



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA  
BIOLOGIA EXPERIMENTAL

**POLARIZACIÓN DE LAS CÉLULAS T CD4<sup>+</sup> DE MEMORIA CENTRALES EN EL  
AVANCE DE LA ENFERMEDAD POR VIH**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**MAURA DANIELA WÜRSCH MOLINA**

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

**COMITÉ TUTOR:**

**DRA. MARIA ISABEL SADA OVALLE**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**DRA. YVONNE ROSENSTEIN AZOULAY**  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

**MÉXICO, D.F. OCTUBRE, 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.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE MEDICINA  
BIOLOGIA EXPERIMENTAL

**POLARIZACIÓN DE LAS CÉLULAS T CD4<sup>+</sup> DE MEMORIA CENTRALES EN EL AVANCE  
DE LA ENFERMEDAD POR VIH**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**MAURA DANIELA WÜRSCH MOLINA**

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

COMITÉ TUTOR:

DRA. MARIA ISABEL SADA OVALLE  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

DRA. YVONNE ROSENSTEIN AZOULAY  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

MÉXICO, D.F. OCTUBRE, 2015

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

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 03 de agosto de 2015, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **WÜRSCH MOLINA MAURA DANIELA** con número de cuenta **514012537**, con la tesis titulada **"POLARIZACIÓN DE LAS CÉLULAS T CD4+ DE MEMORIA CENTRALES EN EL AVANCE DE LA ENFERMEDAD POR VIH"**, realizada bajo la dirección del **DR. HÉCTOR ENRIQUE ESPINOSA ARCINIEGA**:

Presidente: DR. LUIS GUILLERMO LLORENTE PETERS  
Vocal: DRA. LOURDES ANDREA ARRIAGA PIZANO  
Secretario: DRA. MARÍA ISABEL SADA OVALLE  
Suplente: DR. SANTIAGO PÉREZ PATRIGEON  
Suplente: DRA. YVONNE ROSENSTEIN AZOULAY

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

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 01 de octubre de 2015



*M. del Coro Arizmendi*  
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA  
COORDINADORA DEL PROGRAMA

## **Agradecimientos**

Al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por la gran versatilidad de áreas y proyectos que alberga.

Al programa de becas otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) que apoya a los estudiantes de este programa de posgrado.

Al tutor principal de esta tesis, el Doctor Héctor Enrique Espinosa Arciniega que siempre permitió la generación de nuevas ideas en este trabajo y que apoyó totalmente la formación científica de sus alumnos.

A los miembros del Comité Tutor, la Dra. María Isabel Sada Ovalle y la Dra. Yvonne Rosenstein Azoulay que siempre participaron de forma dedicada e interesada a la revisión de mi trabajo y a mi formación académica.

## **Dedicatoria**

A mis padres, Cecilia Molina y Stefan Würsch que siempre han apoyado y facilitado el cumplimiento de mis planes y que me dieron la mejor formación para lograr encontrar mi camino.

A mi hermana Silvana Würsch Molina por ser tan diferente a mí y de esta manera permitir una retroalimentación que nos enriquece a ambas.

A Fernando Fuentes Torres por motivarme siempre y ser mi compañero. Porque todo lo que planeamos es mucho más fácil al estar juntos.

Que gusto y placer tenerlo en mi vida.

# Índice

Lista de figuras y cuadros	i
Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
VIH y SIDA	3
Linfocitos T CD4 <sup>+</sup>	3
Disfunciones asociadas a la pérdida de células T CD4 <sup>+</sup> en la infección por VIH	4
Activación crónica	5
Marcadores de diferenciación celular	7
Hipótesis	9
Objetivos	9
General	9
Específicos	9
Metodología	10
Resultados	15
Discusión	25
Conclusión	29
Literatura Citada	30



## Lista de figuras y cuadros

Tabla 1. Panel de anticuerpos	11
Figura 1. Estrategia de gating	11
Tabla 2. Fluorocromos y concentraciones para los controles	12
Figura 2. Niveles de análisis en pruebas multivariadas	14
Tabla 3. Características de los sujetos incluidos en este estudio	15
Figura 3. Código de colores	16
Figura 4. Composición de los subconjuntos de células T <sub>CM</sub> CD4 <sup>+</sup>	16
Figura 5. Diferencias del MFI de CCR7	17
Figura 6. Frecuencias de los subconjuntos bajo condiciones de estímulo	18
Tabla 4. Clústeres significativos	20
Figura 7. Correlaciones univariadas con la cuenta de células T CD4 <sup>+</sup>	21
Figura 8. Expresión de CD38 y Ki67 entre los subconjuntos de células T <sub>CM</sub>	23
Figura 9. Correlación entre el porcentaje de células “CXCR5+” y la expresión de CD38 y Ki67	24

## Resumen

La patogénesis de la enfermedad ocasionada por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) conduce a una disminución de la cantidad de células T CD4<sup>+</sup> en sangre, causando el desarrollo del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) por mecanismos indirectos e independientes del efecto citopático causado por el ciclo de replicación viral. El incremento en la activación de las células T es considerado uno de estos mecanismos.

En la infección por VIH, la activación celular se encuentra incrementada y ha sido identificada como un fuerte predictor del progreso de la infección, descrito como la disminución de la cantidad de células T CD4<sup>+</sup> en sangre y una progresión más rápida a SIDA, además de ser predictor para varias consecuencias patológicas de la infección. Entre los marcadores de activación, la expresión de la molécula CD38 ha sido ampliamente caracterizada como predictor de la progresión de la enfermedad, aunque su participación en la patogénesis por VIH no se ha demostrado aún. Existen otros marcadores de activación que también se han encontrado incrementados en la infección, como Ki67, que se ha usado para medir proliferación, mecanismo central de la activación celular. El valor predictivo de estos marcadores puede diferir dependiendo de en qué subpoblaciones de células T es expresada, implicando que poseen distintas funciones dentro de la activación celular.

Las células T de memoria centrales (T<sub>CM</sub>, CCR7<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup>) tienen gran capacidad para proliferar y de autorrenovación, y bajo condiciones de estimulación se diferencian en células T de memoria efectora (T<sub>EM</sub>, CCR7<sup>-</sup> CD45RO<sup>+</sup>). Por estas características, las células T<sub>CM</sub> son relevantes en los estudios que evalúan la patogénesis del VIH.

Este estudio tuvo como objetivo realizar un análisis de las distintas subpoblaciones de células T CD4<sup>+</sup>, y los subconjuntos de cada subpoblación, principalmente de las células T<sub>CM</sub>, comparando sus proporciones y la frecuencia con la que expresan las moléculas CD38 y Ki67, con el fin de identificar si la infección por VIH afecta de manera distinta a estos subconjuntos, pudiendo sugerir un mecanismo de alteración de la homeostasis del conjunto de células T<sub>CM</sub> circulantes.

En este estudio describimos como los distintos subconjuntos de células T<sub>CM</sub> pueden estar alterados en la infección por VIH, y como estas alteraciones están asociadas a la expresión de CD38. La expresión de esta molécula está asociada a la pérdida de un subconjunto con capacidades de autorregeneración además de que podría favorecer la infección de otros subconjuntos de células T<sub>CM</sub>. El estudio de los subconjuntos de células T<sub>CM</sub> es relevante porque puede ayudar a comprender cuales células son más susceptibles a la infección por VIH.

## Abstract

The pathogenesis of the disease caused by the human immunodeficiency virus (HIV) leads to a reduction of the CD4<sup>+</sup> T cell blood counts, causing the development of the acquired immune deficiency syndrome (AIDS) by indirect mechanisms moreover the cytopathic effect of the virus replication cycle. The increased T cell activation is considered one of these mechanisms.

In the HIV infection, the cell activation is increased and it has been identified as a strong disease progression predictor, the disease progression is described as a reduction of CD4<sup>+</sup> T cell counts and a fast development of AIDS, besides been the predictor of several pathological consequences. Among activation markers, CD38 expression has been strongly characterized as disease progression predictor, although, its entry in HIV pathogenesis has not been found yet. There are other incremented activation markers, like Ki67, that is used for proliferation measure, the central mechanism of cell activation. The predictive value of these markers can change according in which T cell subsets are expressed, involving that these markers possess distinct functions.

The central memory T cells (T<sub>CM</sub> CCR7<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup>) have a great proliferation capacity and self-renewing capacity, under stimulation, they differentiate into effector memory T cells (T<sub>EM</sub> CCR7<sup>-</sup> CD45RO<sup>+</sup>). For this features, these cells are relevant in studies about HIV pathogenesis.

The aim of this study was to perform a CD4<sup>+</sup> T cell subsets analysis, mainly the T<sub>CM</sub> subpopulation, by comparing their frequencies and their CD38 and Ki67 expression, with the goal of identify if the HIV infection affects in a distinctive way the T<sub>CM</sub> subsets, and in this way, suggest a mechanism of homeostasis alteration in this subpopulation.

In this study we described how the distinct T<sub>CM</sub> subsets can be disrupted in HIV infection, and how this disruptions are associated with CD38 expression. CD38 is associated to the loss of a subset with self-renewing capacities besides that its expression could promote the infection on other T<sub>CM</sub> subsets. The study in T<sub>CM</sub> subsets is relevant because it could help to comprehend which cells are more vulnerable to HIV infection.

# Introducción

## VIH y SIDA

El virus de inmunodeficiencia humana (VIH) es un *lentivirus* que pertenece a la familia *Retroviridae*. infecta a las células del sistema inmune, principalmente a los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, destruyendo o alterando su función (1). Esta infección genera un deterioro progresivo del sistema inmune ocasionando una inmunodeficiencia. El síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) es la etapa final de esta infección, donde la inmunodeficiencia generada ocasiona el paso de infecciones oportunistas (2). La relevancia de esta infección radica en que aún no hay cura y sin un tratamiento antirretroviral oportuno la tasa de sobrevivencia es muy baja (1, 2). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, 36.9 millones de personas se encontraban infectadas al término del año 2014, teniendo alrededor de 2 millones de casos nuevos por año y 1.2 millones de personas fallecidas por causas asociadas a la infección (2).

La patogénesis de esta infección debe de involucrar varios mecanismos indirectos que favorezcan a la muerte celular, independientes del efecto citopático ocasionado por el ciclo de replicación viral (3). Por lo que a más de 30 años del surgimiento de la epidemia por VIH, no se comprenden satisfactoriamente los procesos que dan lugar a la pérdida de células T CD4<sup>+</sup>, la cual caracteriza a esta infección y conduce al desarrollo del SIDA (4). A pesar de que la pérdida de la frecuencia de células T CD4<sup>+</sup> correlaciona con la carga viral, esta solo explica del 3% al 9% de la variabilidad de la pérdida (5). Durante la infección, la tasa de pérdida de células T CD4<sup>+</sup> es muy variable dependiendo de la fase (6), al igual que la carga viral (7), pero se ha visto que solo una pequeña cantidad de células están infectadas o contienen ADN proviral (1/100,00 y 1/10,000) (8). Esto indica que las tasas de infección y replicación viral son bajas comparadas con la pérdida de células T CD4<sup>+</sup> que se observa en la infección (8).

## Linfocitos T CD4<sup>+</sup>

El blanco principal del VIH son los linfocitos T CD4<sup>+</sup> ya que la molécula CD4 es el receptor de entrada (1). esta población celular es heterogénea, y está compuesta por varias subpoblaciones con distintas funciones de acuerdo a su estado de diferenciación causado por la estimulación (9). Las células Naive son células que no han sido estimuladas por un antígeno específico, al ser estimuladas, se producirán células de dos tipos principalmente, las células de memoria centrales (T<sub>CM</sub>, CCR7<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup>); que se alojan en órganos linfoides secundarios y sangre, y las células de memoria efectoras (T<sub>EM</sub>, CCR7<sup>-</sup> CD45RO<sup>+</sup>) que se alojan en sangre y en tejidos (9, 10).

Las células T<sub>CM</sub> no producen citocinas proinflamatorias y son importantes para mantener la frecuencia de células totales, ya que son productoras de IL-2 y tienen una mayor respuesta proliferativa ante estímulos antigénicos y homeostáticos que las células T<sub>EM</sub>, además poseen una vida media prolongada (9–11). Estas características causan que las células T<sub>CM</sub> que sean infectadas acaben siendo reservorios virales (12), sin embargo, podemos decir que estas células son relevantes para los estudios acerca de la patogénesis del VIH ya que a pesar de que si pueden ser infectadas por el virus (~15% en modelos animales) (13–15), su capacidad de proliferación y mantenimiento de la homeostasis continúa presente en la etapa crónica de la enfermedad (13).

