



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**DINÁMICA *IN VITRO* DE LAS POBLACIONES
CELULARES DURANTE LA FORMACIÓN DE
SINCICIOS INDUCIDA POR LAS PROTEÍNAS DE LA
ENVOLTURA DEL VIH-1**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

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

P R E S E N T A:

Biol. Exp. MARÍA GUADALUPE SANDOVAL GONZÁLEZ

**DIRECTOR DE TESIS: DR. CARLOS LARRALDE RANGEL
CO-DIRECCIÓN: DRA. LEONOR HUERTA HENÁNDEZ**

MÉXICO, D.F.

Abril 2008



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

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, al Instituto de Investigaciones Biomédicas, a la UNAM y a CONACYT, PAPIIT y DGEP por las becas otorgadas.

Al Dr. Carlos Larralde Rangel, por permitirme realizar este proyecto en su laboratorio, por sus consejos y dirección.

Dra. Leonor Huerta Hernández, por la dirección de esta tesis, su apoyo incondicional, la revisión de esta tesis y sus consejos.

Dra. Gloria Soldevila Melgarejo y la Dra. Rocío Ortiz Muñiz, miembros del comité tutorial. Por la revisión de esta tesis, sus comentarios acertados y sugerencias.

Al Dr. Enrique Ortega Soto, por sus observaciones, sugerencias y la revisión de esta tesis.

A la M en C Fernández Saavedra G., a la QFB López-Balderas N. y la M en C Rivera-Toledo E. por la revisión de esta tesis.

A la Lic. Lucía Brito, por su apoyo en la revisión bibliográfica y facilitarme los artículos consultados.

A todas las personas que de alguna manera u otra contribuyeron en mi desarrollo académico.

DEDICATORIAS

A Dios por darme las fuerzas necesarias para alcanzar esta meta.

A mi mamá Esperanza González, por todo su amor, comprensión y apoyo incondicional

A mis hermanos: Víctor, Elisa, Ricardo y Dainzu, por su apoyo, cariño, consejos y palabras entusiastas para cumplir con esta meta.

A mis amigas y amigos: José Trinidad, Nayali, Pablito, Pablo, Evelyn, Alberto y Yadira. Por su apoyo incondicional, por los momentos compartidos y su inapreciable amistad.

Y sobre todo...

.... A Carlo Eduardo Campos Sandoval, Frida Elisa Campos Sandoval y Víctor Alejandro Sandoval Rojas, por ser uno de los principales motores que me impulsan a lograr las metas propuestas.

El ensalmo

“Yo...Me comprometo a vivir con intensidad y regocijo, a no dejarme vencer por los abismos del amor, ni por el olvido, ni siquiera por el tormento de una pasión contrariada. Me comprometo a recordar, a conocer mis hierros, a bendecir mis arrebatos. Me comprometo a perdonar los abandonos, a no desdeñar todo lo que me conmueva, me deslumbre, me quebrante y me alegre. Larga vida prometo, larga paciencia, historias largas. Y nada abreviaré que deba sucederme, ni la pena, ni el éxtasis, para cuando sea vieja tenga como deleite la detallada historia de mi vida”.

A. Mastreta

CONTENIDO

1.	ABREVIATURAS	03
2.	RESUMEN	08
3.	ABSTRACT	10
4.	INTRODUCCIÓN	12
4.1.	Fusión celular	14
4.2.	Fusión celular mediada por las proteínas	15
4.3.	Receptores implicados en la fusión	16
4.4.	Fusión celular <i>in vitro</i>	17
4.5.	Fusión celular <i>in vivo</i>	19
4.6.	Citometría de flujo	20
5.	JUSTIFICACIÓN	23
6.	OBJETIVO GENERAL	24
6.1.	Objetivos particulares	24
7.	HIPÓTESIS	25
8.	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	26
8.1.	Líneas celulares	26
8.1.1.	Jurkat HXBc2 (Env ⁺)	26
8.1.2.	Jurkat 522 (Env ⁺ no fusogénicas)	27
8.1.3.	Jurkat E6 (CD4 ⁺)	27
8.2.	Cultivo celular	27
8.3.	Inducción de la expresión de las proteínas gp120/gp41	28
8.4.	Preparación de los colorantes	28
8.5.	Marcaje celular	28
8.6.	Ensayo de fusión celular	29
8.7.	Análisis por citometría de flujo	30
8.8.	Cuenta de números absolutos de células viables	30
8.9.	Incorporación de BrdU y 7-AAD	31
8.10.	Microscopía óptica	32
8.11.	Inhibición de la fusión celular con anti-CD4	32
9.	RESULTADOS	34

