

Universitat Autònoma de Barcelona
Facultat de Ciències
Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia

**Estudio de la Reconstitución de Poblaciones de Linfocitos T Mediante
Marcadores Epigenéticos**

Paula Andrea Correa Vanegas

Laboratorio de Inmunología y Diagnóstico Molecular (LIRAD)
Banco de Sangre y Tejidos de Cataluña (BST)
Instituto de Investigación en Ciencias de la Salud German Trias i Pujol (IGTP)
Badalona (Barcelona), España

2013

Memoria de Tesis Presentada para Obtener el Grado de Doctor en Inmunología
por la Universitat Autònoma de Barcelona

Directores

Ricardo Pujol-Borrell & Roger Colobran Oriol

Diseño y formato de tesis

Paula Andrea Correa Vanegas.

Diseño y edición de portada

René Jaramillo Restrepo.

UAB

Universitat Autònoma de Barcelona



Los Doctores Ricardo Pujol-Borrell y Roger Colobran Oriol, Investigadores del Instituto de Investigación del Hospital Universitari Vall d'Hebron (VHIR), Unidad de Inmunología, del Banc de Sang i Teixits - Laboratorio de Investigación Biomédica en Inmunología, LIRAD. Además, son Profesores Asociados del Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad Autónoma de Barcelona UAB,

Certifican que:

La tesis titulada: “**Estudio de la Reconstitución de Poblaciones de Linfocitos T mediante marcadores epigenéticos**” ha sido realizada por Paula Andrea Correa Vanegas, bajo su dirección y guía, es aprobada para ser presentada y defendida para aplicar por el grado de Doctor en Inmunología de la Universidad Autónoma de Barcelona

Barcelona, 1 de Febrero de 2013

Dr. Ricardo Pujol-Borrell

Dr. Roger Colobran Oriol

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer la formación, el apoyo y la confianza que me han brindado mis dos directores, el Dr. Ricardo Pujol-Borrell y el Dr. Roger Colobran, quienes me acompañaron en cada fase de mi trabajo de tesis y me ayudaron a sortear las dificultades que pudieron surgir en estos 4 años de investigación. Doy las gracias con un especial afecto a las Dras. Marta Vives y Eva Martínez por su calidez, acompañamiento científico y apoyo personal. Gracias también a Marco Fernández, Pilar Armengol, Gerar Requena, Eugeni Aragall y Amanda Rus, por su soporte técnico, por la paciencia y experiencia que compartieron conmigo en el desarrollo de las técnicas moleculares y de citometría. Gracias a Irma, Cristina, Patricia, Carla, Aina y Jorge por su complicidad y amistad en estos años de trabajo juntos y en general a todo el grupo de trabajo del Servicio de Inmunología y de Endocrinología del Hospital Universitario German Trias i Pujol. Y finalmente, pero no menos sentido, gracias a Silvia Ventura y Albert Tomas, Julia Tomas, Fosca y Bruna, por su soporte, confianza, amistad y por convertirse en nuestra familia en Barcelona. A todos les estaré eternamente agradecida.

Tengo que decir que muchas veces me preguntaron y me pregunte: vale la pena?...se justifica el esfuerzo?...y, nunca tuve la respuesta definitiva para estas preguntas, pero siempre me motivo la convicción de que sólo el saber y el conocimiento te hacen libres y que esa libertad no la ponen en tus manos sino que hay que salir a buscarla.

Entonces, te das cuenta de que en el camino de esa búsqueda, vas encontrando la felicidad, el amor, los amigos, la experiencia y la vida misma. Por eso al final de esta etapa de formación puedo responder que, si vale la pena y que es el mejor momento para agradecerle a todas las personas que me ayudaron y me apoyaron para cumplir este sueño, porque de lo único que estoy segura es que sola jamás hubiera podido.

A mi Familia y muy especialmente, a mí esposo y amigo: René

Table de Contenido

ABREVIATURAS

1. INTRODUCCIÓN	12
1.1. El Timo.....	12
1.2. Estructura y Función Tímica.....	12
1.3. Desarrollo y diferenciación de Células T	14
1.4. Reordenamiento y expresión del TCR.....	16
1.5. Selección positiva	18
1.6. Selección negativa.....	18
1.7. Células T SP4 o SP8.....	19
1.8. Regulación de los correceptores CD4 y CD8	22
1.9. Marcadores celulares de timocitos.....	25
1.10. Salida de células T del timo a periferia (<i>Thymic Output</i>)	28
1.11. Monitoreo de la función tímica	30
1.13. Cuantificación de TREC.....	32
1.14. Spectrotyping.....	33
1.15. Reconstitución linfocitaria	35
1.16. Maduración postímica	37
1.17. Epigenética y linfocitos T	40
1.18. Modificación de las histonas.....	41
1.18. MicroRNAs:.....	42
1.19. Metilación del DNA	43
1.19.1. Características y funciones de las CGIs.....	44
1.19.2. Regulación de la metilación del DNA.....	48
1.20. Métodos de estudio de patrones de metilación del DNA	55
2 HIPÓTESIS.....	60
3 OBJETIVOS.....	62
4 MÉTODOS.....	64
4.1. Identificación <i>in silico</i> de islas CpG.....	64
4.2. Muestras y tejidos	65
4.3. Tratamiento de las muestras y obtención de células.....	66
4.4. Tinción con anticuerpos y separación de poblaciones celulares por FACS.....	69
4.5. Extracción de DNA genómico y RNA total	71

4.6	Tratamiento del gDNA con bisulfito.....	71
4.7	Diseño de oligonucleótidos y PCR <i>nested</i>	73
4.8	Clonación.....	77
4.9	Secuenciación.....	81
4.10	Análisis de metilación.....	82
4.11	Síntesis de cDNA y análisis de expresión génica por PCR cuantitativa en tiempo real.....	83
4.12	Monitoreo y cuantificación de la metilación del DNA con PCR y sondas FRET.....	85
4.13	Cuantificación del contenido de TRECs en los diferentes estadios de desarrollo de linfocitos T.....	86
4.14	Análisis estadístico.....	87
5	RESULTADOS.....	89
5.1	Resultados I: Analisis de metilacion en poblaciones de linfocitos T.....	89
5.1.1	Identificación y ubicación de las CGIs en los genes <i>CD4</i> , <i>CD8A</i> y <i>CD8B</i>	90
5.1.2	Marcaje y separación de poblaciones de células T.....	92
5.1.3	Análisis cuantitativo de la metilación en CGIs de los genes <i>CD4</i> y <i>CD8A</i> por secuenciación del DNA tratado con Bisulfito.....	97
5.2	Resultados II: Diseño de una prueba molecular basada en qPCR-FRET.....	127
5.2.1	Perfiles de metilación del extremo 5' de la CGI-1 en el gen <i>CD8A</i> analizados por qPCR-FRET en el desarrollo de los linfocitos T.....	131
5.2.2	Gradiente de metilación del gen <i>CD8A</i> en diferentes poblaciones de células T.....	140
5.3	Resultados III: Analisis de expresión de los correceptores CD4 y CD8.....	143
5.3.1	Expresión de CD4 y CD8 en timo.....	144
5.3.2	Expresión de CD4 y CD8 en linfocitos de sangre de cordón y sangre periférica (adultos).....	145
6	DISCUSION.....	151
6.1	Selección de los marcadores celulares para la separación de poblaciones de células T humanas.....	153
6.2	Perfiles de metilación de los genes <i>CD4</i> y <i>CD8A</i> y características de sus CGIs.....	154
6.3	Nuevas metodologías y la PCR-FRET en el análisis de metilación del DNA.....	159
6.4	La metilación del gen <i>CD8A</i> como biomarcador de células RTEs.....	162
6.5	La expresión de los correceptores CD4 y CD8 en las poblaciones de células T analizadas.....	163
6.6	Una modificación química diferente en el DNA de mamíferos puede ser confundida con la metilación.....	164
7	CONSLUSIONES.....	166

Referencias.....	168
Anexos.....	189

ABREVIATURAS

APC:	<i>Antigen presenting cell.</i>
CB:	<i>Cord blood.</i>
cDNA:	<i>Copy DNA.</i>
CGIs:	<i>CpG islands, regiones del DNA (Islas) ricas en citosina-guanina.</i>
CGIsS:	<i>CpG islands shores.</i>
CLP:	<i>Common lymphoid progenitor.</i>
CpG:	<i>Citosina-fosfato-guanina.</i>
CpGPAP:	<i>CpG island predictor analysis platform.</i>
cTEC:	<i>Células epiteliales tímicas corticales.</i>
DMR:	<i>Differentially methylated regions.</i>
DN:	<i>Double negative thymocytes.</i>
DNAss:	<i>DNA single strand.</i>
DNMTS:	<i>DNA metil transferasas.</i>
DP:	<i>Double positive thymocytes.</i>
ETP:	<i>Early thymic progenitor.</i>
FACS:	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting.</i>
FRET:	<i>Fluorescence resonance energy transfer.</i>
FSC:	<i>Fetal serum cow.</i>
gDNA:	<i>Genomic DNA.</i>
HAT:	<i>Histona acetil transferasa.</i>
HCPGs:	<i>High content of CpG.</i>
HDACs:	<i>Histona deacetilasas.</i>
HRM:	<i>High resolution melting.</i>
ICPGs:	<i>Intermediate content of CpG.</i>
ITAM:	<i>Immune receptor tyrosine-based activation motif.</i>
LCPGs:	<i>Low content of CpG.</i>
LT:	<i>Linfocito T.</i>

MBD:	<i>Methylated binding domain.</i>
MHC:	<i>Major histocompatibility complex.</i>
miRNA:	micro RNAs
MS-qFRET:	<i>Metilation specific quantitative FRET</i>
MS-HRM:	<i>Metilation sensitive High resolution melting</i>
MSP:	<i>Methylation specific primers.</i>
mTEC:	Células epiteliales tímicas medulares.
NKT:	<i>Natural killer T cells.</i>
Pb:	Pares de bases en el DNA.
PBMC:	<i>Peripheral blood mononuclear cells.</i>
PBS:	<i>Phosphate buffer saline.</i>
PBSF:	PBS fetal
PCR:	<i>Polymerase chain reaction.</i>
PTK7:	<i>Protein tyrosine kinase 7.</i>
qRT-PCR:	<i>Quantitative real time – polymerase chain time.</i>
RTE:	<i>Recent thymic emigrant.</i>
SNP:	<i>Single nucleotide polymorphism.</i>
SP:	<i>Single positive.</i>
SMRT:	<i>Single-molecule real time sequencing</i>
TCR:	<i>T cell receptor. Receptor de célula T</i>
TRECs:	<i>T cell receptor excision circles.</i>
Treg:	Células T reguladoras.
TSP:	<i>Thymus seeding progenitor.</i>
TSS:	<i>Transcription star site.</i>
UCSC:	<i>University of California-Santa Cruz.</i>
UTR:	<i>Untranslated region.</i>
Wt:	<i>Wild type.</i>

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El Timo

El timo es un órgano linfoide primario que brinda un microambiente especializado a los progenitores de células T provenientes de médula ósea. Su función se basa en dar educación y maduración a los timocitos antes de que estos sean exportados a la periferia para establecerse como células T maduras y funcionales. El timo junto con la médula ósea son los encargados del mantenimiento homeostático del sistema inmune periférico.

1.2. Estructura y Función Tímica

El timo es un órgano lobulado dividido por septos y fibras y compuesto principalmente de estroma. El estroma es un elemento no hematopoyético de tejido conectivo, que provee el microambiente adecuado para el desarrollo de las células T y está dividido en dos componentes histológicos, uno externo cortical y uno interno medular (Figura 1.1).

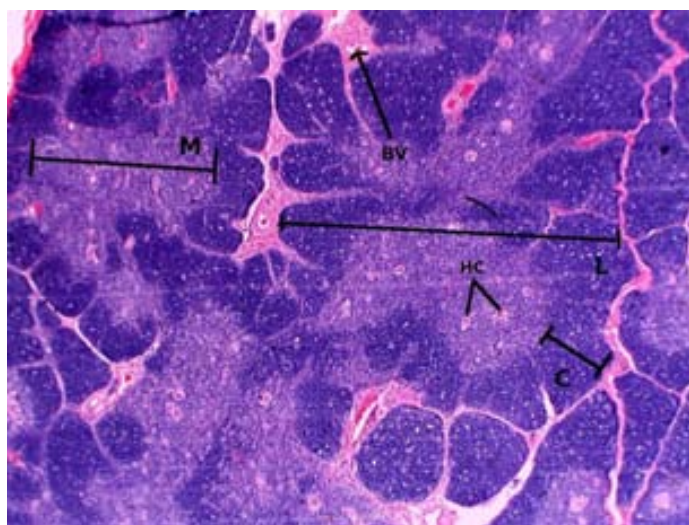


Figura 1.1. M: tejido medular, C: tejido cortical, L: lóbulo, BV: vaso sanguíneo, C: corpúsculos de Hasall. Pathology Department. University of Massachusetts Amherst.

El timo contiene las células T en todas las fases de maduración y son denominadas **timocitos**. La célula T más inmadura entra al timo desde la médula ósea a través de los vasos sanguíneos ubicados en la región cortico medular y desde allí comienzan su proceso de maduración, pasando luego por la porción cortical. Esta zona se encuentra densamente poblada de timocitos inmaduros y células epiteliales tímicas corticales (cTECs). Una vez los timocitos comienzan la maduración, migran hacia la médula tímica que está conformada por fibroblastos, células endoteliales, macrófagos derivados de médula ósea, células dendríticas y células epiteliales tímicas medulares (mTECs). Las mTECs tienen un papel muy importante en la función tímica, pues son ellas las encargadas de expresar un amplio abanico de antígenos propios (muchos de ellos no ubíquos sino restringidos a tejidos específicos) que se presentarán a las células T para educarlas en la respuesta antígeno-específica del sistema inmunológico (1). En esta región los timocitos aprenden la tolerancia a lo propio, la restricción dependiente de antígenos unidos a MHC y completan el reordenamiento del TCR. Además del componente celular, la médula tímica posee tejido conectivo, matriz extracelular y los corpúsculos de Hassall, que son capas concéntricas de células reticulares planas y granulares con alto contenido de queratina, encargadas de albergar remanentes de células tímicas en proceso apoptótico. Es en la médula tímica donde se encuentran los timocitos en estadios más maduros, incluyendo aquellos que ya son aptos para salir a la periferia; esta salida de células T se hace a través de una rica red de vasos linfáticos eferentes, que drenan las células hacia los ganglios linfáticos periféricos.

El timo sufre una marcada involución asociada con la edad, hasta convertirse en un órgano atrófico. En la edad adulta se pierde gran parte del tejido epitelial tímico, lo que genera un desarrollo menos eficiente de las células T o **timopoyesis**, una reducción en las células T recién emigrantes del timo (RTEs) y una reducción en la eficacia de la respuesta inmunológica. En consecuencia, puede haber un detrimento en la salud del individuo, por patologías tales como infecciones oportunistas, autoinmunidad o aumento en la incidencia de cáncer (2,3). La función tímica además de la edad, puede verse

modificada por otros procesos no fisiológicos como son los tratamientos con esteroides, la irradiación y la malnutrición (caquexia) (4,5).

1.3. **Desarrollo y diferenciación de Células T**

Las células T humanas se originan a partir de un precursor pluripotente en la médula ósea o el hígado fetal. El precursor migra al timo, donde adquiere la identidad de célula T e inicia el proceso de diferenciación. Los progenitores que migran cada día son relativamente pocos, pero están adaptados para proliferar rápidamente una vez llegan al microambiente tímico (6). La proliferación celular en esta primera fase es iniciada por acción de la IL-7, producida por las células epiteliales tímicas (7).

Luego de la primera proliferación, estas células pasan por una serie de fenotipos celulares muy discretos para alcanzar las características y funciones propias del linaje T. Este proceso es complejo e involucra cambios en la expresión de muchos genes, factores de transcripción y factores de diferenciación, como se puede observar en la figura 1.2 (8-12).

El primer estadio de diferenciación dentro del timo humano es la célula denominada progenitor linfoide común (CLP). El CLP llega a través de un vaso sanguíneo ubicado en la unión cortico-medular del timo. Esta célula aún tiene la capacidad de diferenciarse hacia células B, T, NK o célula dendrítica (13,14). El CLP se diferencia hacia célula pro-T. Este estadio se caracteriza por la expresión en superficie del receptor de IL-7 (IL-7R) y el CD34. Se ha descrito que esta fase es altamente proliferativa. Posteriormente, aparecen las fases conocidas como pre-T (pre-T1 a pre-T4), donde se generan los cambios intratímicos más significativos. Durante estas fases comienza a evidenciarse la regulación negativa de la molécula CD34 y se sugiere que se inicia el *commitment* del linaje T. También se inicia el reordenamiento del TCR y aparece la expresión de los correceptores CD4 y CD8. Los timocitos continúan su maduración en la que completan

el reordenamiento de los loci del TCR. Además, inician la expresión en superficie de la molécula CD3. A partir de aquí, pasan a la fase de DP donde ya pueden expresar un TCR $\alpha\beta$ maduro, lo cual es interpretado por la célula como una señal de supervivencia y expansión celular (14-17). A partir de la fase de DP, las células T inician los procesos de selección positiva y selección negativa que dan lugar a la célula T CD4 o CD8 (SP4 o SP8), que saldrá a periferia.

De acuerdo con lo anterior, en la diferenciación de los timocitos tienen lugar tres fases claves que son: i) el reordenamiento de los loci del TCR; ii) la selección positiva y iii) la selección negativa. En ellas intervienen grupos de genes, factores de transcripción y citoquinas.

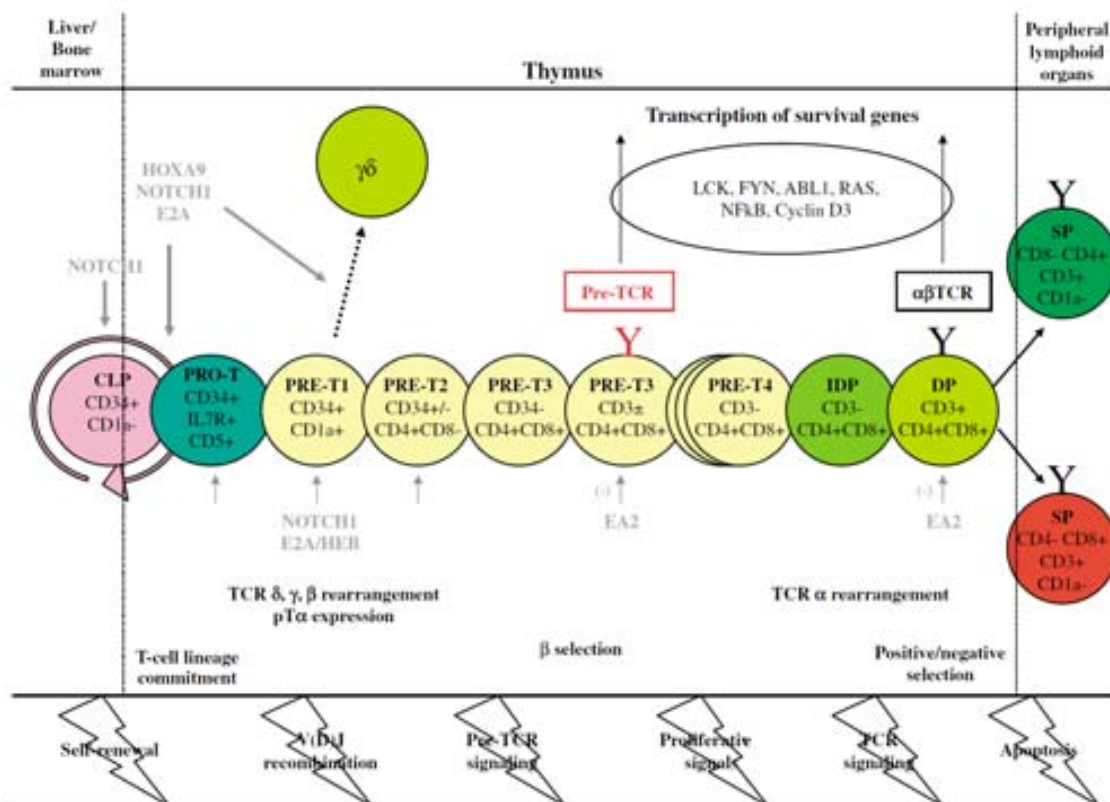


Figura 1.2. Estadios del desarrollo temprano en timocitos. Los precursores emigran de médula ósea, ingresan al timo como precursor linfocítico común (CLP) y comienzan su diferenciación pasando por los estadios de DN, DP y SP. Adaptado de Graux C, et al. Leukemia, 2006.

1.4. Reordenamiento y expresión del TCR

Las células T maduras se caracterizan por la expresión en su membrana del complejo TCR/CD3. El TCR es un heterodímero transmembrana compuestos de dos cadenas $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$. Todas las proteínas α , β , γ o δ están compuestas por un dominio variable y uno constante. Los dominios variables son muy polimórficos y tienen la función del reconocimiento específico de los antígenos que son presentados por las moléculas MHC.

En el humano los genes que codifican para las cadenas α y δ (*TCRA* y *TCRD*), están en el cromosoma 14q11 y los que codifican para la cadena β y γ (*TCRB* y *TCRG*), están localizados en el cromosoma 7q34 y 7q15 respectivamente. Los genes que codifican para varias de las cadenas del TCR, están conformados por diferentes segmentos, entre ellos el V (variable), el D (diversidad), el J (*joining*) y el C (*constant*). Durante el desarrollo de los timocitos, los genes y loci del TCR sufren un estricto reordenamiento que tiene una secuencia lineal donde se codifican unidades completas y se alcanza la exclusión de secuencias y alelos, a través de elecciones al azar entre varios de los segmentos (V, D, J) y por la delección de nucleótidos extras en la porción J de los genes. Estos reordenamientos son los que garantizan la alta variabilidad del TCR y generan el repertorio específico de células T que tendrá cada individuo. Las células T pueden expresar en su superficie diferentes tipos de receptores, el TCR $\alpha\beta$ o TCR $\gamma\delta$. La expresión del TCR $\gamma\delta$ en la superficie de células T humanas comienza a partir de la semana 9 de gestación, mientras que la expresión del TCR $\alpha\beta$ se da a la semana 10. Mientras tanto los timocitos contienen los genes del TCR en estado inactivo y no se expresan. La recombinación solo se inicia después de que se activan los genes *RAG1* y *RAG2* que son esenciales para el reordenamiento de las regiones variables. Las señales del TCR a su vez son esenciales para la supervivencia de la célula T. El TCR se asocia con la molécula de superficie CD3 y la cadena ζ formando un complejo que activa una cascada de señales luego del primer contacto con el antígeno específico.

Dentro de esta cascada las proteínas quinasas p56Lck y p59Fyn median la interacción entre el TCR y los correceptores CD4 y CD8. Además, se fosforila el residuo ITAM presente en el CD3 y la cadena ζ , lo que lleva al reclutamiento de otras quinasas tales como la ZAP-70 y la PI3K. Esta cascada de señales activa otros genes, entre ellos los de citoquinas y factores de crecimiento y diferenciación para que se de la expansión clonal (18,19).

Cuando se generan todos estos eventos, el timocito expresa en su superficie el heterodímero TCR $\alpha\beta$, el CD4 y el CD8. También se da la expresión del receptor de quimiocinas CCR7 que guía la migración del timocito DP hacia la medula tímica (8) y apaga la expresión de los genes *RAG1* y *RAG2*.

Existe también la variación de la célula T que reordena su TCR hacia $\gamma\delta$. Este hecho puede darse si, durante el reordenamiento del gen que codifica para la cadena α que tiene incluido el locus para la cadena γ , se incluye este locus y no el locus α , sólo así podrá expresarse un TCR $\gamma\delta$ (20) (Figura 1.3).

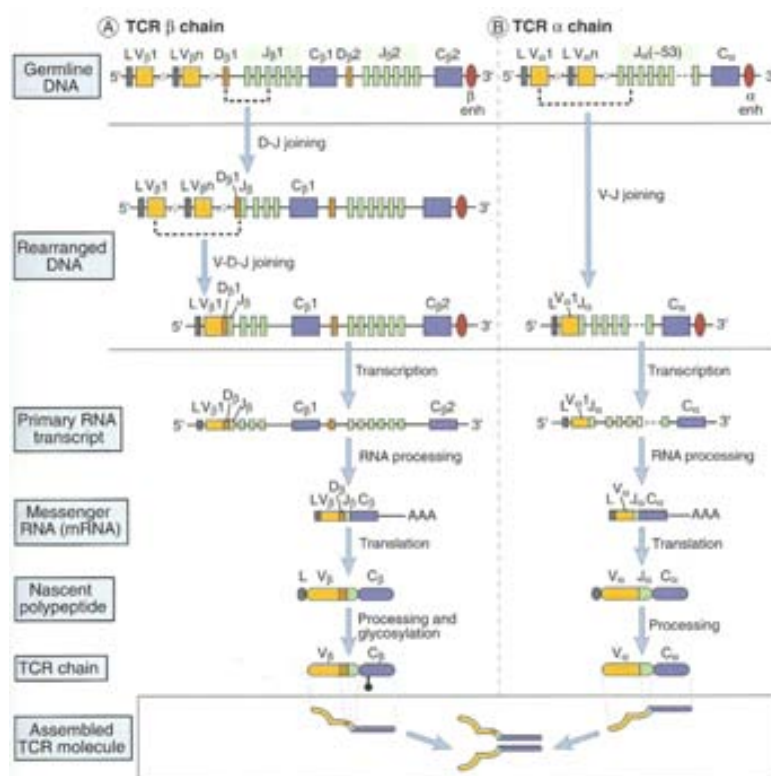


Figura 1.3. Reordenamiento del TCR en humanos. Adaptado de Abbas AK, 2007.

1.5. Selección positiva

La selección positiva de la célula T es dependiente del reconocimiento de antígenos presentados por el complejo MHC (*Major Histocompatibility Complex*). Con este proceso se garantiza la eliminación de células potencialmente nocivas para el sistema inmune. La célula T después de expresar el TCR en su superficie ya está preparada para reconocer cualquier péptido antigénico (propio o extraño), que sea presentado en el contexto de una molécula MHC. Las moléculas MHC son reconocidas como propias por las células T desde que están en el timo y son expresadas principalmente, en la superficie de las células presentadoras de antígeno (APCs), que en el contexto del timo serían las TEC y algunas células dendríticas (DCs). Por tanto la selección positiva es el proceso en el que la célula T DP, cuyo TCR interactúa de forma débil o con baja afinidad frente al péptido propio presentado por una molécula MHC, es estimulada para sobrevivir y dividirse, mientras que los timocitos cuyo TCR no reconoce ninguno de los péptidos MHC de clase I o clase II presentados por las APC, son inducidos a morir por apoptosis. Esto asegura que las células T maduras estarán restringidas por el MHC que expresa cada individuo.

Durante la selección positiva también se fija la restricción del linfocito por las moléculas MHC de clase I o de clase II, asegurando que las células T CD8 solo reconozcan péptidos que son presentados por el MHC clase I, mientras que las células T CD4 solo estarán capacitadas para reconocer péptidos presentados por el MHC clase II y expresarán altos niveles de TCR en la superficie celular (TCR^{high}) (7,21).

1.6. Selección negativa

La selección negativa es el proceso en el cual los timocitos cuyo TCR interactúa con los péptidos presentados por las moléculas MHC de una manera fuerte y con gran avidéz (largo tiempo y difícil disociación) sean eliminados. Así, se asegura que las células T

que son reactivas contra los antígenos propios presentes en altas concentraciones en el timo, sean eliminadas antes de salir a periferia. En esta fase, las células T estarán restringidas por un MHC propio y además toleran los antígenos propios que encontraran en periferia. Este proceso se denomina **tolerancia central**. En este punto los timocitos ya expresarán el CD4 o el CD8 en su superficie y no ambos, por lo que pasan a la siguiente fase de maduración como células T *single positive* (SP) 4 o SP8.

1.7. Células T SP4 o SP8

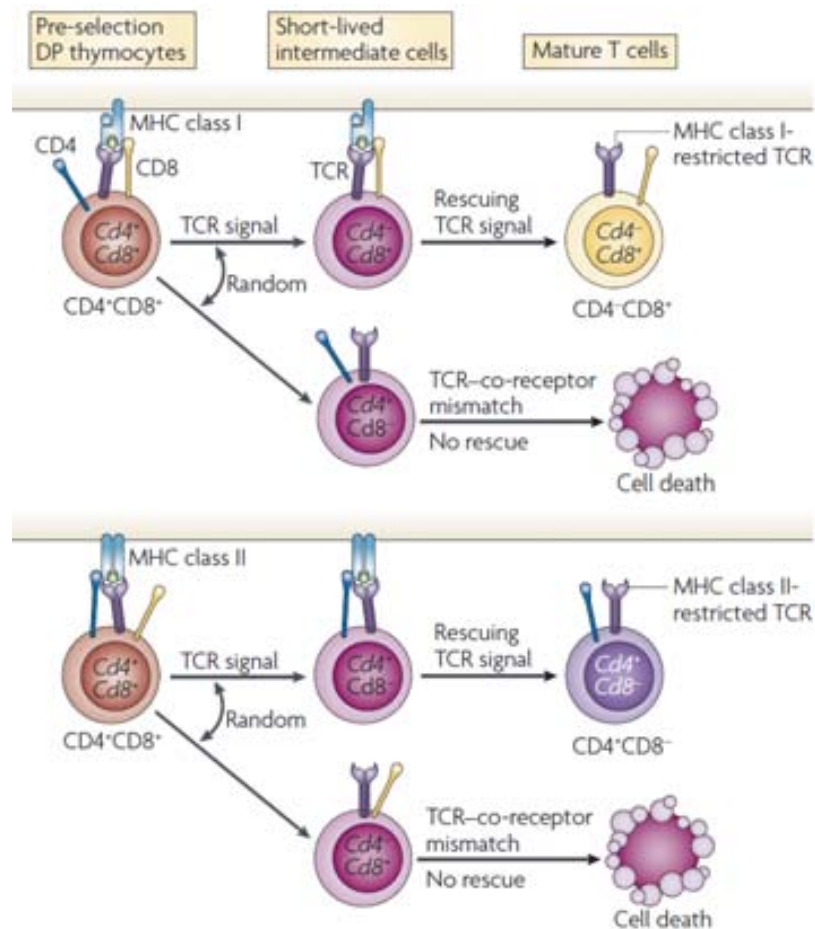
Como se mencionó antes, durante la selección positiva se da la diferenciación del timocito a SP4 o SP8. Esta selección lleva un intrincado cambio en la expresión de correceptores celulares. Requiere de una estricta regulación negativa sobre la expresión bien sea de CD4 o de CD8, según la identidad que haya adquirido la célula T, ya que los timocitos DP expresaban ambos correceptores.

La regulación negativa se inicia sobre el CD8, antes que sobre el CD4. Se inicia con un fenotipo intermedio $CD4^+CD8^{low}TCR^{high}$. Posteriormente, este estadio derivará hacia SP4, mientras que los timocitos que se comprometen hacia SP8 pasan por dos estadios intermedios mas que son $CD4^{low}CD8^{low}TCR^{high}$ y $CD4^{low}CD8^+TCR^{high}$, antes de ser SP8 (22, 23). En este punto las células T ya están maduras para salir del timo y presentan una correlación perfecta entre el MHC clase I o clase II y la expresión de CD8 o CD4. Sin embargo, se han planteado dos hipótesis sobre la decisión del compromiso de la célula T hacia CD4 o CD8. Una teoría propone que es un fenómeno completamente estocástico mientras la otra sugiere que la decisión es instructiva y se toma a partir de la intensidad de la señal con la cual responda el TCR al interactuar con el complejo MHC-peptido (23). Ambas teorías han sido muy discutidas y hasta el momento no se ha probado lo suficiente ninguna de ellas en humanos.

El modelo de selección estocástica sugiere que la finalización de la expresión del gen de cada correceptor durante la fase de DP sucede completamente al azar. Luego, solo sobreviven las células T en las cuales coinciden la especificidad del TCR y el correceptor expresado y son estas células las que se diferencian al estadio SP. Sin embargo, esta hipótesis implicaría que la elección del linaje CD4/CD8 fuese un proceso altamente ineficiente, lo que se contradice con algunos estudios experimentales que sugieren que la eficiencia de tal proceso sería del 90% (23). Otro factor que va en contra de esta hipótesis es que los factores de regulación de la transcripción de los genes CD4 y CD8 son completamente diferentes y por tanto la opción de apagar o encender la expresión de uno u otro no sería la misma (24,25).

El modelo instructivo de la selección del linaje CD4/CD8 postula que durante la selección positiva, la señal directa que da el TCR a las células T DP es la que suspende la expresión del correceptor que no corresponde con la señal emitida. Por tanto este modelo plantea que la señal del TCR está restringida por la molécula MHC con la que interactúa y que su intensidad es regulada por la interacción del complejo TCR/CD4 o TCR/CD8. Esta señal es regulada por el residuo intracitoplasmático de cada uno de los correceptores. El residuo intracitoplasmático del CD4 se une con mayor afinidad a la quinasa Lck, que el residuo del CD8 (26,27). Entonces, la unión TCR-CD4 es fuerte, mientras que la unión TCR-CD8 es más débil, pero son estas uniones las que dan la instrucción del gen que debe expresarse para la decisión del linaje y el paso a célula T SP. Sin embargo, algunos estudios experimentales concluyen que la instrucción de la interacción del TCR con el correceptor es válida pero no suficiente para que defina la célula T como CD4 o CD8 (28). Muchos estudios concluyen que la instrucción por señales tiene más que ver con el número de células T CD4 o CD8, pero que no interfiere con la decisión de linaje (29,30) (Figura 1.4). En conclusión, más estudios deben ser realizados en humanos, para definir claramente los procesos por los cuales las células se comprometen hacia el linaje CD4 o CD8 y conservan su fenotipo en periferia y durante el resto de su vida.

A. Modelo Estocástico



B. Modelo Instructivo basado en la fuerza de la señal

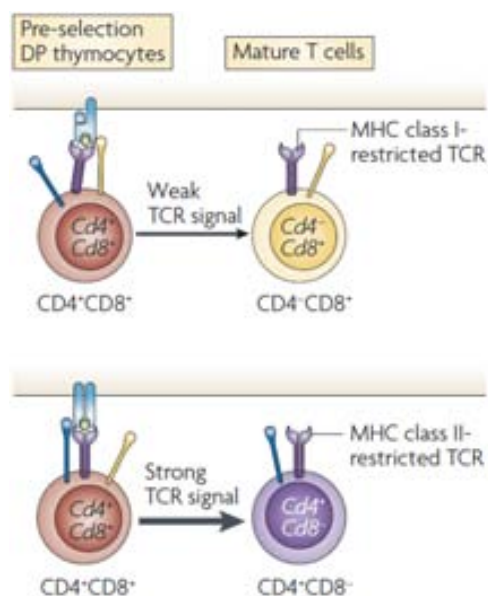


Figura 1.4. **A.** Modelo estocástico de selección del linaje CD4 o CD8. **B.** Modelo instructivo de intensidad de la señal. Adaptado de Singer A et al, Nat Rev Immunol, 2008.

1.8. Regulación de los correceptores CD4 y CD8

Las células T $\alpha\beta$ en timo tienen estadios claramente definidos a partir de la expresión de los correceptores CD4 y CD8 en la superficie celular. Estos correceptores son glicoproteínas que se unen a la membrana e interactúan con los dominios proximales de las moléculas MHC clase I y clase II, mientras que sus dominios citoplasmáticos reclutan miembros de la familia de Lck. Durante el desarrollo de las células T, estas hacen la elección del linaje entre CD4 y CD8, y este hecho implica como se menciono antes, la terminación de la expresión del gen contrario al de la identidad que asumirá la célula T. Además, induce la expresión de una cascada de genes propios de cada programa funcional, bien sea de células T *helper* CD4 o citotóxicas CD8.

Muchos esfuerzos se han hecho para resolver la regulación de la expresión de los genes *CD4* y *CD8*. Experimentos realizados a nivel nuclear muestran una compleja red de elementos reguladores positivos para ambos genes, al igual que otra red de elemento reguladores negativos. Pero actualmente se acepta que la expresión del CD4 está regulada principalmente de forma negativa por la función de un silenciador, mientras que la regulación del CD8 es primordialmente regulada por la interacción de múltiples *enhancers*.

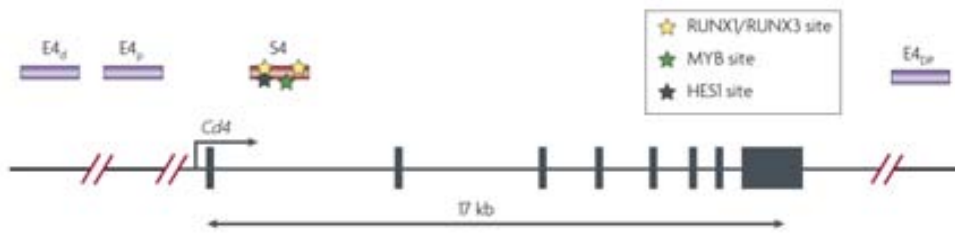
El gen *CD4* se sabe hasta el momento que posee elementos reguladores *upstream* del promotor que son dos *enhancers*, uno proximal y otro distal, conocidos como E4_{pro} y E4_{dis}, respectivamente. Además, posee un silenciador denominado S4.

La regulación positiva del CD4 está controlada principalmente por el E4_{pro}, mientras que el elemento principal durante la regulación negativa es el S4. Algunos estudios identificaron dos elementos reguladores mas, uno de ellos un *enhancer* ubicado en el primer intrón (E_{in}) del gen y un *enhancer* que solo está presente en las células T DP (E_{DP}) (31). Funcionalmente se observó que el E4_{pro} posee sitios de unión para proteínas Heb y E2a, requeridas para la activación de los LT, mientras que el E4_{dis} está

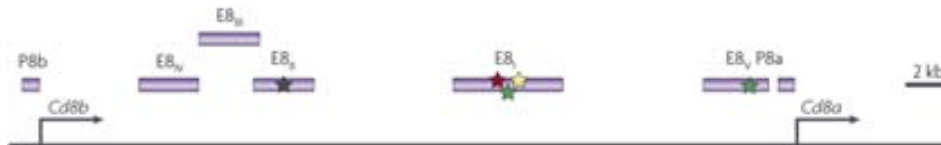
involucrado en la activación del gen *LAG3* (*Gen* de activación de linfocitos 3), el cual se encuentra cercano al gen *CD4* tanto en humanos como en ratón. El $E4_{in}$ por su parte parece intervenir en la función del S4. Hasta el momento los estudios sugieren que los *enhancers* pueden tener diferente función e importancia en la regulación de la expresión de *CD4* en diferentes estadios del desarrollo a partir de células T DP. Algunos experimentos sugieren que el S4 se requiere estrictamente en el silenciamiento del gen *CD4* en los estadios de DP a SP, pero que en periferia ya no es necesario para que el LT mantenga su identidad (33,34). Al parecer no es necesario reprimir el locus *CD4* a partir de que la célula T SP8 sale del timo, lo que hace concluir que se produce una herencia del silenciamiento cuando la clona se expande. *In vivo* se encontró que el S4 del locus *CD4* tiene motivos funcionales críticos que incluyen sitios de unión para RUNX3, MYB y HES1, los cuales son indispensables para que el silenciador actúe (32-34) (Figura 1.5 A y C).

En contraste con el mecanismo de regulación del *CD4*, la expresión del *CD8* es regulada por los *enhancers* E8I-E8IV, localizados en el extremo 5' del promotor del gen *CD8 α* . El E8I controla la expresión inmediatamente después de que los timocitos pasen la selección positiva y este control es activo en LT *CD8 $\alpha\beta$* y LT *CD8 $\alpha\alpha$* intraepiteliales (35). Al parecer la acción del E8I es dependiente de la conformación de la cromatina del gen, sin embargo la acción de este solo factor no es suficiente para inducir la expresión de los genes *CD8 α* y *CD8 β* , lo que sugiere que debe trabajar en conjunto con otros elementos reguladores. Los demás *enhancers* parecen actuar de modo específico en cada estadio del desarrollo: el E8II funciona en DP y SP8, el E8III, solo actúa sobre los DP y el E8IV potencia la acción del E8II para regular los timocitos DP, SP8 y SP4 (36) (Figura 1.5 B y C).

A. Regulación de la expresión del gen para el correceptor CD4



B. Regulación de la expresión del gen para el correceptor CD8



Enhancer	Stage-specific Cd8a enhancer activity			
	DN	DP	CD8 SP	CD4 SP
EB ₁	-	-	+	-
EB ₂	-	+	+	-
EB ₃	-	+	-	-
EB ₄	-	+	+	+
EB ₅	-	+	+	-



C. Interacción de los elementos reguladores para CD4 y CD8 durante la diferenciación de células T

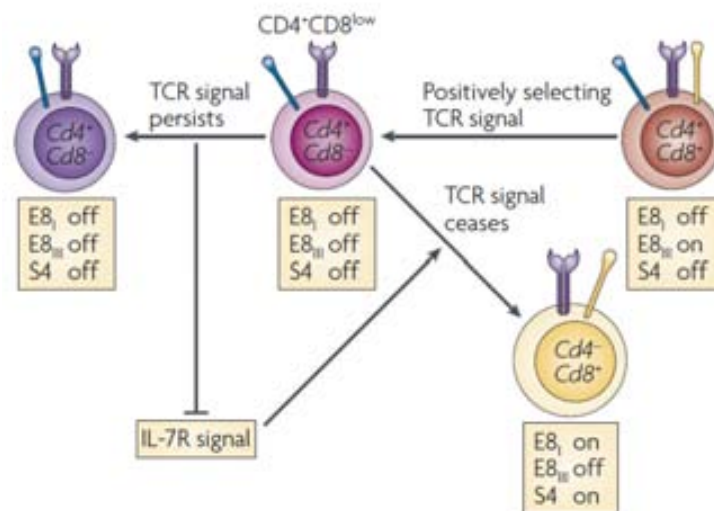


Figura 1.5. Mecanismos de regulación de la expresión de los genes CD4 y CD8. **A.** *Enhancers* (E4_{dis}, E4_{prox}, E4_{DP}), silenciador (S4) y factores nucleares que se unen a cada segmento. **B.** *Enhancers* involucrados en el control de la expresión del CD8 en los diferentes estadios del desarrollo y los factores nucleares que participan. **C.** Red de interacciones y estadios de los elementos de regulación de los genes CD4 y CD8 durante la elección del linaje. Adaptado de Singer A. et al *Nat rev immunol.* 2008.

Además, de los *enhancer* se sugiere la posible existencia de un silenciador que ayude a controlar la actividad del E8II y IV, pero hasta el momento no se ha identificado. El compendio de estudios existentes hasta ahora se resume en que, el primer paso para el control de la expresión del CD4 o el CD8 se inicia por la fuerza y duración de la señal que recibe el TCR al contacto con el antígeno. Luego se completan los procesos por la activación de vías intracelulares en las que participan diferentes genes y factores de transcripción como se resume en la Figura 1.5 C. Dos de los principales factores de transcripción identificados hasta ahora son el ThPOK y el RUNX3, específicamente expresados en timocitos CD4 y CD8 durante la diferenciación. El gen *ThPOK* codifica para un miembro de la familia de factores de transcripción Pok, que corresponden a una serie de dedos de zinc encargados de atraer e interactuar con otros factores de transcripción (37,38). Así, el ThPOK, se conoce como el POK de transcripción *T helper*. Estudios en modelos murinos muestran que una mutación de este gen desencadena una ausencia de LT CD4 mientras que los niveles de CD8 permanecen normales o aumentados. Algunos autores han sugerido también que este factor de transcripción puede actuar sobre el estadio intermedio de células $CD4^+CD8^{low}TCR^{high}$, direccionándolas aberrantemente hacia SP8. En condiciones normales en cambio, se observó que el ThPOK es necesario y suficiente para que se genere el linaje SP4 y se reprima el SP8, según el programa de señales del complejo TCR-MHC-péptido (39). La expresión de ThPOK es inducida por acción del GATA3, aunque no está claro si es por una acción directa o si está mediada a su vez por el RUNX3, que es un gen importante en el silenciamiento de las proteínas TOX, durante la diferenciación hacia LT CD4 (21).

1.9. Marcadores celulares de timocitos

El desarrollo y maduración del linaje T desde que empieza en la médula ósea o el hígado fetal hasta que se diferencian los timocitos en linfocitos T periféricos, se

acompaña de un fenotipo, dado por las moléculas de superficie que expresan en cada uno de sus estadios.

El linaje linfoide proviene del mismo precursor que las demás células hematopoyéticas y es identificado por la molécula CD34. Algunos autores especulan que si el CD34 aparece acompañado del marcador CD10, estas células son precursoras directas de células T y B (40,41). Algunos investigadores encontraron que el 14% de las células en médula ósea tenían el fenotipo CD34⁺CD10⁺CD45RA⁺CD43⁺ e IL7RA⁺. Estas células expresan transcritos para PAX5 e IGB. Además poseen transcritos para GATA3 y pTa específicos de la diferenciación hacia célula T. Este fenotipo se acepta actualmente para identificar el CLP (42). Posteriormente, se identificaron los marcadores CD7⁺, CD38^{low} y CXCR4⁺ como marcadores de precursores linfoides en sangre de cordón neonatal, con potencial para diferenciarse hacia célula T (43). Adicionalmente al CLP, se ha tratado de identificar el progenitor de establecimiento tímico (*Thymus Seeding Progenitor*, TSP) y el progenitor temprano en timo (*Early Thymic Progenitor*, ETP). Algunos autores sugieren que las células CD34⁺CD45RA⁺CD7⁺, corresponden al TSP, mientras que las células CD34⁺CD38^{low} con reordenamiento del TCR corresponden al ETP (44,45). Otros estudios muestran que no hay una sola célula que pueda migrar al timo, sino varias, con fenotipo diferente. Esto se respalda en el hecho de que se encontraron células CD34⁺CD19⁺ en timo (46). En resumen se podría pensar que un grupo de precursores tienen la capacidad de dirigirse e instaurarse en timo y que son multipotenciales, pero que aun no están restringidos al linaje de célula T por lo que esta cualidad la adquieren en una fase posterior del desarrollo tímico.

Los estadios transicionales de la célula T en el timo han sido caracterizados fenotípicamente, por medio de la evaluación de los reordenamientos del gen TCR (45, 47). Se ha encontrado que la célula CD34⁺CD1a⁺ es la primera población que se

compromete al desarrollo del linaje de célula T, perdiendo toda capacidad de transformarse en otra célula (48-51).

Luego de que se establece el linaje de célula T, después del estadio pre-T, como se mencionó en apartados anteriores. El fenotipo de los timocitos se ha establecido de acuerdo a lo que se observa en la figura 1.6. De acuerdo con Blom *et al.* Hay un estadio de célula CD4 intermedio que denominan *small CD4 ISP (immature single positive)* en el que las células son CD34+CD1a+CD3e+CD2+CD5+CD7+IL-7Ra+. Es en este estadio donde se expresa por primera vez el correceptor CD4 y continúa madurando hacia estadios intermedios, antes de su paso a timocito DP (52).

Los estadios más tempranos del desarrollo de la célula T también se han analizado a nivel molecular y la característica mas clara es el avance del reordenamiento de los loci TCR, donde se identificó que la secuencia era TCR $\delta > \gamma > \beta > \alpha$ (47, 45).

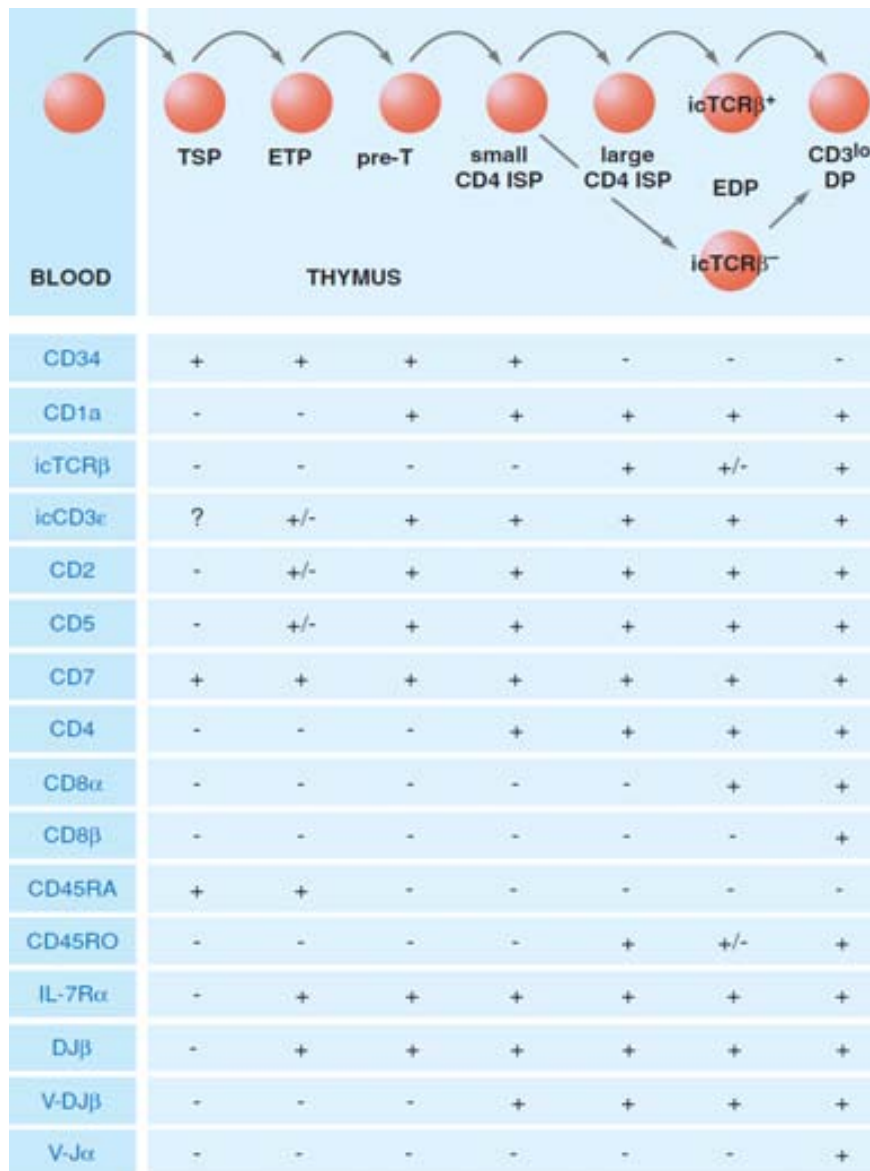


Figura 1.6. Marcadores celulares en el desarrollo temprano de células T humanas.

Adaptada de *Blom B, et al. Annu Rev Immunol 2006*

1.10. Salida de células T del timo a periferia (*Thymic Output*)

El sistema de vigilancia inmunológica genera las señales necesarias para que haya migración de células T desde el timo a la circulación periférica para así mantener el repertorio de LT y la homeostasis periférica. El mecanismo por el cual los timocitos salen del timo, es poco conocido. Hasta ahora la evidencia muestra que las quimocinas

tienen un papel muy importante en este proceso, pero también es sabido que esta acción por sí sola no sería suficiente para mantener la homeostasis. Algunos estudios sugieren que las células T salen del timo siendo aún inmaduras y que completan su desarrollo en órganos linfoides periféricos (53-55). Estos estudios se han enfocado en identificar y cuantificar las células T que recién salen del timo (*Recent Thymic Emigrants, RTEs*), las cuales son claves en la valoración de la función tímica y la reconstitución periférica (53,55). Hasta el momento se sabe que los RTEs salen con un fenotipo maduro en cuanto al perfil de TCR, CD4 y CD8. Los RTEs que son funcionalmente competentes 16 horas después de estar en periferia (56-60) y entre el 10-20% sufren divisiones celulares extratímicas. Los estudios también sugieren que un 50% de las células que están listas para salir del timo, sufren una división justo antes de ser RTEs. Estas células que se han dividido recientemente van a periferia pocas horas después de completar la síntesis del DNA. Esta fase de expansión intratímica tardía demuestra que los requerimientos diarios de LT en periferia son altos (61). Otros estudios realizados por Boursalian *et al* sugieren que la célula T continúa su diferenciación post tímica con maduración progresiva en fenotipo y función. Por tanto, se acepta que la maduración final de los RTEs se da en órganos linfoides periféricos (62).

La mayoría de estudios de *output* tímico muestran que no es un fenómeno al azar y que requiere de una serie de eventos de maduración antes de que la célula RTE pueda salir a periferia. Sin embargo, en humanos la diferenciación fenotípica y funcional entre los RTEs y las células T naive de larga vida ha tenido poco éxito. En general, los estudios sobre el *output* tímico y los RTEs en humanos están metodológicamente muy limitados. Además, las señales que regulan la migración de timocitos maduros a la periferia aún no están completamente claras. Se han propuesto varios procesos para la salida de células T hacia periferia: quimiorrepulsión del estroma tímico, señales de quimioatracción desde la periferia o pérdida de respuesta a las señales de retención tímica (63). En estos procesos estarían involucradas las siguientes quimocinas y sus receptores:

CXCL12 y su receptor CXCR4 (64), CCL19 y CCR7 (65), CCL25 y CCR9 y CCL22 y CCR4.

El *output* en un timo adulto puede reducirse hasta un 95% comparado con lo que un timo joven puede emitir y la tasa de exportación celular es insuficiente para reemplazar la pérdida diaria de células T naive en periferia. Por tanto se hace necesario activar la proliferación homeostática periférica de células T maduras y células T memoria para tratar de compensar la pérdida de función tímica (66).

1.11 Monitoreo de la función tímica

Relativamente poco se conoce acerca del número y composición normal de células en el timo humano y cómo varían sus parámetros de acuerdo con la edad, la respuesta inmunológica y los estados de salud y enfermedad. Hasta hace poco la medición de la función tímica se veía limitada a la determinación de los niveles de LT en el *pool* de células periféricas, pero esto no reflejaba de forma cuantitativa la contribución de RTEs a sangre periférica ni permitía determinar la diversidad del repertorio de células T periféricas (67,68). Luego se diseñaron una serie de métodos de imagen con emisión de fluorescencia o de radioactividad y algunos con marcaje celular específico, para evaluar el tamaño y celularidad del timo (69,70). Aún continúan siendo usados en protocolos clínicos.

La inmunofenotipificación y la citometría multicolor se han convertido en una herramienta para medir el *pool* de células T (71,72). Muchos antígenos de superficie celular han sido explorados como marcadores de RTEs en diferentes especies. Por ejemplo, Kong *et al* describió el chT1 como un marcador de superficie de RTEs en aves de corral, e identificó que era expresado por las células que habían emigrado del timo en un tiempo máximo de dos semanas (73). Sin embargo, hasta el momento no se ha

identificado ningún homólogo de esta molécula de superficie en murinos ni en humanos. En humanos en cambio se encontró que el CD45RA (la isoforma de peso molecular alto de tirosin fosfatasa) y el CD62L (L-Selectina), son los marcadores de mayor utilidad para identificar los células T naive tempranas (74). La desventaja de estos marcadores es que no son exclusivos de RTEs o LT naive *de novo*, puesto que los LT de memoria que son CD45RA- CD45RO+, pueden revertir a CD45RA+ si han pasado un largo tiempo y no han iniciado su proceso de apoptosis. Estas células continúan siendo células de memoria efectoras funcionales, pero fenotípicamente podrían confundirse con una célula naive (75). Por tanto las poblaciones de células T con el marcador CD45RA+ no garantizan una correspondencia indiscutible con RTEs. Otros estudios sugieren que deben combinarse los marcadores CD45RA+/CD45RO-, CD62L+, CD27+, CD95^{low} para la identificación de los RTEs CD4+ (76) o el CD103 y CD11a en el caso de los RTEs CD8+ (72). Por otra parte se reportó que la combinación de los marcadores CD31 y PTK7 podían identificar claramente los RTEs CD4+, pero no los RTE CD8+ (77-80). Actualmente, sigue habiendo controversia en cuanto a la metodología que permite diferenciar entre RTEs y células T naive; pero el fenotipo más aceptado para las células T naïve es el CD3+CD4+/CD8+CD45RA+CD62L+ (81), mientras que para RTEs CD4 es el CD3+CD4+/CD8+CD45RA+CD62L+CD31+ y para RTEs CD8 aun no se define claramente.

Otros métodos menos comunes para la identificación de RTEs en humanos han sido probados en protocolos investigativos o en pacientes infectados por VIH. Estos métodos consisten en el marcaje de la purina desoxirribosa, con un isotipo radioactivo, el deuterio glucosa (D-Glucosa), el cual se combina con una separación de células por citometría y un análisis de espectrometría de masas para evaluar la síntesis de DNA en las células T. Esta tecnología está restringida a protocolos clínicos y requiere de expertos en espectrometría de masas, lo que lo convierte en una metodología impráctica para el estudio e identificación rutinaria de los RTEs (82).

Análisis de la función tímica a nivel molecular

1.13 Cuantificación de TREC

Los estudios de imagen y de inmunofenotipo, así como los marcajes *in vivo* sirven para monitorear la timopoyesis pero, sin embargo, han sido insuficientes para medir la maduración y la cantidad y calidad de los RTEs que salen del timo para repoblar el *pool* de LT en periferia. Douek et al encontraron que como resultado del reordenamiento de segmentos de los genes que codifican para el TCR, ciertas secuencias eran expulsadas produciendo un bioproducto de DNA episomal llamado *T-cell receptor rearrangement excision circle* (TREC) (83,84). Estos TRECs son moléculas estables, no se duplican durante la mitosis y se diluyen con cada división celular (85-87). Los TRECs son producidos por un segmento génico que codifica para la cadena δ del TCR (TCRD), ubicada dentro del locus TCRA, tanto en humanos como en ratones (85-87). Como funcionalmente el reordenamiento del TCRA requiere primero de la delección del locus TCRD, es esto lo que genera la formación del DNA circular sj-TREC (88).

Los sjTREC se miden por técnicas moleculares como la PCR en tiempo real, en la que se cuantifica el número de moléculas de DNA episomal (89). Después de la selección positiva, cada célula T *de novo* que sale del timo conducirá el mayor número de sjTRECs posibles, por tanto se puede correlacionar la proporción de sjTRECs de una célula con la cantidad de progenie clonal que tiene. Sin embargo, los sjTRECs presentan desventajas como marcador de función tímica, ya que pueden haber moléculas de TRECs que se conservan en algunas LT naive de larga vida. Estas moléculas constituirían un resultado falso positivo a la hora de correlacionarlas con el número de RTEs. Por el contrario, puede haber divisiones celulares de los RTEs inmediatamente después de salir a periferia, lo que subestimaría el número de moléculas de TRECs, con respecto al porcentaje real de RTEs (89-93). Estos factores de confusión llevaron a estudiar y desarrollar otras técnicas para detectar la producción de células T de timo. Por tanto se analizó el bioproducto del reordenamiento del gen TCRB que es otro círculo de DNA de exclusión denominado el β TREC. Este es

inversamente proporcional a la división de la célula, por lo que la proporción entre el número de copias de sjTRECs/ β TRECs, puede dar una medida más directa del *output* tímico (88) (Figura 1.7A y 1.7B). Sin embargo, como los TRECs no se replican, la mitad de las células que sufren división después de cada reordenamiento del TCR, no poseerán el mismo número de TRECs ($n_i \beta$, $n_i sj$), por lo que no serán identificadas como RTEs y esto dificultará la evaluación cuantitativa del número de RTEs que se encuentran en periferia, dando como resultado un valor subestimado del número real de células que han salido del timo. Por tanto los TRECs, continúan siendo una estrategia imperfecta de identificación y cuantificación de los RTEs.

