



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LAS CÉLULAS T CD4+ DE MEMORIA
CENTRALES CD38⁺ Y CD38⁻ Y DE SU MODIFICACIÓN POR LA ECTOENZIMA CD38**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Q.F.B ROMERO RODRÍGUEZ JESSICA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. HÉCTOR ENRIQUE ESPINOSA ARCINIEGA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DRA. YVONNE ROSENSTEIN AZOULAY
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. 2023



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
BIOMEDICINA**

**CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LAS CÉLULAS T CD4+ DE MEMORIA
CENTRALES CD38⁺ Y CD38⁻ Y DE SU MODIFICACIÓN POR LA ECTOENZIMA CD38**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Q.F.B ROMERO RODRÍGUEZ JESSICA

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. HÉCTOR ENRIQUE ESPINOSA ARCINIEGA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

COMITÉ TUTOR:

**DRA. YVONNE ROSENSTEIN AZOULAY
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM**

**DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. 2023

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ENTIDAD FACULTAD DE MEDICINA

OFICIO CPCB/164/2023

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora 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 **28 de noviembre de 2022** aprobó la ratificación del jurado asignado en el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 27 de mayo de 2019, para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biomedicina** de la estudiante **ROMERO RODRÍGUEZ JESSICA** con número de cuenta **309215778** con la tesis titulada **“CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LAS CÉLULAS T CD4+ DE MEMORIA CENTRALES CD38+ Y CD38- Y DE SU MODIFICACIÓN POR LA ECTOENZIMA CD38”**, realizada bajo la dirección del **DR. HÉCTOR ENRIQUE ESPINOSA ARCINIEGA**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. EDMUNDO DE IBIS LAMOYI VELÁZQUEZ
Vocal: DRA. LOURDES ANDREA ARRIAGA PIZANO
Vocal: DRA. PAULA LICONA LIMÓN
Vocal: DR. FEDERICO ÁVILA MORENO
Secretario: DRA. YVONNE ROSENSTEIN AZOULAY

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

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 03 de febrero de 2023

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



Agradecimientos institucionales

- Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM
- A CONACYT por la beca de posgrado 817043 otorgada, lo que me permitió tener dedicación exclusiva al posgrado.
- Al Posgrado en Ciencias Biológicas por el apoyo PAEP que me permitió asistir al congreso: The XII Congress of ALAI & XXIII Congress of SMI (Cancún, mayo de 2018).
- A la Dra. Yvonne Rosenstein Azoulay, al Dr. Alejandro Zentella Dehesa y al Dr. Enrique Espinosa Arciniega por formar parte de mi comité tutorial, por su tiempo, confianza y todas las valiosas contribuciones que me permitieron crecer profesional y personalmente.

Agradecimientos

Gracias al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” y a su valioso personal, por brindarme las herramientas necesarias para llevar a cabo el desarrollo de este trabajo.

Gracias a los doctores: Dr. Álvaro Marín, Dr. Joel Vázquez, Dra. Rosario Pacheco y Dr. Eduardo Montes por su valiosa contribución para el desarrollo de este trabajo.

Gracias a Dámaris por su incansable colaboración en este trabajo, por sus valiosos consejos y su incondicional apoyo.

Gracias a Gustavo por todo el apoyo brindado, la asesoría y los buenos momentos.

Gracias a Fernanda, Mónica, Laura y Fernando; hicieron de mi estancia en el laboratorio una estupenda experiencia, sin ustedes llegar hasta este punto no habría sido posible. Tuve la fortuna de encontrar en ustedes algo más que compañeros de trabajo.

Gracias a Daniel Huerta por su valiosa participación en el desarrollo de los experimentos de este proyecto.

A mis amigos por su apoyo incondicional, por todos los buenos y malos momentos compartidos y por acompañarme en una de las experiencias más importantes de mi vida.

Gracias a Carlos, por su incansable apoyo y todos los consejos brindados. Los momentos más complicados de estos últimos años han sido más llevaderos gracias a tu compañía.

Gracias a toda mi familia por su esfuerzo, paciencia y apoyo incondicional, sin ustedes no habría sido posible llegar a este punto. A mi abuelo, porque su vida marcó la mía.

Índice

Abreviaturas

| | |
|---|----|
| 1. Resumen..... | 1 |
| 2. Abstract..... | 3 |
| 3. Introducción..... | 5 |
| I. CD38: Estructura y distribución..... | 5 |
| II. CD38 y activación..... | 6 |
| III. CD38 como receptor..... | 7 |
| IV. CD38 como enzima..... | 9 |
| V. CD38 involucrado en la patogénesis..... | 10 |
| V. CD38 y su papel en la patogénesis del VIH..... | 13 |
| VI. Células T centrales de memoria en la infección por VIH..... | 14 |
| VII. Antecedentes directos..... | 16 |
| VIII. Pregunta de investigación..... | 17 |
| 4. Hipótesis..... | 18 |
| 5. Objetivos..... | 18 |
| 6. Metodología..... | 19 |
| I. Purificación de las células TCD4+ centrales de memoria CD38 ⁺ y CD38 ⁻ | 19 |
| II. Ensayo de PCR multiplex..... | 20 |
| III. Ensayo qPCR..... | 21 |
| IV. Determinación de la concentración inhibitoria de Ara-2'-F-NAD ⁺ en células con morfología de linfocitos y expresión de la proteína CD38..... | 21 |
| V. Purificación de las células TCD4+ centrales de memoria y cultivo bajo las distintas condiciones experimentales..... | 22 |
| VI. Tinción para ensayos de proliferación y estimulación de células TCM..... | 23 |
| VII. Determinación de las variables de interés: Proliferación, supervivencia y diferenciación de las células TCM a células TEM..... | 24 |
| 7.-Resultados..... | 26 |
| I. El perfil transcripcional de las células CD38 ⁺ y CD38 ⁻ tiene alta similitud en condiciones basales; no obstante, refleja importantes diferencias en respuesta ante un estímulo antigénico..... | 26 |
| II. Las células TCM CD38 ⁻ responden a la estimulación vía TCR produciendo más IL-2, IFN- γ y CD40L comparadas con las células CD38 ⁺ | 30 |
| III. La proteína CD38 localizada en la superficie de linfocitos TCD4+ posee actividad NADasa, la cual es inhibida en presencia del compuesto Ara-2'-F-NAD ⁺ | 33 |
| IV. Determinación de pureza de las células TCM aisladas por selección inmunomagnética..... | 34 |

| | |
|--|----|
| V. Estrategia de análisis para la evaluación del impacto de la expresión de CD38 en células TCM en las variables: supervivencia, proliferación y diferenciación a células TEM, cultivadas por 7 días en condiciones basales (medio) o bajo estimulación a través del TCR. | 36 |
| VI. La estimulación vía TCR promueve la supervivencia de las células TCM en cultivo in vitro | 42 |
| VII. Las células CD38+ poseen mayor capacidad de proliferación tanto en condiciones basales, como bajo estimulación a través del TCR..... | 43 |
| VIII. Las células CD38- tienden a diferenciarse hacia células TEM tanto en condiciones basales como en condiciones de estimulación a través del TCR. | 47 |
| 8. Discusión..... | 49 |
| 9. Conclusiones..... | 55 |
| Referencias bibliográficas..... | 56 |

Abreviaturas

| | |
|--------------------------------|--|
| ADP | Adenosina difosfato |
| ADPR | Adenosina difosforibosa |
| APC | Célula presentadora de antígeno |
| Ara-2'-F-NAD+ | Dinucleótido de adenina nicotinamida b-ara-2-deoxi-2'-Fluor |
| B2M | Beta-2 microglobulina |
| Bcl2 | Linfoma de células B |
| Bcl-XI | Linfoma de células B extra largo |
| BCR | Receptor para antígeno en células B |
| BD | Becton Dickinson |
| cADPR | Adenosín difosforibosa cíclico |
| CCR5 | Receptor para quimiocina tipo 5 |
| CD40L | Ligando de CD40 |
| cDNA | DNA complementario |
| CMV | Citomegalovirus |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| e-NAD | Nicotinamida 1,N6 eteno adenin dinucleótido |
| FACS | Clasificación de células basada en fluorescencia |
| FDA | Administración de alimentos y medicamentos |
| FITC | Isotiocianato de fluoresceína |
| FMO | Control de fluorescencia menos uno |
| HLA II | Antígeno de leucocitos humanos clase II |
| HLADR | Antígeno de leucocitos humanos DR |
| IFN-γ | interferón gamma |
| IL-1b | Interleucina 1 beta |
| IL-2 | Interleucina 2 |
| Ki | Constante de inhibición |
| PBA | Buffer de fosfatos adicionado con albúmina sérica bovina al 1% |
| PBMC | Células mononucleares de sangre periférica |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |

| | |
|--------------------|--|
| PE | Ficoeritrina |
| PerCP Cy5.5 | Peridin Clorofil proteína cianina 5.5 |
| PPARg | Receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas |
| R0 | Ronda de proliferación R0 |
| R1 | Ronda de proliferación R1 |
| R8 | Ronda de proliferación R8 |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| rSD | Desviación estándar robusta |
| SASPs | Fenotipo secretorio asociado a la senescencia |
| SEB | Enterotoxina B de estafilococos aureus |
| SFB | Suero fetal bovino |
| SIDA | Síndrome de inmunodeficiencia humana |
| SIRT1 | Sirtuina 1 |
| SIRT3 | Sirtuina 3 |
| SIV | Virus de la inmunodeficiencia del simio |
| SYK | Tirosina cinasa de bazo |
| TCM | Células T centrales de memoria |
| TCR | Receptor de células T |
| TEM | Células efectoras de memoria |
| TNF-a | Factor de necrosis tumoral alfa |
| TRPM2 | Receptor de potencial transitorio melastin-2 |
| VIH | Virus de la inmunodeficiencia humana |

1. Resumen

Introducción: Las alteraciones en la concentración de NAD⁺ pueden impactar la funcionalidad de las células T, ocasionando incluso su muerte. El marcador de activación CD38, es una enzima cuyo principal sustrato es NAD⁺ y tiene una alta eficiencia en su degradación, pudiendo hidrolizar hasta 100 moléculas de NAD⁺ para la generación del producto cADPR. La sobreexpresión de CD38 se ha asociado con diversas patologías por lo que ha sido el eje de estudio de diversas investigaciones, los hallazgos más recientes lo postulan como un importante inmunorregulador.

Estudios previos de nuestro grupo han evidenciado que los linfocitos TCM CD38⁺ tienen un patrón de expresión de citocinas atípico en células de memoria con una disminución en la expresión de IL-2 y aumento en IFN γ . Así mismo, incremento en el arresto de las células TCM en la fase G2/M del ciclo celular que eventualmente conduce a la muerte celular. En el presente estudio se detectó aumento considerable en la expresión de CD38, sin embargo, se carece de evidencia que vincule a CD38 como un agente causal en las observaciones previas.

No obstante, el presente trabajo evaluó la participación de CD38 en la funcionalidad de las células TCM a través de la determinación de los parámetros de supervivencia, proliferación y diferenciación de las células TCM hacia células TEM. Las determinaciones se realizaron en muestras de sujetos VIH- con la finalidad de analizar la actividad de CD38 como única variable de estudio. Adicionalmente, se planteó que de existir una participación directa de CD38 en la alteración de estos parámetros, sería a través de su actividad enzimática y se evaluó la respuesta de las células ante la inhibición enzimática de CD38.

Métodos: Se comparó la expresión de 63 genes mediante ensayos de PCR multiplex, así como la expresión de IL-2 e IFN- γ mediante ensayos de PCR convencional, en células TCM CD38⁺ y CD38⁻ provenientes de sujetos sanos, descartando el aporte de la propia infección y trabajando con la expresión de CD38 como única variable de estudio. Las determinaciones se realizaron en condiciones basales y bajo estimulación vía TCR. Los resultados fueron sometidos a un análisis de enriquecimiento funcional empleando IPA seguido de un análisis de las interacciones proteína-proteína mediante STRING.

Se evaluó la actividad catalítica de las moléculas CD38 expresadas en los linfocitos T humanos empleando un análogo fluorescente de NAD⁺, siguiendo la acumulación del producto por ensayos de fluorimetría. Adicionalmente, se determinó el papel de CD38 en la homeostasis de la respuesta inmune de las células TCM mediante el análisis por citometría de flujo de los parámetros de supervivencia, proliferación y diferenciación hacia células T efectoras de memoria. El análisis se realizó en ambos tipos de células TCM CD38⁺ y CD38⁻ cultivadas por siete días en condiciones basales o bajo estimulación vía TCR (α-CD3/CD28 e IL-2).

Se determinó la concentración inhibitoria del compuesto Ara-2'-F-NAD en condiciones basal y estimuladas vía TCR y se evaluó su efecto en los parámetros de supervivencia, proliferación y diferenciación posterior a siete días de cultivo in vitro.

Resultados: Se detectó un total de 20 genes con expresión diferencial entre células CD38⁺ vs., CD38⁻ en condiciones de estimulación. Mientras que nuestro análisis de predicción mostró la posible interacción entre 10 de estos genes con la regulación de procesos pro-apoptóticos. Nuestros análisis también predicen regulación positiva en la expresión de citocinas con la expresión del transcrito para el gen ADORA2A, el cual podría estar vinculado a la generación de adenosina, el cual representa un inmunoregulador potente asociado con alteraciones en la proliferación celular y disminución en la producción de IFN γ en células T.

Posteriormente, comprobamos que las moléculas CD38 localizadas en la superficie de linfocitos TCM de humano, poseen actividad enzimática y que esta puede ser inhibida por la adición de Ara-2'-F-NAD⁺ a una concentración equivalente a 1,000 Kis. La determinación de los parámetros supervivencia, proliferación y diferenciación, muestran un escenario donde las células CD38⁺ muestran tendencia a mayor supervivencia, aún en ausencia de estímulo y que la estimulación vía TCR mejora la capacidad de supervivencia de ambas poblaciones celulares.

Conclusión: Se comprobó que la proteína CD38 localizada en linfocitos TCM humanos posee actividad catalítica y su expresión no representa un factor que contribuya a la disminución en la supervivencia de las células TCM bajo condiciones no-patológicas. Mientras que ambas poblaciones CD38⁺ y CD38⁻ aún bajo el mismo grado de diferenciación exhiben comportamientos distintos que podrían constituir un mecanismo de cooperación donde las células CD38⁺ tienden a conservar

propiedades de células centrales de memoria con alta capacidad proliferativa y de sobrevivencia, por su parte las células CD38⁻ poseen tendencia a diferenciarse y eventualmente adquirir características propias de una célula de memoria efectora.

2. Abstract

Introduction: Alterations in the concentration of NAD⁺ can change T cell functionality, even causing cell death. The activation marker CD38, is an enzyme whose main substrate is NAD⁺ and has a high efficiency in its degradation, being able to hydrolyze up to 100 molecules of NAD⁺ for the generation of the cADPR product. Overexpression of CD38 has been associated with different pathologies so it has been the axis of study of many investigations, the most recent findings suggest this molecule as an important immunoregulator.

In previous studies we have found evidence that CD38⁺ TCM lymphocytes have an atypical cytokine expression pattern in memory cells with decreased IL-2 expression and increased IFN γ in HIV infected patients and healthy subjects. In addition, we previously reported an increase in G2/M cell cycle arrest that eventually leads to cell death. A considerable increase in CD38 expression was observed in this study, however, there is a lack of evidence linking CD38 as a causative agent in previous observations.

This work evaluated the role of CD38 expression in the activity of TCM cells through the determination of the following parameters: survival, proliferation, and differentiation of TCM cells to TEM cells. The determinations were made in samples of healthy subjects to analyze the activity of CD38 as the only study variable. Additionally, it was proposed that if there is a direct role of CD38 in the alteration of these parameters, it would be through its enzymatic activity and the response of cells to the enzymatic inhibition of CD38 was evaluated.

Methods: The expression of 63 genes by multiplex PCR and the expression of IL-2 and IFN- γ by conventional PCR in CD38⁺ and CD38⁻ TCM cells of healthy donors were compared, working with CD38 expression as the only study variable. The determinations were performed at baseline and under stimulation via TCR. The results were subjected to a functional enrichment analysis using IPA followed by an analysis of protein-protein interactions by STRING.

Catalytic activity of the CD38 molecule in T lymphocytes was evaluated using a fluorescent analogue of NAD⁺, following the accumulation of the product by fluorometry. Additionally, the role of CD38 in the homeostasis of the immune response of TCM cells was determined by flow cytometry analysis of the following parameters: survival, proliferation, and differentiation to memory effector T cells in CD38⁺ and CD38⁻ TCM cells cultured for seven days at baseline or under stimulation via TCR (α-CD3/CD28 and IL-2).

The inhibitory concentration of the compound Ara-2'-F-NAD⁺ was determined at baseline and stimulated via TCR and its effect on survival, proliferation and differentiation parameters was evaluated after seven days in culture.

Results: We found a total of 20 genes with significantly higher expression in CD38⁺ cells compared with CD38⁻ cells after TCR engagement. Prediction analysis shows that the possible interaction between 10 of these genes is associated with the regulation of apoptotic processes. The analysis also predicts a positive regulation in cytokine expression and transcript expression for ADORA2A, which could be linked to the generation of adenosine, an immunoregulator associated with alterations in proliferation and decreased production of IFN γ in T cells.

Subsequently, it was found that CD38 molecules located on the surface of TCM lymphocytes have enzymatic activity and that this can be inhibited by the addition of Ara-2-F'-NAD⁺ at a concentration equivalent to 1,000 Kis.

The determination of survival, proliferation and differentiation parameters show a scenario in which CD38⁺ cells tend to survive longer, even in the absence of a stimulus and that stimulation via TCR improves the survival capacity of both populations.

Conclusions: This study demonstrates that the CD38 protein located in human TCM lymphocytes membrane has catalytic activity, and it was observed that CD38 expression alone is not a contributing factor to decreased survival of TCM cells under non-pathological conditions. CD38⁺ and CD38⁻ cells, even under the same degree of differentiation, exhibit different behaviors that could constitute a cooperation mechanism in which CD38⁺ cells tend to retain properties of central memory cells with high proliferative and survival capacity, while CD38⁻ cells would be more likely to differentiate and eventually acquire characteristics of an effector memory cell.

3. Introducción

La molécula CD38 se encuentra ampliamente distribuida en el organismo del ser humano. Esta molécula se ha descrito como un receptor cuyo ligando es CD31 y como ectoenzima cuyo sustrato es NAD⁺. Las evidencias muestran que estas dos propiedades no son excluyentes una de la otra, pudiendo actuar de forma simultánea (Vaisitti et al. 2015). Desde su identificación (Reinherz y Schlossman, 1980), CD38 ha sido ampliamente empleado como un marcador de activación en el contexto de activación de células T, sin embargo, poco se sabe respecto a su papel activo en este proceso. Más aun a la luz de investigaciones recientes que han puesto de manifiesto que CD38 desempeña un papel importante como regulador del inmunometabolismo de linfocitos T (Hogan, Chini, y Chini 2019; Chatterjee et al. 2018).

I. CD38: Estructura y distribución

CD38 es una glicoproteína de superficie tipo II con un peso de ~45 kDa. En humanos, el gen que codifica para esta proteína se sitúa en el brazo corto del cromosoma 4 (Chr:4p15) dando origen a una proteína de 300 aminoácidos conformada por un pequeño dominio intracelular (20 aa), una hélice transmembrana (23 aa) y una porción extracelular significativamente más larga (257 aa) (Fabio Malavasi et al. 2008) (Morandi et al. 2019). Fue descubierta en 1980 por Reinherz y Schlossman. Los investigadores describieron que la molécula que reaccionaba con el anticuerpo monoclonal OKT10, ahora conocida como CD38, era expresada por una gran porción de timocitos (95%) y en cambio sólo una pequeña fracción de los linfocitos localizados en periferia conservaba la expresión de CD38. Además, se observó que un gran número de células de médula ósea también expresaban dicho marcador, sugiriendo con ello que su expresión no estaba limitada al linaje de linfocitos T y podría ser considerado como un antígeno de diferenciación temprana (Reinherz et al. 1980).

Las evidencias actuales muestran que CD38 se distribuye ampliamente entre las subpoblaciones del linaje linfóide y mielóide (Fabio Malavasi et al. 2008) (Glaría y Valledor 2020) y que el nivel de expresión de CD38 en las distintas subpoblaciones celulares dependerá de su estado de maduración y activación (Kar, Mehrotra, y Chatterjee 2020). La expresión de CD38 no se restringe al sistema inmunológico y se puede hallar en distintos tipos de células y órganos tales como: células epiteliales,

próstata, páncreas, pericardio, túbulo renal, cornea, músculo liso y estriado e incluso en neuronas (Fabio Malavasi et al. 2008). Para fines de este trabajo nos enfocaremos en el estudio de CD38 en el sistema inmune y específicamente en su estudio en células T.

La expresión de CD38 en linfocitos T ocurre desde las primeras etapas del desarrollo de linfocitos T (dobles positivos) y su expresión se mantiene en células *naive* (Fabio Malavasi et al. 2008; Dianzani et al. 1994), en tanto que en células T de memoria la expresión de CD38 disminuye e incluso puede ser nula, no obstante, se ha observado que las células activadas incrementan la expresión de CD38 (Fabio Malavasi et al. 2008; F. Malavasi et al. 1994).

II. CD38 y activación

Los primeros indicios respecto a la inducción de CD38 en linfocitos T bajo condiciones de activación surgieron del trabajo de Schlossman y colaboradores (1981). Los investigadores observaron que en humanos, los linfocitos T CD4+ y CD8+ de sangre periférica, inicialmente con niveles bajos de CD38, aumentaban la expresión de CD38 al ser estimulados con el mitógeno "concavalina A" (Terhorst et al. 1981). En un abordaje posterior, se evaluó la cinética de expresión de CD38 en respuesta a distintos estímulos, encontrando que la cinética de expresión era muy similar entre un mitógeno (PHA) y estímulo aloantigénico, y que, en cambio, había un retraso en la cinética de expresión cuando se trataba de un antígeno soluble (toxoides tetánico). Adicionalmente, al comparar las cinéticas de expresión en las células CD4+ y CD8+ se observó que sólo células CD4 son capaces de inducir una respuesta en presencia de un antígeno soluble (Hercend et al. 1981). Estas observaciones llevaron al establecimiento de CD38 como un marcador de activación de linfocitos T.

Actualmente CD38 es ampliamente aceptado como un marcador de activación de linfocitos T, junto con otros marcadores asociados también al estado de activación destacando entre otros CD69, CD25, CD71, proliferación, etc. (Reddy et al. 2004).

Como se ha mencionado con anterioridad, hasta el momento se han descrito dos funciones principales para CD38: enzima y receptor.

III. CD38 como receptor

Se ha descrito que CD38 puede actuar como receptor mediante la interacción con anticuerpos monoclonales agonistas y CD31 descrito como el ligando no sustrato de CD38 (Fabio Malavasi et al. 2008). En este sentido la molécula CD31 (PECAM-1) es una glicoproteína transmembrana de 130 kDa presente en distintas estirpes celulares (células T, NK, monocitos y plaquetas) y se expresa de forma constitutiva en células del endotelio. La interacción de CD38 localizado en la superficie de las células y CD31 en endotelio, media eventos de adhesión celular. La adhesión mediada por CD38 es débil, lo que permitiría a las células rodar sobre la monocapa de células endoteliales, análogo a la actividad de las selectinas, sin embargo, su actividad se ve sobrepasada por la función de las integrinas. La adhesión mediada por CD38 sería efectiva únicamente en condiciones en las que las interacciones mediadas por integrinas se encuentran disminuidas (Mehta y Malavasi 2000).

