation of Th17 cells during HIV infection. *Clinical and Developmental Immunology* **2013**, 852418, doi:10.1155/2013/852418 (2013).
- 30 Brenchley, J. M. *et al.* Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nature Medicine* **12**, 1365-1371, doi:10.1038/nm1511 (2006).
- 31 Stieh, D. J. *et al.* Th17 cells are preferentially infected very early after vaginal transmission of SIV in macaques. *Cell Host & Microbe* **19**, 529-540 (2016).
- 32 Christensen-Quick, A. *et al.* Human Th17 cells lack HIV-inhibitory RNases and are highly permissive to productive HIV infection. *Journal of Virology* **90**, 7833-7847 (2016).

- 33 Alvarez, Y. *et al.* Preferential HIV infection of CCR6+ Th17 cells is associated with higher levels of virus receptor expression and lack of CCR5 ligands. *Journal of Virology* **87**, 10843-10854 (2013).
- 34 El Hed, A. *et al.* Susceptibility of human Th17 cells to human immunodeficiency virus and their perturbation during infection. *The Journal of Infectious Diseases* **201**, 843-854, doi:10.1086/651021 (2010).
- 35 Brenchley, J. M. *et al.* Differential Th17 CD4 T-cell depletion in pathogenic and nonpathogenic lentiviral infections. *Blood* **112**, 2826-2835, doi:10.1182/blood-2008-05-159301 (2008).
- 36 Prendergast, A. *et al.* HIV-1 infection is characterized by profound depletion of CD161+ Th17 cells and gradual decline in regulatory T cells. *AIDS* **24**, 491-502, doi:10.1097/QAD.0b013e3283344895 (2010).
- 37 Wacleche, V. S. *et al.* New insights into the heterogeneity of Th17 subsets contributing to HIV-1 persistence during antiretroviral therapy. *Retrovirology* **13**, 59, doi:10.1186/s12977-016-0293-6 (2016).
- 38 Sun, H. *et al.* Th1/17 polarization of CD4 T cells supports HIV-1 persistence during antiretroviral therapy. *Journal of Virology* **89**, 11284-11293, doi:10.1128/jvi.01595-15 (2015).
- 39 Wacleche, V. S., Landay, A., Routy, J. P. & Ancuta, P. The Th17 lineage: from barrier surfaces homeostasis to autoimmunity, cancer, and HIV-1 pathogenesis. *Viruses* **9**, doi:10.3390/v9100303 (2017).
- 40 Khoury, G. *et al.* Persistence of integrated HIV DNA in CXCR3+ CCR6+ memory CD4+ T-cells in HIV-infected individuals on antiretroviral therapy. *AIDS* **30**, 1511 (2016).
- 41 Elhed, A. & Unutmaz, D. Th17 cells and HIV infection. *Current opinion in HIV and AIDS* **5**, 146-150, doi:10.1097/COH.0b013e32833647a8 (2010).
- 42 Progress report on HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections 2019: accountability for the global health sector strategies, 2016–2021. (World Health Organization, Geneva, 2019 (WHO/CDS/HIV/19.7). Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.).
- 43 Web Annex 1. Key data at a glance. In: Progress report on HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections 2019. Accountability for the global health sector

- strategies, 2016–2021., (World Health Organization, 2019 (WHO/CDS/HIV/19.22).
Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.).
- 44 Montessori, V., Press, N., Harris, M., Akagi, L. & Montaner, J. S. G. Adverse effects of antiretroviral therapy for HIV infection. *Canadian Medical Association Journal* **170**, 229-238 (2004).
- 45 Ivanov, I. I. *et al.* The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* **126**, 1121-1133, doi:<https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.035> (2006).
- 46 Eberl, G. *et al.* An essential function for the nuclear receptor ROR γ (t) in the generation of fetal lymphoid tissue inducer cells. *Nature Immunology* **5**, 64-73, doi:[10.1038/ni1022](https://doi.org/10.1038/ni1022) (2004).
- 47 Sun, Z. *et al.* Requirement for ROR γ in thymocyte survival and lymphoid organ development. *Science* **288**, 2369-2373, doi:[10.1126/science.288.5475.2369](https://doi.org/10.1126/science.288.5475.2369) (2000).
- 48 Slominski, A. T. *et al.* ROR α and ROR γ are expressed in human skin and serve as receptors for endogenously produced noncalcemic 20-hydroxy- and 20, 23-dihydroxyvitamin D. *The FASEB Journal* **28**, 2775-2789 (2014).
- 49 Ruan, Q. *et al.* The Th17 immune response is controlled by the Rel–ROR γ –ROR γ T transcriptional axis. *Journal of Experimental Medicine* **208**, 2321-2333 (2011).
- 50 Takeda, Y. *et al.* Retinoic acid-related orphan receptor γ (ROR γ): a novel participant in the diurnal regulation of hepatic gluconeogenesis and insulin sensitivity. *PLoS genetics* **10**, e1004331, doi:[10.1371/journal.pgen.1004331](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004331) (2014).
- 51 Cai, D. *et al.* ROR γ is a targetable master regulator of cholesterol biosynthesis in a cancer subtype. *Nature communications* **10**, 4621, doi:[10.1038/s41467-019-12529-3](https://doi.org/10.1038/s41467-019-12529-3) (2019).
- 52 Kim, S. M. *et al.* RAR-related orphan receptor gamma (ROR- γ) mediates epithelial-mesenchymal transition of hepatocytes during hepatic fibrosis. *Journal of cellular biochemistry* **118**, 2026-2036, doi:[10.1002/jcb.25776](https://doi.org/10.1002/jcb.25776) (2017).
- 53 Acosta-Rodriguez, E. V., Napolitani, G., Lanzavecchia, A. & Sallusto, F. Interleukins 1 β and 6 but not transforming growth factor- β are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nature Immunology* **8**, 942-949, doi:[10.1038/ni1496](https://doi.org/10.1038/ni1496) (2007).

