



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

FUSION CELULAR MEDIADA POR LAS PROTEINAS DE  
ENVOLTURA DEL VIH: DEPENDENCIA DEL CORRECEPTOR  
CXCR4 Y DEL NIVEL DE EXPRESION DEL COMPLEJO  
gp 120/gp41

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**QUIMICA FARMACEUTICO BIOLOGA**

**P R E S E N T A**

**EVELYN RIVERA TOLEDO**



MEXICO, D.F.



2004

EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## Jurado Asignado

Presidente	Prof. Fernando García Tamayo
Vocal	Prof. Mónica Berenice Heras Chavarría
Secretario	Prof. Leonor Huerta Hernández
1er. Suplente	Prof. Sonia Mayra Pérez Tapia
2do. Suplente	Prof. Rocío G. Tirado Mendoza

Instituto de Investigaciones Biomédicas, Departamento de  
Inmunología, UNAM



Leonor Huerta Hernández  
Asesor



---

Evelyn Rivera Toledo  
Sustentante

*“Mi filosofía sale del corazón y no de la inteligencia; por eso, digamos, me rindo ante el sentimiento de Eternidad que brota espontáneamente a la cabecera de un hijo querido a punto de exhalar su último suspiro. En esos momentos supremos, en lo profundo de nuestra alma, presentimos que el mundo debe ser algo más que una mera combinación de sucesos debida a un equilibrio mecánico, surgido simplemente del caos de los elementos por una acción gradual de las fuerzas de la materia”.*

Luis Pasteur

## AGRADECIMIENTOS

Con este trabajo quiero agradecer:

A mis padres todo el amor y la paciencia que me brindan constantemente, así como sus esfuerzos realizados para mi formación académica.

A mis hermanos Martín, Rosa, Angélica, Javier, Mario, así como a Margarita por brindarme su apoyo incondicional y momentos incontables de alegría.

A mis tíos, quienes siempre se han preocupado por mí.

A mis amigos, Jay, Manuel, Mariana, Karen, Gina, Miguel Angel, Carlos, Arturo, Sandra, Laura, Paola, Silvia, Mirna, Lore, Gaby, Christian, Mayra, quienes me han dado ánimo, su amistad y todo su apoyo en los momentos difíciles.

A la Hna. Carmen Jiménez por sus buenos consejos.

Al maestro Alfonso Lira por su apoyo.

A mis compañeros del laboratorio por su amistad y consejos.

A Leonor Huerta por dirigir el desarrollo de éste trabajo.

Al Dr. Carlos Larralde por su asesoramiento y apoyo.

También agradezco al Dr. Jorge Sepúlveda del Instituto de Fisiología Celular por su apoyo en microscopía de barrido y al QFB Víctor Hugo Rosales del CINVESTAV por su apoyo para el uso de citómetro de flujo.

A CONACYT por la beca otorgada en el proyecto 40413.

A Tí Dios porque me has permitido concluir con éste trabajo y por haber puesto en mi camino a todas las personas que he mencionado.

## ABREVIATURAS

**Env** Proteínas de envoltura viral gp120/gp41

**VIH** Virus de Inmunodeficiencia Humana

**SIDA** Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

**IFI** Inmunofluorescencia Indirecta

**IS** Inductor de Sincicios

**NIS** No Inductor de Sincicios

**FITC** Isotiocianato de Fluoresceína

**FACS** Fluorescent Activated Cell Sorter (Separación de células activadas por fluorescencia)

**DiO** Perclorato de 3,3'-dioctadeciloxacarbocianina

**Dil** Perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina

## CONTENIDO

	Página
I. RESUMEN .....	1
II. INTRODUCCIÓN.....	3
2.1 Generalidades.....	3
2.2 Mecanismo de infección viral .....	4
2.3 Estructura y función de las proteínas de fusión del VIH.....	5
2.4 Dependencia con otros receptores para fusión .....	6
2.5 Importancia de la fusión celular en la disminución de células CD4+.....	9
2.6 Citometría de flujo aplicada a la cuantificación de la fusión celular.....	10
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	13
IV. OBJETIVOS.....	14
V. METODOLOGÍA.....	15
5.1 Cultivo celular.....	15
5.2 Inducción de la expresión de proteínas de envoltura.....	15
5.3 Marcaje celular.....	16
5.4 Ensayo de fusión celular.....	18
5.5 Inhibición de la fusión por anticuerpos.....	18
5.5.1 Inhibición con 24 horas de inducción.....	18
5.5.2 Inhibición con 36 horas de inducción.....	19
5.5.3 Inhibición con 72 horas de inducción.....	19
5.6 Efecto sobre la fusión por tratamiento enzimático.....	20



5.7 Inmunofluorescencia indirecta para cuantificar la expresión de proteínas.....	20
5.8 Análisis por FACS.....	21
5.9 Microscopía de barrido.....	21
VI. RESULTADOS.....	23
6.1 Dependencia de la fusión con la expresión de Env.....	23
6.2 Efecto del tiempo de inducción sobre la fusión celular.....	25
6.3 Microscopía de barrido.....	27
6.4 Evaluación de la expresión del complejo gp120/gp41 por inmunofluorescencia indirecta (IFI).....	29
6.5 Dependencia del correceptor CXCR4.....	31
6.5.1 Efecto del anticuerpo monoclonal 12G5.....	31
6.5.2 Efecto de la hidrólisis del heparán y condroitín sulfato sobre la fusión.....	35
VII. DISCUSIÓN.....	41
7.1 Efecto del nivel de expresión del complejo gp120/gp41 sobre la fusión.....	41
7.2 Papel del correceptor CXCR4 en la fusión.....	43
VIII CONCLUSIONES.....	47
IX. APÉNDICE.....	48
X. BIBLIOGRAFÍA.....	52

## I. RESUMEN

Las células infectadas por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) expresan en su membrana las proteínas de la envoltura viral (gp120/gp41 ó Env), adquiriendo la capacidad de interactuar con células CD4+ no infectadas circundantes y de fusionarse con ellas. La fusión de membranas celulares tiene varias consecuencias de importancia en la patogénesis del SIDA: constituye un medio eficiente de transmisión del virus célula a célula, los sincicios formados por la fusión de múltiples células pueden funcionar como reservorio del virus, el daño a las células fusionadas es irreversible.

El estudio de la fusión celular se puede abordar mediante el uso de líneas celulares transfectadas con el gen *env* del VIH que expresan el complejo gp120/gp41, en cultivo con células CD4+ no transfectadas.

Con el propósito de examinar la función de los receptores específicos en el contexto de la membrana celular, en ésta tesis se examinó la relación entre la fusión celular y el nivel de expresión del complejo gp120/gp41, así como la dependencia de la fusión del receptor CXCR4 y de los proteoglicanos de membrana heparán y condroitín sulfato.

La fusión se cuantificó mediante un método novedoso que involucra el marcaje de las células participantes en la fusión con colorantes fluorescentes tipo carbocianina (DiI y DiO), los cuales emiten fluorescencia roja y verde respectivamente. Mediante citometría de flujo se cuantificó la población fusionada como el porcentaje de células con doble marca (verde y roja).

La expresión de las proteínas de envoltura de VIH sobre las células transfectadas se mostró a través de una inmunofluorescencia indirecta, donde había mayor fluorescencia en células transfectadas e inducidas durante tres días que en células no inducidas y en no transfectadas.

Los resultados de este trabajo demuestran que hay una correlación directa entre el nivel de expresión del complejo gp120/gp41 y el porcentaje de fusión celular, ya que entre mayor es el tiempo de inducción de las células transfectadas para la expresión de las proteínas virales, mayor es el nivel de células con fluorescencia mixta. Para evaluar la participación del receptor CXCR4 en la fusión, se utilizaron dos anticuerpos: el 12G5 dirigido contra el primero y segundo loop extracelular del receptor y el A145 dirigido contra el extremo amino terminal del mismo, siendo el primero el utilizado por excelencia dado su efecto de inhibición de la infección por el VIH. Las condiciones de incubación de las células con los anticuerpos fueron variables en temperatura, tiempo y concentración. En nuestros resultado obtuvimos que el anticuerpo 12G5 no tiene efecto negativo sobre la fusión, mientras que el anticuerpo A145 logró inhibir la población doble fluorescente hasta 37.3%, sugiriendo que la participación del correceptor CXCR4 no es tan importante cuando es alta la concentración de receptores primarios (gp120/CD4) y que posiblemente en nuestro modelo el extremo amino terminal del correceptor es el que interacciona con gp120 durante el proceso de fusión. Al hidrolizar enzimáticamente los proteoglicanos de la superficie de las células CD4+ y ponerlas en cocultivo con las células Env+, no se observó cambio en la fusión, sugiriendo que no participan en este proceso y que no ejercen un impedimento de tipo estérico sobre el correceptor CXCR4 para la unión con los anticuerpos 12G5 y A145.

Estas observaciones son consistentes con la hipótesis de que otras moléculas de la membrana celular, además de CXCR4, pueden participar en la interacción con las proteínas de la envoltura viral para mediar la fusión.

## II. INTRODUCCIÓN

### 2.1 Generalidades

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es un lentivirus de la familia de los retrovirus que provoca en los individuos infectados el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), descrito como entidad clínica por primera vez en California, EUA en 1981 (10). Debido a que no se conocían agentes que produjeran tales manifestaciones en humanos, se propuso como causa a una variante del virus de leucemia de células T humanas (HTLV), único retrovirus humano conocido con afinidad por los linfocitos T cooperadores, sin embargo, el HTLV producía inmortalización de las células, mientras que éste nuevo agente las destruía. Fue tres años más tarde cuando, investigadores de diferentes nacionalidades, entre ellos Montagnier y colaboradores, lograron aislar el virus causante de las inmunodeficiencias y en el año de 1986 en África se detectó una nueva cepa (VIH-2) que tenía tan solo un 40% de homología genética con el primer virus aislado (VIH-1), (15,23). Los pacientes infectados con esta nueva variante desarrollaban SIDA después de un período de latencia más prolongado, además de que los índices de morbilidad eran menores.

El VIH-1 es la variante de mayor frecuencia a nivel mundial y a pesar del tiempo transcurrido desde su descubrimiento y de la magnitud de esfuerzos de investigación, no se ha logrado encontrar un fármaco o una vacuna que sean eficaces para evitar que un paciente progrese a SIDA debido, entre otros factores, a la hipervariabilidad genética que presenta y a la variedad de desarreglos inmunológicos que ocasiona. Los pacientes tratados con algún fármaco después de cierto tiempo dejan de responder al efecto por lo que es necesario administrar un nuevo medicamento al que el virus no sea resistente, o bien dar terapia combinada con 3 o 4 fármacos, sin dejar de experimentar el individuo las

reacciones adversas de los mismos. En el caso de las vacunas ocurre el mismo problema, ya que los anticuerpos neutralizantes formados en respuesta al antígeno no serán efectivos para las nuevas variantes, que no solo difieren en antigenicidad, sino en patogenicidad. Esta situación hace necesario el entendimiento detallado de los procesos patológicos del VIH, así como de los procesos inmunológicos que desencadena en el huésped que puedan apoyar nuevas ideas para el diseño de agentes terapéuticos.

## **2.2 Mecanismo de infección viral**

La estructura del VIH, así como una descripción de su genoma y de las proteínas que codifica, se encuentran en el apéndice (pág. 48).

Las células susceptibles a la infección por VIH, son aquellas que expresan el receptor CD4 en su superficie; éste ha sido encontrado en diferentes poblaciones de leucocitos, como linfocitos T, linfocitos B, macrófagos, células dendríticas y epiteliales, sin embargo, son los linfocitos T, seguidos por los macrófagos quienes tienen mayor concentración en superficie (27), es por esto que en los pacientes infectados con este virus, se observa una disminución de linfocitos T que lleva a un estado de inmunodepresión.

Inicialmente, la partícula viral a través del complejo gp120/gp41 interacciona con el receptor CD4 de la célula huésped, esto desencadena el proceso de fusión de las membranas para que el complejo nucleoprotéico del VIH ingrese a la célula y su genoma, una vez transcrito a DNA de doble cadena por la transcriptasa reversa pueda incorporarse al genoma huésped (episoma). Es así como se expresan las proteínas necesarias para ensamblar una nueva progenie viral que es liberada por exocitosis (ver pág. 51 del apéndice) teniendo la oportunidad de infectar una nueva célula siempre y cuando su acción no sea neutralizada por anticuerpos específicos creados por el sistema

inmune. Una vez infectada, la célula comienza a expresar en su membrana el complejo gp120/gp41 que tiene la capacidad de fusionar células sanas que expresan el receptor CD4 y así infectarlas sin enfrentarse a la respuesta humoral del huésped, es decir, la formación de sincicios o células gigantes multinucleadas son una forma de evasión del sistema inmune por el VIH.

Se han encontrado células gigantes multinucleadas en el sistema nervioso central y ganglios linfáticos de pacientes infectados y experimentalmente se ha demostrado que los sincicios son viables por corto tiempo al desencadenarse procesos de apoptosis (25), por lo que se ha considerado como un mecanismo importante en la disminución de células CD4+, además, pacientes con variantes poco fusogénicas de VIH también sufren una pérdida importante de linfocitos T y se ha demostrado que se debe a la expresión de las proteínas de envoltura, por inducir eventos de fusión internos que conllevan a la lisis celular (7).

### **2.3 Estructura y función de las proteínas de fusión del VIH**

Las proteínas de envoltura son sintetizadas como un precursor (gp160) altamente glicosilado cuyo transporte a la superficie celular es ineficiente, por lo que es retenido en el retículo endoplásmico o degradado en los lisosomas (9), solo de un 5 a 15% del total es escindido en las subunidades gp120 (extracelular o ectodominio) y gp41 (transmembranal) que permanecen asociadas por interacciones no covalentes.