Experimentos realizados con anticuerpos monoclonales agonistas anti-CD38 han concluido que la respuesta a la estimulación de CD38 está en función del tipo de célula analizada:

En monocitos se ha observado que la unión del anticuerpo agonista IB4, así como el ligando CD31, da lugar a la liberación de las citocinas: IL-1b, IL-6 e IL-10. La respuesta a la estimulación de CD38 fue independiente de los receptores Fc gama, FcγRI (CD64) y FcγRII (CD32) (Lande et al. 2002).

En médula ósea CD38 inhibe la hematopoyesis de células B (Kumagai et al. 1995), por su parte protege de apoptosis a las células B maduras del centro germinal a través de la regulación de Bcl-2 de forma análoga a CD40L, sin embargo, las evidencias muestran que CD38 no incrementa la proliferación aún en presencia de otros agentes como IL-4 (Zupo et al. 1994).

En células T se tiene evidencia de que la activación de CD38 a través del anticuerpo agonista IB4 da como resultado la generación de las citocinas: IL-6, IL-10, IFN-γ y en menor medida IL-10 e IL-2, además se ha observado que la generación de citocinas se encuentra disociado de la proliferación de las células T (Ausiello et al. 1996).

Las evidencias muestran que CD38 suele estar asociado a otras moléculas de superficie tales como TCR, BCR y CD16 (Funaro et al. 1993), e incluso se ha

propuesto que las respuestas a la ligación con anticuerpos monoclonales son dependientes de la actividad de estas otras moléculas especializadas en señalar (Morra et al. 1998); se sabe que el tallo intracelular de CD38 es de apenas 20 aminoácidos. Por su parte el trabajo de Deaglio y colaboradores, en linfocitos T de lámina propia, evidencio una nueva propuesta en la que CD38 sería capaz de señalar aún en células que responden de manera deficiente a la señalización vía TCR, en este trabajo se pudo evaluar la fosforilación de LCK, LAT y SYK en respuesta a la ligación de CD38 (Deaglio et al. 2001), no obstante, aún es necesario realizar más ensayos para responder como es que CD38 señala en ausencia de otras moléculas.

A pesar de las evidencias que se tienen sobre CD38 como receptor, aún es necesario aclarar cuál es la vía de señalización que emplea CD38 y el grado de dependencia de otras moléculas especializadas en señalar. El hallazgo de que el sitio de unión de los anticuerpos agonistas de CD38 albergan el sitio catalítico de CD38 ha llevado a proponer una interdependencia entre la actividad de receptor y enzima, esta hipótesis es reforzada por los hallazgos de Vaissiti et al, ensayos en células de leucemia linfocítica crónica muestran que los procesos de quimiotaxis, adhesión y movilización de calcio en respuesta a la estimulación de CD38 son dependientes de la actividad enzimática de CD38 dado que estas respuestas se ven alteradas en presencia de un inhibidor de la actividad enzimática de CD38. Adicionalmente, se propone que los flujos de calcio mediados por la actividad enzimática de CD38 en los receptores TRPM2 son críticos para la unión de CD38 con su ligando no sustrato, CD31 (Vaisitti et al. 2015).

Las evidencias antes citadas, nos muestran que CD38 es una molécula compleja con la capacidad de asociarse a otras moléculas que por su naturaleza son eficientes en señalar, no obstante, no se descarta la posibilidad de que bajo determinadas condiciones CD38 sea capaz de señalar aún en ausencia de estas moléculas. Las dos funciones conocidas para CD38 pueden colaborar, presumiblemente para potenciar la actividad de receptor. Sin embargo, es necesario ampliar el estudio celular-molecular para dilucidar en qué condiciones se da esta cooperación, bajo una relación funcional bidireccional.

IV. CD38 como enzima

Respecto a su papel como ectoenzima se sabe que CD38 se encuentra filogenéticamente relacionada a la enzima ADP-ribosil ciclasa de *Aplysia californica*.

CD38 es una ectoenzima bifuncional: es una ADP ribosil ciclasa (NAD-cADPR) a la vez que una NADasa. La porción extracelular de CD38 alberga el sitio catalítico que le otorga las características de ADP (adenosina difosfato) ribosil ciclasa, localizado en el residuo Glu-226 (Fabio Malavasi et al. 2008). Mediante su actividad de ADP-ribosiltransferasa sintetiza ADP-ribosa cíclico (cADPR) a partir de dinucleótido nicotinamida y adenina (NAD⁺) e hidroliza cADPR para producir adenosin difosforribosa (ADPR). Bajo condiciones ácidas, CD38 cataliza la síntesis de ácido nicotinadenin-fosfato-dinucleótido (NAADP) empleando como sustrato nicotinamida adenin dinucleótido (NADP⁺) (Lee 2006). Sin embargo, la actividad de NADasa (removedor de NAD⁺) es cien veces mayor que su actividad de ADP ribosil ciclasa, por lo que, se ha considerado una posible implicación de CD38 en patologías asociadas con la disminución en las concentraciones de NAD⁺ como el envejecimiento, resistencia a la insulina, enfermedades neurodegenerativas asociadas al envejecimiento, alteraciones en el metabolismo hepático (Xie et al. 2020) y osteoporosis (C. C. S. Chini et al. 2020a).

Adicionalmente, CD38 también puede estar presente como una proteína tipo III en la que el sitio catalítico (c-terminal) se localiza al interior de la célula. En condiciones fisiológicas se ha observado que su distribución en PBMC's es baja (2.5%) en comparación con la expresión de CD38 en su forma de proteína de clase II (Lee, 2012). El hecho de que ambos tipos se puedan encontrar en una misma célula lleva a la consideración de que la forma III podría estar regulando los niveles de NAD⁺ al interior de la célula y a través de sus metabolitos de catálisis mediar la movilización de Ca²⁺ intracelular, en tanto que la conformación II estaría asociada principalmente a la regulación de los niveles de NAD⁺ de forma extracelular. Este escenario fue recientemente estudiado por Chini y colaboradores quienes proponen que CD38 tiene un papel dual en la homeostasis de NAD⁺. Por un lado la actividad intracelular de CD38 regula la homeóstasis de NAD⁺ al interior de la célula, en tanto que la actividad ecto enzimática regula la disponibilidad de los precursores de NAD⁺, nicotinamin mononucleótido "NMN" (C. C. S. Chini et al. 2020a). Cabe cuestionarse sí bajo

condiciones patogénicas, la sobreexpresión de CD38, al menos a nivel extracelular, podría estar limitando la disponibilidad de NAD⁺ a células vecinas y los efectos que esto tendría en ausencia de un mecanismo de rescate en el resto de las células. Adicionalmente, surge la interrogante de si bajo condiciones de activación además de inducir un incremento en la expresión de CD38 extracelular, también se logra inducir un incremento en la forma intracelular.

V. CD38 involucrado en la patogénesis

CD38 en leucemias

La expresión de CD38 ha sido ampliamente estudiada en distintos tipos de leucemias. En este sentido, en leucemia linfocítica crónica (LLC), caracterizada por la acumulación de linfocitos B CD5⁺ en médula ósea, sangre y órganos linfoides secundarios, la expresión de CD38 resulta un marcador de pobre prognosis donde la sobre- expresión está relacionada con el desarrollo clínico más agresivo, baja respuesta al tratamiento y menor supervivencia global (Konen, Fradette, y Gibbons 2019) (Dürig et al. 2002).

En mieloma múltiple (MM), enfermedad ocasionada por la acumulación en médula ósea de células plasmáticas transformadas que ocasionan lesiones en el tejido óseo, se ha observado que las células plasmáticas transformadas sobreexpresan CD38 por lo que, en 2015 la FDA (Food and Drug Administration) aprobó el uso de un anticuerpo anti-CD38 (daratumumab) como un agente terapéutico para el tratamiento de esta enfermedad (Zannetti et al. 2020) (García-Guerrero et al. 2021).

CD38 en enfermedades autoinmunes

En pacientes con lupus eritromatoso se ha observado un incremento en la expresión de CD38 en células T CD4⁺, CD8⁺ o CD25⁺ comparado con los niveles observados en controles (Pavón et al. 2013). Además, recientemente se ha reportado un incremento en la expresión de CD38 en células T CD8⁺ de pacientes con lupus, adicionalmente estas células muestran una actividad citotóxica defectuosa, lo que, podría suponer que bajo estas condiciones los pacientes serían más propensos a desarrollar infecciones (Katsuyama et al. 2020).

CD38 en obesidad

En fechas recientes se ha investigado el papel de CD38 en la obesidad empleando modelos murinos, destacando la participación de CD38 en la modulación de la adipogénesis y lipogénesis a través de una vía que involucra a la sirtuina 1 (SIRT1) y receptores gamma activados por proliferadores peroxisomales (PPAR γ). En estos estudios, se ha observado que los animales deficientes de CD38 son resistentes a la obesidad inducida por una alimentación alta en grasas (Barbosa et al. 2007). De acuerdo con estos estudios, la deficiencia de CD38 permitiría que hubiera más NAD⁺ disponible para la SIRT1, que lo emplea como sustrato, a su vez la SIRT1 inhibe la actividad de PPAR γ , el cual se considera un regulador maestro en la diferenciación de adipocitos (Wang et al. 2018).

CD38 en envejecimiento

En un primer abordaje respecto al papel de CD38 en el envejecimiento, se observó una estrecha relación entre la disminución de NAD⁺ asociada a la edad y la expresión de CD38 siendo que hay una mayor expresión y actividad NADasa de CD38 en los tejidos de los animales de mayor edad. En este caso, la actividad NADasa de CD38 limitaría la concentración de NAD⁺ disponible para la sirtuina 3 (SIRT3), enzima responsable del correcto funcionamiento mitocondrial regulando la producción de enzimas reactivas de oxígeno, lo que ocasionaría las disfunciones mitocondriales asociadas al envejecimiento (Camacho-Pereira et al. 2016).

Aunado a lo anterior, el estado de inflamación sistémica (no asociada a una infección) característico del envejecimiento es fuente de citocinas inflamatorias, como SASPs (fenotipo secretorio asociado a la senescencia); IL-8, IL-6, IL-1 β , IFN- γ , TNF- α , las cuales pueden inducir la expresión y actividad de CD38. De manera que en el envejecimiento, la inflamación inmune y los SASPs serían los responsables del incremento en la actividad y expresión de CD38, vinculada a las disfunciones inmunes relacionadas a la edad (C. Chini et al. 2019) (Covarrubias et al. 2019).

Finalmente, los hallazgos más recientes han añadido evidencia para crear un escenario cada vez más completo respecto al papel que desempeña CD38 en la disminución de NAD⁺ en el contexto del envejecimiento. En estos trabajos, se ha observado un incremento en la expresión de CD38 en clusters de células inmunes,

principalmente localizados en el tejido blanco adiposo e hígado. Dentro de las células inmunes, los macrófagos CD38+, con un fenotipo pro-inflamatorio M1, serían los mayores contribuyentes para la disminución de NAD+ en tejido (Covarrubias et al. 2021). La inducción de CD38 en estas células estaría directamente asociada a la presencia de SASPs liberados por células senescentes. Adicionalmente, el incremento en CD38 en las células inmunes regularía la disponibilidad a dos niveles: la actividad intracelular de CD38 regularía la disponibilidad de NAD+ al interior de la célula, en tanto que la actividad extracelular podría limitar la disponibilidad de mononucleótido de nicotinamida (NMN), un precursor de NAD+, a otras células (C. C. S. Chini et al. 2020b).

Estas observaciones han sentado el precedente para considerar a CD38 como un blanco terapéutico. Tarragó y colaboradores (2018) describen el uso de 78c, una pequeña molécula que inhibe a CD38, con la finalidad de revertir las alteraciones mitocondriales asociadas a la edad, ocasionadas por una disminución en la concentración de NAD+ mediada por la actividad NADasa de CD38. De acuerdo a sus resultados, a través de la inhibición de CD38 se logran mejorar diversos parámetros fisiológicos y metabólicos alterados en el envejecimiento (función muscular, función cardíaca, tolerancia a la glucosa, etc.) (Tarragó et al. 2018). Estos resultados nos hacen cuestionar si la inhibición de CD38 podría ser un blanco terapéutico en diferentes eventos patológicos en los que existe asociación entre la sobreexpresión de CD38 con un pobre desenlace, como ocurre en los procesos de infección viral como es el caso del VIH.

CD38 en infecciones virales

Durante las infecciones virales agudas (citomegalovirus, varicela, influenza, etc.) se observa un incremento en la población de células T CD8+ con un fenotipo activado, caracterizado por un incremento considerable en los niveles de expresión de CD38, así como de otros marcadores de activación tales como HLA-II y CD25. Sin embargo, unas semanas después (3-6) de la resolución de la infección, la población de linfocitos CD8+CD38+ retorna a los niveles de expresión basales (Bofill y Borthwick 2000). En

algunas infecciones como es el caso de influenza, se ha observado que la prevalencia del estado de activación de las células TCD8+, determinado por la co-expresión de CD38 y HLADR, se asocia con un desenlace poco favorable en el curso de la enfermedad(Fox et al. 2012). En estos contextos la evaluación de CD38 se restringe a su papel como un marcador del estado de activación de las células, no obstante, y dado que se ha reportado que CD38 puede también participar en la regulación de la adhesión y migración celular, no se descarta la posibilidad de que CD38 pueda también participar en la resolución de la infección.

En infecciones crónicas como las resultantes por el virus de hepatitis B o de hepatitis C no se ha observado que la expresión de CD38 sufra variaciones considerables(Bofill y Borthwick 2000). En cambio, en el caso de VIH, CD38 destaca como un importante factor predictivo para el curso de la infección (Fabio Malavasi et al. 2008).

V.CD38 y su papel en la patogénesis del VIH

En el contexto de la infección por VIH, la sobreexpresión de la molécula CD38 en células T CD4 y CD8 ha destacado por su capacidad para predecir el avance la infección e inclusive la sobrevida de los pacientes. A pesar de dichas observaciones, pocos estudios han abordado el cuestionamiento de si CD38 participa activamente en la patogénesis de la infección por VIH.

El virus de inmunodeficiencia humana tiene como blanco principal a linfocitos T CD4+. Si bien es cierto que parte de la pérdida de estas células ha sido atribuido al efecto citopático del virus, existen evidencias de que la muerte de células infectadas por el virus no explica completamente el número de células que se pierden en la infección crónica, pues se estima que el número de células directamente infectadas por el VIH apenas representa entre el 0.1 y el 1% del total de células TCD4+(Douek, Roederer, y Koup 2009). En consonancia, evidencias provenientes de la infección por el virus de la inmunodeficiencia de simios (por sus siglas en inglés, SIV) han mostrado que a pesar de que la carga viral contribuye a la disminución de las células T CD4+, no es

suficiente para explicar la progresión de la infección (Chahroudi et al. 2012). Estas evidencias ponen de manifiesto la necesidad de estudiar mecanismos indirectos de patogénesis y evaluar cómo estos mecanismos podrían estar contribuyendo al avance de la infección. Dentro de los mecanismos indirectos de patogénesis que se han propuesto, destaca la activación inmune crónica (Paiardini y Müller-Trutwin 2013).

En el contexto de la infección por VIH, se han empleado diversos indicadores de activación, entre los cuales destaca la co-expresión de CD38 y HLA-DR (marcadores tardíos de activación) (Reddy et al. 2004) (Motamedi, Xu, y Elahi 2016). En un primer tiempo, se observó que los niveles de linfocitos TCD8+ bajo co-expresión de ambas moléculas son considerablemente más elevados en pacientes VIH+ en contraste de controles no infectados (Ho et al. 1993). Giorgi y colaboradores investigaron el valor predictivo de estas moléculas sobre el avance de la infección, encontrando que la sobreexpresión de CD38 en linfocitos T CD8+ puede predecir el avance de la infección a SIDA (Giorgi et al. 1993). Cuatro años más tarde, este grupo encontró que la expresión elevada de CD38 en células T CD8+ es el mejor predictor del avance a SIDA y muerte, incluso mejor que los bajos niveles de células T CD4+ y otros indicadores de activación del sistema inmune (Liu et al. 1997) y que la sola expresión de CD38 supera el valor predictivo de la carga viral en cuanto al avance de la infección (Liu et al. 1998), puesto que su valor predictivo es independiente de otras variables (Würsch et al. 2016). Las evidencias referidas con anterioridad muestran la relevancia de CD38 en el contexto de la infección por VIH. Mismo que nos permite cuestionarnos si la molécula CD38 está reflejando un proceso de patogénesis del VIH (adicional a la replicación viral), o bien si este es un participante activo en la patogénesis de la infección.

VI. Células T centrales de memoria en la infección por VIH

Dentro del total de las células TCD4+ se encuentran las células naive y las células de memoria. Las células de memoria se caracterizan por haber tenido un enfrentamiento previo al antígeno y montar una respuesta rápida y específica frente un segundo encuentro antigénico. De acuerdo con su fenotipo y función, las células de memoria pueden ser divididas en: células centrales de memoria (TCM) y células de efectoras de memoria (TEM).

Las células TCM se pueden alojar en órganos linfoides secundarios gracias a la expresión de CD62L y CCR7, además pueden recircular en sangre periférica (Xu y Larbi 2017). Estas células se caracterizan por tener una larga sobrevivencia y una alta capacidad proliferativa (Appay et al. 2008), además se caracterizan por producir niveles incrementados de IL-2 e IFN- γ (Xu y Larbi 2017).

Por otro lado, las células TEM se alojan principalmente en tejidos periféricos donde rápidamente pueden hacer frente a un segundo reto antigénico, pero tienen una limitada capacidad proliferativa y en general son células de vida corta (Appay et al. 2008).

En el contexto de la infección por VIH, las células TEM son las más susceptibles a la infección y son el blanco principal del virus. Esto debido a que además de expresar el receptor CD4 también expresan el correceptor CCR5 y la unión del virus a ambas moléculas es necesaria para infectar de manera efectiva a una célula (Grossman et al., 2006^a).

El curso natural de la infección de VIH, no controlada por terapia antirretroviral, sigue tres etapas: aguda, crónica y SIDA. Durante la fase aguda hay una pérdida rápida de las células TEM, durante la fase crónica de la infección hay una recuperación de las células TEM y aun cuando nunca alcanza los niveles observados en controles VIH, su número se mantiene estable a lo largo de la fase crónica, la cual puede tener una duración de 2-10 años. Hacia el final de la fase crónica, se puede observar una disminución abrupta de los linfocitos TCD4⁺ en sangre (<250 células/mL), lo que marca el avance a la fase del síndrome de inmunodeficiencia humana (SIDA) caracterizado por la aparición de enfermedades oportunistas (Grossman et al. 2006).

Evidencias provenientes del modelo de SIV han destacado la importancia de las células TCM como las encargadas de proliferar y diferenciarse a células de memoria efectora (Grossman et al. 2006), sosteniendo un mínimo de células TEM durante la fase crónica de la infección. Se ha observado que las células TCM pierden su capacidad proliferativa de forma progresiva (Grossman et al. 2002) que se ve reflejada en una pérdida sustancial de las células TEM (que son continuamente depletadas por el virus, además de ser intrínsecamente células de vida corta) (Grossman et al. 2006) (Appay et al. 2008), ocasionando el avance hacia la fase de SIDA (Picker et al. 2004) (Bai et al. 2012) (Okoye et al. 2007). Una de las explicaciones que se ha dado a la

pérdida de las células TCM es la muerte de estas mediada por el efecto citopático del virus (Okoye et al. 2007). Sin embargo, se sabe que la susceptibilidad de estas células para ser directamente infectadas por el virus es baja en comparación con las células TEM e incluso las células T naive (Douek, Picker, y Koup 2003).

De manera que las o las causas de la pérdida de las células TCM hacia el final de la fase crónica aún no se ha esclarecido. Se han considerado algunas propuestas tales como: muerte mediada por el efecto citopático del virus (Chun et al. 1997) (Sun et al. 2007) (Douek et al. 2002), disminución de su capacidad proliferativa (alteraciones en la producción de IL-2) (Sun et al. 2007) (Espinosa et al. 2010) y senescencia como consecuencia de la activación inmune crónica (Appay et al. 2007) (Okoye et al. 2007). No obstante, aún es necesario esclarecer la causa de las alteraciones observadas en las células TCM en pacientes infectados con VIH.

VII. Antecedentes directos

De acuerdo con los antecedentes mostrados con anterioridad, conocer cuáles son las causas que ocasionan las alteraciones previamente observadas en las células TCM en el contexto de la infección por VIH sería de gran utilidad para desarrollar estrategias que en sinergia con la terapia antirretroviral permitan una mejor calidad de vida de los pacientes VIH+. En nuestro grupo de investigación se ha estudiado a CD38 no solo como un marcador de activación sino como un posible mediador de la disfunción de las células T. En los primeros estudios se observó que las células TCM CD38+ de pacientes VIH exhiben una disociación en la expresión del marcador CD154 (CD40L) y la expresión de citocinas, estas observaciones se dieron en respuesta a una estimulación policlonal (Espinosa et al. 2010, 154) y antígeno específica (Olvera-García et al. 2014), lo que podría alterar la interacción de las células de memoria con las células presentadoras de antígeno, contribuyendo así a una respuesta inmune alterada.

Adicionalmente, se halló que las células TCM CD38+ mostraban alteraciones en la producción de citocinas, con una disminución en la expresión de IL-2 y un incremento en la producción de IFN- γ comparadas con las células TCM CD38-, tanto en condiciones basales como en un contexto de activación. Sorprendentemente, la diferencia entre células CD38+ y CD38- si bien se encontraba magnificada en

muestras de pacientes VIH+ también estaba presente en las muestras de donadores VIH-. Estas observaciones sugieren que las diferencias observadas podrían estar estrechamente asociadas a la presencia/ausencia de CD38, sin descartar un aporte de la propia infección, quizá debido a que en el contexto de la infección se esperaría un aumento en la expresión de CD38 asociado al estado de activación de las células.

En el trabajo más reciente del grupo, se comparó el transcriptoma de células TCD4+ naive, TCM y TEM de pacientes VIH+ y controles VIH-, los resultados llevaron a proponer un modelo que podría explicar la pérdida progresiva de las células TCM CD4+ en la fase crónica de la infección por VIH. De acuerdo con el modelo, las células TCM estarían entrando continuamente a un ciclo de replicación con un subsecuente arresto en la fase G2/M que las conduciría a una muerte no apoptótica. En este mismo trabajo se observó que la expresión de CD38 en células TCM de pacientes VIH+ fue mayor comparada con la observada en células de controles (Olvera-García et al. 2016). Estos hallazgos nuevamente nos llevan a cuestionarnos la contribución de la presencia (aumentada) de CD38 a las alteraciones observadas en las células TCM. Para contestar esta interrogante habría que estudiar el efecto de CD38 en la funcionalidad de las células TCM en un contexto independiente de la infección por VIH y en un siguiente nivel habría que evaluar cómo es que CD38 podría estar mediando las alteraciones previamente observadas en células TCM.

VIII. Pregunta de investigación

La glicoproteína CD38, es una molécula con más de una función conocida, su amplia distribución en el sistema inmune y su estrecha asociación a distintas patologías ha sido el eje para diversas investigaciones científicas, en años recientes se ha generado evidencia de la participación de CD38 como un relevante inmunomodulador. En este sentido, nuestro grupo de trabajo ha investigado por varios años el papel que desempeña CD38 en la patogénesis del VIH y ha puesto especial atención en el estudio de las células T centrales de memoria y cómo sus funciones se ven alteradas en el curso de la infección. El trabajo más reciente ha llevado al planteamiento de que las alteraciones observadas en las células de memoria podrían estar estrechamente asociadas a la sobreexpresión de CD38 como resultado de un estado de activación crónico.

