



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**FUSIÓN CELULAR MEDIADA POR LAS PROTEÍNAS DE LA
ENVOLTURA DEL VIH: CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y
RELEVANCIA PARA LA PATOGÉNESIS DEL SIDA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A:

Q.F.B. EVELYN RIVERA TOLEDO

DIRECTOR DE TESIS: DR. CARLOS LARRALDE RANGEL

MÉXICO, D.F.

OCTUBRE, 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por la beca asignada durante los estudios de Maestría.

Al Doctor Carlos Larralde Rangel por su dirección para el desarrollo del proyecto de Maestría y la elaboración de ésta Tesis.

Al Doctor Edmundo Lamoyi Velázquez y a la Doctora Blanca Ortiz Quintero, miembros de mi Comité Tutorial.

A la Doctora Leonor Huerta Hernández por su asesoría para el planteamiento y desarrollo del proyecto de Maestría, así como por la revisión de ésta tesis.

DEDICATORIA

A Dios por haberme permitido concluir con éste trabajo y por la fuerza que me infunde cuando más lo necesito.

A mis padres por su apoyo y amor.

A mis hermanos Martín, Margarita, Rosa, Angélica, Javier y Mario por darme siempre ánimo.

A mis sobrinos por hacerme sonreír.

A mis amigos Jay, Mariana, Gabriela, Paola, Manuel, Miguel, Karen, Mayra, Gina, Nayali, Lupita y Arturo.

A mis compañeros y amigos con quienes comparto espacio y trabajo en el laboratorio.

ÍNDICE

I. Resumen	1
I. Summary	3
II. Introducción	4
2.1 Fusión celular.....	4
2.2 Fusión celular mediada por las proteínas de la envoltura del VIH.....	5
2.3 Dependencia de la fusión de otros receptores.....	10
2.4 Importancia de la fusión celular en la infección por el VIH.....	11
2.5 Consecuencias de la fusión celular.....	13
2.6 Estudio de la fusión celular.....	14
III. Planteamiento del Problema e Hipótesis	16
IV. Objetivos	16
V. Materiales y Métodos	17
5.1 Líneas celulares.....	17
5.2 Cultivo celular.....	18
5.3 Inducción de la expresión de proteínas de envoltura.....	18
5.4 Tinción con colorantes fluorescentes vitales.....	18
5.5 Ensayo de fusión celular.....	19
5.6 Inmunofluorescencia directa.....	20
5.7 Análisis por citometría de flujo.....	21
5.8 Evaluación de la expresión de gp120 en células Env ⁺	21
5.9 Western Blot.....	22
VI. Resultados	24
6.2 Caracterización de la fusión celular.....	24
6.2.1 Modelo para el estudio de la fusión celular.....	24
6.2.2 Dependencia de la fusión celular de las proteínas de la envoltura del VIH.....	26

6.2.3 Dependencia de la fusión de los receptores CD4 y CXCR4.....	28
6.3 Consecuencias de la fusión celular sobre la expresión de moléculas de superficie en linfocitos T.....	29
6.3.1 Expresión de CD4.....	31
6.3.2 Expresión de CXCR4.....	32
6.3.3 Expresión de ICAM-1 Y LFA-1.....	35
6.3.4 Expresión de CD3 y CD28.....	38
6.3.5 Expresión del receptor para IL-2 (CD25).....	40
VII. Discusión.....	43
7.1 Expresión de CD4.....	44
7.2 Expresión de CXCR4.....	45
7.3 Expresión de ICAM-1 Y LFA-1.....	46
7.4 Expresión de CD3 y CD28.....	47
7.5 Expresión del receptor para IL-2	47
7.6 Posibles consecuencias sobre el sistema inmune.....	48
VIII. Conclusiones.....	50
Anexo.....	52
Bibliografía.....	53

I.RESUMEN

La fusión celular es un evento que ocurre con frecuencia en los sistemas biológicos y produce cambios importantes en la fisiología celular. En la infección por el VIH se ha sugerido que dicha fusión puede ser uno de los mecanismos que contribuyen a la pérdida de los linfocitos T CD4⁺ que produce un estado de inmunodeficiencia conocido como síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Sin embargo, la fisiología de los sincicios, así como su papel en la patogénesis del SIDA han sido poco estudiados. Las células infectadas por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) expresan en su membrana proteínas virales capaces de inducir la fusión con células no infectadas circundantes. En el presente trabajo se determinó el efecto de la fusión celular inducida por las proteínas de la envoltura del VIH sobre la expresión de receptores de importancia funcional para las células T CD4⁺, en los sincicios y en las células no fusionadas circundantes. Para este propósito se utilizaron células Jurkat transfectadas para expresar las proteínas de la envoltura del VIH gp120/gp41 (células Env⁺), en cocultivo con células Jurkat no transfectadas (células CD4⁺). Para hacer un análisis cuantitativo de la fusión, las células se tiñeron diferencialmente con colorantes lipofílicos que fluorescen en verde y rojo, respectivamente, antes del cocultivo. Después de la fusión celular, los cocultivos se analizaron para identificar a las células fusionadas (doblemente fluorescentes) y a las no fusionadas (de un solo color). Con el uso de anticuerpos monoclonales acoplados a una molécula fluorescente en un tercer canal, se evaluó de manera independiente cada una de las poblaciones celulares en cuanto a la expresión de los receptores CD4, CXCR4, CD3, CD28, LFA-1, ICAM-1 e IL-2R.

Los resultados obtenidos indican que la fusión celular reduce la expresión de los receptores CD4, CXCR4 e ICAM-1 en los sincicios, mientras que mantienen en cantidades elevadas los receptores CD3, CD28 y LFA-1, lo que sugiere que podrían conservar su capacidad para activarse e incluso participar en la respuesta inmune. Con respecto a las células que no se incorporan a los sincicios se encontró una reducción importante en la expresión de CD4 y CXCR4, lo que podría afectar su capacidad para responder frente a estímulos antígenicos. En ningún caso se detectó la expresión del receptor

para interleucina-2, lo que indica que la fusión celular no induce un estado de activación. Estos resultados sugieren que durante la infección por el VIH, la fusión celular y la reducción de la expresión de receptores importantes para las células T puede ser uno de los mecanismos que contribuyen a la progresión del SIDA.

I. SUMMARY

Cell fusion frequently occurs in biological systems and leads the involved cells to important physiological changes. In HIV infection it has been suggested that cell fusion may be one of the mechanisms underlying the CD4⁺ T cell loss, bringing to the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). However, the syncytia's physiology and role in AIDS pathogenesis has not been studied in detail.

Human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) infected cells express on their membrane viral proteins (gp120/gp41) that may induce their fusion with neighbor uninfected cells. In this work, a lymphocytic cell line (Jurkat) transfected for expression of the gp120/gp41 HIV-1 glycoprotein (Env⁺ cells) in coculture with Jurkat untransfected CD4⁺, CXCR4⁺ cells, was used to determine the consequences of the cell fusion induced by the membrane HIV proteins on the expression of important T cell receptors. In order to get a quantitative and objective description of cell fusion, Env⁺ cells and CD4⁺ T cells were labeled with lipophilic fluorescent green and red dyes, respectively, before coculture. After cell fusion, cocultures were analyzed by flow cytometry in order to measure the percentage of syncytia and unfused cells (double-colored or single-colored cells, respectively), as well as the expression of membrane receptors by the use of antibodies coupled to a third party fluorochrome.

Results showed that syncytia has a lower expression of CD4, CXCR4 and ICAM-1 receptors than unfused cells. CD3, CD28 and LFA-1 receptors remain highly expressed on syncytia, suggesting that syncytia might retain the activation capacity necessary to participate in immune responses. In regard to unfused neighbor cells, it was found that they present a reduced expression of CD4 and CXCR4 receptors which might decrease their ability to respond to antigenic stimuli. In none case, IL-2R expressing cells were detected, indicating that cell fusion do not induce an activation state. These results show that cell fusion modifies the expression of important receptors both on syncytia and neighbor unfused T cells. These changes may constitute an additional mechanism of immunodeficiency leading to AIDS.

II. INTRODUCCIÓN

2.1. Fusión celular

La fusión celular es un proceso que favorece el desarrollo de una gran variedad de eventos biológicos, tales como la fecundación, la formación del músculo esquelético, el desarrollo placentario, así como de respuestas inflamatorias de fase crónica (5, 48). Este proceso implica la mezcla de los lípidos que constituyen las membranas celulares y la mezcla de los contenidos acuosos citoplásmicos (fig.1), lo que resulta en la interacción de los citoplasmas y genomas de dos o más células que podrían encontrarse en diferente estado funcional (52).

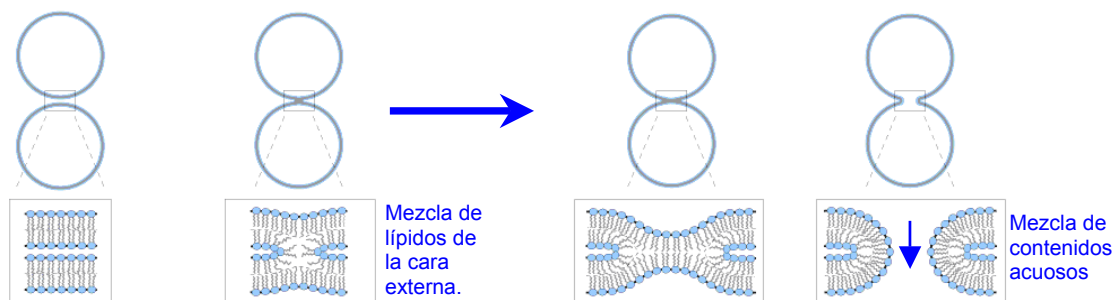


Figura 1. Mecanismo general de fusión de membranas. La fusión requiere el contacto entre las membranas que permite la mezcla de los lípidos de la cara externa de la bicapa lipídica (hemifusión). Eventos posteriores generan un poro que permite la mezcla del contenido acuoso de los compartimentos.

La fusión entre células de la misma o de diferente estirpe (homocariones u heterocariones) puede favorecer la represión de funciones diferenciadas, o bien, activar genes que previamente no se expresaban. Por lo tanto, se pueden generar cambios importantes en la fisiología de las células involucradas (52).

Un ejemplo interesante de este fenómeno se presenta durante la formación de la placenta. Las células precursoras denominadas citotrofoblastos se fusionan entre sí, con lo que adquieren la capacidad de transportar nutrientes, gases y producir hormonas tales como la gonadotropina coriónica indispensable para la progresión del embarazo (78).

Asimismo se sabe que los mioblastos al fusionarse forman el tejido muscular con la facultad para contraerse (61), o que los macrófagos fusionados (células gigantes multinucleadas) potencian su capacidad fagocítica y de producción de citocinas que mantienen repuestas inflamatorias por períodos prolongados (31). Recientemente la fusión celular también se ha estudiado como una alternativa terapéutica para la regeneración tisular inducida por células madre de médula ósea, ya que la fusión de estas células con tejidos dañados induce la proliferación celular (45, 48). Sin embargo el resultado de la fusión no siempre es favorable, pues el cambio en el fenotipo puede conferir a las células características patológicas para los sistemas *in vivo*, como sucede en la formación de tumores metastásicos que pueden ser producto de la fusión entre células tumorales y macrófagos (15). Durante la infección por virus envueltos también se ha observado que la fusión celular es un evento frecuente que podría conducir a la muerte de las células involucradas. Particularmente, en la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), se ha sugerido que éste puede ser uno de los mecanismos que contribuyen a la pérdida de los linfocitos T CD4⁺ que conlleva a los individuos afectados al estado de inmunodeficiencia terminal conocido como SIDA (67). En los siguientes párrafos nos enfocaremos a describir la fusión celular durante la infección por el VIH.

2.2 Fusión celular mediada por las proteínas de la envoltura del VIH

El estudio de virus fusogénicos ha permitido conocer los elementos que constituyen la maquinaria de fusión, la cual está compuesta por glicoproteínas de membrana específicas de cada sistema biológico (42).

El proceso de infección por el VIH es mediado por el complejo glicoprotéico gp120/gp41 expresado sobre la membrana del virus. Éste es

codificado por el gen *env* como un precursor (gp160) que se escinde por proteólisis, dentro del aparato de Golgi, en dos subunidades que se mantienen en contacto a través de interacciones no covalentes (14). La gp120 permanece como una subunidad de superficie y es la responsable de reconocer a su receptor primario CD4, así como un correceptor que puede ser CXCR4 o CCR5 sobre la membrana de la célula hospedera (10, 19). La gp41 se establece como una subunidad transmembranal que contiene una secuencia peptídica denominada “péptido de fusión” que permanece oculta bajo un arreglo estructural metaestable o de alta energía. Cabe mencionar que a nivel de retículo endoplásmico, la gp160 se asocia para formar trímeros y una vez procesada, el complejo gp120/gp41 se ancla en la membrana (Fig. 2), siendo ésta la forma funcional del complejo (10).

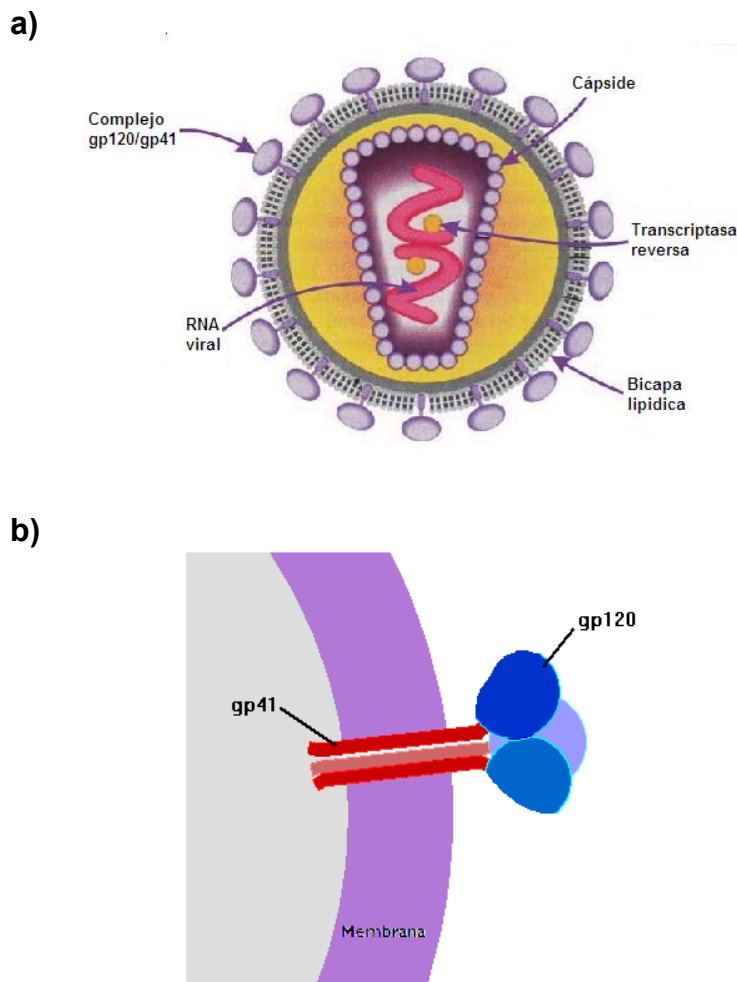


Figura 1. a) Estructura del VIH. b) El complejo gp120/gp41 se asocia para formar trímeros sobre la membrana que lo expresa. Por lo tanto, se sugiere que reacciona con un trímero de CD4 de la membrana de la célula blanco para inducir la fusión.

Cuando gp120 se une a sus receptores específicos, ocurren cambios conformacionales que liberan a gp41 de su estado metaestable. El modelo más aceptado que describe el mecanismo de fusión mediado por las proteínas de la envoltura del VIH, sugiere que gp41 adopta una conformación extendida en la que los dominios amino y carboxilo-terminales de gp41 se encuentran en una conformación helicoidal que expone el péptido de fusión (23). Este arreglo es transitorio y propicio para la inserción del péptido de fusión en la membrana de la célula blanco (fig. 2), lo que es seguido del empaquetamiento de los trímeros de hélices amino y carboxilo-terminal que finalmente acerca las membranas para que se fusionen (60).

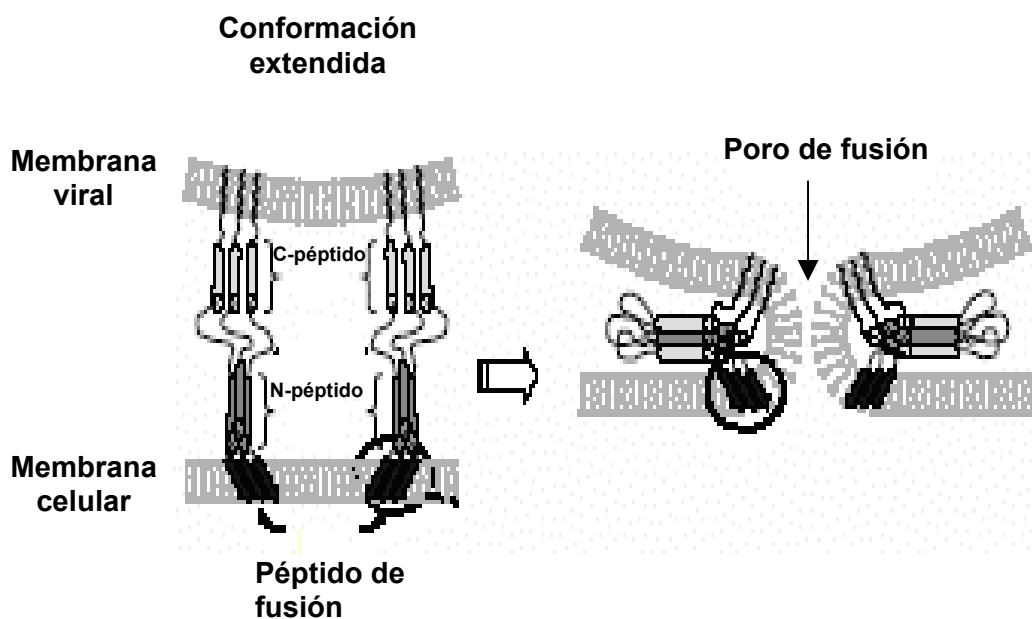


Figura 3. Cambios conformacionales en gp41 durante la fusión. Una vez que gp120 interacciona con CD4 y el correceptor, ocurren cambios conformacionales en gp41 que exponen el péptido de fusión localizado en el extremo amino terminal. Este péptido se inserta en la membrana de la célula blanco. Un plegamiento por el empaquetamiento de las hélices amino y carboxilo terminal de gp41 acerca a las membranas permitiendo la fusión.