Dentro de la estructura de gp120 se distinguen tres regiones principales, amino terminal, central y carboxilo terminal separadas por dos regiones bisagra altamente conservadas. También se divide en 5 regiones de hipervariabilidad que estructuralmente forman horquillas o loops y 5 de mediana conservación que pueden tener conformación en hélice alfa o lámina beta plegada.

Gp41 también presenta 3 regiones: extracelular, transmembranal e intracelular. La región transmembranal se caracteriza por ser una secuencia de aminoácidos hidrofóbicos en hélice alfa. La región extracelular se encuentra en interacción con gp120 y cerca de la región N-terminal se encuentra el péptido de fusión, además, se distinguen dos regiones llamadas dominio N y dominio C .

El VIH interactúa a través de gp120 con el primer dominio de CD4 con una constante de disociación de  $4 \times 10^{-9} \text{M}$ , provocando una serie de cambios conformacionales que se caracterizan principalmente por el cambio de loop a hélice de los dominios N y C localizados en gp41 y su arreglo en trímeros (fig. 1), es decir, se asocian tres dominios N helicoidales que se anclan a la membrana del huésped por exposición del péptido de fusión y tres dominios C helicoidales que permanecen asociados a la membrana viral (11). Posteriormente se da un plegamiento de tal forma que el trímero de dominios C rodean al trímero de dominios N liberando a gp120 y acercando las dos membranas para que ocurra su fusión (53).

#### **2.4 Dependencia con otros receptores para la fusión**

En el mecanismo de fusión de membranas por VIH, no sólo participan gp120 y CD4, sino también otros receptores propios de la célula huésped como los correceptores asociados a proteínas G, de los cuales se han encontrado a CXCR4 y CCR5 como esenciales para la infección viral (50).

A través del uso de anticuerpos monoclonales se ha logrado determinar que el loop V3 de gp120 participa en la interacción con el correceptor y dependiendo de la secuencia de aminoácidos puede tener la capacidad de interactuar ya sea con CXCR4 o con CCR5, y ésta interacción es fuerte solo en presencia de CD4 (31).

El nivel de expresión de correceptores es diferente entre las poblaciones de leucocitos y se sabe que las células dendríticas y macrófagos tienen una mayor concentración de CCR5, mientras que las células T CD4+ nativas y en reposo expresan mayor cantidad de CXCR4 (27).

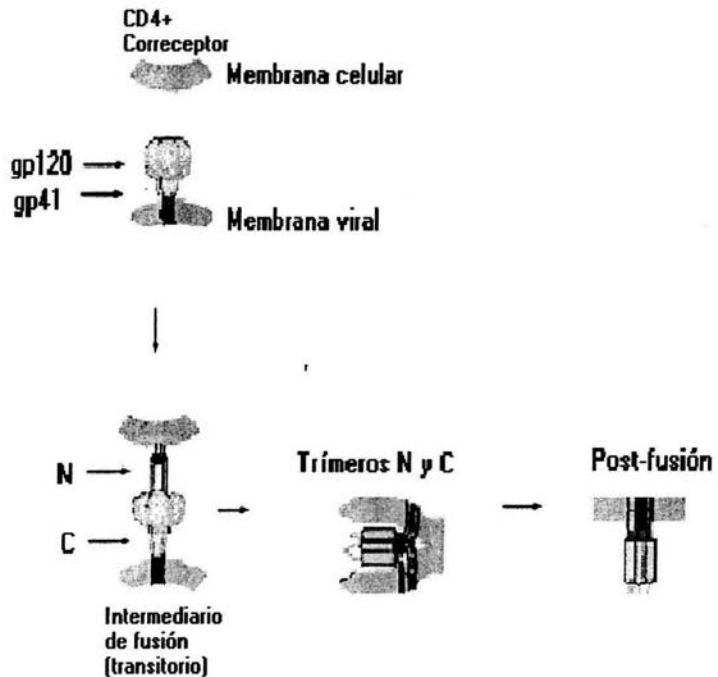


Figura 1. Cambio conformacional de loop a hélice de los dominios N y C de gp41. Se requiere que participen tres moléculas de complejo gp120/gp41 para que se forme el trímero de hélices. Una estructura intermedia transitoria de gp41 se encuentra anclada en ambas membranas y cambios posteriores en su conformación liberan gp120 para que se lleve a cabo el plegamiento necesario, de tal forma que se acerquen las dos membranas y ocurra la fusión.



Una vez que gp120 interacciona con CD4, a través de los cambios conformacionales, se expone el sitio de unión al correceptor y este complejo trimolecular conlleva al arreglo heterotrimérico de fusión (fig. 2). Pacientes que tienen defectos en el gen que expresa CCR5 muestran una fuerte resistencia a la infección, por lo tanto se ha sugerido que los virus con tropismo a macrófagos son críticos para la transmisión viral, mientras que los virus que usan CXCR4 aumentan su número en etapas tardías de la infección (39).

Además de utilizar este tipo de correceptores, el virus puede a través de otras moléculas de superficie como los proteoglicanos hacer más eficiente el proceso infeccioso. Se ha encontrado que el heparán sulfato, un proteoglicano con carga neta negativa al ser hidrolizado con una enzima específica disminuye el enlace del virus y la infección de líneas celulares, así como la formación de células gigantes multinucleadas (37). En este caso también es el loop V3 de gp120 el que interacciona con esta molécula, ya que al adicionarla en forma soluble bloquea la unión de anticuerpos monoclonales anti-loop V3. El estudio de las proteínas Env ha permitido conocer que esta región se encuentra formada principalmente por aminoácidos de carácter básico que le brindan una fuerte carga positiva para su interacción de tipo electrostática con los proteoglicanos (43).

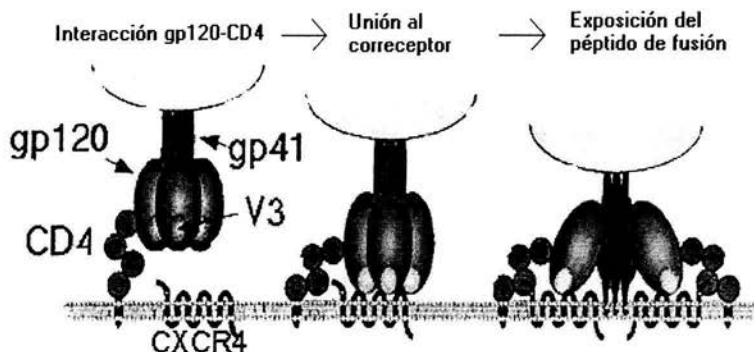


Figura 2. Dependencia de la fusión con el coreceptor CXCR4. Después de la interacción de CD4 con gp120, se expone el sitio de unión al coreceptor y a otras moléculas de superficie.

## 2.5 Importancia de la fusión celular en la disminución de células CD4+

Se considera que la disminución de las células T CD4+ infectadas se lleva a cabo por dos mecanismos: acción de células citotóxicas y efecto citopático. El primero de ellos se debe a la respuesta citotóxica por células CD8+ y NK que destruyen a las células que expresan antígenos virales. Sin embargo, algunos individuos con deficiencia en la respuesta inmune citotóxica han presentado un rápido decline en el número de células CD4+, por lo que se considera que el efecto citopático por lisis celular o inducción de sincicios puede ser igualmente importante (7).

Las células infectadas por el VIH o transfectadas que expresan las glicoproteínas de envoltura muestran una importante disminución en la expresión del receptor CD4 debido a que parte de gp160 forma un complejo con CD4 en el retículo endoplásmico, además de que la proteína Nef internaliza las moléculas de CD4 que han alcanzado la

superficie celular, esto produce eventos de fusión al interior de las células que finalmente son causa de su lisis (50).

La comprensión del mecanismo de fusión celular se ha considerado esencial, ya que en el 50% de los pacientes VIH positivos ocurre un cambio en el fenotipo del virus de no inductor de sincicios (NIS) a inductor de sincicios (IS), lo cual se relaciona con la acelerada pérdida de células CD4+ y una progresión rápida a SIDA (4). La diferencia entre las variantes NIS e IS se basa fundamentalmente en su afinidad por diferentes correceptores; mientras que la NIS utilizan CCR5 presente principalmente en células T activas y de memoria, las IS usan CXCR4 expresado en mayor cantidad en células T en reposo y nativas. De esta forma, las células nativas se ven afectadas por su incorporación a los sincicios que tienen un período corto de vida al sufrir apoptosis o lisis por los fenómenos de fusión mencionados anteriormente, siendo pérdida para el sistema inmune en la respuesta a los antígenos en general.

Se han encontrado células gigantes multinucleadas en el sistema nervioso central y en ganglios linfáticos de pacientes infectados por VIH (35). Se ha mostrado que estas formaciones se encuentran profusamente infectadas, por lo cual se consideran reservorios del virus, en los cuales se encuentra protegido frente a la respuesta inmune.

## **2.6 Citometría de flujo aplicada a la cuantificación de la fusión celular**

La citometría de flujo es un método utilizado para evaluar poblaciones celulares que presentan diferentes características en tamaño, granularidad o fluorescencia, que por ser cuantitativo, confiable y reproducible su uso en la actualidad es frecuente, principalmente en investigación y diagnóstico clínico.

En el departamento de inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas se ha diseñado un método nuevo para cuantificar la fusión celular (20), el cual utiliza células

transfectadas con el gen *env* (líneas celulares HxBc2 y 522 F/Y) para que expresen el complejo gp120/gp41 del VIH-1 y células que expresan el receptor CD4 (E6). Las células se marcan diferencialmente con colorantes tipo carbocianina que emiten fluorescencia roja (DiI) y verde (DiO), y que por ser de carácter lipofílico, se distribuyen principalmente en la membrana plasmática, de tal forma que cuando se ponen en cocultivo y ocurre la fusión, el citómetro de flujo puede cuantificar las células que presentan la doble fluorescencia y así determinar su porcentaje. En la figura 3a se muestran gráficas de granularidad contra tamaño y de fluorescencia roja contra fluorescencia verde para las células HxBc2 con capacidad de fusionarse con las células E6. La población de células con fluorescencia mixta aparecen en el cuadrante superior derecho de las gráficas de fluorescencia (en azul) y pueden distinguirse como una población con alto nivel de granularidad. La figura 3b muestra las gráficas correspondientes a las células 522 F/Y, cuya mutación en gp41 les impide inducir el proceso de fusión con las células E6. Las células con fluorescencia mixta generadas en el cocultivo 522/E6, corresponden a agregados celulares, como lo indica el hecho de que no se distinguen sincicios mediante el examen de los cultivos por microscopía de luz, mientras que sí se observan en los cocultivos de células HxBc2/E6. Asimismo los agregados celulares pueden distinguirse de las fusiones por presentar un tamaño mayor que las células fusionadas y normales, pero no mayor granularidad.

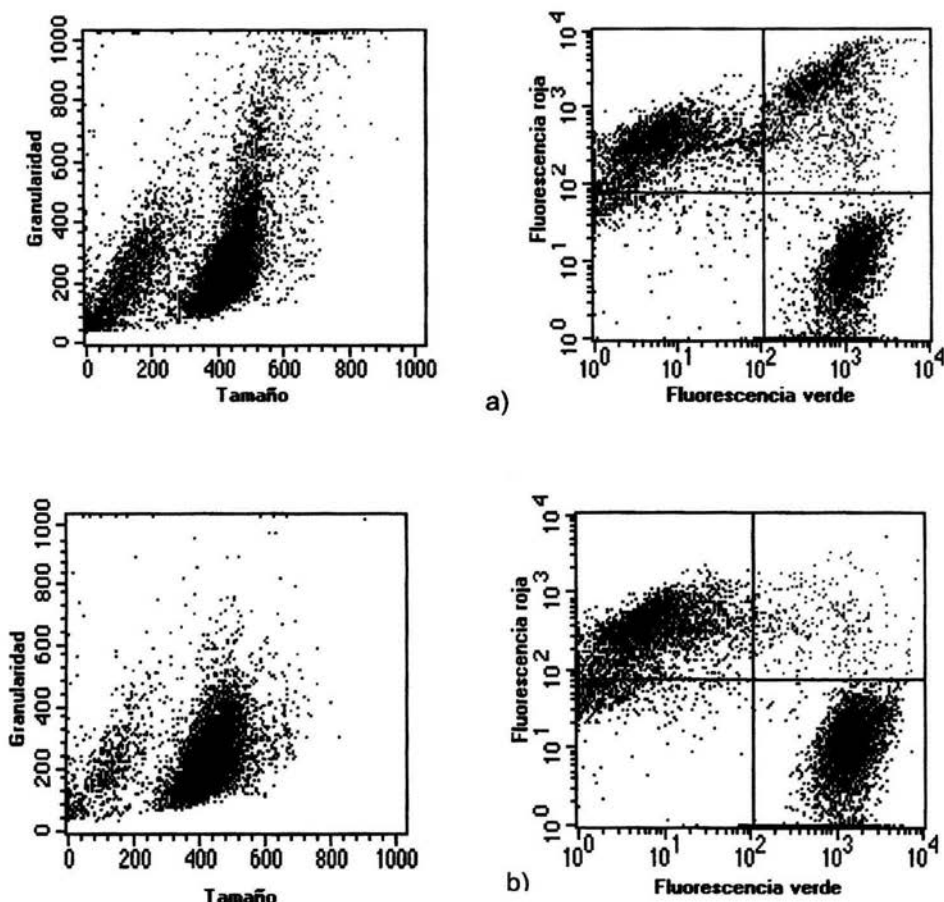


Figura 3. Gráficas de granularidad contra tamaño y de fluorescencia roja (Dil), contra fluorescencia verde (DIO). a) Células que expresan el complejo Env con capacidad para inducir fusión. En azul se observa la población de células con alto nivel de granularidad (gráficas de granularidad contra tamaño) y las células con fluorescencia doble (cuadrante superior derecho de las gráficas de fluorescencia). b) Células que expresan el complejo Env con una mutación en gp41 (522 F/Y) que les impide fusionarse. Las gráficas correspondientes a éstas células indican la presencia de una pequeña población con mayor tamaño, pero casi no hay células que presenten un alto nivel de granularidad. En la gráfica de fluorescencia aparece una pequeña densidad de células en el cuadrante correspondiente a las fusiones. Se ha propuesto que esta población se debe a agregados de células por unión entre gp120 y CD4, pero que no se han fusionado, y es un nivel basal de "fusión" en todos los ensayos realizados por éste método.