Estudios derivados de la investigación en cáncer han evidenciado la importancia de NAD⁺ en la funcionalidad de las células T, resaltando la importancia de CD38 como importante inhibidor de la respuesta antitumoral a través de la interferencia de la respuesta de células T, así como un elemento clave en la vía alterna para generación de adenosina, un compuesto con función inmunosupresora. De manera que es factible considerar que en un contexto en el que haya una sobreexpresión prolongada de CD38 enzimáticamente activo, las células TCM sufrirán alteraciones como las previamente observadas en un contexto de deficiencia de NAD⁺.

Con la finalidad de evaluar la validez de esta propuesta, se ha planteado el objetivo de estudiar la contribución de CD38 a las alteraciones observadas en las células TCM de pacientes VIH⁺ en un modelo independiente de la infección, de tal forma que los hallazgos puedan ser atribuibles principalmente a la expresión de CD38 y si esta contribución proviene de la actividad enzimática de la misma.

4. Hipótesis

La proteína CD38 expresada en la superficie de las células TCM será enzimáticamente activa y ocasionará diferencias funcionales entre aquellas células que lo expresan y las que no. Las células que expresan CD38 serán más propensas a morir y exhibir una limitada capacidad proliferativa frente a un estímulo antigénico, mostrando una mayor tendencia a diferenciarse a células TEM. La adición del inhibidor de CD38, Ara-2'-F'-NAD⁺, ocasionará que las células CD38⁺ preserven características propias de células de memoria con una mejora en la supervivencia, aumento en la capacidad proliferativa y tendencia a permanecer como células TCM con pobre diferenciación hacia células TEM.

5. Objetivos

1. Comparar el perfil transcripcional de las células TCM CD38⁺ y CD38⁻, para 91 genes representativos de la firma transcripcional de las células TCM en el contexto de la infección por VIH.
2. Evaluar la actividad enzimática de CD38 en células mononucleares de sangre periférica
3. Determinar el efecto de Ara-2'-F'-NAD⁺ en la actividad catalítica de CD38

4. Comparar la viabilidad, proliferación y diferenciación de las células TCM CD38⁺ y CD38⁻ en condiciones de cultivo basal o bien bajo estimulación vía TCR.
5. Determinar el efecto del compuesto Ara-2'-F-NAD⁺ en los parámetros de supervivencia, proliferación y diferenciación de células TCM CD38⁺ estimuladas vía TCR.

6. Metodología

I. Purificación de las células TCD4⁺ centrales de memoria CD38⁺ y CD38⁻

Las células empleadas en este proyecto se purificaron a partir de concentrados leucocitarios provenientes del banco de sangre del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Villegas", los donadores cumplieron con los criterios de inclusión y se identificaron como clínicamente sanos, firmaron un consentimiento informado aprobado por el comité de ética del instituto. De acuerdo a la NOM-253-SSA1-2012 en su apartado 16.3, el plasma y componentes sanguíneos no empleados con fines transfusionales pueden ser utilizados con fines diagnósticos o de investigación.

A partir de un concentrado leucocitario de sangre (100 mL) proveniente del banco de sangre del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), se purificó 600 millones de células mononucleares de sangre periférica mediante gradiente de densidad. Posteriormente se realizó la purificación de las células mediante selección positiva (Central memory T cell isolation kit, Miltenyi Biotec).

Una vez purificada la población se tiñó con anticuerpos acoplados a fluorocromos: anti CCR7-PE (Miltenyi Biotec, clona FR 11-11EB), anti CD45 RA-APC (BD Pharmigen, clona HI100) y anti CD38 PerCp Cy5.5 (BD Pharmigen, clona HIT2) para seleccionar y purificar mediante clasificación de células basadas en fluorescencia (FACS) a las células TCM (CD45RA⁻, CCR7⁺) CD38⁺ y CD38⁻. Se emplearon controles específicos para la delimitación de la región en la escala de fluorescencia correspondiente a la señal positiva para cada anticuerpo (FMO'S). La pureza de las subpoblaciones se determinó por citometría de flujo y se emplearon células con una pureza $\geq 90\%$.

Posteriormente el total de células purificadas se dividió en dos y se sembraron en medio completo (RPMI-1640 suplementado con SFB al 10%, L-glutamina 540 µg/mL y 100 U/mL de penicilina y estreptomicina).

Al día siguiente se estimuló una fracción (la otra fracción de las células se empleó como un control de células sin estimular) de las células a través del receptor de células T (TCR) por un lapso de 6 horas, adicionando anti CD3/CD28 acoplado a microesferas (Miltenyi Biotec)(Considerando una relación de 1 perla/4 células) e IL-2 (Roche) a una concentración de 100 U/mL. Al término del estímulo se realizó la extracción de RNA mediante RNAsy mini kit (Quiagen).

Un total de 50 µg/mL de RNA se empleó como templado para la síntesis de DNA complementario (cDNA) usando kit iScript cDNA Synthesis (BIO-RAD). El cDNA fue almacenado a -20°C hasta su uso.

II. Ensayo de PCR multiplex

Se realizó una PCR multiplex para la determinación de 91 genes de interés en cuatro subpoblaciones de interés (TCM ⁺ CD38⁺ y CD38⁻ con y sin estímulo) para seis donadores.

En un primer paso, se realizó una amplificación previa de los genes de interés empleando primers específicos para cada gen. Tras la pre-amplificación, las muestras se sometieron a tratamiento con exonucleasa I, con la finalidad de remover los primers no incorporados.

Se preparó por separado una mezcla de reacción para las muestras (una mezcla de primers específicos) y una mezcla de reacción para los ensayos (incluye el templado preamplificado). Las mezclas de ensayo y de reacción se cargaron en un Dynamic Array IFC de 96.96 y se realizó la PCR empleando el sistema de detección SYBR Green, bajo las siguientes condiciones: 70 °C por 40 min, 90° por 1 min, 30 ciclos a 96°C por 5 segundos y finalmente 60°C por 3 segundos.

Los resultados de PCR fueron analizados con el software Fluidigm Real-Time PCR Analysis versión 4.1.3 (Fluidigm, California, USA).

El cálculo de ΔC_t se realizó empleando el software R. Para cada una de las réplicas biológicas se comparó la expresión de 91 genes en células CD38⁺ y CD38⁻ bajo las mismas condiciones experimentales (condiciones basales o bajo estimulación).

III. Ensayo qPCR

Además de las determinaciones de los 91 genes provenientes de la firma de expresión de las células T_{CM} en la infección por VIH. Se determinó la expresión de tres moléculas cuya expresión difiere en células CD38⁺ y CD38⁻, de acuerdo con observaciones previas de nuestro grupo (Olvera-García et al. 2014) (Espinosa et al. 2010). Se realizó la determinación por qPCR para las moléculas: IL-2, CD40-L e IFN- γ en las dos poblaciones de interés (células T_{CM} ⁺CD38⁺ y CD38⁻) en condiciones basales y bajo estimulación vía TCR. Para este ensayo se emplearon seis replicas biológicas y para cada una de las determinaciones se utilizaron sondas TaqMan específicas. Para este ensayo se utilizaron las mismas muestras empleadas para el ensayo de PCR múltiple.

Al realizar las curvas de eficiencia para cada uno de los genes determinados, se observó que a una dilución 1:2 la amplificación era óptima para todos los genes. De manera que las muestras fueron diluidas 1:2 empleando agua libre de nucleasas.

Para cada uno de los genes determinados se preparó una mezcla de reacción (CD38 y B2M, se determinaron de forma simultánea), la mezcla de reacción se cargó en una placa para PCR y se añadió 2 μ L del templado.

Se realizó la qPCR bajo las siguientes condiciones: 95°C/10min, 95°C/15 s; 60°C/1min / 40 ciclos.

El cálculo de Δ Ct se realizó empleando beta-2-microglobulina (B2M) como gen de referencia para la normalización de los datos de expresión y para el análisis estadístico se usó GraphPadPrism.

IV. Determinación de la concentración inhibitoria de Ara-2'-F-NAD⁺ en células con morfología de linfocitos y expresión de la proteína CD38.

A partir de una fracción de concentrado leucocitario de sangre (30 mL), se purificó 20 millones de células de sangre periférica mediante gradiente de densidad. Posteriormente las células se tiñeron con un anticuerpo anti CD38 acoplado al fluorocromo PerCp Cy5.5 (BD Pharmigen, clona HIT2) para seleccionar y purificar a las células CD38⁺ y CD38⁻ mediante FACS, se emplearon células no teñidas como control de autofluorescencia. Los niveles de pureza fueron superiores al 90%.

Se determinó la actividad enzimática de la porción extracelular de CD38 mediante el sustrato ϵ -NAD⁺, descrito previamente por emplearse como reportero, por ensayo fluorométrico. La determinación se realizó en células CD38⁺ y CD38⁻.

Se añadió ϵ -NAD⁺ a una concentración de 10 μ M al medio de ensayo (Buffer A, a un volumen final de 2 mL) conteniendo a las células CD38⁺ o CD38⁻. El seguimiento a la hidrólisis de ϵ -NAD⁺ se realizó bajo condiciones de temperatura controlada (37°) y agitación constante

Posteriormente se realizó la determinación de la concentración inhibitoria del compuesto Ara-2'-F-NAD⁺ (MyBioSource), descrito como un inhibidor competitivo de la ectoenzima CD38. A la mezcla descrita previamente (buffer A, células CD38⁺ O CD38⁻ y ϵ -NAD⁺) se le añadieron distintas concentraciones de Ara-2'-F-NAD⁺ (equivalentes a 10 Ki, 100Ki y 100Ki; Ki=1.69 nM), se dio seguimiento a la hidrólisis de ϵ -NAD⁺. La concentración inhibitoria de Ara-2'-F-NAD⁺ se realizó por comparación de la gráfica de cinética enzimática (tiempo vs fluorescencia asociada a ϵ -NAD⁺) de las células CD38⁻ y la gráfica obtenida para las células CD38⁺ en presencia de distintas concentraciones de Ara-2'-F-NAD⁺.

V. Purificación de las células TCD4⁺ centrales de memoria y cultivo bajo las distintas condiciones experimentales.

A partir de un concentrado leucocitario de sangre (100 mL) proveniente del banco de sangre del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), obtenido de sujetos clínicamente sanos, se purificó 600 millones de células mononucleares de sangre periférica mediante gradiente de densidad. Posteriormente se realizó la purificación de las células mediante selección positiva (Central memory T cell isolation kit, Miltenyi Biotec), se reservó una fracción de PBMC's para ser empleadas como controles en la tinción de pureza y de fenotipo.

Una vez purificada la población de células TCM, se evaluó la pureza mediante citometría de flujo, una porción de células TCM y PBMCs se tiñeron con los siguientes anticuerpos acoplados a fluorocromos: anti CD4 APC Cy7(BD, clona RPA-T4), anti CCR7-PE (Miltenyi Biotec, clona FR 11-11EB), anti CD45 RA-APC (BD Pharmigen, clona HI100) y anti CD38 PerCp Cy5.5(BD Pharmigen, clona HIT2). La delimitación de la región correspondiente a la señal positiva en la escala de fluorescencia se realizó

mediante controles específicos (FMO's), se emplearon solo aquellas muestras con una pureza $\geq 90\%$.

Las células TCM recién purificadas se colocaron en medio completo (RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino (SFB), se contaron y dividieron en 4 fracciones. Cada una de las fracciones se sembró en una placa de fondo redondo. De igual forma, las PBMCs reservadas para controles se colocaron en medio completo, se contaron y dividieron en 15 fracciones que fueron sembradas en placa de fondo redondo. Las células se mantuvieron en condiciones de cultivo (37°C , $5\%\text{CO}_2$) hasta el día siguiente.

VI. Tinción para ensayos de proliferación y estimulación de células TCM.

El día posterior a la purificación, se sacaron las células de cultivo y se colocaron en tubos de 15 mL divididas en dos grupos: TCM's y PBMC's, se realizaron dos lavados con PBS frío para eliminar los restos del medio de cultivo. Tras los lavados, las células se resuspendieron en PBS y se procedió a realizar la tinción para el rastreador de proliferación de acuerdo con las indicaciones del proveedor (CellTrace Violet, cell proliferation kit; ThermoFisher). Posteriormente, las células se sembraron nuevamente empleando medio completo y se procedió a colocar el estímulo con $\alpha\text{CD3/CD28}$ e IL-2.

Las células TCM se dividieron en 4 fracciones: 2 fracciones se emplearon como control sin estímulo y dos de ellas fueron estimuladas a través del receptor de células T (TCR) por un lapso de 6 horas mediante la adición de anti CD3/CD28 acoplado a microesferas (Miltenyi Biotec)(considerando una relación de 1 perla/4 células) e IL-2(Roche) a una concentración de 100 U/mL. El mismo estímulo se añadió a 10 fracciones de PBMC's (empleadas como controles en la tinción multiparamétrica). Adicionalmente, se añadió Ara-2'-F-NAD⁺ (MyBioSource), inhibidor de CD38, a una concentración de 1.69 μM (concentración determinada por cinética enzimática) a una de las fracciones sin estimular de las células TCM y a una de las fracciones estimulada vía TCR, el inhibidor se añadió de forma simultánea al estímulo. Al término de las 6 horas de estimulación, se retiró el estímulo pasando la fracción de células a través de un tubo de poliestireno colocado en un magneto, se realizaron dos lavados a los pozos en los que se encontraban dichas células.

Las células se lavaron y se resembraron en medio completo adicionado con IL-2 a una concentración de 100 U/mL y Ara-2-F'-NAD+ a una concentración de 1.69 µM. Las células permanecieron en cultivo por un lapso de 6 días y el día 7 se realizó la tinción multiparamétrica. Durante este lapso, se realizó un recambio de medio cada 48 horas, se añadió IL-2 y Ara-2-F'-NAD+ a los pozos correspondientes.

VII. Determinación de las variables de interés: Proliferación, sobrevida y diferenciación de las células TCM a células TEM

El día 7 las células se sacaron de cultivo, se transfirieron de la placa de cultivo a tubos de citometría y se lavaron empleando PBS para retirar el medio de cultivo. Tras el proceso de lavado, las células se resuspendieron en el remanente del PBS empleado para lavarlas. Se procedió a realizar la tinción para viabilidad (Live/Dead fixable near IR, ThermoFisher) de acuerdo a las especificaciones del proveedor. Al finalizar el periodo de incubación se realizó un lavado empleando PBS adicionado con albúmina sérica bovina al 1% (PBA).

Al finalizar el lavado, se procedió a realizar el resto de las tinciones extracelulares de acuerdo con la tabla 1 y 2, los anticuerpos se incubaron por un periodo de 20 minutos a una temperatura de 4°C protegidos de la luz. Al finalizar el periodo de incubación, se realizó un lavado con PBA.

Finalmente, la suspensión celular se resuspendió en PBA o en una solución de paraformaldehído al 1.5% y se realizó la lectura en un citómetro FACS ARIA II (BD). Se emplearon células sin teñir como control de autofluorescencia y PBMC'S como controles específicos para delimitar la región correspondiente a la señal positiva en la escala de fluorescencia (FMO's).

Tabla 1: Tinciones en células T centrales de memoria y PBMCs para el análisis de los parámetros: viabilidad, proliferación y diferenciación en células CD38+ y CD38-

| Muestra | Determinación | Anticuerpos empleados | | | | | | |
|---------|---------------|-----------------------|------|--------|------|-------|------------|------------|
| | | CD38 | CCR7 | CD45RA | CD28 | CD62L | Cell trace | Viabilidad |
| TCM | Sin teñir | | | | | | | |

| | | | | | | | | |
|--|-------------------|---|---|---|---|---|---|---|
| Células mononucleares de sangre periférica | FMO CD38 | | x | x | x | x | x | x |
| | FMO CCR7 | x | | x | x | x | x | x |
| | FMO CD45RA | x | x | | x | x | x | x |
| | FMO CD28 | x | x | x | | x | x | x |
| | FMO CD62L | x | x | x | x | | x | x |
| | Control de muerte | | | | | | | x |
| | Solo cell trace | | | | | | x | |
| TCM | All colors | x | x | x | x | x | x | x |

Tabla 2. Información de los anticuerpos empleados en la tinción para las determinaciones de proliferación, sobrevivencia y diferenciación en células TCM CD38+ y CD38-

| Anticuerpo | Fluorocromo | Clona | Casa comercial | Catálogo |
|------------|---------------|--------|----------------|------------|
| CD38 | PerCp-Cy5.5 | HIT2 | BD | 551400 |
| CCR7 | Pe | 3D12 | eBioscience | 12-1979-42 |
| CD45RA | APC | HI100 | eBioscience | 17-0458-42 |
| CD28 | Pe-eFluor 610 | CD28.2 | eBioscience | 61-0289-42 |
| CD62L | Pe-Cy7 | DREG56 | eBioscience | 25-0629-42 |
| Cell trace | BV421 | | ThermoFisher | C34557 |
| Viabilidad | APC Cy7 | | ThermoFisher | L10119 |

7.-Resultados

I. El perfil transcripcional de las células CD38+ y CD38- tiene alta similitud en condiciones basales; no obstante, refleja importantes diferencias en respuesta ante un estímulo antigénico.

A partir del modelo derivado del análisis transcripcional de células TCM provenientes de pacientes VIH+ en los que se observó un incremento en la expresión de CD38, se comparó la expresión de 91 genes de esa firma entre células TCM CD38+ y CD38- aisladas, provenientes de donadores sanos, con la finalidad de evaluar el aporte de CD38, como única variable, a los resultados previos. En este ensayo se emplearon células en condiciones basales (no estimuladas) y células estimuladas a través del TCR empleando un anticuerpo agonista α -CD3/CD28 e IL-2. Se obtuvieron datos de amplificación para 63 genes (**figura 1**) y al comparar el nivel de expresión de los 63 genes entre ambas poblaciones en condiciones basales se observó que 8 de estos se expresan de forma diferencial entre las células TCM CD38+ y CD38- (**figura 2a**); en cambio, en condiciones de estimulación 16 genes se inducen de forma distinta entre ambas poblaciones, al ser estimuladas vía TCR (**figura 2b**).

Con la finalidad de analizar si el patrón de expresión de estos 63 genes se encontraba asociado a determinados procesos biológicos, se realizó un análisis de enriquecimiento funcional empleando IPA (ingenuity Pathway análisis). Los resultados de este análisis muestran un enriquecimiento en cuatro procesos biológicos: muerte celular y sobrevivencia, crecimiento celular y proliferación, desarrollo y ciclo celulares (**figura 3a**), cuando se realizó un análisis considerando la interacción de las proteínas producto de los transcritos los resultados fueron muy similares. El análisis de la interacción a nivel de proteína de los genes diferencialmente expresados a nivel basal y bajo condiciones de estimulación generó resultados muy similares a los observados en el análisis a nivel de mRNA, con enriquecimiento en los procesos de: regulación de procesos apoptóticos, regulación de producción de citocinas, regulación positiva de producción de citocinas, regulación de procesos de muerte celular programada (**figura 3b**).

En los resultados del análisis de PCR múltiple solo se incluyeron los datos para aquellos genes con los siguientes criterios de inclusión: valor de Ct <30 y un único pico en la curva de disociación (Tajadini, Panjehpour, y Javanmard 2014). La normalización de los genes de interés se realizó mediante el cálculo del Δ Ct, en este

estudio se emplearon 4 genes de referencia: B2M, POLR2A, TBP y GAPDH, se empleó la media geométrica de los tres primeros genes para el cálculo del ΔCt (Vandesompele et al. 2002); sin embargo, GAPDH no fue empleado debido a que se observaron diferencias significativas entre los grupos analizados. Esta diferencia es atribuible a los cambios metabólicos que experimentan los linfocitos al ser activados, se sabe que tras la estimulación en los linfocitos se promueve la glucólisis, estado metabólico que les permite proliferar rápidamente.

Genes inducidos por estimulación vía TCR en células TCM CD38+ y CD38-

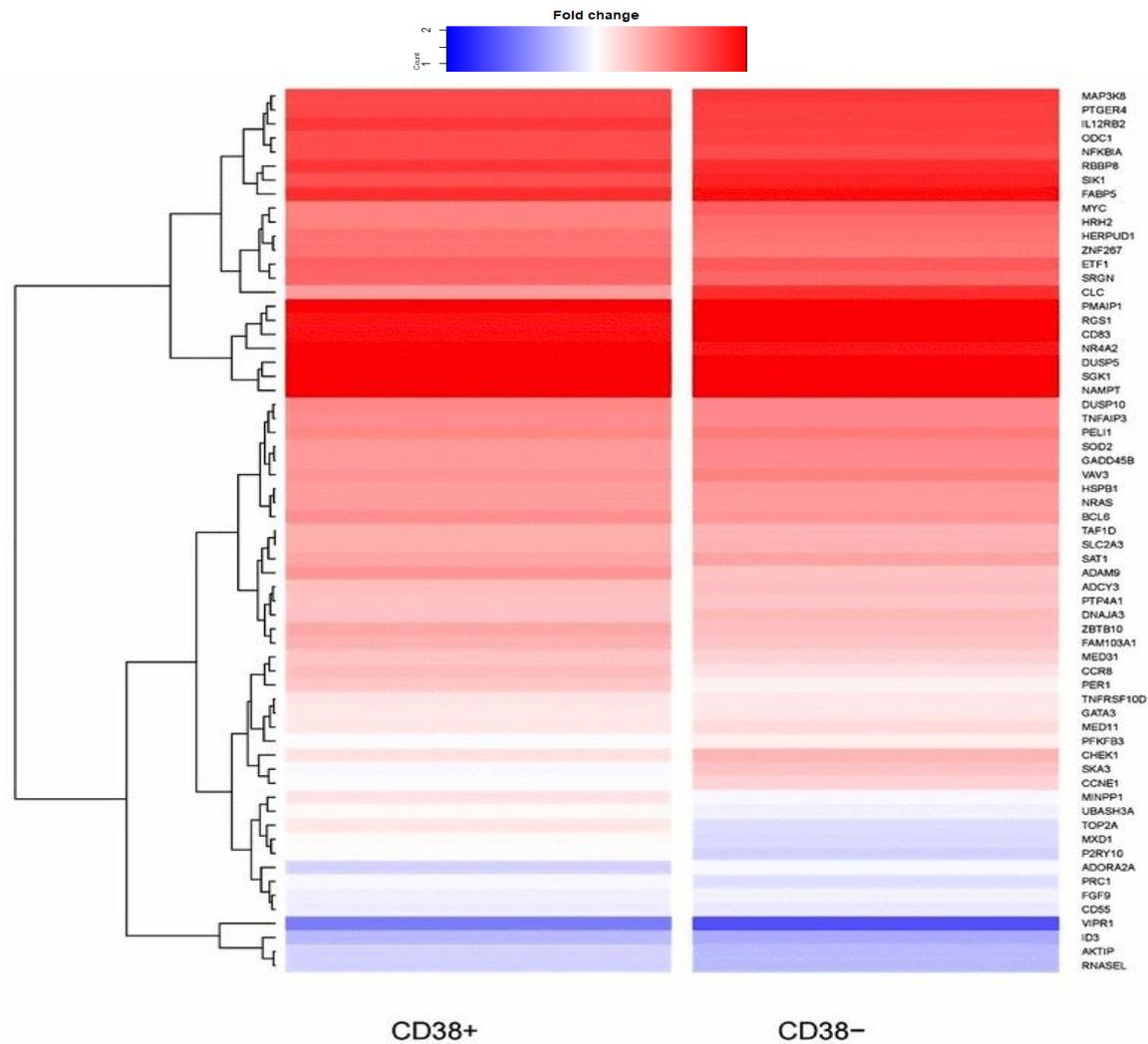
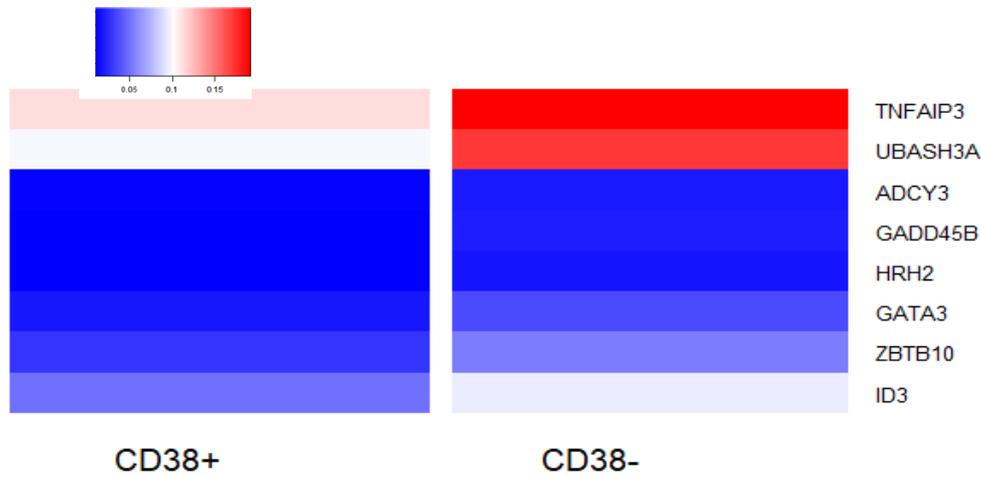


Figura1. Mapa de calor para la expresión de 63 genes bajo inducción en células CD38+ y CD38- activadas vía TCR. Inducción de 63 genes en células CD38+ y CD38- tras haber sido estimuladas con α -CD3/CD28 e IL-2 por un lapso de 6 horas. Se realizó el cálculo de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ como la diferencia del valor de ΔC_t (Ct gen de interés – Ct genes de referencia) antes y después de la estimulación ($\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$ bajo estimulación – ΔC_t en condiciones basales), para cada uno de los genes.