- 54 Wilson, N. J. *et al.* Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nature Immunology* **8**, 950-957, doi:10.1038/ni1497 (2007).
- 55 Planas, D., Routy, J.-P. & Ancuta, P. New Th17-specific therapeutic strategies for HIV remission. *Current Opinion in HIV and AIDS* **14**, 85-92 (2019).
- 56 Ciofani, M. *et al.* A validated regulatory network for Th17 cell specification. *Cell* **151**, 289-303, doi:10.1016/j.cell.2012.09.016 (2012).
- 57 Omenetti, S. *et al.* The intestine harbors functionally distinct homeostatic tissue-resident and inflammatory Th17 cells. *Immunity* **51**, 77-89. e76 (2019).
- 58 Gagliani, N. *et al.* Th17 cells transdifferentiate into regulatory T cells during resolution of inflammation. *Nature* **523**, 221-225, doi:10.1038/nature14452 (2015).
- 59 Yao, Z. *et al.* Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. *Immunity* **3**, 811-821, doi:10.1016/1074-7613(95)90070-5 (1995).
- 60 Yao, Z. *et al.* Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. *Journal of immunology* **155**, 5483-5486 (1995).
- 61 Fossiez, F. *et al.* T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *The Journal of experimental medicine* **183**, 2593-2603, doi:10.1084/jem.183.6.2593 (1996).
- 62 Ryzhakov, G. *et al.* IL-17 boosts proinflammatory outcome of antiviral response in human cells. *The Journal of Immunology* **187**, 5357-5362 (2011).
- 63 Tesmer, L. A., Lundy, S. K., Sarkar, S. & Fox, D. A. Th17 cells in human disease. *Immunological Reviews* **223**, 87-113, doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00628.x (2008).
- 64 Anipindi, V. C. *et al.* Estradiol enhances CD4+ T-cell anti-viral immunity by priming vaginal DCs to induce Th17 responses via an IL-1-dependent pathway. *PLoS Pathogens* **12** (2016).
- 65 Ouyang, W., Kolls, J. K. & Zheng, Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity* **28**, 454-467, doi:10.1016/j.immuni.2008.03.004 (2008).
- 66 Liang, S. C. *et al.* An IL-17F/A heterodimer protein is produced by mouse Th17 cells and induces airway neutrophil recruitment. *Journal of immunology* **179**, 7791-7799, doi:10.4049/jimmunol.179.11.7791 (2007).