### **Disfunciones celulares asociadas a la pérdida de células T CD4<sup>+</sup> en la infección por VIH**

Al identificar que la causa de la disminución de las células T CD4<sup>+</sup> en la infección por VIH se debe tanto a mecanismos directos como indirectos, se han encontrado varias disfunciones celulares que podrían estar asociadas. Algunos de estos mecanismos son:

- Arresto del ciclo celular. Las células T<sub>CM</sub> de pacientes VIH<sup>+</sup> al estar en fase S del ciclo celular son más susceptibles a la muerte celular por apoptosis y tienen limitaciones para completar el ciclo celular (16). Es claro que existe un desbalance en la producción/destrucción de células T CD4<sup>+</sup> durante la infección. Frente a esto, se han identificado a las proteínas Vif y Vpr como causantes del arresto del ciclo celular en la fase G2 en células infectadas (17, 18), pudiendo ocurrir esto a través de mecanismos de ubiquitinación y degradación de proteínas con acción antirretroviral como APOBEC3G (19), promoviendo la estabilidad y bloqueando la degradación del inhibidor del ciclo celular, TP53 (20). También se ha documentado que en células T CD4<sup>+</sup> de pacientes VIH<sup>+</sup>, la expresión de Ki67, molécula presente en todas las fases del ciclo celular (21), no solamente identifica a proliferación celular, sino que podría estar marcando a células en las cuales hay arresto celular en fase G1 del ciclo; además, las células Ki67<sup>+</sup> son productoras de la proteína viral p24 (22).
- Incremento de muerte celular de células no infectadas. Este proceso se ha visto de forma independiente de la vía Fas-FasL (23). Se ha propuesto otro proceso de muerte celular en modelos *in vitro*, la piroptosis, que es un proceso caracterizado por la presencia de caspasa 1 en vez de caspasa 3 (24, 25). Los factores proinflamatorios generados en la piroptosis podrían inducir muerte celular generalizada; al liberarlos estarían induciendo la muerte de otras células.

- Se ha documentado que en la infección por VIH se encuentra incrementada la concentración sérica de Interleucina 7, citocina importante para la proliferación y diferenciación de linfocitos T (26). Sin embargo, la expresión del receptor (IL-7R) está reducida en células  $T_{CM}$  (27, 28). Este fenómeno parece participar como un mecanismo de compensación por la linfopenia de células T  $CD4^+$  presente (27, 29, 30). El patrón de expresión del receptor de IL-7 condiciona a las células a no recibir el estímulo necesario para mantener la homeostasis. La expresión de IL-7R en células  $T_{CM} CD4^+$  de pacientes  $VIH^+$  correlaciona de manera negativa con la expresión de moléculas asociadas a la activación como CD38 y HLADR (28). Como la expresión de marcadores de activación crónica está asociada al progreso de la infección, se podría esperar que la respuesta deficiente a IL-7 empeore con el avance de la infección. Se ha evidenciado en sujetos sanos que las células  $T_{CM}$  que no expresan IL-7R poseen una expresión menor de CCR7 y mayor tendencia a sufrir apoptosis (31). Es posible que la activación celular incrementada que se encuentra en la infección por VIH pudiera condicionar a que este mecanismo de homeostasis esté alterado.

A pesar de estas deficiencias, la frecuencia de las células T  $CD4^+$  puede mantenerse durar varios años hasta la aparición de la fase de SIDA. Otro fenómeno consistente entre los pacientes con VIH es la activación crónica incrementada (32–34), este fenómeno siempre se ha encontrado asociado a la progresión de la enfermedad.

En modelos animales, la infección por el Virus de la Inmunodeficiencia de Simios (SIV) en su hospedero natural, el mangabey ahumado (*Cercocebus atys*), no desarrolla una inmunodeficiencia a pesar de la alta tasa de replicación viral (35). En contraste, la infección en Macacos *Rhesus*, el SIV sí genera una inmunodeficiencia, muy parecida a la generada por la infección por el VIH en humanos. Se han identificado varias diferencias entre la infección por el SIV en mangabeys y en Macacos *Rhesus*, entre las que destaca la baja expresión de marcadores de activación en células T en el hospedero natural (35–39).

### **Activación crónica**

La alta expresión de moléculas asociadas a la activación inmune presenta una consistente correlación con el avance de la infección, caracterizada por la pérdida de células T  $CD4^+$  y un rápido avance a la fase de SIDA (34, 40–47). La activación de células T a la que se refieren diversos estudios implica varios procesos, como la proliferación, la producción de citocinas y el incremento del metabolismo (41), todos estos mecanismos son caracterizados por la expresión de moléculas específicas conocidas como marcadores de activación. La asociación estadística que existe entre la expresión de estos marcadores no es indicadora de causalidad, sin embargo,

es razonable pensar que puedan estar interviniendo dado que su expresión incrementada distingue a individuos en los que la enfermedad por VIH avanzará rápidamente. Cada marcador participa en distintos procesos biológicos, algunos de ellos asociados, pero esto dificulta proponer mecanismos concretos en la inmunopatogénesis, por lo cual es necesario comprender la contribución de cada marcador.

Entre estos marcadores, la molécula CD38 ha sido ampliamente caracterizada como un predictor de progresión de la enfermedad (42, 47, 48). La alta expresión de este marcador durante la patogénesis del VIH también es un correlato de varias consecuencias patológicas asociadas a la infección, tales como disfunciones del endotelio vascular que pueden llegar a causar arterosclerosis, a pesar del tratamiento antirretroviral (49–51). Así mismo, el nivel alto de expresión de CD38 está asociado a una respuesta pobre al tratamiento antirretroviral, donde la recuperación de la frecuencia de las células T CD4<sup>+</sup> no es tan efectiva como en los pacientes en los que la expresión de CD38 disminuye en respuesta al tratamiento (34), adicionalmente, la alta expresión de CD38 se asocia con el desarrollo del Síndrome Inflamatorio por Reconstitución Inmune (SIRI) (52). En los estudios enfocados al desarrollo de potenciales vacunas, la expresión de CD38 ha sido identificada como una respuesta indeseable (53). Esta molécula parece ser importante ya que además de su consistente asociación con el progreso de la infección, también está implicada en otras alteraciones patológicas presentes en la infección por VIH.

Sin embargo la función de CD38 dentro del proceso de patogénesis del VIH no se conoce. Se sabe que es una ectoenzima expresada en varios tipos celulares. Sus funciones son varias. Como enzima participa en la regulación de los niveles de calcio intracelular y en la producción de nicotinamida (NAM), ADP-ribosa cíclica (cADPR). También se le han atribuido funciones relacionadas a la adhesión y migración (54–56).

Existen otros marcadores de activación como Ki67, cuya expresión también se ha encontrado incrementada la infección por VIH y que indican que una célula se encuentra en ciclo celular (21, 47, 57). La expresión alta de Ki67 correlaciona con el perfil de expresión de varios marcadores de activación independientes de la proliferación, como HLA-DR y CD69, pero no siempre correlaciona con la expresión de CD38 (58). El valor predictivo de estos marcadores puede diferir dependiendo de la subpoblación de células T que lo expresa, implicando que poseen distintos roles dentro de la activación celular (47, 57–59). Esto podría indicar que los marcadores de activación se asocian a la progresión de la infección en forma independiente, probablemente por contribuir de diferente manera a la progresión de la infección.

Durante de la infección por VIH se ha documentado que las células  $T_{CM}$  que expresan CD38 tienen una funcionalidad diferente a las que no lo expresan. Las células  $T_{CD38^+}$  presentan una menor expresión de CD40L (60, 61), que es una molécula importante para la coestimulación con las células presentadoras de antígeno. También se ha encontrado que éstas células, al ser estimuladas producen mayores cantidades de IFN- $\gamma$  comparando con las células  $CD38^-$  (61). La producción de IFN- $\gamma$  no es característica principal de las células  $T_{CM}$ , pero ha sido reportado que las células  $T_{CM}$  que lo producen tienen menor capacidad de proliferar y son más susceptibles a la apoptosis (31).

### **Marcadores de diferenciación celular**

La población de células  $T_{CM}$  es heterogénea y se han identificado subconjuntos celulares que cuentan con un fenotipo y funcionalidad diferentes que podría representar poblaciones pre-polarizadas hacia alguna especialización funcional específica (62, 63). La pérdida de la expresión de la molécula CCR7 les da la capacidad de migrar a sitios efectoros (9). De acuerdo con esto, se ha visto en modelos *in vitro* que las células que expresan el receptor de quimiocinas CXCR5 al ser estimuladas mantienen la expresión de CCR7 y proliferan sin diferenciarse, lo que implicaría la autorrenovación celular *in vivo*. En contraste, las células que ya no expresan CXCR5 al ser estimuladas pierden fácilmente la expresión de CCR7, además de que producen citocinas como IFN- $\gamma$  e IL-4 (62–64).

Estas subpoblaciones de células  $T_{CM}$  son caracterizadas de acuerdo a la expresión de los receptores de quimiocinas CXCR3, CCR4 y CXCR5. Cuatro de ellas se consideran de importancia:

- Las células  $T_{CM} CXCR5^+ CXCR3^- CCR4^-$  muestran una gran capacidad para proliferar *in vitro* sin diferenciarse al ser estimulada con citocinas homeostáticas o a través del TCR. Además, algunas de estas células tienen la capacidad de funcionar semejante a una célula T *folicular helper* ( $T_{FH}$ ) cooperando con células B en folículos (65, 66), aunque no forman parte del conjunto de células  $T_{FH}$  ya que estas células no expresan CCR7 y se alojan en folículos (67, 68), pero la expresión de CXCR5 les confiere la capacidad de interactuar con células B por medio de la quimiocina CXCL13 (69, 70), este marcador, al igual que la molécula CCR7, se mantiene después de la estimulación (62).
- Las células  $T_{CM} CXCR5^- CXCR3^+ CCR4^-$ , al ser estimuladas, se diferencian a células  $T_{EM}$  polarizadas a funciones tipo Th1, como la producción de IFN- $\gamma$  (62).
- Las células  $T_{CM} CXCR5^- CXCR3^- CCR4^+$  se diferencian a células  $T_{EM}$  productoras de IL-4 (62).



- Por último, las células  $T_{CM} CXCR5^- CXCR3^- CCR4^-$ , se consideran como comprometidas a diferenciarse a  $T_{EM}$  al ser estimuladas, pero sin polarización intrínseca; es decir, serían más sensibles a la influencia del medio para la determinación de su polarización funcional (62, 71).

Las células  $T_{CM}$  que ya no expresan en su superficie CXCR5, son las que expresan menos intensidad media de fluorescencia (MFI) de la molécula de CCR7 (72), y al ser estimuladas pierden su expresión por completo. Esta proteína participa en el control de la migración de las células de los ganglios linfáticos a sitios efectores lo que las caracterizaría como células en una etapa más diferenciada ( $T_{EM}$ ) que las células  $T_{CM}$  que expresan CXCR5 y mantienen su expresión de CCR7 (62, 72).

En función de lo descrito previamente, proponemos que la molécula CD38 se asocia al progreso de la enfermedad por VIH de manera independiente de otros procesos característicos de la activación, como la entrada a ciclo celular. Esta molécula podría estar participando en la pérdida y disfunción de células  $T_{CM}$  de pacientes  $VIH^+$ , lo cual se vería reflejado de forma diferencial en cada subconjunto de células  $T_{CM}$  ya que es una población muy heterogénea.

## Hipótesis

- En la patogénesis de la infección por VIH, la alta expresión de la molécula CD38 en las células T CD4<sup>+</sup> polarizará a los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de memoria centrales hacia subconjuntos con fenotipos comprometidos a diferenciarse en células efectoras, y disminuirán los subconjuntos con una función autorrenovadora. Esta polarización podría ser la causa de la incapacidad para recuperar la frecuencia total de células T CD4<sup>+</sup> en sangre, en pacientes VIH<sup>+</sup>.

## Objetivos

### *Objetivo general*

- Identificar de qué forma los subconjuntos de células T CD4<sup>+</sup> de memoria centrales de pacientes VIH<sup>+</sup> están afectados en la infección por VIH tanto en proporción, en la expresión de marcadores de activación y en su capacidad de respuesta a un estímulo mediado por el receptor de células T.

### *Objetivos específicos*

- Identificar los subconjuntos de células T CD4<sup>+</sup> de memoria centrales de acuerdo a su patrón de expresión de receptores de quimiocinas (CXCR3, CXCR5 y CCR4) en pacientes VIH<sup>+</sup> y donadores sanos y comparar sus porcentajes en ambos grupos de sujetos con el fin de definir si las proporciones de los subconjuntos están sobreexpresadas o subexpresadas en los pacientes.
- Comparar el porcentaje de expresión de CD38 y Ki67 en los distintos subconjuntos de células T CD4<sup>+</sup> de memoria centrales, al igual que en los subconjuntos de memoria efectoras entre pacientes y controles.
- identificar los grupos de variables asociados a la infección y a la pérdida de células T CD4<sup>+</sup> circulantes en pacientes VIH<sup>+</sup> por medio de un análisis de componentes principales y *clustering*.

