



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

**Activación crónica y su relación con la funcionalidad de
los linfocitos T CD4+ de memoria central y de memoria
efectora en la patogénesis de la infección por VIH**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(Experimental)

P R E S E N T A

Gustavo Olvera García

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:
Dr. Héctor Enrique Espinosa Arciniega

COMITÉ TUTOR:
Dra. Yvonne Rosenstein Azoulay
Dr. José Sullivan López González

MÉXICO, D.F.

Marzo, 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

**Activación crónica y su relación con la funcionalidad de
los linfocitos T CD4+ de memoria central y de memoria
efectora en la patogénesis de la infección por VIH**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(Experimental)

P R E S E N T A

Gustavo Olvera García

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:
Dr. Héctor Enrique Espinosa Arciniega

COMITÉ TUTOR:
Dra. Yvonne Rosenstein Azoulay
Dr. José Sullivan López González

MÉXICO, D.F.

Marzo, 2011



Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 31 de enero de 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del alumno **OLVERA GARCÍA GUSTAVO** con número de cuenta **99246819** con la tesis titulada **"ACTIVACIÓN CRÓNICA Y SU RELACIÓN CON LA FUNCIONALIDAD DE LOS LINFOCITOS T CD4+ DE MEMORIA CENTRAL Y DE MEMORIA EFECTORA EN LA PATOGÉNESIS DE LA INFECCIÓN POR VIH."**, realizada bajo la dirección del : **DR. HÉCTOR ENRIQUE ESPINOSA ARCINIEGA**

Presidente:	DR.	CARLOS LARRALDE RANGEL
Vocal:	DRA.	LAURA BONIFAZ ALFONSO
Secretario:	DRA.	YVONNE ROSENSTEIN AZOULAY
Suplente:	DRA.	LETICIA ROCHA ZAVALETA
Suplente:	DR.	JOSÉ SULLIVAN LÓPEZ GONZÁLEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 18 de marzo de 2011

M^{ra} del Coro Arizmendi

Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga
Coordinadora del Programa

Agradecimientos

- A la Universidad Nacional Autónoma de México.
- Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM.
- Al CONACyT por la beca de posgrado 220275 otorgada, además de la beca mixta para estancias en el extranjero que me permitió realizar la estancia de investigación en el “Center For AIDS Research” de la “Case Western Reserve University” en Cleveland Ohio, USA.
- Al la Fundación Mexicana para la Salud A.C. por el apoyo otorgado para la realización de mi la estancia de investigación en el “Center For AIDS Research” de la “Case Western Reserve University” en Cleveland Ohio, USA, en especial al Dr. Jorge Paniagua Solís.
- Al MD. Michael M. Lederman del “Center For AIDS Research” de la “Case Western Reserve University” en Cleveland Ohio, USA, por el apoyo otorgado para mi estancia de investigación el su laboratorio.
- A la Dra. Yvonne Rosenstein Azoulay, al Dr. José Sullivan López González y al Dr. Enrique Espinosa Arciniega por formar parte de mi comité tutorial y por sus valiosas contribuciones para la realización de esta tesis.

Agradecimientos a título personal

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser una de las pocas vías que existen en México que permiten el desarrollo académico, económico y personal de cualquier individuo sin distinción.

A Rosario por su constante e incondicional apoyo que hace posible alcanzar mis metas.

A mis padres y hermana por ser partes muy importantes de mis logros.

Al Dr. Jorge Paniagua Solís.

Al Dr. Michael M. Lederman.

A mis amigos y compañeros del laboratorio, especialmente a Olivia, Dani y Lety por su apoyo académico y anímico sin el cual hubiese sido más difícil concluir con este trabajo.

Índice

I. Acrónimos y Abreviaturas	IX
II. Índice de figuras y tablas	XI
III. Resumen.....	XII
IV. Abstract	XIV
1. Introducción	16
-1.1. Infección por VIH	16
-1.2. Inmunopatogénesis de la infección por VIH.....	17
-1.3. Linfocitos T de memoria y VIH.....	19
-1.4. Activación inmune y VIH	20
-1.5. Disfunciones inmunes observadas en VIH	23
-1.6. CD38: una ectoenzima, una molécula de adhesión y una molécula de señalización (62-64).....	24
2. Hipótesis	27
3. Objetivos	27
4. Metodología	28
-4.1. Pacientes y muestras	28
-4.2. Preparación de las células mononucleares de sangre periférica.....	28
-4.3. Cultivo y estimulación celular	29

-4.4. Tinción con anticuerpos marcados con fluorocromos y citometría de flujo...	29
-4.5. Análisis estadístico.....	30
5. Resultados.....	31
-5.1. Estrategia de análisis.....	31
-5.2. La expresión de CD38 en LT de memoria correlaciona con el avance de la enfermedad y está aumentada en las subpoblaciones de memoria de pacientes VIH +	33
-5.3. CD154 se expresa en menor proporción en LT CD38+ que en LT CD38-	35
-5.4. La disminución en la producción de citocinas después de un estímulo policlonal en pacientes VIH+ esta influenciada por los LT CD38+ de memoria....	36
-5.5 Los LT CD38+ producen más IFN- γ e IL-2 sin coexpresar CD154, especialmente los LT EM de pacientes VIH+.....	39
-5.6. Los LT CD38+ de memoria producen más IFN- γ y menos IL-2 que los LT CD38-.....	41
6. Discusión.....	43
7. Conclusiones.....	50
8. Bibliografía.....	51

I. Acrónimos y Abreviaturas

CD	“Cluster” de diferenciación
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
LT	Linfocito T
LT CM	Linfocito T de memoria central
LT EM	Linfocito T de memoria efectora
IFN- γ	Interferón gama
IL	Interleucina
SEB	Enterotoxina B de Staphylococcus aureus
CMV	Citomegalovirus
RNA	Ácido ribonucleico
DNA	Ácido desoxiribonucleico
ONUSIDA	Organización de las Naciones Unidad para el SIDA
sida	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
HLA	Antígeno leucocitario humano
μ L	microlitro
SIV	Virus de la inmunodeficiencia de simios
BrdU	Bromo desoxiuridina
NK	Células asesinas naturales (natural killer)
gp	glicoproteína
TLR	Receptores tipo toll
LPS	Lipopolisacárido
LB	Linfocitos B
TNF	Factor de necrosis tumoral
TRAIL	Tumor necrosis factor– related apoptosis-inducing ligand
TCR	Receptor de células T
Th	Linfocito T cooperador
cADPR	ribosa adenosin difosfato cíclico
ADPR	ribosa adenosin difosfato

NAADP	ácido nicotín-adenin dinucleótido fosfato
ZAP-70	Proteíncinasa 70 asociada a la cadena Z
bcl-2	Linfoma 2 de células B
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granunocitos y monocitos
NAD	Nicotin adenin dinucleótido
NADP	Nicotin adenin dinucleótido fosfato
APC	Célula presentadora de antígeno
AIDS	síndrome de inmunodeficiencia adquirida
mL	mililitro
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
µg	microgramo
rpm	revoluciones por minuto
min	minuto
° C	grados Celsius
APC ₁	Aloficocianina
PE	Ficoeritrina
PerCp	Proteína peridinin clorofila
FITC	Isotiocianato de fluoreceina
BFA	Brefeldina A
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad

II. Índice de figuras y tablas

Fig. 1. Prevalencia mundial de VIH estimada para el 2008 en todas las edades	11
Fig. 2. Representación esquemática del avance de la enfermedad por VIH	12
Fig. 3. Representación esquemática de la pleiotropía atribuida a CD38	19
Fig. 4. Estrategia de análisis de citometría	25
Fig. 5. Correlación entre el avance de la enfermedad por VIH y la expresión de CD38	27
Fig. 6. Expresión de CD38 en los linfocitos T de memoria	28
Fig. 7. Distribución de las poblaciones de LT CD4+	29
Fig. 8. Expresión de CD154 en los linfocitos T de memoria	30
Fig. 9. Expresión de IFN- γ total en los linfocitos T de memoria	31
Fig. 10. Expresión de IL-2 total en los linfocitos T de memoria	31
Fig. 11. Proporción de linfocitos T de memoria que no expresaron CD154	33
Fig. 12. Proporción de linfocitos T de memoria que no expresaron CD154	33
Fig. 13. Coproducción de IFN- γ e IL-2	34
Tabla 1. Características clínicas de los pacientes VIH+	24

III. Resumen

Existe una consistente y fuerte correlación entre la expresión de CD38, un marcador de activación crónica en VIH, con la evolución de la enfermedad por VIH y con deficiencias inmunes funcionales en los linfocitos T CD4+ (LT CD4+) no relacionadas a la infección directa por el virus. Sin embargo, hasta la fecha no hay estudios que aporten evidencias de una relación directa entre la expresión de CD38 y una disminución de la función inmune. En este estudio evaluamos si la expresión de CD38 en las subpoblaciones de LT CD4+ de memoria distingue a una población celular con funciones inmunes disminuidas en pacientes VIH+ y controles VIH-. Para probar esta hipótesis medimos la expresión de CD38 en los linfocitos T CD4+ de memoria central (LT CM) y de memoria efectora (LT EM) y evaluamos si existen diferencias en la expresión de CD154 y/o en la producción de IFN- γ e IL-2 después de la estimulación con SEB y con CMV entre las subpoblaciones de LT de memoria CD38+ y CD38-.

Al analizar la expresión de CD38 en cada una de las subpoblaciones de memoria observamos que hay una mayor proporción de LT CM que expresan CD38 comparado con los LT EM tanto en los controles sanos como los pacientes VIH+. Además hay una mayor frecuencia de LT CM y EM que expresan CD38 en los pacientes en comparación con las mismas poblaciones de los controles.

En cuanto a la expresión total de CD154 observamos que hay una menor proporción de LT de memoria CD38+ que expresan CD154 en comparación con los CD38-. Al analizar la producción de IFN- γ e IL-2 observamos que hay una menor proporción de LT de memoria CD38+, particularmente en LT EM de pacientes VIH+, productores de citocinas en comparación con aquellos CD38-. Analizamos también la producción de IFN- γ e IL-2 sin coexpresión de CD154 y encontramos que hay una mayor proporción de LT de memoria CD38+ que producen citocinas sin coexpresar CD154 en comparación con los CD38-.

Finalmente, evaluamos la coexpresión de IFN- γ e IL-2 en pacientes VIH+ y si CD38 afecta dicha coexpresión. Observamos que en ambas subpoblaciones de LT de memoria hay una mayor proporción de células CD38+ que producen IFN- γ sin producir IL-2, después de la

estimulación con CMV y SEB, en comparación con las CD38-. En el caso de la producción de IL-2 sin coexpresión de IFN- γ , al estimular con CMV se observa que su producción es casi nula en todas las poblaciones, sin embargo, si estimulamos con SEB podemos apreciar que en ambas subpoblaciones de memoria hay una menor proporción de células CD38+ que producen IL-2 sin coexpresar IFN- γ , en comparación con las células CD38-.

La expresión de CD38 parece estar relacionada con funciones efectoras (producción de IFN- γ) y con funciones deficientes de supervivencia y proliferación (producción deficiente de IL-2). Esto tendría como consecuencia la pérdida gradual de los LT CD4+ de memoria y por tanto, la aparición de enfermedades oportunistas que caracteriza a la infección por VIH.

IV. Abstract

There is a strong and consistent correlation between CD38 expression on T cells, a chronic activation marker in HIV infection, with HIV disease progression and immune dysfunction in CD4⁺ T cells not related with direct virus infection. However, it remains to be demonstrated whether a cell that expresses CD38 is functionally impaired and if so, whether the multifunctional ectoenzyme CD38 actually renders the cell dysfunctional.

In this study, we investigated if the expression of CD38 on effector memory (EM) and central memory (CM) CD4⁺ T cells conferred any degree of functional impairment in healthy controls or in HIV-infected persons. In order to prove this hypothesis, we evaluated the expression of CD154 and the production of IL-2 and IFN- γ after T-cell receptor stimulation with SEB and CMV in CD38⁺ and CD38⁻ CD4⁺ memory T cells subpopulations.

We found that there is a greater proportion of CM CD4⁺ T cells expressing CD38 compared with EM CD4⁺ T cells in both healthy controls and HIV⁺ patients. Furthermore, there is an increased proportion of CD38 expressing cells in both memory subpopulations (CM and EM CD4⁺ T cells) of HIV⁺ patients compared with healthy controls.

The results show that there is a smaller proportion of CD154⁺ cells in the memory CD38⁺ CD4⁺ T cells than in CD38⁻. As for the production of IFN- γ and IL-2, we observed that CD38⁺ memory T cells, particularly EM cells from HIV⁺ patients, produce fewer cytokines than those that are CD38⁻ after stimulation with SEB. We also analyzed the production of IFN- γ and IL-2 without co-expression of CD154 after stimulation with SEB, and we found that the memory CD38⁺ CD4⁺ T cells produce a higher proportion of cytokines without co-expression of CD154.

Finally, we evaluated the co-production of IFN- γ and IL-2 in HIV⁺ patients and whether the expression of CD38 affects this co-production. The results showed that, in both memory T cells subpopulations, there is a higher proportion of IFN- γ ⁺ IL-2⁻ in CD38⁺ cells compared with those CD38⁻ T cells after stimulation with CMV. This phenomenon was also

observed after SEB stimulation. After CMV stimulation, we observed that the IL-2 production without IFN- γ was almost nonexistent in all populations. However, after SEB stimulation we observed that, in both memory T cell subpopulations, CD38⁺ cells produce a smaller proportion of IL-2 without expressing IFN- γ compared with CD38⁻ cells.

The expression of CD38 is apparently related with effector functions (IFN- γ production) and with deficient survival and proliferation (IL-2 deficient production). This would explain the gradual loss of CM CD4⁺ T cells, the subsequent impossibility to keep the threshold of EM CD4⁺ T cells in effector sites and, therefore, allowing the onset of opportunistic infections in the HIV context.

1. Introducción

1.1. Infección por VIH

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es un retrovirus que se clasifica dentro del género *Lentiviridae* y al igual que todos los miembros de la familia *Retroviridae*, presenta un genoma diploide de RNA y una enzima DNA polimerasa dependiente de RNA y DNA llamada transcriptasa inversa. El blanco principal de la infección del VIH son las células que expresan en la superficie la molécula CD4, presente principalmente en los linfocitos T y sus precursores, pero también en monocitos, macrófagos, células dendríticas y células de la microglía en el sistema nervioso central (1).

El mecanismo principal de entrada a la célula comienza con el reconocimiento del receptor de membrana CD4 por medio de la glicoproteína gp120, esto promueve un cambio conformacional que expone a gp41, este a su vez se une al correceptor CCR5 (ambos receptores están presentes principalmente en los linfocitos T CD4+ con actividad efectora) lo que provoca la fusión de la membrana viral y celular (2). Una vez fusionadas la cápside es liberada al citoplasma celular, el complejo de retrotranscripción promueve la síntesis del ADN viral y una vez completa la síntesis del ADN viral por medio de la RT, se forma el complejo de preintegración que viaja al núcleo para integrarse al DNA (1).