- 67 Jones, C. E. & Chan, K. Interleukin-17 stimulates the expression of interleukin-8, growth-related oncogene-alpha, and granulocyte-colony-stimulating factor by human airway epithelial cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **26**, 748-753, doi:10.1165/ajrcmb.26.6.4757 (2002).
- 68 Laan, M., Lötvall, J., Chung, K. F. & Lindén, A. IL-17-induced cytokine release in human bronchial epithelial cells in vitro: role of mitogen-activated protein (MAP) kinases. *British journal of pharmacology* **133**, 200-206, doi:10.1038/sj.bjp.0704063 (2001).
- 69 Prause, O., Laan, M., Lötvall, J. & Lindén, A. Pharmacological modulation of interleukin-17-induced GCP-2-, GRO-alpha- and interleukin-8 release in human bronchial epithelial cells. *European journal of pharmacology* **462**, 193-198, doi:10.1016/s0014-2999(03)01341-4 (2003).
- 70 Tan, W. *et al.* IL-17F/IL-17R interaction stimulates granulopoiesis in mice. *Experimental hematology* **36**, 1417-1427, doi:10.1016/j.exphem.2008.06.003 (2008).
- 71 Barré-Sinoussi, F. *et al.* Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 868-871, doi:10.1126/science.6189183 (1983).
- 72 Gallo, R. C. *et al.* Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* **224**, 500-503, doi:10.1126/science.6200936 (1984).
- 73 Levy, J. A. *et al.* Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science* **225**, 840-842, doi:10.1126/science.6206563 (1984).
- 74 Rabson, A. B. & Martin, M. A. Molecular organization of the AIDS retrovirus. *Cell* **40**, 477-480, doi:10.1016/0092-8674(85)90189-8 (1985).
- 75 Fauci, A. S. The human immunodeficiency virus: infectivity and mechanisms of pathogenesis. *Science* **239**, 617-622, doi:10.1126/science.3277274 (1988).
- 76 World health statistics 2019: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. (World Health Organization, Geneva, 2019. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO).
- 77 Moir, S., Chun, T. W. & Fauci, A. S. Pathogenic mechanisms of HIV disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* **6**, 223-248, doi:10.1146/annurev-pathol-011110-130254 (2011).

- 78 Levy, J. A. Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiological reviews* **57**, 183-289 (1993).
- 79 Quinn, T. C. *et al.* Viral load and heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. Rakai Project Study Group. *N Engl J Med* **342**, 921-929, doi:10.1056/NEJM200003303421303 (2000).
- 80 Maartens, G., Celum, C. & Lewin, S. R. HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. *The Lancet* **384**, 258-271 (2014).
- 81 Cavrois, M. *et al.* Mass cytometric analysis of HIV entry, replication, and remodeling in tissue CD4⁺ T cells. *Cell reports* **20**, 984-998, doi:10.1016/j.celrep.2017.06.087 (2017).
- 82 Lutgen, V. *et al.* HIV infects astrocytes in vivo and egresses from the brain to the periphery. *PLoS Pathogens* **16**, e1008381, doi:10.1371/journal.ppat.1008381 (2020).
- 83 Hoffman, T. L. *et al.* Stable exposure of the coreceptor-binding site in a CD4-independent HIV-1 envelope protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**, 6359-6364 (1999).
- 84 Kolchinsky, P., Kiprilov, E. & Sodroski, J. Increased neutralization sensitivity of CD4-independent human immunodeficiency virus variants. *Journal of Virology* **75**, 2041-2050 (2001).
- 85 Trautmann, L. *et al.* Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8⁺ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nature Medicine* **12**, 1198-1202 (2006).
- 86 Lackner, A. A., Lederman, M. M. & Rodriguez, B. HIV pathogenesis: the host. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**, a007005-a007005, doi:10.1101/cshperspect.a007005 (2012).
- 87 Barré-Sinoussi, F., Ross, A. L. & Delfraissy, J. F. Past, present and future: 30 years of HIV research. *Nature Reviews Microbiology* **11**, 877-883, doi:10.1038/nrmicro3132 (2013).
- 88 Gottlieb, M. S. *et al.* Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *New England Journal of Medicine* **305**, 1425-1431 (1981).
- 89 Vanhems, P. *et al.* Comprehensive classification of symptoms and signs reported among 218 patients with acute HIV-1 infection. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* **21**, 99-106 (1999).

