



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

CITOMETRIA DE FLUJO APLICADA AL ESTUDIO DE LA
FUSION CELULAR MEDIADA POR LAS PROTEINAS DE
ENVOLTURA DEL VIH: EFECTO DE LA COMBINACION DE
CARBOCIANINAS LIPOFILICAS FLUORESCENTES SOBRE LA
MAGNITUD, ESPECIFICIDAD Y ESTEQUIOMETRIA DE LA
FUSION

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A

NAYALI ALEJANDRA LOPEZ BALDERAS



MEXICO, D.F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

2004



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.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Jurado asignado:

Presidente	Prof. Saturnino de León Chapa
Vocal	Prof. Patricia Elvira Berrón Ruíz
Secretario	Prof. Leonor Huerta Hernández
1er sup.	Prof. Enrique Ortega Soto
2do sup.	Prof. Rosa Elena Sarmiento Silva

Esta tesis se desarrolló en el
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
Departamento de Inmunología, UNAM



Leonor Huerta Hernández
Asesor



Nayali Alejandra López Balderas
Sustentante

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Nayali Alejandra
López Balderas

FECHA: 10-marzo-2004

FIRMA: Nayali L.

Quiero dedicar esta tesis
a mi Mamá
por todo lo que hizo por nosotros
en todos estos años.
Gracias

AGRADECIMIENTOS.

A Leonor Huerta por su tiempo y enseñanzas durante la elaboración de esta tesis.

Al Dr. Carlos Larralde por sus consejos.

Al Dr. Lamoyi por su apoyo, paciencia, críticas y amplios conocimientos brindados.

A mis compañeras de laboratorio y a la señora Chuy por mantener bonito nuestro lugar de trabajo.

A CONACYT por la beca otorgada en el proyecto: 40413.

Al Prof. Saturnino de León y a la Prof. Patricia Berrón por tomarse el tiempo para revisar esta tesis.

A mis hermanos y a Jose por su confianza.

A Pablo por su cariño, paciencia y apoyo en todo momento.

A mi amiguita Aida, a Carlitos, Guadalupe, Ene, Jimena y Alicia por hacer mi estancia en la Facultad mucho más agradable.

A mis amigas de toda la vida: Norma, Cata y Yadira por los momentos vividos.

Y a todas esas personas que fueron importantes en algún momento determinado de mi vida.

CONTENIDO

1. CONTENIDO.....	i
2. ABREVIATURAS.....	iii
3. RESUMEN.....	iv
4. ANTECEDENTES.....	1
CAPITULO I. FUSIÓN CELULAR Y VIH.	
4.1.1. Características generales el Virus de la Inmunodeficiencia Humana.....	1
4.1.2. Virus de la Inmunodeficiencia Humana y SIDA.....	3
4.1.3. Ciclo replicativo	8
4.1.4. Proteínas de fusión.....	11
4.1.5. Patogénesis de la infección por VIH.....	14
4.1.6. Fusión celular.....	15
4.1.7. Fusión celular " <i>in vitro</i> "	17
4.1.8. Fusión celular " <i>in vivo</i> "	19
CAPITULO II. CITOMETRÍA DE FLUJO.	
4.2.1. Citometría de flujo.....	21
4.2.2. Cuantificación de la fusión celular por citometría de flujo.....	23
CAPITULO II. CARBOCIANINAS LIPOFILICAS.	
4.3.1. Características generales de las carbocianinas lipofílicas.....	24

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	26
6. OBJETIVOS.....	27
7. HIPÓTESIS.....	28
8. MATERIAL Y METODOS.....	29
8.1.Células.....	29
8.2.Inducción de la expresión de las proteínas de fusión.....	30
8.3.Marcaje de las células.....	33
8.4.Experimento de fusión.....	29
9. RESULTADOS.....	35
9.1.Fusión con los dos tipos de marca.....	35
9.2.Experimento de doble marca.....	36
9.3.Fusiones con concentraciones variables de DiO.....	39
9.4.Estequiometría.....	42
9.5.Efecto de los colorantes.....	47
9.6.Curva de inhibición con anticuerpo anti-CD4.....	49
10. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	51
11. CONCLUSIONES.....	54
12. ANEXO I. Solución stock de los fluorocromos DiO y Dil.....	55
13. ANEXO II. Solución del Buffer de Fosfatos 10X.....	56
14. BIBLIOGRAFÍA.....	57

ABREVIATURAS

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana.

VIH-1: Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1.

VIH-2: Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 2.

Dil: 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina perclorato. (DiIC₁₈(3))

DiO: 3,3'-dioctadeciloxocarbocianina perclorato. (DiOC₁₈(3))

Env: Glicoproteínas de envoltura del virus de la inmunodeficiencia humana

IS: Cepas de VIH-1 inductoras de sincicios en cultivos celulares establecidos

NIS: Cepas de VIH-1 no inductoras de sincicios en cultivos celulares establecidos

HXBc2-DiO: Células Jurkat de la línea celular HXBc2 marcadas con colorante DiO

HXBc2-Dil: Células Jurkat de la línea celular HXBc2 marcadas con colorante Dil

E6-DiO: Células Jurkat de la clona E6-1 marcadas con el colorante DiO

E6-Dil: Células Jurkat de la clona E6-1 marcadas con el colorante Dil

522-DiO Células Jurkat de la línea celular 522 marcadas con colorante DiO

522-Dil Células Jurkat de la línea celular 522 marcadas con colorante Dil

RESUMEN

El receptor primario para el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) es la molécula CD4, lo que le permite infectar linfocitos T CD4+, macrófagos y células dendríticas. Las células infectadas expresan sobre su superficie las proteínas de la envoltura viral (complejo gp120/gp41). La expresión de las proteínas de envoltura de ciertas variantes del VIH-1 les confiere la capacidad de interactuar y fusionarse con células circundantes CD4+ no infectadas, esta fusión conduce a la formación de células gigantes multinucleadas (sincicios). La fusión celular constituye una forma de transmisión viral célula-célula y un mecanismo de daño para las células que son incorporadas en las fusiones, además existe amplia evidencia de que la emergencia de virus inductores de sincicios en los pacientes infectados por el VIH se asocia al aumento en la tasa de decaimiento de células CD4+ y el deterioro en la condición clínica de los mismos. A pesar de esto, la trascendencia de la fusión celular de linfocitos T CD4+ y los mecanismos patogénicos asociados a la misma durante la patogénesis del SIDA, no han sido evaluados.

En el grupo de investigación donde se llevó a cabo esta tesis, diseñó un método para el estudio de la fusión celular mediada por las proteínas de envoltura (gp120/gp41) del VIH, utilizando para ello las líneas celulares transfectadas tipo Jurkat HXBc2 y 522 que expresan las proteínas de envoltura en la membrana celular, y como célula blanco la clona Jurkat E6-1 (CD4+CXCR4+). Las células se marcan diferencialmente con colorantes lipofílicos fluorescentes denominados DiO y Dil (que emiten fluorescencia verde y roja respectivamente), se colocan en cocultivo y después de un periodo de incubación los productos de fusión son cuantificados por citometría de flujo como partículas con doble fluorescencia.

Empleando este método, se encontró que la población fusionada presenta una mayor intensidad de fluorescencia roja que la población no fusionada, por lo que el objetivo en este estudio es determinar si este incremento se debe a una interacción

entre los colorantes empleados o a la incorporación desigual de las células en las fusiones.

En este estudio se determinó que ocurre un fenómeno de transferencia de energía (FRET) entre los fluorocromos empleados, lo cual favorece la identificación de las fusiones permitiendo diferenciarlas de los agregados celulares.

Asimismo, se encontró que la incorporación de los colorantes favorece de manera importante la fusión (hasta un 150%). Este efecto se observa principalmente cuando esta marcada la célula que expresa las proteínas de envoltura (HXBc2). Notablemente este incremento no altera la especificidad de la fusión.

Finalmente, en nuestras condiciones experimentales observamos la incorporación de un mayor número de células blanco CD4+CXCR4+ (E6) que células expresando las proteínas de la envoltura del VIH (HXBc2) en los sincicios, lo cual implica que este efecto podría ser un mecanismo de amplificación de daño celular debido a la fusión.

Estos hallazgos apuntan a una influencia de las interacciones proteína-lípido en la capacidad fusogénica de células infectadas por el VIH y posibilitarán el estudio de las consecuencias biológicas.

4.1.1 Características generales del Virus de la Inmunodeficiencia Humana

El Virus de la Inmunodeficiencia humana (VIH) es el agente causal de una compleja serie de anormalidades inmunológicas cuya consecuencia final es el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA).

El VIH pertenece a la familia *Retroviridae* y es clasificado en el género Lentivirus.

La partícula viral está comprendida de una cápside rodeada por una membrana lipídica proveniente de la célula huésped en la cual se insertan las glicoproteínas de envoltura. La cápside contiene el ARN viral, además de las enzimas transcriptasa reversa e integrasa (FIG 1). Las características que exhibe en microscopía electrónica revelan un virus envuelto con 100 a 120 nm de diámetro con una cápside en forma de cono.

El genoma consiste de dos hebras de RNA sencillas de polaridad positiva y codifica para los genes estructurales: gag (proteínas de cápside), pol (genes replicativos) y env (glicoproteínas de envoltura, gp120/gp41); para los genes regulatorios: tat y rev; y para genes accesorios (mutaciones en estos genes no eliminan la capacidad de replicación viral en líneas celulares establecidas) vif, vpr, nef, vpu o vpx.

Existen dos tipos de VIH, el VIH tipo 1 (VIH-1) y el VIH tipo 2 (VIH-2); VIH-1 está distribuido alrededor del mundo, mientras que el VIH-2 está limitado al oeste de África (Grant, 2002).

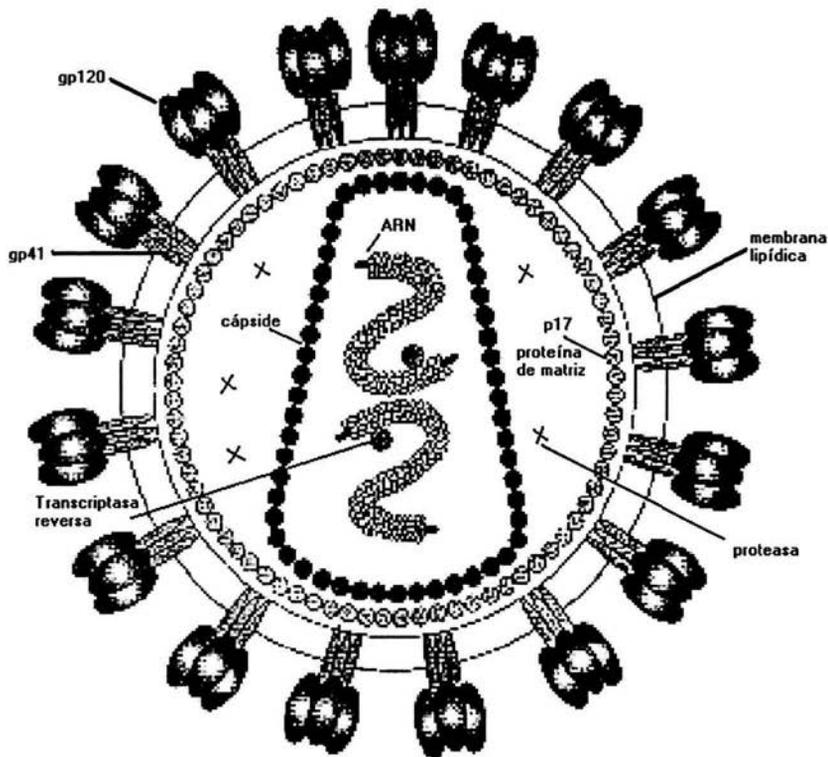


FIG 1. Organización de una partícula viral madura

El receptor primario para el VIH es la molécula CD4, el cual es miembro de la súper familia de inmunoglobulinas (Ig), esta compuesto por un dominio citoplasmático, una región hidrofóbica que atraviesa la membrana y cuatro dominios extracelulares (D1 a D4), funciona normalmente para estabilizar la interacción entre el receptor de células T en la superficie del linfocito T y el complejo Mayor de Histocompatibilidad clase II (MHC II) en la superficie de células presentadoras de antígeno. La distribución de este receptor le permite al VIH infectar no solo linfocitos T CD4+, sino también células centrales en la presentación de antígeno como macrófagos y células dendríticas (Stevenson, 2003).

4.1.2 Virus de la Inmunodeficiencia Humana y SIDA

El Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) es la manifestación más grave de la infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH). El mejor marcador de SIDA es la destrucción de linfocitos T CD4+ y una subsecuente pérdida de la competencia inmune (Fouchier, 1996).

El Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) enumera diversas infecciones oportunistas y clases de cáncer que, en caso de infección por el VIH, constituyen un diagnóstico de SIDA. En 1993, ampliaron el diagnóstico de SIDA en adolescentes y adultos al incluir un recuento de linfocitos T CD4+ de 200 o menos por microlitro.

EPIDEMIOLOGIA.

El primer caso de SIDA en los Estados Unidos se observó en 1968, pero fue hasta 1981 que la CDC (El Centro para el control y Prevención de Enfermedades) reconoció los primeros casos al publicar un reporte de cinco jóvenes homosexuales que presentaban infecciones de *Pneumocystis carinii* y Sarcoma de Kaposi, para febrero de 1983 más de 1,000 casos habían sido reportados en los Estados Unidos, el agente causal fue aislado de un hombre con linfadenopatía en 1983 en el Instituto Pasteur. Para el inicio del 2001 más de 36 millones de personas en el mundo viven infectados por VIH, y 21.8 millones de muertes han ocurrido debido a la infección por el VIH desde el inicio de la epidemia.

Las diferencias entre cepas de VIH-1 aisladas se encuentran en las propiedades de formar sincicios *in vitro*, antígenos de superficie y secuencia genética. Subtipos genéticamente distintos de VIH-1 fueron clasificados en tres grupos: M (principal), O (outlier) y N (Nuevo). El grupo M incluye casi el 95% de los virus aislados globalmente y han sido clasificados en subclases (A - J) basados en

su secuencia completa del genoma viral. La población de virus VIH-1 presentes en un solo individuo pueden variar de 6 a 10% en la secuencia de nucleótidos.

El primate que sirve como reservorios para el VIH-1 aparentemente es el chimpancé *Pan troglodytes*, mientras que para el VIH-2 es el mono sooty mangabey *Cercocebus atys*.

TRANSMISION.

El VIH es transmitido por exposición al virus en la mucosa oral, rectal o vaginal durante el acto sexual; por paso de linfocitos o macrófagos infectados viables en semen o secreciones cervicales, por transfusión de productos sanguíneos infectados, por el uso de equipo contaminado durante inyección o el uso de drogas intravenosas y por circulación materno-fetal.

La transmisión sexual es el modo dominante (cerca de 90% de las infecciones en el mundo). Las enfermedades de transmisión sexual pueden actuar como potenciadores de la infección o incrementar la susceptibilidad a VIH por inflamación en el tracto genital.

HISTORIA NATURAL DE LA INFECCION.

Las características clínicas de la infección dependen de la etapa de la enfermedad, son totalmente variables entre individuos y puede reflejar diferencias en la respuesta inmune del huésped, dosis viral, virulencia, ruta de infección y, velocidad de progresión a SIDA (FIG 2).

Infección Aguda.

Después de la infección muchas personas permanecen asintomáticas, algunas desarrollan linfadenopatía, faringitis, fiebre, mialgia, dolor de cabeza, rash no prurítico, etc, en promedio pueden durar hasta tres semanas y luego desaparecen. En ganglios linfáticos es posible detectar una notable replicación viral días después

de la primera exposición, esta replicación ocasiona una viremia durante la cual existen cifras elevadas de partículas virales.

Infección Asintomática.