El VIH comienza a detectarse en el plasma de los pacientes de 4 a 11 días posteriores al establecimiento de la infección (3). A partir de entonces, la replicación persistente del VIH provoca un deterioro progresivo del sistema inmune caracterizado por una reducción gradual del número de linfocitos T (LT) CD4+ totales, que posteriormente culmina en una inmunodeficiencia grave donde aparecen las manifestaciones clínicas del sida: múltiples infecciones oportunistas y tumores malignos (4). A finales del 2008, ONUSIDA estimó que, a nivel mundial, existen 33.4 millones de personas que viven con VIH (5) (Fig.1). En el caso de México existen oficialmente cerca de 220 000 personas adultas infectadas (6). La infección por este virus es considerada como una pandemia y por ende un problema de salud pública mundial. Debido a este hecho, el estudio de la inmunopatogénesis de la

enfermedad por VIH proporcionará información que ayude a la creación de nuevas herramientas de pronóstico, tratamiento y prevención para la enfermedad.

Número estimado de adultos y niños que vivían con el VIH en 2008

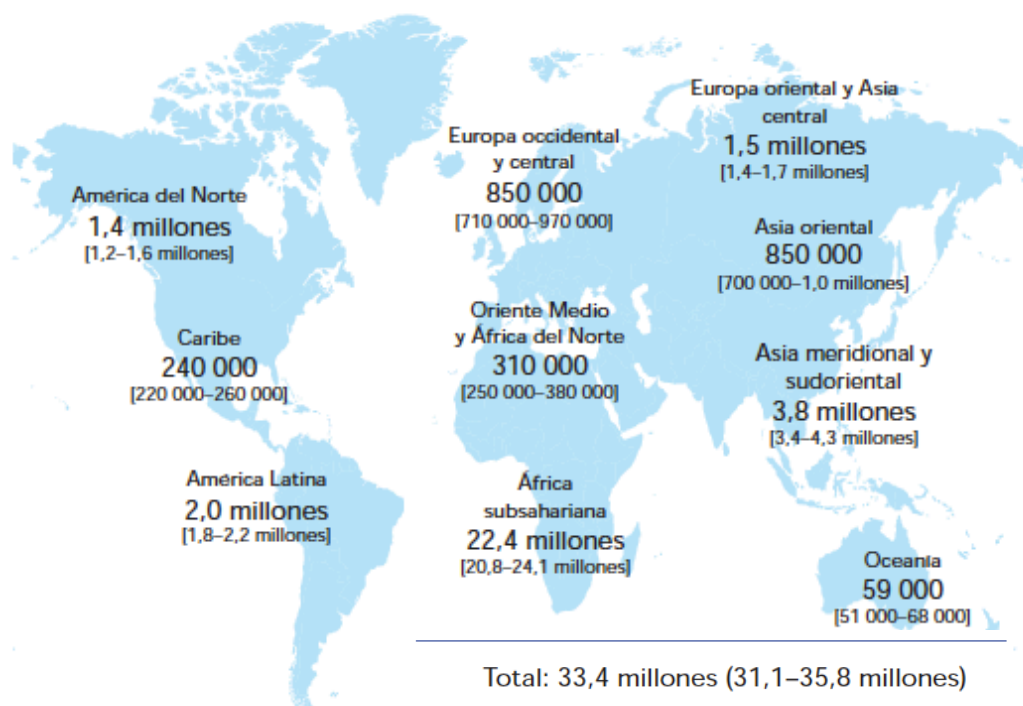


Fig. 1. Prevalencia mundial de VIH estimada para el 2008 en todas las edades. Figura tomada del Boletín ONUSIDA. Situación de la epidemia de sida, 2009.

1.2. Inmunopatogénesis de la infección por VIH

La progresión típica de la infección por VIH se divide en tres etapas (fig.2): aguda, crónica y sida. Uno de los primeros fenómenos que se han descrito durante la etapa aguda es la pérdida de casi el 50% de los linfocitos T CD4+ en memoria efectora CCR5+ (7). Esta disminución coincide temporalmente con un pico en la replicación viral y está acompañada por un aumento generalizado en la expresión de marcadores de **activación inmune** como **CD38** y **HLA-DR** en las células T, un aumento de **citocinas proinflamatorias** en el plasma como TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-2 entre otras y aumento en el **recambio** de linfocitos T, B y NK (8, 9). El daño a la superficie de la mucosa gastrointestinal es resultado de la infección

aguda y ocurre como uno de los primeros fenómenos de depleción de los linfocitos T CD4+ ya que es este sitio el que contiene mayor cantidad de los linfocitos CCR5+ que son más propensos a la infección por VIH (10-12).

La aparición de la respuesta inmune antiviral mediada por los linfocitos T CD8+ del huésped marca la entrada a la fase crónica de la infección. Esta respuesta del huésped para controlar la infección coincide con la caída de la carga viral en el plasma (13, 14). Los niveles de activación inmune continúan aumentando (fig. 2); sin embargo, en la etapa crónica de la infección ocurre a una menor tasa (9, 15).

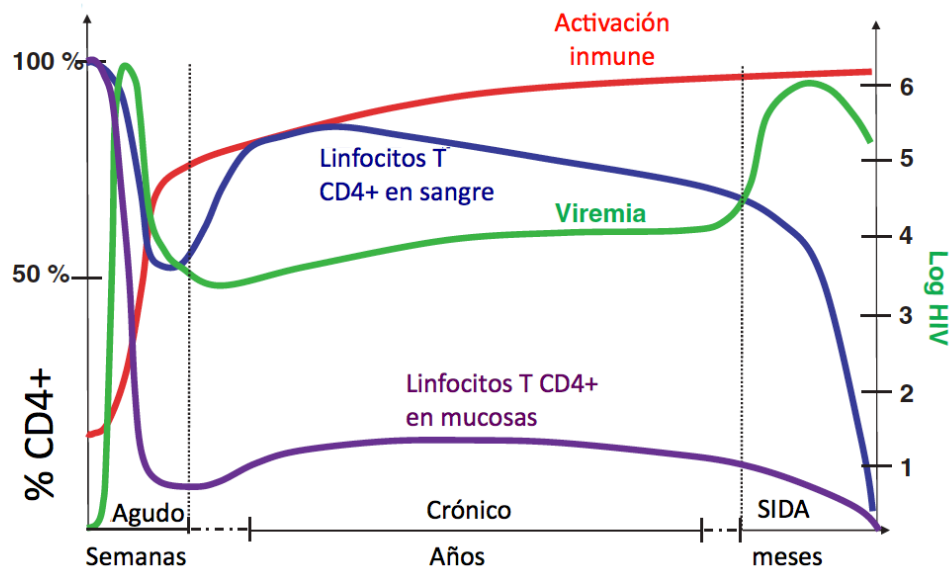


Fig. 2. Representación esquemática del avance de la enfermedad por VIH. Durante las primeras semanas después de la infección hay un pico de carga viral que coincide con la disminución de LT CD4+ en circulación periférica y con una disminución drástica de los LT CD4+ en mucosas. Una vez que se establece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

La pérdida de linfocitos T CD4⁺ que se produce en la fase aguda se recupera sólo parcialmente; sin embargo, la disminución de esta población continúa lenta pero progresivamente durante la fase crónica que puede durar de 2 a 8 años sin tratamiento.

Por último, la etapa de sida se presenta cuando el número de LT CD4⁺ llega alrededor de 250 células/ μ L, y está definida por la aparición de infecciones oportunistas en los individuos infectados. La respuesta inmune suscitada por dichas infecciones oportunistas provee de un ambiente propicio para la transmisión célula-célula del HIV ya que se incrementa la secreción de citocinas proinflamatorias, que a su vez inducen la transcripción de los genes virales integrados al DNA del hospedero y por ende la replicación viral a tasas más elevadas (16-18). Durante esta etapa los linfocitos T CD4⁺ prácticamente desaparecen de la circulación.

Algunos de los modelos que han tratado de explicar porqué esta linfopenia no puede revertirse a lo largo de la infección son: a) la muerte de estas células inducida por el virus, b) la destrucción por el sistema inmune de las células infectadas y c) la apoptosis y la incapacidad de producir nuevos linfocitos (9, 19).

1.3. Linfocitos T de memoria y VIH

De acuerdo con su grado de diferenciación periférica, los LT CD4⁺ han sido clasificados en LT naive (vírgenes), los cuales no han sido previamente expuestos a su antígeno específico; LT efectores de vida corta, los cuáles se producen cuando un LT se activa y prolifera dando lugar a células con la capacidad de sintetizar citocinas tales como IL-2, IFN- γ , IL-4 y/o IL-6 que ejercen su actividad efectora en sitios periféricos; y LT de memoria. Estos linfocitos se pueden dividir en dos tipos: 1) LT de memoria central (LT CM), células de vida larga que recirculan preferencialmente por órganos linfoides secundarios y con una gran capacidad de generar una respuesta inmune secundaria por proliferación y diferenciación a LT efectores; se caracterizan por expresar en su membrana CD45RO y CCR7 entre otras. 2) LT de memoria efectora (LT EM) que se encuentran principalmente en tejidos periféricos (p. ej. mucosas) pierden la expresión de CCR7 y de moléculas coestimuladoras como CD28, tienen gran capacidad de generar una respuesta inmune

secundaria ejerciendo directa e inmediatamente su actividad efectora y son en gran medida responsables del control de las infecciones (20-22). Esta última población es la que experimenta una dramática disminución cuantitativa durante la fase aguda (Fig. 2) de la infección por VIH ya que al estar en sitios efectores son más propensos a activación además de expresar CCR5 (23).

Con el modelo de infección de VIH en simios, que utiliza al virus de inmunodeficiencia de simios (SIV) y que infecta a los macacos rhesus (*Macaca mulatta*), se ha demostrado que la proliferación y diferenciación de LT CM CD4⁺ provee de LT EM a las mucosas (24) y que la población residual de los LT EM, mantenida por los LT CM, es suficiente para evitar la aparición de enfermedades oportunistas durante la fase crónica de la infección hasta que este equilibrio se pierde (25).

La pérdida de los LT CD4⁺ en individuos infectados no se explica por la infección viral directa ni por la actividad lítica de los LT CD⁺8, debido a que la proporción de los linfocitos infectados alcanza apenas aproximadamente un 0.1% del total de LT CD4⁺ (23, 26). Además, las características funcionales de células tanto infectadas como las que presentan activación no mediada por TCR, son temas importantes en el entendimiento de cómo el VIH deteriora las funciones inmunes gradual y progresivamente; sobre todo en las subpoblaciones de memoria, ya que son éstas las que presentan un aumento significativo y sostenido en la expresión de marcadores de activación como HLA-DR y CD38 (8, 27).

1.4. Activación inmune y VIH

El mecanismo por el cual el VIH induce disfunción inmune ha sido ampliamente estudiado desde el descubrimiento del virus. Como se mencionó, los análisis virológicos iniciales demuestran que existen bajos niveles de replicación viral en los individuos infectados, sugiriendo que la actividad citolítica del virus por si sola es incapaz de inducir sida (26, 28), por lo que se pensó que factores adicionales, como la activación inmune crónica, deben estar jugando un papel importante en las disfunciones inmunológicas asociadas a la infección por VIH (8).

Desde hace tiempo, la activación inmune crónica se ha considerado un mediador central en la patogénesis del VIH, esta hipótesis deriva del hecho que existen muchos hallazgos en los que se vincula, de forma correlativa, con el avance de la enfermedad (29-31). Con respecto a los LT de pacientes VIH+ la activación inmune crónica se refiere a una frecuencia más alta de expresión de marcadores de activación (CD38 y HLA-DR) en comparación con los LT de controles VIH- (8, 27) así como una mayor frecuencia de proliferación (Ki67 e incorporación de BrdU) (17, 32-34), además de altos niveles de apoptosis en células no infectadas (14, 33). La proliferación aumentada en LT de pacientes infectados con VIH, no está restringida a estas células, también se ha observado en linfocitos B, células asesinas naturales (NK) (29, 35).

En la infección patogénica por SIV los macacos rhesus, que no son hospederos naturales pero que pueden infectarse con SIV, experimentan un rápido aumento en la activación de los LT CD4 y CD8, seguido de una depleción rápida de los LT CD4+, progresión a sida y muerte. Por el contrario, el mangabey ahumado (*Cercocebus atys*) o los monos verdes africanos (*Cercopithecus aethiops*), que son hospederos naturales del SIV, muestran un incremento mínimo en la activación de los LT a pesar de los altos niveles en la replicación viral. En la mayoría de los casos no presentan pérdida drástica de LT CD4+ con el tiempo y pocas veces progresan a sida, a pesar de que si hay replicación viral (36-38). El que la activación inmune crónica diferencie a la infección patogénica de la no patogénica en la infección por el virus de inmunodeficiencia en simios (SIV) es una fuerte evidencia de que la activación inmune crónica es causa, al menos en parte, de la inmunosupresión y el avance a sida.

Otro indicio que soporta la hipótesis de que la activación inmune crónica tiene un papel fundamental en la patogénesis del VIH se encuentra en el hecho de que la expresión de CD38 en LT CD8+, predice el avance de la enfermedad mejor que la cuenta de CD4 y que la carga viral plasmática (39, 40). Se ha establecido que el nivel de expresión de CD38 en los LT CD8+ alcanza un máximo poco después de la infección aguda y una alta expresión de CD38 en este punto predice una pérdida más rápida de LT CD4+ independientemente de la carga viral plasmática (15). Adicionalmente, altos niveles de activación en los LT entre

individuos seronegativos en alto riesgo de infectarse, puede estar asociado con una progresión más rápida de la enfermedad post-infección (41). Se ha observado también en pacientes que mantienen cargas virales indetectables sin tratamiento antiretroviral (controladores elite), que también cursan con altos niveles de CD38 en sus LT lo cual contribuye a la pérdida progresiva de LT CD4+ y posterior inmunosupresión incluso sin viremia medible (42).

Las causas de esta activación inmune crónica aún son inciertas pero se considera que es un fenómeno multifactorial. El primero es el efecto directo del VIH sobre los LT. El VIH puede directamente influenciar la activación inmune a través de la unión de la proteína de la envoltura gp120/160 a CD4 y/o CCR5 lo que desencadena activación no mediada por TCR (43)(44). Un segundo factor capaz de inducir activación inmune sistémica es la respuesta inmune generada por el hospedero hacia el VIH. Esta activación es iniciada por la respuesta inmune innata a través de la estimulación de los receptores tipo Toll (TLRs) 7, 8 y 9 (45-47) y posteriormente por la activación de la respuesta inmune adaptativa, tanto humoral como celular, específica contra el VIH. El papel de la respuesta adaptativa, en particular la respuesta citotóxica de LT CD8+ es complejo, por una parte su activación es benéfica ya que suprime la replicación viral, sin embargo, se vuelve dañina debido a que la presión del sistema inmune induce la selección de variantes de escape y como consecuencia se mantiene el estado de activación de manera crónica. Por último, recordemos que la infección por VIH causa una drástica pérdida de los LT EM residentes de mucosas en las primeras semanas (7) que cuya población no se recupera y que está asociada con la translocación de productos bacterianos desde el lumen del intestino hacia la circulación sistémica, donde son capaces de activar de forma crónica al sistema inmune por la unión a algunos TLR como TLR-2, TLR-4, TLR-5 y TLR-6 (10, 12, 48). Uno de los productos de translocación bacteriana que se ha encontrado aumentado en pacientes VIH+ es el LPS pero es importante mencionar que otros patógenos, principalmente en etapas tardías de la infección pueden estar asociados a la activación inmune (49). Toda esta actividad produce activaciones no mediadas por TCR o BCR en LT y linfocitos B respectivamente (LB) causada por la producción sostenida de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1, entre

otras. Es posible que este ambiente de activación crónico induzca la expresión de moléculas asociadas con la apoptosis (CD95, TRAIL) en la superficie de los LT haciéndolos más susceptibles a la muerte celular inducida por activación (33, 36, 45, 50-53).