- 90 Perlmutter, B. L., Glaser, J. B. & Oyugi, S. O. How to recognize and treat acute HIV syndrome. *American family physician* **60**, 535-542, 545-536 (1999).
- 91 Hecht, F. M. *et al.* Use of laboratory tests and clinical symptoms for identification of primary HIV infection. *AIDS* **16**, 1119-1129, doi:10.1097/00002030-200205240-00005 (2002).
- 92 Daar, E. S., Pilcher, C. D. & Hecht, F. M. Clinical presentation and diagnosis of primary HIV-1 infection. *Current Opinion in HIV and AIDS* **3**, 10-15, doi:10.1097/COH.0b013e3282f2e295 (2008).
- 93 Zulfiqar, H. F. *et al.* HIV diagnosis and treatment through advanced technologies. *Front Public Health* **5**, 32-32, doi:10.3389/fpubh.2017.00032 (2017).
- 94 Burchard, P. R., Abou Tayoun, A. N., Scherer, A. & Tsongalis, G. J. A rapid RT-PCR assay for the detection of HIV-1 in human plasma specimens. *Experimental and molecular pathology* **97**, 111-115, doi:10.1016/j.yexmp.2014.06.005 (2014).
- 95 Gosselin, A. *et al.* Peripheral blood CCR4+CCR6+ and CXCR3+CCR6+CD4+ T cells are highly permissive to HIV-1 infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **184**, 1604-1616, doi:10.4049/jimmunol.0903058 (2010).
- 96 DaFonseca, S. *et al.* Impaired Th17 polarization of phenotypically naive CD4(+) T-cells during chronic HIV-1 infection and potential restoration with early ART. *Retrovirology* **12**, 38, doi:10.1186/s12977-015-0164-6 (2015).
- 97 Deeks, S. G. *et al.* International AIDS Society global scientific strategy: towards an HIV cure 2016. *Nature Medicine* **22**, 839 (2016).
- 98 Chun, T. W., Davey, R. T., Jr., Engel, D., Lane, H. C. & Fauci, A. S. Re-emergence of HIV after stopping therapy. *Nature* **401**, 874-875, doi:10.1038/44755 (1999).
- 99 Gianella, S. *et al.* HIV RNA rebound in seminal plasma after antiretroviral treatment interruption. *Journal of Virology*, doi:10.1128/jvi.00415-20 (2020).
- 100 Chun, T. W. *et al.* Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *PNAS* **94**, 13193-13197, doi:10.1073/pnas.94.24.13193 (1997).
- 101 Siliciano, J. D. *et al.* Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. *Nature Medicine* **9**, 727-728, doi:10.1038/nm880 (2003).

- 102 Calvanese, V., Chavez, L., Laurent, T., Ding, S. & Verdin, E. Dual-color HIV reporters trace a population of latently infected cells and enable their purification. *Virology* **446**, 283-292, doi:10.1016/j.virol.2013.07.037 (2013).
- 103 Chavez, L., Calvanese, V. & Verdin, E. HIV latency is established directly and early in both resting and activated primary CD4 T cells. *PLoS Pathogens* **11**, e1004955, doi:10.1371/journal.ppat.1004955 (2015).
- 104 Soriano-Sarabia, N. *et al.* Quantitation of replication-competent HIV-1 in populations of resting CD4+ T cells. *Journal of Virology* **88**, 14070-14077, doi:10.1128/jvi.01900-14 (2014).
- 105 Mullegama, S. V. *et al.* Nucleic Acid Extraction from Human Biological Samples. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **1897**, 359-383, doi:10.1007/978-1-4939-8935-5_30 (2019).
- 106 Cady, N. C., Stelick, S. & Batt, C. A. Nucleic acid purification using microfabricated silicon structures. *Biosensors & bioelectronics* **19**, 59-66, doi:10.1016/s0956-5663(03)00123-4 (2003).
- 107 Tan, S. C. & Yiap, B. C. DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. *Journal of biomedicine & biotechnology* **2009**, 574398, doi:10.1155/2009/574398 (2009).
- 108 Price, C. W., Leslie, D. C. & Landers, J. P. Nucleic acid extraction techniques and application to the microchip. *Lab on a chip* **9**, 2484-2494, doi:10.1039/b907652m (2009).
- 109 Bustin, S. A., Benes, V., Nolan, T. & Pfaffl, M. W. Quantitative real-time RT-PCR—a perspective. *Journal of molecular endocrinology* **34**, 597-601, doi:10.1677/jme.1.01755 (2005).
- 110 Bachman, J. Reverse-transcription PCR (RT-PCR). *Methods in enzymology* **530**, 67-74, doi:10.1016/b978-0-12-420037-1.00002-6 (2013).
- 111 Wang, Y. *et al.* Large scale real-time PCR validation on gene expression measurements from two commercial long-oligonucleotide microarrays. *BMC genomics* **7**, 59, doi:10.1186/1471-2164-7-59 (2006).
- 112 Nolan, T., Hands, R. E. & Bustin, S. A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature protocols* **1**, 1559-1582, doi:10.1038/nprot.2006.236 (2006).