## Metodología

### *Sujetos de estudio*

En este estudio fueron reclutados 11 pacientes VIH<sup>+</sup> y 11 donadores sanos VIH<sup>-</sup>. Los pacientes fueron reclutados en la consulta externa del Departamento de Infectología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Se obtuvo consentimiento informado de todos los participantes, aprobado por el comité de ética del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán y por el comité de ética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas (No. De registro: B17-10). Las características de los sujetos de estudio se encuentran en la tabla 3 en la sección de resultados. Ningún paciente presentaba infecciones oportunistas ni estaba recibiendo fármacos antirretrovirales o inmunorreguladores.

### *Obtención de células mononucleares de sangre periférica*

Se obtuvieron muestras de 60 mL de sangre periférica por punción venosa, y a partir de estas, las células mononucleares (CMN) fueron separadas por sedimentación en ficoll (Lymphoprep, Axis-Shield PoC AS) inmediatamente después de su obtención. Estas fueron lavadas por 15 minutos a temperatura ambiente y 2000 rpm y resuspendidas en medio RPMI 1640 (Lonza) adicionado con 10 U/mL de penicilina, estreptomina, L-glutamina (los 3 de Gibco) y 10% de suero bovino fetal inactivado (Lonza).

### *Inmunofenotipificación ex vivo*

Las células provenientes de pacientes VIH<sup>+</sup> y de donadores sanos fueron inmediatamente fenotipificadas *ex vivo* con los anticuerpos listados en la tabla 1 (la concentración fue pre-titulada). Se incubaron por 30 minutos y después se lavaron con PBS (Lonza). Posteriormente fueron fijadas, resuspendiéndolas 30 minutos con 500 µL de paraformaldehído al 4% (JK Baker) en la oscuridad. Se permeabilizaron lavándolas dos veces con Perm Wash Buffer (BioLegend), y después se incubaron con 20 µL del anticuerpo para Ki67 intracelular conjugado con FITC (BD Biosciences) por 30 minutos.

Se realizó un control negativo para cada fluorocromo. Para determinar el tipo de control, se realizó un análisis en el cual solo los fluorocromos que fueron necesarios se incluyeron en el tubo control. Los fluorocromos necesarios en cada tubo control se determinaron de la siguiente manera: si después de aplicar la compensación, los fluorocromos seguían teniendo señal falsa positiva en otro canal de emisión, eran añadidos al tubo control, además de esta

determinación, se añadieron controles de isotipo (anticuerpos del mismo isotipo del anticuerpo específico, marcados con el mismo fluorocromo) para cada control negativo establecido. Los controles usados se encuentran en la tabla 2. Las células fueron adquiridas en un citómetro Facs CANTO II (Becton Dickinson) con *software* FACS DIVA versión 6.0 y los archivos generados se analizaron con FlowJo *software* (Tree Star), la estrategia de delineación de cada población (*gating*) se muestra en la figura 1.

Tabla 1. Panel usado para las tinciones de esta investigación.

Molécula	Fluorocromo	Concentración	Marca	Observaciones
CD4	APC-Cy7	1 $\mu\text{L}/10^6$ células	BD Biosciences	
CD8	APC-Cy7	5 $\mu\text{L}/10^6$ células	BioLegend	
CD45RO	Biotina-streptavidina-PE Texas red	0.5 $\mu\text{L}$ de biotina más 25 $\mu\text{L}$ de una dilución 1/1000 de streptavidina/ $10^6$ células	BioLegend BD Biosciences	Detección por anticuerpo secundario
CCR7	PE-Cy7	5 $\mu\text{L}/10^6$ células	BD Biosciences	
CXCR3	PE	20 $\mu\text{L}/10^6$ células	BD Biosciences	
CCR4	Alexa Fluor 647	1 $\mu\text{L}/10^6$ células	BD Biosciences	
CXCR5	PerCP-Cy 5.5	1.25 $\mu\text{L}/10^6$ células	BioLegend	
CD38	Alexa Fluor 700	2 $\mu\text{L}/10^6$ células	BioLegend	
Ki67	FITC	20 $\mu\text{L}/10^6$ células	BD Biosciences	Tinción intracelular

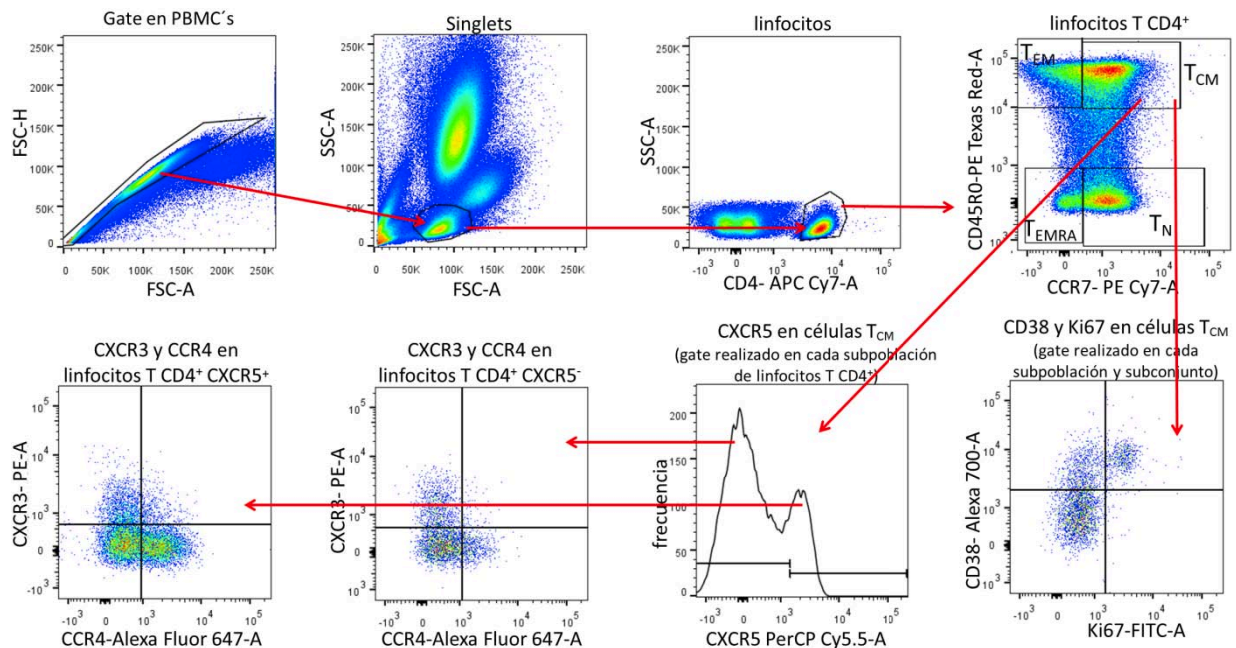


Figura 1. Estrategia de *gating* para la tinción de las CMN de pacientes VIH<sup>+</sup> y donadores sanos.  $T_{EM}$ : células de memoria efectoras,  $T_{CM}$ : células de memoria centrales,  $T_N$ : células T naive, y  $T_{EMRA}$ : células de memoria efectora CD45RA<sup>+</sup>.

Tabla 2. Fluorocromos y concentraciones que se establecieron para los controles negativos para cada fluorocromo del panel.

Anticuerpo/fluorocromo	Concentración
<b>Control de CCR7-PE-Cy7</b>	
CD4 APC-Cy7 / CD8 APC-Cy7	1µL/5 µL
CD45R0 Biotina-Strept.-PE Texas Red	0.5/25 µL (1:1000)
CXCR5 PerCP-Cy5.5	1.25 µL
CXCR3 PE	20 µL
rat IgG2a κ PE-Cy7	2.5 µL
<b>Control de CXCR5- PerCP Cy5.5</b>	
CD4 APC-Cy7 / CD8 APC-Cy7	1µL/5 µL
CD45R0 Biotina-Strept.-PE Texas Red	0.5/25 µL (1:1000)
CCR7 PE-Cy7	5 µL
CCR4 Alexa Fluor 647	1 µL
CXCR3 PE	20 µL
Mouse IgG1 κ PerCP CY5.5	1.25 µL
<b>Control de CD45R0 Biotina-streptavidina-PE Texas Red</b>	
CD4 APC-Cy7 / CD8 APC-Cy7	1µL/5 µL
CXCR3 PE	20 µL
Mouse IgG2a κ Biotina, Strept.-PE Texas Red	0.5/25 µL (1:1000)
<b>Control de CXCR3-PE</b>	
CD4 APC-Cy7 / CD8 APC-Cy7	1µL/5 µL
CD45R0 Biotina-Strept.-PE Texas Red	0.5/25 µL (1:1000)
Mouse IgG1 κ PE	20 µL
<b>Control de CCR4-Alexa Fluor 647</b>	
CD4 APC-Cy7 / CD8 APC-Cy7	1µL/5 µL
CD45R0 Biotina-Strept.-PE Texas Red	0.5/25 µL (1:1000)
CCR7 PE-Cy7	5 µL
Mouse IgG1 κ Alexa Fluor 647	1 µL
<b>Control de CD38-Alexa Fluor 700</b>	
CD4 APC-Cy7 / CD8 APC-Cy7	1µL/5 µL
CCR4 Alexa Fluor 647	1 µL
CXCR5 PerCP-Cy5.5	1.25 µL
Mouse IgG1 κ Alexa Fluor 700	2 µL
<b>Control de Ki67-FITC</b>	
CD4 APC-Cy7 / CD8 APC-Cy7	1µL/5 µL
Mouse IgG1 κ FITC	20 µL

### *Cultivo celular de células de pacientes VIH<sup>+</sup> y donadores sanos*

Se colocó un millón de células/mL de medio RPMI 1640 suplementado y se incubaron a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad relativa por 48 horas. Estas células se cultivaron con los siguientes estímulos: **1)** 10µg/10<sup>6</sup> de células de un anticuerpo agonista a CD3 clona UCHT1 unido a la placa (BioLegend), **2)** 10µg/10<sup>6</sup> de células de un anticuerpo agonista a CD3 unido a la placa (BioLegend) más 1µg/10<sup>6</sup> de células de un anticuerpo agonista a CD28 (BioLegend), y **3)** 20ng/10<sup>6</sup> de células de PMA (Sigma-Aldrich) y 2ng/10<sup>6</sup> de células de ionomicina (Sigma-Aldrich).

### *Análisis estadístico:*

Se realizó un análisis multivariado, para el cual se hizo una división de variables en diversos niveles de análisis de acuerdo a la estrategia de *gating* de subpoblaciones, subconjuntos y expresión de CD38 y Ki67 en cada uno de ellos. Lo que este análisis busca que los datos a analizar tengan homogeneidad, esto se refiere a que en cada nivel solo existan variables de una misma categoría (Fig. 2). Las variables de estos niveles se sometieron a un análisis de componentes principales (PCA), con el fin de agrupar variables correlacionadas, reducir las dimensiones y obtener componentes independientes (ortogonales) que estuvieran aportando el 80% de la varianza (se incluyeron las variables de: porcentaje de las subpoblaciones y porcentaje de subconjuntos que expresan cada patrón de activación (Fig. 2), sin incluir variables categóricas (paciente, control). El PCA nos permite obtener componentes independientes que expliquen el mayor porcentaje de la varianza de los datos. Posteriormente se usó el método de *clustering* con K-medias, utilizando los componentes que arroja el PCA (42, 73). En este análisis se evitó el efecto de factores confusores, incluyendo en cada análisis las variables de las cuales se derivan las variables a analizar, y así explicar si el efecto se debe a esa variable o a las demás.

Posteriormente se realizaron dos tipos de regresiones múltiples utilizando los clústeres como cofactores: regresión logística, donde la variable dependiente es el estatus de infección, infectado por VIH o no infectado, y regresión lineal múltiple en la cual la variable dependiente fue la cuenta de células T CD4<sup>+</sup> de pacientes VIH<sup>+</sup> en sangre o la carga viral.

Dentro de las comparaciones univariadas, se usó la prueba U de Mann Whitney para la comparación de datos no pareados (comparación de pacientes VIH<sup>+</sup> y controles) y la prueba de Rangos con Signo de Wilcoxon para la comparación de datos pareados (diferencias entre subpoblaciones de T<sub>CM</sub> de un mismo grupo de sujetos). Se realizaron correlaciones (Spearman) para evaluar la relación entre diferentes variables experimentales y variables indicadoras del avance de la infección. Los valores de P menores a 0.05 fueron considerados como significativos para todas las pruebas.