1.5. Disfunciones inmunes observadas en VIH

Se ha observado que los linfocitos T en pacientes VIH+ tienen una respuesta proliferativa disminuida después de una activación policlonal, incluso entre aquellos con una cuenta de LT CD4+ conservada (54, 55); además de que producen menos IFN- γ e IL-2 (56, 57). Se ha observado también que hay una mayor proporción de LT CD4+ de sangre periférica activados en paciente VIH+ que en controles sanos, estas células son identificadas como células en ciclo (Ki67+), son principalmente LT CM y muestran una activación no mediada por TCR (33). La infección por VIH en ganglios linfáticos también provoca activación de los LT CM, junto con una mayor propensión a apoptosis y un incremento en la producción de citocinas (51). La apoptosis que se observa en ganglios ocurre tanto en LT infectados como en LT activados no infectados, lo que permite proponer que las células activadas crónicamente pueden presentar alteraciones funcionales. En apoyo a esta idea, recientemente se ha mostrado que en respuesta a infecciones crónicas (como CMV) los LT CM expresan marcadores de diferenciación terminal como KLRG1 (killer cell lectin-like receptor G1), un receptor asociado a una pobre respuesta proliferativa y a una producción incrementada de IFN- γ , al mismo tiempo que mantienen algunos marcadores relacionados directamente con proliferación homeostática como IL-7R. Regularmente IL-7R se pierde cuando los LT se diferencian a células efectoras (58). Es probable que estas características modifiquen la funcionalidad habitual de los LT CM.

Complementariamente, los LT CM generados a partir de un estímulo antigénico fuerte (como se puede esperar en infección crónica por VIH) se comprometen de forma prematura a una respuesta de tipo Th1 (LT CM pre-Th1) (59, 60), con una baja capacidad de proliferación y una mayor producción de IFN- γ (61).

1.6. CD38: una ectoenzima, una molécula de adhesión y una molécula de señalización (62-64)

CD38 es una glicoproteína de superficie expresada por células hematopoiéticas inmaduras y LT naive, su expresión disminuye en células maduras y LT de memoria y es reexpresada a altos niveles por linfocitos T, linfocitos B, células dendríticas y células NKs activadas. CD38 está compuesto por 300 residuos de aminoácidos, que comprenden una pequeña región citoplasmática seguida por una larga porción extracelular (63).

Propiedades enzimáticas

El dominio extracelular de CD38 contiene un sitio activo que puede sintetizar ribosa adenosin difosfato cíclico (cADPR) y ADPR. Además puede sintetizar ácido nicotín-adenin dinucleótido fosfato (NAADP). cADPR es un segundo mensajero que controla niveles de Ca^{2+} intracelular. ADPR y NAADP, catalizados por CD38, también cooperan en la regulación de Ca^{2+} intracelular. Se ha visto que esto promueve activación, proliferación, diferenciación y migración en los linfocitos (Fig.3) (62).

CD38 y migración celular

Debido a que la migración celular depende de una red cooperadora de receptores de adhesión expresados por los linfocitos y las células endoteliales, se sugiere que CD38 es parte de esta red. Se ha observado que el tratamiento con un anticuerpo monoclonal anti-CD38 inhibe la adhesión de las células CD38⁺ a las células endoteliales(63). Actualmente se sabe que esta interacción está mediada por la unión de CD38 a CD31 sobre las células endoteliales. La interacción entre estas moléculas aumenta la expresión de integrinas en los linfocitos y promueve los pasos posteriores de la adhesión (65). Existe evidencia de que los productos enzimáticos generados por CD38 también están involucrados en el proceso de adhesión (64).

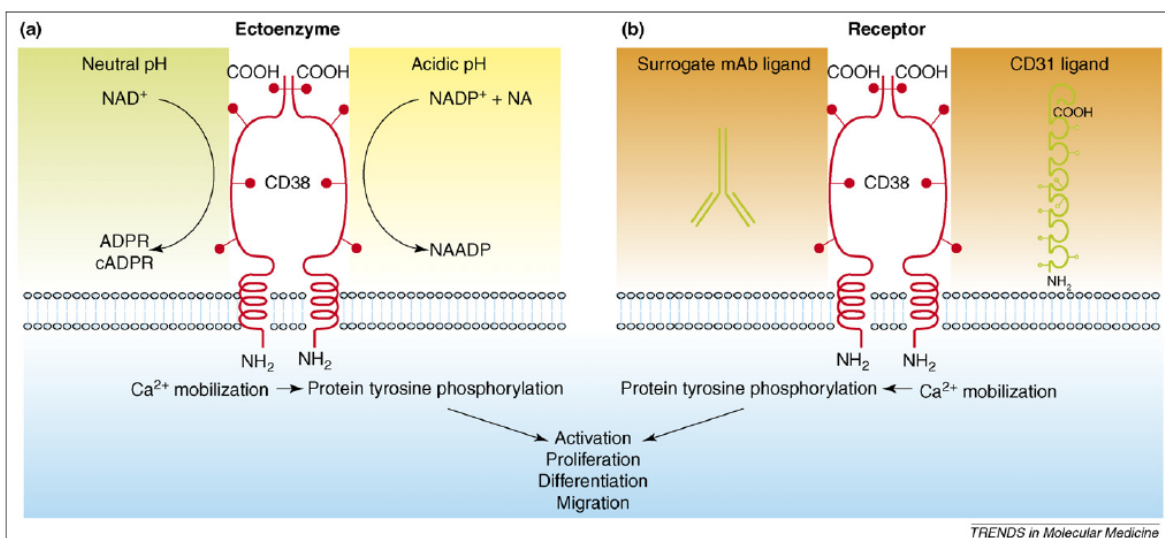


Fig. 3. Representación esquemática de la pleiotropía atribuida a CD38. Esta molécula funciona como ectoenzima (a) transformando NAD⁺ y NADP⁺ a cADPR, ADPR y NAADP. El balance de las reacciones es influenciado por el pH extracelular. los productos enzimáticos son movilizados de Ca²⁺ dentro de la célula. CD38 actúa también como receptor (b) interactúa con CD31 resultando en eventos intracelulares que incluyen movilización de Ca²⁺, activación, proliferación, diferenciación y migración. Figura tomada de Deaglio *et al*, *Trens Mol Med*, 2008

Propiedades señaladoras de CD38

El uso de anticuerpos monoclonales agonistas demostraron que CD38 está involucrado con señales que influyen el ciclo de vida de la célula. La unión de dichos anticuerpos agonistas a CD38 produce una señalización en la que se involucra la acción de ZAP-70, lo que sugiere que CD38 puede estar asociado con receptores a antígeno y sus correceptores en LT y LB. La señalización por CD38 inhibe la maduración de LB inmaduros en la médula ósea; en los LB maduros de los centros germinales CD38 promueve señales de rescate que protege a las células de apoptosis mediante el aumento de la expresión de bcl-2 (una molécula asociada con efectos antiapoptóticos) de manera similar a como lo hace CD40. En LT purificados, la señalización por CD38 induce la producción de IL-6, GM-CSF, IFN- γ , IL-10 y bajos niveles de IL-4. Sin embargo, se desconocen cuales serían las condiciones que regularían estos fenómenos (62, 64).

En el contexto de la infección por VIH existe una sobreexpresión de CD38 así como una mayor proporción de LT CD8⁺ y LT CD4⁺ (principalmente de memoria) que expresan

CD38 (de 50 a 90% de las células T de memoria en pacientes VIH+ comparado con un 15 a 40% en controles VIH-) junto con otros marcadores de activación. La sobreexpresión de CD38 puede ser detectada en células no infectadas, lo que indica que esta expresión no es causada por la infección directa (63, 64).

A pesar de que la relación entre los índices de activación inmune y las deficiencias funcionales han sido demostradas, permanece incierto si estos índices son simplemente correlativos o si una célula activada (especialmente aquellas que expresan CD38) está funcionalmente alterada y si CD38 es la causante de la disfunción. Uno de los estudios que investigó la relación directa entre la expresión de CD38 y la funcionalidad de las subpoblaciones de memoria de LT CD4+ encontró que después de una activación policlonal mediada por TCR existe una producción aumentada de IFN- γ e IL-2 en ausencia de la expresión de CD154 (66), lo que podría implicar interacciones deficientes entre LT CD4+ y células presentadoras de antígeno (APC); sin embargo, en dicho estudio no se midió la respuesta específica de antígeno lo que ayudaría a aclarar si este fenómeno ocurre también en este contexto, por lo que nosotros decidimos buscar diferencias funcionales en las diferentes subpoblaciones de los LT de memoria CD4+ que expresan o no CD38 de pacientes VIH+ y controles VIH- después de un estímulo policlonal mediado por TCR así como por un estímulo específico mediado por CMV.

2. Hipótesis

Debido a que existe una relación correlativa consistente entre la expresión de CD38 y la evolución de la enfermedad por VIH, las subpoblaciones de LT CD4+ de memoria que expresan CD38 tendrán alteraciones en su producción de citocinas en comparación con aquellas poblaciones que no expresan CD38 en respuesta a una activación a través de TCR.

3. Objetivos

- Determinar la proporción de linfocitos T CD4+ de memoria central (LT CM) y de memoria efectora (LT EM), así como la expresión de CD38, en células mononucleares de pacientes VIH+ y controles VIH-.
- Evaluar la producción de CD154, IFN- γ e IL-2 en las subpoblación de LT CD4+ CM y EM después de un estímulo policlonal y un estímulo antígeno específico en pacientes VIH+ y controles VIH-.
- Evaluar y comparar el efecto de la expresión de CD38 sobre la producción de citocinas en las subpoblaciones de memoria en pacientes VIH+ y controles VIH-.

4. Metodología

Este Trabajo experimental se realizó en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias en colaboración con el “Center for AIDS Research” de la “Case Western Reserve University” en Cleveland Ohio, USA, bajo la co-tutoría del MD. Michael M. Lederman.

4.1. Pacientes y muestras

Este proyecto se realizó en consistencia con las políticas de la Junta de Revisión Institucional del Hospital Universitario de la “Case Western Reserve University”, Cleveland Ohio, USA. Se reclutaron pacientes con VIH en etapa crónica de la infección sin tratamiento antirretroviral. Se obtuvieron muestras de sangre heparinizada de pacientes y controles. Ningún paciente presentaba alguna infección oportunista activa o malignidad y ninguno estaba recibiendo algún fármaco inmunomodulador.

Se reclutaron 8 donadores VIH-, CMV+ y 19 pacientes VIH+ en etapa crónica con una mediana de linfocitos T CD4+ de 420 células/ μ L (intervalo intercuartil de 303-603) (Tabla 1) y una mediana de carga viral de VIH de 17293 (intervalo intercuartil de 8,115-113,001). Dos de los pacientes al momento de la toma tenían una carga viral menor a 50 copias/mL sin recibir tratamiento antiretroviral, por lo que se les clasificó como controladores elite y sus resultados no fueron considerados en los análisis estadísticos finales.

4.2. Preparación de las células mononucleares de sangre periférica

A partir de 30 a 40 mL de sangre periférica se purificaron células mononucleares (PBMC por sus siglas en inglés) por gradiente de densidad (Ficoll-Paque, GE Healthcare Biosciences AB, Piscataway, NJ, USA). Después de recuperar las PBMC se lavaron dos veces con medio RPMI 1640 (Lonza, Walkersville, MD, USA) y se cuantificaron microscópicamente con colorante vital azul tripano al 0.2% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Posteriormente se resuspendieron en medio RPMI 1640 completo que contenía 100 U/mL de Penicilina, 0.1 mg/ mL Estreptomina (Penicillin/Streptomycin Lonza), 2 mM L-

glutamina (Lonza), 5 mM de amortiguador HEPES (Lonza) y 10% suero fetal bovino inactivado (HyClone, Logan, UT, USA).

4.3. Cultivo y estimulación celular

Se colocaron 2×10^6 células por pozo en placas de 24 pozos en 1 mL de medio completo. Se incubaron las células en diferentes condiciones: a) únicamente en medio completo como control de células sin estimular, b) en medio completo adicionado con $5 \mu\text{g/mL}$ de enterotoxina B de *Staphylococcus aureus* (Sigma-Aldrich) (SEB por sus siglas en inglés) como superantígeno activador policlonal de TCR (receptor de células T) (67) y c) en medio completo adicionado con lisado de citomegalovirus (CMV) a una dilución de 1:20 (68) (Bio Whittaker, Walkersville, MD, USA). Para las muestras a las que se analizó la producción simultánea de IFN- γ e IL-2 las células se cultivaron en medio completo adicionado con lisado de CMV en una dilución de 1/20 y con $5 \mu\text{g/mL}$ de SEB, ambas condiciones en presencia del anticuerpo agonista anti-CD28 (azide free, low endotoxin, BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Adicionalmente se probó el control negativo del lisado de CMV (Bio Whittaker, Walkersville, MD, USA) en algunas muestras y en ningún caso de encontró respuesta positiva inespecífica.

Las células se incubaron a 37°C con 5% de CO_2 y 80% de humedad. Después de 2 horas se adicionó $10 \mu\text{g/mL}$ de brefeldina A (Sigma-Aldrich) y se incubaron 12 horas adicionales. La expresión de los marcadores CD38, CD45RA y CCR7 no cambian bajo estas condiciones de activación (66) lo que nos permite seguir a las subpoblaciones de memoria de los linfocitos T CD4⁺ medidas *ex vivo* y determinar la producción de citocinas después de su estimulación *in vitro*.

4.4. Tinción con anticuerpos marcados con fluorocromos y citometría de flujo

Después del cultivo con o sin estimulación, las células se transfirieron a tubos de ensayo para citometría (BD Biosciences) y se lavaron mediante la adición de 2mL de amortiguador de tinción (buffer de fosfatos salino, 1% de albúmina sérica bovina y 0.01% de azida de sodio), se centrifugó a 2500 rpm durante tres minutos, se descartó el sobrenadante y se

resuspendió en el volumen residual. Posteriormente se realizaron las tinciones de los marcadores extracelulares usando anticuerpos monoclonales conjugados a fluorocromos con las siguientes especificidades: CD4-Pacific blue, CD45RA-APC₁ ó PE-Cy5, CCR7-PE-Cy7, CD38-PerCP-Cy5.5 (BD Biosciences). Se incubaron 20 min a 4° C y se lavaron con buffer de tinción. Las células se fijaron y permeabilizaron durante 20 min a 4° C con la solución Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) basada en la acción detergente de la saponina y en la actividad fijadora del paraformaldehído. La solución se eliminó mediante un lavado con solución Perm/Wash (BD Biosciences) que contiene saponina a bajas concentraciones para mantener a la célula permeabilizada. Se adicionaron los anticuerpos monoclonales conjugados a fluorocromos contra CD154-PE, IFN- γ -APC₁ ó FITC e IL-2-FITC, se incubaron 30 min a 4° C y se lavaron dos veces con solución Perm/Wash. Finalmente las células se fijaron con 300 μ L de paraformaldehído al 1%.