Una vez que las membranas viral y celular se han fusionado, el VIH tiene libre acceso al interior de la célula para comenzar su ciclo infeccioso (fig. 4).

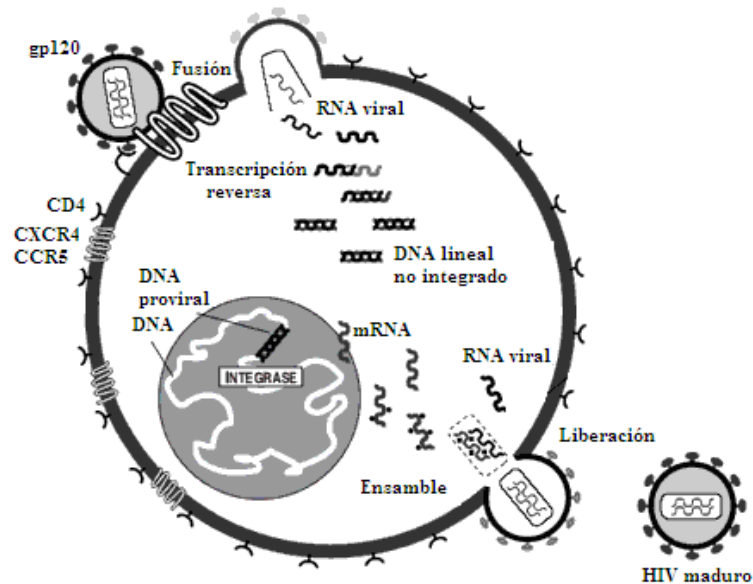


Figura 4. La membrana de la partícula viral se fusiona con la membrana de la célula blanco para ingresar y poder utilizar la maquinaria de replicación del hospedero, de esta manera se producen nuevas partículas infecciosas que serán liberadas con una envoltura proveniente de la membrana celular.

Las células infectadas sintetizan las proteínas virales y expresan en su membrana el complejo viral gp120/gp41 el cual es importante para el ensamblaje de las partículas virales. Al momento de ser liberados, los virus quedan recubiertos por una porción de la membrana celular enriquecida para las proteínas fusogénicas necesarias para la capacidad infecciosa del virus. La incorporación de proteínas en las partículas virales no está restringida a las glicoproteínas virales, ya que es posible detectar proteínas de la membrana de la célula hospedera en la envoltura, tales como MHC-I, CD43, CD44, CD55, CD59, CD63, CD71, CD80, CD86, ICAM-1 y LFA-1 (6). Sin embargo, la importancia de la expresión del complejo gp120/gp41 sobre la membrana de la

célula hospedera no se limita al ensamble correcto de los virus, sino que gp120 le confiere a la célula infectada la capacidad para interaccionar con células CD4⁺ y fusionarse con ellas mediante la gp41, generando células gigantes multinucleadas o sincicios (fig. 5).

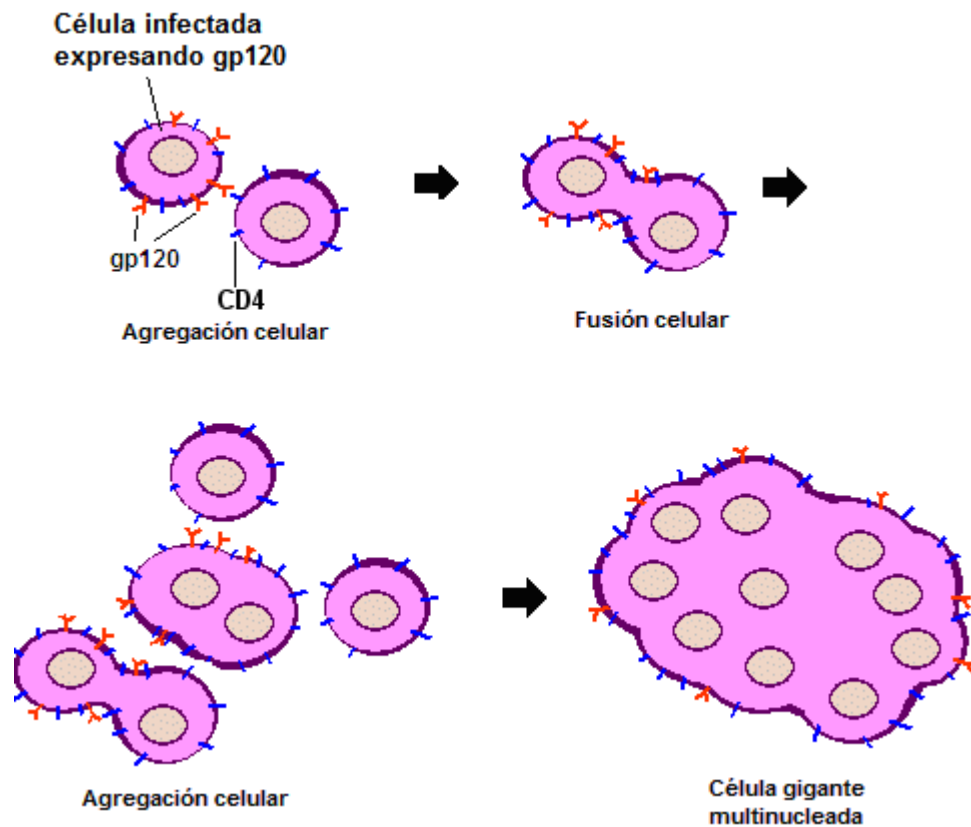


Figura 5. Fusión célula-célula es dependiente del complejo protéico viral gp120/gp41. La fusión entre células produce sincicios o células gigantes multinucleadas de tamaño variable.

Se ha observado en cultivos *in vitro* de células T infectadas, que las células fusionadas por este medio son susceptibles a morir por apoptosis en un tiempo promedio de 72 horas (67). Por lo tanto, la fusión celular se considera como uno de los efectos citopáticos producidos durante la infección por el VIH.

2.3 Dependencia de la fusión de otros receptores

Las células susceptibles a la infección por el VIH son aquellas que expresan el receptor CD4, además de un correceptor que puede pertenecer a la familia de receptores para quimiocinas CXC ó CC (1). La presencia del correceptor es fundamental, ya que se ha observado que la expresión de CD4, aunque requerida para la unión del virus a la célula, no es suficiente para una infección productiva en ausencia de los receptores CXCR4 ó CCR5 (46, 77), expresados principalmente en células T CD4+ y macrófagos (41).

A través del uso de anticuerpos monoclonales se ha logrado determinar que una región dentro de gp120 denominada loop V3 es la responsable de la interacción con el correceptor, ya que dependiendo de su secuencia de aminoácidos podrá interactuar principalmente con los receptores CXCR4 o con CCR5 (46) y definirá el tropismo celular del virus, ya que los linfocitos T vírgenes expresan mayor nivel de CXCR4 mientras que macrófagos, y linfocitos T de memoria expresan mayor cantidad de CCR5. Por esta razón a los virus que tienen tropismo por macrófagos o células T de memoria se les conoce como R5 y a los que infectan principalmente linfocitos T vírgenes se les llama virus X4.

Aunque se ha observado que las interacciones con estos receptores son suficientes para la infección y la fusión celular, se ha encontrado que otras moléculas pueden desempeñar un papel importante. Por ejemplo, la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) proveniente del hospedero, es frecuentemente incorporada a la membrana viral y favorece la infección de células de memoria que expresan mayor nivel de LFA-1 (ligando natural de ICAM-1) comparadas con la población de células T que no han sido activadas (70).

Asimismo se ha descrito que moléculas de membrana con carga negativa, como los proteoglicanos, pueden establecer interacciones electrostáticas con el loop V3 de gp120 que tiene secuencias de aminoácidos de carácter básico que le brindan una fuerte carga positiva. En el caso del heparán sulfato se ha encontrado que su remoción por hidrólisis enzimática disminuye el enlace del virus y la infección de líneas celulares, así como la formación de células gigantes multinucleadas (51).

Algunas moléculas, como las lectinas tipo C, pueden mediar la unión del virus a la membrana de monocitos/macrófagos y células dendríticas para favorecer la fusión mediada por las proteínas virales (76), aunque su participación en la fusión de células de estirpe monocítica no ha sido bien estudiada.

Por lo tanto, en el proceso de fusión pueden participar un gran número de moléculas importantes para la respuesta inmune, sin embargo su papel puede ser de mayor o menor importancia dependiendo del nivel de expresión de los receptores primarios gp120 y CD4, como ya se ha visto para CXCR4 (26).

2.4 Importancia de la fusión celular en la infección por el VIH

La dinámica de la infección por el VIH se caracteriza por presentar una fase inicial aguda de viremia elevada en sangre con una disminución importante de las células T CD4⁺, que se restituye con la aparición de células T citotóxicas y de anticuerpos específicos contra el VIH (fig. 6). En la fase crónica subsiguiente, la carga viral disminuye y llega a ser incluso indetectable a nivel de sangre periférica. Sin embargo, en muestras de tejido linfoide de individuos infectados, se ha observado un elevado número de células gigantes multinucleadas en las que se detecta una replicación viral continua (49, 50). Estas observaciones han sugerido que los sincicios generados por fusión celular podrían actuar como reservorios virales. (1, 50). Asimismo, la replicación viral dentro de estos reservorios podría constituir un mecanismo eficiente de diseminación que evita que el virus se enfrente a la acción de anticuerpos neutralizantes u otros elementos de la respuesta inmune (53).

Por otra parte, aproximadamente un 30% de los pacientes que se encuentran en una etapa avanzada de la infección muestran síntomas clínicos de demencia. El análisis post mortem de tejido cerebral y de médula espinal revelan la presencia de sincicios en zonas con un alto grado de destrucción de materia blanca. Estas observaciones sugieren que la actividad metabólica de los sincicios podría favorecer el daño del tejido adyacente conduciendo a un estado degenerativo del sistema nervioso (50).

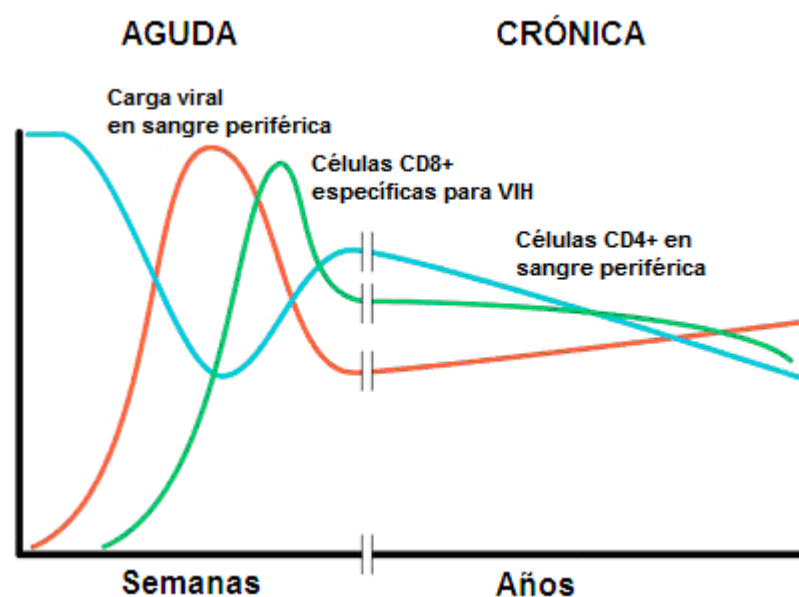


Figura 6. Dinámica de la infección por el VIH. La fase aguda dura solamente algunas semanas, mientras que la fase crónica puede durar muchos años, dependiendo del estado inmunológico del paciente.

Finalmente, en la actualidad es generalmente aceptado que la capacidad fusogénica que los virus presentan *in vitro* se relaciona con las manifestaciones clínicas de la enfermedad. En etapas tempranas de la infección frecuentemente se pueden aislar virus que utilizan el correceptor CCR5 e infectan principalmente macrófagos, células dendríticas y células T de memoria (Fig. 7). Sin embargo, en un 50% de los individuos infectados se ha observado la aparición de variantes virales con afinidad por el receptor CXCR4 (55). Los virus con estas características se replican principalmente en linfocitos T vírgenes y son altamente fusogénicos en cultivos de linfocitos T primarios y de líneas de células T. Este cambio se asocia con la pérdida acelerada de células CD4+ que conduce hacia las manifestaciones clínicas del SIDA, lo que sugiere que existe una correlación entre la aparición de variantes virales inductoras de sincicios y la progresión a SIDA. (1).

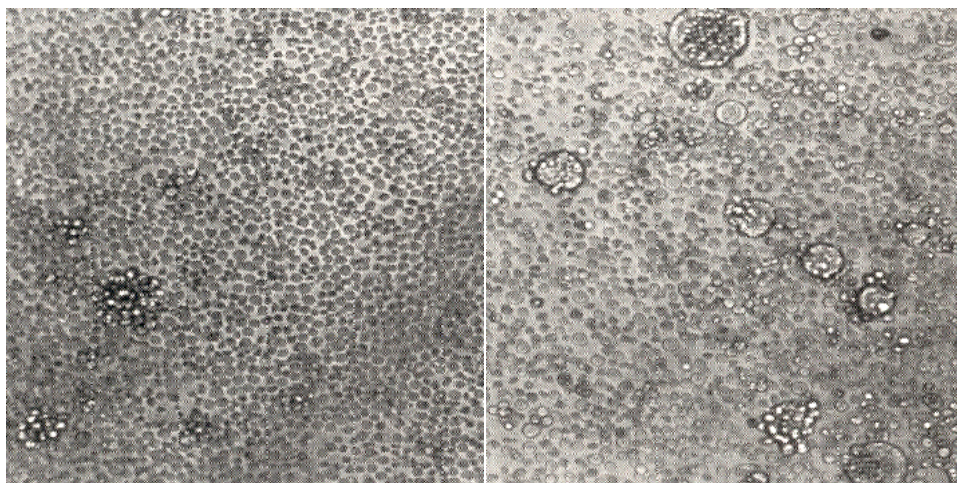


Figura 7. Cultivo de células infectadas con virus aislado a) en una etapa temprana de la infección y b) en etapa avanzada. Nótese que los virus encontrados en la fase inicial no forman sincicios en el cultivo, sin embargo, los virus encontrados en un paciente que presentaba síntomas clínicos de SIDA, son inductores de sincicios.

2.5 Consecuencias de la fusión celular

La mayoría de estudios realizados sobre la viabilidad de los sincicios reportan que la fusión celular inducida por las proteínas gp120/gp41 del VIH es un proceso que favorece la destrucción celular, aunque se conoce poco acerca de los mecanismos implicados. Se ha propuesto que la muerte por apoptosis es el destino final de las células multinucleadas y aún de células no infectadas, ya que se ha observado la activación de cinasas dependientes de ciclinas y de factores de transcripción como p53 que activan la ruta mitocondrial. La participación de este tipo de moléculas sugiere que la apoptosis se activa como consecuencia de la división celular fallida de las células fusionadas (9).

Sylwester y cols. han estudiado no solo el destino final de los sincicios, sino las consecuencias de la fusión sobre las células que constituyen una célula multinucleada, así como algunos aspectos de su fisiología para entender su papel en la destrucción celular. Este grupo de investigadores encontró que las células fusionadas *in vitro* e *in vivo* pueden imitar la organización subcelular y la polaridad de las células individuales, manteniendo su capacidad de

movimiento. También encontraron que células T individuales y sincicios pequeños se desplazan con dirección hacia los sincicios de mayor tamaño por efecto de un factor quimiotáctico liberado por los sincicios, que se supone es gp120 soluble (62, 63). Estos hallazgos sugieren que los sincicios pueden contar con mecanismos particulares que facilitan la fusión y destrucción celular. Sin embargo, aún no queda claro si las células multinucleadas tienen la capacidad de modificar la expresión de receptores o cambiar su estado de activación para influir sobre las células vecinas. Existen algunos reportes que muestran que las células T CD4⁺ provenientes de pacientes infectados tienen deficiencias en su capacidad para responder frente a mitógenos o estímulos antigénicos (30, 32). En estos casos se ha encontrado un defecto en la expresión del receptor para interleucina 2 (38).

Estos antecedentes muestran la necesidad de llevar a cabo un estudio sobre las características de los sincicios formados por las proteínas de fusión del VIH, así como de las células vecinas que no se fusionan, para entender los mecanismos que producen daño celular. Como primer acercamiento, se puede evaluar el efecto de la fusión celular sobre la expresión de receptores en las células fusionadas y en las células vecinas que interaccionan con los sincicios.

2.6 Estudio de la fusión celular

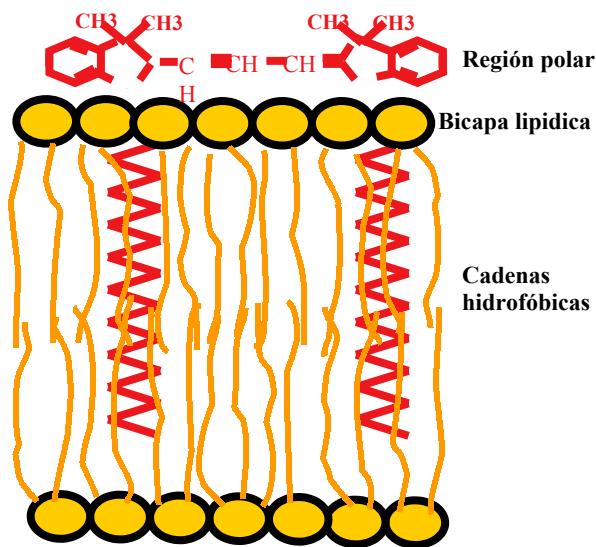
La fusión celular se ha estudiado considerando las dos premisas que la definen: la mezcla de los lípidos de las membranas que las constituyen y la mezcla de los contenidos acuosos (5, 13). De esta forma, se ha utilizado la microscopía, la activación de genes reporteros, así como por la transferencia de colorantes lipídicos y acuosos, además de algunos métodos electrofisiológicos que determinan cambios eléctricos debidos a la mezcla de los contenidos acuosos.

Actualmente los métodos fluorescentes y eléctricos se han mejorado y son utilizados con mayor frecuencia para el estudio de la fusión celular.