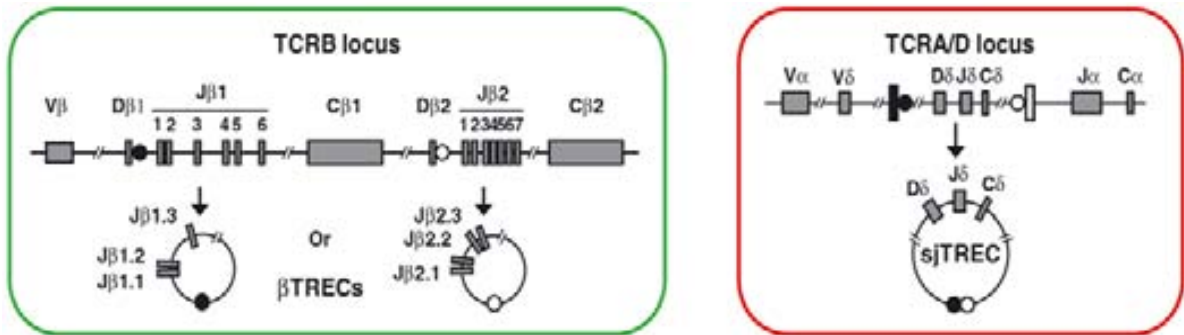
1.14 Spectrotyping

El proceso de reordenamiento de las regiones VDJ durante la timopoyesis resulta en la expresión de un único TCR en cada célula T para generar las nuevas poblaciones de RTEs y células T naive que conforman el repertorio de LT en periferia (94). Basado en este reordenamiento se generó otro método molecular de análisis de la timopoyesis, conocido como *Spectrotyping*. Esta técnica estudia la tercera región hipervariable que se encuentra entre la región V y J de la cadena B del TCR, que se conoce con el nombre de tercera región determinante de complementariedad (CDR3). Los resultados del *Spectrotyping* permiten evaluar la diversidad del repertorio del TCR en periferia, el cual será alto si la reconstitución es de carácter tímico y bajo si es producto de homeostasis periférica.

El método consiste en determinar por técnicas de PCR y RT-PCR, a partir del cDNA de LT, el tamaño y variabilidad de la región CDR3 de la cadena β del TCR. Este sitio es el que determina el contacto del TCR con el complejo péptido/MHC y tiene un papel clave en el reconocimiento antigénico. La gran diversidad del CDR3 se genera por la inserción al azar de nucleótidos durante el reordenamiento de la cadena β del TCR (95-97). Por lo

tanto, a mayor variabilidad de tamaño del cDNA, mayor policlonalidad del pool de células T.

1. Conformación de los β TRECs y de los sjTRECs



2. Análisis de proporciones de β TRECS/sjTRECS para evaluar el *output* tímico

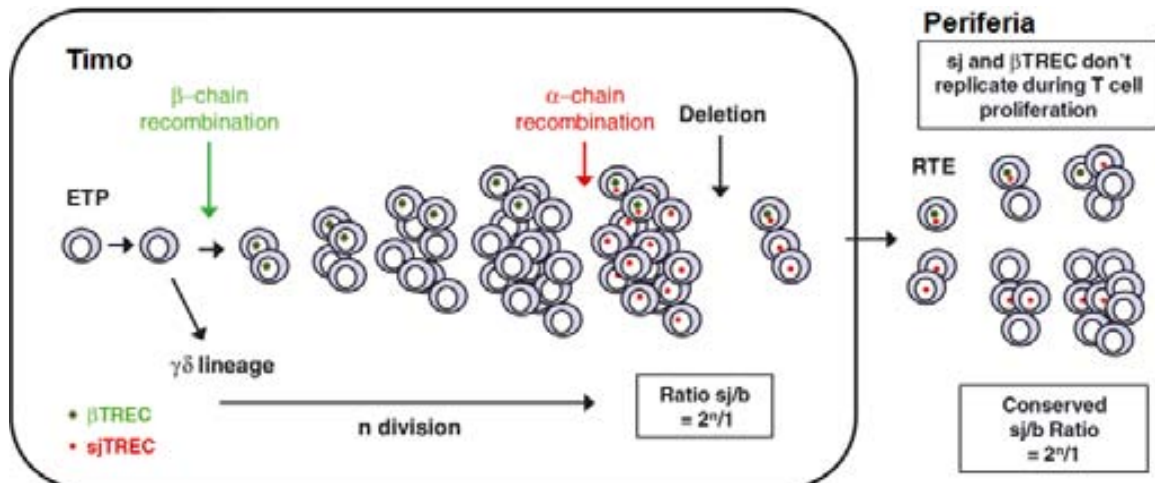


Figura 1.7. A. Conformación de los sjTRECs y los β TRECs. **B.** Generación y seguimiento del DNA episomal, producto del reordenamiento del TCR en timocitos.

Adaptado de Ferrando-Martinez R, J Immunol Methods, 2010.

1.15 Reconstitución linfocitaria

La reconstitución inmunológica depende de dos vías: la primera es la generación de nuevas células T a partir de progenitores hematopoyéticos y timopoyesis; la segunda corresponde a la expansión en periferia de LT maduros residuales que responden a reestimulación antigénica y a citoquinas homeostáticas (98). El mantenimiento homeostático y la diversidad del repertorio T en la periferia dependen de un balance dinámico entre estas dos vías y de la generación de linfocitos funcionales durante la edad adulta de los individuos. La **vía tímica** es más lenta pero garantiza un repertorio policlonal más alto. En ella se conserva la diversidad del TCR y hay generación de células T naive *de novo*. Esto garantiza una repoblación de LT CD4, CD8 y células T reguladoras. La **vía periférica** en cambio, puede activarse rápidamente y asegurar una reconstitución inmediata pero inestable, menos sostenida (3-6 meses) y con características oligoclonales, que puede constituir un desbalance importante de la respuesta inmune frente a algunos antígenos (99).

Las dos vías de reconstitución pueden ser evaluadas por la combinación de marcadores celulares como el CD45RA, CCR7, CD62L con marcadores moleculares como el contenido de sjTRECs en las células. Aquellas células con fenotipo CD45RA⁺CCR7⁺CD62L⁺ y un alto contenido de sjTRECs se considera que provienen de células T naive *de novo* que acaban de pasar por el proceso de timopoyesis. En cambio las células con bajo contenido de sjTRECs y además con características oligoclonales de TCR, se acepta que provienen principalmente de reconstitución periférica por expansión de clonas de LT residuales maduros (100).

La calidad y el tiempo que tarda en darse la reconstitución por la vía de la timopoyesis, depende de la edad del individuo y del estímulo generado por el desbalance periférico. Por ejemplo, en niños que se han sometido a quimioterapia, la renovación del pool de células T por timopoyesis puede tardar tan solo 6 meses. En adolescentes, este

proceso puede tomar entre 12 y 24 meses (101,102) y en adultos la renovación de células T naive *de novo* se limita significativamente, tardando entre 3 y 5 años (103-105). Otros factores pueden alterar el proceso de reconstitución: es el caso de la radiación, la cual puede causar daños a nivel de la médula ósea que pueden verse reflejados en la duración y calidad de la timopoyesis, de forma independiente de la edad (106,107). Las citoquinas, principalmente la IL-7 y su receptor (IL-7R) pueden también afectar la reconstitución inmunológica por vía tímica (108-110). Algunos autores también han reportado que disminuciones en la hormona del crecimiento y en el IGF-1 (*insuline-like grow factor-1*), también pueden afectar la función tímica (111-113).

La **reconstitución inmunológica periférica**, también llamada **expansión homeostática periférica** (114), ocurre principalmente en procesos de depleción aguda, con una caída del *pool* de células T, en muy corto tiempo, con inducción de la conversión de células T naive a células T activadas, induciendo proliferación de las clonas de periferia (114). Algunos han propuesto que esta vía puede activarse de manera independiente de citoquinas y antígenos pero otros autores observan que la IL-7 y la IL-15 son capaces de actuar sobre algunas células T naive en periferia y sobre células T memoria obligandolas a dividirse (115, 116), lo cual podría explicar los altos niveles de IL-7R en las células T naive en periferia (117). Estudios en humanos muestran que hay una correlación inversa entre los niveles de IL-7 en suero y la reconstitución de células T después de una linfodepleción, mientras que altos niveles de IL-7 en periferia, se asocian con severa linfopenia (118). La IL-15 también es determinante en el mantenimiento homeostático de LT, principalmente CD8 de memoria.

La reconstitución periférica es diferente para los LT CD4 que para los LT CD8. La reconstitución por timopoyesis parece ser mas importante en la reconstitución de poblaciones de LT CD4 que en las de LT CD8 y se conoce también que solo las células T naive *de novo* tienen la capacidad de reconstituir el *pool* de LT CD4 memoria central

(119). Los LT CD8, en cambio, se recuperan principalmente por la vía de reconstitución periférica y tienen una tendencia oligoclonal. También se ha encontrado que hay reconstitución tímica del linaje CD8 pero, al parecer, con una dinámica diferente de la observada con las subpoblaciones de LT CD4. Además, se encontró que la reconstitución por vía tímica, de la línea CD8 se da con un repertorio de TCR restringido a largo tiempo.

1.16 Maduración postímica

El primer estadio periférico de las células T es el de célula RTE. Por esto, el número y la identificación de RTEs en son importantes pero hasta el momento muy complejos, ya que no hay biomarcadores claramente definidos para diferenciar entre RTEs y LT naive, lo cual sería de gran valor tanto en condiciones fisiológicas como en algunas condiciones clínicas como la inmunosupresión (bien sea de origen infeccioso, por linfoabrsión, trasplante o quimioterapia), la colitis ulcerativa (123), la leucemia mieloide crónica (124) o la tiroiditis autoinmune (125), entre otras.

La mayoría de estudios sobre RTEs se desarrollan en modelos murinos, por las dificultades técnicas que se encuentran para su estudio en humanos. Estudios en ratones muestran que el pico máximo de RTEs se alcanza a las 3 semanas de edad y que la proporción con respecto al total de células T en periferia es del 100% entre el nacimiento y las 3 semanas y decrece a un 20% a las 6 semanas después de salir del timo, a partir de ese momento comienza el proceso de involución tímica. En ratones los RTEs se acumulan en el bazo y nódulos linfoides periféricos y allí maduran hacia LT naive (126,127).

Se observó que los RTEs compiten por nichos vacíos en los órganos linfoides periféricos con los LT naive de larga vida, que aún no han sido activados por ningún antígeno (126). También sabemos que se ubican preferencialmente en espacios

linfopénicos, lo que parece favorecer su supervivencia y desarrollo hacia LT naive. Una vez los RTEs encuentran su espacio se mantienen allí y comienzan su maduración hacia células T naive; el primer paso es aumentar la expresión del CD24 (127), una molécula esencial para la proliferación homeostática de los RTEs. Además, incrementan altos niveles de expresión de TCR y CD2, en cambio expresan bajos niveles de MHCII, CD45RO, IL-7R y CD28 (127-129).

Los RTEs CD4 y CD8 también varían en su fenotipo y comportamiento. Los CD8 proliferan al llegar al nicho periférico, tienen altos niveles de CCR9 y producen menos niveles de citoquinas. Los RTEs CD4 tienen una menor proporción de proliferación, una menor producción de IL-2, IL-4 e IFN γ y expresan bajos niveles de CD25 (127,130, 131) y tienen alterada la capacidad para diferenciarse en los linajes de células T helper (Th1, Th2, Th17, Treg), especialmente hacia el linaje Th2. (131). Además, algunos estudios encontraron que la regulación epigenética de los loci de las citoquinas IL-2 e IL-4 pueden direccionar la diferenciación de los RTEs CD4 a LT naive (127, 131,132).

Estudios en RTEs humanos, identificados mediante el contenido de TRECs, sugieren que estas células proliferan en periferia, como respuesta a IL-2, IL-4 e IL-7, y su expansión es completamente independiente del TCR. Los RTEs humanos tienen altos niveles de CCR7 en su superficie, a través del cual reciben las señales quimiotácticas para dirigirse y permanecer en los órganos linfoides secundarios. Además, observaron que tienen la apoptosis disminuida hasta en un 33% para garantizar el mantenimiento del pool de células en periferia (54).

Los RTEs CD4 y CD8 permanecen en el nódulo linfático hasta que completan su maduración y se convierten en células T naive. Los LT naive permanecerán en ese estado hasta que reconozcan el antígeno específico, presentado por células dendríticas (DC) que llegan al nódulo linfático. Cuando el LT naive reconoce el péptido, se forma un complejo APC-MHC I/II con el LT CD4/CD8 que genera la primera señal inmunológica y

luego recibe la segunda señal de activación a través de la molécula B7. Esto hace que se active la producción de IL-2 por parte del LT, que ejerce una acción autocrina para activar la expansión clonal de la célula T activada. Se acepta que a partir de esta expansión el LT deja de ser naive y continúa hacia el proceso de diferenciación (Figura 1.8). En este proceso de diferenciación participan citoquinas claves como son la IL-4, IL-10 e IFN- γ . Algunos de los LT activados dejan el órgano linfoide donde ocurrió la activación y entran en circulación como células efectoras. Otras células, particularmente las CD4+, permanecen en el órgano linfoide para inducir diferenciación del linfocito B hacia célula plasmática secretora de anticuerpos específicos contra el antígeno que indujo la activación de la célula T. Las células T efectoras pueden migrar hacia cualquier sitio del organismo donde haya una infección o una inflamación. Allí, se encuentran con el antígeno específico que las activó. Muchas de estas células actúan bien como secretoras de citoquinas y activadoras de otras células inmunológicas (como es el caso de los LT CD4), o bien destruyendo las células afectadas (como en el caso de los LT CD8). En esta fase los receptores de superficie cambian y pasan a ser LT (CD4 o CD8), CD45RA⁻, CD45RO⁺, CD31⁻ y la expresión de quimocinas y sus receptores también se modifica, especialmente la del CCR7.

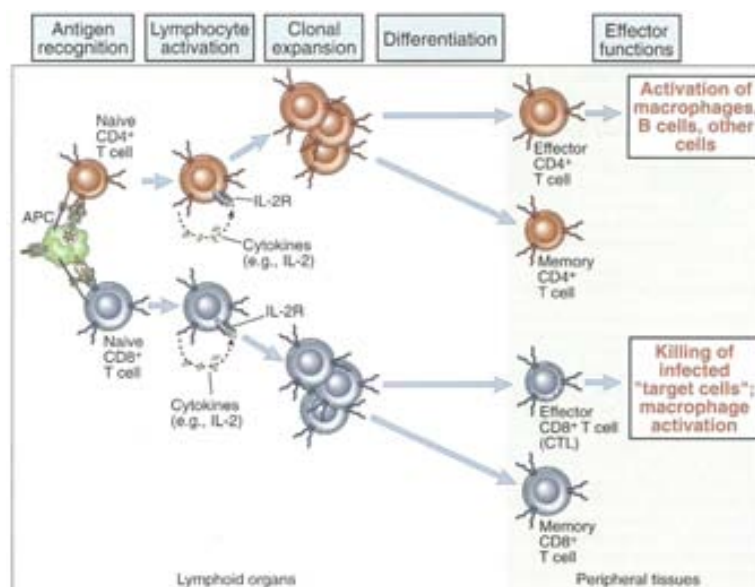


Figura 1.8. Diferenciación y activación de las células T periféricas. Adaptada de Abbas, AK. 2007.

Después de que los LT CD4 y CD8 cumplan su función, muchas de estas células entran en apoptosis y son eliminadas para recobrar los niveles basales de LT en circulación, mientras que otro grupo se diferencia hacia células T de memoria que serán las encargadas de responder rápidamente frente a un segundo reto contra el mismo antígeno para el cual fueron educadas. La función de las células T de memoria ya solo dependerá de la primera señal del TCR, ya que en este caso las señales co-estimuladoras no son requeridas.

1.17 Epigenética y linfocitos T

En los últimos 50 años se avanzó en la comprensión de los mecanismos moleculares que regulan la expresión génica en eucariotas y se identificaron nuevos procesos que intervenían en dicha regulación. Estos nuevos procesos parecían relacionados con la diversidad morfológica y funcional de las células y tejidos, y se les denominó **epigenética**, que es “el estudio de los cambios heredables meióticos y/o mitóticos en la función génica que no pueden ser explicados por cambios en la secuencia del DNA”. Los diferentes procesos que esta definición involucra, están basados en la modificación de la cromatina y la accesibilidad al DNA, por medio de varios aspectos: i) modificaciones de las histonas, que pueden regular el inicio de la transcripción. ii) la acción de los microRNAs (miRNAs) que son pequeñas moléculas de RNA con aproximadamente 22 nucleótidos que participan en la regulación negativa de su gen blanco, al cual son complementarios. Los miRNA pueden unirse creando una interferencia postranscripcional, y iii) la metilación del DNA, que es el proceso epigenético de células eucariotas más avanzadas y que se describe como el más común en mamíferos. La metilación está involucrada en identidad celular, control de la expresión génica específica de tejido, modificaciones celulares dependientes de la edad, la alimentación y el ambiente. También, comienza a tomar fuerza como biomarcador en algunas patologías.

1.18 Modificación de las histonas

Este mecanismo es conocido por el profundo efecto que tiene en el control de la expresión génica y se basa en la observación de que el DNA no está “desnudo” sino que, por el contrario, se encuentra formando un complejo íntimamente ligado a las histonas que se encargan de mantenerlo plegado y comprimido. Esta estructura conforma la cromatina que da forma y estabilidad a los cromosomas.

La cromatina es una estructura conformada por unidades que se repiten y que reciben el nombre de nucleosoma. El nucleosoma, a su vez, se conforma por un octámero de proteínas que contiene dos moléculas de cada histona (H2A, H2B, H3 y H4). Alrededor del octamero de histonas se plega una cadena de DNA de 147 pares de bases (pb) de longitud. Los nucleosomas son estructuras dinámicas que pueden tener muchas configuraciones, lo que hace que la cromatina adquiera diferentes características a lo largo del genoma y pueda presentarse de dos maneras: accesible o abierta, que en tal caso se conoce como eucromatina y se asocia con el favorecimiento del inicio de la transcripción génica; o cerrada y condensada, en cuyo caso se denomina heterocromatina y está asociada con la regulación negativa de algunos genes.

Se conoce que los cambios en la cromatina se regulan por modificación de las histonas, y tales modificaciones pueden ser acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinización, deaminación, e isomerización de las prolinas presentes en cada proteína (133). En mamíferos las modificaciones que sufren las histonas son principalmente postransduccionales y se encuentran más comúnmente en sus extremos C-terminal o N-terminal. La combinación de modificaciones en las histonas, son propias de cada tejido y de cada tipo de célula, siendo interpretados como el código epigenético de la maquinaria celular o “código de histonas”. Las modificaciones más comunes en mamíferos son la acetilación y la metilación. La acetilación es el proceso mejor entendido hasta el momento; se sabe que las lisinas (K) en las posiciones 9 y 14 de todas las histonas pueden ser acetiladas por medio de las enzimas histona-

acetiltransferasas (HATs), las cuales catalizan la unión de grupos acetilos, mientras que las histona-deacetilasas (HDACs) son enzimas que ayudan en la remoción de los grupos acetilos. Ambos grupos de enzimas actúan en conjunto para mantener el balance entre histonas en todas las células (134-136). La histona H4 clave en la compactación de fibras de DNA, a diferencia de las demás histonas, sufre un proceso de acetilación en K16, el cual se asocia con disminución o pérdida de factores de unión entre histonas, lo que genera descompactación de la cromatina, e inicio de transcripción (137,138). La metilación de las histonas por su parte es una modificación más estable que la acetilación. La histona H3 es la que tiene un mayor grado de metilación, seguida de la histona H4. También pueden metilarse las K, en los residuos 4,9, 27 y 36 de la H3, y en la posición 20 de la H4. Los patrones de metilación de estas dos histonas, H3 y H4, son un marcador epigenético importante para monitorear el estado de la cromatina a largo término (139). Las enzimas histona-metiltransferasa (HMTs), son las encargadas de regular el sitio específico de metilación de los residuos de lisina. Se sabe que la hiperacetilación de la H3 combinada con dos o tres sitios metilados en K4 (H3K4me2, K4me3) se asocia con descompactación de la cromatina y accesibilidad al DNA incrementando la actividad transcripcional del gen, mientras que la metilación de histonas, como por ejemplo H3K9me2/3 y H3K27me3 constituye un marcador de represión de la transcripción y condensación de la cromatina.

1.18 MicroRNAs:

Los miRNAs comprenden una clase de pequeños RNAs no codificantes con un tamaño entre 18-25 nucleótidos. Estos miRNAs no codifican para ninguna proteína, pero en cambio pueden ser complementarios a cadenas de DNA o RNA, interfiriendo en su traducción. En humanos, se conocen hasta el momento más de 1100 miRNAs diferentes (miRBase: the microRNA international database, <http://www.mirbase.org/>) (140-142). Muchos de estos miRNAs están involucrados en los procesos de

interferencia del RNA (RNAi). Los miRNAs también están involucrados en la estabilidad de los telómeros, la inducción de la recuperación de la heterocromatina y, la diferenciación celular. Se sabe que intervienen en procesos fisiológicos y patológicos y su biogénesis ha sido muy bien estudiada (143). Sin embargo, algunos aspectos siguen sin ser resueltos, como por ejemplo el mecanismo que regula su expresión y que genes son regulados por cada miRNA identificado. Los miRNAs se asocian con proteínas de la familia argonauta (AGO) y todos intervienen en la unión de complejos proteicos a secuencias específicas del DNA y el RNA (144-146). Esta actividad se identificó como un proceso clave en el control de la diferenciación tisular y el mantenimiento de la identidad de tejidos durante la embriogénesis y la vida adulta (146). Los miRNA participan en los circuitos de regulación epigenética, involucrando los elementos que actúan en *cis* de los diferentes factores de transcripción en regiones promotoras putativas. Se observa que los sitios de unión de los miRNA se encuentran presentes principalmente en las regiones 3' UTRs de los genes y que cada grupo de miRNAs es específico de un tipo celular, pero aún queda por correlacionar cada miRNA con el gen que regula y la función que este cumple. Se ha identificado la importancia de esta regulación en procesos tumorales, de envejecimiento y desarrollo y en cambios génicos asociados con la metilación del DNA (147).

1.19 Metilación del DNA

La metilación del DNA es un mecanismo vital en la expresión de genes durante el desarrollo normal y también, en la etiología de muchas patologías. Juega un papel clave en el *imprinting* genómico, la inactivación del cromosoma X, la estabilidad del genoma y en el silenciamiento de retrotransposones a largo término. La metilación del DNA en células de mamíferos se da por la adición covalente y heredable de un grupo metilo al carbono 5 de los residuos de citosinas en el DNA (5meC). La metilación del DNA es

catalizada por las enzimas DNA metiltransferasas (DNMTs), principalmente en secuencias que contienen dinucleótidos CG, sobre los cuales puede modificar la expresión y actividad génica (148). En vertebrados, el 70-80% de los dinucleótidos CG se encuentran metilados, especialmente en regiones intergénicas; por el contrario hay unas zonas, ricas en dinucleótidos CG, llamadas **islas CpG (CGIs)**, que poseen al menos 300 pb de longitud y que **se caracterizan por no estar metiladas** en diferentes organismos, pero especialmente en el humano y el ratón. Estas mantienen una cromatina permisiva a la transcripción.

Generalmente, las CGIs se ubican cerca a los sitios de inicio de transcripción (TSS) de muchos genes. El 70% de los promotores génicos de mamíferos poseen estas CGIs (149,150). Los mecanismos por los cuales se mantienen las CGIs no metiladas aun no son muy claros, pero se sabe que involucran procesos complejos que tienen que ver con la función de las enzimas DNMT, la modificación de las histonas y la unión de factores de transcripción (151-153). Aunque, la mayoría de CGIs en regiones promotoras están no metiladas, se ha observado que algunas se metilan de forma tejida específica, especialmente durante la diferenciación y desarrollo temprano de las células.

1.19.1 Características y funciones de las CGIs

Los últimos hallazgos han clasificado las CGIs por subclases, de acuerdo con su ubicación en el genoma. La característica más recientemente encontrada es que hay un 50% de CGIs ubicadas en sitios muy remotos en relación a los TSSs de los genes. Aún así, parecen influir sobre la función promotora y los mensajes de inicio de la transcripción (154-157). Otro grupo de CGIs se ha encontrado en regiones intragénicas, que abarcan los primeros exones e intrones del gen, donde el papel como reguladoras

de la expresión aun no esta claro (158,159). Sin embargo, estudios amplios del genoma completo, muestran que estas CGIs también interviene en la regulación de los genes, lo que sugiere que la metilación es un mecanismo regulador de la expresión a diferentes niveles (160-162). Por tanto las CGIs, pueden clasificarse por su ubicación en promotoras, intergénicas o intragénicas, estas dos últimas también se denominaron CGIs huérfanas (154,163), ya que su función sigue siendo incierto. Lo que parece estar más claro ahora es que la distribución de la metilación y las CGIs huérfanas y promotoras dentro de los genomas puede ser una característica evolutiva de las especies que va diferenciándose según su complejidad. Por ejemplo la distribución de las CGIs se encuentra altamente compartida por el genoma humano y el de ratón (figura 1.9), pero difieren significativamente del de plantas y drosófilas, por ejemplo (163).

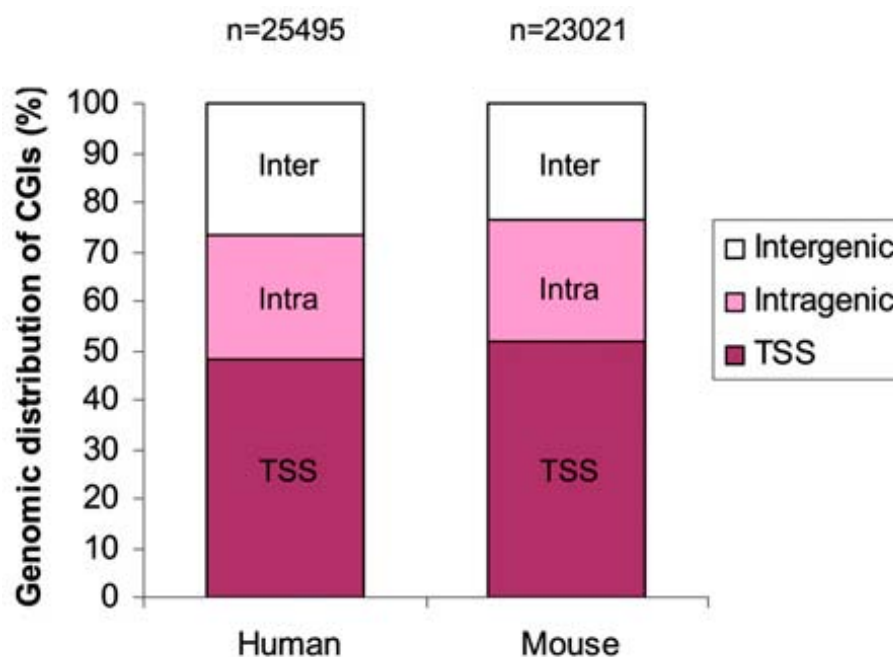


Figura 1.9. Distribución del total de CGIs encontradas en el genoma humano y el de ratón. Adaptada de Deaton AM y Bird A, 2011.

Se sugiere que las CGIs huérfanas están ubicadas en promotores alternativos que aun no se han identificado y parecen actuar en forma específica en cada tejido, lo que amplía la importancia de la metilación en el genoma humano (164-169). Interesantemente, se halló que el 34% de CGIs ubicadas en regiones intragénicas

estaban metiladas, lo que sorprende, si se considera que sólo el 2% de las CGIs en regiones promotoras lo están (158). Esto sugiere que la metilación en el cuerpo de los genes tiene un mayor papel en regular la expresión génica específica de contexto y de tejido.

Por otra parte las CGIs ubicadas en los promotores tienen características que las diferencian de las demás, por ejemplo, están presentes principalmente en genes que carecen de cajas TATA y que muestran heterogeneidad en sus TSSs. Se ubican preferencialmente en la región entre los 50-100 pb del TSS, al parecer como indicadores de que la maquinaria transcripcional tiene condiciones favorables en ese gen, lo que explica que generalmente no estén metiladas. Pero también se encuentran metiladas en algunos pocos casos y se asocian con silenciamiento total del gen (163).

Además, las CGIs en las regiones promotoras se han clasificado en tres clases dependiendo de la proporción de CpG, del contenido de GC y del tamaño que conforma la región (170): de alto contenido de CpG (HCP), predominantemente hipometiladas; de bajo contenido de CpG (LCP), que no necesariamente corresponden a CGIs y se encuentran comúnmente metiladas; y las de contenido intermedio (ICP), que entran justo en el criterio para CGIs y que presentan un patrón de metilación variable (171). Algunos autores han podido identificar que la actividad de muchos promotores concuerda con el grado de metilación del DNA (170) y la localización de la CGIs en el gen (172). Al parecer los promotores que poseen CGIs HCP e ICP principalmente regulan la transcripción a través de modificaciones a la estructura de la cromatina y se combinan con otros mecanismos epigenéticos para el control transcripcional (173-175). Las CGI intragénicas presentan niveles variables de metilación y tienen la particularidad de que los niveles de metilación decrecen e incrementan cuando cruzan las uniones de exones e intrones y en los sitios de terminación de la transcripción (TTS) (163). Estas variaciones en la metilación a lo largo del cuerpo del gen es lo que puede constituir un patrón para cada célula. Las CGIs huérfanas están asociadas con nuevos transcritos y

pueden representar la mayoría de la expresión génica restringida a tejidos y regulada por metilación específica del DNA (154, 159, 161).

Recientes estudios indican que el 76% de la metilación diferencial de los tejidos se encuentra en regiones adyacentes de las CGI denominadas las “orillas de las islas” (*CpG Island Shores*, CGIsS) (176). Esta es una característica muy común en poblaciones hematopoyéticas, donde las CGIsS exhiben gran variabilidad en la metilación del DNA y esta variabilidad se correlaciona directamente con cambios en la expresión génica (177).

Entre las funciones que se les atribuyen a las CGIs, están el silenciamiento o activación de genes por dos diferentes procesos: i) por influir directamente sobre la unión de factores de transcripción al DNA, pues se sabe que los sitios de unión para ellos en el genoma de mamíferos son ricos en GC y que muchos de estos factores contienen secuencias de reconocimiento CpG (178); ii) por interactuar con proteínas con dominios de enlace a grupos metilo (MBD) que pueden reconocer directamente el DNA metilado y reclutar complejos modificadores de la cromatina (179).

Actualmente, los métodos avanzados de ultrasecuenciación han permitido encontrar que hay un gran número de metilaciones que no necesariamente se dan como 5meC y que pueden presentarse como metilaciones CpHpG y CpHpH trinucleótidos (H= A, T, C). Este fenómeno ocurre más comúnmente en células madre humanas embrionarias (hESCs) y en casos más infrecuentes en células ya diferenciadas. En cuanto a las células diferenciadas, se encontró que un 20% de la metilación en CpG es externa a CGIs y se observa también que hay una alta frecuencia de 5meCpA en todo el genoma (161,162) pero estos hallazgos requieren aún de más estudios que expliquen sus propiedades funcionales en la diferenciación celular, la identificación de patrones de metilación y la regulación de la expresión génica (Figura 1.10).

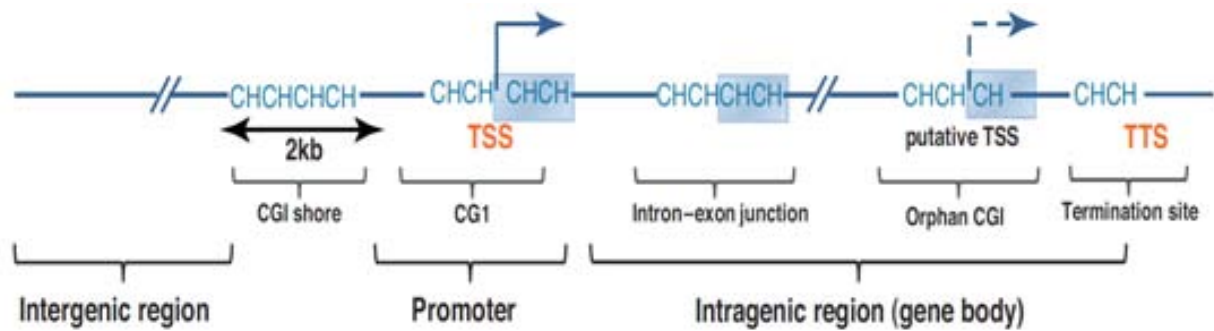


Figura 1.10. Clasificación de las CGIs en el genoma humano y clases de metilación identificadas hasta el momento. Adaptada de Matladi N, et al. Trends Biochem Sci, 2011.

1.19.2 Regulación de la metilación del DNA

El proceso de metilación del DNA es una modificación química muy regulada, que se caracteriza por ser heredable y semi-conservativa. Cualquier alteración en este proceso puede tener implicaciones funcionales, fenotípicas y patológicas. En células de mamíferos la metilación es regulada por la actividad enzimática de las DNA metiltransferasas (DNMTs) que actúan bien sea en el mantenimiento de la metilación o en la metilación *de novo*. La regulación de la metilación en humanos comienza hacia el día 11 de gestación y se da primordialmente en células germinales, luego se pasa a una re-metilación de todo el genoma, donde la metilación *de novo* tiene una función primordial. Finalmente, se fijan los patrones de metilación específica de género y sitios de *imprinting* de metilación que conforman las regiones diferencialmente metiladas (DMR) dentro del genoma. De esta manera también se regula la inactivación del cromosoma X.

Después de regulados los procesos de metilación durante la etapa gestacional, comienzan las regulaciones específicas de tejido; en esta fase también participan las DNMTs identificadas en mamíferos que son DNMT1, DNMT3A y DNMT3B.

La DNMT1 es una enzima de mantenimiento que se encarga principalmente de metilar el DNA hemimetilado después de la replicación de sus cadenas durante el ciclo celular. Las DNMT3A y DNMT3B en cambio, se asocian con metilación *de novo*. Los procesos de metilación *de novo*, son restringidos a estadios pluripotenciales de las células (181). Además, son claves en la inactivación de genes como el caso de la IL-2 durante la diferenciación de LT (180) y en procesos patológicos como el de la hipermetilación de genes supresores de tumores, proceso clave en la generación del cáncer (Figura 1.11).

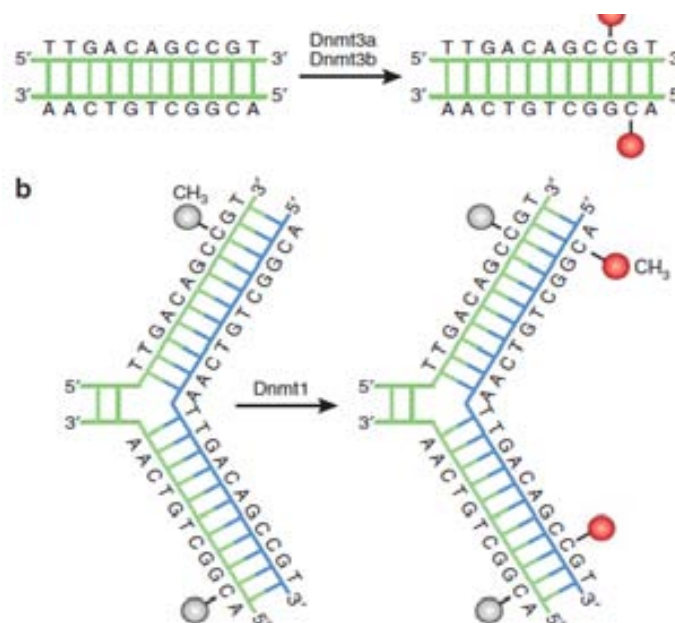


Figura 1.11. Vías de metilación del DNA en mamíferos. **A.** Metilación *de novo* por acción de la DNMT3A y DNMT3B. **B.** Mantenimiento de los patrones de metilación del DNA después de la replicación, mediada por acción de la DNMT1 que mantiene la metilación en las cadenas hijas. Adaptado de Fan G, et al. Neuropsychopharmacology 2012.

Metilación del DNA en la diferenciación de Linfocitos T

Las células madre específicas de tejido son las responsables del desarrollo y la regeneración de órganos completos. Estas células tienen el potencial de autorenovarse

y pueden replicarse con un programa previamente introducido, pudiendo diferenciarse hacia progenitores con un potencial de desarrollo más restringido.

El sistema hematopoyético y en particular el desarrollo de los linfocitos, es uno de los sistemas de diferenciación más complejos y bien establecidos. El estudio de los mecanismos epigenéticos que controlan la adopción del linaje linfoide sigue siendo muy activo. El esquema de diferenciación del sistema hematopoyético desde las células madre hematopoyéticas hasta las células sanguíneas ha estado bien caracterizado, gracias a la posibilidad de identificar y separar muchos de los estadios celulares con el uso de marcadores de superficie y las técnicas de FACS. Sobre estas poblaciones purificadas el estudio de la epigenética adquiere mucho más sentido y, hasta ahora, el linaje más estudiado es el de los linfocitos B (182).

Como se mencionó antes, el desarrollo del linaje T involucra una serie de diferenciaciones celulares secuenciales, binarias e irrevocables. Primero está la elección entre LT y LB, luego viene la elección del $TCR\alpha\beta$ o $TCR\gamma\delta$, seguida de la decisión entre CD4 o CD8 y posteriormente en periferia la de linaje Th1, Th2, Treg, etc. Este desarrollo requiere, en un primer nivel, de modificaciones transcripcionales que involucran interacción de factores de transcripción y elementos reguladores o potenciadores de la expresión génica y, en un segundo nivel, se requiere de los procesos epigenéticos que regulen la accesibilidad de los factores de transcripción a las regiones reguladoras y a la cromatina (183-186).

La DNMT1, por ejemplo, se requiere para la apropiada maduración de los progenitores tímicos en ratones. Mutaciones en esta enzima, conducen a una marcada demetilación del DNA en su paso hacia DP, lo que se asocia con una profunda disminución de células del linaje $TCR\alpha\beta$ y posterior reducción en todos los estadios del linaje T (187-189). En contraposición, estos mismos modelos muestran que el número de células

TCR $\gamma\delta$ incrementa en los ratones, pero con una replicación intratímica limitada (190,191).

Otros eventos epigenéticos que involucran el gen TCR tienen que ver con que los loci se encuentran normalmente metilados en los estadios de DN, pero luego de recibir las señales de activación a través de la vía de señalización de IL-7R, se inicia la demetilación de los sitios CpG en los loci, lo que da paso a la recombinación V(D)J permitiendo la formación del complejo pre-TCR (192-196). Los estudios sugieren que la demetilación del locus TCR γ también es necesaria para que el reordenamiento ocurra. (197)

En cuanto al gen CD4 se sabe que es reprimido de manera reversible en los timocitos DN y que luego se silencia definitivamente cuando la célula pasa de DP a SP8. Este silenciamiento es epigenéticamente regulado, pero la metilación del DNA al parecer no es necesaria.

En el CD8 en cambio se ha descrito una vía mediada por RUNX3 en la cual este gen puede mediar la unión de factores de transcripción e inducir deacetilación de las histonas, lo que induce el silenciamiento del gen CD8 (198,199). Pero, al parecer, los silenciamientos durante la diferenciación celular causan una regulación negativa definitiva y heredable de la expresión del gen CD8 en las células T CD4.

Hasta el momento, solo se ha reportado que la demetilación de los genes *CD8A* y *CD8B* ocurre durante la maduración de timocitos desde los DN hasta DP. Estos genes también se mantienen desmetilados en algunas células T SP4, lo que apoya la hipótesis de que los SP4 provienen de precursores CD8 (200, 201). La metilación también parece ser un proceso importante en los genes *CD8A* y *CD8B*, donde una remetilación *de novo* de estos genes, se observa en células que son seleccionadas negativamente antes de salir del timo (202). Un mecanismo directo relacionado con el gen *GATA3* y la

regulación epigenética de la expresión de CD8 no ha sido definido, como tampoco el papel que pueden jugar las proteínas MBD (203). En resumen los genes *CD4*, *CD8A* y *CD8B* están metilados en los estadios mas inmaduros de los timocitos hasta la fase de pre-T y pro-T1 y la de metilación de estos genes, además del TCR $\alpha\beta$, se correlaciona con el inicio de su expresión en los estadios de maduración de los timocitos desde DN hasta DP, pero luego el promotor de estos genes continua desmetilado en los estadios de maduración hasta SP4 (204-208).

Además de la regulación epigenética del TCR y los correceptores CD4 y CD8, también se ha evaluado el papel de la regulación epigenética en la diferenciación funcional de los LT. Algunos autores encontraron que la expresión de la IL-2 era potenciada cuando se inhibía la metilación del DNA (209). Este gen es quinescente, el DNA se encuentra metilado en la región promotora y el locus se mantiene totalmente inactivo con la cromatina en reposo hasta que la célula madura a LT naive (210,211). Los resultados sugieren que el gen de la IL-2 sufre una rápida demetilación del DNA en respuesta a mensajes de activación celular, que parece iniciarse 20 minutos después de la estimulación del LT naive y durante la fase S de la división celular, esta demetilación se da específicamente en un grupo de dinucleótidos CpG ubicados a 800 pb del TSS de la IL-2 (210). Los hallazgos sobre el papel de la metilación del DNA en la regulación de la transcripción de la IL-2 y la IL-4, han sido claves en cuanto a la activación y diferenciación de células T en periferia y es uno de los grandes avances en la asociación de la epigenética y el sistema inmune.

El IFN- γ fue una de las primeras citoquinas que se encontró que tenía regulación epigenética: se observó que cuando las líneas de células T se trataban con inhibidores de metilación, estas líneas aumentaban la expresión de IFN- γ (212, 213). Además, los niveles de metilación en el promotor del gen *IFN- γ* se correlacionaban inversamente con los niveles de expresión de las células en células T naive, memoria y entre neonatos y adultos y entre células Th1 y Th2 (213,214). El gen *IFN- γ* presenta un estado de

demetilación permanente y heredable en clones de células T CD8. También se observó, que metilaciones *de novo* en este gen se asocian con una reducida producción de esta citocina en las poblaciones de células T. Recientes estudios han aumentado el conocimiento de los cambios epigenéticos en el gen IFN- γ , que no solo incluyen metilación del DNA sino también acetilación de la H3 y H4 (215-220) y metilación de la H3K4-Me (216,219).

Las células Treg son otro grupo de LT sobre los cuales la regulación epigenética se encontró que tenía gran importancia. Las Treg naturales son producidas en el timo y se caracterizan por el fenotipo CD4⁺FOXP3⁺, mientras que en periferia las células T pueden adquirir un fenotipo de Treg por influencia del TGF- β , y esto parece estar mediado por regulación epigenética sobre el gen *FoxP3*. Se sabe que la metilación de sitios CpG específicos en las células T regulan la diferenciación de células Th en células Treg: específicamente la metilación de las CpG en la región entre -600 y -1 pb del promotor proximal de FOXP3. Esta región está encargada de regular su expresión. Así, entre el 10 y el 45% de los sitios CpG se encuentran metilados en células T naive CD4⁺CD25⁻, mientras que el 100% se encuentra desmetilado en las células Treg naturales. Se sabe también que el TGF- β puede inducir una desmetilación en el 70% de las CpG de células T CD4⁺CD25^{low} reguladoras inducidas (221, 223). En resumen, son muchos los genes del sistema inmune identificados hasta ahora en los cuales la metilación del DNA regula su expresión durante los proceso de activación y diferenciación de los LB, células NK y en especial de LT, en humanos, como puede verse en la Tabla 1.1.

Además, se ha encontrado que la metilación del DNA es un proceso clave en la plasticidad y flexibilidad de los LT CD4 en periferia (Figura 1.12). No obstante, aún se requieren muchos más estudios sobre los procesos de metilación, desmetilación y regulación epigenética en las etapas previas a la de LT naive y durante la transición de

timo a periferia, al menos en humanos, ya que al parecer los estudios realizados en ratón no son completamente extrapolables, en lo que a SP4, SP8 y RTEs se refiere.

Gen	Células	Función	Referencia
IFN- γ	CD4 (Th1) CD8	Citocina pro-inflamatoria.	(224)
IL-4	CD4 (Th2)	Citocina pleiotrópica de activación para Th2.	(225)
IL-13	CD4 (Th2)	Maduración y diferenciación de células B.	(225)
IL-17	CD4 (Th17)	Citocina pro-inflamatoria.	(226)
RORC	CD4 (Th17)	Factor clave de transcripción para diferenciación de células T efectoras Th17.	(226)
FoxP3	CD4 (Treg)	Factor clave de transcripción para diferenciación de células T reguladoras.	(227-230)
IL2	CD4, CD8	Activación y proliferación de LT y LB.	(231)
CCR6	CD4 memoria	Migración y reclutamiento de LT	(232)
PD1	CD8	Receptor inhibitorio de la coestimulación de células T	(233)
PRF1	CD8, NK	Molécula efectora que media citólisis por células T y NK	(234)
KIRs	NK	Regulación de muerte celular mediada por células NK	(235, 236)
NKG2A	NK	Reconocimiento de moléculas MHC clase I HLA-E en células NK	(237)
PU.1	LB	Regulación de la división del linaje entre mieloide y linfocito B	(238)
CD5	LB	Regulador negativo de la señalización por BCR	(239)
MHCII (DR-DQ-DP)	APCs	Presentación antigénica de péptido extracelulares	(240-242)
CD21	LB maduros	Receptor del fragmento C3d del complemento	(243)
IL-1B	Mo, M Φ	Citocina proinflamatoria	(244)
CD209 (DC-SIGN)	DC, M Φ	Facilitador del tráfico de DC y del contacto entre LT y DC.	(245)

Tabla 1.1. Genes humanos con función inmune cuya expresión es regulada por los niveles de metilación del DNA durante la activación y diferenciación de células linfoides reportados

hasta ahora. DC: célula dendrítica, Mo: Monocitos, MΦ: macrófagos. NK: células *natural killers*

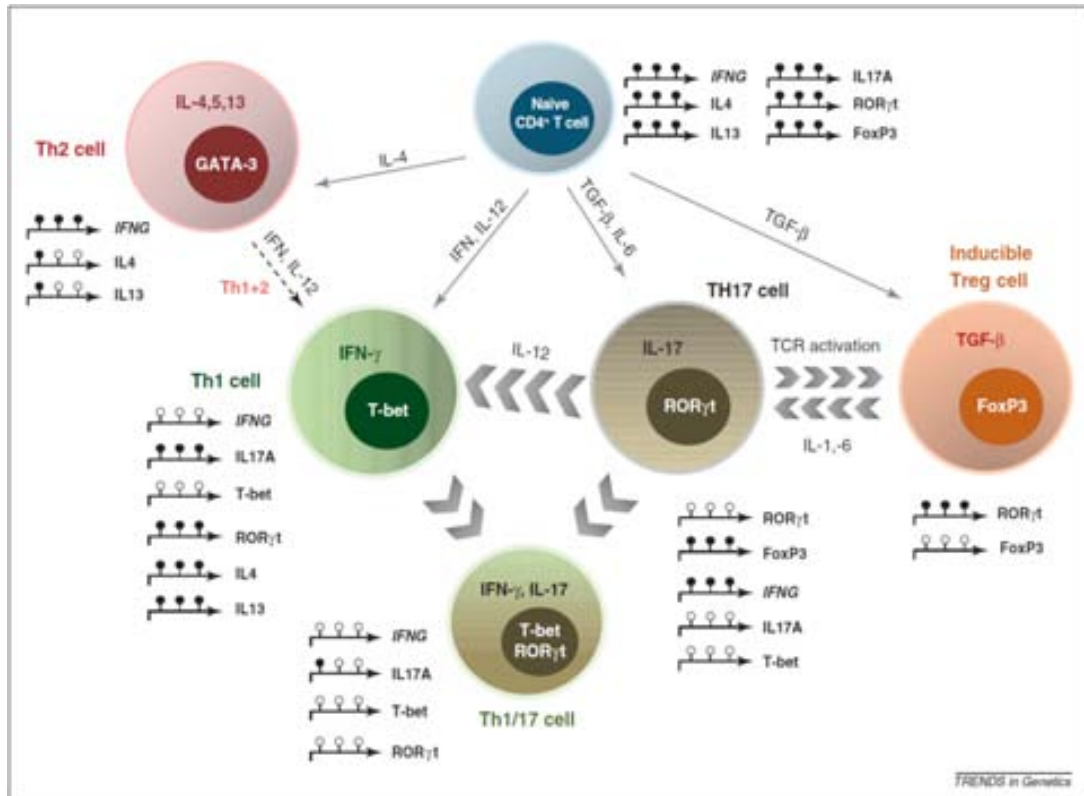


Figura 1.12. Esquema de los patrones de metilación de genes asociados con la activación y diferenciación de LT en periferia. Adaptada de López Larrea C, et al. *Trends in Genetic*, 2012 (246).

1.20 Métodos de estudio de patrones de metilación del DNA

La metilación del DNA tiene un papel muy importante en la biología del desarrollo, la edad y la etiología del cáncer y ahora también comienza a plantearse como un biomarcador molecular de identificación celular y de respuesta personalizada a tratamiento, lo que ha hecho que se desarrollen cada vez mas metodologías que permitan identificar los loci y cuantificar el grado de metilación que estos tienen. La metilación del DNA es usualmente analizada en el contexto de amplificación mediante PCR de segmentos de DNA tratados con bisulfito de sodio. Estos fragmentos de DNA

pueden tener todos los sitios CpG metilados, o por el contrario todos desmetilados o, en la mayoría de los casos, tienen un número variable de CpG metiladas y no metiladas, por lo que generalmente una mezcla de células tendrá muchas moléculas de DNA con diferentes grados de metilación. La heterogeneidad de la metilación puede tener diferentes niveles de complejidad, desde el más simple en el cual los alelos están todos metilados o todos no metilados; también puede ser una mezcla homogénea de células que puede tener ambos grupos de alelos, metilados y no metilados y la más compleja alternativa es una mezcla heterogénea de células pero también de alelos metilados, no metilados o con diferentes proporciones de metilación. Hasta ahora la complejidad de la metilación heterogénea de las células no está totalmente entendida (247, 248). Estas consideraciones obligan al desarrollo e implementación de nuevas y más complejas técnicas de detección y cuantificación. De acuerdo con el objetivo del análisis y el grado de resolución que se pretenda, será la metodología a emplear. En el caso de búsqueda de patrones de metilación como biomarcadores, por ejemplo, requiere que se lleve a cabo en una primera fase el análisis del estado general de metilación de las CGIs y luego un análisis cuantitativo y de identificación de posiciones o zonas metiladas diferencialmente entre diferentes células o estadios de desarrollo (249,250).

La prueba estándar para el análisis de metilación parte de la transformación del DNA con bisulfito de sodio. Esta transformación debe ser estrictamente controlada, ya que transformaciones parciales pueden generar una sobre estimación de sitios metilados en los análisis posteriores (falsos positivos). La mayoría de los métodos de análisis se basan en la amplificación por PCR de los loci que se desean analizar. El producto de la PCR corresponde al sitio delimitado por los oligonucleótidos específicos. El producto de la PCR siempre corresponderá a una mezcla compleja de muchos amplificados y de los heteroduplex formados por ellos. Después de la PCR que parte de un DNA tratado con bisulfito, los sitios CpG metilados se conservaran intactos, mientras que los sitios no metilados se convertirán en TpG (*ver el apartado métodos para más detalles*) y estos resultados permitirán continuar los análisis de los loci por diferentes técnicas que

pueden clasificarse en cuatro grandes grupos de análisis: el primer grupo utiliza primers que son específicos para la secuencia susceptible de estar metilada y discriminan directamente el estatus de metilación del DNA de partida, por tanto puede analizarse la presencia o ausencia de amplificación o hacer una discriminación de moléculas basada en el estatus de metilación. Este grupo incluye la PCR-MSP (*methylation specific primers*), o RT-MSP (*real time-MSP*) y son básicamente técnicas cualitativas de metilación (Figura 1.13A). El segundo grupo consiste en técnicas que permiten seleccionar secuencias metiladas, parcialmente metiladas y secuencias no metiladas, dependiendo de sus propiedades fisicoquímicas. Con estas técnicas se hacen análisis conformacionales de las cadenas sencillas de DNA (DNAss), ya que la adición de los grupos metilos pueden generar cambios conformacionales leves o fuertes según las características de las bases que conforman las cadenas. Los métodos más empleados en este grupo son la HPLC, el gradiente de electroforesis en geles desnaturalizantes o el *high-resolution melting* (HRM), que analiza el cambio en la temperatura de *melting* de las moléculas de DNA, la cual varía dependiendo de que la secuencia contenga C o T (metilada o no metilada respectivamente) (Figura 1.13B). Este grupo de pruebas ofrece resultados semi-cuantitativos y puede generar resultados cuantitativos si la muestra contiene moléculas con niveles de metilación muy homogéneos. El tercer grupo comprende las metodologías que investigan el nivel de metilación de uno o más sitios CpG y son por lo general dependientes de productos de PCR y se continúan con técnicas de secuenciación. A este grupo pertenecen la secuenciación directa de bisulfito, la pirosecuenciación, la espectrometría de masas y el análisis de metilación con *primers* sensibles a un solo nucleótido (MS-SNuPE), combinados con el análisis de restricción sobre bisulfito COBRA. En este tipo de técnicas se puede analizar el nivel de metilación para un sitio CpG dado y se podrá calcular como un promedio de su metilación de todos los posibles tipos de alelos amplificados durante la PCR (Figura 1.13C). Este grupo de técnicas son más cuantitativas que las anteriores, pero no permiten dar valores absolutos y en muchos casos puede no ser posible identificar la posición CpG que está metilada. El cuarto grupo puede examinar la metilación de cada

producto de PCR individualmente y esto se logra al clonar el producto de PCR y secuenciarlo o directamente secuenciando el amplificado sin clonar, utilizando alguna de las diferentes tecnologías de *next-generation sequencing* (NGS). Esta metodología es cuantitativa y permite establecer patrones de metilación y cuantificar el grado de metilación de los alelos metilados, no metilados o metilados en niveles variables, en muestras complejas o de las cuales se desconoce la complejidad de su patrón de metilación (Figura 1.13D).

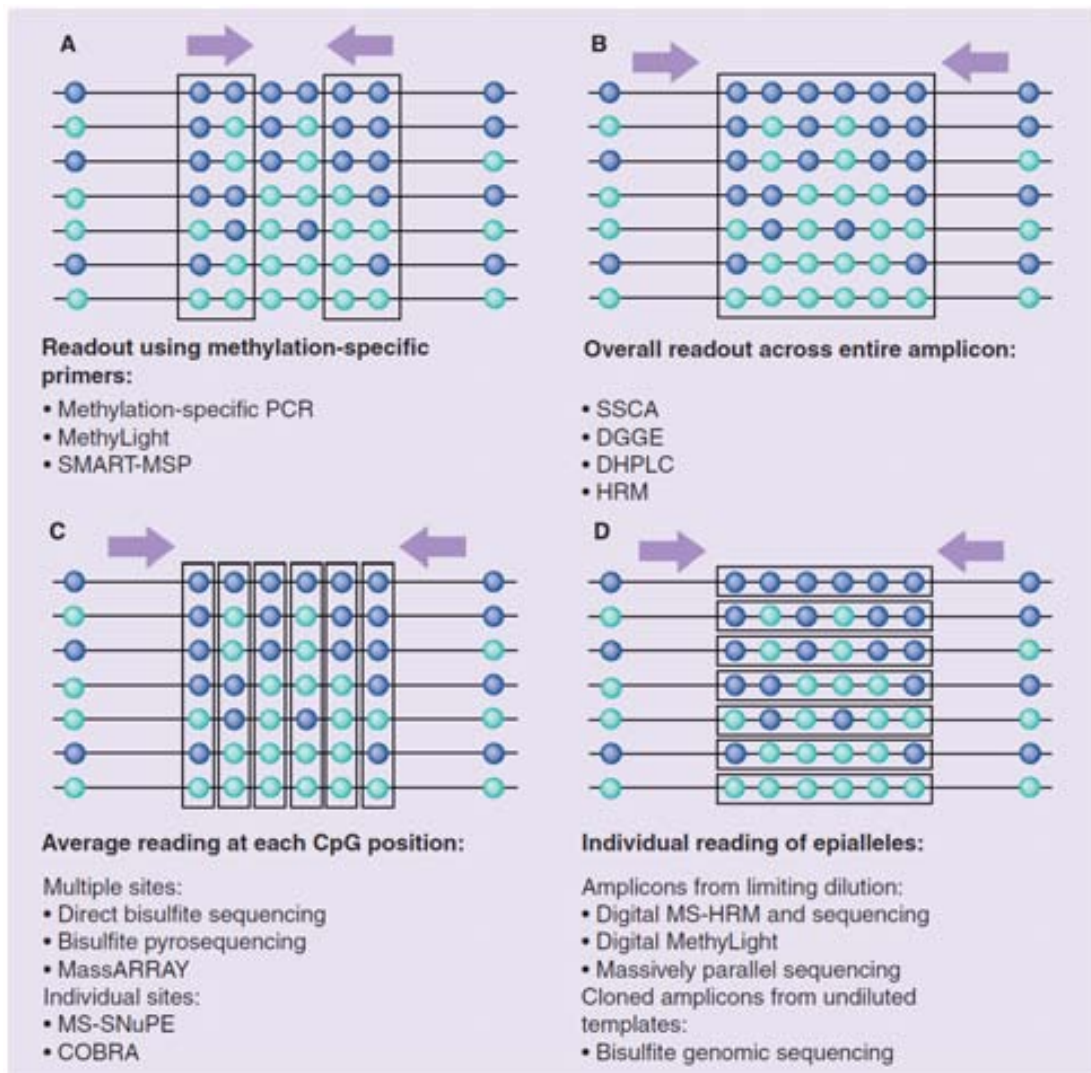


Figura 13 A-D. Técnicas usadas para el estudio de la metilación del DNA

Adaptada de Mikeska T et al. J Mol Diag. 2011.