Las células se analizaron con un citómetro de flujo LSR-II (Becton Dickinson, San José, Ca, USA) y los resultados obtenidos fueron analizados con el software FlowJo 8.7.

Para establecer los límites de las poblaciones en las gráficas de citometría (proceso denominado *gating*, término proveniente del inglés) de los linfocitos T CD4⁺ de memoria central, de memoria efectora y las poblaciones activadas se utilizaron controles de isotipo (BD Biosciences). Los límites para las tinciones intracelulares de IL-2, IFN- γ y CD154 se establecieron mediante los controles de células sin estimular.

4.5. Análisis estadístico

El presente es un estudio experimental, transversal con análisis comparativo de muestras de casos (pacientes con VIH) y controles (sujetos sin infección por VIH). Cada variable relevante (% de células positivas o negativas) se comparó entre pacientes y controles usando la prueba de U de Mann-Whitney. El efecto de la expresión del marcador de activación CD38 se comparó para cada variable relevante usando la prueba de *Wilcoxon signed-rank*. Se realizaron correlaciones y se evaluaron por regresión lineal.

5. Resultados

5.1. Estrategia de análisis

Se eligieron las células no agregadas, con morfología de linfocitos y CD4+ (high). Se determinaron las subpoblaciones de memoria usando CD45RA y CCR7, los LT CM se definieron como CD45RA- CCR7+ y los LT EM se definieron como CD45RA- CCR7- (20). Las subpoblaciones de memoria se clasificaron como CD38- o CD38+ de acuerdo a la ausencia o presencia de la molécula CD38, finalmente se analizó la expresión intracelular de CD154 e IFN- γ o IL-2 o ambas para cada una de las condiciones de activación (Fig. 4).

Tabla 1
Características clínicas de los pacientes VIH+

Paciente	CD4 T células/ μ L	HIV RNA copias/mL
1	1107	383
2	126	233810
3	541	48
4	254	129971
5	902	2042
6	381	7563
7	446	2045
8	1166	48
9	192	80000
10	400	13745
11	420	39837
12	273	222941
13	568	451
14	9	31000
15	435	17293
16	542	14000
17	1090	154
18	108	99250
19	528	135000

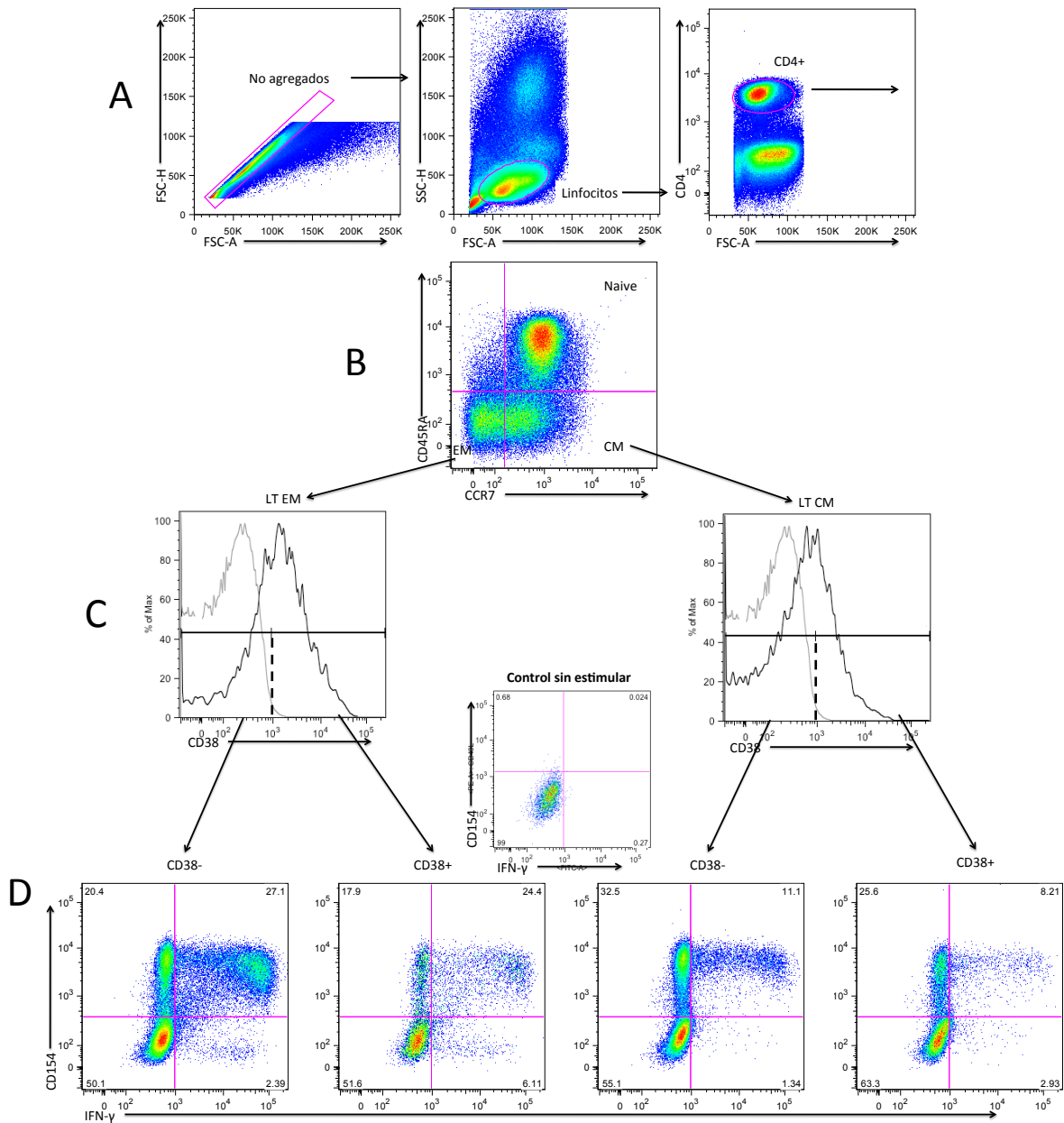


Fig. 4. Estrategia de análisis. Los linfocitos no agregados CD4⁺ (A) se clasificaron en subpoblaciones de memoria de acuerdo a la expresión de CD45RA y CCR7 (B). Cada subpoblación de memoria se dividió en CD38⁻ y CD38⁺ (C). Los límites para cada población se determinaron usando el control de isotipo (líneas gris claro). Se analizó la expresión intracelular de IFN- γ , IL-2 o ambas y CD154 en las células CD38⁻ y CD38⁺ de cada subpoblación de memoria (D) de acuerdo a los límites establecidos con las células control sin estimular. CM: memoria central; EM: memoria efectora; LT: linfocitos T.

5.2. La expresión de CD38 en LT de memoria correlaciona con el avance de la enfermedad y está aumentada en las subpoblaciones de memoria de pacientes VIH+

Debido a que la frecuencia de expresión de CD38 en LT CD8+, LT CD4+ totales y de memoria es un importante indicador correlativo del avance de la enfermedad por VIH, se evaluó la relación entre la frecuencia de expresión de CD38 en las subpoblaciones de memoria y el avance de la enfermedad medido como conteo de LT CD4+ y como carga viral plasmática. Se encontró una relación inversa entre el conteo de LT CD4+ y el porcentaje de células que expresan CD38 tanto en LT CM como en LT EM ($p=0.004$, $r=0.634$ y $p<0.001$, $r=0.7141$, respectivamente) (Fig. 5 A y C). Se encontró una relación directa entre la carga viral plasmática y el porcentaje de expresión de CD38 en los LT CM y LT EM ($p<0.001$, $r=0.6213$ y $p=0.001$, $r=0.6986$ respectivamente) (Fig. 5 B y D). Estos resultados nos indican que, en ambas subpoblaciones de memoria, la proporción de células CD38+ aumenta con la carga viral y aumenta cuando disminuye el conteo de LT CD4+, es decir, el marcador de activación crónica CD38 aumenta tanto en los LT CM como en los LT EM cuando la enfermedad por VIH avanza. En los controladores elite también se puede observar que la expresión de CD38 sigue la correlación encontrada en el resto de los pacientes (Fig. 5 A y C puntos rojos), lo que nos indica que a pesar de que mantienen cargas virales menores a 50 copias/ μ L sin tratamiento antiretroviral se mantiene un estado de activación crónica y éste correlaciones con la cuenta de LT CD4+.

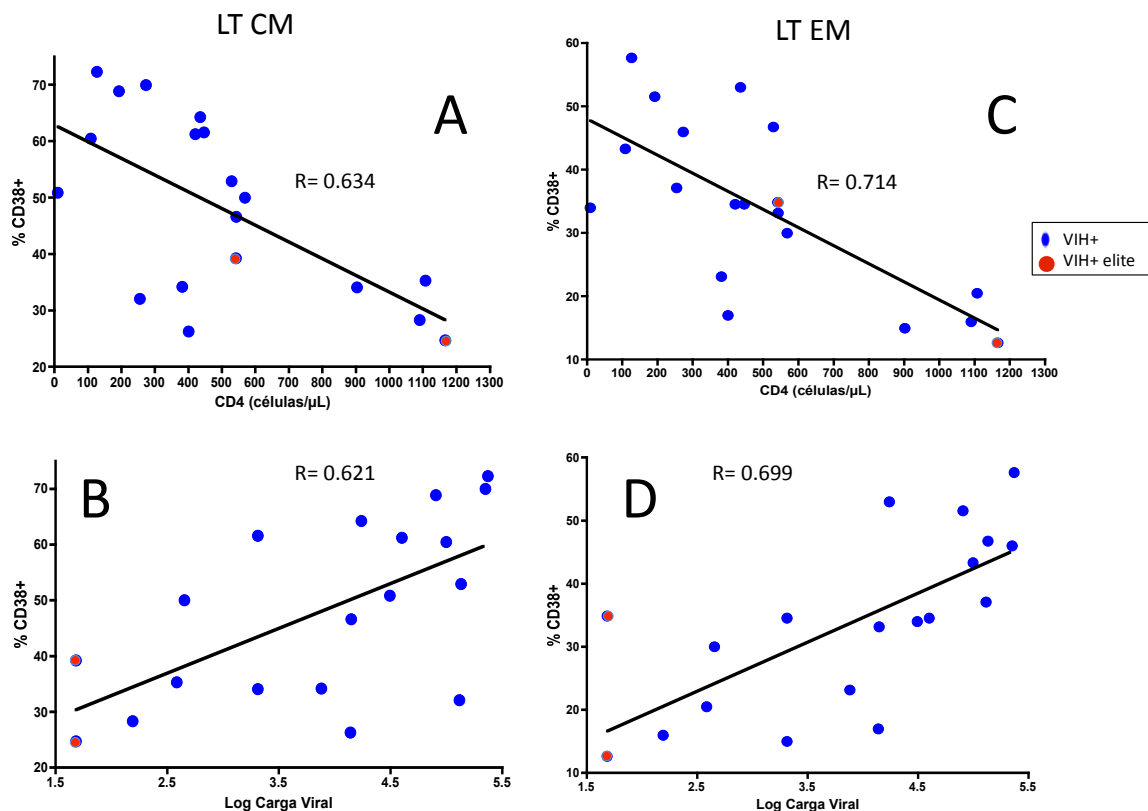


Fig. 5. Correlación entre el avance de la enfermedad por VIH y la expresión de CD38 en LT CM (A y B) y en EM (C y D). En todos los casos encontramos una correlación con una $p < 0.05$ tanto para los LT CM como para los LT EM, negativa con el número de CD4 (A y C) y negativa con el log de la carga viral (B y D). Se observa que la expresión de CD38 en los controladores elite (puntos rojos en A y C) mantiene la correlación con el conteo de LT CD4+.

Al medir el porcentaje de expresión de CD38 en las subpoblaciones de memoria se observó que hay una mayor proporción de LT CM CD38+ comparado con los LT EM tanto en pacientes como en controles ($p < 0.001$ y $p = 0.005$, respectivamente) (Fig. 6). Sin embargo, los LT CM de pacientes VIH+ tienen aumentada la proporción de células CD38+ con respecto a los controles en aproximadamente 20% y lo mismo sucede con los LT EM ($p = 0.008$ y $p < 0.001$, respectivamente), lo que significa que de manera normal un mayor porcentaje de LT CM expresan CD38 en comparación con los LT EM y que en condiciones de infección con VIH la cantidad de LT de memoria que expresan esta molécula de activación aumenta aún más.

Al evaluar la proporción entre las poblaciones de LT de acuerdo con la expresión de CCR7 y CD45RA no se observaron diferencias significativas en la distribución de las subpoblaciones de LT CD4⁺ (Fig.7). Sin embargo, se encontró una tendencia de disminución en el porcentaje de LT CM de los pacientes VIH⁺ comparados con los controles VIH⁻ (p=0.06). Cabe notar que la proporción más alta de LT EM y las proporciones más bajas de LT CM y naive (Fig. 7 círculos rojos) corresponden al paciente 14 (tabla 1) el cual tenía la cuenta más baja de LT CD4⁺ (9 células/ μ L).

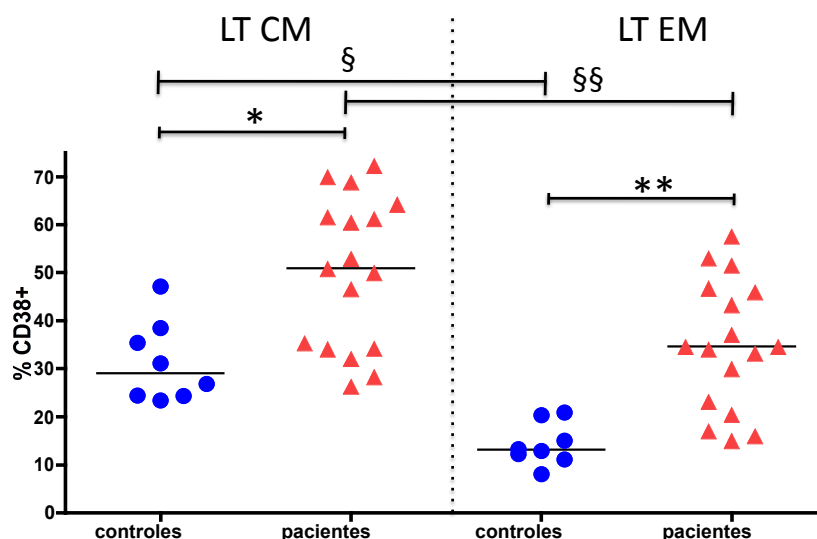


Fig. 6. Expresión de CD38 en los linfocitos T de memoria central (LT CM) y memoria efectora (LT EM) en pacientes y controles. Se encontraron diferencias significativas en el % de CD38⁺ entre LT CM con respecto a los LT EM de controles (círculos azules, §p<0.001) y pacientes (triángulos rojos, §§p=0.005), así como diferencias significativas entre los LT CM de pacientes con respecto a los controles (izquierda *p=0.008) y en los LT EM de pacientes con respecto a los controles (derecha **p<0.001).