9.1.	Aspecto de las células fusionadas	34
9.2.	Determinación del porcentaje de fusión celular	35
9.3.	Determinación de números absolutos de células viables	37
9.4.	Dinámica de las poblaciones celulares	42
9.5.	Viabilidad de las poblaciones celulares <i>in vitro</i>	51
9.6.	Análisis del tamaño la granularidad de cocultivos	52
9.7.	Inhibición de la fusión celular con anti-CD4	55
9.8.	Estudios preliminares del ciclo celular	56
10.	DISCUSIÓN	59
10.1.	Aspecto de las células fusionadas	59
10.2.	Determinación de números absolutos de células viables	60
10.3.	Cinética de crecimiento de células CD4 ⁺ y Env ⁺	61
10.4.	Cinética de crecimiento de las poblaciones celulares	62
10.5.	Estudios preliminares del ciclo celular	63
11.	CONCLUSIONES	64
12.	BIBLIOGRAFÍA	65
13.	ANEXOS	74
13.1.	Anexo 1. Reactivos y soluciones	74
13.2.	Anexo 2. Índice de figuras	75
14.	APÉNDICES	77
14.1.	Apéndice 1. Generalidades del VIH-1	77
14.2.	Apéndice 2. Glosario	85

1. ABREVIATURAS

522: Células Jurkat Env⁺ no fusogénicas.

7-AAD: 7-amino actinomicina D.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

AIM-V: Medio especial para cultivar linfocitos, libre de suero.

APC: Alofococianina.

ARN: Ácido Ribonucleico.

BrdU: Bromodeoxiuridina, análogo de la timina.

CCR5: Correceptor de la familia de quimiocinas, empleado por el VIH que es trópico a macrófagos.

CDC: Centro para el Control y Prevención de Enfermedades.

CD28: Cúmulo de diferenciación, molécula coestimuladora.

CD3: Cúmulo de diferenciación, molécula asociada a TCR, marcador de activación de linfocitos T.

CD4⁺: Células T cooperadoras.

CD8⁺: Células T citotóxicas.

CENSIDA. Centro Nacional para la Prevención y Control del VIH/SIDA

CTL: Linfocitos T citotóxicos.

CXCR4: Correceptor de la familia de quimiocinas, empleado por el VIH que es trópico para linfocitos.

DC: Célula dendrítica.

DC-SIGN: Receptor de células dendríticas para VIH-1.

Dil: Perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina. (Dil C₁₈(3)).

DiO: Perclorato de 3,3'-dioctadeciloxocarbocianina. (DiO C₁₈(3)).

DMSO: Dimetil sulfóxido.

Env⁺: Células Jurkat que expresan las proteínas Env de la clona HXBc2, fusogénicas.

FRET: Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia.

SFB: Suero fetal bovino.

FSC: Forward scatter, detecta la dispersión del láser en un ángulo pequeño, proporcional al tamaño de la partícula.

Gag: Proteína interna del gen estructural del VIH-1.

gp120: Glicoproteína de superficie del VIH-1.

gp41: Glicoproteína transmembranal del VIH-1

HXBc2: Células Jurkat fusogénicas (Env⁺).

ICAM-1: Molécula de adhesión intracelular tipo 1.

IgG: Inmunoglobulina tipo G.

IgM: Inmunoglobulina tipo M.

IP: Yoduro de propidio.

LFA-1: Antígeno funcional linfocitario tipo 1.

LTR: Terminaciones repetitivas largas (Long Terminal Repeats, por sus siglas en inglés).