2a) Genes diferencialmente expresados en condiciones basales



2b) Genes diferencialmente expresados bajo estimulación vía TCR

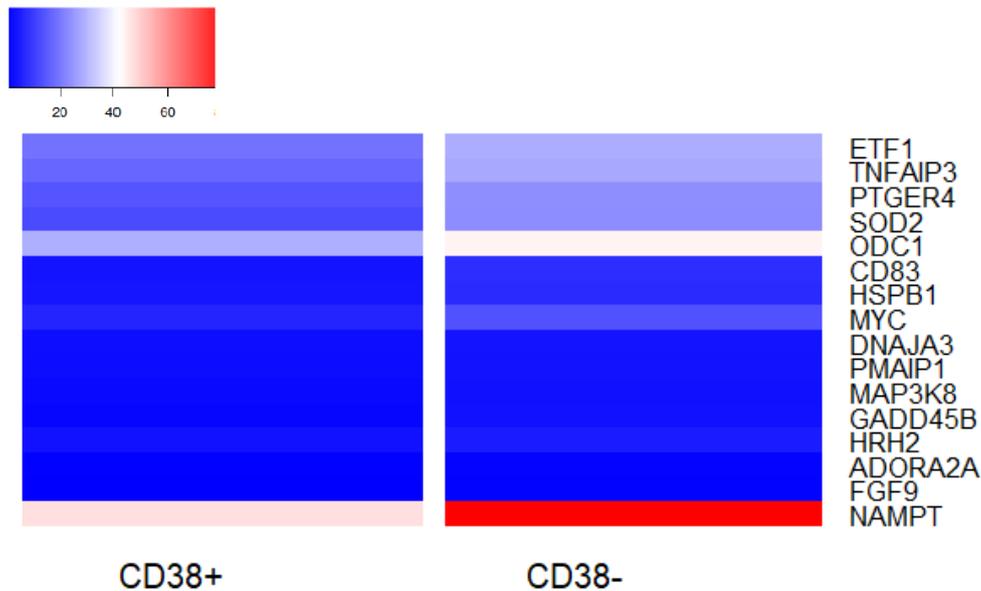


Figura 2. Mapa de calor para genes diferencialmente expresados en condiciones basales o bajo condiciones de estimulación a través del TCR. En la imagen (a) se observa la expresión de 8 genes diferencialmente expresados en condiciones basales. En (b) se muestran 16 genes diferencialmente expresados en células CD38+ y CD38- bajo condiciones de estimulación vía TCR.

3a) Análisis de enriquecimiento realizado en IPA

| Proceso biológico | Valor de P | Número de moléculas |
|-------------------------------------|--|---------------------|
| Muerte celular y sobrevivencia | $1.54 \times 10^{-3} - 2.28 \times 10^{-12}$ | 36 |
| Crecimiento celular y proliferación | $1.45 \times 10^{-3} - 3.86 \times 10^{-12}$ | 40 |
| Desarrollo celular | $1.49 \times 10^{-3} - 1.70 \times 10^{-8}$ | 36 |
| Ciclo celular | $1.33 \times 10^{-3} - 4.37 \times 10^{-8}$ | 23 |

3b) Análisis de la interacción proteína-proteína realizado por STRING

| Proceso biológico | Número de moléculas |
|---|---------------------|
| Regulación de procesos apoptóticos | 12 |
| Regulación de la producción de citocinas | 8 |
| Regulación positiva de la producción de citocinas | 7 |
| Regulación de procesos de muerte celular programada | 11 |

Figura 3. Resultados de enriquecimiento funcional para 63 genes analizados en células TCM CD38+ y CD38-. En la tabla (3a) se muestra la predicción realizada por IPA empleando los resultados del transcrito de 63 genes. En (b) se encuentran los resultados de la predicción de STRING para la interacción de las proteínas producto de aquellos genes diferencialmente expresados en condiciones basales y de estimulación.

II. Las células TCM CD38- responden a la estimulación vía TCR produciendo más IL-2, IFN- γ y CD40L comparadas con las células CD38+.

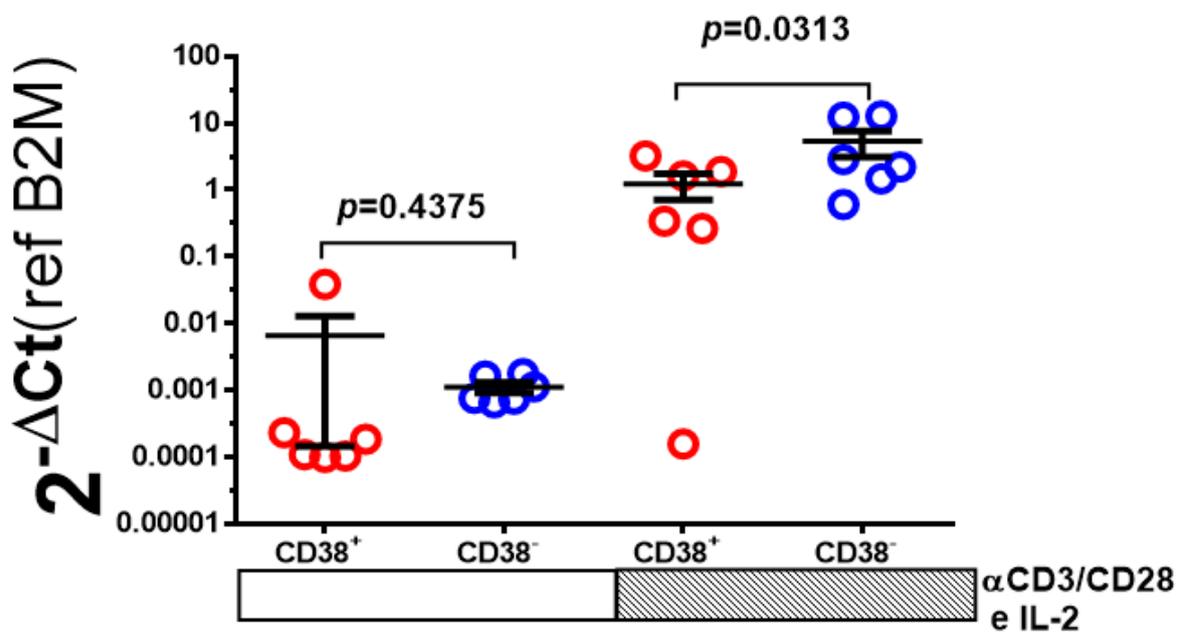
Con la finalidad de caracterizar a las células TCM en cuanto a la expresión de citocinas y basados en las observaciones previas del grupo en cuanto a una menor producción de IL-2 y aumento de expresión de IFN γ por parte de las células TCM CD38+. Nos cuestionamos si, al realizar la determinación de estas citocinas en células TCM aisladas se observaría el mismo patrón de expresión; además, debido a que la población analizada en los estudios previos era una mezcla de células (PBMCs), este nuevo abordaje descarta la influencia de otras poblaciones celulares, logrando con ello una mejor caracterización de las células TCM.

En la **figura 4a** se puede observar que al evaluar la expresión de IL-2 a nivel de mRNA, las células CD38- tienen una significativa mayor expresión ($p=0.0313$) con respecto a las células CD38+. Estos resultados concuerdan con las observaciones previas a nivel de proteína (Espinosa et al. 2010; Olvera-García et al. 2014). Adicionalmente, la determinación de IFN γ (**figura 4b**) generó resultados opuestos a los estudios previos, se observó que son las células CD38- bajo estimulación vía TCR las que inducen en mayor medida esta citocina, en comparación con las células CD38+ ($p= 0.0313$). No obstante, la comparación con los estudios previos tiene la limitante que, en este estudio se determinó la expresión del mRNA, mientras que en otros estudios se determinó la expresión de la proteína, de manera que no es posible descartar

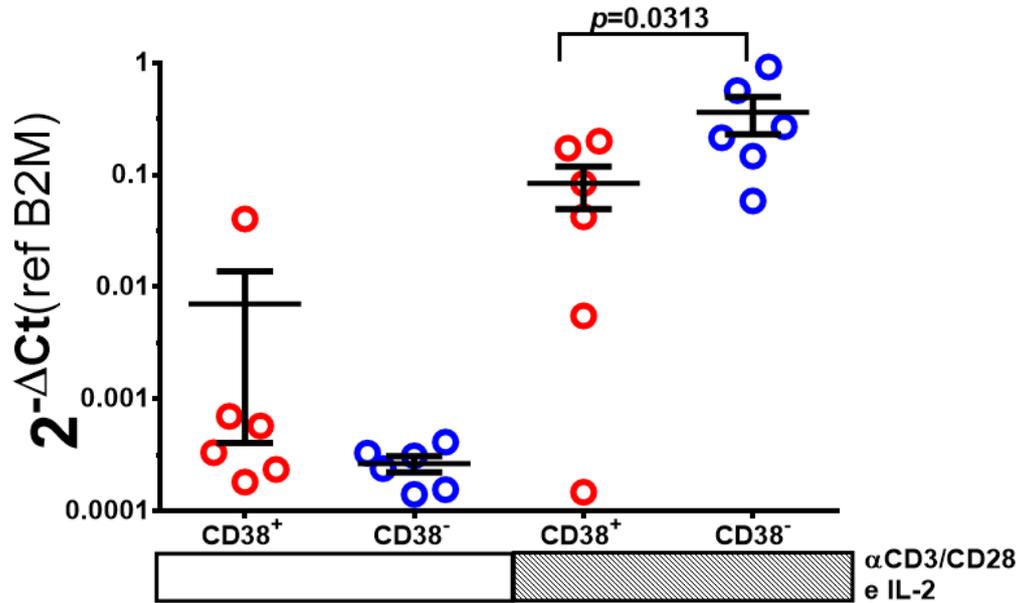
mecanismos de modificación postranscripcional o bien no es posible afirmar que los cambios a nivel del mRNA correspondan a los cambios a nivel de proteína.

Finalmente, en la **figura 4c** se observa la determinación para CD40L, una molécula importante en las señales de co-estimulación de sinapsis inmunológica. Las células CD38+ expresan en menor medida el ligando de CD40 ya sea en condiciones basales o bajo estimulación a través del TCR.

4a) Determinación de la expresión de IL-2 en células TCM CD38+ y CD38-



4b) Determinación de la expresión de IFN γ en células TCM CD38+ y CD38-



4c) Determinación de la expresión de CD40L en células TCM CD38+ y CD38-

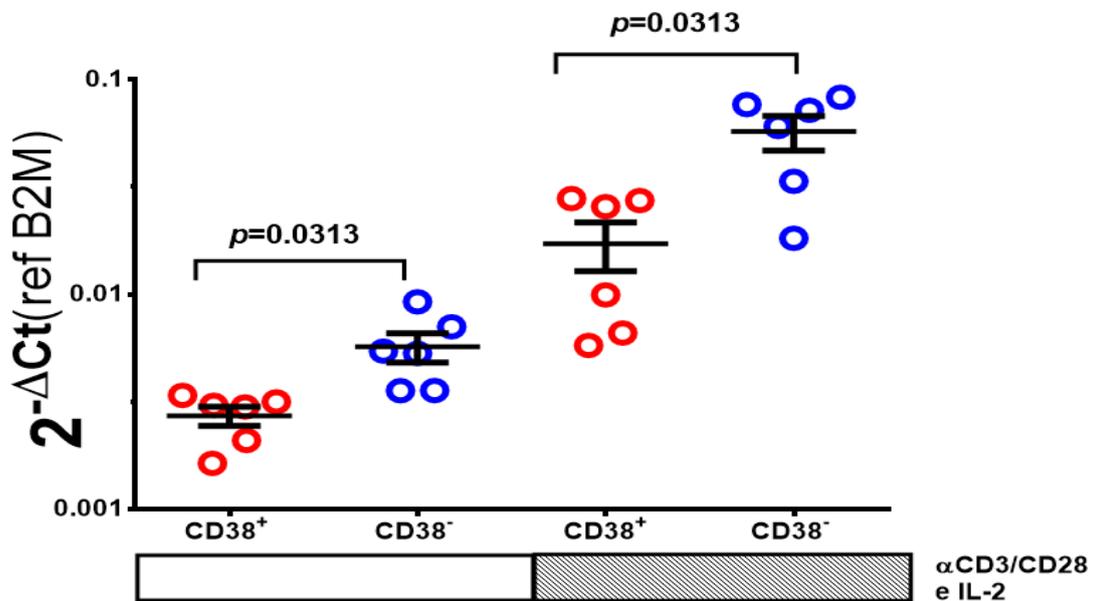


Figura 4. Comparación de la expresión de IL-2, IFN- γ y CD40L en células CD38+ y CD38-. Se observa la determinación de expresión de: IL-2 (a), IFN-g (b) y CD40L (c). Las determinaciones se realizaron en condiciones basales (izquierda) y bajo estimulación vía TCR (α -CD3/CD28 e IL-2) para ambas poblaciones: células CD38+ (rojo) y CD38- (azul). Las pruebas estadísticas se realizaron mediante una prueba de rangos signados de Wilcoxon empleando GraphPadPrism(versión 9.4.0)., la estadística se realizó con una n=6.

III. La proteína CD38 localizada en la superficie de linfocitos TCD4+ posee actividad NADasa, la cual es inhibida en presencia del compuesto Ara-2'-F-NAD+

Una de las primeras interrogantes que surgen respecto a la presencia de CD38 en la superficie de las células inmunes es la función que tiene esta proteína. Puesto que la función de NADasa ha sido ampliamente estudiada, se evaluó si las moléculas de CD38 localizadas en la superficie de los linfocitos TCD4+ poseen actividad NADasa. Para estos fines se empleó el reportero ϵ -NAD⁺, como análogo de NAD⁺ el cual al ser hidrolizado da lugar a un compuesto fluorescente (ϵ -ADPR) que puede ser detectado mediante fluorimetría. En la **figura 5** se puede observar el incremento en la fluorescencia, determinada en unidades relativas de fluorescencia, asociado a la degradación de ϵ -NAD⁺ por la presencia de CD38 (línea negra) en la superficie de los linfocitos TCD4+. La presencia de otras ectoenzimas con actividad NADasa se consideró no significativa a partir de las observaciones en linfocitos TCD4+ que carecen de CD38 (línea azul) en su superficie (determinada por citometría de flujo). Adicionalmente, se evaluó el efecto de ARA-2'-F-NAD⁺, un inhibidor del tipo competitivo de CD38, en la gráfica se puede apreciar que la adición de una dosis equivalente a 100 Kis ($K_i = 1.69$ nM) resulta en una disminución considerable de la capacidad de los linfocitos CD38+ para degradar ϵ -NAD⁺ (línea verde) y gráficamente se puede ver que la adición de una dosis equivalente a 1,000 Kis del inhibidor CD38 (línea roja), emula la cinética exhibida por las células CD38-.

A partir de estas observaciones, se puede considerar que la adición del inhibidor ARA-2'-F-NAD⁺ a una concentración equivalente a 1,000 Kis es suficiente para inhibir la actividad NADasa de CD38 expresado en linfocitos TCD4+.

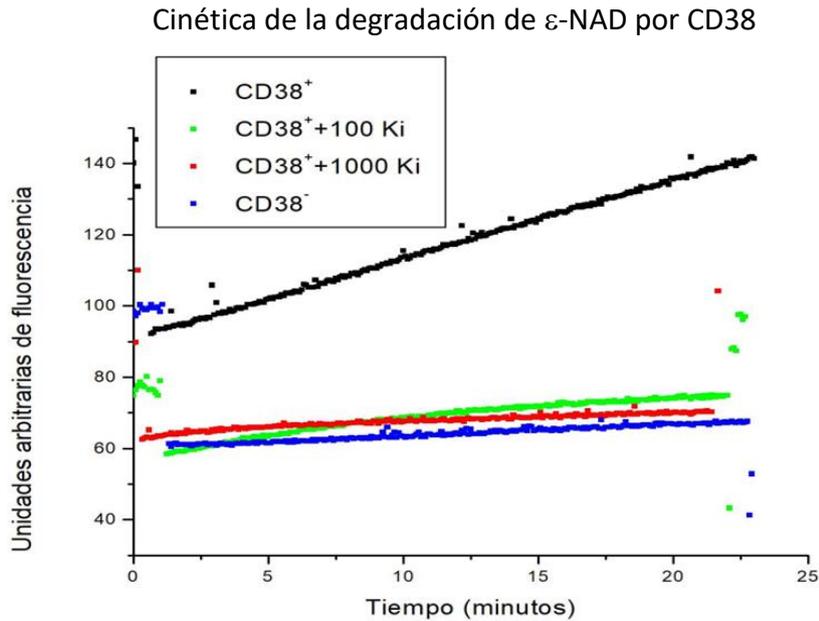
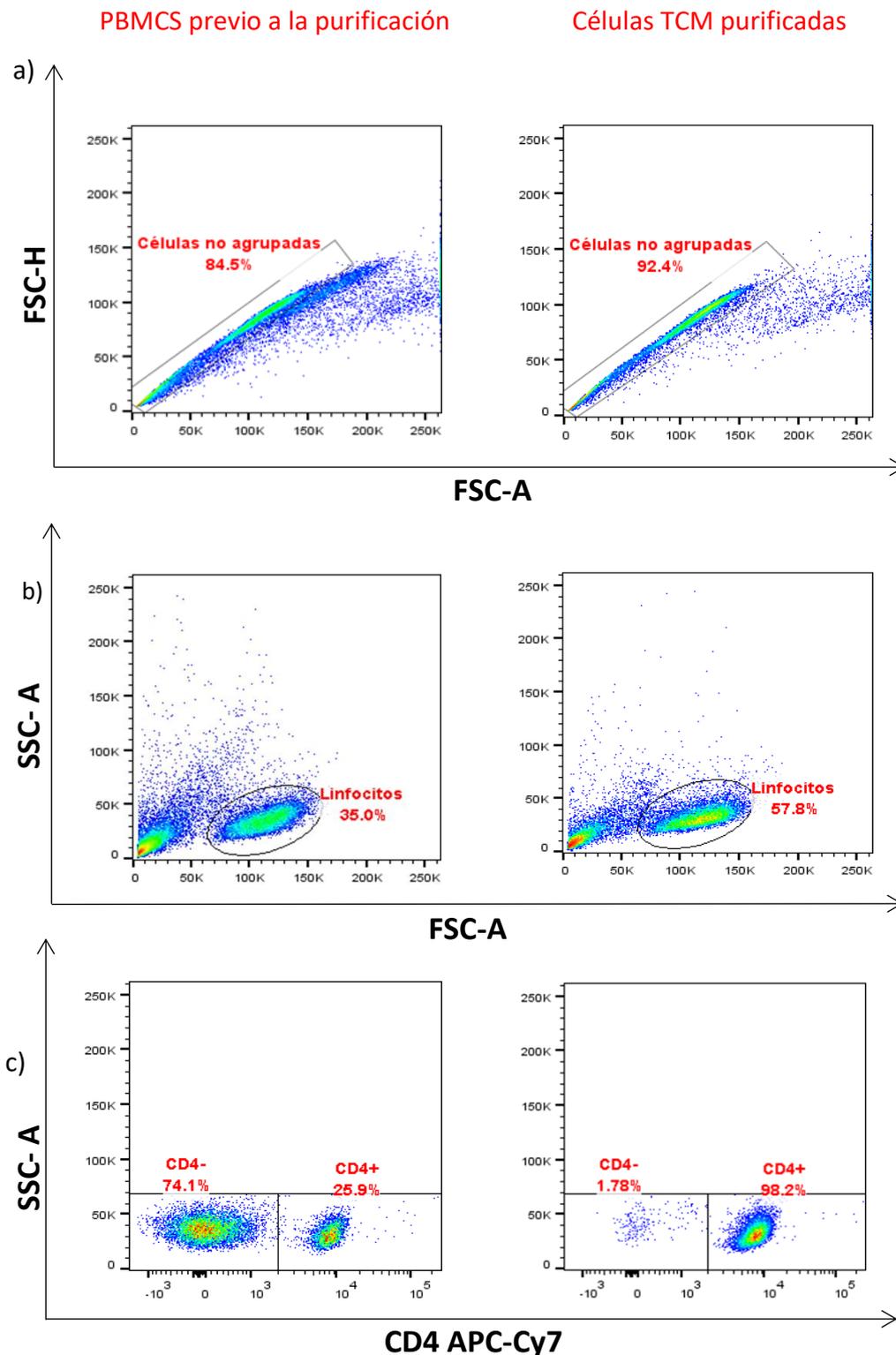


Figura 5. Determinación de la concentración inhibitoria de ARA-2'-F-NAD⁺, inhibidor competitivo de CD38. En la gráfica se puede observar la señal fluorescente asociada a la degradación de e-NAD⁺ por la proteína CD38. La línea negra representa la señal asociada a la degradación de e-NAD⁺ por células con morfología de linfocitos y expresión de la proteína CD38, en tanto que en azul observamos la señal de aquellos linfocitos que no expresan CD38 (CD38⁻). Las líneas verde y roja representan el efecto de la adición del inhibidor de CD38, ARA-2'-F-NAD⁺, a una dosis de 100 Kis ($K_i = 1.69$ nM) y 1,000 Kis respectivamente.

