



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**

**ESPECIALIZACIÓN FUNCIONAL DE LAS CÉLULAS T CD4<sup>+</sup> DE  
MEMORIA CENTRALES QUE EXPRESAN LA PROTEÍNA CD38:**

**IMPLICACIONES EN LA ENFERMEDAD POR VIH**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**ANA BELÉN CAMPOS JUÁREZ**



**MÉXICO, D.F.**

**AÑO 2015**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**                   **Profesor: Enrique Ortega Soto**  
**VOCAL:**                           **Profesor: José Pedraza Chaverri**  
**SECRETARIO:**               **Profesor: Héctor Enrique Espinosa Arciniega**  
**1er. SUPLENTE:**           **Profesor: José Ignacio Páramo Ramírez**  
**2º SUPLENTE:**               **Profesor: Mario Adán Moreno Eutimio**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS “ISMAEL  
COSÍO VILLEGAS”**

**ASESOR DEL TEMA:**

---

**Héctor Enrique Espinosa Arciniega**

**SUSTENTANTE:**

---

**Ana Belén Campos Juárez**

**AGRADECIMIENTOS**

Gracias al Dr. Enrique Espinosa, por su disposición al asesorar este trabajo de tesis.

Gracias a la QFB. Damaris Romero, por su valiosa contribución experimental, ya que este trabajo no habría sido concluido sin su ayuda.

Gracias a la Dra. Elsy Canché Pool por sus valiosas enseñanzas experimentales.

Gracias al Dr. Carlos Castellanos, responsable de la Unidad de Citofluorometría, del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, por permitirnos el uso del citómetro FACS Aria II, para la purificación de nuestras poblaciones celulares.

Gracias al Dr. Noé Ayala Alcántara, Jefe de Servicios de Banco de Sangre y Hematología del INER y a su personal por proporcionarnos los concentrados leucocitarios para la realización de los experimentos.

Gracias a la Comisión Coordinadora de Institutos Nacionales de Salud y Hospitales de Alta Especialidad por la beca PROBEI otorgada para la realización de esta tesis.

Y en general, gracias a todo el Laboratorio de Inmunopatogénesis del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, en donde se realizó este trabajo experimental.

**Agradecimientos a título personal**

Gracias a mi padre luchador incansable; por ser el pilar más fuerte en mi vida y ser quien me apoya incondicionalmente.

Gracias a mis hermanas Blanca y Abi; por ser mi más grande motivación y mi inspiración.

Gracias a mi familia por estar ahí.

Gracias a mis amigos Mallely, Viridiana, Thalía, Abraham, Xavier, Liz, Adri y Jesús por brindarme su amistad, ustedes me llenan de alegría hicieron de mi estancia en la Facultad más divertida.

Gracias Daniel, por aparecer en el momento más oportuno, por crecer, aprender y compartir conmigo esta etapa de nuestras vidas, por ser un amigo relevante y ahuyentar mi soledad mental.

Gracias a la UNAM, por ser la institución que me abrió las puertas por primera vez, y ser la principal institución formadora de recursos humanos.

Gracias a mis profesores de la Facultad de Química quienes siempre contribuyen al desarrollo del conocimiento y el desarrollo humano. En especial al Dr. Saturnino de León Chapa, Dr. Constantino López, y M.C Gustavo Olvera por mostrarme el maravilloso mundo de la inmunología y a la Dra. Rocío Tirado por transmitirme su pasión por los virus.

Y por último gracias al Dr. Enrique Espinosa, por sus consejos, enseñanzas y por ser un pilar muy importante en mi formación tanto profesional como personal.

## Contenido

1. Resumen .....	7
2. Introducción.....	8
2.1 Generalidades sobre el virus .....	8
2.2 Clasificación y composición molecular. ....	8
2.3 Ciclo de infección:.....	9
2.4 Historia natural de la enfermedad por VIH.....	10
2.5 Participación de la activación inmune crónica en la inmunopatogénesis de la infección por VIH.....	12
2.6 Papel de las células T CD4 <sup>+</sup> de memoria centrales en la respuesta contra la infección por VIH.....	16
2.7 El marcador de activación CD38 como predictor del avance a SIDA .....	17
2.8 CD38: distribución y estructura .....	18
2.9 Propiedades funcionales de CD38 y su participación en la respuesta inmune ...	19
3. Antecedentes.....	21
4. Objetivos.....	23
4.1 Objetivos específicos: .....	23
5. Hipótesis.....	23
6. Metodología.....	24
6.1 Muestras.....	24
6.2 Estrategia experimental .....	24
6.2.1 Obtención de células mononucleares de sangre periférica por gradiente en ficoll.....	25
6.2.2 Obtención de las células T CD4 <sup>+</sup> de memoria.....	26
6.2.3 Tinción celular y estrategia de selección de células T CD4 <sup>+</sup> de memoria centrales CD38 <sup>+</sup> y CD38 <sup>-</sup> por clasificación de células activada pro fluorescencia (FACS) .....	27
6.2.4 Compensación.....	29
6.2.5 Controles FMOs .....	30
6.2.6 Tinción de las células T CD4 <sup>+</sup> de memoria .....	31
6.2.7 Estrategia de selección.....	31

6.2.8	Cultivo y Activación policlonal a través del receptor de células T .....	33
6.2.9	Estimulación en presencia de productos de la catálisis de CD38, de un inhibidor de CD38 y un antagonista de un segundo mensajero de CD38 .....	34
6.3	Extracción de RNA, síntesis de cDNA y qPCR .....	35
6.4	Normalización de datos .....	37
6.5	Análisis estadístico .....	37
7.	Resultados .....	39
7.1	Pureza de las células separadas .....	39
7.2	Diferencias en la expresión de citocinas (IL-2, IFN- $\gamma$ e IL-17) .....	41
7.3	Diferencias en la expresión de CD40L y los receptores de quimiocinas (CCR5 y CXCR5).....	45
7.4	Diferencias en la expresión del marcador de proliferación Ki67 .....	48
7.5	Regulación de las funciones inmunes por la actividad enzimática de CD38 .....	49
8.	Discusión.....	54
9.	Perspectivas:.....	59
10.	Conclusiones .....	60
11.	Bibliografía.....	61

## Abreviaturas

ADPR	Dinucleótido de adenina difosforribosa
APC	Célula presentadora de antígenos
APC-Cy7	Alofococianina-R-cianina 7
$\beta$ -ara-F-NAD	2'-deoxi-2'-fluoroarabinosa-NAD
ARN	ácido ribonucleico
BAPTA	ácido 1,2-bis(o-amino-fenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacético
cADPR	Dinucleótido de adenina difosforribosa cíclico
NAD <sup>+</sup>	Dinucleótido de nicotinamida
NAAD	Dinucleótido de nicotinamida y adenina ácido.
PKC	Proteína cinasa C
T <sub>CM</sub>	Células T CD4 <sup>+</sup> de memoria centrales
TCR	Receptor de células T (por sus siglas en inglés)
T <sub>EM</sub>	Células T CD4 <sup>+</sup> de memoria efectoras
Th	Célula T cooperadora (por sus siglas en inglés)
TLR	Receptores tipo Toll (por sus siglas inglés)
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana

## 1 Resumen

**Introducción:** La expresión del marcador de activación CD38 por las células T CD8 y CD4 es un fuerte predictor el avance de la infección por VIH. A pesar de ello, no se sabe si la pérdida y las alteraciones funcionales de las células T CD4<sup>+</sup> de personas con VIH son un producto de la actividad de CD38 y si, del mismo modo, son las células T expresadoras de CD38 las que presentan disfunciones inmunes.

**Objetivo:** Determinar si las células T CD4<sup>+</sup> de memoria centrales (T<sub>CM</sub>) CD38<sup>+</sup> muestran funciones que las distinguen de las células T<sub>CM</sub> CD38<sup>-</sup>, después de una activación policlonal a través del receptor de células T (RTC).

**Método:** Purificamos células T<sub>CM</sub>CD38<sup>+</sup> y CD38<sup>-</sup> de 6 donadores sanos (separación inmunomagnética a partir de células mononucleares de sangre periférica seguida de FACS) y las activamos utilizando un anticuerpo monoclonal agonista anti CD3 unido a una fase sólida y un agonista anti CD28 soluble (experimentos 1,2 y 3), o bien antiCD3 y antiCD28 acoplados a microperlas en presencia de 30U/ml de IL-2 (experimento 4) o 15 U/ml de IL-2 (experimento 5 y 6). Se midió por PCR en tiempo real la inducción de IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-17, CCR5 y CXCR5 a las 6 y 12 h, así como la inducción del factor de transcripción Ki67, como marcador de proliferación, a las 12 y 48 horas. La expresión se normalizó contra GAPDH como gen endógeno (delta Ct) y contra el máximo de expresión de cada experimento (delta-delta Ct). El análisis estadístico se realizó utilizando una prueba T de un solo grupo donde Ho=100.

**Resultados:** Las células T<sub>CM</sub> CD38<sup>+</sup> consistentemente inducen en menor medida la expresión de IL-2 (P= 0.015) CD40L (P= 0.0015) y CXCR5 (P<0.0001) comparadas con las células T<sub>CM</sub>CD38<sup>-</sup>. La inducción de IFN- $\gamma$ , IL-17 y CCR5 es consistentemente menor en las células T<sub>CM</sub> CD38<sup>-</sup> (P=0.03, P=0.045 y P=0.001 respectivamente) comparadas con las CD38<sup>+</sup>. Además las únicas células capaces de entrar a ciclo celular (expresión de Ki67) en las condiciones experimentales usadas son las células T<sub>CM</sub> CD38<sup>+</sup>, mientras que las células T<sub>CM</sub> CD38<sup>-</sup> consistentemente no proliferan (P=0.0127).

**Conclusiones:** Existen diferencias funcionales entre células T<sub>CM</sub> CD38<sup>+</sup> y CD38<sup>-</sup>. Esta respuesta diferencial es intrínseca de las subpoblaciones que expresan y que no expresan CD38. Los resultados sugieren que las T<sub>CM</sub> CD38<sup>+</sup> están especializadas a funciones propias de células de memoria efectoras. Dentro de esta especialización, las células CD38<sup>+</sup> parecen tener menos requerimientos para entrar en proliferación luego de la estimulación del RCT. Dada la sobrerrepresentación de las células CD38<sup>+</sup> en la infección por VIH, se podría esperar un desbalance de las funciones inmunes.

## 2 Introducción

### 2.1 Generalidades sobre el virus

La infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) es considerada un problema de salud pública mundial debido a que es el agente causal del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Hasta el 2013 se calculaba que alrededor de 35 millones de personas en el mundo son portadoras de este virus (1)

### 2.2 Clasificación y composición molecular.

La familia Retroviridae agrupa agentes virales que poseen una enzima que rompió con el dogma central de la biología molecular, la transcriptasa inversa. La familia Retroviridae incluye 7 géneros identificados, en 2 subfamilias: Orthoretrovirinae y Spumaretrovirinae. Se considera que solo dos de los géneros causan enfermedad al humano: Lentivirus y Retrovirus BLV-HTLV. El spumavirus se asocia a infecciones crónicas en diversos animales, entre ellos otros primates, felinos, caballos, ganado vacuno( Revisado en 2).

El VIH es un virus envuelto con doble cápside (una en forma de cono truncado y otra icosaédrica), tiene como genoma dos copias de RNA de cadena positiva, posee varias enzimas, entre ellas la transcriptasa reversa y una proteasa (tabla 2).

**Tabla 1. Clasificación de los retrovirus**

Familia	Género	Virus
<b>Retroviridae</b>	Lentivirus	VIH-1, VIH-2
	Retrovirus BLV- HTLV	HTLV-1, HTLV-2
	Spumavirus	Spumavirus humano

Se han identificado dos tipos diferentes del virus de inmunodeficiencia humana (VIH), el VIH-1 y el VIH-2, los cuales comparten propiedades epidemiológicas,

pero desde el punto de vista serológico y geográfico son relativamente diferentes. Al parecer la patogenicidad del VIH-2 es menor a la del VIH-1.

Su genoma está compuesto de nueve genes de los cuales tres son estructurales (gag, pol y env), dos son reguladores (tat y env) y cuatro se consideran accesorios (vif, vpu, vpr y nef )(2).

**Tabla 2. Función de las proteínas de VIH-1**

<b>Gen</b>	<b>Función</b>
<b>Env</b>	Codifica para las glicoproteínas de envoltura (gp 160, gp 120 y gp 41)
<b>Gag</b>	Codifica para las proteínas estructurales (p55, p24 y p17)
<b>Pol</b>	Codifica para la transcriptasa reversa, proteasa (p66, p51 y p31), integrasa y ribonucleasa
<b>Nef</b>	Desconocida, al parecer disminuye la expresión viral
<b>Vif</b>	Promotor de la infectividad de virus libre
<b>Tat</b>	Activador potente de la transcripción, regulación positiva de la replicación del virus
<b>Rev</b>	Regula la expresión de genes estructurales, aumenta la replicación viral, regulador negativo de Nef
<b>Vpr</b>	Activador débil de la transcripción
<b>Vpu</b>	Requerido para una liberación eficiente del virión

### 2.3 Ciclo de infección

Una vez que el VIH ha logrado entrar al organismo, la gp 120 de la envoltura viral se une a la molécula CD4 en la membrana de los linfocitos T CD4+, macrófagos, células dendríticas, monocitos y en general a cualquier célula que exprese en su superficie al receptor CD4 (serie linfocitaria). Posteriormente la envoltura viral se fusiona con la membrana celular permitiendo de esta manera la entrada de la cápside viral. Dentro de la célula las proteínas de la cápside permanecen

asociadas al RNA viral (RNAv) mientras se copia a una cadena de DNA por medio de la DNA polimerasa dependiente de RNA/DNA y de la transcriptasa reversa. Después el RNA es degradado por la ribonucleasa H y se sintetiza la cadena complementaria de DNA para generar DNA de doble cadena (provirus), el cual se integra al genoma celular mediante una serie compleja de reacciones que son catalizadas por la enzima integrasa. El provirus integrado puede permanecer latente por tiempo indefinido o puede forzar a la maquinaria celular para producir RNAv, el cual puede ser usado para la producción de proteínas virales, las que con el genoma del virus ensamblan nuevos viriones. Eventualmente, las células infectadas se lisan y finalmente los nuevos viriones se liberan. Debido a la capacidad de mutación del virus, es posible obtener diversas variantes antigénicas Revisado en (2)

#### **2.4 Historia natural de la enfermedad por VIH**

En pacientes infectados por VIH y sin tratamiento el curso temporal de la infección por VIH se puede dividir en las siguientes fases:

- 1) Fase aguda: En ella ocurre un agotamiento masivo de las células T CD4<sup>+</sup>, principalmente células efectoras CCR5<sup>+</sup> de las mucosas. La mayoría de las células T CD4<sup>+</sup> intraepiteliales y de la lámina propia son agotadas durante esta primera etapa.(3) este fenómeno podría estar asociado a la alta expresión del correceptor CCR5 y al estado de activación de las células T de memoria efectoras (TEM) que permite la propagación viral (4). La activación se manifiesta por un aumento generalizado en la expresión de marcadores de activación inmune como CD38 y HLA-DR en las células T así como un aumento en las concentraciones plasmáticas de citocinas proinflamatorias(5). Alrededor de 7 días después de la entrada del virus al organismo el número de partículas infecciosas (PI) asciende hasta 5000 PI/ml o más de 100,000 copias de ARN/ml de plasma. (6). Cerca del 85% de los individuos infectados manifiesta una serie de síntomas no específicos que suelen ser confundidos con otras infecciones virales como el síndrome retroviral agudo (SRA). Estos

síntomas son fiebre, linfadenopatía, faringitis, exantema, mialgia, diarrea y lesiones mucocutáneas.(7)

- 2) Fase crónica: Alrededor de 4 a 8 semanas después de la infección primaria, la pérdida de células T CD4<sup>+</sup> circulantes que se produce en la etapa aguda se recupera, aunque la pérdida de esta población continúa progresivamente (5). La respuesta inmune antiviral es mediada principalmente por las células T CD8<sup>+</sup> y coincide con la disminución de la carga viral, las células T CD4<sup>+</sup> de la mucosa no se recuperan, mientras que la activación inmune continúa aumentado aunque a una menor tasa (5,8). Esta etapa suele ser asintomática, ya que no se presentan manifestaciones clínicas evidentes. También se le conoce como latencia clínica, aunque el virus no se encuentra en latencia, ya que continúa replicándose a una menor tasa, particularmente en ganglios linfáticos (9). Esta etapa puede perdurar por años (de 8 a 10 sin tratamiento), pero eventualmente en la mayoría de las personas infectadas, progresará a SIDA (6).
- 3) SIDA: Se caracteriza por la disminución de las cuentas de células T CD4<sup>+</sup> a una concentración menor de <200 células/ $\mu$ L (1) o cualquiera de una lista de infecciones oportunistas (Tabla 3) La respuesta inmune generada por estas infecciones propicia un ambiente inflamatorio (10) que a su vez propicia la transcripción de los genes virales y por lo tanto la replicación viral (11). La carga viral se ve incrementada drásticamente, la respuesta antiviral de las células T CD8<sup>+</sup> se ve disminuida (12).