No hay evidencia sintomática de la enfermedad pero la prueba serológica contra el VIH es positiva. El virus se replica en el bazo y ganglios linfáticos e inicia la destrucción tisular. Algunos pacientes pueden experimentar fatiga además de linfadenopatía generalizada, fiebres o diarreas que pueden durar hasta 1 mes. Esta etapa de latencia puede durar de 2 a 10 años antes de progresar a SIDA. En esta fase se producen niveles bajos de virus, no obstante la destrucción de células T en tejidos linfoides progresa ininterrumpidamente.

Infección Sintomática.

El desarrollo de síntomas señala progresión a la forma más severa y casi siempre mortal de la infección del SIDA; en la cual hay destrucción del tejido linfóide, la cuenta de Linfocitos CD4+ decrece a niveles de aproximadamente 200 células/ μ L, la viremia puede ascender en forma espectacular ya que la replicación se acelera sin control, los pacientes sufren combinación de infecciones oportunistas, neoplasias, caquexia, insuficiencia renal y degeneración del sistema nervioso central (encefalopatía por SIDA).

DIAGNÓSTICO.

El diagnóstico de laboratorio depende de la detección de anticuerpos contra VIH en el suero, avances recientes permiten detectar provirus en los pacientes conduciendo a una prueba segura y sensible. La prueba comúnmente aplicada es la prueba por ELISA, que es sensible y fácil de hacer pero tiene el problema que puede dar falsos positivos. Una prueba ELISA positiva es confirmada por una repetición de esta y por un Western Blotting, en el cual se detectan anticuerpos contra antígenos de VIH previamente separados por electroforesis en un gel de poliacrilamida.

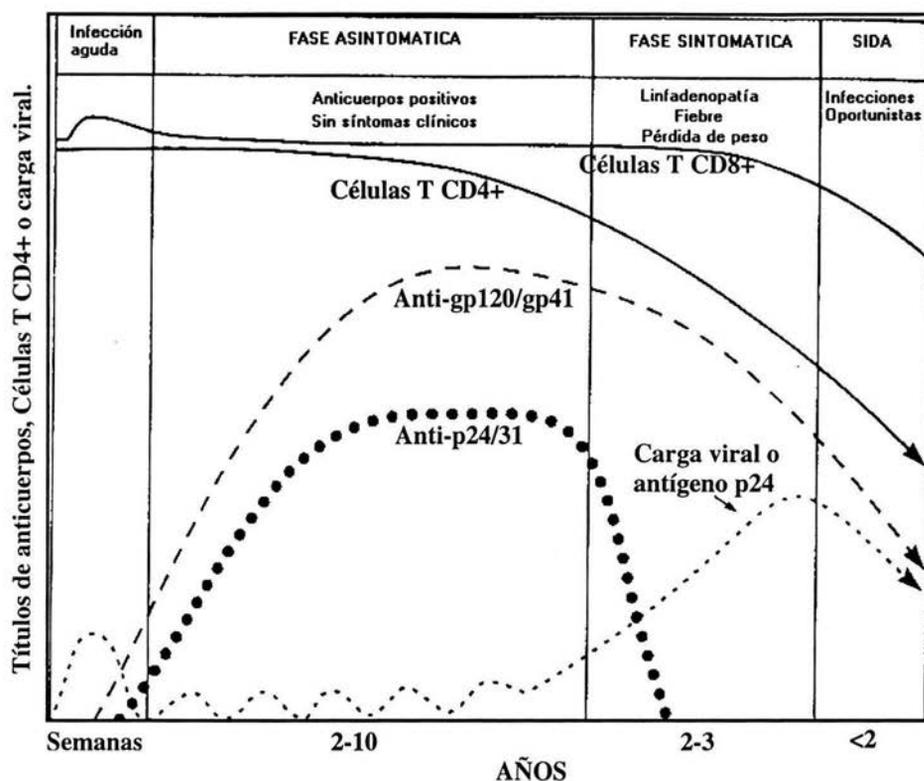


FIG 2. Historia Natural de la infección por VIH. Después de la infección aguda la replicación del virus es controlada y la viremia desciende, en la fase asintomática oscila en valores bajos, en la fase sintomática se incrementa considerablemente. Durante el periodo asintomático el genoma del VIH es detectado en macrófagos, se detectan anticuerpos a antígenos del VIH, en especial anti-gp41, anti-p24. La progresión a SIDA se presenta por el desarrollo de síntomas como fiebre, diarrea, pérdida de peso, etc. disminución en el número de células CD4+ en la sangre, linfadenopatía, presencia de antígenos de VIH en la sangre, disminución de los títulos anti-p24, esta etapa puede durar meses o años, hasta que se presentan las enfermedades oportunistas y se considera SIDA.

Las bandas más importantes son p24, p31(endonucleasa), p41 o gp120/gp160, aproximadamente 0.5% de los pacientes resultan tener resultados indeterminados, pero se seroconvierten dentro de los siguientes seis meses, por lo que el CDC establece que si el Western Blotting continua siendo indeterminado después de seis meses y en ausencia de factores de riesgo conocidos o síntomas clínicos, puede ser considerado como negativo para anticuerpos para VIH.

Algunos otros laboratorios llevan a cabo pruebas complementarias como, detección de antígeno p24 por ELISA, Radioinmunoprecipitación (gp120/gp160), cultivos in vitro para observar efectos citopáticos o detectar la producción de transcriptasa reversa, reacción encadena de la polimerasa (PCR), e hibridación in situ.

TRATAMIENTO

El tratamiento de la infección por VIH y del SIDA consiste en la administración de dos clases de fármacos antirretrovirales que han sido aprobados para su uso en clínica y son utilizados en combinación: Los inhibidores de la transcriptasa reversa e inhibidores de la proteasa viral. Ambos tipos de fármacos se pueden utilizar en monoterapia, y pueden llegar a disminuir los niveles plasmáticos de ARN viral, pero rápidamente emergen cepas resistente, por lo que ahora se utilizan en combinación dos inhibidores diferentes de la transcriptasa reversa y un inhibidor de la proteasa viral, esta terapia se denomina HAART tratamiento antirretroviral de gran actividad (del inglés highly active antiretroviral therapy) llegando a disminuir el ARN plasmático a niveles indetectables en la mayoría de pacientes tratados hasta 3 años.

4.1.3 Ciclo replicativo

El ciclo replicativo del VIH (FIG 3), inicia con la adsorción de partículas virales a la molécula CD4 en la superficie de células susceptibles. Primero interacciona una región de la glicoproteína de envoltura gp120 con un dominio en CD4 en la superficie del linfocito, (el sitio de unión de alta afinidad en CD4 para gp120 ha sido localizado en un pequeño segmento N-terminal del dominio extracitoplásmico) esto provoca un cambio conformacional en gp120, resultando en la unión de otro dominio de ésta con el correceptor, el cual pertenece a la familia de receptores de quimiocinas CC o CXC (múltiples receptores de quimiocinas exhiben actividad en ensayos de fusión con VIH, los dos más importantes son CXCR4 y CCR5). Otra serie de cambios conformacionales permite que una región de gp41 (el péptido de fusión) interactúe con la membrana de la célula blanco, seguido a esto ocurre la fusión de la membrana viral y la membrana plasmática de la célula, liberando la nucleocápside en el citoplasma celular.

Al liberar la nucleocápside en el citoplasma inicia la transcripción reversa del ARN viral, produciendo un híbrido ARN-ADN que es convertido a una molécula de ADN de doble hebra. El producto de la transcripción reversa es transportado a través del citoplasma al núcleo como componente de un complejo de preintegración (PIC). El lentivirus es el único retrovirus en generar PIC's que son activamente transportados en la interface nuclear de las células que no están en división, (arrestadas en fase G0 del ciclo celular).

El DNA de doble hebra sirve como sustrato para la integración de ADN viral al ADN celular catalizado por la enzima viral integrasa. En forma de provirus el VIH puede permanecer latente por meses o años. La activación de células infectadas causa producción de factores de transcripción celular que forman complejos activos con la proteína viral Tat y conduce a la síntesis de polipéptidos precursores de Gag, Pol y Env, los transcriptos son exportados del núcleo al citoplasma por un único

mecanismo de transporte mediado por un transportador codificado por la proteína viral Rev.

La maduración de Env ocurre en el retículo endoplásmico, mientras que las poliproteínas Gag y Gag-Pol la llevan a cabo en ribosomas libres en el citoplasma, estos son transportados vía caminos independientes a la membrana plasmática

Gag, Gag-Pol en asociación con dímeros de ARN genómicos se condensan en la membrana plasmática para formar una zona electrodensa donde las partículas virales comienzan a invaginar de la célula y son liberadas como partículas inmaduras.

El VIH-1 fusiona su membrana con la de la célula blanco e invagina de ella a través de "lipid raft" (microdominios de membrana con una alta concentración de colesterol, esfingolípidos y proteínas asociadas a GPI), lo que le permite incorporar proteínas que se encuentren en estas regiones (como moléculas de adhesión) y/o excluir otras, lo cual podría llegar a afectar la biología del virus (Nguyen, 2000). La palmitoilación y miristilación de gp41 y gag (MA) respectivamente, podrían estar implicados en que las proteínas virales se localicen en estos microdominios de membrana en las células infectadas (Nguyen, 2000).

Una subsecuente proteólisis por la proteasa viral de las proteínas Gag y Pol inmediatamente después de la liberación genera el nucleoide en forma de cono característico de los virus maduros.

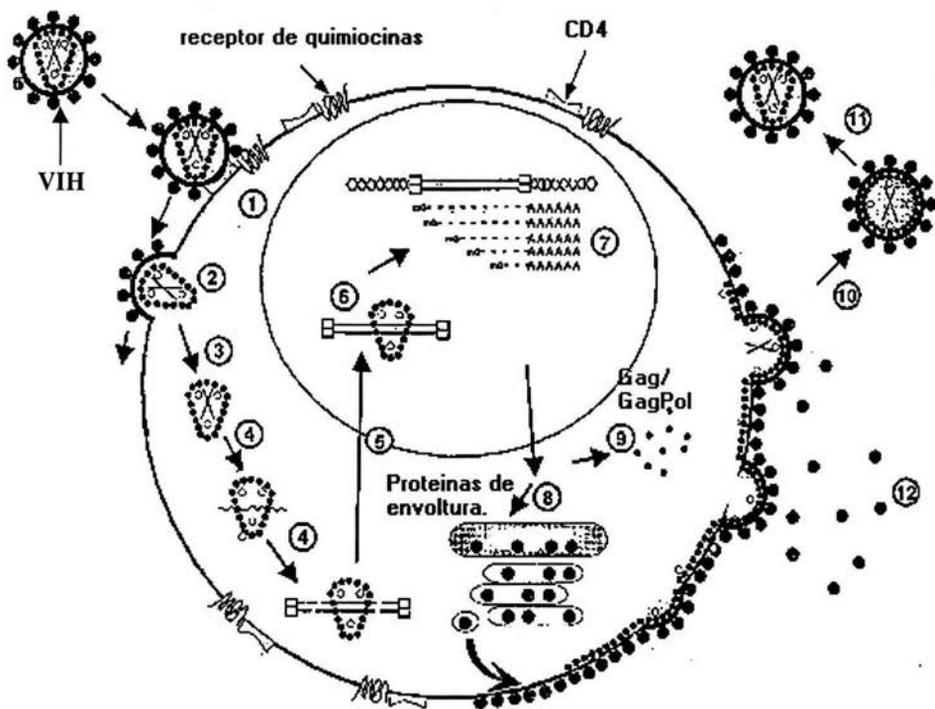


FIG 3. Ciclo de replicación del VIH-1. (1) La infección se inicia con la adsorción de viriones libres a la célula. Interacciona el complejo Env con el CD4 y el receptor de quimiocinas (correceptor). (2) Ocurre la fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática. (3) La nucleocápside es liberada en el citoplasma celular. (4) La transcripción reversa ocurre en la partícula subviral. (5) La doble hebra de ADN sintetizada es transportada al núcleo. (6) El ADN de doble hebra es integrado al ADN cromosomal por la enzima viral integrasa. (7) El ADN viral integrado en el ADN cromosomal sirve como templado para la ARN polimerasa II dependiente de ADN, se producen ARNm que son traducidos a proteínas virales en el citoplasma de las células infectadas. Las poliproteínas Env (8), Gag y Gag/Pol (9) son transportadas vía caminos independientes a la membrana plasmática. (10) Las partículas virales comienzan a invaginar y son liberadas como partículas inmaduras. (11) Una subsecuente proteólisis por la proteasa viral genera partículas maduras, con la cápside característica. (12) gp120 no asociado a viriones puede ser secretado por las células infectadas.

4.1.4 Proteínas de fusión: gp120/gp41

Las glicoproteínas de envoltura (complejo gp120/gp41) juegan un papel muy importante en el ciclo replicativo del virus, ya que contienen los determinantes que interaccionan con el receptor CD4 y el correceptor (CXCR5 o CXR5), y catalizan la fusión entre la bicapa lipídica del virus y la membrana plasmática de la célula blanco.

La capacidad fusogénica de las glicoproteínas gp120/gp41 ha sido consistentemente implicada en efectos citopáticos *in vitro* y la depleción de CD4 *in vivo* (La Bonte, 2003).

Biosíntesis y Transporte.

Es sintetizada de un spliced sencillo de 4.3kb Vpu/Env mRNA bicistronico, la traducción ocurre en ribosomas asociados con el retículo endoplásmico rugoso.

Es sintetizado como un precursor poliproteínico de 160kD (gp160); este precursor es cotraduccionalmente glicosilado y acoplado a una proteína chaperona por medio de uniones disulfuro, experimenta oligomerización en el retículo endoplásmico; el oligomero predominantemente formado es el trímero, pero también se observan dímeros y tetrámeros. Gp160 es transportado al aparato de Golgi donde es proteolíticamente escindida por enzimas celulares a la glicoproteína madura formada por la subunidad de superficie gp120 (SU) y la subunidad transmembranal gp41 (TM).

Las dos subunidades (gp120 y gp41) forman una asociación no covalente que es crítica para el transporte del complejo del aparato de Golgi a la superficie celular.

La glicoproteína de envoltura del VIH-1 se une al CD4 no solo en la fase temprana de infección, sino también durante el transporte de gp160 a la superficie celular, como consecuencia las células infectadas disminuyen el nivel de expresión

del CD4 en su superficie celular, además la proteína viral accesoria Vpu degrada el componente CD4 del complejo gp160-CD4 en el retículo endoplásmico.

Se ha sugerido que las glicoproteínas de envoltura del VIH son incorporadas al virion por medio de una interacción directa entre el complejo Env y la proteína p17 o MA (asociada a membrana, derivada del gene gag) que esta localizada inmediatamente en el interior de la bicapa lipídica del virion.

En la superficie del virion son arreglados en complejos oligoméricos que contienen 3 subunidades de superficie y 3 subunidades transmembranales formando heterotrímeros. En estado nativo, la mayor parte de la superficie expuesta en el complejo Env es la subunidad de superficie gp120 y la mayor parte de la subunidad transmembranal (incluyendo el péptido de fusión) esta no expuesta. Dado que la interacción entre ellas es muy débil una cantidad substancial de gp120 es secretada de la superficie de células expresando Env.

Gp120. La subunidad de superficie esta pesadamente glicosilada. Durante el transporte de su sitio de síntesis en el retículo endoplásmico a la membrana plasmática muchas de las cadenas laterales son modificadas por la adición de complejos azúcares.