IV. Determinación de pureza de las células TCM aisladas por selección inmunomagnética

Bajo la consideración de que el objetivo del estudio era el análisis de células TCD4⁺ centrales de memoria, se empleó la separación magnética como método para aislar estas células a partir de un concentrado de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs). En la **figura 6** se puede observar que, tras el paso por la columna de separación, hay un enriquecimiento en las células no agregadas (**6a**) con morfología de linfocito (**6b**) y de estos el 98.2% expresan el marcador CD4 (**6c**) en comparación con el 25.9% previo a la purificación. Dentro del total de linfocitos TCD4⁺ podemos definir distintas subpoblaciones con fenotipo y funciones distintas, en función de la expresión de CCR7 y CD45RA podemos definir las siguientes subpoblaciones: naive (CCR7⁺ CD45RA⁺), centrales de memoria (CCR7⁺CD45RA), efectora de memoria (CCR7-CD45RA-) y células de memoria totalmente diferenciadas (CCR7-CD45RA-); en la **figura 6d** se muestra que previo a la purificación, en PBMCs es posible hallar estas cuatro subpoblaciones (33.6% naive, 42% TCM, 21.2% TEM y 3.19 TMRA) en tanto que después de la purificación las células TCM representaban

el 97.1% del total de linfocitos TCD4+ (**figura e**), de manera que este método de purificación fue eficaz para los fines del presente proyecto. Adicionalmente, se determinó la expresión de CD38, los resultados muestran que previo a la purificación el nivel de expresión correspondía al 30.6% mientras que, tras la purificación sólo el 22% de las células TCM expresan en su membrana la molécula CD38 (**figura f**). Se emplearon solo aquellas muestras cuya pureza fue superior al 90%.



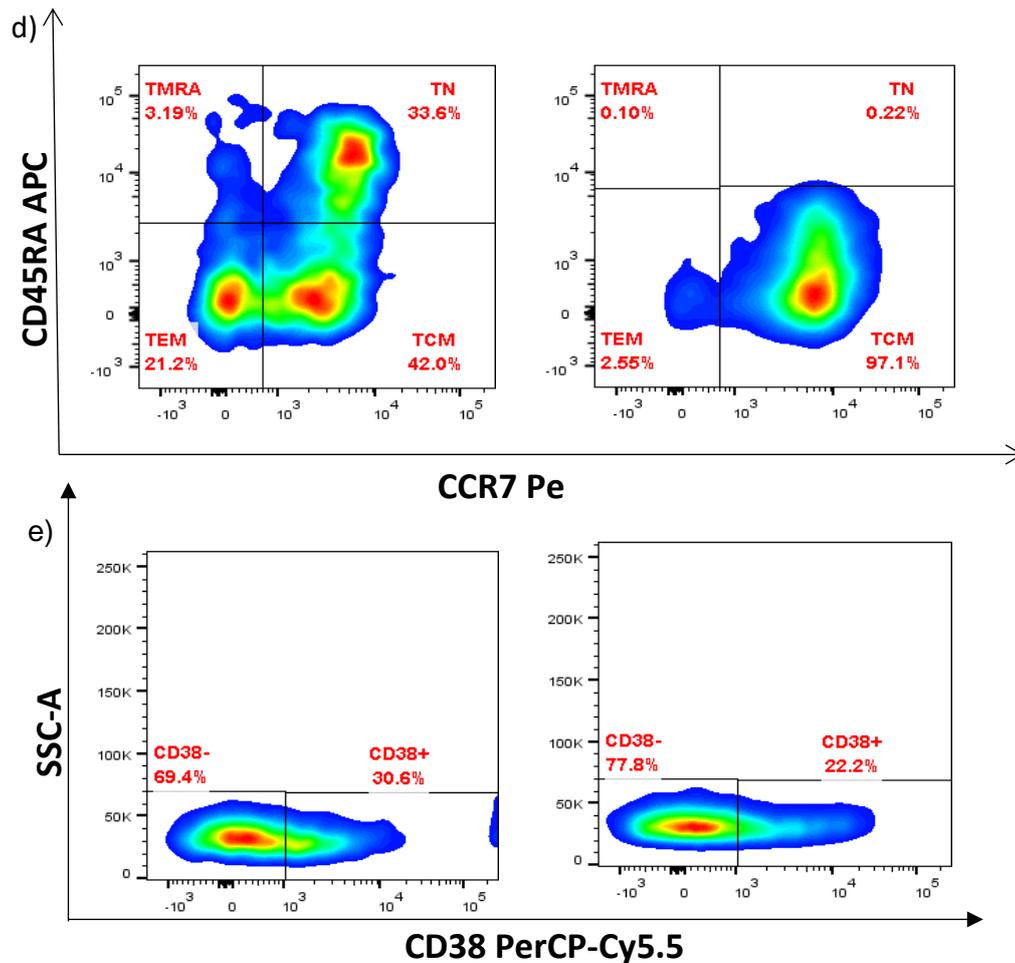


Figura 6. Análisis de citometría para la determinación del grado de pureza de las células obtenidas por selección inmunomagnética. En la figura se compara la expresión de marcadores que identifican a las células TCM, antes (izquierda) y después de la purificación (derecha). Se seleccionó a las células no agregadas (a) con morfología de linfocitos (b) que expresan el marcador CD4 (c) y que por la expresión de los marcadores CCR7 y CD45RA pueden ser clasificadas como células TCM (CCR+CD45RA-) (d). Adicionalmente, se determinó la expresión de CD38 (e). Análisis representativo de una n=8

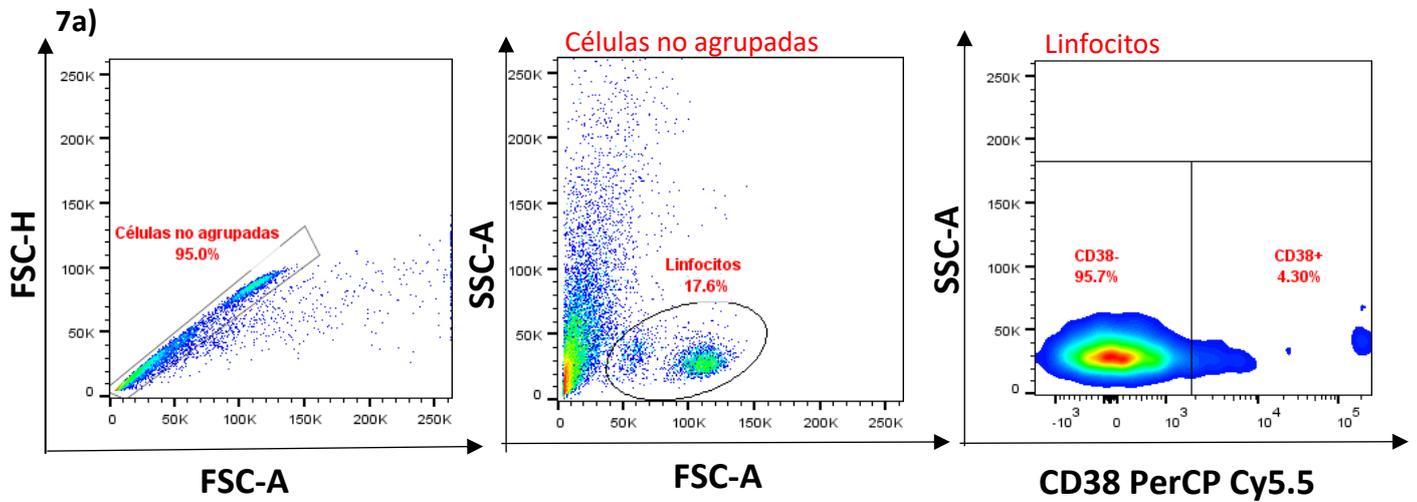
V. Estrategia de análisis para la evaluación del impacto de la expresión de CD38 en células TCM en las variables: supervivencia, proliferación y diferenciación a células TEM, cultivadas por 7 días en condiciones basales (medio) o bajo estimulación a través del TCR.

Con la finalidad de evaluar la incidencia de la actividad enzimática de CD38 en la supervivencia, proliferación y diferenciación de las células TCM, las células seleccionadas por columna que cumplieron con una pureza mayor al 90% se cultivaron durante 7 días bajo distintas condiciones experimentales. En la imagen 7 se observan los resultados para las células cultivadas en condiciones basales (a) y en (b) las células que fueron estimuladas a través del TCR con α -CD3/CD28. En ambos análisis se empleó un análisis jerarquizado en el que cada análisis subsecuente proviene de la

población previamente seleccionada. De esta manera se estudió a las células no agrupadas con morfología de linfocito y de estas se analizó con base en la expresión de CD38 a las células CD38+ y CD38-. Para cada una de estas dos subpoblaciones se determinó el grado de viabilidad y solo para las células vivas se determinó la capacidad proliferativa de acuerdo con la dilución del colorante Cell trace, en condiciones basales más del 95% de las células permanecen sin proliferar, independientemente de si expresan o no CD38. Posteriormente se determinó la diferenciación a células TEM, las dos subpoblaciones de interés se identificaron de acuerdo a la expresión de los parámetros CCR7 y CD45RA: TCM(CCR7+,CD45RA-) y TEM(CCR7-,CD45RA)(Appay et al. 2008). En las células estimuladas vía TCR se observó la dilución del rastreador de proliferación y se consideró 3 puntos importantes para el análisis de este parámetro: una condición definida con R0 donde las células no pierden la detección del reactivo, indicando de manera indirecta la falta de rondas de proliferación durante el ensayo, la región R1 representa a aquellas muestras que tuvieron al menos una ronda de proliferación, detectando máximo 7 rondas, así como la fase R8 para aquellas células con más de 7 rondas de proliferación. En las células no estimuladas podemos observar que más del 95% de las células se encuentran en la región R0. Finalmente, se determinó el porcentaje de células de memoria efectora, de acuerdo con expresión de los marcadores CCR7 y CD45RA según lo descrito previamente, esta determinación se realizó para las células acumuladas en cada una de las rondas de proliferación.

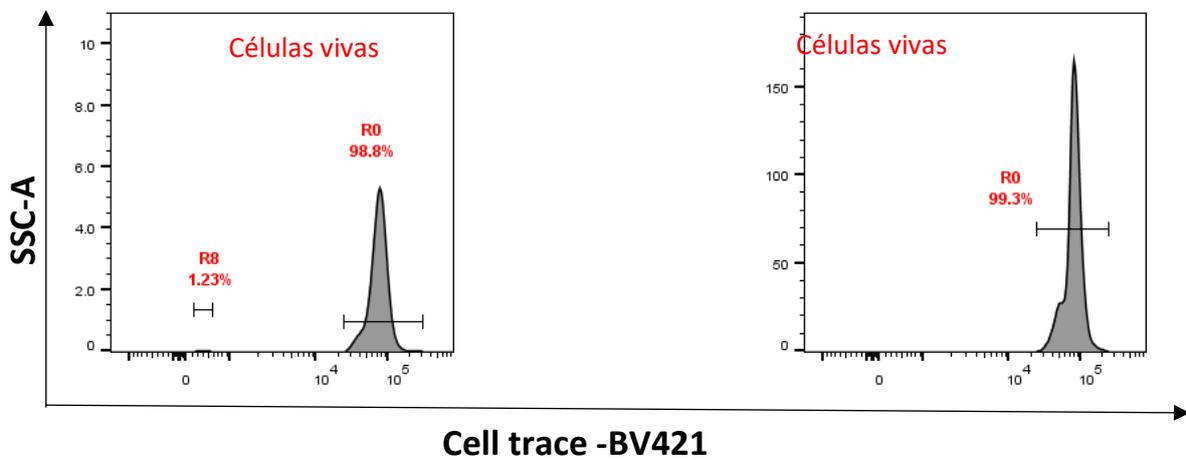
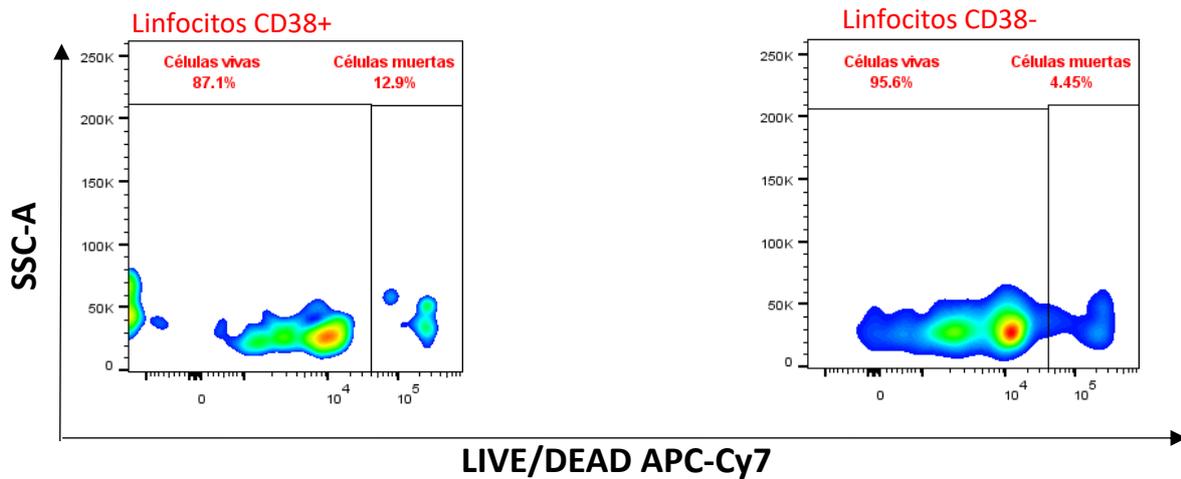
En la imagen c) se muestra un esquema que resume el análisis de citometría para ambas determinaciones.

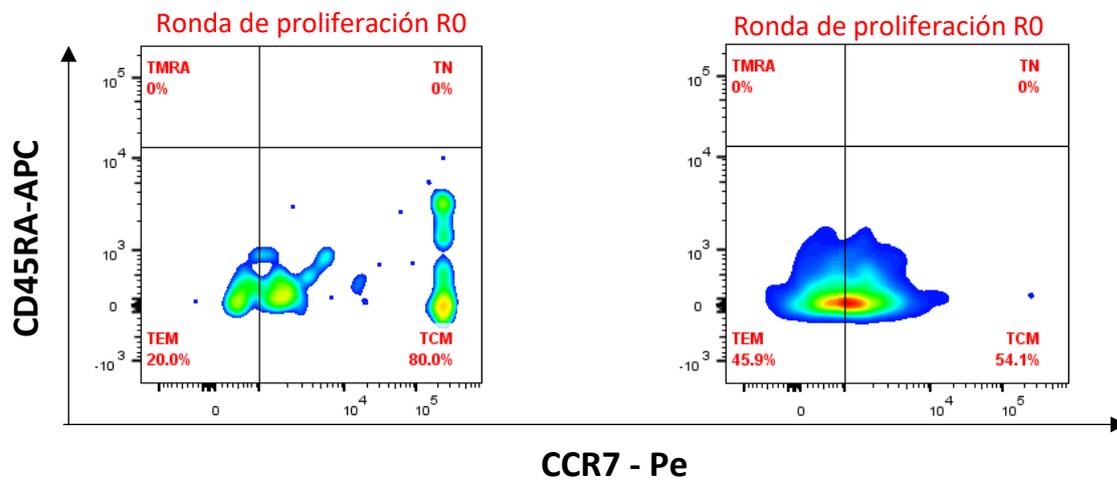
Estrategia de análisis para la evaluación del impacto de la expresión de CD38 en células TCM en las variables: supervivencia, proliferación y diferenciación a células TEM, cultivadas por 7 días en condiciones basales (medio)



Células CD38+ medio (7 días en cultivo)

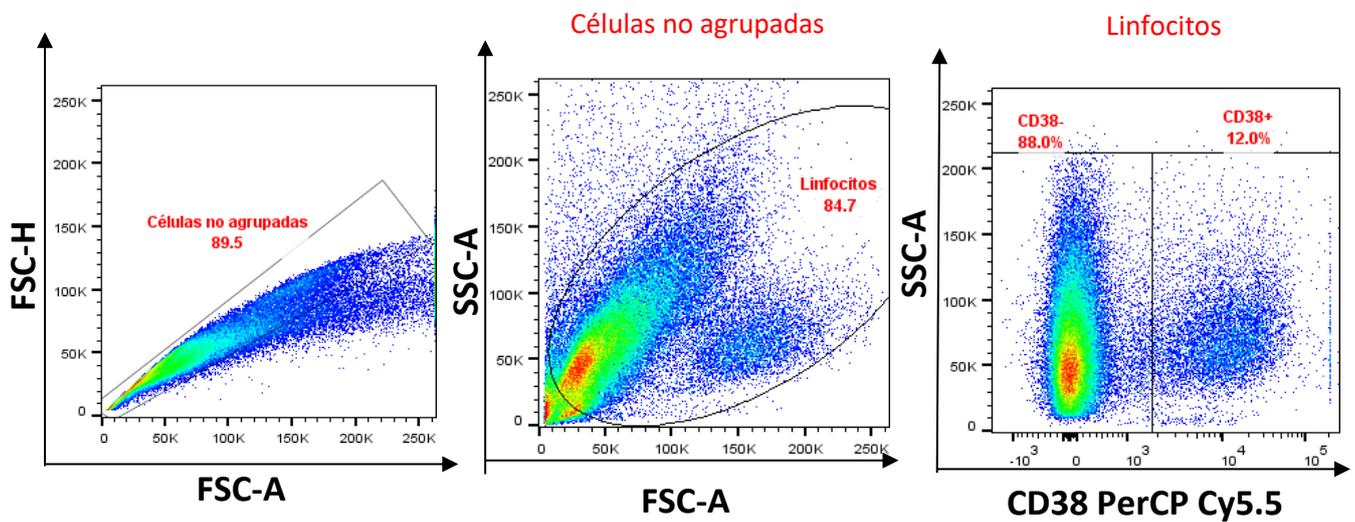
Células CD38- medio (7 días en cultivo)





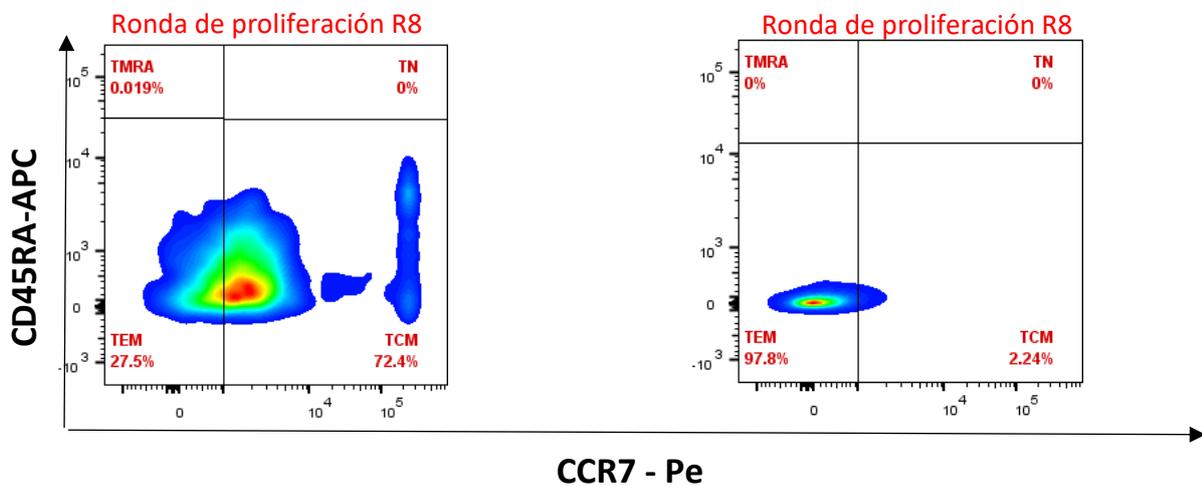
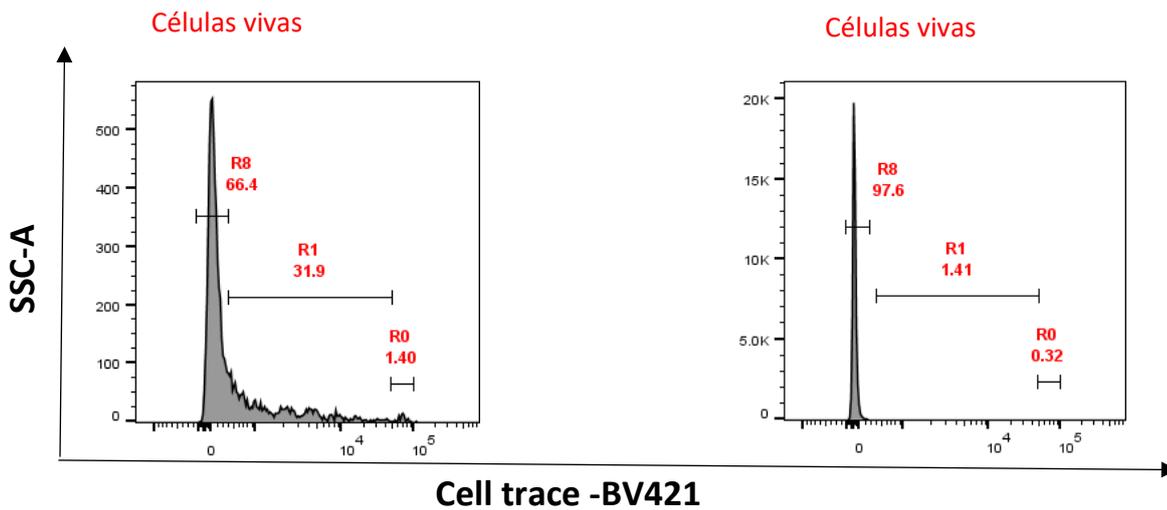
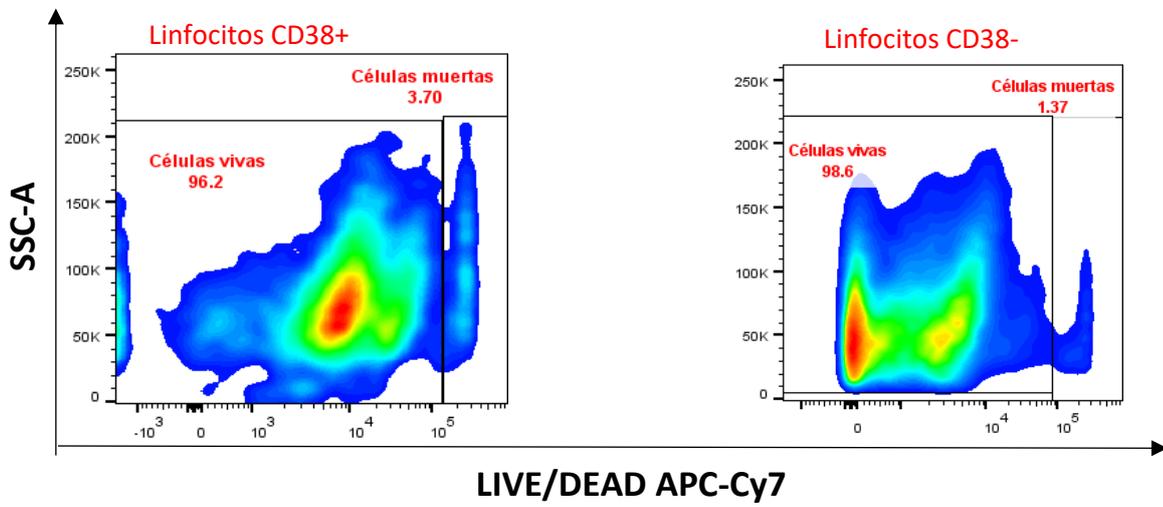
Determinación de los parámetros: viabilidad, proliferación y diferenciación en células TCM CD38+ y CD38-, cultivadas por 7 días en condiciones de estimulación vía TCR (α CD3/CD28 e IL-2).