**Tabla 3. Enfermedades que se manifiestan durante la etapa de SIDA.**

- Las infecciones bacterianas, múltiples o recurrentes
- Candidiasis en bronquios, tráquea o los pulmones
- Candidiasis del esófago
- El cáncer cervical
- Coccidioidomicosis, diseminada o extrapulmonar
- Criptococosis extrapulmonar
- La criptosporidiosis, intestinal crónica (> 1 mes de duración)
- Enfermedad por citomegalovirus (excepto hígado, bazo, o nodos), a la edad de inicio > 1

mes

- Retinitis por citomegalovirus (con pérdida de la visión)
- Encefalopatía relacionada con el VIH
- Herpes simple: úlceras crónicas (> 1 mes de duración) o bronquitis, neumonitis o esofagitis.
- Histoplasmosis, diseminada o extrapulmonar
- Isosporiasis, intestinal crónica (> 1 mes de duración)
- El sarcoma de Kaposi
- Neumonía intersticial linfoide o pulmonar complejo hiperplasia linfoide
- Linfoma de Burkitt
- *Mycobacterium avium* compleja o *Mycobacterium kansasii*, diseminada o extrapulmonar
- *Mycobacterium tuberculosis* de cualquier sitio, pulmonar, diseminada, o extrapulmonar
- Neumonía por *Pneumocystis jirovecii*
- La leucoencefalopatía multifocal progresiva
- *Septicemia por Salmonella* , recurrente
- Toxoplasmosis en cerebro

Muchos mecanismos han sido propuestos para explicar el agotamiento masivo de las células T CD4<sup>+</sup> en la enfermedad por VIH. Dentro de los cuales se encuentra la muerte celular inducida por el efecto citopático del virus, el efecto citotóxico de las células T CD8<sup>+</sup> sobre células infectadas , muerte celular inducida por el ambiente inflamatorio, así como fallas en la proliferación de células T activadas (revisado por (11,13). La depleción masiva de las células T CD4<sup>+</sup> es influenciada por todos estos mecanismos.

## **2.5 Participación de la activación inmune crónica en la inmunopatogénesis de la infección por VIH**

Aunque la activación inmunológica es esencial para montar una respuesta eficaz contra agentes patógenos, paradójicamente también puede proporcionar un ambiente inmunológico que favorezca la replicación viral y la progresión de la infección a SIDA.

Se sabe que la patogénesis de la infección por VIH está íntimamente relacionada con un estado de activación inmune del hospedero. se extiende por un amplio número de células y funciones del sistema inmune y está presente en todos los estadios de la enfermedad por VIH, incluso bajo el control de la replicación viral (8).

Esta activación inmune persistente se manifiesta como una tasa incrementada de proliferación y de recambio de células T. También se exhiben altos niveles de apoptosis de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> (11), una activación policlonal de células B con hipergamaglobulinemia (14), aumento en el número de células con un fenotipo de activación (expresión de CD38 y HLA-DR) (15–17), así como la presencia de una amplia gama de biomarcadores asociados con la inflamación (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-15 e IL-10)(18)(19). Esta activación no está restringida a células T específicas para determinantes del VIH y solo una pequeña proporción de células T activadas son específicas contra el virus (20). Se ha demostrado que tanto los mecanismos específicos contra el VIH así como las respuestas generalizadas no específicas a la infección contribuyen a la continua activación del sistema inmune.

El VIH puede provocar la activación inmune a través de la unión de las proteínas de envoltura como gp120 a receptores de la célula como CD4 o CCR5, lo que desencadena una activación no mediada por el TCR (21) (22). La activación inmune sistémica provocada por el virus inicia con la respuesta inmune innata a través de los TLR y posteriormente la respuesta adaptativa, tanto humoral como celular(23).

Otro de los factores que pueden estar contribuyendo al estado de activación generalizado es el agotamiento de las células T CD4<sup>+</sup> de las mucosas, lo que facilita la translocación de productos bacterianos como el LPS desde el lumen del intestino hacia la circulación sistémica, donde pueden activar de manera recurrente a células de la inmunidad innata a través de la unión con sus TLR (23,24). La activación a través de TLRs y la generación de citocinas proinflamatorias, pueden proveer una estimulación directa a las células T de memoria independiente del TCR(25). Además, la continua estimulación antigénica

generada por la infección de oportunistas, sobre todo en etapas tardías de la infección, también puede estar contribuyendo al estado de activación(8,26,27)

Al estudiar la relación existente entre el recambio celular, activación y carga viral, se encontró que tanto los niveles de activación como la disminución del número de células T CD4<sup>+</sup> se correlacionan. Sin embargo, esto podría sugerir algún tipo de relación causal entre la activación y la destrucción celular (28).

En vista de la muy pequeña proporción de las células CD4<sup>+</sup> que están realmente infectadas con el VIH-1 en un momento dado (29)(30), el efecto citopático inducido por el VIH, así como la destrucción celular mediada por mecanismos inmunes, tales como la muerte celular inducida por linfocitos T citotóxicos o la citotoxicidad dependiente de anticuerpos, no son suficientes para explicar la elevada tasa de muerte celular que se produce en las personas infectadas por el VIH. La apoptosis inducida por la activación representa uno de los más importantes mecanismos que conducen al agotamiento de células T CD4<sup>+</sup> en personas infectadas por el VIH (18,28). Durante la fase crónica de la infección por VIH, la activación inmune generalizada está asociada a una incrementada señalización a través de las vías proapoptóticas de los linfocitos T y una alta proporción de células que están entrando a apoptosis son células activadas con un fenotipo de memoria y alta expresión de CD38, HLA-DR, CD45RO y FAS.(28) Notablemente la inducción de la apoptosis no ocurre únicamente en las células infectadas, sino también en las células no infectadas (31).

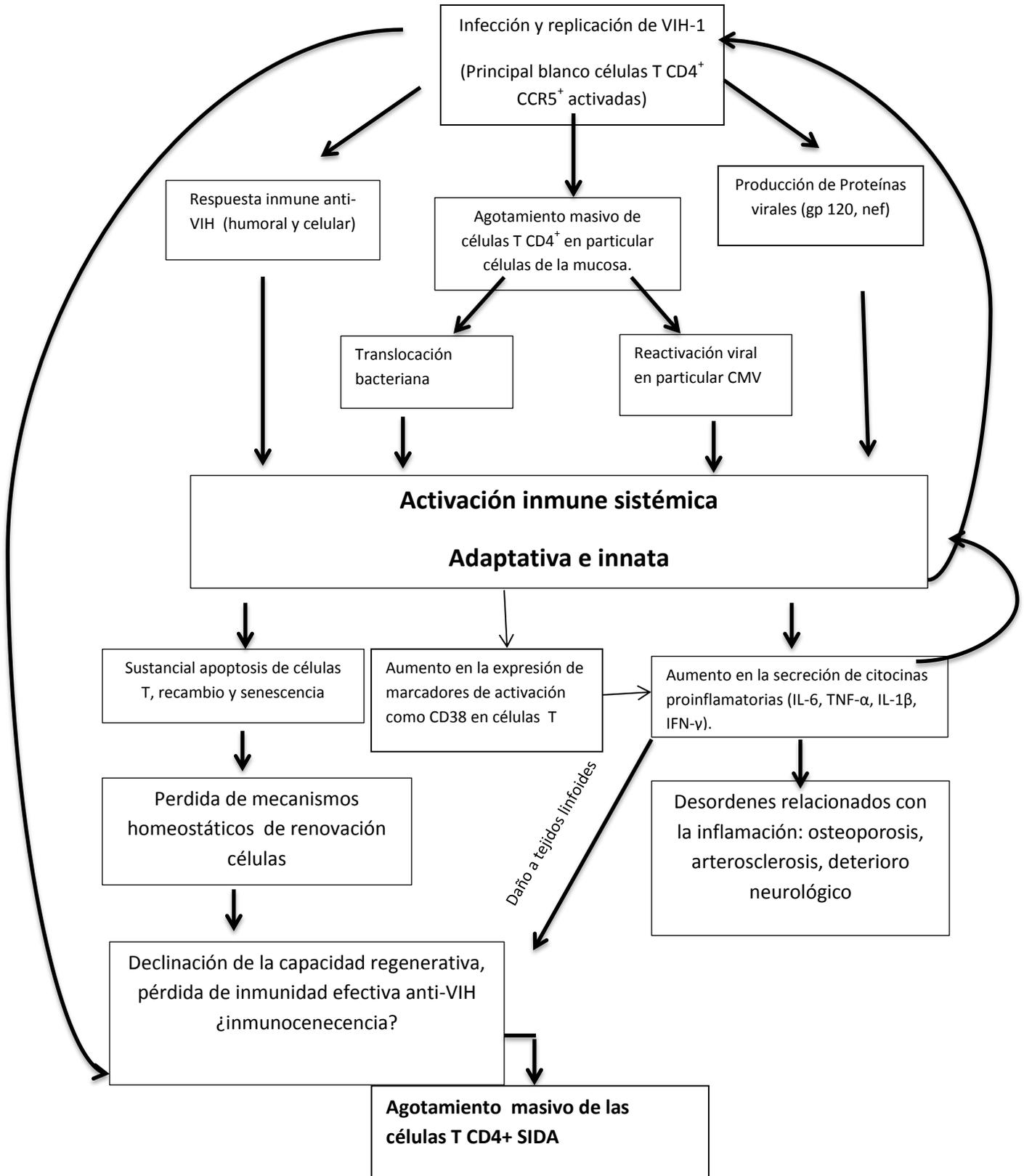


Diagrama 1: Resumen de la Inmunopatogénesis de la infección por VIH

## **2.6 Papel de las células T CD4+ de memoria centrales en la respuesta contra la infección por VIH**

Existen diferentes subpoblaciones de células T, con distintos grados de diferenciación que se pueden distinguir por sus propiedades fenotípicas y funcionales. Existen células que no han sido experimentadas por el antígeno y por lo tanto se consideran vírgenes o “naive”. Dentro de las subpoblaciones experimentadas con el antígeno, tenemos tres que han sido identificadas gracias a los marcadores de superficie y distintas propiedades funcionales que poseen: células T efectoras (de vida corta), células de memoria efectoras y células de memoria centrales. Cuando una célula naive es activada por un estímulo antigénico específico se diferencia para dar lugar a las células efectoras (Th1, Th2, Th17, Treg). Al término del estímulo antigénico estas células efectoras se mueren pero una porción de estas células permanece y da lugar a las células de memoria, disponibles para futuras infecciones. Las células de memoria pueden ser clasificadas como células de memoria efectoras ( $T_{EM}$ ) y células de memoria centrales ( $T_{CM}$ ), que se distinguen de acuerdo a los receptores de quimiocinas en las membranas los cuales les permiten alojarse en diferentes compartimentos inmunes. Las células  $T_{CM}$  que expresan los antígenos CCR7 y CD62L circulan principalmente por los órganos linfoides secundarios (32). Las células  $T_{EM}$  se encuentran en órganos no linfoides como la lámina propia y el epitelio (33) lo que facilita su recirculación hacia sitios inflamados, no expresan CCR7 y CD62L y responden activamente frente a un estímulo antigénico, volviéndose células efectoras (34).

El principal blanco del VIH son las células  $T_{EM} CD4^+$  que se encuentran principalmente en periferia o mucosas. Para mantener la homeostasis (equilibrio) entre células que mueren y que se están autorrenovando es necesaria la participación de una población que abastece a las mucosas de las células que se están muriendo

Las células  $T_{CM}$  poseen una gran capacidad de autorrenovarse (35). Estas células pueden proliferar en respuesta a citocinas homeostáticas (IL-7, IL15), manteniendo el número de células de memoria casi constante (36). El mantenimiento de las células T de memoria también depende de la expresión de moléculas antiapoptóticas (por ejemplo  $Bcl_{XL}$ ). En vista de que algunas células  $T_{CM}$  pierden la expresión de CCR7, adquieren receptores que les permiten alojarse en tejidos periféricos y funciones efectoras, se ha sugerido que pueden estar funcionando como células homeostáticas, capaces de autorrenovarse y de mantener el número de células  $T_{EM}$ , produciendo células capaces de diferenciarse a células con funciones efectoras(32).

En un modelo de infección del virus de inmunodeficiencia simiana, se ha observado que la proliferación y diferenciación de las células TCM provee de células T EM a las mucosas, y que la población residual de las células TEM es suficiente para evitar la aparición de enfermedades oportunistas durante la fase crónica de la infección, hasta que este equilibrio se pierde (37).

Debido a que la principal población afectada en la infección por VIH son las células  $T_{EM}$ , ya que experimentan una dramática disminución en sus cuentas debido a que son más propensas a la infección(38) y dado el papel homeostático que juegan las células TCM para reabastecer a la población que se está perdiendo, es importante entender cuáles son las alteraciones que sufren estas células durante la infección por VIH que interfiere con su capacidad autorrenovadora.

## **2.7 El marcador de activación CD38 como predictor del avance a SIDA**

El número de moléculas CD38 expresadas por célula asociadas con un estado de activación es claramente un fuerte predictor del avance de la enfermedad por VIH(39)

El número de células T  $CD4^+$  por microlitro de sangre en individuos con VIH es el mejor predictor del progreso de la enfermedad aunque en individuos asintomáticos

con similar recuento de células T CD4<sup>+</sup>, la progresión clínica puede diferir (40). Se ha observado que en pacientes con incluso el mismo número de células T CD4<sup>+</sup> tienen un mal pronóstico cuando tienen aumentada la expresión de CD38 (16). Lo que sugiere que la activación inmune tiene un papel importante en la pérdida de células T CD4<sup>+</sup>. En este mismo sentido apunta el hecho de que mientras la carga viral es suprimida con la terapia antiretroviral, la activación inmune persiste y es un predictor de una pobre reconstitución (41).

Hasta ahora, CD38 ha sido usado en forma muy extensa como un marcador de activación en estudios sobre patogénesis de la enfermedad por VIH, prediciendo el riesgo de muerte, de sida, la pérdida de células T CD4, la mala reconstitución de ellas durante el tratamiento e incluso complicaciones inflamatorias no definitorias del SIDA en personas con VIH bajo tratamiento virológicamente exitosas (34,40,41). Sin embargo, se sabe muy poco sobre si CD38 participa en estos aspectos de la enfermedad por VIH.

## 2.8 CD38: distribución y estructura

CD38 es una glicoproteína de superficie tipo II, con un peso molecular aproximado de 45 kDa. Fue descubierta por Reinherz *et al.* en 1980 (42). La forma monomérica de CD38 posee una pequeña región de 23 aminoácidos (23aa) N-terminal intracelular, una sola región transmembranal (22aa) y un dominio C-terminal extracelular (257aa), el cual contiene cuatro sitios potenciales de glicosilación y dos motivos de unión a hialuronato (43).

El dominio extracelular de CD38 posee una secuencia de aminoácidos con alta homología con CD157 (antígeno expresado en células de mamíferos) y con la ADP-ribosiltransferasa del molusco *Aplysia californica*, lo cual las coloca dentro de una misma familia que muestra una notable conservación de la actividad enzimática responsables de la conversión de NAD. (44)

CD38 es expresada por una amplia gama de células de la sangre periférica, entre las que se encuentran las células NK, los linfocitos B y los linfocitos T (45). Los niveles de expresión de CD38 en humanos varían a lo largo del ciclo de vida: La

expresión de CD38 en los linfocitos de neonatos es mayor que en los adultos). Durante la vida adulta, CD38 es detectable en altos niveles en timocitos maduros y en células T activadas, así como, en bajos niveles, en células no activadas o células T vírgenes (naive) (46).

En células B la expresión de CD38 es un indicador de inmadurez y también es expresado por células activadas (47). Esta molécula también se expresa en células del epitelio prostático, en células de los islotes pancreáticos, astrocitos y sistema nervioso central. Otras células no hematopoyéticas que expresan CD38 son células del músculo liso y esquelético, células del túbulo renal y células ganglionares de la retina (48).