L-SIGN: Receptor de células dendríticas para VIH-1.

NIS: Cepas del VIH-1 que son variantes no inductoras de sincicios, en cultivos celulares establecidos.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PBS: Solución salina de fosfatos.

PIC: Complejo de preintegración.

Pol: Enzima, presente en el gen estructural.

RPMI: Medio para cultivos celulares.

RT: Retrotranscriptasa.

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

SIDA: Síndrome de la inmunodeficiencia adquirida.

SNC: Sistema Nervioso Central.

SSC: Side scatter, detecta la dispersión del láser en un ángulo recto y es proporcional a la complejidad de la partícula (granularidad).

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

2. RESUMEN

La expresión de las proteínas de la envoltura gp120/gp41 del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) en la membrana de las células infectadas, les permite interactuar con células circundantes que expresan el receptor CD4 y un correceptor de la familia de los receptores para quimiocinas. Esta interacción conduce a la fusión de las células infectadas y no infectadas, llevando a la formación de células multinucleadas o sincicios. Se ha propuesto que la fusión celular es una de las causas subyacentes en la pérdida de linfocitos T CD4⁺ y la progresión a SIDA. Sin embargo, las características funcionales de los sincicios y sus efectos sobre los tejidos circundantes han sido poco estudiados.

En este trabajo se estudió la dinámica de las poblaciones celulares *in vitro* durante la formación de sincicios inducida por las proteínas de la envoltura del VIH, bajo la hipótesis de que los sincicios modifican el equilibrio cuantitativo y funcional de las poblaciones celulares en el microambiente.

Como modelo experimental se utilizaron células linfocíticas humanas de la línea Jurkat, transfectadas para la expresión del complejo gp120/gp41 de la envoltura viral (células Env⁺), en cocultivo con células Jurkat no transfectadas (células CD4⁺). Para la determinación cuantitativa de la fusión celular y los cambios en las poblaciones celulares no fusionadas, se utilizó un método basado en citometría de flujo de 4 colores: las células se marcaron con los colorantes fluorescentes vitales, las Env⁺ con DiO (fluorescencia verde) y las CD4⁺ con Dil (fluorescencia roja). Después del cocultivo, las poblaciones celulares se analizaron, identificando los sincicios generados como partículas con fluorescencia mixta y las células que permanecieron no fusionadas como partículas de un solo color. El número total de células de cada tipo se calculó en base a la captura de un número fijo de perlas fluorescentes adicionado a cada suspensión celular previamente a su análisis en el citómetro de flujo. Las células no viables se identificaron por el método de incorporación de yoduro de propidio y fueron excluidas del análisis. Este método permitió analizar la dinámica de cada una de las poblaciones celulares determinando el porcentaje

de fusión celular, el número absoluto y la viabilidad durante un periodo de 4 días de cocultivo.

Los resultados mostraron que los sincicios se generan rápidamente en los cocultivos y su número se mantiene aproximadamente constante durante 4 días. Durante este tiempo muestran una viabilidad no menor al 75%.

El número de las células $CD4^+$ que permanecieron no fusionadas fue 3 veces menor después de 4 días de cocultivo, con respecto a las células control no cocultivadas. Por lo tanto, la formación de sincicios se acompañó por una marcada disminución en el número de células $CD4^+$ circundantes. Estas células no mostraron pérdida significativa de viabilidad, por lo que esta disminución no fue debida a muerte celular, sino a su incorporación en los sincicios y/o a una pérdida de su capacidad de duplicación.

En experimentos preliminares de incorporación de un precursor de ADN (bromodeoxiuridina) en células cocultivadas durante 5 horas, se detectó la presencia de este precursor en células multinucleadas, indicando la fusión de células en proceso de replicación.

En conclusión, en este sistema *in vitro* los sincicios fueron estables por varios días y su formación se asoció con una marcada reducción del número de células $CD4^+$ circundantes. La disminución drástica del número de células $CD4^+$ en los cocultivos se relacionó a su incorporación en los sincicios, y probablemente, a que una proporción de ellas estuvo constituida por células en proceso de replicación. Estas observaciones indican que la formación de sincicios podría modificar el equilibrio cuantitativo y funcional de las poblaciones celulares en el microambiente durante la infección por el VIH. Asimismo, se mostró que el ensayo de citometría de flujo de 4 colores permite la evaluación cuantitativa del número absoluto de células viables en experimentos de fusión celular durante periodos largos de cultivo.

