



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**  
**DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA**

**ESTIMULACIÓN COLATERAL DE LINFOCITOS HUMANOS EN  
REPOSO POR FACTORES INFLAMATORIOS: PAPEL EN LA  
HOMEOSTASIS Y EN LA EXPRESIÓN DE CXCR4**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:  
ISABEL RUELAS GALINDO

DIRECTORA DE TESIS  
DRA. LEONOR HUERTA HERNÁNDEZ  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

COMITÉ TUTOR  
DR. HÉCTOR ENRIQUE ESPINOSA ARCINIEGA  
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES  
RESPIRATORIAS  
DR. CARLOS ROSALES LEDEZMA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

MÉXICO, CDMX MAYO 2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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



## **AGRADECIMIENTOS**

- Los paquetes leucocitarios (*buffy coats*) de individuos sanos fueron obtenidos a través del Servicio de Medicina Transfusional del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

- Isabel Ruelas Galindo es estudiante de doctorado del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y recibió la beca 607520 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) de México.

- Este trabajo fue apoyado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (proyecto con número UNAM-PAPIIT IN215820).

- Agradezco al LabNalCit-UNAM (CONACYT) por la asistencia técnica en la adquisición de las muestras de citometría de flujo

- Agradezco al Dr. David Eduardo Meza Sánchez, de la Red de Apoyo a la Investigación, UNAM, por su asistencia en analizar los medios condicionados usando el Sistema Bio Plex 200 y el programa Bio-Plex Manager 6.1.

- Agradezco a la Dra. Leonor Huerta Hernández por su guía y compromiso como tutora y a los miembros de mi comité tutorial, al Dr. Héctor Enrique Espinosa Arciniega y al Dr. Carlos Rosales Ledezma por su continua ayuda, apoyo, comentarios y críticas durante el desarrollo de este proyecto de investigación.

- Agradezco al Comité Académico del Doctorado en Ciencias Biomédicas por el apoyo que se otorga a los estudiantes del programa.

- Agradezco a todos mis compañeros de laboratorio y a las personas que me acompañaron y apoyaron para concluir esta etapa de mi vida académica.



## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>ABREVIATURAS</b> .....	5
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	6
<b>I. ANTECEDENTES</b> .....	8
1. Linfocitos T CD4 humanos de memoria .....	8
1.1. Generalidades de los linfocitos T CD4.....	8
1.2. Generación y homeostasis de los linfocitos T CD4 de memoria.....	10
1.3. Supervivencia y proliferación homeostática de linfocitos T CD4 de memoria.....	14
1.4. Fenotipo de los linfocitos T CD4 de memoria.....	17
2. Activación canónica del TCR de los linfocitos T CD4.....	20
3. Activación colateral de los linfocitos T .....	22
<b>II. ANTECEDENTES DIRECTOS DE LA ACTIVACIÓN COLATERAL DE LINFOCITOS T CD4 HUMANOS EN REPOSO</b> .....	26
<b>III. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN</b> .....	29
<b>IV. HIPÓTESIS</b> .....	29
<b>V. OBJETIVOS</b> .....	29
<b>VI. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	31
1. Separación de PBMC, activación a través del TLR4 o del TCR, y recolección de los medios condicionados TLR4-CM y TCR-CM.....	31
1.1. Separación de PBMC.....	31
1.2. Activación de PBMC a través del TLR4 o del TCR y recolección de los medios condicionados TLR4-CM y TCR-CM.....	32
2. Análisis de citocinas y quimiocinas de los medios condicionados TLR4-CM y TCR-CM a través del inmunoensayo ProcartaPlex Multiplex.....	33
3. Purificación de linfocitos T CD4 humanos de memoria e incubación con los medios condicionados TLR4-CM o TCR-CM.....	34
3.1. Purificación de linfocitos T CD4 humanos de memoria.....	34
3.2. Incubación de linfocitos T CD4 humanos de memoria con los medios condicionados TLR4-CM o TCR-CM.....	35
4. Inmunofluorescencia para el análisis por citometría de flujo.....	37
4.1. Tinción con el colorante Ghost Dye Red 710 e inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales acoplados a fluorocromos para la detección de las moléculas de superficie CD3, CD4, CD45RO, CCR5, CXCR4, CD25 y CD54. Tinción celular para el análisis por citometría de flujo.....	37

4.2. Fijación y permeabilización intranuclear de anticuerpos monoclonales para la detección de la molécula Ki67.....	39
5. Análisis de resultados y análisis estadístico.....	40
<b>VII. RESULTADOS.....</b>	<b>42</b>
1. Citocinas y quimiocinas producidas por PBMC activadas a través del TLR4 o TCR.....	42
2. Efecto de los medios condicionados TLR4-CM y TCR-CM sobre la viabilidad de linfocitos T CD4 humanos de memoria.....	44
3. Los factores solubles provenientes de la activación a través del TLR4, pero no a través del TCR, promueven la expresión de CD3 y CD4.....	48
4. La expresión de CD45RO y de CCR5 es mantenida por los factores solubles provenientes de la activación a través del TLR4 y del TCR.....	52
5. Factores solubles provenientes de la activación a través del TLR4 y del TCR aumentan la expresión de CXCR4.....	55
6. La expresión de CD25 aumenta en presencia de los factores solubles provenientes de la activación a través del TCR.....	57
<b>VIII. DISCUSIÓN.....</b>	<b>60</b>
<b>IX. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>68</b>
<b>X. REFERENCIAS.....</b>	<b>69</b>
<b>XI. ANEXOS.....</b>	<b>88</b>
A. Estabilización de la expresión de las moléculas CD3 y CD4 en cultivos de linfocitos T CD4 humanos de memoria al día de purificación (día 0) y al día 2 de cultivo.....	88
B. Método de cultivo de linfocitos T CD4 humanos de memoria incubados con 1, 10 o 100 ng/ml de IL-7 o IL-15 durante 2, 5 y 8 días.....	89
C. Las concentraciones de 1 y 10 ng/ml de IL-15 mantienen la viabilidad de linfocitos T CD4 humanos de memoria por tiempos prolongados comparada con las mismas concentraciones de IL-7.....	90
D. Concentraciones de 1 y 10 ng/ml de IL-7 o IL-15 mantienen a los linfocitos T CD4 humanos de memoria con un fenotipo en reposo humanos.....	94
E. Fotografías tomadas con microscopio invertido de cultivos de PBMC activadas con anticuerpos anti-CD3/anti-CD28/anti-CD2 o con LPS.....	111
F. Linfocitos T CD4 humanos de memoria incubados con los medios condicionados TLR4-CM o TCR-CM mantienen un fenotipo en reposo.....	113
<b>XII. ARTÍCULOS PUBLICADOS.....</b>	<b>116</b>

## RESUMEN

Los linfocitos T CD4 en reposo pueden activarse por citocinas, independiente del reconocimiento de un antígeno, lo cual se ha observado en cultivos con suero fetal bovino y en combinación con citocinas y quimiocinas como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-2 o IL-4, IL-1 $\beta$ , IL-8 y MIP-1 $\alpha$ , en concentraciones de nanogramos. Se realizaron cultivos de linfocitos T CD4 humanos de memoria en medio AIM V con suero AB humano e IL-15, en presencia o ausencia de medios condicionados provenientes de células mononucleares de sangre periférica activadas con anticuerpos anti-CD3/anti-CD28/anti-CD2 (para la activación a través del receptor de célula T) o con lipopolisacáridos bacterianos (para la activación a través del receptor de tipo Toll-4). Las citocinas y quimiocinas presentes en los medios condicionados fueron evaluadas mediante el inmunoensayo de ProcartaPlex. Se determinó la viabilidad celular, la proliferación, y la expresión de moléculas de superficie (CD3, CD4, CD45RO, CCR5, CXCR4, CD25 y CD54) de los linfocitos T CD4 humanos de memoria mediante citometría de flujo al día 2, 5 y 8 de cultivo. La viabilidad se mantuvo a lo largo del cultivo con el medio condicionado proveniente de la activación del receptor de tipo Toll-4 (TLR4-CM), pero disminuyó en presencia del medio condicionado proveniente de la activación a través del receptor de célula T (TCR-CM). El TLR4-CM, pero no el TCR-CM, mantuvo la expresión estable de CD3 y CD4. Ambas condiciones estabilizaron la expresión de CD45RO y CCR5. De acuerdo con estos resultados, el TLR4-CM promovió la viabilidad y estabilidad del fenotipo de memoria. Ninguno de los medios condicionados indujo proliferación o expresión de marcadores de activación; sin embargo, indujeron un aumento en la expresión del receptor de quimiocina CXCR4, siendo este efecto mayor en

los linfocitos expuestos al TCR-CM. Este trabajo de investigación muestra que los linfocitos T CD4 de memoria no son activados, pero pueden ser sensibles a factores solubles producidos por células activadas con antígenos o patrones moleculares asociados a patógenos, los cuales pueden contribuir a su homeostasis y favorecer la expresión de CXCR4.

## ABSTRACT

Resting CD4 T lymphocyte can be activated by cytokines in an antigen independent manner, which has been observed in cultures with fetal bovine serum and in combination of cytokines and chemokines such as TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-2 o IL-4, IL-1 $\beta$ , IL-8, and MIP-1 $\alpha$ , in nanogram concentrations.

Cultures of memory human CD4 T lymphocytes were performed in AIM V medium with human AB serum and IL-15, in the presence or absence of conditioned medium from peripheral blood mononuclear cells activated using anti-CD3/anti-CD28/anti-CD2 antibodies (for the T cell receptor activation) or with bacterial lipopolysaccharide (for the Toll-like receptor 4 activation). Cytokines and chemokines present in the conditioned medium were evaluated by ProcartaPlex immunoassay. Cell viability, proliferation, and expression of surface molecules (CD3, CD4, CD45RO, CCR5, CXCR4, CD25, and CD54) on memory human CD4 T lymphocytes were determined by flow cytometry on day 2, 5 and 8 of culture. Cell viability was maintained throughout the culture with the conditioned medium from Toll-like receptor 4 activation (TLR4-CM) but decreased in the presence of the conditioned medium from T cell receptor activation (TCR-CM). The TLR4-CM, but not the TCR-CM, maintained the expression of CD3 and CD4 stable. Both conditions stabilized the expression of CD45RO and CCR5. Thus, the TLR4-CM supported better the viability and stability of the memory phenotype. None of the conditioned mediums induced proliferation or expression of activation markers; however, they induced an increased expression of CXCR4 chemokine receptor, being this effect higher in cells exposed to the TCR-CM. This research work shows that memory CD4 T lymphocytes are not activated by, but may be sensitive, to soluble factors produced by antigen or pathogen associated

molecular patterns-activated cells, which may contribute to their homeostasis and favor the CXCR4 expression.

## ABREVIATURAS

**AICD:** por sus siglas en inglés *Activation-induced cell death* (Muerte inducida por activación celular)

**APC:** por sus siglas en inglés *Antigen presentig cell* (Célula presentadora de antígeno)

**Bax:** por sus siglas en inglés *Bcl-2 associated X-protein* (Proteína X asociada a Bcl-2)

**Bcl:** por sus siglas en inglés *B-cell lymphoma* (Linfoma de célula B)

**BSA:** por sus siglas en inglés *Bovine serum albumin* (Albumina sérica bovina)

**Ca:** Calcio

**CCL:** por sus siglas en inglés *Cysteine-cysteine ligand* (Ligando cisteína-cisteína)

**CCR:** por sus siglas en inglés *Cysteine-cysteine chemokine receptor* (Receptor de quimiocina cisteína-cisteína)

**CD:** por sus siglas en inglés *Cluster of differentiation* (Grupo de diferenciación)

**cGAMP:** por sus siglas en inglés *Cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate* (Monofosfato de guanosina-monofosfato de adenosina cíclico)

**CM:** por sus siglas en inglés *Conditioned medium* (Medio condicionado)

**CXCL:** por sus siglas en inglés *Cysteine-X-cysteine ligand* (Ligando cisteína-X-cisteína)

**CXCR:** por sus siglas en inglés *Cysteine-X-cysteine chemokine receptor* (Receptor de quimiocina cisteína-X-cisteína)

**FBS:** por sus siglas en inglés *Fetal bovine serum* (Suero fetal bovino)

**ICAM:** por sus siglas en inglés *Intercellular adhesion molecule* (Molécula de adhesión intercelular)

**IFN:** interferón

**IL:** interleucina

**IMF:** Intensidad media de fluorescencia

**LFA:** por sus siglas en inglés *Lymphocyte function-associated antigen* (Antígeno asociado a la función de los linfocitos)

**LPS:** por sus siglas en inglés *Lipopolysaccharide* (Lipopolisacárido)

**MACS:** por sus siglas en inglés *Magnetic-activated cell sorting* (Clasificación de células activadas magnéticamente)

**MAPK:** por sus siglas en inglés *Mitogen-activated protein kinase* (Proteína quinasa activadas por mitógenos)

**Mel:** por sus siglas en inglés *Myeloid cell leukemia* (Leucemia de células mieloides)

**MHC:** por sus siglas en inglés *Major histocompatibility complex* (Complejo principal de histocompatibilidad)

**NFκB:** por sus siglas en inglés *Nuclear factor-kappa B* (Factor nuclear kappa B)

**PAMP:** por sus siglas en inglés *Pathogen-associated molecular patterns* (Patrones moleculares asociados a patógenos)

**PBMC:** por sus siglas en inglés *Peripheral blood mononuclear cells* (Células mononucleares de sangre periférica)

**PBS:** por sus siglas en inglés *Phosphate-buffered saline* (Buffer fosfato salino)

**Suero hAB:** suero AB humano

**Tc:** por sus siglas en inglés *T citotoxic* (T citotóxica)

**TCR:** por sus siglas en inglés *T cell receptor* (Receptor de célula T)

**T<sub>FH</sub>:** por sus siglas en inglés *T follicular helper* (T colaboradora folicular)

**TGF:** por sus siglas en inglés *Transforming growth factor* (Factor de crecimiento transformador)

**T<sub>H</sub>:** por sus siglas en inglés *T helper* (T colaboradora)

**TLR:** por sus siglas en inglés *Toll-like receptor* (Receptor de tipo *Toll*)

**TNF:** por sus siglas en inglés *Tumor necrosis factor* (Factor de necrosis tumoral)

**T<sub>Reg</sub>:** T reguladora

**VIH:** Virus de inmunodeficiencia humana

## INTRODUCCIÓN

Los linfocitos T CD4 humanos en reposo comprenden las poblaciones celulares *naïve* y de memoria, y pueden distinguirse por la expresión de moléculas de superficie como CD45RA y CD45RO, respectivamente. Estas células tienen la característica de presentar una vida prolongada y proliferación homeostática (división intermitente sin cambios en el fenotipo celular), inducida por el contacto con citocinas como IL-7 y/o IL-15, y/o interacciones de baja afinidad con un péptido acoplado al MHC expresado en la superficie de otras células. Gran parte de la evidencia acerca de la supervivencia y proliferación homeostática de linfocitos T CD4 en reposo se ha realizado en modelos de ratón, y existe poca información sobre el cultivo de linfocitos T CD4 humanos en reposo por tiempos prolongados y en ausencia de suero fetal bovino (FBS). Se decidió usar suero AB humano en lugar del FBS para reducir la exposición a las altas concentraciones de factores de crecimiento presentes en el FBS (**Castells-Sala *et al.*, 2017; Subbiahanadar Chelladurai *et al.*, 2021**).

Se ha propuesto que los linfocitos en reposo son blanco de un proceso llamado activación colateral (*bystander activation*) (**Tough *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1998; Geginat *et al.*, 2001; Di Genova *et al.*, 2006**), el cual se describe como los cambios fenotípicos y funcionales inducidos por mecanismos independientes del contacto antígeno específico y el receptor de célula T (TCR) (**Bangs *et al.*, 2006; Bangs *et al.*, 2009**), e inducidos por citocinas y quimiocinas como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-2 o IL-4, IL-1 $\beta$ , IL-8 y MIP-1 $\alpha$ , producidas por otras células activadas vía el TCR, durante infecciones virales como el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), o vía los receptores de tipo Toll (TLRs) como el



receptor de tipo Toll-4 (TLR4) y su activación por la presencia de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) como los lipopolisacáridos (LPS) bacterianos (**Boyman, 2010; Pacheco *et al.*, 2019**).

De manera que un medio proinflamatorio compuesto por citocinas y quimiocinas generadas por células inmunes activadas podrían estar teniendo un efecto sobre linfocitos T en reposo. Para fines de este proyecto de investigación, se cultivaron linfocitos T CD4 humanos de memoria en un medio de cultivo AIM V en presencia de IL-15 y 5% de suero AB humano, y se determinaron los efectos de factores solubles provenientes de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) estimuladas a través del TCR o del TLR4, sobre la viabilidad celular, la proliferación y moléculas de superficie a lo largo de 8 días de cultivo. Este enfoque se podría asemejar a los posibles efectos de un medio proinflamatorio sobre los linfocitos T CD4 en reposo durante una respuesta inmune.

## **I. ANTECEDENTES**

### **1. Linfocitos T CD4 humanos de memoria.**

#### **1.1. Generalidades de los linfocitos T CD4.**

Existen dos subpoblaciones de linfocitos T que expresan en su superficie las moléculas CD4 o CD8, y presentan distintas funciones durante una respuesta inmune. Los linfocitos T que expresan en la superficie celular la molécula CD4, reconocen a través de su receptor de célula T (TCR) los péptidos unidos al complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase II expresada en la superficie de células presentadoras de antígenos (APC) profesionales. Esta interacción diferencia a los linfocitos CD4 en linfocitos T colaboradores ( $T_H$ ), los cuales producen citocinas que polarizan hacia un tipo de respuesta inmune. Mientras que los linfocitos T que expresan la molécula CD8, reconocen a través de su TCR los péptidos antigénicos unidos al MHC de clase I expresado en todas las células, promoviendo así la diferenciación de los linfocitos CD8 a linfocitos T citotóxicos ( $T_C$ ), los cuales llevan a la eliminación de la célula blanco (**Guégan & Legembre, 2018**).

Los linfocitos CD4 activados y diferenciados participan como intermediarios en la respuesta inmune adaptativa, mediante la estimulación de otras células inmunes. Tienen la capacidad de responder contra una variedad de infecciones y células cancerosas heterogéneas, diferenciándose en varios linajes de linfocitos efectores que se caracterizan por expresar diversos factores de transcripción que llevan al linfocito T a secretar citocinas específicas, como son los linfocitos  $T_H1$  que producen principalmente  $IFN\gamma$ , los linfocitos

T<sub>H</sub>2 que secretan IL-4, IL-5 e IL-13, los linfocitos T<sub>H</sub>9 que producen IL-9, los linfocitos T colaboradores foliculares (T<sub>FH</sub>) que producen IL-21, los linfocitos T<sub>H</sub>17 que producen IL-17 e IL-22 y los linfocitos T reguladores (T<sub>Reg</sub>) que producen IL-10 y TGF- $\beta$  (**DuPage & Bluestone, 2016**). Esta polarización celular depende de estímulos externos, y va dirigida tanto a células inmunes innatas como adaptativas para responder específicamente al evento que impulsa el tipo de respuesta.

Una característica importante de estos linfocitos es la capacidad de migrar desde la sangre hacia diferentes tejidos mediante interacciones con las células endoteliales por medio de selectinas e integrinas que permiten su arresto y extravasación. Además, los linfocitos recirculan de los vasos linfáticos hacia la sangre a través del ducto torácico (**Guégan & Legembre, 2018**).

La respuesta inmune finaliza con la eliminación del antígeno y gran parte de los linfocitos T CD4 efectoras (activados) son eliminadas (>90-95%) por el proceso de apoptosis llamado muerte inducida por activación celular (AICD), y sólo un pequeño porcentaje sobrevive y se diferencia en linfocitos T CD4 de memoria (de vida larga) (**Hammarlund et al., 2003; Farber et al., 2014**). A diferencia de los linfocitos T CD4 *naïve* (linfocitos que no han tenido contacto con su antígeno específico), los linfocitos T CD4 de memoria adquieren una experiencia antigénica que persiste y puede proporcionar protección de por vida contra una gran diversidad de patógenos. A diferencia de la diversidad de clonotipos presente en la población *naïve* (dado por la variabilidad del TCR), los linfocitos humanos T de memoria han revelado clonotipos conservados y con menor diversidad (**Robins et al., 2009; Robins et al., 2010**).

Otra característica de los linfocitos T de memoria es que exhiben bajos umbrales de activación y respuestas efectoras rápidas incluso en presencia de bajas dosis de antígeno

y/o con bajos niveles de coestimulación, comparando con los linfocitos T *naïve* (**Rogers et al., 2000; London et al., 2000; Berard & Tough, 2002; Farber, 2009**).

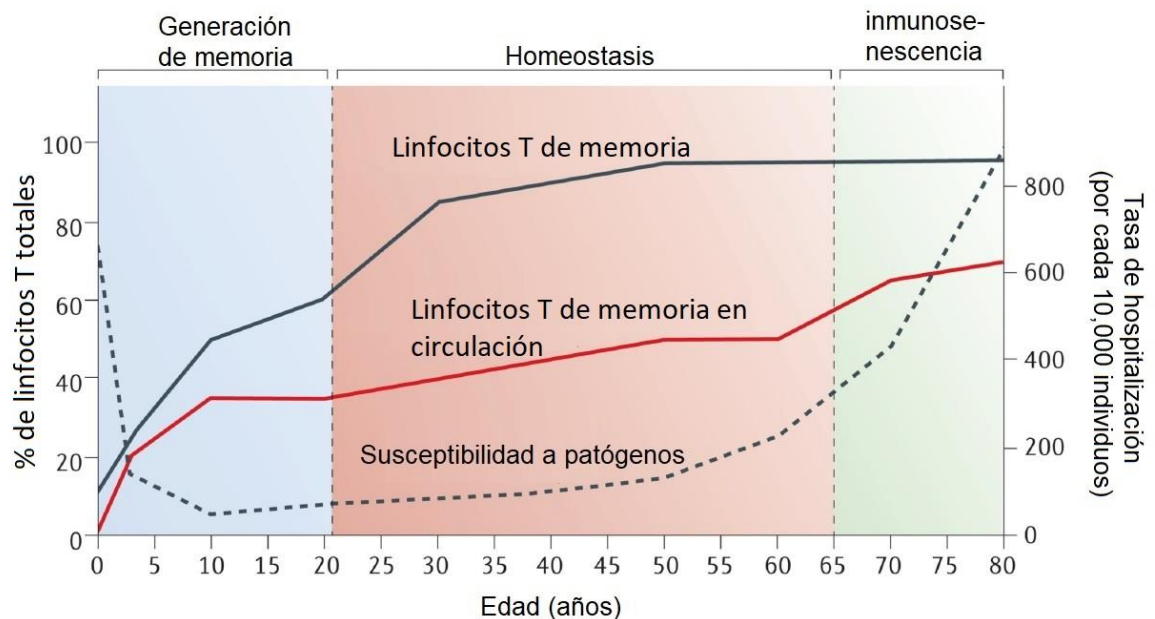
## 1.2. Generación y homeostasis de los linfocitos T CD4 de memoria.

*In vivo*, la vida media de los linfocitos *naïve* humanos es alrededor de 1-10 años mientras que la vida media de los linfocitos de memoria es de 1-12 meses (**Michie et al., 1992; De Boer & Perelson, 2013**). Se ha observado que los linfocitos *naïve* se mantiene por mayor tiempo en interfase con un recambio celular lento, en cambio, los linfocitos de memoria se mantienen menos tiempo en interfase y su recambio celular es más rápido que el de las *naïve* (**Tough & Sprent, 1994**). En cuanto a las subpoblaciones de linfocito T CD4 y CD8, los linfocitos CD4 tienen una vida media más corta (**Vukmanovi-Stejic et al., 2006**). Estas diferencias podrían indicar la presencia de diversos mecanismos homeostáticos.

En la **figura 1** se observa la dinámica de la frecuencia de los linfocitos T de memoria a lo largo de la vida de un individuo, la cual se puede dividir en tres fases: generación, homeostasis e inmunosenescencia (**Farber et al., 2014**).

Al nacer, todos los linfocitos T en la sangre periférica de los seres humanos son *naïve*, y durante la primera década se observa un dramático incremento en la proporción de linfocitos T de memoria en circulación debido a la alta exposición a patógenos, disminuyendo la susceptibilidad a estos. Posteriormente, para la segunda década de vida, se estima que el 35% de los linfocitos T en circulación corresponde a linfocitos de memoria (**Cossarizza et al., 1996**). Durante el rango de los 20-25 años la frecuencia de estos

linfocitos llega a una meseta, manteniéndose estable durante la edad adulta (Saule *et al.*, 2006; Sathaliyawala *et al.*, 2013), momento en el cual el número de linfocitos que vienen del timo comienza a reducirse y los linfocitos de memoria comienzan a ser mantenidas a través de la renovación celular homeostática (den Braber *et al.*, 2012). Después de décadas de una estabilidad en la frecuencia, la proporción y funcionamiento de los linfocitos T de memoria se comienza a ver alterada durante la inmunosenescencia que inicia entre los 65-70 años (Cossarizza *et al.*, 1996; Saule *et al.*, 2006; Goronzy & Weyand, 2013), y paradójicamente, los linfocitos T de memoria en circulación aumentan. Se ha propuesto que la infección persistente del citomegalovirus humano es la principal causa de este aumento (Tu & Rao, 2016),



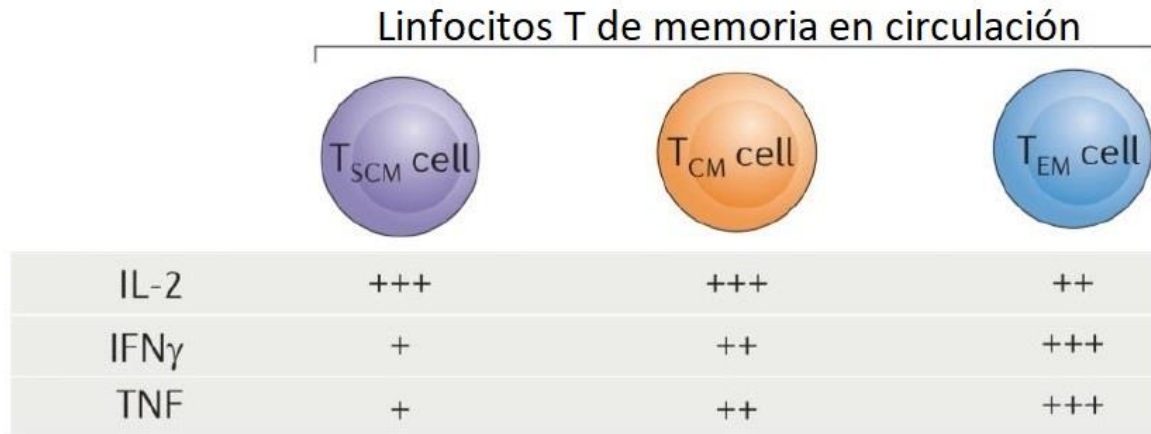
**Figura 1. Frecuencia de linfocitos T de memoria y susceptibilidad a patógenos a lo largo de la vida humana.** Los linfocitos T de memoria pasan a través de tres fases distintas: generación de linfocitos de memoria, homeostasis e inmunosenescencia. Posterior al nacimiento la frecuencia de los linfocitos de memoria (línea negra y roja) comienzan a incrementar hasta llegar a una meseta y se correlacionan inversamente con la susceptibilidad a patógenos (línea punteada), calculada como la tasa de hospitalización por enfermedades infecciosas. Ilustración tomada y modificada de Farber *et al.*, 2014.

Los linfocitos de memoria circulan a través del cuerpo, y pueden encontrarse tanto en tejidos no linfoides como en órganos linfoides secundarios, donde responden al reencuentro de su antígeno específico. En un adulto, la frecuencia de los linfocitos T totales en sangre periférica representa sólo del 2-2.5% del total de linfocitos T en el cuerpo (**Ganusov & De Boer, 2007**), y de este porcentaje, los linfocitos T de memoria representa alrededor del 40-50% del total de los linfocitos T en circulación (**figura 1**). Por otro lado, los linfocitos T de memoria representan la subpoblación de linfocitos T predominante en mucosa, piel, bazo y médula ósea (**Ganusov & De Boer, 2007; Mueller et al., 2013**). Se ha propuesto que los linfocitos de memoria son retenidas en distintos compartimentos anatómicos posiblemente como un mecanismo que estabiliza y preserva a los linfocitos T de memoria específicas contra patógenos, manteniendo así una homeostasis inmunológica en el cuerpo (**Farber et al., 2014**).

La población de linfocitos T de memoria es altamente heterogénea y se han descrito diversas subpoblaciones dependiendo de sus características fenotípicas, efectoras y por su distribución en los tejidos. En sangre periférica, se han dividido principalmente en linfocitos T de memoria central ( $T_{CM}$ ) y de memoria efectoras ( $T_{EM}$ ). Aunque ambas subpoblaciones tienen la capacidad de responder a antígenos (**Champagne et al., 2001; Ellefsen et al., 2002; Pédrón et al., 2011; Wang et al., 2012**), los linfocitos  $T_{CM}$  se caracterizan por tener una alta capacidad proliferativa (**Fearon et al., 2006; Wang et al., 2012**), producir mayor cantidad de interleucina-2 (IL-2) y circular hacia los tejidos linfáticos, mientras que los linfocitos  $T_{EM}$  producen más citocinas efectoras y circulan a múltiples tejidos periféricos (**Lanzavecchia & Sallusto, 2002**). La vida media de los linfocitos  $T_{CM}$  es más corta que los linfocitos  $T_{EM}$  (**Vukmanovic-Stejić et al., 2006**).

Existen otros tipos de subpoblaciones de linfocitos T de memoria. Se ha descrito una población que puede ser encontrada en circulación llamada células madre T de memoria ( $T_{SCM}$ ), las cuales exhiben un alto potencial de supervivencia y capacidad proliferativa, y fenotípicamente se parecen a los linfocitos *naïve*. Además, tienen la capacidad de renovarse y ser multipotentes, pues pueden diferenciarse a linfocitos  $T_{EM}$  o  $T_{CM}$  (**Gattinoni et al., 2010; Gattinoni et al., 2011**). Otra subpoblación, llamados linfocitos T de memoria “residentes de tejido” ( $T_{RM}$ ) están presentes sólo en tejido y no se encuentran en circulación (**Purwar et al., 2011; Clark et al., 2012; Sathaliyawala et al., 2013**).

En sangre periférica de individuos sanos, gran parte de los linfocitos de memoria circulantes producen  $IFN\gamma$ , IL-2 y/o TNF después de una corta estimulación (**Figura 2**), y una baja proporción produce IL-4, IL-10 e IL-17 (**Zhang et al., 2010; Gattinoni et al., 2011**). En cuanto a las subpoblaciones de linfocitos de memoria, los linfocitos  $T_{EM}$  tienen una gran proporción de células productoras de  $IFN\gamma$  y TNF, y pocas son productoras de IL-2. Los linfocitos  $T_{SCM}$  tienen una baja proporción de células productoras de  $IFN\gamma$  y TNF, con una mayor proporción de células productoras de IL-2 que los linfocitos  $T_{EM}$ . Por último, la subpoblación de linfocitos  $T_{CM}$  tiene la mayor frecuencia de las células productoras de IL-2, y una frecuencia de células productoras de  $IFN\gamma$  y TNF intermedia, entre  $T_{EM}$  y  $T_{SCM}$  (**Gattinoni et al., 2011; Gattinoni et al., 2012**).



**Figura 2. Esquema del grado de producción de citocinas entre las diferentes subpoblaciones de linfocitos T de memoria.** Las tres poblaciones de memoria son capaces de producir interleucina-2 (IL-2), interferón- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) y factor de necrosis tumoral (TNF), pero difieren en el grado y la calidad de estas respuestas. Ilustración tomada y modificada de Farber *et al.*, 2014.

### 1.3. Supervivencia y proliferación homeostática de linfocitos T CD4 de memoria.

Los linfocitos T CD4 de memoria y *naïve* son considerados como células en reposo debido a la división celular intermitente sin cambios en su fenotipo, proceso llamado proliferación homeostática. Los linfocitos T CD4 de memoria presentan una mayor regulación positiva transcripcional de genes que codifican marcadores de activación acoplados al TCR en comparación con los linfocitos T *naïve*, incluyendo múltiples moléculas asociadas al MHC de clase II, receptores de quimiocinas, CD95 (Fas) y moléculas efectoras (Weng *et al.*, 2012). *In vivo*, a diferencia de los linfocitos *naïve* donde las células son mantenidas como células individuales con una vida media prolongada y una baja tasa de proliferación, los linfocitos de memoria son mantenidos como clonas específicas que expresan un TCR único, y presentan un recambio más rápido (Macallan *et al.*, 2003; Macallan *et al.*, 2004; Vukmanovic-Stejic *et al.*, 2006).



Las principales citocinas descritas que promueven la supervivencia y la proliferación homeostática de los linfocitos T en reposo son las citocinas IL-2, IL-4, IL-7 e IL-15 (**Boise et al., 1995a; Vella et al., 1997; Nakajima et al., 1997**) que comparten la subunidad  $\gamma_c$  (gamma común o CD132) del receptor de IL-2. También se ha reportado el efecto de IL-6 (**Teague et al., 1997**). Otros factores que se han descrito en la participación de la supervivencia y proliferación homeostática son las señalizaciones tónicas mediante interacciones de reactividad cruzada entre el TCR y auto-antígenos, antígenos ambientales y/o antígenos microbianos de organismos comensales residentes en los tejidos (**Surh & Sprent, 2008; Farber et al., 2014**).

Se ha demostrado que la supervivencia prolongada y la proliferación homeostática *in vivo* de los linfocitos T CD4 humanos *naïve* es inducida por mecanismo periféricos y timopoyéticos, aunque durante la involución del timo asociado a la edad, la preservación del *pool* de linfocitos *naïve* es principalmente por mecanismos periféricos, siendo la IL-7 el principal inductor de la supervivencia, promoviendo la expresión de moléculas anti-apoptóticas como Bcl-2 (linfoma de célula B2), Bcl-xL y Mcl-1 (leucemia de células mieloides 1) (**Silva & Sousa, 2016; Silva et al., 2017**). La principal fuente de IL-7 en los ganglios linfáticos son las células fibroblásticas reticulares, mientras que en la médula ósea y en el timo es producida por células estromales (**Link et al., 2007**). Los linfocitos *naïve* producidas en el timo salen a la periferia, donde circulan a través de la sangre y órganos linfoides secundarios, compitiendo entre ellas por la IL-7.

Por otro lado, el mantenimiento del *pool* de linfocitos T CD4 humanos de memoria no está completamente entendido, y es posible que diferentes mecanismos contribuyan a la supervivencia y recambio homeostático de las diferentes subpoblaciones de memoria en diferentes compartimentos, tanto en circulación como en distintos tejidos. Se ha descrito un

mecanismo importante que podría estar manteniendo de forma homeostática a las poblaciones de memoria. Durante una infección, los linfocitos de memoria que no son específicos pueden activarse a través de un fenómeno llamado inmunidad heteróloga (reactividad cruzada) (**Welsh & Selin, 2002; Clute et al., 2005**).

Se ha reportado que los linfocitos T CD4 de memoria requieren IL-7 e IL-15 (**Surh & Sprent, 2008; Chetoui et al., 2010; Litvinova et al., 2013**), y no está bien establecido si necesitan el contacto con el antígeno-MHC de clase II (señalización a través del TCR) para su mantenimiento funcional y homeostasis como los linfocitos *naïve* (**Kassiotis et al., 2002; Kassiotis et al., 2006; Surh et al., 2006; van Leeuwen et al., 2009; Boyman et al., 2009; Bushar et al., 2010; Gasper et al., 2014**). Gran parte de los linfocitos T CD4 de memoria recircula hacia la médula ósea, donde residen células del estroma productoras de IL-7 (**Tokoyoda et al., 2009; Di Rosa & Gebhardt, 2016**). Por otro lado, la IL-15 es producida por monocitos/macrófagos, células dendríticas, epiteliales, células del estroma de la médula ósea y fibroblastos, en inmunopatologías o durante la respuesta inmune a patógenos microbianos y parásitos en tejido no linfático y epitelial, así como en los tractos respiratorios y gastrointestinales (**Badolato et al., 1997; Fehniger & Caligiuri, 2001; Perera et al., 2012**). De igual manera, la IL-15 induce la expresión de moléculas anti-apoptóticas como Bcl-2 y Bcl-xL (**Nolz & Richer, 2020**), inhibe la apoptosis inducida por CD95 (**Mueller et al., 2003**) y a la proteína proapoptótica Bax (**Oh et al., 2008**), promoviendo de esta manera la supervivencia celular.

Gran parte de la evidencia acerca de la supervivencia y proliferación homeostática de los linfocitos T en reposo proviene de modelos de ratón deficientes de citocinas, receptores de citocinas, moléculas MHC y/o componentes de la cascada de señalización del TCR (**Surh & Sprent, 2008**). *In vitro*, la información sobre la supervivencia y la

homeostasis de los linfocitos T CD4 humanos en reposo es escasa (**Michie *et al.*, 1992; Boise *et al.*, 1995a; Hamann *et al.*, 1996; Farber *et al.*, 2014**), y de estos estudios, los cultivos se mantienen por periodos cortos (de 24 a 48 horas) o en presencia de otras células, por lo que también es relevante su estudio de forma separada, pues de acuerdo a la literatura, cada subpoblación requiere de diferentes condiciones para su supervivencia y proliferación homeostática.

#### **1.4. Fenotipo de los linfocitos T CD4 de memoria.**

La expresión de receptores de quimiocinas también ha ayudado a clasificar a los diferentes tipos de linfocitos T humanos de memoria, aunque esta expresión puede ser transitoria dependiendo del microambiente (**Dutton *et al.*, 1998; Campbell *et al.*, 2003**) y no permite delimitar funcionalmente de manera consistente las diferentes subpoblaciones de linfocitos T de memoria (**Andrew *et al.*, 2001**).

Una forma general de caracterizar fenotípicamente a los linfocitos T CD4 humanos de memoria provenientes de sangre periférica es a través de la presencia de las moléculas de superficie CD3, CD4, CD45RO (o la ausencia de CD45RA) y CCR7. Esta combinación de marcadores permite la identificación de las subpoblaciones de linfocitos T<sub>SCM</sub>, T<sub>CM</sub> y T<sub>EM</sub> (**Farber *et al.*, 2014**). Aunque se pueden utilizar otros marcadores como CD28 y CD95 para distinguir otras subpoblaciones de linfocitos T de memoria que se han descrito como los linfocitos T de memoria de transición (T<sub>TE</sub>) y linfocitos T de memoria efectoras terminales (T<sub>EMRA</sub>) (**Mahnke *et al.*, 2013**).

La molécula CD3 es expresada por todos los linfocitos T y se asocia al TCR (**Smith-Garvin *et al.*, 2009**), formando un complejo para la transducción de la señal posterior al reconocimiento del antígeno asociado al MHC. El complejo CD3-TCR es internalizado y degradado para la desensibilización del linfocito T (y que no haya una sobreestimulación) (**Liu *et al.*, 2000**), mientras que la activación con superantígenos induce su internalización y reciclaje (**Bronstein-Sitton *et al.*, 1999**).

Durante la activación del linfocito T CD4 a través del TCR, además de la participación de CD3, las moléculas CD4 y CD45RO tienen diversas funciones para llevar a cabo una activación eficiente. CD4 funciona como correceptor para el reconocimiento del MHC de clase II y la transducción de la señalización intracelular (**Geginat *et al.*, 2014**; **Glatzová & Cebecauer, 2019**). CD45RO es la isoforma de bajo peso molecular de la molécula tirosina fosfatasa transmembranal CD45, está presente en los linfocitos activados y de memoria, y regula la actividad de la quinasa Lck, encargada de iniciar la transducción de la señalización del complejo CD3-TCR (**Arlettaz *et al.*, 1999**; **Dunlock *et al.*, 2022**). Además de la señal que induce el péptido-MHC, son necesarias señales coestimuladoras para una activación y expansión óptima del linfocito. La molécula CD28 representa la principal molécula coestimuladora expresada constitutivamente en los linfocitos T (con excepción de las subpoblaciones T<sub>EM</sub> y T<sub>TE</sub>) que se une a las moléculas B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86) presentes en las APC, resultando en el aumento de la proliferación del linfocito T, producción de citocinas y supervivencia (**Linsley *et al.*, 1991**; **Boise *et al.*, 1995b**).

El mecanismo por el cual los linfocitos *naïve* y de memoria salen a circulación y regresan a los órganos linfoides secundarios, es a través de la expresión del receptor de quimiocina CCR7, el cual tiene como ligando las quimiocinas CCL19 y CCL21 producidas

por las células reticulares fibroblásticas (**Kobayashi et al., 2017; Yan et al., 2019**), mismas que producen IL-7 (**MacLeod et al., 2010**).

La molécula CD95, es considerada un antígeno de activación, el cual es un miembro de la familia de factor de necrosis tumoral/factor de crecimiento nervioso-R (TNF/NGF-R). Se ha demostrado que esta molécula es expresada por los linfocitos T después de la estimulación con el antígeno, así como en toda la población de memoria (**Fagnoni et al., 2000**). Aunque CD95 se ha relacionado como inductor de muerte celular, involucrado en la señalización de la vía apoptótica, se ha visto que posterior a la activación a través del TCR, CD95 se agrega con CD3 y aumenta la proliferación del linfocito T, aunque continua la interrogante sobre su papel exacto durante la activación celular. En cuanto a su expresión en la población de linfocitos de memoria, se ha propuesto su papel como una respuesta no apoptótica que acelera el proceso de diferenciación/maduración de linfocitos T *naïve* (**Guégan & Legembre, 2018**).

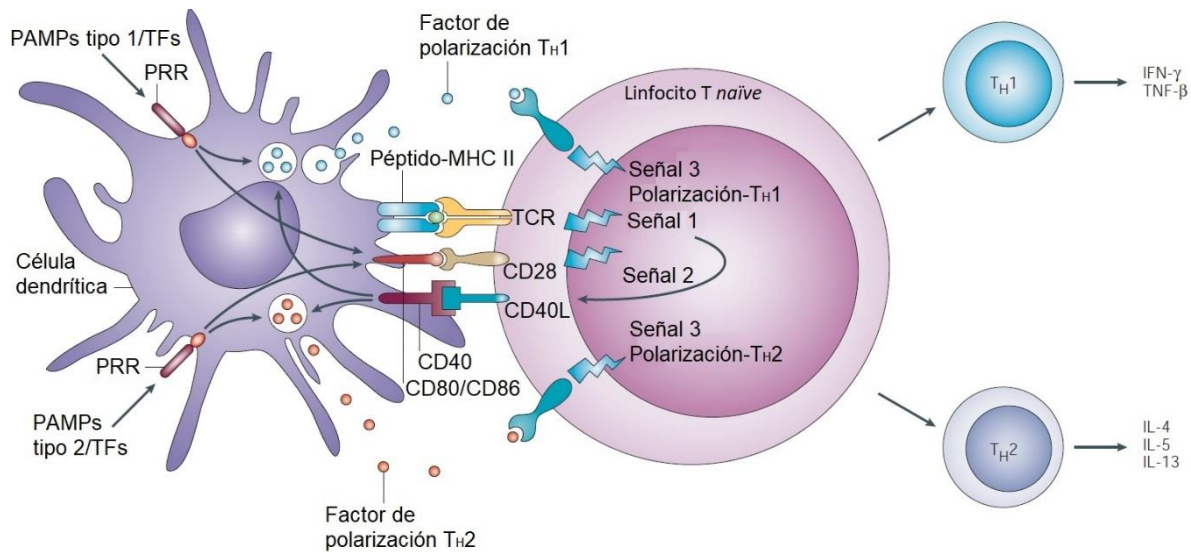
Además, las diferentes subpoblaciones de linfocitos T CD4 de memoria expresan diferentes moléculas de superficie (**Mahnke et al., 2013**). Entre estas moléculas, para fines de este trabajo de investigación, se encuentran los receptores de quimiocina CXCR4 y CCR5, las cuales regulan la migración celular y participan como correceptores en la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) (**Contento et al., 2008**). CXCR4 es el receptor de la quimiocina CXCL12 (SDF-1A), se expresa constitutivamente en toda la población T CD4 de memoria, y su función es dirigir al linfocito hacia la médula ósea (**Contento et al., 2008; Mahnke et al., 2013; Bianchi & Mezzapelle, 2020**). CCR5 es el receptor de las quimiocinas CCL3 (MIP-1a), CCL4 (MIP-1b) y CCL5 (RANTES) y su función es dirigir al linfocito hacia tejido inflamado. Este receptor se expresa en toda la población T CD4 de memoria con excepción de los linfocitos T<sub>SCM</sub> (**Contento et al., 2008;**

Mahnke *et al.*, 2013; Mukaida *et al.*, 2020; Ntanasis-Stathopoulos *et al.*, 2020; Zeng *et al.*, 2022)

## 2. Activación canónica del TCR de los linfocitos T CD4.

Actualmente, se entiende por activación del linfocito T como un resultado del proceso en el que interaccionan APC y linfocitos T en reposo (*naïve* o de memoria) formando una compleja estructura llamada sinapsis inmunológica. La APC presenta un antígeno específico a través del MHC y es reconocido por el TCR. Además de este reconocimiento, el proceso de activación necesita la participación de moléculas coestimuladoras y de adhesión, así como la presencia de citocinas que llevan a la diferenciación y polarización del linfocito T (ej. T<sub>H1</sub> o T<sub>H2</sub>) (Pettmann *et al.*, 2018; Castro-Sánchez *et al.*, 2019; Hilligan & Ronchese, 2020) (figura 3).

La activación, a través del reconocimiento del antígeno-MHC-TCR, induce cambios celulares, moleculares y de metabolismo en ambas células. Están descritas diversas formas de estudiar estos cambios, como las cascadas de señalización intracelulares (Smith-Garvin *et al.*, 2009; Castro-Sánchez *et al.*, 2019), medición del Ca<sup>2+</sup> intracelular (Joseph *et al.*, 2014), el reordenamiento de la actina (Colin-York *et al.*, 2019), el metabolismo (MacIver *et al.*, 2013; Ren *et al.*, 2017), expresión de moléculas de superficie (Holthaus *et al.*, 2018), proliferación (Motamedi *et al.*, 2016), capacidad de cooperación con el linfocitos B (Lebrec *et al.*, 2014), secreción de citocinas y quimiocinas (DuPage *et al.*, 2016), y AICD (Shin *et al.*, 2019), entre otras.



**Figura 3. Esquema de la interacción célula dendrítica y linfocito T CD4 durante la presentación de un péptido, y las señales para su polarización.** La célula dendrítica activada presenta a través del MHC de clase II un péptido procesado proveniente de patógenos internalizados a través de PRR (por sus siglas en inglés *pattern recognition receptors*) especializados, y es reconocido a través del TCR del linfocito T CD4, mientras CD4 participa como correceptor CD4 (señal 1). Este acercamiento celular promueve la interacción de las moléculas coestimuladoras CD28 expresada en el linfocito T, con las moléculas CD80 y CD86 expresadas por la célula dendrítica posterior al reconocimiento de los PAMP (por sus siglas en inglés, *pathogen-associated molecular patterns*) o TF (por sus siglas en inglés, *inflammatory tissue factors*) a través de los PRR especializados, como los TLR (*Toll-like receptors*) (señal 2). Estas interacciones inducen la expresión de varios factores solubles o factores de unión a membrana, como la interleucina-12 (IL-12) y el ligando 2 de quimiocina CC (CCL2), que promueven el desarrollo de linfocitos TH1 o TH2, respectivamente (señal 3). La naturaleza de la señal 3 depende de la activación de determinados PRR por PAMP o TF. Los PAMP y TF de tipo 1 y tipo 2 se pueden definir como aquellos que selectivamente activan a las células dendríticas para la producción de altos niveles de factores polarizadores de linfocitos TH1 o TH2. Posterior a la activación del linfocito T a menudo se requiere un estímulo que retroalimente la expresión óptima del tipo de perfil mediante el ligando CD40 (CD40L). IFN- $\gamma$ , interferón- $\gamma$ ; TNF- $\beta$ , factor de necrosis tumoral- $\beta$ ; IL-4, interleucina-4; IL-5, interleucina-5; IL-13, interleucina-13 Ilustración tomada y modificada de Kapsenberg *et al.*, 2003.