## **2.9 Propiedades funcionales de CD38 y su participación en la respuesta inmune**

Debido a la homología estructural de CD38 con la ADP-ribosil ciclasa de *Aplysia*, los primeros estudios realizados *in vitro* se hicieron para elucidar las propiedades enzimáticas de CD38 y demostraron que esta molécula cataliza diversas reacciones. La primera de ellas es la actividad de fosforribosiltransferasa, que le permite sintetizar adenosindifosforribosa (ADPR) a partir del nucleótido de nicotinamida y adenina ( $\text{NAD}^+$ ). También se ha descrito su actividad de ADP-ribosil ciclasa, mediante la cual convierte ADPR a cADPR así como la reacción inversa (hidrolizar cADPR a su forma no cíclica ADPR) (45)(49). Estudios *in vitro* han demostrado que otro de los sustratos de CD38 es NADP y que CD38 tiene la capacidad de sintetizar NAADP, a partir de NADP y ácido nicotínico (NA) a un pH ácido .

La función de CD38 en condiciones *in vivo* resulta poco clara, hay estudios que sugieren que la principal función enzimática de CD38 es degradar NAADP en medios neutros generando ADPR (50). Otros estudios proponen que su principal actividad es la de producción de NAADP y ADPR(51). Tampoco es claro qué condiciones fisiológicas regulan la actividad de CD38. Debido a que esta enzima se encuentra anclada en la membrana, es probable que participe en la remoción

de NAD<sup>+</sup> extracelular, se sugiere que participa en mecanismos autócrinos como parácrinos, al remover NAD<sup>+</sup> del medio extracelular para generar nucleótidos que pueden ser internalizados provocando la liberación de calcio citoplásmico(52).

Tanto NAADP como cADPR y ADPR son importantes mensajeros para la liberación de calcio intracelular (53). Se sabe que en las células T la señalización mediada por Ca<sup>2+</sup> es importante para activación, secreción de citocinas y quimiotaxis (54,55,56).cADPR está principalmente implicado en el agotamiento parcial sostenido del Ca<sup>2+</sup> del retículo endoplásmico mediante estimulación de la liberación de Ca<sup>2+</sup> a través de los receptores de rianodina (RyR)(57). Así como en los canales iónicos TRPM2, los cuales se encuentran en membrana celular. Su activación facilita la entrada de Ca<sup>2+</sup> extracelular (29). Se ha observado que NAADP también tiene un efecto sobre los receptores de RyR (58). Y también puede activar a los canales de dos poros (TPC) que se encuentran en depósitos ácidos intracelulares de Ca<sup>2+</sup>(59).

Hay evidencias de la participación de estos segundos mensajeros en la regulación de las funciones inmunes. En células T autorreactivas de un modelo animal de aterosclerosis, el tratamiento con un inhibidor de NAADP disminuye los niveles de citocinas proinflamatorias como IL-17 e IFN- $\gamma$  así como la capacidad invasiva de las células T autorreactivas. Estos efectos fueron reversibles al quitar el inhibidor de NAADP, sugiriendo que la señalización de calcio mediada por NAADP está involucrada en el reclutamiento y activación de células T autorreactivas dentro de un órgano diana (60).

Otro estudio demuestra que NAADP estimula de manera inmediata la liberación de Ca<sup>2+</sup> de depósitos ácidos mediante su unión a los canales de dos poros (TPC). En este estudio también se observó que estos TPC migran hacia la sinapsis inmunológica una vez que se estimularon a través del receptor de células T, aumentando la secreción de granzima B en linfocitos T citotóxicos (59)

En otro estudio en el cual utilizan un modelo murino, se observó que la migración de neutrófilos está regulada por el Ca<sup>2+</sup> liberado en respuesta a cADPR. Los ratones deficientes de CD38 (principal productor de cADPR) eran más

susceptibles a infecciones oportunistas, debido a la incapacidad de migrar a sitios inflamados(61).

Estas evidencias sobre el efecto de los productos de CD38 en las funciones inmunes, hacen posible suponer que CD38 mediante su función enzimática podría desempeñar un papel importante en la regulación de las funciones de las células T de memoria.

### **3 Antecedentes**

Aunque CD38 es un fuerte predictor del progreso de la infección por VIH, existen pocos estudios que demuestren la relación causal entre la sobreexpresión de CD38 y disfunciones inmunes. Tampoco se conoce el papel de que CD38 desempeña en las patologías en las que se observa un alto nivel de expresión de CD38.

Un estudio demuestra la relación directa entre la expresión de CD38 y la funcionalidad de las subpoblaciones de memoria de células T CD4<sup>+</sup>, encontrando que después de una activación policlonal a través del TCR existe una producción aumentada de IFN- $\gamma$  e IL-2 en ausencia de la expresión de CD40L en las células T CD4<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>, particularmente en las células CD4<sup>+</sup> provenientes de personas con VIH, lo que podría implicar interacciones deficientes entre la célula presentadora de antígeno y las células T CD4<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>, así como defectos en la proliferación (62).

En otro estudio, se buscaron diferencias funcionales en diversas subpoblaciones de las células T CD4<sup>+</sup> de memoria que expresan o no CD38 provenientes de donadores sanos y pacientes con VIH. Se encontró que las células T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup> tienen aumentada la expresión de CD38 en comparación de las células T<sub>EM</sub> tanto en pacientes con VIH como en controles. Además, la expresión de CD38 estaba relacionada con un incremento en la producción de IFN- $\gamma$  y una disminución en la producción de IL-2 como respuesta al estímulo por CMV, en ausencia de CD40L en una respuesta anamnésica (63). Esto nos permite suponer que CD38 está contribuyendo a la alteración de la funciones de las células T<sub>CM</sub> en la

enfermedad por VIH debido a su representación en estos pacientes. En dichos estudios no se evalúa a las células TCM CD38<sup>+</sup> y CD38<sup>-</sup> aisladas, por lo que no se sabe si la expresión de CD38 es inducida una vez que las células se activan. Del mismo modo, no permiten concluir si esta división de funciones es normal y solamente está amplificada por la sobrerrepresentación de células CD38<sup>+</sup>.

Por lo tanto en este proyecto buscamos diferencias funcionales intrínsecas (que no están siendo ocasionadas por la infección por el VIH y que más bien sean una especialización funcional) de las células T CD4<sup>+</sup> de memoria centrales que expresan y que no expresan CD38. Para este fin, aislamos células TCM CD4<sup>+</sup> de muestras de donadores sanos. Una vez purificadas las células T<sub>CM</sub> CD38<sup>+</sup> y CD38<sup>-</sup> fueron activadas mimetizando la presentación del antígeno utilizando los anticuerpos agonistas anti-CD3 y anti-CD28, en presencia de otras señales importantes para la proliferación como IL-2.

Además de identificar diferencias funcionales proponemos un modelo experimental para evaluar si estas diferencias pueden ser reguladas por los productos de la actividad enzimática de CD38: cADPR y NAADP<sup>-</sup> o antagonistas específicos de éstos (8-Br-cADPR) e inhibidores de la actividad enzimática de CD38 (ara-F-NAD<sup>+</sup>). Lo cual nos permitirá evaluar el papel de CD38 en la inmunopatogénesis de la infección por VIH.

## 4 Objetivo general

Determinar si existen diferencias funcionales entre las células  $T_{CM}$   $CD38^+$  y  $CD38^-$  de donadores sanos en la expresión de citocinas así como en moléculas de superficie inducida por una estimulación policlonal a través del receptor de células T (TCR). Así como evaluar si las diferencias funcionales están siendo reguladas por los productos de la catálisis de CD38 (cADPR y NAADP) y/o inhibidores de la actividad enzimática de CD38 y antagonistas de los productos.

### 4.1 Objetivos específicos:

Purificar células  $T_{CM}$   $CD38^+$  y  $CD38^-$  mediante el sistema de selección clasificada por fluorescencia (FACS).

Obtener las condiciones óptimas de cultivo y activación de las células  $T_{CM}$   $CD38^+$  y  $CD38^-$ .

Evaluar mediante la técnica de PCR, la expresión de citocinas, receptores de quimiocinas, marcador de proliferación y moléculas de coestimulación después de la activación vía TCR.

Plantear un modelo para evaluar la actividad enzimática de CD38 como regulador de funciones de las células  $T_{CM}$ .

## 5 Hipótesis

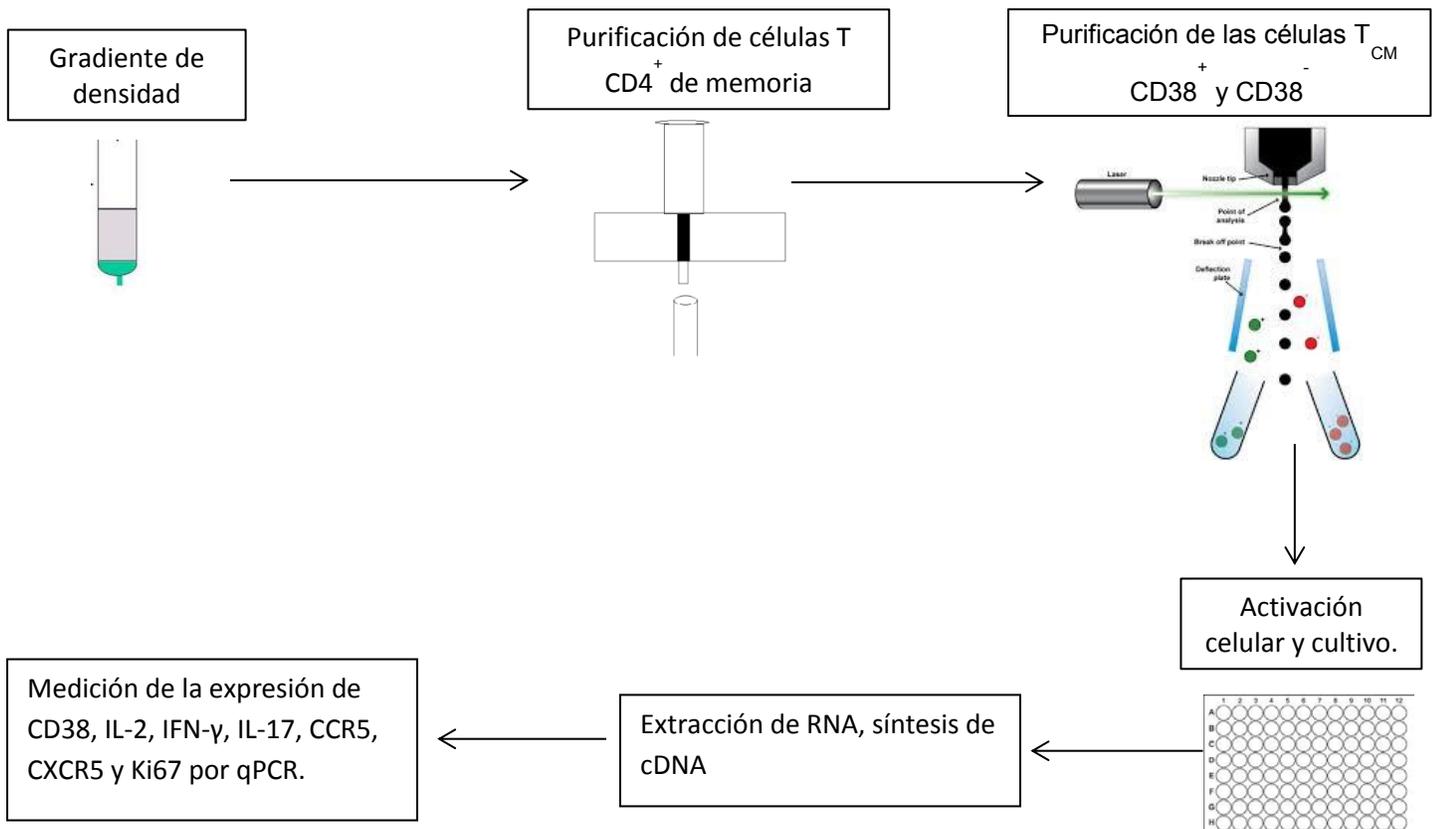
Existen diferencias funcionales intrínsecas entre las células  $T_{CM}$  que expresan CD38 y las que no la expresan, estas diferencias funcionales están siendo reguladas por la actividad enzimática de CD38.

## 6 Metodología

### 6.1 Muestras

Se obtuvieron concentrados leucocitarios de 6 donadores sanos no infectados por VIH, Hepatitis B, C, o alguna infección por *Trypanosoma cruzi*, provenientes del banco de sangre del INER. Las políticas de operación, normas y lineamientos para la donación de sangre se encuentran en el manual de procedimientos del banco de sangre del INER. La ausencia de infección por VIH se documenta rutinariamente en el Banco de Sangre del INER de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-010-SSAS2-1993 (Para la prevención y control de la infección por virus de la inmunodeficiencia humana. D.O.17-I-1997), mediante ELISA y Western blot.

### 6.2 Estrategia experimental



**Diagrama 2. Resumen de la estrategia experimental**

### **6.2.1 Obtención de células mononucleares de sangre periférica por gradiente en ficoll**

Se obtuvieron las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs, por sus siglas en inglés) a partir de 50-75 ml de un concentrado leucocitario, mediante un gradiente de densidad en Ficoll (Lymphoprep™, Axis-Shield, Oslo, Noruega),

Para esto primero se realizó una dilución  $\frac{1}{2}$  de la sangre periférica, con PBS (solución amortiguadora de fosfatos) (Lonza, Walkersville, EUA) v/v. Posteriormente, cada 30 ml de esta dilución se adicionaron cuidadosamente sobre 15 ml de Ficoll y se centrifugaron a 400 g durante 20 minutos a temperatura ambiente (20-28°C). Se recuperó la fracción de PBMCs y se realizó un lavado con PBS seguido de una centrifugación a 2000 rpm durante 10 minutos. La fracción de células recuperadas se sometió a una incubación de 10 minutos con solución de lisis para eritrocitos compuesta por 150mM NH<sub>4</sub>Cl (Meyer, México, D. F.) 10mM KHCO<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) 0.1mM EDTA (Life technologies, N.Y, EUA). Por último, se realizó un lavado con PBS a 2000 rpm durante 10 min.

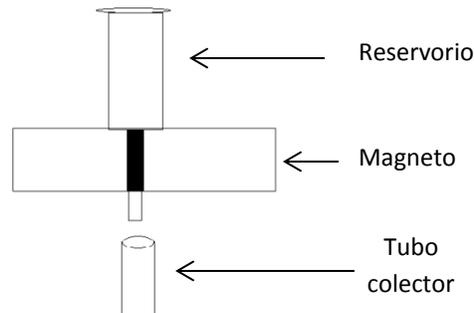
Las células fueron resuspendidas en medio RPMI 1640 (LONZA, Walkersville, EUA) con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Biowest, Kansas, EUA), 2 mM L-glutamina (LONZA, Walkersville, EUA), 100 U/mL de penicilina y 0.1 mg/mL de estreptomina (LONZA, Walkersville, EUA) y se contaron microscópicamente excluyendo a las células muertas por su tinción con el colorante vital azul tripano, diluido (LONZA, Walkersvilles, EUA).

### 6.2.2 Obtención de las células T CD4<sup>+</sup> de memoria

100 x 10<sup>6</sup> PBMCs obtenidas en el paso anterior se colocaron en tubos Falcon de 15 ml y se lavaron con una solución amortiguadora de fosfatos (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10mM NaHPO<sub>4</sub>, 2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) (LONZA, Walkersville, EUA) con 0.5% de suero fetal bovino (SFB) (Biowest, Kansas, EUA) y 2 mM EDTA (Life technologies, N.Y, EUA) a 300 g, durante 10 min y temperatura de 4 a 8°C. Se decantó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 100 µl de la solución anterior.

La purificación de la población de células T CD4<sup>+</sup> de memoria se realizó mediante una selección inmunomagnética negativa. Esta consiste en la unión por atracción magnética a una columna de todas las PBMCs, excepto las células T CD4<sup>+</sup> de memoria. Para esto, primero se realizó una tinción con 100 µl de un cóctel de anticuerpos biotinilados contra CD45RA, CD8, CD14, CD16, CD19, CD56, CD123, TCRγ/δ y CD235a (Miltenyi, Mönchen-Gladbach, Alemania) y se dejó incubar 10 min a 4°C, con agitaciones cada 5 min. Posteriormente se realizó una tinción secundaria con microperlas magnéticas acopladas a un anticuerpo anti-biotina (Miltenyi, Mönchen-Gladbach, Alemania) y se incubó durante 15 min a 4-8°C con agitación cada 5 min. Por último, se realizó un lavado a 300 g durante 10 min y se resuspendió en 500 µl de PBS, 0.5% SFB, 2mM de EDTA. Se procedió a la separación magnética.