HIPÓTESIS

2 HIPÓTESIS

La reconstitución del sistema inmune y en particular de los Linfocitos T, se considera un evento clave de muchos procesos fisiológicos, patológicos y terapéuticos. Experimentos realizados, principalmente en modelos murinos, permitieron identificar que existen dos vías para la reconstitución de células T en la periferia: 1) la dependiente de la función tímica que involucra la generación de células T naïve *de novo* a partir de timocitos y 2) la independiente del timo, que consiste en la expansión de las clonas LT maduros en periferia, por influjo de citoquinas. En humanos, la determinación de la función tímica para la reconstitución periférica de células T requiere de nuevos métodos que permitan identificar y cuantificar las células que recién emigran del timo. Hasta el momento se emplea para esto la fenotipificación por citometría de flujo con marcadores de superficie celular: CD45RA⁺CD45RO⁻CD62L⁺CD31⁺PTK7⁺. Además, se combina con un marcador molecular cuantitativo que consiste en determinar el contenido de sjTREC y β TRECs. No obstante, los métodos empleados, presentan desventajas metodológicas e interpretativas de la función tímica, por lo que la identificación y cuantificación de células *Recent Thymic Emigrants*, aún requiere de la búsqueda e identificación de nuevos marcadores cuantitativos.

Basados en lo anterior, planteamos como hipótesis que la metilación del DNA, juega un papel clave en la diferenciación e identidad celular en humanos y por tanto los perfiles de metilación del DNA de algunos genes, expresados diferencialmente en los estadios de maduración de los linfocitos T, como es el caso de los genes que codifican para los correceptores CD4 y CD8, establecen gradientes de metilación que permiten identificar los estadios de desarrollo de los linfocitos T y correlacionarlos con el *pool* de células T en sangre periférica.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

Basados en los datos bibliográficos y funcionales de los genes CD4 y CD8A, entre otros. Y luego de identificar *in silico* y confirmar que algunas de sus islas CpG se encuentran metiladas en tejidos totales, hemos planteado los siguientes objetivos concretos para la realización de ésta investigación:

- 1) Analizar los patrones de metilación de genes involucrados en los estadios de diferenciación de los linfocitos T mediante pruebas moleculares de metilación del DNA.
- 2) Diseñar una prueba molecular rápida, sensible y específica para identificar los patrones de metilación en los diferentes estadios de las células T y especialmente en emigrantes tímicos recientes. Además de explorar si la amplificación del DNA por PCR combinada con sondas FRET puede ser una nueva opción metodológica para el análisis de patrones de metilación en poblaciones celulares.
- 3) Evaluar la posible aplicación de los patrones de metilación estudiados, como marcadores de emigrantes tímicos recientes y compararlos con los marcadores de uso actual que son los TRECs, el PTK7, el CD31 y el CD45RA
- 4) Correlacionar los perfiles de metilación que puedan haber en los diferentes genes analizados con los estadios de maduración en las sub-poblaciones de linfocitos T provenientes de timo, sangre de cordón y sangre periférica.

MÉTODOS

4 MÉTODOS

4.1 Identificación *in silico* de islas CpG

Se empleó el UCSC (*University of California, Santa Cruz*) *Genome Browser* (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) (251) para predecir y localizar las CGIs en nuestros genes de interés. Adicionalmente, complementamos la información utilizando la plataforma de análisis y predicción de CGIs CpGPAP que consiste en una aplicación en red, cuya interfaz puede predecir el contenido de CGIs en secuencias genómicas presentes en los bancos de datos del genoma o en secuencias específicas de cada investigador (252). Las CGIs seleccionadas para el análisis, fueron aquellas que cumplían con los parámetros internacionales fijados por el consorcio para el estudio del metiloma humano (253,254): i) Fragmentos de DNA entre 200 y 3000 bp. ii) Un porcentaje de dinucleótidos GC, en dicho fragmento de DNA, superior al 50%. iii) Una relación de las CpG observadas vs las esperadas (O/E) mayor al 60%.

Previo al análisis bioinformático se estableció un listado de genes prioritarios, basados en reportes bibliográficos de que dichos genes presentaran algún tipo de regulación epigenética y/o, que estuvieran involucrados en el desarrollo y diferenciación de células T humanas (tabla 4.1). Se trataron con igual prioridad las CGIs localizadas en las regiones no traducidas y regiones promotoras de los genes de interés, que las CGIs intergénicas e intragénicas.

Locus	Islas CpG	Metilación en LT	Referencia
CD45	NO	ND	(251)
CD1A	NO	ND	(251)
TCR α	SI	SI (Timocitos DN)	(251,203)
CD34	NO	ND	(251)
RAG1	NO	ND	(251)
RAG2	NO	ND	(251)
CD3 γ, δ, ϵ	NO	ND	(251)
CD8A	SI	ND	(251)
CD8B	SI	ND	(251)
CD4	SI	ND	(251)
ThPOK	NO	ND	(251)
CCR9	NO	ND	(251)
CCR7	NO	ND	(251)
CD7	SI	SI (Marcador de leucemia)	(251, 255)

Tabla 4.1. Identificación de genes asociados con el desarrollo de células T que están asociados con CGIs o regulación epigenética.

4.2 Muestras y tejidos

Los análisis preliminares sobre el grado de metilación de las CGIs en los genes seleccionados y la puesta a punto de la técnica de secuenciación de DNA tratado con bisulfito, fueron llevados a cabo en 3 tipos de tejidos humanos totales: timo, tiroides y sangre periférica. Los detalles y resultados de esta primera fase exploratoria fueron ya publicados y se encuentran anexos a esta tesis (Anexo 1) (256).

Adicionalmente, se recolectaron y procesaron muestras de timo, sangre de cordón y sangre periférica para todos los experimentos descritos en esta tesis. Todas las muestras se obtuvieron con el previo consentimiento escrito y firmado por los pacientes y donantes o sus representantes legales en los casos de menores de edad. Para todos los procedimientos se contó con la aprobación del comité de ética de la institución. Los timos se obtienen de pacientes infantiles de la unidad de cardiología neonatal e infantil, sometidos a cirugía de corazón abierto en el Hospital Universitari Vall d'Hebron (HUVH). La sangre periférica de adultos y la sangre de cordón se obtuvieron de donantes sanos del Banc de Sang i Teixits (BST) de Catalunya. Datos demográficos de los pacientes incluidos en el estudio se encuentran registrados en la tabla 4.2.

4.3 Tratamiento de las muestras y obtención de células

Timocitos

Aproximadamente 5 g de tejido de timo, procedente de 9 infantes entre 1 y 48 meses de edad fueron sometidos a disgregación mecánica, por agitación a 4°C, durante 30 minutos en medio RPMI con suero fetal bovino (FCS) al 1%. A continuación, el tejido disgregado se filtró a través de una membrana de nylon de 70 μ m y se lavó tres veces con buffer fosfato salino (PBS) 1X que contenía FCS al 2% (PBSF). Cada lavado incluía una centrifugación de 5 minutos a 400 g. Al finalizar los lavados, las células fueron resuspendidas en PBS 1X y luego se realizó una lisis de eritrocitos con tampón de lisis (*BD Bioscience. Europe*) siguiendo las instrucciones comerciales. Luego de lavar los detritos celulares los timocitos obtenidos fueron filtrados por segunda vez y resuspendidos en *stain buffer (BSA)* (*BD Pharmigen. bioscience. Europe*).

Cada muestra de timo se sometió a recuento celular por citometría de flujo empleando el reactivo *perfect count microspheres/CyT-PCM100* (*Citognos, Salamanca, Spain*).

Brevemente, 25 μ l de las células en suspensión se mezclaron con 25 μ l de *perfect count beads* y se llevaron a un volumen final de 250 μ l, empleando *stain buffer*. Posteriormente, se cuantificaron las células en el citómetro FACS-CANTO II (BD Bioscience, San José, CA).

Tejido	Código	Edad	Sexo
Timo	TMB 428i	1 mes	Masculino
Timo	TMB 429i	22 meses	Masculino
Timo	TMB 431i	46 meses	Masculino
Timo	TMB 434i	1 mes	Femenino
Timo	TMB 435i	7 meses	Masculino
Timo	TMB 436i	9 meses	Masculino
Timo	TMB 438i	9 meses	Femenino
Timo	TMB 439i	5 meses	Masculino
Timo	TMB 441i	48 meses	Femenino
Sangre de cordón	CB1	N	ND
Sangre de cordón	CB2	N	ND
Sangre de cordón	CB3	N	Masculino
Sangre de cordón	CB4	N	Masculino
Sangre de cordón	CB5	N	Femenino
Sangre de cordón	CB6	N	Femenino
Sangre de cordón	CB7	N	Femenino
Sangre de cordón	CB8	N	Masculino
Sangre de cordón	CB9	N	Femenino
Sangre adulta	SP1	ND	ND
Sangre adulta	SP3	52 años	Femenino

Sangre adulta	SP4	47 años	Femenino
Sangre adulta	SP5	38 años	Femenino
Sangre adulta	SP6	57 años	Femenino
Sangre adulta	SP7	ND	ND
Sangre adulta	SP8	23 años	Femenino
Sangre adulta	SP9	27 años	Masculino
Sangre adulta	SP10	38 años	Masculino

Tabla 4.2. Datos demográficos de los individuos donantes de los diferentes tejidos. Edad en meses o años, sexo. **ND:** No dato. **N:** neonato.

Células mononucleares de sangre periférica y cordón umbilical

Muestras de sangre periférica de 9 donantes sanos entre los 23 y 52 años de edad y 9 muestras de sangre de cordón fueron procesadas para la obtención de las poblaciones linfocitarias.

Se emplearon 50 ml de cada muestra de sangre, tanto de cordón neonatal como de sangre adulta. Las muestras se diluyeron volumen a volumen con PBS 1X (pH 7,2). Luego fueron centrifugadas a 400 g durante 10 minutos. Después de centrifugar, se descartó el plasma y las células fueron diluidas nuevamente en PBS 1X para luego realizar una separación de los PBMC por gradiente de densidad, centrifugando cada muestra por 25 minutos con Ficoll-Hypaque (*Histopaque 1077. Sigma Aldrich. Europa*). La fracción de PBMC fue recolectada en *stain Buffer (BD Pharmigen, bioscience. Europe)* y se realizó el recuento celular bajo el mismo protocolo empleado para los timocitos.

4.4 Tinción con anticuerpos y separación de poblaciones celulares por FACS

De cada muestra de timo se emplearon 25×10^6 células totales. Las células se marcaron durante 45 minutos a temperatura ambiente y protegidas de la luz, empleando los siguientes anticuerpos: anti-CD3^{APC}, anti-CD4^{FITC} y anti-CD8^{PE} (BD Pharmingen bioscience. Europe). Posteriormente se procedió a la separación de 4 diferentes poblaciones de timocitos: DN, DP, SP4 y SP8 (tabla 4.3).

Tejido	Población celular	Fenotipo
Timo	Timocitos DN	CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁻
	Timocitos DP	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺
	SP CD4	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻
	SP CD8	CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁺
Sangre Cordón	CD4-RTE	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻ CD45RA ⁺ CD62L ⁺ CD31 ⁺
	CD8-RTE	CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD62L ⁺ CD31 ⁺
	CD4-Naive	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻ CD45RA ⁺ CD62L ⁺
	CD8-Naive	CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD62L ⁺
Sangre Adulta	CD4-RTE	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻ CD45RA ⁺ CD62L ⁺ CD31 ⁺
	CD8-RTE	CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD62L ⁺ CD31 ⁺
	CD4-Naive	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻ CD45RA ⁺ CD62L ⁺
	CD8-Naive	CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD62L ⁺
	CD4-memory	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻ CD45RA ⁻
	CD8-memory	CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁺ CD45RA ⁻

Tabla 4.3. Fenotipo de cada una de las poblaciones celulares separadas por FACS según el tipo de muestra. **DN:** timocitos dobles negativos, **DP:** timocitos dobles positivos, **SP:** timocitos *single positive*. **RTE:** *Recent thymic emigrants*.

En cuanto a las células de sangre de cordón y sangre periférica de adultos, se emplearon 30×10^6 PBMCs y se marcaron durante 45 minutos a temperatura ambiente y protegidas de la luz, usando los siguientes anticuerpos: anti-CD3^{V450} (*BD Horizon*), anti-CD4^{PECy7}, anti-CD8^{PerCp}, anti-CD45RA^{FITC}, anti-CD62L^{PE} y anti-CD31^{Alexa647} (*BD Pharmingen bioscience. Europe*).

Después de marcar las células se separaron 6 diferentes poblaciones de LT de sangre adulta y 4 poblaciones de LT de sangre de cordón (tabla 4), empleando el equipo FACS-ARIA II (*BD Biosciences. San José. CA*). Cada población se recolectó en tubos que contenían 2 ml de PBS 1X y FCS al 2%. La pureza de cada población celular se evaluó sobre 5000 eventos de la ventana de CD3⁺ y luego se confirmó su fenotipo. Para evaluar la pureza de las poblaciones se empleó el citómetro FACS-CANTO II (*BD Bioscience. San José. CA*).

Las células separadas se centrifugaron a 400 g durante 6 minutos. El sobrenadante fue descartado y las células fueron lisadas y congeladas en nitrógeno líquido durante 15 minutos para luego almacenarlas a -80 °C, hasta la extracción posterior de DNA genómico y RNA total.

Para todos los marcajes celulares de cada muestra se incluyeron los siguientes controles: muestra no marcada y controles de población positiva y negativa, empleando la técnica de FMO (*Fluorescence minus one*) para poblaciones continuas, las cuales permitieron fijar las ventanas de análisis. Este último control se empleó específicamente para paneles de más de cuatro fluorocromos, como en el caso de las poblaciones de sangre periférica y de sangre de cordón.

4.5 Extracción de DNA genómico y RNA total

El DNA genómico (gDNA) y el RNA total de todas las poblaciones linfocitarias de timo, sangre periférica y sangre de cordón fueron obtenidos empleando el kit comercial ZR duet DNA/RNA (*ZymoResearch corp. USA*). Este kit permite extraer el RNA y el DNA partiendo de la misma muestra. Esto nos pareció apropiado para poder correlacionar los resultados de metilación del DNA con los resultados de expresión génica en cada población de LT. Todas las muestras se procesaron siguiendo las instrucciones del fabricante. Además, en todos los casos se trataron las muestras de RNA con 10 UI de DNasa a 37°C, durante 15 minutos, de acuerdo con lo sugerido en el protocolo para evitar contaminación con gDNA. La concentración y pureza del gDNA y del RNA se midió en todas las muestras por espectrofotometría con el equipo *Nanodrop ND-1000 Spectrometer (Thermo Scientific. USA)*. La calidad de ambos fue calculada con la relación de absorbancia A260/A280 y A260/A230.

El gDNA fue almacenado a -20 °C, hasta su tratamiento de conversión con bisulfito, mientras que el RNA fue almacenado a -80 °C, hasta su utilización en la síntesis de DNA copia (cDNA) y la cuantificación de la expresión génica.

4.6 Tratamiento del gDNA con bisulfito

Un total de 117 muestras de gDNA (27 de timocitos, 54 de sangre periférica adulta y 36 de sangre de cordón) fueron transformadas con bisulfito de sodio, un compuesto químico, capaz de mediar en la deaminación de citosinas a uracilos en el DNA desnaturalizado de cadena sencilla. En el caso de las citosinas metiladas dentro de la cadena de DNA, estas quedan protegidas de la acción del bisulfito y se conservan sin ningún cambio (257,258) (figura 4.1).

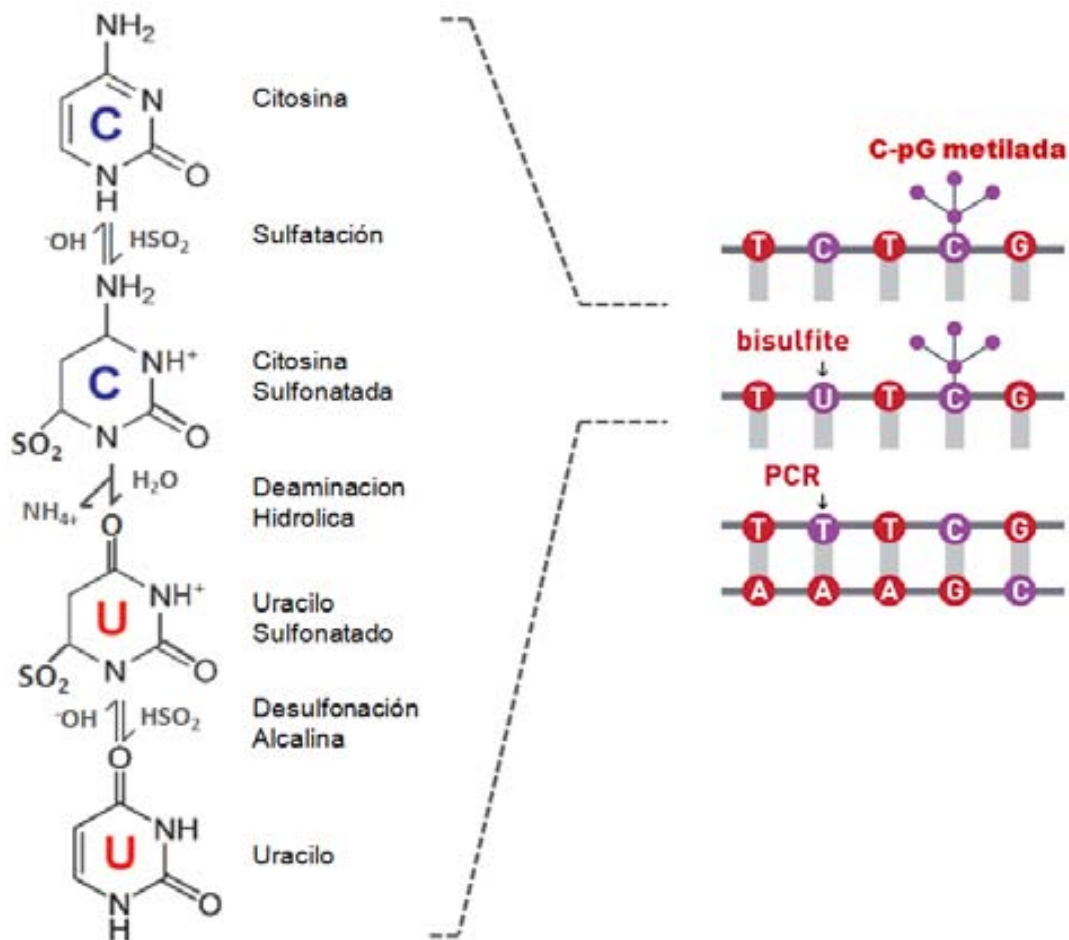


Figura 4.1. Esquema de reacciones generadas durante la conversión del DNA al ser tratado con bisulfito de sodio y el sistema de complementariedad de las bases en la doble cadena del DNA durante el tratamiento y después de la amplificación por PCR.

La conversión del DNA con bisulfito es posible si se controlan las condiciones adecuadas de tiempo y temperatura de desnaturalización de la doble cadena de DNA y la concentración de sales durante la reacción. Aun así, el tratamiento es muy agresivo y entre el 5 - 20% del gDNA total puede ser degradado (259). Para nuestros experimentos, el tratamiento del DNA se realizó con el kit comercial EZ DNA Methylation™ Kit (Zymo Research Corporation. USA), siguiendo las instrucciones del fabricante, como se describe a continuación: para obtener una óptima conversión del DNA, empleamos entre 250-500 ng de gDNA. El DNA fue desnaturalizado con 50 μ l de Zymo M buffer que contiene NaOH y esta reacción se incubó durante 15 minutos a

37°C. Después se adicionaron 150 μ l de reactivo de conversión CT recién preparado a cada muestra. Esta mezcla fue incubada a 50°C durante 16 horas y protegida de la luz. Pasado este tiempo, el DNA transformado por el bisulfito se une a una columna de afinidad y es desulfonado con el reactivo *M-Desulphonation buffer*, durante 20 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, el gDNA transformado por el bisulfito se eluyó de la columna después de centrifugar a $>11.000 g$ durante 1 minuto con 15 μ l de buffer de elución.

4.7 Diseño de oligonucleótidos y PCR *nested*

El tratamiento del gDNA con bisulfito introduce cambios en la secuencia dependiendo del estado de metilación del DNA de partida. En una muestra puede haber una mezcla heterogénea de niveles de metilación. La heterogeneidad da como resultado un *pool* de moléculas con diferentes secuencias, según la localización de las citosinas metiladas (meC). Así, el objetivo en el diseño de oligonucleótidos para el análisis de metilación es el de amplificar secuencias metiladas y no metiladas con igual eficiencia. Según lo anterior, los oligonucleótidos para gDNA tratado con bisulfito se diseñaron bajo los siguientes criterios: 1) que no se situaran sobre una posición CpG de la secuencia original de la isla. 2) Ambos oligonucleótidos, sentido y antisentido, se diseñaron sobre la secuencia original de DNA, y luego se reemplazaron todas las citosinas (C) por timina (T) en el oligonucleótido sentido y, todas las guaninas (G) por adeninas (A) en el oligonucleótido antisentido.

Este diseño se realizó con el programa *Methyl Primer Express*[®] *Software v1.0* (*Applied Biosystems. Life Technologies*) (260), para amplificar 3 diferentes CGIs del gen *CD8A* y una CGIs del gen *CD4* (tabla 4.4).

Identificación	Primer sentido 5'—3'	Primer antisentido 5'—3'	Pb
CD8.CGI1.1ext	TTTTTCAAATTTTGGTTTTTTT	AAAATATCCCCAACCTCTT	762
CD8.CGI1.1int	TTTCAAATTTTGGTTTTTTT'	CTAACACTTCAACTCCACTATCTC	598
CD8.CGI1.2ext	TTAAGGGTTGTTAAGTGGTGG	TCCTTCCCCTATTTCTTTAAAAA	807
CD8.CGI1.21int	TTAAGGGTTGTTAAGTGGTGG	TTCTATCTCCCAAAAAAAAAATACCT	398
CD8.CGI1.2.2int	GGTATAGGTATTTTTTTTTGGG	TAAAACTTCTTATCCATCCTTC	402
CD8A.CGI2ext	GGTGTTAGGTTTTTAAATATATTGTTGT	TAATTACACCACTACACTCCAACC	658
CD8A.CGI2int	TGTTTGTTTTTAGTTTGGGTTAGTTTTT	TATACCCCAACAATCAACTTCTACTTA	452
CD8A.CGI3ext	GTTTAAGGATTTGGTAGTAGTTGGTAG	AAATCCCCAAACTTAAAAATCTC	600
CD8A.CGI3int	GTTTAAGGATTTGGTAGTAGTTGGTAG	AAATCCCCAAACTTAAAAATCTC	600
CD4.CGI2Exter	GTTTTGTTTTTGTTTTGTAATTAG	TCCTCTACTCTTCTAAAACTCTCC	654
CD4.CGI2Int	TCCTCTACTCTTCTAAAACTCTCC	ATAAAAACCCACCTCCCAAC	401

Tabla 4.4. Secuencia de los primers específicos de metilación para cada una de las CGI analizadas en el gen *CD8A* y el tamaño de los respectivos productos de PCR en **pb** (pares de bases)

Para amplificar las regiones de interés se empleó la técnica de PCR *nested* o *semi-nested*, según los casos., La PCR *nested* o *semi-nested* se utiliza usualmente para incrementar la sensibilidad y especificidad de los productos de PCR y, para ello, se debe disponer de dos pares de oligonucleótidos para cada locus amplificado. El primer par de oligonucleótidos amplifica el locus de interés siguiendo los principios de una PCR convencional. El segundo par (oligonucleótidos *nested*) se unen dentro del producto de DNA de la primera PCR y produce un segundo producto que será más pequeño en tamaño que el primero y tendrá mayor especificidad, ya que esta estrategia reduce significativamente la posibilidad de amplificar moléculas no específicas.

Adicionalmente, como control del tratamiento con bisulfito, se diseñaron oligonucleótidos convencionales de amplificación esperando no observar ningún producto de PCR ya que el DNA estaba tratado con bisulfito y por tanto la secuencia no sería complementaria. De obtener amplificación, esto sería un indicativo de la existencia de gDNA sin transformar y podría traducirse en resultados falsos positivos.

La amplificación de las 3 CGIs del gen *CD8A* se realizó de la siguiente manera: dado que la CGI-1 del *CD8A* era demasiado larga para ser amplificada como un solo fragmento (>2000 pb), nosotros la subdividimos con diferentes pares de oligonucleótidos en tres fragmentos con un tamaño entre 400-650 pb. Las otras dos CGIs (2 y 3) fueron amplificadas completas mediante una única PCR *nested* (figura 4.2, tabla 4.5). La CGI 4.2 completa también fue amplificada por PCR *nested*.

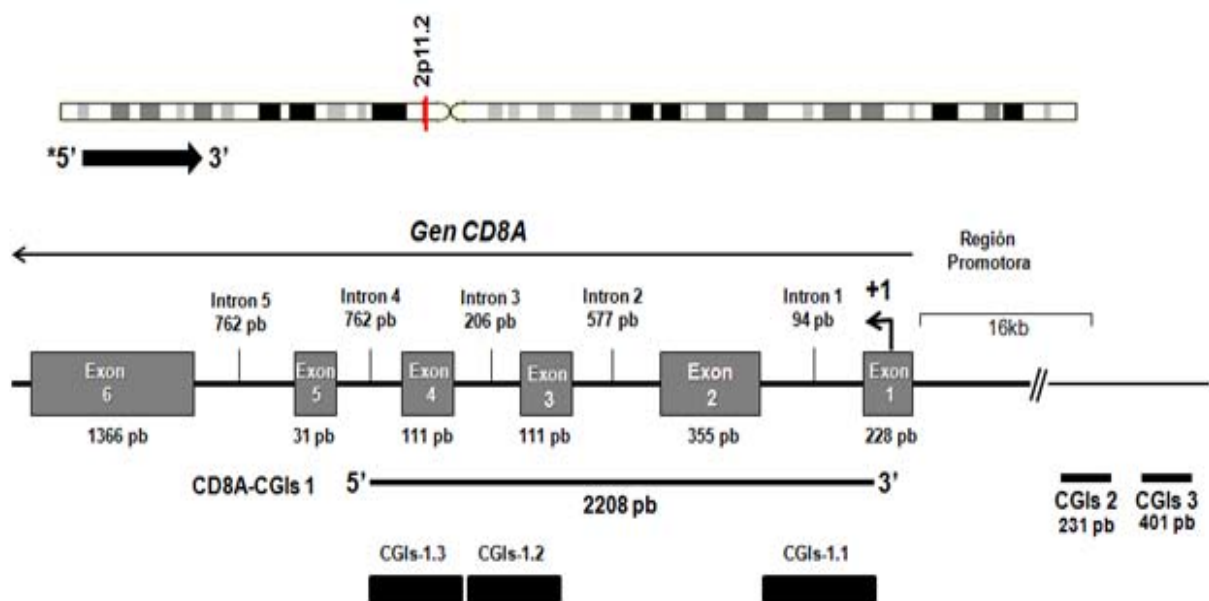


Figura 4.2. Esquema del gen *CD8A* con sus respectivos exones e intrones. Ubicación de las CGIs 1-3 y sus tamaños.

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo de la siguiente manera: el primer paso de la PCR *nested* fue realizado en un volumen final de 10 μ l y durante 35 ciclos empleando 10 μ M de cada oligonucleótido externo a una temperatura de *annealing*

preestablecida para cada CGI, (como se puede ver en la tabla 6), 2 μ l de gDNA de cada muestra, tratado con bisulfito (50-80 ng aproximadamente), 2,0 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs y 0,5 UI de *GoTaq[®] Flexi DNA Polymerase* (Promega). Debe tenerse en cuenta que algunas polimerasas, tales como la Pfu no toleran la presencia de uracilos (U) en las cadenas de DNA, por tanto este tipo de DNA polimerasas no pueden ser utilizadas para amplificar directamente DNA tratado con bisulfito, al menos en el primer paso de amplificación de la PCR *nested*. Las formas mutantes de Pfu desarrolladas recientemente pueden incorporar deoxy-uracilos (261), como es el caso de la *GoTaq[®] Flexi DNA Polymerase* (Promega Biotech Ibérica), empleada en nuestros experimentos.

Después del primer paso de PCR, el producto de PCR fue purificado mediante columnas de Sílica (*NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up*, Macherey-Nagel) y se eluyó en 10 μ l de H₂O grado molecular. Este procedimiento se incorporó para mejorar la eficiencia y especificidad del segundo paso de PCR. La segunda amplificación fue realizada para cada CGI en un volumen final de 10 μ l y durante 30 ciclos, empleando 10 μ M de cada oligonucleótido interno a una temperatura de *annealing* preestablecida (tabla 4.5), 2 μ l del DNA purificado producto de la primera PCR, 2,0 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs y 0,5 UI de *GoTaq[®] Flexi DNA Polymerase* (Promega Biotech Ibérica).

De nuevo, el producto de PCR del segundo paso fue purificado en las columnas de sílica (*NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up*, Macherey-Nagel) y se eluyó en 10 μ l de H₂O grado molecular. El producto eluido de cada PCR fue evaluado por electroforesis en un gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio (BrEt) y visualizado con luz UV, para confirmar el tamaño y la integridad del producto obtenido. Una vez verificado esto, se paso a la fase de clonación de cada uno de los amplímeros específicos, procedentes de la amplificación por PCR *nested*.

CGIs / Fase de amplificación	Oligonucleotidos	Ciclos	Annealing	DNA amplificado
CGI-1 externo PCR1	CD8.CGI1.1ext <i>sense/ antisense</i>	30	56°C	Genómico-tratado con bisulfito
CGI-1.1 interno PCR2	CD8.CGI1.1int <i>sense/ antisense</i>	35	56°C	Producto de la PCR 1
CGI-1.2 externo PCR3	CD8.CGI1.2ext <i>sense/ antisense</i>	30	60°C	Genómico-tratado con bisulfito
CGI-1.2.1 interno PCR4	CD8.CGI1.2.1int <i>sense/ antisense</i>	35	62°C	Producto de la PCR3
CGI-1.2.2 externo PCR5	CD8.CGI1.2.2int <i>sense/ antisense</i>	35	58°C	Producto de la PCR3
CGI-2externo PCR6	CD8A.CGI2ext <i>sense/ antisense</i>	30	62°C	Genómico-tratado con bisulfito
CGI-2 interno PCR7	CD8A.CGI2int <i>sense/ antisense</i>	35	60°C	Producto de la PCR6
CGI-3 externo PCR8	CD8A.CGI3ext <i>sense/ antisense</i>	30	60°C	Genómico-tratado con bisulfito
CGI-3 interno PCR9	CD8A.CGI3int <i>sense/ antisense</i>	35	58°C	Producto de la PCR6

Tabla 4.5. Condiciones de PCR para las CGIs del gen *CD8A* con DNA genómico tratado con bisulfito.

4.8 Clonación

Un análisis cuantitativo y detallado de la metilación del DNA es posible a partir de la secuencia de fragmentos de DNA tratados con bisulfito y amplificados por PCR. Estos

productosde PCR luego son clonados en plásmidos. Así, cada clon secuenciado corresponde a una sola molécula de DNA. El porcentaje total de metilación de ese fragmento de DNA y para esa muestra estará dado por el total de metilación de sus clones secuenciados.

Cada fragmento de PCR purificado de las CGIs de los genes *CD4* y *CD8A*, fueron clonado dentro del vector pCR2.1-TOPO (*Invitrogen Corporation. USA*), usando el kit comercial TA Cloning® (*Invitrogen Corporation. USA*). Este kit utiliza la actividad terminal transferasa que tiene la enzima *Taq DNA polimerasa*, que consiste en sobrecargar los productos de la PCR con una A en ambos extremos de las cadenas del DNA, esto los hace fuertemente complementarios a los extremos del vector, que terminan en T (Figura 4.3). Este sistema incrementa la eficiencia de la enzima en la reacción de ligación (262).

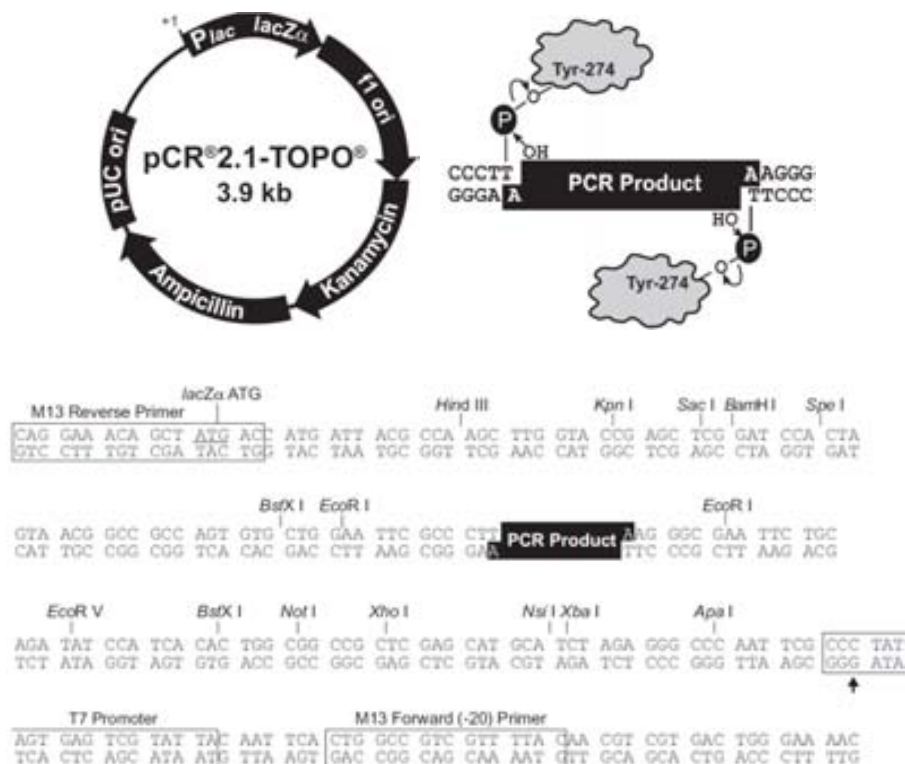


Figura 4.3. Esquema del vector de clonación pCR2.1-TOPO empleado para evaluar cada producto de PCR, del DNA tratado con bisulfito. El mismo vector se empleó para cada población celular de cada muestra y para cada una de las CGIs amplificadas por PCR.

Para la reacción de ligación y clonación, usamos 2 μ l del producto de PCR purificado, 2 μ l del vector pCR2.1-TOPO (\approx 50 ng), 1 μ l de buffer de ligación 10X y 1 μ l de T4 DNA ligasa (4 weiss unit/ μ l), en un volumen final de 10 μ l. La reacción de ligación fue incubada a 14 °C, durante 16 horas. Luego de esta incubación, se utilizó 1 μ l de la reacción para transformar las células bacterianas competentes *E. coli* One Shot[®] TOP 10 F' (*Invitrogen Corporation. USA*). La transformación de las células fue llevada a cabo siguiendo el protocolo comercial. En resumen, 1 μ l del producto de cada ligación fue adicionado a 50 μ l de células competentes e incubado durante 30 minutos en hielo. Luego de este tiempo se realizó un choque térmico por 30 segundos a 42 °C en un baño de agua. Las células fueron puestas de inmediato en hielo para facilitar la captura del DNA y su viabilidad. A continuación, se adicionaron 250 μ l de medio de cultivo enriquecido para bacterias S.O.C (*Invitrogen Corporation. USA*) y se incubaron durante 1 hora a 37 °C, para estabilizar las células y favorecer su crecimiento en fase exponencial. 100 μ l de las *E coli* transformadas fueron cultivadas en platos de LB-agar, preparados con la mezcla de cultivo selectivo comercial InMedia Amp Blue (*Invitrogen Corporation. USA*), el cual contenía LB-ampicilina (100 μ g/ml) y 50 μ g/ml de X-Gal/IPTG. Este agar permite seleccionar las colonias positivas por su color blanco. Las colonias que poseen el inserto alteran la capacidad del gen *LacZ*, de degradar la β -Galactosidasa (XGAL), por lo que las colonias no pueden transformar el compuesto y continúan siendo de color blanco, después de una incubación por 16-18 horas a 37 °C (Figura 4.4).

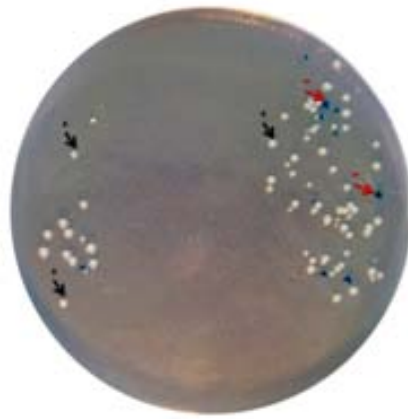


Figura 4.4. Colonias bacterianas en cultivo, transformadas con el vector pCR2.1-TOPO y el producto de PCR de las CGIs evaluadas. En azul se observan las colonias que no poseen el inserto, por tanto se consideran negativas (-). En blanco, las colonias que contienen el inserto y que serán secuenciadas posteriormente por ser positivas (+).

Para la selección de colonias positivas y su posterior secuenciación, desarrollamos un protocolo metodológico que modifica el protocolo convencional y optimiza el tiempo, manipulación y costos. Comúnmente, la obtención de colonias blancas transformantes para secuenciación, requiere i) la identificación del plásmido con el inserto en cada colonia por PCR, ii) el crecimiento durante 18 horas de los clones bacterianos positivos en medio de cultivo LB-líquido + antibiótico y finalmente, iii) la extracción del DNA plasmídico. Este protocolo es tedioso y costoso, especialmente cuando se tiene un gran número de clones bacterianos para ser analizados, como es el caso de los estudios de metilación del DNA. Por esto, hemos puesto a punto un protocolo en el cual hacemos la identificación directamente del clon bacteriano positivo por PCR (263), sin crecimiento previo en medio líquido y sin extracción de DNA plasmídico. Las colonias de bacterias fueron pinchadas directamente del plato de agar LB-ampicilina usando una micropunta estéril. Cada colonia fue diluida en 50 μ l de PBS 1X con un fuerte vortex durante un minuto a máxima potencia. 2 μ l de la colonia bacteriana diluida en PBS fue usada directamente como molécula molde de DNA. La colonia bacteriana fue amplificada por PCR convencional en un volumen final de 10 μ l. Para esta PCR empleamos los mismos oligonucleótidos internos de la PCR *nested* diseñados para cada CGIs de interés. Las

condiciones de amplificación fueron: una desnaturalización inicial de 7 minutos a 95 °C para la lisis bacteriana, luego se realizaron 30 ciclos de 95 °C durante 30", 58 °C por 30" y 72 °C durante 45". Finalmente, se hizo un ciclo de extensión a 72 °C durante 5 minutos.. Después de finalizada la PCR, 5 μ l de la reacción fueron empleados para electroforesis en gel de agarosa al 2% con Bromuro de etidio (BrEt) y visualizados por luz UV. Una vez confirmada la existencia y el tamaño del DNA amplificado, el volumen restante (5 μ l) fue purificado con 2 μ l del reactivo ExoSap-iT (*USB, Affymetrix, USA*), incubado a 37 °C por 15 minutos y 15 minutos mas a 80 °C para inactivar y degradar el ExoSap-iT presente en la reacción. El producto de PCR purificado se usó para secuenciar.

4.9 Secuenciación

Para obtener resultados cuantitativos y estadísticamente suficientes, se secuenciaron un gran número de clones bacterianos positivos. De cada producto de PCR clonado, se secuenciaron un mínimo de 10 clones. Las reacciones de secuenciación se hicieron de forma automatizada, siguiendo el protocolo establecido para el BigDye (*Applied Biosystems, USA*). Las muestras fueron amplificadas y preparadas siguiendo las instrucciones del servicio de secuenciación de la fundación IGTP. El DNA de interés se secuenció por electroforesis capilar en el analizador genético ABI 3100 (*Applied Biosystems, USA*). La reacción se realizó en un volumen final de 10 μ l que contenían: 2 μ l de *BigDye Terminator v1.1 ready reaction mix (Applied Biosystem)*, 1 μ l de 10 μ M del primer interno reverso y 1,5 μ l de cada producto de la PCR purificado con EXoSap-iT (*USB, Affymetrix, USA*) y 5.5 μ l de H₂O grado molecular.

4.10 Análisis de metilación

El grado de metilación del DNA fue analizado al comparar los resultados de la secuencia original (DNA sin tratar con bisulfito) con los resultados de la secuencia del DNA tratado. Básicamente se identificaron y cuantificaron todas las C no metiladas que habían sido convertidas a T. Luego, se identificaron y cuantificaron los picos de C, que al no estar convertidos a T, indicaban la presencia de citosinas metiladas 5-mC en la secuencia del genoma. El estado de cada posición CpG dentro de las CGIs analizadas se graficó en un esquema de círculos blancos (no metiladas) y negros (metiladas), para cada clon secuenciado; esto nos permitió calcular las frecuencias y los porcentajes de metilación de cada región del DNA (figura 4.5).

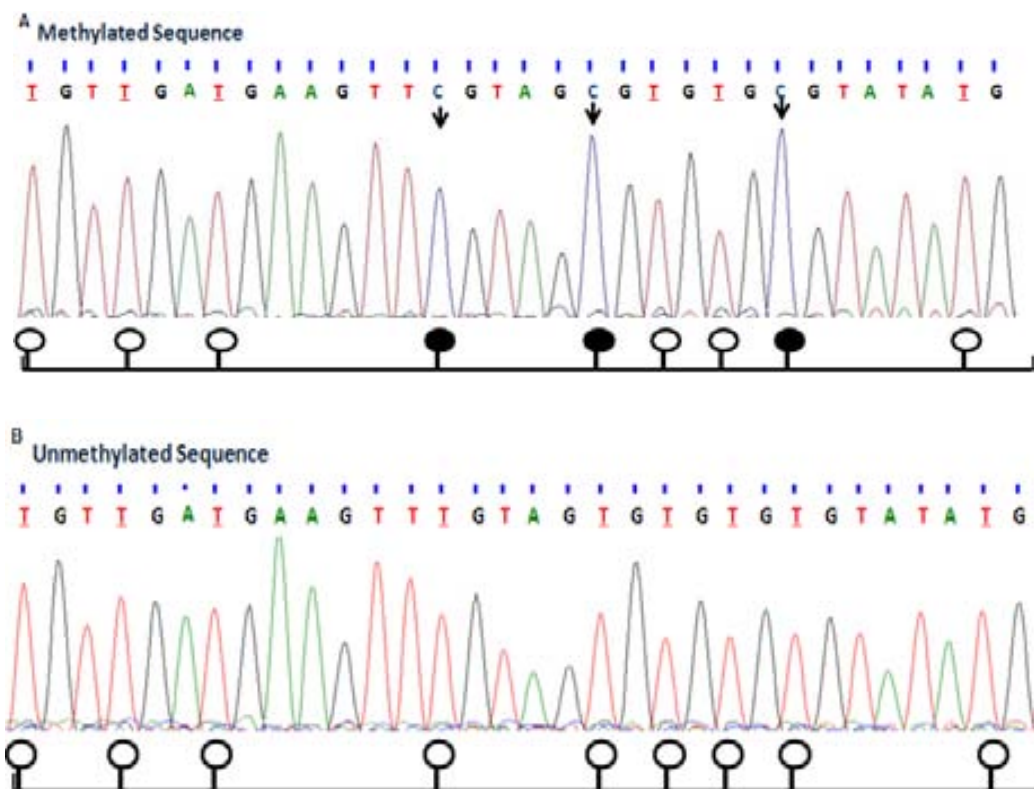


Figura 4.5. En **A** se observa un ejemplo de una secuencia correspondiente a un clon con DNA metilado en las posiciones 14,19 y 25. Abajo los círculos blancos corresponden a las posiciones CpG susceptibles de metilarse pero que **no** lo están y en negro se observan las posiciones CpG metiladas. En **B** se observa la misma secuencia correspondiente a un clon diferente y que en este caso no posee posiciones CpG metiladas.

En resumen, para el desarrollo de esta tesis se analizaron 6 diferentes productos de PCR y clonación: uno de la CGI-4.2 del gen *CD4*, uno de la CGI-2, uno de la CGI-3 y tres de la CGIs 1 del gen *CD8A*. Además, los 6 productos se generaron para tres tipos de muestras diferentes (timo, sangre de cordón y sangre periférica adulta). De los tres tipos de muestras se separaron 13 diferentes grupos de células T, procedentes de 3 individuos. De cada tipo de producto procedente de cada una de las muestras y para cada población de LT secuenciamos al menos 10 clones.

4.11 Síntesis de cDNA y análisis de expresión génica por PCR cuantitativa en tiempo real

La retrotranscripción se hizo a partir de 2 μ g de RNA total, mezclados con 1 μ l de oligo-dT de 15–18mer (*Pharmacia-Biotech*) a una concentración de 0,5 μ M en un volumen final de 13 μ l en H₂O. Esta mezcla fue llevada al termociclador durante 10 minutos a 68°C y 10 minutos más de incubación en hielo. Posteriormente, se preparó una segunda mezcla, con un volumen final de 7 μ l por reacción, a la que se adicionaron 1 μ l de la enzima retrotranscriptasa reversa *M-MLV RNaseH⁻, Point mutant* 200 UI/ μ l (*Promega Corporation. Madison. USA*), 1 μ l de inhibidor de RNAsas *RNasin Ribonuclease Inhibitor* a 40 UI/ μ l (*Promega Corporation. Madison. USA*), 1 μ l de dNTPs 10mM (*Promega Corporation. Madison. USA*) y se completó el volumen (4 μ l) con H₂O libre de DNasas y RNAasas. La segunda mezcla fue agregada a la primera reacción hasta completar un volumen final de 20 μ l. Luego, cada tubo fue llevado al termociclador durante 10 minutos a 40°C y 45 minutos más a 42°C.

Una vez obtenido el cDNA, se realizó la qRT-PCR para *CD4* y *CD8A* usando los oligonucleótidos y sondas pre-diseñados *TaqMan Gene Expression assay* (*Applied Biosystems. Foster City. CA. USA*). La expresión del *CD8A* se evaluó con tres sets de sondas TaqMan y oligonucleótidos, cada uno correspondiente a sus tres diferentes

transcriptos: i) CD8A wt; ii) CD8A- Δ 4, y iii) CD8Avar3 (una variante larga que incluye exones adicionales que se encuentran *upstream* del intron 1 original) (Figura 4.6). El transcrito CD8Avar3 no disponía de *TaqMan Gene Expression assay* comercial, por lo que fue necesario diseñar un set de oligonucleótidos y la sonda correspondiente con el software *LightCycler Probe Design 2.0* (Roche. Mannheim. Germany). Los oligonucleótidos y la sonda TaqMan seleccionados fueron los siguientes: Primer sentido CD8A-v3 5'-ACCCATACGCCAGCTTCACATA-3', primer antisentido CD8A-v3 5'CCTCCAAAATGCTGGGATTACAG-3'. Sonda TaqMan: 5'^{FAM}-AGCATGAACCAGGTGCAGTGGC-3'^{MGB-NFQ}.

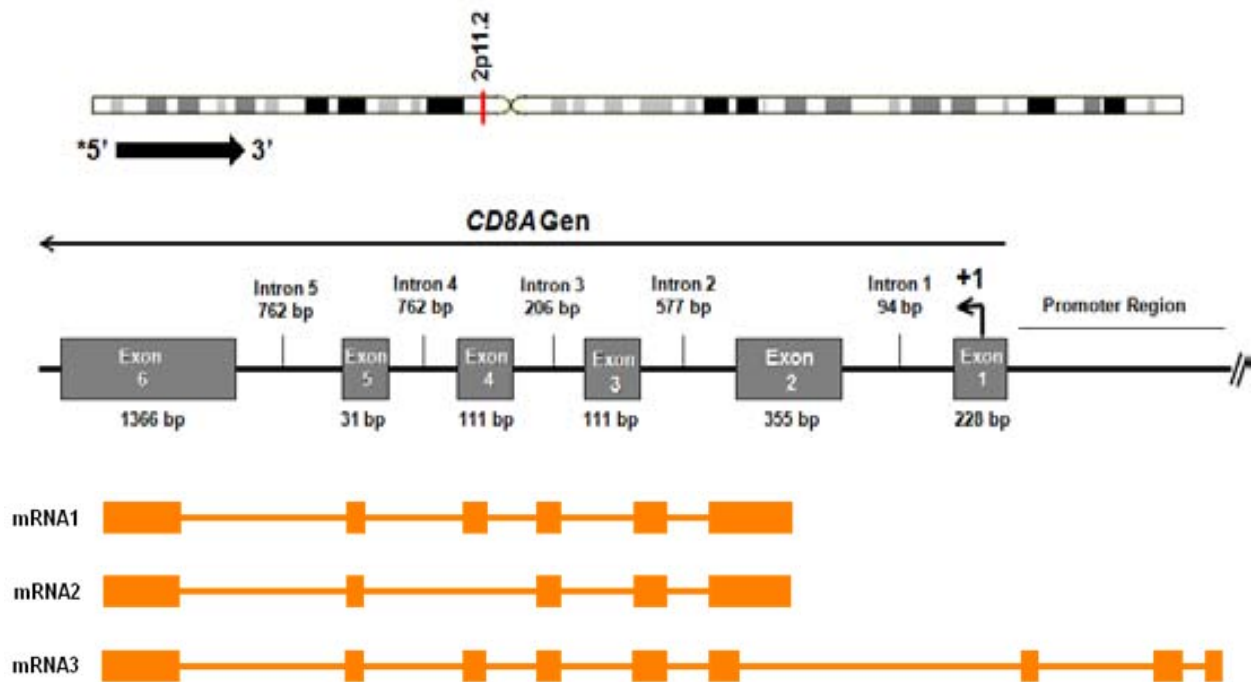


Figura 4.6. Gen *CD8A* y los diferentes transcritos reportados. El mRNA1 corresponde al transcrito canónico o *wild type*, el transcrito mRNA2 corresponde a una forma alternativa en la cual el exon 4 del gen no se transcribe y finalmente el mRNA3 corresponde a una tercera variante (V3) que posee un TSS diferente. V3 posee 3 exones más en la región 5'UTR del gen.

La cuantificación relativa de la expresión de *CD4* y *CD8A*, se hizo por duplicado en placas de 96 pozos (*LightCycler Multiwell plate. Roche, Mannheim, Germany*) en una reacción que contenía: 7,5 μ l de *TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems. Foster City. CA. USA)*, 0,75 μ l del *TaqMan Gene Expression assay* correspondiente. 2 μ l de cada cDNA (100-200 ng) y ajustamos a un volumen final de 15 μ l de reacción con H₂O grado molecular. Cada reacción fue amplificada en el equipo *Light Cycler LC480 (Roche. Mannheim. Germany)*. Los ciclos de qRT-PCR incluyeron: desnaturalización a 95°C por 10 minutos, 50 ciclos de amplificación con cuantificación de fluorescencia de 95°C por 15 segundos y 60°C de *annealing* y extensión por 1 minuto; finalmente un último ciclo a 40°C por 20 segundos. Los valores de expresión corresponden al Δ Ct de cada muestra y fueron recolectados y analizados en el software *LightCycler 480 SW 1.5 (Roche. Mannheim. Germany)*. La media del valor de la expresión de las muestras fue normalizada frente a la media expresión del gen *GAPDH*, que se identificó empleando el mismo protocolo que para los demás genes.

4.12 Monitoreo y cuantificación de la metilación del DNA con PCR y sondas FRET

La transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) es un fenómeno cuántico que se da entre dos moléculas. La excitación es transferida de un fluorocromo donador a un fluorocromo receptor por una interacción dipolo-dipolo sin emisión de fotones. Como resultado, la molécula fluorescente donadora es extinguida, mientras que la molécula fluorescente receptora es excitada perdiendo energía por emisión de fluorescencia. La FRET hace que la intensidad y vida media del donador disminuya hasta extinguirse mientras que la intensidad de fluorescencia del aceptor se incrementa (264). La teoría de FRET tiene muchas aplicaciones biológicas y se ha desarrollado desde la década de los 80s para el análisis de moléculas de DNA. Esta aplicación requiere que las dos moléculas de fluoróforos (donante-receptor) se encuentren físicamente ubicadas a una distancia muy corta entre ellas (micras) (Figura 4.7).

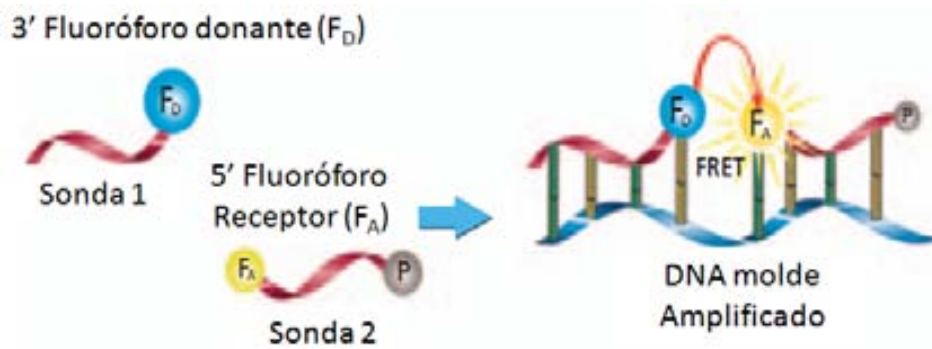


Figura 4.7. Principio del método de análisis con sondas FRET acopladas a fragmentos específicos de DNA amplificado por PCR.

Bajo este principio se han diseñado diferentes ensayos *in vitro* para evaluar la conformación del DNA, bien sea detección de SNPs, mutaciones o metilación (264). La metodología propuesta para esta tesis busca combinar una PCR seguida de un estudio de curvas *melting* con el uso de un par de sondas FRET, cada una con una emisión de fluorescencia diferente que permita cuantificar el grado de metilación de un fragmento de DNA.

4.13 Cuantificación del contenido de TRECs en los diferentes estadios de desarrollo de linfocitos T

Los niveles de sjTRECs fueron medidos en el gDNA de cada una de las poblaciones de células T separadas, tanto de timo como de periferia. Para ello empleamos la técnica de qRT-PCR partiendo de 50-100 ng de gDNA, previamente cuantificado por espectrofotometría con el equipo Nanodrop ND-1000 Spectrometer (*Thermo Scientific, USA*). La amplificación se hizo con los oligonucleotidos y sondas TaqMan previamente reportados: Sentido 5'-CACATCCCTTTCAACCATGCT-3'; anti-sentido 5'-GCCAGCTGCAGGGTTTAGG-3' y la sonda 5'-FAM-ACACCTCTGTTTTTGTTAAAGGTGCCCACT-TAMRA-3'. La reacción de amplificación se llevo a cabo en el equipo *Light Cycle LC480 (Roche, Mannheim, Germany)*. Las muestras se

sometieron a un ciclo inicial de 1 minuto a 95 °C, seguido de 50 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 62 °C. La fluorescencia fue monitorizada en modo de adquisición simple. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado. El número de copias de DNA episomal se cuantificó basado en los estándares construidos a partir de un amplímero de sjTREC, purificado clonado y cuantificado por espectrofotometría. La concentración de $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de DNA amplificado fue calculada como número de copias del DNA. Para el estándar se hicieron diluciones seriadas desde 10^7 hasta 10^0 copias. Los estándares fueron almacenados a -20°C y empleados en cada reacción de cuantificación.

Adicionalmente, empleamos el gen de la albumina *ALB2* como gen constitutivo, para la normalización y cuantificación del contenido de sjTRECs por cada célula T. Partiendo de los estándares, junto con el gen de normalización fijamos el límite inferior de sensibilidad de la cuantificación.

4.14 Análisis estadístico

La frecuencia de metilación se calculó para cada CGI de cada población celular, en todas las muestras involucradas en el estudio. La desviación estándar entre muestras y el valor de p fueron derivados de pruebas estadísticas a 2 colas empleando el software de análisis GraphPad Prims 5.0. Se considero un intervalo de confianza de 95%. En todos los casos una $p < 0.05$ fue considerada como significativa.

El coeficiente de correlación se calculó para pruebas no paramétricas (Sperman), con un IC 95%, entre el grado de metilación de cada CGI y cada uno de los grupos celulares evaluados.

La relación entre el estado de metilación de cada CGI, los niveles de expresión de *CD4* y de los diferentes transcritos de *CD8A*, se evaluaron por la prueba de Mann-Whitney U.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Resultados I: Analisis de metilacion en poblaciones de linfocitos T

Consideraciones previas

Como se mencionó en la introducción, la diferenciación y el desarrollo de LT es un proceso complejo, en el cual intervienen muchos procesos biológicos. Hay diferentes vías de señalización, regulación diferencial de la expresión génica e interacciones celulares, que mantienen el *pool* de células T en la periferia. Sin embargo, aún se busca un biomarcador cuantitativo que permita identificar el estadio de células RTEs, que es un indicador clave de la función tímica y la reconstitución linfocitaria periférica. Es por esto que consideramos que combinando los actuales conocimientos sobre epigenética con el desarrollo de nuevas metodologías que nos permitieran definir algunos patrones de metilación propios de algunos genes que no hubiesen sido evaluados previamente en estos grupos celulares y que fuesen claves en el desarrollo de las células T en humanos, como es el caso de los correceptores *CD4* y *CD8*, podríamos encontrar nuevos marcadores moleculares para un fenotipo complejo como es el de célula RTE.

Para cada gen evaluamos los siguientes parámetros: 1. La presencia de CGIs de acuerdo con los parámetros establecidos por el consorcio para el estudio del metiloma humano (254), 2. La clasificación de las CGIs, según se encontraran en la región promotora, en las regiones intergénicas o en regiones intragénicas y 3. Si habían datos registrados en el UCSC (Universidad de California-Santa Cruz) *Genome Browser* (252).

5.1.1 Identificación y ubicación de las CGIs en los genes *CD4*, *CD8A* y *CD8B*

Gen *CD4*

Encontramos que el gen *CD4* ubicado en el cromosoma 12 p13.31, no posee ninguna CGI en su región promotora, ni intragénicas, pero en cambio posee una CGI intergénica, ubicada aproximadamente a 12 Kb *upstream* de su TSS y que se ubica en una región común con el gen *LAG3*. Esta CGI la identificamos como CGI-4.2, posee 44 sitios CpG y un tamaño total de 328 pb (Figura 5.1).

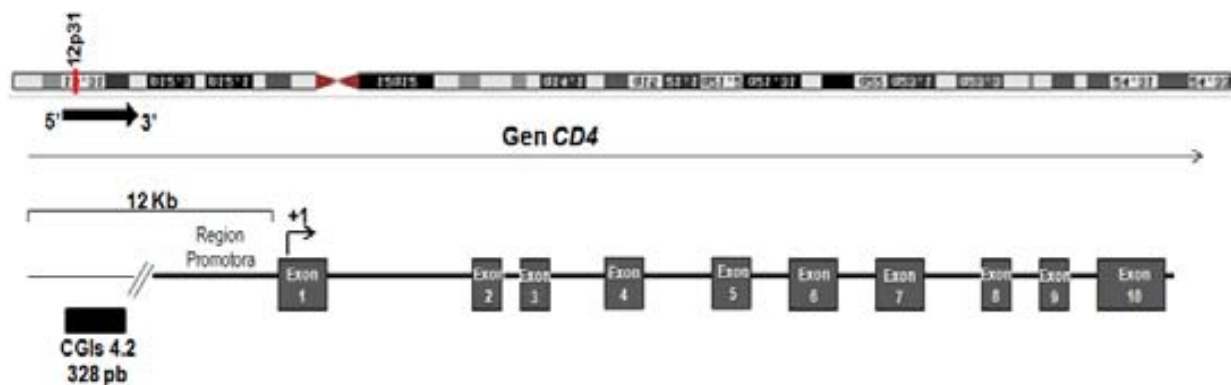


Figura 5.1. Representación del gen *CD4* y la ubicación de la CGI identificada por estudios *in silico*

Genes *CD8A* y *CD8B*

En cuanto al gen *CD8A* ubicado en el cromosoma 2p11.2 hemos encontrado que posee tres CGIs: dos en una región intergénica ubicadas a unas 16 Kb de su TSS (en una región común entre el gen *CD8A* y *CD8B*) y la tercera en una región intragénica que incluye desde del exón 1 al intrón 4 del gen. Estas CGIs las hemos identificado como CGI-1, CGI-2 y CGI-3. La CGI-1 a su vez la subdividimos en CGI-1.1, CGI-1.2 y CGI-1.3, por su gran tamaño (2.208 pb).