5.3. CD154 se expresa en menor proporción en LT CD38⁺ que en LT CD38⁻

Después de la estimulación con SEB, se evaluó la proporción de células que expresaron CD154 en cada una de las subpoblaciones de memoria (Fig. 8 A y B) y se encontró que, tanto en pacientes como controles, existe un menor porcentaje de LT CM CD38⁺ que expresan CD154 en comparación con los LT CM CD38⁻ (p<0.001 y p=0.012 respectivamente). Para el caso de los LT EM no hay diferencia en la expresión de CD154 entre CD38⁻ y CD38⁺ en los controles, sin embargo, los LT EM CD38⁺ de pacientes

expresan significativamente menos CD154 que los LT EM CD38- ($p < 0.001$) e incluso menos que los LT EM CD38+ de controles ($p = 0.018$). Así, si bien la expresión de CD38 determina una menor capacidad de inducir CD154, ésta está aún más disminuida en las células CD38+ de los pacientes con VIH.

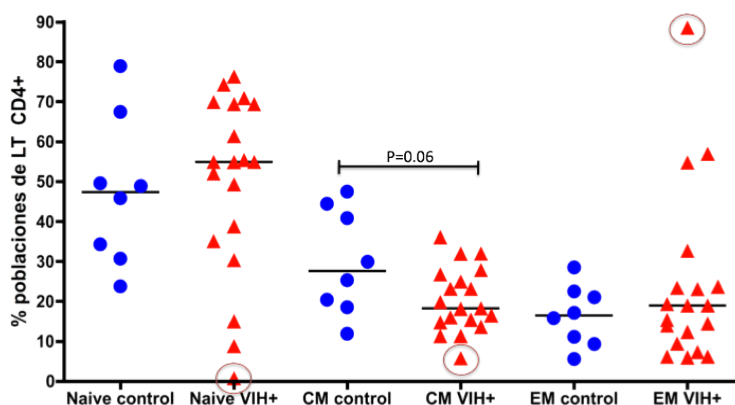


Fig. 7. Distribución de las poblaciones de LT CD4+. Existe una tendencia de porcentaje disminuido de LT CM entre pacientes y controles. Los círculos rojos indican las proporciones de las poblaciones para el paciente 14, el cual tiene un estado avanzado de infección por VIH.

Después de la estimulación con CMV (Fig. 8 C y D) se encontró que un menor porcentaje de los LT CM CD38+ expresan CD154 en comparación con los CD38- de los pacientes ($p = 0.044$), se observa también una tendencia de aumento en el porcentaje de LT CM CD38- que expresan de CD154 de pacientes con respecto a la misma población en controles. En lo que respecta a los LT EM no se encontraron diferencias significativas pero se puede observar que muchos de los pacientes VIH+ están por encima del valor máximo encontrado en los controles, estas observaciones están en concordancia con estudios previos en donde se reporta un aumento en la respuesta contra CMV en pacientes VIH+ (69).

5.4. La disminución en la producción de citocinas después de un estímulo policlonal en pacientes VIH+ esta influenciada por los LT CD38+ de memoria

Al medir la producción de IFN- γ total después de la activación con SEB (Fig. 9 A y B) se observó que un menor porcentaje de LT EM CD38+ de pacientes producen IFN- γ comparado con los LT EM CD38+ de controles ($p = 0.036$) (Fig. 9 B).

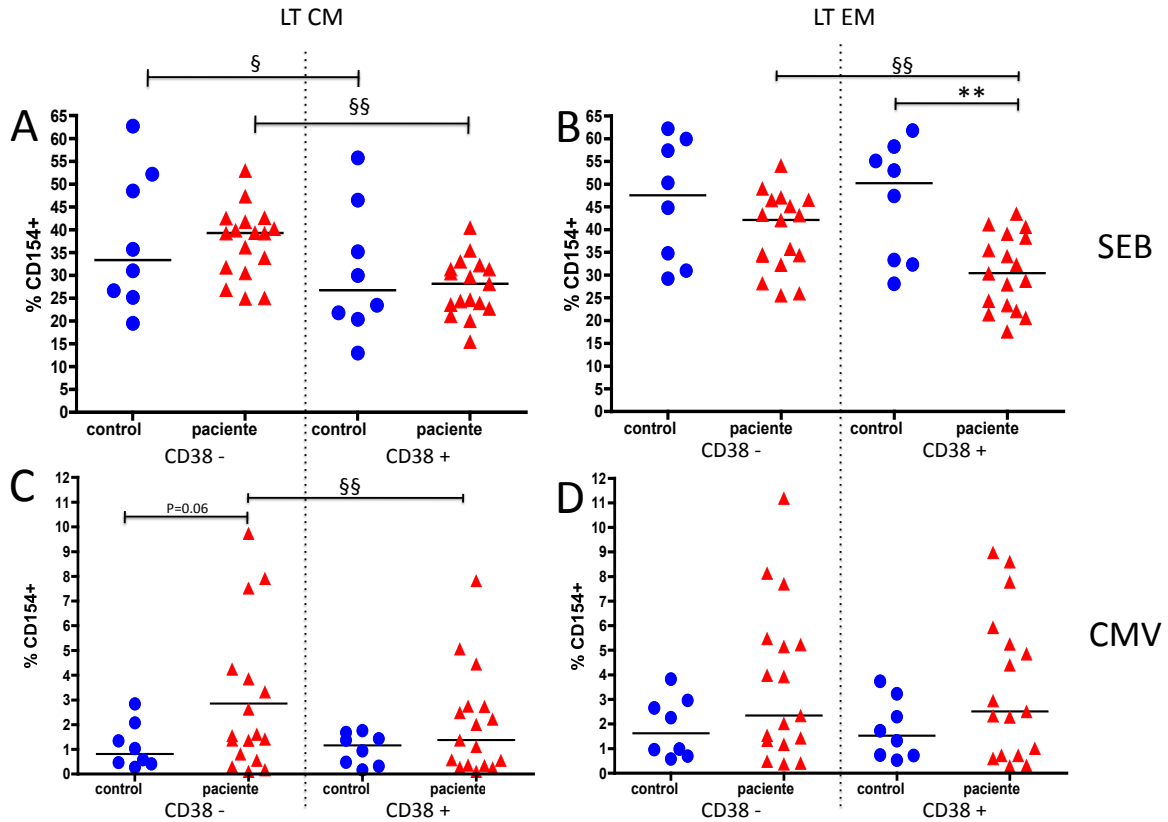


Fig 8. Expresión de CD154 en los linfocitos T de memoria central (LT CM) y memoria efectora (LT EM) en pacientes y controles estimulados con SEB (A y B) y CMV (C y D). (A) § $p=0.012$, §§ $p<0.001$; (B) §§§ $p<0.001$, ** $p=0.018$; (C) §§ $p=0.044$.

En lo que respecta a la producción de IFN- γ total después de la activación con CMV (Fig. 9 C y D), se observó lo contrario, en este caso hay una mayor proporción de LT CM CD38+ que producen IFN- γ comparado con los LT CM CD38- tanto en pacientes ($p=0.007$) como en controles ($p=0.025$). Cabe señalar que la proporción de LT CM que producen IFN- γ es mucho menor a la que producen los LT EM y además es posible observar que las proporciones más altas en la producción de IFN- γ en la población de LT EM corresponde a los pacientes VIH+ (Fig. 9 D).

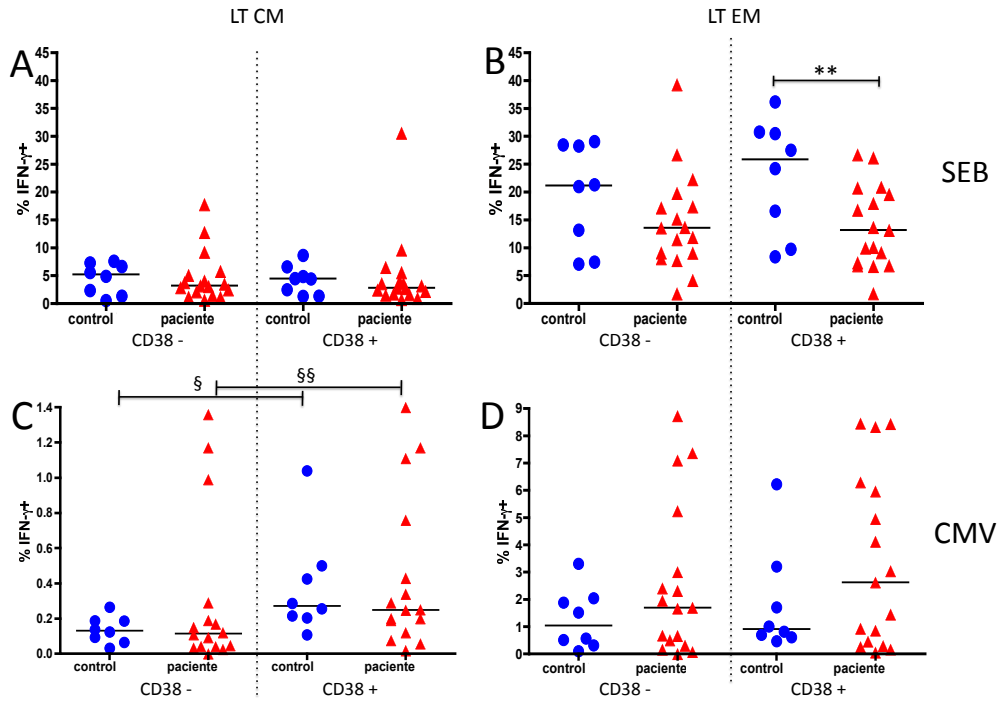


Fig 9. Expresión de IFN- γ total en los linfocitos T de memoria central (LT CM) y memoria efectora (LT EM) en pacientes y controles estimulados con SEB (A y B) y CMV (C y D). (B) ** $p=0.036$; (C) § $p=0.025$, §§ $p=0.007$.

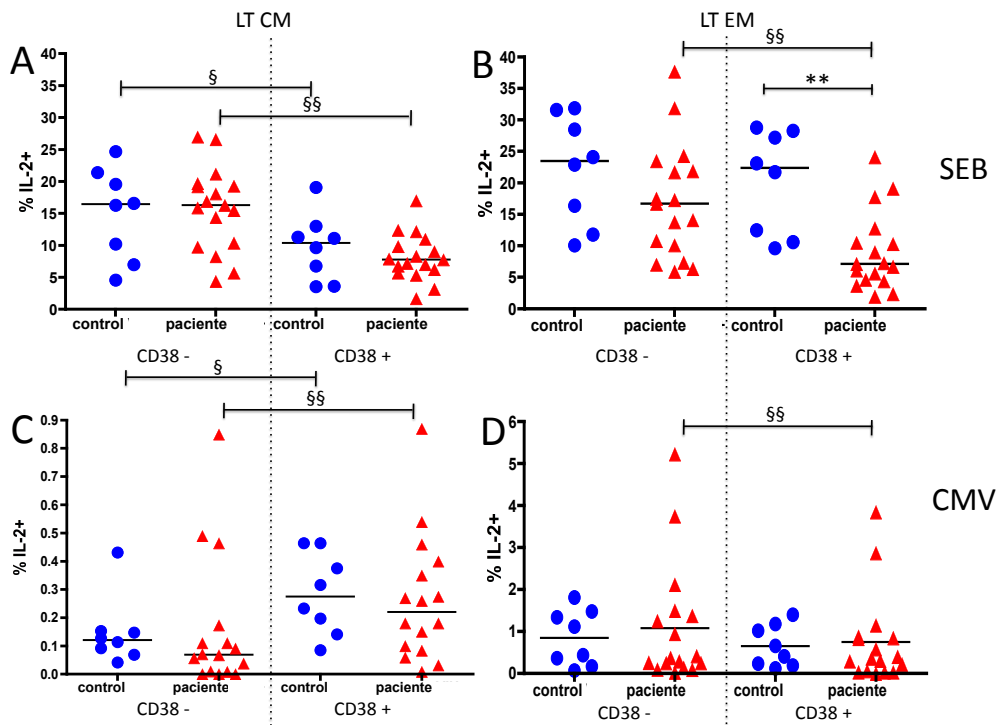


Fig 10. Expresión de IL-2 total en los linfocitos T de memoria central (LT CM) y memoria efectora (LT EM) en pacientes y controles estimulados con SEB (A y B) y CMV (C y D). (A) § $p=0.012$, §§ $p<0.001$; (B) §§ $p=0.003$, ** $p=0.002$; (C) § $p=0.012$, §§ $p=0.028$; (D) §§ $p=0.047$.

Cuando se analizó la producción de IL-2 después de la estimulación con SEB (Fig. 10 A y B) se observó un menor porcentaje de LT CM CD38+ productores de IL-2 en comparación con los LT CM CD38- tanto en pacientes ($p < 0.001$) como en controles ($p = 0.012$), mientras que la proporción de LT EM CD38+ de pacientes que producen IL-2 es menor en comparación con los LT EM CD38- ($p = 0.003$) y menor que los LT EM CD38+ de los controles ($p = 0.002$).

Después de la estimulación con CMV (Fig. 10 C y D) se observó, de manera similar a lo que sucedió con la producción de IFN- γ , que tanto en los pacientes ($p = 0.028$) como en los controles ($p = 0.012$) los LT CM CD38+ producen más IL-2 total que los LT CM CD38-. Sin embargo, en los LT EM se observó que los LT EM CD38+ producen menos IL-2 total que los LT EM CD38- (Fig. 10 D; $p = 0.047$). Cabe mencionar que en este caso no se aprecia que los LT EM de pacientes sean los que particularmente expresen más IL-2 que los controles.

5.5 Los LT CD38+ producen más IFN- γ e IL-2 sin coexpresar CD154, especialmente los LT EM de pacientes VIH+

Al evaluar la expresión de CD154 en la población de LT que produce IFN- γ después de la estimulación con SEB se observó un mayor porcentaje de LT CM CD38+ que producen IFN- γ sin coexpresar CD154 en comparación con los LT CM CD38- tanto en pacientes ($p = 0.008$) como en controles ($p = 0.018$) (Fig. 11 A y B). Lo mismo sucede con los LT EM CD38+, particularmente los de pacientes VIH+ donde además se observa una clara tendencia al aumento de esta producción no simultánea en comparación con los LT EM CD38+ de controles ($p = 0.06$) (Fig. 11 B).

Después de la activación con CMV se observó un mayor porcentaje de LT EM CD38+ que producen más IFN- γ sin coexpresar CD154 en comparación con los LT EM CD38- en pacientes ($p = 0.028$) (Fig. 11 C). No se muestran los resultados obtenidos para los LT CM ni para los LT EM de controles debido a que los eventos adquiridos no fueron suficientes para realizar el subanálisis, por esta misma razón el número de puntos en la figura 11 C es menor.