Se utilizaron columnas LS colocadas sobre un magneto (QuadroMACS, Milteny, Mönchen-Gladbach, Alemania) (Figura 2). El pH de la columna fue equilibrado con 3 ml de solución de elución (PBS, 0.5% SFB y 2mM EDTA) en el reservorio. Posteriormente, se adicionó la suspensión celular y se recuperó la fracción que pasaba libremente por la columna (elución) que corresponde a la población de células T CD4<sup>+</sup> de memoria. Se realizaron 3 lavados del reservorio con 3 ml de la solución de elución, la suspensión celular obtenida fue centrifugada a 1700 rpm durante 5 minutos. Por último, se resuspendió el eluado en 10 ml de medio RPMI completo (10%SFB, 1% antibiótico) y se procedió a realizar el conteo celular.



**Figura 1.** Sistema de separación magnética. La suspensión celular se deposita en el reservorio, las células no teñidas pasan libremente por la columna, mientras que las células teñidas se unen a la columna. La tinción consiste en un anticuerpo biotinilado contra un marcador específico de una población celular en particular y un anticuerpo secundario unido a una microperla magnética.

### 6.2.3 Tinción celular y estrategia de selección de células T CD4<sup>+</sup> de memoria centrales CD38<sup>+</sup> y CD38<sup>-</sup> por clasificación de células activada por fluorescencia (FACS)

A partir del total de células T CD4<sup>+</sup> de memoria obtenidas en el paso anterior, se realizó la purificación de las células T CD4<sup>+</sup> T<sub>CM</sub> CD38<sup>+</sup> y CD38<sup>-</sup> mediante la clasificación celular activada por fluorescencia (FACS, por sus siglas en inglés), utilizando un citómetro FACS Aria I (Unidad de Citofluorometría del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM).

La siguiente tabla muestra los anticuerpos utilizados y el fluorocromo al que está acoplado cada anticuerpo y su clona.

**Tabla 4. Panel de anticuerpos utilizados para la separación de T CM CD38<sup>+</sup> y CD38<sup>-</sup> por FACS**

<b>Anticuerpo</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Casa comercial</b>	<b>Catálogo</b>	<b>Clona</b>
Anti-CD4	APC-CY7	BD	557871	RPA-T4
Anti-CD45RA	APC	BD	550855	HI100
Anti-CCR7	PE	Miltenyi	130-093-621	FR11-11E8
Anti-CD38	Biotina	Miltenyi	130-092-288	IB6
Estreptavidina	PercPCY5.5	BD	405214	

### 6.2.4 Compensación

Con la finalidad de eliminar la señal espuria generada por los empalmes en los espectros de emisión de los fluorocromos, se generó una matriz de compensación para la tinción realizada, cuya finalidad es restar las señales interferentes. Esta matriz se obtiene con monotinciones en microesferas de poliestireno (CompBeads™ de BD, San José, California, EUA) que tienen acoplados anticuerpos contra la cadena  $\kappa$  de las inmunoglobulinas provenientes de ratón o rata. La siguiente tabla muestra las cantidades de anticuerpos utilizadas.

**Tabla 5. Diseño de los tubos de compensación**

Tubo	Perlas de compensación negativas	Perlas de Compensación Positivas	Anti CD4	Anti CD197	Anti CD38	Anti CD45RA
1	1 gota	-	-	-	-	-
2	1 gota	1 gota	1 $\mu$ l	-	-	-
3	1 gota	1 gota	-	2 $\mu$ l	-	-
4	1 gota	1 gota	-	-	3 $\mu$ l	-
5	1 gota	1 gota	-	-	-	4 $\mu$ l

### 6.2.5 Controles FMOs

Para aquellos marcadores en los que no fue posible eliminar la señal espuria con la compensación, se utilizaron tinciones controles FMO (Fluorescence Minus One), estos controles permiten delimitar el área que corresponde a una señal negativa por parte de otros anticuerpos, debido a que contienen todos los anticuerpos excepto el que se quiere evaluar. Se realizaron controles FMO para CD45RA, CCR7 y CD38 empleando  $1 \times 10^6$  de PBMCs como muestra la siguiente tabla.

**Tabla 6. Diseño de los controles FMO**

Tubo	Células Mononucleares	Anti CD4 APC/ CY7	Anti CD197 PE	Anti CD38 Biotina	Anti CD45 RA APC
1(Sin teñir)	$1 \times 10^6 / 50 \mu\text{l}$	-	-	-	-
2(FMO CCR7)	$1 \times 10^6 / 50 \mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	-	10 $\mu\text{l}$	15 $\mu\text{l}$
3 FMO CD38	$1 \times 10^6 / 50 \mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{l}$	-	15 $\mu\text{l}$
4 FMO CD45RA	$1 \times 10^6 / 50 \mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{L}$	-
5 (PBMC's)	$1 \times 10^6 / 50 \mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$	15 $\mu\text{l}$

### 6.2.6 Tinción de las células T CD4<sup>+</sup> de memoria

Las células T CD4<sup>+</sup> de memoria (previamente purificadas), fueron lavadas con PBS con 2% de SFB a 1700 rpm, durante 5 minutos. Por cada  $10 \times 10^6$  de células se resuspendieron en 100  $\mu$ l de PBS/ SFB 2% y se adicionaron 10 $\mu$ l del anticuerpo anti-CD38 biotinilado (volumen recomendado por el fabricante), se incubó durante 20 minutos a una temperatura 4-8°C, posteriormente se lavaron con PBS/SFB %. Las células se resuspendieron en 50  $\mu$ l de PBS/SFB 2% y se adicionaron 50  $\mu$ L de estreptavidina acoplada a PerCP-Cy5.5 en una dilución (1:100) con PBS y se completó el volumen a 100 $\mu$ l con PBS/SFB 2%, se incubó durante 20 min, a una temperatura 4-8°C en la oscuridad y por último se realizó otro lavado.

Una vez realizada la tinción indirecta, se adicionaron simultáneamente el resto de los anticuerpos, anti-CD4 (1  $\mu$ L/ $10 \times 10^6$  células), anti-CCR7 (5 $\mu$ l/ $10 \times 10^6$  células) y anti-CD45RA (15 $\mu$ l/ $10 \times 10^6$  células) completando el volumen a 100  $\mu$ l. Se incubó en la oscuridad durante 20 minutos a 4-8°C.

### 6.2.7 Estrategia de selección

Utilizando el programa FACS DIVA (Becton Dickinson, San José, Cal, EUA), a partir de la población de células únicas no agregadas (“singlets”), se delineó la población de linfocitos de acuerdo a sus propiedades de dispersión de la luz. En el eje de las abscisas se grafica la dispersión frontal o “forward scatter” FSC y en el eje de las ordenadas se grafica la dispersión lateral o “side scatter” (SSC). Estos parámetros reflejan las propiedades morfológicas de las células, como tamaño relativo y complejidad. De acuerdo a estas propiedades fue posible delimitar la población de linfocitos. A partir de la población con expresión alta de CD4 (CD4<sup>high</sup>). Entre éstas se delineó la subpoblación T<sub>CM</sub> como CD45RA<sup>-</sup> CCR7<sup>+</sup>. Una vez seleccionada esta población se utilizó la señal positiva para el anticuerpo anti-CD38 para delinear y separar las células T<sub>CM</sub> CD38<sup>+</sup> de las CD38<sup>-</sup> (Fig.1).

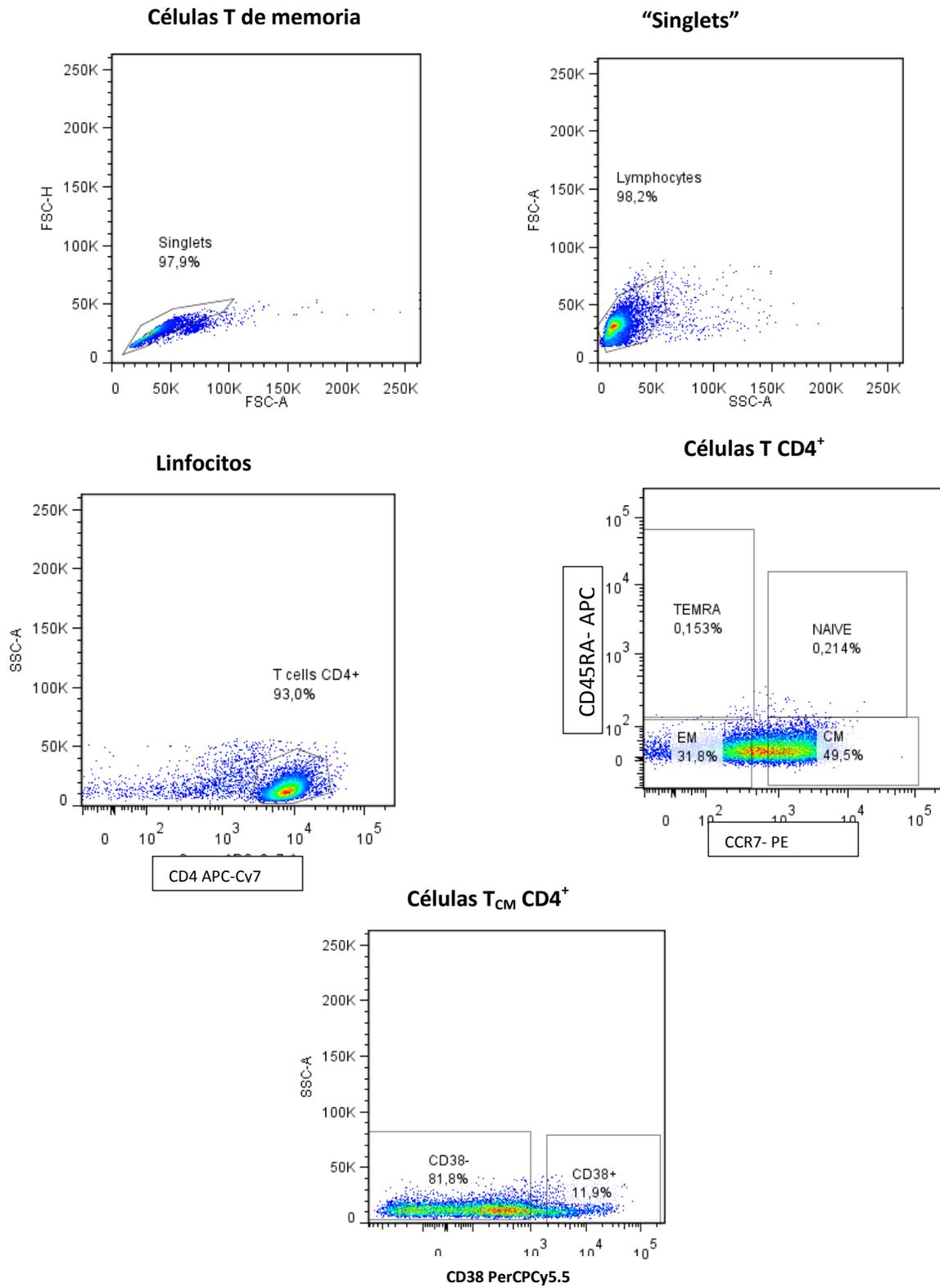


Figura 2. Estrategia de selección células T<sub>CM</sub> CD38<sup>+</sup> y CD38<sup>-</sup>. Los porcentajes corresponden a una determinación aislada, durante la separación.

### 6.2.8 Cultivo y Activación policlonal a través del receptor de células T

Para observar las diferencias en las funciones de las células T<sub>CM</sub> CD38<sup>+</sup> y CD38<sup>-</sup> ante una estimulación policlonal a través del receptor de células T (TCR por sus siglas en inglés), se realizó la inducción de la expresión de los genes de las citocinas IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-17, de la molécula coestimuladora CD154 (CD40L), el marcador de activación CD38, los receptores de quimiocinas CCR5, CXCR5, CXCR4, CXCR3, CXCL9 y el marcador de ciclo celular Ki67, el cual es un marcador aceptable de proliferación (64).

En los experimentos 1,2 y 3, la activación se realizó en placas sensibilizadas con un anticuerpo agonista anti CD3. Se sensibilizó la placa con 100 ng de anti-CD3 (BD, San José, California, EUA) en 100  $\mu$ l, y se dejó incubando 1 hora a 37 °C. Posteriormente se retiró el sobrenadante y se agregaron 100 000 células por pozo, en un volumen de 100  $\mu$ l de medio RPMI completo. Por último se adicionaron con 100 ng de anti-CD28 (BD, San José, California, EUA). Y se dejó incubando a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 12 horas.

En el experimento 4, se usaron anti-CD3 y anti-CD28 acopladas a microesferas (Dynabeads, Life Technologies, Oslo, Noruega) en una proporción perla/célula 1/1, más 30 U/mL de IL-2 (Biolegend, San Diego, California, EUA) mientras que en experimento 5 y 6 se usaron 15 U/ml de IL-2 (Tabla 7).

La inducción se realizó durante 48 horas para medir la inducción del marcador de entrada a ciclo celular Ki67 y durante 6 horas para el resto de los genes. Estos tiempos de cultivo se decidieron con base en cinéticas previas (no se muestran). El cultivo se realizó con 100 mil células en un volumen de 100  $\mu$ l de medio RPMI 1640 completo (10%SFB, 1% antibiótico) a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, como se muestra a continuación:

**Tabla 7. Condiciones experimentales**

Experimento	Condición
1,2 y 3	Anti-CD3 unido a una fase sólida (100ng), anti-CD28 soluble (100ng), 12 horas de cultivo.
4	Anti-CD3, anti-CD28 acoplados a microesferas (1:1), IL-2 (30U/ml) 6 y 48 horas de cultivo para evaluar Ki67.
5 y 6	Anti-CD3, anti-CD28 acoplados a microesferas (1:1), IL-2 (15U/ml), 6 y 48 horas de cultivo para evaluar Ki67.

### **6.2.9 Estimulación en presencia de productos de la catálisis de CD38, de un inhibidor de CD38 y un antagonista de un segundo mensajero de CD38**

En el último experimento, además de la activación a través del TCR, las células  $T_{CM} CD38^-$  fueron cultivadas con uno de dos de los productos conocidos de las reacciones catalizadas por CD38: 100  $\mu M$  de adenindifosforribosa cíclica (cADPR) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) o 100  $\mu M$  del dinucleótido de adenina y ácido nicotínico fosfatado (NAADP) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). Además se hicieron cultivos en presencia de estos segundos mensajeros más ácido 1,2-bis(o-amino-fenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacetico (BAPTA) 20  $\mu M$  (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), un complejante de  $Ca^{2+}$ .

Las células  $T_{CM} CD38^+$  fueron cultivadas en presencia de 2'-deoxi-2'-fluoroarabinosa-NAD ( $\beta$ -araF-NAD<sup>+</sup>) 6  $\mu M$ , inhibidor competitivo de CD38, o en

presencia del antagonista de cADPR 8-Br-cADPR 100 $\mu$ M y el quelante de calcio BAPTA 20 $\mu$ M.

Posteriormente las células fueron activadas con anti-CD3 y anti-CD28 unido a microperlas, en presencia de 15U/ml de IL-2 Durante 6 horas y 48 horas (para la medición de la expresión de Ki67).

### 6.3 Extracción de RNA, síntesis de cDNA y qPCR

La extracción de RNA se realizó utilizando un sistema de afinidad por columna de gel de sílice “RNeasy Micro Kit” (Qiagen, Hilden, Alemania) en tratamiento con DNAsa (Qiagen, Hilden Alemania). Una vez obtenido el RNA se procedió a sintetizar el cDNA mediante una reacción de retrotranscripción, utilizando el estuche comercial “Iscrip™ Reverse Transcription Supermix” (Biorad, California, EUA). Las condiciones de la reacción se muestran en la tabla 8, el cDNA obtenido se cuantificó mediante espectroscopía UV a 260 nm y se ajustó a una concentración a 40 ng/ $\mu$ L.