Gp120 contiene entremezclados dominios conservados (C1 a C5) y variables (V1 a V5) (FIG 4A). Los residuos de cisteína Cys presentes en gp120 son altamente conservados y forman enlaces disulfuro que enlazan las primeras cuatro regiones variables en grandes loops. El loop V3 es esencial en la reacción de fusión de membranas, ya que mutaciones en este bloquean la formación de sincicios e infección en líneas celulares establecidas, sin perturbar el proceso, transporte y propiedades de unión a CD4 en gp120; la importancia de esta región, aparentemente es su rol en la interacción con el correceptor, por lo que determina el tropismo celular del VIH-1, las cepas de VIH-1 M-trópicas infectan principalmente macrófagos y usan CCR5 como correceptor, mientras que las cepas T-trópicas infectan linfocitos T CD4+ y usan CXCR4.

Gp41. La subunidad transmembranal, esta formada por un dominio citoplásmico; una región transmembranal, y el ectodominio, en el cual se encuentra el péptido de fusión y dos dominios que son muy importantes en el mecanismo de fusión (N-hélice y C-hélice) (FIG 4B), sustituciones no hidrofóbicas en el péptido de fusión, reducen grandemente o bloquean la formación de sincicios y resultan en una progenie de viriones no infectivos.

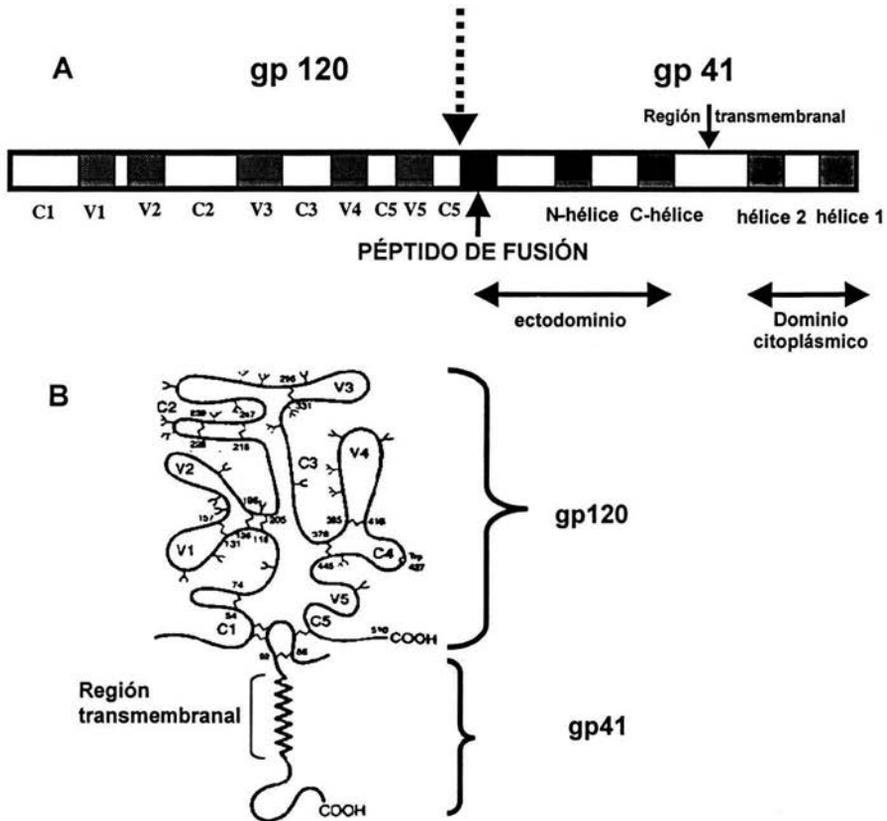


FIG 4. Proteínas de Fusión (gp120/gp41) del VIH. (A) Representación lineal de la glicoproteína Env del VIH. En la subunidad de superficie (gp120) C1...5 representan las regiones conservadas y V1...5 las regiones variables. (B) Interacción entre gp120 y gp41; en forma nativa se encuentran formando heterotrimeros. (3 gp120 y 3 gp41).

4.1.5 Patogénesis de la infección por VIH

La patogénesis de la infección por VIH es un proceso muy complejo y multifactorial. Múltiples mecanismos de muerte celular parecen estar operando después de la infección de una célula CD4+ por el virus.

La depleción de células T CD4 es la característica central y única de la infección por VIH-1, y es grandemente responsable de la profunda inmunodeficiencia característica de las etapas avanzadas de la enfermedad (Chun, 1997).

Desde el conocimiento del SIDA enormes esfuerzos se han hecho para identificar los mecanismos por los cuales el VIH-1 causa la enfermedad, la primera hipótesis es que el VIH-1 provoca la pérdida de células CD4+ debido a la infección directa y muerte de éstas, la segunda hipótesis es que la infección daña indirectamente la función celular de células infectadas y no infectadas (Stevenson, 2003). Los defectos en función y número de linfocitos T CD4+ observados en la infección por VIH pueden ser el reflejo de estos daños celulares directos o indirectos.

Entre los posible mecanismos de disfunción y muerte de células CD4+ se han considerado: Mecanismos directos: Acumulación de ADN viral no integrado, interferencia con el proceso de ARN celular, pérdida de la integridad de la membrana plasmática debido a la gemación de virus, eliminación de células infectadas por respuestas inmunes específicas, entre otras. Mecanismos indirectos: Eventos de señales aberrantes, formación de sincicios, autoinmunidad, muerte de células espectadoras por antígenos virales, inhibición de linfopoyesis, etc.

4.1.6 Fusión celular

La secuencia de eventos que conducen a la formación de células gigantes o sincicios¹ se considera análoga a la que ocurre en la fusión de la membrana viral con la membrana de la célula blanco en la infección por el VIH., sin embargo, se debe considerar que en la fusión célula-célula podrían estar implicadas otras moléculas presentes en las membranas celulares. La formación de sincicios se presenta cuando una célula no infectada que expresan CD4+ y el correceptor se fusiona con una célula infectada expresando las glicoproteínas de envoltura del VIH-1 (gp120/gp41) en su membrana (Gougeon, 2003; La Bonte, 2003; La Bonte 2000; Sodroski, 1986).

La fusión de membranas mediada por las glicoproteínas de envoltura del VIH-1 es un proceso altamente cooperativo, ya que esta estimado que se requieren 4 a 6 correceptores, múltiples CD4 y 3 a 6 trímeros de Env VIH-1 para formar el poro de fusión (Cao, 1996; Hammache, 1999).

La fusión celular (FIG 5A) se da por varias interacciones que conllevan a cambios conformacionales en el complejo gp120/gp41 resultando en la fusión de las membranas: (a) El VIH se une a la superficie de la célula blanco a través de la interacción de gp120 con la molécula CD4, (otras moléculas de adhesión podrían estar participando en la eficiencia de la unión), (b) Cambios conformacionales exponen sitios en la proteína gp120 que le permiten interaccionar con el correceptor (presumiblemente el loop V3), se ha considerado que gp120 puede inducir la reorganización lateral de los microdominios de membrana o "lipid raft", contribuyendo a juntar el complejo gp120-CD4 con el receptor de quimiocina ya que CXCR4 se encuentra principalmente fuera de estas regiones, o bien, que esta asociación podría deberse a cambios en el citoesqueleto inducidos por la interacción CD4-Env, (Mañes, 2000; Virad, 2002), (c) gp41 sufre cambios conformacionales que exponen el péptido

¹ Masa de citoplasma conteniendo varios núcleos delimitados por una sola membrana, este es formado como resultado de fusión de células o series incompletas de ciclos de división celular.

de fusión (en el extremo amino terminal) y forma un intermediario transitorio (pre-horquilla), este intermediario atraviesa las dos membranas; con su región transmembranal atraviesa la membrana viral y con el péptido de fusión la membrana de la célula blanco, (d) Cambios conformacionales en ambos gp120/gp41 debilitan la interacción y se liberan las subunidades de gp120, (e) El intermediario resuelve a formar el complejo de fusión trimérico helicoidal (formado por la N-hélice y C-hélice de gp41) una estructura extremadamente estable en la cual las dos regiones transmembranales terminan ocupando la misma membrana, es decir ocurre la fusión (Ecker, 2001).

La estructura determinada por cristalografía de rayos-X o NMR para el complejo trimérico helicoidal muestran una estructura en la cual los dos dominios helicales (N-hélice y C-hélice) se empaquetan para generar un complejo de seis-hélices (FIG 5B). Las N-hélices forman una hélice enrollada en el centro del paquete, con el C-hélice unido a una ranura hidrofóbica conservada formada por dos N-péptidos (Weng, 2000).

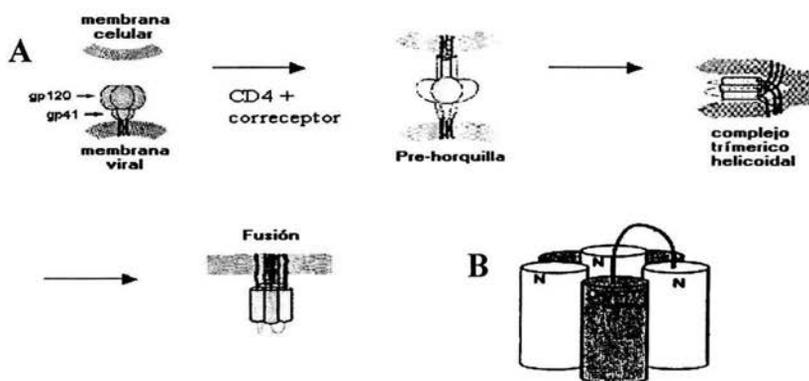


FIG 5. (A) Mecanismo de fusión: El heterotrímero Env interactúa con el CD4 y correceptor, se forma el intermediario (pre-horquilla) que posteriormente de lugar a la estructura más estable: el complejo trimérico helicoidal que pone a las membranas en contacto estrecho hasta llevarse a cabo la fusión. **(B) Estructura propuesta para el trímero helicoidal** formada entre las N-hélices y C-hélices del ectodominio de gp41.

4.1.7 Fusión celular “*in vitro*”

Las primeras características biológicas descritas para la infección por VIH y los primeros efectos citopáticos observados *in vitro* fueron la inducción de sincicios y la muerte celular (Sodroski, 1986).

Ambos efectos citopáticos agudos asociados con la infección de VIH-1 (formación de sincicios y muerte celular) han sido estudiados casi exclusivamente en líneas celulares establecidas (La Bonte, 2000; S  ller, 2001) e involucran la habilidad de las glicoproteínas de envoltura (gp120/gp41) para fusionar membranas celulares (Cao, 1996; Etemad-Moghadam, 2002; La Bonte, 2000).

Ciertas cepas de VIH-1 aisladas son llamadas inductoras de sincicios (IS) a causa de su habilidad para inducir la formación de células gigantes multinucleadas o sincicios en ciertas líneas celulares T *in vitro*, mientras que otras que no tienen esta habilidad son llamadas no inductoras de sincicios (NIS). Existe una considerable relación entre el tropismo a infectar células T CD4+ y el fenotipo IS; y el tropismo por macrófagos con el NIS; también tienen relación con la velocidad de replicación y el tipo de correceptor empleado durante la infección.

Los sincicios observados *in vitro*, exhiben limitada longevidad y experimentan apoptosis (La Bonte, 2000). Incluso se ha observado muerte celular inducida en células infectadas y no infectadas, aunque los resultados en este aspecto muestran ser controversiales.

Se encontró un alto porcentaje de apoptosis en células espectadoras CD4+ que no fueron productivamente infectadas después de la infección con virus que emplean CXCR4 como correceptor, sin embargo, fue dependiente de la interacción del correceptor con gp120. La muerte celular observada en la infección por virus que emplean CCR5 fue poca y restringida grandemente a células productivamente infectadas. (Jekle, 2003).

En cultivos de células Jurkat la muerte de células espectadoras es infrecuente comparado con la muerte de células que expresan gp120/gp41 y la muerte celular es dependiente de la actividad fusogénica del complejo (La Bonte, 2000).

Otros autores ha reportado que la muerte celular ocurre exclusivamente en células expresando Env y no en células espectadoras a menos que éstas sean incorporadas en sincicios letales (La Bonte, 2003). El camino por el cual las células dentro de los sincicios sufren apoptosis no es mediado por el camino de FAS (CD95) o por el Factor de Necrosis Tumoral (aunque las células infectada son más susceptibles a apoptosis por CD95), este se lleva a cabo por mecanismos de daño a la mitocondria (Gougeon, 2003).

Otros autores han considerado que el contacto con las glicoproteínas de envoltura no es suficiente para inducir apoptosis, más bien es transferida de células apoptóticas a no apoptóticas dentro de los sincicios, provocando una amplificación de estas señales incrementando el número de células apoptoticas (Scheller, 1997).

El estudio de la formación de sincicios *in vitro* es entonces de vital importancia para determinar el fenotipo de cepas aisladas de pacientes infectados y analizar su papel en la patogénesis *in vivo*, así como para medir el efecto inhibitorio de posibles tratamientos, anticuerpos, o péptidos, etc.

Otro factor muy importante de considerar, es que la fusión celular ha sido considerada como un mecanismos de infección célula-célula, considerándola incluso más eficiente que la infección virus-célula *in vitro*. Además, *in vivo* le permite al virus infectar nuevas células sin exponerse a anticuerpos neutralizantes (Phillips, 1994).

Un camino alternativo para estudiar la actividad fusogénica de las glicoproteínas de envoltura es expresar estas en la membrana plasmática de una célula y monitorear el resultado usando ensayos de fusión célula-célula sin llevar a cabo una infección con virus (Blumenthal, 2002).

4.1.8 Fusión celular “*in vivo*”

La formación de sincicios ha sido identificada en tejidos de individuos infectados por VIH-1, pero no es una característica histopatológica prominente ni universal (La Bonte, 2003), además estos pueden consistir de pocas células o tener corta vida lo que podrían ser difíciles de identificar (La Bonte, 2000).

El Virus de la Inmunodeficiencia del Simio (SIV) infecta macacos, y estos desarrollan una encefalitis (SIVE) que es patológicamente indistinguible del asociado con infección de VIH-1, con formación de células multinucleadas como la principal manifestación histopatológica (Ryzhova, 2002).

Existe evidencia de la formación de sincicios en muestras de pacientes infectados, por ejemplo, se encontraron fusiones de macrófagos en el SNC y amígdalas, pequeñas células multinucleadas de linfocitos en nódulos linfáticos (Orestein, 2000), formación de células gigantes multinucleadas en tejido linfoide donde las células que participan presentan fenotipo de células dendríticas (Dargent, 2000), también en muestras de colon de pacientes infectados con hiperplasia intestinal se encontraron sincicios de células mononucleares (Lewin-Smith, 1999).

El fenotipo de los virus presentes en un individuo infectado es de gran importancia, pues la infección por VIH-1 es generalmente establecida por cepas de baja replicación, tropismo por macrófagos, determinadas como variantes no inductoras de sincicios que requieren al receptor CCR5 como correceptor (Kaw, 2002), estas cepas predominan durante las etapas tempranas de la infección.

Sin embargo, durante el curso de la infección ocurre un cambio de fenotipo en los virus, en aproximadamente 50% de los individuos infectados, la aparición y predominancia de cepas que usan CXCR4 y con la capacidad de formar sincicios preceden a un rápido decline en el número de células T CD4+ y progresión a la enfermedad clínica.

Se había considerado que las variantes de VIH-1 IS son más citopáticas que las NIS (Fouchier, 1996), sin embargo, se ha demostrado recientemente que son igualmente citopáticas para sus células blanco, excluyendo entonces la diferencia de citopaticidad como explicación para el acelerado decline CD4 después de la emergencia de cepas IS (Kwa, 2002).

Estudios *in vivo*, analizaron la distribución de virus IS y NIS sobre la población de células CD4+ de pacientes infectados, encontrando que las cepas NIS infectan principalmente células de memoria (RO+) y las cepas IS a células de memoria y vírgenes (RO+ y en RA+). Ya que las células vírgenes contribuyen al pool de células de memoria, la muerte de estas puede tener un gran impacto en la renovación de CD4 (Blaak, 2000). Aunado a esto se considera que las células de memoria son más susceptibles a los efectos citopáticas inducidos por el VIH-1 (Chun, 1997).