En nuestro laboratorio se ha desarrollado un método que permite el estudio y cuantificación de la fusión celular por citometría de flujo (35). Éste utiliza células transfectadas para expresar el complejo viral gp120/gp41 y

células CD4⁺. Las células se marcan diferencialmente con colorantes tipo carbocianina que emiten fluorescencia roja (DiI) y verde (DiO), y que por ser de carácter lipofílico se distribuyen principalmente en la membrana plasmática debido a sus cadenas saturadas de 18 carbonos (fig. 8). El marcaje es estable, intenso y no afecta la viabilidad celular. Cuando las células marcadas se ponen en cocultivo y ocurre la fusión, el citómetro de flujo puede cuantificar el porcentaje de células que presentan la doble fluorescencia (células fusionadas), así como el porcentaje de células que se mantienen de un solo color (no fusionadas). Este método se ha evaluado extensamente en el laboratorio (34, 35, 36, 44) y es el que se utiliza en el presente trabajo para el estudio de la fusión celular.

a)



b)

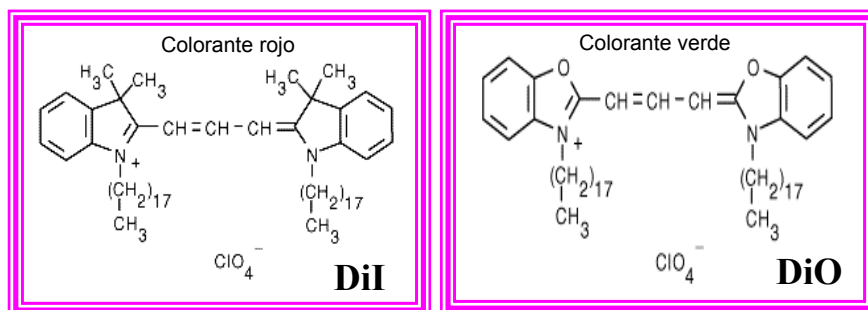


Figura 8. a) Estructura y arreglo de los colorantes lipofílicos fluorescentes en una bicapa lipídica, b) estructura del colorante DiI que emite fluorescencia roja y del DiO que emite fluorescencia verde.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La fusión celular es un evento común que se observa en los individuos infectados por el VIH y existen evidencias que sugieren que es un mecanismo que contribuye a la pérdida de células T CD4⁺, característica principal de la infección. Sin embargo, no se sabe si la fusión tiene efectos sobre la expresión de receptores importantes para la fisiología de las células T en las células fusionadas o en las células vecinas que no se fusionan, pudiendo afectar su funcionalidad como células del sistema inmunitario.

HIPÓTESIS

La fusión celular mediada por las proteínas de la envoltura del VIH modifica la expresión de receptores de membrana en los sincicios y en las células vecinas.

IV. OBJETIVOS

1. Evaluar si la fusión celular es dependiente de la expresión de las proteínas de la envoltura del VIH.
2. Determinar si hay cambios en el fenotipo de las células T fusionadas (sincicios) y no fusionadas, evaluando la expresión de moléculas de membrana tales como CD4, CD3, CD28, LFA-1, ICAM-1, CD25 y CXCR4.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Líneas celulares

La línea celular Jurkat HXBc2 transfectada para expresar las proteínas de membrana gp120/gp41 del VIH, fue donada por el Dr. Joseph Sodroski (Harvard Medical School, Boston, Mass.), a través del AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH. Esta línea celular proviene de la transfección estable de células Jurkat E6-1 con dos plásmidos diferentes, el primero que contiene los genes *env* y *rev* de la cepa HXBc2 del VIH-1 acoplados al operador de tetraciclina y a una secuencia de resistencia a higromicina. El segundo cuenta con el activador VP16 de citomegalovirus unido a un represor dependiente de tetraciclina y a una secuencia de resistencia a geneticina (fig. 9). De esta manera, en ausencia de tetraciclina se induce la expresión del complejo protéico viral (8). La línea linfocítica Jurkat E6-1 fue donada por el Dr. Robin Weiss, a través del mismo programa.

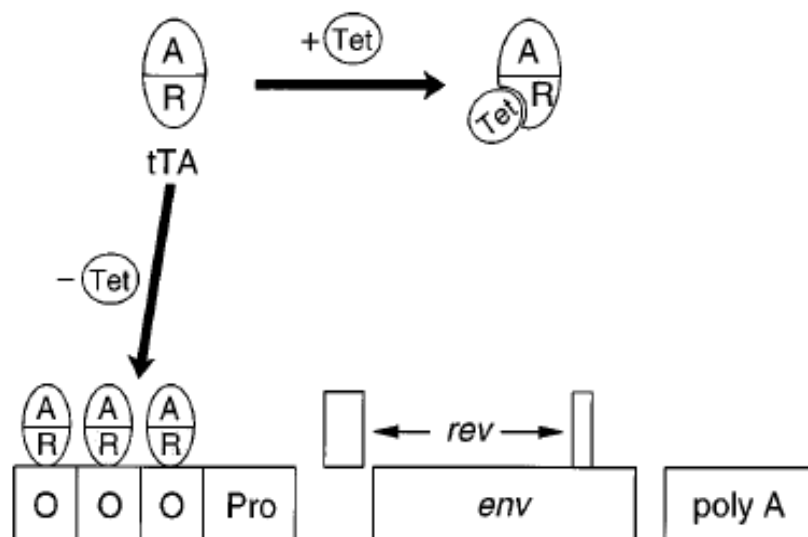


Figura 9. Estructura del sistema para la expresión inducible de las proteínas gp20/gp41 del VIH. La proteína tTA está compuesta por el activador A y por el represor de tetraciclina R. La unión de la proteína tTA al operador de tetraciclina promueve la expresión de las glicoproteínas virales. Cuando el antibiótico se encuentra presente, se une a la proteína tTA obstaculizando su unión al promotor e inhibiendo la expresión del gen *env*.

5.2 Cultivo celular

Las células HXBc2 y E6 (denominadas en lo subsiguiente como Env⁺ y CD4⁺ respectivamente), se cultivan en suspensión en botellas T-75 con medio RPMI (Gibco BRL) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (Gibco BRL), penicilina 50 U/ml y estreptomina 50 µg/ml (Gibco BRL). Las células Env⁺ también son cultivadas en presencia de 1 µg/ml de tetraciclina, 200 µg/ml de higromicina y 200 µg/ml de geneticina. Ambos cultivos se mantienen a 37°C con 5% de CO₂.

5.3 Inducción de la expresión de proteínas de envoltura

En condiciones de esterilidad las células Env⁺ se colocan en tubos para centrifuga de 50 ml, se centrifugan 3 min a 1150 rpm para retirar el medio de cultivo y se lavan 2 veces con 40 ml de PBS (1 mM NaH₂PO₄, 5.6 mM Na₂HPO₄, 126 mM NaCl, pH 7.2) estéril con la finalidad de retirar la tetraciclina. Finalmente se resuspenden en medio de cultivo RPMI suplementado (1X10⁶ células/ml) adicionado con 200 µg/ml de geneticina y 200 µg/ml de higromicina. Se incuban a 37°C con 5% de CO₂ durante el tiempo necesario, como máximo 3 días para la expresión de las proteínas gp120/gp41 del VIH.

5.4 Tinción con colorantes fluorescentes vitales

Las células se marcan con los colorantes lipofílicos fluorescentes, DiO (perclorato de 3,3'-dioctadeciloxacarbocianina, Molecular Probes), fluorescente en color verde y Dil (perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametil-indocarbocianina, Molecular Probes), fluorescente en color rojo (ver figura 8). Para su uso se preparan soluciones stock concentradas disolviendo 3.5 mg de colorante por ml de dimetil sulfóxido estéril. A partir de éstas se hacen diluciones 1:30 de DiO y 1:10 de Dil en el mismo disolvente. Estas diluciones

se utilizan para marcar directamente las células y permanecen útiles durante 4 meses. Las soluciones stock son reemplazadas cada año.

Doce horas previas al ensayo de fusión las células Env⁺ inducidas para expresar las proteínas virales y las células CD4⁺ se ajustan a una concentración de 5 a 15X10⁶ células/ml de medio RPMI. A las células Env⁺ se les adiciona 15 µl/ml de DiO 1:30 (esta concentración aumenta de 2 a 3 microlitros por cada semana sucesiva a la preparación de la dilución del colorante ya que la intensidad de la fluorescencia obtenida en las células marcadas va decayendo) y protegidas de la luz se incuban con agitación moderada durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se lavan 2 veces con 10 volúmenes de medio RPMI y se mantienen en cultivo en el mismo medio adicionado de los antibióticos geneticina e higromicina en las concentraciones ya mencionadas.

Las células CD4⁺ se marcan con el colorante Dil 1:10 a una concentración de 5 µl/ml siguiendo el mismo procedimiento que para las anteriores. Se puede usar la misma concentración de Dil durante 2 o 3 meses para marcar las células, ya que, a diferencia del DiO, su fluorescencia es estable durante este tiempo. En caso de que la fluorescencia roja decaiga de un experimento a otro, se puede incrementar en algunos microlitros la cantidad de Dil.

5.5 Ensayo de fusión celular

Las células Env⁺ y CD4⁺ marcadas se resuspenden en medio de cultivo especial para linfocitos libre de suero (AIM-V, Gibco BRL), se ajustan a una concentración de 0.2X10⁶ células/0.1ml. Para inducir la formación de sincicios, en una placa de 96 pozos de fondo plano se colocan en cocultivo 100 µl por pozo de suspensión de células CD4⁺ y 100 µl de células Env⁺. Es importante que las suspensiones de células sean constantemente resuspendidas con micropipeta para que en cada pozo se mantenga una proporción igual de células blanco CD4⁺ y células Env⁺ (1:1). Asimismo, el conteo del número de células debe ser cuidadoso. La vigilancia de estos aspectos proporciona una

mayor reproducibilidad experimental, ya que el porcentaje de fusión se ve afectado por las proporciones iniciales de las células participantes.

La placa se incuba durante 2, 5 y 8 horas a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂. Se preparan tubos para citometría con 2 ml de PBS, las células se cosechan de cada pozo con ayuda de una micropipeta usando puntas para 1 ml y se adicionan en el tubo correspondiente para lavarse una vez centrifugando 3 min, 1150 rpm. Se decanta el sobrenadante y se resuspende en 300 µl de buffer para citometría de flujo (FacsFlow, Becton Dickinson).

5.6 Inmunofluorescencia directa

Para evaluar la expresión de moléculas de membrana importantes en la fisiología de las células T y en la infección por VIH, se cosechan células con 2, 5 u 8 horas de cocultivo a partir de 2 pozos (aproximadamente 0.8X10⁶células totales), se lavan en 2 ml de PBS 2 min, centrifugando a 1100 rpm, se resuspenden en 50 µl de buffer para inmunofluorescencia (PBS, 0.1% NaN₃, 2% suero fetal bovino inactivado) y se les adiciona 16 µl (20 µl/1X10⁶células) de alguno de los siguientes anticuerpos (BD Pharmingen): anti-CD4 (cat. 555348), anti-CD3 (cat. , anti-CD25 (cat. 555433), anti-CD54 (cat. 555512), anti-LFA-1 (cat. 551131), anti-CD28 (cat. 555730), o anti-CXCR4 (cat. 555975) acoplados a PE-Cy5 (Cychrome), cuya fluorescencia es detectable en el canal FL3-H del citómetro de flujo. Se incuban en hielo durante 30 min y se elimina el anticuerpo no unido lavando con 2 ml de buffer de lavado (PBS, NaN₃ al 0.1%). Finalmente las células se resuspenden en 1 ml de solución amortiguadora para citometría de flujo (FACSFlow, Becton Dickinson). Los experimentos con 5 horas de cocultivo se realizaron por lo menos dos veces de manera independiente. Los resultados de 2 y 8 horas de cocultivo se obtuvieron a partir de un experimento.

5.7 Análisis por citometría de flujo

Las células resuspendidas en buffer para FACS se analizan en un citómetro de flujo Becton-Dickinson modelo FACScalibur con lámpara de xenón de excitación a 488 nm, utilizando el programa Cell-Quest (Becton Dickinson). El análisis se realiza sobre 10,000 eventos adquiridos construyendo gráficas de puntos de granularidad contra tamaño o de fluorescencias. Con las gráficas de fluorescencia se pueden detectar tres poblaciones de células diferentes, las CD4⁺ (rojas) no fusionadas, las Env⁺ (verdes) no fusionadas y los sincicios como partículas de fluorescencia mixta. En las gráficas de granularidad contra tamaño se puede ver una población de células con un valor alto de granularidad.

Para detectar la unión de los anticuerpos acoplados a PE-Cy5 (CyChrome), se determinaron regiones correspondientes para cada una de las 3 poblaciones en las gráficas de fluorescencia, es decir, para las células doblemente fluorescentes y para las no fusionadas de cada tipo (verdes y rojas). Para cada región se construyeron histogramas de fluorescencia en FL3-H y se determinó la intensidad media de fluorescencia (IMF). Es importante mencionar que se consideró la media geométrica por ser un parámetro adecuado para analizar distribuciones en escalas logarítmicas.

5.8 Evaluación de la expresión de gp120 en células Env⁺

La expresión de gp120 en las células Env⁺ se evaluó por inmunoprecipitación para asegurar que nuestro fenómeno de fusión es mediado por esta proteína de la envoltura del VIH. La inmunoprecipitación se efectuó utilizando un anticuerpo policlonal anti-gp120 (ABI, cat. 13204000) para capturar la proteína gp120 de lisados celulares, seguida de adsorción con sefarosa acoplada a proteína A (Sigma, cat. P-3391), como sigue: doce horas previas a la inmunoprecipitación se preparó la sefarosa-proteína A en un tubo Eppendorff agregando 500 µl de PBS frío, 30 µl de sefarosa-proteína A y 5 µl del anticuerpo policlonal. Se incubó por 12 horas en un agitador rotatorio a 4 °C.

Células Env⁺ inducidas por 11, 24, 48 y 72 horas para expresar el complejo gp120/gp41 se lavaron 2 veces con PBS frío, posteriormente se ajustaron a 20×10^6 en 1 ml de buffer para lisis (Tritón X100 al 1%, tris-Cl 50 mM pH 7.4, NaCl 300 mM, EDTA 5 mM, NaN₃ 0.02%) en tubos Eppendorff y se incubaron en hielo por 40 minutos agitando en un vortex cada 10 minutos a baja velocidad. Los tubos se centrifugaron 15 minutos a 14, 000 rpm y se recuperó el sobrenadante para inmunoprecipitar.

La sefarosa-proteína A unida al anticuerpo se lavó 2 veces con 1 ml de buffer para lisis centrifugando a 14, 000 rpm durante 5 segundos. El volumen completo obtenido del lisado celular se agregó a la sefarosa, además de 10 µl de BSA al 10%. Se mantuvo en agitación constante a 4 °C durante 2 horas.

Finalmente se lavó la sefarosa 4 veces en buffer de lavado (Tritón X100 al 0.1%, tris-Cl 50 mM pH 7.4, NaCl 300 mM, EDTA 5 mM, NaN₃ 0.02%) y una vez más en PBS frío. La sefarosa con el inmunoprecipitado se congeló a -20 °C para ser analizado por Western Blot.

5.9 Western Blot

La sefarosa con el inmunoprecipitado se descongeló y se le adicionaron 60 µl de buffer para desnaturalizar la muestra, los tubos se pusieron a ebullición por 5 minutos y se cargaron 20 µl de muestra en geles de agarosa al 7% para electroforesis. Los geles se corrieron a 90 V por 2 horas. Posteriormente los geles se transfirieron en membranas de nitrocelulosa (Bio-rad) en una cámara de electrotransferencia semi-seca (Bio-rad) durante 1:10 horas a 20V. Terminada la transferencia, la membrana se bloqueó con leche semi-descremada (Svelty) al 5% durante 2 horas a temperatura ambiente.

Para el revelado, la membrana se incubó con 3 ml de una dilución 1:10 del anticuerpo policlonal de conejo anti-gp120 dilución (el mismo usado para inmunoprecipitar) en buffer TN-T (Tris base, NaCl, Tween-20 al 10%) con leche semidescremada (Svelty) al 1% y 4% de BSA (Sigma) durante 1.5 horas. La membrana se lavó 4 veces con 10 ml del mismo buffer 5 minutos cada vez para retirar el anticuerpo no unido y se adicionó anti-IgG de conejo acoplado a

peroxidasa (BD Pharmingen, cat. 554021) diluído 1:3000 en el mismo buffer. El anticuerpo unido a las proteínas se reveló utilizando un kit quimioluminiscente de sustrato para peroxidasa para Western Blot, (Sigma, cat. CPS-1-60) con una proporción sustrato:buffer 1:5.

VI. RESULTADOS

6.2 Caracterización de la fusión celular

6.2.1 Modelo para el estudio de la fusión celular

Para estudiar la fusión celular dependiente de las proteínas de la envoltura del VIH se utilizaron células linfocíticas de la línea Jurkat transfectadas establemente con el gen *env* de la cepa HXBc2 del VIH-1. En estas células, el gen *env* se encuentra en un plásmido bajo el control de un operador dependiente de tetraciclina (fig. 9). Asimismo expresan el represor de tetraciclina fusionado al dominio de activación del virus del herpes simple, de tal forma que la síntesis de las proteínas virales gp120/gp41 se induce únicamente removiendo este antibiótico del medio de cultivo. Éstas células se denominarán en lo sucesivo Env⁺.

La línea celular Jurkat E6-1 son linfocitos T CD4⁺, CXCR4⁺ (denominados en lo subsecuente CD4⁺) que al ser incubados en cocultivo con las células Jurkat transfectadas (Env⁺), son capaces de formar células gigantes multinucleadas o sincicios que pueden ser observados con microscopio de luz (Fig. 10).

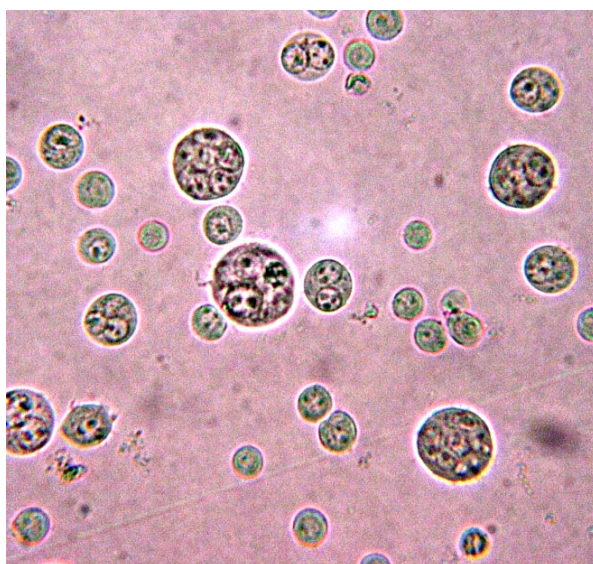


Figura 10. Fotografía por microscopía de luz de un cocultivo de 5 horas de células Env⁺ y CD4⁺. Se pueden distinguir sincicios con más de 8 núcleos. Fotografía: cortesía de la QFB. Nayali López Balderas.