3. ABSTRACT

Cells infected with the human immunodeficiency virus (HIV) express the virus envelope fusion protein (Env) on their plasma membrane, a process that enables infected cells to bind and fuse with neighbor uninfected cells to form multinucleated cells or syncytia. The relevance of cell-cell fusion for the pathogenesis of AIDS is unknown, although *in vitro* studies indicate that syncytia formation may be a mechanism of CD4⁺ T cell depletion.

In this work, the effect of syncytia formation on the *in vitro* dynamics of lymphocyte cell populations during the HIV-envelope dependent syncytia formation was studied. Human lymphocyte Jurkat cell lines transfected for the expression of the viral gp120/gp41 envelope proteins (Env⁺ cells), were cocultured with Jurkat non-transfected cells (CD4⁺ cells). To quantify cell fusion and the changes in the number of the unfused cell populations, a four-color flow cytometry method was used: fusion partners were stained with the lipophilic fluorescent dyes Dil (red) and DiO (green), and fused cells were detected as double fluorescent particles. Non-fused cells were identified as single colored particles. The absolute cell number of each cell population were calculated on the base of a predetermined number of fluorescent pearls added to cell suspensions before analysis by flow cytometry. Non-viable cells were identified by the propidium iodine exclusion method. This assay allowed the analysis of the percentage, absolute number, and viability of each cell population in the course of 4-day cocultures.

Our results showed that syncytia generate in the first hours of coculture and their number keep nearly constant during 4 day. Syncytia viability was not lower than 75% through this period. A three-fold reduction of the number of CD4⁺ cells remaining unfused was observed in cocultures respective to control, non-cocultured cells. Unfused CD4⁺ cells did not show significant loss of viability, and thus, the observed decrease was not due to cell death, but to incorporation into syncytia and/or to a diminished ability of duplication.

Preliminary experiments showed the presence of the DNA-precursor bromodeoxyuridine into multinucleated cells, indicating the fusion of replicating

cells. Preliminary experiments involving bromodeoxyuridine incorporation into cocultured cells suggested that syncytia have the capacity to synthesize DNA, probably due to the fusion of dividing CD4⁺ cells.

Therefore, in our system, syncytia were stable for several days, and their formation associated with a marked reduction of the number of CD4⁺ cells. These observations indicate that syncytia formation could significantly affect the quantitative and functional cellular equilibria in the microenvironment during HIV-infection. Likewise, it was shown that the four-color flow cytometry assay allows the quantitative study of the absolute number of viable cells in cell fusion experiments during long-term cultivation.

4. INTRODUCCIÓN

El virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), es el agente causal del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Los primeros casos de SIDA fueron descritos por primera vez en Nueva York y San Francisco en el año 1981 (32,47), tras haberse observado entre jóvenes homosexuales una rara enfermedad, en la que predominaban enfermedades oportunistas tales como: Sarcoma de Kaposi, neumonía producida por el *Pneumocystis carinii* y una inexplicable y persistente linfadenopatía. Es hasta entonces que el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés), reconoce los primeros casos de SIDA (26,33,47,67).

En 1983 se reportó el aislamiento de un retrovirus en pacientes que presentaban síndrome de linfadenopatía. En Francia en el Instituto Pasteur, Luc Montagnier identificó el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) como el agente causal de la enfermedad (apéndice 1) (57). Posteriormente en 1984, en Estados Unidos en el Instituto de Salud, Robert C. Gallo, publicó con evidencia virológica y epidemiológica que un virus nuevo conocido como VIH-1, es el causante del SIDA (26,48).