Esta capacidad de infectar a ambos tipos de células le da a las cepas IS una población blanco mayor que podría ser la diferencia crucial entre las variantes IS y NIS con respecto a su patogenicidad (Blaak, 2000), ya que existe una gran expresión de CXCR4 en el pool de células T por lo que la disminución en la producción o renovación tímica y un incremento en la destrucción de CD4 conllevan a un mayor impacto en la depleción CD4 en las cepas IS que para las cepas NIS (Fouchier, 1996; Jekle, 2003; Kwa, 2002).

En la infección por VIH-2 la progresión a la enfermedad es menor que en VIH-1, con un limitado impacto en la forma de vivir de la mayoría de pacientes infectados, a pesar de que las dos infecciones tiene un desbalance similar en la proporción de células de memoria/vírgenes (Sousa, 2002).

En modelos *in vivo* el fenotipo de la cepa de virus tiene relación con su capacidad patogénica.

En monos infectados por cepas SHIV-patógenas,(Quimeras de VIH y SIV, el SHIV contiene segmentos que codifican para las proteínas de envoltura, Tat, Rev, Vpu del VIH y el resto de las proteínas son del SIV) se observó un precipitado y

profundo decline de CD4, habiendo una relación entre la capacidad fusogénica de Env, el número de virus producidos por célula y el grado de decline en la cuenta de CD4 en los monos infectados. Un incremento en la fusogenicidad de Env podría ser explicado como un incremento en la eficiencia para llevar a cabo nuevas infecciones y el decremento de la vitalidad de estas células productoras de virus por lo que se puede decir que los cambios para que una cepa no fusogénica, no patógena se convierta a patógena fusogénica están en la glicoproteína de envoltura (gp120/gp41) (Etemad-Moghadam, 2002).

En otro modelo *in vivo* empleando ratones SCID-hu, cepas IS aisladas de pacientes infectados eliminan rápida y eficientemente células CD4⁺ presentes en timocitos humanos. Los resultados determinan que el fenotipo IS (que emplea CXCR4 como correceptor) es un importante determinante de patogénesis, pues estos replican más rápido y son más patogénicos para los timocitos en este modelo que las clonas NIS (Cameni, 2000).

4.2.1 Citometría de Flujo

La citometría de flujo se ha desarrollado enormemente los últimos años, una de las líneas originales de desarrollo fue específicamente dirigida hacia aplicaciones inmunológicas, pero actualmente se enfoca a muchas áreas; ya que al medir la emisión de luz visible y fluorescente no solo permite cuantificar antígenos, sino que permite evaluar características bioquímicas y biofísicas de células individuales o de subpoblaciones en base a características seleccionadas.

Un clasificador celular activado por fluorescencia (FACS por sus siglas en inglés Fluorescence-activated cell sorter) es una adaptación del citómetro de flujo que permite separar poblaciones celulares de acuerdo con la sonda fluorescente a la

que se unen y con la magnitud en que lo hacen. Esta técnica se realiza mediante desviación diferencial de las células con campos electromagnéticos cuya intensidad y dirección varían de acuerdo con la intensidad medida de la señal fluorescente.

La citometría de flujo es una técnica multiparamétrica, es decir, ofrece información simultánea de un gran número de parámetros de cada una de las células que se analizan y la relación entre los parámetros de una célula y los de otra.

Su fundamento se basa en hacer pasar una suspensión de células alineadas y de una en una a través de una región sensible iluminada por un láser focalizado. El impacto de cada célula con el rayo de luz produce señales que corresponden a diferentes parámetros de la célula y que son recogidos por distintos detectores; estos convierten dichas señales en señales eléctricas que posteriormente serán digitalizadas para permitir la medida simultánea de varios parámetros en una misma célula.

Las señales producidas por la interacción de las células con el haz de luz son de dos tipos:

1. Señales de dispersión: Resultan de la interacción de la luz con una partícula produciendo un cambio de dirección (no de longitud de onda) en todas las direcciones del espacio. La dispersión depende del tamaño de la célula, núcleo y granularidad del interior de la célula. En los citómetros de flujo se miden dos fracciones de dispersión: a) la luz dispersada en un ángulo pequeño (0-10) llamada FSC (Forward Scatter), esta medida es proporcional al tamaño de la partícula, y b) la luz dispersada en ángulo recto llamada SSC (Side Scatter) que es proporcional a la complejidad interna de la partícula (granularidad).

2. Señales de Fluorescencia: los citómetros de flujo permiten detectar señales de fluorescencia procedentes de fluorocromos (moléculas químicas que absorben luz a determinada longitud de onda y emiten a otra longitud de onda diferente) situados en la célula, siendo la cantidad de fluorescencia emitida proporcional a la cantidad de componentes fluorescentes presentes de la partícula.

4.2.2 Cuantificación de fusión celular por citometría de flujo

La fusión de virus envueltos ha sido estudiada por medio de ensayos biológicos de infectividad, formación de sincicios, hemólisis, y por técnicas de microscopía. Estas técnicas tienen limitaciones en cuanto a la cuantificación de la extensión de la fusión y no permiten un continuo monitoreo de la reacción de fusión (Blumenthal, 2002).

Una variedad de ensayos frecuentemente usados en la observación de fusión viral han sido diseñados empleando análogos de lípidos fluorescentes, proporcionando métodos sensibles para el estudio de los mecanismos de fusión, entre estos se encuentran: redistribución de Fluorescencia, Reducción de Fluorescencia “dequenching”, transferencia de energía (FRET por sus siglas en inglés: Fluorescence resonance energy transfer) etc. (Blumenthal, 2002).

En el grupo de investigación donde se llevo a cabo esta tesis, se diseñó un método para el estudio de la fusión celular mediada por las glicoproteínas de la envoltura gp120/gp41 del VIH, utilizando para ello células obtenidas de una leucemia aguda humana (Jurkat); la clona E6-1, y las líneas celulares HXBc2 y 522 establemente transfectadas con el gene *env* y *rev* del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HXBc2) que expresan el complejo gp120/gp41 en su membrana en forma inducible.

Las células se marcan diferencialmente con carbocianinas lipofílicas fluorescentes denominadas Dil y DiO (que emiten fluorescencia roja y verde, respectivamente). Las células se colocan en cocultivo para permitir la fusión, después de unas horas de incubación los productos de fusión son detectados por citometría de flujo como partículas con doble fluorescencia.

El método se ha caracterizado y ha mostrado ser útil para analizar la cinética de fusión, la variabilidad en el tamaño de los productos fusionados, la correlación de

la fusogenicidad de las células con la expresión de CD4. Además a demostrado tener una alta especificidad, ya que es inhibido eficientemente por anticuerpo monoclonal anti-CD4, por algunos anticuerpos anti-CXCR4, anti-gp120, anti-gp41 y por sueros de pacientes seropositivos al VIH.

4.3.1 Características generales de los colorantes lipofílicos fluorescentes

Las carbocianinas lipofílicas han sido extensamente empleadas en biología celular para investigar la estructura y dinámica de la membranas celulares, bicapas lipídicas artificiales y como trazadores neuronales (Honig, 1986 y 1989). Las más empleadas son las octadecil (C_{18}) indocarbocianinas y oxocarbocianinas (Dil y DiO respectivamente).

La molécula es bilateralmente simétrica (FIG 6A), formada por dos anillos conjugados que varían solo en la posición Y, y están unidos por tres o cinco átomos de carbono (Honig, 1989).

Es el número de carbonos en la unión entre los anillos y el constituyente Y lo que determina las propiedades de emisión y absorción del fluorocromo; unidas a los anillos tienen dos largas cadenas alquílicas, las cuales determinan su afinidad en las pruebas de membranas (les dan un carácter altamente lipofílico, son rápidamente incorporados en la membrana y difunden lateralmente en esta). Carbocianinas con cadenas >12 carbonos tienen preferencia por los dominios ordenados y las carbocianinas con cadenas ≤ 12 carbonos o con insaturaciones tienen preferencia por los dominios fluidos en la membrana (Honig, 1989).

La orientación de Dil en la membrana ha sido determinada por microscopia de fluorescencia (Axelrod, 1979), la cabeza del fluorocromo sobresale paralelamente a la

superficie de la membrana, y las dos cadenas alquílicas se insertan perpendicularmente en el interior de la membrana (FIG 6B)

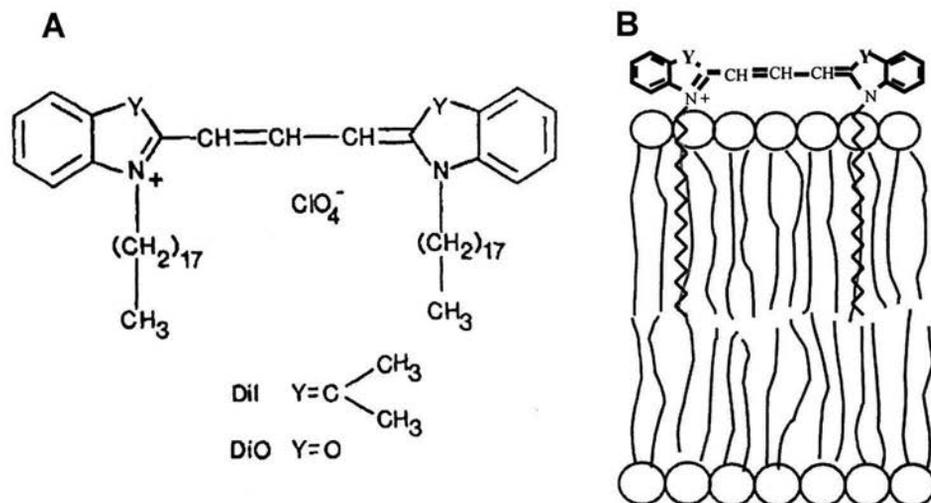


FIG 6. (A) Estructura química de los fluorocromos empleados. (B) Inserción de los fluorocromos en la membrana celular

Dil (Abs 549/Em 565) es excitado en el verde y fluoresce brillantemente rojo cuando es visto con filtros para rodamina, mientras que DiO (Abs 484/Em 501) es excitado en el azul, y fluoresce verde cuando es visto a través de filtros para fluoresceína. DiO no puede ser visto con filtros de rodamina pero el espectro de emisión del Dil es muy amplio y produce una fluorescencia dorada cuando es visto con filtros para fluoresceína (Honig, 1989).

La difusión lateral que presentan los fluorocromos sirve para marcar totalmente la célula, no se presenta transferencia de estos en membranas celulares intactas y tienen frecuentemente baja toxicidad.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En resultados anteriores de experimentos de fusión empleando carbocianinas lipofílicas fluorescentes para marcar diferencialmente las células (Huerta, 2002) se observó que la población fusionada (cuadrante superior derecho en la FIG 6) presenta una mayor intensidad de fluorescencia roja (FL2-H) con respecto a las células no fusionadas marcadas de rojo (cuadrante superior izquierdo). Este desplazamiento no se observa en la fluorescencia verde (FL1-H), lo que podría significar que hay más células rojas en las fusiones que células verdes.

Asimismo, dado que las carbocianinas utilizadas se incorporan en la membrana celular (FIG 6B) estas podrían afectar las propiedades fusogénicas de las células influyendo sobre la magnitud, especificidad y estequiometría de la fusión.

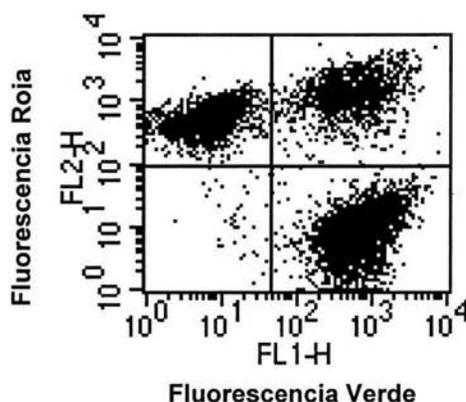


FIG 7. Grafica de fluorescencia verde vs roja de los ensayos de fusión celular mediada por las glicoproteínas de envoltura del VIH cuantificada por citometría de flujo. Cocultivo de células HXBc2-DiO/E6-Dil.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL. Estudiar el efecto del uso combinado de las carbocianinas lipofílicas fluorescentes sobre la magnitud, especificidad y estequiometría de la fusión celular mediada por las proteínas de la envoltura del VIH.

OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Determinar si el incremento en la intensidad de fluorescencia roja en las células fusionadas es debida a:

- a) Una transferencia de energía entre los fluorocromos empleados (DiO y Dil)
- b) Diferencias en la incorporación de células rojas y verdes en los sincicios (A lo que llamaremos estequiometría).

2. Analizar el efecto de los fluorocromos empleados sobre la magnitud de la fusión.

3. Determinar si los fluorocromos empleados alteran la especificidad de la fusión.

HIPOTESIS

La fusión celular mediada por las glicoproteínas de envoltura del VIH esta determinada por interacciones entre el complejo gp120/gp41, la molécula CD4 y el correceptor en la célula blanco, siendo estas proteínas transmembranales, las interacciones requeridas dependen mucho de la integridad y composición de la membrana. Considerando la naturaleza química de los fluorocromos empleados (carbocianinas lipofílicas), al insertarse en la membrana estos podrían estar potenciando la fusión celular; influyendo en la magnitud, especificidad y estequiometría de esta.

MATERIALES Y METODOS

Células.

Se utilizan células linfocíticas Jurkat, que se obtuvieron a partir de una leucemia linfoblástica aguda, el grupo de trabajo las adquirió a través del Programa de Reactivos de Referencia e Investigación en SIDA (NIH AIDS Research & Reference Reagent Program).

Se emplean líneas celulares (Jurkat) establemente transfectadas con un sistema de expresión inducible por tetraciclina, este es usado para modular la expresión de los genes env y rev del VIH-1 (también transfectados en ellas). Las líneas que se emplearon son la HXBc2 (expresa la glicoproteína Env de la cepa HXBc2 adaptada en laboratorio y que se sabe es citopática); y la línea 522 F/Y la cual expresa una mutante de la glicoproteína de envoltura de HXBc2 que contiene una mutación en el aminoácido 522 (cambio F/Y) del péptido de fusión, (en el extremo amino terminal de gp41) este cambio no afecta el proceso del precursor, asociación de las subunidades, unión a CD4, o transporte a la superficie celular, pero resulta en la reducción de la habilidad para fusionar membranas celulares en un ensayo de formación de sincicios y en pruebas de infectividad del virus (Cao, 1996). Como célula blanco se emplean células Jurkat de la clona E6-1 (CD4+ CXCR4+).

Las células son mantenidas en botellas T75 (Cellstar) con medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FSB) (Gibco) y antibióticos; Penicilina (100U/ml) y Estreptomicina (100µg/ml) (Gibco). Se mantienen en un incubador a 37°C y 0.5% de CO₂. El medio se cambia en su totalidad cada tres días.

A las líneas celulares se agrega al medio Tetraciclina (1µg/ml) para inhibir la expresión de las glicoproteínas y, Geneticina (G418) (200µg/ml) e Higromicina (200µg/mL) (Gibco) para seleccionar las células transfectadas. Las células E6 sólo se mantienen en medio suplementado.

INDUCCION DE CÉLULAS HXBc2 Y 522

Se induce la expresión del complejo gp120/gp41 en las líneas celulares transfectadas incubándolas tres días antes de la fusión sin tetraciclina.