El análisis cuantitativo de la fusión se llevó a cabo por citometría de flujo, marcando las células Env^+ y $CD4^+$ con colorantes fluorescentes en verde y rojo, respectivamente, de tal forma que después de ser cocultivadas, los sincicios se pueden distinguir de las células individuales no fusionadas por presentar las dos fluorescencias (verde y roja). Además, ésta población doblemente fluorescente se distribuye en la región de mayor granularidad, sugiriendo que por efecto de la fusión, la complejidad del citoplasma aumenta dependiendo del número de células incorporadas a los sincicios (figura 11).

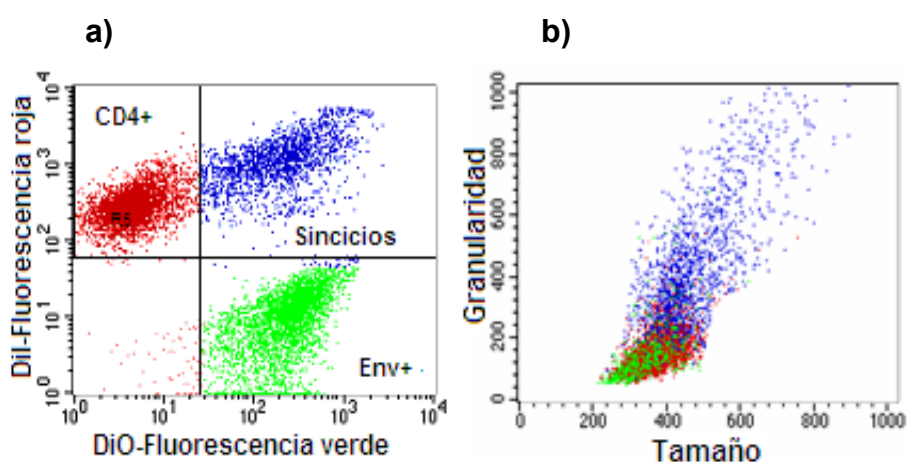


Figura 11. Análisis por citometría de flujo de los cocultivos de células Env^+ y $CD4^+$, a) Gráfica de fluorescencia. Se pueden distinguir la población de células verdes y rojas no fusionadas de las células con fluorescencia mixta o sincicios. b) gráfica de granularidad contra tamaño. Se puede observar que hay una población con mayor nivel de granularidad y corresponde a la población doblemente fluorescente de la gráfica de fluorescencia.

La separación física a través de citometría de flujo, según la fluorescencia de las células cocultivadas, permite el análisis individual de cada población. En un trabajo previo se llevó a cabo el análisis por microscopía de barrido tanto de las células fusionadas como de las no fusionadas (58). La figura 12 muestra células $CD4^+$ (rojas) y sincicios (doble fluorescentes) separadas según su fluorescencia a partir de un cocultivo de 5 horas. El volumen de los sincicios calculado a partir de su diámetro, es cuatro veces

mayor que el volumen de las células no fusionadas. Esta diferencia en tamaño, así como su fluorescencia mixta, sugiere que efectivamente los sincicios son producto de la fusión entre células $CD4^+$ y Env^+ .

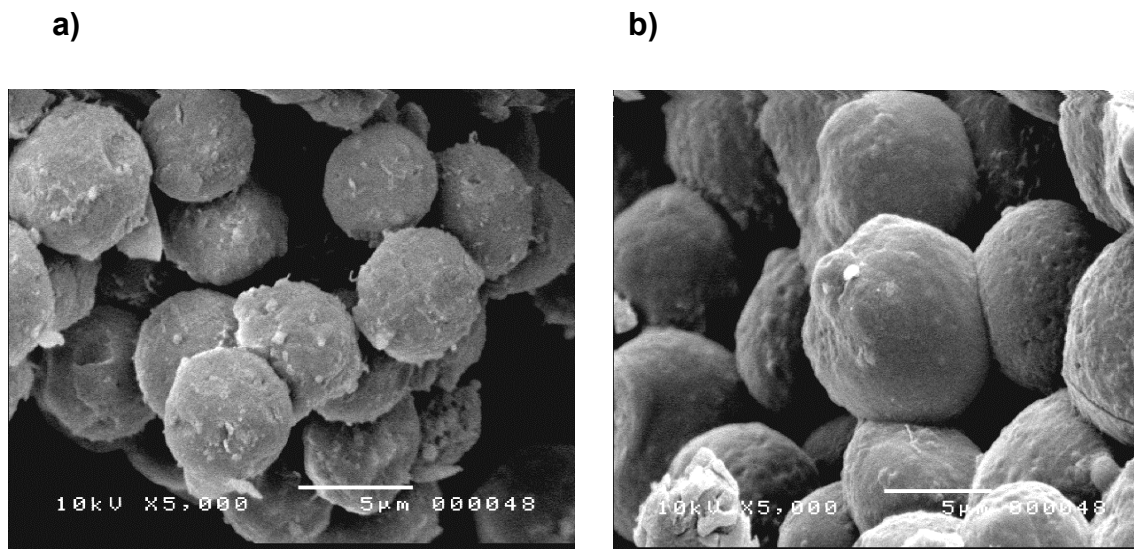


Figura 12. Microscopía de barrido de células separadas por citometría de flujo a partir de un cocultivo de 5 horas según su fluorescencia, verde, roja o mixta. a) células que presentaban fluorescencia roja y que corresponden a la fracción de células $CD4^+$ no fusionadas. b) células con fluorescencia mixta (verde y roja) y que se distinguen de las células $CD4^+$ por tener mayor tamaño.

6.2.2 Dependencia de la fusión celular de las proteínas de la envoltura del VIH

Para evaluar la participación de los receptores típicos del proceso de infección por el VIH en nuestro modelo de fusión celular, primero se determinó la expresión del complejo gp120/gp41 en las células Env^+ a través de ensayos de inmunoprecipitación. Con este propósito se utilizaron lisados celulares provenientes de células Env^+ , incubadas en ausencia de tetraciclina durante 11, 21, 48 y 72 horas para inducir la expresión de las proteínas virales. Los lisados se inmunoprecipitaron con un anticuerpo policlonal anti-gp120 y los

complejos se analizaron por Western Blot. La figura 13 confirma que las células Env⁺ sintetizan la proteína viral gp120 y la cantidad es dependiente del tiempo de inducción.

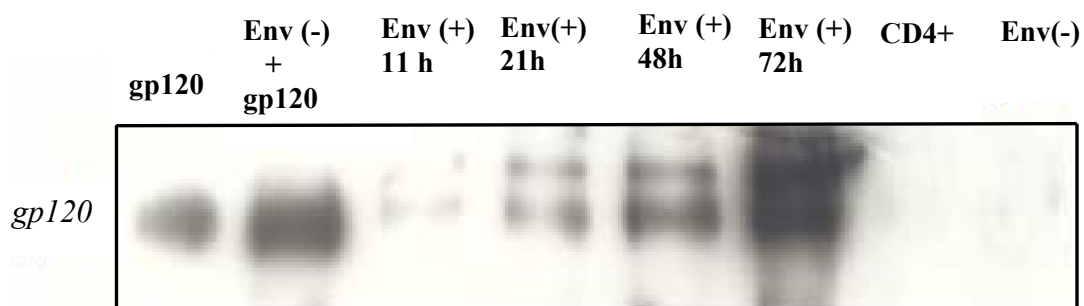


Figura 13. Western blot de un inmunoprecipitado obtenido con un anticuerpo policlonal anti-gp120 a partir de 20×10^6 células Env⁺ inducidas durante 11, 21, 48 y 72 horas (Env⁺) y no inducidas (Env⁻) para expresar el complejo viral gp120/gp41. Como control positivo se muestra la proteína gp120 pura adicionada al inmunoprecipitado de células Env⁻ y como control negativo un inmunoprecipitado de células CD4⁺ no transfectadas.

Para evaluar si el nivel de expresión de gp120 se relaciona con la capacidad de las células para fusionarse, las células CD4⁺ se cocultivaron con células Env⁺ inducidas durante 11, 21, 48 y 72 horas. Después de 5 horas de incubación, se obtuvo un 2.5% de fusión en los cocultivos con células Env⁺ inducidas durante 11 horas. Las células inducidas por más de 21 horas produjeron como máximo un 13% de fusión (fig. 14), a pesar de que la síntesis de gp120 se mantiene en aumento. Estos resultados sugieren que las células Env⁺ requieren una cantidad umbral de proteínas virales para producir un nivel máximo de fusión y ésta se alcanza después de 11 horas de inducción. Por otro lado, existe la posibilidad de que sólo una pequeña población de células Env⁺ exprese las proteínas virales en cantidad suficiente para fusionar células CD4⁺, de ahí que se obtenga como máximo un 13% de fusión.

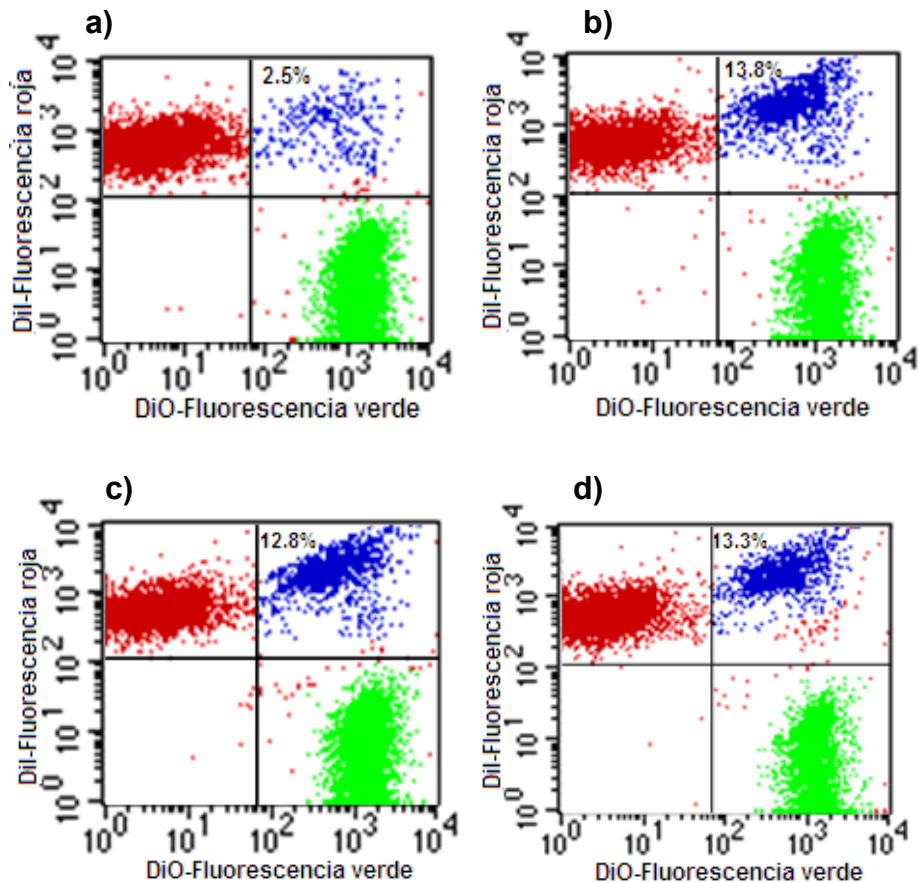


Figura 14. Porcentaje de fusión obtenida con células Env^+ inducidas para expresar el complejo Env durante a) 11, b) 21, c) 48 y d) 72 horas y células $CD4^+$.

Datos obtenidos en el laboratorio muestran que anticuerpos monoclonales dirigidos contra las proteínas virales gp120 y gp41, con una reconocida capacidad neutralizante para una amplia variedad de aislados virales, (anticuerpos 2G12, F105 y 2F5), tienen la capacidad de inhibir hasta un 80% de la fusión total (34). Ver anexo 1.

Estas observaciones, en conjunto con los resultados de la inmunoprecipitación mostrados arriba, indican que la fusión entre las células Env^+ y $CD4^+$ es dependiente de las proteínas virales gp120 y gp41.

6.2.3 Dependencia de la fusión de los receptores $CD4$ y $CXCR4$

El mecanismo de fusión de membranas inducida por las proteínas de fusión del VIH, además de ser dependiente del receptor $CD4$, requiere la

presencia de un correceptor, tanto en la fusión virus-célula como en la fusión célula-célula (1). Los correceptores más importantes en este proceso son los receptores para quimiocinas CXCR4 y CCR5 (44). Datos experimentales obtenidos previamente en el laboratorio, demuestran que la fusión de las células Env⁺ y CD4⁺ depende de estos receptores (58). La figura 15 muestra que un anticuerpo anti-CD4 inhibe el 98% de la fusión total, mientras que los anticuerpos anti-CXCR4, A145 y 12G5 inhiben como máximo el 37% de fusión. Estos resultados indican que la interacción gp120-CD4 es esencial para la formación de sincicios, mientras que la interacción gp120-CXCR4 es parcialmente necesaria.

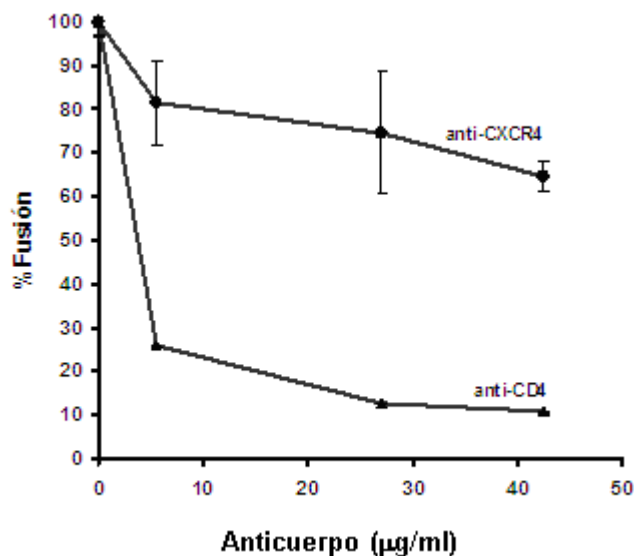


Figura 15. Efecto de un anticuerpo anti-CD4 y de los anticuerpos 12G5 y A145 (anti-CXCR4) sobre la fusión celular.

6.3. Consecuencias de la fusión celular sobre la expresión de moléculas de superficie en linfocitos T

El estudio de la fusión celular en la infección por el VIH se ha llevado a cabo con el propósito de determinar si es un proceso que contribuye a la pérdida de células T CD4⁺. Como se menciona en la introducción, estudios

clínicos indican que la aparición de virus inductores de sincicios en el 50% de los pacientes infectados, así como la presencia de células gigantes multinucleadas en sistema nervioso central y ganglios linfáticos se correlaciona con la acelerada progresión a SIDA (1, 27, 55). Asimismo estudios *in vitro* muestran que la principal causa de muerte de linfocitos T está asociada a la formación de sincicios que mueren por apoptosis en un tiempo promedio de 72 horas (67).

Hasta ahora se tiene un conocimiento limitado acerca de los cambios que ocurren en las células que se fusionan y su posible influencia sobre las células vecinas. Por esta razón y para entender mejor las consecuencias de la fusión en la fisiología de las células T, así como su efecto sobre las células vecinas, se evaluó la expresión de receptores de membrana importantes en la funcionalidad de los linfocitos T a través de inmunofluorescencia directa. En la tabla 1 se presentan los receptores estudiados en el presente trabajo.

Tabla 1. Receptores evaluados por ser representativos en la función inmunológica de los linfocitos T, además de su importancia en la infección por el VIH.

RECEPTOR	FUNCIÓN
CD4	Unión a las moléculas HLA de las células presentadoras de antígeno. Señalización para activar a la célula T. Receptor primario del VIH
CD3	Transducción de señales durante reconocimiento antigénico
CD28	Receptor de coestimulación que mantiene la activación del linfocito T. Se une a CD80 y CD86.
CD25	Cadena de alta afinidad del receptor para IL-2. Marcador de activación
LFA-1	Molécula de adhesión. Estabiliza la interacción linfocito T- CPA*. Induce rearrreglos en el citoesqueleto. Aumenta infectividad del VIH. Ligando de ICAM-1.
ICAM-1	Molécula de adhesión. Por unión a su ligando aumenta infectividad del VIH. Ligando de LFA-1.
CXCR4	Receptor de quimiocinas importantes en la distribución anatómica de leucocitos. Receptor para SDF-1. Es correceptor del VIH

*CPA: Célula Presentadora de Antígeno

Con éste propósito se utilizaron anticuerpos monoclonales acoplados a un fluorocromo (CyChrome), cuya fluorescencia es detectada por el canal FL3-H del citómetro de flujo. De esta manera, se determinaron regiones adecuadas

para cada una de las 3 poblaciones en las gráficas de fluorescencia (fig. 16a) y se construyeron histogramas para evaluar la intensidad de fluorescencia correspondiente a cada población (células CD4⁺ y Env⁺ no fusionadas y sincicios). En los resultados posteriores se reporta la intensidad media de fluorescencia (IMF) que corresponde a la cantidad máxima de anticuerpo unido por célula, y el porcentaje de células que unen el anticuerpo.

6.3.1 Expresión de CD4

CD4 es una molécula coestimuladora que favorece la transducción de señales tempranas durante la activación mediada por el receptor de las células T (TCR). En ausencia de CD4, la activación celular es ineficiente, principalmente cuando la concentración de antígeno es baja o cuando las células requieren de mayor tiempo de estimulación, como sucede con las células T vírgenes (75). Durante la infección por VIH, CD4 es el receptor primario del virus, reconocido por la glicoproteína viral gp120.

El efecto de la fusión celular sobre la expresión de CD4 se evaluó en cocultivos de células Env⁺ y CD4⁺ incubados durante 5 horas. En la figura 16b se muestra la expresión basal de éste receptor en células no cocultivadas. El 86.1% de las células CD4⁺ expresan el receptor con una IMF=28. Las células Env⁺ no expresan en su membrana el receptor, lo que coincide con lo reportado para las células infectadas por el VIH (14). Después del cocultivo, las células CD4⁺ no fusionadas presentaron una reducción en el nivel de expresión del CD4 (IMF=9.1) en comparación con las células no cocultivadas (IMF=28), asimismo, el porcentaje de células que lo expresaban disminuyó del 86.1% al 57.4%. Estos resultados sugieren que las células con mayor expresión de CD4 fueron incorporadas a los sincicios, o bien, que el receptor fue internalizado. Las células Env⁺ no fusionadas se mantuvieron sin manifestar la expresión de éste receptor. Finalmente, solo un 40% de los sincicios mostraron expresión del CD4 con una IMF=10.5, a pesar de ser producto de la fusión entre membranas que lo expresaban en mayor cantidad (fig. 16c). Estos resultados sugieren que la fusión de células que expresan las proteínas virales con células CD4⁺ reduce la expresión del receptor CD4.