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El proceso de fusión celular inducida por el VIH es un mecanismo que se intenta describir detalladamente dada su importancia como mecanismo de infección y de evasión a la respuesta del sistema inmune del hospedero. Además, se ha considerado como un medio importante para inducir la disminución de los linfocitos T, ya sea por alteraciones en la estabilidad de la membrana de las células fusionadas o por la inducción de procesos apoptóticos en las mismas, o bien, por la lisis de células individuales infectadas que expresan el complejo gp120/gp41. De los múltiples estudios realizados se ha encontrado que además de participar los receptores CD4 de la célula huésped y gp120 viral, también lo hacen otros receptores asociados a la célula, como los correceptores para quimiocina CXCR4 y CCR5, siendo el primero de ellos el principalmente utilizado por cepas de VIH altamente fusogénicas encontradas en individuos que están próximos al estadio clínico de SIDA.

Por lo anterior, utilizando un modelo de células transfectadas para expresar el complejo gp120/gp41 de VIH, se buscó relacionar el nivel de expresión de las proteínas de envoltura con el nivel de fusión celular y la dependencia de este proceso con el correceptor CXCR4.

#### IV. OBJETIVOS

1. Determinar el efecto de distintos niveles de expresión del complejo gp120/gp41 en células transfectadas con el gen *env* de VIH, sobre la fusión celular.
  
2. Determinar si la fusión célula-célula es dependiente del correceptor CXCR4.
  - 2.1. Evaluar el efecto del nivel de expresión del complejo Env sobre la participación del correceptor.
  
  - 2.2. Evaluar el efecto de la hidrólisis de los proteoglicanos heparán y condroitín sulfato sobre la participación del correceptor.
  
  - 2.3. Determinar si el reciclamiento de la molécula CXCR4 influye en el efecto de anticuerpos anti-CXCR4 sobre la fusión.

## **V. METODOLOGÍA**

La línea celular Jurkat, HxBc2 transfectada para expresar las proteínas funcionales de envoltura de la cepa de VIH-1 HxBc2, la 522 F/Y transfectada para expresar proteínas de envoltura de la cepa HxBc2 con una mutación en gp41 que disminuye su capacidad de fusión y la E6-1 fueron obtenidas a través de AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH. La expresión del complejo gp120/gp41 tanto en HxBc2 como en 522 F/Y es suprimida en presencia de tetraciclina, de tal forma que cuando este antibiótico está ausente, se induce la expresión y las clonas positivas se seleccionan en presencia de los antibióticos higromicina y geneticina (7).

### **5.1 Cultivo celular**

Las células HxBc2, 522 F/Y y E6 se mantienen en suspensión en botellas T-75 con medio RPMI-1640 (Gibco BRL) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) inactivado (Gibco BRL), penicilina 50 U/ml y estreptomina 50 µg/ml (Gibco BRL), además, a las dos primeras se les adiciona 1 µg/ml de tetraciclina, 200 µg/ml de higromicina (Invitrogen) y 200 µg/ml de geneticina (Gibco BRL); se mantienen en incubación a 37 °C con 5% CO<sub>2</sub>.

### **5.2 Inducción de la expresión de proteínas de envoltura**

En condiciones de esterilidad se colocan las células HxBc2 y 522 F/Y en tubos para centrifuga de 50 ml, se centrifugan 3 min a 1150 rpm para retirar el medio de cultivo, se lavan 2 veces con 40 ml de PBS (1mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5.6mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 126 mM NaCl, pH 7.2)



estéril cada vez con la finalidad de retirar la tetraciclina y finalmente se resuspenden en el volumen adecuado de medio RPMI suplementado más 200  $\mu\text{g/ml}$  de geneticina y 200  $\mu\text{g/ml}$  de higromicina en botellas T-75. Se incuban a 37°C con 5%  $\text{CO}_2$  durante el tiempo necesario, como máximo 3 días para la expresión de las proteínas.

### 5.3 Marcaje celular

Para marcar las células se utilizan dos colorantes lipofílicos fluorescentes tipo carbocianina (fig.4):

- Perclorato de 3,3'-dioctadeciloxacarbocianina (DiO) . Fluorescencia verde-amarilla. Abs/Em 484/501
- Perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina (Dil). Fluorescencia rojo-anaranjado. Abs/Em 549/565.

Las soluciones stock se preparan disolviendo 3.5 mg de colorante por ml de dimetil sulfóxido (DMSO) y a partir de éstas se hacen diluciones 1:10 de Dil y 1:30 de DiO en el mismo disolvente.

Las células en proceso de inducción, 24 horas previas al ensayo de fusión se pasan a tubos para centrifuga de 15 ml, se centrifugan 3 min 1150 rpm para eliminar el medio de cultivo, se cuentan en un hematocitómetro y se ajustan a una concentración de  $5\text{-}15 \times 10^6$  células/ml de medio. Se les adiciona 35  $\mu\text{l/ml}$  de DiO 1:30 (esta concentración aumenta de dos a tres unidades por cada semana sucesiva a la preparación de la dilución del colorante, ya que la fluorescencia va decayendo) y protegidas de la luz se incuban en agitación constante durante 15 min a temperatura ambiente. Se lavan 2 veces con 10 volúmenes de medio RPMI suplementado cada vez y se pasan a botellas T-75 en el mismo medio, además

de 200 µg/ml de geneticina (Gibco BRL) y 200 µg/ml de higromicina (Invitrogen). Se dejan incubar toda la noche a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>.

Las células E6 se marcan con Dil 1:10 a una concentración de 11 µl/ml siguiendo el mismo procedimiento que para las anteriores.

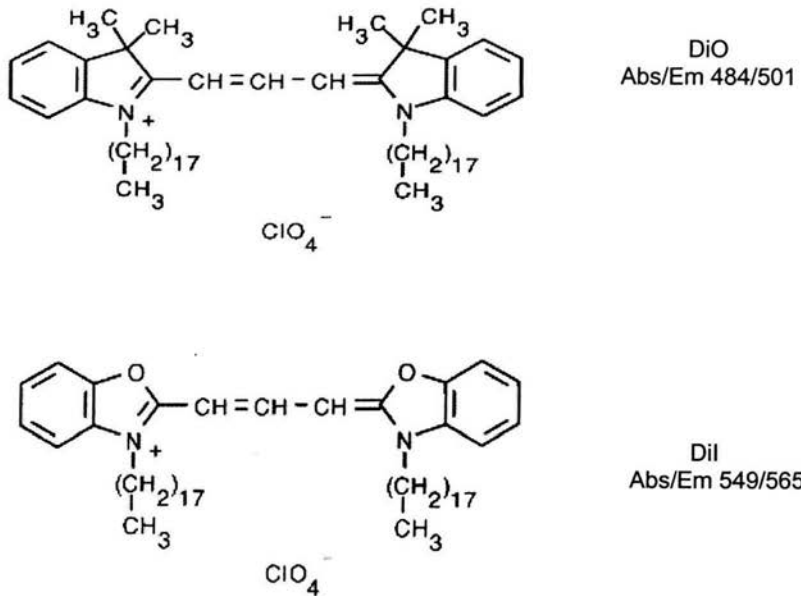


Figura 4. DiO y Dil. Estructura química de las carbocianinas lipofílicas fluorescentes utilizadas para marcar las células.

## 5.4 Ensayo de Fusión celular

Las células marcadas HxBc2, 522 F/Y y E6 se pasan a tubos para centrifuga de 15ml, se centrifugan 3 min, 1150 rpm y se resuspenden en medio libre de suero AIM-V (Gibco BRL), se cuentan en un hematocitómetro haciendo una dilución adecuada en azul tripano (Gibco BRL) y se ajustan a una concentración de  $0.2 \times 10^6$  células/0.09 ml en el mismo medio de cultivo. En una placa de 96 pozos de fondo plano se colocan 90  $\mu$ l por pozo de suspensión de células E6 y posteriormente se adicionan 90  $\mu$ l de células HxBc2 (fusogénicas) o 522 F/Y (no fusogénicas) resuspendiendo cuidadosamente una vez con la micropipeta para favorecer el contacto entre las células, la placa se incuba durante 5 horas a 37 °C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Se preparan tubos para FACS con 2 ml de buffer, las células se cosechan de cada pozo con ayuda de una micropipeta y se adicionan en el tubo correspondiente para lavarse una vez centrifugando 3 minutos a 1100 rpm, se elimina el sobrenadante con mucho cuidado para no perder el pellet y se resuspende en 300  $\mu$ l de buffer.

## 5.5 Inhibición de la fusión por anticuerpos

### 5.5.1 Inhibición con 24 horas de inducción

El análisis para observar la participación de los correceptores CXCR4 y CCR5 se llevó a cabo inicialmente, utilizando células inducidas durante 24 horas.

Como en el ensayo descrito anteriormente, 90  $\mu$ l de suspensión de células E6 se preincubaron con 2.77, 5.55, 10.98 ó 42.55  $\mu$ g/ml de los anticuerpos monoclonales anti-CXCR4 (clona 12G5), anti-CCR5 (clona 2D7) ó anti-CD4 (Pharmingen) durante 40 minutos a

37°C, posteriormente se adicionaron en la misma proporción las células HxBc2 ó 522 con 24 horas de inducción y se dejó el cocultivo en incubación durante 5 horas.

#### 5.5.2 Inhibición con 36 horas de inducción

En este ensayo, células E6 se preincubaron con 42.5 µg/ml de 12G5 ó 2D7 durante 40 minutos a 37°C, se adicionaron las células HxBc2 o 522 inducidas durante 36 horas y el cocultivo se incubó 5 horas.

#### 5.5.3 Inhibición con 72 horas de inducción

Células E6 se preincubaron durante 20 minutos en hielo con 27.02 µg/ml de 12G5 ó 2D7, el control con anti-CD4 fue de 16.4 µg/ml, posteriormente se adicionó otra dosis igual para tener una concentración final de 52.63 µg/ml, se incubó el mismo tiempo. En la misma proporción se adicionaron las HxBc2 y 522 con 3 días de inducción, incubándose el cocultivo durante 20 minutos más en hielo pasándose finalmente a 37°C durante 5 horas.

En otro ensayo, células E6 se preincubaron con 5.52, 27.02 ó 42.5 µg/ml de anti-CXCR4 de la clona A145 (MBL) o con 12G5, o bien, con la mezcla de los anticuerpos durante 30 minutos en hielo (se utilizaron las mismas concentraciones para el control con anti-CD4), las células Env+ inducidas 72 horas se adicionaron incubando 20 minutos más en frío pasando finalmente el cocultivo a 37 °C durante 5 horas.

## **5.6 Efecto sobre la fusión por tratamiento enzimático**

Para determinar si las moléculas de adhesión que normalmente se encuentran en mayor concentración sobre la superficie de las células participan en los eventos de fusión, se hizo un tratamiento enzimático a los tres tipos celulares con las enzimas heparitinasa (EC 4.2.2.8) y condroitinasa (EC 4.2.2.4).

Los liofilizados de las enzimas se reconstituyeron en PBS estéril ajustado con NaOH 2M a pH 7.5 quedando a las siguientes concentraciones: heparitinasa 12.8 mU/ml, condroitinasa 2.1 mU/ml.

Después de tres días de inducción, las células previamente marcadas con DiO y Dil se cuentan y ajustan por separado en PBS pH 7.5 a una concentración de  $1 \times 10^6$  células / ml. Se adicionan 8 mU de heparitinasa por ml de suspensión celular y 4mU de condroitinasa por ml de suspensión celular, se incuban a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 1.5 horas (43). Se lavan dos veces con 20 ml de PBS pH 7.2 cada vez, se cuentan y ajustan a una concentración de  $0.2 \times 10^6$  células/0.09ml en medio AIM-V y se montan en la placa de 96 pozos de fondo plano para el ensayo de fusión.

## **5.7 Inmunofluorescencia Indirecta para cuantificar la expresión de proteínas**

Células HxBc2 y 522 F/Y inducidas durante 3 días y E6 (control negativo) se lavan con buffer de lavado (PBS-azida de sodio al 0.1%) centrifugando 3 min a 1150 rpm y se ajustan en buffer de tinción (PBS-azida de sodio al 0.1%+ SNC\* 20%) a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/0.05ml; se colocan 50 µl de la suspensión celular en tubos para FACS y se adiciona 1 µl de suero de pacientes VIH+ (dilución 1:50), se incuban en hielo 30 min y se

elimina el anticuerpo primario haciendo un lavado con 2 ml de buffer de lavado. Las células se resuspenden en 50  $\mu$ l de buffer de tinción y se agregan 5  $\mu$ l del anticuerpo conjugado (anti-IgG humano marcado con FITC, Zymed), se incuban en hielo 30 min, se lavan nuevamente en 2 ml de buffer de lavado y finalmente se resuspenden en 1 ml de buffer para FACS.

\*suero normal de cabra.