Entre las moléculas de expresión temprana durante la activación del linfocito T CD4 a través del TCR son las moléculas CD25 y CD54. Estas moléculas están bien caracterizadas como marcadores de la activación del linfocito T (Thoma *et al.*, 1992; Hernandez-Caselles *et al.*, 1993; Chirathaworn *et al.*, 2002; Cortés-Rubio, 2013; Rosenblum *et al.*, 2016). La molécula CD25 es la subunidad alfa del receptor de alta afinidad para IL-2 y participa en la supervivencia y proliferación del linfocito T

(Letourneau *et al.*, 2009; Bajnok *et al.*, 2017; Peng *et al.*, 2022). La expresión de la molécula de adhesión CD54 (ICAM I) en linfocitos T activados fortalece las interacciones físicas con otras células (linfocito T - linfocito T o linfocito T - linfocito B) y a estructuras como endotelio vascular, matriz extracelular y epitelio. Además, participa en la transducción de señales intracelulares que regulan la proliferación y producción de citocinas (Dustin *et al.*, 1986; Tohma *et al.*, 1991; Tohma *et al.*, 1992; Maio & Vecchio, 1992; Chirathaworn *et al.*, 1995; Stanciu & Djukanovic, 1998; Roy *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2021).

Otra molécula detectada durante la activación del linfocito T a través del TCR es la molécula Ki67, la cual se detecta tanto intracelular como intranuclear, y participa durante las fases activas del ciclo celular, por lo que está ausente en linfocitos en reposo. Su función no está del todo entendida y comúnmente se usa para detectar proliferación. (Li *et al.*, 2015; Motamedi *et al.*, 2016; Sun & Kaufman, 2018).

### **3. Activación colateral de los linfocitos T.**

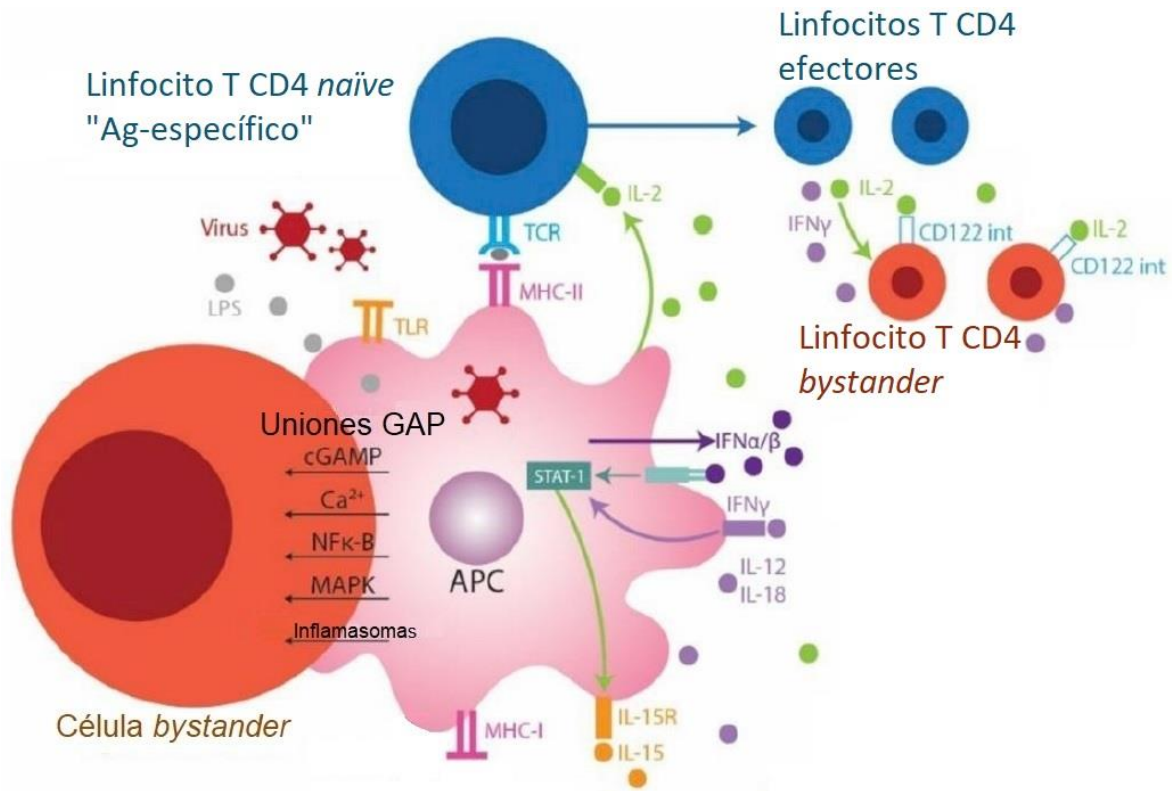
Además de la activación específica explicada anteriormente, se ha descrito otro tipo de activación del linfocito T llamada activación colateral (encontrada en la literatura como *bystander activation*), la cual se ha definido como todos los cambios fenotípicos y funcionales que tiene el linfocito T mediante un mecanismo independiente de la vía específica del TCR (Bangs *et al.*, 2006), resultando en una activación que no es antígeno-específica (Bangs *et al.*, 2009) y está mediada por señales solubles en respuesta a infección por virus o bacterias que favorecen un medio inflamatorio con la presencia de citocinas y



quimiocinas, (**Wucherpfennig, 2001**), o por comunicación intercelular vía uniones estrechas (como las uniones gap) donde células infectadas o activadas transfieren diversos componentes a células vecinas, como cGAMP, Ca<sup>2+</sup>, NFκB, MAPK e inflammasomas (**Pacheco et al., 2019**).

La activación colateral se describió por Unutmaz y colaboradores (**Unutmaz et al., 1994**) utilizando linfocitos T CD4 humanos *naïve* y de memoria purificadas a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donadores sanos. Los linfocitos T CD4 fueron cultivados *in vitro* con citocinas proinflamatorias (IL-2, TNF-α e IL-6), induciendo su proliferación y la expresión de la molécula de activación CD69. Además, los linfocitos de memoria fueron capaces de tener una función efectora mediante la producción de IFN-γ e IL-4, así como la capacidad de cooperar con los linfocitos B para producir anticuerpos. Con estos resultados propusieron que la activación colateral podría participar *in vivo* reclutando linfocitos T efectores al sitio donde hay una respuesta inmune y mantener el repertorio policlonal de los linfocitos *naïve* y de memoria, sin cambiar su fenotipo, en ausencia de una estimulación antigénica.

Posteriormente, Tough y colaboradores (1996) demostraron en ratones la proliferación de linfocitos T mediada por citocinas y no por antígenos. Los resultados de este trabajo sugerían una explicación a la masiva proliferación de los linfocitos T durante una infección por virus, que, se ha demostrado, gran parte no son antígeno específicas debido a la baja frecuencia de TCR específicos en el repertorio de linfocitos *naïve* (**Murali-Krishna et al., 1998; Moon et al., 2007; Obar et al., 2008; Jenkins et al., 2010; Kwok et al., 2012; Alanio et al., 2015**).



**Figura 4. Mecanismos de activación colateral mediada por patógenos infecciosos.** Células infectadas por virus o bacterias pueden inducir la activación de células no infectadas a través de señales solubles (citocinas) y por comunicación intercelular (uniones *gap*). Ag, antígeno; APC, célula presentadora de antígeno; cGAMP, monofosfato de guanosina cíclico-monofosfato de adenosina; IFN, interferón; IL, interleucina; LPS: lipopolisacárido; MHC: complejo principal de histocompatibilidad; TCR: receptor de células T; TLR: receptor tipo *toll*. Ilustración tomada y modificada de Pacheco *et al.*, 2019.

Se ha propuesto que la activación colateral del linfocito T mediada por citocinas no es una respuesta incidental, sino que podría estar participando durante las respuestas inmunes induciendo apoptosis para dar un espacio inmunológico (Bangs *et al.*, 2009; Serbanescu *et al.*, 2016; Sckisel *et al.*, 2017;), un estado de preparación para que la célula responda rápidamente a su antígeno específico (Unutmaz *et al.*, 1995; Geginat *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2003; McSorley, 2014), una amplificación de la respuesta innata y adaptativa para contrarrestar una infección (Unutmaz *et al.*, 1994; Geginat *et al.*, 2001; Bangs *et al.*, 2009; Di Genova *et al.*, 2010; Munk *et al.*, 2011; Chu *et al.*, 2013; Salerno

*et al.*, 2016) y el mantenimiento del repertorio de memoria policlonal (**Tough *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1998; Geginat *et al.*, 2001; Di Genova *et al.*, 2006**). Por otra parte, se ha propuesto su posible participación en inmunopatologías (**Meresse *et al.*, 2004; Brennan *et al.*, 2008; Sattler *et al.*, 2009; Wenink *et al.*, 2012; Chevalier *et al.*, 2016; Whiteside *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2018**), así como en enfermedades donde se promueve un ambiente proinflamatorio como es el caso de la infección por el VIH (**Bangs *et al.*, 2006**).

A partir de estos trabajos, se han utilizados diversos modelos para demostrar y describir a la activación colateral como un proceso celular que ocurre en condiciones tanto fisiológicas como patológicas. Se ha descrito principalmente en modelos de ratón o en linfocitos CD8 humanos en condiciones patológicas (**Slichter *et al.*, 2016; Skisel *et al.*, 2017; Whiteside *et al.*, 2018**), por lo que poco se conoce de la activación colateral en linfocitos humanos T CD4 en reposo, particularmente en la población de memoria.

## II. ANTECEDENTES DIRECTOS DE LA ACTIVACIÓN COLATERAL DE LINFOCITOS T CD4 HUMANOS EN REPOSO

Se han realizado experimentos *in vitro* de activación colateral en linfocitos T CD4 humanos en reposo, en los cuales los linfocitos fueron cultivados en presencia de suero fetal bovino (FBS) y citocinas en concentraciones en el rango de nanogramos (**Unutmaz et al., 1994, 1995; Kanegane & Tosato, 1996; Geginat et al., 2001; Sattler et al., 2009; Munk et al., 2011**). Otros estudios utilizaron sobrenadantes provenientes de PBMC o de células dendríticas estimuladas con el superantígeno enterotoxina B estafilocócica (SEB) (**Geginat et al., 2001; Bangs et al., 2009**), o de macrófagos estimulados con lipopolisacáridos (LPS) de bacterias (**Unutmaz et al., 1994**), usando suero AB humano. En la **tabla 1** se muestran detalles sobre la activación colateral de los linfocitos T CD4 humanos en reposo.

Los efectos que se observaron en los linfocitos en reposo activados colateralmente fueron la inducción de proliferación celular (**Unutmaz et al., 1994, 1995; Kanegane & Tosato, 1996; Geginat et al., 2001**), expresión de marcadores de activación (**Unutmaz et al., 1994, 1995; Kanegane & Tosato, 1996; Bangs et al., 2009; Sattler et al., 2009**), inducción de un fenotipo efector (**Unutmaz et al., 1994; Geginat et al., 2001; Sattler et al., 2009; Munk et al., 2011**), capacidad cooperadora con los linfocitos B (**Unutmaz et al., 1994**), inducción de un nivel de apoptosis menor al de la activación a través del TCR (**Bangs et al., 2009**), activación de diferentes vías de señalización intracelular (**Geginat et al., 2001**), así como diferentes niveles de expresión de moléculas de adhesión y receptores de quimiocinas y citocinas (**Unutmaz et al., 1995; Geginat et al., 2001; Sattler et al.,**

**2009**). En términos generales, la activación colateral se puede analizar de una forma similar a la activación de un linfocito T a través del TCR.

Por lo tanto, teniendo el antecedente que la activación colateral se lleva a cabo por el contacto de los linfocitos con citocinas y quimiocinas producidas durante una respuesta específica a un antígeno vía el TCR, como ocurre durante una infección viral, o durante la activación del TLR4 en presencia de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) como LPS (**Boyman *et al.*, 2010; Pacheco *et al.*, 2019**), se podría esperar un efecto directo de estas citocinas y quimiocinas sobre linfocitos T CD4 humanos de memoria.

**TABLA 1**  
**Activación colateral de linfocitos humanos T CD4 en reposo**

Citocina(s)	Subpoblación celular	Medio de cultivo	Efecto	Referencias
TNF- $\alpha$ + IL-6 + IL-2/IL-4	<i>Naïve</i>	Medio RPMI 5-8% de suero hAB	Fenotipo intermedio entre <i>naïve</i> (CD45RA) y de memoria (marcadores de activación y moléculas de adhesión) Actividad efectora	Unutmaz <i>et al.</i> , 1994; 1995
IL-2/IL-15	<i>Naïve</i> y de memoria	Medio RPMI 10% de FBS	Expresión de CD69 Proliferación	Kanegane y Tosato, 1996
IL-7, IL-15, TNF- $\alpha$ , IL-6 + IL-10	<i>Naïve</i> y de memoria (central y efectora)	Medio RPMI 1% de suero hAB	Proliferación, expresión de CD40L y cambio de la expresión de CCR5 Actividad efectora	Geginal <i>et al.</i> , 2001
IL-4, TNF- $\alpha$ , IL-6 + IL-10	<i>Naïve</i>	Medio RPMI 1% de suero hAB	Proliferación	Bangs <i>et al.</i> , 2009
IL-7+IL-15+ SN de CD estimuladas con LPS	<i>Naïve</i> y de memoria	Medio RPMI 1% de suero hAB	Proliferación	Bangs <i>et al.</i> , 2009
PBMC estimuladas con SEB (Transwell)	<i>Naïve</i> y de memoria	Medio RPMI 1% de suero hAB	Expresión de CD25 y CD69 Diferente expresión génica Menor apoptosis que la activación a través del TCR	Bangs <i>et al.</i> , 2009
IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, TNF- $\alpha$ + MIP-1 $\alpha$	Memoria	Medio RPMI 10% de suero hAB	Actividad efectora Expresión de CCR5	Sattler <i>et al.</i> , 2009
IL-12 + IL-18	<i>Naïve</i> y de memoria	Medio RPMI 10% de FBS	Actividad efectora Sin proliferación ni apoptosis	Munk <i>et al.</i> , 2011

CD, células dendríticas; PBMC, células mononucleares de sangre periférica; SEB, enterotoxina B estafilocócica; TNF, factor de necrosis tumoral; IL, interleucina; MIP, proteína inflamatoria de macrófagos; hAB, suero humano tipo AB; FBS, suero fetal bovino; TCR, receptor de célula T

### **III. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Cuáles son los efectos de factores solubles liberados por PBMC activadas a través del TCR o TLR4 sobre la viabilidad, la expresión de moléculas de superficie y el fenotipo en reposo de linfocitos T CD4 humanos de memoria?

### **V. HIPÓTESIS**

Los factores solubles liberados por PBMC activadas a través del TCR o TLR4 promoverán la viabilidad y estabilizarán la expresión de moléculas de superficie de linfocitos T CD4 humanos de memoria manteniendo un fenotipo en reposo

### **V. OBJETIVOS**

#### **Objetivo general**

Determinar los efectos de los factores solubles liberados por PBMC activadas a través del TCR o TLR4 sobre la viabilidad, expresión de moléculas de superficie y el fenotipo en reposo de linfocitos T CD4 humanos de memoria.

## **Objetivos particulares**

- Obtención de medios condicionados a partir de PBMC humanas activadas a través del TCR (TCR-CM) o TLR4 (TLR4-CM), y caracterización de los factores solubles presentes.
- Incubación y análisis del efecto de los factores solubles liberados por PBMC activadas a través del TCR o TLR4 sobre linfocitos T CD4 humanos de memoria. Análisis de su viabilidad, expresión de moléculas de superficie y el fenotipo en reposo.



## **VI. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1. Separación de PBMC, activación a través del TLR4 o del TCR, y recolección de los medios condicionados TLR4-CM y TCR-CM.**

#### **1.1. Separación de PBMC.**

Las PBMC fueron separadas a partir de paquetes leucocitarios (*buffy coats*) de donadores sanos hombres usando gradientes de Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). Los paquetes leucocitarios se mantuvieron en obscuridad a 20°C durante 24 horas aproximadamente. Para el inicio de la separación de las PBMC, fue necesario resuspender la sangre (15 veces), y se diluyó en *buffer* fosfato salino (PBS) 1X estéril (pH ajustado entre 7.2-7.4) en una proporción de 1:2, y nuevamente se resuspendió (15 veces). Esta suspensión se colocó sobre la solución de Ficoll-Paque (10ml de solución por 30 ml de suspensión) de manera que quedaran dos fases. La preparación se centrifugó a 400xg durante 40 minutos a 20°C (sin freno ni aceleración). Finalizado el tiempo de centrifugación, se recuperaron las PBMC a partir del anillo formado entre el Ficoll y el plasma, y se resuspendieron en PBS 1X estéril. Se realizaron dos lavados; en el primero se centrifugó a 350xg durante 15 minutos a 20°C (con freno y aceleración máxima) para retirar cualquier exceso de Ficoll y plasma presente, el segundo lavado se centrifugó a 100xg durante 15 minutos a 20°C para desechar posibles plaquetas presentes.

## **1.2. Activación de PBMC a través del TLR4 o del TCR y recolección de los medios condicionados TLR4-CM y TCR-CM.**

Para la obtención de los medios condicionados, las PBMC fueron separadas a partir de paquetes leucocitarios (*buffy coats*) de 4 donadores sanos hombres (21-57 años) usando gradientes de Ficoll-Paque PLUS (ver apartado 1.1. Separación de PBMC). Para la activación del TLR4, se sembraron  $2.5 \times 10^6$  de PBMC/ml en placas de 12 pozos de fondo plano con alta adherencia (CellBIND, Corning) en medio de cultivo más lipopolisacáridos biotinados ultrapuros de *Escherichia coli* O111:B4 (LPS-EB Biotin, InvivoGen) a una concentración final de  $1 \mu\text{g/ml}$  durante 24 horas a  $37^\circ\text{C}$  con 5% de  $\text{CO}_2$ . Para la activación a través del TCR, se sembraron  $5 \times 10^6$  PBMC/ml en placas de 12 pozos de fondo plano con alta adherencia en medio de cultivo más anticuerpos anti-CD3/anti-CD28/anti-CD2 acoplados a perlas magnéticas en una proporción perla-célula de 1:2 durante 3 días. Al finalizar los tiempos de las incubaciones correspondientes, los CM fueron recolectados y centrifugados a  $300 \times g$  durante 10 minutos a  $20^\circ\text{C}$ .

Para la remoción del LPS-EB biotinados, los CM fueron previamente incubados con Estreptavidina acoplada a Dynabeads M-280 (Invitrogen) en una proporción de 1mg de Dynabead por cada  $10 \mu\text{g}$  de LPS usado, y se colocó esta suspensión en rotación suave (a 4 rpm) durante 30 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Finalizando la incubación, los CM se centrifugaron a  $300 \times g$  durante 10 minutos y se colocaron en tubos Amicon Ultra-4 100K (Merck Millipore) para su ultrafiltración. Se centrifugaron a  $4000 \times g$  durante 10 minutos a  $20^\circ\text{C}$ . Al finalizar la centrifugación, los CM fueron alicuotados y congelados a  $-20^\circ\text{C}$ .

Los anticuerpos anti-CD3/anti-CD28/anti-CD2 acoplados a perlas magnéticas fueron removidos mediante centrifugación a  $300 \times g$  durante 10 minutos a  $20^\circ\text{C}$ , y de igual manera

se ultrafiltraron con tubos Amicon Ultra-4 100K bajo las mismas condiciones, alicuotando y congelando a -20°C. Ver **figura 5**.

Los medios condicionados fueron ultrafiltrados para remover vesículas o restos celulares, de manera que los posibles efectos detectados por la incubación de los linfocitos T CD4 humanos de memoria con los medios condicionados fueran exclusivamente debidos a los factores solubles presentes en estos.

## **2. Análisis de citocinas y quimiocinas de los medios condicionados TLR4-CM y TCR-CM a través del inmunoensayo ProcartaPlex Multiplex.**

Las concentraciones de citocinas y quimiocinas en los CM (obtenidos a partir de 4 donadores hombres sanos) se determinaron usando el kit *ProcartaPlex Human Cytokine & Chemokine Panel 1A 34-plex* (Invitrogen, Thermo Fisher, Carlsbad, CA, USA), de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los resultados fueron analizados en un Sistema Bio Plex 200 (Bio-Rad) usando el software Bio-Plex Manager 6.1. Las citocinas y quimiocinas analizadas fueron: Eotaxina (CCL11); GM-CSF; GRO- $\alpha$  (CXCL1); IFN- $\alpha$ ; 95 IFN- $\gamma$ ; IL-1 $\beta$ ; IL-1 $\alpha$ ; IL-1RA; IL-2; IL-4; IL-5; IL-6; IL-7; IL-8 (CXCL8); IL-9; IL-10; IL-12 p70; IL-13; 96 IL-15; IL-17A; IL-18; IL-21; IL-22; IL-23; IL-27; IL-31; IP-10 (CXCL10); MCP-1 (CCL2); MIP-1 $\alpha$  (CCL3); MIP-1 $\beta$  (CCL4); RANTES (CCL5); SDF-1 $\alpha$  (CXCL12); TNF- $\alpha$ ; TNF- $\beta$  (LTA).

### **3. Purificación de linfocitos T CD4 humanos de memoria e incubación con los medios condicionados TLR4-CM o TCR-CM.**

#### **3.1. Purificación de linfocitos T CD4 humanos de memoria.**

Para la purificación de linfocitos T CD4 humanos de memoria, se inició con la separación de PBMC a partir de paquetes leucocitarios de 8 donadores sanos hombres (24-59 años) usando gradientes de Ficoll-Paque PLUS (ver apartado 1.1. Separación de PBMC). Subsecuentemente se purificaron los linfocitos T CD4 humanos de memoria mediante selección negativa utilizando el kit *Memory CD4<sup>+</sup> T Cell Isolation* conteniendo anticuerpos contra CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD45RA, CD56, CD123, TCR $\gamma/\delta$ , y CD235a (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). A partir de  $120 \times 10^6$  de PBMC, se resuspendieron en 40 $\mu$ l de *buffer* MACS (*AutoMACS Rinsing Solution* más albumina sérica bovina (BSA) en una dilución 1:20 a 4°C) por cada  $10^7$  de células, adicionando 10 $\mu$ l de *memory CD4<sup>+</sup> T Cell Biotin-Ab Cocktail II* por cada  $10^7$  de células. Se resuspendió e incubó durante 10 minutos a 4°C en oscuridad. Posteriormente, se adicionaron 30 $\mu$ l de *buffer* MACS por cada  $10^7$  de células más 20 $\mu$ l de *Anti-Biotin Microbead* por cada  $10^7$  de células. Se resuspendió e incubó por 15 minutos a 4°C en oscuridad. Al finalizar la incubación, se adicionó 1ml de *buffer* MACS por cada  $10^7$  de células y se centrifugó a 300xg durante 10 minutos a 4°C. Las células se resuspendieron en 500 $\mu$ l de *buffer* MACS y se filtraron a través de una columna magnética LD (Miltenyi Biotec), previamente enfriada a 4°C y humedecida con 2ml de *buffer* MACS. Los linfocitos T CD4 humanos que pasaron a través de la columna se recuperaron y la suspensión celular se centrifugó a 300xg durante 10 minutos a 20°C y se resuspendieron en medio AIM V (Gibco, Grand Island,

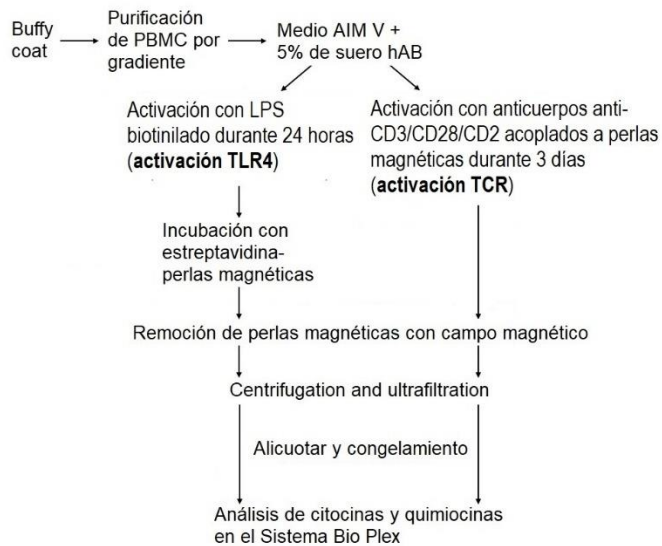
NY) más 5% de suero AB humano (Valley Biomedical, Winchester, VA), 500µl de medio de cultivo por  $1 \times 10^6$  de células. Este medio de cultivo suplementado se usó para todos los experimentos mostrados en este trabajo de investigación.

### **3.2. Incubación de linfocitos T CD4 humanos de memoria con los medios condicionados TLR4-CM o TCR-CM.**

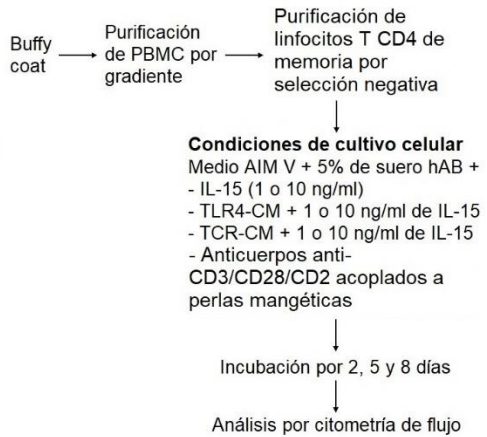
Para el cultivo, se sembraron  $2 \times 10^5$  células/100 µl de medio de cultivo en placas de 96 pozos con fondo plano en presencia o ausencia de IL-15 (1 o 10 ng/ml) durante 2, 5 y 8 días a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Para la estimulación con los sobrenadantes, los CM obtenidos de PBMC activadas a través del TLR4 o TCR, provenientes de 4 donadores (ver apartado 2.1. Activación de PBMC a través del TLR4 o del TCR y recolección de los medios condicionados TLR4-CM y TCR-CM), se homogenizaron por condición. Los CM provenientes de PBMC estimuladas con LPS (TLR4-CM) o con anticuerpos anti-CD3/anti-CD28/anti-CD2 (TCR-CM), fueron agregados en una proporción medio de cultivo-CM de 1:1 más IL-15 (1 o 10 ng/ml). Al día 5 de cultivo se agregó en total 50 µl de medio de cultivo fresco más CM (manteniendo la proporción 1:1). Como control negativo, para todos los experimentos, los linfocitos de memoria fueron mantenidas con medio de cultivo solo. Como control de la activación canónica, se sembraron  $2 \times 10^5$  de células/100 µl de medio de cultivo y se estimularon con anticuerpos anti-CD3/anti-CD28/anti-CD2 acoplados a perlas magnéticas en una proporción perla-célula de 1:2 durante 2, 5 y 8 días, agregando 100µl de medio de cultivo fresco al día 2, y con un reemplazo de medio al día 5, removiendo 100µl y agregando 100µl de medio de cultivo fresco, sin romper los

agregados. Las células fueron analizadas al día 2, 5 y 8 a través de citometría de flujo. Ver **figura 5**.

### 1. ACTIVACIÓN DE PBMC Y RECOLECCIÓN DE MEDIO CONDICIONADO



### 2. INCUBACIÓN DE LINFOCITOS T CD4 DE MEMORIA CON MEDIO CONDICIONADO



**Figura 5.** Diagrama de flujo de la secuencia experimental. PBMC, células mononucleares de sangre periférica; LPS, lipopolisacáridos; suero hAB, suero AB humano; TCR, receptor de célula T; TLR4, receptor tipo Toll 4; TLR4-CM, medio condicionado proveniente de la activación del TLR4; TCR-CM, medio condicionado proveniente de la activación del TCR.

#### **4. Inmunofluorescencia para el análisis por citometría de flujo.**

##### **4.1. Tinción con el colorante Ghost Dye Red 710 e inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales acoplados a fluorocromos para la detección de las moléculas de superficie CD3, CD4, CD45RO, CCR5, CXCR4, CD25 y CD54.**

Se usó un panel de 9 fluorocromos para analizar la expresión de moléculas de superficie, proliferación y muerte celular en citometría de flujo. Previamente a la tinción, se removieron los anticuerpos anti-CD3/anti-CD28/anti-CD2 del cultivo de linfocitos activados. De manera que se recolectaron en PBS 1X estéril, se centrifugaron a 300xg durante 5 minutos a 20°C y se resuspendieron en PBS 1X estéril más 0.5% de BSA. Se colocaron las células durante 30 segundos en un agitador vortex (Marca Grant Instruments, UK), posteriormente se colocaron en un magneto separado durante 2 minutos y la suspensión celular se colocó en un nuevo tubo. Este paso se repitió una vez más. La suspensión celular se centrifugó a 300xg durante 5 minutos a 20°C y se resuspendió en PBS 1X estéril.

El colorante de viabilidad Ghost Dye Red 710 (GDR-710) se utilizó a una dilución estandarizada 1:2000 (Tonbo Biosciences, San Diego, CA, USA). Este colorante se une a grupos aminos de la célula, de manera que, si la membrana celular está comprometida, este colorante ingresará a la célula, lo que resulta en un aumento de la intensidad media de fluorescencia (IMF), permitiendo la distinción de células vivas (menor IMF) y muertas (mayor IMF) (**Paschall *et al.*, 2020**). Para todas las condiciones, las células fueron resuspendidas en PBS 1X estéril y se centrifugaron a 300xg durante 5 minutos a 20°C. Las suspensiones celulares se colocaron en PBS 1X más el colorante GDR-710 a cada

condición. Se resuspendió y se incubó durante 30 minutos en oscuridad a 4°C. Al finalizar la incubación se centrifugó a 300xg durante 5 minutos a 4°C, se resuspendió en PBS 1X estéril más 0.5% de BSA (previamente enfriado) y nuevamente se centrifugó a 300xg durante 10 minutos a 4°C. Se desechó el sobrenadante de manera que quedara aproximadamente 100µl del volumen en cada condición.

Posteriormente se incubó con una combinación de anticuerpos específicos contra moléculas de superficie para analizar el fenotipo: el anticuerpo anti-CD3 PE-Cy7, dilución estandarizada 1:100 (clona UCHT1, Tonbo Biosciences), para detectar el complejo proteico CD3 y distinguir la población de linfocitos T, el anticuerpo anti-CD4 PerCP-Cy5.5, dilución estandarizada 1:50 (clona OKT4, Tonbo Biosciences), para detectar el correceptor CD4 como marcador de linfocitos T<sub>H</sub>, el anticuerpo anti-CD45RO PE, dilución estandarizada 1:100 (clona UCHL1, Tonbo Biosciences), para detectar la isoforma de la tirosina fosfatasa transmembranal CD45RO y distinguir la subpoblación de linfocitos de memoria, y los receptores de quimiocina CCR5 y CXCR4, se marcaron con los anticuerpos anti-CD195 (CCR5) PE/Dazzle 594, dilución estandarizada 1:100 (clona J418F1, BioLegend, San Diego, CA), y anti-CD184 (CXCR4) PE-Cy5, dilución 1:10 estandarizada (clona 12G5, BD Biosciences). Para determinar la activación celular, se marcó la molécula coestimuladora CD54 y la subunidad alfa del receptor de IL-2, CD25, con los anticuerpos anti-CD54 FITC, dilución estandarizada 1:100 (clona 15.2, Tonbo Biosciences), y anti-CD25 APC, dilución estandarizada 1:50 (clona BC96, Tonbo Biosciences), respectivamente.

Los anticuerpos mencionados en el párrafo anterior se añadieron para todas las condiciones. Se incubaron durante 10 minutos en oscuridad a 4°C. Finalizando este



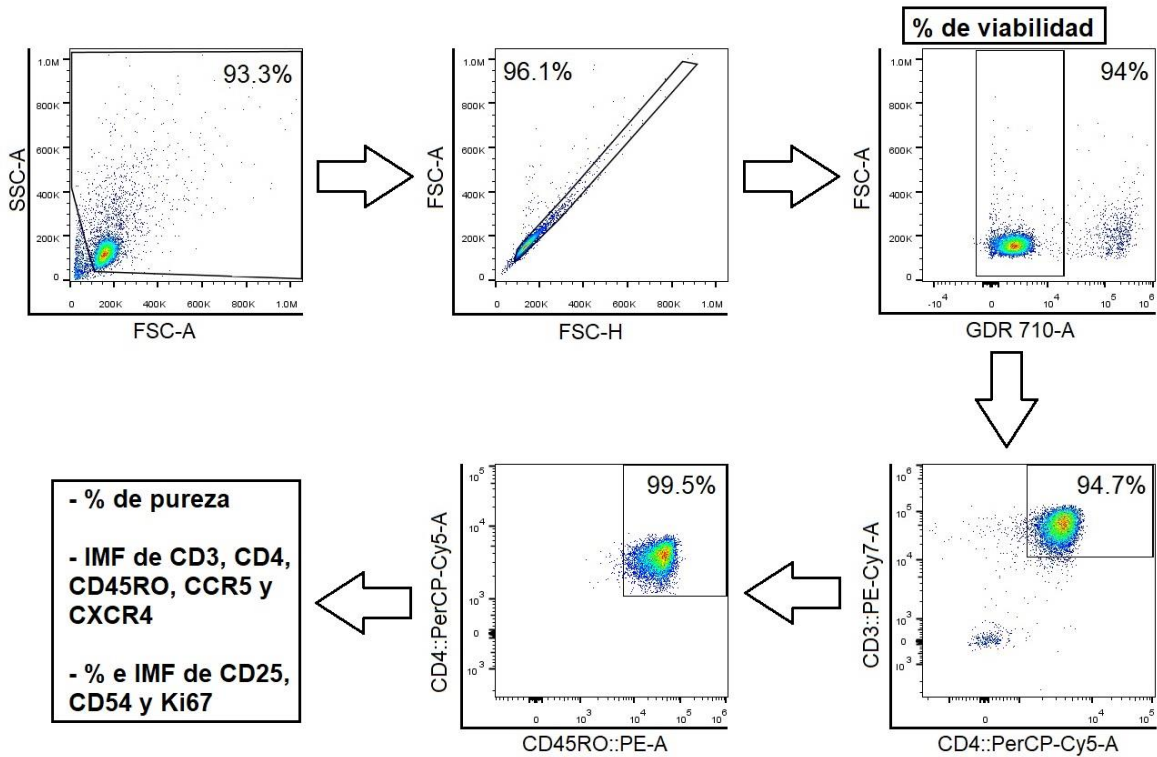
tiempo, se agregó PBS 1X estéril más 0.5% de BSA y se centrifugó a 300xg durante 10 minutos a 4°C.

#### **4.2. Fijación y permeabilización intranuclear de anticuerpos monoclonales para la detección de la molécula Ki67.**

Finalmente, para determinar la proliferación, se marcó la proteína Ki67 con el anticuerpo anti-Ki67 eFluor450, dilución estandarizada 1:40 (clona 20Raj1, Thermo Fisher Scientific, San Diego, CA), utilizando el set de fijación y permeabilización nuclear *Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer* (Thermo Fisher Scientific).

Las células se resuspendieron en 200µl de *Foxp3 Fixation/Permeabilization working solution* (1 parte de *Foxp3 Fixation/Permeabilization Concentrate* más 3 partes de *Foxp3 Fixation/Permeabilization Diluent*) y se incubaron durante 30 minutos en oscuridad a 4°C. Al finalizar la incubación se centrifugaron a 400xg durante 5 minutos a 20°C y se realizaron 2 lavados con 200µl de 1X *working solution of Permeabilization Buffer* (1 parte de *Permeabilization Buffer* 10X más 9 partes de agua MilliQ). Se agregó el anticuerpo anti-Ki67 a cada condición y se incubó durante 30 minutos en oscuridad a 20°C. Al finalizar la incubación se realizaron 2 lavados con el 1X *working solution of Permeabilization Buffer*.

Las células se mantuvieron en PBS 1X hasta la adquisición en el citómetro de flujo Attune Nxt (Thermo Fisher Scientific). Generalmente, se colectaron 10,000 células y se realizó el análisis usando el software FlowJo vX.0.7. En la **figura 6** se muestra la lógica que se usó para obtener los distintos parámetros analizados (porcentajes e IMF).



**Figura 6.** Esquema del análisis de la citometría de flujo de los experimentos de linfocitos T CD4 humanos de memoria. Se muestra el ejemplo del análisis de linfocitos T CD4 humanos de memoria incubados con sólo medio de cultivo durante 2 días.

## 5. Análisis de resultados y análisis estadístico.

El porcentaje de pureza posterior a la selección negativa de los linfocitos T CD4 humanos de memoria fue usualmente  $>92\%$  según lo verificado por citometría de flujo (tiempo 0).

Las muestras que presentaron menos del 50% de viabilidad celular (día 8 de cultivo), no fueron incluidas en el análisis del fenotipo y de marcadores de activación, aunque la viabilidad sí fue reportada.

Para los marcadores CD3, CD4, CD45RO, CXCR4, CCR5, CD25, CD54 y Ki67, los porcentajes y las IMF fueron obtenidos a partir del subconjunto de linfocitos T CD4<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> exclusivamente. Los resultados de IMF fueron normalizados respecto a la IMF del día 2 con sólo medio de cultivo, de manera que:

$$\text{Índice} = \frac{I}{I_2}$$

Donde **I** corresponde a la IMF del dato a normalizar e **I<sub>2</sub>** corresponde a la IMF del día 2 con sólo medio de cultivo y suero AB humano.

Se decidió normalizar respecto al día 2 de cultivo debido a una mayor estabilidad de la expresión de las moléculas de superficie. Al día 0 se observó que la expresión de las moléculas de superficie era heterogénea en todos los donadores, posiblemente por la variedad interindividual y por el procesamiento de las células durante la purificación de los linfocitos T CD4 de memoria, de manera que, al mantenerlos en cultivo durante 48 horas, la expresión de las moléculas de superficie se estabilizaba (ver **Anexo A**).

El análisis estadístico se llevó a cabo usando el software Graph Prism Version 9 (GraphPad Software, San Diego, CA). Se aplicó la prueba de Levene para la determinación de la homogeneidad de las varianzas y se determinó la significancia estadística con la prueba *t* de Student de dos colas para datos no pareados.  $P < 0.05$  fueron considerados significativos.

## VII. RESULTADOS

### 1. Citocinas y quimiocinas producidas por PBMC activadas a través del TLR4 o del TCR.

Los medios condicionados obtenidos de la activación de PMBC a través del TLR4 (TLR4-CM) o del TCR (TCR-CM) fueron analizados con el sistema Bio Plex 200 para determinar la concentración de citocinas y quimiocinas provenientes de las PBMC de 4 donadores y su valor promedio. En la **Tabla 2** se muestra la variedad de citocinas y quimiocinas detectadas en el TCR-CM y TLR4-CM. La activación con LPS indujo una mayor variedad y concentración de citocinas que la activación con anticuerpos anti-CD3/anti-CD28/anti-CD2. En cambio, se detectaron concentraciones similares de quimiocinas con ambos tipos de activación. Algunas citocinas y quimiocinas que se determinaron, pero no se encontraron fueron CCL11 (eotaxina), IFN- $\alpha$ , IL-7, IL-15, IL-12p70, IL-23, IL-27 e IL-31.

Con las condiciones de cultivo, la activación con anticuerpos anti-CD3/anti-CD28/anti-CD2 indujo la producción de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias, por lo que no correspondió a la polarización hacia un fenotipo efector particular. En nuestras condiciones de cultivo, la IL-2, la cual se esperaba que estuviera presente en los medios condicionados proveniente de las células activadas con anticuerpos anti-CD3/anti-CD28/anti-CD2, fue encontrada solamente en concentraciones moderadas (3.3 - 10.33 pg/ml), posiblemente debido al rápido consumo de esta citocina bajo una activación y proliferación óptima de las células.

Bajo estas condiciones, una alta concentración de IL-2 no estaría disponible para los linfocitos en reposo cercanos. De hecho, el consumo de IL-2 por parte de células activadas durante una respuesta inmune podría ser un efecto que reduciría la disponibilidad de esta citocina para la activación colateral de otras células.

La activación con LPS de PBMC no indujo la producción de IFN- $\gamma$ , IL-23, IL-18, y CXCL10 (IP-10), las cuales se han reportado que sí se producen (**El-Mezzein *et al.*, 2001; Luan *et al.*, 2017**).

Se observó que IL-6, IL-1RA, CCL4 (MIP-1 $\beta$ ), CXCL8 (IL-8), CCL2 (MCP-1) y CXCL12 (SDF-1 $\alpha$ ) fueron las citocinas y quimiocinas más abundantes en ambos medios condicionados, estando las concentraciones en un rango de nanogramos.

Se pueden notar diferencias tanto en la concentración como en el tipo de citocinas y quimiocinas producidas entre ambas condiciones. Mientras que la activación de las PBMC con los anticuerpos anti-CD3/anti-CD28/anti-CD2 fue capaz de inducir la producción de todas las citocinas y quimiocinas mostradas en la **tabla 2**, la activación con LPS no indujo la producción de IFN- $\gamma$ , IL-9, IL-21, IL-17A, IL-18, IL-22 e IL-4. La IL-13 fue detectada sólo en un donador en el TLR4-CM (3.86 pg/ml), y se encontraron bajas concentraciones (0.26 - 1.05 pg/ml) de CXCL10 comparadas con el TCR-CM (242.54 - 1395.53 pg/ml). Bajas concentraciones de IL-4 se encontraron en el TCR-CM de dos donadores (1.90 and 5.43 pg/ml).

Debido a que se obtuvo una gran variedad de niveles de citocinas y quimiocinas entre donadores se decidió combinar los sobrenadantes para su uso posterior en la incubación con los linfocitos T CD4 humanos de memoria.

**TABLA 2**

**Concentración de citocinas y quimiocinas en medio condicionado proveniente de PBMC activadas con LPS o anticuerpos anti-CD3/CD28/CD2\***

		TLR4-CM					TCR-CM				
		Donador				Promedio (pg/ml)	Donador				Promedio (pg/ml)
		1	2	3	4		1	2	3	4	
		Concentración (pg/ml)				Concentración (pg/ml)					
Citocinas proinflamatorias	IL-6	25715.5	22717.5	7754.6	6178.6	<b>15591.6</b>	2272.8	8419.7	11722.5	680.6	<b>5773.9</b>
	IL-1 $\beta$	308	441.5	282.8	128.1	<b>290.1</b>	369.6	87.7	189.9	251.7	<b>224.7</b>
	TNF- $\alpha$	92.6	191.5	275.2	79.5	<b>159.7</b>	189.6	77.7	140.3	133.2	<b>135.2</b>
	IL-2	11	12.1	11.3	9.8	<b>11.1</b>	7.5	9.8	10.3	3.3	<b>7.7</b>
	IL-5	5.2	6.1	6.0	3.0	<b>5.1</b>	35.1	29.3	105.2	101.2	<b>67.7</b>
	IL-1 $\alpha$	3.4	6.9	5.5	1.2	<b>4.3</b>	77.1	2.3	5.3	43.1	<b>31.9</b>
	TNF- $\beta$	1.6	3.1	1.9	2.4	<b>2.2</b>	37.8	2.7	4.6	22.0	<b>16.8</b>
	IFN- $\gamma$	0.0	0.0	0.0	0.0	<b>0.0</b>	899.0	259.6	271.0	1335.5	<b>691.3</b>
	IL-13	0.0	0.0	3.9	0.5	<b>1.1</b>	361.6	392.1	899.9	566.0	<b>554.9</b>
	IL-18	0.0	0.0	0.0	0.0	<b>0.0</b>	208.5	91.4	119.0	287.4	<b>176.6</b>
	IL-9	0.0	0.0	0.0	0.0	<b>0.0</b>	32.2	6.2	31.4	43.2	<b>28.2</b>
	IL-17A	0.0	0.0	0.0	0.0	<b>0.0</b>	31.2	23.1	22.9	28.4	<b>26.4</b>
	IL-21	1.0	0.0	0.0	0.0	<b>0.2</b>	9.9	3.3	9.2	14.9	<b>9.3</b>
IL-4	0.0	0.6	0.0	0.0	<b>0.1</b>	5.4	0.0	0.0	1.9	<b>1.8</b>	
Citocinas antiinflamatorias	IL-1RA	11302.8	42192.4	89758.3	30412.8	<b>43416.6</b>	97768.5	16910.2	21140.4	66616.3	<b>50608.9</b>
	IL-10	24.4	36.5	47.1	24.4	<b>33.1</b>	13.7	4.8	18.3	10.8	<b>11.9</b>
	IL-22	0.0	0.0	0.0	0.0	<b>0.0</b>	86.3	9.1	34.0	61.8	<b>47.8</b>
Quimiocinas	CCL4	742.9	65942.2	224326.0	31096.1	<b>80526.8</b>	26903.0	55.0	40.9	72762.0	<b>24940.3</b>
	CCL2	3958.8	8517.9	7312.8	5060.9	<b>6212.6</b>	7952.5	3274.0	3674.7	7547.5	<b>5612.2</b>
	CXCL12	570.7	9475.6	6601.1	4070.8	<b>5179.5</b>	7463.6	1645.6	1475.0	4561.8	<b>3786.5</b>
	CXCL8	620.6	3234.1	1890.0	1368.4	<b>1778.3</b>	3576.7	1423.6	1116.9	1478.4	<b>1898.9</b>
	CCL3	117.5	2343.7	1683.0	981.4	<b>1281.4</b>	1792.3	27.0	43.4	1935.6	<b>949.6</b>
	CXCL1	106.4	1186.3	747.5	522.4	<b>640.6</b>	829.2	412.8	198.5	808.2	<b>562.2</b>
	GM-CSF	119.9	332.3	133.2	95.1	<b>170.1</b>	514.1	48.6	98.1	274.2	<b>233.8</b>
	CCL5	18.0	24.6	32.9	29.9	<b>26.3</b>	50.9	4.3	2.5	80.6	<b>34.6</b>
	CXCL10	0.3	0.7	1.0	0.8	<b>0.7</b>	1395.5	242.5	588.0	1062.2	<b>822.1</b>

\* Citocinas y quimiocinas analizadas, pero no encontradas: CCL11, IFN- $\alpha$ , IL-7, IL-15, IL-12p70, IL-23, IL-27 and IL-31.

## 2. Efecto de los medios condicionados TLR4-CM y TCR-CM sobre la viabilidad de linfocitos T CD4 humanos de memoria.

Los cultivos de linfocitos T CD4 humanos de memoria suelen contener concentraciones en nanogramos de las citocinas que comparten la subunidad  $\gamma$ c del receptor de IL-2 (IL-2, IL-4, IL-15, e IL-7), y altas concentraciones de FBS. El efecto de otras citocinas y quimiocinas sobre la viabilidad celular y la estabilidad del fenotipo de memoria no está reportado, por lo que, en este trabajo, se examinó a través de citometría de flujo

durante 2, 5 y 8 días la viabilidad y el fenotipo de linfocitos T CD4 humanos de memoria incubados con medios condicionados obtenidos de la activación de PBMC con anticuerpos anti-CD3/anti-CD28/anti-CD2 (TCR-CM) o con LPS (TLR4-CM).