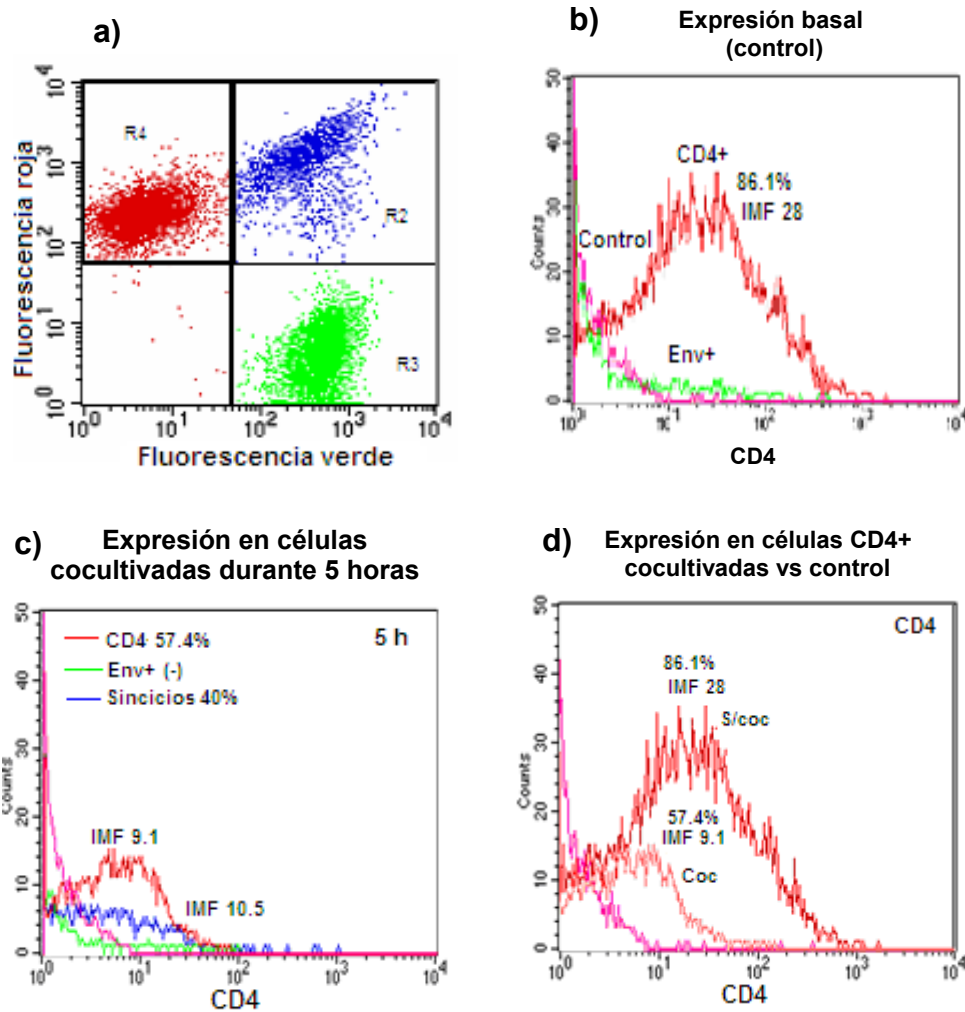


Figura 16. Expresión de CD4 en monocultivos y cocultivos de células Env^+ y $CD4^+$. a) Los colorantes fluorescentes permiten distinguir las 3 poblaciones de células del cocultivo. Se pueden seleccionar cada una de las poblaciones y analizar de manera independiente según su fluorescencia debida al anticuerpo anti-CD4/Cychrome detectable en FL3-H. b) Histogramas de fluorescencia para determinar la expresión de CD4, en monocultivos de células Env^+ y $CD4^+$. c) Expresión de CD4 en las células Env^+ , $CD4^+$ y sincicios después de 5 horas de cocultivo. d) Análisis de la expresión del receptor en células $CD4^+$ antes (s/coc) y después del cocultivo (Coc). Se reporta la intensidad media de fluorescencia (media geométrica). El histograma en color rosa corresponde al control de isotipo. Los datos reportados son representativos de dos experimentos independientes.

6.3.2 Expresión de CXCR4

Dentro de la fisiología normal de las células T se encuentra su respuesta frente a factores quimiotácticos que regulan su tráfico a través de tejidos linfoides periféricos y su migración hacia zonas de inflamación. Hasta ahora se

han identificado 16 receptores diferentes para quimiocinas presentes en diferentes poblaciones de leucocitos. CXCR4 y CCR5 son receptores para quimiocinas expresados por los linfocitos T que además de ser importantes para su función, son utilizados como correceptor por el VIH. Particularmente, CXCR4 es el correceptor más frecuentemente usado por virus inductores de sincicios en cultivos de líneas de células T y linfocitos T de sangre periférica (77).

En la figura 17a se puede observar que CXCR4 se expresa en un porcentaje mayor de células Env⁺ (75%) que de células CD4⁺ (60%).

Para determinar el efecto de la fusión celular sobre la expresión de CXCR4, los cocultivos de células Env⁺ y CD4⁺ se evaluaron en diferentes tiempos de incubación. La gráfica de barras de la figura 17d compara el nivel de expresión del correceptor (IMF) de cada población celular en los diferentes tiempos de cocultivo. La expresión de CXCR4 en las células Env⁺ no fusionadas se redujo con respecto al tiempo, hasta un 40% a las 8 horas de cocultivo (IMF=76.3 a las 2 horas e IMF=45.3 a las 8 horas de cocultivo), asimismo disminuyó el porcentaje de células que lo expresaban de un 82.3% a las 2 horas a un 53.3% a las 8 horas de cocultivo. En las células CD4⁺ se observó una pequeña reducción en el porcentaje de células CXCR4⁺, así como en la intensidad de fluorescencia, hasta las 8 horas de cocultivo (fig. 17b y 17d). El análisis de los sincicios muestra que la cantidad de CXCR4 en su membrana es considerablemente mayor con respecto a las células individuales (IMF=138.9 a las 2 horas). Sin embargo, conforme avanzó el tiempo de incubación, la expresión del correceptor se hizo heterogénea, de tal forma que la cantidad de sincicios positivos para éste receptor disminuyó de un 48.8% a un 19.1% después de 8 horas de cocultivo (fig. 17c).

Estos resultados sugieren que el aumento inicial en el número de receptores presentes en la membrana de los sincicios puede ser producto de la suma de las moléculas provenientes de las células individuales, sin embargo, es posible que exista una dinámica de reciclamiento de CXCR4 en las células multinucleadas y en las Env⁺.

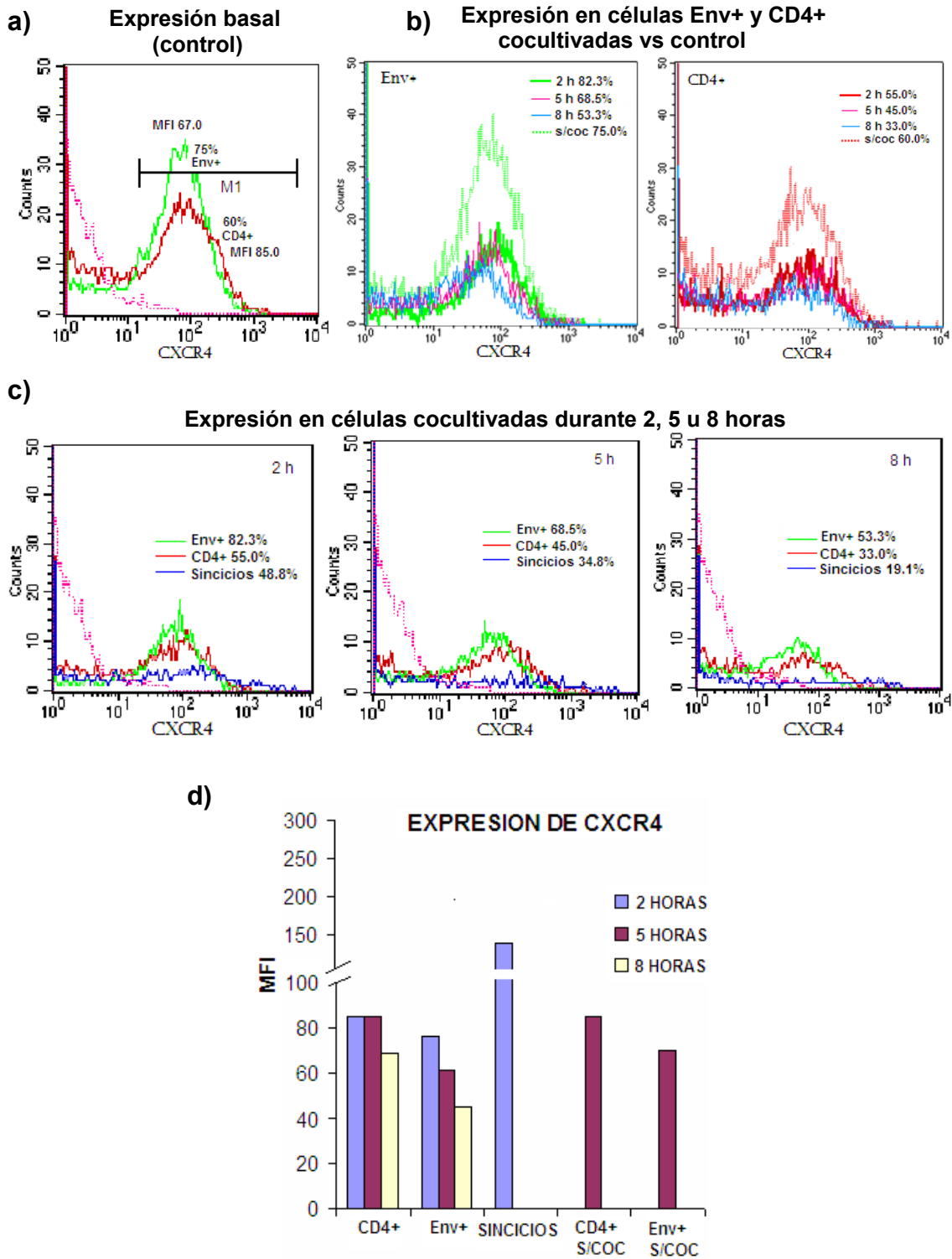


Figura 17. Expresión de CXCR4 en monocultivos (s/coc) y cocultivos. a) Expresión del corresponsor en células Env⁺ y CD4⁺ no cocultivadas. b) Cinética de expresión de CXCR4 a 2, 5 y 8 horas de cocultivo y porcentaje de células Env⁺ y CD4⁺. Se compara con la expresión en las células no cocultivadas. c) Expresión de CXCR4 en las tres poblaciones de células de cocultivos de 2, 5 y 8 horas. d) Gráfica de barras que compara las IMF de cada población celular. Los datos reportados a las 5 horas son representativos de tres experimentos independientes, los resultados a dos y cinco horas corresponden a un experimento.

6.3.3 Expresión de ICAM Y LFA-1

La eficiencia de la fusión celular mediada por las proteínas de la envoltura del VIH se incrementa por la participación de moléculas propias del hospedero. Se ha observado que moléculas de adhesión como ICAM-1 y LFA-1 aumentan la estabilidad de la interacción primaria gp120-CD4 y con ello la eficiencia del proceso de fusión (6, 70). Estas moléculas también son elementos importantes durante el establecimiento de la respuesta inmune adaptativa, ya que estabilizan la interacción entre el linfocito T y la célula presentadora de antígeno que induce la activación y diferenciación celular. LFA-1 es expresada de manera constitutiva en linfocitos T, mientras que ICAM-1 es una molécula inducible bajo condiciones de activación celular. La figura 18 muestra que el 42.3% células Env⁺ y el 92.4 % de células CD4⁺ expresan LFA-1.

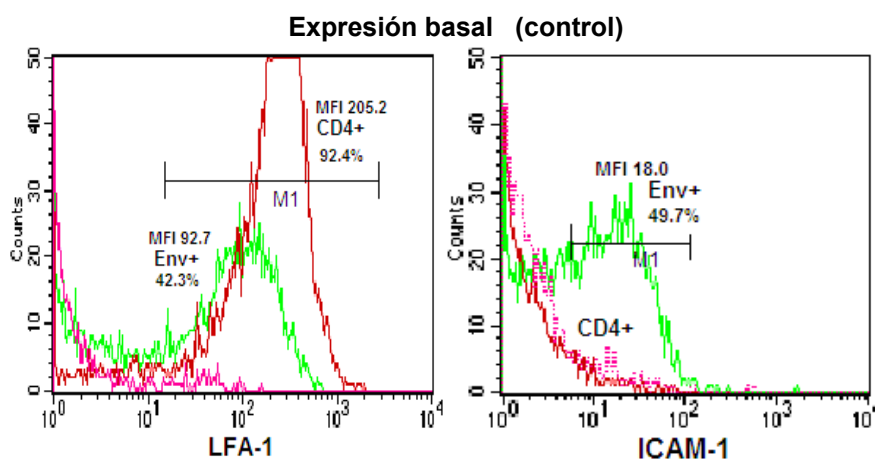


Figura 18. Expresión normal de LFA-1 e ICAM-1 en células Env⁺ y CD4⁺ no cocultivadas. Los datos reportados son representativos de dos experimentos independientes.

En los cocultivos de 2 y 5 horas, el porcentaje de células positivas para LFA-1, así como sus niveles de expresión se mantuvieron constantes (fig. 19a y 19b). Con respecto a los sincicios, es interesante observar que presentaron una mayor intensidad de fluorescencia que las células individuales, indicando la expresión de un mayor número de receptores (fig 19b). Esto sugiere que la expresión de LFA-1 en los sincicios representa la suma de receptores de las células individuales que se fusionaron, o bien, la regulación positiva de ésta

molécula de adhesión por efecto de la fusión celular. Asimismo, sugieren que los sincicios mantienen propiedades de adhesión a células presentadoras de antígeno iguales o mayores a las de las células T individuales.

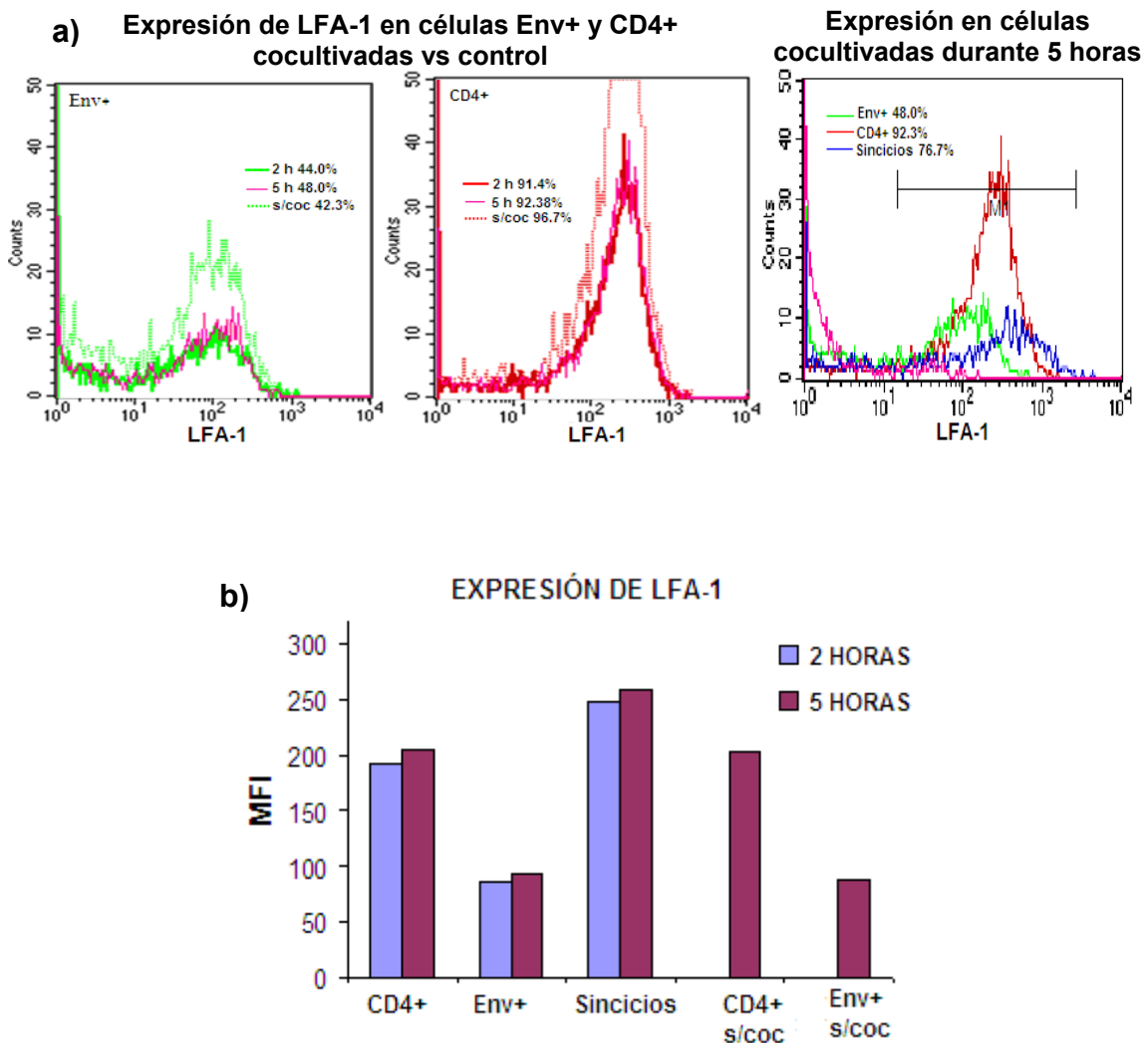


Figura 19. Expresión de LFA-1. a) Expresión de LFA-1 en células Env⁺ y CD4⁺ cocultivadas durante 2 y 5 horas con respecto a los controles de células no cocultivadas y expresión en las tres poblaciones de un cocultivo de 5 horas. b) Gráfica de intensidad media de fluorescencia que indica el nivel de expresión de LFA-1 en las 3 poblaciones de células presentes en cocultivos de 2 y 5 horas. Los datos reportados con 5 horas de cocultivo son representativos de dos experimentos independientes, los resultados con dos horas de cocultivo son de un experimento.

Como ya se mencionó, ICAM-1 es una molécula de adhesión que se expresa durante la activación celular, sin embargo, el 49.7% de las células Env⁺ la expresan con una IMF=18. Esto sugiere que la expresión de las

proteínas gp120/gp41 incide a su vez en la expresión de ICAM-1 (fig. 18). Es interesante notar que la expresión de LFA-1 en las células CD4 y de su ligando, ICAM-1 en las células Env⁺, es congruente con el establecimiento de uniones estrechas entre las membranas de ambas células que favorecen la interacción entre los receptores específicos y posteriormente a la fusión.