La CGI-1.1 corresponde al extremo 3' de la CGI-1. Posee un tamaño de 598 pb y un total de 33 posiciones CpG. La CGI-1.2 tiene 398 pb y 24 posiciones CpG, mientras que la CGI-1.3 posee 402 pb y 31 dinucleótidos CpG. En cuanto a las CGIs 2 y 3, poseen 231 y 431 pb respectivamente y tienen 41 y 36 dinucleótidos CpG. (Figura 5.2)

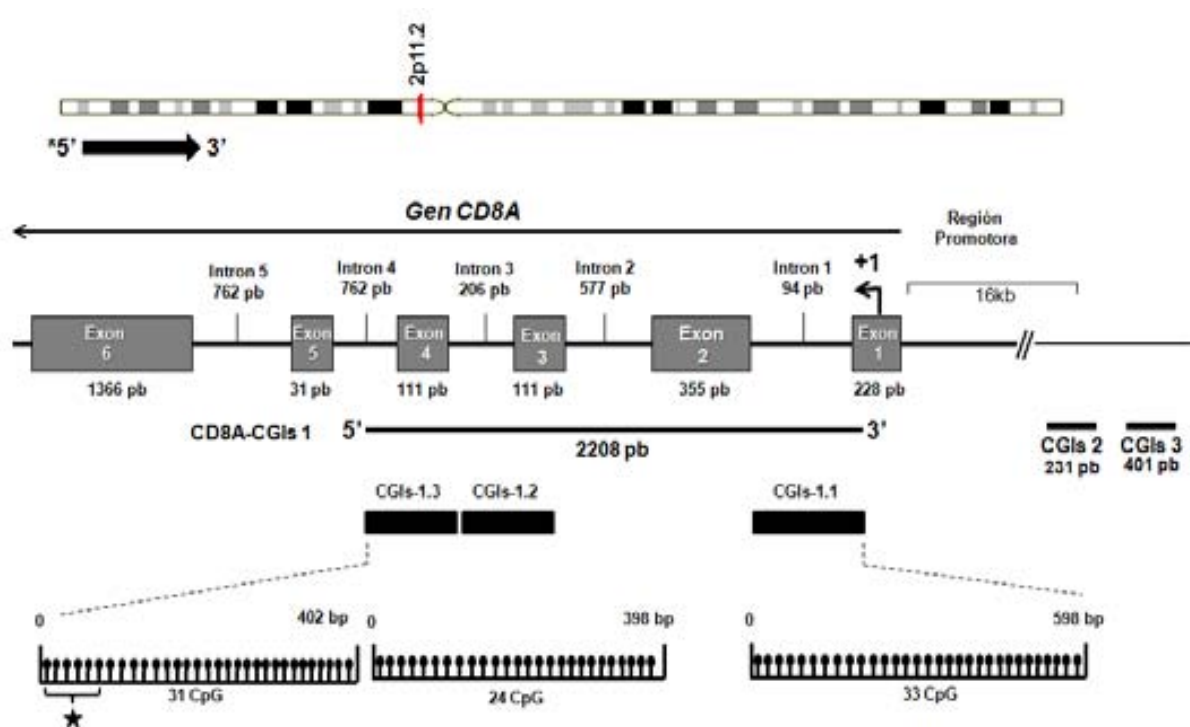


Figura 5.2. Representación del gen *CD8A* y la ubicación de las CGIs identificadas por estudios *in silico*

El gen *CD8B* no posee CGIs y solo se observan las CGIs ya mencionadas en la región intergénica con el gen *CD8A*.

Además de los genes *CD4*, *CD8A* y *CD8B*, los otros genes que consideramos (ver tabla 4.1 apartado de métodos), no poseía CGIs ni regiones teóricas susceptibles de metilación, excepto algunos loci del TCR que ya habían sido reportados previamente pero donde se observó que el estado de metilación solo variaba en la fase de reordenamiento en células T intratímicas (203).

5.1.2 Marcaje y separación de poblaciones de células T

Luego de identificadas las CGIs en los genes *CD8A* y *CD4*, quisimos evaluar los perfiles de metilación, mediante pruebas moleculares en diferentes estadios de desarrollo de células T tanto CD4 como CD8. Para esto separamos por *FACS sorting* cada grupo celular.

Poblaciones tímicas

Los grupos celulares más inmaduros fueron separados de 9 timos infantiles con una media de edad de 16 meses, correspondientes a 3 individuos de sexo femenino y 6 individuos de sexo masculino. Las poblaciones de timocitos obtenidos fueron: DP, SP4 y SP8 (Figura 5.3), todas separadas por FACS, empleando los anticuerpos previamente descritos en el apartado de métodos. Las poblaciones obtenidas tenían una pureza entre 97 y 99% como puede verse en la Tabla 5.1.

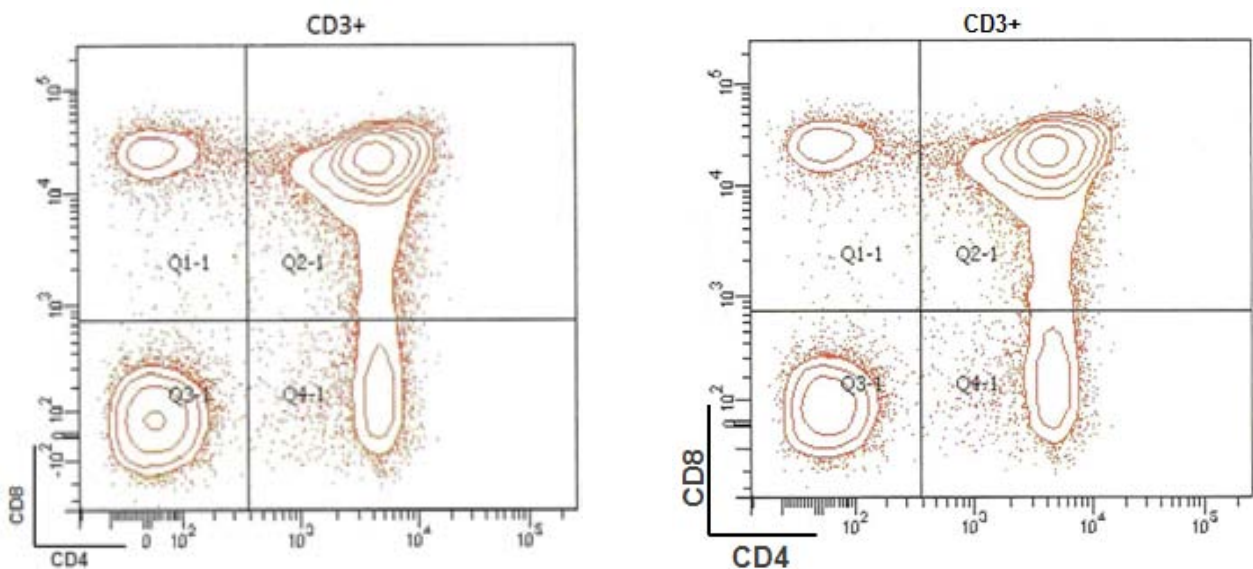


Figura 5.3. Poblaciones celulares de timo, separadas por FACS, donde se pueden observar las ventanas de análisis, con las respectivas poblaciones, correspondientes a 2 de las 9 muestras separadas.

Población	Media (% de células)	Media (# de células)	Pureza
CD3	61,38 ± 2,52	17 ± 0,8 X 10 ⁶	98 ± 0,2
DP	68,52 ± 29,56	4,2 ± 0,5 X 10 ⁶	97 ± 0,5
SP4	19,35 ± 12,75	2,5 ± 0,9 X10 ⁶	98 ± 0,1
SP8	5,5 ± 1,5	1,1 ± 0,6 X 10 ⁶	99 ± 0,5

Tabla 5.1. Poblaciones de timocitos separadas por FACS. Los datos están expresados como media de los porcentajes y los números absolutos (± su desviación estándar).

Además, se registra la media de la pureza para cada población.

Como esperábamos, se encontró un mayor porcentaje de timocitos DP, seguido de los SP4 y finalmente los SP8 .

Poblaciones de células T periféricas

Las poblaciones periféricas de LT, se obtuvieron de un total de 9 muestras de sangre de cordón neonatal y 9 muestras de sangre periférica adulta.

La sangre periférica de adultos sanos era en su mayoría de individuos de sexo femenino (F-5: M-2). En dos de los casos no se pudieron registrar los datos de la edad ni el sexo de los donantes. En el caso de sangre de cordón 4 de las muestras eran de neonatos de sexo femenino, 3 de sexo masculino y en dos casos no pudimos registrar el sexo.

Las poblaciones de LT periféricas, separadas fueron: RTEs CD4, RTEs CD8, naive CD4, naive CD8, en el caso de la sangre de cordón (figura 5.4, tabla 5.2). Para la

sangre adulta se separaron además de las poblaciones anteriores, las de memoria CD4 y memoria CD8 (figura 5.5, tabla 5.3).

\

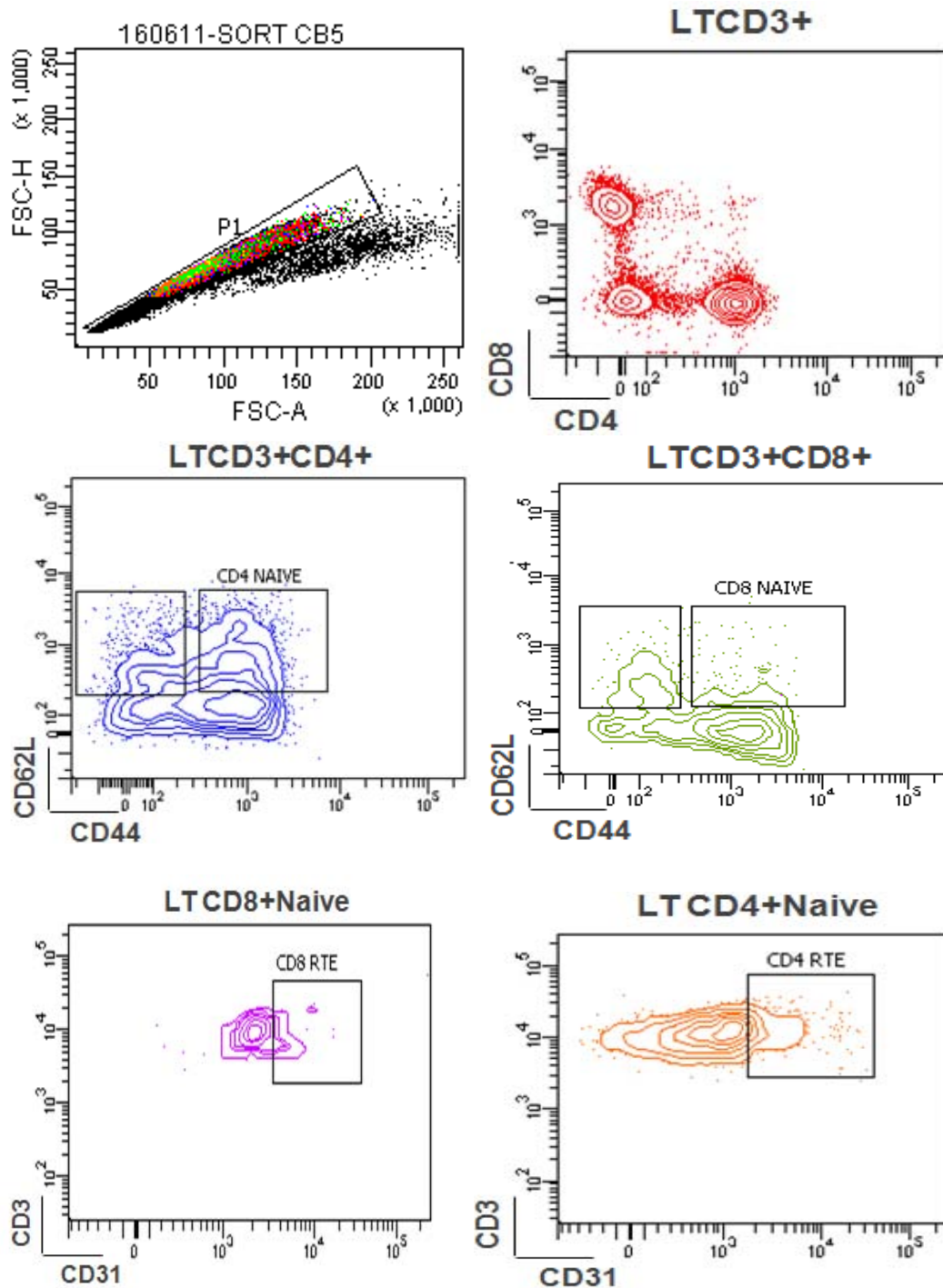


Figura 5.4. Ventanas de análisis para la identificación y separación de las poblaciones de LT por FACS, en las cuales se identifican los RTEs CD4, RTEs CD8, naive CD4 y naive CD8 en una de las muestras de sangre de cordón analizadas. El esquema de análisis fue el mismo para todas las demás muestras.

Población	Media (% de células)	Media (# de células x 10 ⁵)	Pureza
RTE CD4+	66,1 ± 3,2	5,5 ± 0,5	98 ± 0,5
RTE CD8+	43,6 ± 15,3	3,5 ± 0,8	98 ± 0,6
Naive CD4+	26,4 ± 4,8	6,3 ± 0,5	99 ± 0,1
Naive CD8+	14,2 ± 10,5	0,32 ± 0,02	96 ± 0,5

Tabla 5.2. Poblaciones de sangre de cordón, separadas por FACS. Los datos están expresados como media de los porcentajes y los números absolutos (\pm su desviación estándar). Además, se registra la media de la pureza para cada población.

Las poblaciones obtenidas tenían una pureza entre 96 y 99% .El porcentaje mas alto de células T en cordón neonatal fue el de RTE CD4 (63 – 70%). Las células T naive CD8, encambio fueron las más escasas en todas las muestras. La población en la que mayor variación se encontró, tanto en porcentajes como en número de células, fue la de RTEs CD8.

Las poblaciones de LT de sangre periférica de adulto se separaron teniendo en cuenta los marcadores celulares estándar para la identificación por citometría de poblaciones periféricas en humanos. Además, se emplearon los marcadores de superficie para RTEs reportados hasta el momento, como son el CD31, el CD45RA y el CD62L. Adicionalmente, se empleó el marcador PTK7 en uno de los marcajes exploratorios de sangre periférica humana, para tratar de reproducir los resultados reportados por Heins et al (79) y confirmar si presentaban un patrón de metilación diferente a las demás poblaciones. Nuestros resultados no confirman los porcentajes obtenidos para RTEs PTK7⁺, ya que en nuestras muestras y en otras evaluadas por investigadores de nuestro grupo, los porcentajes de células naive CD4⁺PTK7⁺ en sangre periférica de donantes sanos adultos son menores al 0,05% del total de CD4⁺ (datos no mostrados).

Las poblaciones linfocitarias periféricas de los donantes sanos presentaron parámetros de normalidad (41,42, 265).

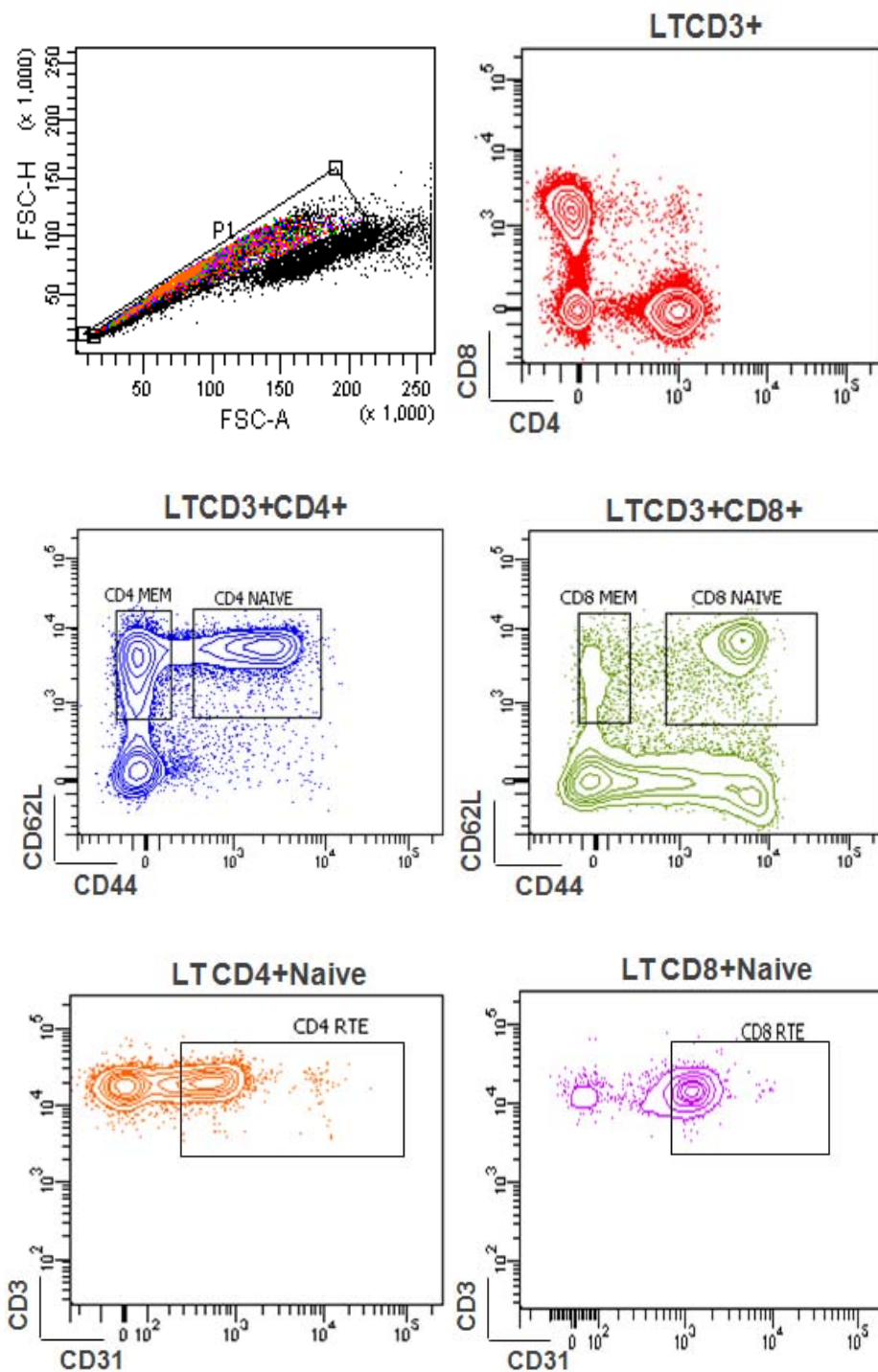


Figura 5.5. Ventanas de análisis para la identificación y separación de las poblaciones de LT por FACS, en las cuales se identifican los RTEs CD4, RTEs CD8, naive CD4 y naive CD8 y memoria CD4 y CD8, en una de las muestras de sangre periférica adulta analizadas. El esquema de análisis fue el mismo para todas las demás muestras.

Población	Media (% de células)	Media (# de células x 10 ⁵)	Pureza
RTEs CD4	17 ± 8,3	8,6 ± 4,0	99 ± 0,1
RTEs CD8	5 ± 3,1	7,3 ± 4,0	96 ± 0,5
Naive CD4	35 ± 2,8	11,1 ± 5,6	98 ± 0,1
Naive CD8	45 ± 11,3	7,8 ± 2,9	97 ± 0,3
Memoria CD4	34 ± 6,3	13,3 ± 4,2	99 ± 0,2
Memoria CD8	13 ± 3,7	5,1 ± 0,5	97 ± 0,2

Tabla 5.3. Poblaciones de sangre periférica adulta, separadas por FACS. Los datos están expresados como media de los porcentajes y los números absolutos (± su desviación estándar). Además, se registra la media de la pureza para cada población.

Las poblaciones de LT obtenidas de sangre periférica de adultos, tenían una pureza entre 96 y 99% .El porcentaje mas alto de células T fue el de naive CD8 (45%). Encontramos también que el porcentaje de células RTEs CD4 y CD8 es muy diferente en una misma muestra y también entre individuos. En todos los casos la población minoritaria fue la de células RTE CD8.

5.1.3 Análisis cuantitativo de la metilación en CGIs de los genes *CD4* y *CD8A* por secuenciación del DNA tratado con Bisulfito.

Evaluamos el grado de metilación de las CGIs CD4-2.1, CD8A-1, CD8A-2 y CD8A-3, en un total de 13 poblaciones de linfocitos T, separadas como se indicó en los apartados anteriores. Para la evaluación de la metilación empleamos tres de las muestras de **timo infantil** (TMB428i, 429i y 431i), 3 muestras de **sangre de cordón** (CB1, CB2, CB3) y 3 muestras de **sangre periférica de adulto** (SP1, SP2, SP3). En total se evaluaron 39 poblaciones celulares.

El DNA de cada población celular fue extraído y cuantificado. Entre 200 y 500 ng de gDNA fueron transformados con bisulfito de sodio. La calidad de la transformación fue evaluada, empleando oligonucleótidos específicos para la CGI-2 del gen *CD8A* y la CGI-4.2 del gen *CD4*, diseñados para ser complementarios a dos o más sitios CpG del DNA no tratado. El 10% de las muestras de DNA convertidas con el bisulfito fueron empleadas para amplificar por PCR, con los oligonucleótidos previamente mencionados. Ninguna de las muestras de prueba produjo amplificación, lo que nos muestra que la conversión del DNA con el bisulfito fue eficiente.

Todas las CGIs evaluadas por PCR *nested*, amplificaron con alta especificidad y eficiencia. El fragmento de DNA esperado se visualizó a partir del segundo ciclo de amplificación en un gel de agarosa al 2% como se puede observar en la figura 5.6.

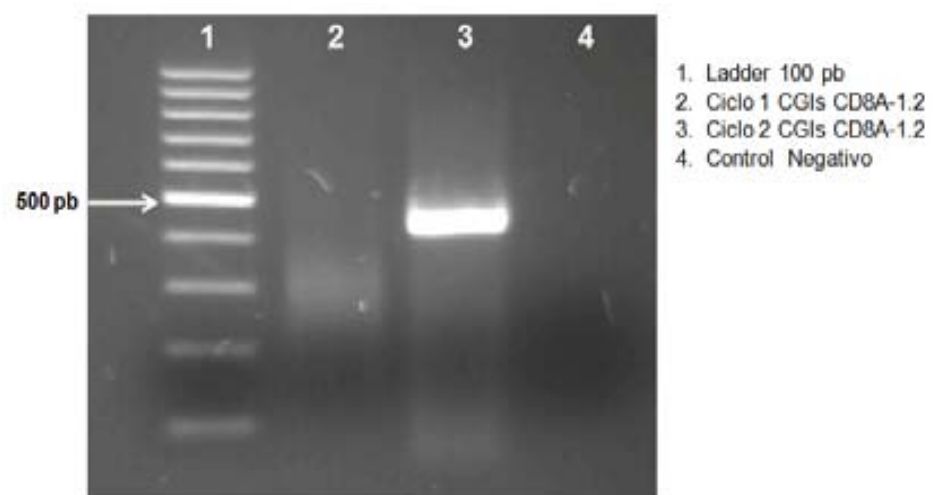


Figura 5.6. Gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio, para visualizar las bandas producto de la PCR *nested* para la CGI 1.2 del gen *CD8A*. Podemos ver en la primera columna, el marcador de peso molecular de 100 pb, en las columnas siguientes podemos observar primero (2) el producto del primer ciclo de amplificación de la PCR *nested* con los oligonucleótidos externos, luego (3) observamos el producto específico de 402 pb correspondiente al segundo ciclo de amplificación de la PCR *nested* con los oligonucleótidos internos. El carril 4 es el control negativo de amplificación.

En total se amplificaron 6 diferentes fragmentos de DNA, que correspondían a las 4 CGIs evaluadas en los genes *CD4* y *CD8A* (ya que de la CGI-1 del *CD8A* se amplificaron 3 fragmentos diferentes). Cada producto de PCR fue purificado y clonado en el vector pCR2.1-TOPO (como se menciona en el apartado de métodos).

Para el proceso de transformación y verificación de los insertos de cada clon bacteriano, llevamos a cabo el protocolo optimizado publicado previamente en *Correa PA, et al. 2012* (Anexo1). El resumen puede verse en la figura 5.7.

El análisis cuantitativo de los patrones de metilación es un proceso exploratorio largo y complejo, que requiere de la secuencia de al menos 10 clones diferentes de cada producto de PCR, para cada población celular y para cada muestra, por tanto realizamos aproximadamente 2.500 secuencias de DNA clonado y tratado con bisulfito para poder determinar los patrones de metilación de cada una de las CGIs estudiadas.

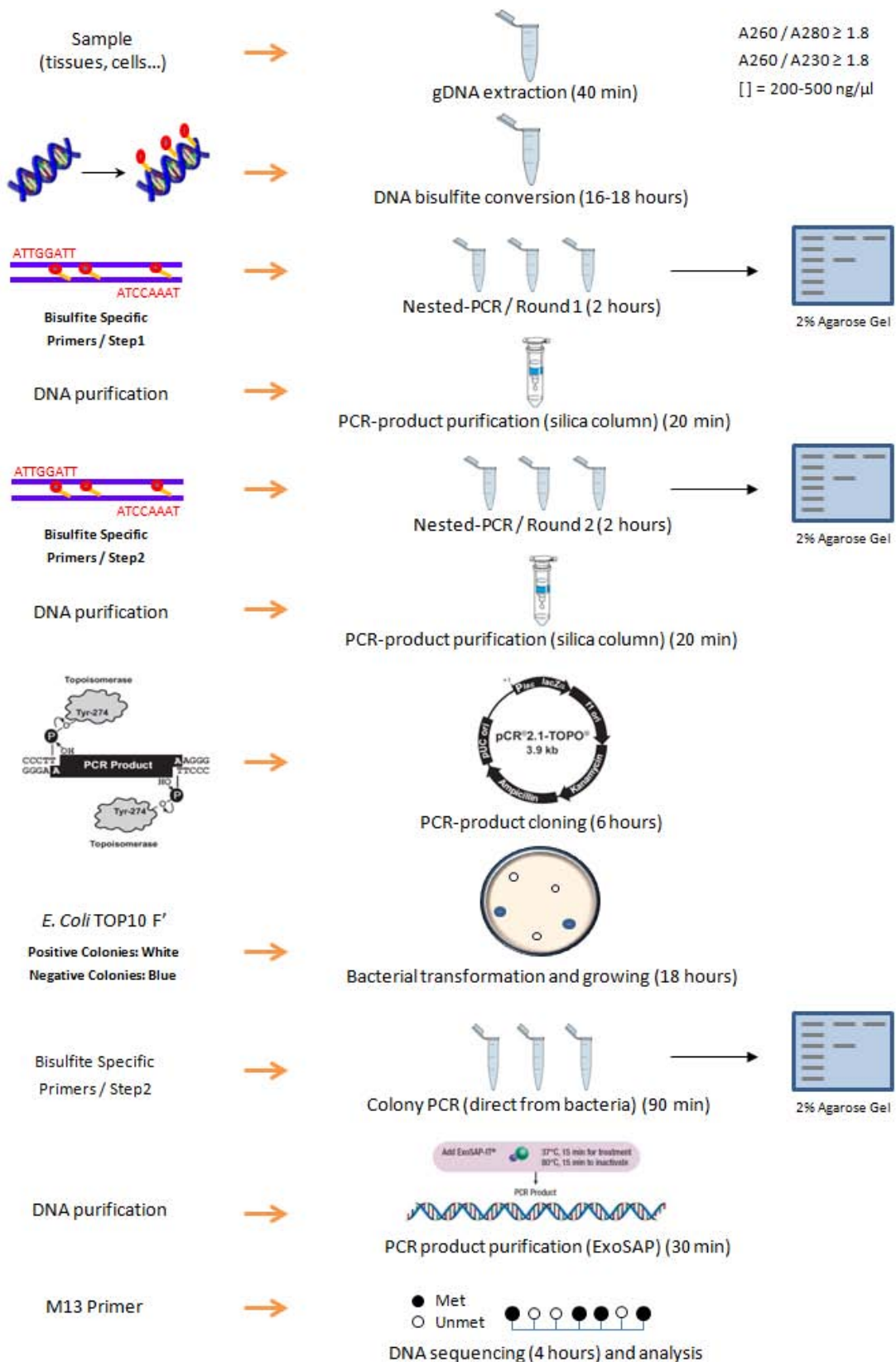


Figura 5.7. Representación esquemática de los pasos metodológicos estandarizados para la amplificación, clonación, transformación de colonias bacterianas y análisis cuantitativo de la metilación del DNA tratado con bisulfito

5.1.3.1 Análisis cuantitativo de la metilación en la CGI-4.2 del gen CD4

La CGI-4.2 del gen CD4, posee una metilación total inferior al 15% en todas las poblaciones de LT analizadas, tanto de CD4 como de CD8.

El mayor porcentaje de metilación se encuentra en las CpG que conforman los extremos de la CGI, pero no observamos diferencias estadísticamente significativas entre poblaciones. La variación entre individuos es poca, pero donde más se observa es en el estadio de células RTE CD4 (Figura 5.8).

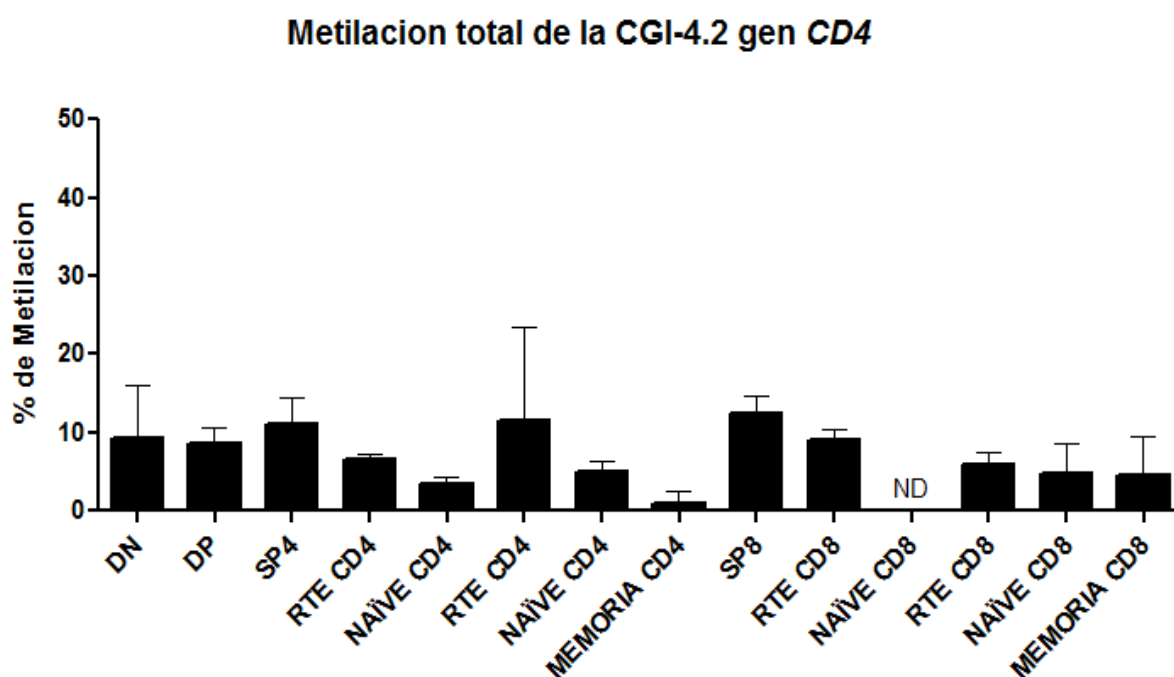
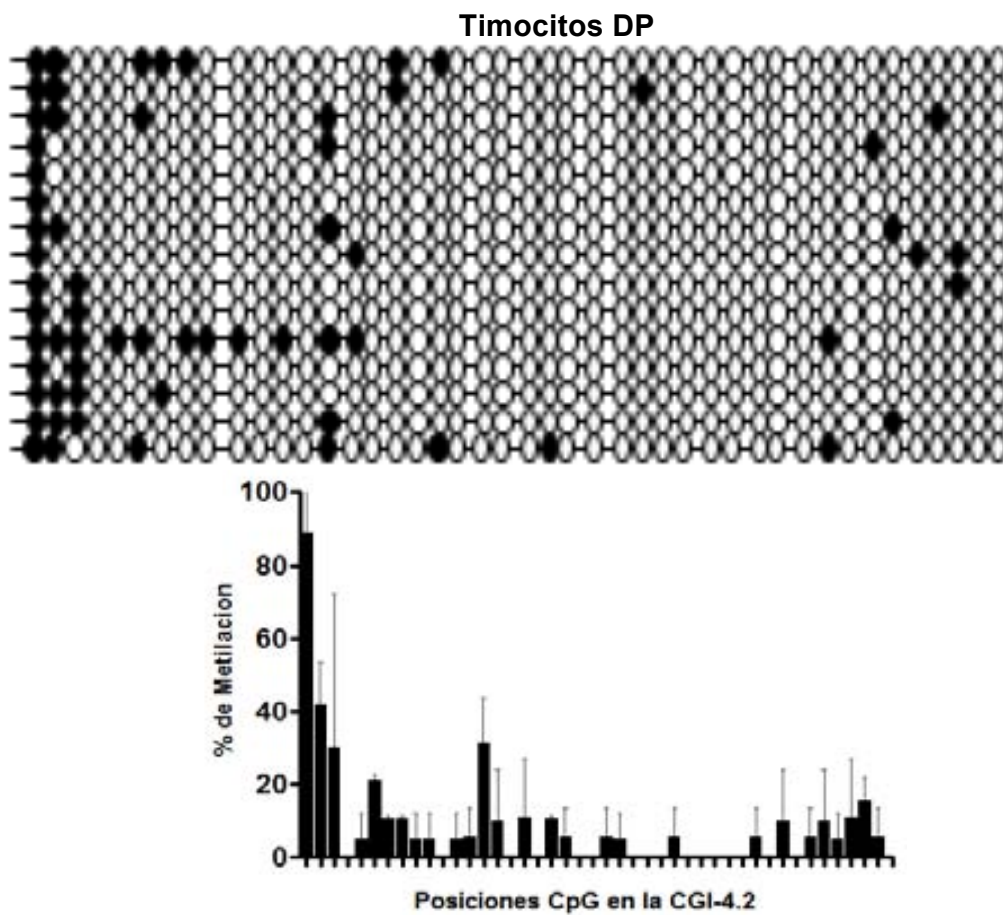


Figura 5.8. Analisis del porcentaje de metilación en las 44 CpGs que la conforman la CGI-4.2., Datos evaluados en 3 diferentes muestras y en todas las poblaciones de LTs. Nd: no determinado por falta de material genético suficiente.

La CGI-4.2 se metila más en timocitos (>10%), que en sangre periférica, tanto adulta como de cordón. pero estas diferencias no son significativas. La metilación de esta CGI no diferencia entre linajes CD4 y CD8, excepto en la fase de LT de memoria en sangre periférica adulta.

La distribución de la metilación para la CGI-4.2 se grafica en la figura 5.9 A-C. En la figura podemos ver cada una de las líneas con esferas, que representan el patrón de metilación de cada uno de los clones secuenciados, para cada población celular. Las gráficas de esferas blancas y negras, corresponden a los resultados de un individuo representativo de los 3 evaluados para cada tejido. Cada esfera representa las 44 posiciones CpG que conforman la CGI-4.2. Las esferas blancas indican una posición no metilada, mientras que las esferas negras corresponden a un sitio metilado.



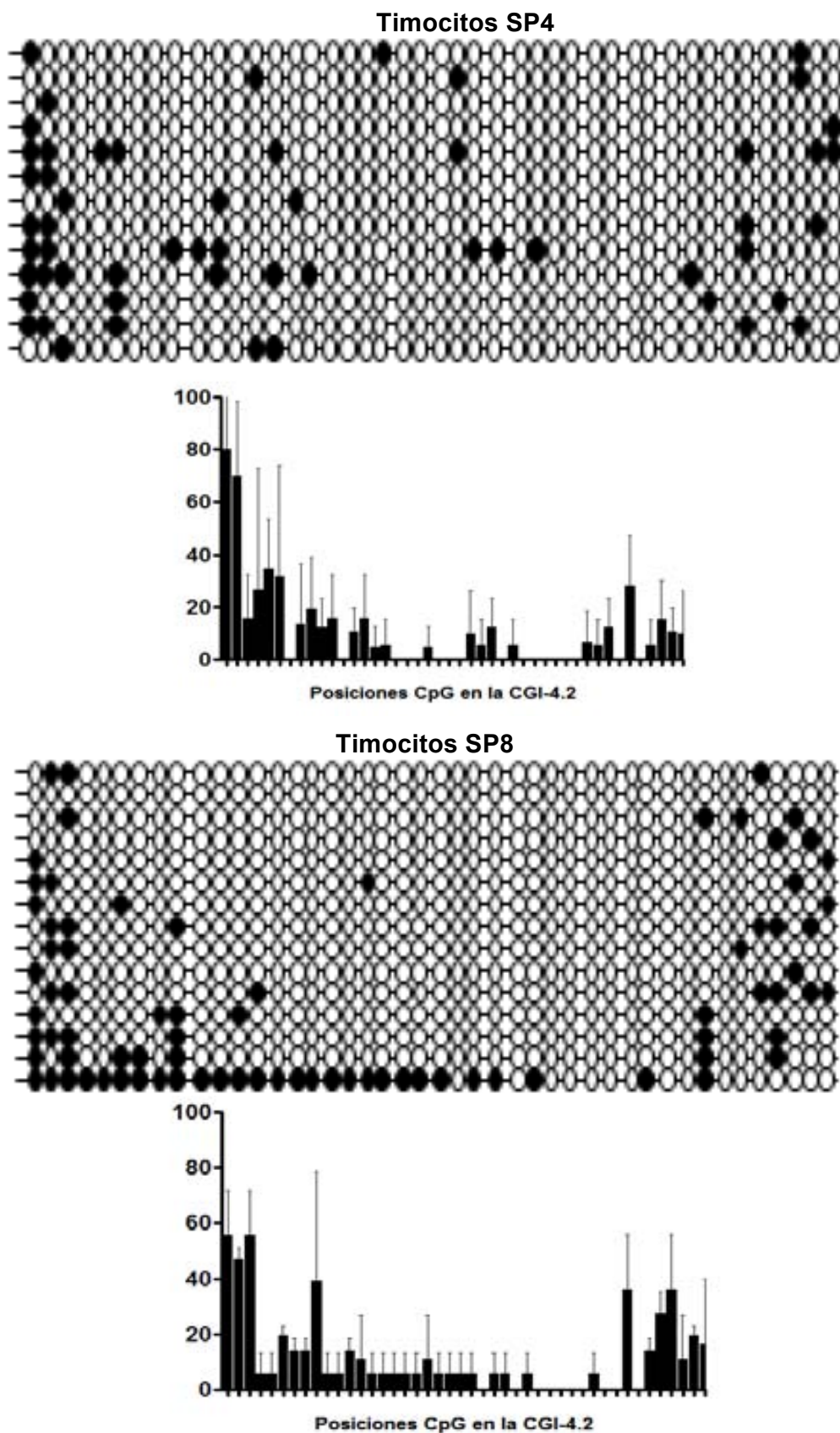
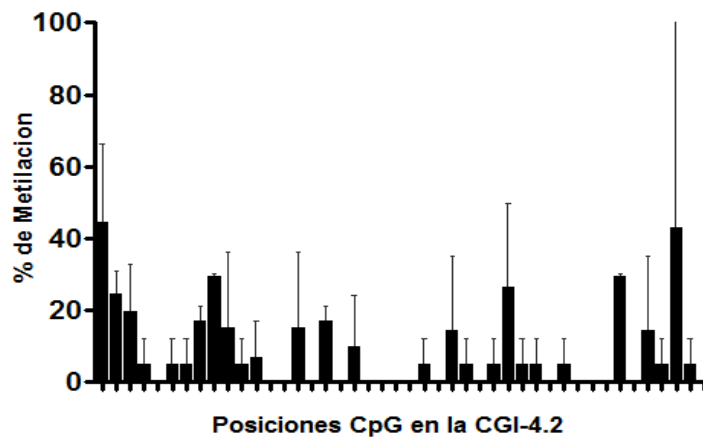
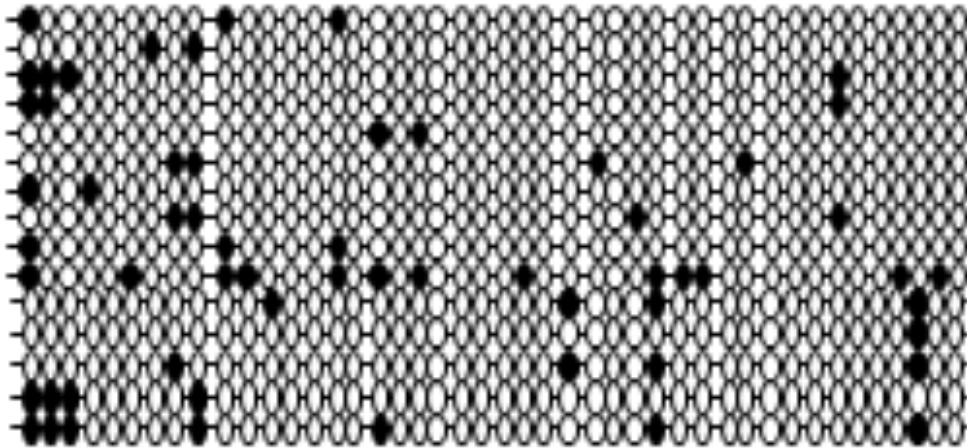
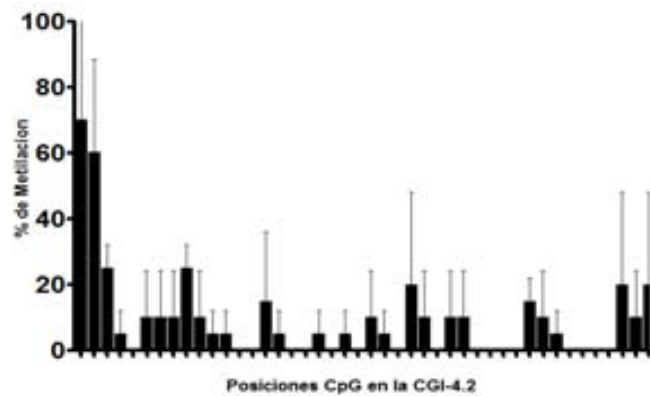
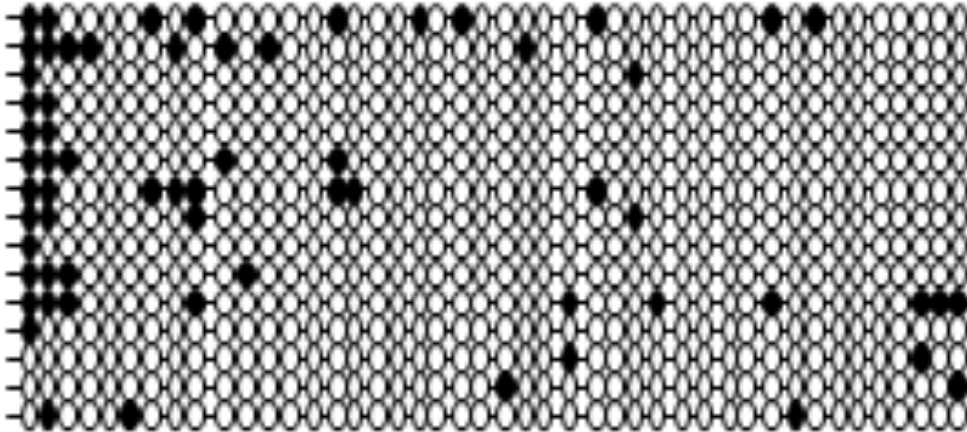


Figura.5.9. A Patrón de metilación de la CGI-4.2 en timocitos humanos. Las gráficas representan la media del % de metilación de cada posición CpG dentro de la CGI-4.2 y la desviación estándar entre los individuos analizados.

Sangre de cordón. RTEs CD4.



Sangre de cordón. RTEs CD8.



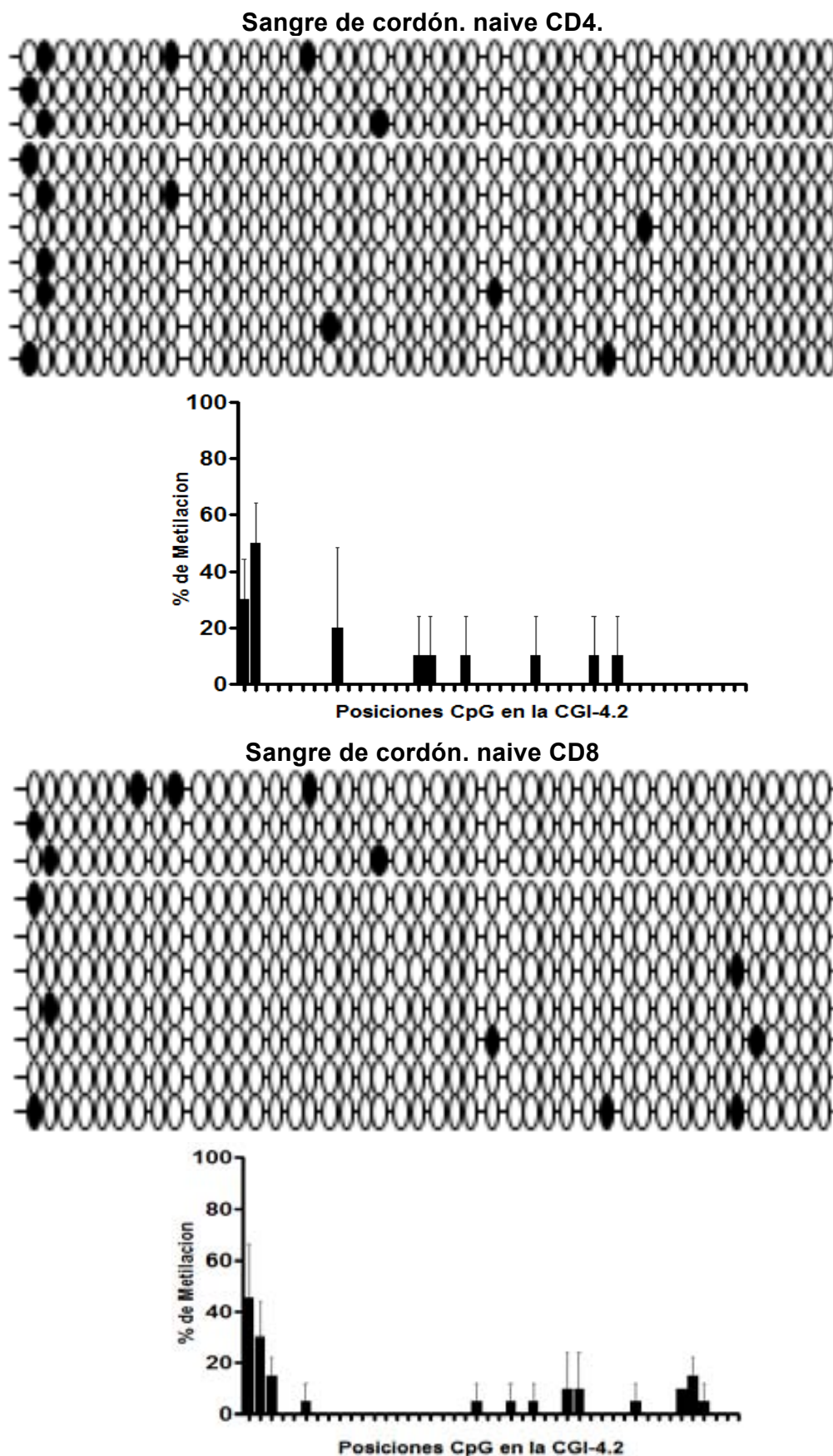
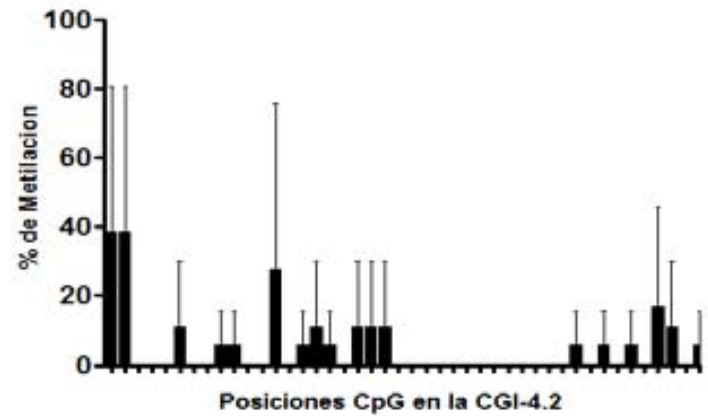
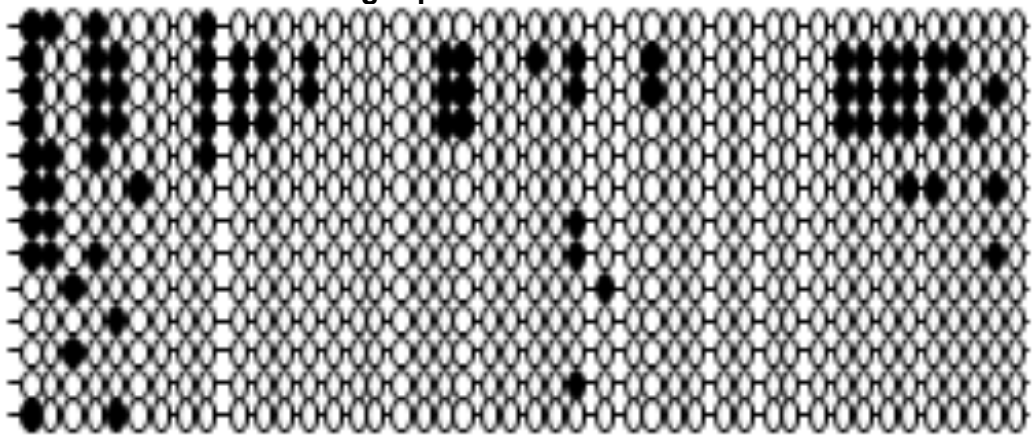
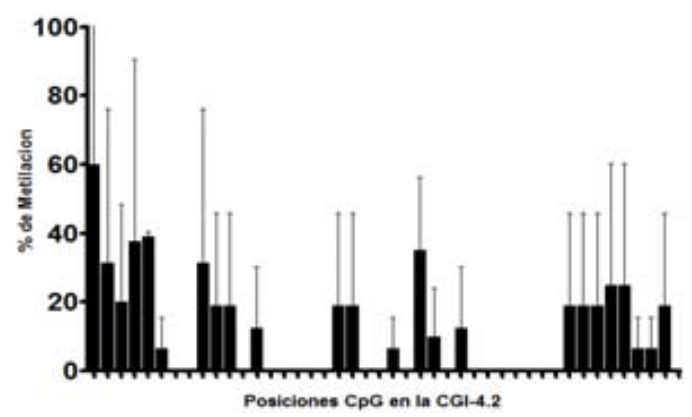
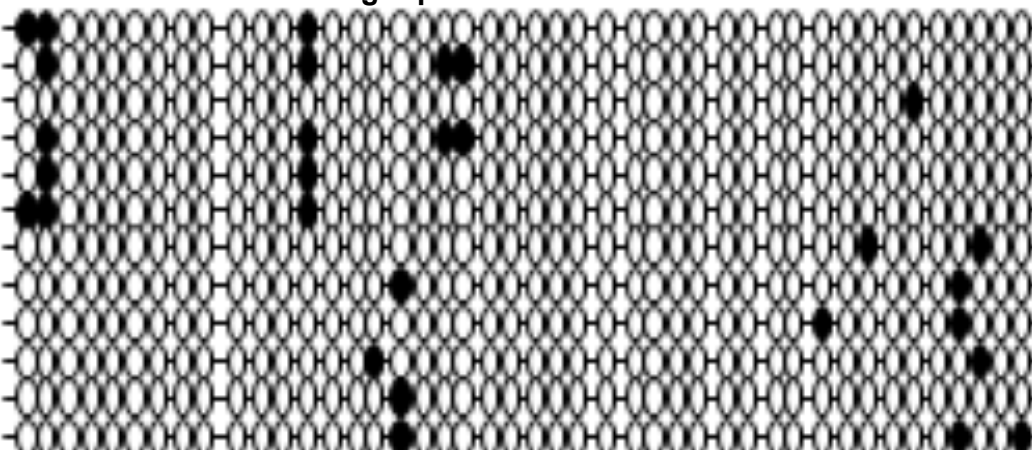


Figura.5.9. B Patrón de metilación de la CGI-4.2 en LT de sangre de cordón. Esquema de análisis igual que en la figura 5.8C

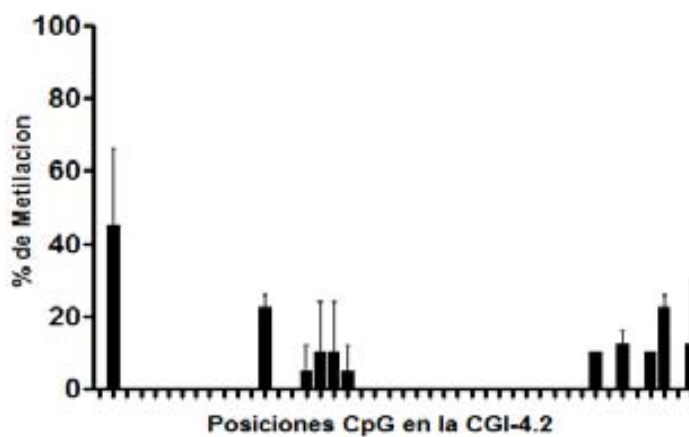
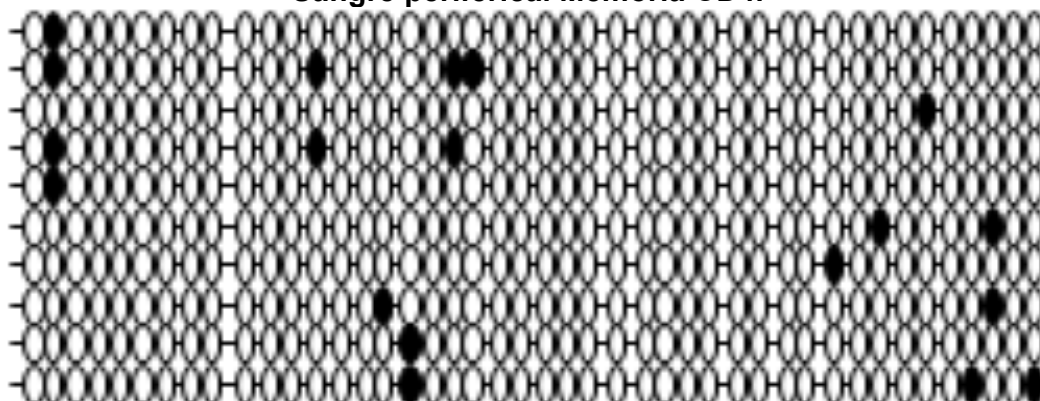
Sangre periférica. RTEs CD4.



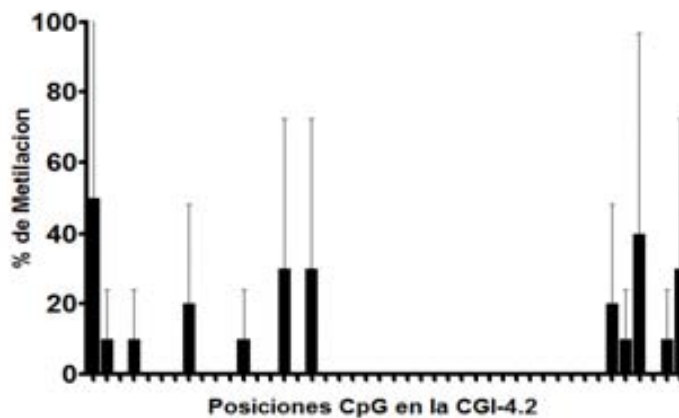
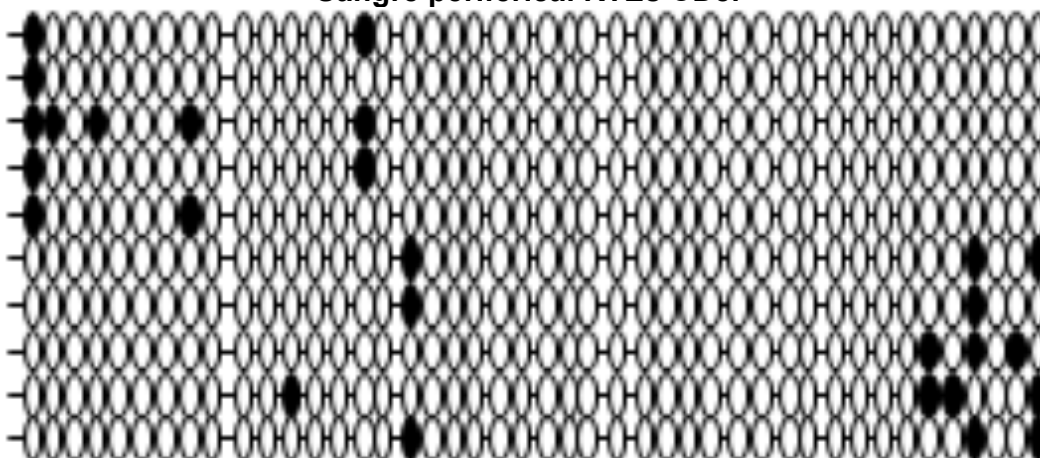
Sangre periférica. naive CD4.