- 113 Etienne, L. *et al.* Single real-time reverse transcription-PCR assay for detection and quantification of genetically diverse HIV-1, SIVcpz, and SIVgor strains. *Journal of clinical microbiology* **51**, 787-798, doi:10.1128/jcm.02792-12 (2013).
- 114 Orton, R. J. *et al.* Distinguishing low frequency mutations from RT-PCR and sequence errors in viral deep sequencing data. *BMC genomics* **16**, 229, doi:10.1186/s12864-015-1456-x (2015).
- 115 Deepak, S. *et al.* Real-Time PCR: Revolutionizing Detection and Expression Analysis of Genes. *Current genomics* **8**, 234-251, doi:10.2174/138920207781386960 (2007).
- 116 Bustin, S. A. & Mueller, R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clinical science (London, England : 1979)* **109**, 365-379, doi:10.1042/cs20050086 (2005).
- 117 Haddar, C., Verhoeven, P. O., Bourlet, T., Pozzetto, B. & Pillet, S. Brief comparative evaluation of six open one-step RT-qPCR mastermixes for the detection of SARS-CoV-2 RNA using a Taqman probe. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* **132**, 104636, doi:10.1016/j.jcv.2020.104636 (2020).
- 118 Kim, Y. G. *et al.* Comparison between Saliva and Nasopharyngeal Swab Specimens for Detection of Respiratory Viruses by Multiplex Reverse Transcription-PCR. *Journal of clinical microbiology* **55**, 226-233, doi:10.1128/jcm.01704-16 (2017).
- 119 Green, M. R. & Sambrook, J. Quantification of RNA by Real-Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). *Cold Spring Harbor protocols* **2018**, doi:10.1101/pdb.prot095042 (2018).
- 120 Green, M. R. & Sambrook, J. Analysis of DNA by Agarose Gel Electrophoresis. *Cold Spring Harbor protocols* **2019**, doi:10.1101/pdb.top100388 (2019).
- 121 Koontz, L. Agarose gel electrophoresis. *Methods in enzymology* **529**, 35-45, doi:10.1016/b978-0-12-418687-3.00004-5 (2013).
- 122 Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y. & Kim, Y. H. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of visualized experiments : JoVE*, doi:10.3791/3923 (2012).
- 123 Green, M. R. & Sambrook, J. Agarose Gel Electrophoresis. *Cold Spring Harbor protocols* **2019**, doi:10.1101/pdb.prot100404 (2019).

- 124 Aoki, S., Takezawa, T., Sugihara, H. & Toda, S. Progress in cell culture systems for pathological research. *Pathology international* **66**, 554-562, doi:10.1111/pin.12443 (2016).
- 125 Philippeos, C., Hughes, R. D., Dhawan, A. & Mitry, R. R. Introduction to cell culture. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **806**, 1-13, doi:10.1007/978-1-61779-367-7_1 (2012).
- 126 Baust, J. M. *et al.* Best practices in cell culture: an overview. *In vitro cellular & developmental biology. Animal* **53**, 669-672, doi:10.1007/s11626-017-0177-7 (2017).
- 127 Grievink, H. W., Luisman, T., Kluft, C., Moerland, M. & Malone, K. E. Comparison of Three Isolation Techniques for Human Peripheral Blood Mononuclear Cells: Cell Recovery and Viability, Population Composition, and Cell Functionality. *Biopreservation and biobanking* **14**, 410-415, doi:10.1089/bio.2015.0104 (2016).
- 128 Korkusuz, P., Köse, S., Yersal, N. & Önen, S. Magnetic-Based Cell Isolation Technique for the Selection of Stem Cells. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **1879**, 153-163, doi:10.1007/7651_2018_151 (2019).
- 129 Trickett, A. & Kwan, Y. L. T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads. *Journal of immunological methods* **275**, 251-255, doi:10.1016/s0022-1759(03)00010-3 (2003).
- 130 Raulf-Heimsoth, M. T cell - primary culture from peripheral blood. *Methods in molecular medicine* **138**, 17-30, doi:10.1007/978-1-59745-366-0_2 (2008).
- 131 Maciorowski, Z., Chattopadhyay, P. K. & Jain, P. Basic Multicolor Flow Cytometry. *Current protocols in immunology* **117**, 5.4.1-5.4.38, doi:10.1002/cpim.26 (2017).
- 132 Telford, W. G. Overview of Lasers for Flow Cytometry. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **1678**, 447-479, doi:10.1007/978-1-4939-7346-0_19 (2018).
- 133 McKinnon, K. M. Flow Cytometry: An Overview. *Current protocols in immunology* **120**, 5.1.1-5.1.11, doi:10.1002/cpim.40 (2018).
- 134 Givan, A. L. Flow cytometry: an introduction. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **699**, 1-29, doi:10.1007/978-1-61737-950-5_1 (2011).
- 135 Robinson, J. P. Overview of Flow Cytometry and Microbiology. *Current protocols in cytometry* **84**, e37, doi:10.1002/cpcy.37 (2018).