MATERIAL

Micropipeta 200µL eppendor	Microcentrífuga 5804R (eppendorf)
Botellas T75 (Cellstar)	Pipetas 10 y 25mL estériles
Tubos 50mL para centrifuga (CORNING)	Medio RPMI suplementado
Geneticina e Higromicina (Gibco)	PBS IX (1:10) estéril*
(50mg/mL)	

MÉTODO

1. Pasar las células de las botellas a tubos para centrifuga 50mL
2. Centrifugar a 1150rpm, durante 3 min
3. Decantar el medio
4. Lavar dos veces con 40ml de PBS IX (1:10), centrifugando a 1150rpm, 3 min
5. Resuspender en botellas T75 nuevas con medio RPMI 1640 suplementado
6. Agregar Geneticina e Higromicina (4µl/ml de medio)
7. Incubar a 37°C y 0.5% CO₂

* Ver Anexo II

MARCAJE DE CELULAS PARA EL EXPERIMENTO DE FUSIÓN

En condiciones normales las células E6 se marcan con Dil (1:10) y las líneas celulares HXBc2 y 522 con DiO (1:30) un día antes del experimento de fusión. Para el desarrollo de esta tesis en algunos ensayos se invertirá el tipo de marca o se llevaran acabo los dos para cada tipo de célula.

MATERIAL

Tubos para centrifuga de 50ml y 15mL (CORNING)

Pipetas graduadas 10ml estériles. Micropipetas de 10 μ L y 200 μ L (eppendorf)

Microcentrifuga 5804 R(eppendorf) Botellas T75 (Cellstar)

Agitador Hemacitómetro (Sigma)

Tubos eppendorf 1ml no estériles Medio RPMI 1640 suplementado

Azul Tripano 0.4% (Sigma) Papel aluminio

Soluciones de los colorantes Dil (1:10) y DiO (1:30) *

Geneticina (50mg/ml) e Higromicina (50mg/ml) (Gibco)

* Ver Anexo I

MÉTODO

1. Pasar las células que se incubaron sin tetraciclina (HXBc2 y 522) y las células E6 de las botellas a tubos para centrifuga de 50ml
2. Centrifugar a 1150rpm, 3min. Decantar el medio
3. Resuspender en 1ml o más de medio RPMI 1640 suplementado*
4. Colocar 90µL de azul Tripano 0.4% en un tubo eppendorf de 1mL*
5. Resuspender las células y tomar una muestra de 10µL. Agregarla al tubo con azul Tripano
6. Contar la células en el hemacitómetro
7. Colocar las células requeridas para el experimento de fusión (con un exceso) en un tubo para centrifuga de 15ml. Ajustando a un volumen que permita marcar entre $5-15 \times 10^6$ células/mL. (Se pueden dejar en el tubo de 50mL si se van a emplear todas)
8. Agregar la cantidad de fluorocromo requerido según el tipo de célula. Agitando ligeramente para permitir una distribución homogénea
9. Proteger los tubos de la luz envolviéndolos con papel aluminio
10. Incubar 15min con agitación a temperatura ambiente
11. Transcurridos los 15min, agregar 10 veces más el volumen de medio (p.ej. a 1ml se agregan 10ml de medio). Centrifugar a 1150rpm, 3min y decantar
12. Lavar nuevamente con la misma cantidad de medio empleado en el paso anterior
13. Resuspender en botellas T75 nuevas con medio RPMI 1640 suplementado. Agregando a las líneas celulares HXBc2 y 522 las cantidades correspondientes de Geneticina e Higromicina
14. Incubar a 37°C y 0.5% CO₂

* El volumen en el que se resuspenden las células y la dilución en Azul Tripano para contar se ajustan según la cantidad de células que se tengan.

EXPERIMENTO DE FUSIÓN

MATERIAL

Tubos para centrifuga de 15 y 50ml.(CORNING)

Micropipetas de 10 μ L , 200 μ L y 1000 μ L (eppendorf)

1 gasa estéril

Tubos eppendorf 1ml no estériles

Pipeta multicanal (eppendorf)

Microcentrífuga 5804 R (eppendorf)

Pipetas graduadas 10ml estériles

Placa de 96 pozos con fondo plano

Azul Tripano 0.4% (Sigma)

Hemacitómetro (Sigma)

Tubos para Citometro de flujo

PBS (1X) no estéril

Medio enriquecido para linfocitos sin Suero Fetal Bovino (AIM-V)

Buffer para FACS.(FACS Flow)

Anticuerpo Monoclonal Anti-CD4 humano (1mg/mL) (PharMingen)

MÉTODO

1. Pasar las células de las botellas a los tubos para centrifuga de 10 o 50 mL (según la cantidad de células que se tengan)
2. Centrifugar a 1150rpm, 3min. Decantar el medio
3. Absorber con una gasa estéril el exceso de medio
4. Resuspender en 1mL de medio AIM-V*
5. Colocar 90µL de azul Tripano en un tubo ependorf de 1mL
6. Resuspender las células y tomar una muestra de 10µL. Colocarla en el tubo con Azul Tripano*
7. Contar las células en el hemacitómetro y ajustarlas a 200,000 células en 0.09mL utilizando medio AIM-V
8. Colocar 0.09mL de cada una de las células en una placa de 96 pozos con fondo plano utilizando la pipeta multicanal, (HXBc2 con E6 y 522 con E6) para tener un volumen final de 180µL en cada pozo. En experimentos donde se requiera el control con anticuerpo anti-CD4, se colocan las células E6, se agrega el anticuerpo y se incuban 40 min a 37°C, 0.5% CO₂, después de este tiempo se agrega el otro tipo de célula
9. Incubar 5 horas a 37°C,0.5% de CO₂
10. Extraer las células de los pozos y colocarlas en tubos para Citometro de flujo con 2mL de PBS (IX)
11. Centrifugar a 1100rpm, 3min. Decantar
12. Resuspender en 300µL de Buffer de FACS (Becton Dickinson)
13. Capturar en el citómetro de Flujo (FACScan)
14. Los datos se analizan por medio del programa CELLQuest.

*El volumen en el que se resuspenden las células y la dilución en Azul Tripano para contar se ajustan según la cantidad de células que se tengan

RESULTADOS

FUSIÓN CON LOS DOS TIPOS DE MARCA

Para determinar si el incremento en la fluorescencia roja de las fusiones se debe a una mayor incorporación de células rojas (E6) en los sincicios o a una interacción entre los colorantes, se invirtió el protocolo de marcaje que se había usado hasta entonces (HXBc2-DiO/E6-Dil), obteniendo dos tipos de cocultivo: uno con células E6 marcadas con Dil y HXBc2 marcadas con DiO, y en el otro células E6 marcadas con DiO y células HXBc2 marcadas con Dil, además del respectivo control no fusogénico de células 522 y el control con anticuerpo monoclonal anti-CD4 para cada tipo de marca.

En los resultados obtenidos (FIG 8), observamos que el incremento de la fluorescencia roja en las fusiones es independiente del tipo de célula que fue marcada con verde o rojo, ya que se observa en los dos tipos de cocultivo. En base a esto, el desplazamiento observado podría ser considerado entonces como una interacción entre los fluorocromos o bien, que la célula marcada de verde (con DiO) tiene la capacidad de fusionarse con más de una célula roja (marcada con Dil).

Notablemente, cambiar el tipo de marca en las células no altera el porcentaje total de fusión ni la especificidad de la misma, ya que el porcentaje de fusión obtenido es semejante en ambos casos y la inhibición con anticuerpo monoclonal anti-CD4 es igualmente eficiente (FIG 8).

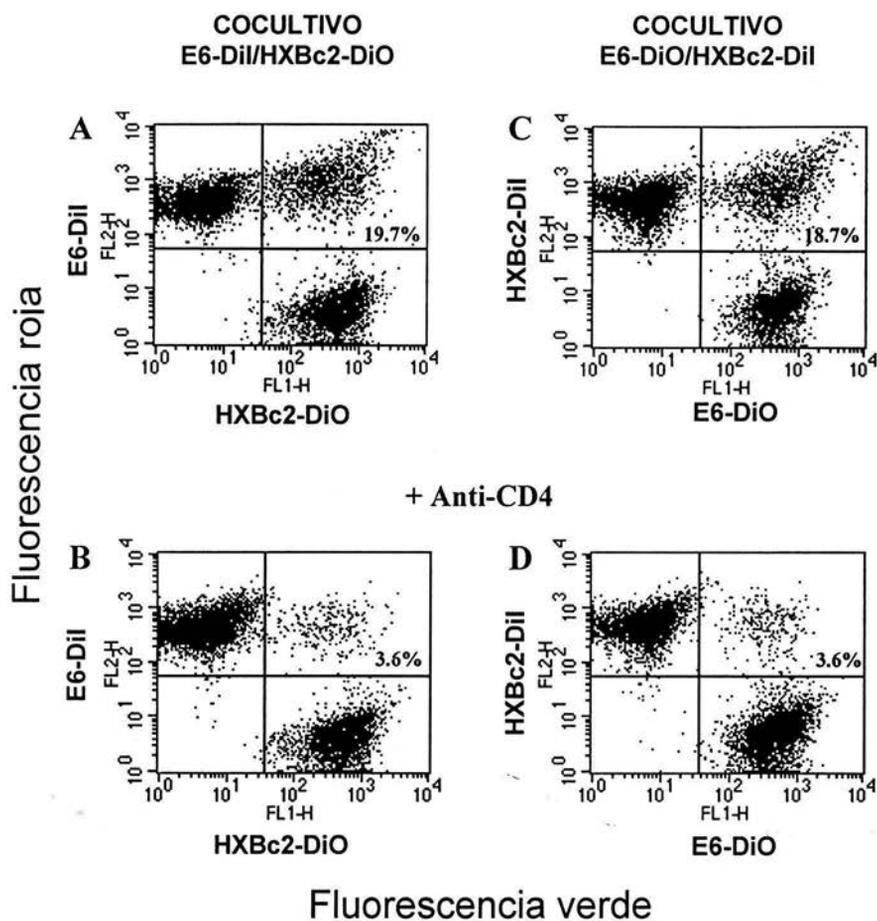


FIG 8. Inversión de colorantes. En la parte superior se muestra el tipo de cocultivo y la marca fluorescente que tiene cada célula. B y D son el mismo tipo de célula que A y C respectivamente, pero se adicionaron 20µg/mL de anticuerpo monoclonal anti-CD4. La fluorescencia roja (FL2-H) corresponde a la fluorescencia emitida por Dii y la fluorescencia verde (FL1-H) a la emitida por DiO. El número en el cuadrante superior derecho es el promedio del porcentaje de fusión obtenido.

EXPERIMENTO DE DOBLE MARCA

Para demostrar que ocurre una transferencia de energía entre los colorantes empleados, células de un solo tipo se marcaron con los dos colorantes y se analizaron en el citómetro de flujo. Células E6 se marcaron con Dil ($4\mu\text{M}$), se dividieron y se marcaron nuevamente con concentraciones crecientes de DiO. Antes de analizar en el citómetro de flujo, las células con doble marca se mezclaron con células sólo rojas para comparar sus respectivas fluorescencias (FIG 9).

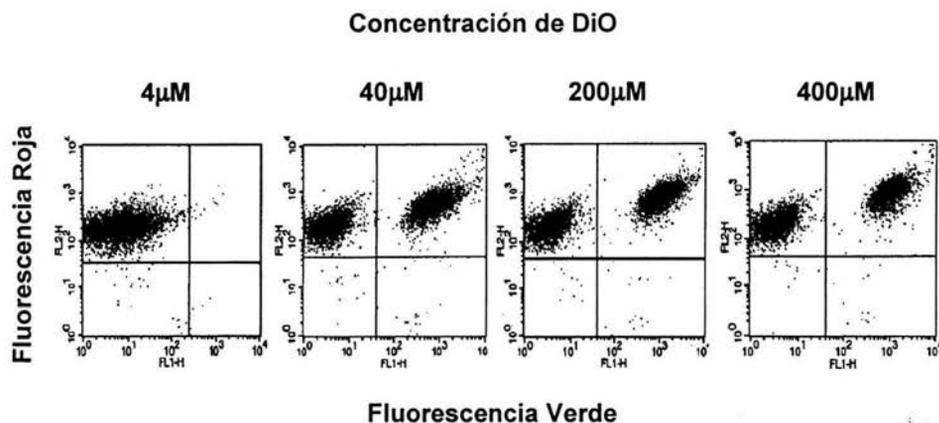


FIG 9. Células con doble marca. Mezcla de células solo rojas (cuadrante superior izquierdo) y células con las dos marcas (cuadrante superior derecho), nótese que a la concentración $4\mu\text{M}$ de DiO no se logró separar las dos poblaciones, pero en las concentraciones mayores a esta si se observan claramente. El incremento en la intensidad de fluorescencia roja de las células doblemente marcadas es mayor al aumentar la concentración de DiO con la que se marcaron.

Este resultado nos permite asegurar que en este sistema se lleva acabo una interacción entre los fluorocromos empleados, ya que el incremento en la fluorescencia roja se observa siempre y cuando los dos colorantes se encuentren en

la misma membrana. Asimismo el incremento en la fluorescencia roja depende de la concentración de DiO utilizada.

Esta interacción, es conocida como transferencia de energía o FRET (por sus siglas en inglés Fluorescence Resonance Energy Transfer) y se presenta cuando el espectro de emisión de uno de los colorante se traslapa con el espectro de absorción del otro, en este caso se traslapa el espectro de emisión del DiO con el espectro de absorción del Dil (FIG 10).

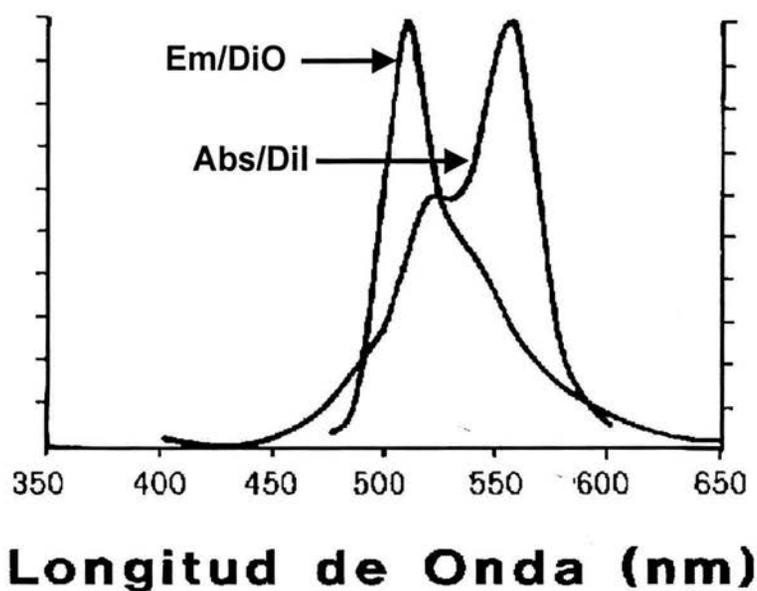


FIG 10. El espectro de Emisión de DiO traslapa con el espectro de Absorción de Dil (<http://www.probes.com/servlets/spectra/>).

FUSIONES CON CONCENTRACIONES VARIABLES DE DiO

Proseguimos a determinar si la transferencia de energía que se presenta en las fusiones también depende de la concentración de DiO con la cual se marcan las células y analizamos si el incremento en la concentración de DiO altera el porcentaje o la especificidad de la fusión. En este experimento cocultivamos células E6 marcadas con Dil ($4\mu\text{M}$) con células HXBc2 marcadas con diferentes concentraciones de DiO, además de los controles con anticuerpo anti-CD4 y con las células no fusogénicas 522.