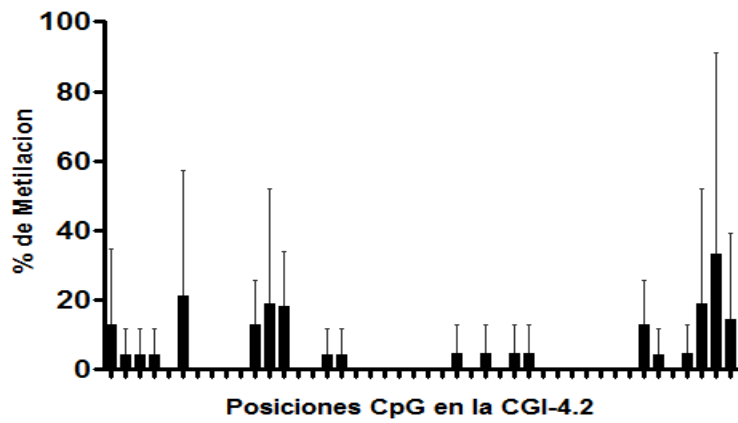
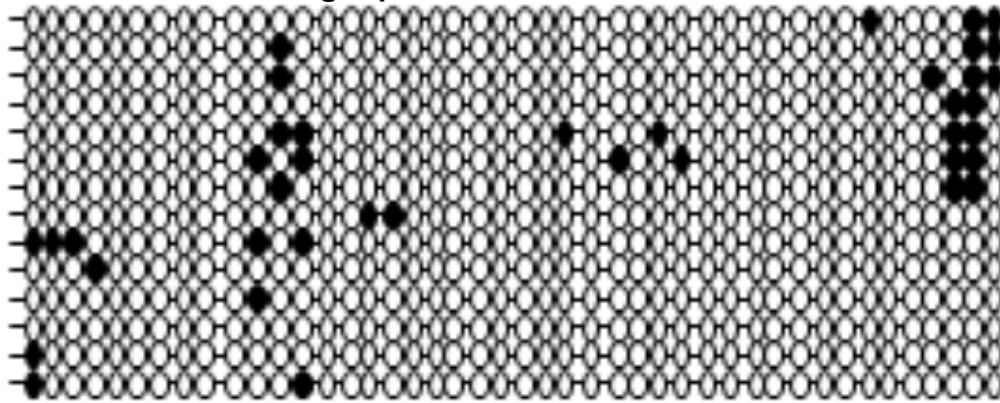
Sangre periférica. Memoria CD4.



Sangre periférica. RTEs CD8.



Sangre periférica. LT naiva CD8.



Sangre periférica. LT memoria CD8.

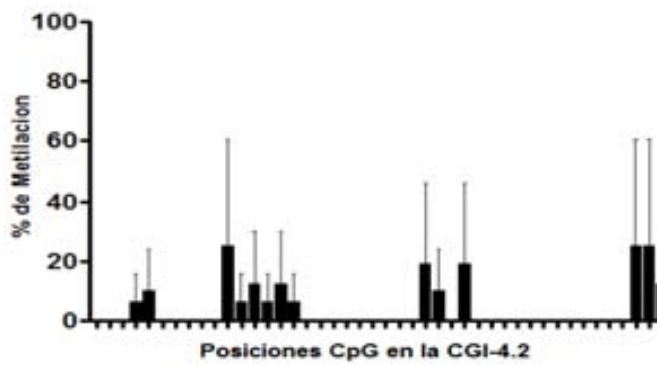
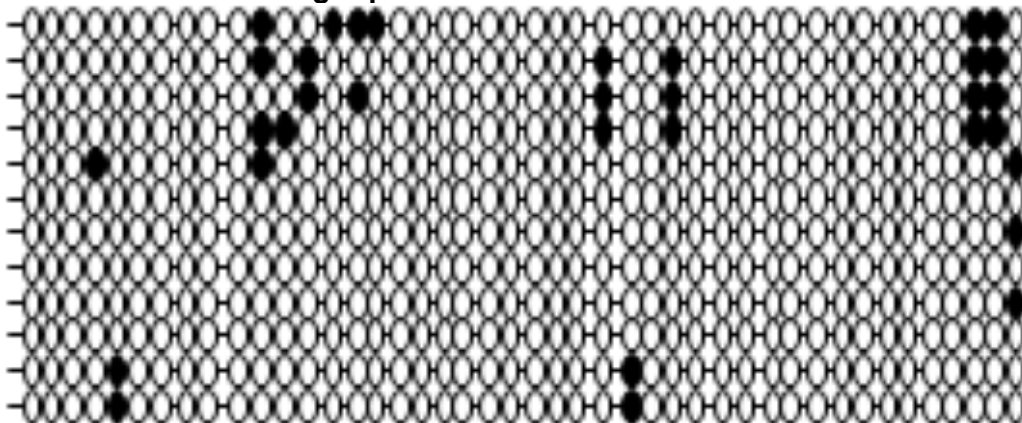


Figura.5.9.C Patrón de metilación de la CGI-4.2 en LT de sangre de periférica. Esquema de análisis igual que en la figura 5.8B

5.1.3.2 Análisis cuantitativo de la metilación en la CGI-1 del gen CD8A

Como mencionamos previamente en el apartado de métodos, la CGI-1 del gen CD8A, la subdividimos en tres fragmentos, debido a su longitud (2.208 pb). El fragmento CGI-1.1 del extremo 3' de la isla presentó una metilación muy escasa (< 2%) en las poblaciones evaluadas y no se detectaron diferencias entre ellas. Este fragmento tuvo las mayores dificultades técnicas, debido a que la amplificación era escasa cuando el DNA de partida, tratado con bisulfito, contenía concentraciones de DNA inferiores a 500 ng. Por tanto, este fragmento no se consideró como una región adecuada para la búsqueda de perfiles de metilación en las poblaciones de LT.

En el fragmento CGI-1.2 se observa una clara diferencia entre células T CD4 y CD8, aunque no estadísticamente significativa. Sin embargo, la metilación total de este fragmento de la CGI-1 puede considerarse poca ya que es < 10% en poblaciones CD4 y < 5% en poblaciones CD8 (figura 5.10).

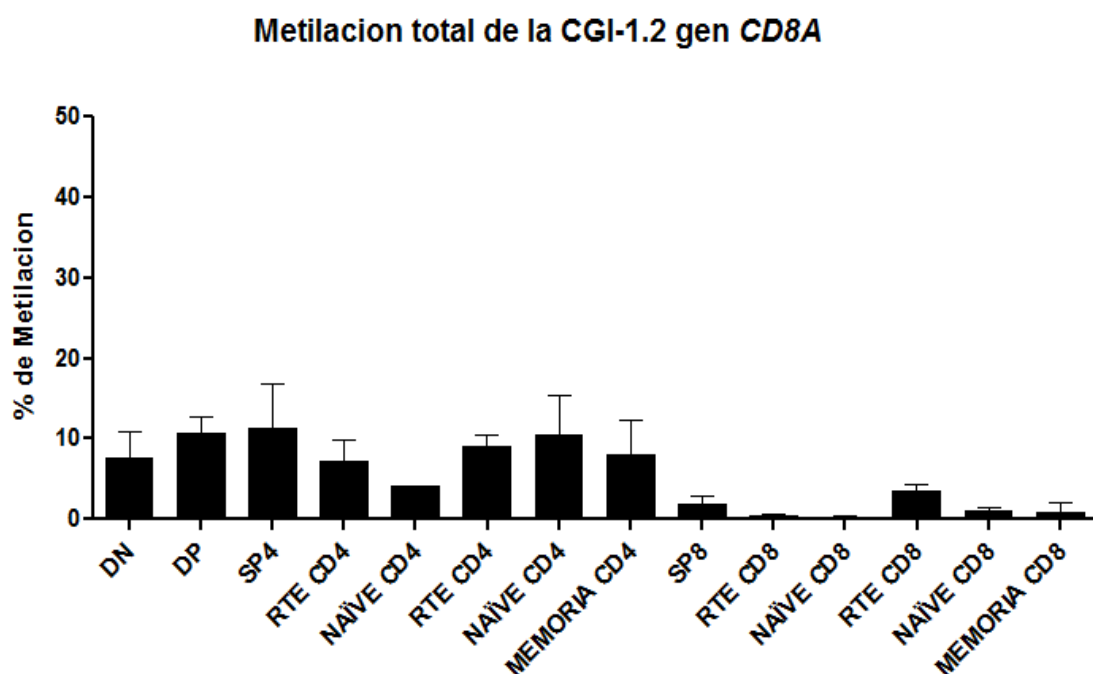


Figura 5.10. Análisis del porcentaje de metilación en las 24 CpGs que conforman la CGI-1.2 del gen CD8A. Datos evaluados en 3 diferentes muestras y en todas las poblaciones de LTs.

Los timocitos presentan una metilación acendante a medida que se van diferenciando. También es evidente que desde el estadio SP en timo ya existen diferencias entre el linaje CD4 y CD8 en esta región de la CGI-1.

En el fragmento CGI-1.3 del gen *CD8A* se observa una metilación superior a la encontrada en CGI-1.2 en todas las poblaciones evaluadas. La variación en los niveles de metilación entre individuos para CGI-1.3 no es significativa (figura 5.11).

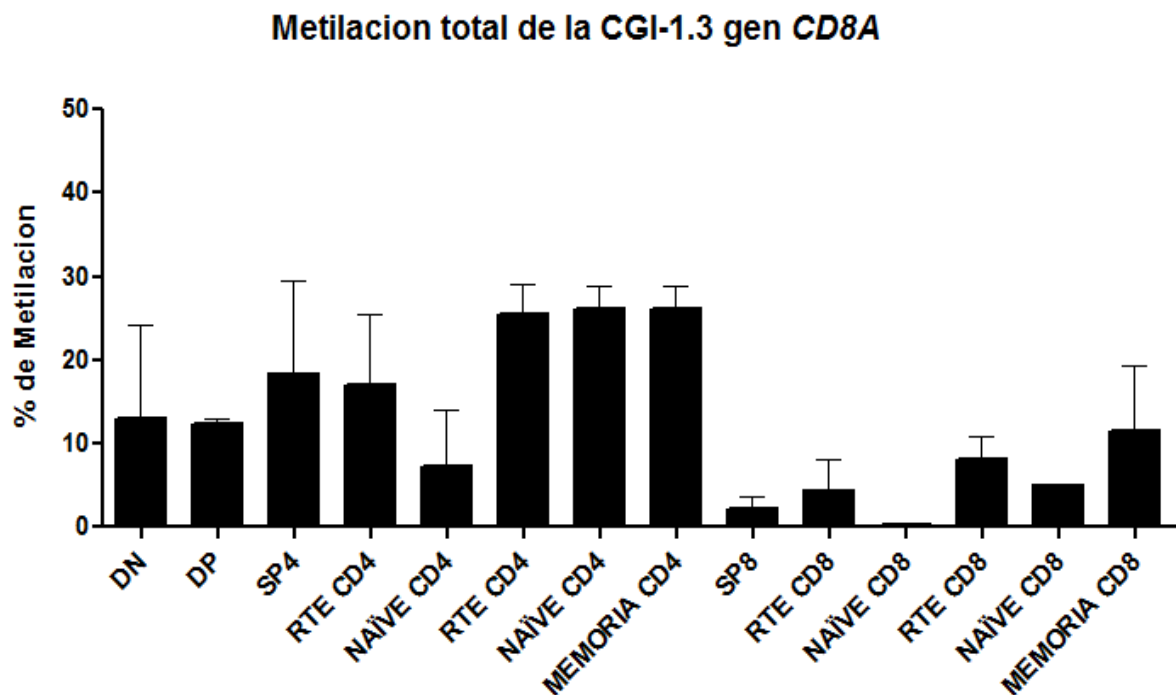


Figura 5.11. Análisis del porcentaje de metilación en las 31 CpGs que conforman la CGI-1.3 del gen *CD8A*. Datos evaluados en 3 diferentes muestras y en todas las poblaciones de LTs.

En timo los estadios de DN y DP presentan una metilación del 12%. Además, la diferencia entre células T CD4 y CD8 comienza a ser significativa desde el estadio SP (18 vs 2%).

Posteriormente, en las muestras de sangre de cordón encontramos una desmetilación importante entre el estadio de células RTE CD4 vs LT naive CD4 (17% vs 7%). Esto

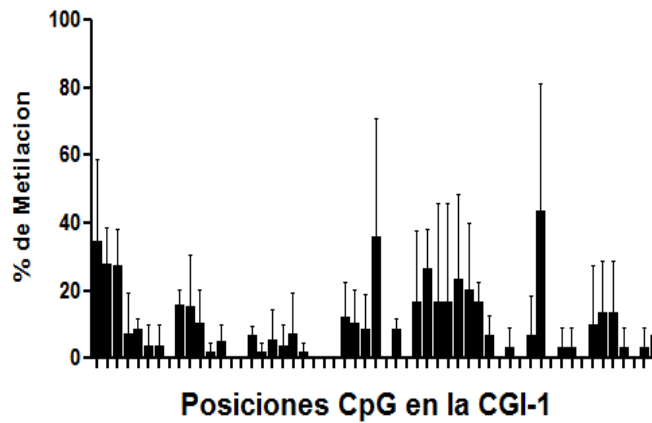
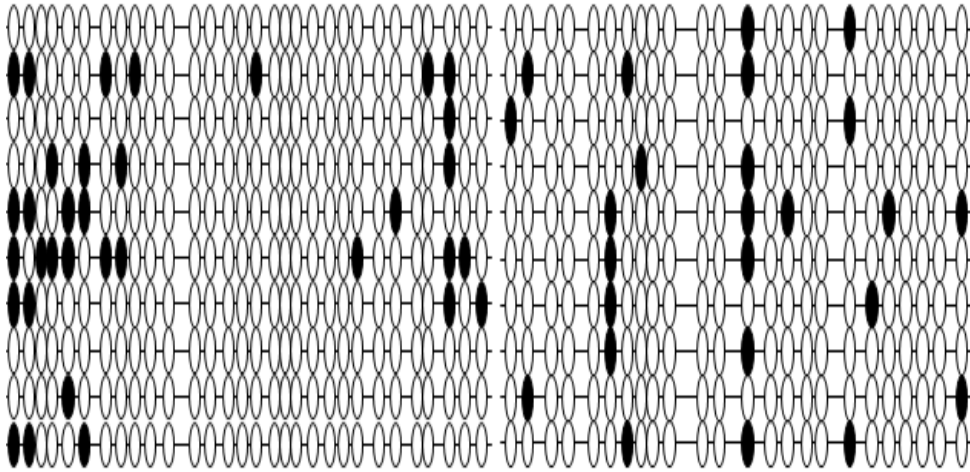
mismo se observa en los de RTE CD8 vs LT naive CD8 (8% vs 5%) aunque la diferencia es menor.

En sangre periférica de adultos en cambio vemos que las poblaciones CD4 conservan un nivel de metilación del 25% en todos los estadios, mientras que en las poblaciones CD8, los porcentajes son menores y solo se alcanza un 11% en el estadio de LT CD8 memoria,

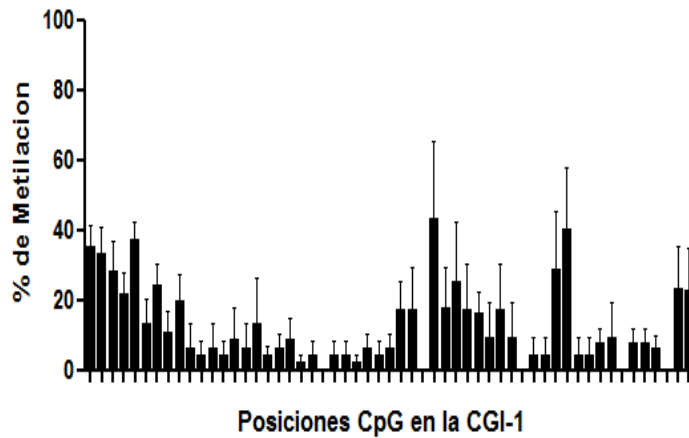
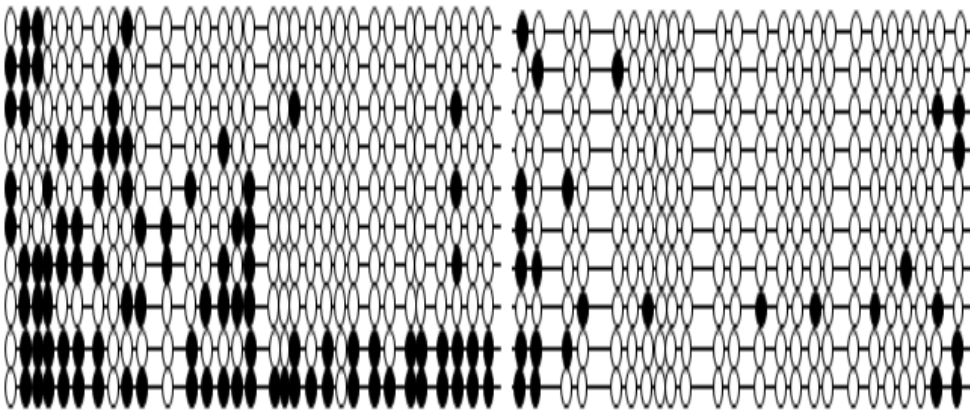
Luego de encontrar estos porcentajes de metilación pasamos a buscar donde se concentraba el mayor grado de metilación de la CGI-1 (en sus fragmentos 1.2 y 1.3). Nuestros resultados muestran que el grado de metilación más alto se concentra en la región 5' del fragmento 1.3. Además, en esta región se observa una diferencia aun más significativa entre las células T CD4 y CD8 en todos sus estadios. También se evidencia un gradiente creciente de metilación, no detectable al analizar la metilación total de la CGI-1, que se presenta tanto en LT CD4 como CD8 en la sangre periférica de adultos.

La distribución de la metilación para cada posición de la CGI-1 (fragmentos 1.2 y 1.3) del gen *CD8A*, se encuentra graficada en la Figura 5.12 A-C, donde podemos ver cada una de las poblaciones celulares, con su respectivo patrón de metilación.

Timocitos DP



Timocitos SP4



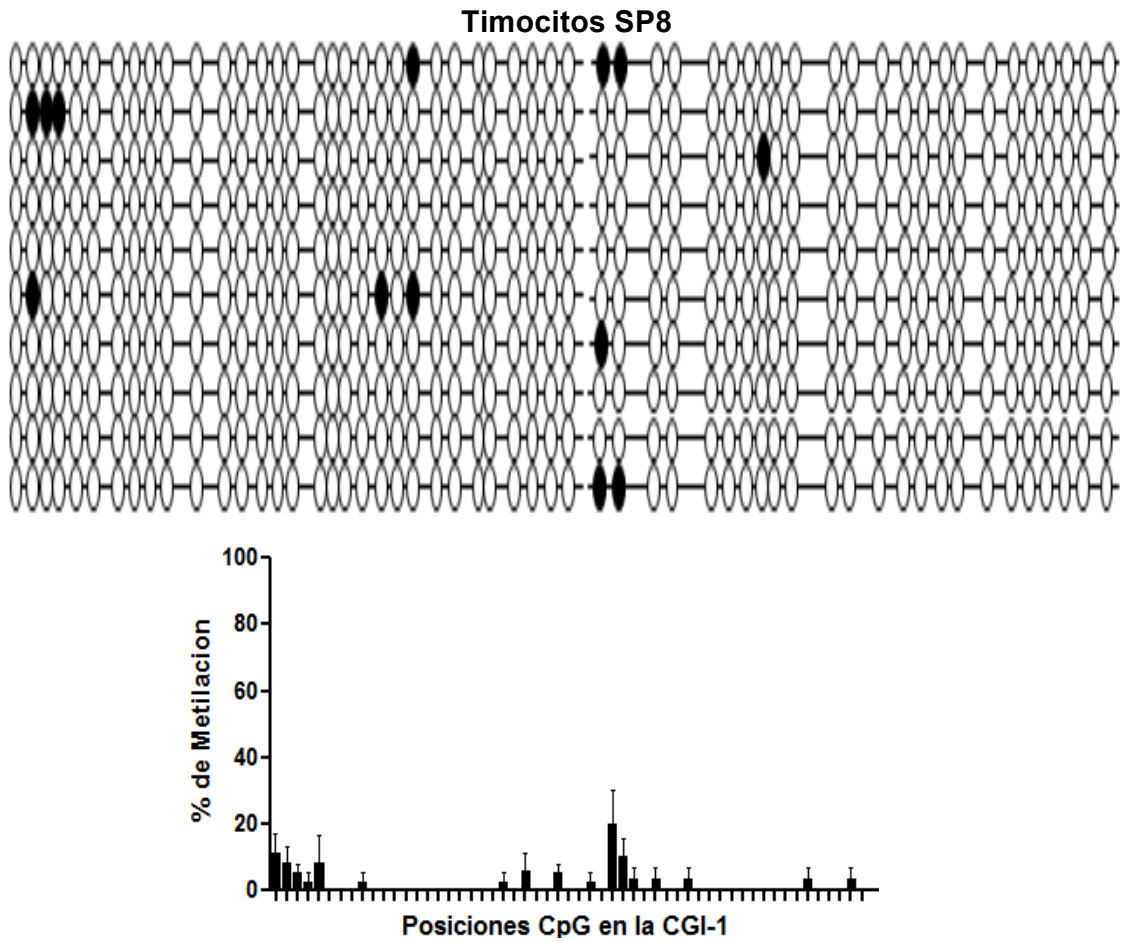
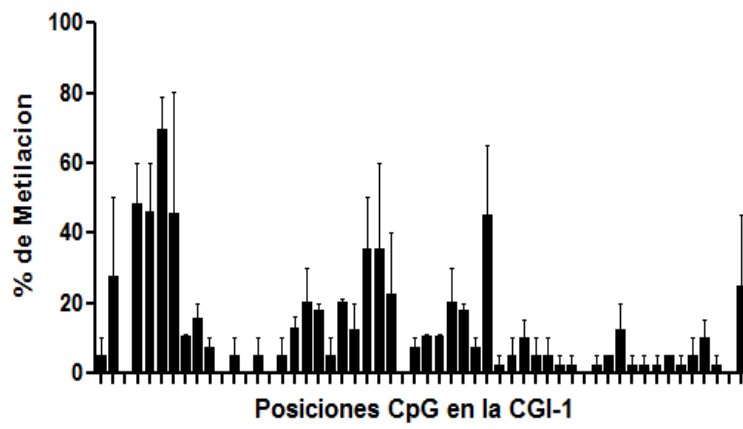
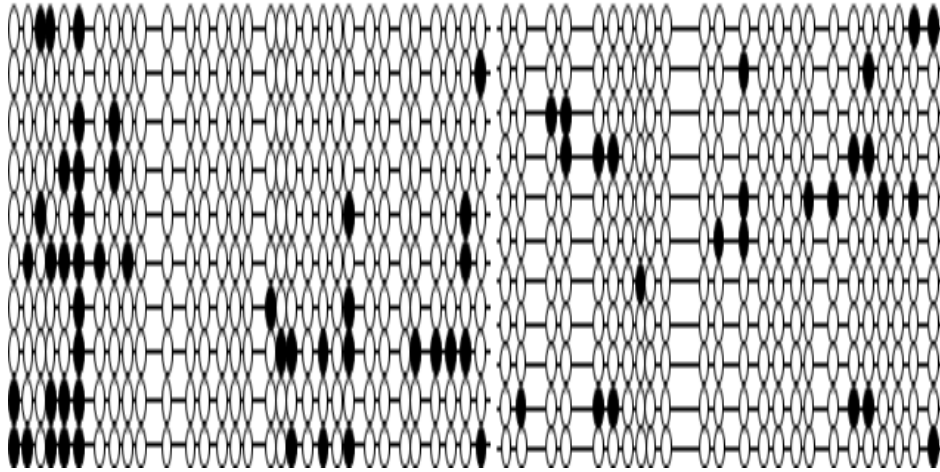
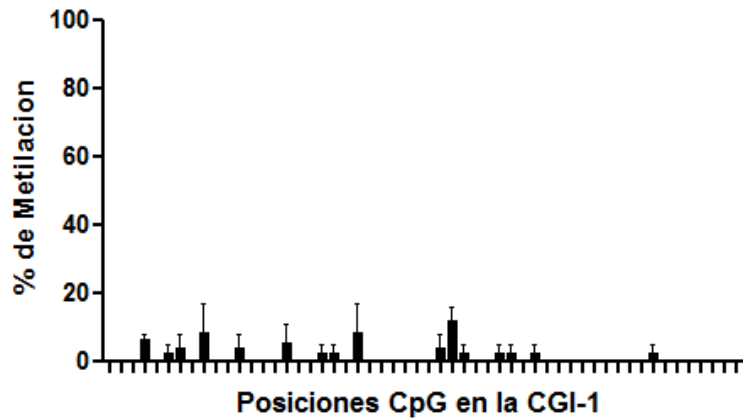
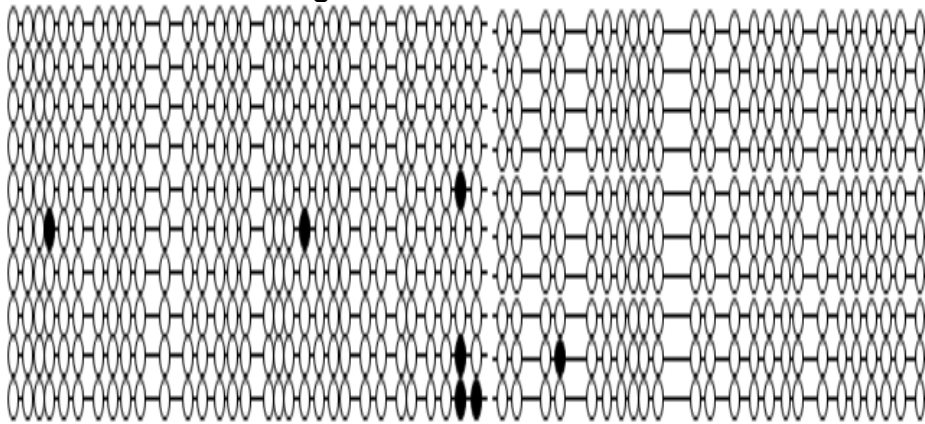


Figura.5.12.A Patrón de metilación de la CGI-1 (fragmentos CGI-1.2 1.3) del gen *CD8A* en timocitos. Esquema de análisis igual que en la figura 5.8

Sangre de cordón. RTEs CD4



Sangre de cordón. RTEs CD8



Sangre de

cordón.

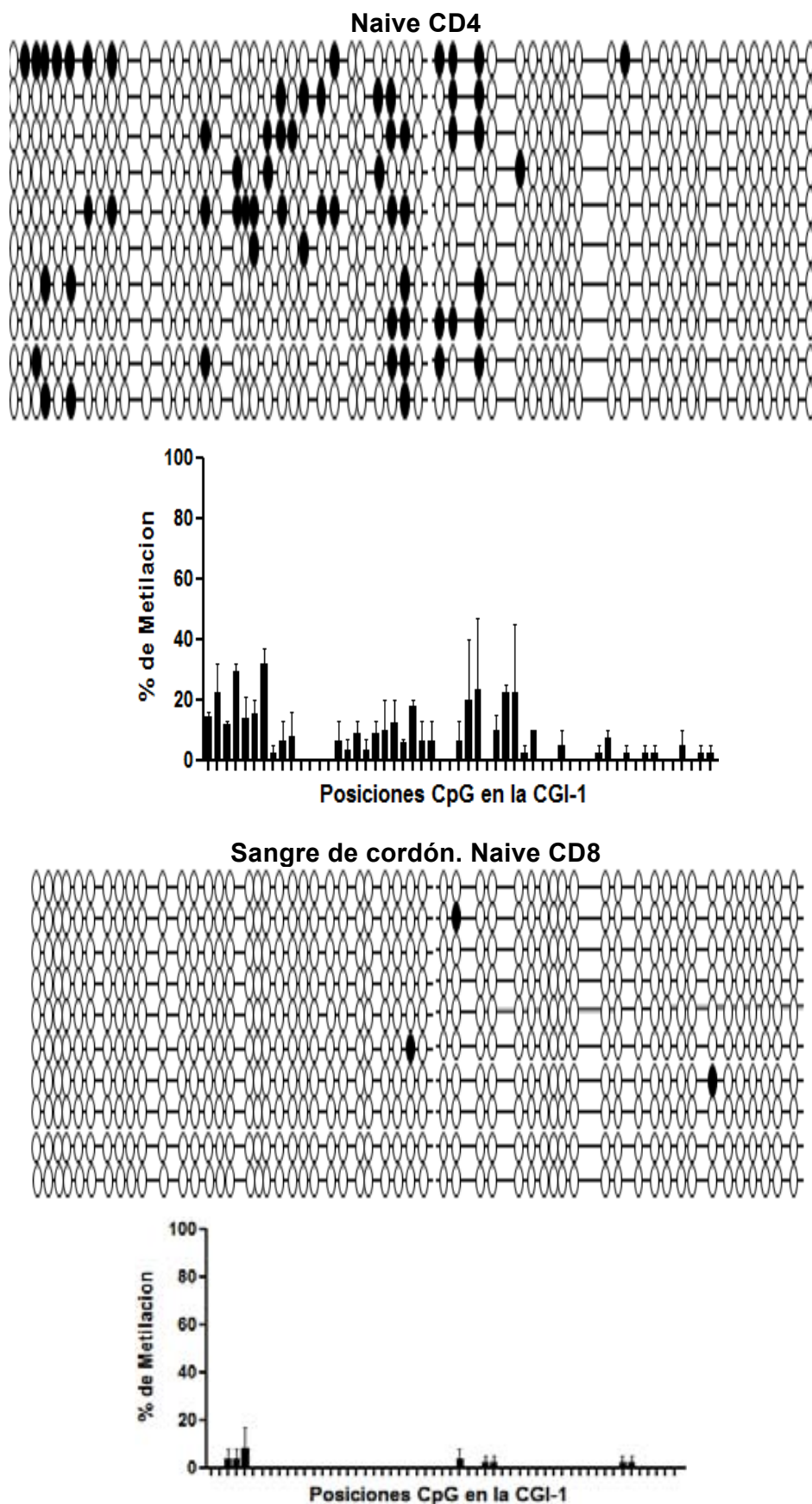
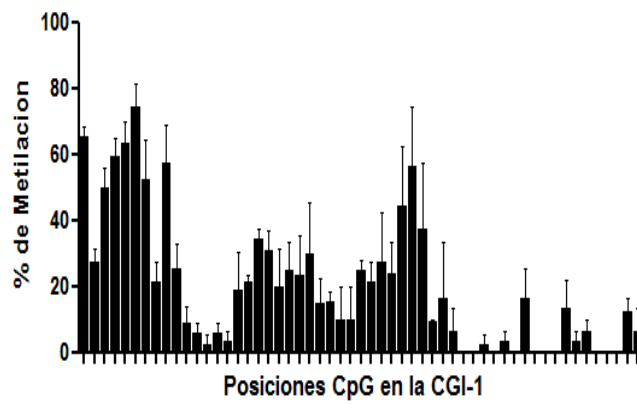
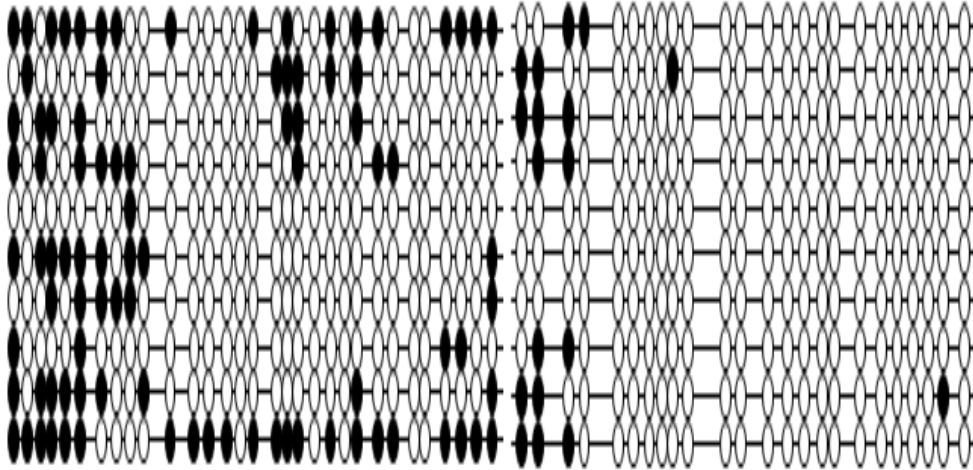
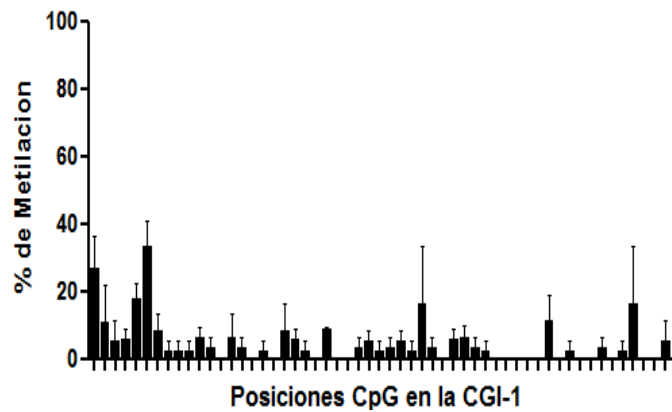
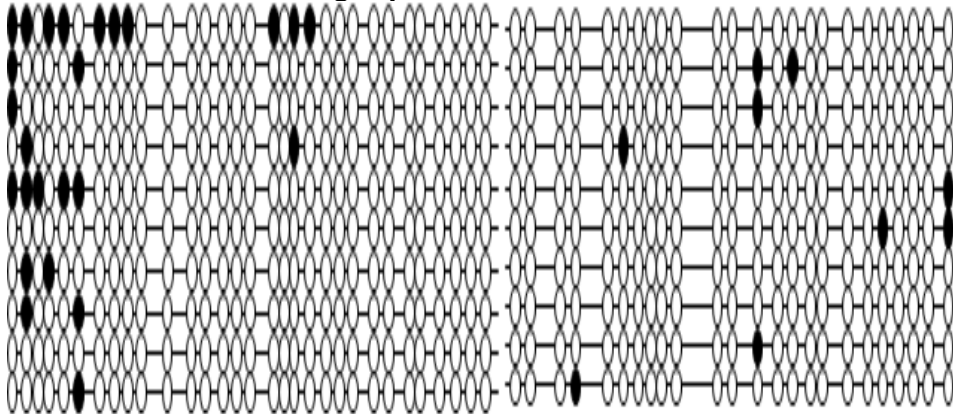


Figura.5.12.B Patrón de metilación de la CGI-1 (fragmentos CGI-1.2 1.3) del gen *CD8A* en LT de sangre de cordón. Esquema de análisis igual que en la figura 5.8

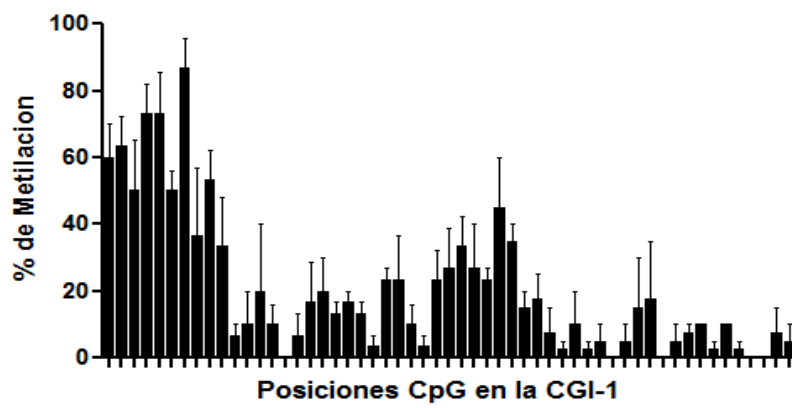
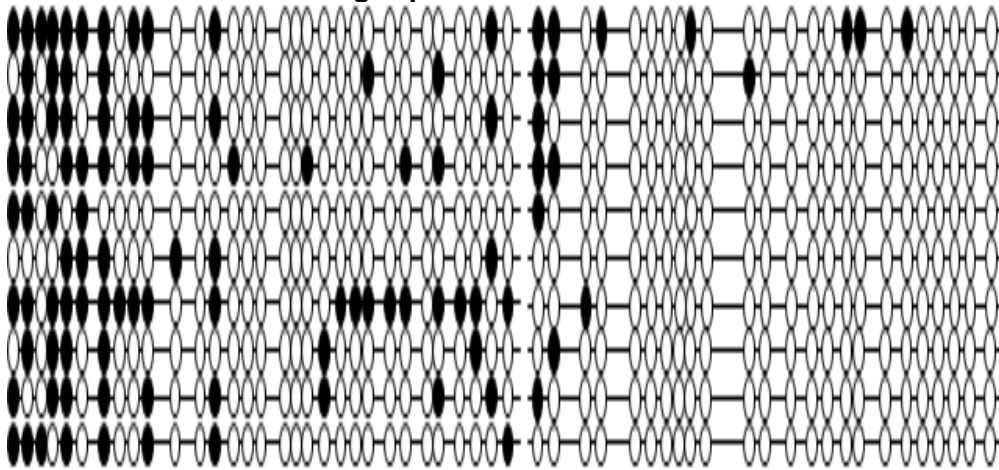
Sangre periférica. RTEs CD4



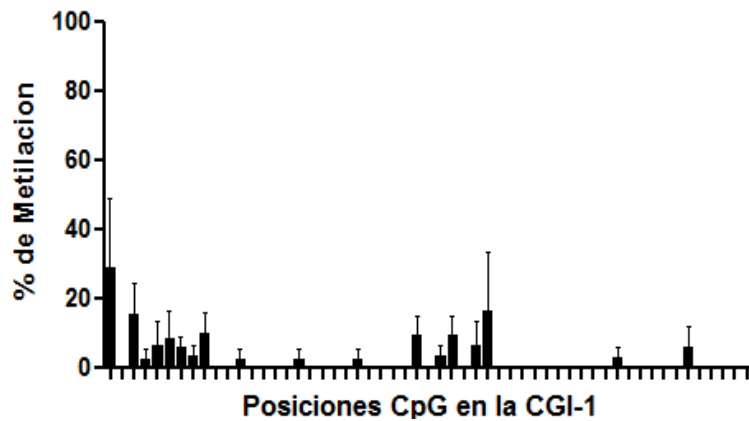
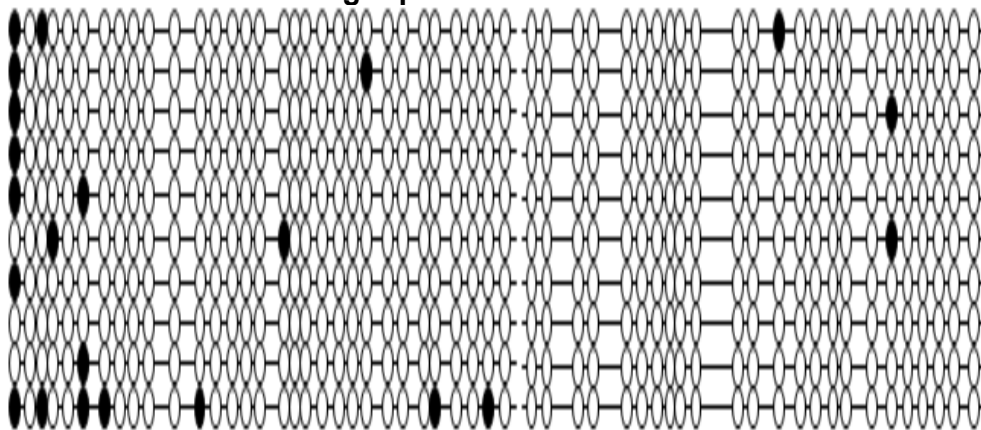
Sangre periférica. RTEs CD8



Sangre periférica. Naive CD4



Sangre periférica. Naive CD8



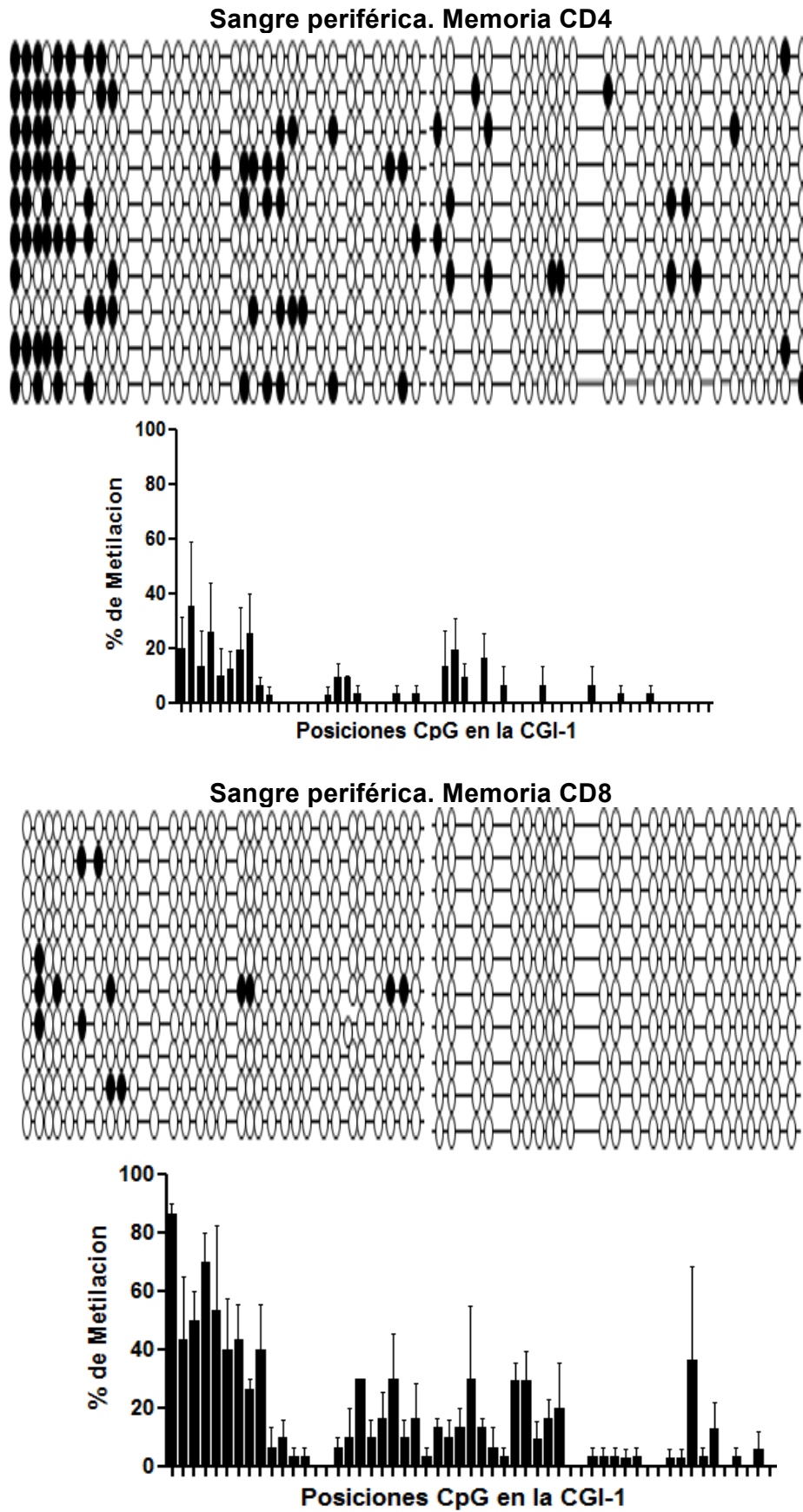


Figura.5.12.C Patrón de metilación de la CGI-1 (fragmentos CGI-1.2 1.3) del gen *CD8A* en LT de sangre de periférica. Esquema de análisis igual que en la figura 5.8

5.1.3.3 *Análisis cuantitativo de la metilación en la CGI-2 del gen CD8A*

La CGI-2 del gen *CD8A*, ubicada en la región intergénica compartida con el gen *CD8B* no se metila en ninguno de los estadios de desarrollo de los LT CD4, ni tampoco de los LT CD8 evaluados. La no metilación de esta isla también se confirmó en tejidos totales de timo, sangre periférica y tejido tiroideo, como control no hematopoyético. En ninguna de las muestras analizadas se encontró metilación. Por tanto esta CGI no fue considerada como región candidata para continuar con los objetivos de esta investigación.

5.1.3.4 *Análisis cuantitativo de la metilación en la CGI-3 del gen CD8A*

La CGI-3 del gen *CD8A* tiene el más alto grado de metilación de todas las CGIs analizadas. En las poblaciones de células T del timo es donde se encuentra el mayor porcentaje de metilación (>50%) y no se observan diferencias entre los SP4 y SP8 (figura 5.13). Además, aunque en la figura 5.7 se presente un esquema de la distribución de la metilación de la CGI-3, se debe aclarar que esta isla posee una alta variabilidad en la distribución de la metilación, pues encontramos algunos clones completamente metilados en todas las posiciones CpG que conforman la isla y en todas las poblaciones de LT analizadas, mientras que otros clones dentro de la misma población pueden tener uno o ninguno de sus sitios CpG metilados. En los LT de sangre de condón se observa un grado de metilación similar entre las poblaciones CD4 y CD8 RTEs, mientras que en las naive, comienzan a surgir diferencias discretas entre LT CD4 y CD8 pero sin ser significativas, especialmente por la alta variabilidad entre individuos y entre clones, donde aparece el mismo fenómeno de todas las posiciones metiladas vs ninguna metilada. Por otra parte, en las poblaciones separadas de sangre periférica adulta se observa que el grado de metilación entre LT CD4 y CD8 es alto ($\geq 30\%$), en la mayoría de posiciones CpG. También observamos que en este tipo de

muestra la variabilidad entre individuos es muy alta, pero comienzan a observarse diferencias claras entre LT CD4 y CD8 ya desde el estadio de LT naíve. Es en el estadio de LT CD8 memoria donde hay un menor grado de metilación, pero sin que ninguna de estas diferencias delimiten posiciones o regiones de la isla claramente diferentes que constituyan un patrón diferencial en los estadios de desarrollo de los LT evaluados.

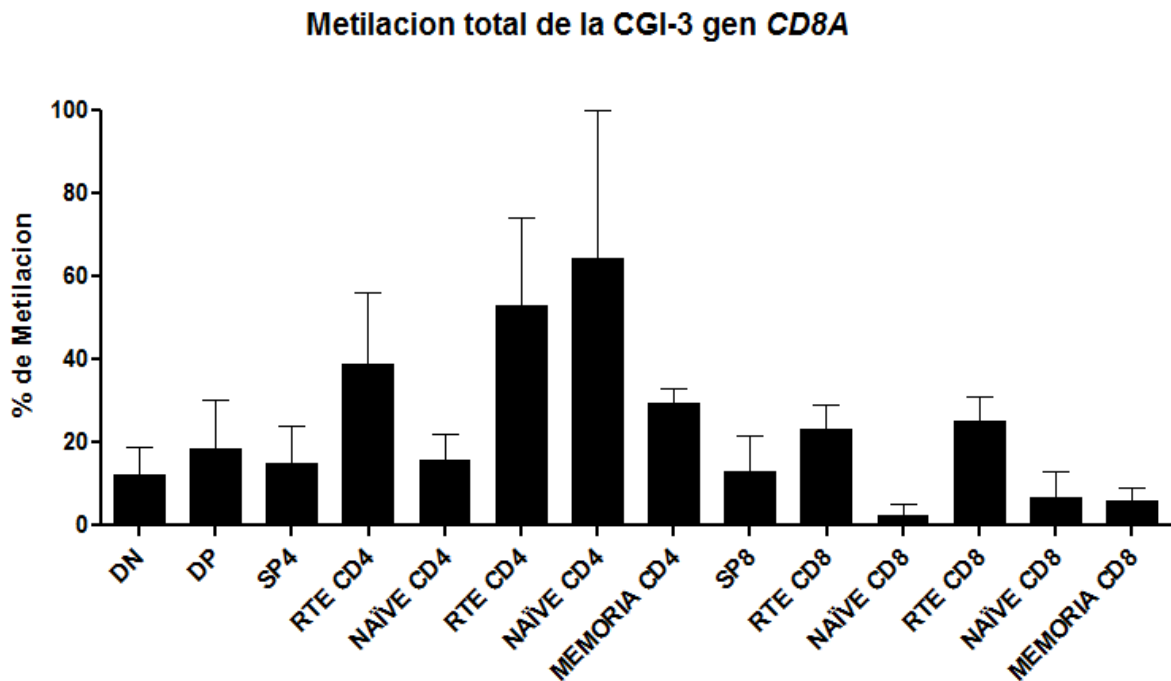
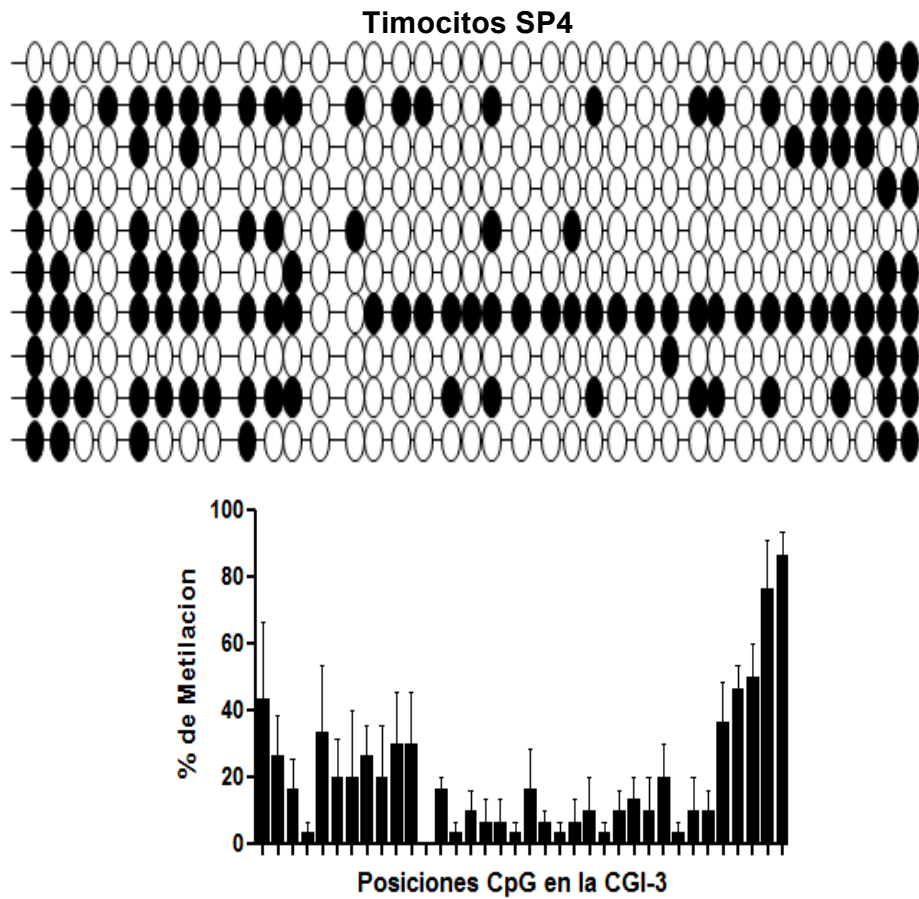
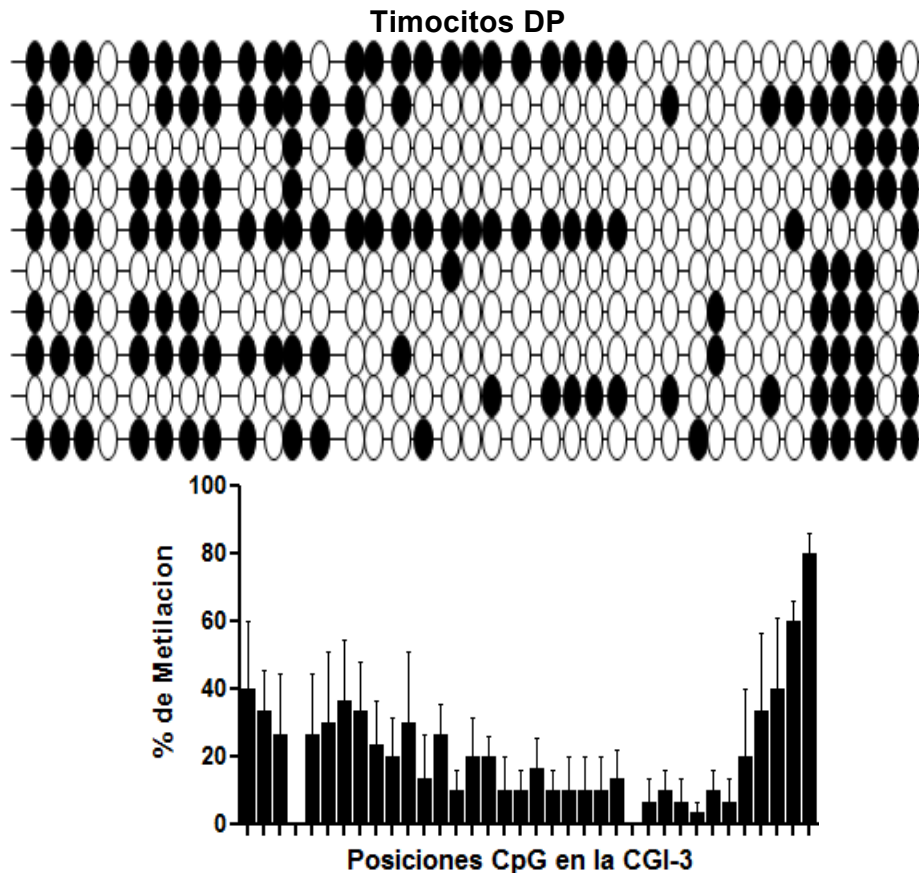


Figura 5.13. Analisis del porcentaje de metilacion en las 31 CpGs que conforman la CGI-1.3 del gen *CD8A*. Datos evaluados en 3 diferentes muestras y en todas las poblaciones de LTs.

Nuestros resultados sugieren que el patrón de metilación de la CGI-3 podría influir en la expresión o función del gen *CD8A* y/o *CD8B* de los LT CD4 y CD8 memoria. Este hecho podría ser interesante de profundizar en nuevos estudios pero dado el patrón que hemos observado, la metilación de la CGI-3 no parece estar involucrada en el desarrollo e identidad celular de las poblaciones de LT de individuos sanos. La metilación para la CGI-3 se encuentra graficada en la Figura 5.14 A-C, donde observamos un patrón de metilación representativo de las muestras evaluadas.