- 136 Abraham, R. T. & Weiss, A. Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm. *Nature Reviews Immunology* **4**, 301-308, doi:10.1038/nri1330 (2004).
- 137 Campestrini, J., Silveira, D. B. & Pinto, A. R. HIV-1 Tat-induced bystander apoptosis in Jurkat cells involves unfolded protein responses. *Cell Biochemistry Function* **36**, 377-386, doi:10.1002/cbf.3357 (2018).
- 138 Hain, A. *et al.* IL-2 inducible kinase ITK is critical for HIV-1 infection of Jurkat T-cells. *International Journal of Scientific Reports* **8**, 3217, doi:10.1038/s41598-018-21344-7 (2018).
- 139 Alkhatib, G. *et al.* CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* **272**, 1955-1958, doi:10.1126/science.272.5270.1955 (1996).
- 140 Martínez-Muñoz, L. *et al.* CCR5/CD4/CXCR4 oligomerization prevents HIV-1 gp120IIIB binding to the cell surface. *PNAS* **111**, E1960-1969, doi:10.1073/pnas.1322887111 (2014).
- 141 Ren, X. X. *et al.* Dendritic cells matured by co-culturing with HIV-1 latently infected Jurkat T cells or stimulating with AIDS-associated pathogens secrete TNF- α to reactivate HIV-1 from latency. *Virulence* **8**, 1732-1743, doi:10.1080/21505594.2017.1356535 (2017).
- 142 Das, B. *et al.* Estrogen receptor-1 is a key regulator of HIV-1 latency that imparts gender-specific restrictions on the latent reservoir. *PNAS* **115**, E7795-e7804, doi:10.1073/pnas.1803468115 (2018).
- 143 Gagne, M. *et al.* Strength of T cell signaling regulates HIV-1 replication and establishment of latency. *PLoS Pathogens* **15**, e1007802, doi:10.1371/journal.ppat.1007802 (2019).
- 144 Koka, P. *et al.* Increased expression of CD4 molecules on Jurkat cells mediated by human immunodeficiency virus tat protein. *Journal of Virology* **62**, 4353-4357 (1988).
- 145 Qi, C., Jia, X., Lu, L., Ma, P. & Wei, M. HEK293T cells are heterozygous for CCR5 delta 32 mutation. *PLoS ONE* **11**, e0152975, doi:10.1371/journal.pone.0152975 (2016).
- 146 Hou, P. *et al.* Genome editing of CXCR4 by CRISPR/cas9 confers cells resistant to HIV-1 infection. *Scientific Reports* **5**, 15577, doi:10.1038/srep15577 (2015).

- 147 Kim, J. H. *et al.* Consequences of human immunodeficiency virus type 1 superinfection of chronically infected cells. *AIDS Res Hum Retroviruses* **9**, 875-882, doi:10.1089/aid.1993.9.875 (1993).
- 148 Symons, J. *et al.* HIV integration sites in latently infected cell lines: evidence of ongoing replication. *Retrovirology* **14**, 2, doi:10.1186/s12977-016-0325-2 (2017).
- 149 Ao, Z. *et al.* Activation of HIV-1 expression in latently infected CD4+ T cells by the small molecule PKC412. *Virology Journal* **13**, 177, doi:10.1186/s12985-016-0637-9 (2016).
- 150 Platt, E. J., Wehrly, K., Kuhmann, S. E., Chesebro, B. & Kabat, D. Effects of CCR5 and CD4 cell surface concentrations on infections by macrophagetropic isolates of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Virology* **72**, 2855-2864 (1998).
- 151 Platt, E. J., Biliska, M., Kozak, S. L., Kabat, D. & Montefiori, D. C. Evidence that ecotropic murine leukemia virus contamination in TZM-bl cells does not affect the outcome of neutralizing antibody assays with human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Virology* **83**, 8289-8292, doi:10.1128/jvi.00709-09 (2009).
- 152 Fogh, J. & Trempe, G. in *Human Tumor Cells In Vitro* 115-159 (Springer, 1975).
- 153 Martínez-Maqueda, D., Miralles, B. & Recio, I. in *The impact of food bioactives on health* 113-124 (Springer, Cham, 2015).
- 154 Al-Ghadban, S., Kaissi, S., Homaidan, F. R., Naim, H. Y. & El-Sabban, M. E. Cross-talk between intestinal epithelial cells and immune cells in inflammatory bowel disease. *Scientific Reports* **6**, 1-13 (2016).
- 155 Arboleya, S. *et al.* Production of immune response mediators by HT-29 intestinal cell-lines in the presence of Bifidobacterium-treated infant microbiota. *Beneficial Microbes* **6**, 543-552 (2015).
- 156 MacLeod, M. K. L., Clambey, E. T., Kappler, J. W. & Marrack, P. CD4 memory T cells: what are they and what can they do? *Semin Immunol* **21**, 53-61, doi:10.1016/j.smim.2009.02.006 (2009).
- 157 Gasper, D. J., Tejera, M. M. & Suresh, M. CD4 T-cell memory generation and maintenance. *Crit Rev Immunol* **34**, 121-146, doi:10.1615/critrevimmunol.2014010373 (2014).
- 158 O'Garra, A. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity* **8**, 275-283, doi:10.1016/s1074-7613(00)80533-6 (1998).