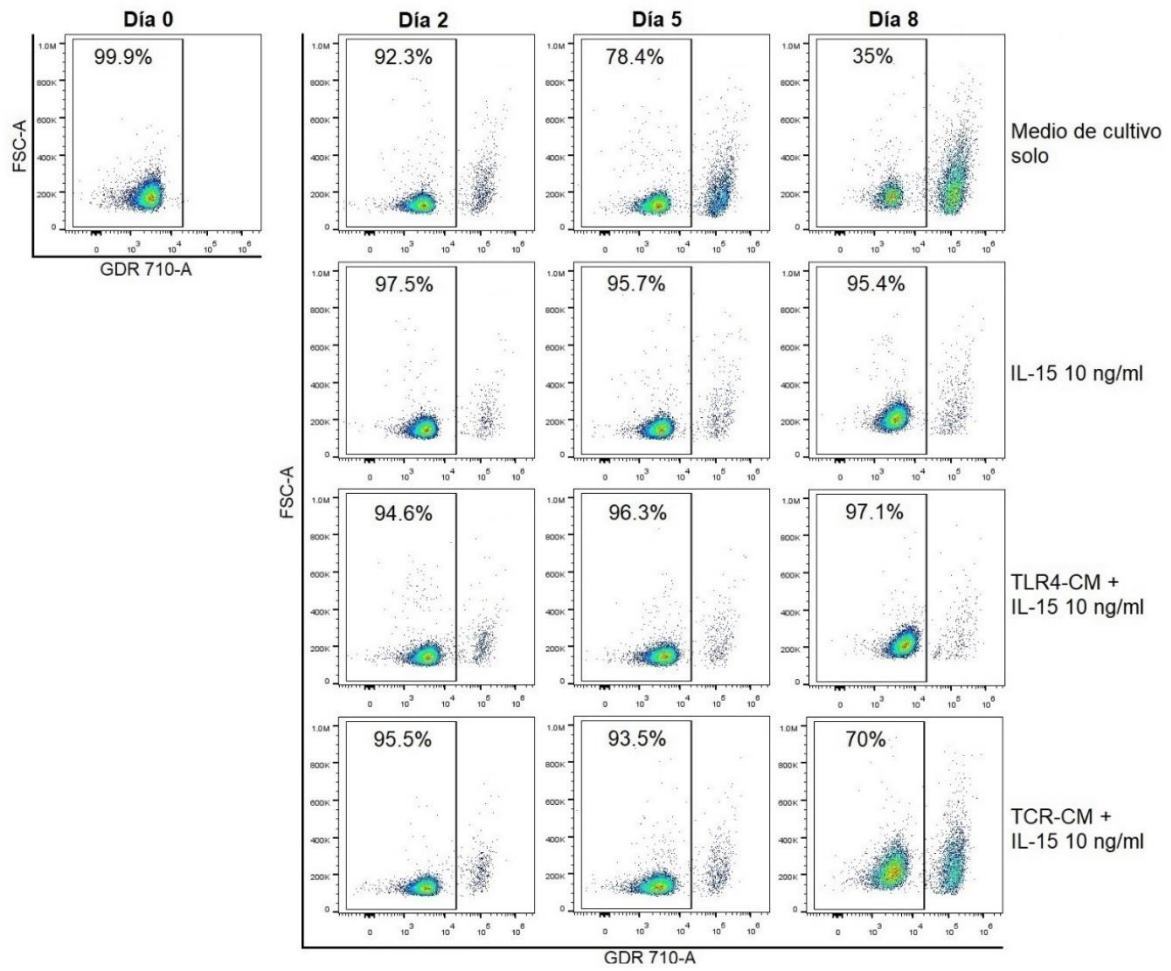
Para detectar los cambios inducidos por estos factores, los linfocitos T CD4 humanos de memoria se mantuvieron en condiciones de cultivo previamente establecidas (ver **Anexos B, C y D**) (medio AIM V suplementado con 5% de suero AB humano más 1 o 10 ng/ml de IL-15), donde las células mantenían una buena viabilidad celular sin la inducción de moléculas de activación y proliferación. A este medio de cultivo, se le añadió en una proporción de 1:1 el medio condicionado (combinación de 4 donadores) TCR-CM o TLR4-CM. Una ventaja de no usar FBS es evitar posibles sinergismos de los factores solubles presentes en los medios condicionados con el exceso de factores de crecimiento presentes en el FBS.

De forma consistente, la viabilidad se mantuvo alrededor del 90% al día 5 de cultivo en presencia de IL-15, e incluso en presencia del medio condicionado TCR-CM o TLR4-CM (**figura 7**). El medio AIM V suplementado con 5% de suero AB humano, permitió la supervivencia del control de linfocitos T CD4 de memoria activados a través del TCR, esto en ausencia de IL-15 (94% al día 2 y 83% al día 8 de cultivo).

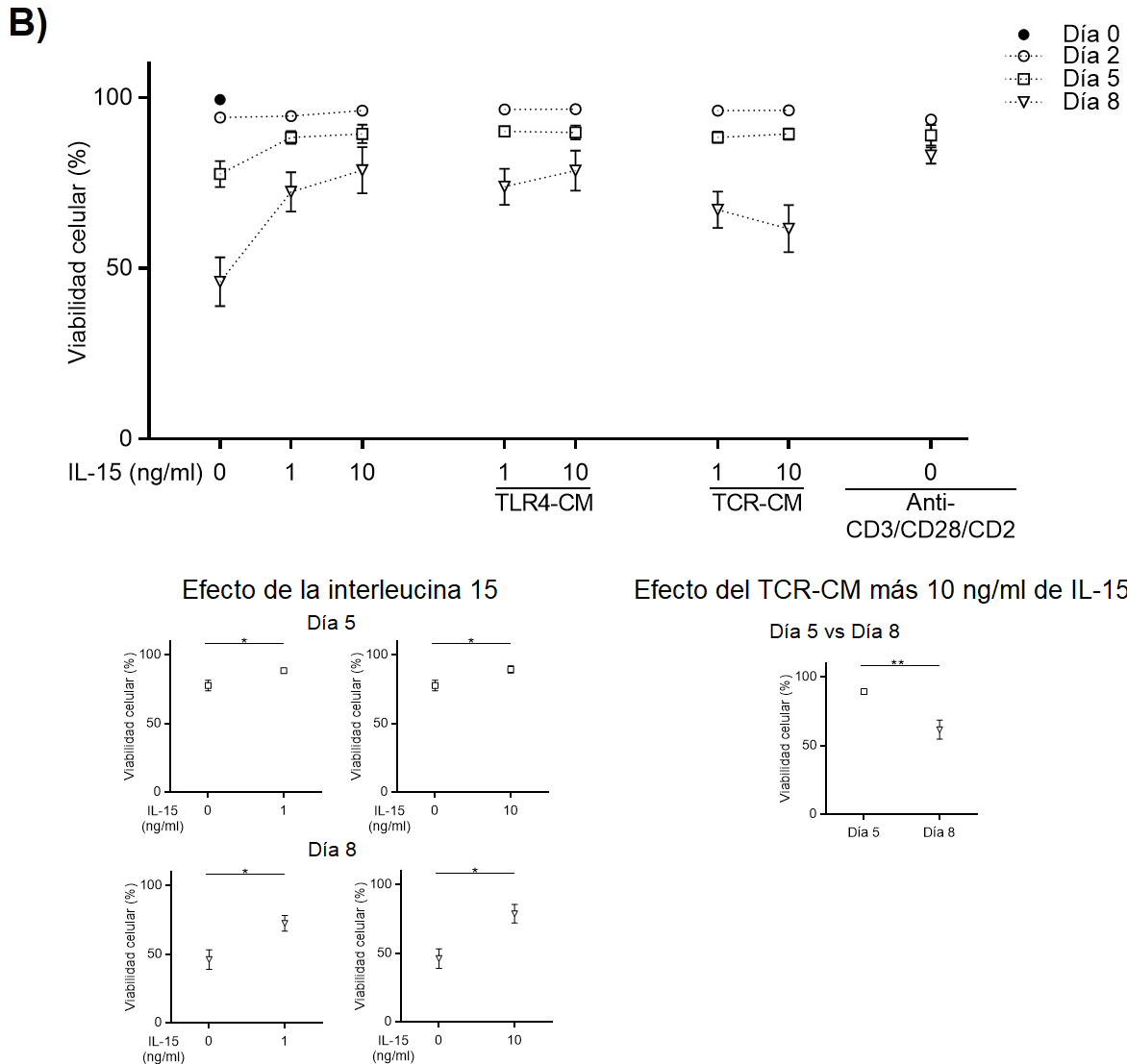
Al día 8, los linfocitos cultivados en presencia del TLR4-CM mostraron un decaimiento en la viabilidad por debajo del 80%, el cual no fue significativo respecto al día 5, indicando que las citocinas y quimiocinas inducidas por la activación de PBMC con LPS no tuvo efecto tóxico sobre los linfocitos de memoria. En cambio, los linfocitos cultivados en presencia del TCR-CM mostraron un decaimiento de la viabilidad al día 8 en presencia incluso de 1 (67%) o 10 ng/ml (61%) de IL-15, siendo significativo al día 8 respecto al día 5 con 10 ng/ml de IL-15.

A)

VIABILIDAD CELULAR







**Figura 7. Viabilidad de los linfocitos T CD4 humanos de memoria cultivadas con los medios condicionados TLR4-CM o TCR-CM en presencia de IL-15.** Linfocitos T CD4 humanos de memoria purificados cultivados en medio AIM V con 5% de suero AB humano más 1 o 10 ng/ml de IL-15. El medio condicionado proveniente de PBMC activadas con LPS (TLR4-MC) o con anticuerpos anti-CD3/anti-CD28/anti-CD2 (TCR-MC) fueron adicionados el día de la siembra y la viabilidad se determinó a los días 2, 5 y 8 mediante la tinción con el colorante Ghost Dye Red 710 (GDR-710). El día 0 muestra la viabilidad celular después de la purificación. Como control de la activación de los linfocitos T (activación canónica), las células se incubaron con anticuerpos anti-CD3/anti-CD28/anti-CD2 acoplados a perlas magnéticas, sin ser expuestas a los medios condicionados ni a la IL-15. (A) Gráficas de puntos representativas de la incorporación de colorante GDR-710. (B) Comparación del porcentaje de viabilidad celular obtenido en ausencia o presencia de IL-15 o en presencia de medio condicionado más IL-15. Se muestra la viabilidad obtenida de las células activadas directamente con anticuerpos anti-CD3/anti-CD28/anti-CD2. Los datos mostrados en la gráfica (B) son el promedio de 8 experimentos independientes para los días 0, 2 y 8, y 6 experimentos independientes para el día 5 de cultivo y se muestra el error estándar. \*p < 0.05; \*\*p < 0.01

### **3. Los factores solubles provenientes de la activación a través del TLR4, pero no a través del TCR, promueven la expresión de CD3 y CD4.**

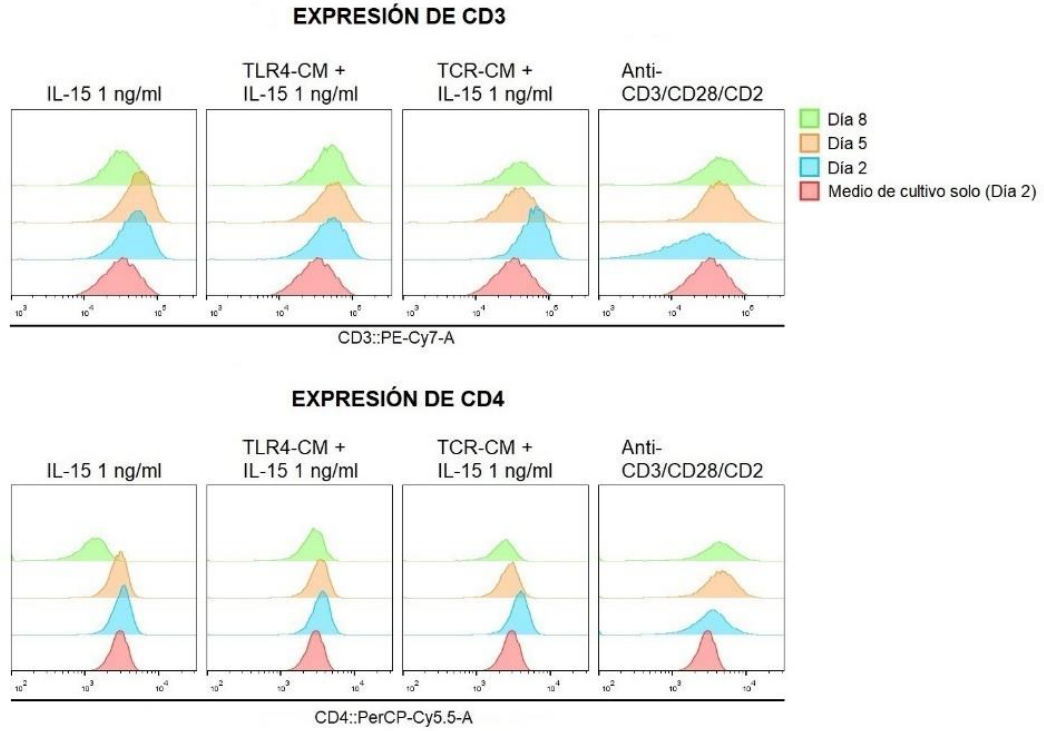
Posteriormente, se analizó la expresión de las moléculas de superficie CD3 y CD4 (**figura 8**). Como se mencionó anteriormente, la molécula CD3 es rápidamente internalizada después de la activación a través del TCR y lentamente se vuelve a expresar en la superficie celular, mientras que la expresión de CD4 aumenta después de 3-4 días. De acuerdo con lo anterior, las **figuras 8D-E** muestran que la activación canónica (directamente a través del TCR) disminuyó la expresión de CD3 al día 2 ( $I/I_2$  de 0.63) y lentamente se volvió a expresar ( $I/I_2$  de 1.02 después de 8 días de activación a través del TCR), mientras que CD4 fue continuamente aumentando su expresión hasta los 8 días ( $I/I_2$  de 1.40 después de 8 días de activación a través del TCR). Por lo que se corroboró que la expresión de CD3 y CD4, después de la activación bajo nuestras condiciones de cultivo, concuerda con lo establecido en la literatura (**Ridgway *et al.*, 1998; Wiegers *et al.*, 2000; Novak *et al.*, 2001; van der Donk *et al.*, 2021**).

El medio condicionado TLR4-CM aumentó la expresión de CD3 al día 2 ( $I/I_2$  de 1.29 para 1 ng/ml de IL-15 y 1.68 para 10 ng/ml de IL-15) y se mantuvo hasta los 8 días de cultivo ( $I/I_2$  de 1.18 para 1 ng/ml de IL-15 y 1.12 para 10 ng/ml de IL-15) (**figura 8B**). En cambio, las condiciones con sólo IL-15 o con el TCR-CM más IL-15, aumentaron la expresión de CD3 al día 2, regresando a los niveles basales al día 8 de cultivo. Por lo tanto, el TLR4-CM favoreció una mayor expresión de CD3 por más tiempo que el TCR-CM o que sólo con IL-15.

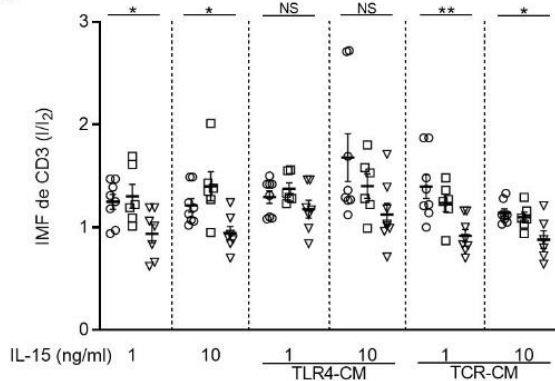
Similar a CD3, la condición con TLR4-CM más IL-15 favoreció el aumento de la expresión de CD4 durante 8 días ( $I/I_2$  de 0.85 y 0.88 en presencia de 1 y 10 ng/ml de IL-15,

respectivamente), mientras que el TCR-CM no tuvo efecto (**figura 8C**). La expresión de CD4 disminuyó con medio de cultivo solo ( $I/I_2$  de 0.88 después de 5 días y 0.78 después de 8 días de cultivo) o en presencia de IL-15 ( $I/I_2$  de 0.74 y 0.75 después de 8 días de cultivo en presencia de 1 y 10 ng/ml de IL-15, respectivamente), incluso cuando la viabilidad se mantuvo alta con esas condiciones (**figura 7**).

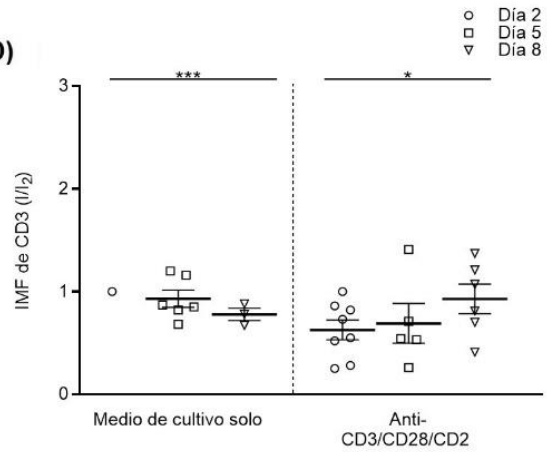
A)



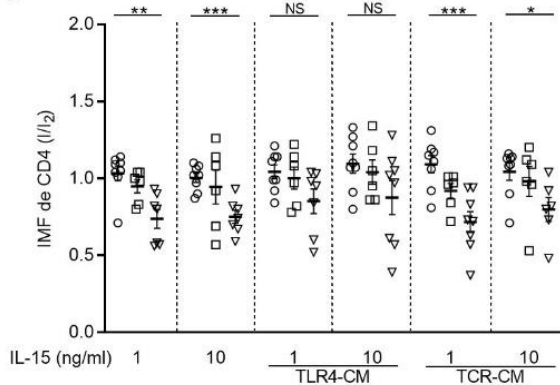
B)



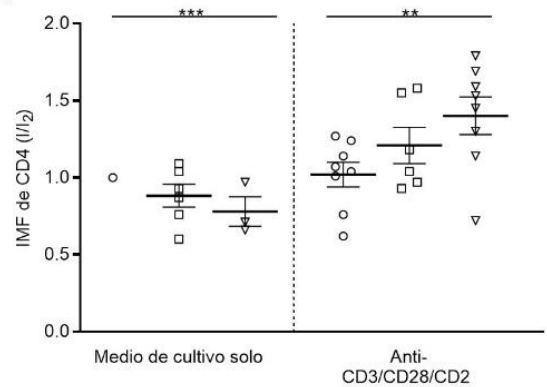
D)



C)



E)

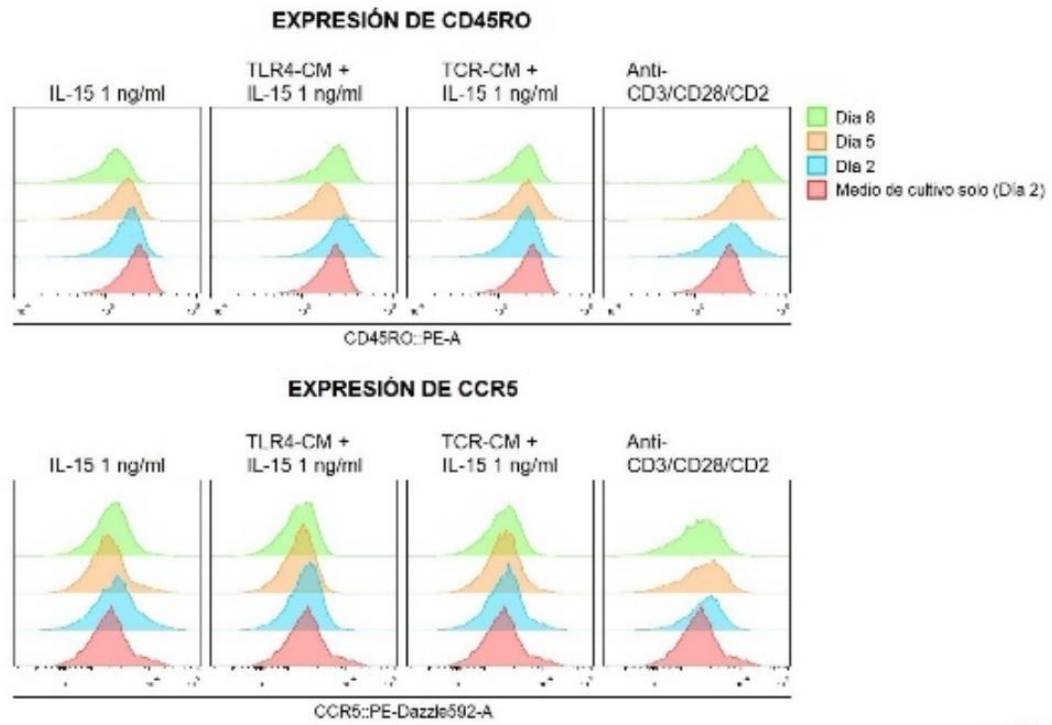


**Figura 8. La expresión de CD3 y CD4 en los linfocitos T CD4 humanos de memoria es mantenida por el medio condicionado proveniente de las PBMC activadas a través del TLR4.** Los linfocitos T CD4 humanos de memoria purificados fueron cultivados en medio AIM V con 5% de suero AB humano más 1 o 10 ng/ml de IL-15 y en ausencia o presencia de TLR4-CM o TCR-CM, como se indica, durante 2, 5 y 8 días. El medio condicionado proveniente de PBMC estimuladas con LPS (TLR4-CM) o con anticuerpos anti-CD3/anti-CD28/anti-CD2 (TCR-CM) fueron adicionados el día de la siembra. (A) Histogramas representativos de la expresión de CD3 y CD4 en células viables con diferentes condiciones de cultivo, como se indica. (B) La expresión de CD3 se incrementó ligeramente con todas las condiciones al día 2 pero sólo se mantuvo con el TLR4-CM más IL-15. (C) La expresión de CD4 se mantuvo sólo con el TLR4-CM más IL-15. (D-E) Las condiciones de cultivo promovieron la expresión de CD4 y disminuyeron la expresión de CD3 tras la activación con los anticuerpos anti-CD3/anti-CD28/anti-CD2 en ausencia de IL-15 o de los CM. La razón de cambio de la expresión de CD3 y CD4 se normalizó respecto al día 2 de cultivo con medio solo ( $I/I_2$ ). Cada punto representa un donador. Los datos mostrados en las gráficas (B-E) son el promedio de 8 experimentos independientes para los días 0, 2 y 8, y 6 experimentos independientes para el día 5 de cultivo y se muestra el error estándar. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; NS, no significativo

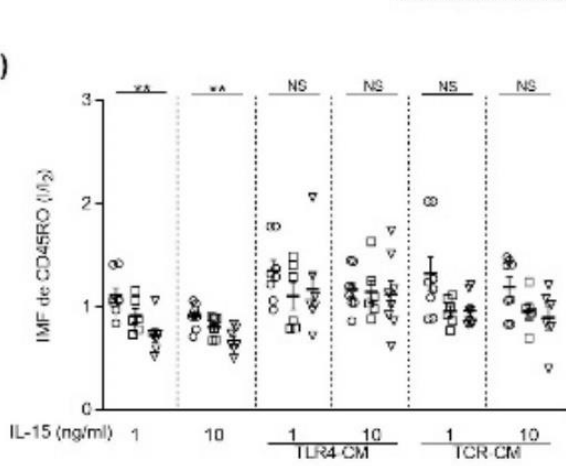
#### **4. La expresión de CD45RO y de CCR5 es mantenida por los factores solubles provenientes de la activación a través del TLR4 y del TCR.**

Otras moléculas analizadas fueron CD45RO y CCR5. La molécula CCR5 es el receptor de las quimiocinas CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ), CCL4 (MIP-1 $\beta$ ), CCL3L1 y CCL5 (RANTES). Tanto CD45RO como CCR5 fueron detectadas en los linfocitos T CD4 humanos de memoria, como se muestra en la **figura 9A**. Bajo las condiciones de cultivo, la expresión de CD45RO aumentó después de la activación directa de PBMC con los anticuerpos anti-CD3/anti-CD28/anti-CD2 (I/I<sub>2</sub> de 1.76 después de 2 días de activación a través del TCR) y se mantuvo en esos niveles durante los 8 días de cultivo (I/I<sub>2</sub> de 1.77) (**figura 9D**). Tanto el TLR4-CM como el TCR-CM aumentaron ligeramente la expresión de CD45RO al día 2 y mantuvieron estable esta expresión durante el tiempo de cultivo (**figura 9B**). De forma similar, CCR5 aumentó después de la activación a través del TCR (I/I<sub>2</sub> de 1.44 después de 2 días de activación a través del TCR) y esta expresión se mantuvo durante los 8 días de cultivo (I/I<sub>2</sub> de 1.54 después de 8 días de activación a través del TCR) (**figura 9E**). La expresión de CD45RO y de CCR5 disminuyó a lo largo del tiempo de cultivo en presencia de sólo IL-15 (I/I<sub>2</sub> de 0.81 y 0.74 para 1 y 10 ng/ml de IL-15, respectivamente, después de 8 días de cultivo). Se observó, en cambio, que, tanto el TLR4-CM como el TCR-CM mantuvieron la expresión de este receptor a niveles moderados (I/I<sub>2</sub> de 0.93 para TLR4-CM más 1 ng/ml de IL-15 y 0.87 para TCR-CM más 1 ng/ml de IL-15 después de 8 días de cultivo).

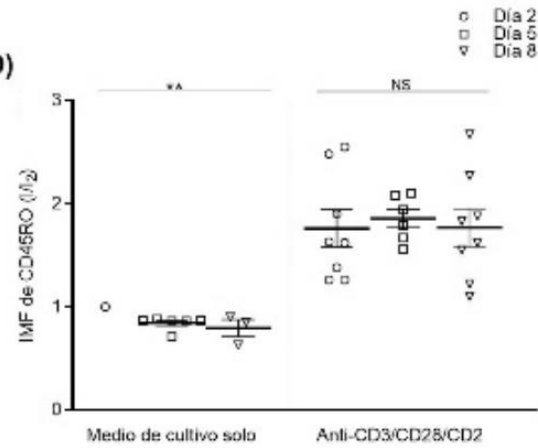
A)



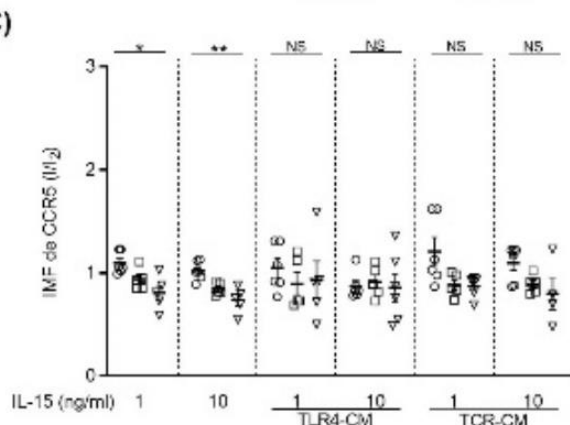
B)



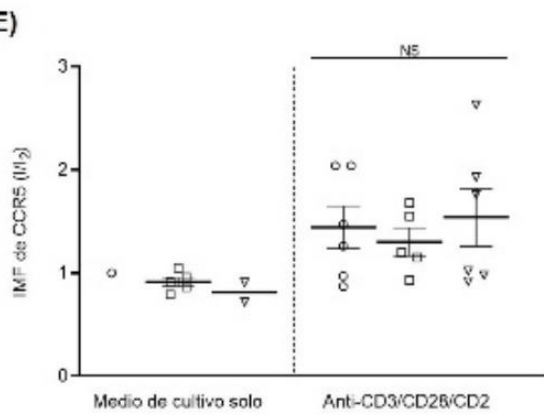
D)



C)



E)



**Figura 9. La expresión de CD45RO y CCR5 es mantenida por el medio condicionado proveniente de las PBMC activadas a través del TLR4 o del TCR.** Los linfocitos T CD4 humanos de memoria purificados fueron cultivados en medio AIM V con 5% de suero AB humano más 1 o 10 ng/ml de IL-15 y en ausencia o presencia de TLR4-CM o TCR-CM, como se indica, durante 2, 5 y 8 días. El medio condicionado proveniente de PBMC activadas con LPS (TLR4-CM) o con anticuerpos anti-CD3/anti-CD28/anti-CD2 (TCR-CM) fueron adicionados el día de la siembra. (A) Histogramas representativos de la expresión de CD45RO y CCR5 en células viables con diferentes condiciones de cultivo, como se indica. (B) La expresión de CD45RO se incrementó ligeramente al día 2 y se mantuvo hasta los 8 días de cultivo con ambos CM, pero no con IL-15 sola. (C) La expresión de CCR5 se mantuvo con ambos CM, pero no con IL-15 sola. (D-E) Las condiciones de cultivo promovieron la expresión de CD45RO y CCR5 posterior a la activación con anticuerpos anti-CD3/anti-CD28/anti-CD2 en ausencia de IL-15 o CM. La razón de cambio de la expresión de CD45RO y CCR5 se normalizó respecto al día 2 de cultivo con medio solo (I/I<sub>2</sub>). Cada punto representa un donador. Los datos mostrados en las gráficas (B-E) son el promedio de 8 experimentos independientes para los días 0, 2 y 8, y 6 experimentos independientes para el día 5 de cultivo y se muestra el error estándar. \*p < 0.05; \*\*p < 0.01; NS, no significativo

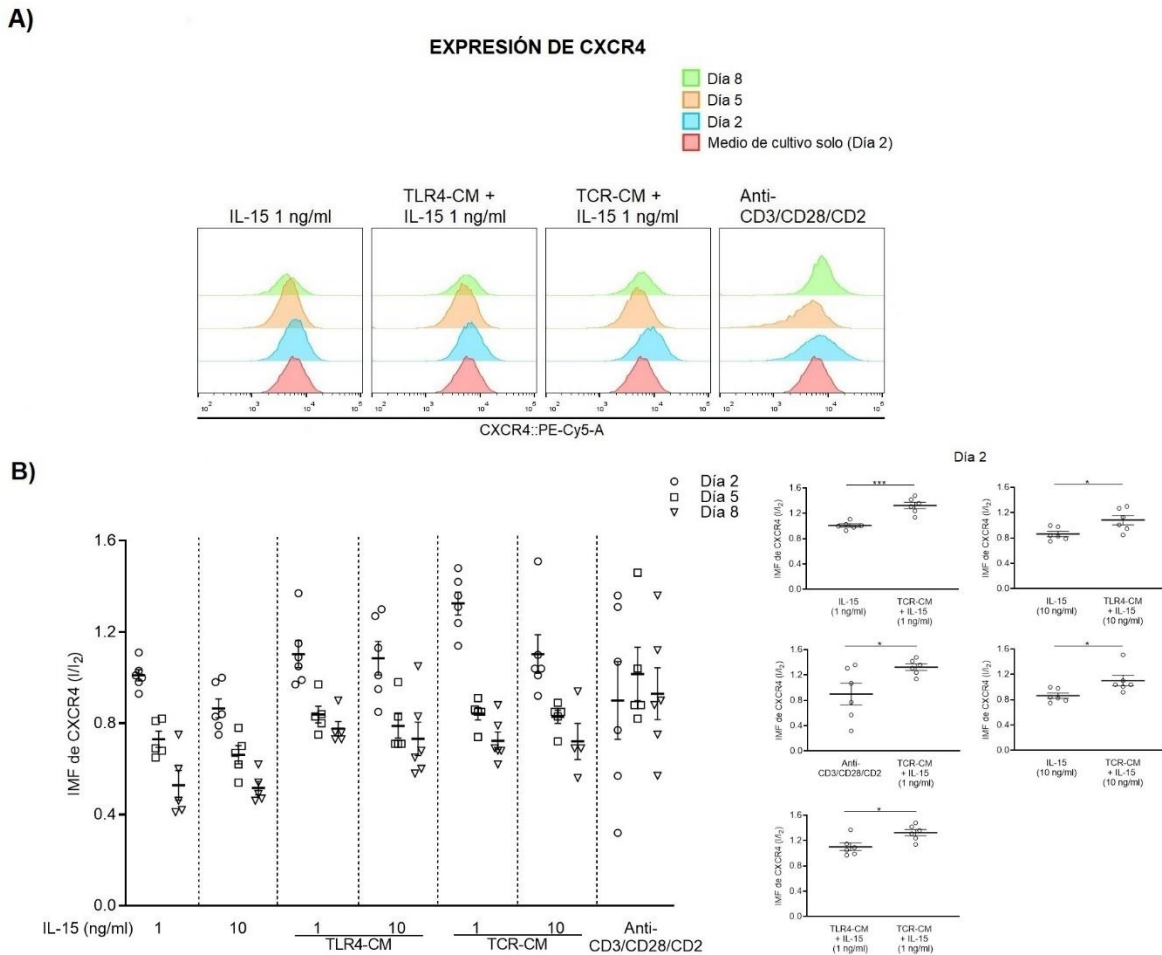


## **5. Factores solubles provenientes de la activación a través del TLR4 y del TCR aumentan la expresión de CXCR4.**

Otra molécula analizada fue CXCR4, la cual es el receptor de la quimiocina CXCL12 y se expresa de manera constitutiva en la superficie de los linfocitos T CD4. Después de la activación a través del TCR de los linfocitos T CD4 de memoria con los anticuerpos anti-CD3/anti-CD28/anti-CD2, la expresión de CXCR4 se mantuvo a lo largo del tiempo de cultivo ( $I/I_2$  de 0.90, 1.02 y 0.93 después de 2, 5 y 8 días de activación a través del TCR) (**figura 10**). Como se observó para CD3, CD4, CD45RO y CCR5, la expresión de estos marcadores en los linfocitos T CD4 humanos de memoria disminuyó a lo largo del tiempo de cultivo en presencia de sólo IL-15. CXCR4 disminuyó de forma similar con esta condición. En cambio, ambos medios condicionados aumentaron la expresión de este marcador ( $I/I_2$  de 1.10 y 1.32 para TLR4-CM y TCR-CM, respectivamente, más 1 ng/ml de IL-15, después de 2 días de cultivo) comparado con la IL-15 sola ( $I/I_2$  de 1.01 con 1 ng/ml de IL-15 después de 2 días de cultivo). El TCR-CM promovió la expresión de CXCR4 de forma significativa al día 2 de cultivo, siendo el mayor efecto observado en presencia de 1 ng/ml de IL-15 ( $I/I_2$  de 1.32). Posterior a los 2 días de cultivo, la expresión de este receptor disminuyó, aunque continuó siendo significativamente mayor ( $I/I_2$  de 0.72 después de 8 días de cultivo) que la expresión de las células cultivadas con sólo IL-15 ( $I/I_2$  de 0.53 después de 8 días de cultivo).

La condición con TLR4-CM indujo un efecto significativo al día 2 en presencia de 10 ng/ml de IL-15 ( $I/I_2$  de 1.08) comparado con la expresión de CXCR4 con sólo IL-15 ( $I/I_2$  de 0.87). Similar al efecto observado con el TCR-CM, la expresión de CXCR4 inducida por el TLR4-CM disminuyó al día 8 pero permaneció significativamente mayor que la

expresión en condiciones con IL-15 sola ( $I/I_2$  de 0.78 y 0.73 para TLR4-CM más 1 y 10 ng/ml de IL-15, respectivamente, y 0.53 y 0.52 para 1 y 10 ng/ml de IL-15 sola después de 8 días de cultivo) (figura 10B).



**Figura 10. La expresión de CXCR4 es aumentada por los medios condicionados provenientes de PBMC activadas a través del TLR4 o del TCR.** Los linfocitos T CD4 humanos de memoria purificados fueron cultivados en medio AIM V con 5% de suero AB humano más 1 o 10 ng/ml de IL-15 y en ausencia o presencia de TLR4-CM o TCR-CM, como se indica, durante 2, 5 y 8 días. El medio condicionado proveniente de PBMC activadas con LPS (TLR4-CM) o con anticuerpos anti-CD3/anti-CD28/anti-CD2 (TCR-CM) fueron adicionados el día de la siembra. (A) Histogramas representativos de la expresión de CXCR4 en células viables con diferentes condiciones de cultivo, como se indica. (B) La expresión de CXCR4 incrementó al día 2 con ambos CM, pero no con IL-15 sola. La expresión disminuyó a los días 5 y 8 de cultivo, pero se mantuvo mayor que su respectivo control de IL-15 sola. La razón de cambio de la expresión de CXCR4 se normalizó respecto al día 2 de cultivo con medio solo ( $I/I_2$ ). Cada punto representa un donador. Los datos mostrados en la gráfica (B) son el promedio de 8 experimentos independientes para los días 0, 2 y 8, y 6 experimentos independientes para el día 5 de cultivo y se muestra el error estándar. \* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.01$

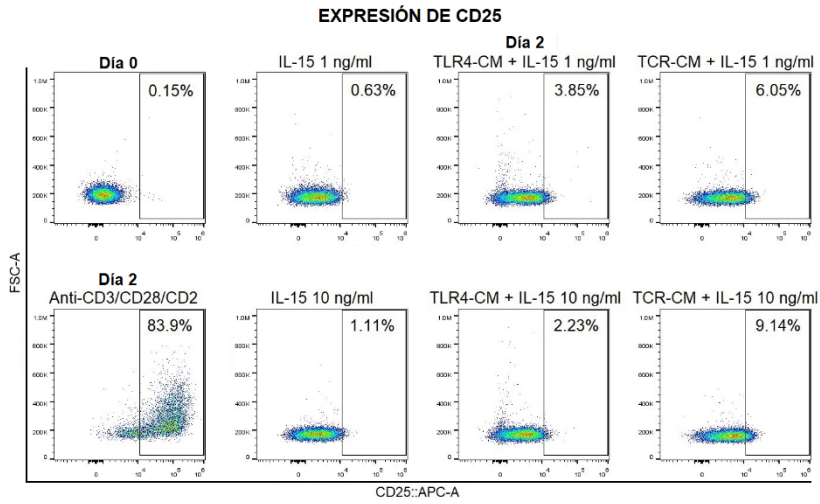
## **6. La expresión de CD25 aumenta en presencia de los factores solubles provenientes de la activación a través del TCR.**

Como se había indicado previamente, la activación del linfocito T a través del TCR induce la expresión de marcadores de activación bien caracterizados como CD25. La activación canónica de los linfocitos T CD4 de memoria a través del TCR, indujo una alta expresión de CD25 bajo nuestras condiciones de cultivo (86.77% de células CD25<sup>+</sup> e I/I<sub>2</sub> de 28.26 después de 5 días de activación a través del TCR) (**Figura 10D-E**).

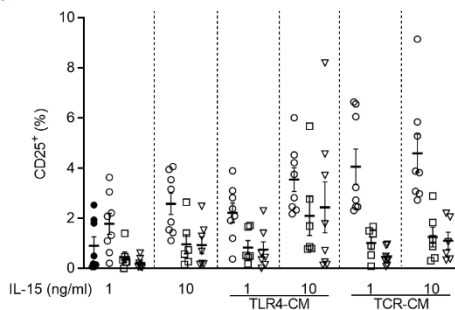
Los medios condicionados aumentaron el porcentaje de linfocitos T CD4 de memoria CD25<sup>+</sup>, aunque su efecto fue moderado comparado con los niveles inducidos por la activación directa a través del TCR (3.54% y 4.59% de linfocitos T CD4 de memoria CD25<sup>+</sup> para el TLR4-CM y el TCR-CM más 10 ng/ml de IL-15, respectivamente, después de 2 días de cultivo) (**figura 10B y 10D**). El aumento del porcentaje de células CD25<sup>+</sup> inducido por el TCR-CM fue significativo al día 2 de incubación en presencia de 1 o 10 ng/ml de IL-15 (4.06% y 4.59%, respectivamente), respecto a las células cultivadas con IL-15 sola (1.78% y 2.58% para 1 y 10 ng/ml, respectivamente). Sin embargo, no se observó un aumento significativo de la intensidad media de fluorescencia de CD25 con los CM (**figura 11C**).

La activación a través del TCR de los linfocitos de memoria indujo, como previamente se había mostrado, altos niveles del marcador de activación CD54 y de proliferación Ki67 (86.6% y I/I<sub>2</sub> de 18.7 para CD54, y 62.1% y I/I<sub>2</sub> de 18.6 para Ki67 después de 5 días de activación a través del TCR), pero no en presencia de los medios condicionados con las mismas condiciones de cultivo en experimentos paralelos (ver **anexo F**).

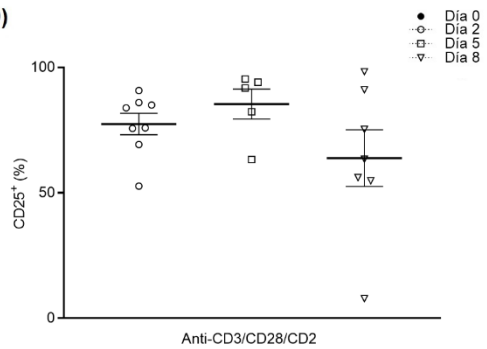
A)



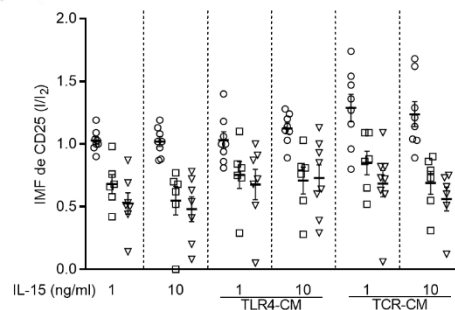
B)



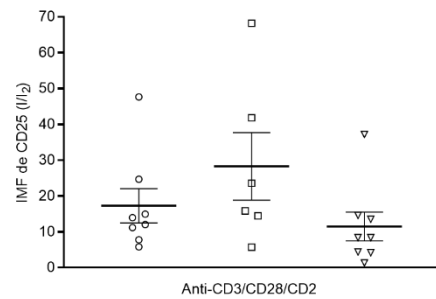
D)



C)



E)



**Figura 11. El porcentaje de linfocitos T CD4 de memoria CD25<sup>+</sup> aumentó en presencia de TCR-CM.** Los linfocitos T CD4 humanos de memoria purificados fueron cultivados en medio AIM V con 5% de suero AB humano más 1 o 10 ng/ml de IL-15 y en ausencia o presencia de TLR4-CM o TCR-CM, como se indica, durante 2, 5 y 8 días. El medio condicionado proveniente de PBMC estimuladas con LPS (TLR4-CM) o con anticuerpos anti-CD3/anti-CD28/anti-CD2 (TCR-CM) fueron adicionados el día de la siembra. (A) Gráficas de puntos representativas de FSC vs CD25 de las células viables con diferentes condiciones de cultivo. (B) El porcentaje de linfocitos T CD4 de memoria CD25<sup>+</sup> aumentó con TCR-CM al día 2. (C) La intensidad media de fluorescencia de CD25 tendió a aumentar con TCR-CM al día 2. (D) Porcentaje e (E) intensidad media de fluorescencia de células CD25<sup>+</sup> activadas a través del TCR (con anticuerpos anti-CD3/anti-CD28/anti-CD2). La razón de cambio de la expresión de CD25 se normalizó respecto al día 2 de cultivo con

medio solo ( $I/I_2$ ). Cada punto representa un donador. Los datos son el promedio de 8 experimentos independientes para los días 0, 2 y 8, y 6 experimentos independientes para el día 5 de cultivo. Las barras de error representan el error estándar. \* $p < 0.05$

## VIII. DISCUSIÓN

La respuesta inmune contra antígenos proteicos o contra PAMP induce la liberación de factores solubles para apoyar la activación y la proliferación de linfocitos específicos contra un antígeno; tales factores también tienen contacto con linfocitos en reposo que no son específicos al antígeno, y podrían tener un papel en su homeostasis, activación parcial, o la inducción de funciones efectoras (para una revisión ver referencias **Pacheco *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2020**).

*In vitro*, se ha observado que la activación colateral induce la expresión de marcadores de activación y proliferación de linfocitos T CD4 humanos en reposo (**Unutmaz *et al.*, 1994; Unutmaz *et al.*, 1995; Kanegane & Tosato, 1996; Geginat *et al.*, 2001; Bangs *et al.*, 2009; Sattler *et al.*, 2009; Munk *et al.*, 2011**). Estos efectos se han observado principalmente en presencia de FBS y altas concentraciones de citocinas, que pueden sobreestimar a las células. Estas condiciones que inducen efectos no estarían representando lo que en realidad sucede *in vivo*. En lugar de citocinas o quimiocinas particulares, en este proyecto de investigación se analizó el efecto *in vitro* de factores solubles derivados de células activadas sobre linfocitos T CD4 humanos de memoria que podrían semejar más a las combinaciones y concentraciones de factores solubles liberados durante una respuesta inmune.

El análisis se llevó a cabo bajo condiciones en las que se minimizaron posibles efectos aditivos, como la presencia del FBS, altas concentraciones de citocinas y la presencia de vesículas y restos celulares provenientes de células activadas. Los linfocitos de memoria fueron cultivados en un medio AIM V suplementado con 5% de suero humano e IL-15. Además, estas condiciones permitieron la activación de linfocitos de memoria con

anticuerpos anti-CD3/anti-CD28/anti-CD2, como se determinó por la alta expresión de marcadores de activación (CD25 y CD54) y proliferación, así como la expresión de los receptores de quimiocina CCR5 y CXCR4. En paralelo, los linfocitos T CD4 humanos de memoria purificados y no activados fueron expuestos a medios condicionados provenientes de PBMC activadas a través del TLR4 o del TCR.

Las PBMC se activaron durante 24 horas para la obtención del TLR4-CM y 3 días para el TCR-CM. Estos tiempos de activación se eligieron con base a lo descrito en la literatura (**Harris *et al.*, 2008; Ibrahim *et al.*, 2014; Luan *et al.*, 2017**). Sin embargo, se pueden explorar otros tiempos de activación, ya que la producción y concentración de los factores solubles varía, lo que podría resultar en otros efectos sobre los linfocitos T CD4 humanos de memoria.

Se puede descartar la posibilidad de que LPS residual pudiera estar promoviendo la expresión de CD3 y CD4 en los linfocitos de memoria, ya que hay una gran cantidad de información en la literatura que ha reportado la ausencia de TLR4 funcional en linfocitos humanos T CD4 de memoria provenientes de donadores sanos. Se ha reportado TLR4 funcional en linfocitos T CD4 sólo en activación a través del TCR y en linfocitos T<sub>Reg</sub> durante enfermedades inflamatorias (**Komai-Koma *et al.*, 2004; Caron *et al.*, 2005; Lewkowicz *et al.*, 2006; Pace *et al.*, 2015; Hao *et al.*, 2017; Castro *et al.*, 2022**). Caron y colaboradores (**Caron *et al.*, 2005**) propusieron que el LPS no afecta a los linfocitos T CD4 humanos probablemente debido a 1) la ausencia de moléculas accesorias en linfocitos T (como CD14) que pertenece al complejo del receptor de LPS, 2) la localización intracelular de las proteínas TLR4, que pueden ser modificadas para la expresión en la membrana de la célula posterior a la activación o, 3) la ausencia de las proteínas TLR4 en los linfocitos T CD4 (**Caron *et al.*, 2005**). De manera que, la evidencia reciente y los

resultados obtenidos (ausencia de la expresión de Ki67 posterior a la exposición con los sobrenadantes) no apoyan el efecto directo del LPS sobre los linfocitos T CD4 de memoria provenientes de individuos sanos.

En este trabajo se realizó la activación a través del TCR utilizando, además de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, anticuerpos anti-CD2. La molécula CD2 es un receptor coestimulador expresado principalmente en linfocitos T y NK que se une a LFA-3, una proteína de superficie celular expresada en células presentadoras de antígenos, durante la sinapsis inmunológica. CD2 influye en la reorganización del citoesqueleto de actina, la señalización celular y la supervivencia de los linfocitos T (para una revisión ver la referencia **Binder, 2020**). Por tanto, la participación de CD2 en la activación a través del TCR es importante para una activación óptima.

El uso de anticuerpos anti-CD2 puede explicar las variaciones del tipo y concentración de factores solubles producidos por PBMC activadas con sólo anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28. Harris y colaboradores (2008) reportan que la activación de PBMC humanas con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 durante 72 horas, induce la producción de IFN- $\gamma$  e IL-2 en el rango de nanogramos, mientras que con nuestras condiciones no se detectaron dichas citocinas. En cambio, ellos no detectaron CXCL12 (SDF1 $\alpha$ ), mientras que con nuestras condiciones se detectó en un rango de nanogramos. Otra diferencia es que ellos reportan una mayor concentración de quimiocinas comparando con nuestros resultados. Consistentemente no hubo detección de IL-15.

La citocina IL-15 es producida principalmente por monocitos/macrófagos durante la respuesta inmune a patógenos microbianos y parásitos (**Badolato et al., 1997; Fehniger & Caligiuri, 2001; Perera et al., 2012**), y no se ha descrito su producción durante una respuesta inmune viral donde hay activación a través del TCR. Se ha descrito su



participación en la proliferación homeostática de los linfocitos T CD4 de memoria, así como para la inducción de moléculas anti-apoptóticas (Nolz & Richer, 2020) y pro-apoptóticas (Oh *et al.*, 2008). Es importante señalar que, bajo nuestras condiciones, la adición de 10 ng/ml de IL-15 no fue suficiente para inducir proliferación, pero sí promueve viabilidad, por lo que suponemos la participación de otros factores solubles para la proliferación.

Los medios condicionados provenientes de PBMC activadas a través del TLR4 o del TCR contenían concentraciones de citocinas en un rango de picogramos/ml, con excepción de IL-6, que al igual que las quimiocinas CCL4 (MIP-1 $\beta$ ), CXCL8 (IL-8), CCL2 (MCP-1) y CXCL12 (SDF-1 $\alpha$ ), se produjeron en concentraciones de nanogramos/ml. No se determinaron cuáles de los factores solubles presentes en los medios condicionados podrían ser los posibles responsables de los efectos observados. Nuestros resultados pueden reflejar un efecto combinado de citocinas y quimiocinas que sí detectamos y que se ha reportado tienen efectos sobre linfocitos T CD4 humanos de memoria como IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-1RA, IL-10, CXCL8 (IL-8) y CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ) (ver **tabla 1**).