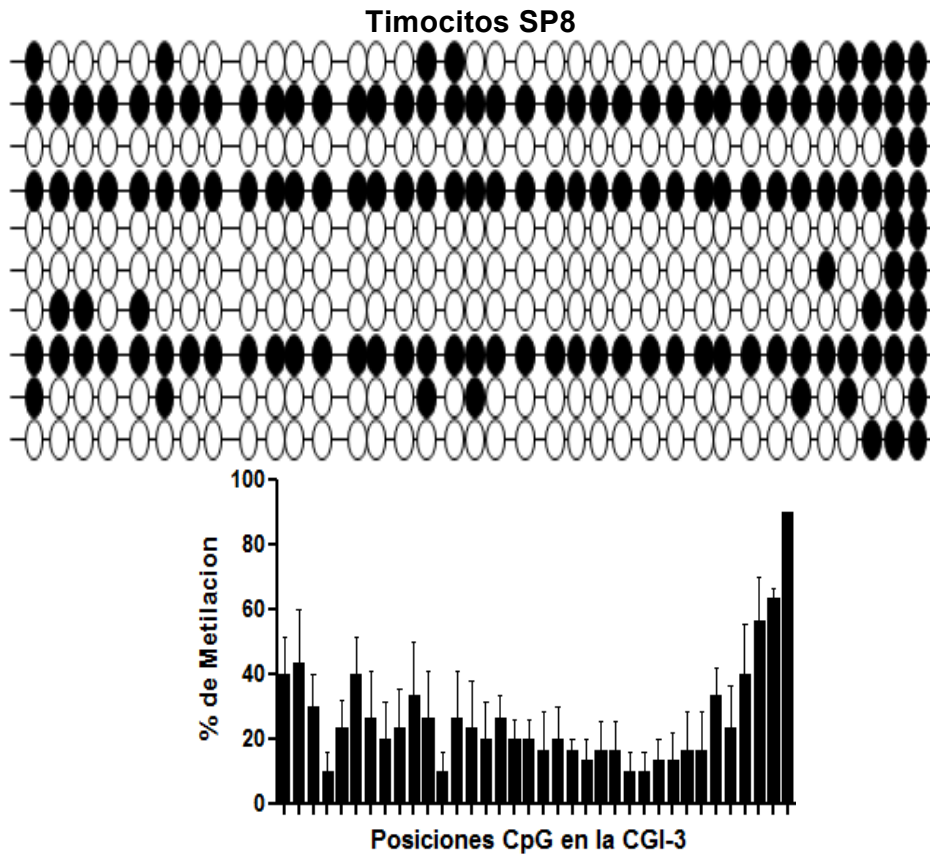
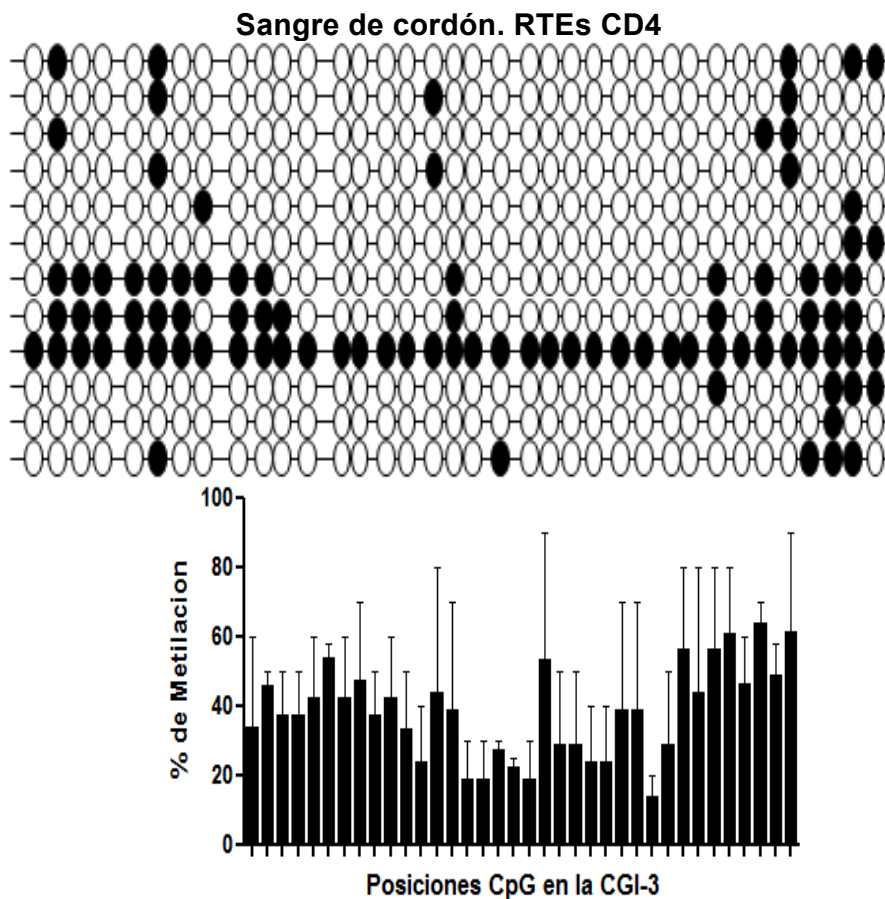
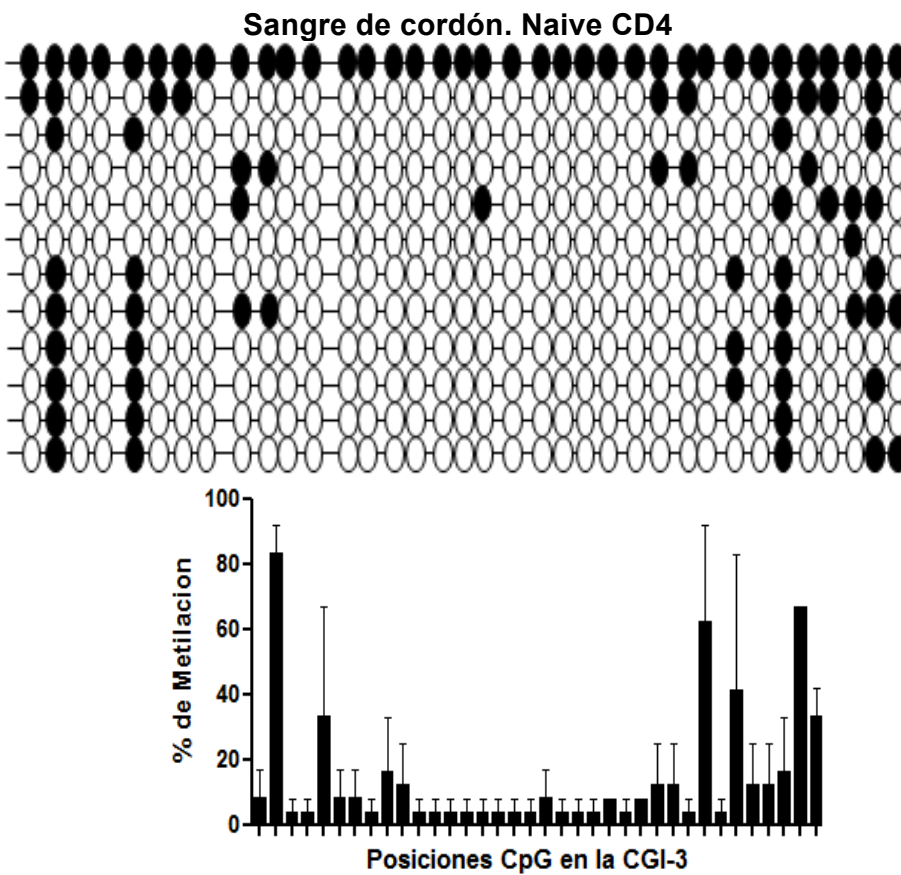
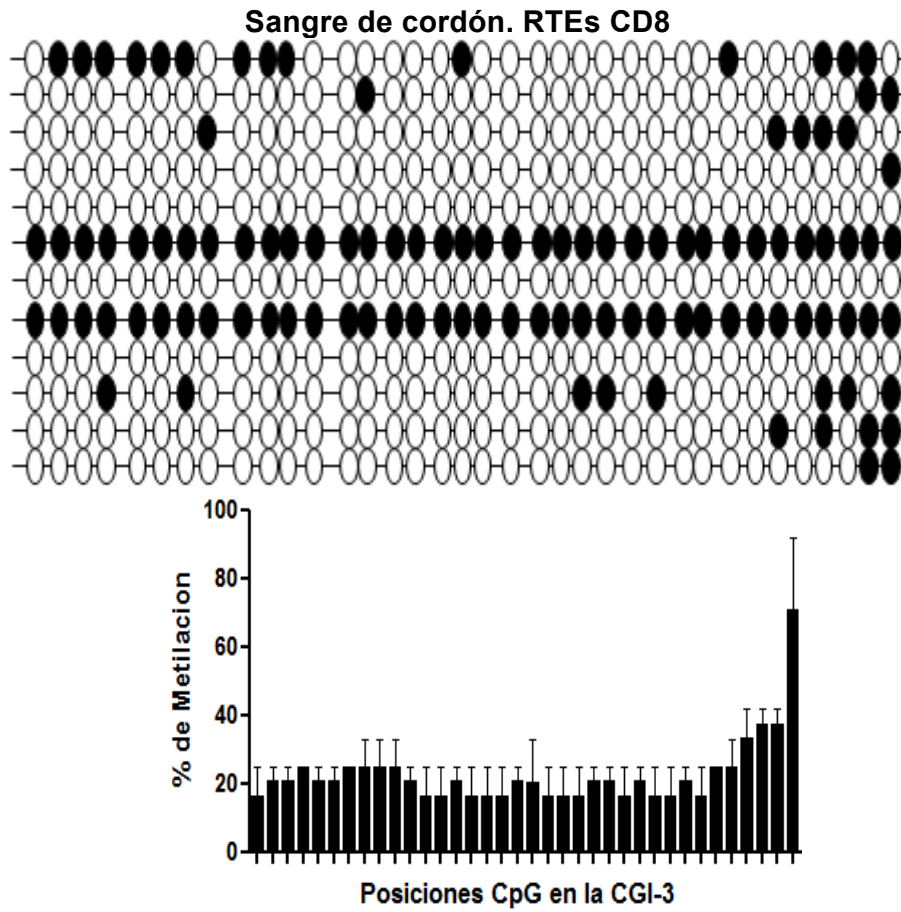


Figura.5.14.A Patrón de metilación de la CGI-3 en timocitos. Esquema de análisis igual que en las figuras anteriores





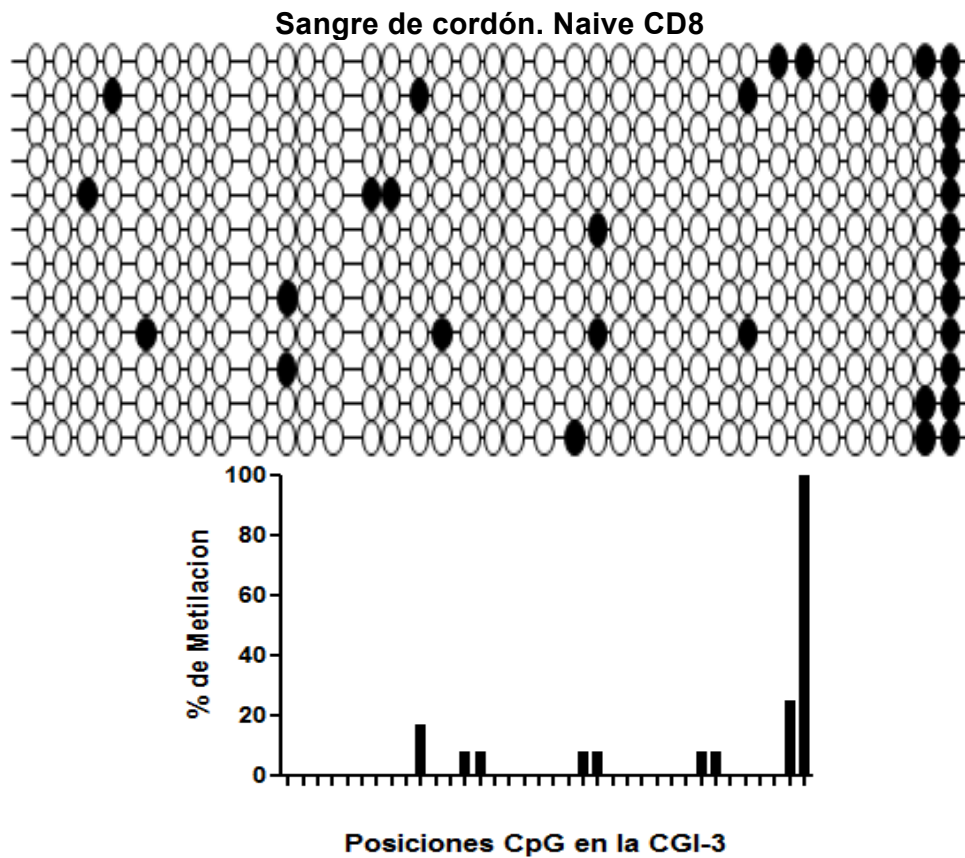
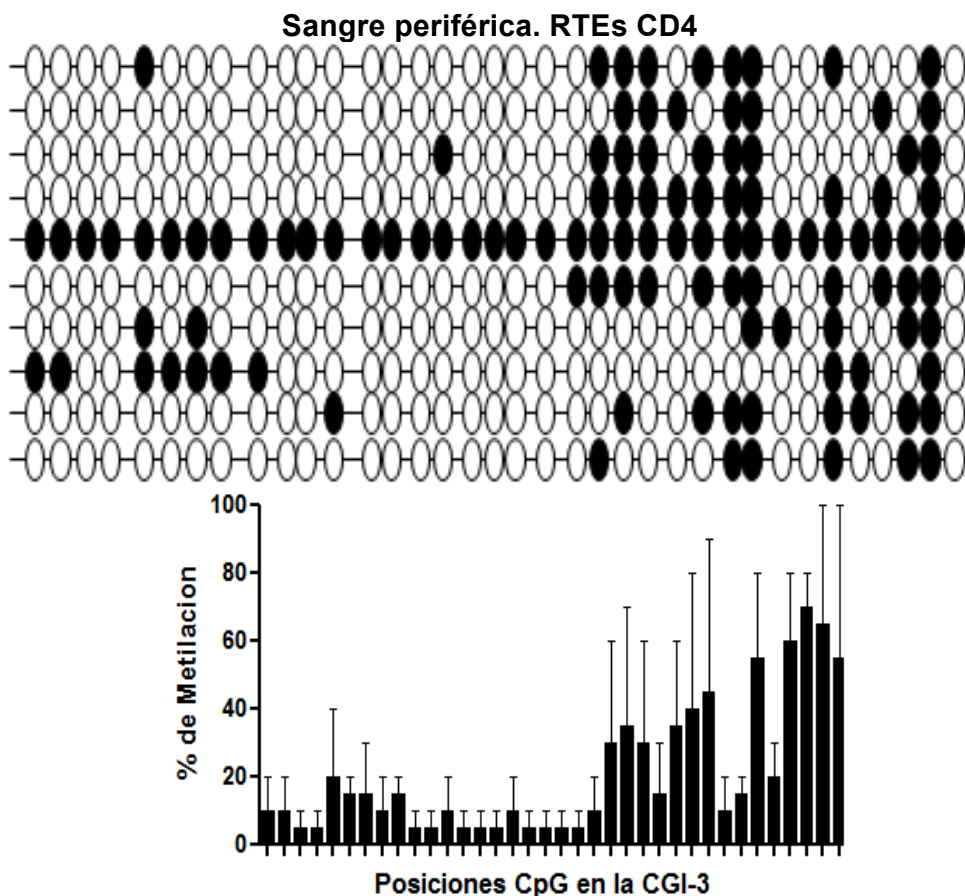
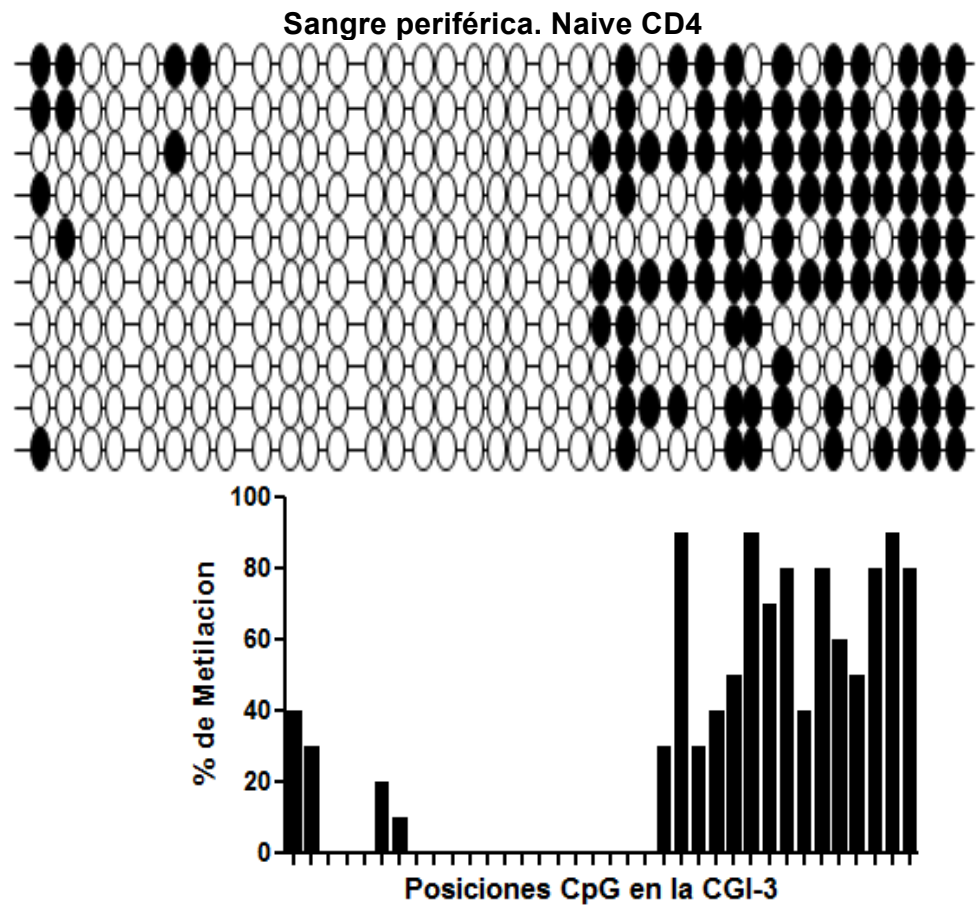
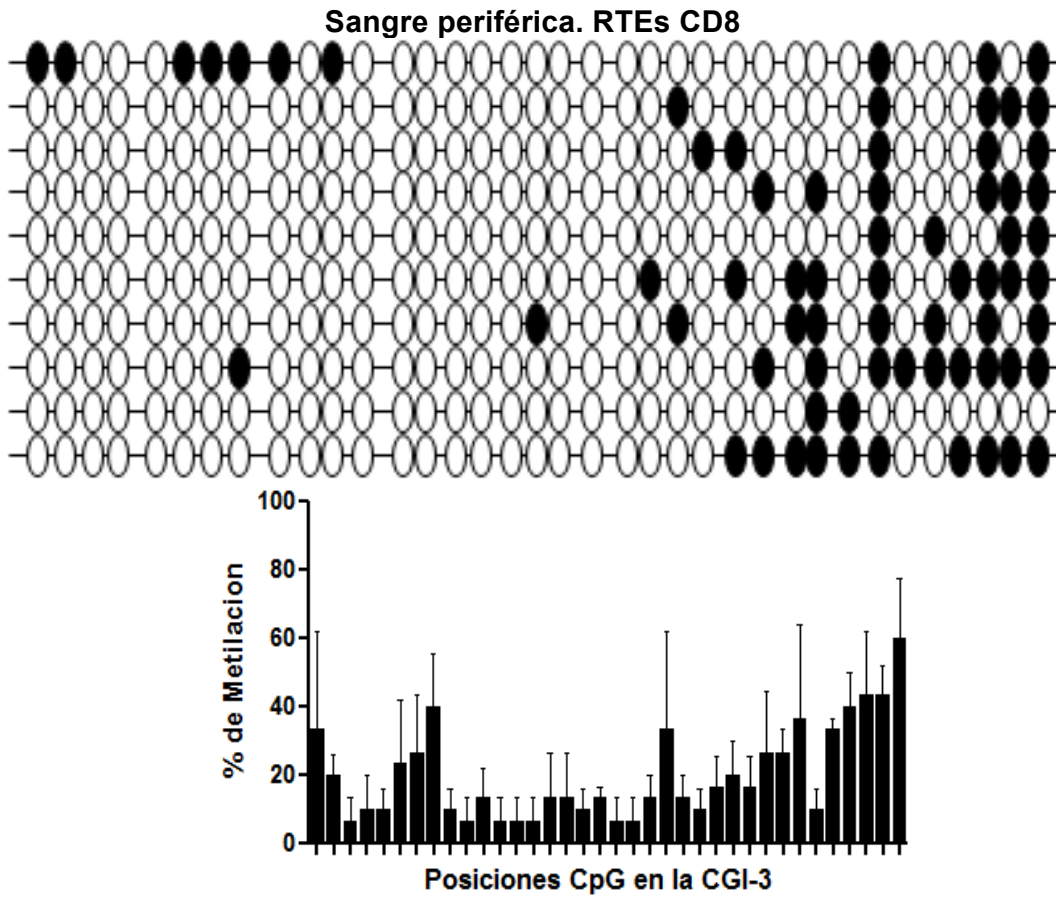
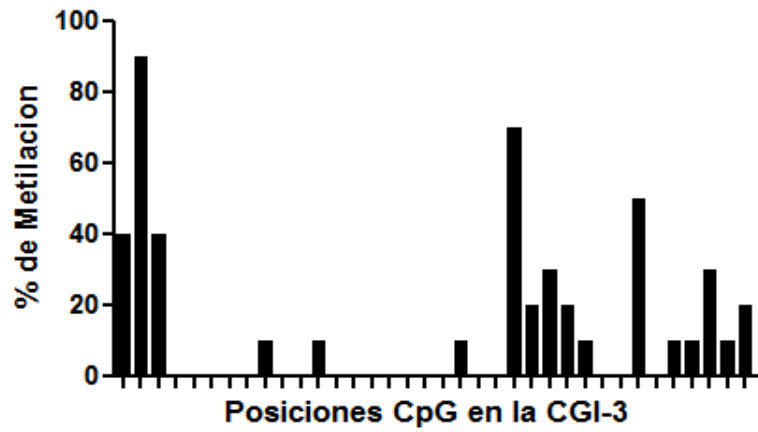
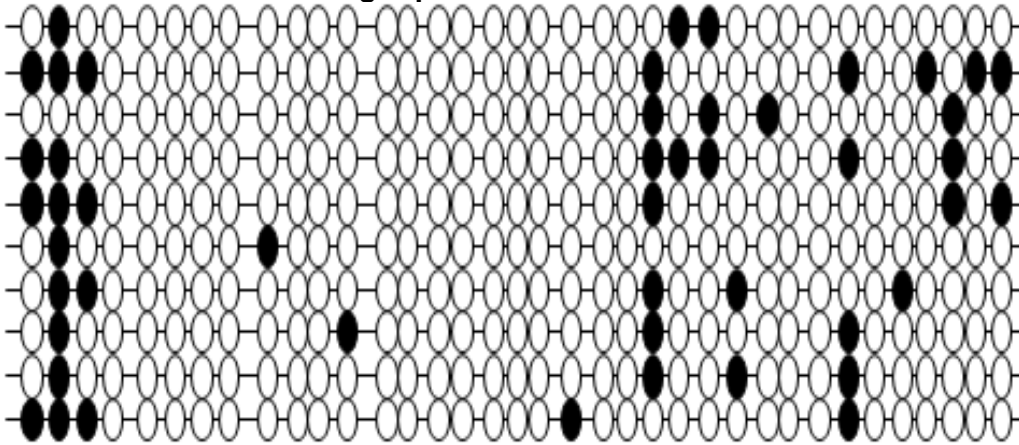


Figura.5.14.B Patrón de metilación de la CGI-3 en sangre de cordón. Esquema de análisis igual que en las figuras anteriores

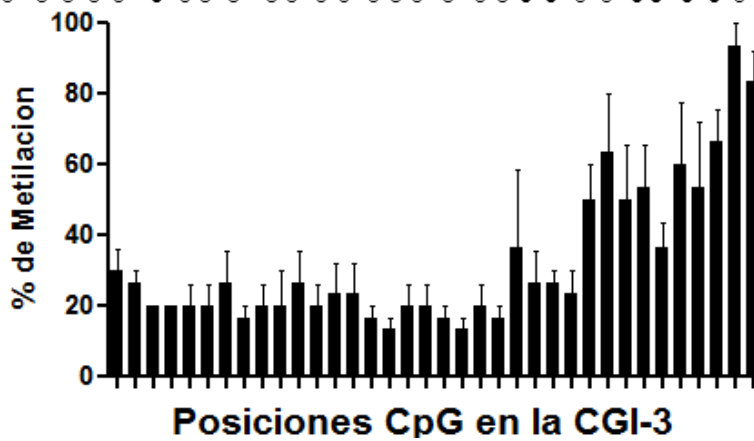
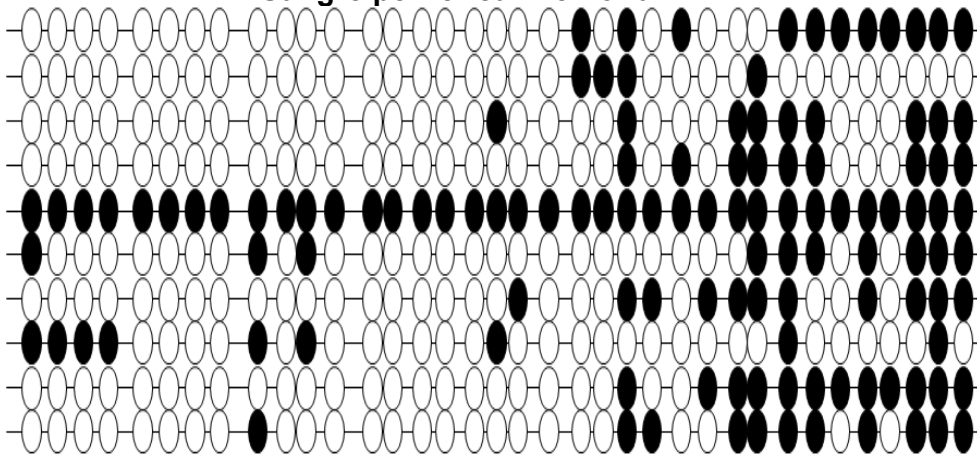




Sangre periférica. Naive CD8



Sangre periférica. Memoria CD4



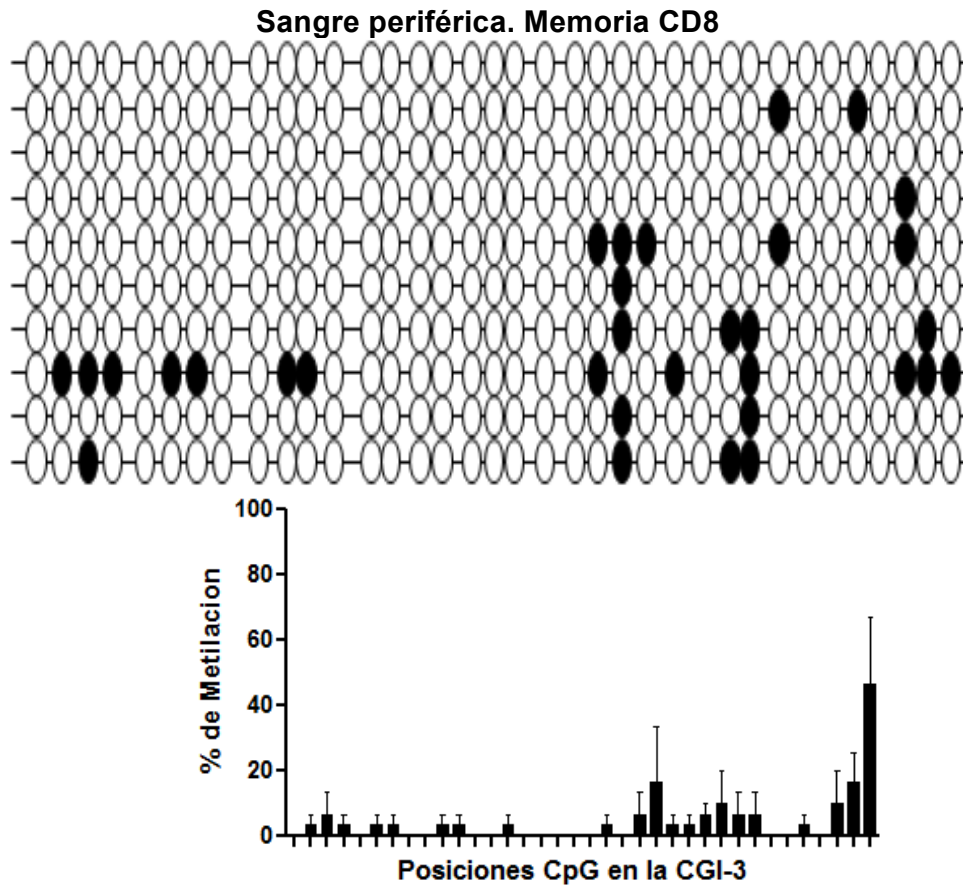


Figura.5.14. C Patrón de metilación de la CGI-3 en sangre periférica. Esquema de análisis igual que en las figuras anteriores

5.2 Resultados II: Diseño de una prueba molecular basada en qPCR-FRET

Consideraciones Previas

Una vez identificado el perfil de metilación de las CGIs de los genes *CD4* y *CD8A* empleando la técnica considerada como *gold standard*, que es la secuenciación de DNA tratado con bisulfito y clonado, establecimos que la región 5' de la CGI-1 del gen *CD8A* era una zona candidata para ser estudiada como región diferencialmente metilada (DMRs), dentro de los estadios de desarrollo de los LT en humanos sanos.

Para confirmar este hallazgo era necesario ampliar el número de muestras estudiadas y aplicar una prueba molecular sensible y específica, dirigida a cuantificar el grado de metilación de la región seleccionada en cada población de LT.

La metodología que nos propusimos optimizar combina por primera vez una PCR seguida de un estudio de curvas *melting* a partir del uso de un par de sondas FRET que permite cuantificar el grado de metilación de un fragmento de DNA tratado con bisulfito.

El diseño se realizó para el extremo 5' de la CGI-1 del gen *CD8A* y la amplificación se hizo directamente de bacterias transformadas con un plásmido vector que posee el fragmento de DNA de interés. Este método se espera que sea un modelo metodológico que pueda ser aplicado a otras regiones del DNA cuyo patrón de metilación pueda ser considerado como biomarcador, tanto en poblaciones celulares normales, como en diferentes patologías de interés.

El protocolo consistió en el diseño de dos primers específicos que amplifican la región que contiene las 6 últimas CpGs de la CGI-1(fragmento CGI-1.3) del gen *CD8A*. Basados en la secuencia contenida en este locus, se diseñaron dos sondas FRET que se hibridan específicamente una adyacente a la otra. La primera sonda (**sensor** o donante) posee una secuencia complementaria a la cadena del DNA e incluye 4 de las 6 posiciones CpG de la isla CGI-1 en su estado **no metilado**. Esta sonda posee en su extremo 3' el fluorocromo fluoresceína (FAM). La temperatura de melting (T_m) de esta sonda (temperatura a la que el 50% de las moléculas de sonda están hibridadas en el DNA) variará dependiendo de si su secuencia complementaria en el DNA posee 4, 3, 2, 1 o ninguna de las posiciones CpG metiladas. Continua a la secuencia de la sonda donante se diseñó la segunda sonda (**anchor** o receptora), que hibrida a dos nucleótidos de distancia de la primera y tiene una secuencia complementaria al DNA amplificado que no incluye ninguna posición CpG en su secuencia. Por tanto esta sonda

siempre estará unida de manera totalmente complementaria a la secuencia molde independientemente del tipo de muestra amplificada y será la encargada de recibir la energía transferida por la sonda donadora y excitarse para emitir la fluorescencia correspondiente, que en este caso es emitida por el fluorocromo LC Red 640 en el extremo 5' de la sonda. Como esta emisión de fluorescencia depende de que las dos sondas (*sensor* y *anchor*) estén hibridadas en el DNA, las Tms de esta emisión se darán a diferentes temperaturas, según el grado de metilación de la secuencia (Figura 5.15). El diseño los oligonucleótidos y las sondas FRET se realizó con los programas *LightCycler Probe Design 2.0* (Roche. Mannheim. Germany) y *OLIGO primer analysis software* (Molecular Biology Insights, Inc).

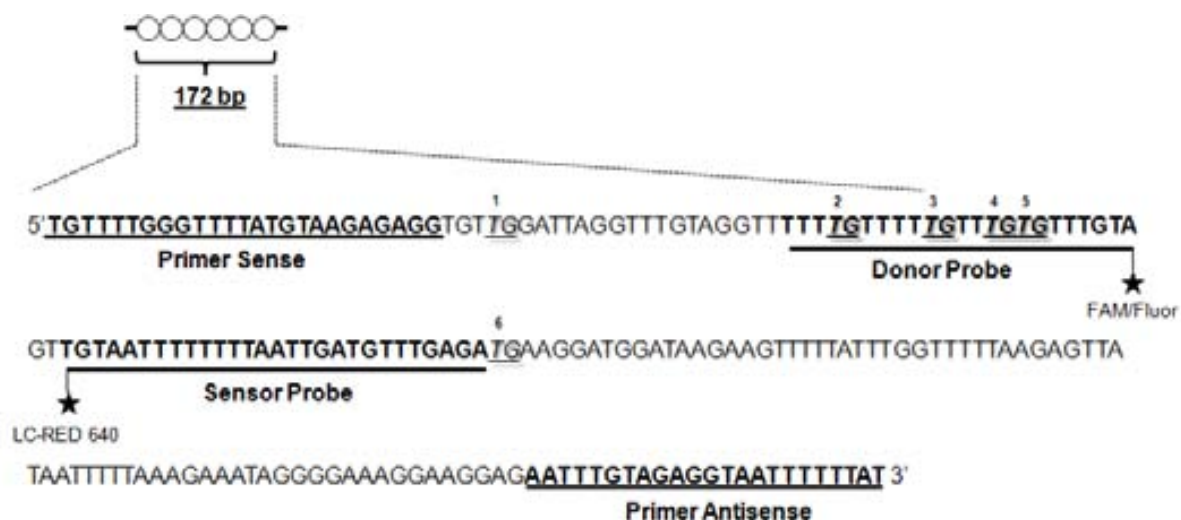


Figura 5.15. Esquema del diseño y ubicación de las sondas y primers para la amplificación del extremo 5' de la CGI-1 del gen *CD8A* humano, que incluye 6 sitios CpG y permite analizar de manera cuantitativa el estado de metilación de 4 de ellos.

La PCR se realizó en un volumen final de 10 μ l que contenían 0,5 μ l de cada primer (10 uM), 1 μ l de dNTPs (2 mM), 1 μ l de Buffer 10X *FastStart Taq DNA polymerase with MgCl₂ 25mM* (Roche Diagnostics. Mannheim. Germany), 0,2 μ l de cada sonda de hibridación (10 μ M) y 2 μ l (\approx 100ng) de cada clon de bacterias totales transformadas con el DNA tratado con bisulfito y clonado en el vector bacteriano descrito previamente.

El protocolo de amplificación se llevo a cabo en el equipo LightCycler LC480 (*Roche. Mannheim. Germany*) y consistió en 10 minutos a 95°C para la lisis bacteriana, la desnaturalización del DNA y la activación de la enzima seguido de 45 ciclos de amplificación así, 95°C por 10 segundos, 58°C de *annealing*, 20 segundos y 72°C de extensión por 30 segundos. Inmediatamente después de la PCR se llevó a cabo el análisis de curvas de *melting*. El ensayo de *melting* se generó con los siguientes pasos: 95°C por 1 segundo, 62°C por 1 minuto, 42°C durante 2 minutos (todo con una rampa de proporción 2.2°C/segundo) y subida hasta 80°C con una lenta rampa de 0.06°C/segundo con adquisición continua de la fluorescencia. Finalmente un último paso de enfriamiento de 40°C por 20 segundos. El análisis de los resultados se hizo con el software del equipo *LightCycler 480 SW 1.5 (Roche. Mannheim. Germany)*, donde se fijó la T_m para las sondas. El grado de metilación de las moléculas de DNA evaluadas se basó en la T_m de las sondas según el número de CpGs metiladas. Para facilitar el análisis y maximizar su fiabilidad se generaron estándares de metilación que correspondían a DNAs clonados y secuenciados con todos los niveles posibles de metilación. Los estándares tenían secuencias correspondientes a 0, 1, 2, 3 y 4 posiciones metiladas. Lo que nos permitió establecer las diferentes T_m en cada situación de metilación (Figura 5.16). Una de las principales ventajas del uso de las sondas FRET en este estudio es su gran capacidad de discriminación entre las diferentes situaciones posibles. A modo de ejemplo podemos observar que la diferencia de temperatura entre las dos situaciones más extremas (4 posiciones metiladas vs 0 posiciones metiladas) es de 13 grados (Figura 5.16). Los estándares se incluyeron sistemáticamente en todas las reacciones y por triplicado.

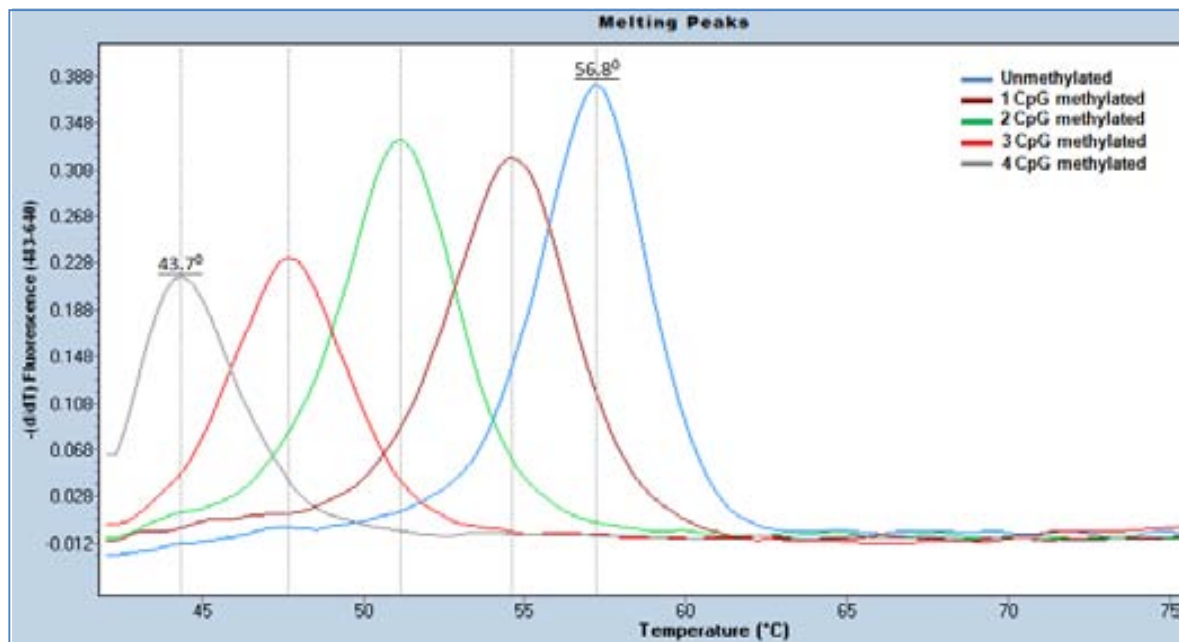


Figura 5.16. Curva de estándares para el análisis de metilación del extremo 5' de la CGI-1 del gen *CD8A* humano. Los estándares permite identificar 5 diferentes T_m que corresponden cada una a un número exacto de sitios CpG metilados en la muestra.

5.2.1 Perfiles de metilación del extremo 5' de la CGI-1 en el gen *CD8A* analizados por qPCR-FRET en el desarrollo de los linfocitos T.

Para el análisis de los patrones de metilación en la orilla 5' de la CGI-1 del gen *CD8A* se emplearon 6 nuevas muestras de timo infantil, 6 muestras de sangre periférica de adultos sanos y 6 muestras de sangre de cordón. Todas las muestras se procesaron de igual manera que las empleadas para el análisis de secuencia de DNA tratado con bisulfito y se separaron las mismas poblaciones, empleando los mismos marcadores celulares. Para cada una de las poblaciones celulares separadas se realizó la técnica de qPCR-FRET, siguiendo las condiciones descritas en el apartado anterior. Los resultados se analizaron como el número y porcentaje de moléculas de DNA con 4, 3, 2, 1 o ninguna de sus CpG metilados. Los clones totales corresponden a la suma de todos los clones de una misma población, provenientes de las 6 muestras.

5.2.1.1 Grado de metilación del extremo 5' de CGI-1 en muestras de timo

Los resultados de metilación de los clones procedentes de 6 diferentes muestras de timocitos SP4 o SP8 se muestran en números totales y porcentajes en la tabla 5.5. Además hemos calculado la media y la desviación estándar y la significancia estadística ($p < 0.005$) aplicando el test de Mann Withney, entre las 6 muestras de timo analizadas, para cada uno de los grados de metilación y se encuentran graficados en la figura 5.17.

Posiciones Metiladas	Número					Clones Totales	% de Metilación				
	4	3	2	1	0		4	3	2	1	0
SP4	4	11	17	15	33	80	5	14	21	19	41
SP8	4	7	7	15	59	92	4.4	7.6	7.6	16	64

Tabla 5.5. Perfiles de metilación de las poblaciones de timocitos SP4 y SP8 en timos infantiles. Se expresan como el número total y % de moléculas de DNA con 4, 3, 2, 1 o 0 posiciones CpG metiladas para cada población.

En timo encontramos que en las poblaciones SP8 hay un mayor porcentaje de clones no metilados que en la población SP4 (62% vs 32%), aunque la diferencia no es significativa. También encontramos que hay diferencias estadísticamente significativas entre las poblaciones SP4 y SP8 con clones que tienen un grado intermedio de metilación (* $p = 0.041$), siendo mucho más frecuente esta condición en clones SP4 que en clones SP8.

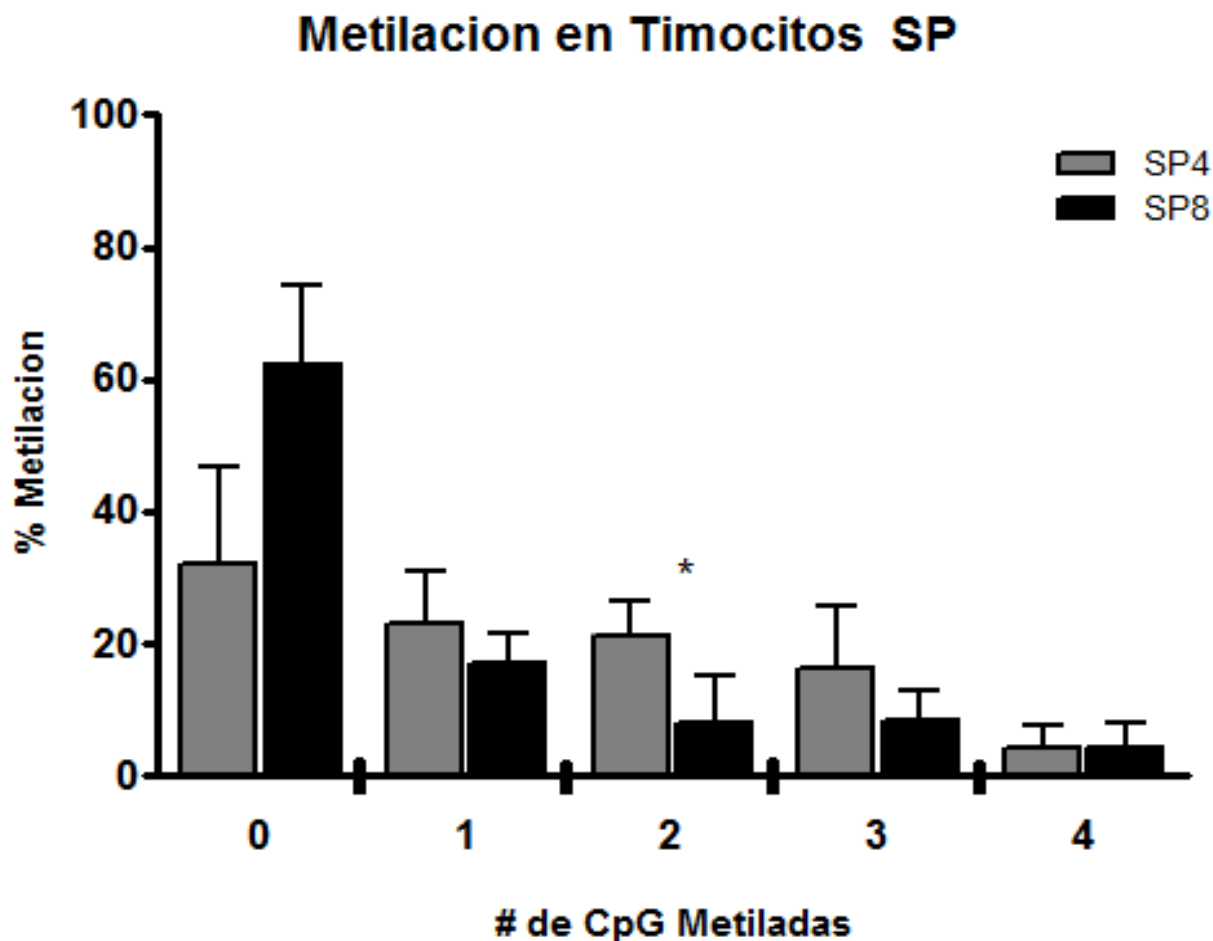


Figura 5.17. Perfil de metilación por qPCR-FRET de la orilla 5' de la CGI-1 del gen *CD8A* en timocitos SP. Resultado de 6 diferentes muestras de timo infantil.* $p < 0.05$

5.2.1.2 Grado de metilación del extremo 5' de CGI-1 en muestras de sangre de cordón

Los resultados de metilación de los clones procedentes de 6 diferentes muestras de células RTE CD4 y RTE CD8, así como también de LT naive CD4 y CD8 se muestran en números totales y porcentajes en la tabla 5.6.

Además, hemos calculado la media y la desviación estándar y la misma prueba estadística empleada previamente. Analizamos, un total de 6 muestras para cada uno de los grados de metilación.

Posiciones Metiladas	Número					Clones Totales	% de Metilación en CB				
	4	3	2	1	0		4	3	2	1	0
RTE CD4	22	44	69	29	37	201	10.9	21.9	34.3	14.4	18.4
LT naive CD4	13	43	48	33	18	155	8.39	27.7	31	21.3	11.6
RTE CD8	1	4	13	24	13	169	0.59	2.37	7.69	14.2	75.1
LT naive CD8	3	3	9	58	53	126	2.38	2.38	7.14	46	42.1

Tabla 5.6. Perfiles de metilación de las poblaciones de Linfocitos CD4 y CD8 en sangre de cordón. Se expresan como el número total y % de moléculas de DNA con 4, 3, 2, 1 o 0 posiciones CpG metiladas para cada población.

Nuestros resultados muestran que los clones de células RTE CD8 se presentan principalmente de forma no metilada 66%, mientras que sólo un 24% de los clones de RTE CD4 no se metilan, esta diferencia es estadísticamente significativa ($p=0.018$). Igualmente, vemos que la diferenciación entre clones RTE CD4 vs RTE CD8 pueden detectarse en todos los grados de metilación posibles, excepto con tres posiciones metiladas, así: dos posiciones metiladas 32% vs 9%, $p=0.018$), con tres posiciones metiladas 22% vs 3%, $p=0.02$ y con 4 posiciones metiladas 10% vs 0%, $p=0.0017$. Estos resultados se encuentran graficados en la figura 5.18.

Metilación en RTEs de Sangre de Cordon

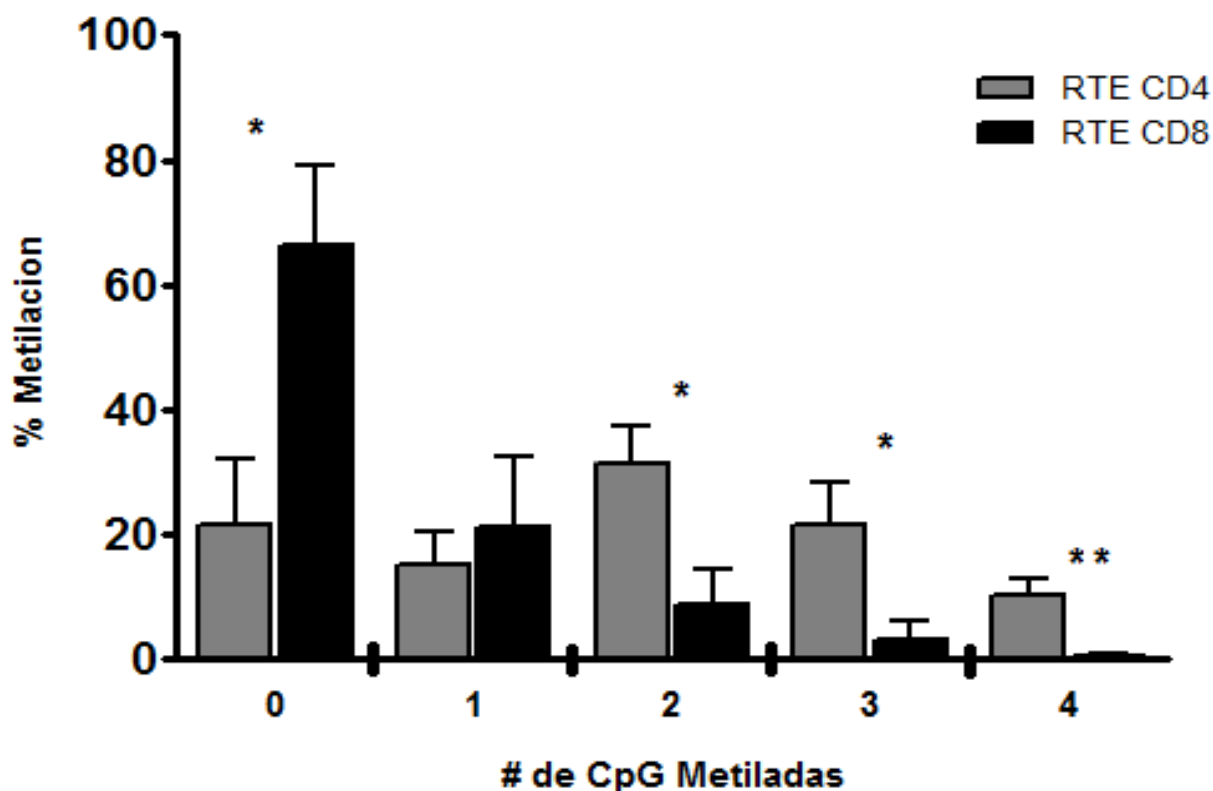


Figura 5.18. Perfil de metilación por qPCR-FRET de la orilla 5' de la CGI-1 del gen *CD8A* en células RTE CD4 y CD8. Resultado de 6 diferentes muestras de de sangre de cordón.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$.

En cuanto a los clones correspondientes al estadio de diferenciación de LT naive en la misma muestra, vemos que el porcentaje de clones CD8 no metilados disminuye con respecto al estadio anterior de células RTE CD8 (naive CD8 36% vs RTE CD8 66%). Sin embargo, la diferencia entre los clones **no metilados** del linaje CD4 y CD8 sigue siendo evidente (11% vs 36% respectivamente). Además, en este estadio continúan observándose que los clones CD4 con 3 y 4 posiciones metiladas son más abundantes que los clones CD8, como puede observarse en la figura 5.19. Estas diferencias son estadísticamente significativas así: cuando encontramos 3 posiciones metiladas los clones de LT naive CD4 representan el 27% vs 2% de los LT naive CD8, la significancia es $p = 0.04$ y, los clones CD4 con 4 posiciones metiladas con respecto a los CD8 son el 7% vs 3% con una $p = 0.0012$.

Metilación en LT Naive de Sangre de Cordón

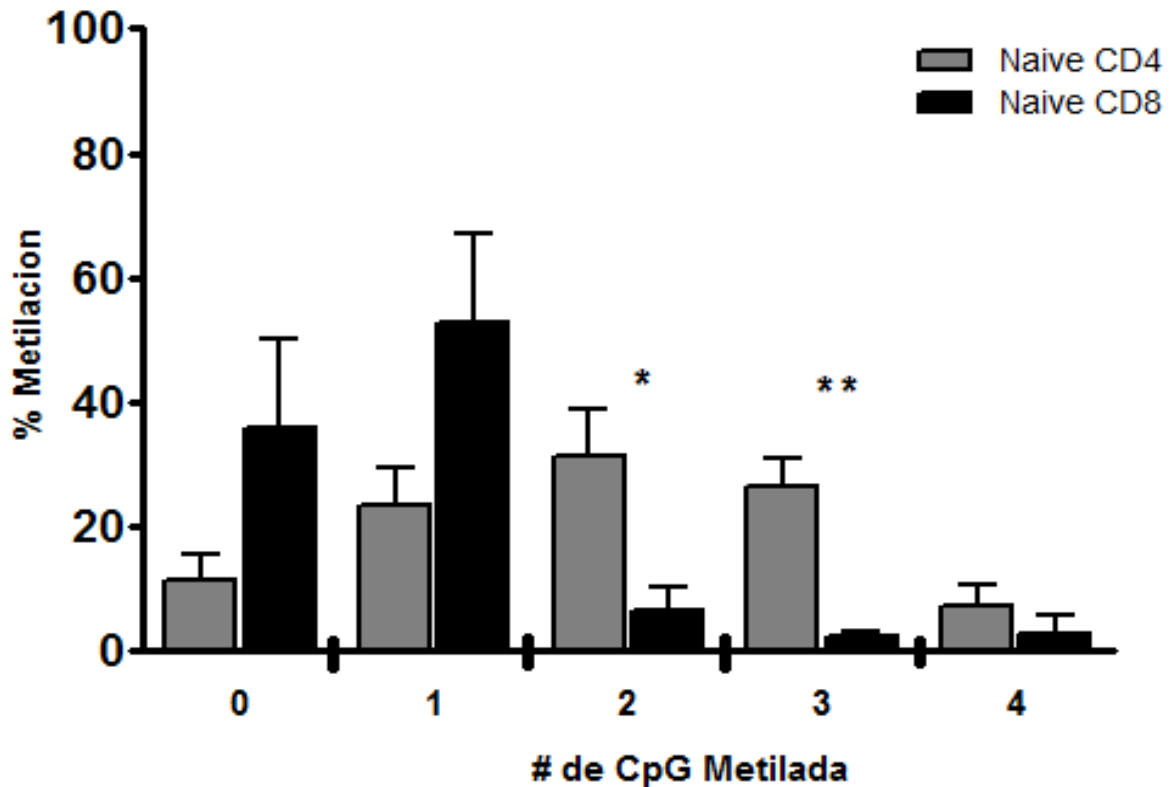


Figura 5.19. Perfil de metilación por qPCR-FRET de la orilla 5' de la CGI-1 del gen *CD8A* en células naive CD4 y CD8. Resultado de 6 diferentes muestras de de sangre de cordón.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$.

5.2.1.3 Grado de metilación del extremo 5' de CGI-1 en muestras de sangre periférica de adultos

Los resultados de metilación de los clones procedentes de 6 diferentes muestras de células RTE CD4 y RTE CD8, de LT naive CD4 y CD8 y de LT memoria CD4 y CD8, se muestran en números totales y porcentajes en la tabla 5.7.

Además, hemos calculado la media, la desviación estándar y el nivel de significancia, empleando la prueba de *Mann Whitney*. Analizamos un total de 6 muestras para cada uno de los grados de metilación.

Posiciones metiladas	Número						% de metilación en SP				
	4	3	2	1	0	Clones Totales	4	3	2	1	0
RTE CD4	14	30	29	5	6	84	16.7	35.7	34.5	5.95	7.14
LT naive CD4	14	36	33	18	4	105	13.3	34.3	31.4	17.1	3.81
LT memoria CD4	21	22	17	6	5	71	29.6	31	23.9	8.45	7.04
RTE CD8	1	11	6	3	95	116	0.86	9.48	5.17	2.59	81.9
LT naive CD8	0	0	1	13	74	88	0	0	1.14	14.8	84.1
LT memoria CD8	0	0	2	24	80	106	0	0	1.89	22.6	75.5

Figura 5.7. Perfiles de metilación de las poblaciones de Linfocitos CD4 y CD8 en sangre periférica. Se expresan como el número total y % de moléculas (clones) de DNA con 4, 3, 2, 1 o 0 posiciones CpG metiladas para cada población.

Nuestros resultados muestran que los clones de células RTE CD8 se presentan principalmente de forma no metilada (92%) en porcentajes superiores a los observados en la misma población en sangre de cordó (66%). La diferencia entre células RTE CD4 y RTE CD8 es evidente en todos los grados de metilacion de la región 5' de la CGI-1. Esta diferencia es aun mas evidente cuando no hay metilacion (RTE CD8 98% vs RTE CD4 8%, $p= 0.0025$). También observamos una clara diferencia entre los RTE CD8 y CD4 a partir de 2, 3 y 4 posiciones metiladas, lo cual es mucho mas común en los clones de RTE CD4 que en los clones de RTE CD8. Las diferencias encontradas se pueden observar en la figura 5.20.

Encontramos que el 33% de los clones RTE CD4 poseen 2 posiciones CpG metiladas, mientras que sólo el 3% de los RTE CD8 presentan este grado de metilación, esta diferencia es significativa ($p=0.03$) y en el caso de tres posiciones metiladas

encontramos que un 37% de los clones RTE CD4 están en esta clasificación vs un 2% de los RTE CD8 ($p= 0.02$). También, debemos resaltar que ningún clon de los RTE CD8 evaluados presentó un grado de metilación de 4 posiciones, en cambio si, el 15% de los RTE CD4 tienen este grado de metilación.

Metilacion en RTEs de Sangre Periferica

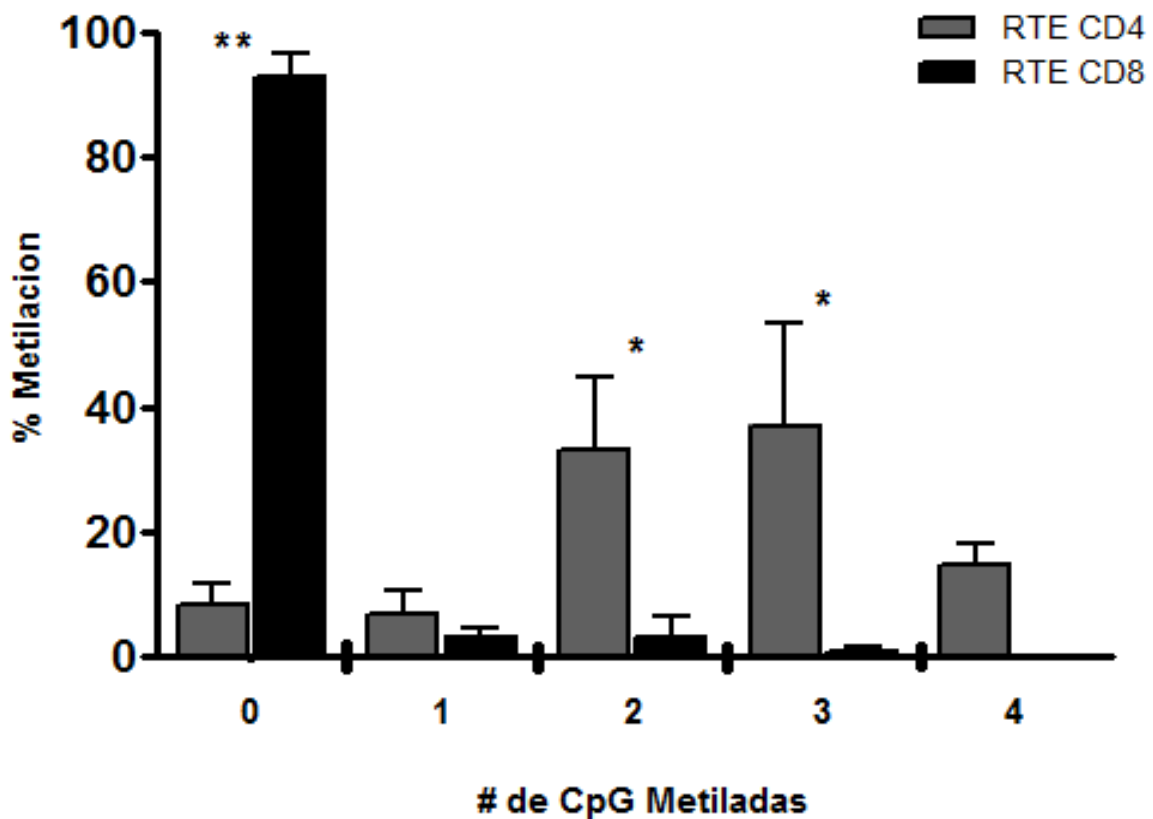


Figura 5.20. Perfil de metilación por qPCR-FRET de la orilla 5' de la CGI-1 del gen *CD8A* en células RTE CD4 y CD8. Resultado de 6 diferentes muestras de de sangre periférica de adulto. * $p<0.05$, ** $p<0.005$.

En cuanto a los clones correspondientes al estadio de diferenciación de LT naive en la misma muestra, vemos que es en esta población celular en la que los clones CD4 y CD8 se encuentran mas diferenciados. En el caso de los LT naive el 82% de los clones están **desmetilados**, mientras que no observamos ningún clon que posea 3 o 4 posiciones metiladas. En el caso de los LT naive CD4 se observa el fenómeno

completamente opuesto, es decir, el 35% de los clones tienen 3 posiciones metiladas y el 20% se encuentra **totalmente metilado** vs el 5% de clones no metilados. Estas diferencias son estadísticamente significativas en las comparaciones que hacemos entre LT naive CD4 vs CD8 no metilados, $p=0.004$, entre CD4 vs CD8 con dos posiciones metiladas, $p= 0.002$ y en el caso de 3 y 4 posiciones metiladas la $p < 0.001$ como puede verse en la figura 5.21.