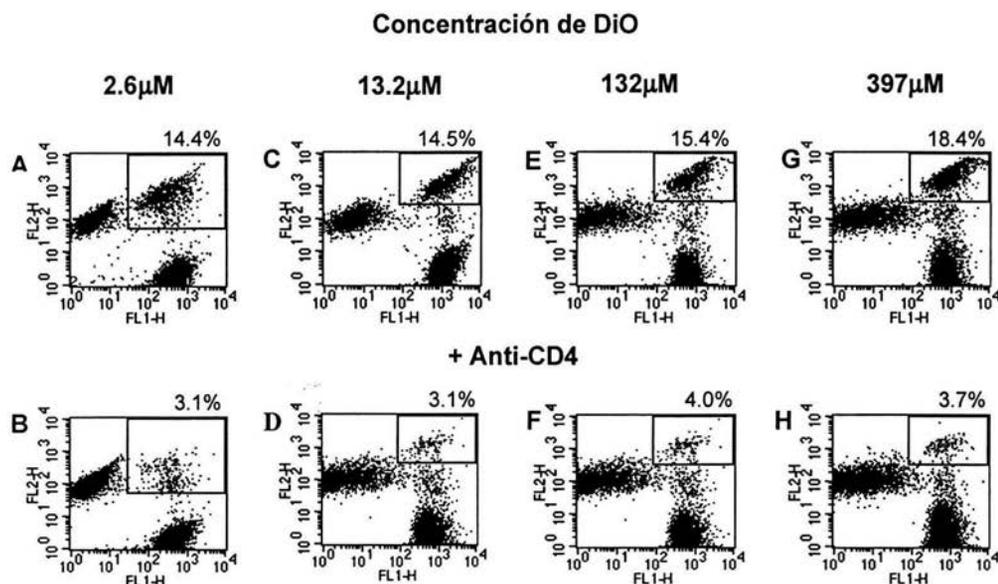


FIG 11. Fusiones con concentraciones variables de DiO. A,C,E,G. Fusiones obtenidas del cocultivo de células E6-Dil/HXBc2-DiO. B,D,F,H. Efecto de la adición de $20\mu\text{g/mL}$ de anticuerpo anti-CD4 sobre el mismo tipo de células (cocultivo E6-Dil/ HXBc2-DiO). En la parte superior se indica la concentración de DiO con la que fueron marcadas las células HXBc2. El número en la parte superior de cada gráfica indica el promedio del porcentaje de fusión obtenido.

En las gráficas de la FIG 11, observamos que el incremento en la fluorescencia roja de las fusiones sí depende de la concentración de DiO empleada para marcar las células. Además, podemos observar que se forman dos tipos de poblaciones: las fusiones observadas en los cocultivos de células HXBc2/E6 sin anticuerpo anti-CD4, y otra población que se observa en el control con anticuerpo anti-CD4 y en las células no fusogénicas 522 (no mostrado), a los que más bien se consideran agregados. El porcentaje de fusión obtenido es muy semejante, y sólo se observa un ligero incremento con la concentración de DiO 300 veces mayor a la que normalmente se emplea. Notablemente la inhibición con anticuerpo monoclonal anti-CD4 es igualmente eficiente en todos los casos.

Al graficar la intensidad de fluorescencia roja de la población con fluorescencia mixta (fusiones y agregados) con respecto a la concentración de DiO empleada para marcar las células HXBc2 (FIG 12), se observa un incremento logarítmico en la intensidad de fluorescencia roja de las fusiones (cocultivo de células HXBc2/E6) y algo que es muy importante, este incremento no se observa en los agregados (en las células 522 y los controles con anticuerpo anti-CD4).

Por lo tanto, el incremento en la fluorescencia roja de las células fusionadas depende de la concentración de DiO con la que se marcan las células y también de que los dos fluorocromos se encuentren en la misma membrana.

Este resultado refuerza la afirmación de que las partículas dobles fluorescentes en el cocultivo de células HXBc2 con células E6 son fusiones, ya que en éstas los colorantes se mezclan y se localizan en la misma membrana, permitiendo que se lleve a cabo la transferencia de energía.

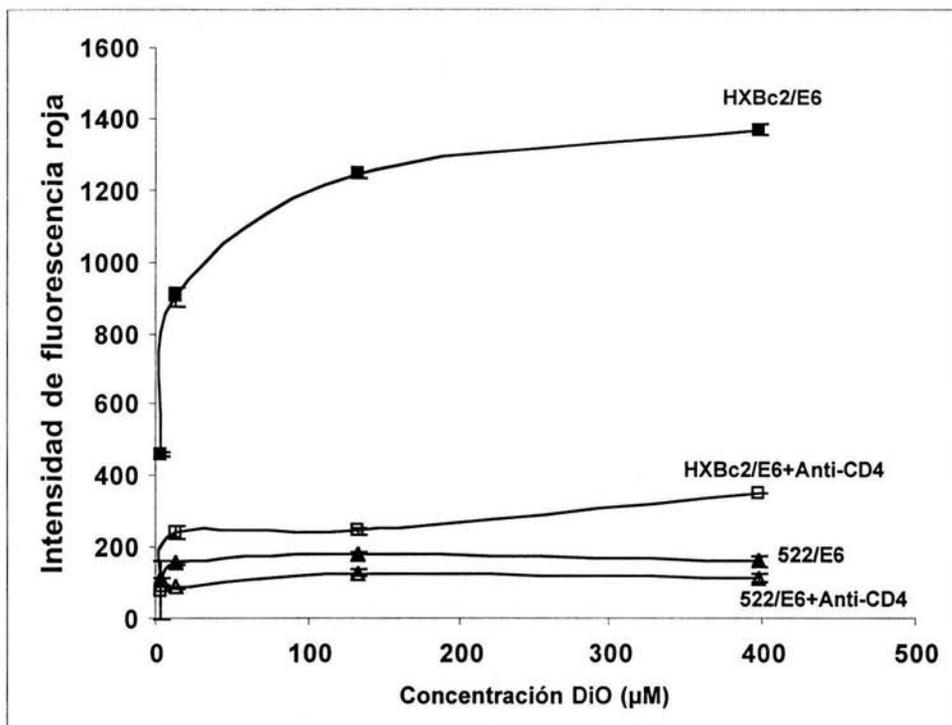


FIG 12. Fusiones con concentraciones de DiO variable. Media geométrica de la Intensidad de fluorescencia roja en la población de células con fluorescencia mixta obtenida en los diferentes cocultivos con respecto a la concentración de DiO utilizada para marcar las células HXBc2 y 522.

ESTEQUIOMETRÍA

Nuestro siguiente objetivo, fue determinar si alguna de las células se incorporaba más que la otra en las fusiones (estequiometría), sin embargo, debido a que no podíamos utilizar directamente la intensidad de las fluorescencias por la transferencia de energía entre los colorantes, la cantidad de células que participan en la fusión se estimó mediante el análisis de los cambios observados en las células no fusionadas en un experimento de cinética a diferentes tiempos de cocultivo. Para evaluar cualquier efecto debido a la combinación de los colorantes presentes en las células se llevaron a cabo los dos tipos de marca posibles y se cocultivaron células HXBc2-DiO con E6-Dil y células HXBc2-Dil con E6-DiO.

Inicialmente se observó el comportamiento de las poblaciones de células fusionadas y no fusionadas en histogramas (FIG 13), en los cuales observamos que la población de células E6 (CD4+) siempre disminuye notablemente y, que este comportamiento es independiente del tipo de marca que las células tengan.

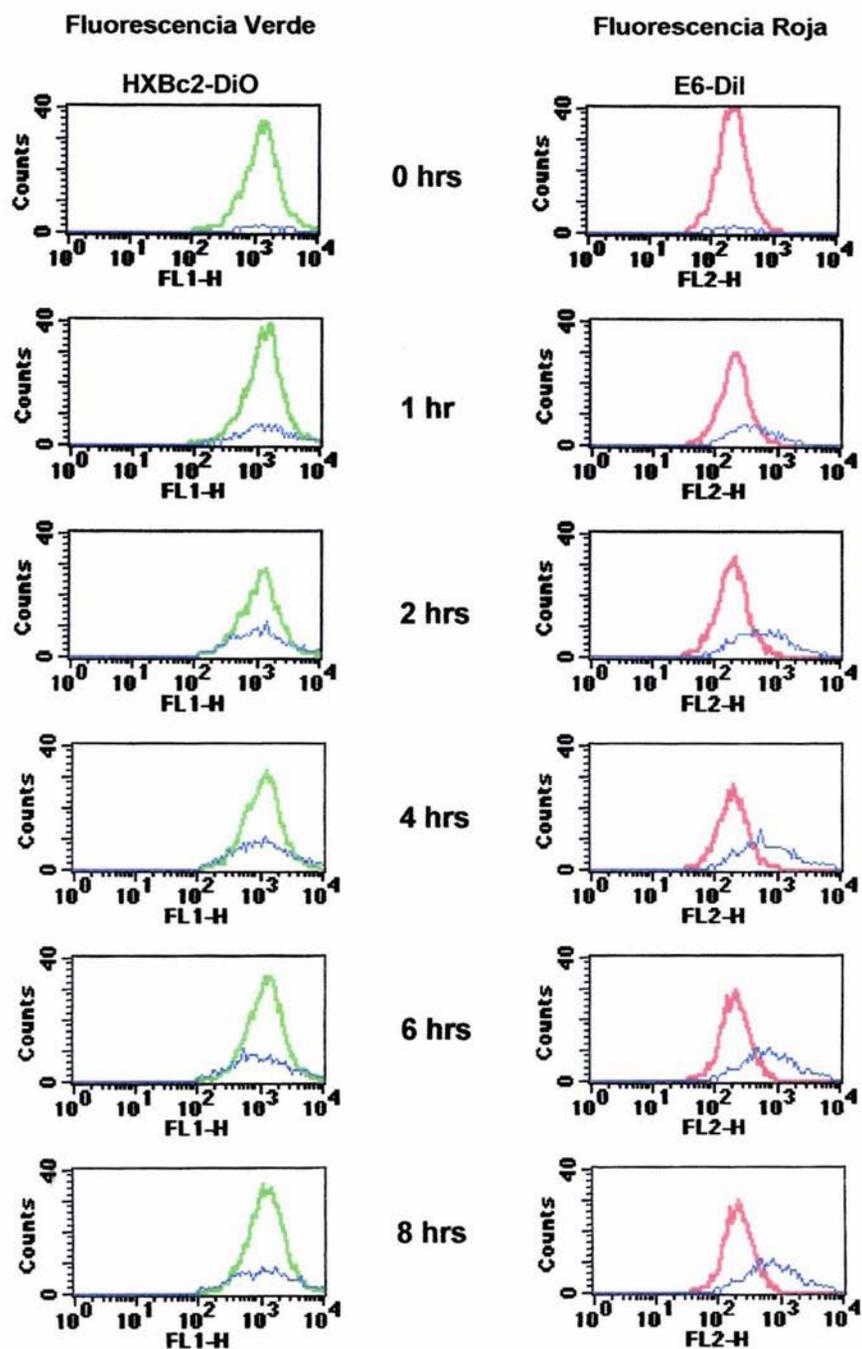
FIG 13. Cinética de Fusión (Sigüientes páginas). Histogramas de fluorescencia de las poblaciones no fusionadas (en líneas roja o verde según es el caso) sobrepuestas con la población fusionada (en color azul) a los diferentes tiempos de cocultivo indicados en el centro de la figura. En la parte superior se indica la población no fusionada que se analiza y el tipo de marca que tiene.

FL1-H corresponde a la emisión en la fluorescencia verde y FL2-H a la emisión de la fluorescencia roja.

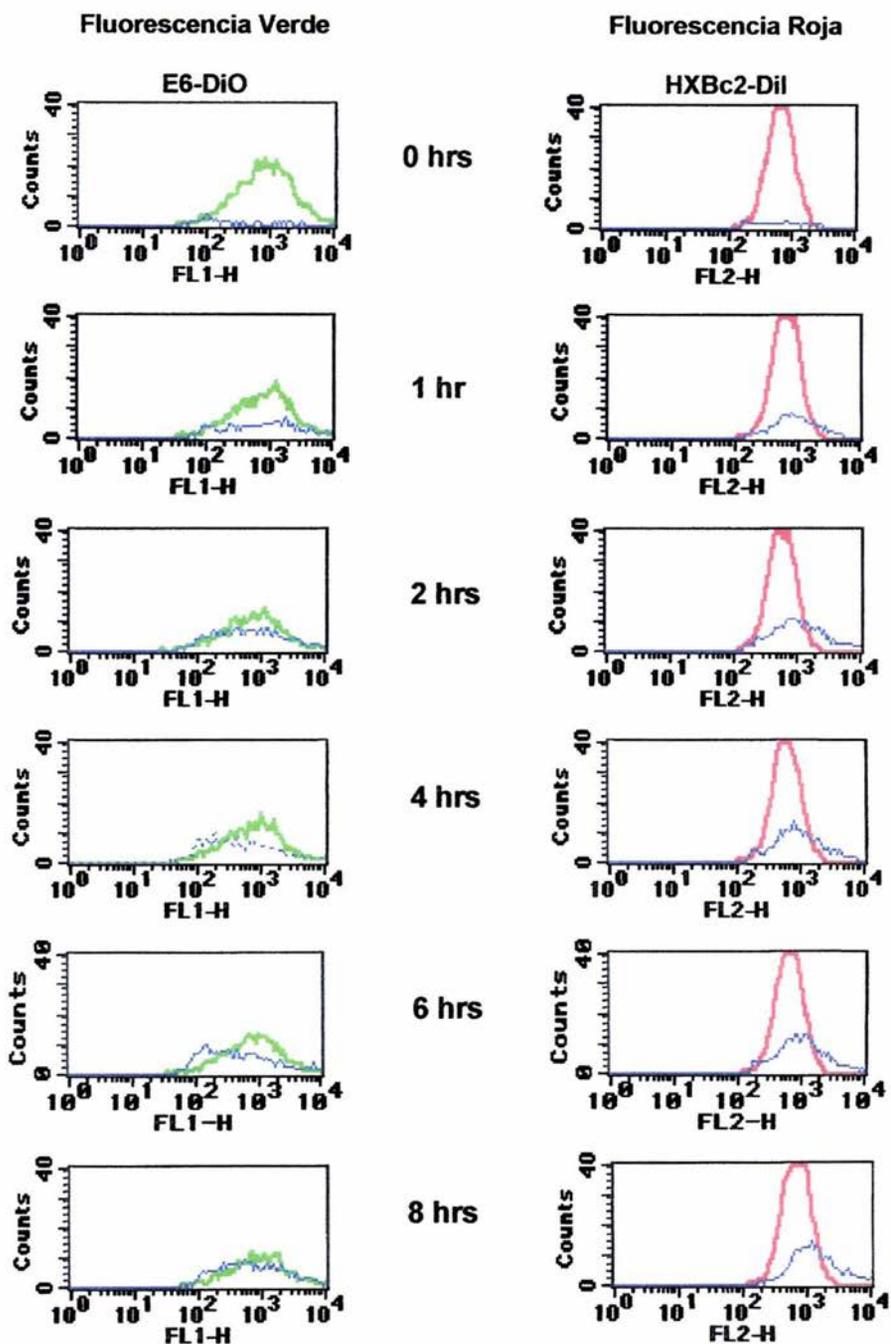
13.A. Cocultivo de células E6-Dil con HXBc2-DiO.

13.B. Cocultivo de células E6-DiO con HXBc2-Dil.

13 A. COCULTIVO E6-Dil / HXBc2-DiO



13 B. COCULTIVO E6-DiO / HXBc2-Dil



Posteriormente se analizó el número total de células tanto fusionadas como no fusionadas, para lo cual graficamos el número de células sin fusionar a los diferentes tiempos de cocultivo (FIG 14), y observamos nuevamente, una clara disminución en la población de células E6 y un ligero incremento en las células HXBc2, siendo este comportamiento independiente del tipo de marca que las células tenían. Además, estas variaciones no se observan en las células no fusogénicas 522.