**Tabla 8. Condiciones de la Reacción de retrotranscripción**

Unión de los cebadores	5 minutos a 25 °C
Transcripción Reversa	30 minutos a 42 °C
Inactivación de la enzima Transcriptasa (RT)	5 minutos a 85 °C

Para evaluar la expresión de genes, se utilizaron sondas TaqMan® (Tabla 10) (Applied biosystems, Warrington, Inglaterra) mediante una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR por sus siglas en Inglés). Se utilizaron 200 ng de cDNA en un volumen final de 15  $\mu$ L. Las condiciones de la reacción se muestran a continuación:

**Tabla 9. Condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa**

1 ciclo		40 ciclos	
Preincubación	Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Hibridación y extensión
50°C, 2 min	95°C, 10 min	95°C 15 seg	60°C 1 min

**Tabla 10. Fluorocromos y secuencia específica de cada sonda.**

GEN	FLUOROCROMO	ID ASSAY
IL-2	FAM	Hs00174114_m1
IL-17	FAM	Hs00174383_m1
IFN- $\gamma$	FAM	Hs00989291_m1
CD40L	FAM	Hs00163934_m1
KI67	FAM	Hs0103244_m1
CD38	FAM	Hs01120071_m1
CXCR5	FAM	Hs00173527_m1
CCR5	FAM	Hs99999149_s1
GAPDH	VIC	Núm. de parte 4326317E

#### 6.4 Normalización de datos

El porcentaje de expresión relativa se obtuvo calculando el  $\Delta CT$ , definido como la diferencia entre el CT (ciclo umbral por sus siglas en inglés) del gen de interés y el CT del gen de GAPDH (gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa, control endógeno) (65) y, después calculando el porcentaje de expresión relativa a la muestra que hubiera tenido la expresión máxima (Ct) encontrada en cada experimento, de acuerdo a las siguientes fórmulas:

$$\Delta CT = CT_{Gen\ problema} - CT_{GAPDH}$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{Muestra\ de\ interes} - \Delta CT_{Muestra\ de\ expresión\ max}$$

$$\% \text{ Expresión relativa} = 2^{-\Delta\Delta CT} \times 100$$

De este modo, la expresión de cada gen en cada condición y experimento se expresó como un porcentaje del nivel máximo alcanzado en cada experimento. Esta normalización arroja un dato normalizado con corrección para los cambios de condiciones.

#### 6.5 Análisis estadístico

Dado que los diferentes experimentos tenían condiciones variadas, no era posible hacer pruebas inferenciales de dos grupos para comparar la media de expresión relativa de los genes en las células  $T_{CM} CD38^+$  y  $T_{CM} CD38^-$  en condiciones de estimulación. Sin embargo, fue posible normalizar los resultados contra el máximo de expresión obtenido en cada experimento. Dado que para todo experimento hubo una población en alguna condición con el 100% de expresión y dado que las subpoblaciones celulares estudiadas mostraban consistentemente el valor máximo o consistentemente un valor abajo del máximo (según el gen estudiado), es justificable entonces determinar si esta proporción del máximo, para cada subpoblación (siempre normalizado al 100%), fue significativamente diferente a él. Esto es posible haciendo una prueba t de una sola muestra en la que la hipótesis

nula ( $H_0$ ) es: media (de los resultados de todos los experimentos para cada gen en cada subpoblación en condiciones de activación)  $\mu \geq 100$ .

Realizamos una prueba  $t$  de una sola muestra en las células  $CD38^-$  y  $CD38^+$  sin estímulo, para determinar si hay expresión basal, donde la hipótesis nula es  $H_0: \mu \leq 0$  lo que significa que no hay expresión basal, si  $p < 0.05$  se rechaza la hipótesis nula, esto quiere decir que la expresión es mayor a 0.

Las condiciones basales fueron las únicas constantes en todos los experimentos, por lo que fue posible realizar una prueba de Wilcoxon de rangos signados para comparar la expresión basal de las células  $CD38^+$  y  $CD38^-$ , y así determinar cuál de las dos poblaciones tienen la mayor expresión de los genes que se expresan de forma constitutiva.

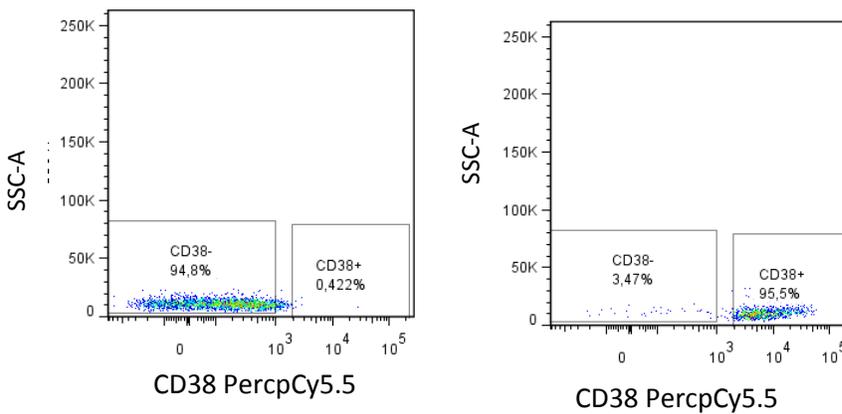
## 7 Resultados

### 7.1 Pureza de las células separadas

La siguiente tabla muestra el promedio de pureza promedio de los 6 experimentos. El porcentaje mínimo de pureza en las células CD38<sup>-</sup> fue de 95.21% y en el caso de las células CD38<sup>+</sup> fue de 90.95%. La pureza fue determinada al término del sorting,

**Tabla 11. Promedio de pureza de los 6 experimentos**

Pureza CD38 <sup>-</sup>	Pureza CD38 <sup>+</sup>
96.92 ± 1.79%	94.44 ± 3.59%



**Figura 3. Gating de pureza, la figura corresponde a un experimento representativo.**

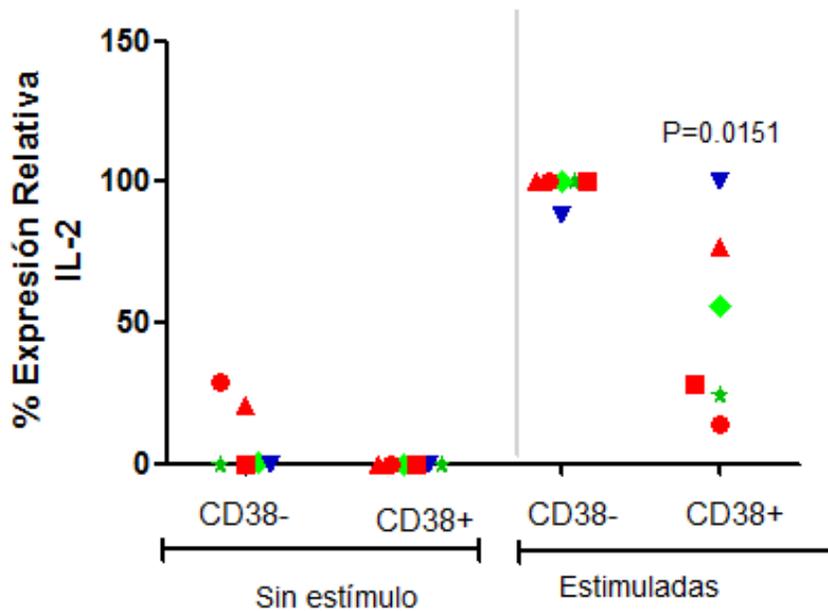
La siguiente tabla muestra las condiciones usadas para activar a las células TCM CD38<sup>+</sup> y CD38<sup>-</sup>. Cada donador tiene una figura diferente, mientras que las condiciones usadas se muestran de un solo color.

**Tabla 12. Condiciones usadas en los experimentos**

<b>Color</b>	<b>Condiciones</b>	<b>n</b>
<b>Rojo</b>	100 ng anti-CD3, sensibilización de placa durante 1 h a 37°C + 100 ng anti-CD28 soluble, cultivo durante 12 hrs.	3
<b>Azul</b>	Anti-CD3 y anti-CD28 acoplado a microperlas (1 :1 perla/célula) +30 IU/mL IL-2, 6 h y 48 h para Ki67.	1
<b>Verde</b>	anti-CD3 y anti-CD28 acoplado a microperlas (1:1 perla/célula) + 15 IU/mL IL-2, 6 h y 48 h para Ki67.	2

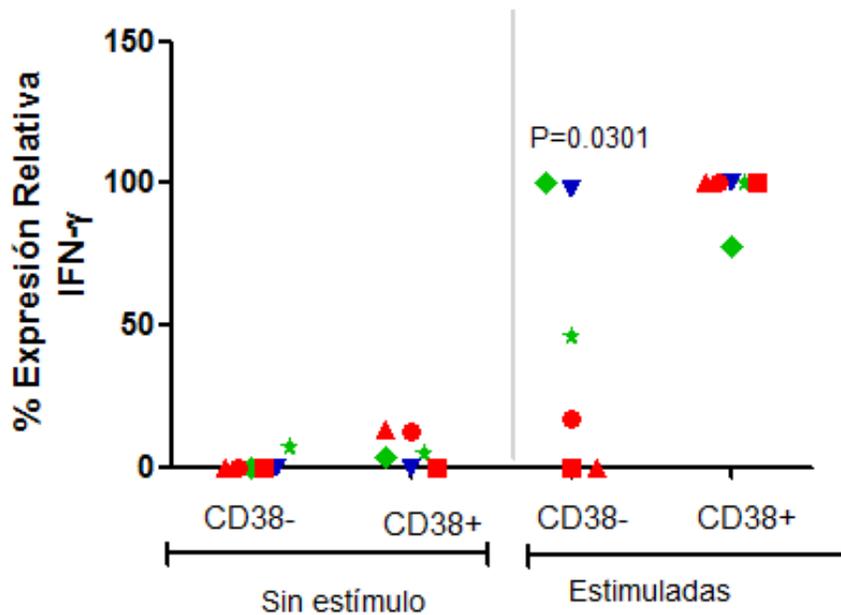
El gráfico 1 muestra la expresión relativa de CD38 en condiciones basales después de la separación por citometría (sin activar). Las células T<sub>CM</sub> CD38<sup>+</sup> muestran expresión basal, pero no las células T<sub>CM</sub> CD38<sup>-</sup>, lo cual confirma la pureza con que se obtuvieron dichas células en los 6 experimentos y que el gen no fue inducido durante el proceso de purificación. Después de la activación, las células CD38<sup>-</sup> no indujeron la expresión de CD38.





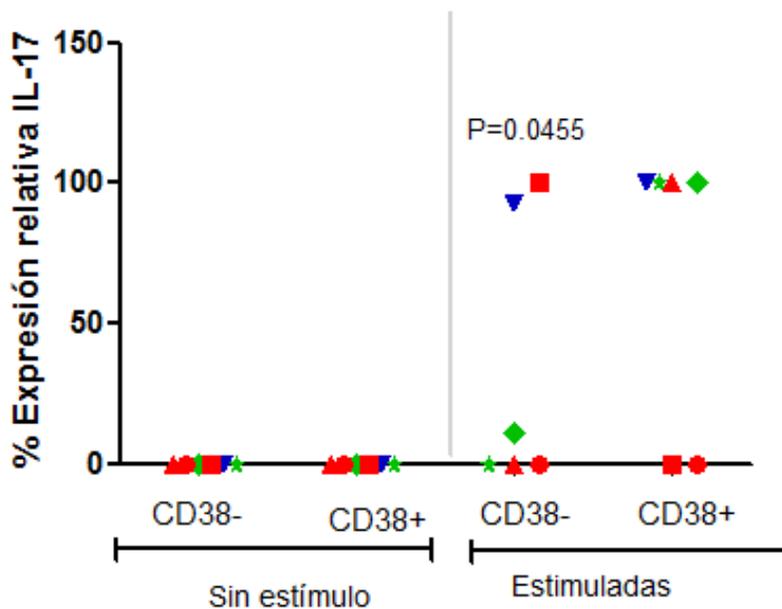
*Grafico 2. Porcentaje de expresión relativa de IL-2 en condiciones basales y de estimulación. Los valores corresponden al % del máximo valor (delta Ct) de expresión obtenido en el experimento ( $P=0.0151$  prueba T de una sola muestra,  $H_0$ : media  $\geq 100$ ). Cada figura representa un donador y cada color representa una condición experimental.*

Los promedios de los valores basales de  $2^{-\Delta\Delta CT}$  de IFN- $\gamma$  en cada tipo de célula no fueron significativamente diferentes de cero, lo que indica que no se expresa basalmente en las células CD38 $^{-}$  ni en las CD38 $^{+}$ . La expresión inducida en las células CD38 $^{-}$  estimuladas fue significativamente menor a 100 ( $P=0.0301$ ). La expresión de IFN- $\gamma$  consistentemente fue la máxima en las células CD38 $^{+}$ .



*Gráfico 3. Porcentaje de expresión relativa de IFN- $\gamma$  en condiciones de estimulación y no estimulación. Los valores corresponden al % del máximo valor (delta Ct) de expresión obtenido en el experimento ( $P=0.0301$  prueba T de una sola muestra,  $H_0$ : media  $\geq 100$ ). Cada figura representa un donador y cada color una condición experimental.*

IL-17 no se expresa basalmente en las células CD38<sup>-</sup> ni en las CD38<sup>+</sup>. La expresión de IL-17 en las células CD38<sup>-</sup> en condiciones de activación es significativamente menor del 100% ( $p=0.0455$ ), mientras que la expresión de IL-17 las células CD38<sup>+</sup> en condiciones es consistentemente el mayor de cada experimento.



*Grafico 4. Porcentaje de expresión relativa de IL-17 en condiciones de estimulación y no estimulación, los valores corresponden al % del máximo valor obtenido en el experimento ( $P=0.0455$ , prueba T de una sola muestra donde  $H_0: media \geq 100$ ). Cada figura representa un donador y cada color una condición experimental.*

### 7.3 Diferencias en la expresión de CD40L y los receptores de quimiocinas (CCR5 y CXCR5)

Las células CD38<sup>+</sup> expresan constitutivamente CCR5 ( $P=0.0384$ ). Hay una tendencia en la expresión basal de CCR5 en las células CD38<sup>-</sup> ( $P=0.056$ ). Existe diferencia significativa entre la expresión basal de CCR5 en las células CD38<sup>+</sup> y CD38<sup>-</sup> ( $P=0.042$ , Wilcoxon). Las células que más frecuentemente tienen la máxima expresión en condiciones de estimulación son las células CD38<sup>+</sup> y la expresión promedio de CCR5 en las células CD38<sup>-</sup> es significativamente menor al 100% ( $P=0.0010$ ).

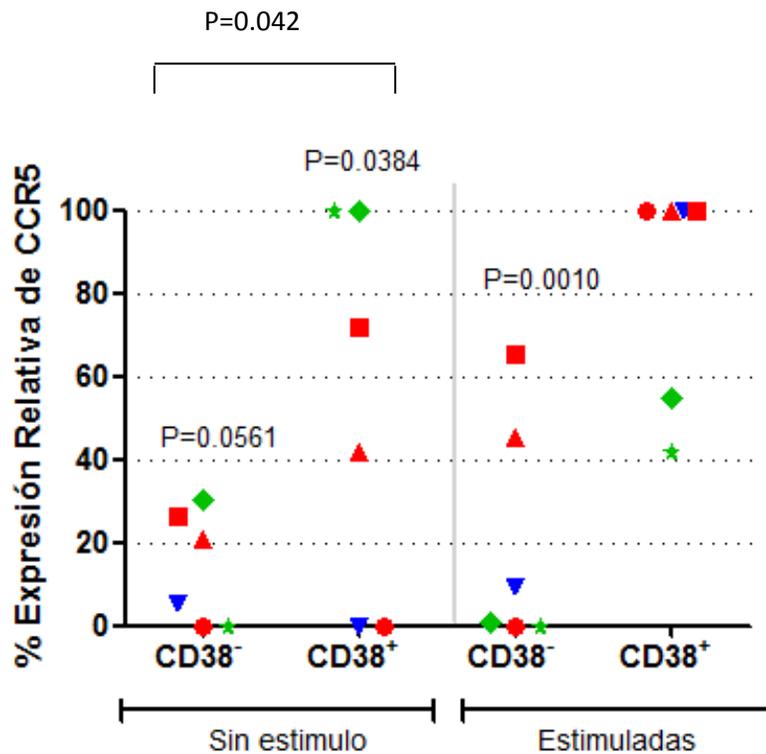


Grafico 4. % Expresión relativa de CCR5 en condiciones basales y de estimulación. ( $P=0.0561$ , prueba T de una sola muestra,  $H_0: media \leq 0$ ). ( $P=0.0384$ , prueba T de una sola muestra,  $H_0: media \leq 0$ ). ( $P=0.001$ , prueba T de una sola muestra,  $H_0: media \geq 100$ ) ( $P=0.119$ , prueba de Wilcoxon de rangos signados).

La expresión del ligando de CD40 (CD40L o CD154) en las células CD38<sup>+</sup> es constitutiva (P=0.0046) al igual que en las células CD38<sup>-</sup> (P=0.0063). No hay diferencia significativa entre las células CD38<sup>+</sup> y CD38<sup>-</sup> en condiciones basales (P= 0.1563). La expresión relativa promedio en condiciones de estimulación es significativamente menor de 100% (P=0.0015) en las T<sub>CM</sub> CD38<sup>+</sup>, una disminución en la expresión de CD40L en respuesta a la estimulación a través del RCT.