- 159 Murphy, K. M. *et al.* Signaling and transcription in T helper development. *Annual review of immunology* **18**, 451-494, doi:10.1146/annurev.immunol.18.1.451 (2000).
- 160 Agarwal, S. & Rao, A. Modulation of chromatin structure regulates cytokine gene expression during T cell differentiation. *Immunity* **9**, 765-775, doi:10.1016/s1074-7613(00)80642-1 (1998).
- 161 Mahnke, Y. D., Brodie, T. M., Sallusto, F., Roederer, M. & Lugli, E. The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets. *European journal of immunology* **43**, 2797-2809, doi:10.1002/eji.201343751 (2013).
- 162 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, doi:10.1038/44385 (1999).
- 163 Campbell, J. J. *et al.* CCR7 expression and memory T cell diversity in humans. *Journal of immunology* **166**, 877-884, doi:10.4049/jimmunol.166.2.877 (2001).
- 164 Sallusto, F., Geginat, J. & Lanzavecchia, A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annual review of immunology* **22**, 745-763, doi:10.1146/annurev.immunol.22.012703.104702 (2004).
- 165 Sallusto, F., Lanzavecchia, A. & Mackay, C. R. Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunology today* **19**, 568-574, doi:10.1016/s0167-5699(98)01346-2 (1998).
- 166 Tao, X. & Xu, A. in *Amphioxus immunity* (ed Anlong Xu) 15-42 (Academic Press, 2016).
- 167 Cole, J., Aberdein, J., Jubrail, J. & Dockrell, D. H. in *Advances in Microbial Physiology* Vol. 65 (ed Robert K. Poole) 125-202 (Academic Press, 2014).
- 168 Fujiwara, N. & Kobayashi, K. Macrophages in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* **4**, 281-286, doi:10.2174/1568010054022024 (2005).
- 169 Gordon, S. & Martinez-Pomares, L. Physiological roles of macrophages. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* **469**, 365-374, doi:10.1007/s00424-017-1945-7 (2017).
- 170 Ginhoux, F. & Guilliams, M. Tissue-resident macrophage ontogeny and homeostasis. *Immunity* **44**, 439-449, doi:10.1016/j.immuni.2016.02.024 (2016).
- 171 Varol, C., Mildner, A. & Jung, S. Macrophages: development and tissue specialization. *Annual review of immunology* **33**, 643-675, doi:10.1146/annurev-immunol-032414-112220 (2015).

- 172 Campbell, J. H., Hearps, A. C., Martin, G. E., Williams, K. C. & Crowe, S. M. The importance of monocytes and macrophages in HIV pathogenesis, treatment, and cure. *AIDS* **28**, 2175-2187, doi:10.1097/qad.0000000000000408 (2014).
- 173 Yang, J., Zhang, L., Yu, C., Yang, X.-F. & Wang, H. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomarker Research* **2**, 1 (2014).
- 174 Yona, S. & Jung, S. Monocytes: subsets, origins, fates and functions. *Curr Opin Hematol* **17**, 53-59, doi:10.1097/MOH.0b013e3283324f80 (2010).
- 175 Yona, S. & Jung, S. Monocytes: subsets, origins, fates and functions. *Curr Opin Hematol* **17**, 53-59, doi:10.1097/MOH.0b013e3283324f80 (2010).
- 176 Ratajewski, M., Walczak-Drzewiecka, A., Salkowska, A. & Dastych, J. Upstream stimulating factors regulate the expression of ROR γ T in human lymphocytes. *Journal of immunology* **189**, 3034-3042, doi:10.4049/jimmunol.1200519 (2012).
- 177 Luci, C. *et al.* Influence of the transcription factor ROR γ T on the development of NKp46+ cell populations in gut and skin. *Nature Immunology* **10**, 75-82 (2009).
- 178 Overbergh, L. *et al.* The use of real-time reverse transcriptase PCR for the quantification of cytokine gene expression. *Journal of Biomolecular Techniques* **14**, 33 (2003).
- 179 Van der Auwera, I. *et al.* Increased angiogenesis and lymphangiogenesis in inflammatory versus noninflammatory breast cancer by real-time reverse transcriptase-PCR gene expression quantification. *Clinical Cancer Research* **10**, 7965-7971 (2004).
- 180 Lin, Q. & Di, Y. P. in *Molecular Toxicology Protocols* 177-193 (Springer, 2020).
- 181 Cleret-Buhot, A. *et al.* Identification of novel HIV-1 dependency factors in primary CCR4(+)CCR6(+)Th17 cells via a genome-wide transcriptional approach. *Retrovirology* **12**, 102, doi:10.1186/s12977-015-0226-9 (2015).
- 182 Li, W. *et al.* Arctigenin suppress Th17 cells and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis through AMPK and PPAR- γ /ROR- γ T signaling. *Molecular neurobiology* **53**, 5356-5366, doi:10.1007/s12035-015-9462-1 (2016).
- 183 Manel, N., Unutmaz, D. & Littman, D. R. The differentiation of human TH-17 cells requires transforming growth factor- β and induction of the nuclear receptor ROR γ T. *Nature Immunology* **9**, 641-649, doi:10.1038/ni.1610 (2008).