En el año 2007 la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó sus estadísticas, informando que alrededor de 60 millones de individuos viven con VIH-1 en todo el mundo. Para el 2007 se calcularon cerca de 5 millones de nuevas infecciones y alrededor de 3 millones de muertes por la enfermedad (67,82,2,72) (Figura 1). Hasta este momento se ha reportado que al menos 25 millones de personas han muerto en todo el mundo a causa del SIDA (26,72).

En México, en el año de 1983, se notificaron los primeros casos de SIDA. La Secretaría de Salud y el Centro Nacional para la Prevención y Control del VIH/SIDA (CENSIDA) reportó en 2005 la existencia aproximada de 98 mil casos de SIDA y quizás 150 mil portadores del virus. Actualmente, México ocupa el décimo tercer lugar a nivel mundial en cuanto al número de notificados mundialmente y el tercero en el

Continente Americano, según el reporte de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (56,24).

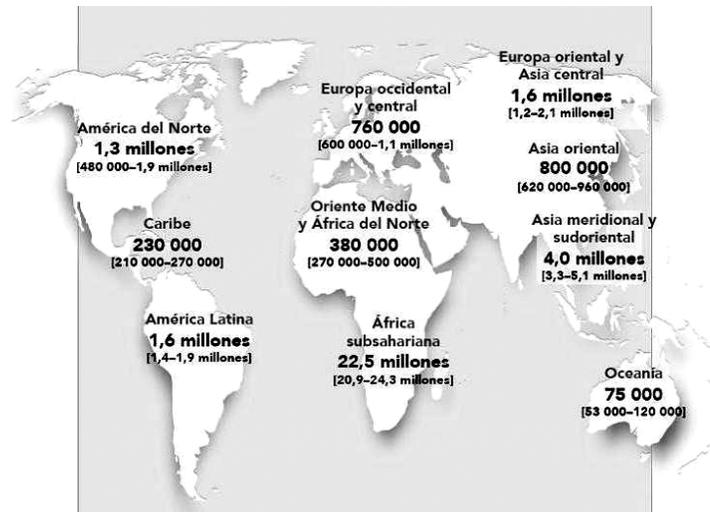


Figura 1. Número estimado de personas que viven con la infección por VIH-1 a nivel mundial (82).

Debido a la magnitud de este grave problema de salud pública, se han hecho grandes inversiones en la investigación biomédica. La atención que se ha centrado en el SIDA es proporcional a su magnitud, lográndose grandes avances, tales como el aislamiento e identificación del agente causal, conocimiento de la estructura molecular, crecimiento *in vitro* y análisis del ciclo de replicación del virus. También se han desarrollado terapias antirretrovirales que mejoran mucho la vida media y la calidad de vida de los pacientes infectados con VIH. Además se ha avanzado en la obtención de una vacuna contra el SIDA. Así mismo se ha estudiado la respuesta inmune ante el virus y los mecanismos que utiliza para producir daño, entre otros aspectos (56).

El tipo de inmunidad implicada en la contención de la infección, y la desaparición progresiva de células CD4⁺ en pacientes infectados son dos aspectos fundamentales en la patogénesis del SIDA (apéndice 1), para los cuales aun no se tiene una explicación satisfactoria. La formación de sincicios se ha asociado con la patogénesis de la enfermedad y se considera un mecanismo que contribuye con la disminución de los linfocitos T CD4⁺.

El propósito de este trabajo es revisar con base en estudios *in vitro* la interacción dinámica de las células que participan en la fusión celular mediadas por las proteínas de la envoltura del VIH-1 y los efectos que resulten en las células involucradas en la formación de sincicios y células circundantes.

4.1. Fusión celular

Las células son componentes íntegros y discretos de los tejidos, y su estado es determinado por la diferenciación celular. Y, bajo ciertas condiciones, pueden fusionarse con las células de otros tipos, mezclando su contenido citoplasmático y genético. La fusión celular es de central importancia para el desarrollo, reparación de tejidos y la patogénesis de enfermedades como el SIDA (9).