La figura 20a muestra una gráfica de fluorescencia de las tres poblaciones de un cocultivo de 5 horas. Se puede apreciar que ICAM-1 es expresado únicamente por las células Env⁺ que permanecen sin fusionarse y no modificaron el número de moléculas expresadas por efecto del tiempo de cocultivo (IMF=18.1). Esto sugiere que el ICAM-1 de la membrana de los sincicios fue internalizado como consecuencia de la fusión celular.

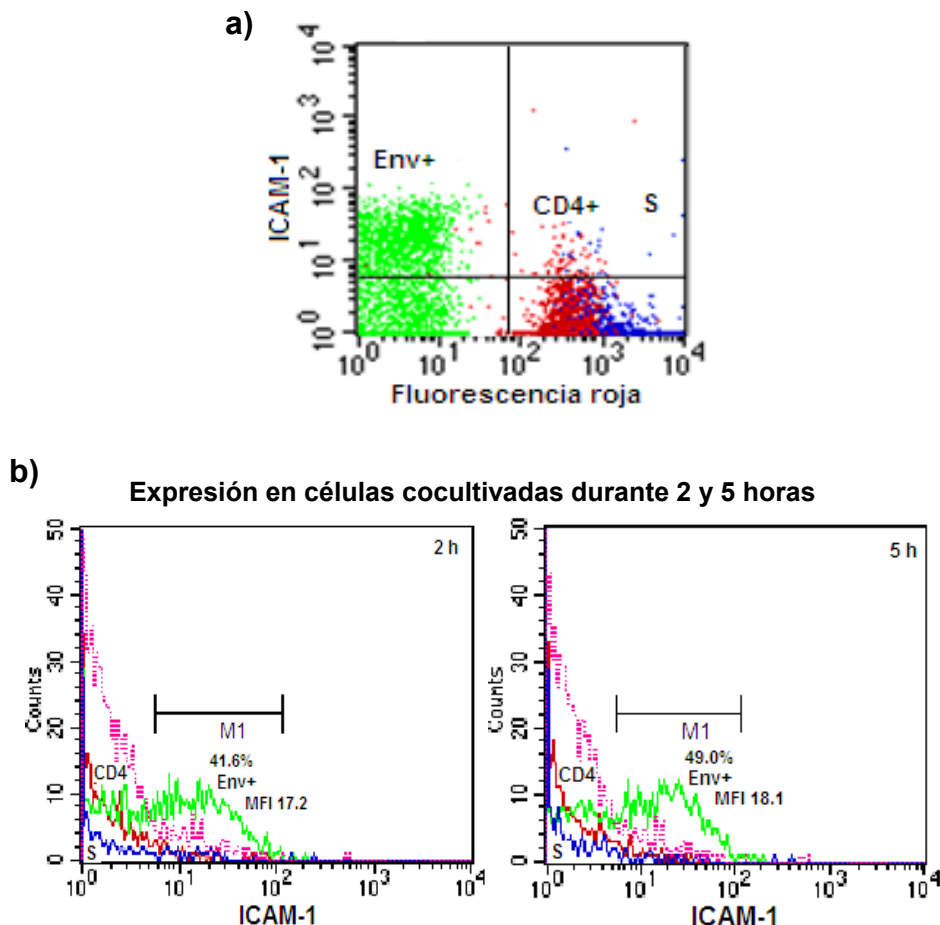


Figura 20. Expresión de ICAM-1. a) Gráfica de puntos que muestra la expresión de ICAM-1 en las tres poblaciones celulares de un cocultivo de 5 horas. b) Histogramas que evalúan la expresión de ICAM-1 en las 3 poblaciones de células de los cocultivos de 2 y 5 horas. Los datos reportados son representativos de dos experimentos independientes.

6.3.4 Expresión de CD3 Y CD28

CD3 es una molécula de importancia en la activación mediada por el TCR, ya que transduce señales a través de la fosforilación de secuencias ITAM (motivos de activación del inmunoreceptor basados en tirosina). Estudios realizados sobre la expresión de CD3 en la membrana de células activadas, han revelado que una vez que el TCR se une al complejo MHC-Antígeno y se incorpora a la sinapsis inmunológica, CD3 se internaliza para asegurar que nuevas moléculas del mismo tipo se unan al complejo y amplifiquen la señal de activación (40). Otra molécula importante que mantiene el estado de activación de las células es CD28. La expresión de este correceptor es esencial para la sobrevivencia de las células activadas, ya que previene la anergia e induce la expresión de moléculas anti-apoptóticas, así como de citocinas como IL-2 que aumentan la respuesta celular. Estudios *in vitro* sobre la funcionalidad de las células T provenientes de pacientes infectados por VIH que presentan variantes virales inductoras de sincicios, han mostrado que tienen una gran deficiencia para responder frente a estímulos antigénicos. Considerando estos antecedentes, nos preguntamos si la expresión de CD3 y CD28 podría estar alterada por efecto de la fusión celular.

Las células Env⁺ y CD4⁺ sin cocultivar expresan constitutivamente los receptores CD3 y CD28 (fig. 21).

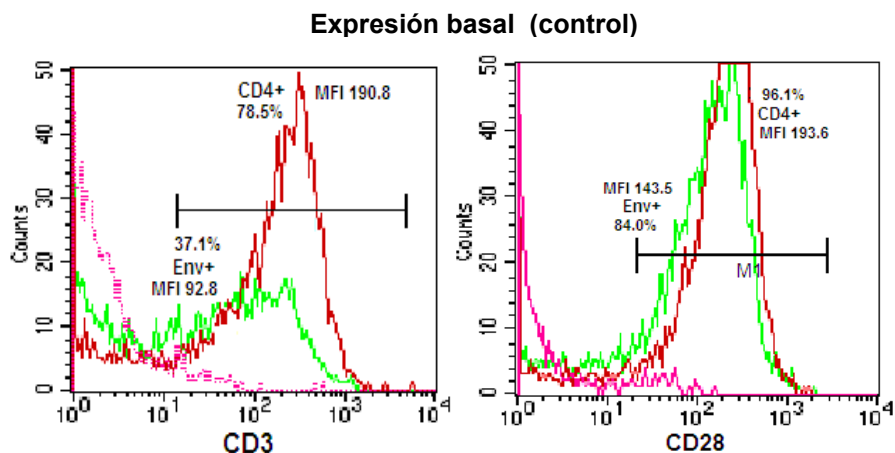


Figura 21. Expresión normal de CD3 y CD28 en células Env⁺ y CD4⁺ sin cocultivar. Los datos reportados son representativos de dos experimentos independientes.

Las figuras 22b y 23b muestran que la expresión de CD3 y CD28 en las células Env⁺ y CD4⁺ no fusionadas permanece constante después de 5 horas de cocultivo. En los sincicios, estos receptores se detectaron con una IMF incrementada hasta un 60% con respecto a las células no fusionadas. Aunque no estudiamos la respuesta de los sincicios frente a estímulos de activación, la presencia de los receptores necesarios sugiere que mantienen la capacidad para activarse.

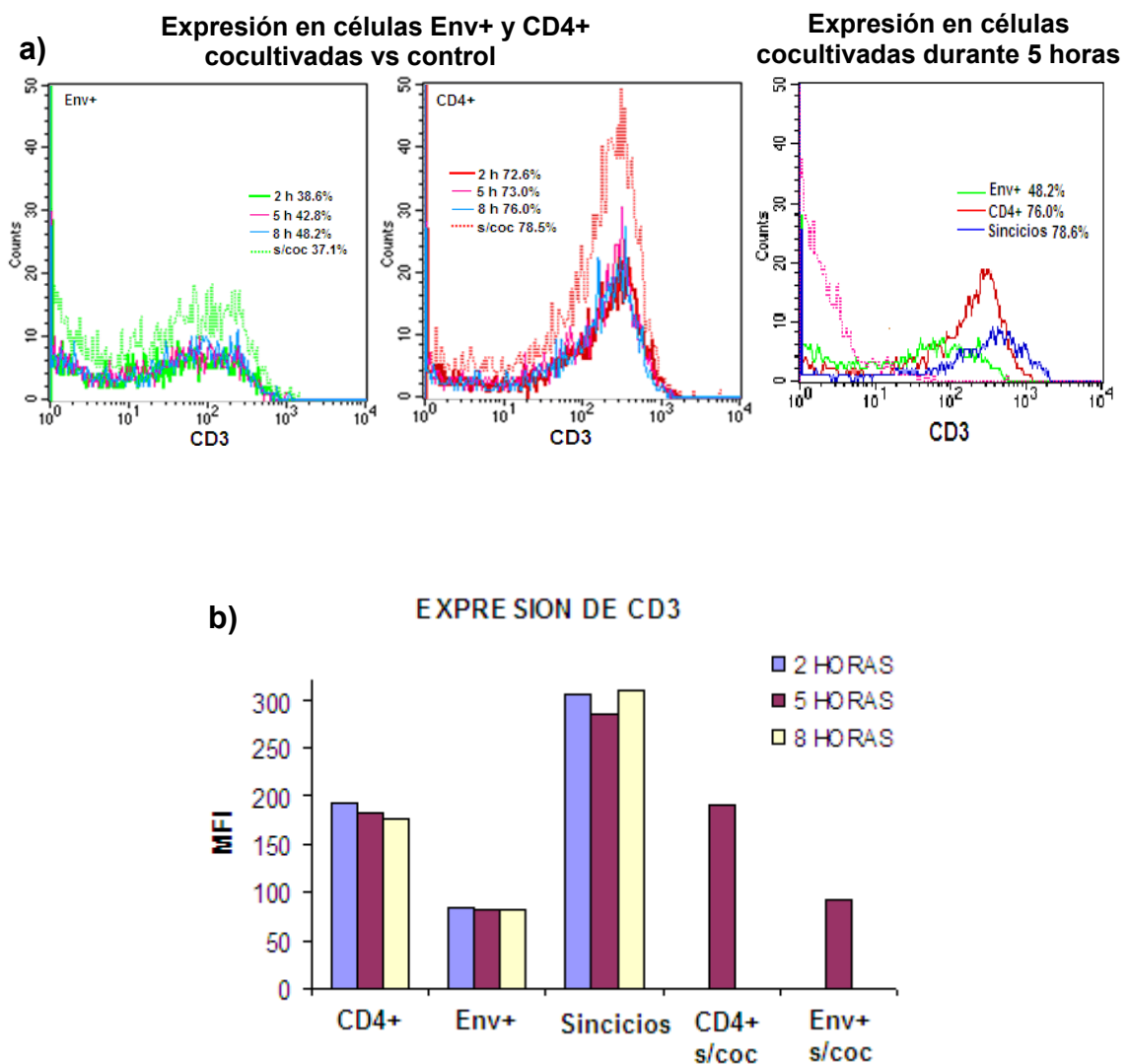


Figura 22. Expresión de CD3. a) Expresión de CD3 en células Env⁺ y CD4⁺ no fusionadas, cocultivadas durante 2, 5 y 8 horas. Se comparan con los controles de células no cocultivadas. También se muestra la expresión de CD3 en las 3 poblaciones de un cocultivo de 5 horas. b) Gráfica de MFI correspondientes a las 3 poblaciones de células presentes en cocultivos de 2, 5 y 8 horas. Los datos reportados con 5 horas de cocultivo son representativos de tres experimentos independientes, los resultados con 2 y 8 horas de cocultivo son de un experimento.

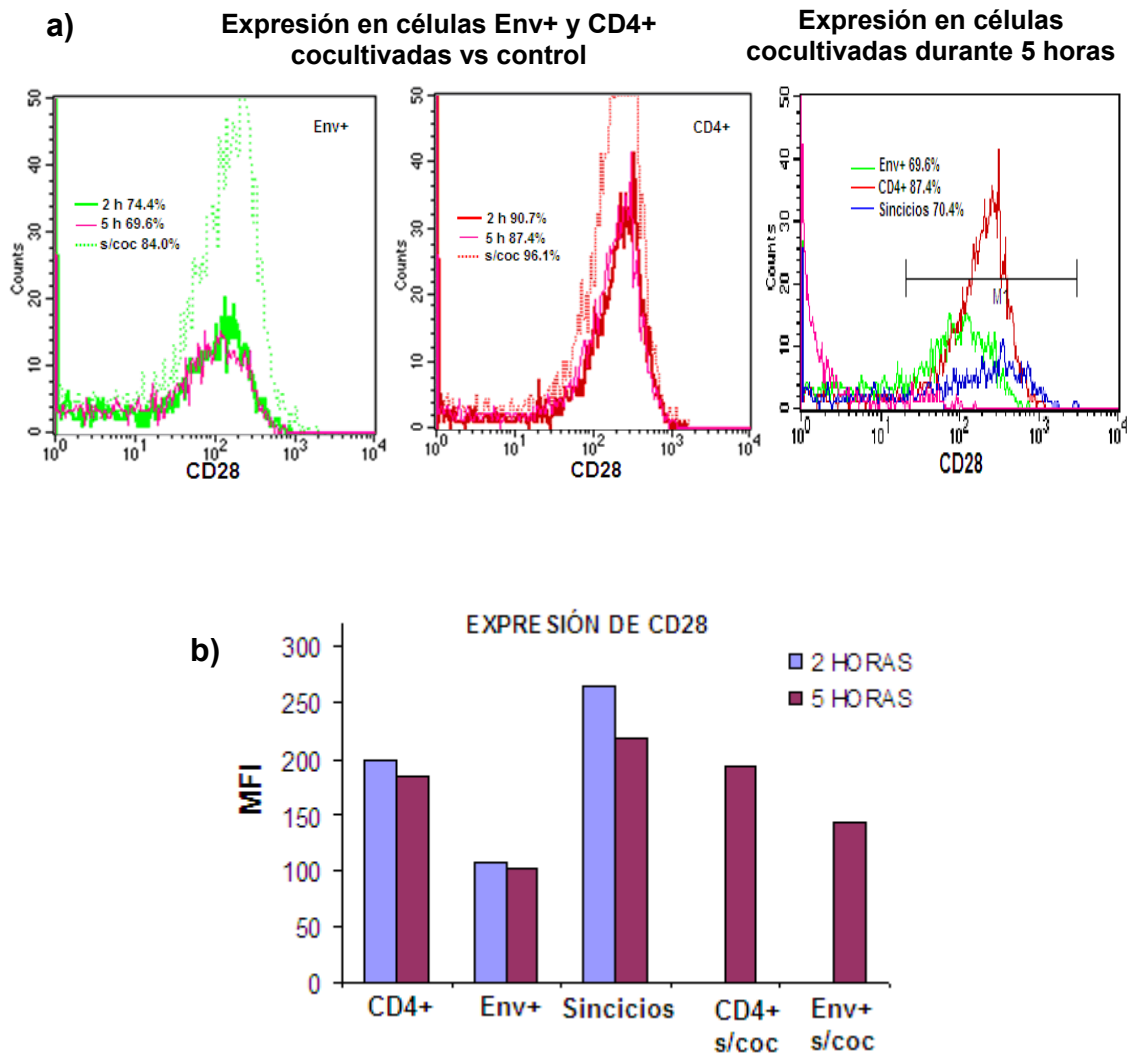


Figura 23. Expresión de CD28. Expresión de CD28 en células Env⁺ y CD4⁺ no fusionadas, cocultivadas durante 2 y 5 horas. Se comparan con los controles de células no cocultivadas. También se muestra la expresión de CD28 en las 3 poblaciones de un cocultivo de 5 horas. b) Gráfica de MFI correspondientes a las 3 poblaciones de células presentes en cocultivos de 2 y 5 horas. Los datos reportados con 5 horas de cocultivo son representativos de dos experimentos independientes, los resultados con dos horas de cocultivo son de un experimento.

6.3.5 Expresión del receptor para IL-2 (CD25)

Uno de los receptores más importantes en la fisiología de las células T es el receptor para la interleucina 2 (IL-2R ó CD25) dado que participa en el desarrollo y diferenciación celular. Está compuesto por dos cadenas IL-2R β e

IL-2R γ , que se expresan de manera constitutiva y de una tercera (IL-2R α) que sólo se expresa bajo condiciones de activación. En este estudio se consideró importante evaluar la presencia de la cadena alfa del receptor para la interleucina 2 como indicador del estado de activación de las células en cocultivo.

Para tener un control de expresión del IL-2R, células Jurkat CD4⁺ fueron estimuladas con fitohemaglutinina (PHA) durante 6 horas para evaluar su capacidad para expresar el receptor. La figura 24 muestra que después de 6 horas de incubación con PHA, un 52% de las células expresan la cadena alfa del receptor para IL-2.

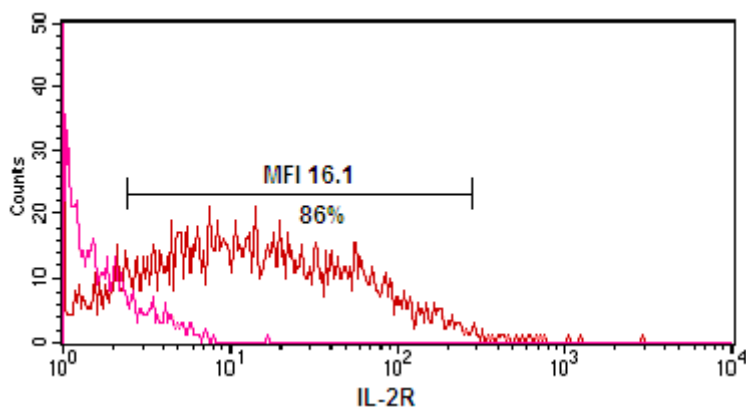


Figura 24. Expresión de IL-2R en células CD4⁺ activadas durante 6 horas con PHA. Resultado representativo de dos determinaciones.

Si la fusión celular influyera sobre el estado de activación celular, posiblemente la fusión mediada por las proteínas de la envoltura del VIH sería más eficiente debido a la expresión de moléculas de adhesión en su estado activo que aumentan los contactos intercelulares. La inmunofluorescencia para evaluar el receptor para IL-2 indica que la expresión es nula en las 3 poblaciones de células después de 8 horas de cocultivo (fig. 25). Por lo tanto, la fusión mediada por las proteínas de la envoltura del VIH no modifica el estado de activación de los sincicios o de las células vecinas no fusionadas.