### **5.8 Análisis por FACS**

Las muestras resuspendidas en el buffer para FACS se capturan en un citómetro de flujo Becton-Dickinson modelo FACScan con lámpara de xenón de excitación a 488 nm. El análisis se hace en el programa Cell-Quest sobre 10,000 eventos capturados graficando granularidad (SSC-H) contra tamaño (FSC-H) y fluorescencia verde (FL1-H) contra fluorescencia roja (FL2-H), o en el caso de las inmunofluorescencia se construyen histogramas de fluorescencia contra el número de eventos.

### **5.9 Microscopía de Barrido**

En otro ensayo para demostrar que la población con doble marca registrada por el citómetro de flujo son efectivamente células fusionadas o sincicios, células marcadas e inducidas durante 3 días se pusieron en cocultivo durante 5 horas, posteriormente se cosecharon las células y se lavaron en buffer para FACS una vez, finalmente se resuspendieron en el mismo a una concentración de  $1 \times 10^7$  células/ml. La muestra se capturó en el citómetro de flujo modelo FACS Vantage del CINVESTAV para separar cada una de

las tres poblaciones (doble marca, verde y roja).

Las células recuperadas se fijaron con glutaraldehído al 1% y solamente las de doble marca y rojas, cuya cantidad era la necesaria, pudieron ser analizadas por microscopía de barrido en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM por el Dr. Jorge Sepúlveda.

## VI. RESULTADOS

### 6.1 Dependencia de la fusión con la expresión de Env

La fusión célula-célula se evaluó utilizando como modelo líneas celulares Jurkat transfectadas con el gen *env* del VIH-1 integrado a un sistema basado en el operón de tetraciclina (7), cuya expresión ocurre en ausencia de éste antibiótico (células HxBc2 y 522 F/Y).

Las células HxBc2, una vez expresado el complejo gp120/gp41 pueden fusionarse en cocultivo con células Jurkat CD4+ (clona E6) no transfectadas. En cambio, las células 522 F/Y (que tienen una sustitución F/Y en la posición 522 de gp41) son incapaces de fusionarse con éstas.

El análisis cuantitativo de la fusión se efectuó mediante un método nuevo en el que las células HxBc2 (también llamadas Env+) y las E6 se marcan con los colorantes fluorescentes DiO (verde) y Dil (rojo) respectivamente, como se describió anteriormente (secc. 5.3). Una mezcla de células marcadas HxBc2/E6 ó 522/E6 en proporción 1:1 se incuban durante 5 horas a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>, después de lo cual se analizan por citometría de flujo (FACS).

Las poblaciones se cuantifican según su marca, ya sea roja, verde o doble fluorescente, siendo esta última la correspondiente a las fusiones. Los resultados se analizan con el programa Cell Quest para obtener el porcentaje de células doblemente fluorescentes mediante gráficas de fluorescencia (ver nota de la figura 3).

Para comprobar que la formación de células doblemente fluorescentes depende de la expresión de las proteínas de envoltura de VIH expresadas en las células transfectadas, en un trabajo previo realizado en el laboratorio se analizó el efecto de anticuerpos monoclonales anti-gp120 (F105, 902, IIIB-V3-21) y anti-gp41 (1577) sobre la fusión celular. Las células HxBc2 inducidas 3 días se preincubaron con dosis variables de anticuerpo durante 40



minutos y posteriormente se pusieron en cocultivo 5 horas con las células E6, incluyendo un control con anti-CD4 a dosis única. En éste ensayo se obtuvo 21% de fusión total.

En la gráfica de la figura 5, donde el porcentaje de fusión total está expresado como el 100%, se observa el efecto de los anticuerpos F105 y 1577.

Conforme a lo analizado en la sección 2.6 (pág. 11) con respecto a la población de agregados que se forma por la interacción de receptores primarios en el cocultivo control de células no fusogénicas 522/E6 se obtiene un nivel basal de células doble fluorescentes que no son sincios en el cocultivo HxBc2/E6, por lo tanto es necesario restar este valor al nivel total de fusión y al obtenido por efecto de los anticuerpos. Las gráficas no muestran ésta corrección, ya que el llevar a cero el nivel de células doble fluorescentes limitaría el análisis del efecto del anticuerpo sobre la agregación celular. De acuerdo a lo anterior, el anticuerpo F105 inhibió la fusión 35.5% utilizando una concentración de 50 µg/ml, mientras que con el anti-gp41, con una concentración máxima de 20 µg/ml, se obtuvo 59.7% de inhibición. Los controles de células 522/E6 y HxBc2/E6+anti-CD4, permanecieron en un nivel de partículas con fluorescencia mixta menor al 20%.

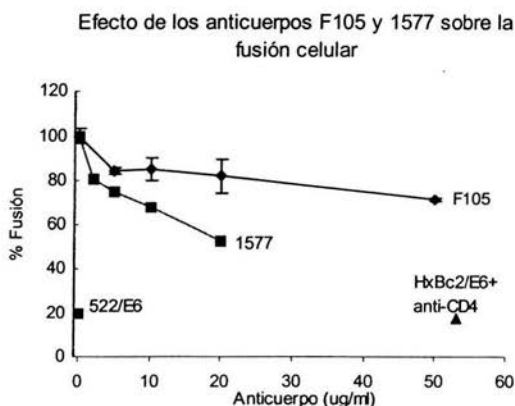


Figura 5. Efecto de anticuerpos monoclonales anti-gp120 (F105) y anti-gp41 (1577) sobre la fusión célula-célula. La fusión total fue de 21%. Se incluyeron controles con células 522/E6 y HxBc2+anti-CD4 (53 µg/ml).

Los resultados posteriores se reportan considerando como en este caso, el nivel basal de células doble fluorescentes en el cocultivo control con células 522/E6.

Con esta información se llegó a la conclusión de que el proceso para la formación de la población doble fluorescente depende del complejo gp120/gp41, por lo tanto su expresión en las células transfectadas es positiva.

## **6.2 Efecto del tiempo de inducción sobre la fusión celular**

La expresión del complejo Env en las células HxBc2 y 522 se incrementa con el tiempo de cultivo en ausencia de tetraciclina y presenta un nivel máximo después de 3 días de inducción (7). Para determinar si la fusión se relaciona con el tiempo de inducción, y por lo tanto con el nivel de expresión de Env, evaluamos la fusión con células inducidas durante 24, 48, 36 y 72 horas. En todos los casos, 24 horas previas al cocultivo, las células se marcaron con los colorantes fluorescentes.

A partir del análisis por FACS se construyeron gráficas de fluorescencia roja contra fluorescencia verde para los diferentes tiempos (fig. 6) que muestran en la región superior derecha la población fusionada cuyo porcentaje es dependiente del tiempo de inducción.

Se puede observar que la población doble fluorescente aumenta en el cocultivo HxBc2/E6 de 5.2% a 18.8% en función del tiempo, mientras que permanece en un intervalo de 3.1 a 3.8% en el cocultivo con las células 522/E6.

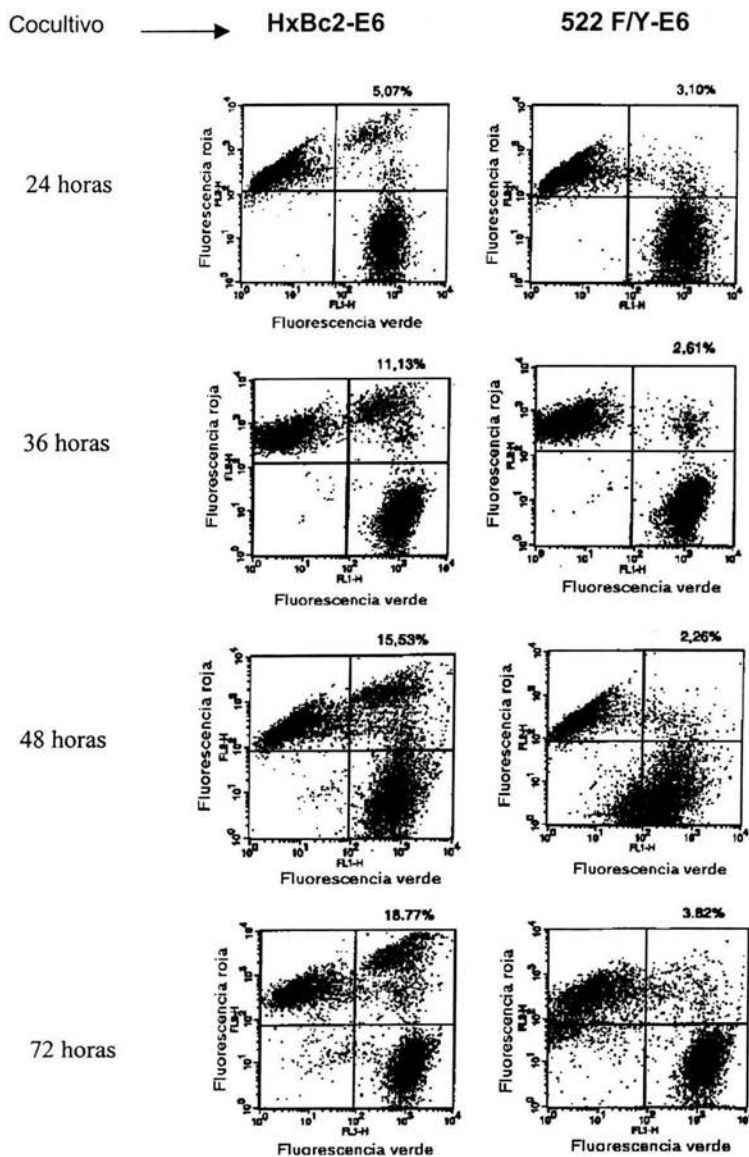


Figura 6. Gráficas de fluorescencia para los cocultivos HxBc2/E6 y 522/E6. Se puede observar que a mayor tiempo de inducción, la población de células doble fluorescentes en el primero de ellos aumenta; el control con células 522 muestra una población constante entre 3.1 y 3.8%.

La figura 7 resume el cambio en el porcentaje de células fusionadas mostrado en las gráficas de fluorescencia. Se observa un incremento del 54% entre las 24 y 48 horas, mientras que en las siguientes 24 horas solo aumenta 16%, es decir, en las primeras 48 horas de inducción se expresa la mayor cantidad de proteínas de envoltura. El control de células 522-E6 mantienen un nivel de células doblemente fluorescentes constante entre 12 y 17% .

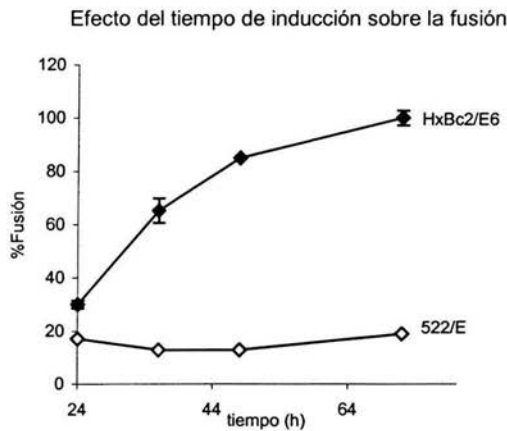


Figura 7. Gráfica del porcentaje de fusión total en función del tiempo de inducción de la expresión de gp120/gp41 por las células HxBc2 y 522 F/Y.

### 6.3 Microscopía de barrido

Para demostrar que la población con doble marca registrada por el citómetro de flujo son sincicios, células marcadas e inducidas durante 3 días se pusieron en cocultivo durante 5 horas, se resuspendieron en buffer de FACS a una concentración de  $1 \times 10^7$  cel/ml y se capturaron en un citómetro de flujo modelo FacsVantage para separar cada una de las 3 poblaciones (doble marca, verde y roja). Las células recuperadas se fijaron con

glutaraldehído al 1% para ser analizadas por microscopia de barrido. La separación tuvo un 85% de pureza.

Las microfotografías de la figura 8a y 8b corresponden a las células con doble fluorescencia (fusiones) y con marca roja (E6 individuales). La escala es de  $5\mu$  en ambas y se pudo determinar calculando el volumen de los sincicios y de las células individuales, que las células doble fluorescentes son cuatro veces más grandes que las E6, aunque esto no permite conocer el número de células que se han incorporado al sincicio.

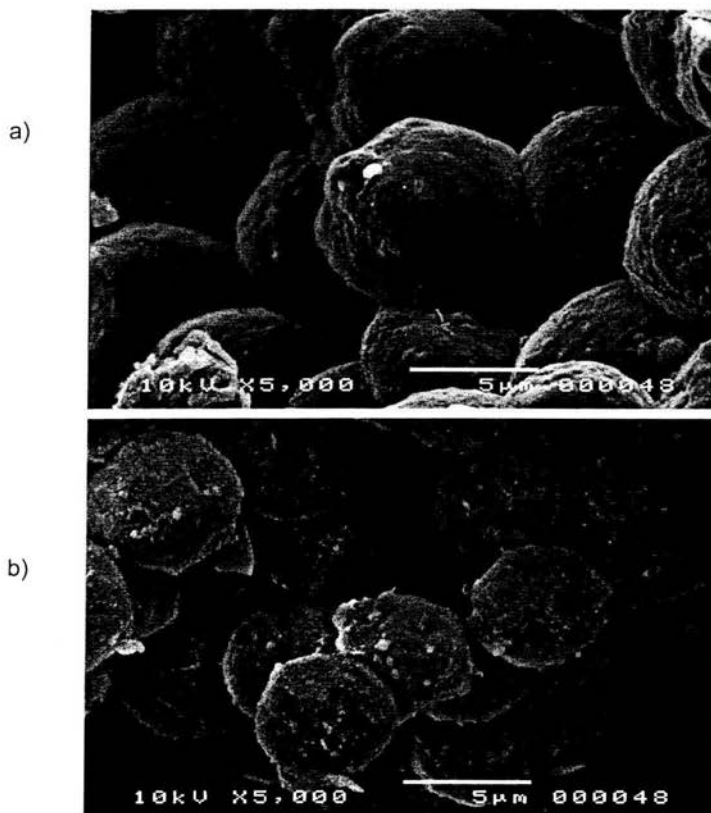


Figura 8. Microscopia de barrido de las poblaciones celulares de un cocultivo de cinco horas, separadas por citometría de flujo. a) Células con fluorescencia mixta (fusiones). b) Células E6 (rojas). Ambas tienen la misma escala. Se puede observar la diferencia en tamaño entre las células fusionadas y no fusionadas.