La fusión celular es un fenómeno frecuente en la naturaleza sumamente importante y se encuentra presente en la fecundación (óvulo y espermatozoide), el desarrollo embrionario (organogénesis), la formación de la placenta (sinciotrofoblasto), la formación de músculo cardíaco, formación de tejido óseo (osteoclastos), diferenciación de células madre, desarrollo de invertebrados (*Caenorhabditis elegans*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Drosophila melanogaster*), en la progresión a cáncer (células tumorales y metástasis) y en infecciones virales (8,9,20,58,60,64,71).

La fusión celular es un evento altamente regulado, requerido en el desarrollo y la homeostasis (9). Además la fusión celular es también una herramienta científica, pues se utiliza en la fabricación de anticuerpos monoclonales, la identificación de oncogenes, genes supresores de tumores y elucidar la función cromosomal. Así mismo tiene aplicaciones terapéuticas como en la terapia génica de cáncer, viroterapia y generación de nuevas vacunas contra el cáncer (58).

La secuencia de eventos que conduce a la formación de células gigantes multinucleadas o sincicios se considera análoga a la que ocurre en la fusión de la membrana viral con la membrana de la célula blanco en la infección por VIH-1; sin embargo, se debe considerar que en la fusión célula-célula podrían estar implicadas otras moléculas presentes en las membranas celulares (46,75).

4.2. Fusión celular mediada por las proteínas de la envoltura del VIH-1

Las glicoproteínas de envoltura del VIH-1 (complejo gp120/gp41) juegan un papel importante en el ciclo replicativo del virus, ya que interaccionan con el receptor CD4 y los correceptores CXCR4 o CCR5, y cataliza la reacción entre la bicapa lipídica del virus y la membrana plasmática de la célula blanco.

La capacidad fusogénica de las glicoproteínas gp129/gp41 ha sido constantemente implicada en los efectos citopáticos *in vitro* y la dependencia de CD4 *in vivo* (61).

Las células infectadas por el VIH-1 expresan en su membrana el complejo protéico gp120/gp41 y tienen la capacidad de formar sincicios (Figura 2), lo que se considera como una forma efectiva de infección célula-célula. La aparición de variantes del VIH-1 inductoras de sincicios se ha asociado con fallas en la homeostasis celular (40), acelerada disminución de linfocitos T CD4⁺ y progresión a SIDA (4,63). La fusión celular en la infección por VIH-1 es de importancia en la transmisión y replicación del virus debido a que el virus intracelular puede diseminarse más rápidamente aun en presencia de anticuerpos dirigidos contra el mismo, escapando a la vigilancia inmunológica (88). La fusión celular puede además constituir un mecanismo de daño celular y muerte (61).

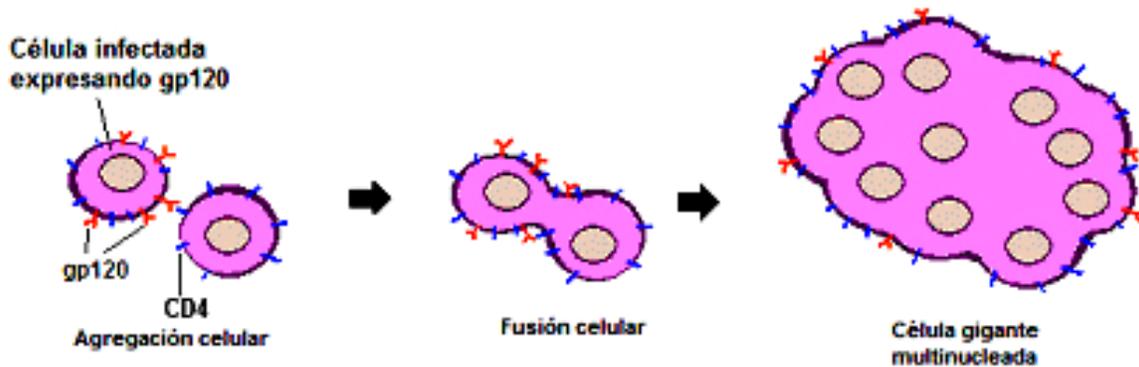


Figura 2. Fusión célula-célula dependiente del complejo proteico viral gp120/gp41 y la producción de sincicios.