7b)



Células CD38+ estimuladas vía TCR con α CD3/CD28 e IL-2 (7 días en cultivo)

Células CD38- estimuladas vía TCR α CD3/CD28 e IL-2 (7 días en cultivo)



7c)

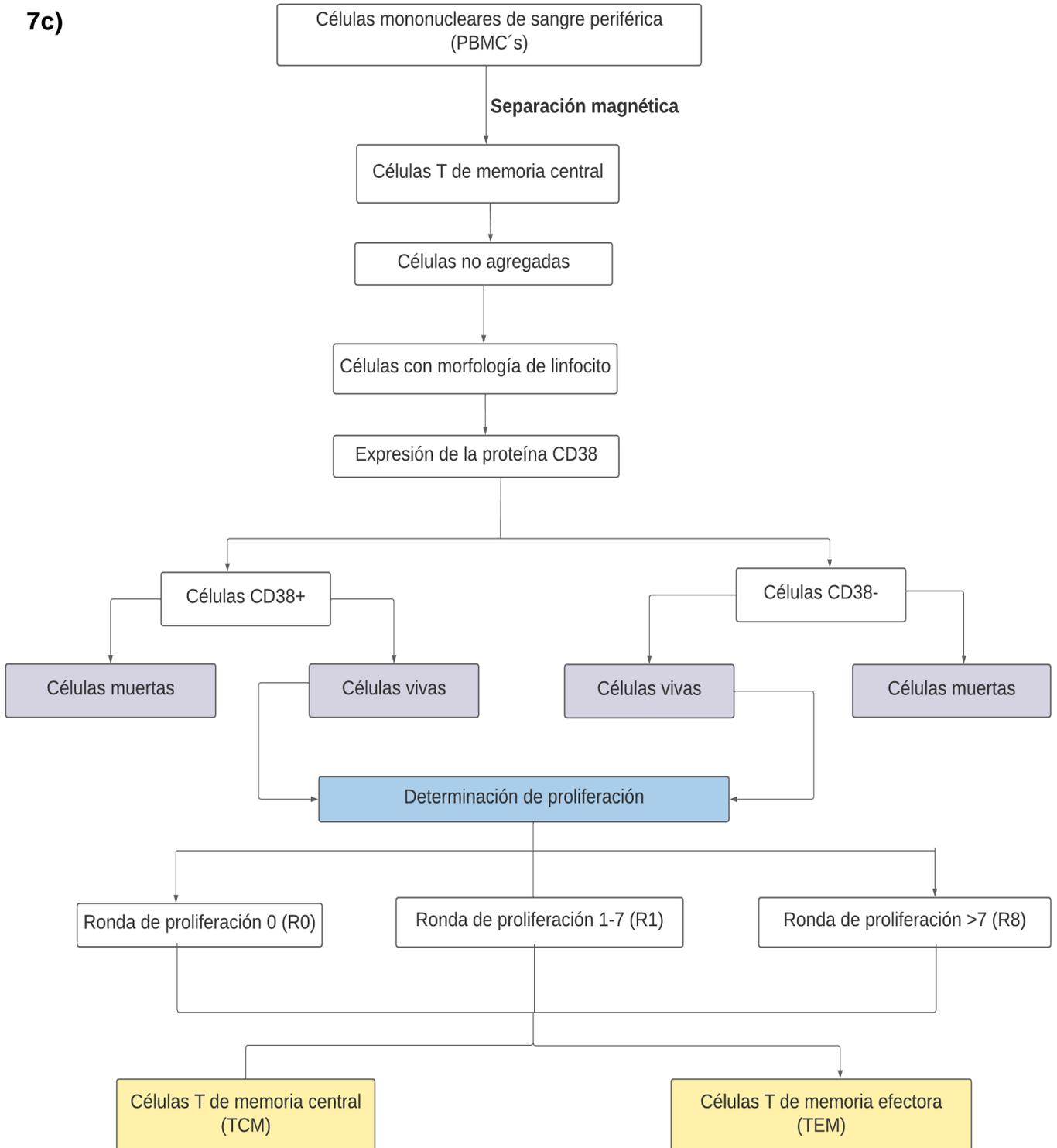


Figura 7. Análisis de citometría de flujo para la determinación de los parámetros viabilidad, proliferación y diferenciación en células TCM CD38+ y CD38-. En a) se muestra el análisis para las células en condiciones de cultivo y en b) las células que fueron estimuladas a través del TCR. El esquema mostrado en c) resume la estrategia de análisis. Imágenes representativas para un sujeto, se empleó una n=8. Los análisis se realizaron en FlowJo versión 10.8.1

VI. La estimulación vía TCR promueve la sobrevida de las células TCM en cultivo in vitro

Estudios previos han mostrado que las células T son susceptibles a la disminución en las concentraciones de NAD⁺. Ensayos con un inhibidor de NAMPT, enzima limitante en la vía de salvamento de NAD⁺, mostraron que la disminución en la concentración de NAD⁺ es seguida por una disminución en las concentraciones intracelulares de ATP y disminución en la sobrevida de los linfocitos T tratados (Bruzzone et al. 2009). La proteína CD38 es una de las principales NADasas con una gran capacidad para remover NAD⁺ y en ensayos previos del grupo, en el contexto de la infección por VIH⁺, se ha observado que hay una correlación positiva entre las concentraciones de NAMPT en plasma y la cuenta de células TCD4⁺ (datos no publicados).

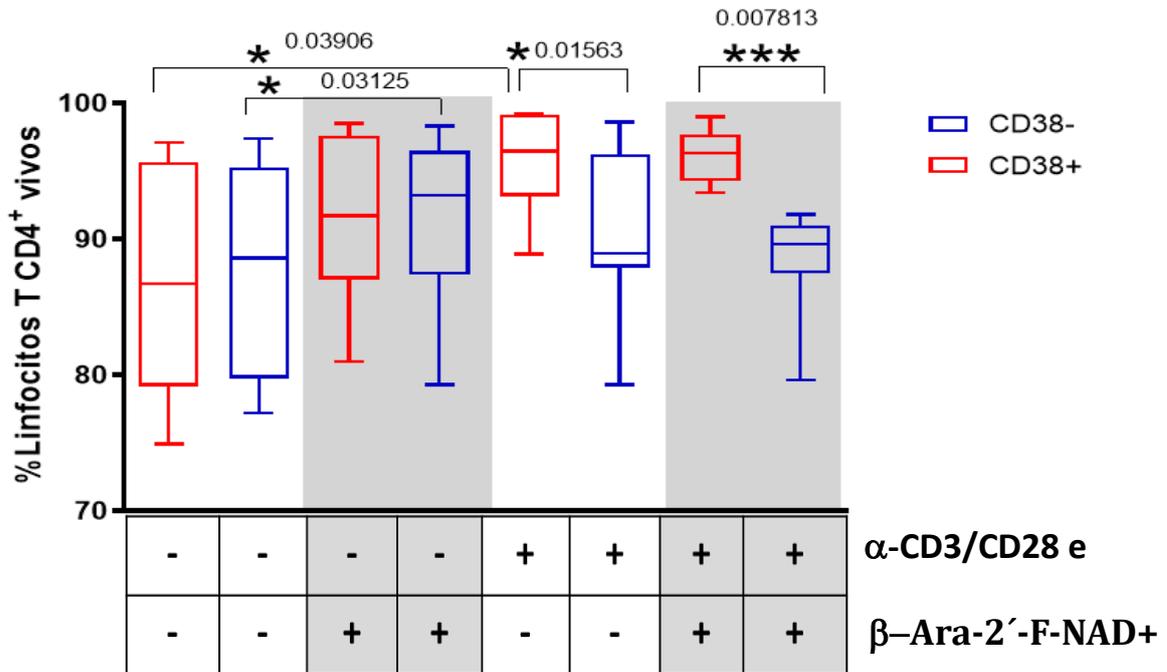
Estos hallazgos nos han llevado a plantearnos que la sobrevida de los linfocitos T también se vería en detrimento bajo condiciones en las que haya un aumento en la tasa de degradación de NAD⁺, tal es el caso de un aumento en la actividad de CD38, ya sea por un aumento en el número de moléculas o bien por mecanismos que modulen su actividad NADasa.

Se realizó la determinación de sobrevida en linfocitos TCM CD38⁺ y CD38⁻ en cuatro condiciones: basal, basal en presencia del inhibidor Ara-2'-F-NAD⁺ y estimuladas con anti CD3/CD28 e IL-2 y estimuladas en presencia de ARA-2'-NAD⁺. La determinación de sobrevida se evaluó tras siete días de cultivo con recambio de medio e inhibidor cada 48 horas, el estímulo anti CD3/CD28 se retiró después de las primeras 6 horas del ensayo.

En la **figura 8** se puede observar el resultado para cuatro condiciones distintas: células en condiciones basales en presencia y ausencia de Ara-2'-F-NAD⁺ y células activadas vía TCR en presencia y ausencia de Ara-2'-F-NAD⁺, estas condiciones fueron evaluadas en linfocitos TCM CD38⁺ y CD38⁻. Los resultados muestran que bajo condiciones basales más del 85% de los linfocitos CD38⁺ y CD38⁻ sobrevive a un periodo largo de cultivo (7 días) aún en un medio no adicionado con IL-7. Bajo condiciones basales en presencia del inhibidor Ara-2'-F-NAD⁺, se observa una tendencia en la mejora de la sobrevida (una media de 91.7 para las células CD38⁺ y 93.25 para las CD38⁻) para ambas poblaciones, sin embargo, esta diferencia sólo es significativa para la población CD38⁻ ($p=0.03125$). La estimulación vía TCR aumenta considerablemente la sobrevida de los linfocitos CD38⁺ incrementándola un

10% (p=0.3906), en tanto que las células CD38- no muestran una mejora sustancial en su sobrevivencia como respuesta a la estimulación. La evaluación del efecto del inhibidor en células estimuladas mostró que este no tiene un efecto aditivo al efecto del estímulo en la mejora de la sobrevivencia de las células positivas o negativas.

VII. Las células CD38+ poseen mayor capacidad de proliferación tanto en condiciones basales, como



bajo estimulación a través del TCR

Figura 8. Determinación de sobrevivencia en células TCD4+ de memoria central CD38+ y CD38. Comparación de la sobrevivencia entre las células CD38+ (rojo) y CD38- (azul). Las primeras cuatro barras representan la condición basal y las otras cuatro las células estimuladas. El sombreado indica la condición experimental en presencia del inhibidor Ara-2'-F-NAD. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba de rangos signados de Wilcoxon empleando GradPadPrsim (versión 9.4.0) con una n=8.

Ante la evidencia de que la disminución en las concentraciones de NAD+, ocasionada por la inhibición de NAMPT, impacta negativamente la sobrevivencia de los linfocitos T (Bruzzzone et al. 2009), nos cuestionamos si la muerte de los linfocitos es precedida por una disminución de la tasa de proliferación. En este caso, evaluamos el impacto de la actividad glicohidrolasa del CD38 localizado en la membrana de los linfocitos TCM en la tasa de proliferación en condiciones de reposo y bajo estimulación vía TCR. Adicionalmente, se evaluó si la inhibición de la actividad NADasa a través de Ara-2'-

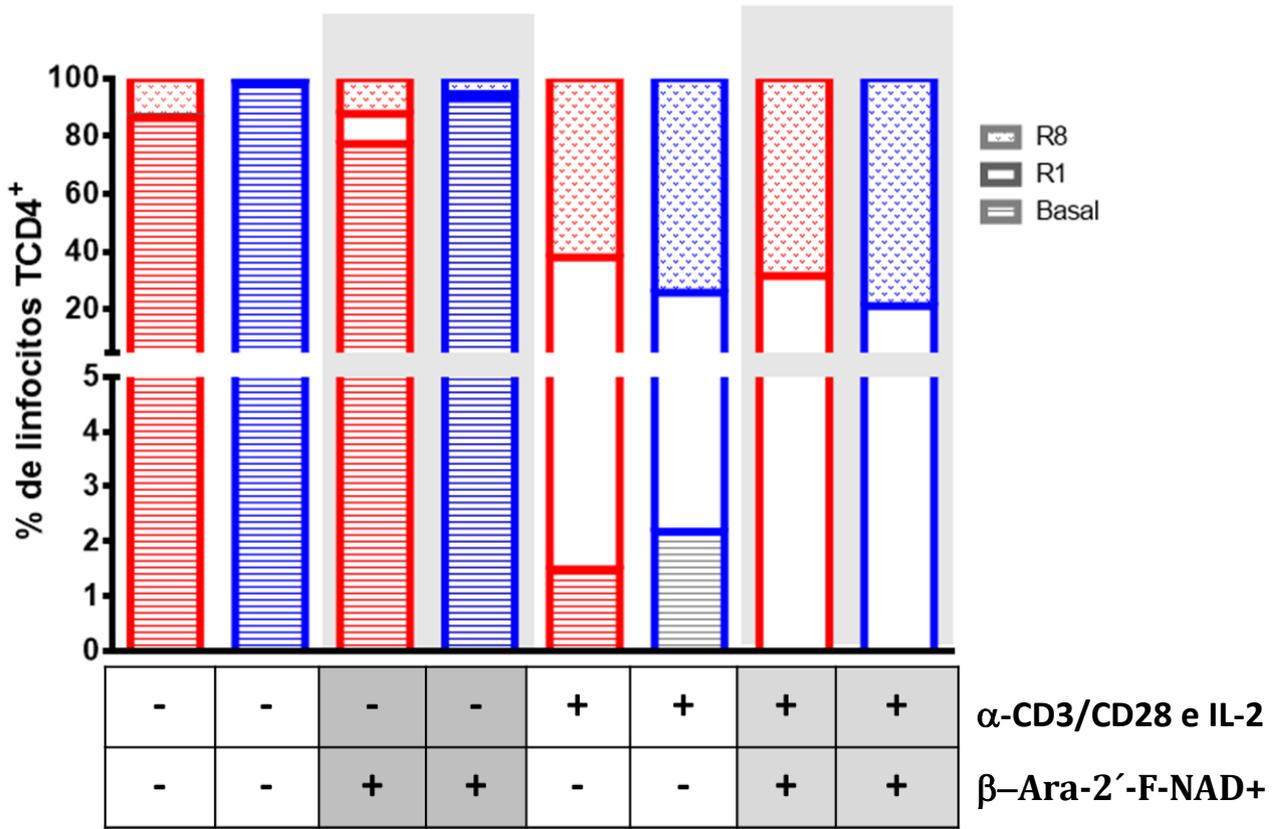
F-NAD⁺ impacta en la tasa de proliferación de los linfocitos TCM tanto en condiciones basales (medio) como en condiciones de estimulación.

Se evaluó la tasa de proliferación en células CD38⁺ y CD38⁻ a través de la dilución del reactivo cell trace violet. Se consideró tres etapas de proliferación, la fase R0 en la cual no observamos dilución del colorante, la fase R1 que representa a aquellas muestras que tuvieron al menos una ronda de proliferación y máximo 7 rondas y la fase R8 para aquellas células con más de 7 rondas de proliferación. En la figura 9a se puede observar la tasa de proliferación asociado a las distintas condiciones experimentales, agrupadas por condición se puede ver en rojo a las células CD38⁺ y en azul a las células CD38⁻, las barras con sombreado representan aquellas condiciones con adición del inhibidor Ara-2'-F'-NAD⁺. La imagen muestra la dinámica entre los tres estadios de proliferación, a medida que disminuye el porcentaje de células en R0 aumenta su distribución en los otros dos estadios.

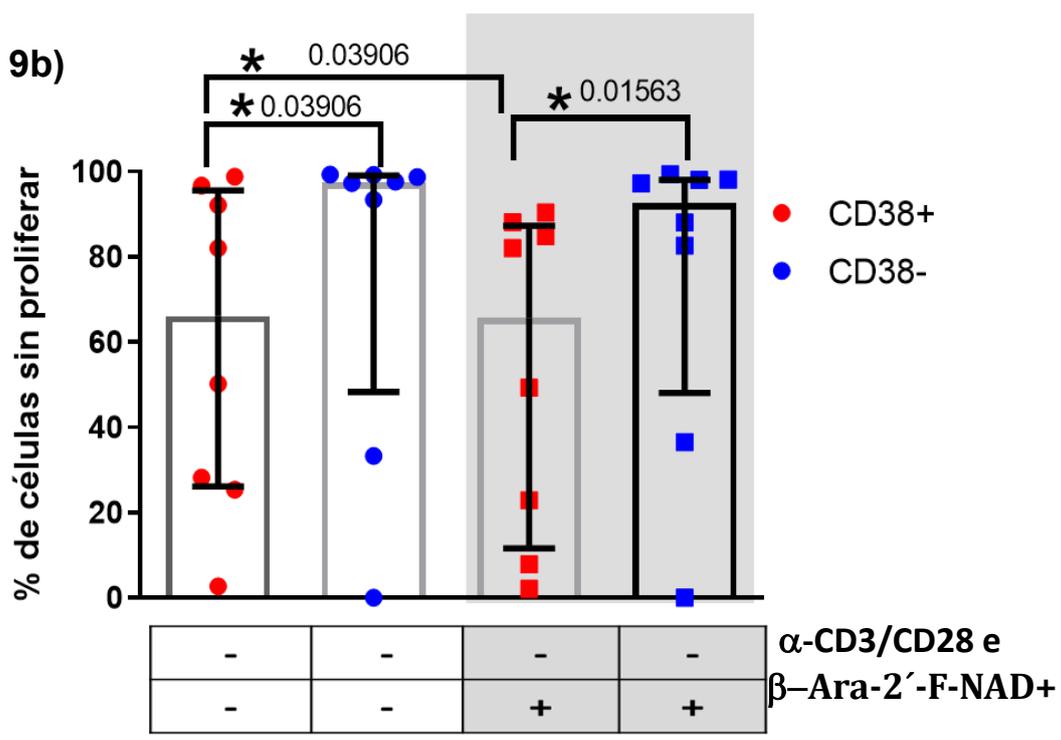
En la figura 9b se muestran un acercamiento a la condición basal con o sin el inhibidor ARA-2'-F'-NAD⁺. Los resultados indican que en condiciones basales las células CD38⁺ tienden más a proliferar en comparación con las células CD38⁻ ($p=0.03906$), aún en ausencia de algún estímulo externo, ya sea por un antígeno o por la presencia de citocinas. El mismo comportamiento se observa en presencia del inhibidor de CD38 ($p=0.01563$), con una ligera disminución en la proliferación con respecto a la condición basal ($p=0.03906$). Por su parte el 95% de las células CD38⁻ permanecen sin proliferar y el inhibidor no incide en su tasa de proliferación.

En la imagen 9c se observa la comparación del nivel de proliferación en condiciones de estimulación vía TCR, la principal diferencia se puede ver en la distribución de las células que tuvieron entre 1 y 7 rondas de proliferación (R1), siendo mayor el porcentaje de las células CD38⁺ que se encuentra en este estadio de proliferación con respecto a las células CD38⁻. El inhibidor no tuvo un efecto significativo en la tasa de proliferación de las células CD38⁺ o CD38⁻ en condiciones de estimulación.

9a)



9b)



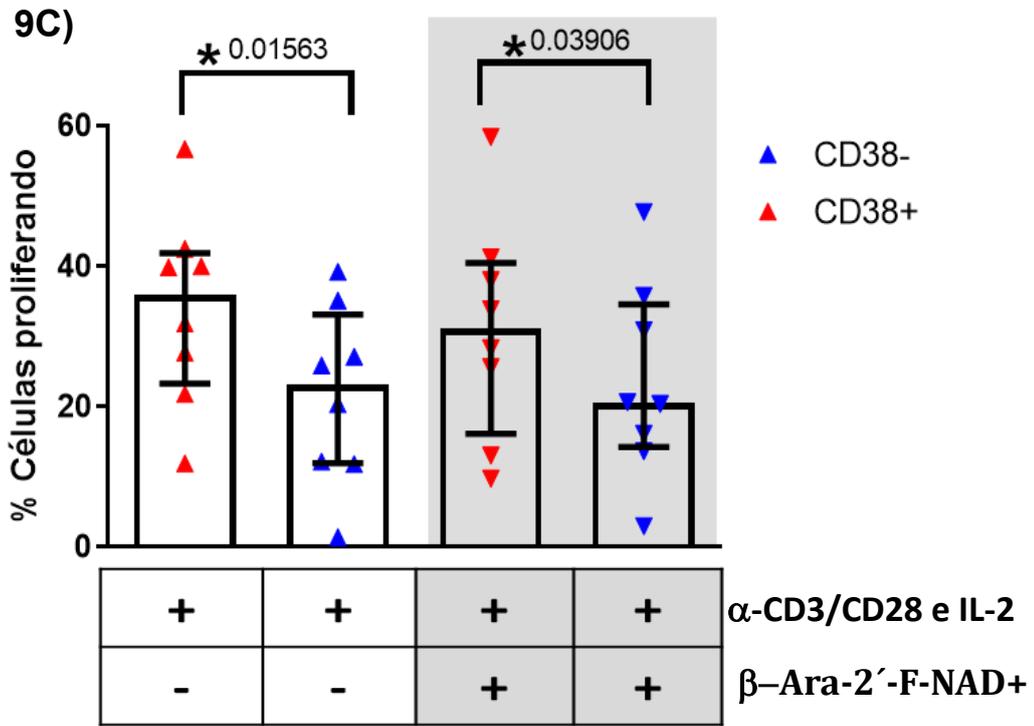


Figura 9. Determinación del grado de proliferación en células TCM CD38+ y CD38-. En a se observa la distribución de las células TCM en las distintas rondas de proliferación, agrupadas por condición se observa en rojo los resultados para las células CD38+ y en azul los resultados para las células CD38-, en gris se muestran las condiciones en presencia del inhibidor Ara-2,-F-NAD+. En b se compara el porcentaje de células que permanecen sin proliferar tras ser cultivadas en medio o en medio adicionado con el inhibidor Ara-2'-F-NAD+. En c se compara el porcentaje de las células CD38+ y CD38- que tras la estimulación vía TCR tuvieron entre 1 y 7 rondas de proliferación (R1), también se evaluó el efecto del inhibidor en esta determinación. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de rangos signados de Wilcoxon empleando GradPadPrism (versión 9.4.0). En b y c se muestra la media +/- rSD, se empleó una n=8.

VIII. Las células CD38⁻ tienden a diferenciarse hacia células TEM tanto en condiciones basales como en condiciones de estimulación a través del TCR.

Otra interrogante abordada en el presente estudio fue la incidencia de CD38 en la diferenciación de las células TCM a células efectoras de memoria. En este ensayo se emplearon condiciones previamente establecidas en el grupo de investigación, en las que se había observado la generación de células TEM a partir de células TCM.