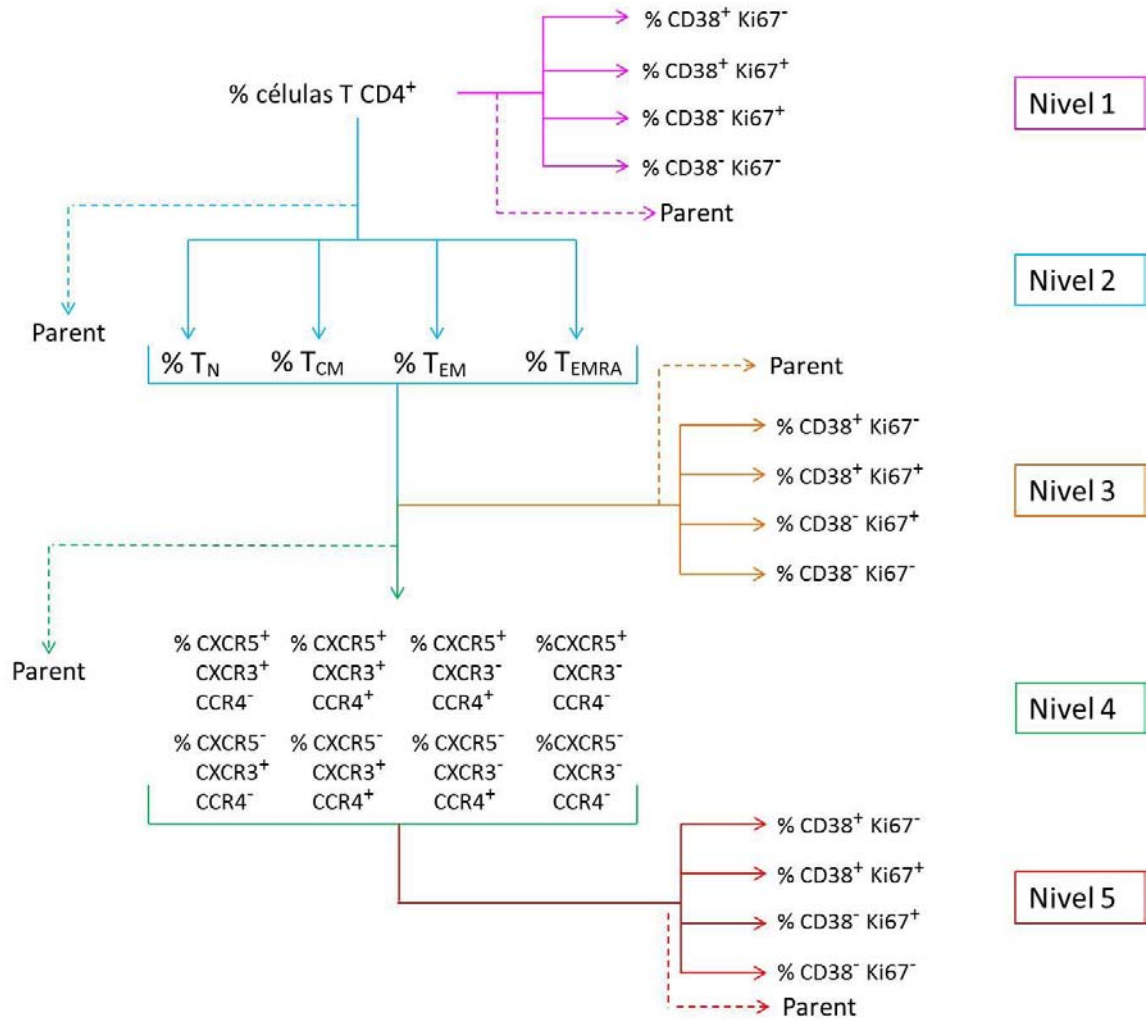


Figura 2.- niveles de análisis utilizados en las pruebas multivariadas, se dividieron con el fin de tener homogeneidad entre los datos comparados.

## Resultados

Se obtuvieron las muestras de 11 pacientes VIH<sup>+</sup> y 11 controles sanos. Los criterios de exclusión para los pacientes fueron aquellos que se encontraban en tratamiento antirretroviral o inmunomodulador y tampoco fueron incluidos aquellos que presentaran infecciones oportunistas. Los datos de los pacientes se muestran en la Tabla 3. No se encontraron diferencias significativas de las edades de los sujetos entre ambos grupos. No se contó con datos de carga viral y cuentas de células T CD4<sup>+</sup> de un paciente, los datos obtenidos de este paciente solo fueron incluidos en las comparaciones con el grupo de controles.

Tabla 3. Características de los sujetos incluidos en este estudio. N.A.: no aplica

	Pacientes VIH <sup>+</sup>	Donadores Sanos
Edad	33.1 (19-50 años)	27.33 (20-48 años)
Hombres	9	9
mujeres	2	2
Carga viral (copias de RNA de VIH/mL de sangre) (Media e intervalo)	116565.4 (1527-421290)	N.A.
Cuenta de células T CD4 <sup>+</sup> /μL de sangre (media e intervalo)	323.2(96-561)	N.A.

### *Comparación de las proporciones de subconjuntos de células T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup> entre pacientes VIH<sup>+</sup> y donadores sanos*

Se caracterizaron los distintos subconjuntos de células T<sub>CM</sub> de acuerdo a la expresión de CXCR5, CXCR3 y CCR4 en pacientes VIH<sup>+</sup> y controles, con el fin de observar si alguno de ellos se encontraba disminuido o sobrerrepresentado con respecto a los demás, en comparación con su frecuencia entre las células T<sub>CM</sub> de controles. Los subconjuntos que en este estudio constituyeron la mayoría de las células T<sub>CM</sub> de controles sanos correspondieron a los encontrados como subconjuntos principales de las células T<sub>CM</sub> en el estudio de Rivino, et al (2004) (62), Estos subconjuntos principales fueron representados por un código de colores para facilitar su descripción a lo largo de esta investigación (Fig. 3).

Se realizó una prueba no pareada entre cada subconjunto de pacientes VIH<sup>+</sup> y controles VIH<sup>-</sup> (Fig. 4). Se observó que la proporción de las células T<sub>CM</sub> CXCR5<sup>+</sup> CXCR3<sup>-</sup> CCR4<sup>-</sup> de pacientes VIH<sup>+</sup> (5%) se encuentra significativamente disminuida en comparación con la proporción que representó el conjunto de T<sub>CM</sub> de controles VIH<sup>-</sup> (14%) (Fig. 4 B,  $P=0.038$ ). Además, la





Células  $T_{CM} CD4^+$  de pacientes  $VIH^+$ , C) Estrategia de gating que se siguió para delimitar los subconjuntos de células  $T_{CM}$ . El valor  $P$  corresponde a diferencias significativas en el porcentaje de la subpoblación entre controles sanos y pacientes, de acuerdo a la prueba  $U$  de Mann Whitney. A la derecha se muestra el código de colores para cada subpoblación y su patrón de expresión de receptores de quimiocinas.

### Expresión de CCR7 en las células $T_{CM} CXCR5^+$

Se ha descrito que entre estos subconjuntos, los que no expresan la molécula CXCR5 se diferenciarán a células  $T_{EM}$  al ser estimuladas *in vitro* con citocinas homeostáticas o a través de su receptor de células T, algunas de ellas ya tienen definida la polarización funcional que tendrán al diferenciarse, de acuerdo al patrón Th1 o Th2. Las células  $T_{CM}$  ya polarizadas producen citocinas características de su polarización y, al ser estimuladas, disminuyen su expresión de CCR7 y CD62L, marcadores que al perderse indicarían la diferenciación hacia un fenotipo efector (62).

Con la finalidad de observar si las células  $T_{CM}$  que expresaban CXCR5 podrían encontrarse un paso antes en el proceso de diferenciación hacia células  $T_{EM}$ , se evaluó la media de la intensidad de fluorescencia (MFI, siglas en inglés) correspondiente a CCR7, dentro de los subconjuntos de células  $T_{CM}$  (todos  $CCR7^+$ ) que expresan o no CXCR5 provenientes de la tinción *ex vivo* (Fig. 5). Se observó una diferencia significativa en la MFI de CCR7 entre el total de células  $T_{CM} CXCR5^+$  y las  $CXCR5^-$  (entre controles:  $P=0.04$ , entre pacientes:  $P=0.03$ ). Estos resultados concuerdan con lo observado por Suresh (2012) (72).

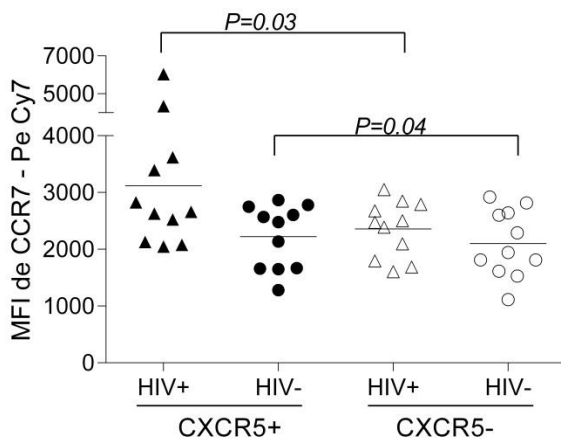


Figura 5: La expresión de CCR7 es significativamente mayor en las células  $CXCR5^+$  en pacientes con VIH.

Se muestran diferencias de la intensidad media de fluorescencia de CCR7 acoplado a PE-Cy7 entre las células  $T_{CM}$  que expresan CXCR5 y las células  $T_{CM} CXCR5^-$  de pacientes  $VIH^+$  y controles  $VIH^-$ . Se realizó una prueba de rangos con signo de Wilcoxon.

### *Mantenimiento del fenotipo CXCR5<sup>+</sup> CXCR3<sup>-</sup> CCR4<sup>-</sup> al estimular in vitro*

Al observar que la frecuencia de las células T<sub>CM</sub> CXCR5<sup>+</sup> CXCR3<sup>-</sup> CCR4<sup>-</sup> de pacientes VIH<sup>+</sup> se encontraba disminuida *ex vivo*, se analizó este fenotipo al estimular a las células, con el objetivo de observar si aumentaría la proporción de estas células o se mantenía disminuido. Se incubaron las células mononucleares de sangre periférica de pacientes y de controles sanos por 48 horas, con un estímulo vía CD3 y otro vía CD3 más coestimulación con un anticuerpo anti-CD28. Como control negativo se dejaron en medio RPMI suplementado sin estímulo. Después de 48 horas se midió la frecuencia de expresión de las subpoblaciones de células T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup>.

Se observó que en pacientes, el conjunto de células T<sub>CM</sub> CXCR5<sup>+</sup> CXCR3<sup>-</sup> CCR4<sup>-</sup> se mantuvo significativamente menor en comparación con el del grupo de controles después de estimular (Fig. 6 A  $\alpha$ -CD3:  $P=0.035$ ,  $\alpha$ -CD3 +  $\alpha$ -CD28:  $P=0.04$ ). No se encontró ninguna otra diferencia al comparar las frecuencias de las subpoblaciones entre pacientes y controles.

Se encontraron varias diferencias entre estímulos, en la subpoblación CXCR5<sup>+</sup> CXCR3<sup>-</sup> CCR4<sup>-</sup> de controles VIH<sup>-</sup>, se encontró una diferencia significativa al comparar su frecuencia *ex vivo* y el control negativo (Fig. 6 A \* $P=0.004$ ). En la subpoblación CXCR5<sup>-</sup> CXCR3<sup>-</sup> CCR4<sup>+</sup> de pacientes VIH<sup>+</sup> se encontraron dos diferencias significativas entre el control negativo y las dos condiciones de estimulación CD3 y CD3 + CD28 (Fig. 6 C, medio vs CD3: # $P=0.004$ , medio vs CD3+CD28: # $P=0.004$ ).

Estos resultados demostraron que la frecuencia de la subpoblación CXCR5<sup>+</sup> CXCR3<sup>-</sup> CCR4<sup>-</sup> se encontraba disminuida en pacientes VIH<sup>+</sup>, y se mantiene así a pesar de ser estimulada. Las demás subpoblaciones de células T<sub>CM</sub> parecen seguir la misma dinámica que las células de controles sanos.