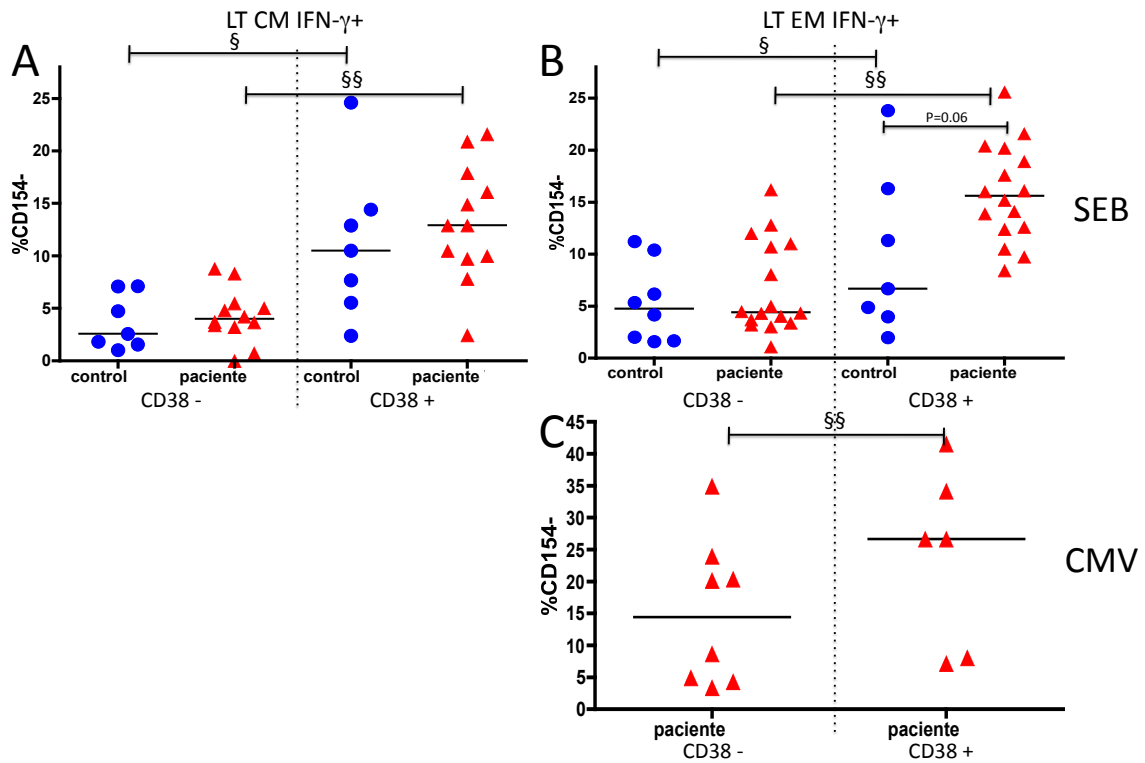


Fig 11. Proporción de LT CM y LT EM IFN- γ + que no expresaron CD154 en pacientes y controles estimulados con SEB (A y B) y CMV (C). (A) §p=0.018, §§p=0.008; (B) §p=0.018, §§p<0.001; (C) §§p=0.028.

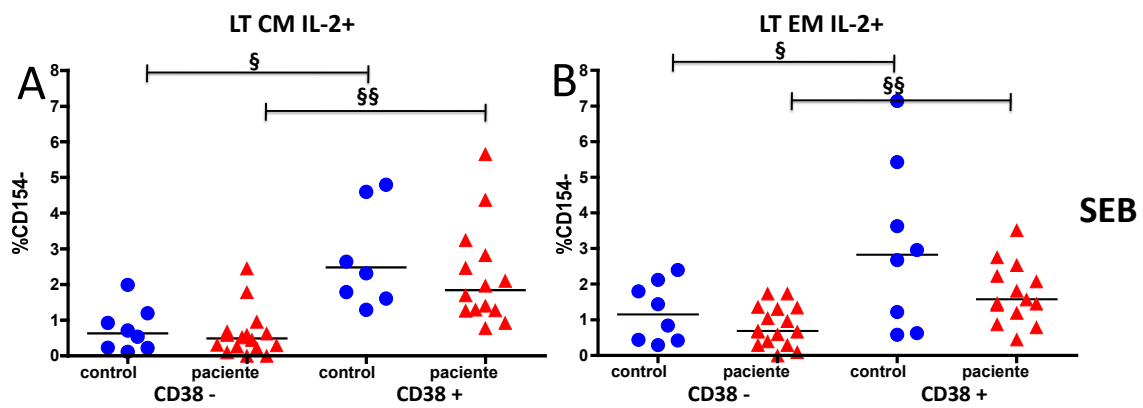


Fig 12. Proporción de LT CM y LT EM IL-2+ que no expresaron CD154 en pacientes y controles estimulados con SEB. (A) §p=0.012, §§p=0.003; (B) §p=0.012, §§p=0.002.

En lo que respecta a la producción de IL-2 sin coexpresión de CD154, en la figura 12 se muestra únicamente los resultados obtenidos para la estimulación con SEB debido a la falta de eventos en el análisis después de la activación con CMV. Se puede observar que tanto en pacientes ($p=0.003$) como en controles ($p=0.012$) el porcentaje de LT CM CD38+ que producen IL-2 sin coexpresar CD154 es mayor en comparación con los CD38-, lo mismo sucede con los LT EM.

5.6. Los LT CD38+ de memoria producen más IFN- γ y menos IL-2 que los LT CD38-.

Debido a que la expresión simultánea de citocinas está relacionada con un mejor control de la infección por VIH (70) y una vez que encontramos que los LT CD38+ de memoria en pacientes VIH+ expresan menos CD154, en general más IFN- γ y menos IL-2, además de producir citocinas sin coexpresar CD154, nos dispusimos a averiguar si CD38 afecta la coexpresión de IFN- γ e IL-2 después de la estimulación con SEB o CMV (utilizando en este caso un anticuerpo monoclonal agonista anti-CD28 para incrementar la respuesta, principalmente para CMV, y observar el efecto de la expresión de CD38).

Al analizar la producción de IFN- γ , IL-2 o ambas después de la estimulación con SEB se observó un mayor porcentaje de LT EM CD38+ que expresan IFN- γ sin coexpresar IL-2 en comparación con los LT EM CD 38- ($p=0.047$ Fig.13 A). Esta diferencia entre LT CD38+ y LT CD38- se observa también en los LT CM ($p=0.022$). En contraste, la producción de IL-2 sin coexpresión de IFN- γ en los LT CM CD38+ es menor a la observada en los LT CM CD38- ($p=0.05$) y lo mismo sucede con los LT EM en donde los que expresan CD38 producen menos IL-2 simple positivo que los CD38- ($p=0.005$). Por último, no se encontraron diferencias en la expresión simultánea de IFN- γ e IL-2 entre LT CD38+ y LT CD38- en ninguna de las subpoblaciones de memoria (CM y EM).

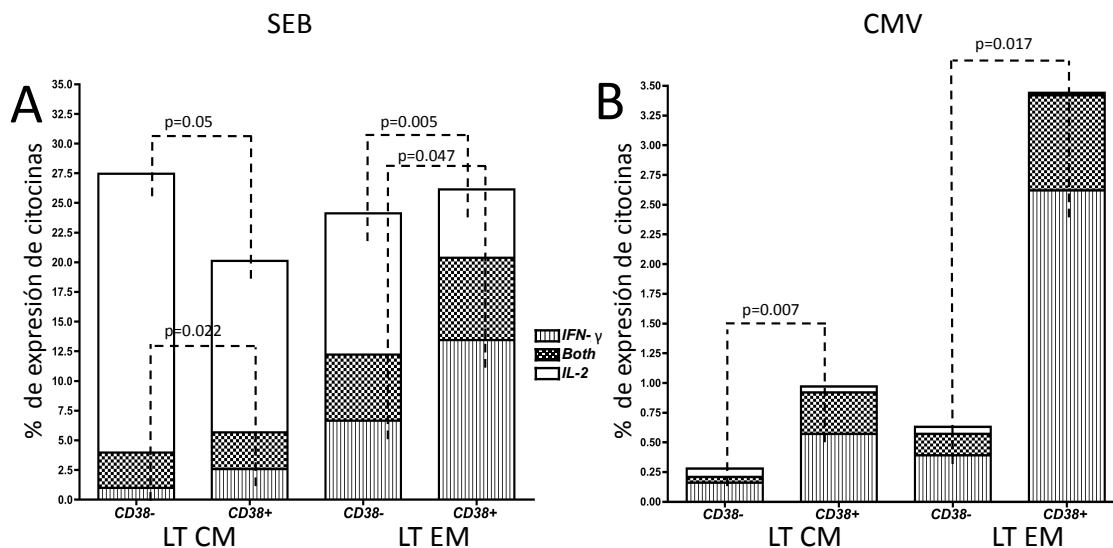


Fig.13. Coproducción de IFN- γ e IL-2. Producción de IFN- γ (barras con líneas verticales), IL-2 (barras vacías) o ambas (barras con cuadrícula) en los linfocitos T de memoria central (LT CM) y memoria efectora (LT EM) en pacientes estimulados con SEB (A) y CMV (B), ambos adicionando anti-CD28 agonista.

Con respecto a la producción simple o simultánea de IFN- γ e IL-2 después del estímulo con CMV se observó un porcentaje 6.7 veces mayor de LT EM CD38+ productores de IFN- γ sin coexpresar IL-2 en comparación con los LT EM CD38- ($p=0.017$, Fig.13 B), esta diferencia entre LT CD38+ y CD38- se observa también en los LT CM ($p=0.007$). No se encontraron diferencias entre LT CD38+ y LT CD38- en ninguna de las subpoblaciones de memoria en cuanto a la frecuencia de expresión simultánea de IFN- γ e IL-2. Tampoco se encontraron diferencias en la expresión de IL-2 sin coexpresar IFN- γ , sin embargo, es interesante mencionar que la producción de IL-2 es muy baja (menor a 0.1 en todos los casos) en respuesta a CMV.

6. Discusión

Existe una consistente y fuerte correlación entre la expresión de CD38 y la evolución de la enfermedad por VIH (8, 15, 29, 42, 71), además de deficiencias inmunes funcionales en los LT CD4+ no relacionadas a la infección directa por el virus (54, 55); sin embargo, hasta la fecha no hay estudios que aporten evidencias de una relación directa entre la expresión de CD38 y una alteración de la función inmune. Nosotros pensamos que existe una relación directa entre la expresión de CD38 en las subpoblaciones de memoria de LT CD4+ y una función inmune alterada. Para probar esta hipótesis medimos la expresión de CD38 en los linfocitos T de memoria central (LT CM) y de memoria efectora (LT EM) y observamos si existen diferencias en la producción de IFN- γ e IL-2 después de la estimulación con SEB y con CMV entre linfocitos de memoria CD38+ y CD38-.

En la población de pacientes VIH+ que analizamos pudimos observar la correlación ya descrita entre el avance de la enfermedad medida como conteo de CD4 o carga viral plasmática y la expresión de CD38 en los LT de memoria (Fig. 5). Este fenómeno fue descrito desde finales de la década de 1980 y es una de las principales causas por las que se piensa que la expresión de este marcador de activación en los LT puede estar asociado directamente con alguna disfunción inmune, ya que se ha demostrado que la expresión de CD38 sobretodo en LT CD8+ es un mejor predictor de avance de la enfermedad que la carga viral o la cuenta de LT CD4+(39). Esta correlación la encontramos tanto en los LT CM como en los LT EM por lo que no podemos asumir que alguna de las subpoblaciones de memoria contribuya más a la correlación. Es decir, en ambas subpoblaciones la expresión de CD38 aumenta conforme avanza en la enfermedad por VIH.

Con respecto a estas correlaciones se puede observar que los dos pacientes controladores elite mantienen la tendencia correlativa entre el conteo de LT CD4+ y la expresión de CD38. Esto es una evidencia que apoya la idea de que la expresión de CD38 no esta limitada a la infección directa por el virus ni depende estrictamente de la carga viral sino de un estado crónico de activación y predice la disminución de LT CD4+ aún sin viremia. A pesar de que en nuestro estudio solo tenemos dos pacientes controladores elite, existen

otros reportes que establecen evidencias más robustas del mismo fenómeno en esta población de pacientes (42, 71-73).

Al evaluar la expresión de CD38 en cada una de las subpoblaciones de memoria observamos que una mayor proporción de LT CM que expresan CD38 comparados con los LT EM en los controles sanos. Esta diferencia se observa también en los pacientes VIH+. Además el porcentaje de LT CM y EM que expresan CD38 en pacientes es mayor en comparación con las mismas poblaciones en los controles (Fig. 7). Dado que existe una sobrerrepresentación de LT de memoria que expresan CD38 en los pacientes VIH+, las anomalías encontradas en la funcionalidad de las células CD38+ tendrán un efecto más relevante en el contexto de la infección por VIH.

Se sabe que CD38 funciona como molécula de adhesión y su ligando conocido es CD31, debido a esta función de adhesina se ha propuesto que su expresión es importante en el *homming* y la recirculación por ganglios linfáticos (63). Esta idea está en concordancia con la expresión aumentada de CD38 en los LT CM (incluso en controles) debido a que estos linfocitos preferencialmente están recirculando por órganos linfoides secundarios, sin embargo, el *homming* que establece la interacción entre CD38 y CD31 aun no está claramente establecida.

La mayor proporción de LT CD38+ encontrada entre los LT CM de pacientes podría explicar por qué en etapas tardías de la enfermedad la proporción de LT CM tiende a estar subrepresentada (Fig. 7 círculos rojos y ref. (51)), pues se sabe que CD38 desencadena señales intracelulares por dos vías 1) a través de los productos que genera su actividad enzimática y 2) a través de la unión con su ligando. Estas señales están relacionadas a activación y diferenciación (62) y es posible que la sobreexpresión de CD38 observada en los LT de memoria de los pacientes aumente su susceptibilidad a ser activados de manera inespecífica, a su muerte prematura por activación y/o a ser infectados por el virus.

Estas ideas deben ser confirmadas ya que no se conoce con exactitud el mecanismo por el cual CD38 actúa como molécula activadora, bajo qué condiciones de interacción molecular con otros receptores, bajo qué condiciones microambientales ni en qué procesos inmunes.

Para estimular a las subpoblaciones de memoria de LT CD4⁺ utilizamos SEB, una toxina que induce activación inespecífica a través de TCR y lisado de CMV como un estímulo específico de antígeno. La enterotoxina B de *Staphylococcus* es un superantígeno que permite la unión inespecífica del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) expresado en una célula presentadora de antígeno (APC) y el TCR de un linfocito. Esta unión provoca la activación policlonal de los LT. La producción de citocinas después de una estimulación con SEB puede diferir de aquella inducida por estimulación antígeno-específica, debido a que la activación con este superantígeno no requiere procesamiento por una APC y puede producir respuesta en células de memoria y naive que expresen la cadena variable adecuada del receptor de linfocitos T. De este modo, para determinar si existe un comportamiento diferente en cuanto a la producción de IFN- γ e IL-2 en las subpoblaciones de memoria observamos también la producción de citocinas después de estimulación con lisado de CMV como activación antígeno-específica.