En la imagen 10a) se observa los resultados de diferenciación para aquellas células que en condición basal permanecieron sin proliferar. En estas condiciones las células TCM CD38⁻ tienden a diferenciarse más hacia células TEM (CCR7-CD45RA⁻) comparadas con las células CD38⁺, el mismo comportamiento se observa al comparar las células cultivadas en presencia del inhibidor Ara-2'-F-NAD.

La imagen 10b) muestra los resultados de diferenciación para aquellas células que tuvieron entre 1 y 7 rondas de proliferación (R1), tras la estimulación vía TCR. Los resultados indican que la estimulación incremento el porcentaje de células TCD38⁺ que se diferencian a células TEM, con respecto a las cifras observadas en la condición basal. No obstante, son las células CD38⁻ las que se diferencian más hacia células de memoria efectora en condiciones de estimulación y esta dinámica se conserva con la adición del inhibidor Ara-2'-F-NAD⁺.

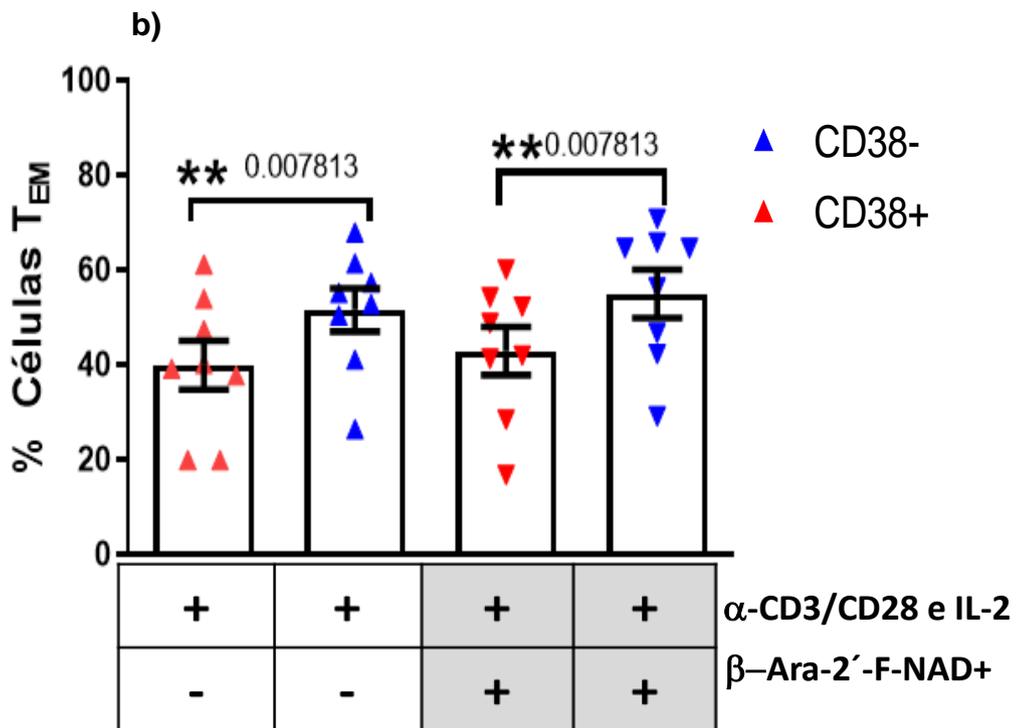
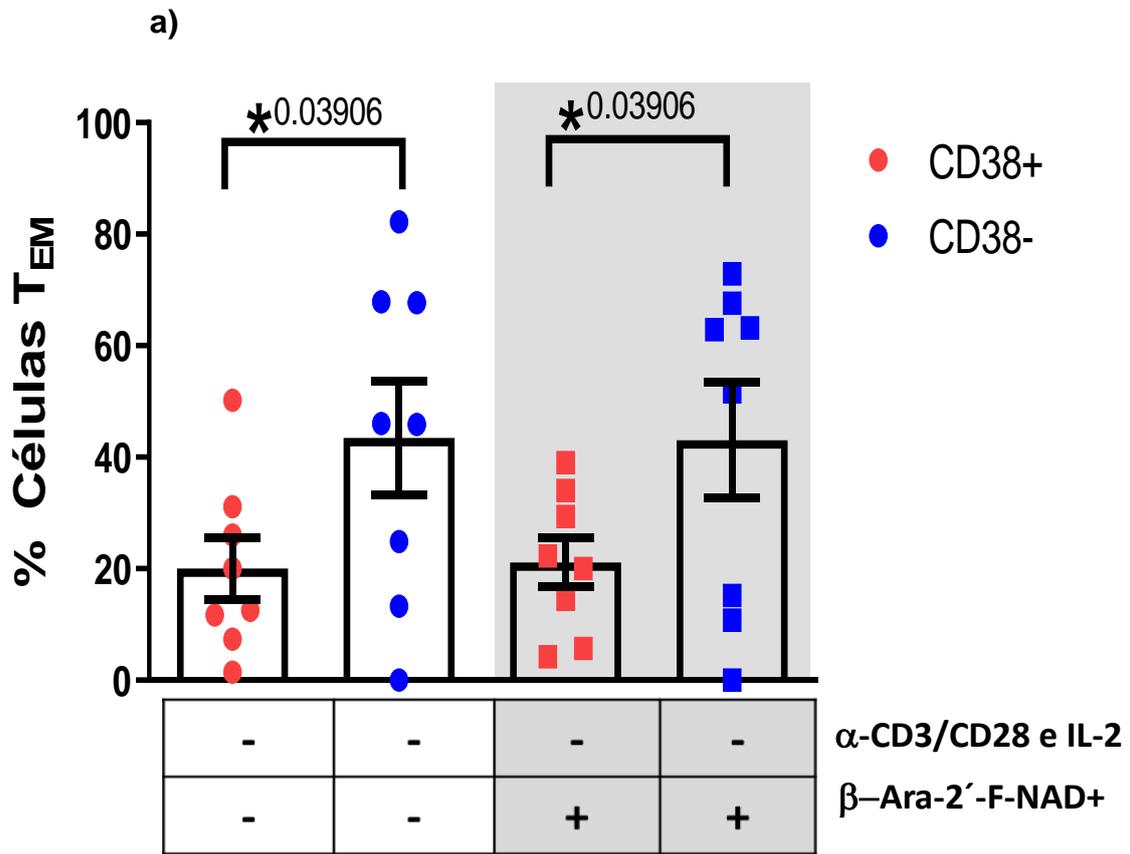


Figura 10. Determinación del grado de diferenciación de las células TCM CD38+ y CD38- a células efectoras de memoria. Comparación de la incidencia de CD38 en la diferenciación de las células CD38+ (rojo) y CD38- (azul) en condiciones basales y en presencia de Ara-2'-F-NAD a una concentración de 1.69 μ M (figura a). En b se realiza esta comparación en células que han sido estimuladas a través del receptor de células T con o sin adición del inhibidor de CD38. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de rangos signados de Wilcoxon empleando GradPadPrism (versión 9.4.0). En b y c se muestra la media \pm rSD, se empleó una n=8.

8. Discusión

En este trabajo evaluamos el efecto de la actividad enzimática de CD38 en diversos parámetros de funcionalidad de las células TCM. En una primera caracterización se emplearon células TCM CD38⁺ y CD38⁻ aisladas, para comparar su perfil transcripcional a partir de la determinación de 91 genes de interés. Los resultados de este análisis nos condujeron a plantear un diseño experimental que permitiera caracterizar in vitro el efecto de la expresión de CD38 en la funcionalidad de las células T, especialmente en aquellas que se encuentran activadas. La funcionalidad se evaluó a través de la determinación de los parámetros: supervivencia, proliferación y diferenciación a células TEM.

El interés en el estudio de CD38 como un agente que puede contribuir en aspectos clave de la funcionalidad de las células TCM proviene principalmente de estudios previos del grupo de investigación, en los que se ha observado que en respuesta a un estímulo antigénico (SEB, proteína B de estafilococos aureus y CMV; citomegalovirus) las células CD38⁺ producen menos IL-2 y más IFN- γ comparadas con las células CD38⁻ (Espinosa et al. 2010; Olvera-García et al. 2014), característica atípica en las células de memoria y que en cambio se asemeja a características propias de células efectoras (Sallusto et al. 1999; Willinger et al. 2005; Appay et al. 2008). Adicionalmente, en la última década se ha acumulado evidencia que vincula la expresión de CD38 con niveles disminuidos de NAD⁺ en tejidos y células inmunes como monocitos y células T (Covarrubias et al. 2021; C. C. S. Chini et al. 2020b). En este sentido, evidencia derivada de ensayos en células T con inhibidores de NAMPT, la enzima limitante de la vía de salvamento para NAD⁺, muestran que la disminución en las concentraciones de NAD⁺ alteran la proliferación y producción de citocinas y culmina en la muerte de las células, siendo las células activadas las más susceptibles a la falta de NAD⁺ en comparación con las células en reposo (Bruzzone et al. 2009).

Previamente se ha mencionado que en un primer acercamiento se realizó una comparación del transcriptoma de las células CD38⁺ y CD38⁻ para 91 genes de interés y de este análisis se obtuvieron 20 genes diferencialmente expresados entre ambas poblaciones (figura 2a y 2b) cuyo análisis de enriquecimiento mostró que estos genes podían relacionarse entre sí en tres procesos biológicos generales: Muerte celular y supervivencia, proliferación y producción de citocinas (figura 3a y 3b). Debido a

que los genes fueron preseleccionados es altamente probable que haya un sesgo en los resultados, además las diferencias en el nivel de expresión de los distintos genes no fue lo suficientemente amplia para que el análisis predijera si la regulación de los procesos era positiva o negativa. De manera que habría que evaluar directamente cada uno de estos parámetros en las poblaciones: TCM CD38+y CD38-, para averiguar si CD38 puede regularlos.

Con la finalidad de poder comprobar si las moléculas de CD38 expresadas en la superficie de los linfocitos T humanos poseen actividad enzimática, se llevó a cabo un ensayo fluorométrico para dar seguimiento a la degradación de e-NAD un análogo del sustrato de CD38 cuyo producto de degradación es fluorescente. En la figura 5 se muestran que efectivamente CD38 posee actividad NADasa y esta puede ser inhibida por el compuesto Ara-2'-F-NAD⁺ a una concentración de 1.69 μ M. Una vez demostrada la prueba de principio, procedimos a realizar las distintas determinaciones empleando cuatro condiciones experimentales para ambas poblaciones de estudio: Células control cultivadas en condiciones basales (medio), células cultivadas en condiciones de estimulación vía TCR (α -CD3/CD28) y estas condiciones se replicaron con la adición del inhibidor de CD38, Ara-2'-F-NAD⁺.

El primer parámetro que se evaluó fue la sobrevivencia de las células. Se sabe que la sobrevivencia de las células T es controlada por un balance entre la expresión de moléculas pro apoptóticas y anti apoptóticas y la combinación de estas moléculas da lugar a distintos programas que sostienen la sobrevivencia de las células. Se han descrito dos mecanismos principales asociados a la sobrevivencia de linfocitos T: el primero es mediado por IL-7 y su receptor y es el encargado de sostener la sobrevivencia de células naive y células de memoria en reposo a través de Bcl-2; mientras que en condiciones de estimulación antigénica vía TCR, un segundo mecanismo mediado por las proteínas anti apoptóticas Bcl-2, Bcl-xL, A1 y Mcl-1 y la proteína proapoptótica Bim, sustituye al primero y será el encargado de sostener la sobrevivencia de las células activadas(Boyman et al. 2009; Tuzlak et al. 2017).

En primer lugar, es necesario destacar que la sobrevivencia de las células en reposo fue superior al 80% tanto para células CD38+ como para CD38- aún en ausencia de IL-7 o IL-15 exógena(Schluns y Lefrançois 2003), la mejora en la sobrevivencia de las células activadas puede estar asociada a la expresión de las proteínas anti apoptóticas Bcl-

XL y A1, esto es consistente con el tiempo del experimento, pues se ha observado que su expresión aumenta considerablemente a partir de las 6 horas tras la estimulación antigénica. Los resultados indicarían que las células CD38⁺ responden más rápido a las señales generadas a partir de la estimulación vía TCR.

Un aspecto destacable es que en condiciones basales, el inhibidor Ara-2'-F-NAD mejoró la sobrevivencia de las células CD38, a pesar de que el ensayo de cinética enzimática sugiere que bajo nuestras condiciones experimentales la principal enzima degradadora de NAD⁺ en los linfocitos TCM es CD38, sería necesario realizar otros ensayos para evaluar la presencia de otras enzimas que pudieran estar contribuyendo a estos resultados; además, es posible que haya una contribución del efecto del inhibidor en las células CD38⁺ que se encuentran en el mismo cultivo. . En estudios previos se ha resaltado que la ectoenzima CD38 puede alterar el medio para las células vecinas, a través del consumo de precursores de NAD⁺ tales como mononucleótido de nicotinamida, NMN(C. C. S. Chini et al. 2020b).

Los resultados muestran que las células CD38⁺ no son más propensas a morir con respecto a las células CD38⁻, por el contrario, muestran altos niveles de sobrevivencia en condiciones basales, aún después de un periodo prologado en cultivo y responden más rápido a las señales generadas tras la estimulación vía TCR (figura 8), lo que refuta nuestra hipótesis. Debido a que emplearon muestras provenientes de sujetos sanos y a pesar de inducir la expresión de CD38 por estimulación antigénica de las células consideramos que el incremento en la expresión no se asemeja al nivel de expresión observado en condiciones patológicas(Liu et al. 1997), por lo que sería importante realizar estas pruebas en presencia de otros estímulos que asemejen la expresión de CD38 en una condición patológica, además sería necesario determinar las fluctuaciones en las concentraciones de NAD⁺ en presencia de CD38. Se sabe que en respuesta a la estimulación antigénica los linfocitos sobreexpresan NAMPT, enzima clave en la vía de salvamento para la generación de NAD⁺, de manera que es factible considerar que aún en condiciones de incremento en la expresión de CD38, los niveles de NAD⁺ pueden ser regulados evitando que estos disminuyan a niveles que resulten mortales para las células.

Los resultados de la determinación del estado proliferativo de las células TCM CD38⁺ y CD38⁻ muestran que en estado basal (medio) una pequeña fracción de las células

CD38+ puede estar proliferando, lo que sería consistente con un estado en el que las células habrían sido activadas in vivo, previo al estudio. Por su parte las células CD38- permanecen sin proliferar. La estimulación a través del receptor de células T promueve la proliferación en ambas poblaciones, siendo las células CD38+ las que proliferan más. La determinación del grado de expresión de IL-2 a nivel de mRNA indicó que las células CD38+ producen menos IL-2 (figura 4a) consistente con observaciones previas a nivel de proteína (Espinosa et al. 2010; Olvera-García et al. 2014), sin embargo no se observó incidencia de esta diferencia en alterar la proliferación de las células CD38+, esto se puede deber a que como parte de la estrategia experimental las células fueron suplementadas con IL-2 exógena, además se ha descrito que si bien la expresión de IL-2 aumenta durante la activación de los linfocitos, disminuye durante la fase de memoria y en cambio la IL-15 mantiene sus nivel de expresión desde la activación de los linfocitos y durante el estadio de memoria (Schluns y Lefrançois 2003). En otros estudios se ha reportado que la proliferación de los linfocitos activados es reducida drásticamente en presencia del compuesto FK866, el cual inhibe la enzima NAMPT, enzima clave en la síntesis de NAD (Bruzzone et al. 2009; Cantó, Menzies, y Auwerx 2015). Nuevamente se hace necesario evaluar los niveles de NAD en presencia de CD38 y determinar si es comparable con los niveles observados con el compuesto FK866. Un hallazgo destacable es que NAMPT se encuentra en la lista de los genes diferencialmente expresados en entre ambas poblaciones, en la figura 2b se observa que de hecho son las células CD38- las que expresan más NAMPT por lo que dar seguimiento a esta proteína en los futuros experimentos sería muy informativo, pues aunque se desconoce si hay mecanismos postranscripcionales involucrados en la regulación de la expresión de NAMPT implicaría que las células CD38 tienen niveles de NAD considerablemente más altos debido a una mayor concentración de NAMPT y sin el aporte de CD38 a la degradación de NAD.

La evaluación de la tasa de proliferación entre ambas poblaciones mostró que, de manera consistente, las células TCM CD38- se diferencian más hacia células de memoria efectora tanto en condiciones basales como bajo estimulación vía TCR (figura 10). Este hallazgo es consistente con los resultados para la determinación del nivel de expresión del transcrito de IFN- γ (figura 4), se determinó una mayor producción por parte de las células CD38.

La actividad de CD38 a través de la regulación de los niveles de NAD⁺ puede incidir en la regulación de la diferenciación de las células TCM a células TEM. Previamente se ha reportado que CD38 limita la disponibilidad de NAD⁺ para otras enzimas importantes en la regulación inmune, tal es el caso de la sirtuina 2 (SIRT 2), una desacetilasa dependiente de NAD⁺. En el contexto de la investigación en cáncer de mama se ha observado que la SIRT 2 correlaciona de forma positiva con la diferenciación de células TCD8 a células TEM y en cambio en los escenarios en los que se estudiaron células sin esta proteína (linfocitos T CD8⁺ Sirt2^{-/-}) hubo una disminución considerable en el número de células TEM (Jiang et al. 2020). La regulación de las sirtuinas se puede dar por cambios en el nivel de expresión de la proteína o bien a través de la modulación de su sustrato, NAD⁺. De manera que la expresión de CD38 puede estar limitando la disponibilidad del sustrato para SIRT2, ocasionando una disminución en la generación de células TEM a partir de células TCM CD38⁺ (figura 10). Sin embargo, sería necesario realizar ensayos para determinar la actividad de la sirtuina 2 en nuestras condiciones experimentales y realizar pruebas con inhibidores para SIRT2 con la finalidad de comprobar si la regulación de su actividad ocasiona alteraciones en la diferenciación de células TCM CD4⁺ a células TEM.

La regulación en el estado de diferenciación de las células T CD4⁺ mediada por SIRT2 podría estar estrechamente vinculada a la disminución de la proteína Opa1, pues la proteína SIRT2 regula su actividad desacetilando esta proteína. La proteína Opa1 controla el proceso de fusión de la membrana interna mitocondrial, un evento clave en la generación de células de memoria. Estudios previos han reportado una considerable reducción en la generación de células de memoria en condiciones en las que la expresión de Opa1 se encuentra disminuida (Buck et al. 2016). Adicionalmente, las sirtuina1 también pueden incidir en la generación de células de memoria mediante la acetilación del factor Foxo1 y CD38 puede regular esta vía limitando la disponibilidad de NAD⁺ para la SIRT1 (Chatterjee et al. 2018).

Los resultados de las determinaciones de proliferación y diferenciación de las células CD38⁺ y CD38⁻, muestran que en general las células CD38⁺ activadas tienden a acumularse más en las primeras rondas de proliferación (R1) con respecto a las células CD38⁻, por el contrario, las células CD38⁻ son más propensas a diferenciarse a células TEM. Esta dinámica podría constituir un mecanismo de cooperación en el

que las células CD38+ son tendientes a conservar propiedades de células centrales de memoria con alta capacidad proliferativa y de supervivencia, en cambio las células CD38- serían más propensas a diferenciarse y eventualmente adquirir características propias de una célula de memoria efectora

9. Conclusiones

1. En este trabajo demostramos que el CD38 expresado en la superficie de linfocitos T posee actividad NAD⁺ glicohidrolasa. Adicionalmente se determinó que su actividad puede ser inhibida por Ara-2,-F-NAD a una concentración de 1.69 μ M,
2. Los ensayos demostraron que, bajo condiciones no patogénicas, CD38 no altera la sobrevivencia de las células y las señales derivadas de la estimulación antigénica vía TCR promueven la sobrevivencia de las células TCM.
3. Las células CD38⁺ y CD38⁻ exhiben comportamientos distintos que podrían constituir un mecanismo de cooperación en el que las células CD38⁺ son tendientes a conservar propiedades de células centrales de memoria con alta capacidad proliferativa y de sobrevivencia, en cambio las células CD38⁻ serían más propensas a diferenciarse y eventualmente adquirir características propias de una célula de memoria efectora.
4. Los resultados de este trabajo representan un avance en el conocimiento que se tiene sobre la función de CD38, sin embargo, será necesario que en futuros experimentos se añadan condiciones experimentales que incrementen la expresión de CD38 a niveles cercanos a los observados en condiciones patogénicas. La evaluación de la concentración de NAD⁺ se hace necesaria para tener evidencia directa del efecto de CD38 en la regulación de su concentración, de igual forma determinar los productos de catálisis de CD38 permitirá dar seguimiento a la actividad catalítica de CD38.
5. La creciente evidencia que vincula a CD38 con la regulación de diversos procesos metabólicos, hace necesario extender el abordaje que se ha hecho en este trabajo y resalta la necesidad de investigar la participación de CD38 en el inmunometabolismo de las células TCM.

Referencias bibliográficas

- Appay, Victor, Jorge R. Almeida, Delphine Sauce, Brigitte Autran, y Laura Papagno. 2007. «Accelerated Immune Senescence and HIV-1 Infection». *Experimental Gerontology* 42 (5): 432-37. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2006.12.003>.
- Appay, Victor, Rene A. W. van Lier, Federica Sallusto, y Mario Roederer. 2008. «Phenotype and Function of Human T Lymphocyte Subsets: Consensus and Issues». *Cytometry. Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology* 73 (11): 975-83. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20643>.
- Ausiello, C. M., A. la Sala, C. Ramoni, F. Urbani, A. Funaro, y F. Malavasi. 1996. «Secretion of IFN-Gamma, IL-6, Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor and IL-10 Cytokines after Activation of Human Purified T Lymphocytes upon CD38 Ligation». *Cellular Immunology* 173 (2): 192-97. <https://doi.org/10.1006/cimm.1996.0267>.
- Bai, Francesca, Camilla Tincati, Esther Merlini, Carlotta Pacioni, Elisabetta Sinigaglia, Giovanni Carpani, Antonella d'Arminio Monforte, y Giulia Marchetti. 2012. «Reduced Central Memory CD4+ T Cells and Increased T-Cell Activation Characterise Treatment-Naive Patients Newly Diagnosed at Late Stage of HIV Infection». *AIDS Research and Treatment* 2012: 314849. <https://doi.org/10.1155/2012/314849>.
- Barbosa, Maria Thereza P., Sandra M. Soares, Colleen M. Novak, David Sinclair, James A. Levine, Pinar Aksoy, y Eduardo Nunes Chini. 2007. «The Enzyme CD38 (a NAD Glycohydrolase, EC 3.2.2.5) Is Necessary for the Development of Diet-induced Obesity». *The FASEB Journal* 21 (13): 3629-39. <https://doi.org/10.1096/fj.07-8290com>.
- Bofill, M., y N.J. Borthwick. 2000. «CD38 in Health and Disease». En *Chemical Immunology and Allergy*, editado por K. Mehta y F. Malavasi, 75:218-34. Basel: KARGER. <https://doi.org/10.1159/000058771>.
- Boyman, Onur, Sven Létourneau, Carsten Krieg, y Jonathan Sprent. 2009. «Homeostatic Proliferation and Survival of Naïve and Memory T Cells». *European Journal of Immunology* 39 (8): 2088-94. <https://doi.org/10.1002/eji.200939444>.
- Bruzzone, Santina, Floriana Fruscione, Sara Morando, Tiziana Ferrando, Alessandro Poggi, Anna Garuti, Agustina D'Urso, et al. 2009. «Catastrophic NAD+ Depletion in Activated T Lymphocytes through Nampt Inhibition Reduces Demyelination and Disability in EAE». Editado por Colin Combs. *PLoS ONE* 4 (11): e7897. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007897>.
- Buck, Michael D., David O'Sullivan, Ramon I. Klein Geltink, Jonathan D. Curtis, Chih-Hao Chang, David E. Sanin, Jing Qiu, et al. 2016. «Mitochondrial Dynamics Controls T Cell Fate through Metabolic Programming». *Cell* 166 (1): 63-76. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.035>.
- Camacho-Pereira, Juliana, Mariana G. Tarragó, Claudia C.S. Chini, Veronica Nin, Carlos Escande, Gina M. Warner, Amrutesh S. Puranik, et al. 2016. «CD38 Dictates Age-Related NAD Decline and Mitochondrial Dysfunction through an SIRT3-Dependent Mechanism». *Cell Metabolism* 23 (6): 1127-39. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.05.006>.
- Cantó, Carles, Keir J. Menzies, y Johan Auwerx. 2015. «NAD(+) Metabolism and the Control of Energy Homeostasis: A Balancing Act between Mitochondria and the Nucleus». *Cell Metabolism* 22 (1): 31-53. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.05.023>.
- Chahroudi, Ann, Steven E. Bosinger, Thomas H. Vanderford, Mirko Paiardini, y Guido Silvestri. 2012. «Natural SIV Hosts: Showing AIDS the Door». *Science (New York, N.Y.)* 335 (6073): 1188-93. <https://doi.org/10.1126/science.1217550>.
- Chatterjee, Shilpak, Anusara Daenthanasanmak, Paramita Chakraborty, Megan W. Wyatt, Payal Dhar, Shanmugam Panneer Selvam, Jianing Fu, et al. 2018. «CD38-NAD+ Axis Regulates Immunotherapeutic Anti-Tumor T Cell Response». *Cell Metabolism* 27 (1): 85-100.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.10.006>.