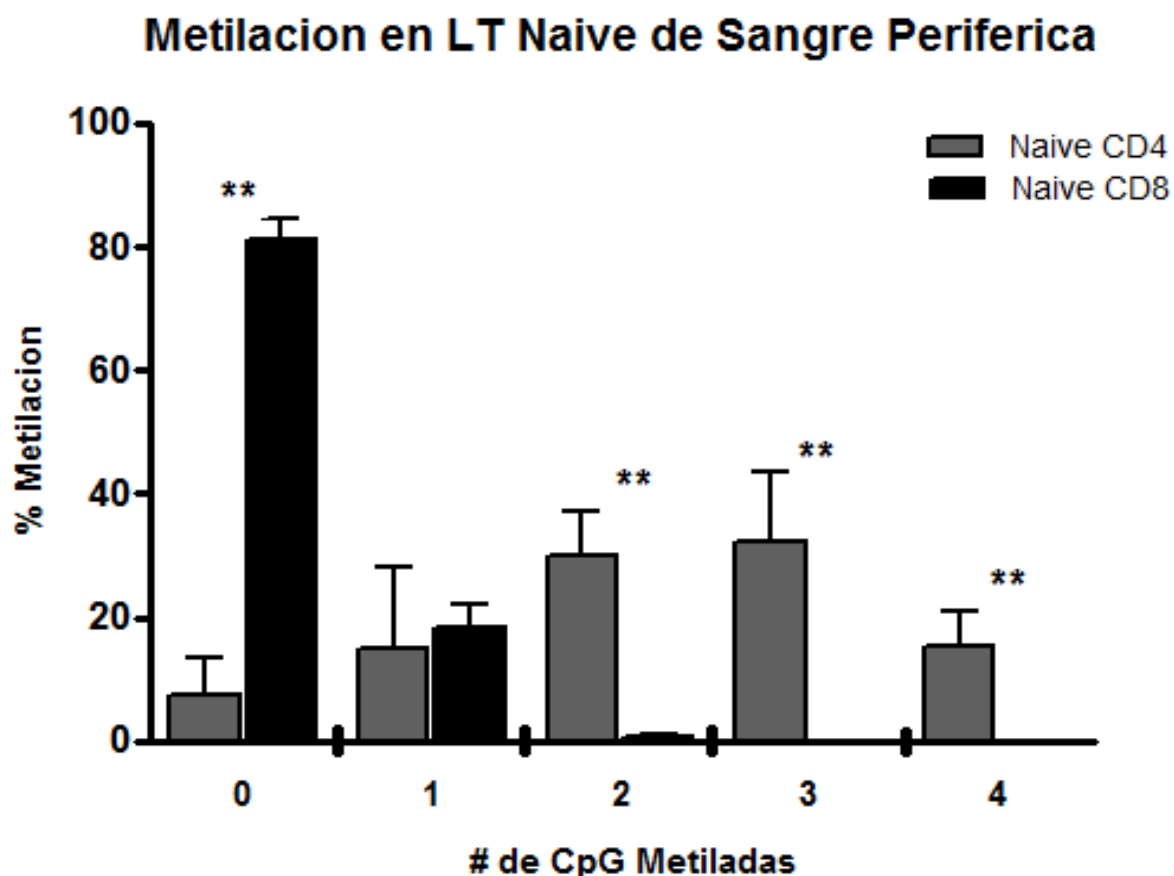


Figura 5.21. Perfil de metilación por qPCR-FRET de la orilla 5' de la CGI-1 del gen *CD8A* en LT naive CD4 y CD8. Resultado de 6 diferentes muestras de de sangre periférica de adulto. * $p<0.05$, ** $p<0.005$.

El análisis de los clones correspondientes al estadio de diferenciación de LT memoria en sangre periférica de adultos muestra un patrón muy similar al que observamos en la población de LT naive CD8 y CD4. Hay que resaltar que en este estadio los clones LT memoria CD4 completamente metilado es del 43%. Igualmente hay diferencias estadísticamente significativas entre LT memoria CD4 vs CD8 no metilados (3% vs

78%), $p=0.004$, entre CD4 vs CD8 con tres posiciones metiladas (31% vs 0%), $p= 0.002$ y en el caso de 4 posiciones metiladas (43% vs 0%) la $p < 0.0001$ como puede verse en la figura 5.22.

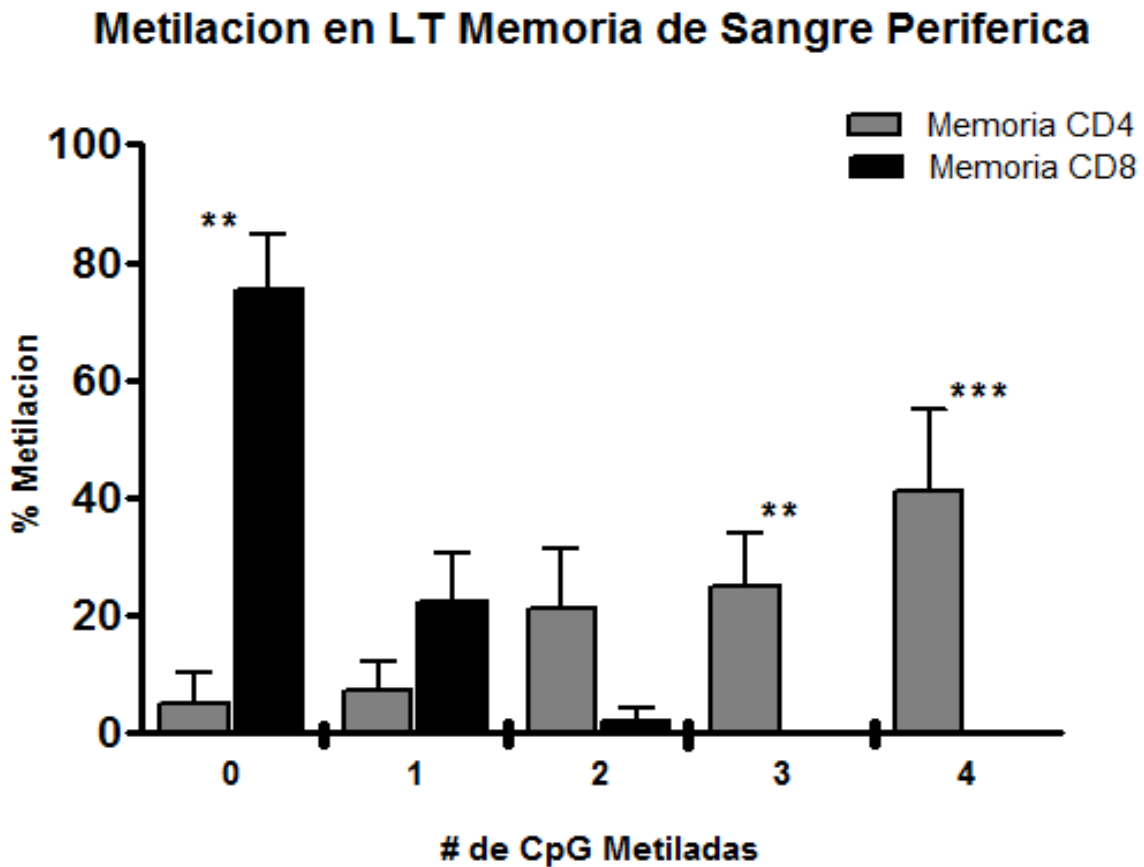


Figura 5.22. Perfil de metilación por qPCR-FRET de la orilla 5' de la CGI-1 del gen *CD8A* en LT memoria CD4 y CD8. Resultado de 6 diferentes muestras de de sangre periférica de adulto. * $p<0.05$, ** $p<0.005$, *** $p<0.0005$.

5.2.2 Gradiente de metilación del gen *CD8A* en diferentes poblaciones de células T

Basados en los resultados de la qPCR-FRET y teniendo en cuenta que las mayores diferencias en todas las poblaciones de LT CD4 y CD8, se observan cuando no hay ninguna posición CpG metilada, quisimos evaluar un gradiente de metilación para todas las poblaciones linfocitarias, tanto CD4 como CD8, con respecto al grado de metilación de este fragmento del gen *CD8A*. Para esto fijamos un nivel de metilación en una escala de 0 a 1 (0 = No metilado, 1= metilado en 1 o más sitios), que representan los patrones

potencialmente diferentes en todas las poblaciones celulares de todos los tejidos evaluados.

El gradiente de metilación lo evaluamos primero en las poblaciones de células T CD4. Encontramos que el grado de **metilación** de la DMR 5' CGI-1 **incrementa** paulatinamente a medida que los LT CD4 avanzan en su desarrollo, esto se confirma tanto en sangre de cordón como en sangre periférica adulta (figura 5.23). La condición contraria también es cierta, es decir, el nivel de clones de LT CD4 no metilados disminuye a medida que avanza el desarrollo de estas células. Esto es más evidente en sangre de cordón, ya que en sangre periférica el porcentaje de clones de LT CD4 no metilados es muy conservado. Sin embargo, ninguna de las diferencias en el gradiente de metilación es estadísticamente significativa.

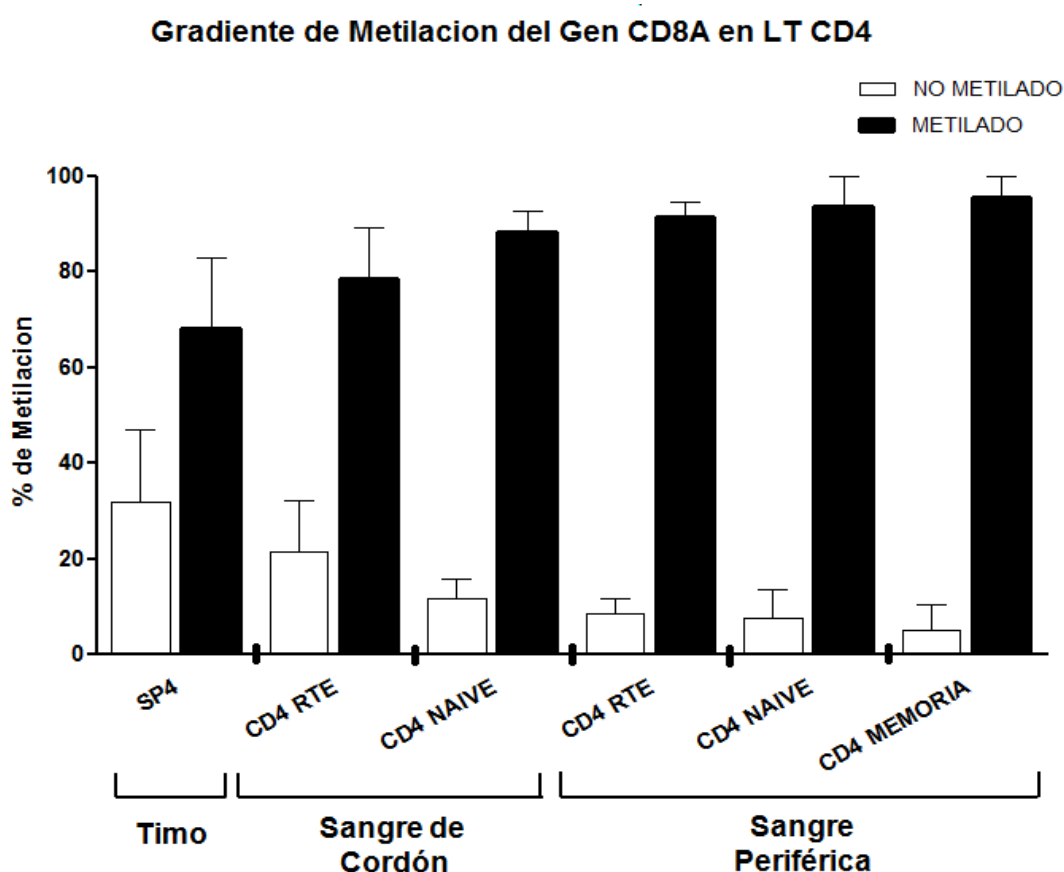


Figura 5.23. Gradiente de metilación de las diferentes poblaciones de LT CD4 analizadas por qPCR-FRET, desde el estadio tímico de SP4, hasta el estadio de memoria. No metilado= 0 CpGs metiladas, Metilado \geq 1 CpG metiladas.

El mismo análisis descrito en el apartado anterior lo realizamos en poblaciones de células T CD8. Interesantemente, encontramos que el grado de **metilación** de la DMR 5' CGI-1 **incrementa** en la transición de célula RTE CD8 a LT naive CD8 (33% vs 47%), en sangre de cordón y en sangre periférica de adultos sanos (7% vs 19%), siendo esta última diferencia estadísticamente significativa en este tipo de muestras ($p=0.043$). No obstante los porcentajes de CD8 metilado son bajos. En cuanto a la condición contraria, observamos que las células RTE CD8 en sangre periférica de adultos se **demetilan** significativamente al salir del estadio tímico SP8 (93% vs 62%, $p=0.012$), resultado que se confirma con el dato inverso y es que los SP8 están más metilados (37.5%) que los RTEs CD8 periféricos (7%), $p=0.012$. El porcentaje de células no metiladas sigue siendo alto en los estadios de LT naive y LT memoria CD8, en periferia (figura 5.24).

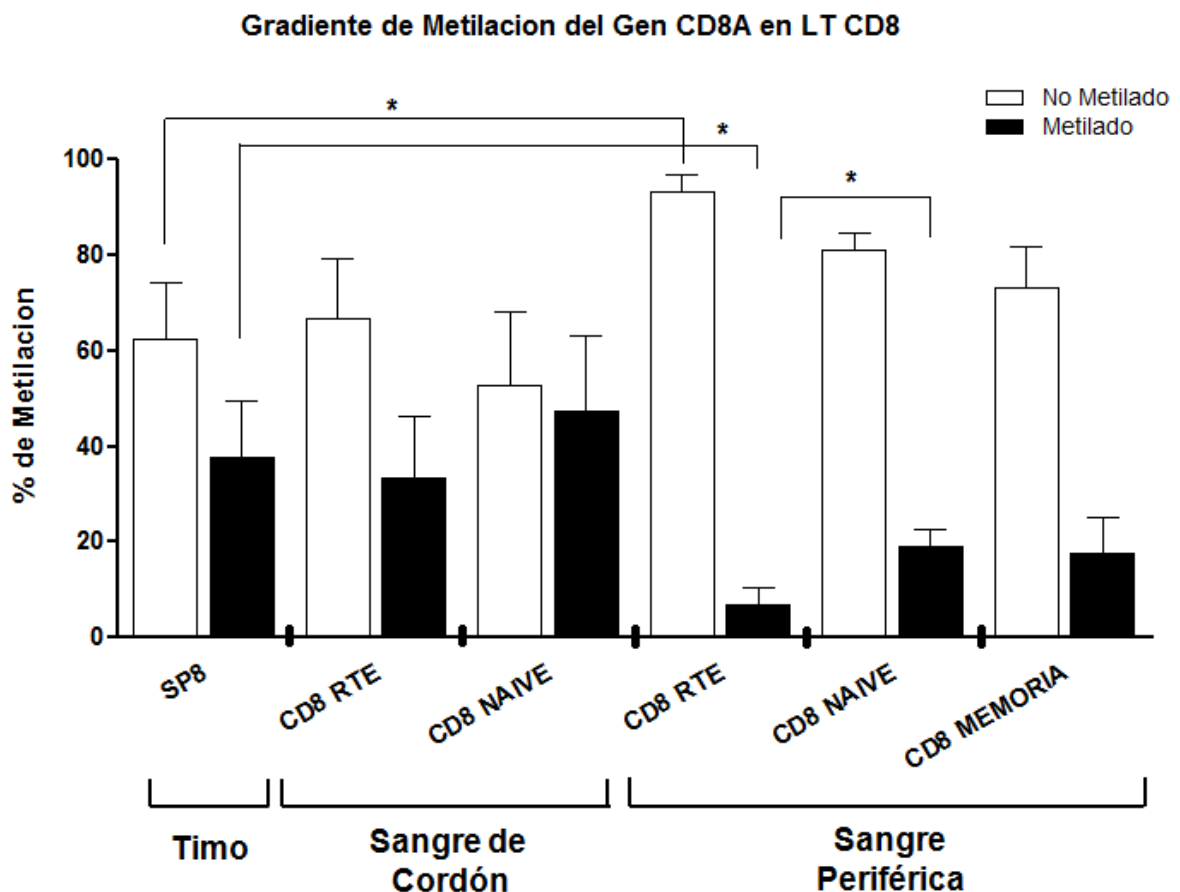


Figura 5.22. Gradiente de metilación de las diferentes poblaciones de LT CD8 analizado por qPCR-FRET, desde el estadio tímico de SP4, hasta el estadio de LT CD8 memoria. No metilado= 0 CpGs metiladas, Metilado \geq 1 CpG metiladas. * $p<0.05$.

5.3 Resultados III: Analisis de expresión de los correceptores CD4 y CD8

Consideraciones previas

Después de analizar los patrones de metilación en las diferentes poblaciones de LT quisimos evaluar los niveles de expresión de los correceptores CD4 y CD8 en cada una de ellas.

Los resultados de expresión de los correceptores nos permiten analizar si hay una correlación entre el grado de diferenciación y desarrollo de las poblaciones de LT evaluadas, el contenido de TRECs en cada una de ellas y el gradiente de metilación encontrado en la CGI-1.3 del gen *CD8A*.

Finalmente, los niveles de expresión de CD4 y CD8 que encontramos en las poblaciones de LT evaluadas, pueden considerarse como un segundo control de la clasificación celular que hemos hecho, especialmente si se tiene en cuenta que el RNA cuantificado proviene exactamente del mismo grupo de células a las cuales se les ha evaluado el grado de metilación (ver apartado de métodos página 81).

Niveles de Expresión de los genes CD4 y CD8, en poblaciones de linfocitos T determinados por qRT-PCR, con sondas TaqMan.

Evaluamos la expresión del CD8 wt, CD8-V3 y del CD4, tanto en LT CD4 como en LT CD8 de todos los grupos celulares estudiados. Para el análisis de expresión incluimos también la población de timocitos DN como un indicador de la expresión basal de los correceptores. Los resultados pueden verse en la tabla 5.8 y están expresados como

unidades de expresión relativa de cada gen calculado con la fórmula del $\Delta\Delta CT$ y normalizados de acuerdo con la expresión del gen *GAPDH* humano.

Tejido	Población Celular	Expresión de CD4	Expresión de CD8 wt	Expresión de CD8-V3
Timo	DN	291	4596	83
	DP	14500	285716	807
	SP4	7055	2991	51
	SP8	85	140761	583
Sangre de Cordón	RTE CD4	4126	366	4
	Naïve CD4	5250	77	Nd
	RTE CD8	275	89740	147
	Naïve CD8	385	23258	Nd
Sangre Periférica	RTE CD4	6657	178	Nd
	Naïve CD4	3883	78	Nd
	Memoria CD4	5404	84	Nd
	RTE CD8	36	84127	99
	Naïve CD8	440	94648	62
	Memoria CD8	21	76638	735

Tabla 5.8. Valores de expresión relativa de los genes CD4, CD8-wt y CD-v3, en todas las poblaciones de LT. Estos valores corresponden a la media de 7 muestras diferentes de cada tipo de tejido (timo, sangre de cordón y sangre periférica de adulto). **Nd:** no detectable.

5.3.1 Expresión de CD4 y CD8 en timo

A partir de los resultados expresión del CD4, CD8-wt y CD8-v3 en timocitos DN, hemos fijado el límite inferior de expresión para cada gen. Nuestros resultados muestran que a nivel del timo se puede detectar la expresión de CD4, CD8 wt y CD8-V3 en todas las poblaciones celulares. El estadio de timocitos DP es en el que encontramos los niveles más altos de expresión para los tres transcritos (CD4, CD8wt, CD8-v3). También encontramos que el CD8-wt tiene niveles “basales” más altos que los demás

correceptores. Otro resultado a destacar es que el CD8-V3, se expresa principalmente en timocitos. Además, observamos que una vez los timocitos se diferencian al estadio de SP, el nivel de expresión del CD4 en los timocitos SP4, baja exactamente en un 50% con respecto a la población de DP. Exactamente lo mismo, ocurre para la expresión de CD8wt en SP8.

5.3.2 Expresión de CD4 y CD8 en linfocitos de sangre de cordón y sangre periférica (adultos)

En términos generales nuestros resultados confirman lo esperado. Las células de linaje CD4 en general expresan altos niveles de transcritos de CD4 y lo mismo se observa para las células de linaje CD8 y el nivel de expresión de CD8 –wt y CD8-v3.

En cuanto a los niveles de expresión de los genes evaluados en sangre de cordón y sangre periférica, observamos que las poblaciones se comportan diferentes según el tipo de muestra analizada.

Encontramos que la expresión de CD4 aumenta al pasar del estadio de célula RTE CD4 al de LT naive CD4 en sangre de cordón (media = 4.126 vs 5.250 unidades), mientras que en las muestras de sangre periférica adulta el resultado se presenta a la inversa entre RTEs CD4 y LTs naive CD4 (media= 6.657 vs 3.883 unidades). El evento completamente opuesto se observa en los linfocitos T CD8. En este caso observamos que los niveles de expresión de CD8-wt disminuyen al pasar de célula RTE CD8 al estadio de LTnaive CD8 en sangre de cordón (media = 89.706 vs 23.258 unidades), mientras que en sangre periférica adulta el resultado es opuesto RTEs CD8 84.127 vs LT naive CD8 94648 unidades relativas.

Adicionalmente, uno de los resultados más interesantes es que los niveles de expresión de CD8-wt disminuyen gradualmente desde el estadio de SP8 en el timo hasta el estadio de LT naive CD8 en sangre de cordón. El nivel de expresión relativa del CD8-wt

es estadísticamente diferente entre los estadios de célula RTE CD8 y LT naive CD8 de las muestras de cordón ($p=0.0051$), pero no en las de sangre periférica adulta.

Otro resultado a resaltar es que los LT naive CD8 continúan expresando el correceptor CD4, a pesar de su estadio de desarrollo. En cambio los LT CD4 expresan valores de CD8-wt y CD8-V3 por debajo del valor de expresión de los timocitos DN, que fueron considerados como nuestro límite inferior.

El gradiente de expresión de los tres transcritos analizados en todas las poblaciones de LTs, puede observarse en las graficas 5.55, 5.26 y 5.27, con sus respectivas medias y desviaciones estándar,

El nivel de expresión del transcrito CD8-v3 en los LT CD8 de memoria en sangre periférica es alto (media = 735 unidades). Esta variable sólo se detectó en los estadios tímicos y específicamente en el linaje CD8, donde se mantuvo aunque en menor nivel hasta el estadio de célula RTE CD8 de sangre de cordón. Las diferencias entre la expresión de CD8-v3 en células RTE CD8 vs LT memori CD8 no alcanzan a ser significativas debido a la alta desviación que presenta el transcrito en la población de LT de memoria.

Resaltamos que en nuestro estudio no detectamos expresión de la variante CD8-□Exon4, en ninguna de las muestras analizadas.

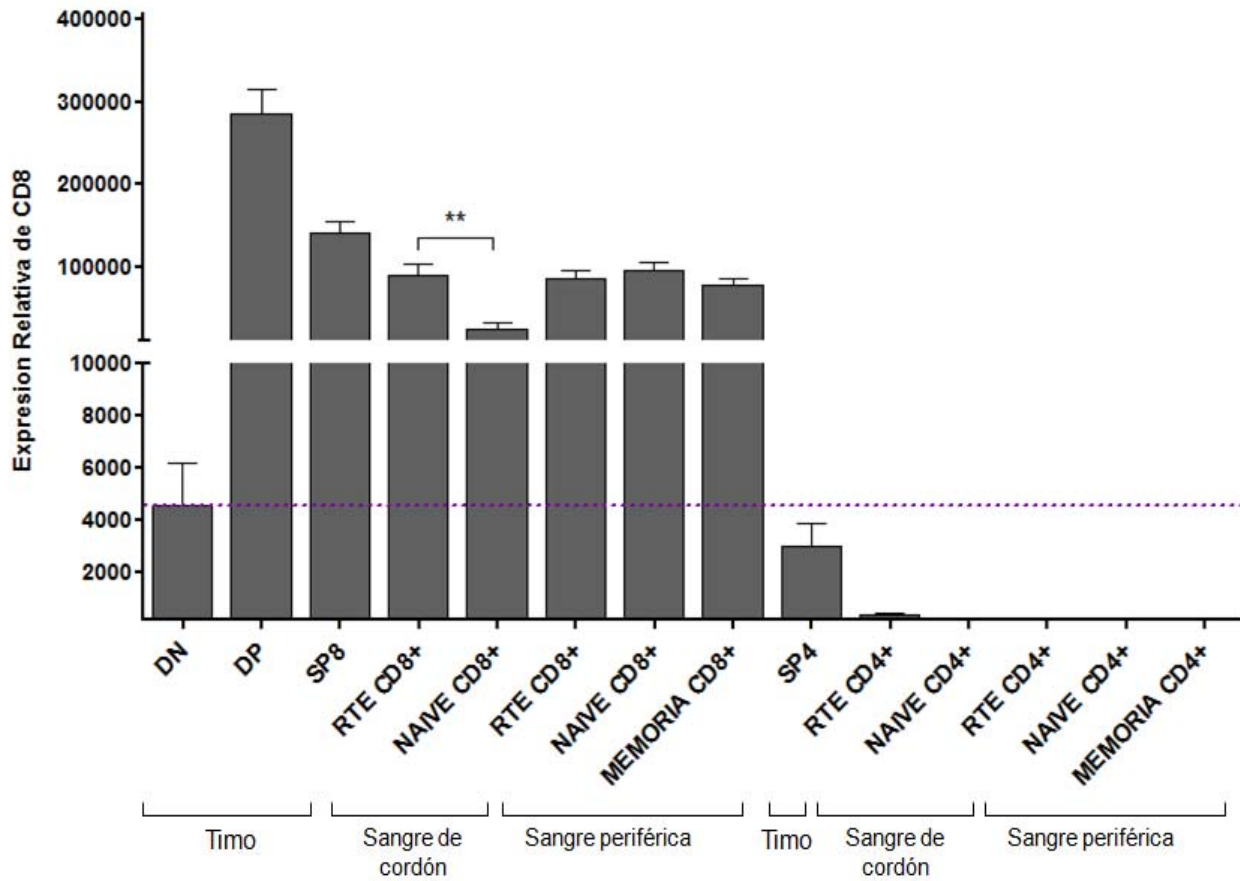


Figura 5.25. Gradiente de expresión relativa del gen CD8wt, en los estadios de diferenciación y desarrollo de los LTs CD8 y CD4 de timo, sangre de cordón y sangre periférica. La línea discontinua representa el punto fijado como limite inferior de expresión, basado en la expresión relativa del CD8-wt en timocitos DN.

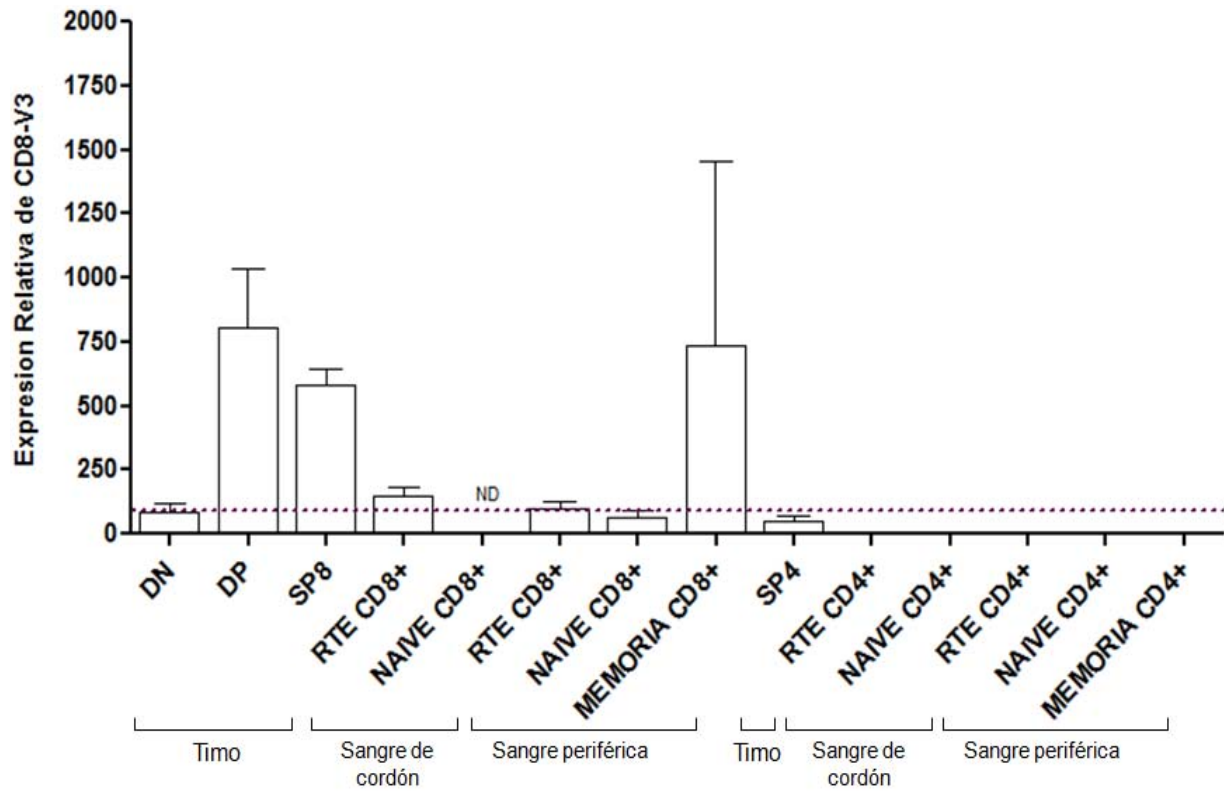


Figura 5.26. Gradiente de expresión relativa del gen CD8-v3, en los estadios de diferenciación y desarrollo de los LT CD8 y CD4 de timo, sangre de cordón y sangre periférica. En algunas poblaciones de LT los niveles de expresión de esta variante no pudieron ser detectados (**nd**) con la metodología que empleamos. La línea discontinua representa el punto fijado como limite inferior de expresión, basado en la expresión relativa del CD8-v3 en timocitos DN.

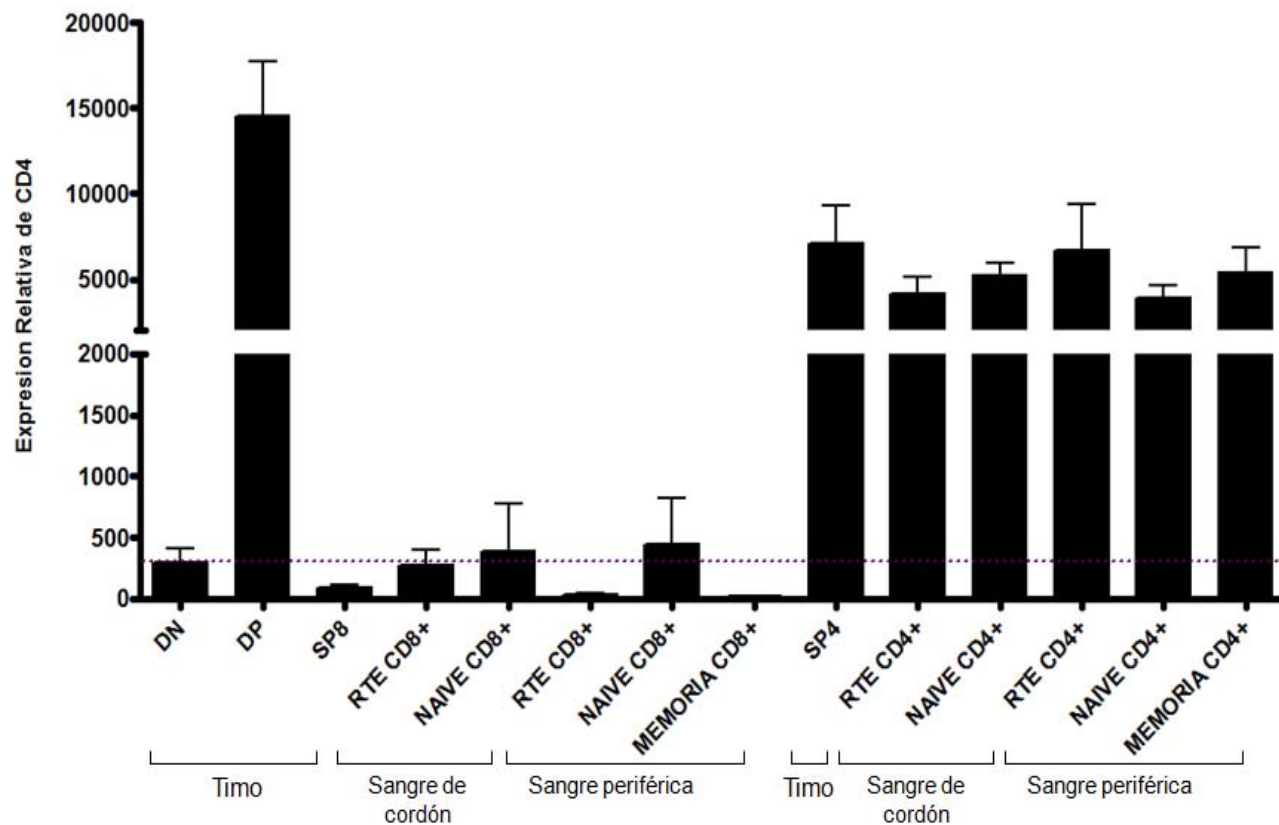


Figura 5.27. Niveles de expresión relativa del gen CD4, en los estadios de diferenciación de LT CD8 y CD4 de timo, sangre de cordón y sangre periférica. La línea discontinua representa el punto fijado como limite inferior de expresión, basado en la expresión relativa del CD8-v3 en timocitos DN.

DISCUSIÓN

6 DISCUSION

Durante su desarrollo los LT tienen una serie de elecciones secuenciales para definir su identidad, primero la selección entre el linaje T o B, luego la definición de su TCR como $\alpha\beta$ vs $\gamma\delta$ e inmediatamente después definir sus correceptores CD4 vs CD8. Esta toma de decisiones continúa en periferia después de la activación. En esta fase la elección consiste en definir si el linaje será Th1, Th2, Treg o Th17.

Durante todas las fases de diferenciación que sufren los LT solo hay registro de cambios en la información genética primaria (secuencia de bases) durante la elección de TCR $\alpha\beta$ vs TCR $\gamma\delta$. Las demás elecciones son iniciadas y mantenidas sin cambios en la secuencia del DNA. No obstante, la elección de linaje en los LT requiere de la activación y represión controlada de transcritos en grupos completos de genes. Este control de la expresión génica define los diferentes fenotipos celulares, ya no solo en los LT, sino en la mayoría de linajes del sistema inmune (203). Por tanto la regulación epigenética en conjunto con los complejos formados por los factores de transcripción, tiene un papel fundamental en la determinación del linaje, la expresión de genes y las características fenotípicas de los LT.

Algunos estadios de diferenciación en las células T son complejos de cuantificar y definir desde el punto de vista fenotípico y especialmente en sangre periférica, como es por ejemplo el caso de los LT reguladores o las células RTEs. Ambos grupos de células son de suma importancia en el diagnóstico, seguimiento y pronóstico de muchas patologías. Sin embargo los métodos actuales de detección para estas células no permiten cuantificarlas con exactitud por la ausencia de especificidad de los marcadores utilizados para identificarlas (266, 267). Los avances en el estudio de la epigenética y en especial de la metilación del DNA sugieren que los patrones de metilación de algunos genes o regiones dentro el genoma asociadas con el desarrollo de los LTs y su

fenotipo, podrían constituirse en marcadores de *bona fide* para la identificación de estadios complejos.

Nosotros hemos examinado el estado de metilación de las CGIs presentes en los genes *CD4* y *CD8A* de humanos sanos. Para ello separamos los LT en grupos celulares según su estadio de diferenciación tanto en su fase tímica como periférica, dando especial importancia al grupo de células RTEs CD4 y CD8. El DNA de cada población celular se trató con bisulfito de sodio y luego se analizó la metilación por secuenciación. Esta metodología se aplicó en una primera fase exploratoria para cuantificar el grado de metilación de las CGIs en cada población de LT. Una vez identificado el perfil de metilación de las CGIs en cada gen, pasamos al diseño y puesta a punto del análisis de metilación para DMRs, basándonos en la técnica de PCR con sondas FRET, una metodología novedosa en el estudio de perfiles de metilación del DNA. Finalmente, comparamos los niveles de metilación de la CGI-1.3 del gen *CD8A*, única región DMR encontrada en los diferentes estadios celulares de LT evaluados, con los niveles de expresión de los correceptores CD4 y CD8 y con el contenido de TRECs, que es la metodología cuantitativa disponible hasta el momento para la identificación de células RTEs.

Para el desarrollo de los objetivos de esta investigación tratamos de definir una serie de parámetros metodológicos y conceptuales que nos permitieran un estudio sistemático de la metilación en las poblaciones de LT de interés. Por tal motivo la discusión se ha subdividido en fases de acuerdo con los parámetros que consideramos claves durante la tesis y dado la carencia de trabajos similares en LT humanos.

6.1 Selección de los marcadores celulares para la separación de poblaciones de células T humanas.

Nuestros resultados incluyen poblaciones de células T tanto en la fase tímica como periférica. Para la selección de los timocitos se cuenta con marcadores celulares claramente definidos que no dan lugar a confusión en la clasificación de las poblaciones, no obstante, una primera dificultad fue definir los marcadores celulares a utilizar en periferia, especialmente para la población que consideraríamos como células RTEs, ya que precisamente los marcadores celulares actuales dan lugar a confusión. Por tanto, nuestras poblaciones de células RTEs tanto CD4 como CD8 se han separado por FACS, empleando la combinación de marcadores celulares reportada hasta ahora para RTEs CD4, que incluye el CD45RA, CD62L y CD31. Además; hicimos algunos marcajes de prueba con el PTK7 descrito por *Hains et al (79)*, como un marcador específico de RTEs CD4. Sin embargo, nuestras muestras tenían un porcentaje de células positivas para este marcador inferior al 0,01%, lo que concuerda con resultados de otras investigaciones realizadas por miembros de nuestro grupo (*Teniente A, et al. datos no publicados*) y contradice los resultados previamente reportados (79,80) y además lo convierte en un marcador inadecuado para nuestro estudio, ya que el número de células al separar la población sería muy escaso para los análisis moleculares posteriores. Por tanto sólo incluimos el marcador CD31 como indicador de RTEs aunque no es del todo específico y en el caso de los RTEs CD8 es de poca utilidad. Efectivamente, nuestros resultados muestran que el marcador CD31⁺ no correlacionaba adecuadamente con las poblaciones CD8^{+/high}CD45RA⁺CD62L⁺ de sangre periférica adulta. Este hecho ya había sido observado por *Tanaskovic S, et al (78)*. Las células RTEs CD8 no cuentan hasta ahora con un marcador de superficie celular. Algunos autores proponen que el CD69 y CD103 podría asociarse con esta población (268), pero los resultados aun son controvertidos, por tanto la población de RTEs CD8 de este estudio se seleccionó con los mismos criterios empleados para la población RTE CD4 y se confirmó su grado de diferenciación por su contenido de TRECs.

En las demás poblaciones de periferia empleamos el marcador CD45RA como criterio básico de definición de células naive (CD45RA⁺) y de células memoria (CD45RA⁻), acorde con lo propuesto por el *human immunology project* (269). Incluimos además el marcador CD62L para completar el fenotipo y aunque no reemplaza completamente la información que podría brindar el marcador CCR7, si es de utilidad en nuestras poblaciones de interés.

Nuestro estudio tiene la fortaleza de incluir tres grandes grupos de LT periféricos que son las células RTEs, los LT naive y los LT memoria, además de tres grupos tímicos DP, SP4 y SP8 de humanos sanos. Esta afirmación la basamos en que la mayoría de trabajos sobre metilación del DNA y LT se han concentrado en el estudio las poblaciones generadas luego de la activación del LT y en su transición de LT naive a LT Th1, Th2, Treg, etc. (246), pero se ha dejado un poco de lado lo que pasa en las poblaciones de células T más inmaduras, pese a que la mayoría de datos que se tienen de estos estadios provienen de resultados en modelos murinos que no son siempre extrapolables a humanos.

6.2 Perfiles de metilación de los genes CD4 y CD8A y características de sus CGIs

Nuestros resultados describen el estado de metilación de las CGIs en los genes *CD4* y *CD8A* humanos, durante las diferentes fases de diferenciación y desarrollo de los LT. Nosotros encontramos que la metilación de la CGI en el gen *CD4* es muy conservada en los diferentes estadios de desarrollo de los LT analizados. La CGI-4.2 posee una metilación <10% en casi todas las poblaciones celulares estudiadas. Aunque esta metilación puede considerarse escasa, es un dato relévate si se tiene en cuenta que varios estudios de metiloma humano reportan que la mayoría de las CGIs asociadas a genes del sistema inmune no se metilan (155). En la CGI-4.2 observamos también que

el grado de metilación tiende a disminuir en las poblaciones de LT periféricos, pero no sólo CD4 sino también CD8, lo que sugeriría que la metilación va disminuyendo con el desarrollo de las células T. Resultados similares han sido observados por *Tutt Landolfi, et al.* (270)), quienes evaluaron el grado de metilación de la región 5' del gen *Cd4* murino en la diferenciación de los LT CD4 y encontraron que hay una leve desmetilación de la región ubicada *upstream* del TSS. No obstante, la ubicación de la CGI de nuestro estudio incluye una región diferente a la estudiada por los otros grupos. La CGI-4.2 se encuentra presente en la región intergénica con el gen *LAG3*, que también participa en los procesos de diferenciación de LT.

Cuando comparamos los resultados de la metilación de la CGI del gen *CD4* con los niveles de expresión de este correceptor en LT CD4, vemos que en sangre periférica de adultos sanos y sangre de cordón los niveles de expresión son bastante constantes en los diferentes estadios de desarrollo evaluados, al igual que lo observado en los niveles de metilación. Sin embargo, la expresión de CD4 en LT CD8 es ausente como era de esperarse y no se observan cambios en los niveles de metilación evaluados en el gen *CD4*, en el grupo de poblaciones de LT CD8, lo que sugiere que la metilación, al menos de este locus del gen no influencia la expresión del correceptor CD4 en los LT ni interviene en la identidad celular, ni en el desarrollo y diferenciación de los LT en humanos sanos.

En el gen *CD8A* por el contrario encontramos diferencias en el estado de metilación de cada una de sus CGIs. El caso más extremo lo observamos en la CGI 2, ubicada en la región intergénica con el gen *CD8B*, a unas 16 Kb *upstream* del TSS del gen *CD8A*. Esta CGI está completamente desmetilada, en todos los estadios de diferenciación de las células T, tanto CD4 como CD8. Adicionalmente, evaluamos el estado de metilación de esta CGI-2 en otros tejidos no hematopoyéticos, como es el caso de tirocitos totales y timo total y tampoco encontramos ninguno de sus dinucleótidos CG metilados. Estos resultados sugieren que la desmetilación de esta región del gen *CD8A* no es exclusiva

de células T, ni un evento específico de tejido, sino que se corresponde con la naturaleza no metilada descrita para las CGIs cercanas a regiones promotoras a lo largo del genoma (159).

Este resultado es importante porque sugiere que esta región no está involucrada en la regulación de la expresión del CD8 y que probablemente posea una cromatina permisiva a los eventos de control de expresión y diferenciación que se lleven a cabo en regiones adyacentes o cercanas, bien sea para el gen *CD8A* u otros genes.

También encontramos que la CGI-3, ubicada aproximadamente a 1.5 Kb *upstream* de la CGI-2, se metila más que las demás CGIs en todos los estadios de diferenciación de los LTs. En la CGI-3 llama la atención el hecho de que sólo se metila de manera diferente en los LT CD4 y CD8, en los estadios periféricos y especialmente en la fase de linfocitos de memoria, mientras que en los estadios tímicos o periféricos tempranos, la CGI 3 no presenta diferencias entre las poblaciones de LT CD4 o CD8. Estos resultados pueden sugerir que la metilación en esta región intergénica, puede tener un papel importante después de la activación de los LT pero no en los estadios tempranos de diferenciación periférica. También, podríamos pensar que esta CGI influye sobre transcritos diferentes del correceptor CD8, como es el caso del CD8-v3. Esta variante del CD8 posee dos exones más que el transcrito CD8-wt (ver figura 4.6). Esto obliga a la existencia de un TSS diferente para el transcrito CD8-v3, que se ubique *upstream* del TSS canónico y por tanto este más cercano a la CGI-3. Casualmente, la mayor expresión de CD8-v3 se encuentra en estadios tímicos y en LT CD8 de memoria, por lo que sería de gran interés profundizar en la relación que pueda existir entre estas variables.

Nosotros encontramos que la CGIs 1 del gen *CD8A* tiene el perfil de metilación más variable de todas las en CGIs evaluadas y en todas las poblaciones de LTs CD4 y CD8.

Esta CGI cumple con las características de las CGI intragénicas. Se encuentra ubicada al interior del gen *CD8A*. Su inicio está ubicado a 111 pb *upstream* del TSS y se continua hacia el interior del gen finalizando a aproximadamente a 400 pb del intrón 4. Toda la CGI se metila de forma variable, pero encontramos que el fragmento CGI-1.3 ubicado al extremo 5' de la CGI es el que presenta un gradiente de metilación claramente diferenciable entre LT CD4 y LT CD8. La metilación del DNA en esta región no había sido estudiada previamente en linfocitos humanos, pero, existen dos trabajos previos en diferentes estadios de desarrollo de linfocitos T CD4 y CD8 murinos. En estos estudios encuentran, por medio de enzimas de restricción sensibles a metilación, que hay una región en el gen *Cd8a* ubicada exactamente entre sus exones I y IV en la que se observa una metilación diferencial entre timocitos murinos (transición de DN a DP) y que luego también hay una demetilación en los estadios periféricos de la misma región, en LT CD4 (271, 272). Los resultados de *Carbone et al* (272), coinciden en parte con nuestros resultados. A pesar de las diferencias en las metodologías empleadas, la región descrita por el autor es la misma en la que nosotros encontramos las diferencias más significativas del estudio en humanos. Sin embargo, nuestros resultados no concuerdan en cuanto a la desmetilación observada en los estadios periféricos de LT CD4, nosotros por el contrario encontramos que la metilación al menos en la orilla 5' de la CGI-1 incrementa gradualmente en los estadios periféricos de los LT CD4 y estos resultados nos parecen más lógicos, si se tiene en cuenta que a mayor desarrollo de la célula hay una mayor pérdida de plasticidad y mayor identidad con el linaje, en este caso CD4, lo que a su vez sugiere que el aumento de la metilación se asocia con la pérdida de expresión del correceptor CD8, como era de esperarse en el linaje CD4.

La región ubicada en la orilla 5' de la CGI-1 (fragmento CGI-1.3) tiene un gradiente de desmetilación en la transición de timocitos a células RTE CD8 periférica. Especialmente en sangre periférica de adultos (62% vs 93%). Sin embargo en los estadios periféricos la dinámica de metilación de esta región se invierte y comienza a darse un gradiente de

metilación ascendente, tanto en LT CD4 como CD8 que se correlación con los niveles de expresión del correceptor CD8 en las poblaciones de LT CD8 y CD4 estudiadas.

Estos resultados son de gran interés si tenemos en cuenta que varios estudios han reportado que la metilación diferencial de las CGI en el sistema inmune, se encuentra principalmente en regiones intragénicas donde la metilación se asocia con la identidad y la diferenciación de los tejidos y células. Aun, no es claro si los patrones de metilación presentes en las CGI intragénicas pueden tener algún papel sobre la regulación de la expresión de los genes en los cuales se encuentra (166,177), pero algunos autores comienzan a postular posibles mecanismos por los cuales estas CGIs intragénicas y sus perfiles de metilación podrían tomar parte de la dinámica del genoma: el primero que se propone es que están asociadas con el silenciamiento de promotores no caracterizados o específicos de otros tipos de célula, lo que explicaría su papel en el desarrollo y diferenciación de las células y tejidos (157, 158). Otro es que puedan tener algún papel sobre la unión de factores de transcripción o *splicing* alternativos para los transcritos del gen. Todos estos postulados retan a las descripciones previas de que la expresión de los genes en mamíferos está regulada (en parte) por metilaciones del DNA en su región promotora o CGIs TSS.

Aunque hasta ahora no se establece claramente el significado funcional de la metilación en las CGIs (158, 167). En nuestro estudio la CGI intragénica 1 del gen *CD8A*, tiene una metilación creciente a medida que el LT se va diferenciando. Esto apoya la hipótesis funcional que sugiere que a mayor metilación de la CGI intragénica, mayor definición de la especificidad del tejido, mayor represión de la cromatina, mayor restricción de la expresión de algunos genes y por tanto mayor identidad celular y pérdida de la plasticidad. También podemos plantear que nuestros resultados representan el primer paso para confirmar que el grado de metilación de una CGI intragénicas, de un gen en concreto, en este caso del *CD8A*, se puede correlacionar directamente con sus niveles de expresión.

Nuestros resultados también concuerdan con trabajos previos que describen que las diferencias en los grados de metilación se evidencian más en los extremos de las CGI (*CG islands shores*), que en el cuerpo mismo de la CGI (159).

6.3 Nuevas metodologías y la PCR-FRET en el análisis de metilación del DNA

Nuestros resultados emplean por primera vez la técnica de PCR seguida de un estudio de curvas de *melting* a partir del uso de dos sondas FRET para el análisis cuantitativo de la metilación del DNA tratado con bisulfito en un locus concreto. Con esta metodología alcanzamos niveles cuantitativos altamente reproducibles y la amplificación se logró sin la necesidad de extraer el DNA, sino directamente de clones bacterianos que contenían los insertos de interés. Los resultados fueron comparados siempre frente a una curva estándar que incluía un número variable de posiciones CG metiladas para el locus analizado y la resolución fue incluso de una sola posición CG metilada.

La técnica fue validada frente a los resultados de secuenciación de DNA tratado con bisulfito de sodio y las frecuencias de metilación para el locus analizado fueron reproducibles.

Consideramos que esta metodología puede ser un modelo para la evaluación de la metilación del DNA en otros locus que puedan ser considerados como biomarcadores asociados con enfermedad y que requieran un resultado cuantitativo de la metilación.

Nuestra metodología, al igual que otras que se han desarrollado para el estudio de la metilación del DNA presenta ventajas y desventajas dependiendo del grado de resolución al que se pretenda llegar y de la heterogeneidad de la metilación en las muestras analizadas.

La principal ventaja es que ofrece una sensibilidad de hasta un dinucleótido CG metilado (o no metilado dependiendo del diseño) y que la distancia entre los picos de temperaturas de *melt* es lo suficientemente amplia como para obtener la especificidad adecuada. Otra ventaja importantes es que es completamente cuantitativa y permite el análisis de múltiples clones o muestras a la vez, a partir de amplificaciones en placa e incluyendo una curva estándar para cada amplificación. Cabe también resaltar que para muchos protocolos puede incluso reemplazar la información que genera la técnica de secuenciación del DNA tratado con bisulfito en los laboratorios o instituciones que no cuenten con un secuenciador. Además, los costos de reactivos y equipos también pueden disminuir significativamente.

Esta técnica continúa empleando como base el tratamiento del DNA con bisulfito de sodio que es considerado el *gold standar* en los estudios de metilación por lo que puede ser validada con cualquier otra metodología cuantitativa de Metilación.

La técnica desarrollada para esta estudio presenta ventajas sobre la *Metilation sensitive High resolution melting* (MS-HRM). Esto lo pudimos comprobar experimentalmente en el laboratorio, donde también empleamos esta técnica para evaluar el grado de metilación de la misma región del gen CD8A, pero los resultados fueron menos sensibles que los obtenidos con la PCR-FRET y además la diferenciación entre las temperaturas de *melt* eran mucho más estrechas, lo que también disminuía la especificidad de la técnica (datos no mostrados). La MS-HRM está basada en el uso de un marcador de color que se intercale en condiciones saturantes al DNA de doble cadena. Esta metodología requiere de antemano contar con controles positivos de metilación y tener una eficiencia muy alta de conversión con bisulfito de sodio. Se puede generar mucho ruido de fondo por la presencia de DNA de doble cadena no específico o por dímeros de oligonucleótidos. Este problema es eliminado en el diseño de PCR con sondas FRET porque la especificidad del fragmento está dada por los oligonucleótidos y la complementariedad de ambas sondas.

Consideramos que nuestra metodología también puede ser menos compleja y mas económica que la técnica de MS-qFRET (*methylation specific quantitative FRET*), en la cual se emplean primer que diferencian entre fragmentos metilados y no metilados que luego son capturados con *Quantum dots* y cuantificados por la resonancia FRET (273).

Una de las desventajas es que si se evalúa la metilación por posiciones CG específicas, este no debe ser el método de elección, pues se debe tener en cuenta que la sonda es más o menos complementaria al fragmento de DNA según el número de CG metiladas, lo que se traduce en más o menos grados de temperatura de *melt*, pero que no puede resolver la posición exacta a la cual no es complementaria la sonda (para el caso de nuestro protocolo). En cambio, si lo que se busca, son zonas o regiones del DNA que puedan o no estar metiladas y saber la frecuencia exacta de metilación, entonces este tipo de metodología puede ser la de elección.

Otra posible desventaja tiene que ver más con las características de la muestra. Si se tienen grupos celulares complejos en los que las moléculas de DNA pueden presentar diferentes grados de metilación, esta técnica al igual que la secuenciación de DNA tratado con bisulfito, requiere que los fragmentos sean clonados, para poder obtener datos cuantitativos, si por el contrario son muestras homogéneas como es el caso de muchos tumores sólidos en los que las células son mono u oligoclonales entonces no es necesario el proceso de clonación para obtener datos cuantitativos del grado de metilación de un locus en concreto. Finalmente, es importante considerar el tamaño del fragmento y la secuencia del DNA de interés como en toda técnica basada en PCR, para el diseño, la eficiencia y la especificidad de los oligonucleótidos.

6.4 La metilación del gen CD8A como biomarcador de células RTEs.

Nuestros resultados nos han llevado a confirmar la hipótesis de trabajo sólo parcialmente, pues como observamos previamente, encontramos una región diferencialmente metilada del gen *CD8A*, lo cual es muy interesante desde el punto de vista de las características moleculares de los LT en los diferentes estadios de diferenciación y en la regulación de los correceptores CD4 y CD8. También es muy interesante que hayamos encontrado que el estadio de célula RTE CD8 tiene un grado de metilación significativamente inferior al de los LT naive CD8 en las muestras de sangre periférica de adultos sanos. Sin embargo, llama la atención que estos mismos resultados presentan una tendencia similar en las poblaciones de sangre de cordón, pero no alcanzan a ser estadísticamente significativos, a pesar de que son estas muestras, las que consideraríamos como el parámetro de comparación para el estadio de células RTEs. También, es de considerar que la diferencia en los porcentajes de metilación entre ambas poblaciones es muy escasa (17% vs 29%) como para ser considerado un biomarcador eficiente en la identificación de una población celular. Por tanto si que el grado de metilación de algunos genes como el *CD8A* varían con el estadio de diferenciación y desarrollo de los LT, al menos es las poblaciones analizadas en este estudio, de acuerdo con nuestra hipótesis de trabajo, pero por si solos no constituyen un marcador de diferenciación celular. No obstante, valdría la pena explorar más a fondo la diferencia observada entre los niveles de expresión del CD8 en células RTE CD8 de sangre de cordón y los LT naive CD8, pues de confirmarse en otras muestras podría ser un marcador que combinado con otros ya existentes permitiría diferenciar RTEs CD8 los cuales hasta ahora son los que más carecen de un buen marcador.

6.5 La expresión de los correceptores CD4 y CD8 en las poblaciones de células T analizadas

Los niveles de expresión de los correceptores CD4 y CD8 encontrados en nuestro estudio confirman lo esperado de acuerdo con la pureza obtenida durante la separación de las poblaciones de células T. Además, vale la pena resaltar que hemos encontrado algunos datos interesantes que nos han brindado información sobre el comportamiento de los transcritos de dos correceptores tan importantes en el campo de la inmunología. Por ejemplo encontramos que la expresión de ambos correceptores se disminuye exactamente en un 50% en la transición del estadio de timocitos DP a SP, bien sea CD4 o CD8. También, es de resaltar que la expresión de CD4 se mantiene hasta el estadio de LT naive en el linaje de LTs CD8, lo cual podría estar asociado con una mayor plasticidad de la célula CD8 para reprogramarse hacia el linaje de LT CD4, antes de la activación en periferia, si fuese necesario. Estos datos ya habían sido sugeridos previamente por otros grupos (203). La expresión de CD8 en cambio solo parece mantenerse hasta el estadio de célula RTE CD4 en el linaje de LT CD4.

En cuanto a las variantes CD8-v3 y CD8- \square exon4, encontramos resultados muy interesantes, como por ejemplo, que a pesar de estar reportada en el banco de datos genéticos oficial, el transcrito del CD8 con la delección del exón 4 no se detecta en ninguno de los estadios celulares evaluados en esta tesis. Por otra parte el transcrito v3 que es una versión larga que incluye dos exones más *upstream* el TSS del gen *CD8A*, se expresa exclusivamente en el linaje de LT CD8 en periferia, pero mayoritariamente en LT CD8 de memoria. También presenta altos niveles de expresión en LT DP pero desconocemos si tiene algún papel funcional o de identidad de linaje en estas células.

6.6 Una modificación química diferente en el DNA de mamíferos puede ser confundida con la metilación.

Recientemente se ha confirmado la existencia de una modificación química en el DNA de mamíferos, descrita previamente. La modificación es la 5-Hydroxymethylcytosine (5hm-C) (162, 272) y es generada por las enzimas TET, catalizadoras de la oxidación de las 5meC en dinucleótidos CG. Con esta confirmación surge la hipótesis de que este mecanismo puede regular la expresión génica o representar una forma intermedia de un proceso de desmetilación del DNA (272). Las 5hmC se han implicado en la interferencia de la unión de las proteínas MBD y por tanto en la modificación de complejos de cromatina. Dada la gran similitud entre las 5hmC y la 5meC, las técnicas basadas en transformación con bisulfito no pueden distinguir actualmente entre las dos modificaciones y consecuentemente tampoco se puede discriminar su impacto funcional. Nuevas técnicas que discriminen entre estas dos modificaciones se vienen desarrollando y algunas podrán dar luces sobre la distribución de las 5hmC en el genoma. Algunas detecciones por secuenciación SMRT (*single-molecule real time sequencing*) comienzan a sugerir que esta modificación está presente en niveles fisiológicamente relevantes de manera tejido específica, lo que implica que cualquier modificación en ellas puede tener implicaciones biológicas. También debe tenerse en cuenta que muchas de las metilaciones descritas actualmente pueden ser realmente hidroximetilaciones en las citosinas y que por tanto el significado biológico de unas y otras puede verse afectado. En nuestro estudio por razones metodológicas obvias no discriminamos entre estas dos modificaciones.

CONCLUSIONES

7 CONCLUSIONES

1. Describimos por primera vez que la metilación del DNA en una región del gen *CD8A* humano incrementa de forma gradual durante el desarrollo de los linfocitos T CD4 y que esta región involucrada en la identidad y diferenciación del linaje de LT CD4 y LT CD8.
2. El incremento en la metilación en el extremo 5' de la CGI-1 del gen *CD8A* es significativo, especialmente en la transición del estadio de células RTE CD8 a linfocitos T naive CD8, tanto en neonatos como en adultos.
3. No todas las CGIs de los genes son igualmente útiles para la diferenciación de poblaciones de linfocitos T. Lo que sugiere que cada región es susceptible de metilarse y cada patrón de metilación en genes candidatos a biomarcadores, de identidad celular o asociación con enfermedades, deben ser previamente caracterizados en tejidos normales y en poblaciones celulares específicas.
4. Igualmente, no todas las posiciones CpG de la isla 1 del gen *CD8A* son válidas para la diferenciación de estadios de desarrollo de los Linfocitos T en humanos normales y a pesar de que el patrón de metilación, al menos en el gen *CD8A*, no está dado por una posición CpG específica, si es claro que la variabilidad en el grado de metilación de esta isla se concentra en una pequeña zona 5' a la orilla de la isla, que puede ser claramente identificada, lo que coincide con lo observado en otros genes a lo largo del genoma humano.
5. Hemos diseñado una técnica totalmente cuantitativa para el análisis de metilación en locus específicos basada en PCR a tiempo real con sondas FRET. Esta metodología puede ser aplicada a cualquier genes y cualquier población celular, a partir del diseño de sondas y oligonucleótidos específicos para cada locus de

interés, brindando un grado de resolución similar al de secuenciación de DNA tratado con bisulfito.