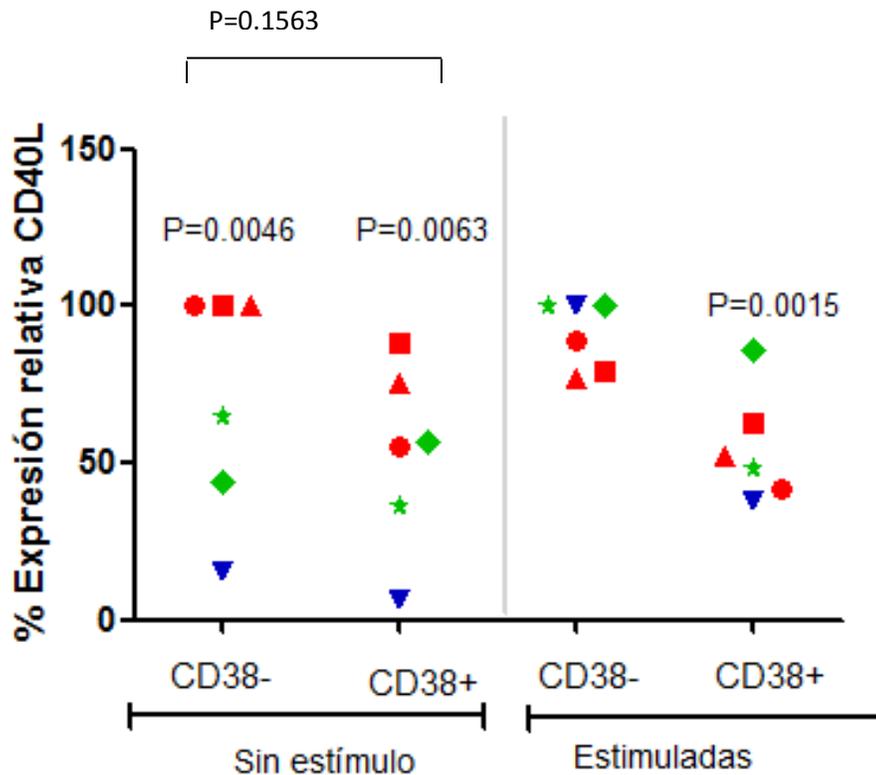


Gráfico 5. Expresión relativa de CD40L en condiciones basales y de estimulación. (P=0.0046, prueba T de una sola muestra, Ho: media≤0). (P=0.0063, prueba T de una sola muestra, Ho: media≤0). (p=0.0015, prueba T de una sola muestra, Ho:media≥100) (P=0.1563, prueba Wilcoxon de rangos signados).

La expresión de CXCR5 es constitutiva tanto en las células CD38<sup>-</sup> como en las células CD38<sup>+</sup> (expresión promedio significativamente mayor a 0 con P=0.0048 y P=0.0111 respectivamente). No hay diferencia significativa en la expresión basal

de CXCR5 en las células CD38<sup>-</sup> y CD38<sup>+</sup> (P=0.923). La expresión en las células CD38<sup>+</sup> estimuladas es significativa menor al 100% (P<0.001), lo que indica que la expresión de CXCR5 en condiciones de activación es consistentemente mayor en las células CD38<sup>-</sup>.

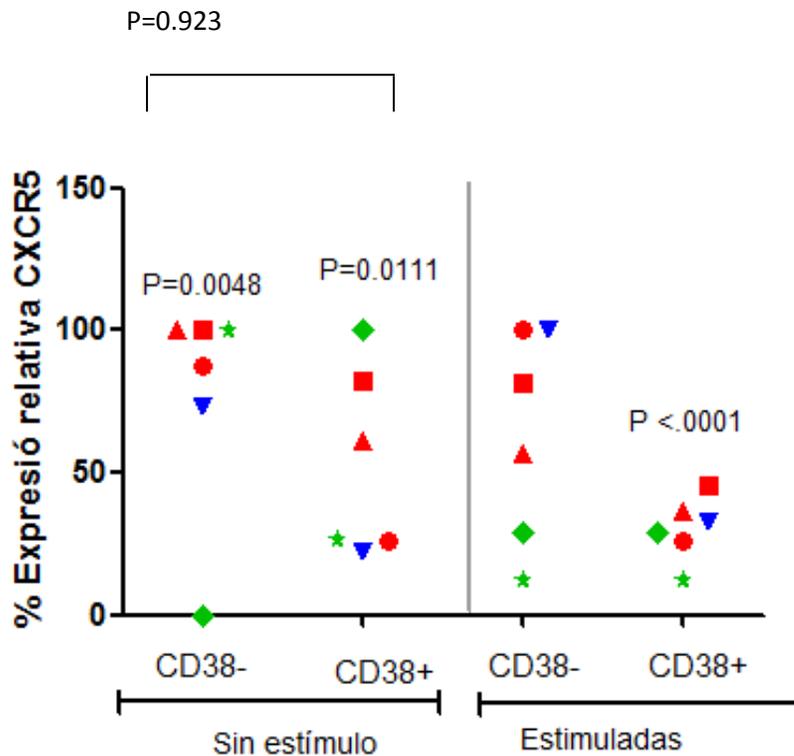


Gráfico 6. Porcentaje de expresión relativa de CXCR5 en condiciones de estimulación y no estimulación. (P=0.0048, prueba T de una sola muestra, Ho: media≤0). (P=0.0111, prueba T de una sola muestra, Ho: media≤0). (p<0.0001, prueba T de una sola muestra, Ho:media≥100).(P=0.923, prueba de Wilcoxon de rangos signados).



## **7.5 Regulación de las funciones inmunes por la actividad enzimática de CD38**

Realizamos un único experimento para evaluar si es factible estudiar la función enzimática de CD38 como regulador de ciertas funciones inmunes. A las células CD38<sup>-</sup> les adicionamos los productos de la catálisis de CD38 (cADPR y NAADP, conocidos como segundos mensajeros de CD38), esperando que éstas se comportaran como las células CD38<sup>+</sup>, y que esto fuera revertido en presencia de un quelante de Ca<sup>2+</sup>, pues los segundos mensajeros de CD38 desencadenan un aumento en la concentración citoplásmica del ión Ca<sup>2+</sup>.

Al mismo tiempo, a las células CD38<sup>+</sup> les adicionamos un inhibidor de la actividad enzimática de CD38 (ara-F-NAD), así como un antagonista de uno de sus productos (8-Br-cADPR) y un quelante de Ca<sup>2+</sup> (BAPTA). A ambos tipos de células las activamos con anti-CD3, anti-CD28 e IL-2, durante 6 horas (condiciones idénticas al experimento 5).

Al evaluar la expresión de CD38, observamos que no hay expresión de CD38 en las células CD38<sup>-</sup> después de la activación a través del TCR incluso después de la adición de los productos de catálisis de CD38 (cADPR y NAADP). En las células CD38<sup>+</sup> la expresión de CD38 parece disminuir al adicionar 8-Br-cADPR pero se recupera en presencia de ara-F-NAD y el máximo de la expresión está en las células CD38<sup>+</sup> tratadas con BAPTA.

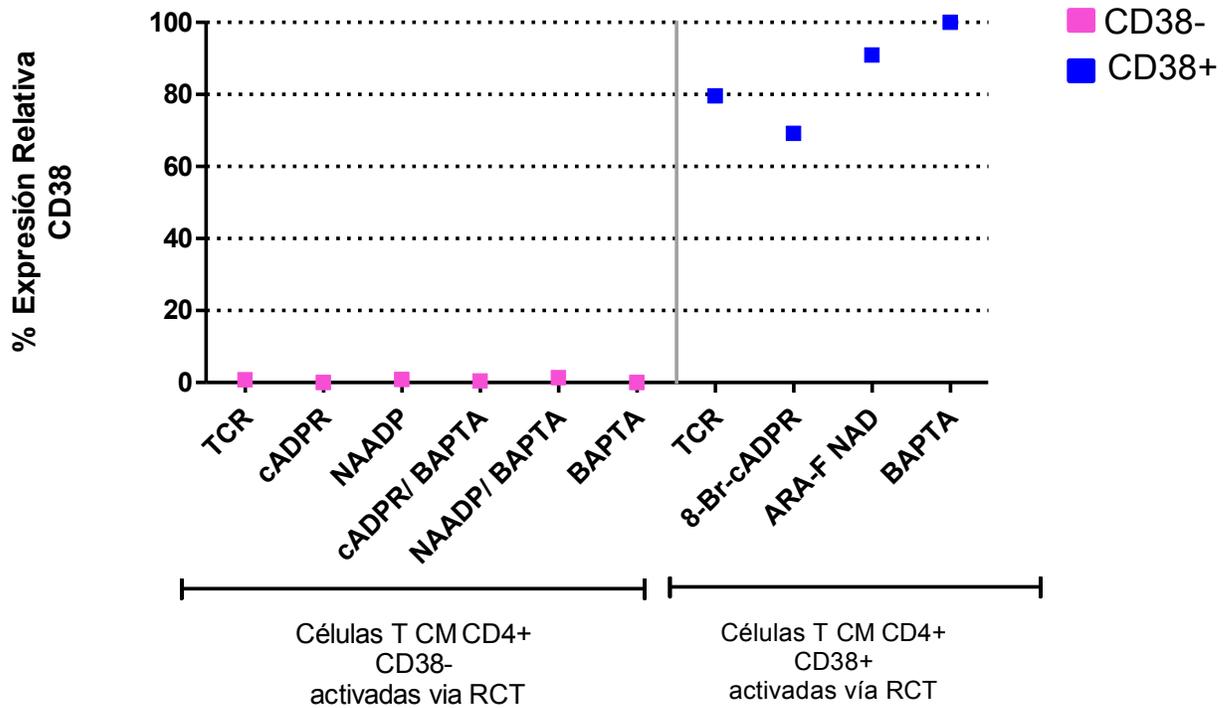


Gráfico 8. Efecto de cADPR, NAADP, 8-Br-cADPR, ara-FNAD<sup>+</sup> y BAPTA en la expresión de CD38, en condiciones de estimulación a través del TCR.

#### Regulación de la expresión de IL-2

La expresión de IL-2 en las células CD38<sup>-</sup> comparadas con la máxima respuesta en el experimento, en aproximadamente un 50% con la adición de cADPR y alcanzó la máxima expresión cuando se adicionó NAADP. Este incremento se pierde al adicionar BAPTA a las células tratadas con cADPR. De la misma forma, las células que fueron tratadas con NAADP en presencia de BAPTA, disminuyen su expresión alcanzando aproximadamente el 60% de la expresión máxima, también se observó una disminución de la expresión hasta menos del 40% en presencia de BAPTA.

Las células  $CD38^+$  expresan menos IL-2 que las células  $CD38^-$ . La expresión disminuyó en las células  $CD38^+$  con la adición del antagonista de cADPR, y se observa otra disminución con la adición de ara-F-NAD o BAPTA.

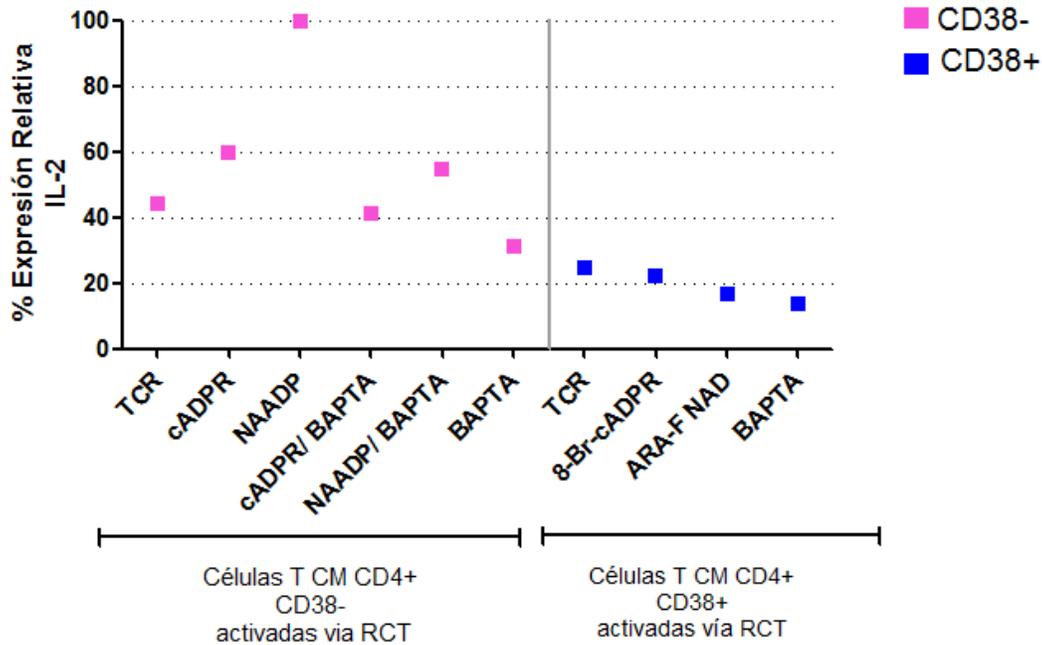
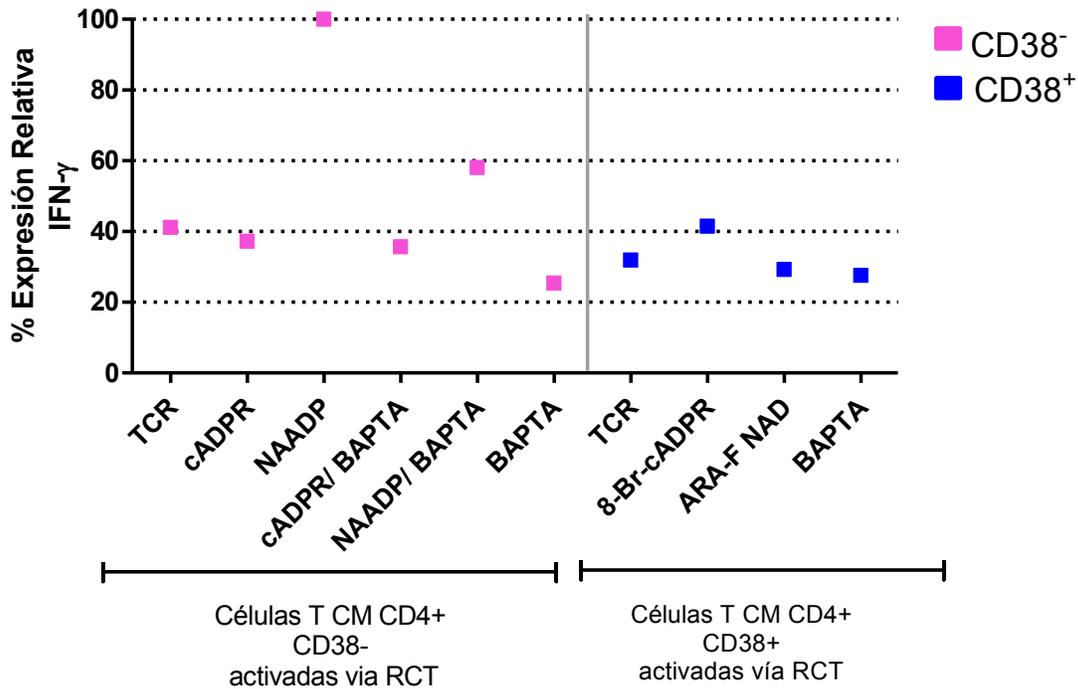


Gráfico 9. Efecto de cADPR, NAADP, 8-Br-cADPR, ara-FNAD<sup>+</sup> y BAPTA en la expresión de IL-2, en condiciones de estimulación a través del TCR.