Los resultados indican que las concentraciones (en el rango de picogramos) de citocinas o quimiocinas producidas por otras PBMC activadas, no activan a los linfocitos T CD4 humanos de memoria. Nuestras observaciones también indican que las citocinas y quimiocinas producidas por células activadas a través del TCR o del TLR4 pueden estabilizar (CD3, CD4, CD45RO y CCR5) (**figuras 8 y 9**) o aumentar (CXCR4) (**figura 10**) la expresión de receptores relevantes para la respuesta inmune de linfocitos T CD4 de memoria. De manera que, las citocinas y quimiocinas producidas por las células activadas contribuyen a la estabilidad del fenotipo en reposo *in vitro*. Además, el aumento de la

expresión de CXCR4 sugiere que los factores solubles de las células activadas podrían aumentar la capacidad de migración de los linfocitos T de memoria en reposo. El perfil de expresión de CXCR4 en los histogramas indica una marcada homogeneidad posterior a la exposición con los TLR4-CM y TCR-CM (**figura 10**), sugiriendo que la expresión de CXCR4 aumenta en todas las subpoblaciones celulares (de memoria central y efectora); sin embargo, es necesaria una mayor caracterización del fenotipo celular para determinar su papel en la función celular.

En particular, incluso cuando CXCR4 se expresa de forma constitutiva por los linfocitos T CD4 de memoria, tanto el TLR4-CM como el TCR-CM aumentaron la expresión de esta molécula en el día 2, y aunque disminuyó en los días consecutivos su expresión aún era mayor que en presencia de sólo IL-15. Esta disminución posiblemente se debió al consumo de los factores, responsables de este efecto, presentes en el medio condicionado. CXCR4 y su ligando CXCL12 (SDF-1) están involucrados en muchas funciones, como la regulación del tráfico de linfocitos maduros al tejido linfático secundario y su retención en la médula ósea para su autorrenovación, controlando así la distribución de linajes mieloides y linfoides mediante la regulación de la entrada y salida de la médula ósea (**Liu *et al.*, 2015**; para una revisión ver referencia **Pabst, 2018**). Además, se ha descrito que la interacción CXCL12-CXCR4 favorece la supervivencia y la activación del linfocito T (**Suzuki *et al.*, 2001**).

Está reportado que la expresión de CXCR4 disminuye tras la activación a través del TCR, la activación policlonal, la interacción con CXCL12, e IFN- $\gamma$ , mientras que IL-2, IL-4, IL-7, e IL-15 aumentan su expresión (**Arieta Kuksin *et al.*, 2015**). De manera que, las citocinas y quimiocinas producidas por las células activadas pueden favorecer la estabilidad del fenotipo celular en los linfocitos en reposo y aumentar su capacidad de

migración y supervivencia a través de la expresión de CXCR4. En patologías inflamatorias, como la infección por el VIH, un aumento de la expresión de CXCR4 puede ser relevante, ya que la activación inmune se correlaciona y predice la aparición de cepas virales con tropismo por CXCR4 y la progresión de la enfermedad (**Connell *et al.*, 2020**).

En contraste con lo reportado en la literatura, los resultados presentados en este trabajo de investigación no muestran la inducción de marcadores de activación o proliferación tras la exposición a los sobrenadantes (ver **anexo F**). Esto podría estar relacionado con las concentraciones de citocinas y quimiocinas producidas por PBMC activadas en comparación con las concentraciones de citocinas añadidas en otros estudios. La observación previa de que los linfocitos en reposo responden a altas concentraciones de citocinas mediante la proliferación y expresan fenotipos de activación, muestra que los linfocitos T tienen, de hecho, la capacidad de activarse de una manera no específica al antígeno. Sin embargo, la importancia de esta capacidad para la función celular puede ser difícil de evaluar debido a la dificultad para alcanzar altas concentraciones de citocinas *in vivo*.

La estimulación colateral de linfocitos T CD4 de memoria promovida por los factores solubles producidos por la activación a través del TCR, aumenta la expresión de CXCR4 acompañada del mantenimiento de la expresión de CD45RO y CCR5, y un fenotipo en reposo (por la baja o nula inducción de la expresión de CD25, CD54 y el marcador de proliferación). Debido a la ausencia de IL-15 en este medio proinflamatorio, los linfocitos T CD4 de memoria podrían requerir de la citocina IL-7 para subsistir, por lo que si no migran hacia la fuente productora (ej. médula ósea), el medio proinflamatorio que las rodea afectará de forma negativa su viabilidad. Este mecanismo apoya la propuesta de que factores solubles producidos por células durante una respuesta a virus, inducen un

espacio inmunológico para los linfocitos T específicos que se activan a través del TCR y se encuentran proliferando (**Bangs *et al.*, 2009; Serbanescu *et al.*, 2016; Sckisel *et al.*, 2017**). De manera que la estimulación colateral podría ser uno de los mecanismos por el cual los linfocitos de memoria migren hacia sus nichos para la renovación homeostática (**Liu *et al.*, 2015; Pabst, 2018**).

Por otro lado, la ausencia de IL-15 en el medio condicionado donde se activaron los receptores TLR4 con LPS en cultivos de PBMC, se puede deber a que fue consumida por otras células durante la activación, como posiblemente ocurrió con la citocina IL-2 en el medio condicionado donde se activó a través del TCR en cultivos de PBMC.

El efecto observado de la estimulación colateral de linfocitos T CD4 de memoria, mediada por el medio condicionado proveniente de la activación del TLR4, fue el mantenimiento de la expresión de CD3, CD4, CD45RO y CCR5, un fenotipo en reposo y un aumento de la expresión de CXCR4, mientras que la viabilidad no se vio afectada.

Estos resultados nos podrían indicar que los linfocitos T CD4 de memoria que se encuentran cercanas a la respuesta inmune mediada por TLR4, tienen una mejor estabilidad tanto en la viabilidad como en su fenotipo celular, y no necesariamente tengan que regresar a médula ósea para disponer de IL-7 (posiblemente por la tendencia de expresar menos CXCR4 que los linfocitos estimulados colateralmente con el TCR-CM). De manera que la estimulación colateral mediada por factores solubles provenientes de la activación del TLR4 apoya la propuesta de que un medio proinflamatorio promueve el mantenimiento del repertorio de memoria policlonal (**Tough *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1998; Geginat *et al.*, 2001; Di Genova *et al.*, 2006**).

El análisis por tiempo prolongado de los linfocitos T CD4 de memoria incubados con medios proinflamatorios, apoya la propuesta de que factores solubles producidos por

células durante una respuesta a virus o bacterias podrían estar participando como estimuladores paracrinos, estabilizando el fenotipo de linfocitos T en reposo y cambiando la expresión de los receptores de quimiocinas, posiblemente modificando sus capacidades de migración. Estos resultados divergen de los efectos reportados por algunos autores sobre el efecto de citocinas proinflamatorias que inducen una activación colateral (*bystander activation*), por lo que proponemos el concepto de estimulación colateral (*bystander stimulation*) para describir los efectos de medios proinflamatorios sobre la viabilidad y el mantenimiento del fenotipo en reposo de linfocitos T de memoria.

## **IX. CONCLUSIÓN**

Este trabajo de investigación abordó los efectos que tienen factores inflamatorios sobre la viabilidad y el fenotipo de linfocitos T CD4 humanos de memoria. Para ello, fue necesario establecer condiciones de cultivo por tiempos prolongados para mantener linfocitos T CD4 humanos de memoria purificados, y que nos permitieran evaluar los efectos de factores proinflamatorios provenientes de la activación del TCR o TLR4 de cultivos de PBMC humanas.

Por un lado, el medio proinflamatorio producido por la activación del TCR, promueve el aumento en la expresión de CXCR4 y la disminución de la viabilidad, mientras que el medio proinflamatorio producido por la activación del TLR4, aunque promueve menos, también induce la expresión de CXCR4, pero sin un efecto sobre la viabilidad celular. Ambas condiciones promueven el mantenimiento de las moléculas de superficie CD3, CD4, CD45RO y CCR5, así como el mantenimiento de un fenotipo en reposo (ausencia de las moléculas CD25, CD54 y Ki67).

## X. REFERENCIAS

- **Alanio** C, Nicoli F, Sultanik P, Flecken T, Perot B, Duffy D, Bianchi E, Lim A, Clave E, van Buuren MM, Schnuriger A, Johnsson K, Boussier J, Garbarg-Chenon A, Bousquet L, Mottez E, Schumacher TN, Toubert A, Appay V, Heshmati F, Thimme R, Pol S, Mallet V, Albert ML. Bystander hyperactivation of preimmune CD8+ T cells in chronic HCV patients. *Elife*. 2015 Nov 14;4:e07916. doi: 10.7554/eLife.07916.
- **Andrew** DP, Ruffing N, Kim CH, Miao W, Heath H, Li Y, Murphy K, Campbell JJ, Butcher EC, Wu L. C-C chemokine receptor 4 expression defines a major subset of circulating nonintestinal memory T cells of both Th1 and Th2 potential. *J Immunol*. 2001 Jan 1;166(1):103-11. doi: 10.4049/jimmunol.166.1.103.
- **Arieta Kuksin** C, Gonzalez-Perez G, Minter LM. CXCR4 expression on pathogenic T cells facilitates their bone marrow infiltration in a mouse model of aplastic anemia. *Blood*. 2015 Mar 26;125(13):2087-94. doi: 10.1182/blood-2014-08-594796.
- **Arlettaz** L, Barbey C, Dumont-Girard F, Helg C, Chapuis B, Roux E, Roosnek E. CD45 isoform phenotypes of human T cells: CD4(+) CD45RA(-)RO(+) memory T cells re-acquire CD45RA without losing CD45RO. *Eur J Immunol*. 1999 Dec;29(12):3987-94. doi: 10.1002/(SICI)1521-4141(199912)29:12<3987::AID-IMMU3987>3.0.CO;2-4.
- **Badolato** R, Ponzi AN, Millesimo M, Notarangelo LD, Musso T. Interleukin-15 (IL-15) induces IL-8 and monocyte chemotactic protein 1 production in human monocytes. *Blood*. 1997 Oct 1;90(7):2804-9.
- **Bajnok** A, Ivanova M, Rigó J Jr, Toldi G. The Distribution of Activation Markers and Selectins on Peripheral T Lymphocytes in Preeclampsia. *Mediators Inflamm*. 2017; 2017:8045161. doi: 10.1155/2017/8045161.
- **Bangs** SC, McMichael AJ, Xu XN. Bystander T cell activation--implications for HIV infection and other diseases. *Trends Immunol*. 2006 Nov;27(11):518-24. doi: 10.1016/j.it.2006.09.006.
- **Bangs** SC, Baban D, Cattan HJ, Li CK, McMichael AJ, Xu XN. Human CD4+ memory T cells are preferential targets for bystander activation 523 and apoptosis. *J Immunol*. 2009 Feb 15;182(4):1962-71. doi: 10.4049/jimmunol.0802596.

- **Berard** M, Tough DF. Qualitative differences between *naïve* and memory T cells. *Immunology*. 2002 Jun;106(2):127-38. doi: 10.1046/j.1365-2567.2002.01447.x.
- **Bianchi** ME, Mezzapelle R. The Chemokine Receptor CXCR4 in Cell Proliferation and Tissue Regeneration. *Front Immunol*. 2020 Aug 28; 11:2109. doi: 10.3389/fimmu.2020.02109.
- **Binder** C, Cvetkovski F, Sellberg F, Berg S, Paternina Visbal H, Sachs DH, Berglund E, Berglund D. CD2 Immunobiology. *Front Immunol*. 2020 Jun 9; 11:1090. doi: 10.3389/fimmu.2020.01090.
- **Boise** LH, Minn AJ, June CH, Lindsten T, Thompson CB. Growth factors can enhance lymphocyte survival without committing the cell to undergo cell division. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995a Jun 6;92(12):5491-5. doi: 10.1073/pnas.92.12.5491.
- **Boise** LH, Minn AJ, Noel PJ, June CH, Accavitti MA, Lindsten T, Thompson CB. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity*. 1995b Jul;3(1):87-98. doi: 10.1016/1074-7613(95)90161-2.
- **Boyman** O, Létourneau S, Krieg C, Sprent J. Homeostatic proliferation and survival of *naïve* and memory T cells. *Eur J Immunol*. 2009 Aug;39(8):2088-94. doi: 10.1002/eji.200939444.
- **Boyman** O. Bystander activation of CD4+ T cells. *Eur J Immunol*. 2010 Apr;40(4):936-9. doi: 10.1002/eji.201040466.
- **Brennan** FM, Smith NM, Owen S, Li C, Amjadi P, Green P, Andersson A, Palfreeman AC, Hillyer P, Foey A, Beech JT, Feldmann M. Resting CD4+ effector memory T cells are precursors of bystander-activated effectors: a surrogate model of rheumatoid arthritis synovial T-cell function. *Arthritis Res Ther*. 2008;10(2):R36. doi: 10.1186/ar2390.
- **Bronstein-Sitton** N, Wang L, Cohen L, Baniyash M. Expression of the T cell antigen receptor zeta chain following activation is controlled at distinct checkpoints. Implications for cell surface receptor down-modulation and re-expression. *J Biol Chem*. 1999 Aug 13;274(33):23659-65. doi: 10.1074/jbc.274.33.23659.
- **Bushar** ND, Corbo E, Schmidt M, Maltzman JS, Farber DL. Ablation of SLP-76 signaling after T cell priming generates memory CD4 T cells impaired in steady-state and cytokine-driven homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jan 12;107(2):827-31. doi: 10.1073/pnas.0908126107.



- **Campbell** DJ, Kim CH, Butcher EC. Chemokines in the systemic organization of immunity. *Immunol Rev.* 2003 Oct; 195:58-71. doi: 10.1034/j.1600-065x.2003.00067.x.
- **Caron** G, Duluc D, Frémaux I, Jeannin P, David C, Gascan H, Delneste Y. Direct stimulation of human T cells via TLR5 and TLR7/8: flagellin and R-848 up-regulate proliferation and IFN-gamma production by memory CD4+ T cells. *J Immunol.* 2005 Aug 1;175(3):1551-7. doi: 10.4049/jimmunol.175.3.1551.
- **Castells-Sala** C, Martorell J, Balcells M. A human plasma derived supplement preserves function of human vascular cells in absence of fetal bovine serum. *Cell Biosci.* 2017 Aug 14; 7:41. doi: 10.1186/s13578-017-0164-4.
- **Castro** C, Oyamada HAA, Cafasso MOSD, Lopes LM, Monteiro C, Sacramento PM, Alves-Leon SV, da Fontoura Galvão G, Hygino J, de Souza JPBM, Bento CAM. Elevated proportion of TLR2- and TLR4-expressing Th17-like cells and activated memory B cells was associated with clinical activity of cerebral cavernous malformations. *J Neuroinflammation.* 2022 Feb 2;19(1):28. doi: 10.1186/s12974-022-02385-2.
- **Castro-Sánchez** P, Aguilar-Sopeña O, Alegre-Gómez S, Ramirez-Munoz R, Roda-Navarro P. Regulation of CD4+ T Cell Signaling and Immunological Synapse by Protein Tyrosine Phosphatases: Molecular Mechanisms in Autoimmunity. *Front Immunol.* 2019 Jun 26; 10:1447. doi: 10.3389/fimmu.2019.01447.
- **Champagne** P, Ogg GS, King AS, Knabenhans C, Ellefsen K, Nobile M, Appay V, Rizzardi GP, Fleury S, Lipp M, Förster R, Rowland-Jones S, Sékaly RP, McMichael AJ, Pantaleo G. Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes. *Nature.* 2001 Mar 1;410(6824):106-11. doi: 10.1038/35065118.
- **Chetoui** N, Boisvert M, Gendron S, Aoudjit F. Interleukin-7 promotes the survival of human CD4+ effector/memory T cells by up-regulating Bcl-2 proteins and activating the JAK/STAT signalling pathway. *Immunology.* 2010 Jul;130(3):418-26. doi: 10.1111/j.1365-2567.2009.03244.x.
- **Chevalier** N, Macia L, Tan JK, Mason LJ, Robert R, Thorburn AN, Wong CH, Tsai LM, Bourne K, Brink R, Yu D, Mackay CR. The Role of Follicular Helper T Cell Molecules and Environmental Influences in Autoantibody Production and Progression to Inflammatory Arthritis in Mice. *Arthritis Rheumatol.* 2016 Apr;68(4):1026-38. doi: 10.1002/art.39481.

- **Chirathaworn** C, Tibbetts SA, Chan MA, Benedict SH. Cross-linking of ICAM-1 on T cells induces transient tyrosine phosphorylation and inactivation of cdc2 kinase. *J Immunol.* 1995 Dec 15;155(12):5479-82.
- **Chirathaworn** C, Kohlmeier JE, Tibbetts SA, Rumsey LM, Chan MA, Benedict SH. Stimulation through intercellular adhesion molecule-1 provides a second signal for T cell activation. *J Immunol.* 2002 Jun 1;168(11):5530-7. doi: 10.4049/jimmunol.168.11.5530.
- **Chu** T, Tyznik AJ, Roepke S, Berkley AM, Woodward-Davis A, Pattacini L, Bevan MJ, Zehn D, Prlic M. Bystander-activated memory CD8 T cells control early pathogen load in an innate-like, NKG2D-dependent manner. *Cell Rep.* 2013 Mar 28;3(3):701-8. doi: 10.1016/j.celrep.2013.02.020.
- **Cortés-Rubio** CN. 2013. Efecto de la activación sobre la fusión de linfocitos T inducida por las proteínas de la envoltura del VIH. Tesis de Maestría, México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- **Clark** RA, Watanabe R, Teague JE, Schlapbach C, Tawa MC, Adams N, Dorosario AA, Chaney KS, Cutler CS, Leboeuf NR, Carter JB, Fisher DC, Kupper TS. Skin effector memory T cells do not recirculate and provide immune protection in alemtuzumab-treated CTCL patients. *Sci Transl Med.* 2012 Jan 18;4(117):117ra7. doi: 10.1126/scitranslmed.3003008.
- **Clute** SC, Watkin LB, Cornberg M, Naumov YN, Sullivan JL, Luzuriaga K, Welsh RM, Selin LK. Cross-reactive influenza virus-specific CD8+ T cells contribute to lymphoproliferation in Epstein-Barr virus-associated infectious mononucleosis. *J Clin Invest.* 2005 Dec;115(12):3602-12. doi: 10.1172/JCI25078.
- **Colin-York** H, Javanmardi Y, Skamrahl M, Kumari S, Chang VT, Khuon S, Taylor A, Chew TL, Betzig E, Moeendarbary E, Cerundolo V, Eggeling C, Fritzsche M. Cytoskeletal Control of Antigen-Dependent T Cell Activation. *Cell Rep.* 2019 Mar 19;26(12):3369-3379.e5. doi: 10.1016/j.celrep.2019.02.074.
- **Connell** BJ, Hermans LE, Wensing AMJ, Schellens I, Schipper PJ, van Ham PM, de Jong DTCM, Otto S, Mathe T, Moraba R, Borghans JAM, Papathanasopoulos MA, Kruize Z, Venter FWD, Kootstra NA, Tempelman H, Tesselaar K, Nijhuis M. Immune activation

correlates with and predicts CXCR4 co-receptor tropism switch in HIV-1 infection. *Sci Rep*. 2020 Sep 28;10(1):15866. doi: 10.1038/s41598-020-71699-z.

- **Contento** RL, Molon B, Boullaran C, Pozzan T, Manes S, Marullo S, Viola A. CXCR4-CCR5: a couple modulating T cell functions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jul 22;105(29):10101-6. doi: 10.1073/pnas.0804286105.

- **Cossarizza** A, Ortolani C, Paganelli R, Barbieri D, Monti D, Sansoni P, Fagiolo U, Castellani G, Bersani F, Londei M, Franceschi C. CD45 isoforms expression on CD4+ and CD8+ T cells throughout life, from newborns to centenarians: implications for T cell memory. *Mech Ageing Dev*. 1996 Mar 29;86(3):173-95. doi: 10.1016/0047-6374(95)01691-0.

- **De Boer** RJ, Perelson AS. Quantifying T lymphocyte turnover. *J Theor Biol*. 2013 Jun 21;327:45-87. doi: 10.1016/j.jtbi.2012.12.025.

- **den Braber** I, Mugwagwa T, Vrisekoop N, Westera L, Mögling R, de Boer AB, Willems N, Schrijver EH, Spierenburg G, Gaiser K, Mul E, Otto SA, Ruiters AF, Ackermans MT, Miedema F, Borghans JA, de Boer RJ, Tesselaar K. Maintenance of peripheral naive T cells is sustained by thymus output in mice but not humans. *Immunity*. 2012 Feb 24;36(2):288-97. doi: 10.1016/j.immuni.2012.02.006.

- **Di Genova** G, Roddick J, McNicholl F, Stevenson FK. Vaccination of human subjects expands both specific and bystander memory T cells but antibody production remains vaccine specific. *Blood*. 2006 Apr 1;107(7):2806-13. doi: 10.1182/blood-2005-08-3255.

- **Di Genova** G, Savelyeva N, Suchacki A, Thirdborough SM, Stevenson FK. Bystander stimulation of activated CD4+ T cells of unrelated specificity following a booster vaccination with tetanus toxoid. *Eur J Immunol*. 2010 Apr;40(4):976-85. doi: 10.1002/eji.200940017.

- **Di Rosa** F, Gebhardt T. Bone Marrow T Cells and the Integrated Functions of Recirculating and Tissue-Resident Memory T Cells. *Front Immunol*. 2016 Feb 16; 7:51. doi: 10.3389/fimmu.2016.00051.

- **Dunlock** VE, Arp AB, Singh SP, Charrin S, Nguyen V, Jansen E, Schaper F, Beest MT, Zuidschewoude M, van Deventer SJ, Nakken B, Szodoray P, Demaria MC, Wright MD, Querol Cano L, Rubinstein E, van Spruiel AB. Tetraspanin CD53 controls T cell immunity

through regulation of CD45RO stability, mobility, and function. *Cell Rep.* 2022 Jun 28;39(13):111006. doi: 10.1016/j.celrep.2022.111006.

- **DuPage** M, Bluestone JA. Harnessing the plasticity of CD4(+) T cells to treat immune-mediated disease. *Nat Rev Immunol.* 2016 Mar;16(3):149-63. doi: 10.1038/nri.2015.18.

- **Dustin** ML, Rothlein R, Bhan AK, Dinarello CA, Springer TA. Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol.* 1986 Jul 1;137(1):245-54.

- **Dutton** RW, Bradley LM, Swain SL. T cell memory. *Annu Rev Immunol.* 1998; 16:201-23. doi: 10.1146/annurev.immunol.16.1.201.

- **El-Mezzein** RE, Matsumoto T, Nomiya H, Miike T. Increased secretion of IL-18 in vitro by peripheral blood mononuclear cells of patients with bronchial asthma and atopic dermatitis. *Clin Exp Immunol.* 2001 Nov;126(2):193-8. doi: 10.1046/j.1365-2249.2001.01664.x.

- **Ellefsen** K, Harari A, Champagne P, Bart PA, Sékaly RP, Pantaleo G. Distribution and functional analysis of memory antiviral CD8 T cell responses in HIV-1 and cytomegalovirus infections. *Eur J Immunol.* 2002 Dec;32(12):3756-64. doi: 10.1002/1521-4141(200212)32:12<3756::AID-IMMU3756>3.0.CO;2-E.

- **Fagnoni** FF, Vescovini R, Passeri G, Bologna G, Pedrazzoni M, Lavagetto G, Casti A, Franceschi C, Passeri M, Sansoni P. Shortage of circulating naive CD8(+) T cells provides new insights on immunodeficiency in aging. *Blood.* 2000 May 1;95(9):2860-8.

- **Farber** DL. Biochemical signaling pathways for memory T cell recall. *Semin Immunol.* 2009 Apr;21(2):84-91. doi: 10.1016/j.smim.2009.02.003.

- **Farber** DL, Yudanin NA, Restifo NP. Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. *Nat Rev Immunol.* 2014 Jan;14(1):24-35. doi: 10.1038/nri3567.

- **Fearon** DT, Carr JM, Telaranta A, Carrasco MJ, Thaventhiran JE. The rationale for the IL-2-independent generation of the self-renewing central memory CD8+ T cells. *Immunol Rev.* 2006 Jun; 211:104-18. doi: 10.1111/j.0105-2896.2006.00390.x.

- **Fehniger** TA, Caligiuri MA. Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood.* 2001 Jan 1;97(1):14-32. doi: 10.1182/blood.v97.1.14.

- **Ganusov** VV, De Boer RJ. Do most lymphocytes in humans really reside in the gut? *Trends Immunol.* 2007 Dec;28(12):514-8. doi: 10.1016/j.it.2007.08.009.
- **Gasper** DJ, Tejera MM, Suresh M. CD4 T-cell memory generation and maintenance. *Crit Rev Immunol.* 2014;34(2):121-46. doi: 10.1615/critrevimmunol.2014010373.
- **Gattinoni** L, Ji Y, Restifo NP. Wnt/beta-catenin signaling in T-cell immunity and cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res.* 2010 Oct 1;16(19):4695-701. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-0356.
- **Gattinoni** L, Lugli E, Ji Y, Pos Z, Paulos CM, Quigley MF, Almeida JR, Gostick E, Yu Z, Carpenito C, Wang E, Douek DC, Price DA, June CH, Marincola FM, Roederer M, Restifo NP. A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nat Med.* 2011 Sep 18;17(10):1290-7. doi: 10.1038/nm.2446.
- **Gattinoni** L, Klebanoff CA, Restifo NP. Paths to stemness: building the ultimate antitumour T cell. *Nat Rev Cancer.* 2012 Oct;12(10):671-84. doi: 10.1038/nrc3322.
- **Geginat** J, Sallusto F, Lanzavecchia A. Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naive, central memory, and effector memory CD4(+) T cells. *J Exp Med.* 2001 Dec 17;194(12):1711-9. doi: 10.1084/jem.194.12.1711.
- **Geginat** J, Paroni M, Maglie S, Alfen JS, Kastirr I, Gruarin P, De Simone M, Pagani M, Abrignani S. Plasticity of human CD4 T cell subsets. *Front Immunol.* 2014 Dec 16; 5:630. doi: 10.3389/fimmu.2014.00630.
- **Glatzová** D, Cebecauer M. Dual Role of CD4 in Peripheral T Lymphocytes. *Front Immunol.* 2019 Apr 2; 10:618. doi: 10.3389/fimmu.2019.00618.
- **Goronzy** JJ, Weyand CM. Understanding immunosenescence to improve responses to vaccines. *Nat Immunol.* 2013 May;14(5):428-36. doi: 10.1038/ni.2588.
- **Guégan** JP, Legembre P. Nonapoptotic functions of Fas/CD95 in the immune response. *FEBS J.* 2018 Mar;285(5):809-827. doi: 10.1111/febs.14292.
- **Hamann** D, Baars PA, Hooibrink B, van Lier RW. Heterogeneity of the human CD4+ T-cell population: two distinct CD4+ T-cell subsets characterized by coexpression of CD45RA and CD45RO isoforms. *Blood.* 1996 Nov 1;88(9):3513-21.
- **Hammarlund** E, Lewis MW, Hansen SG, Strelow LI, Nelson JA, Sexton GJ, Hanifin JM, Slifka MK. Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination. *Nat Med.* 2003 Sep;9(9):1131-7. doi: 10.1038/nm917.

- **Hao** Y, Li H, Li Y, Lyu M, Zhang D, Fu R, Guan Y, Wang S, Sun B, Dou X, Yang R. Decreased TLR4 expression on monocytes may cause regulatory T cells abnormality in patients with primary immune thrombocytopenia. *Autoimmunity*. 2017 Aug;50(5):283-292. doi: 10.1080/08916934.2017.1309034.
- **Harris** KM, Lenz P, Hankey KG, MacVittie T, Farese A, Nakajima K, Hasumi K, Mann DL. Products of anti-CD3/anti-CD28 activated lymphocytes induce differentiation and maturation of dendritic cells and have adjuvant-like activity in vitro and in vivo. *Clin Immunol*. 2008 Oct;129(1):58-68. doi: 10.1016/j.clim.2008.06.003.
- **Hernandez-Caselles** T, Rubio G, Campanero MR, del Pozo MA, Muro M, Sanchez-Madrid F, Aparicio P. ICAM-3, the third LFA-1 counterreceptor, is a co-stimulatory molecule for both resting and activated T lymphocytes. *Eur J Immunol*. 1993 Nov;23(11):2799-806. doi: 10.1002/eji.1830231112.
- **Hilligan** KL, Ronchese F. Antigen presentation by dendritic cells and their instruction of CD4+ T helper cell responses. *Cell Mol Immunol*. 2020 Jun;17(6):587-599. doi: 10.1038/s41423-020-0465-0.
- **Holthaus** L, Lamp D, Gavrigan A, Sharma V, Ziegler AG, Jastroch M, Bonifacio E. CD4+ T cell activation, function, and metabolism are inhibited by low concentrations of DMSO. *J Immunol Methods*. 2018 Dec; 463:54-60. doi: 10.1016/j.jim.2018.09.004.
- **Ibrahim** JN, Jounblat R, Delwail A, Abou-Ghoch J, Salem N, Chouery E, Megarbane A, Medlej-Hashim M, Lecron JC. Ex vivo PBMC cytokine profile in familial Mediterranean fever patients: Involvement of IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$  and Th17-associated cytokines and decrease of Th1 and Th2 cytokines. *Cytokine*. 2014 Oct;69(2):248-54. doi: 10.1016/j.cyto.2014.06.012.
- **Jenkins** MK, Chu HH, McLachlan JB, Moon JJ. On the composition of the preimmune repertoire of T cells specific for Peptide-major histocompatibility complex ligands. *Annu Rev Immunol*. 2010; 28:275-94. doi: 10.1146/annurev-immunol-030409-101253.
- **Jiang** J, Lau LL, Shen H. Selective depletion of nonspecific T cells during the early stage of immune responses to infection. *J Immunol*. 2003 Oct 15;171(8):4352-8. doi: 10.4049/jimmunol.171.8.4352.
- **Joseph** N, Reicher B, Barda-Saad M. The calcium feedback loop and T cell activation: how cytoskeleton networks control intracellular calcium flux. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Feb;1838(2):557-68. doi: 10.1016/j.bbame.2013.07.009.

- **Kanegane** H, Tosato G. Activation of naive and memory T cells by interleukin-15. *Blood*. 1996 Jul 1;88(1):230-5.
- **Kassiotis** G, Garcia S, Simpson E, Stockinger B. Impairment of immunological memory in the absence of MHC despite survival of memory T cells. *Nat Immunol*. 2002 Mar;3(3):244-50. doi: 10.1038/ni766.
- **Kassiotis** G, Gray D, Kiafard Z, Zwirner J, Stockinger B. Functional specialization of memory Th cells revealed by expression of integrin CD49b. *J Immunol*. 2006 Jul 15;177(2):968-75. doi: 10.4049/jimmunol.177.2.968.
- **Kim** J, Chang DY, Lee HW, Lee H, Kim JH, Sung PS, Kim KH, Hong SH, Kang W, Lee J, Shin SY, Yu HT, You S, Choi YS, Oh I, Lee DH, Lee DH, Jung MK, Suh KS, Hwang S, Kim W, Park SH, Kim HJ, Shin EC. Innate-like Cytotoxic Function of Bystander-Activated CD8+ T Cells Is Associated with Liver Injury in Acute Hepatitis A. *Immunity*. 2018 Jan 16;48(1):161-173.e5. doi: 10.1016/j.immuni.2017.11.025.
- **Kobayashi** D, Endo M, Ochi H, Hojo H, Miyasaka M, Hayasaka H. Regulation of CCR7-dependent cell migration through CCR7 homodimer formation. *Sci Rep*. 2017 Aug 17;7(1):8536. doi: 10.1038/s41598-017-09113-4.
- **Komai-Koma** M, Jones L, Ogg GS, Xu D, Liew FY. TLR2 is expressed on activated T cells as a costimulatory receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Mar 2;101(9):3029-34. doi: 10.1073/pnas.0400171101.
- **Kwok** WW, Tan V, Gillette L, Littell CT, Soltis MA, LaFond RB, Yang J, James EA, DeLong JH. Frequency of epitope-specific naive CD4(+) T cells correlates with immunodominance in the human memory repertoire. *J Immunol*. 2012 Mar 15;188(6):2537-44. doi: 10.4049/jimmunol.1102190.
- **Lanzavecchia** A, Sallusto F. Progressive differentiation and selection of the fittest in the immune response. *Nat Rev Immunol*. 2002 Dec;2(12):982-7. doi: 10.1038/nri959.
- **Lebrec** H, Molinier B, Boverhof D, Collinge M, Freebern W, Henson K, Mytych DT, Ochs HD, Wange R, Yang Y, Zhou L, Arrington J, Christin-Piché MS, Shenton J. The T-cell-dependent antibody response assay in nonclinical studies of pharmaceuticals and chemicals: study design, data analysis, interpretation. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2014 Jun;69(1):7-21. doi: 10.1016/j.yrtph.2014.02.008.

- **Lee** HG, Cho MZ, Choi JM. Bystander CD4<sup>+</sup> T cells: crossroads between innate and adaptive immunity. *Exp Mol Med*. 2020 Aug;52(8):1255-1263. doi: 10.1038/s12276-020-00486-7.
- **Létourneau** S, Krieg C, Pantaleo G, Boyman O. IL-2- and CD25-dependent immunoregulatory mechanisms in the homeostasis of T-cell subsets. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 Apr;123(4):758-62. doi: 10.1016/j.jaci.2009.02.011.
- **Lewkowitz** P, Lewkowitz N, Sasiak A, Tchórzewski H. Lipopolysaccharide-activated CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cells inhibit neutrophil function and promote their apoptosis and death. *J Immunol*. 2006 Nov 15;177(10):7155-63. doi: 10.4049/jimmunol.177.10.7155.
- **Li** LT, Jiang G, Chen Q, Zheng JN. Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (review). *Mol Med Rep*. 2015 Mar;11(3):1566-72. doi: 10.3892/mmr.2014.2914.
- **Link** A, Vogt TK, Favre S, Britschgi MR, Acha-Orbea H, Hinz B, Cyster JG, Luther SA. Fibroblastic reticular cells in lymph nodes regulate the homeostasis of naive T cells. *Nat Immunol*. 2007 Nov;8(11):1255-65. doi: 10.1038/ni1513.
- **Linsley** PS, Brady W, Grosmaire L, Aruffo A, Damle NK, Ledbetter JA. Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation. *J Exp Med*. 1991 Mar 1;173(3):721-30. doi: 10.1084/jem.173.3.721.
- **Litvinova** LS, Sokhnevich NA, Gutsol AA, Kofanova KA. The Influence of immunoregulatory cytokines IL-2, IL-7 and IL-15 upon Activation, Proliferation and Apoptosis of Immune Memory T-cells in vitro. *Cell and Tissue Biology*. 2013 7(6):539-544. doi: 10.1134/S1990519X13060072.
- **Liu** H, Rhodes M, Wiest DL, Vignali DA. On the dynamics of TCR:CD3 complex cell surface expression and downmodulation. *Immunity*. 2000 Nov;13(5):665-75. doi: 10.1016/s1074-7613(00)00066-2.
- **Liu** Q, Li Z, Gao JL, Wan W, Ganesan S, McDermott DH, Murphy PM. CXCR4 antagonist AMD3100 redistributes leukocytes from primary immune organs to secondary immune organs, lung, and blood in mice. *Eur J Immunol*. 2015 Jun;45(6):1855-67. doi: 10.1002/eji.201445245.
- **London** CA, Lodge MP, Abbas AK. Functional responses and costimulator dependence of memory CD4<sup>+</sup> T cells. *J Immunol*. 2000 Jan 1;164(1):265-72. doi: 10.4049/jimmunol.164.1.265.



- **Luan** L, Patil NK, Guo Y, Hernandez A, Bohannon JK, Fensterheim BA, Wang J, Xu Y, Enkhbaatar P, Stark R, Sherwood ER. Comparative Transcriptome Profiles of Human Blood in Response to the Toll-like Receptor 4 Ligands Lipopolysaccharide and Monophosphoryl Lipid A. *Sci Rep.* 2017 Jan 5; 7:40050. doi: 10.1038/srep40050.
- **Macallan** DC, Asquith B, Irvine AJ, Wallace DL, Worth A, Ghattas H, Zhang Y, Griffin GE, Tough DF, Beverley PC. Measurement and modeling of human T cell kinetics. *Eur J Immunol.* 2003 Aug;33(8):2316-26. doi: 10.1002/eji.200323763.
- **Macallan** DC, Wallace D, Zhang Y, De Lara C, Worth AT, Ghattas H, Griffin GE, Beverley PC, Tough DF. Rapid turnover of effector-memory CD4(+) T cells in healthy humans. *J Exp Med.* 2004 Jul 19;200(2):255-60. doi: 10.1084/jem.20040341.
- **MacIver** NJ, Michalek RD, Rathmell JC. Metabolic regulation of T lymphocytes. *Annu Rev Immunol.* 2013; 31:259-83. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-095956.
- **MacLeod** MK, Kappler JW, Marrack P. Memory CD4 T cells: generation, reactivation and re-assignment. *Immunology.* 2010 May;130(1):10-5. doi: 10.1111/j.1365-2567.2010.03260.x.
- **Mahnke** YD, Brodie TM, Sallusto F, Roederer M, Lugli E. The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets. *Eur J Immunol.* 2013 Nov;43(11):2797-809. doi: 10.1002/eji.201343751.
- **Maio** M, Del Vecchio L. Expression and functional role of CD54/Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) on human blood cells. *Leuk Lymphoma.* 1992 Sep;8(1-2):23-33. doi: 10.3109/10428199209049814.
- **McSorley** SJ. The Role of Non-Cognate T Cell Stimulation during Intracellular Bacterial Infection. *Front Immunol.* 2014 Jul 9; 5:319. doi: 10.3389/fimmu.2014.00319.
- **Meresse** B, Chen Z, Ciszewski C, Tretiakova M, Bhagat G, Krausz TN, Raulet DH, Lanier LL, Groh V, Spies T, Ebert EC, Green PH, Jabri B. Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent NKG2D signaling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease. *Immunity.* 2004 Sep;21(3):357-66. doi: 10.1016/j.immuni.2004.06.020.
- **Michie** CA, McLean A, Alcock C, Beverley PC. Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms. *Nature.* 1992 Nov 19;360(6401):264-5. doi: 10.1038/360264a0.

- **Moon JJ**, Chu HH, Pepper M, McSorley SJ, Jameson SC, Kedl RM, Jenkins MK. Naive CD4(+) T cell frequency varies for different epitopes and predicts repertoire diversity and response magnitude. *Immunity*. 2007 Aug;27(2):203-13. doi: 10.1016/j.immuni.2007.07.007.
- **Motamedi M**, Xu L, Elahi S. Correlation of transferrin receptor (CD71) with Ki67 expression on stimulated human and mouse T cells: The kinetics of expression of T cell activation markers. *J Immunol Methods*. 2016 Oct; 437:43-52. doi: 10.1016/j.jim.2016.08.002.
- **Mueller YM**, Makar V, Bojczuk PM, Witek J, Katsikis PD. IL-15 enhances the function and inhibits CD95/Fas-induced apoptosis of human CD4+ and CD8+ effector-memory T cells. *Int Immunol*. 2003 Jan;15(1):49-58. doi: 10.1093/intimm/dxg013.
- **Mueller SN**, Gebhardt T, Carbone FR, Heath WR. Memory T cell subsets, migration patterns, and tissue residence. *Annu Rev Immunol*. 2013; 31:137-61. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-095954.
- **Mukaida N**, Sasaki SI, Baba T. CCL4 Signaling in the Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol*. 2020; 1231:23-32. doi: 10.1007/978-3-030-36667-4\_3.
- **Munk RB**, Sugiyama K, Ghosh P, Sasaki CY, Rezanka L, Banerjee K, Takahashi H, Sen R, Longo DL. Antigen-independent IFN- $\gamma$  production by human *naïve* CD4 T cells activated by IL-12 plus IL-18. *PLoS One*. 2011 May 10;6(5):e18553. doi: 10.1371/journal.pone.0018553.
- **Murali-Krishna K**, Altman JD, Suresh M, Sourdive DJ, Zajac AJ, Miller JD, Slansky J, Ahmed R. Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity*. 1998 Feb;8(2):177-87. doi: 10.1016/s1074-7613(00)80470-7.
- **Nakajima H**, Shores EW, Noguchi M, Leonard WJ. The common cytokine receptor gamma chain plays an essential role in regulating lymphoid homeostasis. *J Exp Med*. 1997 Jan 20;185(2):189-95. doi: 10.1084/jem.185.2.189.
- **Nolz JC**, Richer MJ. Control of memory CD8+ T cell longevity and effector functions by IL-15. *Mol Immunol*. 2020 Jan; 117:180-188. doi: 10.1016/j.molimm.2019.11.011.

- **Novak** EJ, Masewicz SA, Liu AW, Lernmark A, Kwok WW, Nepom GT. Activated human epitope-specific T cells identified by class II tetramers reside within a CD4<sup>high</sup>, proliferating subset. *Int Immunol*. 2001 Jun;13(6):799-806. doi: 10.1093/intimm/13.6.799.
- **Ntanasis-Stathopoulos** I, Fotiou D, Terpos E. CCL3 Signaling in the Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol*. 2020; 1231:13-21. doi: 10.1007/978-3-030-36667-4\_2.
- **Obar** JJ, Khanna KM, Lefrançois L. Endogenous naive CD8<sup>+</sup> T cell precursor frequency regulates primary and memory responses to infection. *Immunity*. 2008 Jun;28(6):859-69. doi: 10.1016/j.immuni.2008.04.010.
- **Oh** S, Perera LP, Terabe M, Ni L, Waldmann TA, Berzofsky JA. IL-15 as a mediator of CD4<sup>+</sup> help for CD8<sup>+</sup> T cell longevity and avoidance of TRAIL-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Apr 1;105(13):5201-6. doi: 10.1073/pnas.0801003105.
- **Pabst** R. The bone marrow is not only a primary lymphoid organ: The critical role for T lymphocyte migration and housing of long-term memory plasma cells. *Eur J Immunol*. 2018 Jul;48(7):1096-1100. doi: 10.1002/eji.201747392.
- **Pace** E, Di Sano C, Ferraro M, Bruno A, Caputo V, Gallina S, Gjomarkaj M. Budesonide increases TLR4 and TLR2 expression in Treg lymphocytes of allergic asthmatics. *Pulm Pharmacol Ther*. 2015 Jun; 32:93-100. doi: 10.1016/j.pupt.2015.02.003.
- **Pacheco** Y, Acosta-Ampudia Y, Monsalve DM, Chang C, Gershwin ME, Anaya JM. Bystander activation and autoimmunity. *J Autoimmun*. 2019 Sep; 103:102301. doi: 10.1016/j.jaut.2019.06.012.
- **Paschall** AV, Middleton DR, Wantuch PL, Avci FY. Therapeutic Activity of Type 3 Streptococcus pneumoniae Capsule Degrading Enzyme Pn3Pase. *Pharm Res*. 2020 Nov 2;37(12):236. doi: 10.1007/s11095-020-02960-3.
- **Pédron** B, Guérin V, Cordeiro DJ, Masmoudi S, Dalle JH, Sterkers G. Development of cytomegalovirus and adenovirus-specific memory CD4 T-cell functions from birth to adulthood. *Pediatr Res*. 2011 Feb;69(2):106-11. doi: 10.1203/PDR.0b013e318204e469.
- **Peng** Y, Tao Y, Zhang Y, Wang J, Yang J, Wang Y. CD25: A potential tumor therapeutic target. *Int J Cancer*. 2022 Sep 9. doi: 10.1002/ijc.34281.

- **Perera** PY, Lichy JH, Waldmann TA, Perera LP. The role of interleukin-15 in inflammation and immune responses to infection: implications for its therapeutic use. *Microbes Infect.* 2012 Mar;14(3):247-61. doi: 10.1016/j.micinf.2011.10.006.
- **Pettmann** J, Santos AM, Dushek O, Davis SJ. Membrane Ultrastructure and T Cell Activation. *Front Immunol.* 2018 Sep 25; 9:2152. doi: 10.3389/fimmu.2018.02152.
- **Purwar** R, Campbell J, Murphy G, Richards WG, Clark RA, Kupper TS. Resident memory T cells (T(RM)) are abundant in human lung: diversity, function, and antigen specificity. *PLoS One.* 2011 Jan 26;6(1):e16245. doi: 10.1371/journal.pone.0016245.
- **Ren** W, Liu G, Yin J, Tan B, Wu G, Bazer FW, Peng Y, Yin Y. Amino-acid transporters in T-cell activation and differentiation. *Cell Death Dis.* 2017 May 4;8(5):e2757. doi: 10.1038/cddis.2017.207.
- **Ridgway** W, Fassò M, Fathman CG. Following antigen challenge, T cells up-regulate cell surface expression of CD4 in vitro and in vivo. *J Immunol.* 1998 Jul 15;161(2):714-20.
- **Robins** HS, Campregher PV, Srivastava SK, Wachter A, Turtle CJ, Kahsai O, Riddell SR, Warren EH, Carlson CS. Comprehensive assessment of T-cell receptor beta-chain diversity in alphabeta T cells. *Blood.* 2009 Nov 5;114(19):4099-107. doi: 10.1182/blood-2009-04-217604.
- **Robins** HS, Srivastava SK, Campregher PV, Turtle CJ, Andriesen J, Riddell SR, Carlson CS, Warren EH. Overlap and effective size of the human CD8+ T cell receptor repertoire. *Sci Transl Med.* 2010 Sep 1;2(47):47ra64. doi: 10.1126/scitranslmed.3001442.
- **Rogers** PR, Dubey C, Swain SL. Qualitative changes accompany memory T cell generation: faster, more effective responses at lower doses of antigen. *J Immunol.* 2000 Mar 1;164(5):2338-46. doi: 10.4049/jimmunol.164.5.2338.
- **Rosenblum** MD, Way SS, Abbas AK. Regulatory T cell memory. *Nat Rev Immunol.* 2016 Feb;16(2):90-101. doi: 10.1038/nri.2015.1.
- **Roy** J, Audette M, Tremblay MJ. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) gene expression in human T cells is regulated by phosphotyrosyl phosphatase activity. Involvement of NF-kappaB, Ets, and palindromic interferon-gamma-responsive element-binding sites. *J Biol Chem.* 2001 May 4;276(18):14553-61. doi: 10.1074/jbc.M005067200.

- **Salerno F**, Guislain A, Cansever D, Wolkers MC. TLR-Mediated Innate Production of IFN- $\gamma$  by CD8<sup>+</sup> T Cells Is Independent of Glycolysis. *J Immunol*. 2016 May 1;196(9):3695-705. doi: 10.4049/jimmunol.1501997.
- **Sathaliyawala T**, Kubota M, Yudanin N, Turner D, Camp P, Thome JJ, Bickham KL, Lerner H, Goldstein M, Sykes M, Kato T, Farber DL. Distribution and compartmentalization of human circulating and tissue-resident memory T cell subsets. *Immunity*. 2013 Jan 24;38(1):187-97. doi: 10.1016/j.immuni.2012.09.020.
- **Sattler A**, Wagner U, Rossol M, Sieper J, Wu P, Krause A, Schmidt WA, Radmer S, Kohler S, Romagnani C, Thiel A. Cytokine-induced human IFN-gamma-secreting effector-memory Th cells in chronic autoimmune inflammation. *Blood*. 2009 Feb 26;113(9):1948-56. doi: 10.1182/blood-2008-02-139147.
- **Saule P**, Trauet J, Dutriez V, Lekeux V, Dessaint JP, Labalette M. Accumulation of memory T cells from childhood to old age: central and effector memory cells in CD4(+) versus effector memory and terminally differentiated memory cells in CD8(+) compartment. *Mech Ageing Dev*. 2006 Mar;127(3):274-81. doi: 10.1016/j.mad.2005.11.001.
- **Sckisel GD**, Mirsoian A, Minnar CM, Crittenden M, Curti B, Chen JQ, Blazar BR, Borowsky AD, Monjazebe AM, Murphy WJ. Differential phenotypes of memory CD4 and CD8 T cells in the spleen and peripheral tissues following immunostimulatory therapy. *J Immunother Cancer*. 2017 Apr 18; 5:33. doi: 10.1186/s40425-017-0235-4.
- **Serbanescu MA**, Ramonell KM, Hadley A, Margoles LM, Mittal R, Lyons JD, Liang Z, Coopersmith CM, Ford ML, McConnell KW. Attrition of memory CD8 T cells during sepsis requires LFA-1. *J Leukoc Biol*. 2016 Nov;100(5):1167-1180. doi: 10.1189/jlb.4A1215-563RR.
- **Shin SY**, Kim MW, Cho KH, Nguyen LK. Coupled feedback regulation of nuclear factor of activated T-cells (NFAT) modulates activation-induced cell death of T cells. *Sci Rep*. 2019 Jul 23;9(1):10637. doi: 10.1038/s41598-019-46592-z.
- **Silva SL**, Sousa AE. Establishment and Maintenance of the Human *Naïve* CD4<sup>+</sup> T-Cell Compartment. *Front Pediatr*. 2016 Oct 31; 4:119. doi: 10.3389/fped.2016.00119.
- **Silva SL**, Albuquerque AS, Matoso P, Charmeteau-de-Muylder B, Cheynier R, Ligeiro D, Abecasis M, Anjos R, Barata JT, Victorino RM, Sousa AE. IL-7-Induced Proliferation of

Human Naive CD4 T-Cells Relies on Continued Thymic Activity. *Front Immunol.* 2017 Jan 19; 8:20. doi: 10.3389/fimmu.2017.00020.