#### **6.4 Evaluación de la expresión del complejo gp/120/gp41 por inmunofluorescencia indirecta (IFI)**

Una vez determinado que el tiempo de inducción para la expresión del complejo Env en células HxBc2 afecta el nivel de fusión con células E6, se llevó a cabo una inmunofluorescencia indirecta (IFI) con el objetivo de evaluar cualitativamente su concentración en membrana. Para ello células HxBc2 y 522 inducidas durante 3 días se incubaron con sueros de pacientes VIH+ (gp120/gp41 positivos por western blot) como fuente de anticuerpo primario a una dilución final 1:50 en buffer de tinción conteniendo suero normal de cabra (agente bloqueador) al 20%, esto con el objetivo de tener una amplia variedad de anticuerpos contra los múltiples epítopes de las proteínas de envoltura. La unión de los anticuerpos a las células se determinó utilizando un segundo anticuerpo anti-IgG marcado con FITC. Como control se utilizaron células no inducidas y células E6 (no transfectadas).

Uno de los sueros probados, produjo los mejores resultados. En los histogramas de la figura 9 se puede observar un desplazamiento hacia mayor fluorescencia tanto en las células HxBc2 como en las 522 inducidas durante tres días con respecto a las no inducidas. Esta fluorescencia no depende de la unión inespecífica del segundo anticuerpo (ver control de anticuerpo conjugado).

Existe un alto nivel de unión inespecífica que se detecta con el control de células E6, ya que la fluorescencia que presentan es semejante a la observada en las células transfectadas no inducidas. La unión inespecífica de anticuerpos del suero a las células se manifestó incluso cuando se aumentó la concentración de agente bloqueador de 20 a 40% .

Lo anterior indica que la remoción de la tetraciclina efectivamente induce la expresión del complejo Env sobre la membrana celular tanto en las células HxBc2 como en las 522

F/Y. Asimismo, la inmunofluorescencia muestra un alto nivel de unión de los anticuerpos del suero a células que no expresan las proteínas virales.

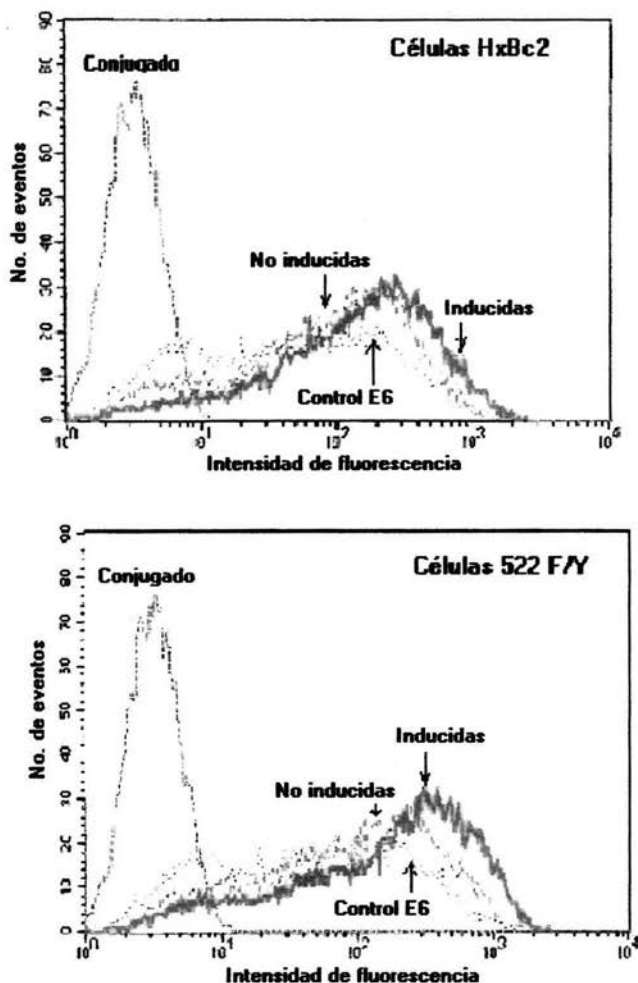


Figura 9. Determinación de la expresión de Env por las células HxBc2 y 522 inducidas por tres días y no inducidas para expresar el complejo gp120/gp41. La inmunofluorescencia indirecta se llevó a cabo usando sueros de pacientes infectados y anti-IgG marcado con FITC como segundo anticuerpo. Se incluyó un control con células E6 (no transfectadas) y con el segundo anticuerpo o conjugado. El agente bloqueador (SNC) se utilizó al 20%.

## 6.5 Dependencia de la fusión del correceptor CXCR4

### 6.5.1 Efecto del anticuerpo monoclonal 12G5

La infección de una célula por el VIH, depende de la interacción de la proteína viral gp120 con el receptor CD4 y de un correceptor de la familia de los receptores para quimiocinas, acoplados a proteínas G principalmente CXCR4 y CCR5 (28). Es dentro del loop V3 de gp120 donde se localiza una secuencia que influye de manera importante en el tropismo del virus, ya sea por células que expresan uno u otro correceptor (32).

Para determinar la dependencia del correceptor CXCR4 en nuestro modelo de fusión celular mediada por gp120/gp41, evaluamos el efecto sobre la fusión de anticuerpos monoclonales dirigidos al mismo.

La presencia de CXCR4 en las células Jurkat transfectadas como no transfectadas se determinó previamente en el laboratorio mediante una inmunofluorescencia directa utilizando el anticuerpo 12G5 acoplado a FITC. Los resultados mostraron que las 3 líneas celulares (HxBc2, 522 y E6) tienen una expresión homogénea del correceptor (fig. 10).

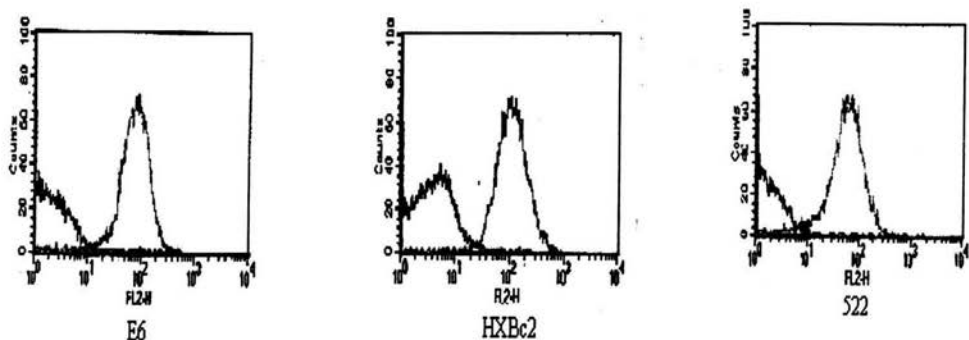


Figura 10. Inmunofluorescencia directa con el anticuerpo monoclonal anti-CXCR4 12G5 marcado con FITC. Se observa que las tres líneas celulares tienen una expresión homogénea del receptor CXCR4.



La participación de CXCR4 en la fusión se evaluó inicialmente utilizando el anticuerpo 12G5, el cual inhibe fuertemente la infección de células por virus trópicos a células T. Este anticuerpo se une a un epítipo conformacional localizado en el primero y segundo loop extracelular del correceptor (ver figura 16).

Dado que muchos virus trópicos para células T pueden utilizar CCR5 en adición a CXCR4, incluimos el anticuerpo 2D7, el cual se une a un epítipo localizado en el segundo loop extracelular de la molécula CCR5.

Se llevó a cabo un ensayo con células Env+ inducidas durante 36 horas, en donde la fusión total del cocultivo HxBc2/E6 se inhibió 22.4% con una concentración de 42.5 µg/ml de 12G5 (valor corregido con respecto al control de células 522/E6). Con la misma concentración del 2D7, la fusión permaneció constante (fig. 11).

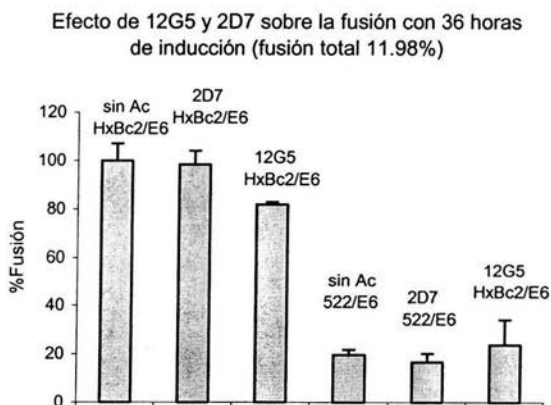


Figura 11. Efecto de los anticuerpos 12G5 y 2D7 sobre la fusión celular con 36 horas de inducción (fusión total 11.98%). Las células E6 se preincubaron con 42.5 µg/ml de los anticuerpos durante 40 minutos a 37°C .

Dado que obtuvimos sólo 22.4% de inhibición, el siguiente experimento lo llevamos a cabo considerando la hipótesis de Kabat y cols. (39) que propone que cuando la concentración de receptores primarios CD4 y gp120 es alta, la dependencia con el correceptor es mínima para desencadenar el proceso de fusión, de tal forma que resultaría difícil bloquear los correceptores por la adición de anticuerpos monoclonales. Una cantidad mínima de éstos receptores no ocupados podría ser suficiente para permitir la fusión.

Para tener menor expresión del complejo gp120/gp41 sobre la membrana de las células, tanto HxBc2 como 522 F/Y se indujeron durante 24 horas y se pusieron en cocultivo con células E6 preincubadas con concentraciones variables de 12G5 ó 2D7 (máximo 42.5 µg/ml). La figura 12a muestra una gráfica donde se observa que 12G5 no inhibe e incluso tiende a promover la fusión, mientras que 2D7 la inhibe en un 17%. Este experimento se repitió omitiendo la última concentración de anticuerpo e incluyendo un control de inhibición con anti-CD4 (fig. 12b), obteniendo resultados semejantes.

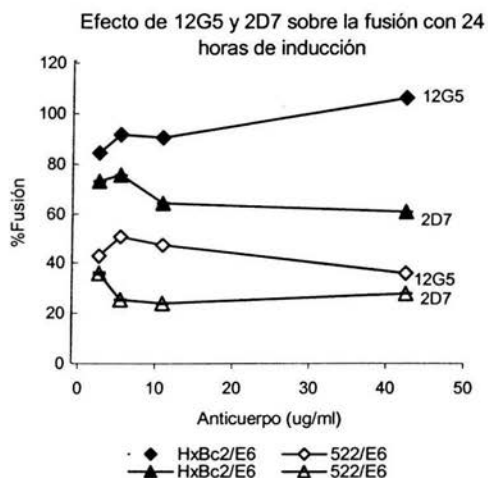


Fig. 12 a)

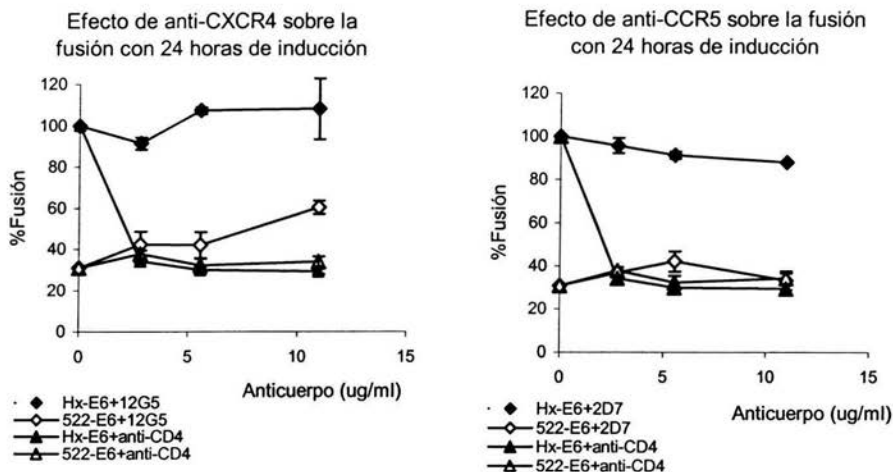


Fig. 12 b)

Figura 12. Gráficas de inhibición de la fusión con 24 horas de inducción, a) experimento con una concentración máxima de 42.5  $\mu\text{g/ml}$ , no se incluyó un control sin anticuerpo b) experimento con concentración máxima de 10.98  $\mu\text{g/ml}$  y control con anti-CD4, la fusión total fue de 4.6%. Preincubación a 37  $^{\circ}\text{C}$ , 40 min.

Se ha descrito que CXCR4 no se encuentra solamente en la membrana plasmática, sino también en vesículas internas en el citoplasma sufriendo procesos de internalización y reciclamiento por la acción de anticuerpos específicos, así como por estímulos de proliferación y la unión a su ligando (14). Con el fin de minimizar un posible reciclamiento del receptor por la preincubación a 37  $^{\circ}\text{C}$ , las células E6 se preincubaron en hielo con dos concentraciones de los anticuerpos 12G5 y 2D7, posteriormente se adicionaron a las células Env+, manteniéndolas en frío durante 20 minutos adicionales para dar tiempo a la formación de contactos intercelulares en presencia del anticuerpo.