### Regulación de la expresión de IFN- $\gamma$

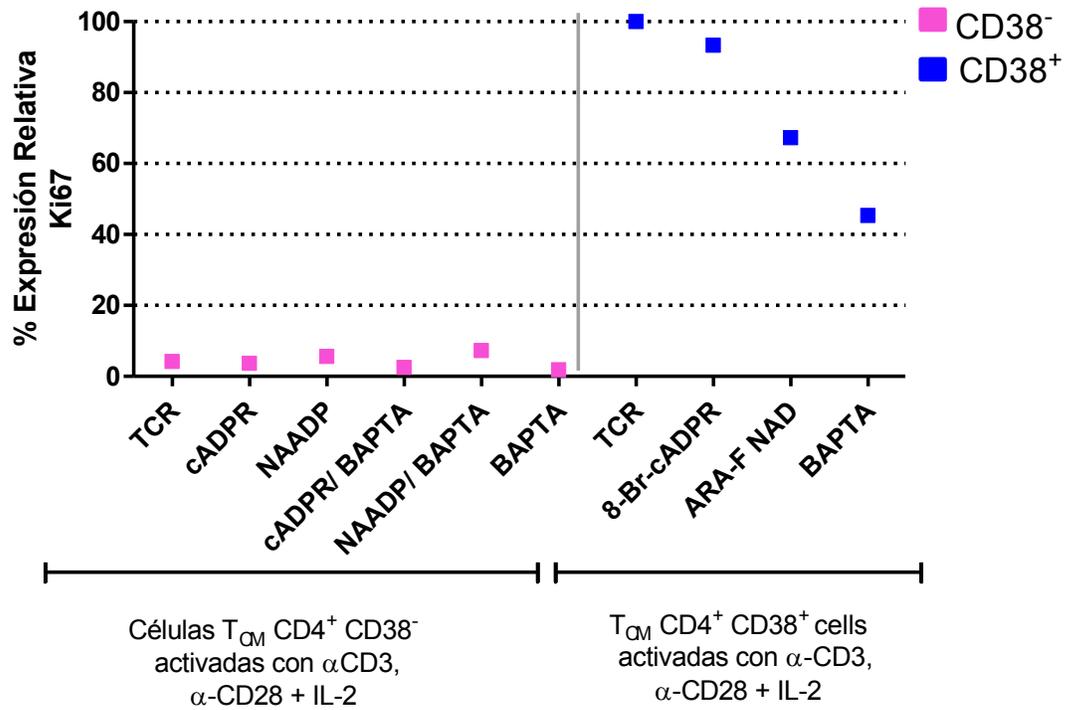
La adición de cADPR no aumentó la inducción de IFN- $\gamma$  en las células  $CD38^-$ , mientras que NAADP aumenta la expresión en las células  $T_{CM} CD4^+ CD38^-$ , a más del doble, alcanzando la más alta expresión. Con la adición de BAPTA a las células cultivadas con NAADP este efecto se pierde y la expresión aumenta solo hasta un 60% del máximo del experimento, (observada en las células  $CD38^-$  estimuladas a través del TCR en presencia de NAADP). La expresión de IFN- $\gamma$  en las células  $T_{CM} CD4^+ CD38^+$  no parece verse afectada con la adición de 8-Br-cADPR, ARA-F-NAD y BAPTA. (Gráfico 9)



Gráfica 10. Efecto de cADPR, NAADP, 8-Br-cADPR, ara-FNAD<sup>+</sup> y BAPTA en la expresión de IFN- $\gamma$ , en condiciones de estimulación a través del TCR.

#### Regulación de la expresión de Ki67

Las células CD38<sup>-</sup> no expresaron este marcador de proliferación aún después de la adición de los productos de la catálisis de CD38. Por el contrario, en las células CD38<sup>+</sup>, la adición del antagonista de cADPR 8-Br-cADPR parece haber disminuido su expresión, mientras que la inhibición de la actividad enzimática de CD38 (con ara-F-NAD), y más aún con la adición del quelante de calcio BAPTA parece disminuir en proporciones importantes la expresión de Ki67 en condiciones de estimulación a través del receptor de células T.



Gráfica 11. Efecto cADPR, NAADP, 8-Br-cADPR, ara-F NAD<sup>+</sup> y BAPTA en la expresión de Ki67.

## 8 Discusión

Se sabe que CD38 es un fuerte predictor del avance de la infección por VIH a SIDA (39) y que existen deficiencias funcionales en las células  $T_{EM}$  y  $T_{CM} CD4^+ CD38^+$  de pacientes  $VIH^+$  (62,63). Sin embargo, en estos estudios previos, las células no habían sido purificadas y por lo tanto, las disfunciones observadas podrían haber sido favorecidas por las interacciones con otras células, como . Para evaluar si existen diferencias funcionales relacionadas con la expresión de CD38 que no están siendo ocasionadas por la infección de VIH, y contestarnos si las alteraciones funcionales previamente descritas, se tratan en realidad de propiedades normales de las células  $CD38^+$ , aislamos de donadores sanos células  $T_{CM} CD4^+$  que expresan y que no expresan CD38 y las activamos con un estímulo policlonal a través del TCR, con un anticuerpo agonista anti-CD3 y en presencia de coestimulación con anti-CD28, además del estímulo adicionales de IL-2.

En este trabajo se encontró que las células  $T_{CM} CD4^+ CD38^+$  consistentemente y a pesar de las condiciones de estimulación, tienen aumentada la respuesta de IFN- $\gamma$  una vez que son estimuladas, en comparación con las células  $CD38^-$ . IFN- $\gamma$  es una citocina efectora típica de la respuesta inmune de tipo Th1(66). Aunque la expresión de esta citocina en la población de células T de memoria centrales es escasa, (ya que las células principalmente de memoria efectoras son las responsables de la secreción de IFN- $\gamma$ , mientras que las células de memoria centrales se caracterizan por su capacidad autoregenerativa(32)) la secreción aumentada puede estar participando en el ambiente inflamatorio típico de la activación inmune.

También encontramos que las células que expresan CD38 tienen aumentada la expresión de IL-17 en condiciones de estimulación, comparadas con las células que no expresan CD38. IL-17 es una citocina proinflamatoria, involucrada en funciones efectoras de tipo Th17 (67), que modula la inflamación y el desarrollo de enfermedades autoinmunes como el lupus )(68). Las células Th17 están enriquecidas en la mucosa y en la lámina propia del tracto gastrointestinal y

juegan un papel importante en la defensa contra microorganismos (69). Estas células además son susceptibles a ser infectadas por el VIH, ya que expresan CCR5 correceptor del VIH(26)(70),. En este contexto, una perturbación en el papel de las células Th17 en la infección por VIH podría comprometer la defensa de las mucosas contra microorganismos patógenos o residentes y esto adicionalmente podría desencadenar un estado de activación, lo que favorecería la replicación viral (10). De estas dos formas, el aumento en la respuesta de las citocinas efectoras IFN- $\gamma$  e IL-17, en un contexto en el que las células CD38 estén sobrerrepresentadas (como la infección por VIH) contribuiría a la inmunosupresión.

CD40L (CD154) es una proteína principalmente expresada en células T activadas y se une a CD40 presente en la superficie de células presentadoras de antígeno, induciendo la activación en las APC en asociación con la estimulación del TCR y las moléculas del MHC (62). Las células CD38<sup>+</sup> en condiciones de activación tienen disminuida la expresión de CD40L comparadas con las células CD38<sup>-</sup>, esto concuerda con los estudios previos de nuestro grupo de investigación, en donde observaron que las células CD38<sup>+</sup> de pacientes VIH<sup>+</sup> presentaban una disociación con la expresión de CD40L e IFN- $\gamma$ . Lo cual podría repercutir en la incapacidad de activar adecuadamente a las células presentadoras, ya sea macrófagos, células dendríticas o células B.

Si bien lo que distingue a las células T de memoria centrales es la capacidad de autorregeneración, en el presente trabajo encontramos que entre ellas, las que expresan CD38 poseen propiedades funcionales típicamente efectoras (alta expresión de IFN- $\gamma$  e IL-17 y baja expresión de IL-2) y además una disminución en la expresión de CD40L (71). Por lo tanto nuestros datos indican que la expresión de CD38 no solo está relacionada con el estado de activación sino también con una especialización funcional. En nuestro modelo, debido a que utilizamos células purificadas de donadores sanos, las funciones evaluadas no están siendo favorecidas por interacciones con otras células y tampoco son disfunciones ocasionadas por la infección del VIH. Más bien, son propiedades intrínsecas de las células T<sub>CM</sub> CD38<sup>+</sup>. Por lo tanto, las disfunciones reportadas previamente (62,63)

podrían deberse principalmente o exclusivamente a la sobrerrepresentación de las células que expresan CD38.

También observamos que las células  $T_{CM}$  que expresan CD38 tienen disminuida la expresión de CXCR5. Éste es un receptor de CXCL13 (72) y su expresión está relacionada con la capacidad de autorregeneración (proliferar sin diferenciarse), se dice que las células de memoria CXCR5<sup>+</sup> no están comprometidas a diferenciarse y que podrían estar manteniendo las reservas de Tcm (73). Estas células pueden diferenciarse a células Th1 o Th2 en respuesta a citocinas polarizantes y un estímulo antigénico determinado. Mientras que una célula comprometida a diferenciarse (CXCR5<sup>-</sup>) puede hacerlo en ausencia de citocinas polarizantes(74).

Otro hallazgo de nuestra investigación es que la expresión de CCR5 en condiciones basales está aumentada en las células CD38<sup>+</sup> comparadas con las células CD38<sup>-</sup> así como en condiciones de activación. CCR5 además de ser un correceptor del VIH y por lo tanto hacer a una célula un blanco más susceptible a la infección (30), su expresión en células T CD4<sup>+</sup> de memoria está relacionada con una tendencia a diferenciarse a células efectoras de tipo Th1 con capacidad de migrar a sitios inflamados (75). Dada la sobrerrepresentación de las células CD38<sup>+</sup> en la infección por VIH, el agotamiento de las células T CD4<sup>+</sup> podría ser debido, además del efecto citopático del VIH en células infectadas, a una mayor diferenciación a células efectoras, que son de vida corta, con limitados ciclos replicativos y más susceptibles a experimentar procesos apoptóticos(71).

Dentro de las diferencias funcionales que encontramos, las células  $T_{CM}$  CD4<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup> tienen disminuida la respuesta de IL-2 y aumentada la inducción de Ki67 en respuesta a la estimulación, mientras que las células  $T_{CM}$  CD4<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> activadas consistentemente tuvieron la máxima expresión de IL-2 pero poca o nula expresión de Ki67 en las condiciones restrictivas de nuestro sistema, (en ausencia de APCs, citocinas homeostáticas, ni estímulo antigénico). IL-2 está relacionada con la capacidad de autorregeneración y mantenimiento de la memoria inmunológica, ya que estimula el crecimiento, diferenciación y supervivencia de células  $T_{CM}$  CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> antígeno-específicas (76). El

mantenimiento de las células T de memoria requiere de la expresión de moléculas antiapoptóticas como BCL<sub>XL</sub>, y de su capacidad para responder a citocinas homeostáticas. En humanos las células T<sub>CM</sub> y T<sub>EM</sub> pueden proliferar en respuesta a IL-7 e IL-15 y esta respuesta puede ser aumentada por citocinas producidas por células dendríticas. Nuestros hallazgos sugieren que las células T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup> pueden proliferar en respuesta a un estímulo mediado por el TCR, aun cuando su expresión de IL-2 es baja, lo cual podría sugerir que son células con baja capacidad regenerativa de la población de memoria central. En un contexto de la infección por VIH podrían contribuir a la pérdida progresiva de las células T CD4<sup>+</sup> por un compromiso a diferenciarse a células con funciones efectoras y por lo tanto de un periodo de vida corto. Esta interpretación es apoyada también por la alta expresión de CCR5 (relacionado con la migración a sitios inflamados característica de células efectoras) y baja expresión de CXCR5 (baja capacidad de autorrenovación) de las T<sub>CM</sub> CD38<sup>+</sup> estimuladas. .

Las células T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> mostraron poca o nula inducción de la expresión de Ki67 en todas las condiciones probadas, a pesar de tener una expresión sustancial de IL-2 y otras moléculas. La falta de Ki67 indica que las células no entraron a ciclo y por lo tanto no están proliferando (64) Estas células podrían necesitar estímulos adicionales para proliferar, como señales homeostáticas (IL-7 o IL-15), señales coestimuladoras inducidas por APCs o un antígeno específico. Debido a su alta expresión de CXCR5 podrían ser células que no están comprometidas a diferenciarse, por lo tanto sería interesante inducir su diferenciación con citocinas polarizantes y evaluar su perfil de diferenciación. En cualquier caso, es necesario realizar más investigación para conocer los requerimientos de estas células para proliferar. Estos requerimientos diferentes demuestran nuevamente la especialización funcional de las TCM asociada a la expresión de CD38.

Las células que expresan CD38, poseen características funcionales diferentes a las de las células CD38<sup>-</sup>, entonces la expresión de CD38 no solamente está asociada con un fenotipo de activación, sino que también, dada la sobrerrepresentación de estas células en la patogénesis de la infección por VIH, pueden estar contribuyendo con alteraciones funcionales, favoreciendo, un

ambiente proinflamatorio, el agotamiento de las células T CD4<sup>+</sup>, ya sea por el efecto citopático directo del virus ya que pueden ser más susceptibles a la infección, o bien por su predisposición a diferenciarse, lo que las haría células con un tiempo de vida corto (71).

En este contexto, es importante evaluar si la molécula CD38 misma está regulando estas funciones inmunes especializadas. Dado que se conocen funciones de las células T reguladas por los segundos mensajeros de CD38 como enzima (45,50,52), es posible que la actividad enzimática de CD38 esté involucrada. De ser así, al inhibir las señales generadas por sus segundos mensajeros, se podrían revertir dichas funciones que caracterizan a las T<sub>CM</sub> CD38<sup>+</sup>, lo cual tendría potencial terapéutico. Para este fin realizamos un experimento piloto, en el cual cultivamos a las células CD38<sup>+</sup> con un antagonista específico de cADPR (8-Br-cADPR), un inhibidor de CD38 (ara-F-NAD<sup>+</sup>), y un quelante de calcio intracelular (BAPTA) y activamos estas células a través del TCR, como se indica en el experimento 5. Las células CD38<sup>-</sup> fueron cultivadas con los productos de catálisis de CD38 (NAADP y cADPR) en presencia y ausencia de BAPTA, tratando de imitar la presencia de CD38. Observamos que NAADP regula de manera positiva la expresión de IL-2 e IFN- $\gamma$ , aumentando su expresión en las células T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup>. Es probable que la principal regulación de estas citocinas sea mediada por el Ca<sup>2+</sup> liberado por principalmente por NAADP. Sorprendentemente observamos que la expresión de Ki67 fue regulada negativamente en las células CD38<sup>+</sup>, al bloquear a cADPR, al inhibir la actividad enzimática de CD38 y al complejar el Ca<sup>2+</sup>. Esto muestra en principio la posibilidad de que las células CD38<sup>-</sup> podrían ser reguladas parácrinamente por las CD38<sup>+</sup> y que los segundos mensajeros de CD38 podrían tener funciones diferentes en distintas poblaciones celulares y en distintos genes.

## 9 Perspectivas

Para evaluar si existe alguna regulación parácrina por parte de las células CD38<sup>+</sup> sobre las células CD38<sup>-</sup> se utilizará el sistema de Transwells (Cornig, Life sciences, California, EUA) cultivado células TCM CD38<sup>+</sup> sobre células CD38<sup>-</sup> en un mismo pozo, pero separadas por una membrana, de tal manera que solo estén en contacto los sobrenadantes. A las células CD38<sup>+</sup> le adicionaremos NAD<sup>+</sup> y NADP y activaremos a las células a través del TCR (condiciones del experimento 5). Después se buscará en los sobrenadantes la presencia de los productos de CD38 cADPR y NAADP. Las células serán recolectadas y se evaluará todo un perfil de expresión de citocinas y receptores de quimiocinas como IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-17, CD40L, CXCR5, CCR5.

Realizaremos experimentos adicionales para evaluar la capacidad proliferativa de las células CD38<sup>-</sup> frente a estímulos homeostáticos.

Hay muchos estudios que comprueban la función de los segundos mensajeros cADPR y NAADP como buenos movilizadores de calcio (52,53,58,77,78), y también hay evidencia de que están involucrados en muchas funciones celulares. Por lo tanto, es factible pensar que la sobreexpresión de CD38 en la inmunopatogénesis de la infección por VIH está favoreciendo la liberación de Ca<sup>2+</sup> intracitoplásmico vía estos segundos mensajeros, y por lo tanto un desequilibrio en las funciones inmunes. Para comprobar esta hipótesis, es necesario realizar una serie de réplicas del experimento anteriormente mencionado.

## 10 Conclusiones

Nuestros resultados sugieren las células  $T_{CM} CD4^+$  que expresan CD38 son células especializadas en realizar funciones efectoras.

Las células  $T_{CM} CD4^+CD38^-$  no responden al estímulo a través del TCR, por lo que pensamos que necesitan otros requerimientos para su proliferación.

CD38 podría no solo indicar un estado de activación en la inmunopatogénesis de la infección por VIH. Dada la sobrerrepresentación de las células  $T_{CM} CD38^+$  en la infección por VIH, se podría esperar un desequilibrio en las funciones inmunes normales de las células  $T_{CM} CD4^+$  en favor de funciones efectoras. .

Estos hallazgos nos sugieren evaluar el potencial de CD38 como ectoenzima para regular las funciones inmunes en las células  $T_{CM}$ . Por lo tanto el modelo experimental diseñado es útil para evaluar esta posibilidad.