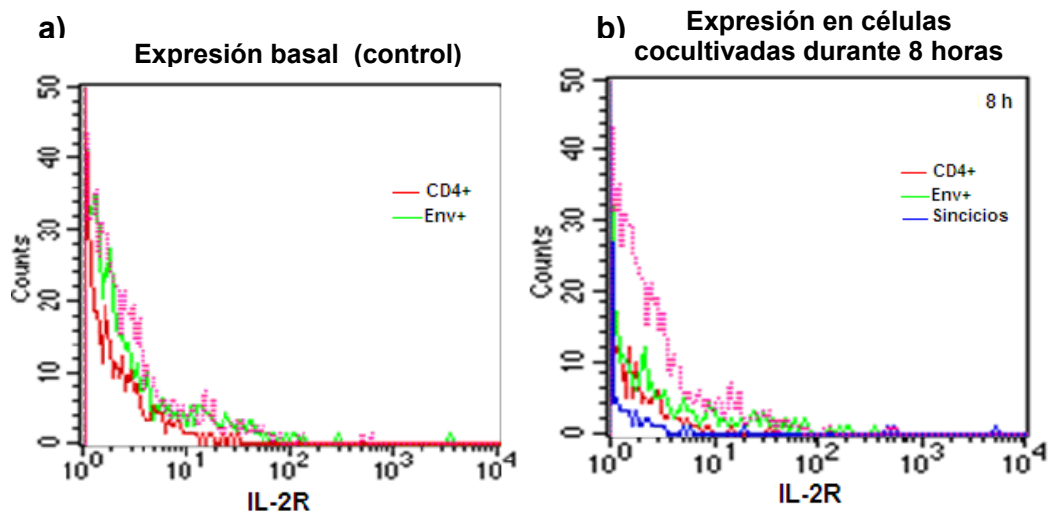


Figura 25. Expresión de IL-2R. a) Expresión de IL-2R en células Env⁺ y CD4⁺ no cocultivadas. b) expresión en células cocultivadas durante 8 horas. Los datos reportados son representativos de dos experimentos independientes.

La siguiente tabla es un resumen de los resultados mostrados acerca de las consecuencias de la fusión celular sobre la expresión de receptores importantes para la funcionalidad de las células T.

Tabla 2. Resumen de la expresión de receptores en las tres poblaciones celulares presentes en los cocultivos de células Env⁺ y CD4⁺.

RECEPTOR*							
Célula	CD4	CD3	CD28	CD25	LFA-1	ICAM-1	CXCR4
CD4 ⁺	<<	Cte.	Cte.	-	Cte.	-	Cte.
Env ⁺	-	Cte.	Cte.	-	Cte.	Cte.	<<
Sincicios	<<	>>	>>	-	>>	-	<<

*Expresión del receptor correspondiente después de 5 horas de cocultivo comparado con células no cocultivadas.

<<: disminución del número de receptores en la membrana plasmática después del cocultivo.

-: falta de expresión

>>: aumento en el número de receptores en la membrana plasmática.

Cte: expresión del constante del receptor antes y después del cocultivo.

VII. DISCUSIÓN

La fusión celular es un evento que ocurre en múltiples procesos biológicos y los cambios que produce en la fisiología celular generalmente son notables (4, 48). Sin embargo, las consecuencias no siempre son favorables para la sobrevivencia de las células fusionadas e incluso podría tener un efecto negativo sobre las células circundantes no fusionadas (22), principalmente en la fusión mediada por proteínas virales (9).

A lo largo de la infección por el VIH la fusión celular es un proceso que se encuentra activo (49). En muestras de tejido linfóide de pacientes infectados se han detectado células gigantes multinucleadas en las que existe una replicación viral constante (27). También se han encontrado sincicios en SNC de pacientes que presentaban síntomas de demencia asociada a SIDA cuya presencia se asocia a la destrucción del tejido adyacente (50). Estos hallazgos nos han llevado a preguntarnos a cerca del papel que desempeñan las células multinucleadas y su importancia para la patogénesis del SIDA.

Hasta ahora existen algunos estudios *in vitro* con linfocitos T infectados que indican que la fusión contribuye de manera importante a la muerte celular (67). Aunque se ha determinado que los sincicios sufren muerte por apoptosis, aún se desconocen los cambios que produce la fusión en la fisiología celular y las consecuencias para su entorno.

Para responder a esta pregunta, como un primer acercamiento, se evaluó la expresión de receptores de membrana importantes en la fisiología de las células T y en la infección por el VIH (CD4, CXCR4, CD3, CD28, LFA-1, ICAM-1 e IL-2R). Con este fin se recurrió a un modelo que permite hacer un análisis cuantitativo de la fusión celular por citometría de flujo. Este utiliza una línea celular transfectada que expresa las proteínas de la envoltura del VIH y una línea celular CD4⁺. Las células en cocultivo mimetizan los eventos de fusión que ocurren a nivel molecular con células infectadas por el VIH (fig. 13-15).

7.1 Expresión de CD4

El receptor CD4 es importante para la activación de células T por el papel que desempeña en la fosforilación de secuencias tipo ITAM, presentes en el complejo CD3-TCR. Esta molécula es además el receptor primario para el VIH, cuya interacción con la proteína de la envoltura viral gp120, inicia los cambios conformacionales que producen la fusión de las membranas celular y viral. Esta interacción ha sido motivo de estudio debido a las alteraciones biológicas producidas en las células involucradas. (12, 24). Se ha reportado que la síntesis de gp120 por la célula infectada afecta la expresión normal de CD4 debido a que el precursor de gp120 (gp160) se une con el CD4 a nivel de retículo endoplásmico, formando un complejo que impide la expresión de ambos receptores en la membrana plasmática (14). También se ha observado que la gp120 puede ser liberada de la membrana en forma soluble y reaccionar con el CD4 de células vecinas, promoviendo su internalización (72).

Los resultados obtenidos en nuestros experimentos para evaluar el efecto de la fusión celular sobre la expresión de CD4, muestran que las células que expresan el complejo viral gp120/gp41 (Env⁺ y sincicios), presentan niveles reducidos o nulos de CD4 en su membrana. Esta observación es compatible con la falta de expresión de CD4 en las células infectadas (14). Es interesante considerar que la cantidad de CD4 presente en la membrana de los sincicios, está reducida con respecto a los niveles observados en las células individuales. Este resultado sugiere que si la gp120 existe en su forma soluble en el medio de cocultivo (no determinado en el presente trabajo), podría unirse al receptor CD4 de la membrana sincicial, bloqueando la unión del anticuerpo anti-CD4 afectando su detección, o bien, induciendo su internalización.

Con respecto a las células CD4⁺ no fusionadas, se observó que después de 5 horas de cocultivo, la intensidad media de fluorescencia disminuyó alrededor de un 67% con respecto a las células no cocultivadas (fig. 16). Este resultado sugiere de nuevo, que la gp120 soluble, podría estar afectando la detección del CD4 de las células blanco libres. Sin embargo, es posible que las células no fusionadas sean aquellas cuya cantidad de CD4 haya sido insuficiente para promover la fusión, ya que la concentración de receptores que median la fusión de membranas es importante y se debe alcanzar un umbral que favorezca la

formación de complejos multimoleculares necesarios para que el proceso de fusión se lleve a cabo. Si este resultado fuera producto de la selección celular por parte de los sincicios y si además ocurriera en los individuos infectados, las consecuencias para el sistema inmunológico serían desfavorables, ya que las células disponibles no tendrían una buena capacidad para responder frente a estímulos antigénicos.

7.2 Expresión de CXCR4

El receptor CXCR4 es importante para la quimiotaxis y la distribución anatómica de los linfocitos T. Además, esta molécula sirve como correceptor para el VIH. En nuestro modelo de estudio hemos encontrado que CXCR4 se expresa tanto en las células Env⁺ como en las CD4⁺ y participa en el proceso de fusión celular (fig. 17).

El análisis del efecto de la fusión sobre el fenotipo de las células participantes, muestra que las células Env⁺ disminuyen la expresión de CXCR4 con respecto al tiempo de cocultivo, mientras que las células CD4⁺ no muestran alteración importante. Esto podría deberse a la selección de las células Env⁺ con mayor expresión de CXCR4 durante la formación de sincicios. También es posible que la unión de gp120 soluble con el correceptor induzca su internalización. Se sabe que la unión de CXCR4 a su ligando endógeno (SDF-1) induce su reciclamiento (26).

Los sincicios formados a las 2 horas de cocultivo mostraron una cantidad elevada de CXCR4 en su membrana (IMF=139), probablemente como producto de la suma de los receptores provenientes de las células individuales. Sin embargo, el número de células multinucleadas positivas para este receptor disminuyó en cocultivos de más de 5 horas de incubación. Es importante notar que la reducción de CXCR4 se presentó exclusivamente en células que sintetizan gp120, lo que puede sugerir que hay interacciones a nivel intracelular que internalizan el receptor o bien, a nivel de membrana entre gp120 y CXCR4 que induzcan su internalización o como ya se mencionó, que impidan la unión del anticuerpo para su detección.

7.3 EXPRESIÓN DE LFA-1 E ICAM-1

Las moléculas de adhesión tienen un papel importante durante la respuesta inmune por favorecer la extravasación celular y la interacción entre linfocitos y células presentadoras de antígeno. Además, se ha encontrado que algunas moléculas como LFA-1 y su ligando ICAM-1 participan en el proceso de infección por el VIH (6). Aunque LFA-1 se expresa de manera constitutiva, solo bajo condiciones de activación adquiere la conformación adecuada para unirse a su ligando (70). En cambio, ICAM-1 es una molécula inducible.

En el análisis de las células que participan en la fusión en cuanto a su expresión de LFA-1, encontramos que los niveles se mantuvieron constantes hasta las 5 horas de cocultivo. Los sincicios presentaron una cantidad elevada de esta molécula en su membrana. Existen reportes que muestran que la eficiencia de la infección por el VIH aumenta de manera importante cuando los viriones llevan en su membrana ICAM-1 por aumentar la estabilidad en la unión con la célula blanco. Es muy probable que en la fusión célula-célula, las interacciones entre estas dos moléculas mejore el proceso de fusión. De esta manera podemos sugerir que los sincicios por tener una cantidad elevada de LFA-1 tienen mayor capacidad para fusionar células que expresan su ligando.

De manera interesante encontramos que alrededor del 50% de las células Env⁺, a diferencia de las CD4⁺, aunque provienen de la misma línea celular, expresan la molécula ICAM-1. Es posible que la expresión del gen viral afecte la transcripción normal en la célula, lo cual es importante estudiar, ya que podría estar afectando otros procesos biológicos normales no contemplados al utilizar esta línea celular como modelo de estudio.

La expresión de ICAM-1 se mantuvo constante en las células CD4⁺ y Env⁺ libres, no fusionadas. Sin embargo, en los sincicios no fue posible detectar esta molécula. Esto sugiere nuevamente, que pueden estar ocurriendo procesos de internalización de receptores como consecuencia de la fusión celular.

7.4 EXPRESIÓN DE CD3 Y CD28

Los receptores CD3 y CD28 son importantes en la transducción de señales para la activación y sobrevivencia celular. Al evaluar si la fusión afecta la expresión de estos receptores, encontramos que en las células libres no fusionadas, Env⁺ y CD4⁺, no hubo cambios con respecto a las células no cocultivadas. Sin embargo en los sincicios encontramos niveles elevados de ambos receptores. Esto sugiere que los sincicios podrían mantener su capacidad para activarse frente a estímulos antigénicos. Una pregunta intrigante que surge con este resultado es si al fusionarse células con TCR's de diferente especificidad, ¿podrían hacer del sincicio una célula multi-específica? Esto podría ser importante para el sistema inmune, ya sea para aumentar su capacidad de respuesta frente a antígenos, disminuyendo el estado de inmunodeficiencia observada en los individuos infectados o contribuyendo a la activación crónica que al final resulta desfavorable por disminuir la reserva celular debido al recambio constante para reponer las células inmunes de los compartimentos periféricos (ganglios, bazo, etc.)(21).

7.5 Expresión de IL-2R

La expresión de la cadena alfa del receptor para la interleucina 2 es un marcador de activación celular. Para determinar si la fusión favorece la adquisición de un fenotipo de activación en las células participantes, evaluamos la expresión de éste receptor. Nuestros resultados muestran que después de 8 horas de cocultivo no hay expresión de IL-2R en ninguna de las 3 poblaciones celulares presentes en los cocultivos. Por lo tanto, la fusión celular no induce la expresión de IL-2R. Esto no descarta la posibilidad de que los sincicios tengan la capacidad de activarse frente a un estímulo adecuado.

7.6 Posibles consecuencias sobre el sistema inmune

El análisis de la expresión de receptores importantes para la fisiología de las células T CD4⁺ que participan en el proceso de fusión mediada por las proteínas de la envoltura del VIH, indica que los sincicios conservan los receptores necesarios para activarse, incluso en cantidades elevadas con respecto a las células individuales. Es posible especular que si los sincicios mantuvieran además la expresión del TCR proveniente de las células originales, tendrían el potencial para responder ante diferentes antígenos según la especificidad del TCR de las células fusionadas. Sin embargo, la manifestación de esta y otras propiedades potenciales de los sincicios dependería de manera importante del número, tipo y estado fisiológico de las células reclutadas. Algunas observaciones a partir de experimentos realizados en el laboratorio, indican que los sincicios pueden incorporar en proporción diferente células Env⁺ ó CD4⁺, dependiendo de la proporción inicial de estas células en el cocultivo, de la cantidad de proteínas virales expresadas en la membrana de las células Env⁺ y del tiempo de incubación (44). Los resultados del presente trabajo muestran que, a diferencia de las células CD4⁺, las células Env⁺ tienen niveles indetectables de CD4 y reducidos de CXCR4, mientras que manifiestan expresión de ICAM-1. Por lo tanto, cabe la posibilidad de que los sincicios formados por un mayor número de células CD4⁺ conserven mejor su capacidad para responder frente a antígenos. En consecuencia, las células multinucleadas podrían participar en la respuesta inmune durante la infección por el VIH. En este sentido, es importante explorar otras características de las células fusionadas, como su tiempo de vida y capacidad proliferativa.

Como ya se mencionó, las células que no se incorporan a los sincicios, manifiestan una reducción importante en la expresión de CD4, lo que disminuiría su capacidad de respuesta frente a estímulos antigénicos. Si esto sucede en los individuos infectados por el VIH, entonces, es posible que cuando aparecen variantes virales inductoras de sincicios y los procesos de fusión ocurren con mayor frecuencia, el sistema inmune se debilita por la falta de la capacidad de los linfocitos T para establecer una adecuada respuesta inmunológica.

Los resultados del presente trabajo muestran que la fusión celular modifica la expresión de receptores de importancia funcional tanto en las células fusionadas como en las circundantes, lo que podría incidir en la eficiencia de la respuesta inmune. La comprensión de los factores que influyen en la formación de sincicios y de sus consecuencias biológicas es un área de investigación que apenas inicia. Falta mucho por estudiar a cerca de la biología de las células involucradas en la fusión para determinar su importancia en la infección por el VIH.

VIII. CONCLUSIONES

- Las células Jurkat, transfectadas para la expresión de las proteínas de fusión del VIH (células Env⁺) se fusionan *in vitro* con células Jurkat CD4⁺. La tinción diferencial de las células con colorantes lipofílicos fluorescentes, previa a su cocultivo, permite cuantificar la población de células fusionadas, mediante citometría de flujo. Por este método, determinamos que la fusión es dependiente de la proteína viral gp120 y de los receptores CD4 y CXCR4, lo que coincide con lo reportado para las células infectadas por el virus.
- Los sincicios formados por la fusión entre células Env⁺ y CD4⁺ presentan una expresión reducida de los receptores CD4, CXCR4 e ICAM-1, comparados con las células originales. Por otro lado, moléculas como LFA-1, CD28 y CD3 se encuentran en cantidades elevadas, sugiriendo que los sincicios conservan propiedades de adhesión y activación características de los linfocitos T.
- Las células Env⁺ que no se incorporan a los sincicios tienen niveles reducidos de CXCR4 e indetectables de CD4, además de que expresan la molécula de adhesión ICAM-1. Por lo tanto, es posible que las células que expresan las proteínas virales no tengan la capacidad para responder frente a estímulos antigénicos por la falta de receptores importantes para la activación celular.
- Las células CD4⁺ que no se incorporan a los sincicios, tienen una expresión reducida de CD4 en su membrana, posiblemente como una consecuencia de la interacción con gp120 soluble que podría inducir procesos de internalización, o bien, como consecuencia de la selección de células con mayor cantidad de CD4 para fusionarse con los sincicios.
- La falta de expresión del receptor para IL-2 sugiere que la fusión no induce un estado de activación en las células que participan en el proceso. Sin

embargo, no se descarta la posibilidad de que los sincicios respondan frente a un estímulo de activación adecuado.

- La fusión celular es un evento que podría ser favorable para los individuos infectados por el VIH si los sincicios conservaran su capacidad para responder frente a estímulos antigénicos. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que la fusión celular puede influir negativamente en las células T que no se fusionan al inducir por mecanismos que aún no son claros, la reducción de la expresión de receptores importantes para su fisiología, produciendo de esta manera un déficit para la respuesta inmune.