- **Singh** M, Thakur M, Mishra M, Yadav M, Vibhuti R, Menon AM, Nagda G, Dwivedi VP, Dakal TC, Yadav V. Gene regulation of intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1): A molecule with multiple functions. *Immunol Lett.* 2021 Dec; 240:123-136. doi: 10.1016/j.imlet.2021.10.007.

- **Slichter** CK, McDavid A, Miller HW, Finak G, Seymour BJ, McNevin JP, Diaz G, Czartoski JL, McElrath MJ, Gottardo R, Prlic M. Distinct activation thresholds of human conventional and innate-like memory T cells. *JCI Insight.* 2016 Jun 2;1(8):e86292. doi: 10.1172/jci.insight.86292.

- **Smith-Garvin** JE, Koretzky GA, Jordan MS. T cell activation. *Annu Rev Immunol.* 2009; 27:591-619. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132706.

- **Stanciu** LA, Djukanovic R. The role of ICAM-1 on T-cells in the pathogenesis of asthma. *Eur Respir J.* 1998 Apr;11(4):949-57. doi: 10.1183/09031936.98.11040949.

- **Sun** X, Kaufman PD. Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma.* 2018 Jun;127(2):175-186. doi: 10.1007/s00412-018-0659-8.

- **Subbiahanadar Chelladurai** K, Selvan Christyraj JD, Rajagopalan K, Yesudhasan BV, Venkatachalam S, Mohan M, Chellathurai Vasantha N, Selvan Christyraj JRS. Alternative to FBS in animal cell culture - An overview and future perspective. *Heliyon.* 2021 Jul 28;7(8):e07686. doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e07686.

- **Surh** CD, Boyman O, Purton JF, Sprent J. Homeostasis of memory T cells. *Immunol Rev.* 2006 Jun; 211:154-63. doi: 10.1111/j.0105-2896.2006.00401.x.

- **Surh** CD, Sprent J. Homeostasis of naive and memory T cells. *Immunity.* 2008 Dec 19;29(6):848-62. doi: 10.1016/j.immuni.2008.11.002.

- **Suzuki** Y, Rahman M, Mitsuya H. Diverse transcriptional response of CD4+ T cells to stromal cell-derived factor SDF-1: cell survival promotion and priming effects of SDF-1 on CD4+ T cells. *J Immunol.* 2001 Sep 15;167(6):3064-73. doi: 10.4049/jimmunol.167.6.3064.

- **Teague** TK, Marrack P, Kappler JW, Vella AT. IL-6 rescues resting mouse T cells from apoptosis. *J Immunol.* 1997 Jun 15;158(12):5791-6.

- **Tohma** S, Hirohata S, Lipsky PE. The role of CD11a/CD18-CD54 interactions in human T cell-dependent B cell activation. *J Immunol.* 1991 Jan 15;146(2):492-9.
- **Tohma** S, Ramberg JE, Lipsky PE. Expression and distribution of CD11a/CD18 and CD54 during human T cell-B cell interactions. *J Leukoc Biol.* 1992 Jul;52(1):97-103. doi: 10.1002/jlb.52.1.97.
- **Tokoyoda** K, Zehentmeier S, Hegazy AN, Albrecht I, Grün JR, Löhning M, Radbruch A. Professional memory CD4<sup>+</sup> T lymphocytes preferentially reside and rest in the bone marrow. *Immunity.* 2009 May;30(5):721-30. doi: 10.1016/j.immuni.2009.03.015.
- **Tough** DF, Sprent J. Turnover of naive- and memory-phenotype T cells. *J Exp Med.* 1994 Apr 1;179(4):1127-35. doi: 10.1084/jem.179.4.1127.
- **Tough** DF, Borrow P, Sprent J. Induction of bystander T cell proliferation by viruses and type I interferon in vivo. *Science.* 1996 Jun 28;272(5270):1947-50. doi: 10.1126/science.272.5270.1947.
- **Tu** W, Rao S. Mechanisms Underlying T Cell Immunosenescence: Aging and Cytomegalovirus Infection. *Front Microbiol.* 2016 Dec 27; 7:2111. doi: 10.3389/fmicb.2016.02111.
- **Unutmaz** D, Pileri P, Abrignani S. Antigen-independent activation of naive and memory resting T cells by a cytokine combination. *J Exp Med.* 1994 Sep 1;180(3):1159-64. doi: 10.1084/jem.180.3.1159.
- **Unutmaz** D, Baldoni F, Abrignani S. Human naive T cells activated by cytokines differentiate into a split phenotype with functional features intermediate between naive and memory T cells. *Int Immunol.* 1995 Sep;7(9):1417-24. doi: 10.1093/intimm/7.9.1417.
- **van der Donk** LEH, Ates LS, van der Spek J, Tukker LM, Geijtenbeek TBH, van Heijst JWJ. Separate signaling events control TCR downregulation and T cell activation in primary human T cells. *Immun Inflamm Dis.* 2021 Mar;9(1):223-238. doi: 10.1002/iid3.383.
- **van Leeuwen** EM, Sprent J, Surh CD. Generation and maintenance of memory CD4(+) T Cells. *Curr Opin Immunol.* 2009 Apr;21(2):167-72. doi: 10.1016/j.coi.2009.02.005.
- **Vella** A, Teague TK, Ihle J, Kappler J, Marrack P. Interleukin 4 (IL-4) or IL-7 prevents the death of resting T cells: stat6 is probably not required for the effect of IL-4. *J Exp Med.* 1997 Jul 21;186(2):325-30. doi: 10.1084/jem.186.2.325.

- **Vukmanovic-Stejić** M, Zhang Y, Cook JE, Fletcher JM, McQuaid A, Masters JE, Rustin MH, Taams LS, Beverley PC, Macallan DC, Akbar AN. Human CD4<sup>+</sup> CD25<sup>hi</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells are derived by rapid turnover of memory populations in vivo. *J Clin Invest.* 2006 Sep;116(9):2423-33. doi: 10.1172/JCI28941.
- **Wang** A, Chandran S, Shah SA, Chiu Y, Paria BC, Aghamolla T, Alvarez-Downing MM, Lee CC, Singh S, Li T, Dudley ME, Restifo NP, Rosenberg SA, Kammula US. The stoichiometric production of IL-2 and IFN- $\gamma$  mRNA defines memory T cells that can self-renew after adoptive transfer in humans. *Sci Transl Med.* 2012 Aug 29;4(149):149ra120. doi: 10.1126/scitranslmed.3004306.
- **Welsh** RM, Selin LK. No one is naive: the significance of heterologous T-cell immunity. *Nat Rev Immunol.* 2002 Jun;2(6):417-26. doi: 10.1038/nri820.
- **Weng** NP, Araki Y, Subedi K. The molecular basis of the memory T cell response: differential gene expression and its epigenetic regulation. *Nat Rev Immunol.* 2012 Mar 16;12(4):306-15. doi: 10.1038/nri3173.
- **Wenink** MH, Santegoets KC, Platt AM, van den Berg WB, van Riel PL, Garside P, Radstake TR, McInnes IB. Abatacept modulates proinflammatory macrophage responses upon cytokine-activated T cell and Toll-like receptor ligand stimulation. *Ann Rheum Dis.* 2012 Jan;71(1):80-3. doi: 10.1136/annrheumdis-2011-200348.
- **Whiteside** SK, Snook JP, Ma Y, Sonderegger FL, Fisher C, Petersen C, Zachary JF, Round JL, Williams MA, Weis JJ. IL-10 Deficiency Reveals a Role for TLR2-Dependent Bystander Activation of T Cells in Lyme Arthritis. *J Immunol.* 2018 Feb 15;200(4):1457-1470. doi: 10.4049/jimmunol.1701248.
- **Wiegers** GJ, Stec IE, Klinkert WE, Reul JM. Glucocorticoids regulate TCR-induced elevation of CD4: functional implications. *J Immunol.* 2000 Jun 15;164(12):6213-20. doi: 10.4049/jimmunol.164.12.6213.
- **Wucherpfennig** KW. Mechanisms for the induction of autoimmunity by infectious agents. *J Clin Invest.* 2001 Oct;108(8):1097-104. doi: 10.1172/JCI14235.
- **Yan** Y, Chen R, Wang X, Hu K, Huang L, Lu M, Hu Q. CCL19 and CCR7 Expression, Signaling Pathways, and Adjuvant Functions in Viral Infection and Prevention. *Front Cell Dev Biol.* 2019 Oct 1; 7:212. doi: 10.3389/fcell.2019.00212.



- **Zeng** Z, Lan T, Wei Y, Wei X. CCL5/CCR5 axis in human diseases and related treatments. *Genes Dis.* 2022 Jan;9(1):12-27. doi: 10.1016/j.gendis.2021.08.004.
- **Zhang** X, Sun S, Hwang I, Tough DF, Sprent J. Potent and selective stimulation of memory phenotype CD8+ T cells in vivo by IL-15. *Immunity.* 1998 May;8(5):591-9. doi: 10.1016/s1074-7613(00)80564-6.
- **Zhang** HH, Song K, Rabin RL, Hill BJ, Perfetto SP, Roederer M, Douek DC, Siegel RM, Farber JM. CCR2 identifies a stable population of human effector memory CD4+ T cells equipped for rapid recall response. *J Immunol.* 2010 Dec 1;185(11):6646-63. doi: 10.4049/jimmunol.0904156.

## XI. ANEXOS

### A. Estabilización de la expresión de las moléculas CD3 y CD4 en cultivos de linfocitos T CD4 humanos de memoria al día de purificación (día 0) y al día 2 de cultivo.

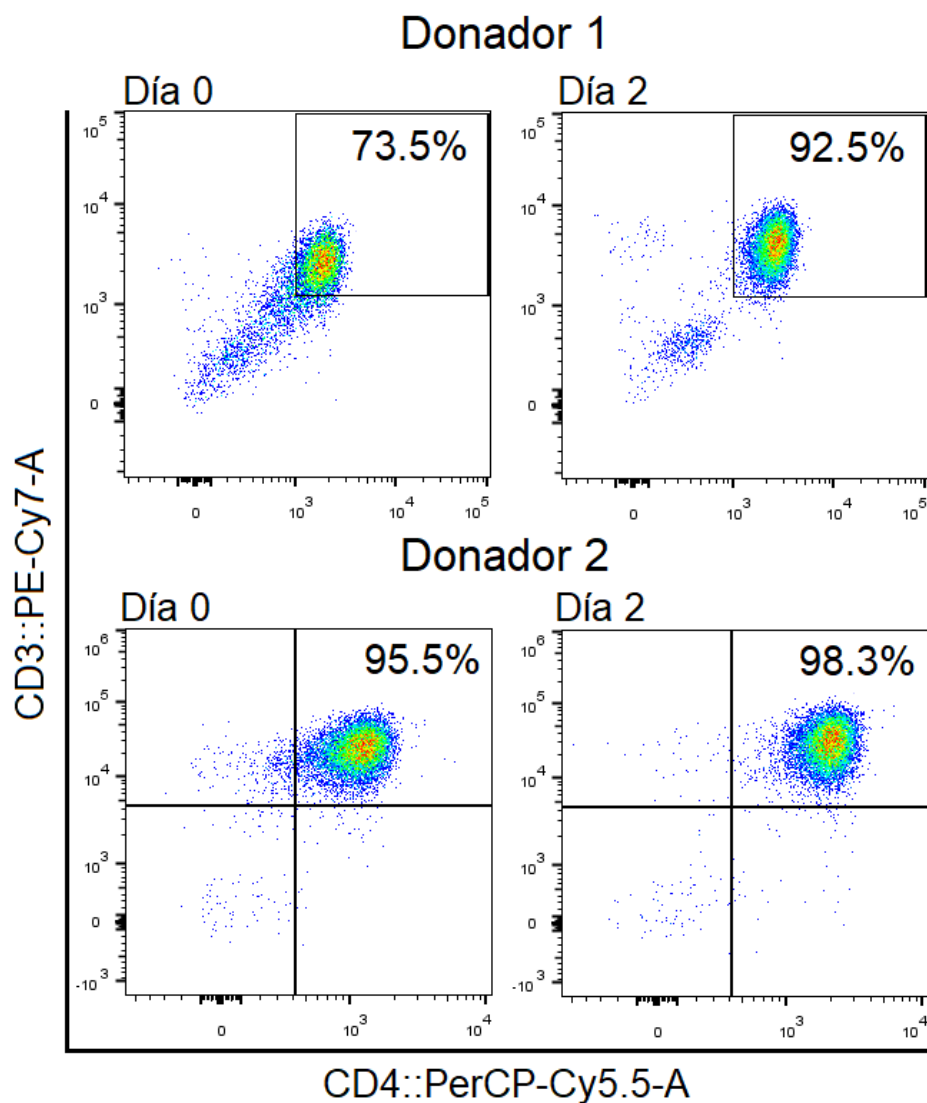


Figura 1. Estabilización de la expresión de las moléculas CD3 y CD4 en cultivos de linfocitos T CD4 humanos de memoria al día de purificación (día 0) y al día 2 de cultivo. Linfocitos T CD4 humanos de memoria purificados y cultivados en medio AIM V suplementado con 5% de suero AB humano (medio de cultivo). Gráficas de puntos representativas de la expresión de CD3 y CD4 de células viables al día de la purificación (día 0) y al día 2 de cultivo de dos donadores.

**B. Método de cultivo de linfocitos T CD4 humanos de memoria incubados con 1, 10 o 100 ng/ml de IL-7 o IL-15 durante 2, 5 y 8 días.**

Las PBMC fueron separadas a partir de paquetes leucocitarios (*buffy coats*) de 3 donadores sanos hombres (25-59 años) usando gradientes de Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) (ver apartado **VI. Materiales y métodos, 1.1. Separación de PBMC**). Posteriormente los linfocitos T CD4 humanos de memoria fueron purificados mediante selección negativa (ver apartado **VI. Materiales y métodos, 3.1. Purificación de linfocitos T CD4 humanos de memoria**). Los linfocitos T CD4 humanos de memoria se cultivaron con distintas condiciones; medio de cultivo con 1, 10 o 100 ng/ml de IL-7 o IL-15 (Miltenyi Biotec), o con anticuerpo anti-CD3/anti-CD28/anti-CD2 acoplados a perlas magnéticas (Miltenyi Biotec). Se sembraron  $2 \times 10^5$  de células/100 $\mu$ l de medio de cultivo en placas de 96 pozos con fondo plano (Corning) durante 2, 5 y 8 días a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Al día 5 de cultivo se agregó 50  $\mu$ l de medio de cultivo fresco más lo correspondiente de la citocina dependiendo de la condición. Como control negativo, para todos los experimentos, los linfocitos de memoria fueron mantenidos con medio de cultivo solo. Como control de la activación canónica (a través del TCR), se sembraron  $2 \times 10^5$  células/100 $\mu$ l de medio de cultivo y se estimularon con anticuerpo anti-CD3/anti-CD28/anti-CD2 acoplados a perlas magnéticas en una proporción perla-célula de 1:2 durante 2, 5 y 8 días, agregando 100  $\mu$ l de medio de cultivo fresco al día 2, y con un reemplazo de medio al día 5, removiendo 100  $\mu$ l y agregando 100  $\mu$ l de medio de cultivo fresco, sin romper los agregados. Las células fueron analizadas al día 2, 5 y 8 a través de citometría de flujo.

**C. Las concentraciones de 1 y 10 ng/ml de IL-15 mantienen la viabilidad de linfocitos T CD4 humanos de memoria por tiempos prolongados comparada con las mismas concentraciones de IL-7.**

Para el desarrollo de este proyecto de investigación fue necesario establecer inicialmente las condiciones óptimas de cultivo para mantener a los linfocitos T CD4 humanos de memoria; viabilidad alta sin alteración de la expresión de las moléculas CD3, CD4 y CD45RO, así como evitar la inducción de la expresión de moléculas asociadas a la activación (CD54 y CD25) y proliferación (Ki67) celular.

Se determinaron los efectos de diferentes concentraciones de IL-7 o IL-15 sobre cultivos de linfocitos T CD4 humanos de memoria, las cuales fueron purificadas a partir de PBMC para evitar la presencia de otras células. Los linfocitos de memoria purificados se cultivaron en un medio AIM V suplementado con 5% de suero AB humano.

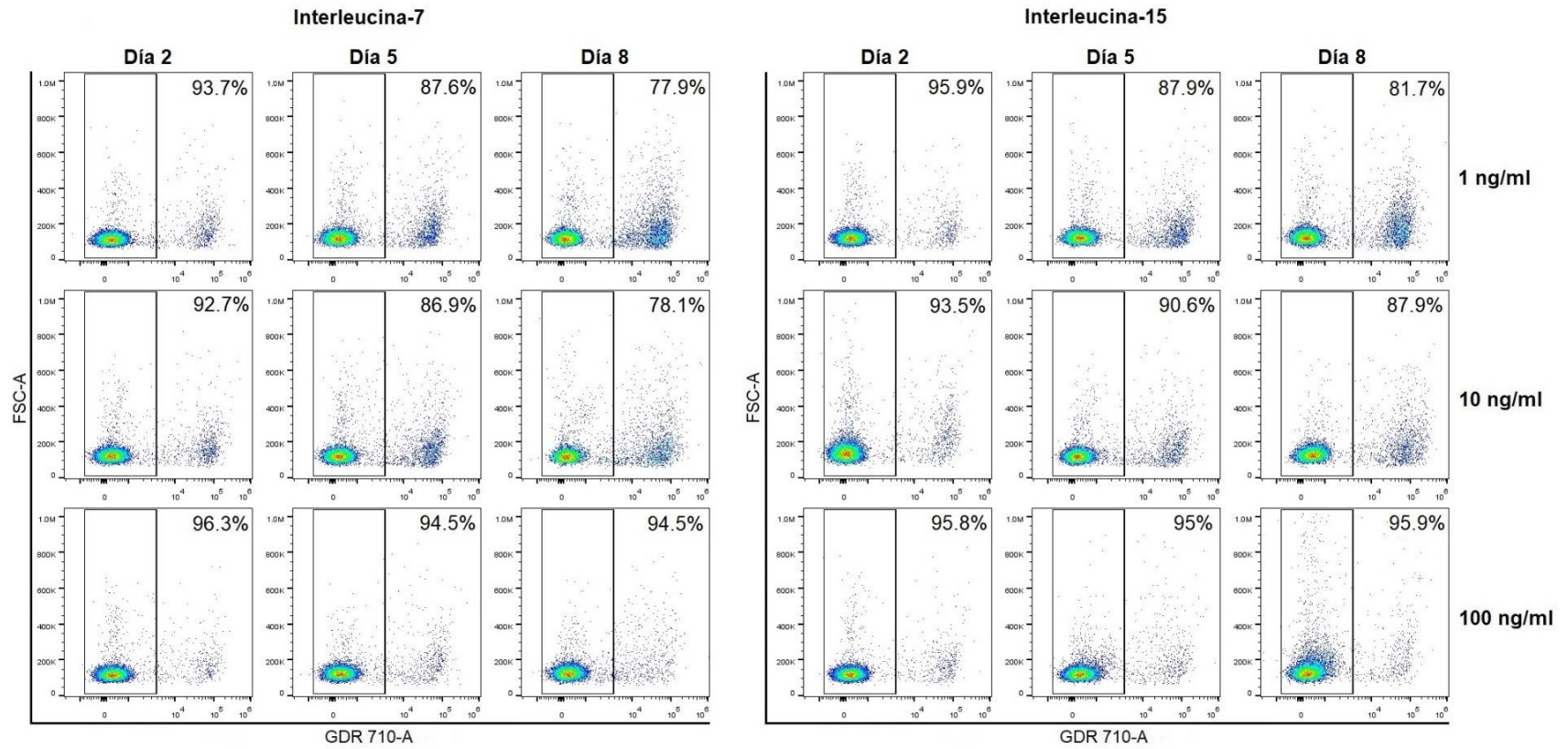
Está documentado que las citocinas IL-7 e IL-15 participan en la promoción de la supervivencia y la proliferación homeostática *in vivo* de los linfocitos en reposo. Debido a la ausencia de información sobre el cultivo de linfocitos T CD4 humanos de memoria por tiempos prolongados, se evaluaron los efectos de diferentes concentraciones de las citocinas IL-7 e IL-15 sobre la viabilidad y el fenotipo celular. Usando citometría de flujo, se analizó la expresión de las moléculas de superficie CD3, CD4 y CD45RO, así como la exclusión de células que incorporaron el colorante GDR-710 para determinar la viabilidad celular, y la expresión de las moléculas CD25 y CD54 asociadas a la activación celular, y de la molécula intranuclear Ki67 asociada a proliferación celular.

Se observa en la **figura 2** cómo se afecta la viabilidad celular de manera dependiente de la concentración de citocinas. En la **figura 2A** se puede observar a partir de

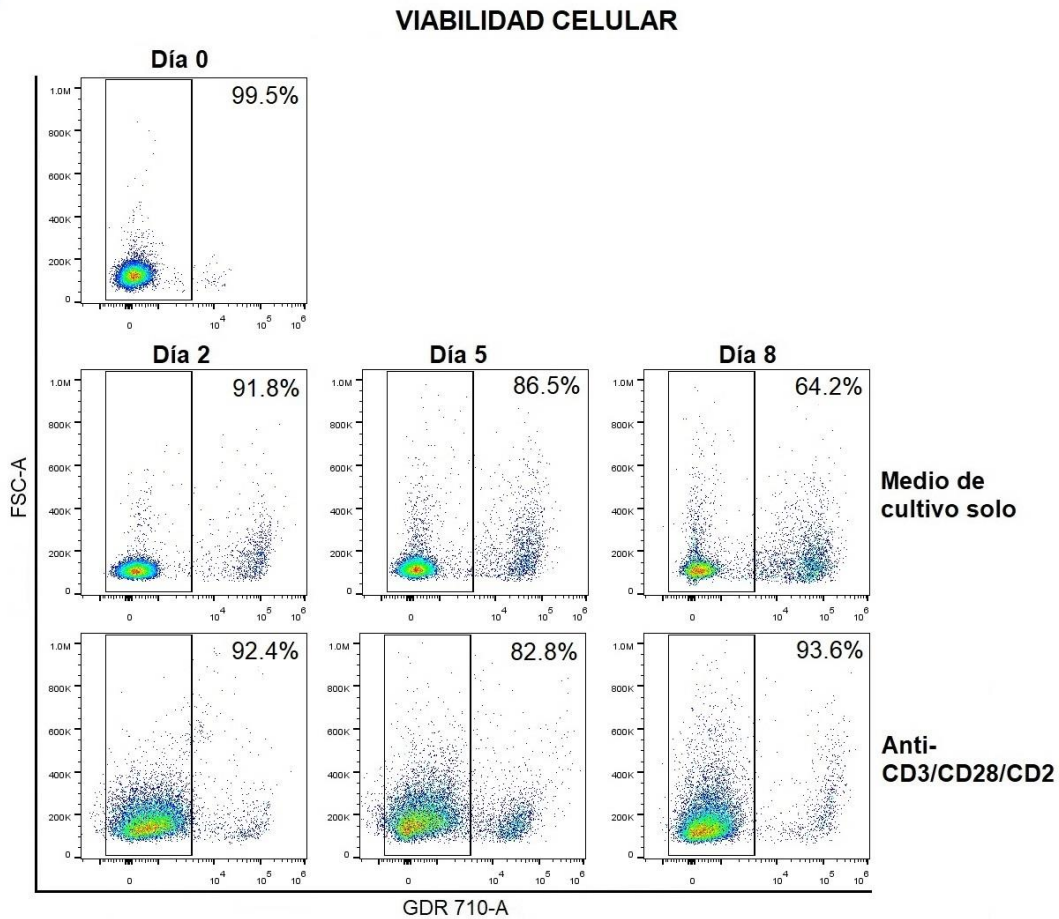
un experimento representativo, cómo la incorporación del GDR-710 va disminuyendo conforme se aumenta la concentración de las citocinas IL-7 o IL-15, y cómo la ausencia de estas (**figura 2B**, condición de medio de cultivo solo) aumenta el porcentaje de células que incorporan el colorante GDR-710, siendo más notorio al día 8 de cultivo. La viabilidad celular posterior a la purificación (día 0) se mantuvo por arriba del 98% (**figura 2C**) y la presencia de citocinas tendió a mantener el porcentaje de viabilidad por arriba del porcentaje obtenido con medio de cultivo solo (79%) a 8 días de cultivo. Se observó una tendencia de estas células a mantener una mayor viabilidad celular con IL-15, pues al día 8 de cultivo se obtuvo 87% con 1 ng/ml y 90% con 10 ng/ml de esta citocina, comparado con las mismas concentraciones de IL-7 (83% y 85%, respectivamente). En cuanto a los porcentajes de viabilidad con la condición de mayor concentración (100 ng/ml), ambas citocinas tienden a mantener una alta viabilidad (96% con IL-7 y 93% con IL-15). La viabilidad celular de los linfocitos activados a través del TCR se mantuvo en 93% al día 8 de cultivo.

A)

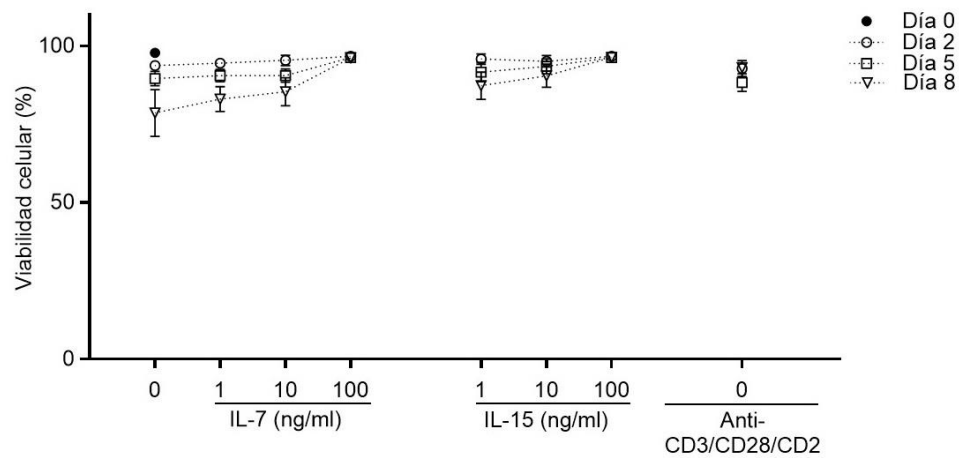
VIABILIDAD CELULAR



B)



C)



**Figura 2. La viabilidad de los linfocitos T CD4 humanos de memoria tiende a ser dependiente de la concentración de la citocina IL-7 o IL-15.** Linfocitos T CD4 humanos de memoria purificados y cultivados en medio AIM V suplementado con 5% de suero AB humano (medio de cultivo) más 1, 10 o 100 ng/ml de IL-7 o IL-15. La viabilidad celular se determinó posterior a la purificación (día 0) y a los días 2, 5 y 8 de cultivo mediante la tinción con el colorante Ghost Dye Red 710 (GDR-710). Como control de la activación de los linfocitos T (activación canónica), las células se

incubaron con anticuerpos anti-CD3/CD28/CD2 acoplados a perlas magnéticas. (A) Gráficas de puntos representativas de la incorporación de GDR-710 de cultivos incubados con 1, 10 o 100 ng/ml de IL-7 o IL-15 durante 2, 5 y 8 días. (B) Gráficas de puntos representativas de la incorporación de GDR-710 de células recién purificadas (día 0) y de los controles de células incubadas con medio de cultivo y células activadas con anticuerpos anti-CD3/CD28/CD2 acoplados a perlas magnéticas durante 2, 5 y 8 días, ambas condiciones sin citocinas añadidas. (C) Comparación del porcentaje de viabilidad de los linfocitos T CD4 humanos de memoria con diferentes condiciones de cultivo. Se muestran los porcentajes de viabilidad celular en la esquina superior derecha de cada gráfica de puntos. Los datos mostrados en la gráfica (C) son el promedio de 3 experimentos independientes y se muestra el error estándar.

#### **D. Concentraciones de 1 y 10 ng/ml de IL-7 o IL-15 mantienen a los linfocitos T CD4 humanos de memoria con un fenotipo en reposo.**

Posteriormente se analizaron las moléculas CD3, CD4 y CD45RO, las cuales son marcadores para identificar a la población de linfocitos T CD4 humanos de memoria a través de citometría de flujo. Las tres moléculas participan durante la activación del linfocito T, posterior al contacto del TCR con el péptido unido al MHC. La molécula CD3 se requiere para la señalización intracelular, así como para el ensamblado y transporte a la superficie del complejo TCR-CD3. La molécula CD4 es el correceptor en la activación del linfocito T restringida por MHC clase II. La isoforma CD45RO es una fosfatasa que aumenta la señalización intracelular durante la activación del linfocito T. Está bien establecido que CD3 es rápidamente internalizado después de la activación a través del TCR y lentamente se vuelve a expresar en la superficie celular (**van der Donk et al., 2021**), mientras que la expresión de CD4 y CD45RO aumentan después de 3-4 días (**Ridgway et al., 1998; Wiegers et al., 2000; Novak et al., 2001; Dunlock et al., 2022**).

Los linfocitos de memoria a lo largo de 8 días de cultivo bajo las condiciones experimentales en las que se trabajaron mantienen de manera homogénea la expresión de las tres moléculas (como se puede observar en las **figuras 3A-B**). Fue constante que al día



de la purificación (día 0), los linfocitos de memoria presentaron una heterogeneidad principalmente en la expresión de CD3 y CD4 (**figura 3C**), y esta se homogeneizó al día 2 de cultivo (**figura 3A**) en todas las condiciones incluyendo el control sin ninguna citocina añadida (**figura 3C**), aunque sólo en esta condición al día 8 de cultivo se observó que se redujo el porcentaje de células CD3<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>. La expresión de CD45RO fue muy homogénea desde el día 0 hasta el día 8 de cultivo en presencia de IL-7 o IL-15 e incluso en ausencia de estas (**figura 3B y 3D**).

En el control de activación a través del TCR, se observó lo esperado en la expresión de las tres moléculas; la expresión de CD3 disminuyó al día 2 de activación, regresando a la expresión basal al día 5 de activación (I/I<sub>2</sub> de 1.08) y aumentando al día 8 (I/I<sub>2</sub> de 1.24) (**figura 3E**), la expresión de CD4 fue aumentando conforme pasaban los días de activación llegando a un máximo al día 8 (I/I<sub>2</sub> de 1.56) (**figura 3F**) y la expresión de CD45RO aumentó al día 2 de activación y se mantuvo así hasta el día 8 (I/I<sub>2</sub> alrededor de 1.5) (**figura 3G**). Estos resultados nos indicaron que las condiciones experimentales de activación a través del TCR eran óptimas y los linfocitos de memoria eran capaces de activarse y responder como se esperaba. Las diferentes concentraciones de IL-7 o de IL-15 no tienden a modificar la expresión de CD3, CD4 y CD45RO (**figura 3E-G**).

Posteriormente, se evaluó si la presencia de IL-7 o IL-15 inducían la expresión de las moléculas CD25 y CD54. De acuerdo con los resultados obtenidos, IL-7 e IL-15 no inducen la expresión de CD25 a las concentraciones de 1 y 10 ng/ml (**figura 4A y 5A**). En cambio, la concentración de 100 ng/ml de IL-7 o IL-15 sí fue capaz de inducir la expresión de CD25 en un porcentaje considerable de linfocitos T CD4 de memoria, siendo mayor en los cultivos incubados con IL-7 (25% al día 2, 30% al día 5 y 27% al día 8) que con IL-15 (9% al día 2, 12% al día 5 y 14% al día 8) (**figura 4A y 5A**). Aproximadamente el 3% de

las células recién purificadas expresaron CD25 (**figura 4B y 5A**), y este porcentaje se redujo a lo largo del cultivo con medio de cultivo solo (**figura 4B y 5A**) y con las concentraciones de 1 y 10 ng/ml de IL-7, bajando aproximadamente hasta 1% al día 8 (**figura 4A y 5A**). Las células con 1 ng/ml de IL-15 también redujeron el porcentaje de células CD25<sup>+</sup> pero con 10 ng/ml se mantuvo el porcentaje inicial (**figura 4A y 5A**). En el control de activación a través del TCR, aproximadamente el 90% de las células expresaron CD25 desde el día 2 de activación, manteniéndose aproximadamente este porcentaje hasta el día 8 (84% de células CD25<sup>+</sup>) (**figura 4B y 5A**). Aunque aumentó el porcentaje de células CD25<sup>+</sup> con 100 ng/ml de IL-7 o IL-15, la IMF no aumentó como en el control de activación a través del TCR (**figura 4C y 5D**).

La expresión de CD54 se indujo sólo con 100 ng/ml de IL-15 y se detectó hasta el día 5 (5% de células CD54<sup>+</sup>) aumentando al día 8 (8%) (**figura 4D y 5B**). El porcentaje de células CD54<sup>+</sup> al día de la purificación fue cercana a 0% y se mantuvo así a lo largo de los días de cultivo en ausencia de citocinas (**figura 4E y 5B**). En cambio, la activación a través del TCR indujo la expresión de CD54 en más del 90% de la población celular al día 2, manteniéndose este porcentaje al día 5, y al día 8 disminuyó esta expresión aproximadamente a 70% (**figura 4E y 5B**). De igual manera que CD25, a pesar de la expresión de CD54 con la condición de 100 ng/ml de IL-15, la IMF aumentó, pero no al nivel del control de activación por el TCR (**figura 4F y 5E**).

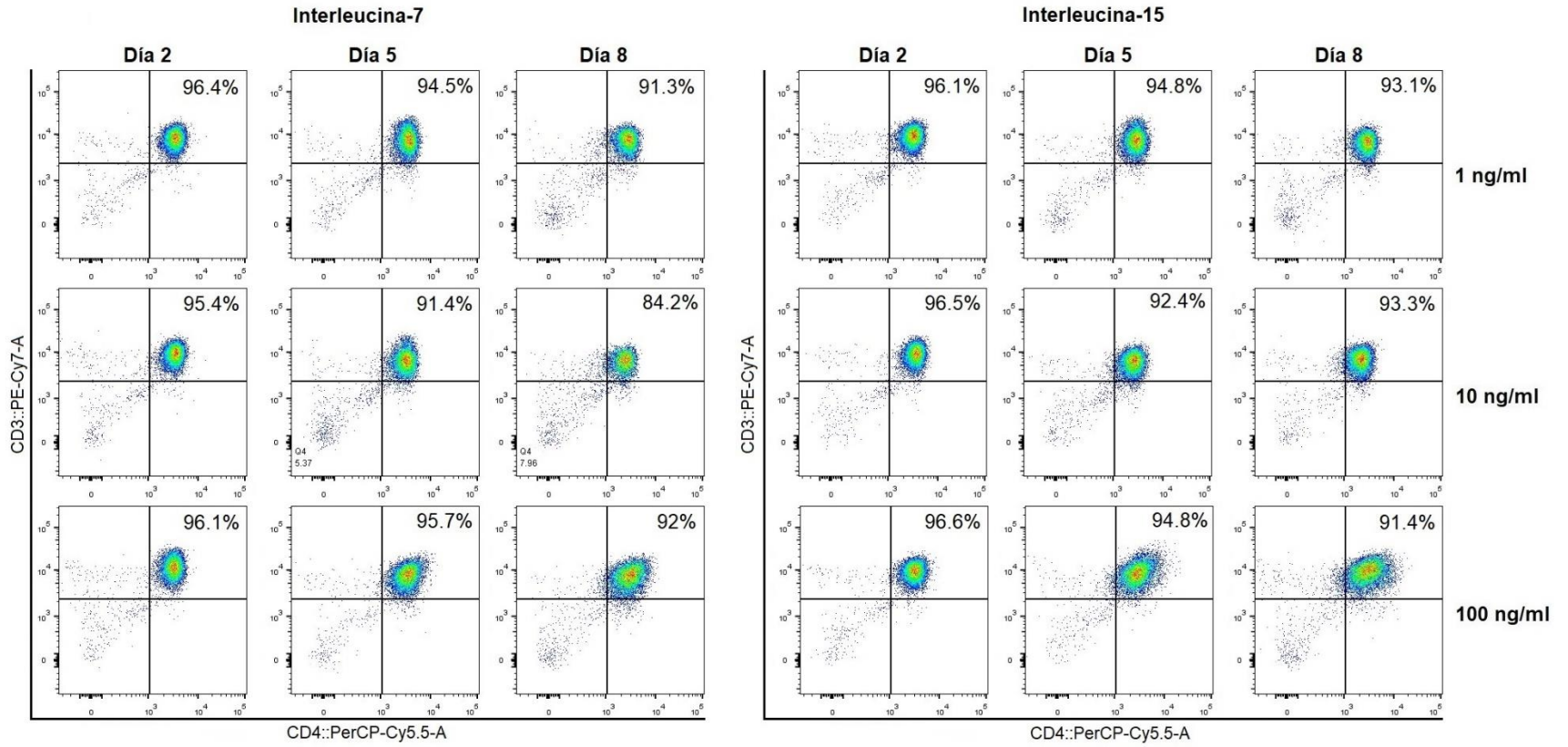
Otra molécula evaluada por citometría de flujo fue Ki67 intracelular e intranuclear. Esta molécula tiene gran participación durante el ciclo celular y es utilizada comúnmente para la detección de proliferación celular (**Motamedi et al., 2016; Sun & Kaufman, 2018**). Las concentraciones 1 y 10 ng/ml de IL-7 o IL-15 no indujeron la expresión de Ki67 (**figura 4G y 5C**). En cambio, la concentración más alta de ambas citocinas sí fue capaz de

inducir proliferación desde el día 2 y aumentando el porcentaje de células Ki67<sup>+</sup> conforme pasaron los días de cultivo, siendo mayor con IL-15 que con IL-7 (18% contra 8 % de células Ki67<sup>+</sup>, respectivamente) (**figura 4G y 5C**). Los linfocitos de memoria recién purificados presentaron un 3% de proliferación, y conforme pasaron los días de cultivo en ausencia de citocinas, este porcentaje se redujo a 0% (**figura 4H y 5C**). Las condiciones usadas para activar a los linfocitos de memoria a través del TCR indujo la proliferación celular. Al día 2 de activación proliferó alrededor del 30% de la población celular, y a los días 5 y 8 de activación este porcentaje aumento a más del 60% (**figura 4H y 5C**). La activación a través del TCR no indujo un gran aumento de la IMF de Ki67, como sucedió con las moléculas CD25 y CD54, pero sí fue mayor que con 100 ng/ml de IL-7 o IL-15 (**figura 4I y 5F**)

Con los resultados anteriores, de acuerdo con la tendencia obtenida, se tomaron las concentraciones de 1 y 10 ng/ml de IL-15 como condiciones óptimas para el cultivo de linfocitos T CD4 humanos de memoria durante 8 días; una viabilidad cercana al 90%, expresión de los marcadores CD3, CD4 y CD45RO, así como la ausencia de los marcadores de activación CD25, CD54 y Ki67. Además, con la finalidad de tener un control de activación a través del TCR, las condiciones experimentales fueron suficientes para inducir la expresión de los marcadores de activación CD25 y CD54, la proliferación.

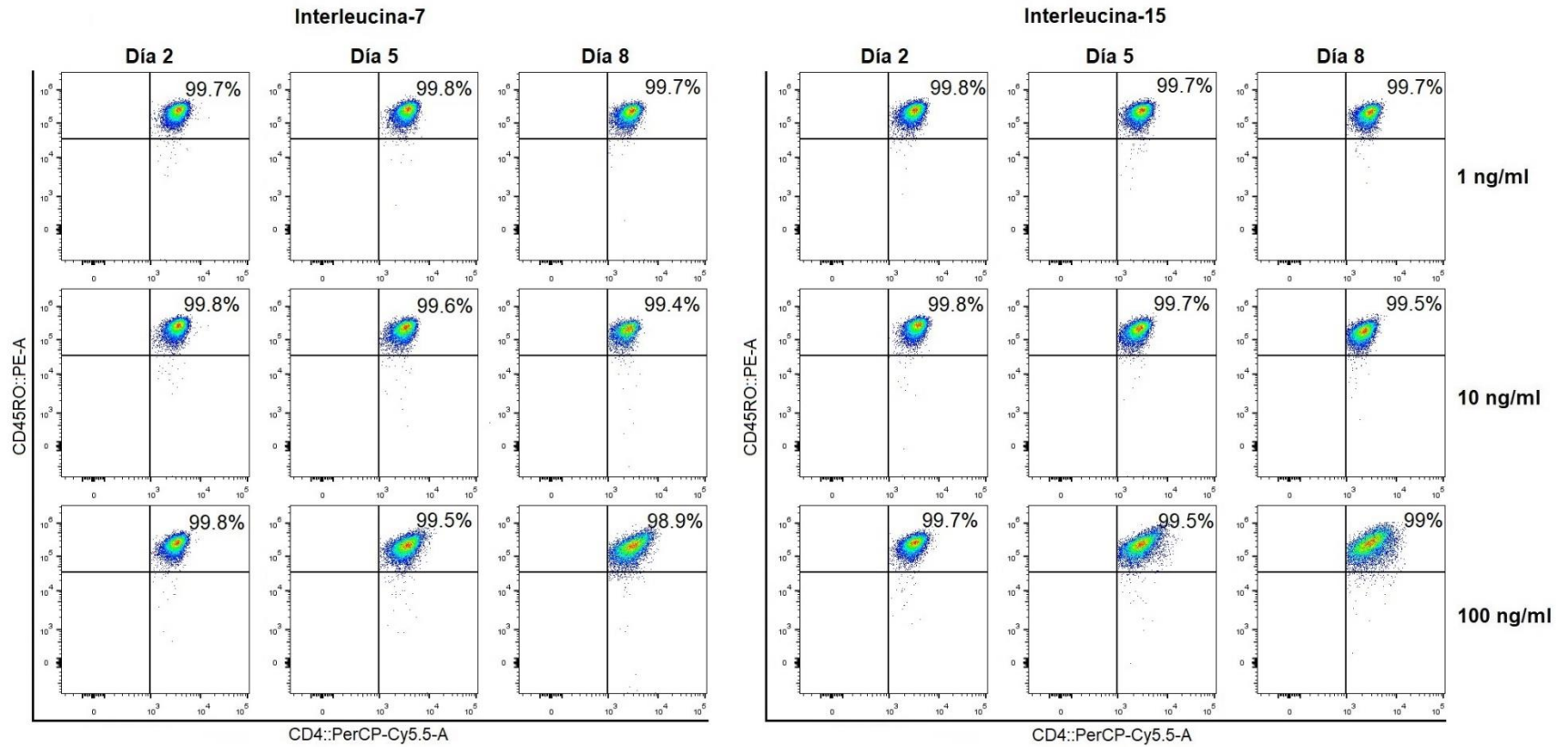
A)

EXPRESIÓN DE CD3 Y CD4

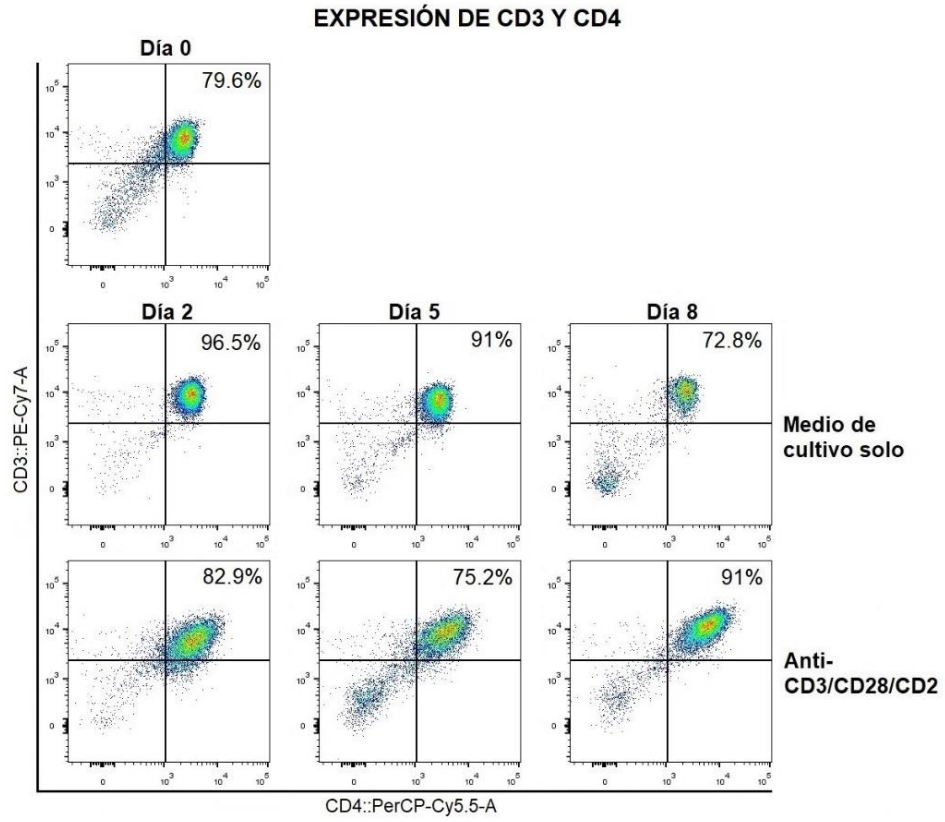


B)