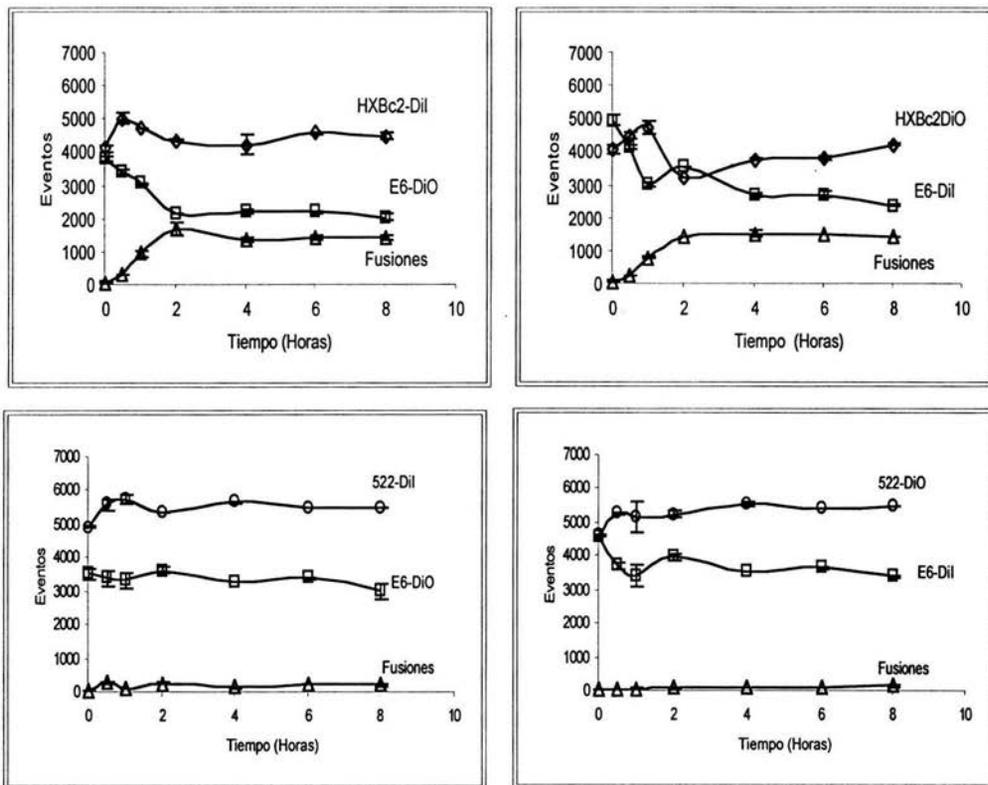


FIG 14. Cinética de fusión. Total de células no fusionadas y fusiones con respecto al tiempo de cocultivo. Se observa una clara disminución en la población de células E6 no fusionadas conforme se incrementa el número de fusiones formadas. En la gráfica se indica el tipo de población analizada y el fluorocromo con el que fue marcada.

El comportamiento observado en la población de células HXBc2 no fusionadas se debe a un efecto de compensación durante el análisis, ya que capturamos un número de eventos constante de 10000, lo cual no nos permite ver los cambios reales en el número de células presentes en el pozo a los diferentes tiempos.

Es importante aclarar que al formarse las fusiones, el número de células totales en el pozo disminuye, pues esto nos ayudará a interpretar los datos.

Si la estequiometría de la fusión fuera 1:1, los dos tipos de células disminuirían igualmente en la misma medida que aumenta el número de fusiones formadas, y a pesar de que el número de células totales presentes en el pozo al final es menor, la proporción entre ellas seguiría siendo 1:1, aún al analizar los 10000 eventos.

Pero, si la estequiometría es diferente de 1:1, es decir, si una se incorpora más que la otra, la cantidad de uno de los tipos celulares disminuiría más que el otro tipo. Aunado a esto, la cantidad de células totales en el pozo disminuye. Estos dos factores provocan que la proporción final entre las células sea diferente de la que había al inicio, de modo que hay más células del tipo que se incorpora menos, lo cual se ve reflejado al analizar los 10000 eventos, donde observamos que las células HXBc2 aumentan ligeramente y las células E6 disminuyen.

En resumen, la disminución de la cantidad de células E6 no fusionadas con el tiempo de cocultivo, indica, que se están incorporando más células E6 (CD4+ CXCR4+) en las fusiones que células HXBc2 (que expresan gp120/gp41).

EFECTO DE LOS COLORANTES

El efecto de los colorantes sobre la fusión, se determinó llevando a cabo experimentos de fusión en los cuales solo una o ninguna de las células fueron marcadas, en comparación con fusiones en las cuales los dos tipos celulares tuvieron marca.

Debido a la presencia de células sin marca, no se utilizaron las gráficas de fluorescencia para determinar el porcentaje de fusión, sino que, se utilizó una región en las gráficas de tamaño y granularidad (mostrada en la FIG 15) para estimar un porcentaje de fusión de los cocultivos. Esta región corresponde a las fusiones de mayor tamaño y granularidad.

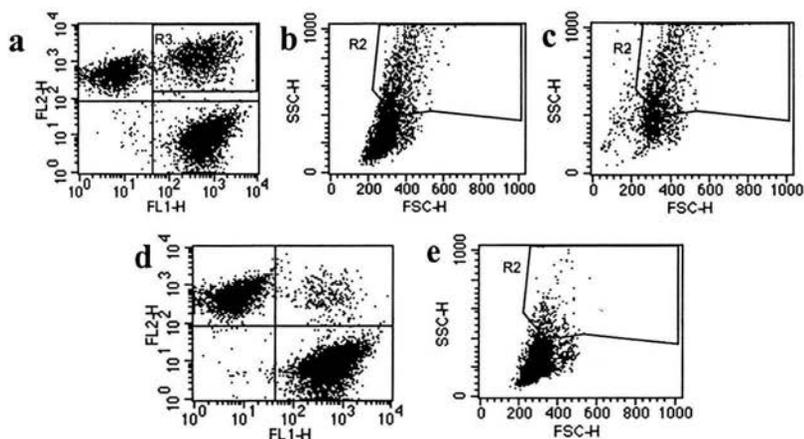


FIG 15. Efecto de los colorantes. (a) Gráfica de fluorescencia roja vs verde del cocultivo HXBc2-DiO/E6-Dil, la región R3 indica la población fusionada. (b) Gráfica de tamaño y granularidad del cocultivo mostrado en la gráfica a. (c) Gráfica de tamaño y granularidad de la región R3 (Fusiones) de la gráfica a. (d) Gráfica de fluorescencia roja vs verde del cocultivo 522-DiO/E6-Dil, (e) Gráfica de tamaño y granularidad del cocultivo mostrado en d. Nótese que la región R2 no abarca el total de las fusiones, pero si podemos considerar que la mayor parte de células en esta región son fusiones. Esta región 2 es la que se utilizó para analizar los ensayos donde una o ninguna de las células tienen marca.

Los porcentajes de fusión obtenidos se muestran en la siguiente gráfica:

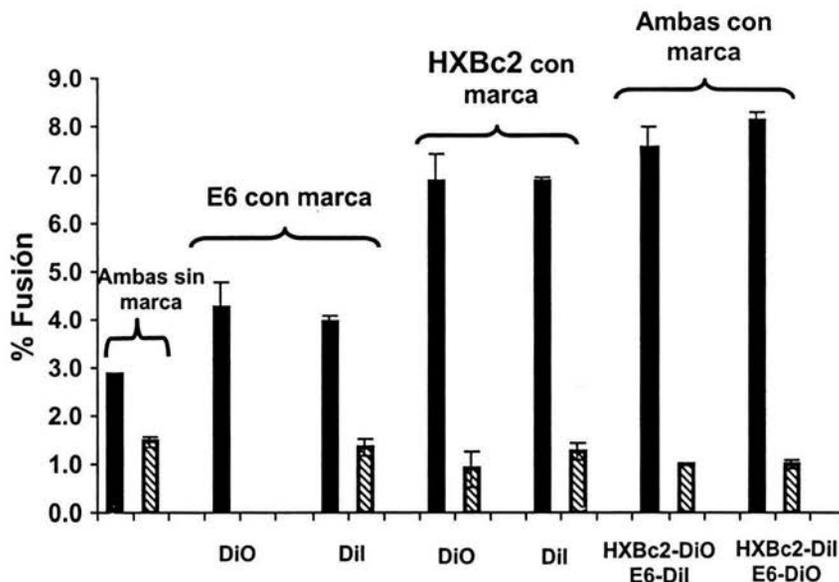


FIG 16. Efecto de los colorantes sobre la fusión. Las barras negras representan el porcentaje obtenido del cocultivo de células HXBc2/E6 y las barras blanco con negro el del cocultivo de las células 522/E6. En la parte superior se indica la célula que tiene marca y en la parte inferior el tipo de marcador fluorescente que tiene. Los colorantes incrementan el porcentaje de fusiones de mayor tamaño y granularidad principalmente cuando se encuentran en la célula HXBc2, y ligeramente cuando se encuentran en la célula E6, pero el porcentaje de fondo en células 522 no se incrementa en ningún caso.

Los porcentajes de fusión mostrados en la FIG 16, muestran que los colorantes si tienen efecto sobre la magnitud de la fusión. Este efecto se da en forma selectiva, pues existe un ligero incremento (40% más) cuando se marca solo la célula

E6 (CD4+), y se observa un incremento considerable (135% más) cuando es la célula HXBc2 (Env+) la que está marcada, y cuando los dos tipos de célula están marcadas (incremento de 170%), todo esto con respecto al porcentaje obtenido en el cocultivo donde ninguna de las células tiene marca. Estos resultados sugieren que los colorantes interactúan principalmente con las proteínas de la envoltura del VIH.

En ninguno de los cocultivos mostrados en la FIG 16 se observa un cambio en el porcentaje de fusión obtenido en los controles con células no fusogénicas (522) por lo que el efecto de los colorantes, mencionada anteriormente, no es inespecífico.

CURVA DE INHIBICION CON ANTICUERPO ANTI-CD4

Para corroborar que los marcadores fluorescentes no interfieren en la especificidad de la fusión, llevamos a cabo una curva de inhibición con anticuerpo anti-CD4 cocultivando células marcadas alternativamente ya sea con Dil o con DiO.

En esta curva (FIG 17) observamos que la inhibición por el anticuerpo monoclonal anti-CD4 es igualmente eficiente, independientemente del tipo de marca que las células tengan.

Por lo tanto que apesar del efecto que tienen los fluorocromos sobre la fusión, no afectan la especificidad del proceso.

Curva de inhibición con Anti-CD4

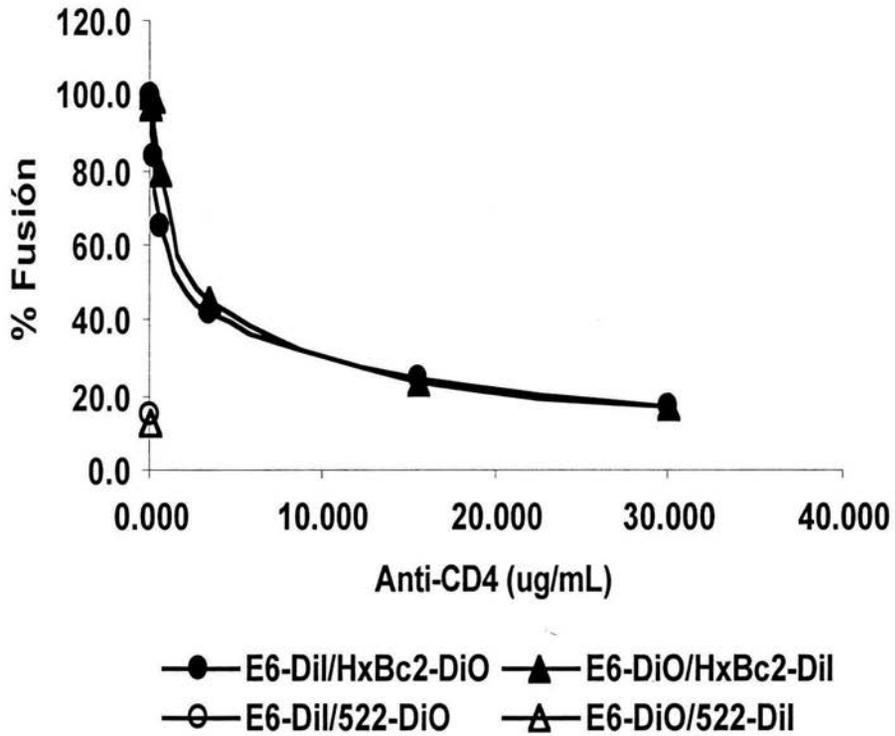


FIG 17. Curva de inhibición con Anti-CD4. Se grafico el promedio del porcentaje de fusión obtenido con diferentes concentraciones de anticuerpo monoclonal anti-CD4. La inhibición que se presenta es la misma independientemente del tipo de marca que tengan las células.

DISCUSION DE RESULTADOS

Nuestros resultados demuestran que el incremento en la intensidad de fluorescencia roja observada en las células fusionadas, se debe principalmente a la transferencia de energía (FRET) que ocurre entre los colorantes empleados.

Este efecto favorece la identificación de las fusiones, ya que nos permite diferenciarlas de agregados celulares en los cuales este incremento en la fluorescencia roja no se presenta, ya que la transferencia de energía solo se lleva a cabo cuando la distancia entre la molécula fluorescente donadora y la molécula fluorescente aceptora es de entre 1 y 10nm de distancia (Vereb, 2003), es decir, deben estar colocalizados en la misma membrana. En las células agregadas la cercanía física entre los colorantes no es suficiente para producir FRET aunque algunas regiones de la membrana están en contacto estrecho.

Notablemente, encontramos que las células E6 (CD4+CXCR4+) se incorporan más en las fusiones que las células HXBc2 (que expresan gp120/gp41) es decir, la estequiometría de la fusión E6/HXBc2 es mayor a uno; este comportamiento es independiente del tipo de colorante que las células contienen. Puesto que la formación de sincicios conduce a la apoptosis de las células fusionadas (La Bonte, 2000) y se asocia, asimismo, con la capacidad del virus para transmitirse célula a célula (Phillips, 1994), la fusión de varias células blanco con una célula que expresa las proteínas de envoltura (infectada), podría ser un mecanismo potencial de amplificación del daño al sistema inmune.

Las explicaciones probables para nuestra observación de que la fusión celular involucra una estequiometría E6/HXBc2 mayor a 1 incluyen:

a) El nivel de expresión de las moléculas que participan principalmente en el mecanismo de fusión, es decir, del CD4, correceptor, y del complejo gp120/gp41.

b) A una desestabilización transitoria de la membrana citoplásmica de la célula Env+. Dimitrov, (2001) ha reportado que las células que expresan gp120/gp41, sufren un incremento en la permeabilidad de la membrana al interactuar con CD4 y el correceptor; este cambio es transitorio y se da en las etapas tempranas de la fusión. Aunque se desconoce el mecanismo exacto, es probable que dominios hidrofóbicos en gp41 desestabilicen la estructura de la membrana celular facilitando la fusión.

c) Un efecto de los colorantes lipofílicos empleados, ya que estos se insertan en los microdominios de membrana (Klausner, 1980; Mukherjee, 1999, Nguyen, 2000) que también contienen a las proteínas gp120 y gp41. En estos sitios, ciertos tipos de lípidos tienden a agruparse debido a fuerzas de atracción entre sus cadenas alquil (largas y saturadas) y/o a interacciones entre sus cabezas polares, dando lugar a microdominios o plataformas móviles también conocidos como "lipid raft" (Hammache, 1999; Simons, 1997). Se ha reportado que la infección por el VIH y la formación de sincicios entre células infectadas y no infectadas es dependiente de la integridad de dichos microdominios de membrana y puede ser inhibida al alterar la composición e integridad de los mismos (Popik, 2002, Liao, 2001 Mañes, 2000; Virad, 2002, Hammache, 1999; Hug, 2000).