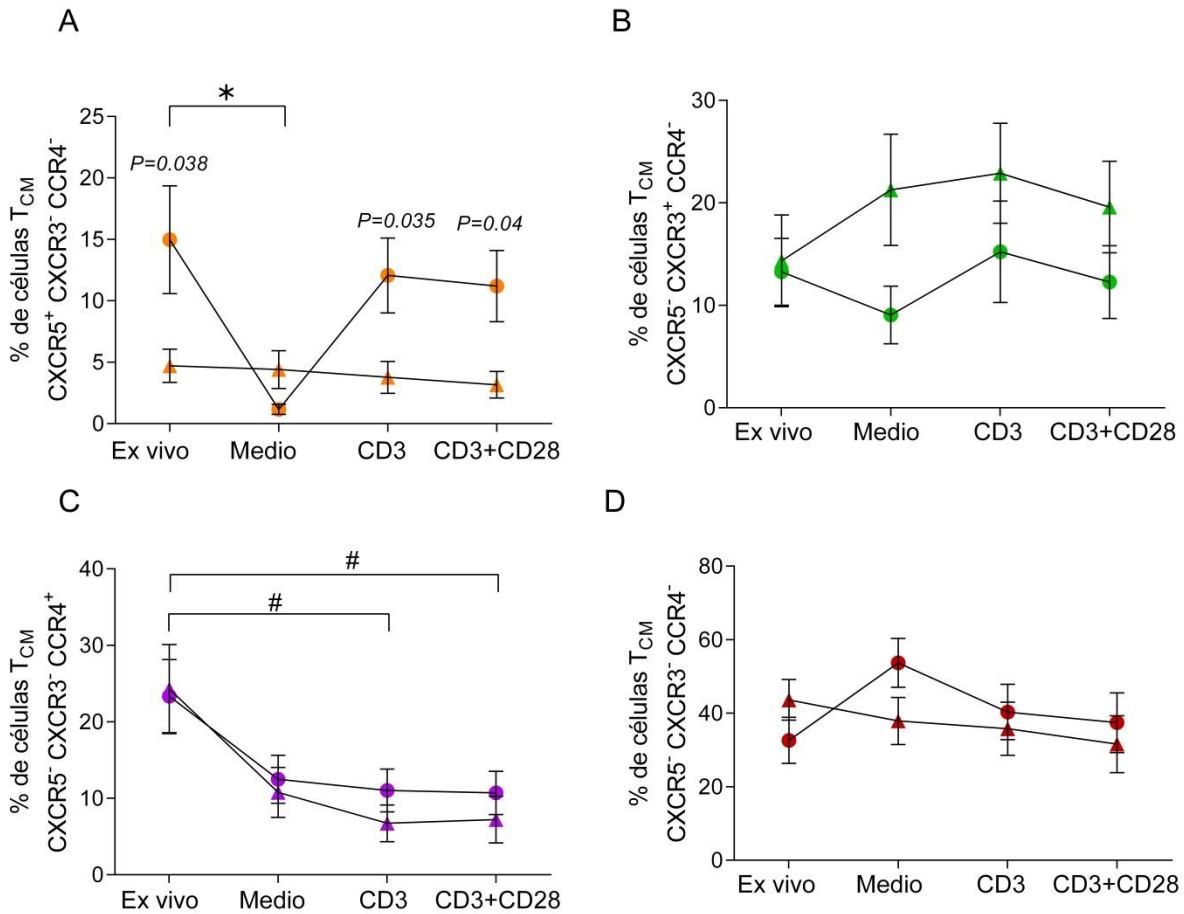


Figura 6: Las células  $T_{CM}$   $CXCR5^+ CXCR3^- CCR4^-$  en pacientes  $VIH^+$  se mantienen disminuidas aún con estimulación. Se midieron las frecuencias de los subconjuntos de las células  $T_{CM}$   $CD4^+$  en varias condiciones: ex vivo, Medio RPMI suplementado,  $\alpha$ -CD3 y  $\alpha$ -CD3 +  $\alpha$ -CD28. A)  $CXCR5^+ CXCR3^- CCR4^-$ , B)  $CXCR5^- CXCR3^+ CCR4^-$ , C)  $CXCR5^- CXCR3^+ CCR4^+$ , D)  $CXCR5^- CXCR3^- CCR4^-$ . El valor P que se muestra corresponde a una prueba de U Mann Whitney entre la frecuencia de la subpoblación de pacientes y controles. El valor  $P < 0.05$  entre condiciones se indica así: \* para comparaciones de controles sanos y # para comparaciones de pacientes  $VIH^+$ .

### Variables asociadas a los marcadores de progresión de la enfermedad

Se realizó un análisis multivariado para detectar variables que correlacionaran con las células  $T$   $CD4^+$ , la carga viral o con la infección en forma independiente de las demás variables. Para esto, primero se hizo un análisis de *clustering* basado en componentes principales, el cual agrupó en una misma dimensión a las variables que correlacionaban entre sí. Con estos clústers se realizaron dos tipos de correlaciones: lineal y logística.

Dentro de los subconjuntos de las células  $T_{CM} CD4^+$ , se obtuvo un clúster que está significativamente correlacionado de forma lineal a la frecuencia de las células T  $CD4^+$  en pacientes VIH<sup>+</sup> (Tabla 4). Este clúster está formado por las células  $CXCR5^- CXCR3^- CCR4^+$  y las cuatro posibles combinaciones de la expresión de CD38 y Ki67, sin embargo solo dos de estas combinaciones participan de manera principal en esta correlación ( $CD38^+ Ki67^-$  y  $CD38^+ Ki67^+$ ) y las otras dos combinaciones ( $CD38^- Ki67^+$  y  $CD38^- Ki67^-$ ) tienen un coeficiente negativo, por lo cual se encuentran participando de manera inversa a las otras, en su asociación con la las cuentas de células T  $CD4^+$ , (Tabla 4,  $P=0.036$ ). El mismo clúster mostró una asociación positiva con la carga viral, (Tabla 4,  $P=0.030$ ).

Lo que se identificó en este análisis es que la expresión de CD38 es el factor determinante para encontrar correlaciones con la pérdida de las células T  $CD4^+$  y con el aumento de la carga viral. Esto implica que, aunque la expresión de Ki67 como la de CD38 correlacionaron con los factores de avance de la infección, es CD38 el principal, ya que este correlaciona al expresarse junto con Ki67 o al estar sin este marcador.

El segundo resultado encontrado en este análisis, es que son las células  $T_{CM} CCR4^+$  en las que la expresión de CD38 parece estar ligado a la patogénesis del VIH.

Tabla 4.- Clústeres que resultaron significativos para las pruebas de regresión logística o regresión lineal.

Variables en el Clúster	Signo de coeficiente dentro del clúster	P	Correlación
$T_{CM} CXCR5^- CCR4^+ CXCR3^- / Ki67^- CD38^+$	+	0.036	Negativa, Lineal, con la cuenta de células T $CD4^+$ /mm <sup>3</sup> sangre
$T_{CM} CXCR5^- CCR4^+ CXCR3^- / Ki67^+ CD38^+$	+		
$T_{CM} CXCR5^- CCR4^+ CXCR3^- / Ki67^+ CD38^-$	-		
$T_{CM} CXCR5^- CCR4^+ CXCR3^- / Ki67^- CD38^-$	-		
$T_{CM} CXCR5^- CCR4^+ CXCR3^- / Ki67^- CD38^+$	+	0.030	Positiva, Lineal, con la carga viral
$T_{CM} CXCR5^- CCR4^+ CXCR3^- / Ki67^+ CD38^+$	+		
$T_{CM} CXCR5^- CCR4^+ CXCR3^- / Ki67^+ CD38^-$	-		
$T_{CM} CXCR5^- CCR4^+ CXCR3^- / Ki67^- CD38^-$	-		

Con el fin de visualizar la relación que tiene la expresión de estos marcadores de activación en el subconjunto  $CXCR5^- CXCR3^- CCR4^+$  con la frecuencia de las células T  $CD4^+$ , realizamos correlaciones univariadas entre las cuentas de células T  $CD4^+$  de pacientes VIH<sup>+</sup> y la expresión de CD38 con o sin la expresión de Ki67 en las células  $T_{CM} CXCR5^- CXCR3^- CCR4^+$  (estrategia de gating Fig. 7 A, correlaciones Fig. 7 B, C). Encontramos que la frecuencia de células  $T_{CM}$  con el patrón  $CD38^+ Ki67^-$  correlaciona negativamente con las cuentas de células T  $CD4^+$  por microlitro de sangre (Fig. 7 C  $P=0.017$ ). No se encontró esta correlación con la frecuencia de las células  $T_{CM} CXCR5^- CXCR3^- CCR4^+$  que coexpresan CD38 y Ki67 (Fig. 7 D  $P>0.05$ ). Esto ilustra de nuevo

que el factor determinante de la correlación es la expresión de CD38 en este subconjunto de células T.

En estas correlaciones univariadas se observó mejor cómo la expresión de CD38 en ausencia de Ki67 puede estar asociada a la cuenta de células T CD4<sup>+</sup>, que es indicador clínico del avance de la infección, y su expresión podría estar ligada causalmente a la pérdida de células T CD4<sup>+</sup> circulantes en pacientes VIH<sup>+</sup>.

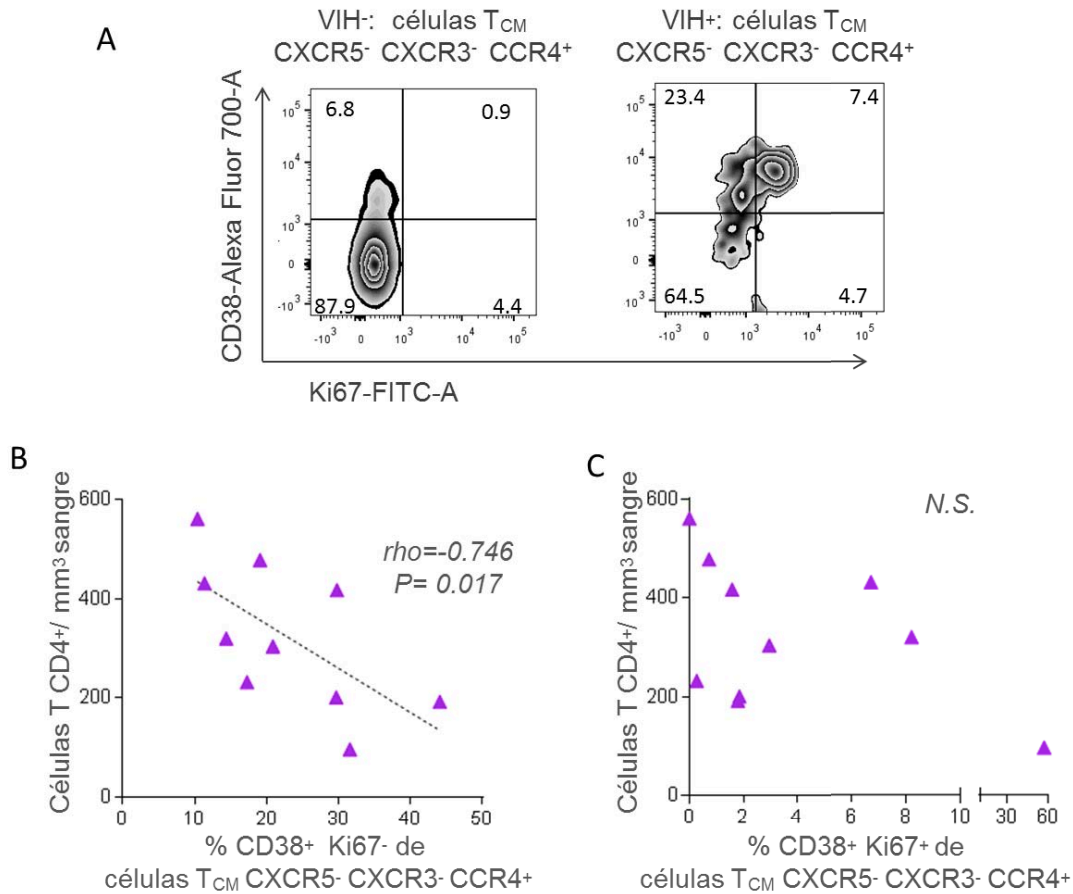


Figura 7: Correlación entre las células T CD4<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> en sangre y las frecuencias de células de memoria CXCR5<sup>-</sup> CXCR3<sup>-</sup> CCR4<sup>+</sup> con los fenotipos de expresión de Ki67 y CD38 A) Gráfico representativo de los resultados de la citometría mostrando los posibles patrones de expresión de CD38 y Ki67 en células T<sub>CM</sub> CXCR5<sup>-</sup> CXCR3<sup>-</sup> CCR4<sup>+</sup> en controles y pacientes. B) Correlación entre las células T CD4<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> con % CD38<sup>+</sup> Ki67<sup>-</sup> de las células T<sub>CM</sub> CXCR5<sup>-</sup> CXCR3<sup>-</sup> CCR4<sup>+</sup>. C) Correlación entre las cuentas de células T CD4<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> con él % de CD38<sup>+</sup> Ki67<sup>+</sup> de las células T<sub>CM</sub> CXCR5<sup>-</sup> CXCR3<sup>-</sup> CCR4<sup>+</sup>. Los valores P y rho corresponden a pruebas de correlación de Spearman.

## *Análisis de la frecuencia de expresión de CD38 y Ki67 dentro de los subconjuntos de células T<sub>CM</sub>*

Al observar que la expresión de CD38 fue independiente de la expresión de Ki67 al asociarse en forma negativa con la frecuencia de las células T CD4<sup>+</sup>, se realizaron comparaciones univariadas con el propósito de identificar la manera en la que los subconjuntos expresan CD38 y Ki67 en la infección por VIH.

Se midió la expresión *ex vivo* de CD38 y Ki67 en los principales subconjuntos de células T<sub>CM</sub> de pacientes VIH<sup>+</sup> y de controles. Se clasificaron las observaciones de acuerdo a los fenotipos relevantes de expresión de Ki67 y CD38: su coexpresión (CD38<sup>+</sup> Ki67<sup>+</sup>) y la expresión de CD38 individualmente (CD38<sup>+</sup> Ki67<sup>-</sup>).