La gráfica de la figura 13 muestra que bajo estas condiciones, 2D7 no modifica la fusión, mientras que 12G5 la inhibe un 10% con respecto al control HxBc2/E6 sin anticuerpo. Los controles con células 522 y con HxBc2+anti-CD4 permanecen en el mismo porcentaje, lo que nos demuestra nuevamente que la fusión no depende de forma importante de la presencia de éstos correceptores.

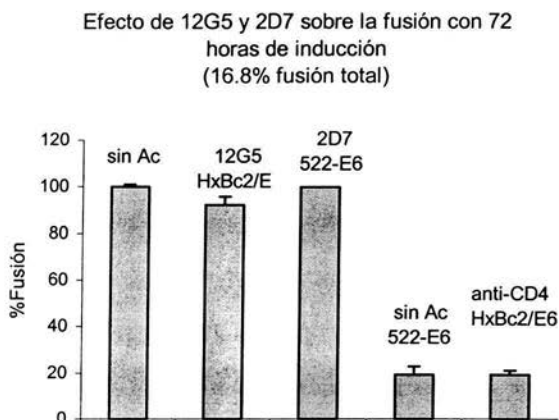


Figura 13. Efecto de 12G5 y 2D7 sobre la fusión con 72 horas de inducción (fusión total 16.8%). La preincubación con el anticuerpo se hizo en hielo a concentración de 52.6 µg/ml .

### 6.5.2 Efecto de la hidrólisis del heparán y condroitín sulfato sobre la fusión

Además de los correceptores para quimiocinas, la literatura reporta que el VIH puede utilizar otras moléculas para hacer más eficiente el mecanismo de fusión (38), entre ellas se encuentran los proteoglicanos que participan en procesos de señalización y mantenimiento del microambiente intercelular. Se ha reportado que el complejo heparán-condroitín sulfato (sindecan) es blanco del virus y promotor de la infección. Por otra parte, se sabe que los linfocitos tienen un alto contenido de ésta molécula en su membrana (6).

Considerando lo anterior, se llevó a cabo la hidrólisis de éstos proteoglicanos con las enzimas heparitinasa tipo III (29) y condroitinasa en las células CD4+ (E6), esto con dos finalidades: determinar si ejercían un impedimento de tipo estérico con respecto a CXCR4 de tal forma que no favorecieran el acercamiento adecuado de 12G5 a su epítotope y además conocer si estos mismos participan en el proceso de fusión celular.

La actividad de las enzimas no se determinó, sin embargo, se observó que después de tratar las células, éstas en más de un 50% se quedaban adheridas al tubo falcon donde se llevaba a cabo la hidrólisis, algo que no sucede cuando no se exponen a las enzimas; éste comportamiento se asoció con la reducción de carga negativa de la membrana celular por pérdida de los proteoglicanos sulfatados, y por lo tanto, con la actividad enzimática.

Las células E6 tratadas con heparitinasa o condroitinasa se pusieron en cocultivo con las células HxBc2 o 522 durante 5 horas. La gráfica 14 muestra, que la hidrólisis de éstos dos proteoglicanos no afecta la fusión celular, ya que no hubo inhibición con respecto al control sin tratamiento.

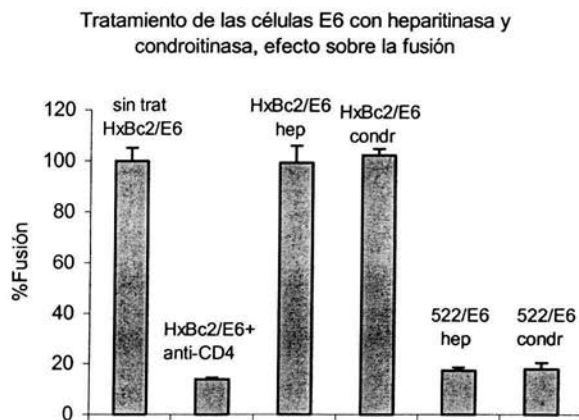


Fig. 14. Efecto de la hidrólisis del heparán sulfato y condroitín sulfato de las células E6 sobre la fusión celular. Tratamiento con heparitinasa y condroitinasa.

Cuando células E6 tratadas con la enzima heparitinasa se preincubaron con una concentración de 21.7 µg/ml de 12G5, y se cocultivaron con HxBc2 ó 522 , tampoco se obtuvo un efecto de inhibición, esto se puede ver en la gráfica de la figura 15.

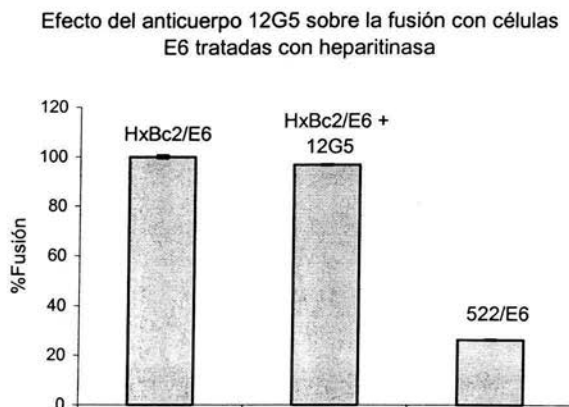


Figura 15. Efecto del anticuerpo 12G5 sobre la fusión con células E6 tratadas con heparitinasa. La preincubación se realizó a 37°C.

### 6.5.3 Efecto del anticuerpo monoclonal A145

Dado que no se observó un efecto significativo del anticuerpo 12G5 sobre la fusión, se decidió evaluar la actividad de un segundo anticuerpo anti-CXCR4 (A145) dirigido contra un epítipo que se encuentra en el extremo amino terminal del corresponsor (fig.16).

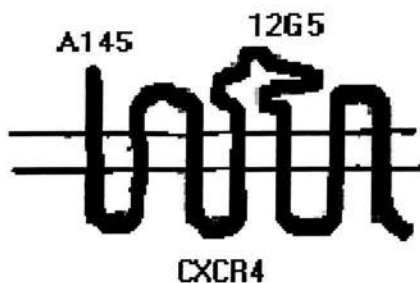


Figura 16. Estructura del correceptor CXCR4 y sitio de acción de los anticuerpos A145 y 12G5.

Se probaron 3 dosis de A145 (5.52, 27.02 y 42.50  $\mu\text{g/ml}$ ) solas o combinadas con las mismas concentraciones de 12G5 en células inducidas 3 días preincubando el anticuerpo en frío como en el ensayo anterior para disminuir el reciclamiento del correceptor.

La figura 17 muestra una gráfica donde 12G5 tiene una tendencia a promover la fusión aunque con la concentración más alta se observa inhibición del 15%, mientras que el A145 inhibe 37.3%, efecto que no se ve considerablemente potenciado cuando se combina con el anticuerpo 12G5. Estos resultados sugieren que en nuestro modelo CXCR4 participa en el proceso de fusión, siendo la región amino terminal el principal sitio de unión para gp120.

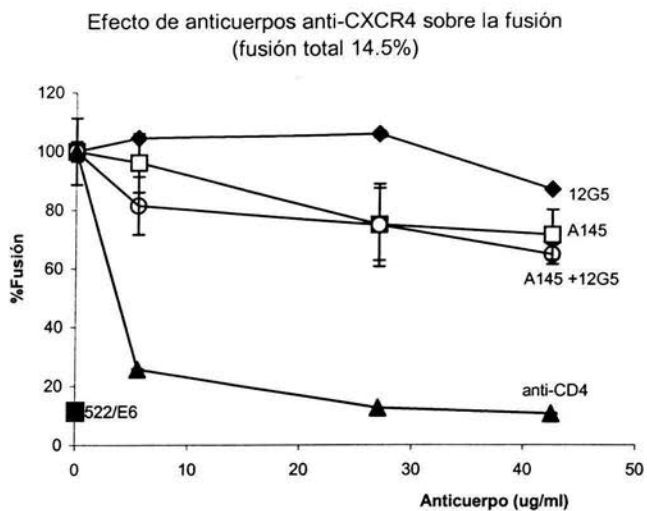


Figura 17. Efecto de los anticuerpos monoclonales anti-CXCR4, A145 y 12G5 sobre la fusión en el cocultivo con células HxBc2/E6. Se incluyó un control con células 522/E6. La preincubación de los anticuerpos se realizó en hielo.

En la siguiente tabla se resumen los resultados obtenidos a partir de los ensayos para evaluar el papel del corresponsor CXCR4 en la fusión celular con los anticuerpos monoclonales 12G5 y A145.



Preincubación (°C)	Inducción (horas)	% ACTIVIDAD		
		12G5 (anti-CXCR4)	2D7 (anti-CCR5)	A145 (anti-CXCR4)
37	24	*20↑ (42.5 µg/ml)	17↓ (42.5 µg/ml)	—
37	36	22.4↓ (42.5 µg/ml)	0 (42.5 µg/ml)	—
4	72	10↓ (52.6 µg/ml)	0 (52.6 µg/ml)	—
4	72	15↓ (42.5 µg/ml)	—	37.3↓ (42.5 µg/ml)

Tabla 1. Efecto de los anticuerpos monoclonales anti-CXCR4 12G5 y A145 y el anti-CCR5 2D7 sobre la fusión bajo diferentes condiciones experimentales. El porcentaje de actividad corresponde al porcentaje de inhibición o promoción de la fusión celular. Las flechas indican el efecto de los anticuerpos sobre la fusión.

↓ Inhibición de la fusión

↑ Promoción de la fusión

\* Agregación celular

## VII. DISCUSIÓN

### 7.1 Efecto del nivel de expresión del complejo gp120/gp41 sobre la fusión

El VIH es un retrovirus cuyo proceso de infección implica la fusión de la membrana viral con la membrana de la célula huésped mediante la interacción de las proteínas de fusión del virus (gp120/gp41 ó Env) con el receptor primario CD4 y un correceptor de la superficie de las células blanco principalmente CXCR4 y CCR5, (27). Una vez infectada, la célula comienza a expresar en su superficie el complejo gp120/gp41, lo cual le permite fusionarse con células no infectadas CD4+ formando sincicios o células gigantes multinucleadas *in vitro*. La detección de virus formadores de sincicios en el suero de individuos infectados se asocia con la progresión a SIDA (20, 27). Esto ha conducido a la hipótesis de que la fusión de membranas celulares es proceso que puede contribuir en forma a la disminución progresiva de los linfocitos T cooperadores observada en la sangre de los individuos infectados y a la disfunción inmunológica asociada al SIDA.

El estudio de la fusión de membranas inducida por las proteínas de la envoltura del VIH, es facilitada por la generación de líneas celulares transfectadas con el gen *env* del virus, las cuales se fusionan *in vitro* con células portadoras de los receptores específicos. En el presente trabajo se utilizaron células de leucemia humana de la línea Jurkat transfectadas establemente para expresar el complejo Env de la variante HxBc2 del VIH, cuya actividad fusogénica es semejante a la de las células infectadas.

La caracterización previa de las propiedades fusogénicas de éstas células realizada por Cao (7), muestra que la expresión de Env se incrementa con el tiempo de cultivo en ausencia de tetraciclina, la cual actúa como represor del gen *env*. Esta expresión puede detectarse en las células por inmunofluorescencia después de tres días de cultivo en ausencia de éste antibiótico, utilizando el suero de un paciente seropositivo a las proteínas

gp120 y gp41 y un anticuerpo anti-IgG humano conjugado a fluoresceína, (fig 9). Es interesante notar que los anticuerpos del suero de los pacientes son altamente reactivos con la superficie de células no inducidas y aún con células no transfectadas (células E6). Esta actividad se debe probablemente al estado de hiperactividad inmunológica inducida por la infección en la mayoría de los individuos infectados (26).

El incremento en la expresión de Env con el tiempo de inducción se utilizó para determinar si la fusión depende del nivel de expresión de Env. Los resultados muestran que, efectivamente, entre mayor es el tiempo de inducción en las células transfectadas, mayor es el porcentaje de fusión obtenido.

Estudios sobre la localización de los receptores que median la fusión han mostrado que CD4 y gp120 se encuentran asociados a microdominios lipídicos de membrana (29) formadas principalmente por glicoesfingolípidos (GSL) y colesterol ("lipid rafts"). Cuando gp120 reacciona con CD4, ocurren cambios conformacionales que exponen el sitio de unión para el correceptor, el cual debe desplazarse hacia el sitio de la interacción gp120-CD4 por un proceso de desestabilización de la membrana (24, 29). Para que esto ocurra es necesario que al menos tres heterodímeros gp120/gp41 reaccionen con tres receptores CD4 (40). Por lo tanto, la concentración de éstas moléculas en la membrana celular, debe alcanzar un umbral que favorezca la formación de los complejos multimoleculares necesarios para que el proceso de fusión se lleve a cabo.

El incremento en la cantidad de células fusionadas que resulta de un tiempo más largo de inducción, indica que paulatinamente, más células alcanzan el nivel de expresión de Env requerido para promover la fusión. Asimismo, el aumento en el tiempo de inducción también favorece la formación de productos de fusión de gran tamaño (fig. 6), indicando que un alto nivel de expresión de Env podría otorgar a las células HxBc2 la capacidad de fusionarse con varias células E6.

El estudio del reclutamiento de células de cada población en los sincicios se ha abordado recientemente en el laboratorio mediante la observación del cambio en el número de células no fusionadas que acompaña a la generación de productos de fusión. Asumiendo que una disminución en el número de células de cada población refleja su incorporación en las fusiones, se ha determinado que, efectivamente, las fusiones incorporan más células E6 que HxBc2. Por lo tanto, la expresión de niveles altos de Env en las células HxBc2 se asocia con la fusión de varias células E6 con una Env+.