- Chini, Claudia C. S., Thais R. Peclat, Gina M. Warner, Sonu Kashyap, Jair Machado Espindola-Netto, Guilherme C. de Oliveira, Lilian S. Gomez, et al. 2020a. «CD38 Ecto-Enzyme in Immune Cells Is Induced during Aging and Regulates NAD⁺ and NMN Levels». *Nature Metabolism* 2 (11): 1284-1304. <https://doi.org/10.1038/s42255-020-00298-z>.
- . 2020b. «CD38 Ecto-Enzyme in Immune Cells Is Induced during Aging and Regulates NAD⁺ and NMN Levels». *Nature Metabolism* 2 (11): 1284-1304. <https://doi.org/10.1038/s42255-020-00298-z>.
- Chini, Claudia, Kelly A. Hogan, Gina M. Warner, Mariana G. Tarragó, Thais R. Peclat, Tamar Tchkonja, James L. Kirkland, y Eduardo Chini. 2019. «The NADase CD38 Is Induced by Factors Secreted from Senescent Cells Providing a Potential Link between Senescence and Age-Related Cellular NAD⁺ Decline». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 513 (2): 486-93. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.03.199>.
- Chun, T. W., K. Chadwick, J. Margolick, y R. F. Siliciano. 1997. «Differential Susceptibility of Naive and Memory CD4⁺ T Cells to the Cytopathic Effects of Infection with Human Immunodeficiency Virus Type 1 Strain LAI». *Journal of Virology* 71 (6): 4436-44.
- Covarrubias, Anthony J., Abhijit Kale, Rosalba Perrone, Jose Alberto Lopez-Dominguez, Angela Oliveira Pisco, Herbert G. Kasler, Mark S. Schmidt, et al. 2019. «Aging-Related Inflammation Driven by Cellular Senescence Enhances NAD Consumption via Activation of CD38⁺ pro-Inflammatory Macrophages». Preprint. Immunology. <https://doi.org/10.1101/609438>.
- . 2021. «Author Correction: Senescent Cells Promote Tissue NAD⁺ Decline during Ageing via the Activation of CD38⁺ Macrophages». *Nature Metabolism* 3 (1): 120-21. <https://doi.org/10.1038/s42255-020-00328-w>.
- Deaglio, S., R. Mallone, G. Baj, D. Donati, G. Giraudo, F. Corno, S. Bruzzone, M. Geuna, C. Ausiello, y F. Malavasi. 2001. «Human CD38 and Its Ligand CD31 Define a Unique Lamina Propria T Lymphocyte Signaling Pathway». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15 (3): 580-82. <https://doi.org/10.1096/fj.00-0522fje>.
- Dianzani, U., A. Funaro, D. DiFranco, G. Garbarino, M. Bragardo, V. Redoglia, D. Buonfiglio, L. B. De Monte, A. Pileri, y F. Malavasi. 1994. «Interaction between Endothelium and CD4⁺CD45RA⁺ Lymphocytes. Role of the Human CD38 Molecule». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 153 (3): 952-59.
- Douek, Daniel C., Jason M. Brenchley, Michael R. Betts, David R. Ambrozak, Brenna J. Hill, Yukari Okamoto, Joseph P. Casazza, et al. 2002. «HIV Preferentially Infects HIV-Specific CD4⁺ T Cells». *Nature* 417 (6884): 95-98. <https://doi.org/10.1038/417095a>.
- Douek, Daniel C., Louis J. Picker, y Richard A. Koup. 2003. «T Cell Dynamics in HIV-1 Infection». *Annual Review of Immunology* 21: 265-304. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141053>.
- Douek, Daniel C., Mario Roederer, y Richard A. Koup. 2009. «Emerging Concepts in the Immunopathogenesis of AIDS». *Annual Review of Medicine* 60: 471-84. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.60.041807.123549>.
- Dürig, J., M. Naschar, U. Schmücker, K. Renzing-Köhler, T. Hölter, A. Hüttmann, y U. Dührsen. 2002. «CD38 Expression Is an Important Prognostic Marker in Chronic Lymphocytic Leukaemia». *Leukemia* 16 (1): 30-35. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402339>.
- Espinosa, Enrique, Christopher E. Ormsby, Gustavo Reyes-Terán, Robert Asaad, Scott F. Sieg, y Michael M. Lederman. 2010. «Dissociation of CD154 and Cytokine Expression Patterns in CD38⁺ CD4⁺ Memory T Cells in Chronic HIV-1 Infection». *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999)* 55 (4): 439-45. <https://doi.org/10.1097/QAI.0b013e3181ef991d>.
- Fox, Annette, Nguyen Minh Hoa Le, Peter Horby, H. Rogier van Doorn, Vu Trung Nguyen, Hong Ha Nguyen, Trung Cap Nguyen, et al. 2012. «Severe Pandemic H1N1 2009 Infection Is Associated with Transient NK and T Deficiency and Aberrant CD8 Responses». *PloS One* 7 (2): e31535. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031535>.

- Funaro, A., L. B. De Monte, U. Dianzani, M. Forni, y F. Malavasi. 1993. «Human CD38 Is Associated to Distinct Molecules Which Mediate Transmembrane Signaling in Different Lineages». *European Journal of Immunology* 23 (10): 2407-11. <https://doi.org/10.1002/eji.1830231005>.
- García-Guerrero, Estefanía, Ralph Götz, Sören Doose, Markus Sauer, Alfonso Rodríguez-Gil, Thomas Nerreter, K. Martin Kortüm, et al. 2021. «Upregulation of CD38 Expression on Multiple Myeloma Cells by Novel HDAC6 Inhibitors Is a Class Effect and Augments the Efficacy of Daratumumab». *Leukemia* 35 (1): 201-14. <https://doi.org/10.1038/s41375-020-0840-y>.
- Giorgi, J. V., Z. Liu, L. E. Hultin, W. G. Cumberland, K. Hennessey, y R. Detels. 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». *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 6 (8): 904-12.
- Glaría, Estibaliz, y Annabel F. Valledor. 2020. «Roles of CD38 in the Immune Response to Infection». *Cells* 9 (1): E228. <https://doi.org/10.3390/cells9010228>.
- Grossman, Zvi, Martin Meier-Schellersheim, William E. Paul, y Louis J. Picker. 2006. «Pathogenesis of HIV Infection: What the Virus Spares Is as Important as What It Destroys». *Nature Medicine* 12 (3): 289-95. <https://doi.org/10.1038/nm1380>.
- Grossman, Zvi, Martin Meier-Schellersheim, Ana E. Sousa, Rui M. M. Victorino, y William E. Paul. 2002. «CD4+ T-Cell Depletion in HIV Infection: Are We Closer to Understanding the Cause?». *Nature Medicine* 8 (4): 319-23. <https://doi.org/10.1038/nm0402-319>.
- Hercend, T., J. Ritz, S. F. Schlossman, y E. L. Reinherz. 1981. «Comparative Expression of T9, T10, and Ia Antigens on Activated Human T Cell Subsets». *Human Immunology* 3 (3): 247-59. [https://doi.org/10.1016/0198-8859\(81\)90021-5](https://doi.org/10.1016/0198-8859(81)90021-5).
- Ho, H. N., L. E. Hultin, R. T. Mitsuyasu, J. L. Matud, M. A. Hausner, D. Bockstoce, C. C. Chou, S. O'Rourke, J. M. Taylor, y J. V. Giorgi. 1993. «Circulating HIV-Specific CD8+ Cytotoxic T Cells Express CD38 and HLA-DR Antigens». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 150 (7): 3070-79.
- Hogan, Kelly A., Claudia C. S. Chini, y Eduardo N. Chini. 2019. «The Multi-Faceted Ecto-Enzyme CD38: Roles in Immunomodulation, Cancer, Aging, and Metabolic Diseases». *Frontiers in Immunology* 10: 1187. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01187>.
- Jiang, Cui, Jingwei Liu, Min Guo, Xiaoxin Gao, Xuan Wu, Ning Bai, Wendong Guo, et al. 2020. «The NAD-Dependent Deacetylase SIRT2 Regulates T Cell Differentiation Involved in Tumor Immune Response». *International Journal of Biological Sciences* 16 (15): 3075-84. <https://doi.org/10.7150/ijbs.49735>.
- Kar, Anwesha, Shikhar Mehrotra, y Shilpak Chatterjee. 2020. «CD38: T Cell Immuno-Metabolic Modulator». *Cells* 9 (7): E1716. <https://doi.org/10.3390/cells9071716>.
- Katsuyama, Eri, Abel Suarez-Fueyo, Sean J. Bradley, Masayuki Mizui, Ana V. Marin, Lama Mulki, Suzanne Krishfield, et al. 2020. «The CD38/NAD/SIRTUIN1/EZH2 Axis Mitigates Cytotoxic CD8 T Cell Function and Identifies Patients with SLE Prone to Infections». *Cell Reports* 30 (1): 112-123.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.12.014>.
- Konen, Jessica M., Jared J. Fradette, y Don L. Gibbons. 2019. «The Good, the Bad and the Unknown of CD38 in the Metabolic Microenvironment and Immune Cell Functionality of Solid Tumors». *Cells* 9 (1): E52. <https://doi.org/10.3390/cells9010052>.
- Kumagai, M., E. Coustan-Smith, D. J. Murray, O. Silvennoinen, K. G. Murti, W. E. Evans, F. Malavasi, y D. Campana. 1995. «Ligation of CD38 Suppresses Human B Lymphopoiesis». *The Journal of Experimental Medicine* 181 (3): 1101-10. <https://doi.org/10.1084/jem.181.3.1101>.
- Lande, Roberto, Francesca Urbani, Beatrice Di Carlo, Giuseppe Sconocchia, Silvia Deaglio, Ada Funaro, Fabio Malavasi, y Clara M. Ausiello. 2002. «CD38 Ligation Plays a Direct Role in the Induction of IL-1 β , IL-6, and IL-10 Secretion in Resting Human Monocytes». *Cellular Immunology* 220 (1): 30-38. [https://doi.org/10.1016/S0008-8749\(03\)00025-X](https://doi.org/10.1016/S0008-8749(03)00025-X).
- Lee, Hon Cheung. 2006. «Structure and Enzymatic Functions of Human CD38». *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)* 12 (11-12): 317-23. <https://doi.org/10.2119/2006-00086.Lee>.

- Liu, Z., W. G. Cumberland, L. E. Hultin, A. H. Kaplan, R. Detels, y J. V. Giorgi. 1998. «CD8+ T-Lymphocyte Activation in HIV-1 Disease Reflects an Aspect of Pathogenesis Distinct from Viral Burden and Immunodeficiency». *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology: Official Publication of the International Retrovirology Association* 18 (4): 332-40.
- Liu, Z., W. G. Cumberland, L. E. Hultin, H. E. Prince, R. Detels, y J. V. Giorgi. 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». *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology: Official Publication of the International Retrovirology Association* 16 (2): 83-92.
- Malavasi, F., A. Funaro, S. Roggero, A. Horenstein, L. Calosso, y K. Mehta. 1994. «Human CD38: A Glycoprotein in Search of a Function». *Immunology Today* 15 (3): 95-97. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(94\)90148-1](https://doi.org/10.1016/0167-5699(94)90148-1).
- Malavasi, Fabio, Silvia Deaglio, Ada Funaro, Enza Ferrero, Alberto L. Horenstein, Erika Ortolan, Tiziana Vaisitti, y Semra Aydin. 2008. «Evolution and Function of the ADP Ribosyl Cyclase/CD38 Gene Family in Physiology and Pathology». *Physiological Reviews* 88 (3): 841-86. <https://doi.org/10.1152/physrev.00035.2007>.
- Mehta, Kapil, y Fabio Malavasi. 2000. *Human CD38 and related molecules*. Chemical immunology, vol. 75. Basel: Karger.
- Morandi, Fabio, Irma Airoidi, Danilo Marimpietri, Cristiano Bracci, Angelo Corso Faini, y Roberto Gramignoli. 2019. «CD38, a Receptor with Multifunctional Activities: From Modulatory Functions on Regulatory Cell Subsets and Extracellular Vesicles, to a Target for Therapeutic Strategies». *Cells* 8 (12): E1527. <https://doi.org/10.3390/cells8121527>.
- Morra, M., M. Zubiaur, C. Terhorst, J. Sancho, y F. Malavasi. 1998. «CD38 Is Functionally Dependent on the TCR/CD3 Complex in Human T Cells». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 12 (7): 581-92. <https://doi.org/10.1096/fasebj.12.7.581>.
- Motamedi, Melika, Lai Xu, y Shokrollah Elahi. 2016. «Correlation of Transferrin Receptor (CD71) with Ki67 Expression on Stimulated Human and Mouse T Cells: The Kinetics of Expression of T Cell Activation Markers». *Journal of Immunological Methods* 437: 43-52. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2016.08.002>.
- Okoye, Afam, Martin Meier-Schellersheim, Jason M. Brenchley, Shoko I. Hagen, Joshua M. Walker, Mukta Rohankhedkar, Richard Lum, et al. 2007. «Progressive CD4+ Central Memory T Cell Decline Results in CD4+ Effector Memory Insufficiency and Overt Disease in Chronic SIV Infection». *The Journal of Experimental Medicine* 204 (9): 2171-85. <https://doi.org/10.1084/jem.20070567>.
- Olvera-García, Gustavo, Tania Aguilar-García, Fany Gutiérrez-Jasso, Iván Imaz-Rosshandler, Claudia Rangel-Escareño, Lorena Orozco, Irma Aguilar-Delfín, et al. 2016. «A Transcriptome-Based Model of Central Memory CD4 T Cell Death in HIV Infection». *BMC Genomics* 17 (1): 956. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3308-8>.
- Olvera-García, Gustavo, Enrique Espinosa, Scott F. Sieg, y Michael M. Lederman. 2014. «Cytomegalovirus-Specific Responses of CD38⁺ Memory T Cells Are Skewed towards IFN- γ and Dissociated from CD154 in HIV-1 Infection». *AIDS (London, England)* 28 (3): 311-16. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000000162>.
- Paiardini, Mirko, y Michaela Müller-Trutwin. 2013. «HIV-Associated Chronic Immune Activation». *Immunological Reviews* 254 (1): 78-101. <https://doi.org/10.1111/imr.12079>.
- Pavón, Esther J., Esther Zumaquero, Antonio Rosal-Vela, Keng-Meng Khoo, Daniela Cerezo-Wallis, Sonia García-Rodríguez, Montserrat Carrascal, et al. 2013. «Increased CD38 Expression in T Cells and Circulating Anti-CD38 IgG Autoantibodies Differentially Correlate with Distinct Cytokine Profiles and Disease Activity in Systemic Lupus Erythematosus Patients». *Cytokine* 62 (2): 232-43. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2013.02.023>.

- Picker, Louis J., Shoko I. Hagen, Richard Lum, Edward F. Reed-Inderbitzin, Lyn M. Daly, Andrew W. Sylwester, Joshua M. Walker, et al. 2004. «Insufficient Production and Tissue Delivery of CD4+ Memory T Cells in Rapidly Progressive Simian Immunodeficiency Virus Infection». *The Journal of Experimental Medicine* 200 (10): 1299-1314. <https://doi.org/10.1084/jem.20041049>.
- Reddy, Manjula, Edward Eirikis, Cuc Davis, Hugh M. Davis, y Uma Prabhakar. 2004. «Comparative Analysis of Lymphocyte Activation Marker Expression and Cytokine Secretion Profile in Stimulated Human Peripheral Blood Mononuclear Cell Cultures: An in Vitro Model to Monitor Cellular Immune Function». *Journal of Immunological Methods* 293 (1-2): 127-42. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2004.07.006>.
- Reinherz, E. L., P. C. Kung, G. Goldstein, R. H. Levey, y S. F. Schlossman. 1980. «Discrete Stages of Human Intrathymic Differentiation: Analysis of Normal Thymocytes and Leukemic Lymphoblasts of T-Cell Lineage». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77 (3): 1588-92. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.3.1588>.
- Sallusto, F., D. Lenig, R. Förster, M. Lipp, y A. Lanzavecchia. 1999. «Two Subsets of Memory T Lymphocytes with Distinct Homing Potentials and Effector Functions». *Nature* 401 (6754): 708-12. <https://doi.org/10.1038/44385>.
- Schluns, Kimberly S., y Leo Lefrançois. 2003. «Cytokine Control of Memory T-Cell Development and Survival». *Nature Reviews. Immunology* 3 (4): 269-79. <https://doi.org/10.1038/nri1052>.
- Sun, Yue, Sallie R. Permar, Adam P. Buzby, y Norman L. Letvin. 2007. «Memory CD4+ T-Lymphocyte Loss and Dysfunction during Primary Simian Immunodeficiency Virus Infection». *Journal of Virology* 81 (15): 8009-15. <https://doi.org/10.1128/JVI.00482-07>.
- Tajadini, Mohamadhasan, Mojtaba Panjehpour, y Shaghayegh Haghjooy Javanmard. 2014. «Comparison of SYBR Green and TaqMan Methods in Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction Analysis of Four Adenosine Receptor Subtypes». *Advanced Biomedical Research* 3: 85. <https://doi.org/10.4103/2277-9175.127998>.
- Tarragó, Mariana G., Claudia C.S. Chini, Karina S. Kanamori, Gina M. Warner, Ariel Caride, Guilherme C. de Oliveira, Micaela Rud, et al. 2018. «A Potent and Specific CD38 Inhibitor Ameliorates Age-Related Metabolic Dysfunction by Reversing Tissue NAD+ Decline». *Cell Metabolism* 27 (5): 1081-1095.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.03.016>.
- Terhorst, C., A. van Aghoven, K. LeClair, P. Snow, E. Reinherz, y S. Schlossman. 1981. «Biochemical Studies of the Human Thymocyte Cell-Surface Antigens T6, T9 and T10». *Cell* 23 (3): 771-80. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(81\)90441-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(81)90441-4).
- Tuzlak, Selma, Robyn L. Schenk, Ajithkumar Vasanthakumar, Simon P. Preston, Manuel D. Haschka, Dimitra Zotos, Axel Kallies, Andreas Strasser, Andreas Villunger, y Marco J. Herold. 2017. «The BCL-2 pro-Survival Protein A1 Is Dispensable for T Cell Homeostasis on Viral Infection». *Cell Death and Differentiation* 24 (3): 523-33. <https://doi.org/10.1038/cdd.2016.155>.
- Vaisitti, T., V. Audrito, S. Serra, R. Buonincontri, G. Sociali, E. Mannino, A. Pagnani, et al. 2015. «The Enzymatic Activities of CD38 Enhance CLL Growth and Trafficking: Implications for Therapeutic Targeting». *Leukemia* 29 (2): 356-68. <https://doi.org/10.1038/leu.2014.207>.
- Vandesompele, Jo, Katleen De Preter, Filip Pattyn, Bruce Poppe, Nadine Van Roy, Anne De Paepe, y Frank Speleman. 2002. «Accurate Normalization of Real-Time Quantitative RT-PCR Data by Geometric Averaging of Multiple Internal Control Genes». *Genome Biology* 3 (7): RESEARCH0034.
- Wang, Ling-Fang, Lian-Jie Miao, Xiao-Nv Wang, Cong-Cong Huang, Yi-Song Qian, Xuan Huang, Xiao-Lei Wang, et al. 2018. «CD38 Deficiency Suppresses Adipogenesis and Lipogenesis in Adipose Tissues through Activating Sirt1/PPAR γ Signaling Pathway». *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 22 (1): 101-10. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13297>.
- Willingger, Tim, Tom Freeman, Hitoshi Hasegawa, Andrew J. McMichael, y Margaret F. C. Callan. 2005. «Molecular Signatures Distinguish Human Central Memory from Effector Memory CD8 T Cell Subsets». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 175 (9): 5895-5903. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.9.5895>.

- Würsch, Daniela, Christopher E. Ormsby, Dámaris P. Romero-Rodríguez, Gustavo Olvera-García, Joaquín Zúñiga, Wei Jiang, Santiago Pérez-Patrigéon, y Enrique Espinosa. 2016. «CD38 Expression in a Subset of Memory T Cells Is Independent of Cell Cycling as a Correlate of HIV Disease Progression». *Disease Markers* 2016: 9510756. <https://doi.org/10.1155/2016/9510756>.
- Xie, Na, Lu Zhang, Wei Gao, Canhua Huang, Peter Ernst Huber, Xiaobo Zhou, Changlong Li, Guobo Shen, y Bingwen Zou. 2020. «NAD+ Metabolism: Pathophysiologic Mechanisms and Therapeutic Potential». *Signal Transduction and Targeted Therapy* 5 (1): 227. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00311-7>.
- Xu, Weili, y Anis Larbi. 2017. «Markers of T Cell Senescence in Humans». *International Journal of Molecular Sciences* 18 (8): 1742. <https://doi.org/10.3390/ijms18081742>.
- Zannetti, Beatrice Anna, Angelo Corso Faini, Evita Massari, Massimo Geuna, Enrico Maffini, Giovanni Poletti, Claudio Cerchione, Giovanni Martinelli, Fabio Malavasi, y Francesco Lanza. 2020. «Novel Insights in Anti-CD38 Therapy Based on CD38-Receptor Expression and Function: The Multiple Myeloma Model». *Cells* 9 (12): 2666. <https://doi.org/10.3390/cells9122666>.
- Zupo, S., E. Rugari, M. Dono, G. Taborelli, F. Malavasi, y M. Ferrarini. 1994. «CD38 Signaling by Agonistic Monoclonal Antibody Prevents Apoptosis of Human Germinal Center B Cells». *European Journal of Immunology* 24 (5): 1218-22. <https://doi.org/10.1002/eji.1830240532>.