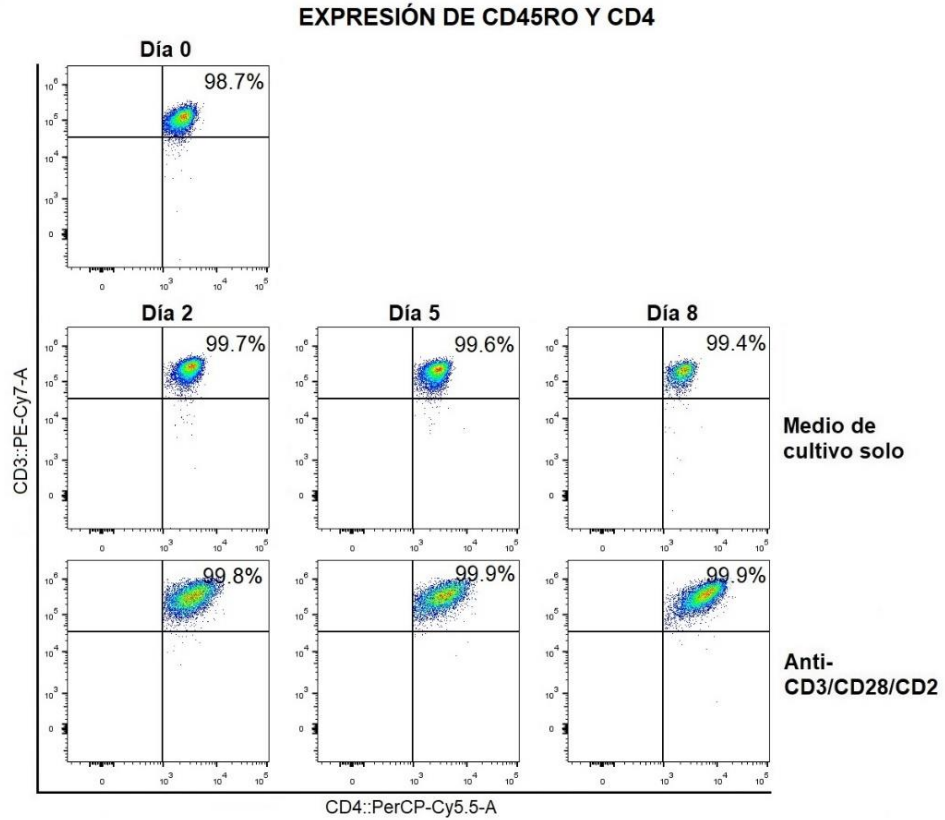
EXPRESIÓN DE CD45RO Y CD4

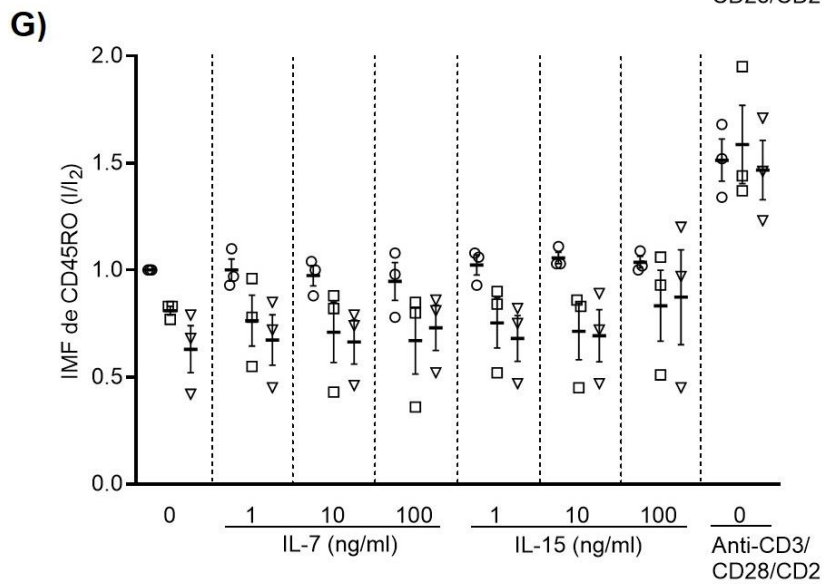
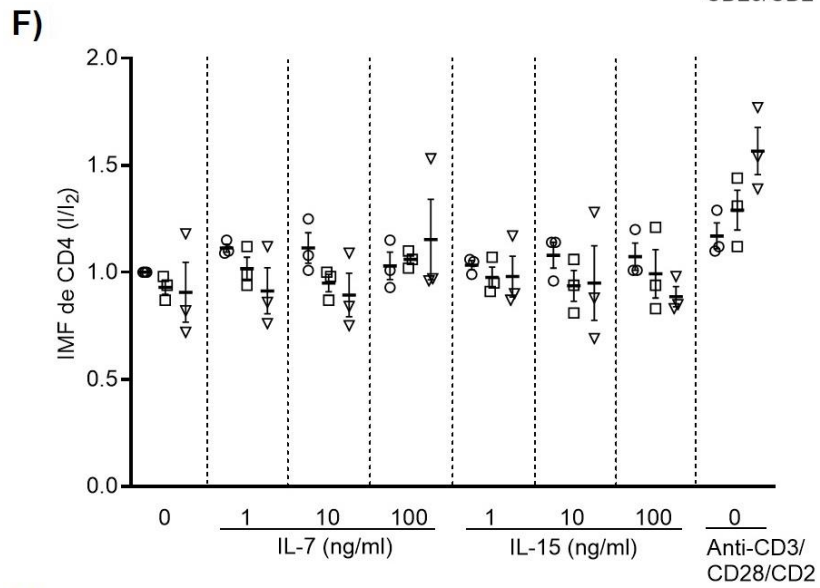
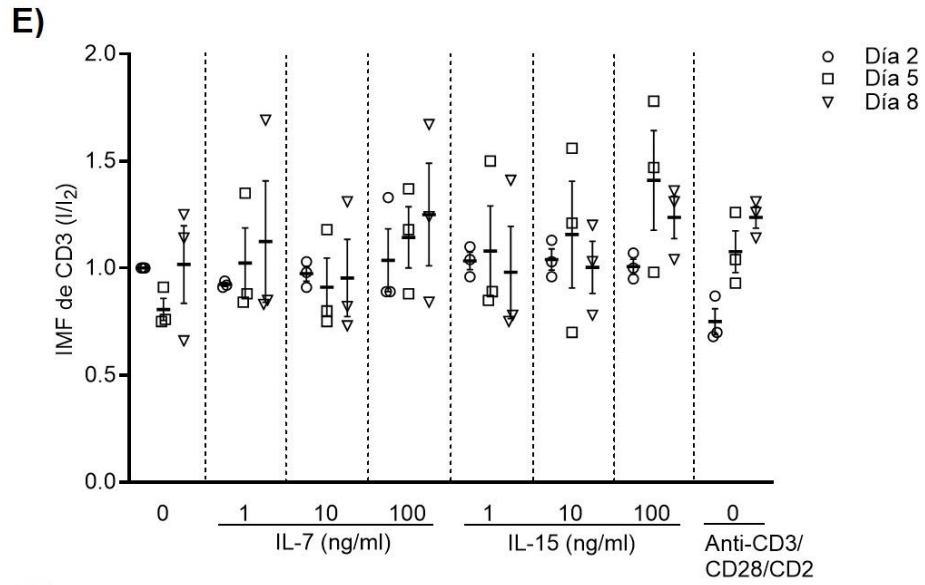


C)



D)



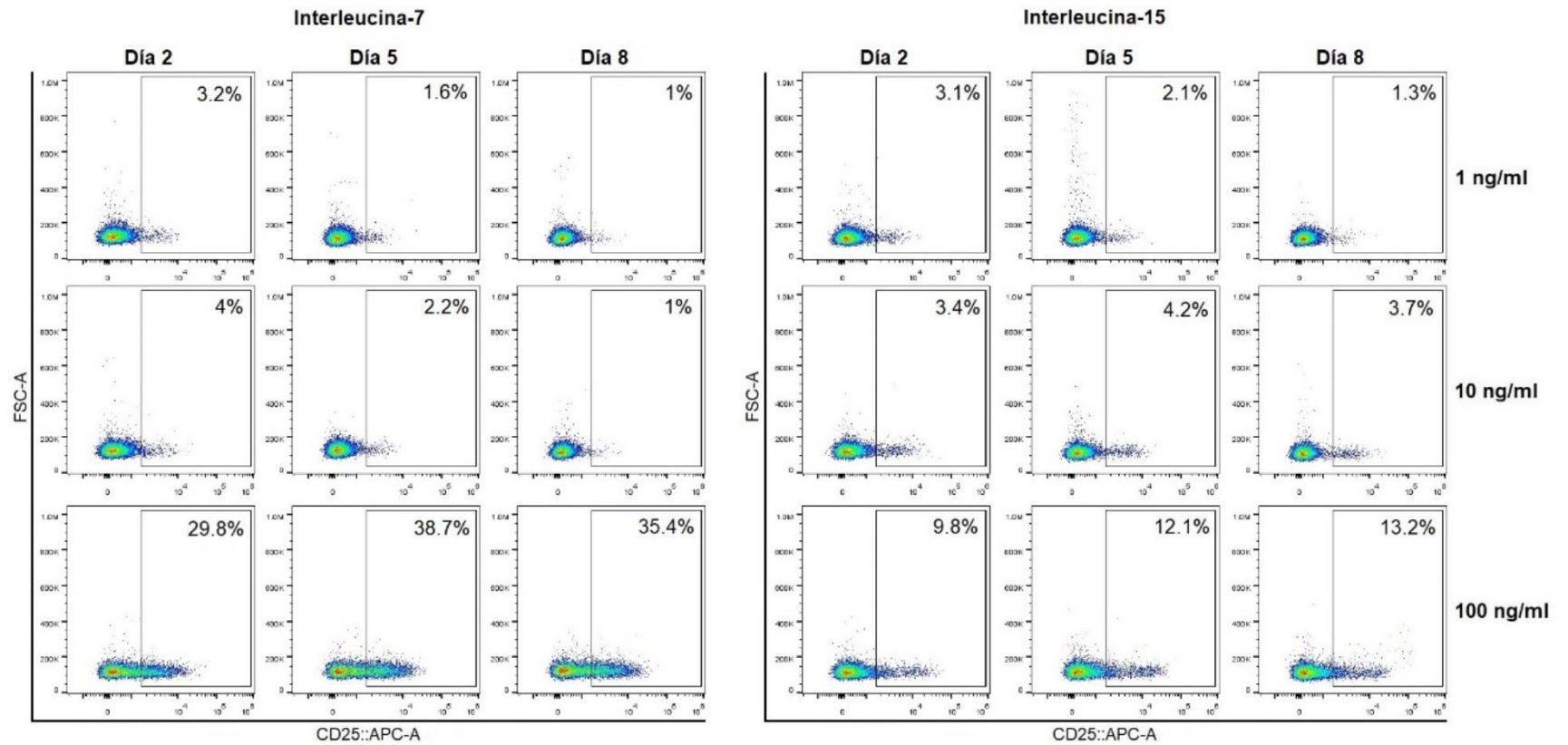


**Figura 3. Expresión de CD3, CD4 y CD5RO.** Linfocitos T CD4 humanos de memoria purificados y cultivados en medio AIM V suplementado con 5% de suero AB humano (medio de cultivo) más 1, 10 o 100 ng/ml de IL-7 o IL-15 durante 2, 5 y 8 días. A-B) Gráficas de puntos representativas de la expresión de CD3, CD4 y CD45RO de células viables con diferentes concentraciones de IL-7 o IL-15 durante diferentes días como se indica. C) Gráficas de puntos representativas de la expresión de CD3, CD4 y CD45RO de células recién purificadas (día 0) y de los controles de células incubadas con medio de cultivo y células activadas con anticuerpos anti-CD3/CD28/CD2 acoplados a perlas magnéticas durante 2, 5 y 8 días, ambas condiciones sin citocinas añadidas. D-F) Comparación de la expresión de CD3, CD4 y CD45RO de las células humanas T CD4 de memoria con diferentes condiciones de cultivo. Los datos mostrados en las gráficas (E-G) son el promedio de 3 experimentos independientes y se muestra el error estándar.



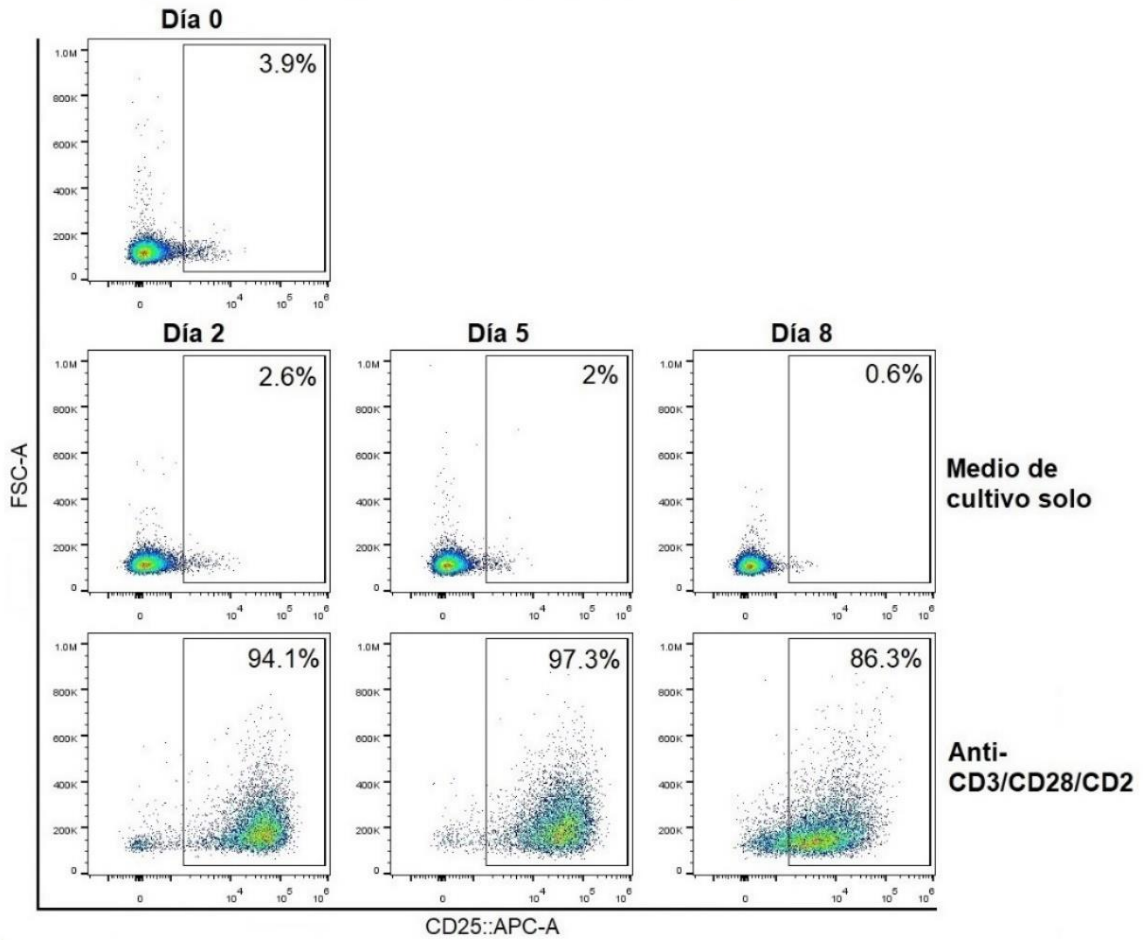
A)

PORCENTAJE DE CÉLULAS CD25<sup>+</sup>



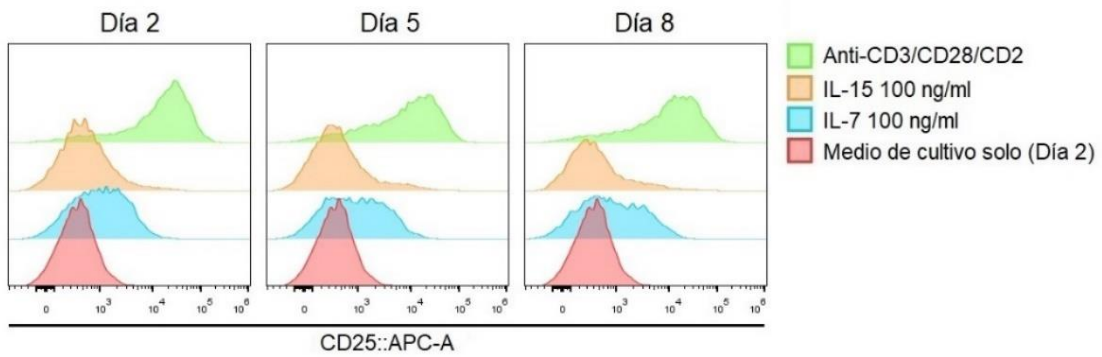
B)

### PORCENTAJE DE CÉLULAS CD25<sup>+</sup>



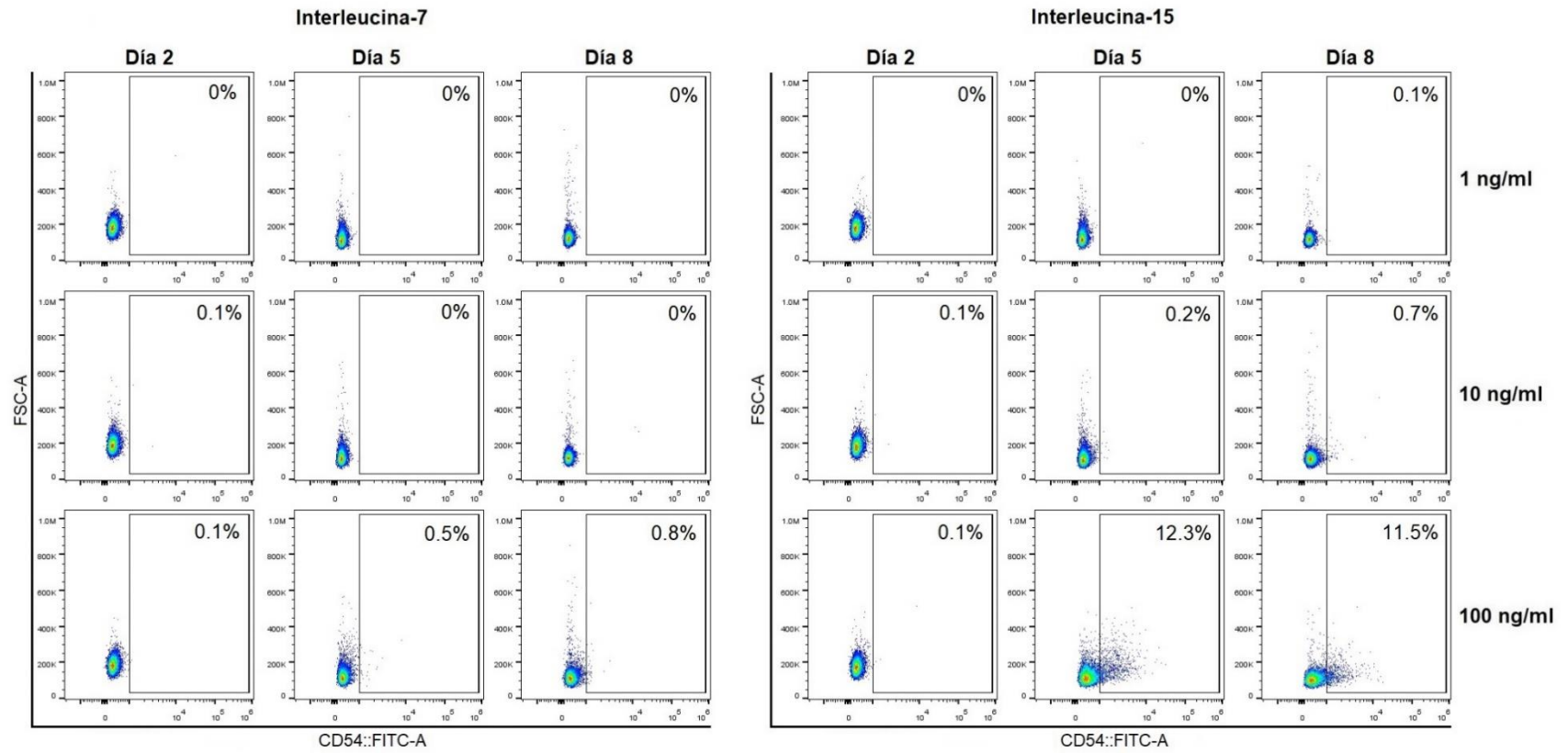
C)

### EXPRESIÓN DE CD25



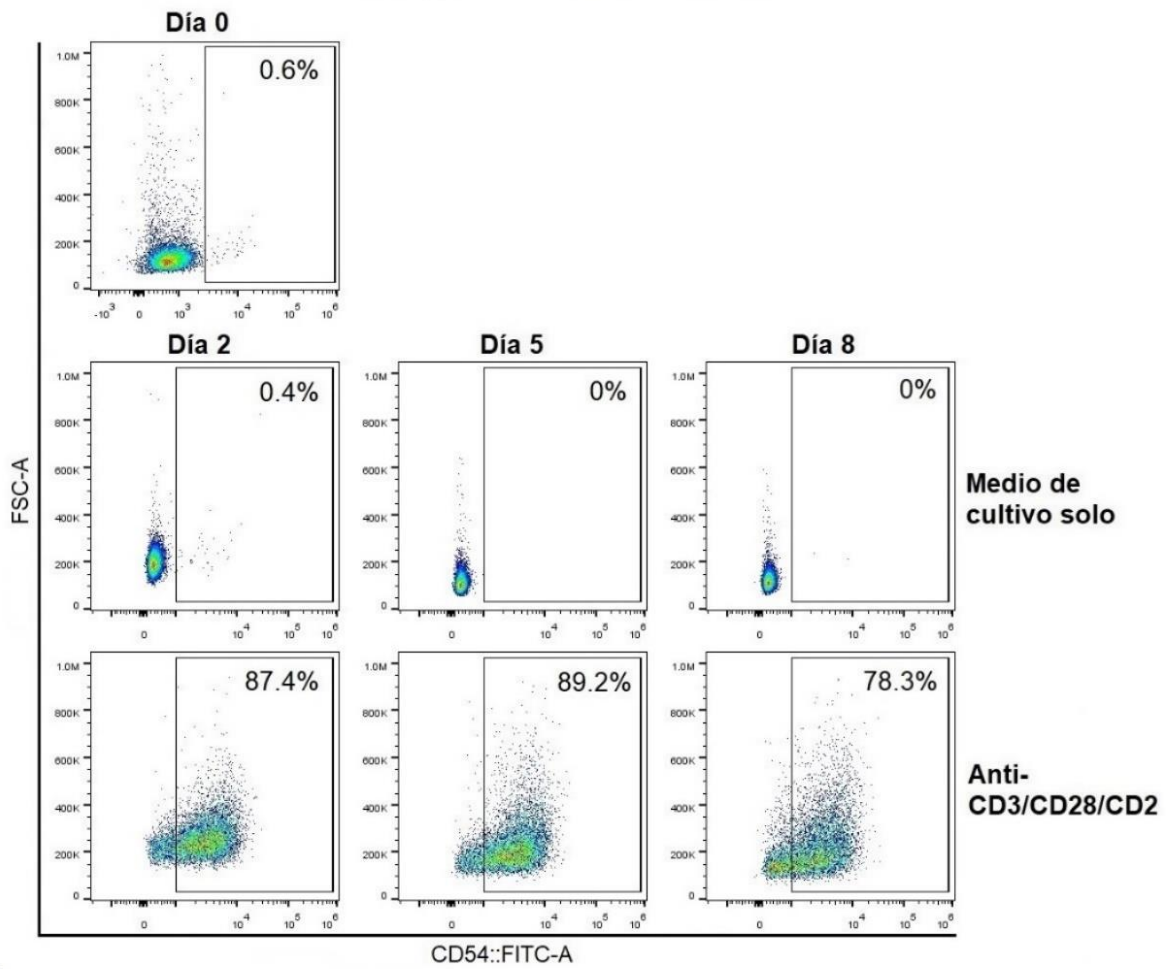
D)

PORCENTAJE DE CÉLULAS CD54<sup>+</sup>



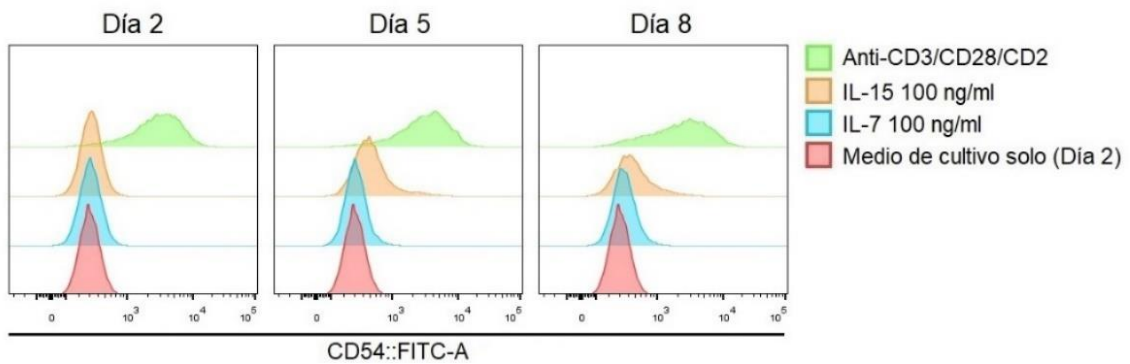
E)

**PORCENTAJE DE CÉLULAS CD54<sup>+</sup>**



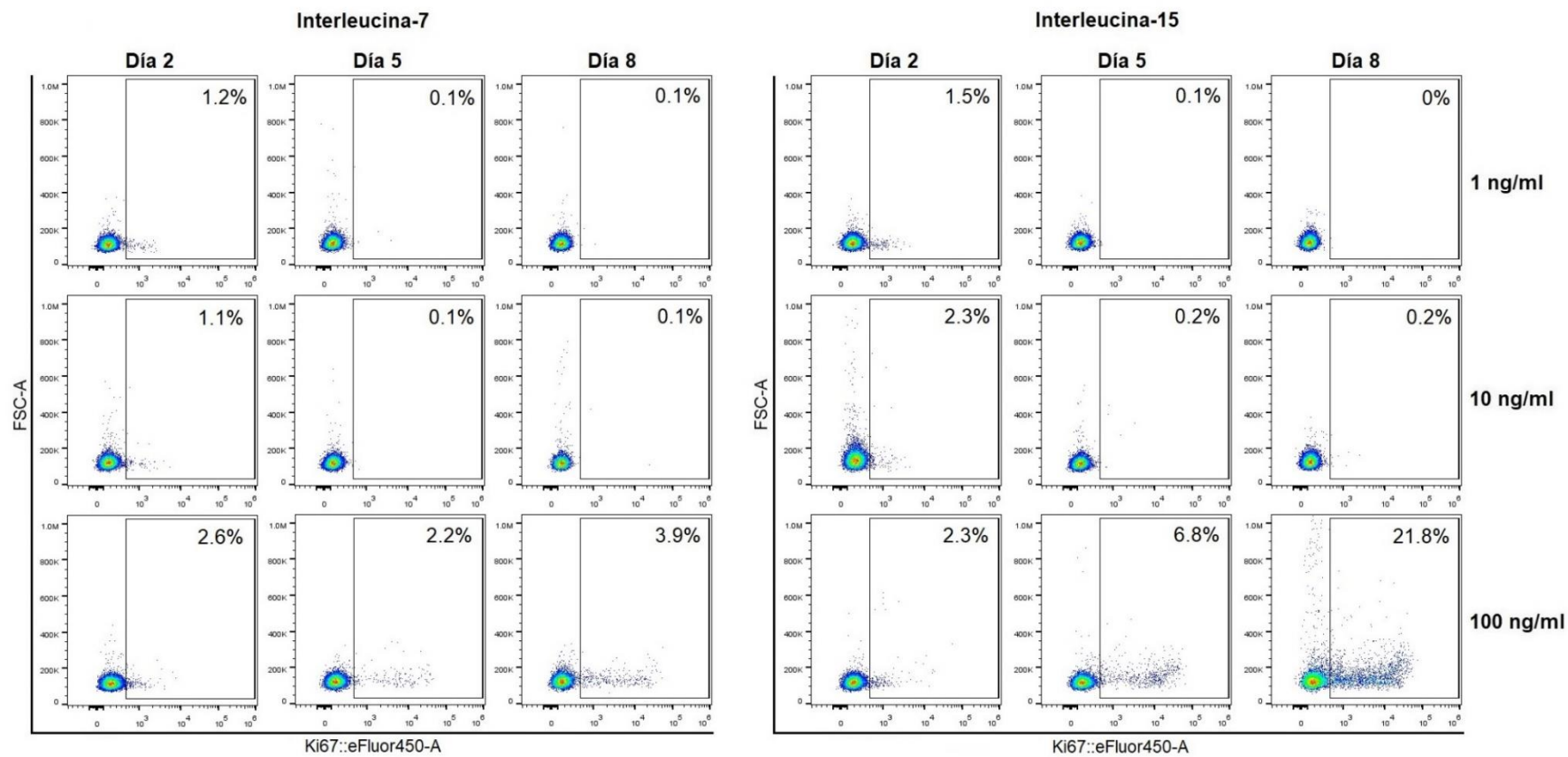
F)

**EXPRESIÓN DE CD54**



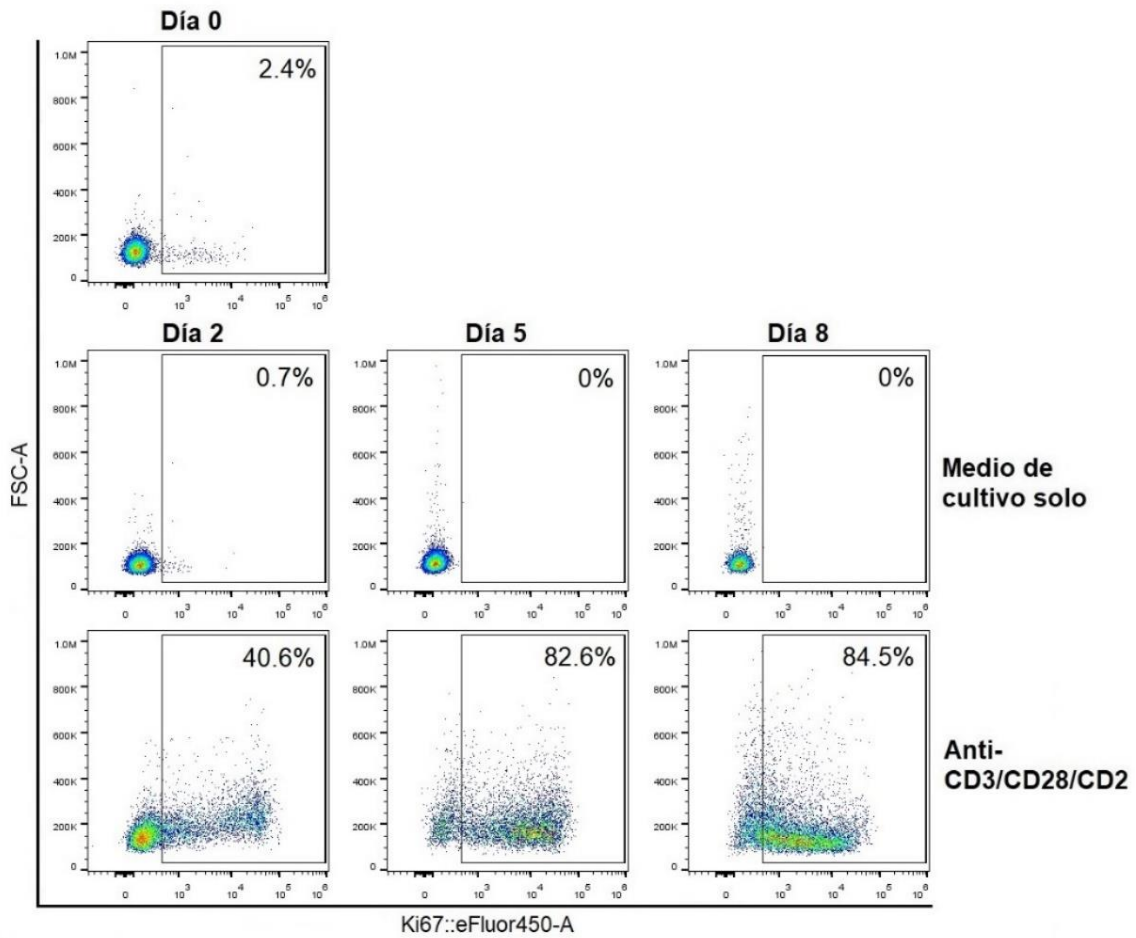
G)

PORCENTAJE DE CÉLULAS Ki67<sup>+</sup>



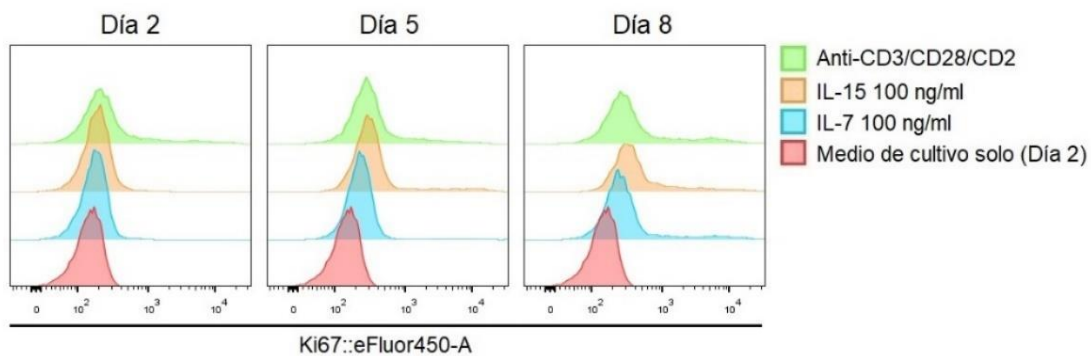
H)

**PORCENTAJE DE CÉLULAS Ki67<sup>+</sup>**



I)

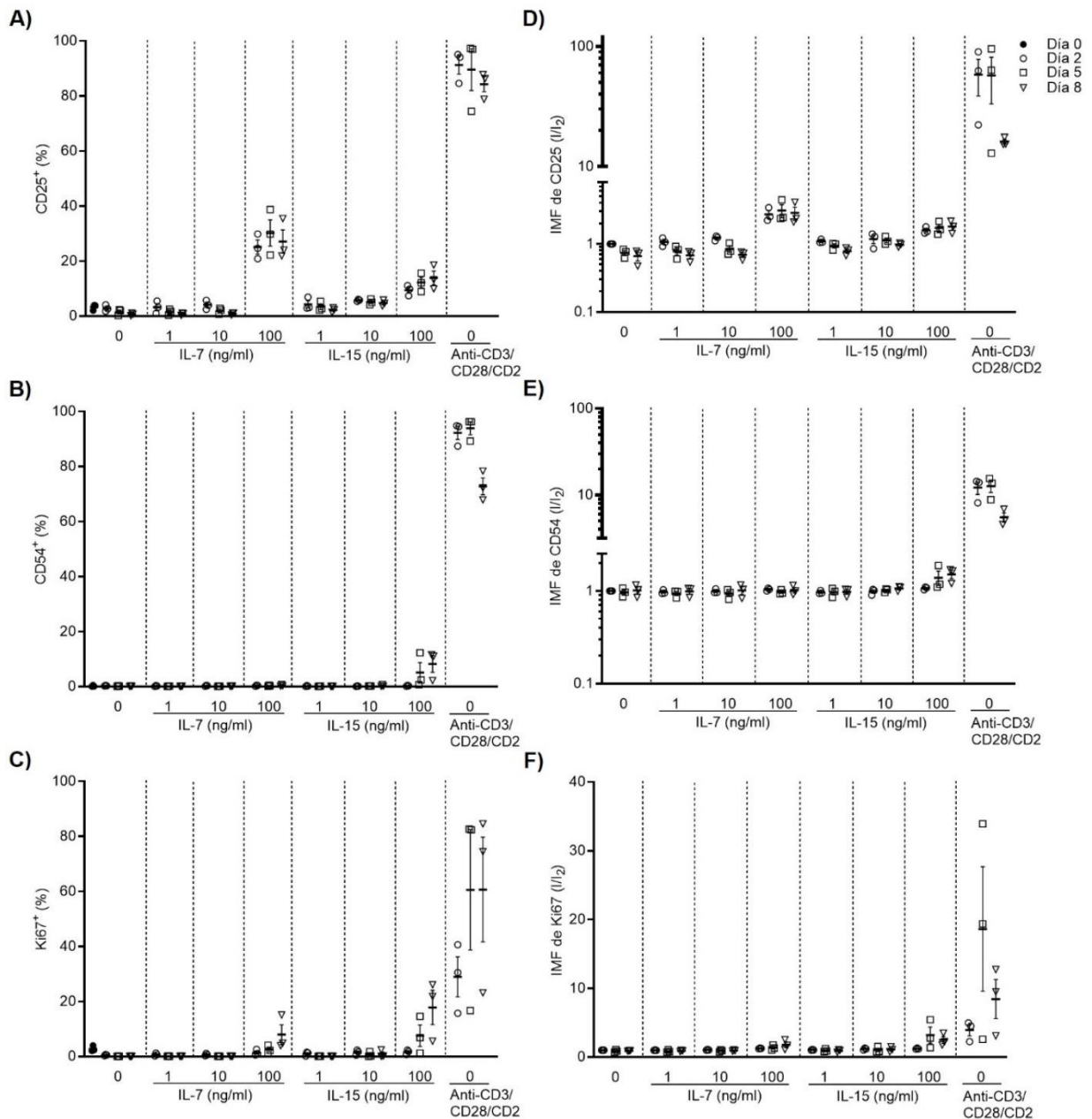
**EXPRESIÓN DE Ki67**



**Figura 4. Expresión de CD25, CD54 y Ki67 en linfocitos T CD4 humanos de memoria bajo diferentes condiciones de cultivo.** Linfocitos T CD4 humanos de memoria purificados y cultivados en medio AIM V suplementado con 5% de suero AB humano (medio de cultivo) más 1, 10 o 100 ng/ml de IL-7 o IL-15. Los porcentajes e IMF de CD25, CD54 y Ki67 se determinaron posterior a la purificación (día 0) y a los días 2, 5 y 8 de cultivo. Como control de la activación de los linfocitos T (activación canónica), las células se incubaron con anticuerpos anti-CD3/CD28/CD2 acoplados a perlas.

Gráficas de puntos representativas del porcentaje de células CD25<sup>+</sup> (A), CD54<sup>+</sup> (D) y Ki67<sup>+</sup> (G) de cultivos incubados con 1, 10 o 100 ng/ml de IL-7 o IL-15 durante 2, 5 y 8 días. Gráficas de puntos representativas del porcentaje de células CD25<sup>+</sup> (B), CD54<sup>+</sup> (E) y Ki67<sup>+</sup> (H) de células recién purificadas (día 0) y de los controles de células incubadas con medio de cultivo y células activadas con anticuerpos anti-CD3/CD28/CD2 acoplados a perlas magnéticas durante 2, 5 y 8 días, ambas condiciones sin citocinas añadidas. Histogramas representativos de la expresión de CD25 (C), CD54 (F) y Ki67 (I) con las condiciones de cultivo indicadas durante los diferentes días de cultivo.





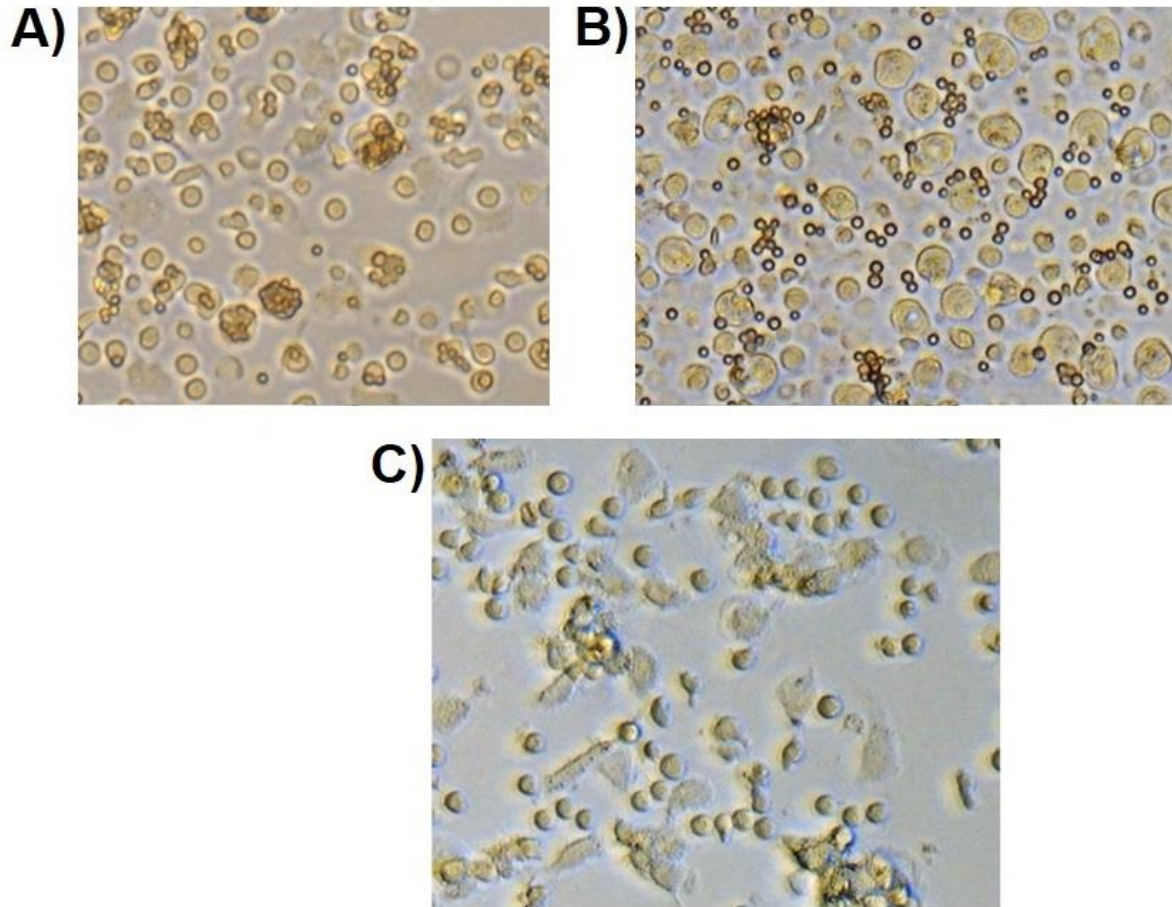
**Figura 5. La presencia de 1 y 10 ng/ml de IL-7 o IL-15 mantiene en reposo a los linfocitos T CD4 humanos de memoria.** Linfocitos T CD4 humanos de memoria purificados y cultivados en medio AIM V suplementado con 5% de suero AB humano (medio de cultivo) más 1, 10 o 100 ng/ml de IL-7 o IL-15. Los porcentajes e IMF de CD25, CD54 y Ki67 se determinaron posterior a la purificación (día 0) y a los días 2, 5 y 8 de cultivo. Como control de la activación de los linfocitos T (activación canónica), las células se incubaron con anticuerpos anti-CD3/CD28/CD2 acoplados a perlas magnéticas. Comparación de los porcentajes de células CD25<sup>+</sup> (A), CD54<sup>+</sup> (B) y Ki67<sup>+</sup> (C) con diferentes condiciones de cultivo. Comparación de las IMF de células CD25 (D), CD54 (E) y Ki67 (F) con diferentes condiciones de cultivo. La razón de cambio de la expresión de CD25, CD54 y Ki67 se normalizó respecto al día 2 de cultivo con medio solo (I/I<sub>2</sub>). Cada punto representa un donador. Los datos mostrados son el promedio de 3 experimentos independientes y se muestra el error estándar.



### **E. Fotografías tomadas con microscopio invertido de cultivos de PBMC activadas con anticuerpos anti-CD3/anti-CD28/anti-CD2 o con LPS.**

Para la obtención del medio condicionado TCR-CM, se separaron PBMC de sangre periférica de donadores hombres sanos y se incubaron durante 3 días con anticuerpos anti-CD3/anti-CD28/anti-CD2 acoplados a perlas magnéticas, activando sólo linfocitos T a través del TCR. Se decidió este tiempo de incubación debido a que fue el tiempo máximo en el cual se pudieron mantener a las células con una buena viabilidad y sin retirar ni agregar medio de cultivo. Además, es un tiempo en el cual, con este agente activador, gran parte de las células expresan los marcadores de activación CD25 y CD54, y proliferan. Al microscopio se observaron cambios morfológicos como el aumento del tamaño (**figura 6A-B**).

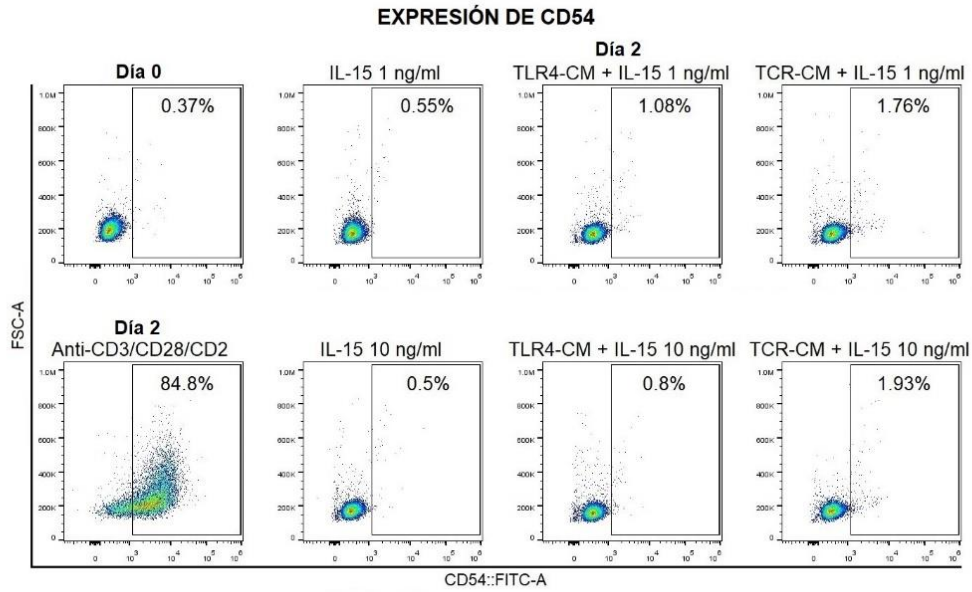
Para la obtención del medio condicionado TLR4-CM, una proporción de las PBMC obtenidas para la obtención del TCR-CM (mismos donadores hombres sanos), se incubaron durante 24 horas con 1 µg/ml de LPS acoplado a biotina, activando a monocitos, células dendríticas y algunas subpoblaciones de linfocitos T a través del TLR4. Con estas condiciones, se observó al microscopio un notable cambio en la morfología celular (proyecciones) y su adhesión al fondo de la placa (**figura 6C**).



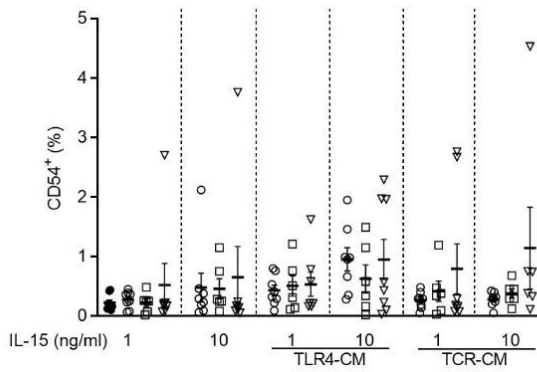
**Figura 6.** Fotografías a 200X tomadas con microscopio invertido de cultivos de PBMC humanas estimuladas con anticuerpos anti-CD3/anti-CD28/anti-CD2 acoplados a perlas magnéticas al día 0 (A) y a 3 días de activación (B), y PBMC humanas estimuladas con 1µg/ml de LPS acoplado a biotina durante 24 horas (C).

**F. Linfocitos T CD4 humanos de memoria incubados con los medios condicionados TLR4-CM o TCR-CM mantienen un fenotipo en reposo.**

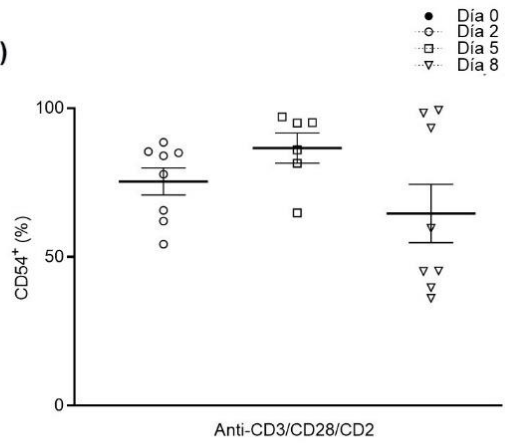
**A)**



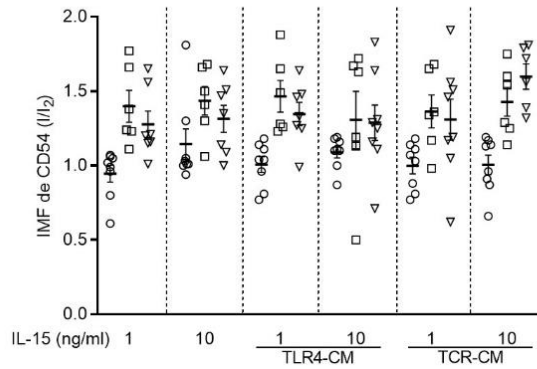
**B)**



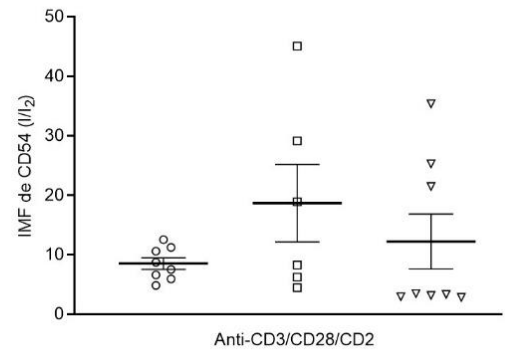
**D)**



**C)**



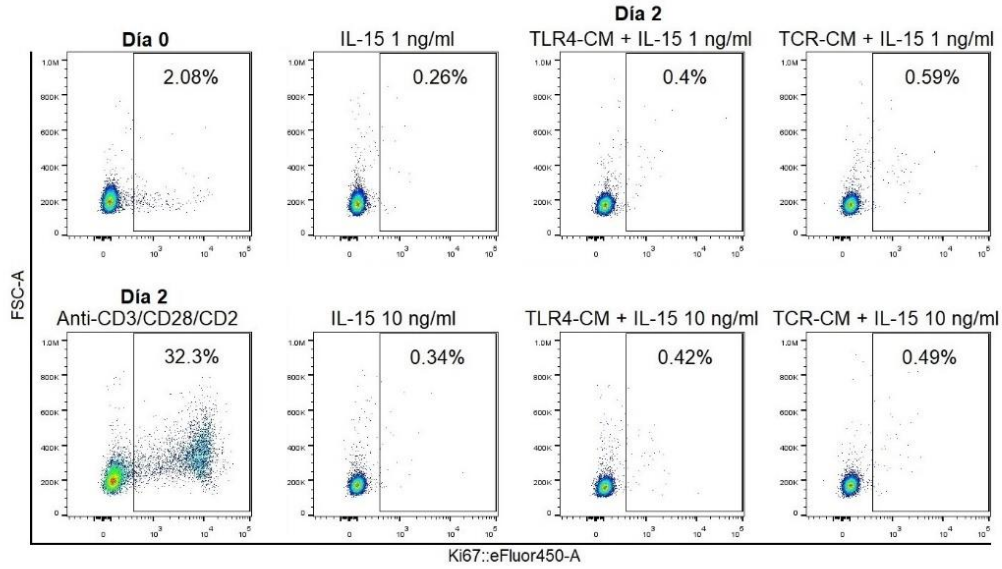
**E)**



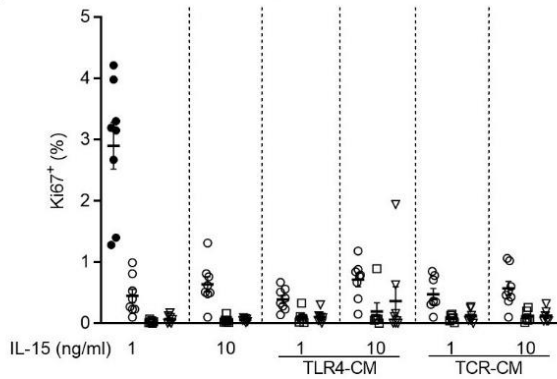
**Figura 7. El porcentaje de linfocitos T CD4 de memoria CD54<sup>+</sup> y de la IMF aumentan después de la activación de los linfocitos T CD4 de memoria a través del TCR, pero no con TLR4-MC ni TCR-MC.** Los linfocitos T CD4 humanos de memoria purificados fueron cultivados en medio AIM V con 5% de suero AB humano más 1 o 10 ng/ml de IL-15 y en ausencia o presencia de TLR4-CM o TCR-CM, como se indica, durante 2, 5 y 8 días. El medio condicionado proveniente de PBMC activadas con LPS (TLR4-CM) o con anticuerpos anti-CD3/anti-CD28/anti-CD2 (TCR-CM) fueron adicionados el día de la siembra. (A) Gráficas de puntos representativas de FSC vs CD54 de las células viables con diferentes condiciones de cultivo. (B) Los medios condicionados no inducen el aumento de células CD54<sup>+</sup>. (C) La IMF de CD54 no aumentó con los medios condicionados. (D) Porcentaje e (E) intensidad media de fluorescencia de células CD54<sup>+</sup> activadas a través del TCR (con anticuerpos anti-CD3/anti-CD28/anti-CD2). La razón de cambio de la expresión de CD54 se normalizó respecto al día 2 de cultivo con medio solo (I/I<sub>2</sub>). Cada punto representa un donador. Los datos mostrados en las gráficas (B-E) son el promedio de 8 experimentos independientes para los días 0, 2 y 8, y 6 experimentos independientes para el día 5 de cultivo y se muestra el error estándar.