La adición de brefeldina A (BFA) nos permitió, además de detectar intracelularmente las citocinas producidas y el CD154, evitar la expresión *de novo* de CD38 en la membrana plasmática de los LT derivada de la estimulación *ex vivo* y con esto poder rastrear la funcionalidad de los LT que *in vivo* estaban ya expresando CD38. En un estudio previo de nuestro equipo se realizó un seguimiento de la expresión de CD38 en presencia de BFA y se demostró que después de 12 horas no existían cambios en la expresión de CD38 (66), por lo cual usamos este tiempo de activación en presencia de BFA para realizar este estudio.

Al analizar la expresión total de CD154 después de la activación policlonal con SEB observamos que en general un menor porcentaje de LT que son CD38⁺ expresan CD154 comparados con los CD38⁻. Adicional a esta deficiencia determinada por la expresión de CD38 que se da tanto en los LT CM como en los LT EM, podemos observar que en los LT EM hay un efecto de la infección por VIH y esta subpoblación expresa aún menos CD154. (Fig.8 A y B).

En cuanto a la expresión de CD154 después de estimular con CMV, podemos ver que el efecto de la expresión de CD38⁺ es observable sólo en la población de LT CM de pacientes

(Fig. 8 C y D), cabe mencionar que la tendencia que existe a una mayor expresión de CD154 en los LT CM CD38- de pacientes con respecto a controles, puede atribuirse al incremento de la respuesta contra CMV en pacientes VIH+ ya visto en otros estudios (69).

CD154 (CD40L) es una proteína de membrana expresada en LT CD4 activados a través de TCR(74, 75). La unión de CD154 con CD40 expresado en las APC promueve la secreción de IL-12 e IFN- γ , controla la activación de LT mediada por APC y regula la diferenciación de LT CD8+ a células efectoras(76, 77). Estudios en pacientes con síndrome de hiper IgM proveen evidencia de la importancia que tienen esta molécula en la modulación de la respuesta inmune celular. Los LT CD4+ de personas con esta inmunodeficiencia primaria pierden la expresión funcional de CD154 y estos pacientes son susceptibles a infecciones oportunistas tal como sucede en los pacientes con VIH(78, 79). Los mecanismos por los cuales la falta de CD154 incrementa la susceptibilidad de infecciones oportunistas son variados e incluyen: disminución en la producción de IL-12, IL-2 e IFN- γ , una activación deficiente de las APC, un deficiente *priming* de LT CD4+ y CD8+ y una deficiente respuesta inmune humoral(80). Estudios anteriores en donde se analizó la población de LT CD4+ totales han demostrado que en el contexto de la infección por VIH existe una deficiente producción de CD154 en respuesta tanto a estímulos policlonales como a estímulos antígeno-específico (77, 79, 80). De este modo, considerando que la población de LT de memoria que expresa CD38 está sobrerrepresentada en la infección por VIH, la importancia de nuestro hallazgo radica en que podemos afirmar, basados en nuestras observaciones, que las deficiencias en la expresión de CD154 después de un estímulo policlonal y específico está determinada por las subpoblaciones de memoria CD38+ y en particular en los LT EM, por lo que podemos atribuirle a ésta población las deficiencias relacionadas con la expresión de CD154 discutidas arriba y quizá parte de la causa de las alteraciones en la producción de citocinas que se reportan en este estudio.

Al analizar la expresión total de IFN- γ e IL-2 observamos que después del estímulo con SEB, hay una menor proporción de LT de memoria CD38+, particularmente los LT EM de pacientes VIH+, que producen citocinas en comparación con aquellos LT de memoria CD38- (Fig. 9 y 10 A y B). Estudios anteriores han reportado esta deficiencia en los LT

CD4+ activados (56, 57) pero nuestras observaciones indican que esta deficiencia en la producción de citocinas en los pacientes VIH+ esta influenciada principalmente por los LT EM CD38+ (recordemos que esta población está sobrerrepresentada en pacientes VIH+), probablemente relacionada con la disminución de la expresión de CD154 y por tanto un “priming” incompleto.

Para el caso de la estimulación con CMV observamos una mayor proporción de LT CM CD38+ que producen IFN- γ e IL-2 comparados con los LT CM CD38- (fig.9 y 10 C y D) lo que contrasta con la expresión de CD154 observada para la misma subpoblación en donde son los CD38- los que expresan más este marcador. Para el caso de los LT EM CD38+ de pacientes la producción total de IL-2 está disminuida con respecto a los CD38-. Debemos considerar que aunque los LT CM CD38+ producen más IL-2 que los LT CM CD38- la mediana máxima esta en aproximadamente 0.3% mientras que para el caso de los LT EM la mediana máxima esta en aproximadamente 1% y adicionalmente sabemos que en los pacientes VIH+ la proporción de LT EM tiende a ser mayor, es posible que la tendencia general sea la observada para la población de LT EM en donde los CD38+ producen menos IL-2 que los CD38-.

Analizamos también la producción de IFN- γ e IL-2 sin coexpresión de CD154 al estimular con SEB y encontramos que la proporción de LT de memoria CD38+ que producen citocinas sin expresar CD154 es mayor en comparación con los LT de memoria CD38- (Fig. 11 A, B y 12), este fenómeno afecta especialmente a los LT EM CD38+ de los pacientes VIH+, donde tanto la expresión de CD38 como la infección por el virus causa un incremento en la proporción de células que producen IFN- γ sin coexpresión de CD154. Esto está en concordancia con lo que describió en un estudio previo realizado por nuestro equipo (66). Adicionalmente aportamos evidencias de que este fenómeno sucede también después de un estímulo específico con CMV (Fig. 11 C). Estas observaciones son consistentes con una falla en la expresión de CD154 de los LT CD38+ (aun cuando están produciendo citocinas) discutido inicialmente y que contribuye a las deficiencias inmunes descritas para pacientes VIH+. Además pone de manifiesto que los LT EM de pacientes VIH+ son más susceptibles a las alteraciones inmunes encontradas en esta subpoblación.

Desafortunadamente debido a la falta de eventos en este análisis, no pudimos analizar la producción de IL-2 sin coexpresión de CD154 después del estímulo con CMV, sin embargo, la falta de eventos puede ser indicativo de que la proporción de células que están produciendo IL-2 sin producir CD54 es significativamente menor a la observada para el IFN- γ .

Finalmente, después de que observamos que los LT CD38⁺ de memoria en pacientes VIH⁺ expresan menos CD154, en general más IFN- γ y menos IL-2, además de producir citocinas sin coexpresar CD154, nos dispusimos a evaluar la coexpresión de IFN- γ e IL-2 y si CD38 afecta esta coexpresión (fig.13). Además de los estímulos ya descritos adicionamos un anticuerpo monoclonal agonista anti-CD28, con el objetivo de incrementar las respuestas principalmente contra CMV y poder observar más claramente el efecto. En este caso observamos que con CMV, en ambas subpoblaciones de LT de memoria (más evidente en LT EM como se espera de esta población), el porcentaje de células CD38⁺ que producen IFN- γ sin coexpresión de IL-2 es mayor en comparación con aquellas células CD38⁻ y este efecto se mantiene con SEB. En el caso de la producción de IL-2 sin coexpresión de IFN- γ al estimular con CMV se observa que su producción es casi nula en todas las poblaciones, sin embargo, si estimulamos con SEB podemos apreciar que en ambas subpoblaciones de memoria (más evidente en LT CM como se espera de esta población), el porcentaje de células CD38⁺ que producen IL-2 sin coexpresión de IFN- γ es menor en comparación con aquellas células CD38⁻.

Podemos notar un comportamiento consistente, en la población de LT CM el efecto de la expresión de CD38 aparece tanto en pacientes como en controles y puede ser considerado como normal, sin embargo, la sobrerrepresentación de los LT CM que expresan CD38 en los pacientes infectados con VIH puede resultar en respuestas inmunes deficientes en estos individuos. Para el caso de los LT EM podemos observar alteraciones causadas 1) por la expresión de CD38: que en algunos casos son compartidas con los controles VIH⁻ pero la proporción aumentada de células que expresan CD38 en pacientes VIH⁺ aumentaría el efecto que tienen éste marcador en la funcionalidad; y 2) El efecto de la infección con VIH

que produce alteraciones más profundas en la función inmune de aquellos LT EM que expresan CD38+ de pacientes VIH+.

La expresión de CD38 parece estar relacionada a funciones efectoras (producción de IFN- γ) y no asociada a funciones de supervivencia y proliferación (producción de IL-2). Esto explicaría la pérdida gradual de los LT CM y subsecuentemente la imposibilidad de mantener la población umbral de LT EM en sitios efectoras y por tanto la aparición de enfermedades oportunistas. Derivado de esto podemos especular que en los LT EM CD38+ (considerando que en los pacientes VIH+ los LT EM tienden a aumentar conforme avanza la enfermedad y además los que expresan CD38 están sobrerrepresentados) la estimulación del TCR induce activación, representada en este caso por IFN- γ y por otro lado los LT CM CD38+ (que también están sobrerrepresentados) fallan en inducir suficiente IL-2 para soportar la proliferación necesaria para que ocurra la diferenciación a LT EM (20, 21, 24, 81). Estos hechos pueden ser causa de la inmunosupresión y probablemente un componente más que contribuye a la linfopenia ocasionada por la infección por VIH.

Se necesitan experimentos adicionales para determinar si efectivamente los LT CM o EM CD38+, debido a la disminución en la expresión de CD154 fallan en inducir activación en las APC y si éstas a su vez fallan en inducir una activación completa en las subpoblaciones de LT memoria y, si los LT CD38- tienen todas estas funciones completas. Del mismo modo sería interesante evaluar la funcionalidad de las subpoblaciones de memoria de LT CD4+ con respecto a la expresión de CD38, categorizando grupos de pacientes en diversos estadios de la enfermedad así como pacientes controladores elite y pacientes bajo tratamiento antiretroviral exitoso para evaluar si las disfunciones observadas van progresando y si se revierten con el tratamiento.

7. Conclusiones

- Los LT CD4⁺ CD38⁺, tanto CM como EM, en pacientes VIH⁺ inducen menos CD154, producen más IFN- γ y menos IL-2 después de un estímulo a través de TCR que aquellos que no expresan CD38, por lo que es posible que la expresión de CD38 y el aumento en su frecuencia de expresión participe directamente en la patogénesis de la infección por VIH, al 1) establecer un ambiente poco favorable para la activación de APCs debido que probablemente no se establece una interacción adecuada entre CD40 de las APCs y CD154 de los LT, 2) mantener un ambiente de activación mediado por IFN- γ y 3) producir una disminución en la proliferación de LT por la ausencia de IL-2. Es probable que lo anterior finalmente resulte en una alteración de las funciones inmunes vinculada a la inmunosupresión de los pacientes VIH⁺.

8. Bibliografía

1. Levy JA. 2008. *El VIH y la patogénesis del SIDA*. México, D.F.: Fondo de Cultura Económica
2. Chan DC, Kim PS. 1998. HIV entry and its inhibition. *Cell* 93: 681-4
3. Daar ES, Moudgil T, Meyer RD, Ho DD. 1991. Transient high levels of viremia in patients with primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 324: 961-4
4. Fauci AS, Pantaleo G, Stanley S, Weissman D. 1996. Immunopathogenic mechanisms of HIV infection. *Ann Intern Med* 124: 654-63
5. ONUSIDA. 2009. Situación de la epidemia de sida.
6. CENSIDA. 2009. El VIH/SIDA en México 2009.
7. Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, Price DA, Taylor JH, Beilman GJ, Nguyen PL, Khoruts A, Larson M, Haase AT, Douek DC. 2004. CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* 200: 749-59
8. Giorgi JV, Liu Z, Hultin LE, Cumberland WG, Hennessey K, Detels R. 1993. Elevated levels of CD38+ CD8+ T cells in HIV infection add to the prognostic value of low CD4+ T cell levels: results of 6 years of follow-up. The Los Angeles Center, Multicenter AIDS Cohort Study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 6: 904-12
9. Lawn SD, Butera ST, Folks TM. 2001. Contribution of immune activation to the pathogenesis and transmission of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clin Microbiol Rev* 14: 753-77
10. Brenchley JM, Price DA, Douek DC. 2006. HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe? *Nat Immunol* 7: 235-9
11. Douek D. 2007. HIV disease progression: immune activation, microbes, and a leaky gut. *Top HIV Med* 15: 114-7
12. Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, Kazzaz Z, Bornstein E, Lambotte O, Altmann D, Blazar BR, Rodriguez B, Teixeira-Johnson L, Landay A, Martin JN, Hecht FM, Picker LJ, Lederman MM, Deeks SG, Douek DC. 2006. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med* 12: 1365-71
13. Pantaleo G, Graziosi C, Fauci AS. 1993. New concepts in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 328: 327-35
14. Douek DC, Roederer M, Koup RA. 2009. Emerging concepts in the immunopathogenesis of AIDS. *Annu Rev Med* 60: 471-84
15. Deeks SG, Kitchen CM, Liu L, Guo H, Gascon R, Narvaez AB, Hunt P, Martin JN, Kahn JO, Levy J, McGrath MS, Hecht FM. 2004. Immune activation set point during early HIV infection predicts subsequent CD4+ T-cell changes independent of viral load. *Blood* 104: 942-7
16. Martin JC, Bandres JC. 1999. Cells of the monocyte-macrophage lineage and pathogenesis of HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 22: 413-29

17. Douek DC, Betts MR, Hill BJ, Little SJ, Lempicki R, Metcalf JA, Casazza J, Yoder C, Adelsberger JW, Stevens RA, Baseler MW, Keiser P, Richman DD, Davey RT, Koup RA. 2001. Evidence for increased T cell turnover and decreased thymic output in HIV infection. *J Immunol* 167: 6663-8
18. Biancotto A, Iglehart SJ, Vanpouille C, Condack CE, Lisco A, Ruecker E, Hirsch I, Margolis LB, Grivel JC. 2008. HIV-1 induced activation of CD4+ T cells creates new targets for HIV-1 infection in human lymphoid tissue ex vivo. *Blood* 111: 699-704
19. Picker LJ. 2006. Immunopathogenesis of acute AIDS virus infection. *Curr Opin Immunol* 18: 399-405
20. Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A. 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401: 708-12
21. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. 2004. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* 22: 745-63
22. Lanzavecchia A, Sallusto F. 2005. Understanding the generation and function of memory T cell subsets. *Curr Opin Immunol* 17: 326-32
23. Douek DC, Picker LJ, Koup RA. 2003. T cell dynamics in HIV-1 infection. *Annu Rev Immunol* 21: 265-304
24. Picker LJ, Hagen SI, Lum R, Reed-Inderbitzin EF, Daly LM, Sylwester AW, Walker JM, Siess DC, Piatak M, Jr., Wang C, Allison DB, Maino VC, Lifson JD, Kodama T, Axthelm MK. 2004. Insufficient production and tissue delivery of CD4+ memory T cells in rapidly progressive simian immunodeficiency virus infection. *J Exp Med* 200: 1299-314
25. Grossman Z, Meier-Schellersheim M, Paul WE, Picker LJ. 2006. Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys. *Nat Med* 12: 289-95
26. Rodriguez B, Sethi AK, Cheruvu VK, Mackay W, Bosch RJ, Kitahata M, Boswell SL, Mathews WC, Bangsberg DR, Martin J, Whalen CC, Sieg S, Yadavalli S, Deeks SG, Lederman MM. 2006. Predictive value of plasma HIV RNA level on rate of CD4 T-cell decline in untreated HIV infection. *JAMA* 296: 1498-506
27. Kestens L, Vanham G, Vereecken C, Vandenbruaene M, Vercauteren G, Colebunders RL, Gigase PL. 1994. Selective increase of activation antigens HLA-DR and CD38 on CD4+ CD45RO+ T lymphocytes during HIV-1 infection. *Clin Exp Immunol* 95: 436-41
28. Mellors JW, Rinaldo CR, Jr., Gupta P, White RM, Todd JA, Kingsley LA. 1996. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* 272: 1167-70
29. Sodora DL, Silvestri G. 2008. Immune activation and AIDS pathogenesis. *Aids* 22: 439-46
30. Hunt PW. 2007. Role of immune activation in HIV pathogenesis. *Curr HIV/AIDS Rep* 4: 42-7