Notablemente, la cantidad de células fusogénicas totales no rebasa el 21%. Asumiendo que cada sincicio incorpora al menos una célula de cada tipo, esto implica que la fusión involucra al menos al 42% de las células de cada población. Este porcentaje se asocia probablemente a heterogeneidad en el ciclo celular, propio de las líneas celulares en cultivo.

Estudios recientes en el laboratorio muestran que las células fusionadas, incluyendo las de tamaño mayor, permanecen 100% viables al menos 24 horas (datos no mostrados).

## **7.2 Papel del correceptor CXCR4 en la fusión**

El análisis del papel del correceptor CXCR4 en la fusión se llevó a cabo estudiando el efecto de anticuerpos monoclonales anti CXCR4 en diferentes condiciones experimentales: distintos niveles de expresión del complejo Env en la membrana, diferentes temperaturas de preincubación y digestión de proteoglicanos de la membrana citoplásmica.

En la tabla 1 se resumen los principales resultados obtenidos en las condiciones descritas.

Cuando la expresión de Env se indujo durante 24 horas, el anticuerpo 12G5 (anti-CXCR4) incrementó la fusión en un 20% con respecto al control sin anticuerpo. En cambio,

2D7 (anti-CCR5), la inhibió en un 17%. Es probable que con bajos niveles de expresión de Env, la fusión se incrementa por el anticuerpo 12G5 debido a su capacidad para promover la aglutinación celular (fig. 11). Por otro lado, la inhibición por el 2D7 implica que éste correceptor participa en la fusión cuando la expresión de Env en la superficie celular es baja.

Con células inducidas durante 36 horas, se obtuvo 22.4% de inhibición de la fusión con el 12G5, siendo el máximo nivel obtenido con éste anticuerpo, mientras que anti-CCR5 prácticamente no modificó el porcentaje.

El ensayo donde se usaron células con tres días de inducción tan solo se inhibió la población doble fluorescente 10% en presencia de 12G5, en tanto que 2D7 no mostró actividad considerable.

Estos resultados sugieren que hay una dependencia entre la concentración del complejo gp120/gp41 y el uso del correceptor, es decir, aparentemente cuando hay bajo nivel de glicoproteínas (24 horas de inducción), el receptor que participa es CCR5, por lo que se puede inhibir con 2D7, mientras que CXCR4 no es utilizado. Cuando las células se han inducido 36 horas, la población fusionada decrece 22.4% y a 72 horas un 10%, sugiriendo que bajo la primera condición, la concentración de Env es la óptima para hacer participe a CXCR4.

La molécula CXCR4 sufre procesos de reciclamiento, es decir, se encuentra almacenado en vesículas citoplásmicas y cuando la célula se expone a algún estímulo, por ejemplo de proliferación, CXCR4 es liberado hacia la superficie celular. Después de algunos minutos su concentración declina nuevamente (14). Este reciclamiento puede ser inducido por SDF-1 (el ligando endógeno), y por anticuerpos específicos. En particular, la internalización de complejos CXCR4-anticuerpo, produce la disociación de éstos en el citoplasma, liberando moléculas de CXCR4 a la superficie celular. Este proceso podría evitar que la fusión sea inhibida por anticuerpos anti-CXCR4. Para minimizar esta posibilidad, las

células E6 se preincubaron en frío con el anticuerpo 12G5. En estas condiciones, sin embargo, tampoco se observó inhibición de la fusión por éste anticuerpo, sugiriendo nuevamente, que la cantidad del complejo glicoprotéico es más importante. Es probable que a los tres días de inducción, la concentración del complejo gp120/gp41 sea tan alta que la reacción con el receptor primario CD4, con quien tiene alta afinidad, sea suficiente para promover la fusión, siendo el correceptor innecesario o sólo parcialmente utilizado.

Los resultados de los ensayos en los que el heparán y condroitín sulfato se hidrolizaron para dar mayor acceso al correceptor, indican que la falta de actividad inhibitoria de la fusión por el anticuerpo 12G5, no se debe a un impedimento de tipo estérico de éstos proteoglicanos sobre la interacción del anticuerpo con CXCR4. De nuevo, ésta observación es compatible con una participación marginal del correceptor en la fusión. También, observamos que ninguno de éstos proteoglicanos participa en el mecanismo de fusión célula-célula, ya que el porcentaje de fusión obtenido con las células tratadas y no tratadas enzimáticamente, fue similar.

Además del anticuerpo 12G5 cuyo epítopo se encuentra localizado en el primero y segundo loop extracelular de CXCR4, se probó la actividad inhibitoria del anticuerpo monoclonal A145. El epítopo de éste segundo monoclonal se encuentra localizado en la región extracelular amino terminal del correceptor. Este anticuerpo produjo el mayor porcentaje de inhibición de la fusión (37.3%). No hubo efecto sinérgico con el anticuerpo 12G5. Estos datos indican que el extremo amino terminal de la molécula CXCR4 es la que participa principalmente en la fusión, mientras que las primera y segunda horquilla lo hacen sólo marginalmente. Se ha reportado que el anticuerpo A145 tiene una baja capacidad para inhibir la infección viral (49). Nuestras observaciones indican, sin embargo, que la fusión célula-célula podría ser más eficientemente inhibida por A145 que la fusión virus-célula.

En resumen, la participación de CXCR4 en el proceso de fusión depende de la concentración de Env, ya que cuando ésta se eleva, aparentemente el correceptor es innecesario. Alternativamente, otros correceptores podrían estar involucrados en la fusión, como lo han sugerido estudios de fusión virus-célula, donde el anticuerpo 12G5 no siempre inhibe la infección celular (30). Adicionalmente, cabe la posibilidad de que CXCR4 esté participando en la fusión celular y que los anticuerpos 12G5 y A145 se unan a epítopes de poca afinidad con gp120 y por lo tanto poco importantes para inducir la fusión, de tal forma que sean otras secuencias las que medien con mayor eficiencia el proceso. Un estudio sobre la conformación del receptor CXCR4, muestra que esta puede ser variable dependiendo del tipo de célula que lo expresa, de tal forma que la actividad de un anticuerpo dirigido contra éste receptor depende de la célula sobre la cual se pruebe (2). Por lo tanto, podríamos sugerir que la línea celular Jurkat tiene modificado conformacionalmente a CXCR4, de tal forma que no une a 12G5, aunque sí participa en la fusión celular.

Dada la dependencia del efecto de 12G5 de la expresión de Env descrita antes, nuestros resultados son congruentes con la hipótesis de que la participación de CXCR4 en la fusión está condicionada por el nivel de expresión de Env.

## VIII. CONCLUSIONES

- La magnitud de la fusión célula-célula mediada por las proteínas de envoltura del VIH (gp120/gp41), es dependiente de la concentración de éste complejo expresado en la membrana celular.
- La fusión se puede inhibir completamente con anticuerpos anti-CD4 y parcialmente con anticuerpos anti-correceptor. Por lo tanto, este proceso depende estrictamente de la molécula CD4 y sólo parcialmente del correceptor CXCR4.
- El uso de CXCR4 depende de la concentración del complejo Env expresado en la membrana, ya que si ésta es elevada, la dependencia de la fusión del correceptor se reduce.
- El reciclamiento del correceptor CXCR4 no es causa de su intervención parcial en la fusión célula-célula.
- La participación del correceptor CXCR4 en el proceso de fusión celular depende aparentemente de su extremo amino terminal, ya que el anticuerpo A145 inhibió mayor porcentaje de la fusión.
- Los proteoglicanos heparán y condroitín sulfato no afectan la interacción entre gp120 viral y CXCR4, ya que no se observó actividad inhibitoria de la fusión por el anticuerpo 12G5 cuando se hidrolizaron éstas moléculas.



## IX. APÉNDICE

### Características del virus y estructura

El VIH es un virus envuelto cuyo genoma está codificado por RNA y depende de la enzima transcriptasa reversa para codificar su genoma a DNA; consta de dos cadenas de RNA de sentido positivo de 9.2 kb cada una, asociadas a proteínas para darle estabilidad. Este complejo nucleoprotéico está protegido por una cápside que a su vez es recubierta por una bicapa de fosfolípidos que proviene de la membrana de la célula huésped (figura 1).

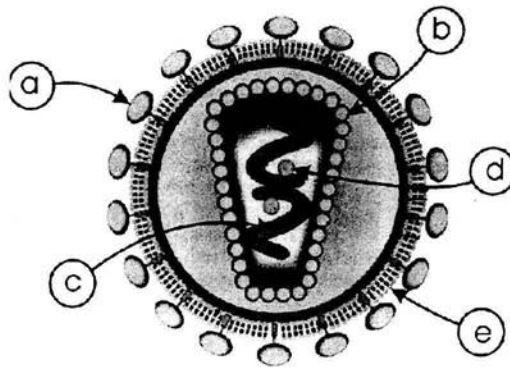


Figura 1. Estructura del VIH, a. Complejo gp120/gp41, b. Core, c. RNA, d. Transcriptasa reversa, e. Envoltura lipídica

Su genoma está limitado en los extremos por secuencias de repeticiones terminales largas (LTR) que regulan la integración y la expresión del DNA viral (fig. 2); estas secuencias tienen afinidad por factores de transcripción de la célula huésped, favoreciendo la expresión de las proteínas virales (15).

El VIH tiene los tres genes estructurales característicos de los retrovirus: *gag*, *pol*, *env*.

El gen *gag* codifica un precursor que se escinde en 4 proteínas que forman la estructura de la cápside; *pol* expresa un precursor que genera las enzimas proteasa, útil cuando se expresan proteínas precursoras, endonucleasa para integrar el DNA viral en el genoma del huésped y la transcriptasa reversa que es la polimerasa que transcribe el RNA a DNA. El gen *env* también expresa un precursor (gp160) que genera las proteínas glicosiladas gp120 y gp41 que se anclan en la envoltura lipídica y son las encargadas de los procesos de fusión celular.

Otras proteínas de gran importancia en la regulación de la infección viral son expresadas por genes que también constituyen el genoma del VIH, entre ellos *rev*, *tat*, *nef*, *vpu*, *vif* y *vpr*.

Tat es una proteína que hace eficaz la transcripción al unirse a una secuencia de iniciación en LTR, y se ha demostrado in vitro que su ausencia empobrece el proceso de elongación. La proteína Rev tiene afinidad por el RNA al reconocer una secuencia específica dentro de la estructura del gen *env*, favoreciendo su transporte fuera del núcleo y facilitando de esta manera la traducción del RNA. Nef también es llamada "factor negativo" por su capacidad de aumentar o disminuir la capacidad de replicación viral, además de reducir la expresión de MHC clase I y del receptor CD4, lo cual afecta la activación de las células T. Vif se puede encontrar acumulada en el citoplasma y en la membrana plasmática de las células infectadas; tiene la capacidad de incrementar la infectividad del virus. Vpr causa el arresto

de la célula huésped en la etapa G2 del ciclo celular y la proteína Vpu participa en la liberación del virus de la célula huésped y en la hidrólisis de los complejos gp160-CD4 formados intracelularmente.

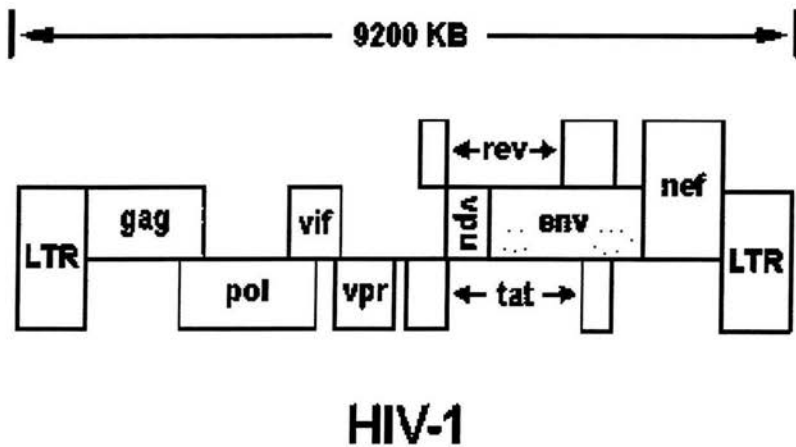


Figura 2. Estructura del genoma del VIH, tiene los tres genes característicos de los retrovirus (gag, pol y env), además de los reguladores presentes en los lentivirus (vif, nef, tat, rev, vpu, vpr).

### CICLO DE INFECCIÓN DEL VIH

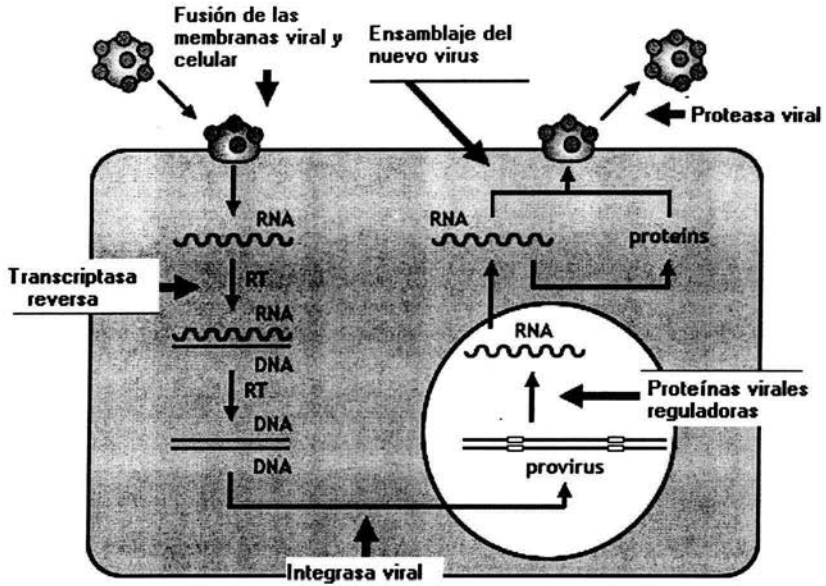


Figura 3. Ciclo de infección del VIH. El primer paso es la interacción entre gp120 viral y el receptor CD4 de la célula blanco que desencadena el proceso de fusión de membranas que le permite al virus "inyectar" su material genético (RNA). Su genoma se transcribe a DNA por medio de la transcriptasa reversa y posteriormente se incorpora al genoma humano por medio de la integrasa; son las proteínas reguladoras las encargadas de modular la expresión protéica para finalmente ensamblar una nueva progenie viral.