A)

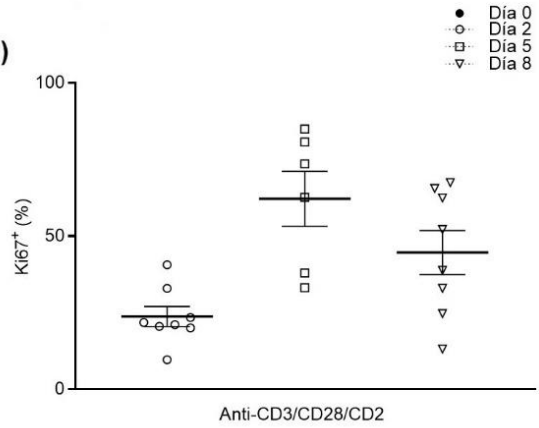
EXPRESIÓN DE KI67



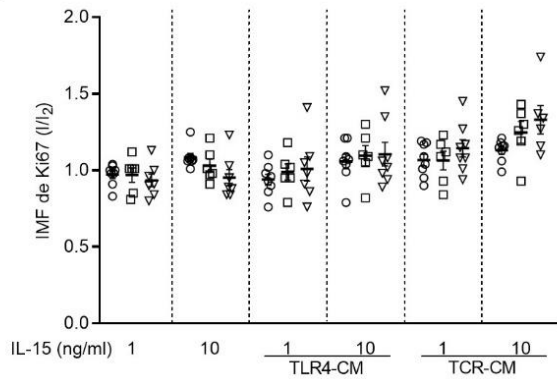
B)



D)



C)



E)

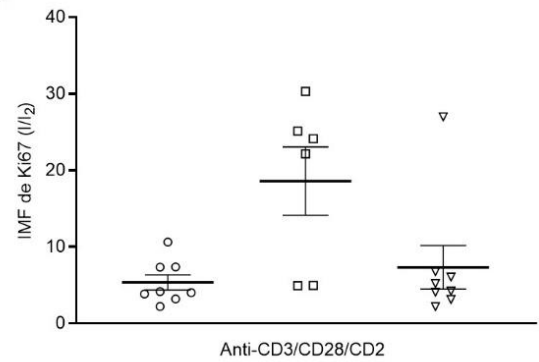


Figura 8. El porcentaje de linfocitos T CD4 de memoria Ki67+ y de la IMF aumentan después de la activación de los linfocitos T CD4 de memoria a través del TCR, pero no con TLR4-MC ni TCR-MC. Los linfocitos T CD4 humanos de memoria purificados fueron cultivados en medio AIM V con 5% de suero AB humano más 1 o 10 ng/ml de

IL-15 y en ausencia o presencia de TLR4-CM o TCR-CM, como se indica, durante 2, 5 y 8 días. El medio condicionado proveniente de PBMC activadas con LPS (TLR4-CM) o con anticuerpos anti-CD3/anti-CD28/anti-CD2 (TCR-CM) fueron adicionados el día de la siembra. (A) Gráficas de puntos representativas de FSC vs Ki67 de las células viables con diferentes condiciones de cultivo. (B) Los medios condicionados no inducen el aumento de células Ki67<sup>+</sup>. (C) La IMF de Ki67 no aumentó con los medios condicionados. (D) Porcentaje e (E) intensidad media de fluorescencia de células Ki67<sup>+</sup> activadas a través del TCR (con anticuerpos anti-CD3/anti-CD28/anti-CD2). La razón de cambio de la expresión de Ki67 se normalizó respecto al día 2 de cultivo con medio solo (I/I<sub>2</sub>). Cada punto representa un donador. Los datos mostrados en las gráficas (B-E) son el promedio de 8 experimentos independientes para los días 0, 2 y 8, y 6 experimentos independientes para el día 5 de cultivo y se muestra el error estándar.

## **XII. ARTÍCULOS PUBLICADOS**



# Soluble factors from TLR4- or TCR-activated cells contribute to stability of the resting phenotype and increase the expression of CXCR4 of human memory CD4 T cells

Isabel Ruelas-Galindo<sup>1</sup> · Leonor Huerta<sup>1</sup>

Received: 18 May 2022 / Accepted: 15 November 2022

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2022

## Abstract

It has been proposed that cytokines can induce activation of resting T cells in an antigen-independent manner. However, experimental conditions have included the use of fetal serum and nanogram concentrations of added cytokines. To evaluate the effect of cytokines and chemokines generated by activated immune cells on the phenotypic profile of human memory CD4 T cells, the cells were cultured in FBS-free conditions in the presence of IL-15 and 5% of hAB serum and incubated with conditioned medium (CM) obtained from PBMC activated through the TCR using anti-CD3/CD28/CD2 antibodies (TCR-CM) or through TLR4 using bacterial LPS (TLR4-CM). Cytokines and chemokines present in the CMs were evaluated by ProcartaPlex immunoassay. Cell viability, proliferation, and surface markers were determined by flow cytometry on day 2, 5, and 8 of culture. Cell viability was maintained by TLR4-CM plus IL-15 for 8 days but decreased in the presence of the TCR-CM plus IL-15. In combination with IL-15, the TLR4-CM, but not the TCR-CM, maintained the expression of CD3 and CD4 stable. Both conditions stabilized the expression of CD45RO and CCR5. Thus, the TLR4-CM better supported the viability and stability of the memory phenotype. None of the CMs induced proliferation or expression of activation markers; however, they induced an increased expression of CXCR4. This study indicates that resting memory CD4 T cells are not activated by, but may be sensitive to soluble factors produced by antigen or PAMP-stimulated cells, which may contribute to their homeostasis and favor the CXCR4 expression.

**Keywords** Bystander activation · Memory CD4 T cells · Cytokines · Chemokines · TCR · TLR4

## Introduction

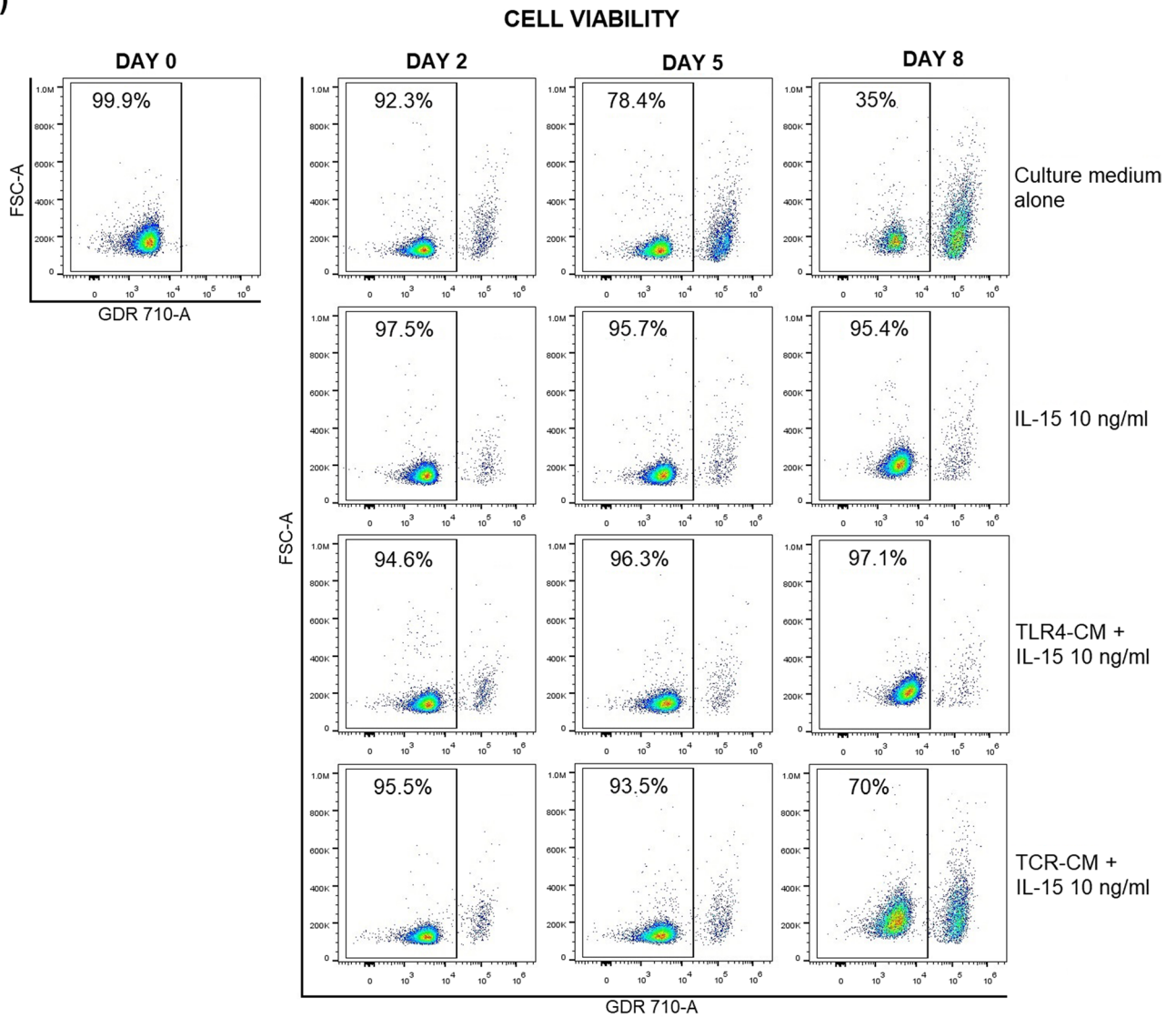
Human resting CD4 T cells comprise the naïve and memory cell populations, termed by the expression of surface molecules as CD45RA<sup>+</sup> and CD45RO<sup>+</sup>, respectively. These cells have a long half-life, and they divide intermittently with no phenotypic changes, a process called homeostatic proliferation. While the naïve subset is maintained by individual cells with a long lifespan, the memory subset is maintained by long-lived clones that have a more rapid turnover [1]. In vitro,

cytokines that enable the survival and homeostatic proliferation of resting cells include IL-2, IL-4, IL-7, and IL-15, which share the common cytokine receptor  $\gamma$  chain ( $\gamma_c$  or CD132) [2–4] and IL-6 [5]. Memory CD4 T cells have been reported to require IL-7 and IL-15 [6–8]. It is not well established whether they require contact with pMHC (peptide-Major Histocompatibility Complex) expressed on the surface of other cells [9–12]. IL-7 induces survival through the induction of anti-apoptotic molecules such as Bcl-2, Bcl-xL, and Mcl-1 [13, 14]. The main source of IL-7 in lymph nodes are reticular fibroblast cells, while in bone marrow and thymus IL-7 are produced by stromal cells [15]. Instead, IL-15 is secreted by monocyte/macrophages, dendritic cells, epithelial and bone marrow stromal cells, and fibroblasts during the immune response to microbial pathogens and parasites [16–18]. Like IL-7, IL-15 induces the expression of the anti-apoptotic molecules Bcl-2 and Bcl-xL

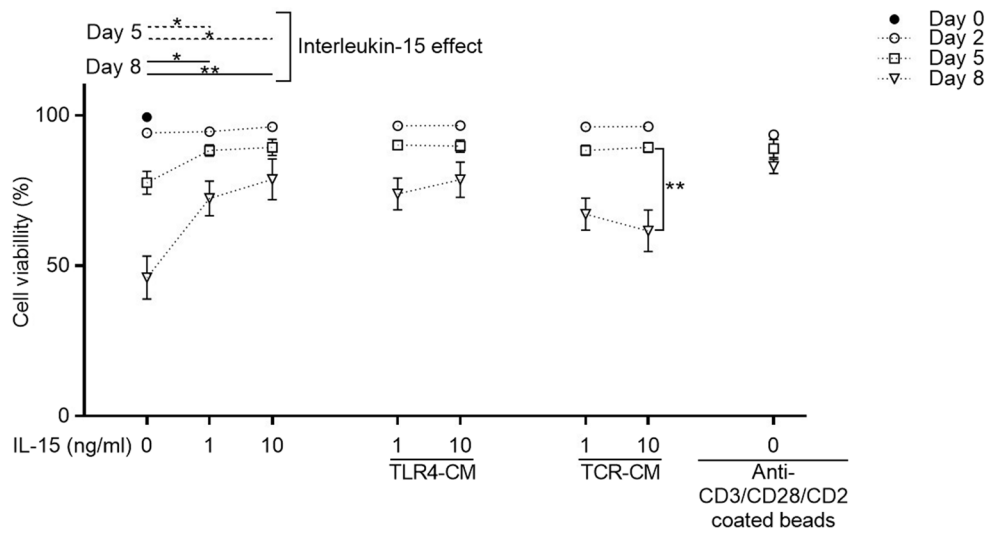
✉ Leonor Huerta  
leonorhh@biomedicas.unam.mx

<sup>1</sup> Department of Immunology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Ciudad de Mexico 04510, México

A)



B)





**Fig. 1** Viability of resting memory CD4 T cells cultured in FBS-free conditions and IL-15. Freshly isolated resting memory CD4 T cells were cultured in AIM V medium with 5% of hAB serum plus 1 or 10 ng/ml of IL-15. Conditioned medium (CM) from PBMC stimulated with LPS (TLR4-CM) or anti-CD3/CD28/CD2 coated beads (TCR-CM) was added at day of seeding and viability was determined at 2, 5, and 8 days by staining with the Ghost Dye Red 710 (GDR-710). Day 0 shows cell viability after purification. As a control of T cell activation (canonical activation), cells were incubated with anti-CD3/CD28/CD2 coated beads but not exposed to CMs nor IL-15 in parallel experiments. **(A)** Representative plots of the incorporation of GDR-710. **(B)** Comparison of the percentage of cell viability obtained in the absence or presence of IL-15 or in the presence of conditioned medium plus IL-15. Viability obtained for cells activated directly with anti-CD3/CD28/CD2 coated beads is shown. Data are the mean of 8 independent experiments for days 0, 2, and 8, and 6 independent experiments for day 5. Error bars represent SEM. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$

[19] and inhibits CD95/Fas-induced apoptosis [20] and the proapoptotic protein Bax [21], enhancing cell survival.

Besides homeostatic cytokines, it has been proposed that cells may be targets of bystander activation [22–25], which is described as the phenotypic and functional changes induced by antigen-specific independent mechanisms mediated by the TCR [26, 27] and induced by cytokines and chemokines produced by other cells activated through the TCR, such as viral infections, or by pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) through Toll-like receptors (TLR) [28, 29].

Several models have been used to study bystander activation [22, 30–32], which has been reported mainly in mice and in human CD8 T cells under pathological conditions. Little is known about bystander activation of human resting memory CD4 T cells. In some of the few existing in vitro studies, cells were cultured in the presence of fetal bovine serum (FBS) and/or high concentrations of particular cytokines (in the nanogram range) [25, 33–37]. Other studies used supernatants from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) or dendritic cells stimulated with staphylococcal enterotoxin B (SEB) [25, 27] or macrophages stimulated with bacterial lipopolysaccharide (LPS) [33], using human type AB (hAB) serum. Some of the observed effects include cell proliferation [25, 33–35], expression of activation markers [27, 33–36], adhesion molecules and chemokine and cytokine receptors [25, 34, 36], induction of effector phenotypes [25, 33, 36, 37] and apoptosis [27]. Thus, culture conditions have been variable and have included the use of FBS and nanogram concentrations of added cytokines.

Thus, a proinflammatory milieu composed of cytokines and chemokines generated by activated immune cells may affect resting T lymphocytes in the microenvironment. Here, we cultured human resting memory CD4 T cells in FBS-free conditions in the presence of IL-15 and 5% of hAB serum

and determined the effects of conditioned medium (CM) obtained from PBMC activated through the TCR using anti-CD3/CD28/CD2 coated beads (TCR-CM), or through TLR4 using bacterial LPS (TLR4-CM). The CMs contained a wide variety of soluble factors at low concentrations (in the picogram range). Cell viability, proliferation, and surface markers were determined for 8 days. This approach more closely resembles the possible effects of an inflammatory milieu on resting CD4 T cells during an immune response. We report here that a proinflammatory CM generated by TLR4-stimulated cells can maintain the expression of lymphocyte markers, thus acting as a homeostatic environment for memory CD4 T cells, maintaining their resting phenotype and viability. Also, we found that both CMs from TLR4 and TCR-stimulated cells increased the expression of CXCR4 at the cell membrane.

## Materials and methods

### PBMC stimulation and conditioned medium (CM) collection

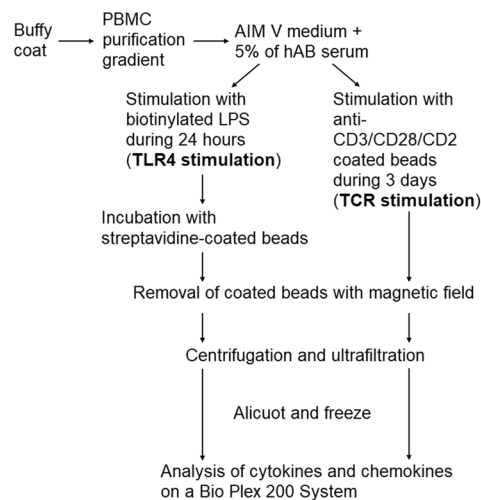
PBMC were isolated from buffy coats of 4 healthy male donors (21–57 years old) on Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) gradients. The culture medium used for all the experiments was AIM V serum-free medium (Gibco, Grand Island, NY) supplemented with 5% of hAB serum (Valley Biomedical, Winchester, VA). For TLR4 stimulation, PBMC were plated at  $2.5 \times 10^6$ /ml in 12-well flat bottom CellBIND Surface plates (Corning) in culture medium with biotinylated ultrapure *Escherichia coli* O111:B4 lipopolysaccharide (LPS-EB Biotin, Invivogen) at a final concentration of 1  $\mu$ g/ml for 24 h at 37 °C with 5% of CO<sub>2</sub>. For T cell activation, PBMC were plated at  $5 \times 10^6$ /ml in 12-well flat bottom CellBIND Surface plates (Corning) in culture medium with anti-CD3/CD28/CD2 coated beads (Miltenyi Biotec) at a bead-to-cell ratio of 1:2 for 3 days. At the end of the corresponding incubation days, the CMs were collected and centrifuged. For the removal of LPS-EB Biotin, the CMs were previously incubated with Dynabeads M-280 Streptavidin (Invitrogen). Anti-CD3/CD28/CD2 coated beads were removed using a magnet (MidiMACS Separator, Miltenyi Biotec). Both CMs were ultrafiltered using Amicon Ultra-4 100 K (Merck Millipore).

### Cytokine and chemokine analyses

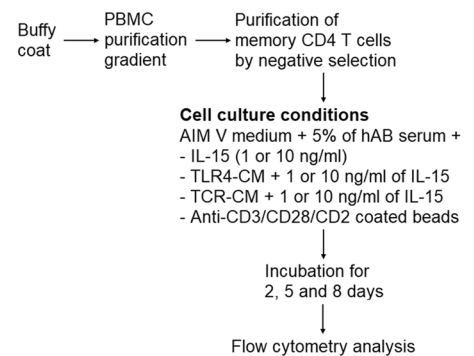
Cytokine and chemokine concentrations in CMs were determined using the ProcartaPlex Human Cytokine and Chemokine Panel 1A 34-plex kit (Invitrogen, Thermo Fisher, Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's

**Fig. 2** Flowchart of the experimental sequence. PBMC, peripheral blood mononuclear cells; LPS, lipopolysaccharide; hAB serum, human type AB serum; TCR, T cell receptor; TLR4, Toll-like Receptor 4; TLR4-CM, conditioned medium from TLR4 stimulation; TCR-CM, conditioned medium from TCR stimulation

### 1. CONDITIONED MEDIUM COLLECTION FROM STIMULATED PBMC



### 2. INCUBATION OF RESTING MEMORY CD4 T CELLS WITH CONDITIONED MEDIUM



protocol. Results were analyzed on a Bio Plex 200 System (Bio-Rad) using the software Bio-Plex Manager 6.1. The cytokines and chemokines analyzed were Eotaxin (CCL11), GM-CSF, GRO- $\alpha$  (CXCL1), IFN- $\alpha$ , 95 IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1RA, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8 (CXCL8), IL-9, IL-10, IL-12 p70, IL-13, 96 IL-15, IL-17A, IL-18, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27, IL-31, IP-10 (CXCL10), MCP-1 (CCL2), MIP-1 $\alpha$  (CCL3), MIP-1 $\beta$  (CCL4), RANTES (CCL5), SDF-1 $\alpha$  (CXCL12), TNF- $\alpha$ , and TNF- $\beta$  (LTA).

### Isolation of primary human memory CD4 T cells and incubation with CMs

PBMC were isolated from buffy coats of 8 healthy male donors (24–59 years old) on Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) gradients and primary human memory CD4 T cells were subsequently purified by negative selection using the Memory CD4<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit containing antibodies against CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD45RA, CD56, CD123, TCR $\gamma/\delta$ , and CD235a (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). The percentage of purity after the negative selection of the memory CD4<sup>+</sup> T cells was routinely >92% as verified by flow cytometry (time 0). Recently, purified cells were plated at  $2 \times 10^5/100 \mu\text{l}$  in 96-well flat bottom (Corning) in AIM V in the absence or presence of IL-15 (1 or 10 ng/ml; Miltenyi Biotec) for 2, 5, and 8 days at 37 °C with 5% of CO<sub>2</sub>. For stimulation with the supernatants, cells were incubated with a pool of the CMs obtained from 4 donors, as described previously. CMs from PBMC stimulated with LPS-EB Biotin (TLR4-CM) or anti-CD3/CD28/CD2 coated beads (TCR-CM) was added at a proportion of medium-supernatant of 1:1 plus IL-15 (1 or 10 ng/ml). 50  $\mu\text{l}$  of fresh culture medium and CM was added at day 5 (in the proportion 1:1). As a negative

control, for all the experiments, memory cells were maintained with culture medium alone. As control of canonical activation, purified memory CD4<sup>+</sup> T cells were plated at  $2 \times 10^5/100 \mu\text{l}$  and stimulated with anti-CD3/CD28/CD2 coated beads at a bead-to-cell ratio of 1:2 for 2, 5, and 8 days, adding 100  $\mu\text{l}$  of fresh culture medium at day 2, and with media replacement at day 5, removing 100  $\mu\text{l}$  and adding 100  $\mu\text{l}$  of fresh culture medium, without breaking the clumps. The cells were analyzed at days 2, 5, and 8 by flow cytometry. Samples that presented less than 50% of cell viability (from day 8) were not included in the analysis of phenotype and activation markers, although viability is reported.

### Antibodies and flow cytometry

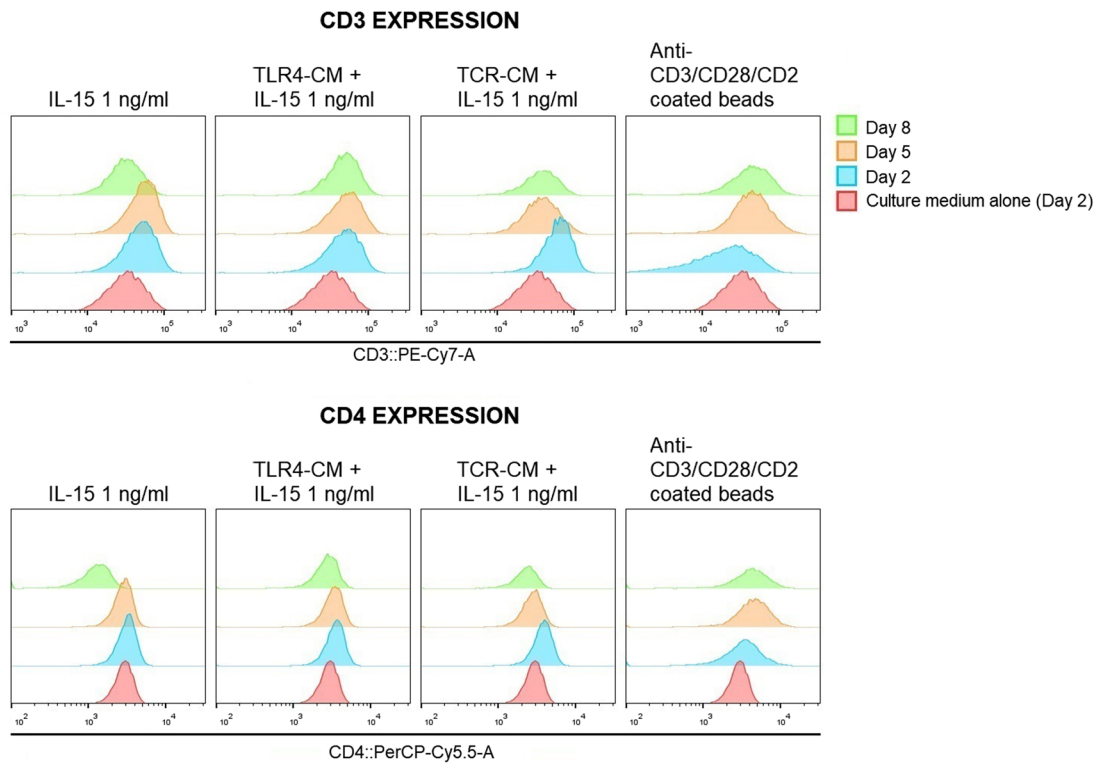
A 9-color panel for flow cytometry was used to analyze the expression of surface molecules, proliferation, and cell death. Initially, fixable viability Ghost Dye Red 710, 1:2000 dilution (Tonbo Biosciences, San Diego, CA, USA) staining was performed to exclude dead cells, followed by staining with a combination of specific antibodies against phenotype surface antigens: anti-CD4 PerCP-Cy5.5, 1:50 dilution (clone OKT4, Tonbo Biosciences), anti-CD45RO PE, 1:100 dilution (clone UCHL1, Tonbo Biosciences), anti-CD3 PE-Cy7, 1:100 dilution (clone UCHT1, Tonbo Biosciences), anti-CD195 (CCR5) PE/Dazzle 594, 1:100 dilution (clone J418F1, BioLegend, San Diego, CA), and anti-CD184 (CXCR4) PE-Cy5, 1:10 dilution (clone 12G5, BD Biosciences). For activation markers anti-CD25 APC, 1:50 dilution (clone BC96, Tonbo Biosciences) and anti-CD54 FITC, 1:100 dilution (clone 15.2, Tonbo Biosciences) were used. Finally, to determine proliferation, intra-nuclear staining was performed for Ki67 eFluor450, 1:40 dilution (clone

**Table 1** Concentration of cytokines and chemokines in conditioned medium from PBMC stimulated with LPS or antibodies anti-CD3/CD28/CD2\*

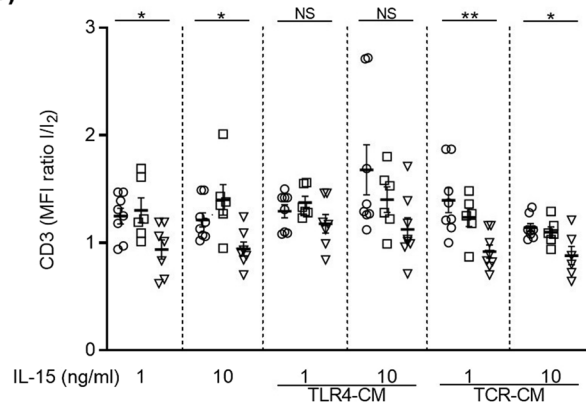
	TLR4-CM				TCR-CM				Average (pg/ml)		
	Donor		Concentration (pg/ml)		Donor		Concentration (pg/ml)				
	1	2	3	4	1	2	3	4			
Pro-inflammatory cytokines	IL-6	25715.5	22717.5	7754.6	6178.6	15591.6	2272.8	8419.7	11722.5	680.6	5773.9
	IFN- $\gamma$	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	899.0	259.6	271.0	1335.5	691.3
	IL-1 $\beta$	308	441.5	282.8	128.1	290.1	369.6	87.7	189.9	251.7	224.7
	IL-13	0.0	0.0	3.9	0.5	1.1	361.6	392.1	899.9	566.0	554.9
	TNF- $\alpha$	92.6	191.5	275.2	79.5	159.7	189.6	77.7	140.3	133.2	135.2
	IL-1 $\alpha$	3.4	6.9	5.5	1.2	4.3	77.1	2.3	5.3	43.1	31.9
	IL-2	11	12.1	11.3	9.8	11.1	7.5	9.8	10.3	3.3	7.7
	IL-4	0.0	0.6	0.0	0.0	0.1	5.4	0.0	0.0	1.9	1.8
	IL-5	5.2	6.1	6.0	3.0	5.1	35.1	29.3	105.2	101.2	67.7
	IL-9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	32.2	6.2	31.4	43.2	28.2
IL-21	1.0	0.0	0.0	0.0	0.2	9.9	3.3	9.2	14.9	9.3	
IL-17A	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	31.2	23.1	22.9	28.4	26.4	
TNF- $\beta$	1.6	3.1	1.9	2.4	2.2	37.8	2.7	4.6	22.0	16.8	
IL-18	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	208.5	91.4	119.0	287.4	176.6	
Anti-inflammatory cytokines	IL-IRA	11302.8	42192.4	89758.3	30412.8	43416.6	97768.5	16910.2	21140.4	66616.3	50608.9
	IL-10	24.4	36.5	47.1	24.4	33.1	13.7	4.8	18.3	10.8	11.9
	IL-22	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	86.3	9.1	34.0	61.8	47.8
	CCL4	742.9	65942.2	224326.0	31096.1	80526.8	26903.0	55.0	40.9	72762.0	24940.3
Chemokines	CXCL8	620.6	3234.1	1890.0	1368.4	1778.3	3576.7	1423.6	1116.9	1478.4	1898.9
	CCL2	3958.8	8517.9	7312.8	5060.9	6212.6	7952.5	3274.0	3674.7	7547.5	5612.2
	CXCL12	570.7	9475.6	6601.1	4070.8	5179.5	7463.6	1645.6	1475.0	4561.8	3786.5
	GM-CSF	119.9	332.3	133.2	95.1	170.1	514.1	48.6	98.1	274.2	233.8
	CCL3	117.5	2343.7	1683.0	981.4	1281.4	1792.3	27.0	43.4	1935.6	949.6
	CXCL1	106.4	1186.3	747.5	522.4	640.6	829.2	412.8	198.5	808.2	562.2
	CXCL10	0.3	0.7	1.0	0.8	0.7	1395.5	242.5	588.0	1062.2	822.1
CCL5	18.0	24.6	32.9	29.9	26.3	50.9	4.3	2.5	80.6	34.6	

\*Cytokines and chemokines analyzed but not found: CCL11, IFN- $\alpha$ , IL-7, IL-15, IL-12p70, IL-23, IL-27 and IL-31

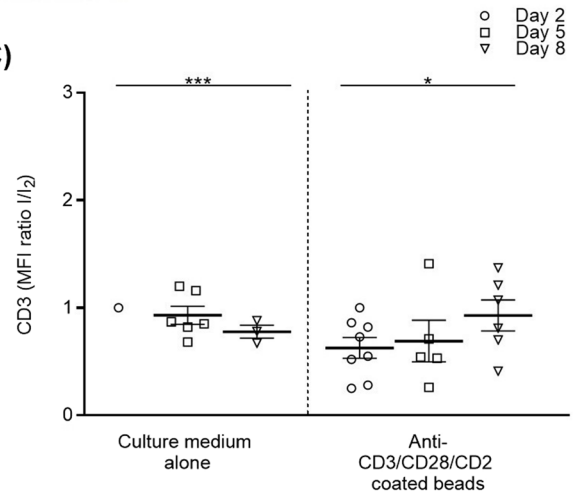
A)



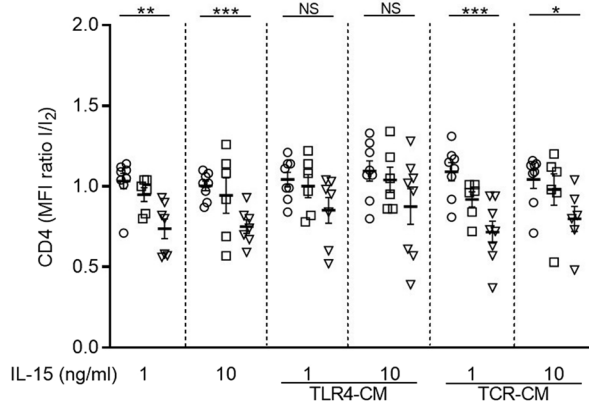
B)



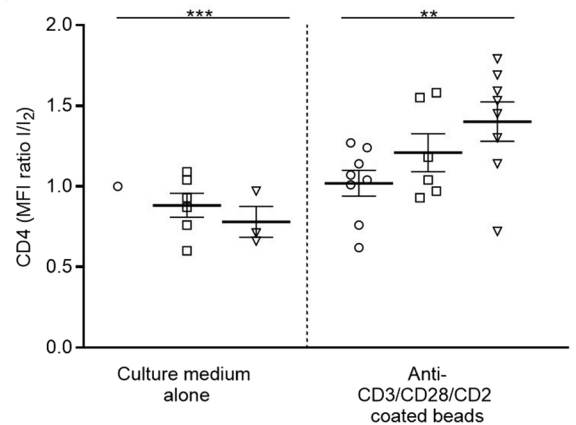
C)



D)



E)



○ Day 2  
 □ Day 5  
 ▼ Day 8

**Fig. 3** The expression of CD3 and CD4 in resting memory CD4 T cells is maintained by CM from TLR4-stimulated PBMC. Resting memory CD4 T cells were cultured in AIM V medium containing 5% of hAB serum, adding 1 or 10 ng/ml of IL-15 and in the absence or presence of TLR4-CM or TCR-CM, as indicated, during 2, 5, or 8 days. CM from PBMC stimulated with LPS (TLR4-CM) or anti-CD3/CD28/CD2 coated beads (TCR-CM) was added at day of seeding. **(A)** Representative histograms of the expression of CD3 and CD4 of viable cells at different culture conditions during different days, as indicated. **(B)** The expression of CD3 was slightly increased with all the conditions at day 2 but it was only maintained up to 8 days by the TLR4-CM plus IL-15. **(D)** The expression of CD4 was maintained only by TLR4-CM plus IL-15. **(C and E)** In control, parallel experiments, activation with anti-CD3/CD28/CD2 coated beads in the absence of IL-15 or CM promoted the expression of CD4 and lowered the expression of CD3. The fold change for the expression of CD3 and CD4 was normalized respective to the expression at day 2 of culture with medium alone ( $I/I_2$ ). Each dot represents one donor. Error bars represent SEM. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; NS, not significant

20Raj1, Thermo Fisher Scientific, San Diego, CA) using the Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set (Thermo Fisher Scientific). The cells were maintained in PBS until acquisition on an Attune Nxt Flow Cytometer (Thermo Fisher Scientific). Typically, 10,000 cells were collected and were analyzed using the FlowJo vX.0.7 software.

### Statistical analysis

For CD4, CD3, CD45RO, CXCR4, CCR5, CD25, CD54, and Ki67, percentages and the mean fluorescence intensity (MFI) were obtained from the memory CD4<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> T cell subset. MFI was normalized respective to the expression at day 2 of culture with medium alone ( $I/I_2$ ), due to the more homogeneous expression of markers relative to day 0. Statistical analysis was performed with Graph Prism Version 9 (GraphPad Software, San Diego, CA). Levene test was applied for determination of homogeneity of variances and statistical significance was determined with the unpaired two-tailed Student's *t*-test.  $P < 0.05$  was considered significant.

## Results

### Maintenance of resting human memory CD4 T cells in the absence of FBS

The maintenance of human memory CD4 T cells is usually performed with the use of nanogram concentrations of so-called homeostatic cytokines, those that share the IL-2 receptor  $\gamma$ c (IL-2, IL-4, IL-15, and IL-7) and high concentrations of FBS. The effect of other cytokines and chemokines on the cellular viability and the stability of the memory phenotype is not reported. In this work, we examined the effect of soluble factors released by activated cells on the

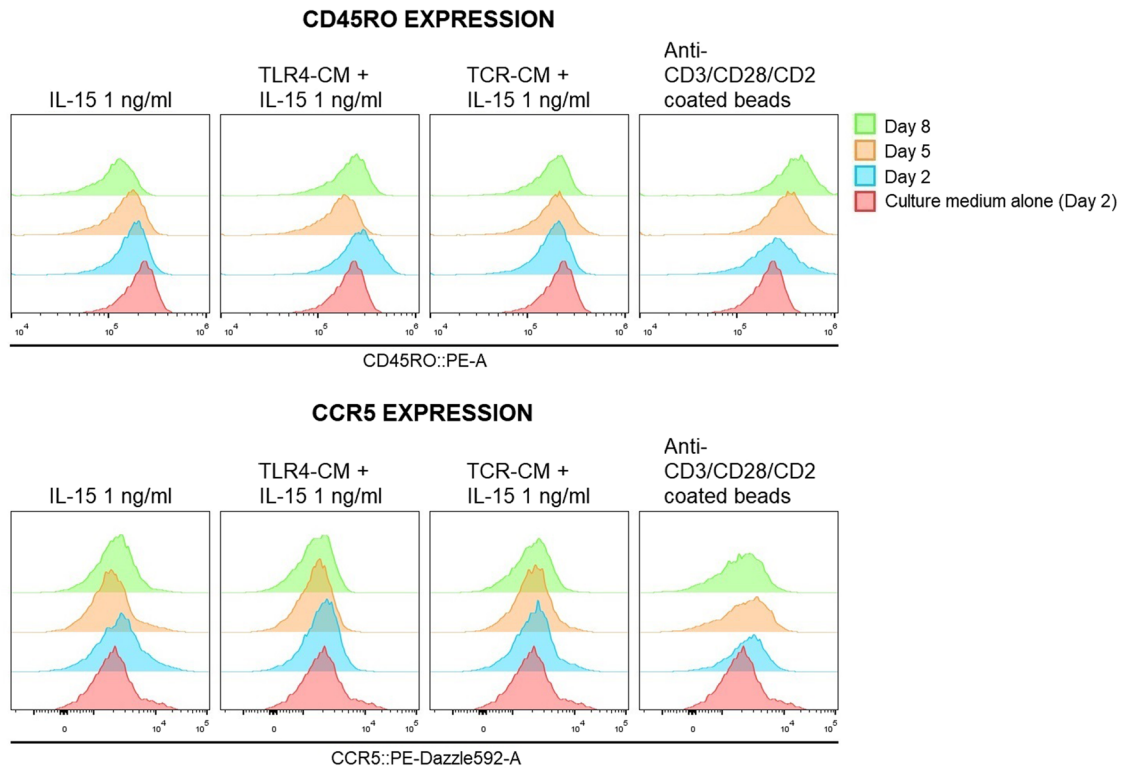
viability and phenotype of resting memory CD4 T cells. To detect changes induced by these factors, we cultured freshly isolated memory CD4 T cells, in FBS-free conditions (AIM V medium) with 5% of hAB serum in the presence or absence of IL-15 (1 or 10 ng/ml) and conditioned medium from PBMC stimulated with biotinylated LPS (TLR4-CM) or anti-CD3/CD28/CD2 coated beads (TCR-CM). It was expected that absence of FBS would avoid detecting phenotypic changes induced by synergism of cytokines in the supernatants with growth factors in the FBS. In these conditions, cell viability was maintained around 90% after 5 days in the presence of IL-15 (Fig. 1). Culture in AIM V medium alone allowed the survival of control cells activated through the TCR in the absence of IL-15 (94% at day 2 and 83% at day 8 of culture). Thereafter, we analyzed cells cultured in the presence of conditioned medium from PBMC stimulated with biotinylated LPS (TLR4-CM) or anti-CD3/CD28/CD2 coated beads (TCR-CM). To obtain the CMs, PBMC were stimulated with LPS-biotin for 24 h or with anti-CD3/CD28/CD2 coated beads for 3 days, as shown in Fig. 2. LPS was removed from CMs using streptavidin coupled to magnetic beads followed by magnetic separation of beads; anti-CD3/CD28/CD2 coated beads were separated magnetically. Vesicles or cell debris were removed by ultrafiltration, so that the effects observed were exclusively due to the soluble factors in the CMs. Concentrations of cytokines and chemokines in the supernatants were analyzed with a Bio Plex 200 System (Table 1). Subsequently, cells were incubated with CMs and analyzed at day 2, 5, and 8 by flow cytometry. The effect of TCR-CM and TLR4-CM was determined in parallel.

Figure 1 shows that both TLR4-CM or TCR-CM plus IL-15 maintained cell viability around 90% for 5 days. At day 8, cells cultured in the presence of TLR4-CM showed a viability decay below 80%, which however was non-significant, indicating that cytokines and chemokines induced by the LPS stimulation of PBMC had no toxic effect on resting lymphocytes. Accordingly, the TLR4-CM better supported the stable expression of CD3 and CD4 (Fig. 3). Instead, cells cultured in the presence of TCR-CM showed a viability decay at day 8 even in the presence of 1 (67%) or 10 ng/ml (61%) of IL-15, being significant at day 8 respective to day 5 with 10 ng/ml of IL-15.

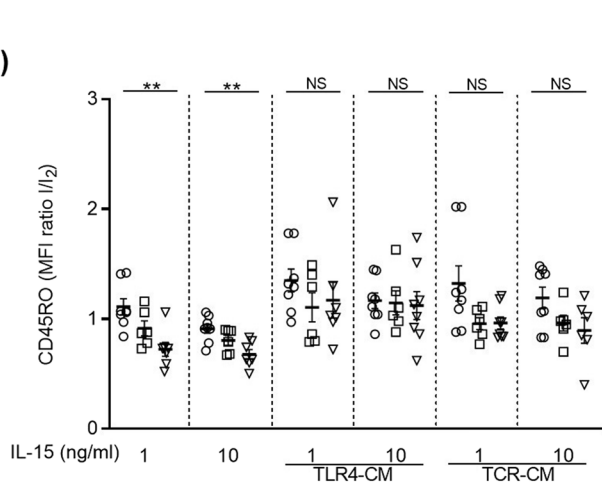
### Cytokines and chemokines produced by TLR4- or TCR-stimulated cells

Table 1 shows the concentration of cytokines and chemokines in the CMs obtained from PBMC of each donor and the average value, which would be present in the pools used for incubation with the resting memory CD4 T cells. A variety of cytokines were detected in the TCR-CM, whereas a less variety and decreased levels were found in the TLR4-CM. Similar levels of chemokines were detected with both

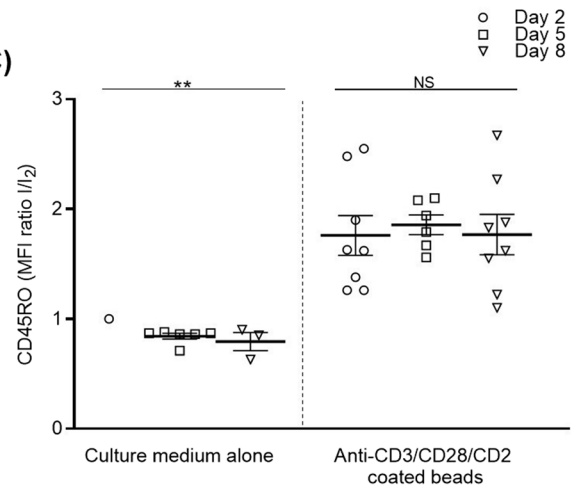
A)



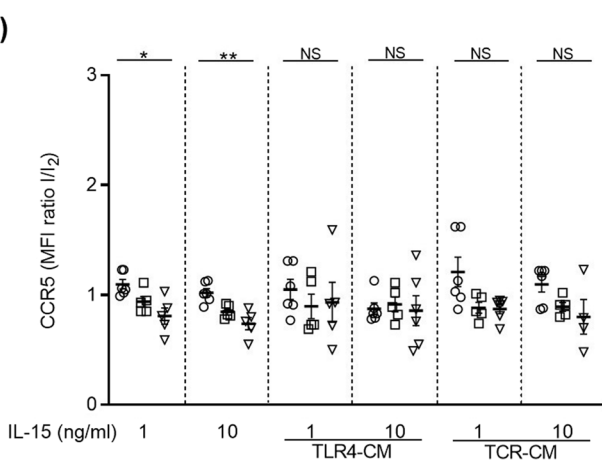
B)



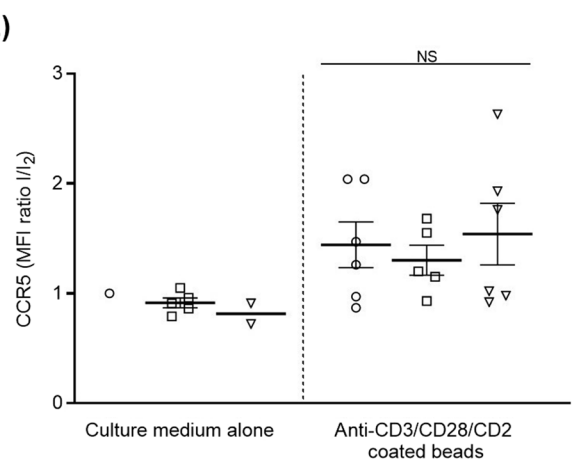
C)



D)



E)





**Fig. 4** The expression of CD45RO and CCR5 is maintained by CMs from TLR4-stimulated or TCR-activated PBMC. Resting memory CD4 T cells were cultured in AIM V medium containing 5% of hAB serum, adding 1 or 10 ng/ml of IL-15 and in the absence or presence of TLR4-CM or TCR-CM, as indicated, during 2, 5, or 8 days. CMs from PBMC stimulated with LPS (TLR4-CM) or anti-CD3/CD28/CD2 coated beads (TCR-CM) were added at day of seeding. **(A)** Representative histograms of the expression of CD45RO and CCR5 of viable cells at different culture conditions during different days, as indicated. **(B)** The expression of CD45RO was slightly increased at day 2 and was maintained up to 8 days by both CMs but not by IL-15 alone. **(D)** The expression of CCR5 was maintained by both CMs but not by IL-15 alone. **(C and E)** Culture conditions promoted the expression of CD45RO and CCR5 upon activation with anti-CD3/CD28/CD2 coated beads in the absence of IL-15 or CMs. The fold change for the expression of CD45RO and CCR5 was normalized respective to the expression at day 2 of culture with medium alone ( $I/I_2$ ). Each dot represents one donor. Error bars represent SEM. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; NS, not significant

kind of stimulation. Some cytokines and chemokines that were determined but were absent were CCL11 (eotaxin), IFN- $\alpha$ , IL-7, IL-15, IL-12p70, IL-23, IL-27, and IL-31.