## 11 Bibliografía.

1. WHO case definitions of HIV for surveillance and revised clinical staging and immunological classification of HIV-related disease in adults and children. Geneva: World Health Organization; 2007.
2. Coffin JM, Hughes SH, Varmus H. Retroviruses. Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997.
3. Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, Horowitz A, Hurley A, Hogan C, et al. Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *J Exp Med*. 2004 Sep 20;200(6):761–70.
4. Mattapallil JJ, Douek DC, Hill B, Nishimura Y, Martin M, Roederer M. Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection. *Nature*. 2005 Apr 28;434(7037):1093–7.
5. Plaeger SF, Collins BS, Musib R, Deeks SG, Read S, Embry A. Immune Activation in the Pathogenesis of Treated Chronic HIV Disease: A Workshop Summary. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2012 May;28(5):469–77.
6. Levy JA. HIV pathogenesis: knowledge gained after two decades of research. *Adv Dent Res*. 2006;19(1):10–6.
7. Machala L, Cerný R. [Acute HIV infection]. *Casopis Lékařů Českých*. 2004;143(9):584–587; discussion 587–588.
8. Douek DC. Immune activation, HIV persistence, and the cure. *Top Antivir Med*. 2013 Oct;21(4):128–32.
9. Pierson T, McArthur J, Siliciano RF. Reservoirs for HIV-1: mechanisms for viral persistence in the presence of antiviral immune responses and antiretroviral therapy. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:665–708.
10. Biancotto A, Iglehart SJ, Vanpouille C, Condack CE, Lisco A, Ruecker E, et al. HIV-1 induced activation of CD4+ T cells creates new targets for HIV-1 infection in human lymphoid tissue ex vivo. *Blood*. 2008 Jan 15;111(2):699–704.
11. Lawn SD, Butera ST, Folks TM. Contribution of immune activation to the pathogenesis and transmission of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clin Microbiol Rev*. 2001 Oct;14(4):753–777, table of contents.
12. Grossman Z, Meier-Schellersheim M, Paul WE, Picker LJ. Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys. *Nat Med*. 2006 Mar;12(3):289–95.
13. Picker LJ. Immunopathogenesis of acute AIDS virus infection. *Curr Opin Immunol*. 2006 Aug;18(4):399–405.
14. Coker WJ, Jeter A, Schade H, Kang Y. Plasma cell disorders in HIV-infected patients: epidemiology and molecular mechanisms. *Biomark Res*. 2013;1(1):8.

15. Lichtfuss GF, Hoy J, Rajasuriar R, Kramski M, Crowe SM, Lewin SR. Biomarkers of immune dysfunction following combination antiretroviral therapy for HIV infection. *Biomark Med*. 2011 Apr;5(2):171–86.
16. Lenkei R, Bratt G, Holmberg V, Muirhead K, Sandström E. Indicators of T-cell activation: correlation between quantitative CD38 expression and soluble CD8 levels in asymptomatic HIV+ individuals and healthy controls. *Cytometry*. 1998 Oct 1;33(2):115–22.
17. Fahey JL, Taylor JM, Manna B, Nishanian P, Aziz N, Giorgi JV, et al. Prognostic significance of plasma markers of immune activation, HIV viral load and CD4 T-cell measurements. *AIDS Lond Engl*. 1998 Sep 10;12(13):1581–90.
18. Nasi M, Pinti M, Mussini C, Cossarizza A. Persistent inflammation in HIV infection: Established concepts, new perspectives. *Immunol Lett*. 2014 Jan 30;
19. Goovaerts O, Jennes W, Massinga-Loembé M, Ceulemans A, Worodria W, Mayanja-Kizza H, et al. LPS-binding protein and IL-6 mark paradoxical tuberculosis immune reconstitution inflammatory syndrome in HIV patients. *PloS One*. 2013;8(11):e81856.
20. Pantaleo G, Fauci AS. New concepts in the immunopathogenesis of HIV infection. *Annu Rev Immunol*. 1995;13:487–512.
21. Schindler M, Münch J, Kutsch O, Li H, Santiago ML, Bibollet-Ruche F, et al. Nef-mediated suppression of T cell activation was lost in a lentiviral lineage that gave rise to HIV-1. *Cell*. 2006 Jun 16;125(6):1055–67.
22. Sailaja G, Skountzou I, Quan F-S, Compans RW, Kang S-M. Human immunodeficiency virus-like particles activate multiple types of immune cells. *Virology*. 2007 Jun 5;362(2):331–41.
23. Mogensen TH, Melchjorsen J, Larsen CS, Paludan SR. Innate immune recognition and activation during HIV infection. *Retrovirology*. 2010 Jun 22;7:54.
24. Báfica A, Scanga CA, Schito M, Chaussabel D, Sher A. Influence of coinfecting pathogens on HIV expression: evidence for a role of Toll-like receptors. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2004 Jun 15;172(12):7229–34.
25. Fauci AS, Pantaleo G, Stanley S, Weissman D. Immunopathogenic mechanisms of HIV infection. *Ann Intern Med*. 1996 Apr 1;124(7):654–63.
26. Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med*. 2006 Dec;12(12):1365–71.
27. Brenchley JM, Price DA, Douek DC. HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe? *Nat Immunol*. 2006 Mar;7(3):235–9.
28. Sousa AE, Carneiro J, Meier-Schellersheim M, Grossman Z, Victorino RMM. CD4 T cell depletion is linked directly to immune activation in the pathogenesis of HIV-1 and HIV-2 but only indirectly to the viral load. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2002 Sep 15;169(6):3400–6.

29. Lassen K, Han Y, Zhou Y, Siliciano J, Siliciano RF. The multifactorial nature of HIV-1 latency. *Trends Mol Med*. 2004 Nov;10(11):525–31.
30. Douek DC, Brenchley JM, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Okamoto Y, et al. HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells. *Nature*. 2002 May 2;417(6884):95–8.
31. Lichtner M, Marañón C, Vidalain P-O, Azocar O, Hanau D, Lebon P, et al. HIV type 1-infected dendritic cells induce apoptotic death in infected and uninfected primary CD4 T lymphocytes. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2004 Feb;20(2):175–82.
32. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:745–63.
33. Masopust D, Vezys V, Marzo AL, Lefrançois L. Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science*. 2001 Mar 23;291(5512):2413–7.
34. Benito JM, López M, Lozano S, Ballesteros C, Martínez P, González-Lahoz J, et al. Differential upregulation of CD38 on different T-cell subsets may influence the ability to reconstitute CD4+ T cells under successful highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999. 2005 Apr 1;38(4):373–81.
35. Watt FM, Hogan BL. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science*. 2000 Feb 25;287(5457):1427–30.
36. Schluns KS, Lefrançois L. Cytokine control of memory T-cell development and survival. *Nat Rev Immunol*. 2003 Apr;3(4):269–79.
37. Picker LJ, Hagen SI, Lum R, Reed-Inderbitzin EF, Daly LM, Sylwester AW, et al. Insufficient production and tissue delivery of CD4+ memory T cells in rapidly progressive simian immunodeficiency virus infection. *J Exp Med*. 2004 Nov 15;200(10):1299–314.
38. Douek DC, Picker LJ, Koup RA. T cell dynamics in HIV-1 infection. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:265–304.
39. Karim R, Mack WJ, Stiller T, Operskalski E, Frederick T, Landay A, et al. Association of HIV clinical disease progression with profiles of early immune activation: results from a cluster analysis approach. *AIDS Lond Engl*. 2013 Jun 1;27(9):1473–81.
40. Liu Z, Cumberland WG, Hultin LE, Prince HE, Detels R, Giorgi JV. Elevated CD38 antigen expression on CD8+ T cells is a stronger marker for the risk of chronic HIV disease progression to AIDS and death in the Multicenter AIDS Cohort Study than CD4+ cell count, soluble immune activation markers, or combinations of HLA-DR and CD38 expression. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirology Off Publ Int Retrovirology Assoc*. 1997 Oct 1;16(2):83–92.
41. López M, Soriano V, Peris-Pertusa A, Rallón N, Restrepo C, Benito JM. Elite controllers display higher activation on central memory CD8 T cells than HIV patients successfully on HAART. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2011 Feb;27(2):157–65.

42. Lund FE. Signaling properties of CD38 in the mouse immune system: enzyme-dependent and -independent roles in immunity. *Mol Med Camb Mass*. 2006 Dec;12(11-12):328–33.
43. Schuber F, Lund FE. Structure and enzymology of ADP-ribosyl cyclases: conserved enzymes that produce multiple calcium mobilizing metabolites. *Curr Mol Med*. 2004 May;4(3):249–61.
44. Graeff R, Liu Q, Kriksunov IA, Hao Q, Lee HC. Acidic Residues at the Active Sites of CD38 and ADP-ribosyl Cyclase Determine Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate (NAADP) Synthesis and Hydrolysis Activities. *J Biol Chem*. 2006 Sep 29;281(39):28951–7.
45. Ferrero E, Malavasi F. Human CD38, a leukocyte receptor and ectoenzyme, is a member of a novel eukaryotic gene family of nicotinamide adenine dinucleotide+-converting enzymes: extensive structural homology with the genes for murine bone marrow stromal cell antigen 1 and aplysian ADP-ribosyl cyclase. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1997 Oct 15;159(8):3858–65.
46. Alessio M, Roggero S, Funaro A, De Monte LB, Peruzzi L, Geuna M, et al. CD38 molecule: structural and biochemical analysis on human T lymphocytes, thymocytes, and plasma cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1990 Aug 1;145(3):878–84.
47. Malavasi F, Funaro A, Alessio M, DeMonte LB, Ausiello CM, Dianzani U, et al. CD38: a multi-lineage cell activation molecule with a split personality. *Int J Clin Lab Res*. 1992;22(2):73–80.
48. Mehta K, Shahid U, Malavasi F. Human CD38, a cell-surface protein with multiple functions. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 1996 Oct;10(12):1408–17.
49. Howard M, Grimaldi JC, Bazan JF, Lund FE, Santos-Argumedo L, Parkhouse RM, et al. Formation and hydrolysis of cyclic ADP-ribose catalyzed by lymphocyte antigen CD38. *Science*. 1993 Nov 12;262(5136):1056–9.
50. Schmid F, Bruhn S, Weber K, Mittrücker H-W, Guse AH. CD38: a NAADP degrading enzyme. *FEBS Lett*. 2011 Nov 16;585(22):3544–8.
51. Chini EN, Chini CCS, Kato I, Takasawa S, Okamoto H. CD38 is the major enzyme responsible for synthesis of nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate in mammalian tissues. *Biochem J*. 2002 Feb 15;362(Pt 1):125–30.
52. De Flora A, Zocchi E, Guida L, Franco L, Bruzzone S. Autocrine and paracrine calcium signaling by the CD38/NAD+/cyclic ADP-ribose system. *Ann N Y Acad Sci*. 2004 Dec;1028:176–91.
53. Lee HC. Cyclic ADP-ribose and nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) as messengers for calcium mobilization. *J Biol Chem*. 2012 Sep 14;287(38):31633–40.
54. Guse AH, da Silva CP, Berg I, Skapenko AL, Weber K, Heyer P, et al. Regulation of calcium signalling in T lymphocytes by the second messenger cyclic ADP-ribose. *Nature*. 1999 Mar 4;398(6722):70–3.
55. Boubali S, Liopeta K, Virgilio L, Thyphronitis G, Mavrothalassitis G, Dimitracopoulos G, et al. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II regulates IL-10 production by human T

- lymphocytes: a distinct target in the calcium dependent pathway. *Mol Immunol*. 2012 Sep;52(2):51–60.
56. Partida-Sanchez S, Gasser A, Fliegert R, Siebrands CC, Dammermann W, Shi G, et al. Chemotaxis of mouse bone marrow neutrophils and dendritic cells is controlled by adp-ribose, the major product generated by the CD38 enzyme reaction. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2007 Dec 1;179(11):7827–39.
  57. Magnone M, Bauer I, Poggi A, Mannino E, Sturla L, Brini M, et al. NAD<sup>+</sup> levels control Ca<sup>2+</sup> store replenishment and mitogen-induced increase of cytosolic Ca<sup>2+</sup> by Cyclic ADP-ribose-dependent TRPM2 channel gating in human T lymphocytes. *J Biol Chem*. 2012 Jun 15;287(25):21067–81.
  58. Dammermann W, Zhang B, Nebel M, Cordiglieri C, Odoardi F, Kirchberger T, et al. NAADP-mediated Ca<sup>2+</sup> signaling via type 1 ryanodine receptor in T cells revealed by a synthetic NAADP antagonist. *Proc Natl Acad Sci*. 2009 Jun 30;106(26):10678–83.
  59. Davis LC, Morgan AJ, Chen J-L, Snead CM, Bloor-Young D, Shenderov E, et al. NAADP activates two-pore channels on T cell cytolytic granules to stimulate exocytosis and killing. *Curr Biol CB*. 2012 Dec 18;22(24):2331–7.
  60. Cordiglieri C, Odoardi F, Zhang B, Nebel M, Kawakami N, Klinkert WEF, et al. Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate-mediated calcium signalling in effector T cells regulates autoimmunity of the central nervous system. *Brain J Neurol*. 2010 Jul;133(Pt 7):1930–43.
  61. Partida-Sánchez S, Cockayne DA, Monard S, Jacobson EL, Oppenheimer N, Garvy B, et al. Cyclic ADP-ribose production by CD38 regulates intracellular calcium release, extracellular calcium influx and chemotaxis in neutrophils and is required for bacterial clearance in vivo. *Nat Med*. 2001 Nov;7(11):1209–16.
  62. Espinosa E, Ormsby CE, Reyes-Terán G, Asaad R, Sieg SF, Lederman MM. Dissociation of CD154 and cytokine expression patterns in CD38<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> memory T cells in chronic HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr 1999*. 2010 Dec;55(4):439–45.
  63. Olvera-García G, Espinosa E, Sieg SF, Lederman MM. Cytomegalovirus-specific responses of CD38<sup>+</sup> memory T cells are skewed towards IFN- $\gamma$  and dissociated from CD154 in HIV-1 infection. *AIDS Lond Engl*. 2014 Jan 28;28(3):311–6.
  64. Kramer E, Herman O, Frand J, Leibou L, Schreiber L, Vaknine H. Ki67 as a biologic marker of basal cell carcinoma: a retrospective study. *Isr Med Assoc J IMAJ*. 2014 Apr;16(4):229–32.
  65. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*. 2008;3(6):1101–8.
  66. Messi M, Giacchetto I, Nagata K, Lanzavecchia A, Natoli G, Sallusto F. Memory and flexibility of cytokine gene expression as separable properties of human T(H)1 and T(H)2 lymphocytes. *Nat Immunol*. 2003 Jan;4(1):78–86.

67. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:485–517.
68. Martin JC, Baeten DL, Josien R. Emerging role of IL-17 and Th17 cells in systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol Orlando Fla*. 2014 May 22;
69. Le Saout C, Lane HC, Catalfamo M. The Role of Cytokines in the Pathogenesis and treatment of HIV Infection. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2012;23(0):207–14.
70. El Hed A, Khaitan A, Kozhaya L, Manel N, Daskalakis D, Borkowsky W, et al. Susceptibility of human Th17 cells to human immunodeficiency virus and their perturbation during infection. *J Infect Dis*. 2010 Mar 15;201(6):843–54.
71. Farber DL, Yudanin NA, Restifo NP. Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. *Nat Rev Immunol*. 2014 Jan;14(1):24–35.
72. Moser B, Schaerli P, Loetscher P. CXCR5(+) T cells: follicular homing takes center stage in T-helper-cell responses. *Trends Immunol*. 2002 May;23(5):250–4.
73. Chevalier N, Jarrossay D, Ho E, Avery DT, Ma CS, Yu D, et al. CXCR5 expressing human central memory CD4 T cells and their relevance for humoral immune responses. *J Immunol Baltim Md* 1950. 2011 May 15;186(10):5556–68.
74. Rivino L, Messi M, Jarrossay D, Lanzavecchia A, Sallusto F, Geginat J. Chemokine receptor expression identifies Pre-T helper (Th)1, Pre-Th2, and nonpolarized cells among human CD4+ central memory T cells. *J Exp Med*. 2004 Sep 20;200(6):725–35.
75. Appay V, van Lier RAW, Sallusto F, Roederer M. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol*. 2008 Nov;73(11):975–83.
76. Minami Y, Kono T, Miyazaki T, Taniguchi T. The IL-2 receptor complex: its structure, function, and target genes. *Annu Rev Immunol*. 1993;11:245–68.
77. Berg I, Potter BV, Mayr GW, Guse AH. Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP(+)) is an essential regulator of T-lymphocyte Ca(2+)-signaling. *J Cell Biol*. 2000 Aug 7;150(3):581–8.
78. Galione A, Ruas M. NAADP receptors. *Cell Calcium*. 2005 Oct;38(3-4):273–80.