Se encontró que la expresión de CD38 solo (CD38<sup>+</sup> Ki67<sup>-</sup>) fue significativamente mayor en los cuatro subconjuntos principales de células T<sub>CM</sub> de pacientes VIH<sup>+</sup> que en los subconjuntos de controles (Fig. 8 A. CXCR5<sup>+</sup> CXCR3<sup>-</sup> CCR4<sup>-</sup>  $P=0.013$ , CXCR5<sup>-</sup> CXCR3<sup>+</sup> CCR4<sup>-</sup>  $P=0.0004$ , CXCR5<sup>-</sup> CXCR3<sup>-</sup> CCR4<sup>+</sup>  $P=0.0003$ , CXCR5<sup>-</sup> CXCR3<sup>-</sup> CCR4<sup>-</sup>  $P=0.0004$ ).

Cuando se compararon los porcentajes de expresión de las células coexpresando ambos marcadores (fenotipo CD38<sup>+</sup> Ki67<sup>+</sup>) no se encontró el mismo efecto, únicamente los subconjuntos de pacientes VIH<sup>+</sup> que no expresan CXCR5 muestran una frecuencia de células positivas para ambos marcadores con una frecuencia significativamente mayor que los subconjuntos de controles (Fig. 8 B, CXCR5<sup>-</sup> CXCR3<sup>+</sup> CCR4<sup>-</sup>  $P=0.002$ , CXCR5<sup>-</sup> CXCR3<sup>-</sup> CCR4<sup>+</sup>  $P=0.009$ , CXCR5<sup>-</sup> CXCR3<sup>-</sup> CCR4<sup>-</sup>  $P=0.036$ ).

Únicamente en el subconjunto CXCR5<sup>+</sup> CXCR3<sup>-</sup> CCR4<sup>-</sup> de pacientes VIH<sup>+</sup> no se observó un incremento en la expresión de CD38 junto con Ki67, en comparación con la frecuencia encontrada en controles (Fig. 8 B, pacientes=  $1.76 \pm 2.64$ , controles=  $0.55 \pm 1.13$ ,  $P > 0.05$ ). Este subconjunto fue el único que se encontró en un porcentaje disminuido en las células T<sub>CM</sub> de pacientes, comparadas con las de controles (Fig. 4 B). El único subconjunto que se encuentra reducido en la infección por VIH es el que no expresa de manera más abundante el marcador de entrada a ciclo celular (Ki67) como efecto de la infección.

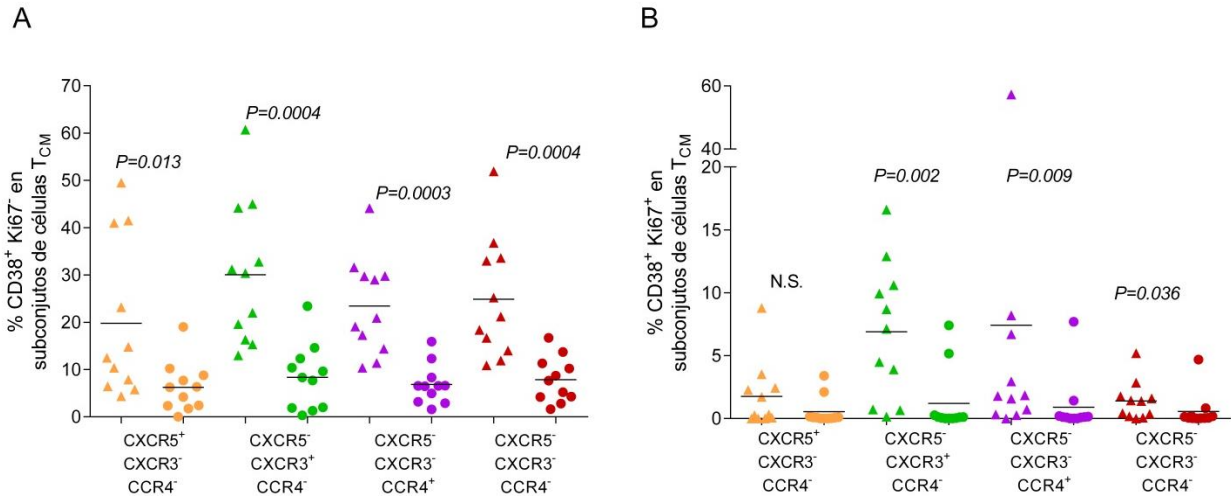


Figura 8: expresión de CD38 y Ki67 entre los subconjuntos de células T<sub>CM</sub>. A) se muestra el % de expresión de CD38 en ausencia de Ki67 en cada subconjunto de células T<sub>CM</sub> de pacientes (▲) y controles (●). B) se muestra el % de coexpresión de CD38 y Ki67 en cada subconjunto de células T<sub>CM</sub> de pacientes (▲) y controles (●). El valor P corresponde a una prueba de U de Mann Whitney.

### El perfil “CD38<sup>+</sup> Ki67<sup>-</sup>” como factor pronóstico de la pérdida de células T CD4<sup>+</sup>

Las células T<sub>CM</sub> CXCR5<sup>+</sup> CXCR3<sup>-</sup> CCR4<sup>-</sup> parecen no estar entrando a ciclo celular (y potencialmente proliferando) igual que los otros subconjuntos durante la infección por VIH. Sin embargo, sí están expresando CD38 en ausencia de Ki67 de una manera significativamente mayor que las células de controles, esto podría ser una causa de su subrepresentación dentro del conjunto de las células T<sub>CM</sub>.

A partir de este hecho se analizó si existe alguna correlación entre el fenotipo de CD38<sup>+</sup> Ki67<sup>-</sup> con la pérdida de este subconjunto. Se observó que únicamente la frecuencia de expresión de CD38 sin Ki67 en las células CXCR5<sup>+</sup> CXCR3<sup>-</sup> CCR4<sup>-</sup> correlaciona con su propia pérdida (Fig. 9 A, Rho= -0.709 y P=0.032), cuando Ki67 se expresa no se encuentra ninguna correlación significativa (Fig. 9 B, Rho= -0.09 y P=0.78). Esta correlación apunta de nuevo a un papel independiente de la expresión de CD38 en la pérdida de células T CD4<sup>+</sup> en la infección por VIH. No se encontró este tipo de correlación negativa en ningún otro subconjunto de las subpoblaciones de memoria.



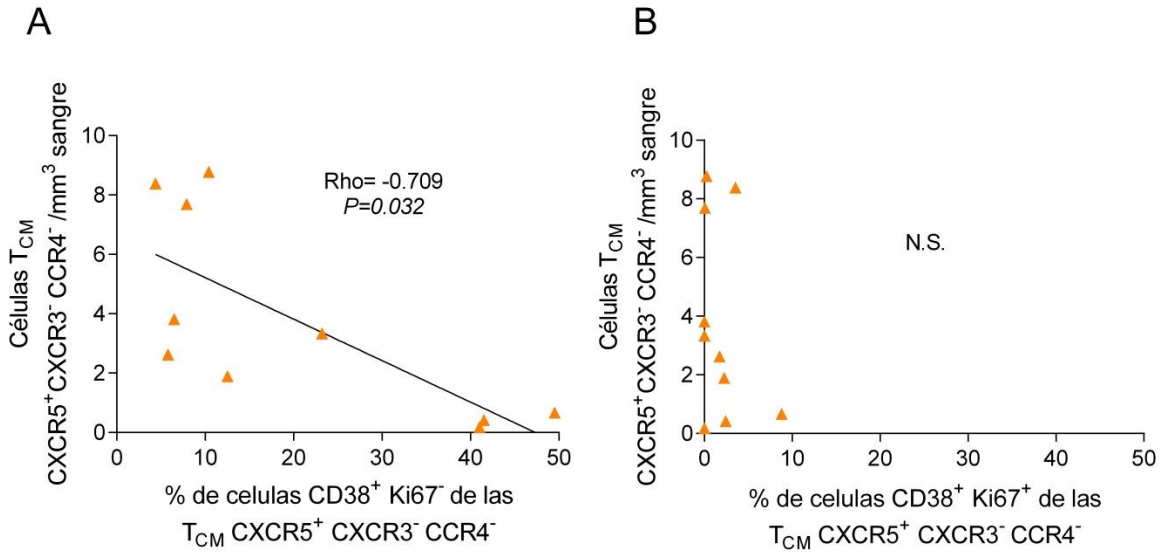


Figura 9: correlación entre el porcentaje de  $T_{CM}$  CXCR5<sup>+</sup> CXCR3<sup>-</sup> CCR4<sup>-</sup> y su propia expresión de los patrones de expresión: CD38<sup>+</sup> Ki67<sup>-</sup> y CD38<sup>+</sup> Ki67<sup>+</sup> en pacientes VIH<sup>+</sup>. El valor P proviene de la prueba de correlación de Spearman.

## Discusión

Este estudio presenta la importancia de analizar a las células  $T_{CM} CD4^+$  dividiéndolas en subconjuntos de acuerdo a los patrones de expresión de receptores de quimiocinas, ya que a pesar de que comparten características básicas, en un proceso patológico las características que identifican a cada una las pueden hacer diferencialmente vulnerables. Este estudio también brinda evidencias de que la activación celular es el resultado de varios procesos que pueden o no ser dependientes uno del otro. Así mismo, este trabajo muestra que en el contexto de la infección por VIH, es la expresión de CD38 la que podría ser más relevante para comprender la patogénesis de la enfermedad.

Por varios años se ha evidenciado que la activación crónica es un predictor del avance de la infección por VIH (3, 32, 33, 40, 43, 74), y se han identificado varios marcadores de activación que correlacionan con la pérdida de células T  $CD4^+$  (32, 42, 45, 58). La expresión de CD38 en células T  $CD4^+$  y T  $CD8^+$  ha sido un fuerte predictor de la progresión de la enfermedad y su expresión podría ser parte de los mecanismos indirectos que forman parte de la patogénesis de la infección por VIH (3, 40, 42, 57). Por esta razón nos enfocamos en identificar si la expresión de CD38 está afiliada a la entrada de las células al ciclo celular, un indicador claro de la activación, o ligado con la pérdida de células T  $CD4^+$  en la fase crónica de la enfermedad.

Se realizó un análisis multivariado con el fin de formar clústeres independientes (ortogonales) de variables correlacionadas. Se obtuvieron distintos clústeres que fueron usados dentro de análisis de regresión logística y de regresión lineal multivariada. Como resultado, obtuvimos un clúster en un subconjunto de células  $T_{CM}$  que correlaciona de forma negativa con las cuentas de células T  $CD4^+$ . En este clúster se encontraban células que coexpresan CD38 y Ki67 y células que solo expresan CD38. Este mismo clúster también correlacionó de forma positiva con la carga viral. Es razonable pensar que la expresión de CD38 se encuentra asociada a la patogénesis de la infección por VIH, de forma independiente al ciclo celular, ya que las dos variables contribuyentes al clúster expresan este marcador, y las células  $Ki67^+$  solo participan cuando hay una coexpresión con CD38.

En la infección por VIH ha sido descrito que hay arresto en la fase S del ciclo celular (16) y Ki67 podría indicar células estancadas en fase G1 (22), por lo que sería interesante determinar si el alto recambio en la infección por VIH y su consecuente arresto celular están ligados a la expresión de CD38. También sería importante seguir trabajando en el análisis de las funciones de CD38, no como marcador de activación, sino como una molécula que podría estar involucrada en procesos celulares que condicionaran la supervivencia celular. Dentro de esto, ha sido encontrado que las células  $T_{CM}$  que expresan CD38, principalmente en pacientes VIH<sup>+</sup>, al

ser estimuladas vía receptor de células T, presentan una respuesta donde domina la producción de IFN- $\gamma$ , y menor producción de IL-2 al compararlas con sus contrapartes CD38<sup>-</sup> (61). Dentro de las células T<sub>CM</sub>, la producción de IFN- $\gamma$  no es muy común, pero se ha encontrado que estas células podrían ser más susceptibles a la apoptosis y tener menor producción y recepción de IL-7 (31). También se ha observado una disminución de la inducción de CD40L (60), importante molécula de coestimulación que se une a CD40 expresado por las células presentadoras de antígeno. Esta caracterización sugiere que las células CD38<sup>+</sup> poseen una menor capacidad de proliferación y autorrenovación, funciones que estarían más disminuidas en la infección por VIH debido a que la expresión de CD38 está aumentada. Las funciones que se encuentran disminuidas en células CD38<sup>+</sup> son muy importantes para mantener la homeostasis, proceso que es importante para el sostenimiento de un mínimo de células T CD4<sup>+</sup> durante la fase crónica de la infección por VIH.