6. La expresión relativa del CD8-wt se encuentra aumentada en las poblaciones de LT RTE CD8 con respecto al estadio de LT naive, en muestras de sangre de Cordón, pero no así en las muestras de sangre periférica.
7. Las poblaciones de linfocitos T de sangre de cordón tienen características diferentes en la expresión de correceptores CD4 y CD8, comparadas con las poblaciones de sangre periférica en adultos.
8. Los niveles de expresión del CD8-wt se correlacionan con los perfiles de metilacion de la CGIs intragenica del gen CD8A, en los diferentes estadios de desarrollo y diferenciacion de las células T, tanto en sangre de cordon como en sangre periférica de adultos sanos. Este hallazgo confirma por primera vez que la metilacion de una CGI intragenica se asocia con la expresión del gen que la posee

Referencias

1. Hans-Reimer, R. Thymus Organogenesis. *Annu. Rev. Immunol.* 2008; 26:355-388.
2. Kyewski, B, Klein, L. A central role for central tolerance. *Annu Rev Immunol.* 2006; 24: 571-606.
3. Weerkamp, F, Haas, EF, Naber, BA, Comans-Bitter, WM, Bogers, AJ, van Dongen. JJ. Age-related changes in the cellular composition of the thymus in children. *J Allergy Clin Immunol.* 2005; 115: 834-840.
4. Lynch, H, Goldberg, EG, Chidgey, A, Van den Brink, MR, Boyd, R, Sempowski, GD. Thymic involution and immune reconstitution. *Trends Immunol.* 2009; 30:366-373.
5. Gray, DH, Ueno, T, Chidgey, AP, Malin, M, Goldberg, GL, Takahama H, et al. Controlling the thymic microenvironment. *Curr Opin Immunol.* 2005; 17: 137-143.
6. Weerkamp, F, Baert, MR. Human thymus contains multipotent progenitors with T/B lymphoid, myeloid, and erythroid lineage potential. *Blood.* 2006; 107: 3131-3137.
7. Abbas, AK, Lichtman, AH, Pillai S. Lymphocyte development and the rearrangement and expression of antigen receptor genes. In *Celular and Molecular Immunology 6th edition*. Editorial Saunders Elsevier. 2007; capitulo 8:153-185.
8. Graux, C, Cools, J, Michaux, L, Vandenberghe, M, Hagemeijer, A. Cytogenetics and molecular genetics of T-cell acute lymphoblastic leukemia: from thymocyte to lymphoblast. *Leukemia.* 2006; 20: 1496-1510.
9. Rothenberg, EV, Moore, JE, Yui, MA. Launching the T-cell-lineage developmental programme. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8: 9-21.
10. David-Fung, ES, Butler, R, Buzi, G, Yui, MA, Diamond, RA, Anderson, MK, et al. Transcription factor expression dynamics of early T-lymphocyte specification and commitment. *Dev Biol.* 2009; 325: 444-467.
11. Zhang, JA, Mortazavi, A, Williams, BA, Wold, BJ, Rothenberg EV. Dynamic transformations of genome-wide epigenetic marking and transcriptional control establish T cell identity. *Cell.* 2012; 149: 467-482.
12. Rothenberg, EV, Zhang, JA. T-cell identity and epigenetic memory. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2010; 356: 117-43.
13. Lee, PP, Fitzpatrick, DR, Beard, C, Jessup, HK, Lehar, S, Makar, KW et al. A critical role for Dnmt1 and DNA methylation in T cell development, function, and survival. *Immunity.* 2001; 15: 763-74.
14. Res, P, Martinez-Caceres, E, Cristina, JA, Staal, F, Noteboom, E, Weijer K, et al. CD34+CD38dim cells in the human thymus can differentiate into T, natural killer, and

- dendritic cells but are distinct from pluripotent stem cells. *Blood* 1996; 87: 5196–5206.
15. Blom, B, Verschuren, MC, Heemskerk, MH, Bakker, AQ, Gastel-Mol, EJ, Wolvers-Tettero, IL et al. TCR gene rearrangements and expression of the pre-T cell receptor complex during human T-cell differentiation. *Blood* 1999; 93: 3033–3043.
 16. Spits, H. Development of alpha/beta T cells in the human thymus. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 760–772.
 17. von Boehmer, H, Fehling, HJ. Structure and function of the pre-T cell receptor. *Annu Rev Immunol* 1997;15: 433–452.
 18. Zipfel, PA, Zhang, W, Quiroz, M, Pendergast, AM. Requirement for Abl kinases in T cell receptor signaling. *Curr Biol* 2004; 14: 1222–1231.
 19. Wange, RL. TCR signaling: another Abl-bodied kinase joins the cascade. *Curr Biol* 2004; 14: R562–R564.
 20. Taghon, T, Rothenberg, EV. Molecular mechanisms that control mouse and human TCR-alpha/beta and TCR-gammadelta T cell development. *Semin Immunopathol.* 2008; 30: 383-98.
 21. Carpenter, AC, Bosselut, R. Decision checkpoints in the thymus. *Nat Immunol.* 2002; 11: 666-73.
 22. Lucas, B, Germain, RN. Unexpectedly complex regulation of CD4/CD8 coreceptor expression supports a revised model for CD4+CD8+ thymocyte differentiation. *Immunity.* 1996; 5: 461-77.
 23. Singer, A, Adoro,S, Park, JH. Lineage fate and intense debate: myths, models and mechanisms of CD4- versus CD8-lineage choice. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8: 788-801.
 24. Ellmeier, W, Sawada, S, Littman, DR. The regulation of CD4 and CD8 coreceptor gene expression during T cell development. *Annu. Rev. Immunol.* 1999; 17, 523–554.
 25. Kioussis, D, Ellmeier, W. Chromatin and CD4, CD8 α and CD8 β gene expression during thymic differentiation. *Nature Rev. Immunol.* 2002; 2,909–919.
 26. Wiest, DL, Yuan, L, Jefferson, J, Benveniste, P, Tsokos, M, Klausner, RD, et al. Regulation of T cell receptor expression in immature CD4+CD8+ thymocytes by p56lck tyrosine kinase: basis for differential signaling by CD4 and CD8 in immature thymocytes expressing both coreceptor molecules. *J. Exp. Med.* 1993; 178:1701–1712.
 27. Shaw, SA, Amrein, KE, Hammond, C, Stern, DF, Sefton, B, Rose, MJ. The lck tyrosine protein kinase interacts with the cytoplasmic tail of the CD4 glycoprotein through its unique amino-terminal domain. *Cell* 1989; 59: 627–636.

28. Love, PE, Lee, J, Shores, EW. Critical relationship between TCR signaling potential and TCR affinity during thymocyte selection. *J. Immunol.* 2000; 165:3080–3087.
29. Bosselut, R, Feigenbaum, L, Sharrow, SO, Singer, A. Strength of signaling by CD4 and CD8 coreceptor tails determines the number but not the lineage direction of positively selected thymocytes. *Immunity* 2001; 14: 483 - 494.
30. Erman, B, Alag, AS, Dahle, O, van Laethem, F, Sarafova, SD, Guinter, et al. Coreceptor signal strength regulates positive selection but does not determine CD4/CD8 lineage choice in a physiologic *in vivo* model. *J. Immunol.* 2006; 177, 6613–6625.
31. Siu, G. Controlling CD4 gene expression during T cell lineage commitment. *Semin Immunol.* 2002; 14: 441-451.
32. Yucel, R, Karsunky, H, Klein-Hitpass, L, Moroy, T. The transcriptional repressor Gfi1 affects development of early, uncommitted c-Kit⁺ T cell progenitors and CD4/CD8 lineage decision in the thymus. *J. Exp. Med.* 2003; 197, 831–844.
33. Hostert, A, Garefalaki, A, Mavria, G, Tolaini, M, Roderick, K, Norton, T, et al. Hierarchical interactions of control elements determine CD8 α gene expression in subsets of thymocytes and peripheral T cells. *Immunity* 1998; 9, 497–508.
34. He, X, Park, K, Wang, H, He, K, Zhang, Y, Hua, X, et al. CD4-CD8 lineage commitment is regulated by a silencer element at the ThPOK transcription-factor locus. *Immunity.* 2008; 28: 346-358.
35. Ellmeier, W, Sunshine, MJ, Losos, K, Hatam, F, Littman, DR. An enhancer that directs lineage specific expression of CD8 in positively selected thymocytes and mature T cells. *Immunity* 1997; 7:537–547
36. Ellmeier, W, Sunshine, MJ, Losos, K, Littman, DR. Multiple developmental stage-specific enhancers regulate CD8 expression in developing thymocytes and in thymus-independent T cells. *Immunity* 1998; 9:485–96.
37. He, X, Park, K, Kappes, DJ. The Role of ThPOK in Control of CD4/CD8 Lineage Commitment. *Annu. Rev. Immunol.* 2010; 28:295–320.
38. He X, Dave VP, Zhang Y, Hua X, Nicolas E, et al. The zinc finger transcription factor Th-POK regulates CD4 versus CD8 T-cell lineage commitment. *Nature* 2005; 433:826–833.
39. Kappes, DJ, He, X, He, X. Role of the transcription factor Th-POK in CD4:CD8 lineage commitment. *Immunol. Rev.* 2006; 209:237–252
40. Gore, SD, Kastan, MB, Civin, CI. Normal human bone marrow precursors that express terminal deoxynucleotidyl transferase include T-cell precursors and possible lymphoid stem cells. *Blood.* 1991; 77: 1681-1690.

41. Terstappen, LW, Huang, S, Picker, LJ. Flow cytometric assessment of human T-cell differentiation in thymus and bone marrow. *Blood*. 1992; 79: 666-677.
42. Haddad, R, Guardiola, P, Izac, B, Thibault, C, Radich, J, Delezoide, AL, et al. Molecular characterization of early human T/NK and B-lymphoid progenitor cells in umbilical cord blood. *Blood*. 2004; 104: 3918-3926.
43. Hao, QL, Zhu, J, Price, MA, Payne, KJ, Barsky, LW, Crooks, GM. Identification of a novel, human multilymphoid progenitor in cord blood. *Blood*. 2001; 97: 3683-3690.
44. Weerkamp, F, Baert, MR, Brugman, MH, Dik, WA, de Haas, EF, Visser, TP, et al. Human thymus contains multipotent progenitors with T/B lymphoid, myeloid, and erythroid lineage potential. *Blood*. 2006; 107: 3131-3137.
45. Blom, B, Spits H. Development of human lymphoid cells. *Annu Rev Immunol*. 2006; 24: 287-320.
46. Weerkamp, F, de Haas, EF, Naber, BA, Comans-Bitter, WM, Bogers, AJ, van Dongen, JJ. Age-related changes in the cellular composition of the thymus in children. *J Allergy Clin Immunol*. 2005; 115: 834-840.
47. Dik, WA, Pike-Overzet, K, Weerkamp, F, de Ridder, D, de Haas, EF, Baert, MR, et al. New insights on human T cell development by quantitative T cell receptor gene rearrangement studies and gene expression profiling. *J Exp Med*. 2005; 201: 1715-1723.
48. Spits, H, Blom, B, Jaleco, AC, Weijer, K, Verschuren, MC. Early stages in the development of human T, natural killer and thymic dendritic cells. *Immunol. Rev*. 1998; 165:75–86.
49. Galy, A, Verma, S, Barcena, A, Spits, H. Precursors of CD3+CD4+CD8+ cells in the human thymus are defined by expression of CD34. Delineation of early events in human thymic development. *J. Exp. Med*. 1993; 178:391–401.
50. Dalloul, AH, Patry, C, Salamero, J, Canque, B, Grassi, F, Schmitt, C. Functional and phenotypic analysis of thymic CD34+CD1a⁺ progenitor-derived dendritic cells: predominance of CD1a⁺ differentiation pathway. *J. Immunol*. 1999; 162:5821–5828.
51. Res, P, Spits, H. Developmental stages in the human thymus. *Semin. Immunol*. 1999; 11:39–46.
52. Hori, T, Cupp, J, Wrighton, N, Lee, F, Spits, H. Identification of a novel human thymocyte subset with a phenotype of CD3⁺CD4⁺ CD8 α + β -1. Possible progeny of the CD3⁺CD4⁺CD8⁺ subset. *J. Immunol*. 1991; 146:4078–4084.
53. Houston, EG Jr, Nechanitzky P, Fink, PJ. Cutting Edge: Contact with Secondary Lymphoid Organs Drives Postthymic T Cell Maturation. *J Immunol* 2008; 181; 5213-5217.

54. Hassan, J, Reen, DJ. Human Recent Thymic Emigrants—Identification, Expansion, and Survival Characteristics. *J Immunol* 2001; 167: 1970-1976.
55. Mabarrack, NHE, Turner, NL, Mayrhofer, G. Recent thymic origin, differentiation, and turnover of regulatory T cells. *J Leukocyte Biol.* 2008; 84: 1287-1297.
56. Stutman, O. Intrathymic and extrathymic T cell maturation. *Immunol Rev.* 1978; 42:138-184.
57. Scollay, R. Thymus cell migration: cells migrating from thymus to peripheral lymphoid organs have a “mature” phenotype. *J Immunol.* 1982; 128: 1566-1570.
58. Scollay, R, Chen, WF, Shortman, K. The functional capabilities of cells leaving the thymus. *J Immunol.* 1984; 132: 25-30.
59. Kelly, KA, Scollay, R. Analysis of recent thymic emigrants with subset- and maturity-related markers. *Int Immunol.* 1990; 2: 419- 425.
60. Gabor, MJ, Godfrey, DI, Scollay, R. Recent thymic emigrants are distinct from most medullary Thymocytes. *Eur J Immunol.* 1997; 27: 2010-2015.
61. Penit, C, Vasseur, F. Expansion of mature thymocyte subsets before emigration to the periphery. *J Immunol.* 1997; 159: 4848-4856.
62. Boursalian, TE, Golob, J, Soper, DM, Cooper, CJ, Fink, PJ. Continued maturation of thymic emigrants in the periphery. *Nat Immunol.* 2004; 4:418-425.
63. Rosen, H, Alfonso, C, Surh, CD, McHeyzer-Williams, MG. Rapid induction of medullary thymocyte phenotypic maturation and egress inhibition by nanomolar sphingosine 1-phosphate receptor agonist. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100: 10907- 10912.
64. Poznansky, MC, Olszak, IT, Evans, RH. Thymocyte emigration is mediated by active movement away from stroma-derived factors. *J Clin Invest.* 2002; 109:1101-1110.
65. Kurobe, H, Liu, C, Ueno, T, Saito, F, Ohigashi, I, Seach, N, et al. CCR7-dependent cortex-to-medulla migration of positively selected thymocytes is essential for establishing central tolerance. *Immunity.* 2006; 24:165-177.
66. Haynes, BF, Markert, ML, Sempowski, GD, Patel, DD, Hale, LP. The role of the thymus in immune reconstitution in aging, bone marrow transplantation, and HIV-1 infection. *Annu Rev Immunol.* 2000; 18:529-560.
67. Haynes, BF, Markert, ML, Sempowski, GD, Patel, DD, Hale, LP. The role of the thymus in immune reconstitution in aging, bone marrow transplantation, and HIV-1 infection. *Annu Review of Immunology* 2000;18:529–60.
68. Douek, DC, McFarland, RD, Keiser, PH, Gage, EA, Massey, JM, Haynes BF, et al. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature* 1998; 396:690–695.

69. Nakahara, T, Fujii, H, Ide, M, Nishiumi, N, Takahashi, W, Yasuda, S, et al. FDG uptake in the morphologically normal thymus: comparison of FDG positron emission tomography and CT. *Br J Radiol* 2001; 74: 821–824.
70. Ferdinand, B, Gupta, P, Kramer, EL. Spectrum of thymic uptake at 18F-FDG PET. *Radiographics*. 2004; 24:1611–1616.
71. De Rosa, SC, Herzenberg, LA, Herzenberg, LA, Roederer, M. 11-color, 13-parameter flow cytometry: identification of human naive T cells by phenotype, function, and T-cell receptor diversity. *Nat Med* 2001; 7:245–248.
72. McFarland, RD, Douek, DC, Koup, RA, Picker, LJ. Identification of a human recent thymic emigrant phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:4215–4220.
73. Kong, F, Chen, CH, Cooper, MD. Thymic function can be accurately monitored by the level of recent T cell emigrants in the circulation. *Immunity* 1998; 8:97–104.
74. Picker, LJ, Treer, JR, Ferguson-Darnell, B, Collins, PA, Buck, D, Terstappen, LW. Control of lymphocyte recirculation in man. I. Differential regulation of the peripheral lymph node homing receptor L-selectin on T cells during the virgin to memory cell transition. *J Immunol* 1993;150:1105–1121
75. Haynes, BF, Hale, LP, Weinhold, KJ, Patel, DD, Liao, HX, Bressler, PB, et al. Analysis of the adult's thymus in reconstitution of T lymphocytes in HIV-1 infection. *J Clin Invest* 1999; 103:453–460.
76. Steffens, CM, Al-Harhi, L, Shott, S, Yogev, R, Landay, A. Evaluation of thymopoiesis using T cell receptor excision circles (TRECs): differential correlation between adult and pediatric TRECs and naive phenotypes. *Clin Immunol* 2000; 97:95–101.
77. Kohler, S, Thiel, A. Life after the thymus: CD31+ and CD31+ human naive CD4+ T-cell subsets. *Blood*, 2009; 113: 769-774.
78. Tanaskovic, S, Fernandez, S, Price, P, Lee, Martyn, S. A French CD31 (PECAM-1) is a marker of recent thymic emigrants among CD4+ T-cells, but not CD8+ T-cells or cd T-cells, in HIV patients responding to ART. *Immunol Cell Biol*. 2010; 88: 321–327.
79. Haines, CJ, Giff, TD, Lu, LS, Lu, X, Tessier-Lavigne, M, Ross, DS, et al. Human CD4 + T cell recent thymic emigrants are identified by protein tyrosine kinase 7 and have reduced immune function. *J. Exp. Med*. 2009; 206: 275-285.
80. Lewis, DB, Haines, C, Ross D. Protein tyrosine kinase 7: a novel surface marker for human recent thymic emigrants with potential clinical utility. *J Perinatol* 2011; 31: S72–S81.
81. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* 2004; 22:745–63.

82. Kovacs JA, Lempicki RA, Sidorov IA, Adelsberger JW, Sereti I, Sachau W, et al. Induction of prolonged survival of CD4+ T lymphocytes by intermittent IL-2 therapy in HIV-infected patients. *J Clin Invest* 2005; 115:2139–48.
83. Fujimoto S, Yamagashi H. Isolation of an excision product of T-cell receptor g-chain gene rearrangements. *Nature* 1987; 327:242
84. Okazaki, K, Davis, D, Sakano, H T cell receptor a gene sequences in the circular DNA of thymocyte nucleic: direct evidence for intramolecular DNA deletion in V-D-J joining. *Cell* 1987; 49:477.
85. Takeshita, S, Masaaki, T, Yamagishi, H. Excision products of the T cell receptor gene support a progressive rearrangement model of the a/g locus. *EMBO J* 1989; 8:3261.
86. Livak F, Schatz D T-cell receptor a locus V (D) J recombination by-products are abundant in thymocytes and mature T cells. *Mol Cell Biol* 1986; 16:609
87. Hazenberg, MD, Verschuren, MCM, Hamann. D, Miedema, F, Van Dongen JJM. T cell receptor excision circles (TRECs) as markers for recent thymic emigrants. Basic aspects, technical approach, and guidelines for interpretation. *J Mol Med* 2001; 679:631.
88. Ferrando-Martinez, S, Franco, JM, Ruiz-Mateos, E, Hernandez, A, Ordonez, A, Gutierrez, E, et al. A reliable and simplified sj/beta-TREC ratio quantification method for human thymic output measurement. *J Immunol Methods*. 2010; 352: 111-117.
89. Douek, D. Thymic output and HIV infection: on the right TREC. *Immunity* 2004; 21:744–745.
90. Hazenberg, MD, Borghans, JA, de Boer RJ, Miedema F. Thymic output: a bad TREC record. *Nat Immunol* 2003; 4 :97–99.
91. Hazenberg MD, Verschuren MC, Hamann D, Miedema F, van Dongen JJ. T cell receptor excision circles as markers for recent thymic emigrants: basic aspects, technical approach, and guidelines for interpretation. *J Mol Med* 2001; 79: 631–640.
92. Ye P, Kirschner, DE. Measuring emigration of human thymocytes by T-cell receptor excision circles. *Crit Rev Immunol* 2002; 22: 483–497.
93. Ye, P, Kirschner, DE. Reevaluation of T cell receptor excision circles as a measure of human recent thymic emigrants. *J Immunol* 2002; 168:4968–4979.
94. Boucher, A, Desforges, M, Duquette, P, Talbot, PJ. Long-term human coronavirus-myelin cross-reactive T-cell clones derived from multiple sclerosis patients. *Clin. Immunol.* 2007; 123:258.
95. Memon, SA, Sportès, C, Flomerfelt, FA, Gress, RE, Hakim, FT. Quantitative analysis of T cell receptor diversity in clinical samples of human peripheral blood. *J Immunol Meth* 2012; 75:84–92

96. Okajima, M, Wada, T, Nishida, M, Yokoyama, T, Nakayama, Y, Hashida, Y, et al. Analysis of T cell receptor Vb diversity in peripheral CD4+ and CD8+ T lymphocytes in patients with autoimmune thyroid diseases. *Clin Exp Immunol* 2008; 155: 166–172
97. Long, SA, Khalili, J, Ashe, J, Berenson, R, Ferrand, C, Bonyhadi, M. Standardized analysis for the quantification of V α CDR3 T-cell receptor diversity. *J Immunol Meth* 2006; 317: 100–113.
98. Mackall, CL, Gress, RE. Pathways of T-cell regeneration in mice and humans: implications for bone marrow transplantation and immunotherapy. *Immunol Rev* 1997; 157:61–72.
99. Hakim, FT, Cepeda, R, Kaimei, S, Mackall, CL, McAtee, N, Zujewski, J, et al. Constraints on CD4 recovery postchemotherapy in adults: thymic insufficiency and apoptotic decline of expanded peripheral CD4 cells. *Blood* 1997; 90:3789–3798.
100. Fry, TJ, Mackall, CL. The many faces of IL-7: from lymphopoiesis to peripheral T cell maintenance. *J Immunol* 2005; 174:6571–6576.
101. Mackall, CL, Fleisher, TA, Brown, MR, Andrich, MP, Chen, CC, Feuerstein, IM, et al. Age, thymopoiesis, and CD4+ T-lymphocyte regeneration after intensive chemotherapy. *N Engl J Med* 1995; 332:143–149.
102. Sarzotti, M, Patel, DD, Li, X, Ozaki, DA, Cao, S, Langdon, S, et al. T cell repertoire development in humans with SCID after nonablative allogeneic marrow transplantation. *J Immunol* 2003; 170:2711–2718.
103. Hakim, FT, Memon, SA, Cepeda, R, Jones, EC, Chow, CK, Kasten-Sportes, C, et al. Age-dependent incidence, time course, and consequences of thymic renewal in adults. *J Clin Invest* 2005; 115:930–939.
104. Nordoy, T, Kolstad, A, Endresen, P, Holte, H, Kvaloy, S, Kvalheim, G, et al. Persistent changes in the immune system 4–10 years after ABMT. *Bone Marrow Transplant* 1999; 24:873–878.
105. Storek, J, Joseph, A, Espino, G, Dawson, MA, Douek, DC, Sullivan, KM, et al. Immunity of patients surviving 20 to 30 years after allogeneic or syngeneic bone marrow transplantation. *Blood* 2001; 98:3505–3512.
106. Min H, Montecino-Rodriguez E, Dorshkind K. Reduction in the developmental potential of intrathymic T cell progenitors with age. *J Immunol* 2004; 173:245–250.
107. Heng, TS, Goldberg, GL, Gray, DH, Sutherland, JS, Chidgey, AP, Boyd, RL. Effects of castration on thymocyte development in two different models of thymic involution. *J Immunol* 2005; 175:2982–2993.
108. Peschon, JJ, Morrissey, PJ, Grabstein, KH, Ramsdell, FJ, Maraskovsky, E, Gliniak, BC, et al. Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J Exp Med* 1994; 180:1955–1960.

109. Andrew, D, Aspinall, R. Age-associated thymic atrophy is linked to a decline in IL-7 production. *Exp Gerontol* 2002; 37:455–463.
110. Phillips, JA, Brondstetter, TI, English, CA, Lee, HE, Virts, EL, Thoman, ML. IL-7 gene therapy in aging restores early thymopoiesis without reversing involution. *J Immunol* 2004; 173:4867–4874.
111. Napolitano, LA, Lo, JC, Gotway, MB, Mulligan, K, Barbour, JD, Schmidt, D, et al. Increased thymic mass and circulating naive CD4 T cells in HIV-1-infected adults treated with growth hormone. *AIDS* 2002; 16:1103–1111.
112. Savino, W, Postel-Vinay, MC, Smaniotta, S, Dardenne, M. The thymus gland: a target organ for growth hormone. *Scand J Immunol* 2002; 55:442–452.
113. Polgreen, L, Steiner, M, Dietz, CA, Manivel, JC, Petryk, A. Thymic hyperplasia in a child treated with growth hormone. *Growth Horm IGF Res* 2007; 17:41–46.
114. Fry, TJ, Mackall, CL. The many faces of IL-7: from lymphopoiesis to peripheral T cell maintenance. *J Immunol* 2005; 174:6571–6576.
115. Fry, TJ, Moniuszko, M, Creekmore, S, Donohue, SJ, Douek, DC, Giardina, S, et al. IL-7 therapy dramatically alters peripheral T-cell homeostasis in normal and SIV-infected nonhuman primates. *Blood* 2003; 101:2294–2299.
116. Moniuszko, M, Fry, T, Tsai, WP, Morre, M, Assouline, B, Cortez, P, et al. Recombinant interleukin-7 induces proliferation of naive macaque CD4+ and CD8+ T cells in vivo. *J Virol* 2004; 78:9740–9749.
117. Park, JH, Yu, Q, Erman, B, Appelbaum, JS, Montoya-Durango, Grimes HL, et al. Suppression of IL7Ralpha transcription by IL-7 and other prosurvival cytokines: a novel mechanism for maximizing IL-7-dependent T cell survival. *Immunity* 2004; 21:289–302.
118. Williams, KM, Hakim, FT, Gress, RE. T cell immune reconstitution following lymphodepletion. *Seminars Immunol* 2007; 19: 318–330
119. Hakim, FT, Memon, SA, Cepeda, R, Jones EC, Chow CK, Kasten-Sportes C, et al. Age-dependent incidence, time course, and consequences of thymic renewal in adults. *J Clin Invest.* 2005; 115:930-939.
120. Hale, JS, Boursalian, TE, Turk, GL, Fink, PJ. Thymic output in aged mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2006; 103:8447–8452.
121. Vriskoop, N, den Braber, I, de Boer, AB, Ruiter, AF, Ackermans, MT, van der Crabben, SN, et al. Sparse production but preferential incorporation of recently produced naive T cells in the human peripheral pool. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2008; 105:6115–6120.

122. Haines, CJ, Giffon, TD, Lu, LS, Lu, X, Tessier-Lavigne, M, Ross, DT, Lewis, DB. Human CD4⁺ T cell recent thymic emigrants are identified by protein tyrosine kinase 7 and have reduced immune function. *J. Exp. Med.* 2009; 206:275–285.
123. Elgbratt, K, Kurlberg, G, Hahn-Zohric, M, Hornquist, EH. Rapid migration of thymic emigrants to the colonic mucosa in ulcerative colitis patients. *Clin. Exp. Immunol.* 2010; 162:325–336.
124. Li Y, Geng S, Yin Q, Chen S, Yang L, Wu X, et al. Decreased level of recent thymic emigrants in CD4⁺ and CD8⁺T cells from CML patients. *J. Transl. Med.* 2010; 8:47.
125. Armengol, MP, Sabater, L, Fernández, M, Ruíz, M, Alonso, N, Otero, MJ et al. Influx of recent thymic emigrants into autoimmune thyroid disease glands in humans. *Clin Exp Immunol*, 2008; 153: 338–350.
126. Houston, EG Jr, Higdon, LE, Fink, PJ. Recent thymic emigrants are preferentially incorporated only into the depleted T-cell pool. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2011; 108:5366–5371.
127. Boursalian, TE, Golob, J, Soper, DM, Cooper, CJ, Fink, PJ. Continued maturation of thymic emigrants in the periphery. *Nat Immunol.* 2004; 5:418-25.
128. Kelly, KA, Scollay, R. Analysis of recent thymic emigrants with subset- and maturity-related markers. *Int. Immunol.* 1990; 2:419–425.
129. Lee CK, Kim K, Welniak LA, Murphy WJ, Muegge K, Durum SK. Thymic emigrants isolated by a new method possess unique phenotypic and functional properties. *Blood.* 2001; 97:1360–1369.
130. Chang, JF, Thomas, CA, Kung, JT. Induction of high level IL-2 production in CD4⁺8⁺ T helper lymphocytes requires post-thymic development. *J. Immunol.* 1991; 147:851–859.
131. Hendricks, DW, Fink, PJ. Recent thymic emigrants are biased against the T-helper type 1 and toward the T-helper type 2 effector lineage. *Blood.* 2011; 117:1239–1249.
132. Makaroff, LE, Hendricks, DW, Niec, RE, Fink, PJ. Postthymic maturation influences the CD8 T cell response to antigen. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2009; 106:4799–4804.
133. Ikegami, K, Ohgane, J, Tanaka, S, Yagi, S, Shiota, K. Interplay between DNA methylation, histone modification and chromatin remodeling in stem cells and during development *Int. J. Dev. Biol.* 2009; 53: 203-214.
134. Munshi, A, Shafi, G, Aliya, N, Jyothy, A. Histone modifications dictate specific biological readouts. *J Genet Genomics* 2009; 36:75- 88.
135. Min-Hao, Kuo CDA. Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *Bioassays* 1998; 20:615-26.

136. Roth, SY, Denu, JM, Allis, CD. Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem* 2001; 70:81-120.
137. Delcuve, GP, Rastegar, M, Davie, JR. Epigenetic control. *J Cell Physiol* 2009; 219:243-250.
138. Robinson, PJ, An, W, Routh, A, Martino, F, Chapman, L, Roeder, RG, et al. 30 nm chromatin fibre decompaction requires both H4- K16 acetylation and linker histone ediction. *J Mol Biol* 2008; 381:816-825.
139. Jenuwein, T, Allis, CD. Translating the histone code. *Science* 2001; 293:1074-1080.
140. Lagos-Quintana, M, Rauhut, R, Lendeckel, W, Tuschl, T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 2001; 294: 853–858.
141. Lau, NC, Lim, LP, Weinstein, EG, Bartel, DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294: 858– 862.
142. Lee, RC, Ambros, V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001; 294: 862–864.
143. Aravin, AA, Hannon, GJ, Brennecke, J. The Piwi-piRNA pathway provides an adaptive defense in the transposon arms race. *Science* 2007; 318: 761–764.
144. Morris, KV, Chan, SW, Jacobsen, SE, Looney, DJ. Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells. *Science*. 2004; 305:1289–1292.
145. Bagga, S, Bracht, J, Hunter, S, Massirer, K, Holtz, J. Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell*. 2005; 122:553–563.
146. Portnoy, V, Huang, V, Place, RF, Li, LC. Small RNA and transcriptional upregulation. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2011; 2: 748–760.
147. Sato, F, Tsuchiya, S, Meltzer, SJ, Shimizu, K. MicroRNAs and epigenetics. *FEBS J* 2011; 278: 1598–1609.
148. Goll, MG, Bestor, TH. Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.* 2005;74, 481–514.
149. Illingworth, RS, Bird, AP. CpG islands – ‘a rough guide’. *FEBS Lett*. 2009; 583: 1713–1720.
150. Straussman R, Nejman D, Roberts D, Steinfeld I, Blum B, Benvenisty N. et al. Developmental programming of CpG island methylation profiles in the human genome. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2009;16: 564–571
151. Blackledge, NP, Klose, RJ. CpG island chromatin: a platform for gene regulation. *Epigenetics* 2011; 6: 147–152
152. Fuks, F. DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2005;15: 490–495
153. Brenner, C, Fuks, F. A methylation rendezvous: reader meets writers. *Dev. Cell* 2007; 12: 843–844.

154. Illingworth, RS, Gruenewald-Schneider, U, Webb, S, Kerr, ARW, James, KD, Turner, DJ, et al. Orphan CpG islands identify numerous conserved promoters in the mammalian genome. *PLoS Genet* 2010; 6: e1001-e1134.
155. Deaton, AM, Bird, A. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev.* 2011; 25: 1010-1022.
156. Mohn, F, Schubeler, D. Genetics and epigenetics: stability and plasticity during cellular differentiation. *Trends Genet* 2009; 25: 129–136.
157. Blackledge, NP, Klose, RJ. CpG island chromatin: a platform for gene regulation. *Epigenetics* 2011; 6: 147–152.
158. Maunakea, AK, Nagarajan, RP, Bilenky, M, Ballinger, TJ, D'Souza, C, Fouse, SD et al. Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters. *Nature* 2010; 466: 253–257.
159. Medvedeva YA, Fridman MV, Oparina NJ, Malko DB, Ermakova EO, Kulakovskiy IV. et al. Intergenic, gene terminal, and intragenic CpG islands in the human genome. *BMC Genomics* 2010; 11: 48.
160. Feng, S, Cokus, SJ, Zhang, X, Chen, PY, Bostick, M, Goll, MG et al. Conservation and divergence of methylation patterning in plants and animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010; 107: 8689–8694.
161. Laurent, L, Wong, E, Li, G, Huynh, T, Tsirigos, A, Ong, CT, et al. Dynamic changes in the human methylome during differentiation. *Genome Res.* 2010; 20: 320–331.
162. Lister, R, Pelizzola, M, Dowen, RH, Hawkins, RD, Hon, G, Tonti-Filippini, J, et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* 2009; 462, 315–322.
163. Bird, A. The dinucleotide CG as a genomic signalling module. *J Mol Biol.* 2011; 409: 47-53.
164. Jones, PA. The DNA methylation paradox. *Trends Genet.* 1999; 15: 34–37.
165. Hellman, A, Chess, A. Gene body-specific methylation on the active X chromosome. *Science* 2007; 315: 1141–1143.
166. Irizarry, RA, Ladd-Acosta, C, Wen, B, Wu, Z, Montano, C, Onyango, P. et al. The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nat. Genet.* 2009; 41: 178–186.
167. Rauch, TA, Wu, X, Zhong, X, Riggs, AD, Pfeifer, GP. A human B cell methylome at 100-base pair resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2009; 106: 671–678.
168. Shann, YJ, Cheng, C, Chiao, CH, Chen, DT, Li, PH, Hsu, MT. Genome-wide mapping and characterization of hypomethylated sites in human tissues and breast cancer cell lines. *Genome Res.* 2008; 18: 791–801.

169. Zilberman, D, Gehring, M, Tran, RK, Ballinger, T, Henikoff, S. Genome-wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription. *Nat. Genet.* 2007; 39: 61–69.
170. Weber, M, Hellmann, I, Stadler, MB, Ramos, L, Pääbo, S, Rebhan, M, et al. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat. Genet.* 2007; 39, 457–466.
171. Takai, D, Jones, PA. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002; 99: 3740–3745.
172. Boyes, J, Bird, A. Repression of genes by DNA methylation depends on CpG density and promoter strength: evidence for involvement of a methyl-CpG binding protein. *EMBO J.* 1992; 11: 327–333.
173. Blackledge, NP, Zhou, JC, Tolstorukov, MY, Farcas, AM, Park, PJ, Klose, RJ, et al. CpG islands recruit a histone H3 lysine 36 demethylase. *Mol. Cell* 2010; 38: 179–190.
174. Lee, JH, Skalnik, DG. CpG-binding protein (CXXC finger protein 1) is a component of the mammalian Set1 histone H3-Lys4 methyltransferase complex, the analogue of the yeast Set1/COMPASS complex. *J. Biol. Chem.* 2005; 280: 41725–41731
175. Roh, TY, Cuddapah, S, Zhao, K. Active chromatin domains are defined by acetylation islands revealed by genome-wide mapping. *Genes Dev.* 2005; 19: 542–552.
176. Zemach, A, McDaniel, IE, Silva, P, Zilberman, D. Genome-wide evolutionary analysis of eukaryotic DNA methylation. *Science* 2010; 328: 916–919.
177. Doi, A, Park, IH, Wen, B, Murakami, P, Aryee, MJ, Irizarry, R, et al. Differential methylation of tissue- and cancerspecific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. *Nat. Genet.* 2009; 41: 1350–1353.
178. Waterston, RH, Lindblad-Toh, K, Birney, E, Rogers, J, Abril, JF, Agarwal, P et al. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature.* 2002; 420: 520-562.
179. Klose, RJ, Bird, AP. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem. Sci.* 2006; 31: 89–97.
180. Bruniquel, D, Schwartz, RH. Selective, stable demethylation of the interleukin-2 gene enhances transcription by an active process. *Nat Immunol.* 2003; 4: 235-40.
181. Thomas, RM, Gamper, CJ, Ladle, BH, Powell, JD, Wells, AD. De novo DNA methylation is required to restrict T helper lineage plasticity. *J Biol Chem.* 2012; 287:22900-22909.

182. Raucha, TA, Wub, X, Zhonga, X, Riggsa, AD, Pfeifer, GP. A human B cell methylome at 100 base pair resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2009; 106: 671–678.
183. Ansel, KM, Djuretic, I, Tanasa, B, Rao, A. Regulation of Th2 differentiation and *Il4* locus accessibility. *Annu. Rev. Immunol.* 2006; 24: 607–656.
184. Lee, GR, Kim, ST, Spilianakis, CG, Fields, PE, Flavell, RA. T helper cell differentiation: regulation by *cis* elements and epigenetics. *Immunity* 2006; 24: 369–379.
185. Ledford, H. Language: disputed definitions. *Nature* 2008; 455: 1023–1028.
186. Merkenschlager, M, Wilson, CB. RNAi and chromatin in T cell development and function. *Curr. Opin. Immunol.* 2008; 20: 131–138.
187. Fields, PE, Lee, GR, Kim, ST, Bartsevich, VV, Flavell, RA. Th2-specific chromatin remodeling and enhancer activity in the Th2 cytokine locus control region. *Immunity* 2004; 21: 865–876.
188. Lee, DU, Rao, A. Molecular analysis of a locus control region in the T helper 2 cytokine gene cluster: a target for STAT6 but not GATA3. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2004; 101: 16010–16015.
189. Koyanagi, M, Baguet, A, Martens, J, Margueron, R, Jenuwein, T, Bix, M EZH2 and histone 3 trimethyl lysine 27 associated with *Il4* and *Il13* gene silencing in TH1 cells. *J. Biol. Chem.* 2005; 280: 31470–31477.
190. Baguet, A, Bix, M. Chromatin landscape dynamics of the *Il4–Il13* locus during T helper 1 and 2 development. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2004; 101: 11410–11415.
191. Yamashita, M. *et al.* Essential role of GATA3 for the maintenance of type 2 helper T (Th2) cytokine production and chromatin remodeling at the Th2cytokine gene loci. *J. Biol. Chem.* 279: 26983–26990 (2004).
192. Yamashita, M, Ukai-Tadenuma, M, Miyamoto, T, Sugaya, K, Hosokawa, H, Hasegawa, A, *et al.* A critical control element for interleukin-4 memory expression in T helper lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 2005; 280: 28177–28185.
193. Avni, O, Lee, D, Macian, F, Szabo, SJ, Glimcher, LH, Rao, A. TH cell differentiation is accompanied by dynamic changes in histone acetylation of cytokine genes. *Nature Immunol.* 2002; 3: 643–651.
194. Fields, PE, Kim, ST, Flavell, RA. Cutting Edge: changes in histone acetylation at the *IL-4* and *IFN-γ* loci accompany Th1/Th2 differentiation. *J. Immunol.* 2002; 169: 647–650.
195. Zhu, J, Cote-Sierra, J, Guo, L, Paul, WE. Stat5 activation plays a critical role in Th2 differentiation. *Immunity* 2003; 19: 739–748.

196. Lee, HJ, Takemoto, N, Kurata, H, Kamogawa, Y, Miyatake, S, O'Garra, A, *et al.* GATA-3 induces T helper cell type 2 (Th2) cytokine expression and chromatin remodeling in committed Th1 cells. *J. Exp. Med.* 2000; 192: 105–115.
197. Acosta-Rodriguez, EV, Rivino, L, Geginat, J, Jarrossay, D, Gattorno, M, Lanzavecchia, A. *et al.* Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nature Immunol.* 2007; 8: 639–646.
198. Schoenborn, JR, Dorschner, MO, Sekimata, M, Santer, DM, Shnyreva, M, Fitzpatrick DR, Stamatoyannopoulos, JA, *et al.* Comprehensive epigenetic profiling identifies multiple distal regulatory elements directing transcription of the gene encoding interferon- γ . *Nature Immunol.* 2007;8: 732–742.
199. Hatton, RD, Harrington, LE, Luther, RJ, Wakefield, T, Janowski, KM, Oliver, JR, *et al.* A distal conserved sequence element controls *Ifng* gene expression by T cells and NK cells. *Immunity* 2006; 25: 717–729.
200. Shi, M, Lin, TH, Appell, KC, Berg, LJ. Janus-kinase-3-dependent signals induce chromatin remodeling at the *Ifng* locus during T helper 1 cell differentiation. *Immunity* 2008; 28: 763–773.
201. Thieu, VT, Yu, Q, Chang, HC, Yeh, N, Nguyen, ET, Sehra, S, *et al.* Signal transducer and activator of transcription 4 is required for the transcription factor T-bet to promote T helper 1 cell-fate determination. *Immunity* 2008; 29: 679–690.
202. Yang, Y, Ochando, JC, Bromberg, JS, Ding, Y. Identification of a distant T-bet enhancer responsive to IL-12/Stat4 and IFN γ /Stat1 signals. *Blood* 2007; 110: 2494–2500.
203. Wilson, CB, Rowell, E, Sekimata, M. Epigenetic control of T - helper - cell differentiation. *Nature Rev Immunology* 2009; 9:91-105.
204. Makar, KW, Pérez-Melgosa, M, Shnyreva, M, Weaver, WM, Fitzpatrick, DR, Wilson, CB. Active recruitment of DNA methyltransferases regulates interleukin 4 in thymocytes and T cells. *Nature Immunol.* 2003; 4: 1183–1190.
205. Makar, KW, Wilson, CB. DNA methylation is a non-redundant repressor of the Th2 effector program. *J. Immunol.* 2004; 173: 4402–4406.
206. Zhang, F, Boothby, M. T helper type 1-specific Brg1 recruitment and remodeling of nucleosomes positioned at the IFN- γ promoter are Stat4 dependent. *J. Exp. Med.* 2006; 203: 1493–1505.
207. Yamashita, M, Hirahara, K, Shinnakasu, R, Hosokawa, H, Norikane, S, Kimura, MY, *et al.* Crucial role of MLL for the maintenance of memory T helper type 2 cell responses. *Immunity* 2006; 24: 611–622.

208. Kimura, M, Koseki, Y, Yamashita, M, Watanabe, N, Shimizu, C, Katsumoto, T, *et al.* Regulation of Th2 cell differentiation by *mel-18*, a mammalian polycomb group gene. *Immunity* 2001; 15: 275–287.
209. Cai, G, Radzanowski, T, Villegas, EN, Kastelein, R, Hunter, CA. Identification of STAT4 -dependent and independent mechanisms of resistance to *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 2000; 165: 2619–2627.
210. Amsen, D, Antov, A, Jankovic, D, Sher, A, Radtke, F, Souabni, A, *et al.* Direct regulation of Gata3 expression determines the T helper differentiation potential of Notch. *Immunity* 2007; 27:89–99.
211. Kaplan, MH, Sun, YL, Hoey, T, Grusby, MJ. Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature* 1996; 382: 174–177.
212. Szabo, SJ, Kim, ST, Costa, GL, Zhang, X, Fathman, CG, Glimcher, LH, *et al.* A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 2000; 100: 655–669.
213. Akimzhanov, AM, Yang, XO, Dong, C. Chromatin remodeling of interleukin-17 (IL-17)–IL-17F cytokine gene locus during inflammatory helper T cell differentiation. *J. Biol. Chem.* 2007; 282: 5969–5972.
214. Spilianakis, CG, Flavell, RA. Long-range intrachromosomal interactions in the T helper type 2 cytokine locus. *Nature Immunol.* 2004; 5: 1017–1027.
215. Zhu, J, Min, B, Hu-Li, J, Watson, CJ, Grinberg, A, Wang, Q, *et al.* Conditional deletion of Gata3 shows its essential function in TH1-TH2 responses. *Nature Immunol.* 2004; 5:1157–1165.
216. Martins, GA, Hutchins, AS, Reiner, SL. Transcriptional activators of helper T cell fate are required for establishment but not maintenance of signature cytokine expression. *J. Immunol.* 2005; 175:5981–5985.
217. Taniuchi, I, Osato, M, Egawa, T, Sunshine, MJ, Bae, SC, Komori, T, *et al.* Differential requirements for Runx proteins in CD4 repression and epigenetic silencing during T lymphocyte development. *Cell* 2002; 111:621–633.
218. Ansel, KM, Greenwald, RJ, Agarwal, S, Bassing, CH, Monticelli, S, Interlandi, J, *et al.* Deletion of a conserved *Ii4* silencer impairs T helper type 1-mediated immunity. *Nature Immunol.* 2004; 5: 1251–1259.
219. Laurence, A, Tato, CM, Davidson, TS, Kanno, Y, Chen, Z, Yao, Z, *et al.* Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity* 2007; 26: 371–381.

220. Gorelik, L, Constant, S, Flavell, RA. Mechanism of transforming growth factor β -induced inhibition of T helper type 1 differentiation. *J. Exp. Med.* 2002; 195: 1499–1505.
221. Kim, HP, Leonard, WJ. CREB/ATF-dependent T cell receptor-induced FoxP3 gene expression: a role for DNA methylation. *J Exp Med.* 2007; 204:1543-1551.
222. Janson, PC, Winerdal, ME, Marits, P, Thorn, M, Ohlsson, R, Winqvist, O. FOXP3 promoter demethylation reveals the committed Tregs population in humans. *PLoS ONE.* 2008; 3:e1612.
223. Girdhari, LA, Bromberg, JS. Epigenetic mechanisms of regulation of Foxp3 expression. *Blood* 2009; 114: 3727-3735.
224. Kersh, EN, Fitzpatrick, DR, Murali-Krishna, K, Shires, J, Speck, SH, Boss, JM, et al. Rapid demethylation of the IFN-gamma gene occurs in memory but not naive CD8 T cells. *J. Immunol.* 2006; 176: 4083–4093.
225. Santangelo, S, Cousins, DJ, Winkelmann, NE, Staynov, DZ, et al. DNA methylation changes at human Th2 cytokine genes coincide with DNase I hypersensitive site formation during CD4 (+) T cell differentiation. *J. Immunol.* 2002; 169:1893–1903.
226. Janson, PC, Linton, LB, Bergman, EA, Marits, P, Eberhardson, M, Piehl, F, et al. Profiling of CD4+ T cells with epigenetic immune lineage analysis. *J. Immunol.* 2011; 186: 92–102.
227. Floess, S, Freyer, J, Siewert, C, Baron, U, Olek, S, Polansky, J, et al. Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. *PLoS Biol.* 2007; 5, e38.
228. Baron, U, Floess, S, Wieczorek, G, Baumann, K, Grützkau, A, Dong, J, et al. DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3(+) conventional T cells. *Eur. J. Immunol.* 2007; 37: 2378–2389.
229. Lal, G, Bromberg, JS. Epigenetic regulation of Foxp3 expression in regulatory T cells by DNA methylation. *J. Immunol.* 2009; 182: 259–273.
230. Janson, PC, Winerdal, ME, Marits, P, Thörn, M, Ohlsson, R, Winqvist, O. FOXP3 promoter demethylation reveals the committed Treg population in humans. *PLoS ONE* 2008; 3: e1612.
231. Thomas, RM, Gao, L, Wells, AD. Signals from CD28 induce stable epigenetic modification of the IL-2 promoter. *J. Immunol.* 2005; 174: 4639–4646.
232. Steinfelder, S, Floess, S, Engelbert, D, Haeringer, B, Baron, U, Rivino, L, et al. Epigenetic modification of the human CCR6 gene is associated with stable CCR6 expression in T cells. *Blood* 2011; 117: 2839–2846.

233. Youngblood, B, Oestreich, KJ, Ha, SJ, Duraiswamy, J, Akondy, RS, West, EE, et al. Chronic virus infection enforces demethylation of the locus that encodes PD-1 in antigen-specific CD8 (+) T cells. *Immunity* 2011; 35: 400–412.
234. Sawalha, AH, Wang, L, Nadig, A, Somers, EC, McCune, WJ. Sex-specific differences in the relationship between genetic susceptibility, T cell DNA demethylation and lupus flare severity. *J. Autoimmun.* 2012; 38: J216–J222.
235. Gómez-Lozano, N, Trompeter, HI, de Pablo, R, Estefanía, E, Uhrberg, M, Vilches, C. Epigenetic silencing of potentially functional KIR2DL5 alleles: implications for the acquisition of KIR repertoires by NK cells. *Eur. J. Immunol.* 2007; 37: 1954–1965.
236. Santourlidis, S, Graffmann, N, Christ, J, Uhrberg, M. Lineage-specific transition of histone signatures in the killer cell Ig-like receptor locus from hematopoietic progenitor to NK cells. *J. Immunol.* 2008; 180: 418–425.
237. Rogers, SL, Rouhi, A, Takei, F, Mager, DL. A role for DNA hypomethylation and histone acetylation in maintaining allele-specific expression of mouse NKG2A in developing and mature NK cells. *J. Immunol.* 2006; 177: 414–421.
238. Danbara, M, Kameyama, K, Higashihara, M, Takagaki, Y. DNA methylation dominates transcriptional silencing of Pax5 in terminally differentiated B cell lines. *Mol. Immunol.* 2002; 38: 1161–1166.
239. Garaud, S, Le Dantec, C, Berthou, C, Lydyard, PM, Youinou, P, Renaudineau, Y. Selection of the alternative exon 1 from the cd5 gene down-regulates membrane level of the protein in B lymphocytes. *J. Immunol.* 2008; 181: 2010–2018.
240. Majumder, P, Boss, JM. DNA methylation dysregulates and silences the HLA-DQ locus by altering chromatin architecture. *Genes Immun.* 2011; 12: 291–299.
241. Seguín-Estévez, Q, De Palma, R, Krawczyk, M, Leimgruber, E, Villard, J, Picard, C, et al. The transcription factor RFX protects MHC class II genes against epigenetic silencing by DNA methylation. *J. Immunol.* 2009; 183: 2545–2553.
242. Suárez-Alvarez, B, Rodriguez, RM, Calvanese, V, Blanco-Gelaz, MA, Suhr ST, Ortega, F, et al. Epigenetic mechanisms regulate MHC and antigen processing molecules in human embryonic and induced pluripotent stem cells. *PLoS ONE* 2010; 5: e10192.
243. Schwab, J, Illges, H. Regulation of CD21 expression by DNA methylation and histone deacetylation. *Int. Immunol.* 2001; 13: 705–710.
244. Wessels, I, Fleischer, D, Rink, L, Uciechowski, P. Changes in chromatin structure and methylation of the human interleukin-1beta gene during monopoiesis. *Immunology* 2010; 130: 410–41

245. Bullwinkel, J, Lüdemann, A, Debarry, J, Singh, PB. Epigenotype switching at the CD14 and CD209 genes during differentiation of human monocytes to dendritic cells. *Epigenetics* 2011; 6: 45–51.
246. Suarez-Alvarez, B, Rodriguez, RM, Fraga, MF, Lopez-Larrea C. DNA methylation: a promising landscape for immune system-related diseases. *Trends Genet* 2012; 28:506-514.
247. Mikeska, T, Candiloro, ILM, Dobrovic, A. The implications of heterogeneous DNA methylation for the accurate quantification of methylation. *Epigenomics* 2010; 2: 561–573.
248. Pasquali, L, Bedeir, A, Ringquist, S, Styche, A, Bhargava, R, Trucco, G: Quantification of CpG island methylation in progressive breast lesions from normal to invasive carcinoma. *Cancer Lett.* 2007; 257: 136–144.
249. Mikeska, T, Bock, C, El-Maarri, O Optimization of quantitative *MGMT* promoter methylation analysis using pyrosequencing and combined bisulfite restriction analysis. *J. Mol. Diagn.* 2007; 9: 368–381.
250. Schuffler, P, Mikeska, T, Waha, A, Lengauer, T, Bock, C: Methmarker: user-friendly design and optimization of gene-specific DNA methylation assays. *Genome Biol.* 2009; 10: R105.
251. University of California Santa Cruz Genome Bioinformatic site USCS Genome Browser-California USA. (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>). Consultado entre Julio de 2009 y enero de 2012.
252. Chuang, LY, Yang, CH, Lin, MC, Yang, CH. CpGPAP: CpG island predictor analysis platform. *BMC Genet.* 2012;13: 13.
253. The Salk Institut for Biological Studies. The Human DNA Methylome. California, USA. (http://neomorph.salk.edu/human_methylome/index.html) Consultado entre Julio de 2009 y enero de 2012.
254. Lister, R, Pelizzola, R, Downen, RH, Hawkins, RD, Hon, G, Tonti-Filippini, J, et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences *Nature* 2009;462: 315-22.
255. Rogers, SL, Zhao, Y, Jiang, X, Eaves, CJ, Mager, DL, Rouhi, A. Expression of the leukemic prognostic marker CD7 is linked to epigenetic modifications in chronic myeloid leukemia. *Molecular Cancer* 2010; 9:1-14
256. Correa, PA, Pujol-Borrell, R, Colobran, R. Bisulfite genomic sequencing to uncover variability in DNA methylation: Optimized protocol applied to human T cell differentiation genes. *Inmunología.* 2012; 31:97-105.
257. Clark, SJ, Harrison, J, Paul, CL, Frommer, M. High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res.* 1994; 22: 2990-2997

258. Tollefsbol, T.O. *Methods in Molecular Biology: Epigenetics Protocols*. 2004: 287. Ed. Humana Press. New Jersey, USA.
259. Grunau, C, Clark, SJ, Rosenthal, A. Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. *Nucleic Acids Res*. 2001; 29:E65-E66.
260. The Li Lab in the Department of Urology and Helen Diller Family Comprehensive Cancer Center, UCSF. Eurogen <http://www.urogene.org/>. Consultado entre Julio de 2009 y septiembre de 2012.
261. Nørholm, MH. A mutant Pfu DNA polymerase designed for advanced uracil-excision DNA engineering. *BMC Biotechnol*. 2010; 10:21.
262. Zhou MY, Gomez-Sanchez CE. Universal TA cloning. *Curr Issues Mol Biol* 2000; 2:1-7.
263. Ohno, K, Tanaka, M, Ino, H, Suzuki, H, Tashiro, M, Ibi, T, et al. Direct DNA sequencing from colony: analysis of multiple deletions of mitochondrial genome. *Biochim Biophys Acta*. 1991; 1090:9-16.
264. Didenko, VV DNA Probes Using Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET): Designs and Applications. *Biotechniques*. 2001; 31: 1106–1121.
265. Schatorjé, EJH, Gemen EFA, Driessen, GJA, Leuvenink, J, van Hout, RWN, E. de Vries. Paediatric Reference Values for the Peripheral T cell Compartment. *Scand J Immunol*. 2012; 77:436-444.
266. Roncador G, Garcia JF, Garcia JF, Maestre L, Lucas E, Menarguez J, et al. FOXP3, a selective marker for a subset of adult T-cell leukaemia/lymphoma. *Leukemia*. 2005; 32:198-206.
267. Loddenkemper C, Maul J, Berg E, Stein H, Zeitz M, Duchmann R. Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4(+)CD25(+) regulatory T cells at the single-cell level. *Eur J Immunol*. 2006;36:245-253.
268. McFarland RD, Douek DC, Koup RA, Picker LJ. Identification of a human recent thymic emigrant phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97:4215-420.
269. Maecker HT, McCoy JP, Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nat Rev Immunol*. 2012; 12:191-200.
270. Tutt Landolfi MM, Scollay R, Parnes JR. Specific demethylation of the CD4 gene during CD4 T lymphocyte differentiation. *Mol Immunol*. 1997;34:53-61.
271. Carbone AM, Marrack P, Kappler JW. Demethylated CD8 gene in CD4+ T cells suggests that CD4+ cells develop from CD8+ precursors. *Science*. 1988;242:1174-1176.

272. Pestano GA, Zhou Y, Trimble LA, Daley J, Weber GF, Cantor H. Inactivation of misselected CD8 T cells by CD8 gene methylation and cell death. *Science*. 1999; 284:1187-1191.
273. Bailey VJ, Easwaran H, Zhang Y, Griffiths E, Belinsky SA, Herman JG, et al.. MS-qFRET: a quantum dot-based method for analysis of DNA methylation. *Genome Res*. 2009; 19:1455-1461.
274. Almeida RD, Loose M, Sottile V, Matsa E, Denning C, Young L, Johnson AD, Gering M, Ruzov A. 5-hydroxymethyl-cytosine enrichment of non-committed cells is not a universal feature of vertebrate development. *Epigenetics*. 2012Apr;7(4):383-9

Anexos

Anexo 1. Artículo Original Completo

Correa PA, Pujol-Borrell R, Colobran R. *Bisulfite genomic sequencing to determine variability in DNA methylation: Optimized protocol applied to human T cell differentiation genes*. *Inmunología*. 2012; 31:97-105.

Otras publicaciones

Resumen en Congreso Internacional

Paula A. Correa, Ricardo Pujol-Borrell, Roger Colobran. *Quantitative DNA methylation Analysis of CD8A gene during T cell differentiation. Epigenetic in Lymphocyte Biology and Diseases*. 2012: Supplement, 86

Resumen en Congreso Nacional

Paula A. Correa, Ricardo Pujol-Borrell, Roger Colobran. *DNA Methylation Patrons of CD8A gene during the Human T cell differentiation*. Congreso de Inmunología, Sociedad Catalana de Inmunología, SCI. Barcelona, Noviembre 2012.

Manuscrito en preparación: Compendio total del trabajo y resultados finales.