4.3. Receptores implicados en la fusión de membranas durante la infección por VIH-1

La molécula CD4, expresada en la membrana de los linfocitos T, es el receptor primario del VIH-1. Esta molécula interacciona con la proteína viral de superficie gp120 como paso previo al proceso de infección, pero esto no es suficiente para permitir la infección, sugiriéndose la participación de un correceptor. En 1996 se descubrió que diversas moléculas con siete dominios transmembranales de la familia de receptores de quimiocinas, principalmente CXCR4 y CCR5, eran los correceptores requeridos para la entrada del VIH-1 a las células y así iniciar su ciclo de replicación (apéndice 1) (27,40,55). El correceptor CCR5 es expresado principalmente en macrófagos, siendo el de elección para los aislados del VIH-1 trópicos de macrófagos (virus R5). El correceptor CXCR4 es expresado en linfocitos T y es utilizado por aislados de VIH-1 trópicos de linfocitos (virus X4) (12,50,86).

En el mecanismo propuesto que explican el proceso de entrada del virus a la célula blanco, sugiere que debe darse primero la unión CD4-gp120 Trauncker en 1988 propuso (Figura 3) que inicialmente la de unión gp120 a CD4 se lleva a cabo con alta afinidad en el dominio amino terminal distal de CD4 (28). Esta unión induce un cambio conformacional en gp120 que permite el acercamiento al dominio de unión al correceptor. El dominio de unión al correceptor sobre gp120, para los aislados CCR5 es próximo al sitio de unión a CD4. Para los aislados CXCR4 se determinó que el sitio

de unión al correceptor sobre gp120 está en una región similar a la empleada por CCR5, pues una sola sustitución en la región convierte un virus X4 en uno R5 y viceversa (21).

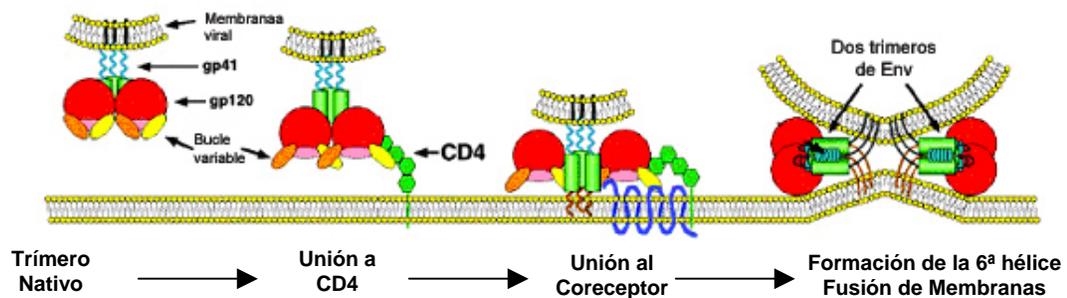


Figura 3. Fusión celular de membranas en la infección por VIH-1.

Después de la unión al correceptor, un cambio conformacional más pronunciado expone la porción de gp41, resultando la formación de un complejo transitorio, al insertarse la región específica de gp41 en la membrana de la célula blanco conocida como péptido fusión, permite colocar ambas membranas en contacto estrecho, culminando en la formación del poro de fusión (7,15,16,39,78,86). En el caso de la fusión virus-célula la fusión de membranas forma parte de la primera etapa del ciclo de replicación del virus (apéndice 1). La fusión célula-célula, solamente requiere la expresión del complejo gp120/gp41 en la membrana de la célula infectada para producir la formación de sincicios (12,17).

4.4. Fusión celular *in vitro*

En estudios realizados *in vitro*, se ha encontrado que la formación de sincicios es un evento citopático que conduce a la muerte celular. Dicho proceso es dependiente del complejo proteico gp120/gp41 (5). Se ha observado que los sincicios tienen longevidad limitada y experimentan apoptosis. Adicionalmente se observó la disminución en la muerte de células circundantes no infectadas, no así las células que

expresan las proteínas de envoltura. Además 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 y no forman sincicios. En etapas tardías de la infección los virus utilizan el correceptor CXCR4 e infecta principalmente células T CD4⁺ vírgenes (4,10,35,68) (Figura 4).