## BIBLIOGRAFIA

1. Alcami, A., Koszinowski, H., 2000. Viral mechanisms of immune evasion. *Trends in microbiology*, 8:410-418
2. Baribaud, F., Edwards, T., Sharron, M., Brelot, A., Heveker, N., Price, K., Mortari, F., Alizon, M., Tsang, M., Doms, R. 2001. Antigenically distinct conformations of CXCR4. *J. Virol.* 75:8957-8967.
3. Berndt, C., Möpps, B., Angermüller, S., Gierschik, P., Krammer, P. 1998. CXCR4 and CD4 mediate a rapid CD95-independent cell death in CD4+ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:12556-12561.
4. Blaak, H., Van't Wout, A., Brouwer, M., Hooibrink, B., Hovenkamp, E., Schuitemaker, H. 2000. In vivo HIV-1 infection of CD45RA+ CD4+ T cells is established primarily by syncytium-inducing variants and correlates with the rate of CD4+ T cell decline. *PNAS, Microbiol.* 97:1269-1274.
5. Blumenthal, R., Gallo, S., Viard, M., Raviv, Y., Puri, A. 2002. Fluorescent lipid probes in the study of viral membrane fusion. *Chem. and phys. of lipids.* 116:39-55.
6. Bobardt M., Saphire A., Hung H., Yu X., Van der Schueren B., Zhang Z., David G., Gallay P. 2003. Syndecan captures, protects, and transmits HIV to T lymphocytes. *Immunity.* 18:27-39.
7. Cao, J., Park, Y., Cooper, A., Sodroski, J. 1996. Molecular determinants of acute single-cell lysis by human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 70:1340-1354.
8. Chesebro, B., Wehrly, K. 1998. Development of a sensitive quantitative focal assay for human immunodeficiency virus infectivity. *J. Virol.* 62:3779-3788.
9. Crise, B., Buonocore, L., Rose, J. 1990. CD4 is retained in the endoplasmic reticulum by the human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein precursor. *J. Virol.* 64:5585-5593.

10. DeVita V., Hellman S., Rosenberg S. SIDA Etiología, Diagnóstico, Tratamiento y Prevención. Ed. Salvat Editores; España, 1990, p.
11. Eckert, D., Kim, P. 2001. Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. *Annu. Rev. Biochem.* 70:777-810.
12. Evans, D., McKeating, J., Meredith, J., Burke, K., Katrat, K., John, A., Ferguson, M., Minor, P., Weiss, R., Almond, J. 1989. An engineered poliovirus chimaera elicits broadly reactive HIV-1 neutralizing antibodies. *Letters to Nature* 339:385-387.
13. Finnegan C., Berg W., Lewis G., DeVico A. 2002. Antigenic Properties of the human immunodeficiency virus transmembrane glycoprotein during cell-cell fusion. *J. Virol.* 76:12123-12134.
14. Förster, R., Jremmer, E., Schubel, A., Breitfeld, D., Kleinschmidt, A., Neri, C., Bernhardt, G., Lipp, M. 1998. Intracellular and surface expression of the HIV-1 coreceptor CXCR4/Fusin on various leukocyte subsets: rapid internalization and recycling upon activation. *J. Immunol.* 160:1522-1531.
15. Franchini, G., Gurgo, C., Guo, H., Gallo, R., Collalti, E., Fagnoli, K., Hall, L., Wong-Staal, F., Reitz, M. 1987. Sequence of simian immunodeficiency virus and its relationship to the human immunodeficiency viruses. *Nature.* 328(6130):539-43.
16. Gallo R., Wong-Staal F. *Retrovirus biology and human disease.* Ed. Marcel Dekker, inc. New York and Basel, USA; 1990, 241-284.
17. Gallo S., Finnegan C., Virad M., Raviv Y., Dimitrov A., Rawat S., Puri A., Durell S., Blumenthal R. 2003. The HIV Env-mediated fusion reaction. *Biochim. Biophys. Acta* 1614:36-50.
18. Hardingham T., Fosang A. 1992. Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J.* 6:861-70.

19. Hoxie, K., Alpers, J., Rackowki, J., Huebner, K., Haggarty, B., Cedarbaum, A., Reed, K. 1986. Alterations in T4 (CD4) protein and mRNA synthesis in cells infected with HIV. *Science*. 234:1123-1127.
20. Huerta, L., Lamoyi, E., Báez, A., Larralde, C. 2002. Human immunodeficiency virus envelope-dependent cell-cell fusion: A quantitative fluorescence cytometric assay. *Cytometry* 47:100-106.
21. Jekle, A., Keppler, O., De Clercq, E., Schols, D., Weinstein, M., Goldsmith, A. 2003. In vivo evolution of human immunodeficiency virus type 1 toward increased pathogenicity through CXCR4-mediated killing of uninfected CD4 T cells. *J. Virol.* 77:5846-5854.
22. Johnson, D., Hubert, M. 2002. Directed Egress of animal viruses promotes cell-to-cell spread. *J. Virol.* 76:1-8.
23. Kanki, P., Barin, F., M'Boup, S., Allan, K., Romet-Lemonne, J., Marlink, R., McLane, M., Lee, T., Arfeuille, B., Denis, F, et al. 1986. New human T-lymphotropic retrovirus related to simian T-lymphotropic virus type III (STLV-IIIAGM). *Science*. 232(4747):238-43.
24. Kozak S., Headr J., Kabat D. 2002. Segregation of CD4 and CXCR4 into distinct lipid microdomains in T lymphocytes suggests a mechanism for membrane destabilization by human immunodeficiency virus. *J. Virol.* 76:1802-15.
25. LaBonte, J., Patel, T., Hofmann, W., Sodroski, J. 2000. Importance of membrane fusion mediated by human immunodeficiency virus envelope glycoproteins for lysis of primary CD4-positive T cells. *J. Virol.* 74:10690-10698.
26. Larralde C., Huerta L. 1996. Network between main protagonists and events leading to AIDS. *Archives of Medical Research.* 27:107-113.
27. Lee B., Sharron M., Montaner L., Weissman D., Doms R. 1999. Quantification of CD4, CCR5, and CCR4 levels on lymphocyte subsets, dendritic cells, and differentially conditioned monocyte-derived macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:5215-5220.

28. Lohse, D., Linhardt, R. 1992. Purification and characterization of heparin lyases from *Flavobacterium heparinum*. J. Biol. Chem. 267:24347-24355.
29. Mañes S., Del Real G., Lacalle R., Lucas P., Gómez-Moutón C., Sánchez-Palomino S., Delgado R., Alcamí J., Mira E., Martínez-A C. 2000. Membrane raft microdomains mediate lateral assemblies required for HIV-1 infection. EMBO reports. 2:190-196.
30. McKnight A., Wilkinson D., Simmons G., Talbot S., Picard L., Ahuja M., Marsh M., Hoxie J., Clapham P. 1997. Inhibition of human immunodeficiency virus fusion by a monoclonal antibody to a coreceptor (CXCR4) is both cell type and virus strain dependent. J. Virol. 71:1692-96.
31. Mondor, Y., Moulard, M., Ugolini, S., Klasse, P., Hoxie, J., Amara, A., Delaunay, T., Wyatt, R., Sodroski, J., Sattentau, Q. 1998. Interactions among HIV gp 120, CD4, and CXCR4: Dependence on CD4 expression level, gp 120 viral origin, conservation of the gp 120 COOH- and NH<sub>2</sub>- Termini and V1/V2 and V3 loops and sensitivity to neutralizing antibodies. Virol. 248:349-405.
32. Moulard, M., Lortat, H., Mondor, Y., Roca, G., Wyatt, R., Sodroski, J., Zhao, L., Olson, W., Kwong, P., Sattentau, Q. 2000. Selective interactions of polyanions with basic surfaces on human immunodeficiency virus type 1 gp 120. J. Virol. 74:1948-1960.
33. Murphy S., Sylwester A., Kennedy R., Soll D. 1995. Phagocytosis of individual CD4+ T cells by HIV-induced T cell syncytia. AIDS Res. and Human Ret. 11:433-42.
34. Olson W., Rabut G., Nagashima K., Tran D., Anselma D., Monard S., Segal J., Thompson D., Kajumo F., Guo Y., Moore J., Maddon P., Dragic T. 1999. Differential inhibition of human immunodeficiency virus type 1 fusion, gp120 binding, and CC-chemokine activity by monoclonal antibodies to CCR5. J. Virol. 73:4145.
35. Oreste J. 2000. In vivo cytolysis and fusion of human immunodeficiency virus type 1-infected lymphocytes in lymphoid tissue. J. Infect. Dis. 182:338-42.



36. Parks, D., Herzenberg, L., Herzenberg, L. 1989. Flow cytometry and fluorescence activated cell sorting. *Fundamental Immunol.* 2a.ed. p.781-802.
37. Patel, M., Yanagishita, M., Roderiquez, G., Bou-Habib, D., Ora vecz, T., Hascall, V., Norcross, M. 1993. Cell-surface heparan sulfate proteoglycan mediates HIV-1 infection of T-cell lines. *AIDS Res. Human Retrov.* 9:167-174.
38. Pilgrim A., Pantaleo G., Cohen O., Fink L., Zhou J Y., Zhou J. T., Bolognesi D., Fauci A., Montefiori D. J. *Infec. Dis.* 176:924-32.
39. Platt, E., Wehrly, K., Kuhmann, S., Chesebro, B., Kabat, D. 1998. Effects of CCR5 and CD4 cell surface concentrations on infections by macrophagetropic isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 72:2855-2864.
40. Poignard P; Saphire EO; Parren PW; Burton DR. 2001. Gp120: Biologic aspects of structural features. *Annu. Rev. Immunol.* 19:253-274.
41. Posner, M., Hideshima, T., Cannon, T., Mukherjee, M., Mayer, K., Byrn, R. 1991. An IgG human monoclonal antibody that reacts with HIV-1/gp 120, inhibits virus binding to cells and neutralizes infection. *J. Virol.* 146:4325-4332.
42. Raja A., Venturi M., Kwong P., Sodroski J. 2003. CD4 binding site antibodies inhibit human immunodeficiency virus gp120 envelope glycoprotein interaction with CCR5. *J. Virol.* 77:713-18.
43. Roderiquez, G., Oravec, T., Yanagishita, M., Chequer, D., Bou-Habib, Mostowski, H., Norcross, M. 1995. Mediation of human immunodeficiency virus type 1 binding by interaction of cell surface heparan sulfate proteoglycans with the V3 region of envelope gp120-gp41. *J. Virol.* 69:2233-2239.
44. Rosenzweig, M., Connole, M., Forand-Barabasz, A., Tremblay, M., Johnson, P., Lackner, A. 2000. Mechanism associated with thymocyte apoptosis induced by simian immunodeficiency virus. *J. Immunol.* 165:3461-3468.

45. Sattentau, Q., Dalgleish, A., Weiss, R., Beverley, P. 1986. Epitopes of the CD4 antigen and HIV infection. *Science*. 234:1120-1122.
46. Shutt D., Jenkins L., Carolan E., Stapleton J., Daniels K., Kennedy R., Soll D. 1998. T cell syncytia induced by HIV release T cell chemoattractants: demonstration with a newly developed single cell chemotaxis chamber. *J. Cell Sci.* 111:99-109.
47. Sylwester A., Murphy S., Shutt D., Soll D. 1997. HIV-induced T cell syncytia are self-perpetuating and the primary cause of T cell death in culture. *J. Immunol.* 158:3996-4007.
48. Sylwester A., Wessels D., Anderson S., Warren R., Shutt D., Kennedy R., Soll D. 1993. HIV-induced syncytia of a cell line form single giant pseudopods and are motile. *J. Cell Sci.* 106:941-953.
49. Tanaka R., Yoshida A., Murakami T., Baba E., Lichtenfeld J., Omori T., Kimura T., Tsurutani N., Fujii N., Wang Z., Peiper S., Yamamoto N., Tanaka Y. 2001. Unique monoclonal antibody recognizing the third extracellular loop of CXCR4 induces lymphocyte agglutination and enhances human immunodeficiency virus type 1-mediated syncytium formation and productive infection. *J. Virol.* 75:11534-11543.
50. Valente S., Chanel C., Dumonceaux J., Olivier R., Marullo S., Briand P., Hazan U. 2001. CXCR4 is down-regulated in cells infected with the CD4-independent X4 human immunodeficiency virus type 1 isolate m7NDK. *J. Virol.* 75:439-447.
51. Vereb G., Szöllösi J., Matkó J., Farkas T., Vigh L., Mátyus L., Waldmann T., Damjanovich S. 2003. Dynamic, yet structured: the cell membrane three decades after the Singer-Nicholson model. *PNAS*, 100(14):8053-8058.
52. Vermes I., Haanen C., Reutelingsperger C. 2000. Flow cytometry of apoptotic cell death. *J. Immunol. Methods.* 243:167-190.
53. Xiao-Nan, D., Yi Xiao, Dierich, M., Chen, Y. 2001. N- and C-domains of HIV-1: mutation, structure and functions. *Immunol. Letters.* 75:215-220.