El clúster encontrado en la correlación por análisis multivariado está formado por el subconjunto CXCR5<sup>-</sup> CXCR3<sup>-</sup> CCR4<sup>+</sup>, células previamente caracterizadas como pre-polarizadas a una función tipo Th2 (62) por la presencia del factor de transcripción GATA3 (10) y la producción de IL-4 al ser estimuladas (62), y que al diferenciarse, están especializadas para migrar a sitios efectoros como pulmones y piel (75–77), al igual que a tejidos inflamados. En este estudio estas células se mantienen su frecuencia al comparar su proporción entre pacientes y controles (Fig. 4). La expresión de CD38 en este subconjunto correlaciona con factores del avance de la enfermedad. Dentro de la patogénesis del VIH, se ha encontrado que las células CD38<sup>+</sup> son más susceptibles para ser infectadas por el VIH (78), y la expresión de CCR4 podría también permitir la infección viral (79) al igual que la producción de IL-4 que favorece la infección por medio del correceptor CXCR4 (80, 81).

En este estudio, también encontramos que el mantenimiento del fenotipo del subconjunto CXCR5<sup>-</sup> CXCR3<sup>-</sup> CCR4<sup>+</sup> bajo condiciones de estimulación se mantiene igual que el de controles sanos, pero la dinámica observada indica que este fenotipo disminuye en un medio con estímulos, lo que indicaría que la expresión de CD38 causaría una disminución de estas células, condición que está incrementada en la infección por VIH (82). Nosotros encontramos que la expresión de CD38 en las células T<sub>CM</sub> CCR4<sup>+</sup> correlaciona negativamente con las cuentas de células T CD4<sup>+</sup> en pacientes VIH<sup>+</sup> y positivamente con la carga viral. Esta asociación podría ser importante porque se estaría favoreciendo la infección productiva por el VIH usando el correceptor de entrada CXCR4 o también las podría hacer blanco viral, además de que las células con este fenotipo estarían disminuyendo debido a la activación.

Otra disfunción encontrada fue la disminución de la proporción de las células T<sub>CM</sub> CXCR5<sup>+</sup> CXCR3<sup>-</sup> CCR4<sup>-</sup> en pacientes VIH<sup>+</sup> (Fig. 4). En el estudio de Rivino, *et al* (2004) (62) se observa que

al estimular estas células no producen IFN- $\gamma$  o de IL-4, pero sí tienen la misma capacidad para proliferar que los otros subconjuntos al ser estimuladas, pero a diferencia de ellas, estas células continúan sin diferenciarse, de este modo autorrenovándose. Se midió la expresión de CCR7, una molécula que participa en migración celular y permite el alojamiento en ganglios linfáticos y ha sido usada para diferenciar una célula de memoria central de una de memoria efectora (83), se evaluó la intensidad media de fluorescencia de la molécula CCR7 en células T<sub>CM</sub> CXCR5<sup>+</sup> y CXCR5<sup>-</sup> (Todas estas células se encuentran dentro del *gate* % CCR7<sup>+</sup>). Las células CXCR5<sup>+</sup> son las que expresan mayor intensidad, y ya que las células evaluadas poseen características similares de complejidad y volumen, este parámetro es válido para cuantificar la expresión de esta molécula. La mayor expresión de CCR7 en estas células parece estar en concordancia con las evidencias de que son células recién estimuladas y posiblemente en una etapa menos diferenciada que las células que han dejado de expresarlo (62). La disminución de la proporción de estas células se mantuvo bajo condiciones de estimulación, lo que podría sugerir que en pacientes, esta subpoblación no se recupera.

La expresión de CXCR5 es característica de las células T *follicular helpers* (T<sub>FH</sub>), estas células tienen la capacidad de poder estimular a las células B e inducir la producción de inmunoglobulinas, además de ayudar en la diferenciación de estas células (67, 68, 84, 85). Entre las células T<sub>CM</sub> hay una fracción que expresa este marcador, y en estudios *in vitro* se ha mostrado que también tienen estas capacidades, y que son mucho mayores que en las células que no expresan CXCR5 (65, 66), sin embargo es menor en comparación con las células T<sub>FH</sub> que no expresan CCR7 y se alojan en ganglios linfáticos (68, 86). Una limitante de este estudio es que las células no fueron identificadas con los marcadores propios de las células T<sub>FH</sub> que se encuentran en sangre (PD-1, BCL-6, ICOS) (68, 84, 87), sin embargo las células que se describimos podrían tener estas capacidades. En la infección por VIH se ha descrito poco acerca de estas poblaciones celulares. En pacientes que poseen una mayor cantidad de anticuerpos neutralizantes de VIH, el porcentaje de células “CXCR5<sup>+</sup> CXCR3<sup>-</sup> PD-1<sup>+</sup>” en sangre periférica es mayor y esto podría estar asociado a la funcionalidad que poseen para estimular la producción de anticuerpos (84). Además, se ha visto que los pacientes VIH<sup>+</sup> con una cantidad mayor de estas células, poseen una mejor respuesta a ciertas vacunas (72). Por estos antecedentes se reconoce la importancia de este subconjunto de células en pacientes VIH<sup>+</sup>, y su disminución significativa podría estar participando en el deterioro del sistema inmune que caracteriza a esta infección.

En este estudio se observó que en pacientes VIH<sup>+</sup> las células CXCR5<sup>+</sup> CXCR3<sup>-</sup> CCR4<sup>-</sup>, a diferencia de sus contrapartes CXCR5<sup>-</sup>, no expresan de manera aumentada el fenotipo “CD38<sup>+</sup> Ki67<sup>+</sup>” que indicaría que las células se encuentran posiblemente proliferando en respuesta a la infección, pero sí expresan de mayor manera el fenotipo “CD38<sup>+</sup> Ki67<sup>-</sup>” (Fig. 8 A y B). Esto podría indicar

que en la infección las células CXCR5<sup>+</sup> CXCR3<sup>-</sup> CCR4<sup>-</sup> no están en ciclo celular de la misma manera que los tres subconjuntos CXCR5<sup>-</sup> lo que las pone en desventaja, y podría ser una causa de su menor representación. Asimismo, la frecuencia de este subconjunto correlaciona negativamente con la expresión de CD38 en ausencia de Ki67 (Fig. 9 A), por lo que además de que su proliferación no se encuentra aumentada, el fenotipo que sí tiene aumentado se encuentra asociado a su pérdida. Esto podría ser porque la expresión de CD38 podría estar induciendo diferenciación o muerte celular por activación.

Previamente se ha caracterizado que en las células CD38<sup>+</sup> incrementa la expresión de CCR5, otro correceptor de entrada para el VIH-1 (48). Este mecanismo podría estar incrementado en las células CXCR5<sup>+</sup>, alterando sus capacidades descritas, que serían de gran utilidad para una respuesta efectiva contra el VIH.

## Conclusión

El objetivo general de este estudio fue identificar cómo los distintos subconjuntos de células  $T_{CM}$  se encuentran alterados en la infección por VIH. Nuestros hallazgos demuestran que las proporciones de los subconjuntos de estas células son diferentes entre paciente VIH<sup>+</sup> y controles VIH<sup>-</sup>. Las células CXCR5<sup>-</sup> CXCR3<sup>-</sup> CCR4<sup>-</sup> tienden a estar sobrerrepresentadas en pacientes, estas son células con una mayor facilidad a diferenciarse y menor capacidad de autorrenovación. Otro hallazgo fue que la proporción de las células CXCR5<sup>+</sup> CXCR3<sup>-</sup> CCR4<sup>-</sup> estuvo significativamente disminuida con respecto a las demás subpoblaciones. Esta disminución estuvo asociada a la expresión de CD38. La pérdida de estas células es relevante por sus propiedades funcionales ya que pueden participar en la cooperación con células B para la producción de anticuerpos y en apoyar una mejor respuesta a vacunas.

Adicionalmente identificamos que la expresión de CCR4 y CD38 en células  $T_{CM}$  estuvo asociada a la pérdida de células T CD4<sup>+</sup> circulantes en pacientes VIH<sup>+</sup>, este fenómeno ha sido asociado a un incremento en la susceptibilidad en el uso de CXCR4 como correceptor de entrada a la célula por la infección con VIH-1.

La expresión de CD38 ha sido referida como un factor pronóstico de la pérdida de células T CD4<sup>+</sup> en la infección por VIH. Su expresión está aumentada en células T de memoria centrales de pacientes infectados por VIH, y parece que está alterando a esta subpoblación en varios niveles. La expresión de esta molécula está asociada a la pérdida de células con capacidad de autorregeneración y además favorece la infección de otros subtipos celulares. Es importante concluir que esta molécula no es uno más de los pronosticadores de la infección, sino que está directamente asociada a ciertas disfunciones dentro de la patogénesis del VIH.

## Literatura Citada

1. Levy JA. *El VIH y la patogénesis del SIDA*. Fondo De Cultura Economica USA; 2008:
2. WHO | HIV/AIDS [Internet] <http://www.who.int/features/qa/71/en/>. cited October 8, 2015
3. Giorgi J V et al. Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage.. *J. Infect. Dis.* 1999;179(4):859–870.
4. Okoye A a., Picker LJ. CD4+ T-Cell Depletion In HIV Infection: Mechanisms Of Immunological Failure. *Immunol. Rev.* 2013;254(1):54–64.
5. Rodríguez B et al. Predictive value of plasma HIV RNA level on rate of CD4 T-cell decline in untreated HIV infection.. *JAMA* 2006;296(12):1498–1506.
6. Patrikar S et al. Rate of decline in CD4 count in HIV patients not on antiretroviral therapy [Internet]. *Med. J. Armed Forces India* 2014;70(2):134–138.
7. Chun TW et al. Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection.. *Nature* 1997;387(6629):183–188.
8. Anderson RW, Ascher MS, Sheppard HW. Direct HIV Cytopathicity Cannot Account for CD4 Decline in AIDS in the Presence of Homeostasis: a Worst-Case Dynamic Analysis. *J. Acquir. immune Defic. Syndr. Hum. retrovirology* 1998;17(3):245–252.
9. Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions.. *Nature* 1999;401(6754):708–712.
10. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance [Internet]. *Annu. Rev. Immunol.* 2004;22:745–763.
11. Lanzavecchia A, Sallusto F. Understanding the generation and function of memory T cell subsets [Internet]. *Curr. Opin. Immunol.* 2005;17(3):326–332.
12. Chomont N, DaFonseca S, Vandergeeten C, Ancuta P, Sékaly R-P. Maintenance of CD4+ T-cell memory and HIV persistence: keeping memory, keeping HIV. [Internet]. *Curr. Opin. HIV AIDS* 2011;6(1):30–36.
13. Okoye A et al. Progressive CD4+ central memory T cell decline results in CD4+ effector memory insufficiency and overt disease in chronic SIV infection. [Internet]. *J. Exp. Med.* 2007;204(9):2171–2185.
14. Cartwright EK et al. Divergent CD4+ T Memory Stem Cell Dynamics in Pathogenic and Nonpathogenic Simian Immunodeficiency Virus Infections [Internet]. *J. Immunol.* 2014;192(10):4666–73.
15. Lee B, Sharron M, Montaner LJ, Weissman D, Doms RW. Quantification of CD4, CCR5, and CXCR4 levels on lymphocyte subsets, dendritic cells, and differentially conditioned monocyte-derived macrophages.. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1999;96(9):5215–5220.

16. Sieg SF, Bazdar DA, Lederman MM. S-phase entry leads to cell death in circulating T cells from HIV-infected persons. [Internet]. *J. Leukoc. Biol.* 2008;83(6):1382–1387.
17. Sakai K, Dimas J, Lenardo MJ. The Vif and Vpr accessory proteins independently cause HIV-1-induced T cell cytopathicity and cell cycle arrest.. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006;103(9):3369–3374.
18. Wang J et al. The HIV-1 Vif protein mediates degradation of Vpr and reduces Vpr-induced cell cycle arrest. [Internet]. *DNA Cell Biol.* 2008;27(5):267–77.
19. Sheehy AM, Gaddis NC, Malim MH. The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. [Internet]. *Nat. Med.* 2003;9(11):1404–7.
20. Izumi T et al. HIV-1 viral infectivity factor interacts with TP53 to induce G2 cell cycle arrest and positively regulate viral replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2010;107(48):20798–20803.
21. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *J. Cell. Physiol.* 2000;182(3):311–322.
22. Combadiere B et al. CD4+Ki67+ Lymphocytes in HIV-Infected Patients are Effector T Cells Accumulated in G1 Phase of the Cell Cycle. *Eur. J. Cell Biol.* 2000;30:3598–3603.
23. Gandhi BRT et al. HIV-1 Directly Kills CD4 by a Fas-independent Mechanism. *J. Exp. Med.* 1998;187(7):1113–1122.
24. Doitsh G et al. Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. [Internet]. *Nature* 2014;505(7484):509–14.
25. Song J et al. Longitudinal Changes in Plasma Caspase-1 and Caspase-3 during the First 2 Years of HIV-1 Infection in CD4Low and CD4High Patient Groups [Internet]. *PLoS One* 2015;10(3):e0121011.
26. Carrette F, Surh CD. IL-7 signaling and CD127 receptor regulation in the control of T cell homeostasis [Internet]. *Semin. Immunol.* 2012;24(3):209–17.
27. Napolitano LA et al. Increased production of IL-7 accompanies HIV-1 – mediated T- cell depletion : implications for T-cell homeostasis. *Nat. Med.* 2001;7(1):73–79.
28. Mercier F et al. Persistent human immunodeficiency virus-1 antigenaemia affects the expression of interleukin-7Ralpha on central and effector memory CD4+ and CD8+ T cell subsets. [Internet]. *Clin. Exp. Immunol.* 2008;152(1):72–80.
29. Kalinowska M, Bazdar D a., Lederman MM, Funderburg N, Sieg SF. Decreased IL-7 Responsiveness Is Related to Oxidative Stress in HIV Disease [Internet]. *PLoS One* 2013;8(3):e58764.
30. Bazdar D a, Kalinowska M, Sieg SF. Interleukin-7 Receptor Signaling Is Deficient in CD4(+) T Cells from HIV-Infected Persons and Is Inversely Associated with Aging [Internet]. *J. Infect. Dis.* 2009;199(7):1019–1028.
31. Lozza L et al. The strength of T cell stimulation determines IL-7 responsiveness, secondary expansion, and lineage commitment of primed human CD4+IL-7Rhi T cells [Internet]. *Eur. J. Immunol.* 2008;38(1):30–39.