- 184 Vázquez-Blomquist, D. *et al.* Selection of reference genes for use in quantitative reverse transcription PCR assays when using interferons in U87MG. *Molecular biology reports* **39**, 11167-11175, doi:10.1007/s11033-012-2026-9 (2012).
- 185 Mahoney, D. J. *et al.* Real-time RT-PCR analysis of housekeeping genes in human skeletal muscle following acute exercise. *Physiological genomics* **18**, 226-231, doi:10.1152/physiolgenomics.00067.2004 (2004).
- 186 Feske, S. Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nature Reviews Immunology* **7**, 690-702, doi:10.1038/nri2152 (2007).
- 187 Kim, K. D. *et al.* Calcium signaling via Orai1 is essential for induction of the nuclear orphan receptor pathway to drive Th17 differentiation. *Journal of immunology* **192**, 110-122, doi:10.4049/jimmunol.1302586 (2014).
- 188 Yahia-Cherbal, H. *et al.* NFAT primes the human RORC locus for ROR γ t expression in CD4(+) T cells. *Nature communications* **10**, 4698, doi:10.1038/s41467-019-12680-x (2019).
- 189 Fernandes, J. R., Berthoud, T. K., Kumar, A. & Angel, J. B. IL-23 signaling in Th17 cells is inhibited by HIV infection and is not restored by HAART: Implications for persistent immune activation. *PLoS One* **12**, e0186823, doi:10.1371/journal.pone.0186823 (2017).
- 190 Gioia, L., Siddique, A., Head, S. R., Salomon, D. R. & Su, A. I. A genome-wide survey of mutations in the Jurkat cell line. *BMC genomics* **19**, 334, doi:10.1186/s12864-018-4718-6 (2018).
- 191 Bartelt, R. R., Cruz-Orcutt, N., Collins, M. & Houtman, J. C. Comparison of T cell receptor-induced proximal signaling and downstream functions in immortalized and primary T cells. *PLoS ONE* **4**, e5430, doi:10.1371/journal.pone.0005430 (2009).
- 192 Annunziato, F. *et al.* Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *The Journal of experimental medicine* **204**, 1849-1861, doi:10.1084/jem.20070663 (2007).
- 193 Monteiro, P. *et al.* Memory CCR6+CD4+ T cells are preferential targets for productive HIV type 1 infection regardless of their expression of integrin β 7. *Journal of immunology* **186**, 4618-4630, doi:10.4049/jimmunol.1004151 (2011).
- 194 Gosselin, A. *et al.* Peripheral blood CCR4+CCR6+ and CXCR3+CCR6+CD4+ T cells are highly permissive to HIV-1 infection. *Journal of immunology* **184**, 1604-1616, doi:10.4049/jimmunol.0903058 (2010).

- 195 Gosselin, A. *et al.* HIV persists in CCR6+CD4+ T cells from colon and blood during antiretroviral therapy. *AIDS* **31**, 35-48, doi:10.1097/qad.0000000000001309 (2017).
- 196 Purvis, H. A. *et al.* Low-strength T-cell activation promotes Th17 responses. *Blood* **116**, 4829-4837, doi:10.1182/blood-2010-03-272153 (2010).
- 197 Bouguermouh, S., Fortin, G., Baba, N., Rubio, M. & Sarfati, M. CD28 co-stimulation down regulates Th17 development. *PLoS ONE* **4**, e5087, doi:10.1371/journal.pone.0005087 (2009).