Por ultimo, estudiamos el efecto de los colorantes en la fusión, ya que algunas veces es asumido que las células premarcadas con un colorante, retiene las características de la célula original, sin embargo pueden llegar a afectar ciertas características de la célula *in vivo* e *in vitro* (Goldbrunner, 1997).

Debido a la estructura química de los colorantes, (FIG 6A), la cual es semejante a la de los lípidos de la membrana celular (una cabeza polar y una cola hidrofóbica), los colorantes DiO y Dil podrían afectar la fusión celular, por lo cual decidimos comparar los niveles de fusión obtenidos con células marcadas y no marcadas.

En nuestro estudio, observamos un incremento de la fusión debida a los colorantes, y se observa principalmente cuando la célula HXBc2 (que expresa

gp120/gp41) es la que está marcada (FIG 16). Esto podría sugerir que los colorantes interactúan con el complejo gp120/gp41 facilitando la fusión celular.

Aunque los colorantes incrementan de forma muy importante la fusión (hasta 170%), este incremento no altera la especificidad de la misma, ya que la inhibición con anticuerpo monoclonal anti-CD4 sigue siendo igualmente eficiente, independientemente del fluorocromo con el que las células han sido marcadas y nunca hay incremento en el porcentaje de partículas doblemente fluorescentes en los cocultivos de células no fusogénicas 522 con células E6.

A partir de estas observaciones, hemos considerado dos posibilidades, la primera es que los colorantes podrían inducir una agregación local de las proteínas virales que favorezca la interacción de éstas con los receptores de la membrana de la célula blanco, y alternativa o adicionalmente, los colorantes podrían alterar las funciones de las proteínas que se encuentran en inmediata proximidad dentro de los microdominios lipídicos, favoreciendo los cambios conformacionales requeridos para que se lleve a cabo la fusión.

CONCLUSIONES

El incremento en la intensidad de fluorescencia roja observado en las fusiones se debe principalmente a la transferencia de energía (FRET) que ocurre entre los colorantes.

El uso combinado de las carbocianinas lipofílicas fluorescentes favorece la identificación de las fusiones e incluso permite diferenciarlas de los agregados, ya que solo en las fusiones, donde los fluorocromos se encuentran colocalizados en la misma membrana se dan las condiciones para que se lleve a cabo el FRET.

En este modelo, se determinó que en promedio, varias células CD4+CXCR4+ (E6) son incorporadas en los sincicios por cada célula que expresa gp120/gp41 (HXBc2). Esta observación implica un posible mecanismo de amplificación del daño al sistema inmune debido a la fusión celular.

Las carbocianinas lipofílicas incrementan hasta un 170% el porcentaje de fusión. Este efecto se puede deberse a una interacción entre los colorantes y las proteínas virales.

Las carbocianinas lipofílicas no alteran la especificidad de la fusión, pues sigue siendo inhibida eficientemente con anticuerpo monoclonal anti-CD4 independientemente del tipo de marca que presentan las células.

ANEXO I

Preparación de Stock de los Fluorocromos Dil y DiO.

Pesar aproximadamente 3.5 mg de las sales (Molecular Probe) en un vial estéril.

Disolver en DMSO estéril (Sigma Cell Culture), lo necesario para tener una concentración final de 3.5mg/mL

Agitar con la micropipeta de 1mL hasta disolver completamente.

Puede ser necesario sonicar la solución de DiO algunos minutos para disolver completamente.

Preparar las diluciones correspondientes Dil (1:10) y DiO (1:30) utilizando para ello DMSO estéril.

ANEXO II

Preparación del amortiguador de fosfatos (PBS10X).

Para preparar 500mL, pesar las siguientes sales:

1.932g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

5.112g Na_2HPO_4 .

37g NaCl .

Se disuelven en agua (calidad reactivo) se afora a 500mL y se esteriliza.

Para la inducción y lavado de células se utiliza una **dilución 1:10 (PBS1X)**.

Para la inducción de la expresión de las proteínas de la envoltura del VIH en las líneas celulares debe ser estéril, pero para el lavado antes de capturar las fusiones no es necesario.

BIBLIOGRAFIA

1. Fields Virology. Editor en jefe: David M. Knipe. Editorial Lippincott Williams and Wilkins, USA 2001, 4ª Edición. Volumen 2. Cap 29 y 30.
2. Molecular Biology of the cell. Alberts B., Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter. G S Garland Science. USA 2002, 4ª Edición, Cap 10.
3. Fundamental immunology. William E. Paul 2ª Edición Raven Press, New York 1989. Cap 29.
4. Immunology, Immunopathology and immunity. Stewart Seel, ASM Press, USA 2001, 6ª Edición, Cap 19.
5. Inmunología Celular y Molecular. Abbas Abul K. McGraw-Hill Interamericana, Cuarta edición. España, 2002.
6. Axelrod D. Carbocyanine Dye Orientation in Red Cell Membrane Studied By Microscopic Fluorescence Polarization. *Biophys J*, Jun 1979, 26(3):557-573.
7. Blaak H., Van't Wout A. B., Brouwer M., Hooibrink B., Hovenkamp E. y Schuitemaker H. In Vivo HIV-1 Infection Of CD45RA+CD4+ T Cell Is Established Primarily By Syncytium-Inducing Variants And Correlates With The Rate Of CD4+ T Cell Decline. *PNAS*, Feb 2000, 97(3): 1269-1274.
8. Blumenthal R., Gallo A. S., Viard M., Raviv Y. y Puri A. Fluorescent Lipid Probes In The Study Of Viral Membrane Fusion. *Chemistry and Physics of lipids*, 2002, 116:39-55.
9. Camerini D., Su Hua-Poo, Gamez-Torre G., Johnson M. L., Zack J. A. y Chen I. S.Y. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Pathogenesis In SCID-Hu Mice Correlates With Syncytium-Inducing Phenotype And Viral Replication. *Journal of Virology*, Apr 2000, 74(7): 3196-3204.
10. Cao J., Park In-Woo, Cooper A., y Sodroski J. Molecular Determinants Of Acute Single-Cell Lysis By Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Journal of Virology*, Mar.1996, 70(3): 1340-1354.
11. Chun Tae-Wook, Chadwick K., Margolick J. y Siliciano R. F. Differential Susceptibility Of Naive And Memory CD4+ T Cell To The Cytopathic Effects Of Infection

With Human Immunodeficiency Virus Type 1 Strain LA1. *Journal of Virology*, June 1997, 71(6): 4436-4444.

12. Dargent J., Lespagnard L., Kornreich A., Hermans P., Clumeck N., y Verhest A. HIV-Associated Multinucleated Giant Cells In Lymphoid Tissue Of The Waldeyer's Ring: A Detailed Study. *Mod Pathol* 2000;13(12):1293-1299.

13. Dimitrov A. S., Xiao X., Dimitrov D. S., Blumenthal R. Early Intermediates In HIV-1 Envelope Glycoprotein-Mediated Fusion Triggered By CD4 And Co-Receptor Complexes. *The Journal of Biological Chemistry* 2001, 276:30335-30341.

14. Ecker D. M. y Kim P. S. Mechanisms Of Viral Membrane Fusion And Its Inhibition. *Annu. Rev. Biochem.*2001, 70:777-810.

15. Etemad-Moghadam B., Rhone D., Steenbeke T., Sun Ying, Manola J., Gelman R., Fanton W. J., Racz P., Tenner-Racz K., Axthelm M. K., Letvin N. L. y Sodroski J. Membrane-Fusing Capacity Of The Human Immunodeficiency Virus Envelope Proteins Determines The Efficiency Of CD4+ T Cell Depletion In Macaques Infected By Simian-Human Immunodeficiency Virus. *Journal of Virology*, June 2002, 75(12):5646-5655.

16. Fouchier A. M. R., Meyaard L., Brouwer M., Hovenkamp E. y Schuitemaker H. Broader Tropism And Higher Cytopathicity For CD4+ T Cell Of A Syncytium Inducing Compared To A Non-Syncytium-Inducing HIV-1 Isolate As A Mechanism For Accelerate CD4+ T Cell Decline In Vivo. *Virology*, 1996, 219:87-95.

17. Gougeon M. Apoptosis As An HIV Strategy To Escape Immune Attack. *Nature Reviews*. May 2003, 3:392-404.

18. Grant A. D. y De Cock K. M. HIV Infection And AIDS In The Developing World. *BMJ*, June 2002, 322:1475-1478.

19. Hammache D., Yahi N., Maresca M., Piéroni G., y Fantini J. Human Erythrocyte Glycophospholipids As Alternative Cofactors For Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Entry: Evidence For CD4-Induced Interaction Between HIV-1 Gp120 And Reconstituted Membrane Microdomains Of Glycophospholipids (Gb3 And GM3). *Journal of Virology*, June 1999, 73(6): 5244-5248.

20. Honig M. G. y Hume R. I. Fluorescent Carbocyanine Dyes Allow Living Neurons Of Identified Origin To Be Studied In Long-Term Culture. *The Journal of Cell Biology*, 1986, 103:171-187.

21. Honig M. G. y Hume R. I. Dil And Dio Versatile Fluorescent Dyes For Neuronal Labelling And Pathway Tracing. *TINS*, 1989,12(9): 333-341.
22. Huerta L., Lamoyi E., Báez-Saldaña A; y Larralde C. Human Immunodeficiency Virus Envelope-Dependent Cell-Cell Fusion: A Quantitative Fluorescence Cytometric Assay. *Cytometry*, 2002, 47:100-106.
23. Hug P., Han-Ming J., Korte T., Xiao X., Dimitrov S. D., Ming W., Puri A. y Blumenthal R. Glycosphingolipids Promote Entry Of A Broad Range De Human Immunodeficiency Virus Type 1 Isolates Into Cell Lines Expressing CD4, CXCR4 And/Or CCR5. *Journal of Virology*, 2000, 74(14): 6377-6385.
24. Jekle A., Keppler T. O., De Clercq E., Schols D., Weinstein M. y Goldsmith A. M. In Vivo Evolution De Human Immunodeficiency Virus Type 1 Towar Increased Pathogenicity Through CXCR4-Mediated Killing Of Uninfected CD4 T Cell. *Journal of Virology*, May 2003, 77(10): 5846-5854.
25. Jones L. St. J. P., Korte T. y Blumenthal R. Conformational Changes In Cell Surface HIV-1 Envelope Glycoproteins Are Triggered By Cooperation Between Cell Surface CD4 And Co-Receptors. *The Journal of biological Chemistry*,1998, 273(1): 404-409.
26. Klausner R. D. y Wolf D. E. Selectivity Of Fluorescent Lipid Analogues For Lipid Domains. *Biochemistry* 1980;19:6199-6203.
27. Kwa D., Vingerhoed J., Boeser-Nunnink B., Broersen S., y Schuitemaker H. Cytopathic Effects Of Non-Syncytium-Inducing And Syncytium- Inducing Human Immunodeficiency Virus Tipe 1 Variants On Different CD4+ T Cell Subsets Are Determined Only By Coreceptor Expression. *Journal of Virology*, Nov 2002, 75(21): 10455-10459.
28. La Bonte J. A., Madani N. y Sodorski J. Cytolysis By CCR5- Using Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Glycoproteins Is Dependent On Membrane Fusion And Can Be Inhibited By High Levels Of CD4 Expression. *Journal of Virology*, June 2003, 77(12):6645-6659.
29. La Bonte A. J., Patel T., Hofmann W. y Sodroski J. Importance Of Membrane Fusion Mediated By Human Immunodeficiency Virus Envelope Glycoproteins For Lysis Of Primary CD4-Positive T Cell. *Journal of Virology*, Nov 2000, 74(22): 10690-10698.

30. Lewin-Smith M, Wahl SM; y Orestein JM. Human Immunodeficiency Virus-Rich Multinucleated Giant Cells In The Colon: A Case Report With Transmission Electron Microscopy, Immunohistochemistry, And In Situ Hibridization. *Modern Pathology* 1999, 12(1):75-81.
31. Liao Z., Cimasky M., Hampton R., Nguyen H. D; y Hildreth E.K. J. Lipid Rafts And HIV Pathogenesis: Host Membrane Cholesterol Is Required For Infection By HIV Type 1. *AIDS Research and Human retroviruses*, 2001, 17(11): 1009-1019.
32. Mañes S., del Real G., Lacalle R., Lucas P., Gómez-Moutón C., Sonsoles S. P., Delgado R., Alcamí J., Mira E., y Martínez-A C. Membrane Raft Microdominios Mediated Lateral Assemblies Required For HIV-1 Infection. *EMBO reports*, 2000, 1(2): 190-196.
33. Mukherjee S., Soe Thwe Thwe y Maxfield F. R.; Endocytic Sorting Of Lipid Analogue Differing Solely In The Chemistry Of Their Hydrophobic Tail. *The Journal of cell Biology*, March 1999, 144(6): 1271-1284.
34. Nguyen H. D. y Hildreth E.K. J. Evidence For Budding Of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Selectively From Glicolipid-Enriched Membrane Lipid Rafts. *Journal of Virology*, Apr 2000, 74(7): 3264-3272.
35. Orestein J. In Vivo Cytolysis Of Human Immunodeficiency Virus Type 1- Infected Lymphocytes In Lymphoid Tissue. *The Journal of Infectious Diseases*. 2000; 182:338-342.
36. Phillips D. The Role of Cell-to-Cell Transmission in HIV Infection. *AIDS*. 1994, 8:719-731.
37. Popik W., Alce M. T. y Au Wei-Chun. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Uses Lipid Raft-Colocalized CD4 And Chemokine Receptor For Productive Entry Into CD4+ T Cell. *Journal of Virology*, May 2002, 76(10): 4709-4722.
38. Ryzhova E. V., Crino P., Shawver L., Westmoreland S. V., Lackner A. A. y González-Scarano F. Simian Immunodeficiency Virus Encephalitis: Analysis De Envelope Sequences From Individual Brain Multinucleated Giant Cells And Tissue Samples. *Virology* 2002; 297; 57-67.
39. Scheller C. and Jassoy C. Syncytium Formation Amplifies Apoptotic Signals: A New View On Apoptosis In HIV Infection In Vitro. *Virology*, 2001, 282:48-55.

40. Simons K. y Ikonen E. Functional Rafts In Cell Membranes. *Nature* 1997,387:569-572.
41. Sodroski J., Goh Wei Chun, Rosen C., Campbell K. y Haseltine W. A. Role Of HTLV-III/LAV Envelope In Syncytium Formation And Cytopathicity. *Nature*, 1986, 322:470-474.
42. Sousa A. E., Carneiro J., Meier-Scellersheim M., Grossman Z. y Victorino R. M.M. CD4T Cell Depletion Is Linked Directly To Immune Activation In The Pathogenesis Of HIV-1 And HIV-2 But Only Indirectly To The Viral Load. *Journal of Immunology*, 2002, 169: 3400-3406.
43. Stevenson M. HIV-1 Pathogenesis. *Nature medicine*, July 2003, 9(7): 853-860.
44. Vereb G, Szollosi J, Matkoj P, Farkas T, Vigh L, Matyus L, Waldmann TA, Dammjanovich S. Dynamic Yet Structured: The Cell Membrane Three Decades After The Singer-Nicolson Model. *PNAS*, July 2003, 100(14): 8053-8058.
45. Viard M., Parolini I., Sargiacocmo M., Fecchi K., Ramoni C., Ablan S., Ruscetti W. F., Ming Wang Ji y Blumenthal R. Role Of Cholesterol In Human Immunodeficiency Virus Type-1 Envelope Protein-Mediated Fusion With Host Cells. *Journal of Virology*. 2002, 76(22): 11584-11595.
46. Weng Y., Yang Z. y Weiss C. D. Structure-Function Studies Of The Self-Assembly Domain Of The Human Immunodeficiency Virus Type 1 Transmembrane Protein Gp41. *Journal of Virology*, June 2000, 74(11): 5368-5372.