ANEXO 1

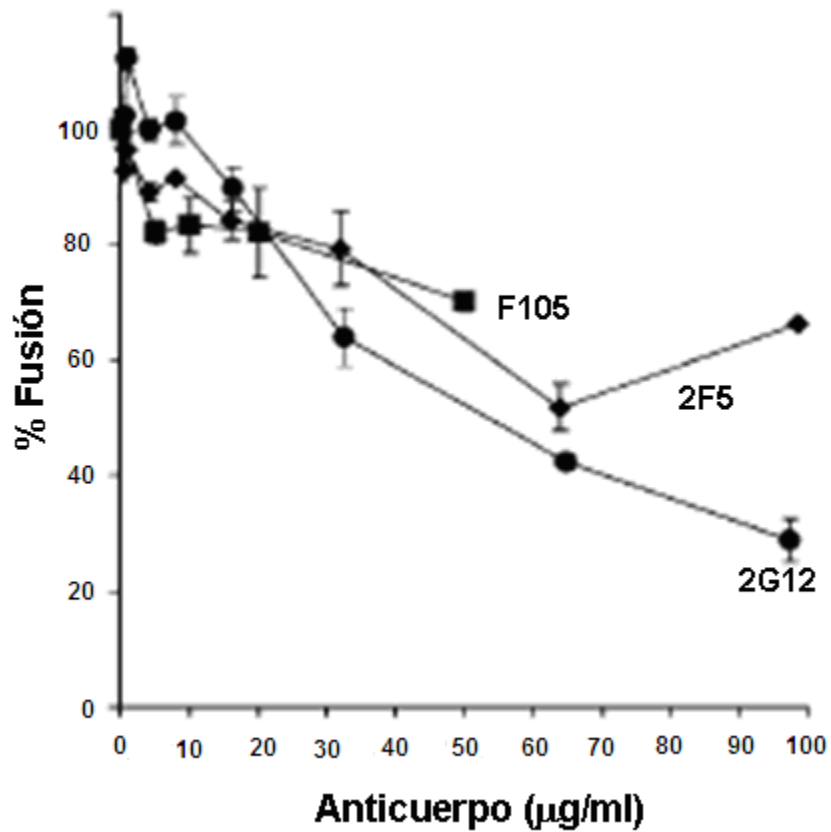


Figura 1. Del *J Gen Virol*. 2005. 86(7):1961-6. Efecto de los anticuerpos F105 y 2G12 (anti-gp120) y 2F5 (anti-gp41) sobre la fusión celular. Los experimentos se llevaron a cabo utilizando células Env⁺ preincubadas durante 30 minutos con concentraciones variables del anticuerpo correspondiente, en cocultivo con células CD4⁺ durante 5 horas. El análisis de la inhibición de la fusión celular se realizó por citometría de flujo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Berger EA, Murphy PM, Farber JM. 1999. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu. Rev. Immunol.* 17:657-700.
2. Bhoopat L, Rithaporn TS, Khunamornpong S, Bhoopat T, Taylor CR, Thorner PS. 2006. Cell reservoirs in lymph nodes infected with HIV-1 subtype E differ from subtype B: identification by combined in situ polymerase chain reaction immunohistochemistry. *Mod. Pathol.* 19(2):255-63
3. Bischof P, Irminger-Finger I. 2005. The human cytotrophoblastic cell, a mononuclear chameleon. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37(1):1-16
4. Blau HM, Blakely BT. 1999. Plasticity of cell fate: insights from heterokaryons. *Semin. Cell Dev. Biol.* 10(3):267-72.
5. Blumenthal R, Clague MJ, Durell SR, Epand RM. 2003. Membrane fusion. *Chem. Rev.* 103(1):53-69.
6. Bounou S, Leclerc JE, Tremblay MJ. 2002. Presence of host ICAM-1 in laboratory and clinical strains of human immunodeficiency virus type 1 increases virus infectivity and CD4(+)-T-cell depletion in human lymphoid tissue, a major site of replication in vivo. *J. Virol.* 76(3):1004-14.
7. Broder CC, Berger EA. 1995. Fusogenic selectivity of the envelope glycoprotein is a major determinant of human immunodeficiency virus type 1 tropism for CD4+ T-cell lines vs. primary macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92(19):9004-8.
8. Cao J, Park IW, Cooper A, Sodroski J. 1996. Molecular determinants of acute single-cell lysis by human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 70(3):1340-54.
9. Castedo M, Perfettini JL, Piacentini M, Kroemer G. 2005. p53-A pro-apoptotic signal transducer involved in AIDS. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331(3):701-6.
10. Center RJ, Leapman RD, Lebowitz J, Arthur LO, Earl PL, Moss B. 2002. Oligomeric structure of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein on the virion surface. *J. Virol.* 76(15):7863-7.
11. Chanturiya A, Chernomordik LV, Zimmerberg J. 1997. Flickering fusion pores comparable with initial exocytotic pores occur in protein-free phospholipid bilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94(26):14423-8.
12. Cicala C, Arthos J, Martinelli E, Censoplano N, Cruz CC, Chung E, Selig SM, Van Ryk D, Yang J, Jagannatha S, Chun TW, Ren P, Lempicki RA, Fauci AS. 2006. R5 and X4 HIV envelopes induce distinct gene expression profiles in primary peripheral blood mononuclear cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.* 103(10):3746-51.
13. Cohen FS, Melikyan GB. 1998. Methodologies in the study of cell-cell fusion. *Methods.* 16(2):215-26.
14. Crise B, Buonocore L, Rose JK. 1990. CD4 is retained in the endoplasmic reticulum by the human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein precursor. *J. Virol.* 64(11):5585-93.
15. Cui W, Ke JZ, Zhang Q, Ke HZ, Chalouni C, Vignery A. 2006. The intracellular domain of CD44 promotes the fusion of macrophages. *Blood.* 107(2):796-805

16. Davis CB, Dikic I, Unutmaz D, Hill CM, Arthos J, Siani MA, Thompson DA, Schlessinger J, Littman DR. 1997. Signal transduction due to HIV-1 envelope interactions with chemokine receptors CXCR4 or CCR5. *J. Exp. Med.* 186(10):1793-8.
17. Decrion AZ, Dichamp I, Varin A, Herbein G. 2005. HIV and inflammation. *Curr. HIV Res.* 3(3):243-59.
18. Derdeyn CA, Silvestri G. 2005. Viral and host factors in the pathogenesis of HIV infection. *Curr. Opin. Immunol.* 17(4):366-73.
19. Dong XN, Xiao Y, Dierich MP, Chen YH. 2001. N- and C-domains of HIV-1 gp41: mutation, structure and functions. *Immunol. Lett.* 75(3):215-20.
20. Doms RW, Trono D. 2000. The plasma membrane as a combat zone in the HIV battlefield. *Genes Dev.* 14(21):2677-88.
21. Douek DC, Picker LJ, Koup RA. 2003. T cell dynamics in HIV-1 infection. *Annu. Rev. Immunol.* 21:265-304.
22. Duelli D, Lazebnik Y. 2003. Cell fusion: a hidden enemy? *Cancer Cell.* 3(5):445-8.
23. Eckert DM, Kim PS. 2001. Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. *Annu. Rev. Biochem.*;70:777-810.
24. Fantuzzi L, Purificato C, Donato K, Belardelli F, Gessani S. 2004. Human immunodeficiency virus type 1 gp120 induces abnormal maturation and functional alterations of dendritic cells: a novel mechanism for aids pathogenesis. *J. Virol.* 78(18):9763-72.
25. Finnegan CM, Berg W, Lewis GK, DeVico AL. 2002. Antigenic properties of the human immunodeficiency virus transmembrane glycoprotein during cell-cell fusion. *J. Virol.* 76(23):12123-34
26. Forster R, Kremmer E, Schubel A, Breitfeld D, Kleinschmidt A, Nerl C, Bernhardt G, Lipp M. 1998. Intracellular and surface expression of the HIV-1 coreceptor CXCR4/fusin on various leukocyte subsets: rapid internalization and recycling upon activation. *J. Immunol.* 160(3):1522-31.
27. Frankel SS, Tenner-Racz K, Racz P, Wenig BM, Hansen CH, Heffner D, Nelson AM, Pope M, Steinman RM. 1997. Active replication of HIV-1 at the lymphoepithelial surface of the tonsil. *Am. J. Pathol.* 151(1):89-96.
28. Graziosi C, Gantt KR, Vaccarezza M, Demarest JF, Daucher M, Saag MS, Shaw GM, Quinn TC, Cohen OJ, Welbon CC, Pantaleo G, Fauci AS. 1996. Kinetics of cytokine expression during primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93(9):4386- 91.
29. Grossman Z, Meier-Schellersheim M, Sousa AE, Victorino RM, Paul WE. 2002. CD4+ T-cell depletion in HIV infection: are we closer to understanding the cause? *Nat. Med.* 8(4):319-23.
30. Gurley RJ, Ikeuchi K, Byrn RA, Anderson K, Groopman JE. 1989. CD4+ lymphocyte function with early human immunodeficiency virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86(6):1993-1997.
31. Hernández-Pando R, Bornstein QL, Aguilar Leon D, Orozco EH, Madrigal VK, Martínez Cordero E. 2000. Inflammatory cytokine production by immunological and foreign body multinucleated giant cells. *Immunology.* 100(3):352-58.
32. Hioe CE, Tuen M, Chien PC Jr, Jones G, Ratto-Kim S, Norris PJ, Moretto WJ, Nixon DF, Gorny Mk, Zolla-Pazner S. 2001. Inhibition of

- human immunodeficiency virus type 1 gp120 presentation to CD4 T cells by antibodies specific for the CD4 binding domain of gp120. *J. Virol.* 75(22):10950-7.
33. Holm GH, Gabuzda D. 2005. Distinct mechanisms of CD4+ and CD8+ T-cell activation and bystander apoptosis induced by human immunodeficiency virus type 1 virions. *J. Virol.* 79(10):6299-311.
 34. Huerta L, Gomez-Icazbalceta G, Soto-Ramírez L, Viveros-Rogel M, Rodríguez R, Fuentes L, Lamoyi E, Larralde C. 2005. Human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) envelope-dependent cell-cell fusion modulation by HIV-positive sera is related to disease progression. *J. Gen. Virol.* 86(7):1961-1966.
 35. Huerta L, Lamoyi E, Baez-Saldana A, Larralde C. 2002. Human immunodeficiency virus envelope-dependent cell-cell fusion: a quantitative fluorescence cytometric assay. *Cytometry.* 47(2):100-6.
 36. Huerta L, López-Balderas N, Lamoyi E, Larralde C. 2006. Discriminating in vitro cell fusion from cell aggregation by flow cytometry combined with fluorescence resonance energy transfer. *Journal of Virological Methods.* Agosto. (doi:10.1016/j.jviromet.2006.07.012)
 37. Jekle A, Keppler OT, De Clercq E, Schols D, Weinstein M, Goldsmith MA. 2003. In vivo evolution of human immunodeficiency virus type 1 toward increased pathogenicity through CXCR4-mediated killing of uninfected CD4 T cells. *J. Virol.* 77(10):5846-54.
 38. Kryworuchko M, Pasquier V, Theze J. 2003. Human immunodeficiency virus-1 envelope glycoproteins and anti-CD4 antibodies inhibit interleukin-2-induced Jak/STAT signalling in human CD4 T lymphocytes. *Clin. Exp. Immunol.* 131(3):422-7.
 39. LaBonte JA, Madani N, Sodroski J. 2003. 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. *J Virol.* 77(12):6645-59.
 40. La Gruta NL, Liu H, Dilioglou S, Rhodes M, Wiest D, Vignali D. 2004. Architectural changes in the TCR:CD3 complex induced by MHC: peptide ligation. *J. Immunol.* 172(6):3662-3669.
 41. Lee B, Sharron M, Montaner LJ, Weissman D, Doms RW. 1999. Quantification of CD4, CCR5, and CXCR4 levels on lymphocyte subsets, dendritic cells, and differentially conditioned monocyte-derived macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96(9):5215-20.
 42. Lentz BR, Malinin V, Haque ME, Evans K. 2000. Protein machines and lipid assemblies: current views of cell membrane fusion. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10(5):607-15.
 43. Levy JA. 2001. The importance of the innate immune system in controlling HIV infection and disease. *Trends Immunol.* 22(6):312-6.
 44. López-Balderas N, Huerta L, Villarreal C, Rivera-Toledo E, Sandoval G, Lamoyi E, Larralde C. 2006. In vitro cell fusion between CD4+ and HIV Env+ T cells generates a diversity of syncytia varying in total number, size and cellular content. *Virus Research.* (doi:10.1016/j.virusres.2006.08.009).
 45. Matsuura K, Wada H, Nagai T, Iijima Y, Minamino T, Sano M, Akazawa H, Molkentin JD, Kasanuki H, Komuro I. 2004. Cardiomyocytes fuse with surrounding noncardiomyocytes and reenter the cell cycle. *J. Cell Biol.* 167(2):351-63.

46. Mondor I, Moulard M, Ugolini S, Klasse PJ, Hoxie J, Amara A, Delaunay T, Wyatt R, Sodroski J, Sattentau QJ. 1998. Interactions among HIV gp120, CD4, and CXCR4: dependence on CD4 expression level, gp120 viral origin, conservation of the gp120 COOH- and NH₂-termini and V1/V2 and V3 loops, and sensitivity to neutralizing antibodies. *Virology*. 248(2):394-405.
47. Murphy S, Sylwester A, Kennedy RC, Soll DR. 1995. Phagocytosis of individual CD4⁺ T cells by HIV-induced T cell syncytia. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 11(4):433-42.
48. Ogle BM, Cascalho M, Platt JL. 2005. Biological implications of cell fusion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6(7):567-75.
49. Oreste J M. 2000. In vivo cytolysis and fusion of human immunodeficiency virus type 1-infected lymphocytes in lymphoid tissue. *J. Infect. Dis.* 182(1):338-42.
50. Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, Cohen OJ, Vaccarezza M, Gant K, Muro-Cacho C, Fauci AS. 1994. Role of lymphoid organs in the pathogenesis of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Immunol. Rev.* 140:105-30.
51. Patel M, Yanagishita M, Roderiquez G, Bou-Habib DC, Oravec T, Hascall VC, Norcross MA. 1993. Cell-surface heparan sulfate proteoglycan mediates HIV-1 infection of T-cell lines. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 9(2):167-74.
52. Pavlath GK, Blau HM. 1986. Expression of muscle genes in heterokaryons depends on gene dosage. *J. Cell Biol.* 102(1):124-30.
53. Piguet V, Sattentau Q. 2004. Dangerous liaisons at the virological synapse. *Clin. Invest.* 114(5):605-10
54. Podbilewicz B. 2004. Sweet control of cell migration, cytokinesis and organogenesis. *Nat. Cell Biol.* 6(1):9-11.
55. Regoes RR, Bonhoeffer S. 2005. The HIV coreceptor switch: a population dynamical perspective. *Trends Microbiol.* 13(6):269-77.
56. Ribeiro RM, Hazenberg MD, Perelson AS, Davenport MP. 2006. Naive and memory cell turnover as drivers of CCR5-to-CXCR4 tropism switch in human immunodeficiency virus type 1: implications for therapy. *J Virol.* 80(2):802-9.
57. Rinfret A, Latendresse H, Lefebvre R, St-Louis G, Jolicoeur P, Lamarre L. 1991. Human immunodeficiency virus-infected multinucleated histiocytes in oropharyngeal lymphoid tissues from two asymptomatic patients. *Am. J. Pathol.* 138(2):421-6.
58. Rivera Toledo Evelyn. "Fusión celular mediada por las proteínas de la envoltura del VIH: Dependencia del correceptor CXCR4 y del nivel de expresión del complejo gp120/gp41". Química Farmacéutica Bióloga. Facultad de Química, UNAM. 2004.
59. Rosenzweig M, Connole M, Forand-Barabasz A, Tremblay MP, Johnson RP, Lackner AA. 2000. Mechanisms associated with thymocyte apoptosis induced by simian immunodeficiency virus. *J. Immunol.* 165(6):3461-8.
60. Sackett K, Shai Y. 2005. The HIV fusion peptide adopts intermolecular parallel beta-sheet structure in membranes when stabilized by the

- adjacent N-terminal heptad repeat: a 13C FTIR study. *J. Mol. Biol.* 350(4):790-805.
61. Shi D, Reinecke H, Murry CE, Torok-Storb B. 2004. Myogenic fusion of human bone marrow stromal cells, but not hematopoietic cells. *Blood.* 104(1):290-4.
 62. Shutt DC, Jenkins LM, Carolan EJ, Stapleton J, Daniels KJ, Kennedy RC, Soll DR. 1998. T cell syncytia induced by HIV release. T cell chemoattractants: demonstration with a newly developed single cell chemotaxis chamber. *J. Cell Sci.* 111:99-109.
 63. Shutt DC, Soll DR. 1999. HIV-induced T-cell syncytia release a two component T-helper cell chemoattractant composed of Nef and Tat. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 22):3931-41.
 64. Stevenson M. 2003. HIV-1 pathogenesis. *Nat Med.* 9(7):853-60.
 65. Sun J, Barbeau B, Tremblay MJ. 2006. HIV-1-mediated syncytium formation promotes cell-to-cell transfer of Tax protein and HTLV-I gene expression. *Virus Res.* 118(1-2):120-9
 66. Sylwester A, Daniels K, Soll DR. 1998. The invasive and destructive behavior of HIV-induced T cell syncytia on collagen and endothelium. *J. Leukoc. Biol.* 63(2):233-44.
 67. Sylwester A, Murphy S, Shutt D, Soll DR. 1997. HIV-induced T cell syncytia are self-perpetuating and the primary cause of T cell death in culture. *J. Immunol.* 158(8):3996-4007.
 68. Sylwester A, Shutt D, Wessels D, Stapleton JT, Stites J, Kennedy RC, Soll DR. 1995. T cells and HIV-induced T cell syncytia exhibit the same motility cycle. *J. Leukoc. Biol.* 57(4):643-50.
 69. Sylwester A, Wessels D, Anderson SA, Warren RQ, Shutt DC, Kennedy RC, Soll DR. 1993. HIV-induced syncytia of a T cell line form single giant pseudopods and are motile. *J. Cell Sci.* 106 (Pt 3):941-53.
 70. Tardif MR, Tremblay MJ. 2005. LFA-1 is a key determinant for preferential infection of memory CD4+ T cells by human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 79(21):13714-24.
 71. Telander D, Malvey E, Mueller D. 1999. Evidence for repression of IL-2 gene activation in anergic T cells. *J. immunol.* 162:1460-1465.
 72. Theodore A.C, Kornfeld R.P, Cruikshank W.W. 1994. CD4 modulation of noninfected human T-lymphocytes by HIV-envelope glycoprotein gp120: contribution to the immunosuppression seen in HIV-1 infection by induction of CD4 and CD3 unresponsiveness. *J. AIDS Hum. Retrovirol.* 7(9):899-907
 73. Valentin A, Lu W, Rosati M, Schneider R, Albert J, Karlsson A, Pavlakis GN. 1998. Dual effect of interleukin 4 on HIV-1 expression: implications for viral phenotypic switch and disease progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95(15):8886-91.
 74. Vigano A, Balotta C, Trabattoni D, Salvaggio A, Riva C, Bricalli D, Crupi L, Colombo MC, Principi N, Galli M, Clerici M. Virologic and immunologic markers of disease progression in pediatric HIV infection. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1996 Sep 1;12(13):1255-62.
 75. Weiss A, Littman D. 1994. Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell.* 76(28):263-274.

76. Wilflingseder D, Banki Z, Dierich M, Stoiber H. 2005. Mechanisms promoting dendritic cell-mediated transmission of HIV. *Mol. Immunol.* 42(2):229-237.
77. Yi Y, Isaacs S, Williams D, Frank I, Schols D, De Clercq E, Kolson D, Collman R. 1999. Role of CXCR4 in cell-cell fusion and infection of monocyte-derived macrophages by primary human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) strains: two distinct mechanisms of HIV-1 dual tropism. *J. Virol.* 73(9):7117-7125.
78. Yu C, Shen K, Lin M, Chen P, Lin C, Chang GD, Chen H. 2002. GCMa regulates the syncytin-mediated trophoblastic fusion. *J. Biol. Chem.* Dec 20;277(51):50062-8.