31. Ascher MS, Sheppard HW. 1988. AIDS as immune system activation: a model for pathogenesis. *Clin Exp Immunol* 73: 165-7
32. Hazenberg MD, Stuart JW, Otto SA, Borleffs JC, Boucher CA, de Boer RJ, Miedema F, Hamann D. 2000. T-cell division in human immunodeficiency virus (HIV)-1 infection is mainly due to immune activation: a longitudinal analysis in patients before and during highly active antiretroviral therapy (HAART). *Blood* 95: 249-55
33. Sieg SF, Rodriguez B, Asaad R, Jiang W, Bazdar DA, Lederman MM. 2005. Peripheral S-phase T cells in HIV disease have a central memory phenotype and rarely have evidence of recent T cell receptor engagement. *J Infect Dis* 192: 62-70
34. Sousa AE, Carneiro J, Meier-Schellersheim M, Grossman Z, Victorino RM. 2002. CD4 T cell depletion is linked directly to immune activation in the pathogenesis of HIV-1 and HIV-2 but only indirectly to the viral load. *J Immunol* 169: 3400-6
35. Mohri H, Bonhoeffer S, Monard S, Perelson AS, Ho DD. 1998. Rapid turnover of T lymphocytes in SIV-infected rhesus macaques. *Science* 279: 1223-7
36. Silvestri G, Sodora DL, Koup RA, Paiardini M, O'Neil SP, McClure HM, Staprans SI, Feinberg MB. 2003. Nonpathogenic SIV infection of sooty mangabeys is characterized by limited bystander immunopathology despite chronic high-level viremia. *Immunity* 18: 441-52
37. Milush JM, Reeves JD, Gordon SN, Zhou D, Muthukumar A, Kosub DA, Chacko E, Giavedoni LD, Ibegbu CC, Cole KS, Miamidian JL, Paiardini M, Barry AP, Staprans SI, Silvestri G, Sodora DL. 2007. Virally induced CD4+ T cell depletion is not sufficient to induce AIDS in a natural host. *J Immunol* 179: 3047-56
38. Sumpter B, Dunham R, Gordon S, Engram J, Hennessy M, Kinter A, Paiardini M, Cervasi B, Klatt N, McClure H, Milush JM, Staprans S, Sodora DL, Silvestri G. 2007. Correlates of preserved CD4(+) T cell homeostasis during natural, nonpathogenic simian immunodeficiency virus infection of sooty mangabeys: implications for AIDS pathogenesis. *J Immunol* 178: 1680-91
39. Giorgi JV, Lyles RH, Matud JL, Yamashita TE, Mellors JW, Hultin LE, Jamieson BD, Margolick JB, Rinaldo CR, Jr., Phair JP, Detels R. 2002. Predictive value of immunologic and virologic markers after long or short duration of HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 29: 346-55
40. Giorgi JV, Hultin LE, McKeating JA, Johnson TD, Owens B, Jacobson LP, Shih R, Lewis J, Wiley DJ, Phair JP, Wolinsky SM, Detels R. 1999. Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage. *J Infect Dis* 179: 859-70
41. Hazenberg MD, Otto SA, van Benthem BH, Roos MT, Coutinho RA, Lange JM, Hamann D, Prins M, Miedema F. 2003. Persistent immune activation in HIV-1 infection is associated with progression to AIDS. *Aids* 17: 1881-8
42. Hunt PW, Brenchley J, Sinclair E, McCune JM, Roland M, Page-Shafer K, Hsue P, Emu B, Krone M, Lampiris H, Douek D, Martin JN, Deeks SG. 2008. Relationship between T cell activation and CD4+ T cell count in HIV-seropositive individuals

- with undetectable plasma HIV RNA levels in the absence of therapy. *J Infect Dis* 197: 126-33
43. Sailaja G, Skountzou I, Quan FS, Compans RW, Kang SM. 2007. Human immunodeficiency virus-like particles activate multiple types of immune cells. *Virology* 362: 331-41
 44. Schindler M, Munch J, Kutsch O, Li H, Santiago ML, Bibollet-Ruche F, Muller-Trutwin MC, Novembre FJ, Peeters M, Courgnaud V, Bailes E, Roques P, Sodora DL, Silvestri G, Sharp PM, Hahn BH, Kirchhoff F. 2006. Nef-mediated suppression of T cell activation was lost in a lentiviral lineage that gave rise to HIV-1. *Cell* 125: 1055-67
 45. Fonteneau JF, Larsson M, Beignon AS, McKenna K, Dasilva I, Amara A, Liu YJ, Lifson JD, Littman DR, Bhardwaj N. 2004. Human immunodeficiency virus type 1 activates plasmacytoid dendritic cells and concomitantly induces the bystander maturation of myeloid dendritic cells. *J Virol* 78: 5223-32
 46. Beignon AS, McKenna K, Skoberne M, Manches O, DaSilva I, Kavanagh DG, Larsson M, Gorelick RJ, Lifson JD, Bhardwaj N. 2005. Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor-viral RNA interactions. *J Clin Invest* 115: 3265-75
 47. Mogensen TH, Melchjorsen J, Larsen CS, Paludan SR. 2010. Innate immune recognition and activation during HIV infection. *Retrovirology* 7: 54
 48. Funderburg N, Luciano AA, Jiang W, Rodriguez B, Sieg SF, Lederman MM. 2008. Toll-like receptor ligands induce human T cell activation and death, a model for HIV pathogenesis. *PLoS ONE* 3: e1915
 49. Bafica A, Scanga CA, Schito M, Chaussabel D, Sher A. 2004. Influence of coinfecting pathogens on HIV expression: evidence for a role of Toll-like receptors. *J Immunol* 172: 7229-34
 50. Murali-Krishna K, Altman JD, Suresh M, Sourdive DJ, Zajac AJ, Miller JD, Slansky J, Ahmed R. 1998. Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity* 8: 177-87
 51. Biancotto A, Grivel JC, Iglehart SJ, Vanpouille C, Lisco A, Sieg SF, Debernardo R, Garate K, Rodriguez B, Margolis LB, Lederman MM. 2007. Abnormal activation and cytokine spectra in lymph nodes of people chronically infected with HIV-1. *Blood* 109: 4272-9
 52. Gougeon ML, Lecoecur H, Dulioust A, Enouf MG, Crouvoiser M, Goujard C, Debord T, Montagnier L. 1996. Programmed cell death in peripheral lymphocytes from HIV-infected persons: increased susceptibility to apoptosis of CD4 and CD8 T cells correlates with lymphocyte activation and with disease progression. *J Immunol* 156: 3509-20
 53. Badley AD, Pilon AA, Landay A, Lynch DH. 2000. Mechanisms of HIV-associated lymphocyte apoptosis. *Blood* 96: 2951-64
 54. Miedema F, Petit AJ, Terpstra FG, Schattenkerk JK, de Wolf F, Al BJ, Roos M, Lange JM, Danner SA, Goudsmit J, et al. 1988. Immunological abnormalities in human immunodeficiency virus (HIV)-infected asymptomatic homosexual men.

- HIV affects the immune system before CD4⁺ T helper cell depletion occurs. *J Clin Invest* 82: 1908-14
55. Sieg SF, Harding CV, Lederman MM. 2001. HIV-1 infection impairs cell cycle progression of CD4⁽⁺⁾ T cells without affecting early activation responses. *J Clin Invest* 108: 757-64
 56. Sieg SF, Bazdar DA, Harding CV, Lederman MM. 2001. Differential expression of interleukin-2 and gamma interferon in human immunodeficiency virus disease. *J Virol* 75: 9983-5
 57. McCloskey TW, Haridas V, Pontrelli L, Pahwa S. 2004. Response to superantigen stimulation in peripheral blood mononuclear cells from children perinatally infected with human immunodeficiency virus and receiving highly active antiretroviral therapy. *Clin Diagn Lab Immunol* 11: 957-62
 58. Stubbe M, Vanderheyde N, Pircher H, Goldman M, Marchant A. 2008. Characterization of a subset of antigen-specific human central memory CD4⁺ T lymphocytes producing effector cytokines. *Eur J Immunol* 38: 273-82
 59. Rivino L, Messi M, Jarrossay D, Lanzavecchia A, Sallusto F, Geginat J. 2004. Chemokine receptor expression identifies Pre-T helper (Th)1, Pre-Th2, and nonpolarized cells among human CD4⁺ central memory T cells. *J Exp Med* 200: 725-35
 60. Lozza L, Rivino L, Guarda G, Jarrossay D, Rinaldi A, Bertoni F, Sallusto F, Lanzavecchia A, Geginat J. 2008. The strength of T cell stimulation determines IL-7 responsiveness, secondary expansion, and lineage commitment of primed human CD4⁺IL-7Rhi T cells. *Eur J Immunol* 38: 30-9
 61. Schwendemann J, Choi C, Schirmacher V, Beckhove P. 2005. Dynamic differentiation of activated human peripheral blood CD8⁺ and CD4⁺ effector memory T cells. *J Immunol* 175: 1433-9
 62. Deaglio S, Aydin S, Vaisitti T, Bergui L, Malavasi F. 2008. CD38 at the junction between prognostic marker and therapeutic target. *Trends Mol Med* 14: 210-8
 63. Savarino A, Bottarel F, Malavasi F, Dianzani U. 2000. Role of CD38 in HIV-1 infection: an epiphenomenon of T-cell activation or an active player in virus/host interactions? *Aids* 14: 1079-89
 64. Malavasi F, Deaglio S, Funaro A, Ferrero E, Horenstein AL, Ortolan E, Vaisitti T, Aydin S. 2008. Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology. *Physiol Rev* 88: 841-86
 65. Deaglio S, Morra M, Mallone R, Ausiello CM, Prager E, Garbarino G, Dianzani U, Stockinger H, Malavasi F. 1998. Human CD38 (ADP-ribosyl cyclase) is a counter-receptor of CD31, an Ig superfamily member. *J Immunol* 160: 395-402
 66. Espinosa E, Ormsby CE, Reyes-Teran G, Asaad R, Sieg SF, Lederman MM. 2010. Dissociation of CD154 and Cytokine Expression Patterns in CD38⁺ CD4⁺ Memory T Cells in Chronic HIV-1 Infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*
 67. Choi YW, Kotzin B, Herron L, Callahan J, Marrack P, Kappler J. 1989. Interaction of Staphylococcus aureus toxin "superantigens" with human T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 8941-5

68. Lange CG, Valdez H, Medvik K, Asaad R, Lederman MM. 2002. CD4+ T-lymphocyte nadir and the effect of highly active antiretroviral therapy on phenotypic and functional immune restoration in HIV-1 infection. *Clin Immunol* 102: 154-61
69. Waldrop SL, Pitcher CJ, Peterson DM, Maino VC, Picker LJ. 1997. Determination of antigen-specific memory/effector CD4+ T cell frequencies by flow cytometry: evidence for a novel, antigen-specific homeostatic mechanism in HIV-associated immunodeficiency. *J Clin Invest* 99: 1739-50
70. Betts MR, Nason MC, West SM, De Rosa SC, Migueles SA, Abraham J, Lederman MM, Benito JM, Goepfert PA, Connors M, Roederer M, Koup RA. 2006. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. *Blood* 107: 4781-9
71. Liu Z, Cumberland WG, Hultin LE, Prince HE, Detels R, Giorgi JV. 1997. Elevated CD38 antigen expression on CD8+ T cells is a stronger marker for the risk of chronic HIV disease progression to AIDS and death in the Multicenter AIDS Cohort Study than CD4+ cell count, soluble immune activation markers, or combinations of HLA-DR and CD38 expression. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 16: 83-92
72. Appay V, van Lier RA, Sallusto F, Roederer M. 2008. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. *Cytometry A* 73: 975-83
73. Lopez M, Soriano V, Peris-Pertusa A, Rallon N, Restrepo C, Benito JM. 2010. Elite Controllers Display Higher Activation on Central Memory CD8 T Cells Than HIV Patients Successfully on HAART. *AIDS Res Hum Retroviruses*
74. Chattopadhyay PK, Yu J, Roederer M. 2005. A live-cell assay to detect antigen-specific CD4+ T cells with diverse cytokine profiles. *Nat Med* 11: 1113-7
75. Lindgren H, Axcrona K, Leanderson T. 2001. Regulation of transcriptional activity of the murine CD40 ligand promoter in response to signals through TCR and the costimulatory molecules CD28 and CD2. *J Immunol* 166: 4578-85
76. van Kooten C, Banchereau J. 2000. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol* 67: 2-17
77. Subauste CS, Wessendarp M, Smulian AG, Frame PT. 2001. Role of CD40 ligand signaling in defective type 1 cytokine response in human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 183: 1722-31
78. Levy J, Espanol-Boren T, Thomas C, Fischer A, Tovo P, Bordigoni P, Resnick I, Fasth A, Baer M, Gomez L, Sanders EA, Tabone MD, Plantaz D, Etzioni A, Monafó V, Abinun M, Hammarstrom L, Abrahamsen T, Jones A, Finn A, Klemola T, DeVries E, Sanal O, Peitsch MC, Notarangelo LD. 1997. Clinical spectrum of X-linked hyper-IgM syndrome. *J Pediatr* 131: 47-54
79. Subauste CS, Wessendarp M, Portilllo JA, Andrade RM, Hinds LM, Gomez FJ, Smulian AG, Grubbs PA, Haglund LA. 2004. Pathogen-specific induction of CD154 is impaired in CD4+ T cells from human immunodeficiency virus-infected patients. *J Infect Dis* 189: 61-70

80. Subauste CS, Subauste A, Wessendarp M. 2007. Role of CD40-dependent down-regulation of CD154 in impaired induction of CD154 in CD4(+) T cells from HIV-1-infected patients. *J Immunol* 178: 1645-53
81. Okoye A, Meier-Schellersheim M, Brenchley JM, Hagen SI, Walker JM, Rohankhedkar M, Lum R, Edgar JB, Planer SL, Legasse A, Sylwester AW, Piatak M, Jr., Lifson JD, Maino VC, Sodora DL, Douek DC, Axthelm MK, Grossman Z, Picker LJ. 2007. Progressive CD4+ central memory T cell decline results in CD4+ effector memory insufficiency and overt disease in chronic SIV infection. *J Exp Med* 204: 2171-85