In our culture conditions, stimulation with anti-CD3/CD28/CD2 coated beads induced the production of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines, and so it did not correspond to polarization toward a particular effector phenotype. In our culture conditions, IL-2, which was expected to be present in the CMs from anti-CD3/CD28/CD2 stimulated cells, was found only at moderate concentrations (3.3—10.33 pg/ml). A low concentration of IL-2 in the TCR-CM could be due to the rapid consumption of this cytokine under optimal activation and proliferation of cells. In these conditions, higher concentrations of IL-2 would not be available for bystander resting cells. Indeed, consumption of IL-2 by activated cells involved in the immune response may be a general effect that would reduce the availability of this cytokine for bystander stimulation.

Regarding the stimulation of PBMC with LPS, cytokines and chemokines such as IFN- $\gamma$ , IL-23, IL-18, and CXCL10 (IP-10), which have been reported to be produced upon LPS activation of PBMC [38][38], were absent with our culture conditions.

A great variability of levels of cytokines and chemokines was observed between donors, so it was decided to pool them for incubation with resting memory CD4 T cells.

It can be observed that IL-6, IL-1RA, CCL4 (MIP-1 $\beta$ ), CXCL8 (IL-8), CCL2 (MCP-1), and CXCL12 (SDF-1 $\alpha$ ) were the most abundant cytokines and chemokines in both CMs, being in the nanogram range. Differences can be noted in both the concentration and type of cytokines and chemokines produced by PBMC stimulated through the TLR4 or TCR. Activation of PBMC with anti-CD3/CD28/CD2 induced the production of all the cytokines and chemokines shown in Table 1, whereas the activation with LPS did not induce IFN- $\gamma$ , IL-9, IL-21, IL-17A, IL-18, IL-22, and IL-4. IL-13 was detected only in one donor in the TLR4-CM (3.86 pg/ml),

and low concentrations (0.26—1.05 pg/ml) of CXCL10 were found compared to the TCR-CM (242.54—1395.53 pg/ml). Low concentrations of IL-4 were found in the TCR-CM from two donors (1.90 and 5.43 pg/ml).

### Soluble factors from TLR4-stimulation, but not from TCR-stimulation, promote the expression of CD3 and CD4

Next, we analyzed the expression of the surface molecules CD3 and CD4 (Fig. 3). Both molecules participate during the T cell activation upon engagement of the TCR by p-MHC. The CD3 molecule is required for intracellular signaling and assembly and transport of the TCR-CD3 complex to the surface. The CD4 molecule is the co-receptor in MHC class II-restricted T-cell activation. It is well established that CD3 is rapidly internalized after stimulation by the TCR and is slowly re-expressed on the cell surface [40], whereas the expression of CD4 increases after 3–4 days [41].

Accordingly, Fig. 3C and E shows that control cells activated canonically (directly through the TCR) downregulated the expression of CD3 at day 2 ( $I/I_2$  of 0.63) and was slowly re-expressed ( $I/I_2$  of 1.02 after 8 days of TCR activation), whereas CD4 was continuously upregulated until the 8 days ( $I/I_2$  of 1.40 after 8 days of TCR activation). So, it can be assured that CD3 and CD4 expression upon activation agrees with expectations in our culture conditions.

In the presence of the TLR4-CM, the expression of CD3 increased at day 2 ( $I/I_2$  of 1.29 for 1 ng/ml of IL-15 and 1.68 for 10 ng/ml of IL-15) and was maintained up to 8 days ( $I/I_2$  of 1.18 for 1 ng/ml of IL-15 and 1.12 for 10 ng/ml of IL-15). The expression of CD3 in cells incubated with IL-15 alone or TCR-CM plus IL-15 was enhanced at day 2 and returned to basal levels at day 8. Thus, TLR4-CM favored a higher expression of CD3 longer than TCR-CM or IL-15 alone.

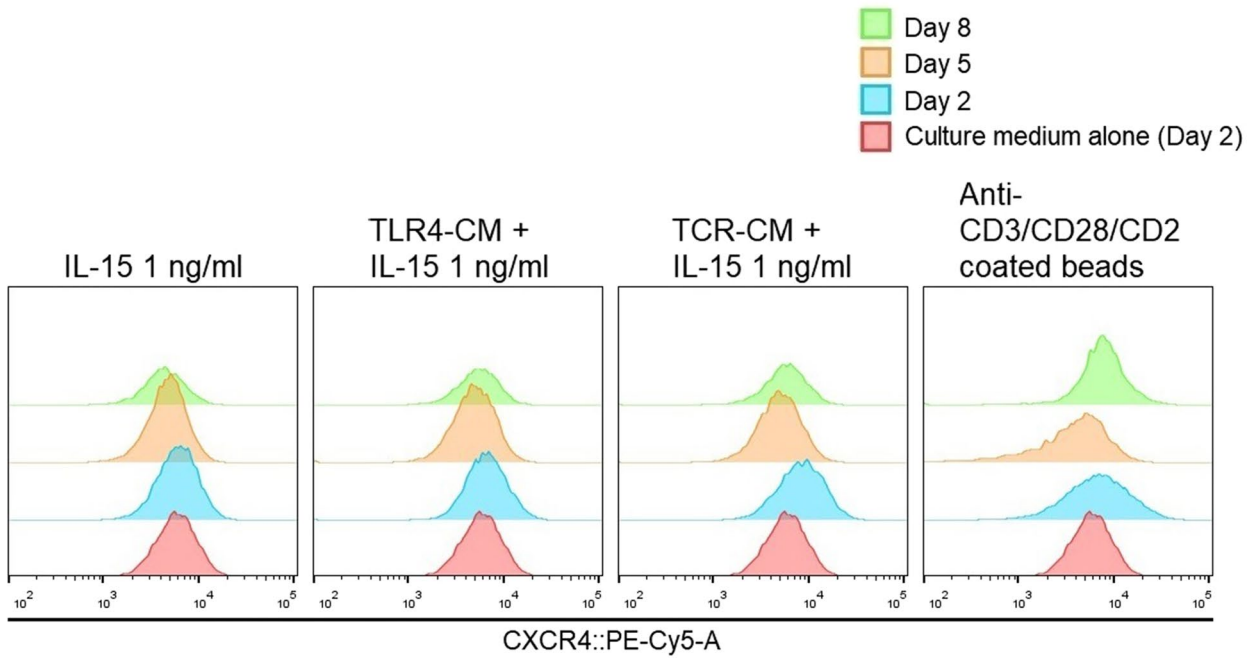
Like CD3, the TLR4-CM plus IL-15 condition favored a high expression of CD4 for 8 days ( $I/I_2$  of 0.85 and 0.88 in the presence of 1 and 10 ng/ml of IL-15, respectively), while the TCR-CM did not have any effect (Fig. 3B and D). The expression of CD4 was downregulated in culture medium alone ( $I/I_2$  of 0.88 after 5 days of culture and 0.78 after 8 days) or in the presence of IL-15 ( $I/I_2$  of 0.74 and 0.75 after 8 days of culture in the presence of 1 and 10 ng/ml of IL-15, respectively), even when the viability was high in these conditions (Fig. 1).

### Expression of CD45RO and CCR5 is sustained by soluble factors from TLR4-stimulation and TCR-stimulation

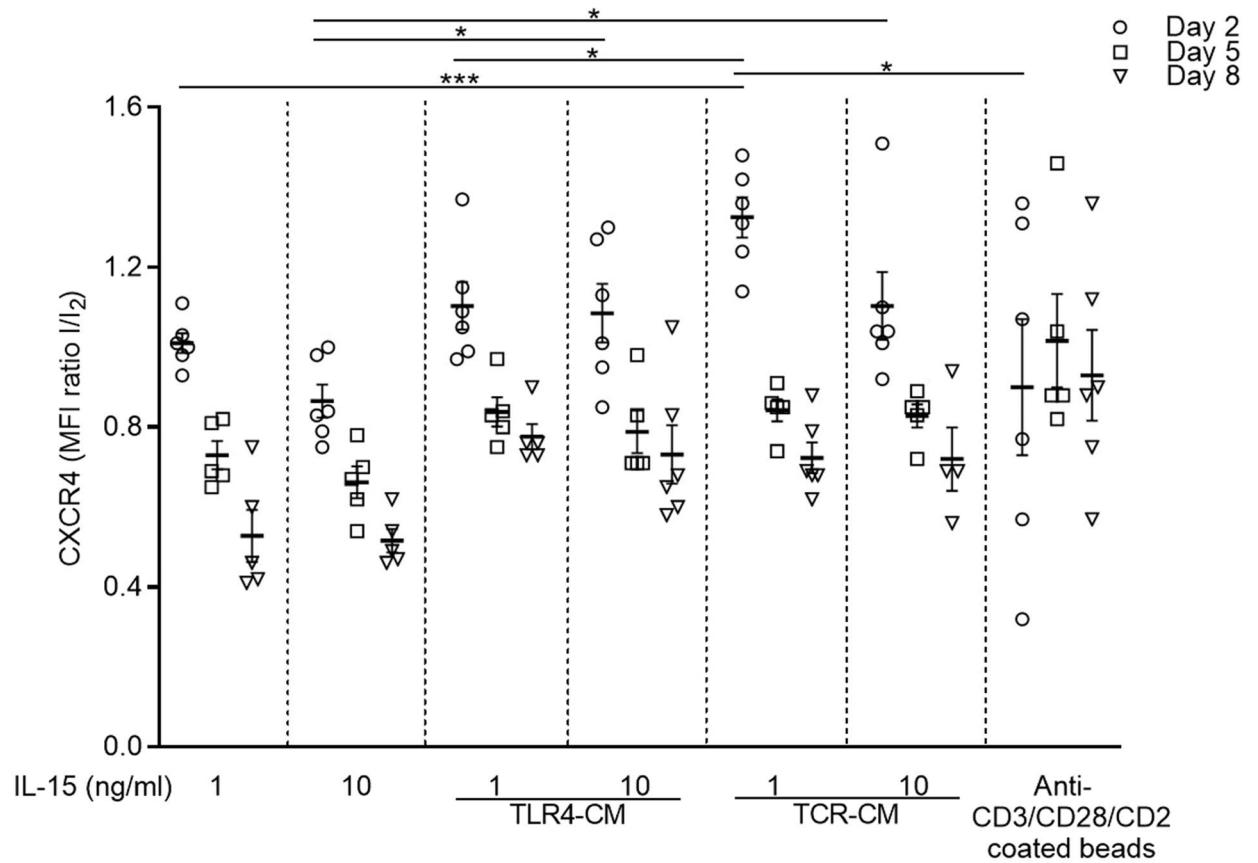
The CD45RO isoform is a phosphatase that participates in intracellular signaling during the T cell activation. CCR5 is the receptor for the CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ), CCL4 (MIP-1 $\beta$ ), CCL3L1, and CCL5 (RANTES) chemokines. Both CD45RO

A)

**CXCR4 EXPRESSION**



B)





**Fig. 5** The expression of CXCR4 is increased by the CMs from TLR4-stimulated or TCR-activated PBMC. Resting memory CD4 T cells were cultured in AIM V medium containing 5% of hAB serum, adding 1 or 10 ng/ml of IL-15 and in the absence or presence of TLR4-CM or TCR-CM, as indicated, during 2, 5, or 8 days. CMs from PBMC stimulated with LPS (TLR4-CM) or anti-CD3/CD28/CD2 coated beads (TCR-CM) were added at day of seeding. **(A)** Representative histograms of the expression of CXCR4 of viable cells at different culture conditions during different days, as indicated. **(B)** The expression of CXCR4 was increased at day 2 by both CMs but not by IL-15 alone. Expression decreased at day 5 and 8 of culture, but it remained higher than their respective control of IL-15 alone. The fold change for the expression of CXCR4 was normalized respectively to the expression at day 2 of culture with medium alone ( $I/I_2$ ). Each dot represents one donor. Error bars represent SEM. \* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$

and CCR5 were well expressed by resting memory CD4 T cells, as shown in Fig. 4A. In our culture conditions, the expression of CD45RO increased after the direct stimulation of PBMC with anti-CD3/CD28/CD2 ( $I/I_2$  of 1.76 after 2 days of TCR activation) and was maintained at this level during the 8 days of culture ( $I/I_2$  of 1.77) (Fig. 4C). Both TLR4-CM and TCR-CM slightly increased the expression of CD45RO at day 2 and maintained it stable during the culture time (Fig. 4B). Similarly, CCR5 was increased after stimulation through the TCR ( $I/I_2$  of 1.44 after 2 days of TCR activation) and maintained the expression during the culture time ( $I/I_2$  of 1.54 after 8 days of TCR activation) (Fig. 4E). The expression of CD45RO and CCR5 decreased throughout the culture time in the presence of IL-15 only ( $I/I_2$  of 0.81 for 1 ng/ml of IL-15 and 0.74 for 10 ng/ml of IL-15 after 8 days of culture). It can be observed, instead, that TLR4-CM and TCR-CM maintained the expression of these receptors at moderate levels ( $I/I_2$  of 0.93 for TLR4-CM plus 1 ng/ml of IL-15 and 0.87 for TCR-CM plus 1 ng/ml of IL-15 after 8 days of culture).

### Soluble factors from TLR4-stimulation and TCR-stimulation increase the expression of CXCR4

CXCR4 is the receptor for CXCL12 and is expressed constitutively on the surface of CD4 T cells. After direct activation of cells with anti-CD3/CD28/CD2 coated beads, the expression of CXCR4 was maintained through the culture time ( $I/I_2$  of 0.90, 1.02, and 0.93 after 2, 5, and 8 days of TCR activation) (Fig. 5). As observed for CD3, CD4, CD45RO, and CCR5, the expression of resting memory CD4 T markers decreased throughout the culture time in the presence of IL-15 alone. CXCR4 decreased similarly in this condition. However, both CMs increased the expression of this marker ( $I/I_2$  of 1.10 and 1.32 for TLR4-CM and TCR-CM plus 1 ng/ml of IL-15, after 2 days of culture) compared with IL-15 alone ( $I/I_2$  of 1.01 with 1 ng/ml of IL-15 after

2 days of culture). The TCR-CM promoted the expression of CXCR4 significantly through the culture time, being the greatest effect observed in the presence of 1 ng/ml of IL-15 at day 2 ( $I/I_2$  of 1.32). After two days, the expression of this receptor decreased, although it remained significantly higher ( $I/I_2$  of 0.72 after 8 days of culture) than that of cells cultured with IL-15 alone ( $I/I_2$  of 0.53 after 8 days of culture). For the TLR4-CM, a significant effect was observed at day 2 only in the presence of 10 ng/ml of IL-15 ( $I/I_2$  of 1.08) compared with IL-15 alone ( $I/I_2$  of 0.87). Like the effect observed with the TCR-CM, CXCR4 expression induced by the TLR4-CM decreased at day 8 but remained significantly higher than the expression induced by IL-15 alone ( $I/I_2$  of 0.78 and 0.73 for TLR4-CM plus 1 and 10 ng/ml of IL-15, respectively, and 0.53 and 0.52 for 1 and 10 ng/ml of IL-15 alone after 8 days of culture) (Fig. 5B).

### CD25 expression is detectable after exposure to soluble factors from TCR-stimulation

T cell activation through the TCR induces the expression of well-characterized markers such as CD25 [42]. This molecule is the high affinity alpha subunit of the IL-2 receptor. The direct activation of memory CD4 T cells through the TCR induced a strong expression of CD25 in our culture conditions (86.77% of CD25<sup>+</sup> T cells and  $I/I_2$  of 28.26 after 5 days of TCR activation) (Fig. 6C and E).

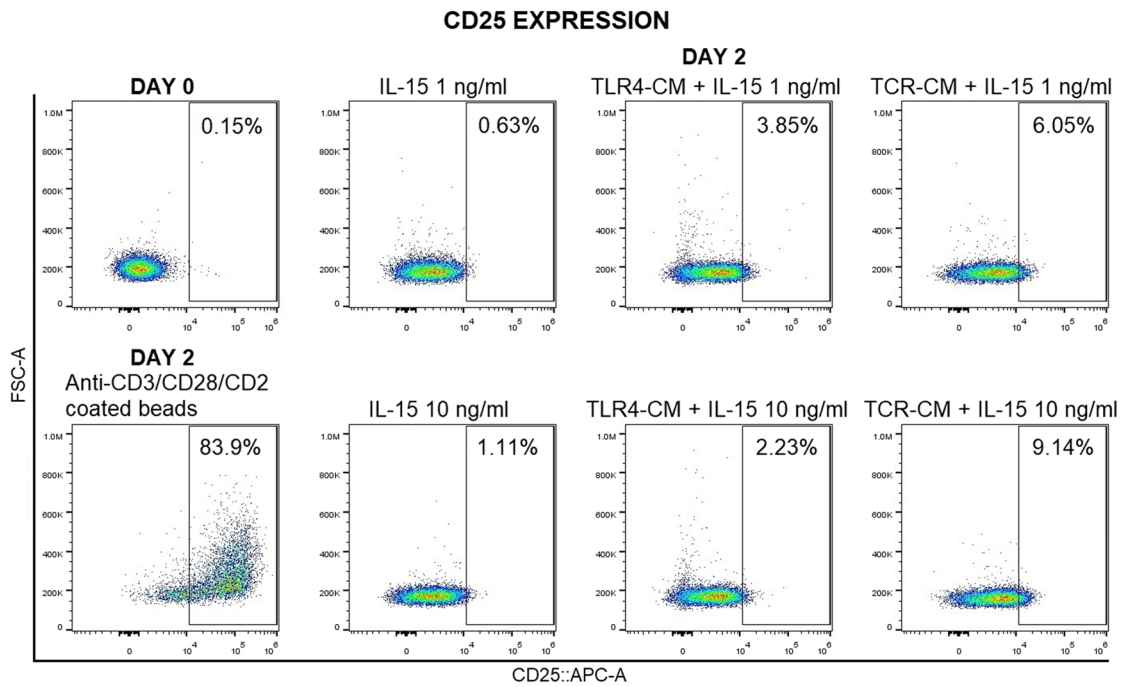
CMs increased the percentage of CD25<sup>+</sup> memory CD4 T cells, although their effect was moderate compared with the levels induced by direct activation through the TCR (3.54% and 4.59% of CD25<sup>+</sup> memory CD4 T cells for TLR4-CM and TCR-CM plus 10 ng/ml of IL-15, respectively, after 2 days of culture) (Fig. 6B and C). The increase of CD25 induced by the TCR-CM was significant at day 2 of incubation in the presence of 1 or 10 ng/ml of IL-15 (4.06% and 4.59%, respectively), respective to cells culture with IL-15 alone (1.78% and 2.58% for 1 and 10 ng/ml, respectively).

Expression of the activation and proliferation markers CD54 and Ki67 were well expressed by cells activated directly through the TCR (86.6% and  $I/I_2$  of 18.7 for CD54, and 62.1% and  $I/I_2$  of 18.6 for Ki67 after 5 days of TCR activation), but not in the presence of CMs at the same culture conditions in parallel experiments (Supplementary information).

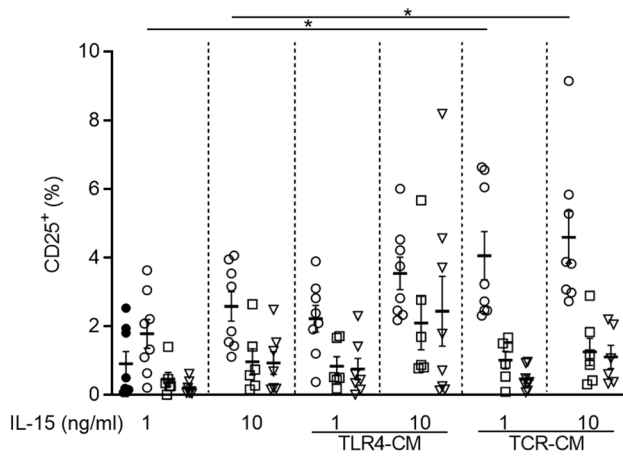
## Discussion

The immune response to protein antigens or PAMPs produces the release of soluble factors supporting the activation and proliferation of antigen-specific lymphocytes; such factors also reach non-antigen specific resting cells and may have a role in their homeostasis, partial activation, or

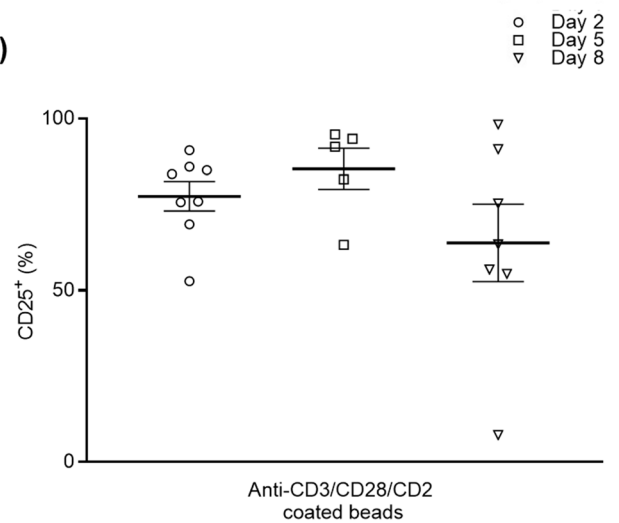
A)



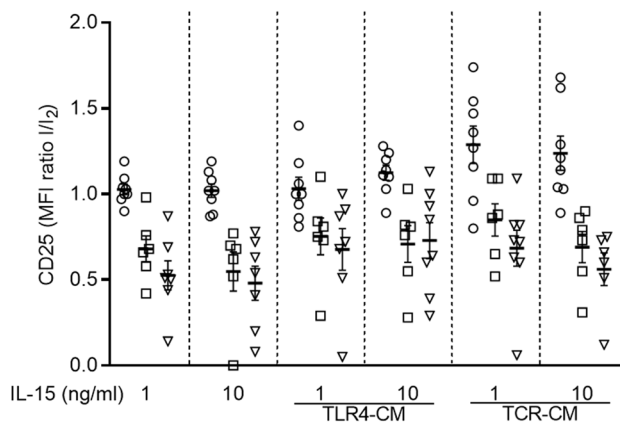
B)



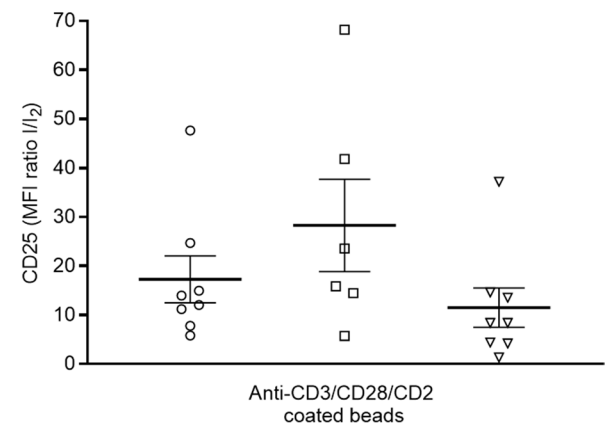
C)



D)



E)



**Fig. 6** The percentage of CD25<sup>+</sup> memory CD4 T cells increase in the presence of the TCR-CM. Resting memory CD4 T cells were cultured in AIM V medium containing 5% of hAB serum, adding 1 or 10 ng/ml of IL-15 and in the absence or presence of TLR4-CM or TCR-CM, as indicated, during 2, 5, or 8 days. CMs from PBMC stimulated with LPS (TLR4-CM) or anti-CD3/CD28/CD2 coated beads (TCR-CM) were added at day of seeding. **(A)** Representative plots of the FSC vs CD25 of viable cells at different culture conditions. **(B)** The percentage of CD25<sup>+</sup> memory CD4 T cells increased with the TCR-CM at day 2. **(D)** The mean fluorescence intensity of CD25 tended to increase with the TCR-CM at day 2. **(C)** Percentage and **(E)** mean fluorescence intensity of CD25 in cells activated through the TCR (with anti-CD3/CD28/CD2 coated beads) in control experiments. The fold change of expression was normalized respective to the expression at day 2 of culture with medium alone ( $I/I_2$ ). Each dot represents one donor. Error bars represent SEM. \* $p < 0.05$

induction of effector functions (for a review see [28, 43]. It can be assumed that the type and extension of this bystander stimulation are variable, depending on the type and amount of the soluble factors released from activated cells. Here, we analyzed the effect of soluble factors derived from activated cells on resting memory CD4 T cells in vitro. Analysis has been performed under conditions minimizing confounding effects, such as the presence of FBS, large quantities of cytokines, and the presence of vesicles and debris from activated cells (Fig. 2). Human resting memory CD4 T cells were cultured in a fetal serum-free medium containing IL-15 and 5% of human adult serum. These conditions allowed the activation by anti-CD3/CD28/CD2 antibodies, as determined by the high expression of the activation (CD25 and CD54) and proliferation (Ki67) markers, as well as the expression of the chemokine receptors CCR5 and CXCR4; so, culture conditions were suitable for activation. In parallel, purified resting, non-activated, memory CD4 T cells were exposed to conditioned medium (CM) collected from cultures of PBMC activated through TLR4 or the TCR. The concentrations of cytokines, except IL-6, were mostly in the range of picograms, whereas some chemokines were produced in nanogram concentrations (CCL4 (MIP-1 $\beta$ ), CXCL8 (IL-8), CCL2 (MCP-1), and CXCL12 (SDF-1 $\alpha$ )).

In contrast with some reports in the literature using particular cytokines to stimulate resting T cells, we did not observe a relevant induction of activation or proliferation markers upon exposure to the supernatants (Fig. 6 and Supplementary information). This may be related to lower concentrations of cytokines and chemokines produced by activated cells compared to the concentration of cytokines added in other studies. The previous observation that resting cells are responsive to high concentrations of cytokines by proliferating and expressing activation phenotypes shows that cells have indeed the capacity to be activated in an antigen non-specific manner. However, the significance of this capacity for the cell function may be hard to assess due

to the difficulty to reach high concentration of cytokines in vivo. Our results indicate that the concentrations of cytokines or chemokines produced by other activated cells do not activate resting memory T cells. Instead, these factors can stabilize (CD3, CD4, CD45RO, and CCR5) (Figs. 3 and 4) or increase (CXCR4) (Fig. 5) the expression of receptors relevant for the immune response in memory CD4 T cells. Thus, cytokines and chemokines produced by activated cells contribute to the stability of the resting phenotype in vitro. In addition, the increase of the CXCR4 expression suggests that soluble factors from activated cells may promote the migration capability of resting memory T cells. The profile of CXCR4 expression in histograms do not indicate a marked heterogeneity upon exposure to the TCR and TLR4 supernatants (Fig. 5), suggesting that the expression of CXCR4 increases in all the cell subtypes (central and effector memory); however, a more extensive characterization of the cell phenotype is necessary to determine its role in cell function.

It was shown that the presence of soluble factors from TLR4-stimulated cells do not affect cell viability in the presence of IL-15 (Fig. 1A). Consistently, the TLR4-CM allowed the stability of phenotypic markers (such as CD4 and CCR5) during 8 days of culture, and the expression of CD3 and CD45RO was increased at day 2 of culture and was maintained up to 8 days (Figs. 3 and 4). In contrast, the TCR-CM decreased cell viability, even in the presence of IL-15, and was unable to maintain the CD4 and CD3 expression, although it supported stable levels of CD45RO and CCR5. Notably, even when CXCR4 is expressed constitutively by memory CD4 T cells, both TLR4-CM and TCR-CM increased the expression of this molecule at day 2 (although it decreased later, its expression was still higher than in the presence of IL-15 alone). CXCR4 and its ligand CXCL12 (SDF-1) are involved in many functions like regulation of mature lymphocyte trafficking within secondary lymphoid tissue and retention of cells in the bone marrow for self-renewal, thus controlling distribution of myeloid and lymphoid lineages by regulating homing to and egress from bone marrow ([44] and references therein; for a review see [45]). In addition, it has been described that CXCL12-CXCR4 interaction favors survival and priming of T cells [46]. CXCR4 is downregulated by activation through the TCR, polyclonal stimulation, CXCL12 interaction, and IFN- $\gamma$ , whereas IL-2, IL-4, IL-7, and IL-15 upregulate its expression. Thus, cytokines and chemokines produced by activated cells may favor the stability of the cell phenotype in resting cells and increase their migration capability and survival through CXCR4 expression. Under inflammatory pathologies, like human immunodeficiency virus (HIV) infection, an increase of the expression of CXCR4 may be relevant, since immune activation correlates with and predicts the appearance of CXCR4-tropic strains and disease progression [47].

The possibility that residual LPS could promote the expression of CD3 and CD4 on resting cells can be discarded since vast information from the literature has reported the lack of functional TLR4 on human resting memory CD4 T cells from healthy donors. Functional TLR4 on CD4 T cells has been reported only in TCR-activated, Treg effector cells, during inflammatory diseases [48–53]. The possible participation of Treg in our experiments was discarded since CD25<sup>+</sup> cells were not detected in recently purified cells (Fig. 6B), while it was expressed upon activation through the TCR in control experiments (Fig. 6D). Caron et al., 2005 proposed that LPS do not affect human CD4 T cells probably due to (1) the absence of accessory molecules on T cells (such as CD14) that belongs to the LPS-receptor complex, (2) the intracellular localization of the TLR proteins, which can be modified for expression on the cell membrane upon activation or, (3) the absence of TLR proteins in the cell [49]. So, current evidence and our own observations (lack of Ki67 expression upon exposure to supernatants) did not support a direct effect of LPS on resting T CD4<sup>+</sup> memory cells from healthy individuals. Thorough absorption of LPS from supernatants was performed to remove high concentrations of this agent.

In this work, activation through the TCR was carried out in control experiments using anti-CD2 antibodies in addition to anti-CD3 and anti-CD28 antibodies. CD2 is a costimulatory receptor expressed mainly in T and NK cells that bind to LFA-3, a cell surface protein expressed on APCs at the immunological synapse. CD2 influences the rearrangement of the actin cytoskeleton, cell signaling, and T cell survival (for a review [54]). Thus, participation of CD2 in activation through the TCR is important for optimal activation. The use of anti-CD2 antibodies may explain differences in the concentration of the soluble factors in our supernatants compared to the activation with only anti-CD3 and anti-CD28 antibodies [55].

The identity of the factors responsible for the observed effects was not determined. Our results may reflect the combined effect and relative concentrations of diverse components. PBMC were activated for 24 h for obtaining the TLR4-CM and 3 days for TCR-CM. These activation times were chosen based on what is commonly described in the literature [38, 55, 56]. However, other activation times can be explored.

Our results agree with the view that a proinflammatory milieu mediated by TLR4 contributes to the homeostatic maintenance of bystander resting memory T cells [22–25], but not necessarily activates them in the absence of their cognate antigen. On the other hand, our observations that soluble factors released by cells activated through the TCR induce a decreased survival of bystander resting cells and an increase of CXCR4 expression agree with the view of the generation of “immunological space” for the

proliferation of antigen-specific T cells [27, 31, 57] and probably induce the returning of bystander cells to their niches for homeostatic renewal [44, 44].

It has been proposed that bystander activation of resting T cells is induced during an immune response [28, 43], and that it induces expression of activation markers and proliferation of human resting CD4 T cells in vitro [25, 27, 33–37]. These effects have been observed mainly in the presence of FBS and high concentrations of cytokines, which may overstimulate cells, complicating the interpretation of the observed changes. Instead of particular cytokines or chemokines, our culture conditions may represent more closely the combinations and concentrations of soluble factors released during an immune response.

In summary, our findings show that the long-term culture of human memory CD4 T cells in the absence of fetal bovine serum, combined with low concentrations of IL-15, is a suitable model for the study of activated cells. Conditioned medium from TCR and TLR4-activated PBMC stabilized the resting phenotype of memory cells, as determined by the expression of CD3, CD4, CD45RO, and CCR5. In addition, conditioned medium, mainly that from TCR-stimulated PBMC, promotes an increase of CXCR4 expression. Soluble factors produced by activated cells do not activate resting memory cells, as determined by the low or null induction of the expression of CD25, CD54, and the proliferation marker Ki67. Thus, the long-term analysis of resting memory T CD4<sup>+</sup> cells supports the proposal that soluble factors produced by cells during an immune response to viruses or bacteria may play a role as paracrine bystander stimulators, stabilizing the phenotype of resting cells while changing their migration capabilities. According to our observations, we propose that the term “bystander stimulation” is appropriate for the observed effects.

**Supplementary information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s12026-022-09345-1>.

**Acknowledgements** Buffy coats from healthy individuals were obtained through the Servicio de Medicina Transfusional from Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. We thank the LabNalCit-UNAM (CONACYT) for technical support in the acquisition of flow cytometry samples. We thank Dr. David Eduardo Meza Sánchez, from Red de Apoyo a la Investigación, UNAM, for his assistance in analyzing conditioned media using the Bio Plex 200 System and Bio-Plex Manager 6.1 software.

**Funding** Ruelas-Galindo is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México, through the 607520 scholarship. This work was supported by Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (grant UNAM-PAPIIT IN215820 to LH).



**Data availability** The datasets generated during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare no competing interests.

## References

1. Michie CA, McLean A, Alcock C, Beverley PC. Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms. *Nature*. 1992;360(6401):264–5. <https://doi.org/10.1038/360264a0>.
2. Boise LH, Minn AJ, June CH, Lindsten T, Thompson CB. Growth factors can enhance lymphocyte survival without committing the cell to undergo cell division. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(12):5491–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.12.5491>.
3. Vella A, Teague TK, Ihle J, Kappler J, Marrack P. Interleukin 4 (IL-4) or IL-7 prevents the death of resting T cells: stat6 is probably not required for the effect of IL-4. *J Exp Med*. 1997;186(2):325–30. <https://doi.org/10.1084/jem.186.2.325>.
4. Nakajima H, Shores EW, Noguchi M, Leonard WJ. The common cytokine receptor gamma chain plays an essential role in regulating lymphoid homeostasis. *J Exp Med*. 1997;185(2):189–95. <https://doi.org/10.1084/jem.185.2.189>.
5. Teague TK, Marrack P, Kappler JW, Vella AT. IL-6 rescues resting mouse T cells from apoptosis. *J Immunol*. 1997;158(12):5791–6.
6. Surh CD, Sprent J. Homeostasis of naive and memory T cells. *Immunity*. 2008;29(6):848–62. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.11.002>.
7. Chetoui N, Boisvert M, Gendron S, Aoudjit F. Interleukin-7 promotes the survival of human CD4+ effector/memory T cells by up-regulating Bcl-2 proteins and activating the JAK/STAT signaling pathway. *Immunology*. 2010;130(3):418–26. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03244.x>.
8. Litinova LS, Sokhnevich N, Gutsol AA, Kofanova KA. The influence of immunoregulatory cytokines IL-2, IL-7, and IL-15 upon activation, proliferation, and apoptosis of immune memory T-cells in vitro. *Cell and Tissue Biology*. 2013;7(6):539–44. <https://doi.org/10.1134/S1990519X13060072>.
9. Surh CD, Boyman O, Purton JF, Sprent J. Homeostasis of memory T cells. *Immunol Rev*. 2006;211:154–63. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2006.00401.x>.
10. van Leeuwen EM, Sprent J, Surh CD. Generation and maintenance of memory CD4(+) T cells. *Curr Opin Immunol*. 2009;21(2):167–72. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2009.02.005>.
11. Boyman O, Létourneau S, Krieg C, Sprent J. Homeostatic proliferation and survival of naive and memory T cells. *Eur J Immunol*. 2009;39(8):2088–94. <https://doi.org/10.1002/eji.200939444>.
12. Gasper DJ, Tejera MM, Suresh M. CD4 T-cell memory generation and maintenance. *Crit Rev Immunol*. 2014;34(2):121–46. <https://doi.org/10.1615/critrevimmunol.2014010373>.
13. Silva SL, Sousa AE. Establishment and maintenance of the human naive CD4+ T-cell compartment. *Front Pediatr*. 2016;31(4):119. <https://doi.org/10.3389/fped.2016.00119>.
14. Silva SL, Albuquerque AS, Matoso P, Charmeteau-de-Muylder B, Cheyner R, Ligeiro D, Abecasis M, Anjos R, Barata JT, Victorino RM, Sousa AE. IL-7-induced proliferation of human naive CD4 T-cells relies on continued thymic activity. *Front Immunol*. 2017;19(8):20. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00020>.
15. Link A, Vogt TK, Favre S, Britschgi MR, Acha-Orbea H, Hinz B, Cyster JG, Luther SA. Fibroblastic reticular cells in lymph nodes regulate the homeostasis of naive T cells. *Nat Immunol*. 2007;8(11):1255–65. <https://doi.org/10.1038/ni1513>.
16. Badolato R, Ponzi AN, Millesimo M, Notarangelo LD, Musso T. Interleukin-15 (IL-15) induces IL-8 and monocyte chemotactic protein 1 production in human monocytes. *Blood*. 1997;90(7):2804–9.
17. Fehniger TA, Caligiuri MA. Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood*. 2001;97(1):14–32. <https://doi.org/10.1182/blood.v97.1.14>.
18. Perera PY, Lichy JH, Waldmann TA, Perera LP. The role of interleukin-15 in inflammation and immune responses to infection: implications for its therapeutic use. *Microbes Infect*. 2012;14(3):247–61. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.10.006>.
19. Nolz JC, Richer MJ. Control of memory CD8+ T cell longevity and effector functions by IL-15. *Mol Immunol*. 2020;117:180–8. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2019.11.011>.
20. Mueller YM, Makar V, Bojczuk PM, Witek J, Katsikis PD. IL-15 enhances the function and inhibits CD95/Fas-induced apoptosis of human CD4+ and CD8+ effector-memory T cells. *Int Immunol*. 2003;15(1):49–58. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxg013>.
21. Oh S, Perera LP, Terabe M, Ni L, Waldmann TA, Berzofsky JA. IL-15 as a mediator of CD4+ help for CD8+ T cell longevity and avoidance of TRAIL-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(13):5201–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.080103105>.
22. Tough DF, Borrow P, Sprent J. Induction of bystander T cell proliferation by viruses and type I interferon in vivo. *Science*. 1996;272(5270):1947–50. <https://doi.org/10.1126/science.272.5270.1947>.
23. Zhang X, Sun S, Hwang I, Tough DF, Sprent J. Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8+ T cells in vivo by IL-15. *Immunity*. 1998;8(5):591–9. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80564-6](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80564-6).
24. Di Genova G, Roddick J, McNicholl F, Stevenson FK. Vaccination of human subjects expands both specific and bystander memory T cells but antibody production remains vaccine specific. *Blood*. 2006;107(7):2806–13. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-08-3255>.
25. Geginat J, Sallusto F, Lanzavecchia A. Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naive, central memory, and effector memory CD4(+) T cells. *J Exp Med*. 2001;194(12):1711–9. <https://doi.org/10.1084/jem.194.12.1711>.
26. Bangs SC, McMichael AJ, Xu XN. Bystander T cell activation—implications for HIV infection and other diseases. *Trends Immunol*. 2006;27(11):518–24. <https://doi.org/10.1016/j.it.2006.09.006>.
27. Bangs SC, Baban D, Cattan HJ, Li CK, McMichael AJ, Xu XN. Human CD4+ memory T cells are preferential targets for bystander activation and apoptosis. *J Immunol*. 2009;182(4):1962–71. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802596>.
28. Pacheco Y, Acosta-Ampudia Y, Monsalve DM, Chang C, Gershwin ME, Anaya JM. Bystander activation and autoimmunity. *J Autoimmun*. 2019;103:102301. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2019.06.012>.
29. Boyman O. Bystander activation of CD4+ T cells. *Eur J Immunol*. 2010;40(4):936–9. <https://doi.org/10.1002/eji.201040466>.
30. Slichter CK, McDavid A, Miller HW, Finak G, Seymour BJ, McNevin JP, Diaz G, Czartoski JL, McElrath MJ, Gottardo R, Prlic M. Distinct activation thresholds of human conventional and innate-like memory T cells. *JCI Insight*. 2016;1(8):e86292. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.86292>.
31. Sckisel GD, Mirsoian A, Minnar CM, Crittenden M, Curti B, Chen JQ, Blazar BR, Borowsky AD, Monjazebe AM, Murphy WJ. Differential phenotypes of memory CD4 and CD8 T cells in the spleen and peripheral tissues following immunostimulatory therapy. *J Immunother Cancer*. 2017;18(5):33. <https://doi.org/10.1186/s40425-017-0235-4>.

32. Whiteside SK, Snook JP, Ma Y, Sonderegger FL, Fisher C, Petersen C, Zachary JF, Round JL, Williams MA, Weis JJ. IL-10 deficiency reveals a role for TLR2-dependent bystander activation of T cells in lyme arthritis. *J Immunol*. 2018;200(4):1457–70. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701248>.
33. Unutmaz D, Pileri P, Abrignani S. Antigen-independent activation of naive and memory resting T cells by a cytokine combination. *J Exp Med*. 1994;180(3):1159–64. <https://doi.org/10.1084/jem.180.3.1159>.
34. Unutmaz D, Baldoni F, Abrignani S. Human naive T cells activated by cytokines differentiate into a split phenotype with functional features intermediate between naive and memory T cells. *Int Immunol*. 1995;7(9):1417–24. <https://doi.org/10.1093/intimm/7.9.1417>.
35. Kanegane H, Tosato G. Activation of naive and memory T cells by interleukin-15. *Blood*. 1996;88(1):230–5.
36. Sattler A, Wagner U, Rossol M, Sieper J, Wu P, Krause A, Schmidt WA, Radmer S, Kohler S, Romagnani C, Thiel A. Cytokine-induced human IFN-gamma-secreting effector-memory Th cells in chronic autoimmune inflammation. *Blood*. 2009;113(9):1948–56. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-139147>.
37. Munk RB, Sugiyama K, Ghosh P, Sasaki CY, Rezanka L, Banerjee K, Takahashi H, Sen R, Longo DL. Antigen-independent IFN- $\gamma$  production by human naive CD4 T cells activated by IL-12 plus IL-18. *PLoS ONE*. 2011;6(5):e18553. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018553>.
38. Luan L, Patil NK, Guo Y, Hernandez A, Bohannon JK, Fensterheim BA, Wang J, Xu Y, Enkhbaatar P, Stark R, Sherwood ER. Comparative transcriptome profiles of human blood in response to the Toll-like receptor 4 ligands lipopolysaccharide and monophosphoryl lipid A. *Sci Rep*. 2017;5(7):40050. <https://doi.org/10.1038/srep40050>.
39. El-Mezzein RE, Matsumoto T, Nomiya H, Miike T. Increased secretion of IL-18 in vitro by peripheral blood mononuclear cells of patients with bronchial asthma and atopic dermatitis. *Clin Exp Immunol*. 2001;126(2):193–8. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2001.01664.x>.
40. van der Donk LEH, Ates LS, van der Spek J, Tukker LM, Geijtenbeek TBH, van Heijst JWJ. Separate signaling events control TCR downregulation and T cell activation in primary human T cells. *Immun Inflamm Dis*. 2021;9(1):223–38. <https://doi.org/10.1002/iid3.383>.
41. Wieggers GJ, Stec IE, Klinkert WE, Reul JM. Glucocorticoids regulate TCR-induced elevation of CD4: functional implications. *J Immunol*. 2000;164(12):6213–20. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.12.6213>.
42. Rosenblum MD, Way SS, Abbas AK. Regulatory T cell memory. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(2):90–101. <https://doi.org/10.1038/nri.2015.1>.
43. Lee HG, Cho MZ, Choi JM. Bystander CD4+ T cells: crossroads between innate and adaptive immunity. *Exp Mol Med*. 2020;52(8):1255–63. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-00486-7>.
44. Liu Q, Li Z, Gao JL, Wan W, Ganesan S, McDermott DH, Murphy PM. CXCR4 antagonist AMD3100 redistributes leukocytes from primary immune organs to secondary immune organs, lung, and blood in mice. *Eur J Immunol*. 2015;45(6):1855–67. <https://doi.org/10.1002/eji.201445245>.
45. Pabst R. The bone marrow is not only a primary lymphoid organ: the critical role for T lymphocyte migration and housing of long-term memory plasma cells. *Eur J Immunol*. 2018;48(7):1096–100. <https://doi.org/10.1002/eji.201747392>.
46. Suzuki Y, Rahman M, Mitsuya H. Diverse transcriptional response of CD4+ T cells to stromal cell-derived factor SDF-1: cell survival promotion and priming effects of SDF-1 on CD4+ T cells. *J Immunol*. 2001;167(6):3064–73. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.6.3064>.
47. Connell BJ, Hermans LE, Wensing AMJ, Schellens I, Schipper PJ, van Ham PM, de Jong DTCM, Otto S, Mathe T, Moraba R, Borghans JAM, Papatheanasopoulos MA, Kruijze Z, Venter FWD, Kootstra NA, Tempelman H, Tesselaar K, Nijhuis M. Immune activation correlates with and predicts CXCR4 co-receptor tropism switch in HIV-1 infection. *Sci Rep*. 2020;10(1):15866. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71699-z>.
48. Komai-Koma M, Jones L, Ogg GS, Xu D, Liew FY. TLR2 is expressed on activated T cells as a costimulatory receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(9):3029–34. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400171101>.
49. Caron G, Duluc D, Frémaux I, Jeannin P, David C, Gascan H, Delneste Y. Direct stimulation of human T cells via TLR5 and TLR7/8: flagellin and R-848 up-regulate proliferation and IFN-gamma production by memory CD4+ T cells. *J Immunol*. 2005;175(3):1551–7. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.3.1551>.
50. Lewkowicz P, Lewkowicz N, Sasiak A, Tchórzewski H. Lipopolysaccharide-activated CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit neutrophil function and promote their apoptosis and death. *J Immunol*. 2006;177(10):7155–63. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.10.7155>.
51. Pace E, Di Sano C, Ferraro M, Bruno A, Caputo V, Gallina S, Gjomarkaj M. Budesonide increases TLR4 and TLR2 expression in Treg lymphocytes of allergic asthmatics. *Pulm Pharmacol Ther*. 2015;32:93–100. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2015.02.003>.
52. Hao Y, Li H, Li Y, Lyu M, Zhang D, Fu R, Guan Y, Wang S, Sun B, Dou X, Yang R. Decreased TLR4 expression on monocytes may cause regulatory T cells abnormality in patients with primary immune thrombocytopenia. *Autoimmunity*. 2017;50(5):283–92. <https://doi.org/10.1080/08916934.2017.1309034>.
53. Castro C, Oyamada HAA, Cafasso MOSD, Lopes LM, Monteiro C, Sacramento PM, Alves-Leon SV, da Fontoura GG, Hygino J, de Souza JPBM, Bento CAM. Elevated proportion of TLR2- and TLR4-expressing Th17-like cells and activated memory B cells was associated with clinical activity of cerebral cavernous malformations. *J Neuroinflammation*. 2022;19(1):28. <https://doi.org/10.1186/s12974-022-02385-2>.
54. Binder C, Cvetkovski F, Sellberg F, Berg S, Paternina Visbal H, Sachs DH, Berglund E, Berglund D. CD2 immunobiology. *Front Immunol*. 2020;9(11):1090. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01090>.
55. Harris KM, Lenz P, Hankey KG, MacVittie T, Farese A, Nakajima K, Hasumi K, Mann DL. Products of anti-CD3/anti-CD28 activated lymphocytes induce differentiation and maturation of dendritic cells and have adjuvant-like activity in vitro and in vivo. *Clin Immunol*. 2008;129(1):58–68. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2008.06.003>.
56. Ibrahim JN, Jounblat R, Delwail A, Abou-Ghoch J, Salem N, Chouery E, Megarbane A, Medlej-Hashim M, Lecron JC. Ex vivo PBMC cytokine profile in familial Mediterranean fever patients: involvement of IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$  and Th17-associated cytokines and decrease of Th1 and Th2 cytokines. *Cytokine*. 2014;69(2):248–54. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2014.06.012>.
57. Serbanescu MA, Ramonell KM, Hadley A, Margoles LM, Mittal R, Lyons JD, Liang Z, Coopersmith CM, Ford ML, McConnell KW. Attrition of memory CD8 T cells during sepsis requires LFA-1. *J Leukoc Biol*. 2016;100(5):1167–80. <https://doi.org/10.1189/jlb.4A1215-563RR>.

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.