32. Fahey JL et al. Prognostic significance of plasma markers of immune activation, HIV viral load and CD4 T-cell measurements.. *AIDS* 1998;12(13):1581–1590.
33. Paiardini M, Müller-Trutwin M. HIV-associated chronic immune activation. [Internet]. *Immunol. Rev.* 2013;254(1):78–101.
34. Hunt PW et al. T Cell Activation Is Associated with Lower CD4 + T Cell Gains in Human Immunodeficiency Virus – Infected Patients with Sustained Viral Suppression during Antiretroviral Therapy. *J. Infect. Dis.* 2003;187(10):1534–1543.
35. Silvestri G et al. Nonpathogenic SIV Infection of Sooty Mangabeys Is Characterized by Limited Bystander Immunopathology Despite Chronic High-Level Viremia [Internet]. *Immunity* 2003;18(3):441–452.
36. Brenchley JM et al. Differential infection patterns of CD4+ T cells and lymphoid tissue viral burden distinguish progressive and nonprogressive lentiviral infections. [Internet]. *Blood* 2012;120(20):4172–81.
37. Paiardini M et al. Bone marrow-based homeostatic proliferation of mature T cells in nonhuman primates: implications for AIDS pathogenesis. [Internet]. *Blood* 2009;113(3):612–21.
38. Paiardini M et al. Low levels of SIV infection in sooty mangabey central memory CD4<sup>+</sup> T cells are associated with limited CCR5 expression. [Internet]. *Nat. Med.* 2011;17(7):830–836.
39. Silvestri G, Paiardini M, Pandrea I, Lederman MM, Sodora DL. Understanding the benign nature of SIV infection in natural hosts. *J. Clin. Invest.* 2007;117(11):3148–3154.
40. Deeks SG et al. Immune activation set point during early HIV infection predicts subsequent CD4+ T-cell changes independent of viral load. [Internet]. *Blood* 2004;104(4):942–7.
41. Palmer CS et al. Increased glucose metabolic activity is associated with CD4+ T-cell activation and depletion during chronic HIV infection. [Internet]. *AIDS* 2014;28(3):297–309.
42. Karim R et al. Association of HIV clinical disease progression with profiles of early immune activation: results from a cluster analysis approach. [Internet]. *AIDS* 2013;27(9):1473–81.
43. Koning F a et al. Low-level CD4+ T cell activation is associated with low susceptibility to HIV-1 infection [Internet]. *J. Immunol.* 2005;175(9):6117–6122.
44. Lederman MM et al. Immunologic failure despite suppressive antiretroviral therapy is related to activation and turnover of memory CD4 cells [Internet]. *J. Infect. Dis.* 2011;204(8):1217–1226.
45. Taiwo B et al. Associations of T cell activation and inflammatory biomarkers with virological response to darunavir/ritonavir plus raltegravir therapy [Internet]. *J. Antimicrob. Chemother.* 2013;68(8):1857–1861.
46. Bai F et al. Reduced central memory CD4+ T Cells and increased T-Cell activation characterise treatment-naive patients newly diagnosed at late stage of HIV infection [Internet]. *AIDS Res. Treat.* 2012;2012:314849.
47. Hazenberg MD et al. Persistent immune activation in HIV-1 infection is associated with progression to AIDS. [Internet]. *AIDS* 2003;17(13):1881–8.

48. Meditz AL et al. HLA-DR+ CD38+ CD4+ T Lymphocytes Have Elevated CCR5 Expression and Produce the Majority of R5-Tropic HIV-1 RNA In Vivo. [Internet]. *J. Virol.* 2011;85(19):10189–10200.
49. Merlini E et al. T-Cell Phenotypes, Apoptosis and Inflammation in HIV+ Patients on Virologically Effective cART with Early Atherosclerosis [Internet]. *PLoS One* 2012;7(9):e46073.
50. Kaplan RC et al. T cell activation predicts carotid artery stiffness among HIV-infected women. *Atherosclerosis* 2012;217(1):207–213.
51. Longenecker C et al. Markers of inflammation and CD8 T-cell activation, but not monocyte activation, are associated with subclinical carotid artery disease in HIV-infected individuals. [Internet]. *HIV Med.* 2013;14(6):385–390.
52. Antonelli LR V et al. Elevated frequencies of highly activated CD4+ T cells in HIV+ patients developing immune reconstitution inflammatory syndrome. [Internet]. *Blood* 2010;116(19):3818–27.
53. Reuter M a. et al. DNA-based HIV vaccines do not induce generalized activation in mucosal tissue T cells. *Hum. Vaccines Immunother.* 2012;8(11):1648–1653.
54. Malavasi F et al. CD38 and CD157 as Receptors of the Immune System: A Bridge Between Innate and Adaptive Immunity. *Mol. Med.* 2006;12(11-12):334–341.
55. Deaglio S, Mehta K, Malavasi F. Human CD38: A revolutionary story of enzymes and receptors. *Leuk. Res.* 2001;25(1):1–12.
56. Nata K et al. Human gene encoding CD38 (ADP-ribosyl cyclase/cyclic ADP-ribose hydrolase): Organization, nucleotide sequence and alternative splicing. *Gene* 1997;186(2):285–292.
57. 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 [Internet]. *J. Immunol.* 2002;169(6):3400–3406.
58. Orendi JM et al. Activation and cell cycle antigens in CD4+ and CD8+ T cells correlate with plasma human immunodeficiency virus (HIV-1) RNA level in HIV-1 infection.. *J. Infect. Dis.* 1998;178(5):1279–1287.
59. Jaspan HB et al. Immune activation in the female genital tract during HIV infection predicts mucosal CD4 depletion and HIV shedding. [Internet]. *J. Infect. Dis.* 2011;204(10):1550–6.
60. Espinosa E et al. Dissociation of CD154 and cytokine expression patterns in CD38+ CD4+ memory T cells in chronic HIV-1 infection.. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2010;55(4):439–445.
61. Olvera-García G, Espinosa E, Sieg SF, Lederman MM. Cytomegalovirus-specific responses of CD38+ memory T cells are skewed towards IFN- $\gamma$  and dissociated from CD154 in HIV-1 infection. [Internet]. *AIDS* 2014;28(3):311–6.
62. Rivino L et al. Chemokine receptor expression identifies Pre-T helper (Th)1, Pre-Th2, and nonpolarized cells among human CD4+ central memory T cells. [Internet]. *J. Exp. Med.* 2004;200(6):725–735.
63. Sallusto F, Lenig D, Mackay CR, Lanzavecchia A. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes.. *J. Exp. Med.* 1998;187(6):875–883.

64. Sallusto F, Lanzavecchia A. Heterogeneity of CD4<sup>+</sup> memory T cells: Functional modules for tailored immunity [Internet]. *Eur. J. Immunol.* 2009;39(8):2076–2082.
65. Chevalier N et al. CXCR5 expressing human central memory CD4 T cells and their relevance for humoral immune responses [Internet]. *J Immunol* 2011;186(10):5556–5568.
66. Morita R et al. Human Blood CXCR5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T Cells Are Counterparts of T Follicular Cells and Contain Specific Subsets that Differentially Support Antibody Secretion [Internet]. *Immunity* 2011;34(1):108–121.
67. Crotty S. Follicular helper CD4 T cells (TFH) [Internet]. *Annu. Rev. Immunol.* 2011;29:621–663.
68. He J et al. Circulating precursor CCR7<sup>lo</sup>PD-1<sup>hi</sup> CXCR5<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells indicate Tfh cell activity and promote antibody responses upon antigen reexposure [Internet]. *Immunity* 2013;39(4):770–781.
69. Förster R et al. A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen. *Cell* 1996;87(6):1037–1047.
70. Legler DF et al. B cell-attracting chemokine 1, a human CXC chemokine expressed in lymphoid tissues, selectively attracts B lymphocytes via BLR1/CXCR5.. *J. Exp. Med.* 1998;187(4):655–660.
71. Stubbe M, Vanderheyde N, Pircher H, Goldman M, Marchant A. Characterization of a subset of antigen-specific human central memory CD4<sup>+</sup> T lymphocytes producing effector cytokines [Internet]. *Eur. J. Immunol.* 2008;38(1):273–282.
72. Pallikkuth S et al. Impaired peripheral blood T-follicular helper cell function in HIV-infected nonresponders to the 2009 H1N1/09 vaccine [Internet]. *Blood* 2012;120(5):985–993.
73. Ding C, He X. K -means Clustering via Principal Component Analysis. In: *International Conference on Machine Learning*. 2004:
74. Catalfamo M et al. CD4 and CD8 T cell immune activation during chronic HIV infection: roles of homeostasis, HIV, type I IFN, and IL-7 [Internet]. *J. Immunol. (Baltimore, Md 1950)* 2011;186(4):2106–2116.
75. Kunkel EJ et al. Expression of the chemokine receptors CCR4, CCR5, and CXCR3 by human tissue-infiltrating lymphocytes.. *Am. J. Pathol.* 2002;160(1):347–355.
76. Mikhak Z, Strassner JP, Luster AD. Lung dendritic cells imprint T cell lung homing and promote lung immunity through the chemokine receptor CCR4. [Internet]. *J. Exp. Med.* 2013;210(9):1855–69.
77. Nouri-Aria KT et al. CCR4 in human allergen-induced late responses in the skin and lung. *Eur. J. Immunol.* 2002;32(7):1933–1938.
78. Horikoshi H et al. Differential susceptibility of resting CD4<sup>+</sup> T lymphocytes to a T-tropic and a macrophage ( M ) -tropic human immunodeficiency virus type 1 is associated with their surface expression of CD38 molecules. *Virus Res.* 2001;73(1):1–16.
79. Gosselin A et al. Peripheral blood CCR4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup> and CXCR3<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells are highly permissive to HIV-1 infection. [Internet]. *J. Immunol.* 2010;184(3):1604–1616.

80. Horikoshi H et al. Resting CD4(+) T cells with CD38(+)CD62L(+) produce interleukin-4 which contributes to enhanced replication of T-tropic human immunodeficiency virus type 1. [Internet]. *Virology* 2002;293(1):94–102.
81. Li Y et al. Interleukin-4 Up-Regulates T-Tropic Human Immunodeficiency Virus Type 1 Transcription in Primary CD4+ CD38+ T-Lymphocyte Subset. *Microbiol. Immunol.* 2005;49(2):155–165.
82. Brenchley JM et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. [Internet]. *Nat. Med.* 2006;12(12):1365–1371.
83. Campbell JJ et al. CCR7 Expression and Memory T Cell Diversity in Humans [Internet]. *J. Immunol.* 2001;166(2):877–884.
84. Locci M et al. Human circulating PD-1+CXCR3-CXCR5+ memory Tfh cells are highly functional and correlate with broadly neutralizing HIV antibody responses [Internet]. *Immunity* 2013;39(4):758–769.
85. Warnatz K. Dissecting CXCR5+ T cell populations - On the quest for a better understanding of B cell help during T dependent antibody responses [Internet]. *Eur. J. Immunol.* 2006;36(7):1662–1664.
86. Havenith SHC et al. CXCR5+CD4+ follicular helper T cells accumulate in resting human lymph nodes and have superior B cell helper activity [Internet]. *Int. Immunol.* 2014;26(3):183–192.
87. Schmitt N, Ueno H. Blood Tfh cells come with colors [Internet]. *Immunity* 2013;39(4):629–630.