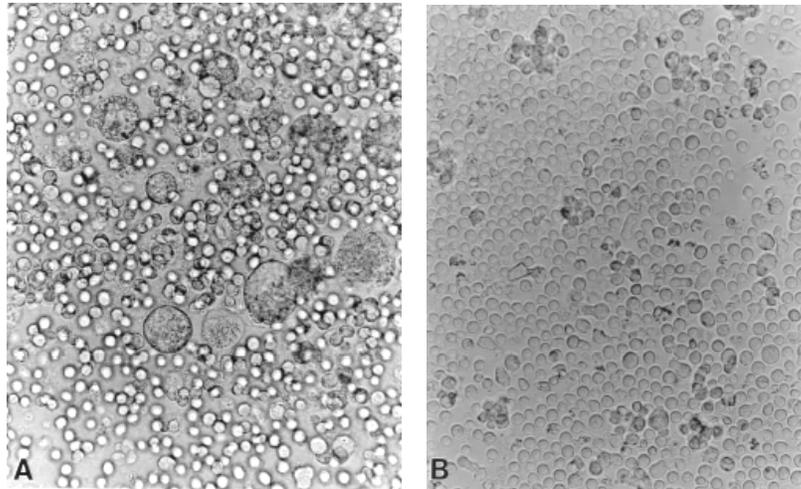


Figura 4. Cultivo de células infectadas con virus aislado de paciente. A). En etapa avanzada de la infección, se observa la formación de sincicios y B). En una etapa inicial de la infección donde no hay formación de sincicios (68).

Ciertas cepas del VIH-1 aisladas, son llamadas inductoras de sincicios (IS) a causa de su habilidad para inducir la formación de células gigantes multinucleadas en ciertas líneas celulares T *in vitro*, mientras que otras que no tienen esta habilidad son llamadas no inductoras de sincicios (NIS). Existe una considerable relación entre el tropismo a infectar células T CD4⁺ y el fenotipo IS; y el tropismo por macrófagos con el fenotipo NIS (15,17,28,40,44,70,73).

En cocultivos de células Jurkat la muerte de las células circundantes es poco común comparada con la muerte de células que expresan gp120/gp41, donde la muerte celular es dependiente de la actividad fusogénica del complejo (55).

El contacto con las glucoproteínas de envoltura del VIH no es suficiente para inducir apoptosis, más bien es transferida de célula apoptótica a no apoptótica dentro de los sincicios, amplificando estas señales e incrementando el número de células apoptóticas (70).

4.5. Fusión celular *in vivo*

En estudios *in vivo* se han identificado sincicios en tejidos de individuos infectados con VIH-1. Aproximadamente en el 50% de los pacientes infectados que progresan a SIDA, en los que se asocia la encefalopatía aguda y demencia, se observó la presencia de sincicios en SNC. En los que se identificó macrófagos mononucleados y multinucleados donde puede efectuarse la replicación viral. También se ha encontrado la presencia de sincicios en amígdalas (en DCs de mucosa nasofaríngea), adenoides, centros germinales y nódulos linfáticos periféricos y axiales de pacientes con SIDA. Lewin-Smith y colaboradores reportaron en el año de 1999, la presencia de sincicios en células mononucleares, en muestras de colón de pacientes infectados con VIH-1 y con hiperplasia intestinal (49).

La formación de sincicios con células no infectadas mejora la infección viral célula a célula y sirven como reservorio virales. (Figuras 5 y 6) (3,4,13,29,30,42,44,59,61,65,69,79), es importante mencionar que en la formación de sincicios lo trascendental es el fenotipo viral, ya que la infección es establecida por cepas de baja replicación, con un tropismo a macrófagos, determinadas como variantes no inductoras de sincicios, predominantes en etapas tempranas de la infección. Pero durante el curso de la infección cambia el fenotipo viral en aproximadamente 50% de los individuos infectados, donde predominan las cepas trópicas a linfocitos, y estas si tienen la capacidad de formar sincicios, llevando a una rápida disminución de linfocitos T CD4⁺ y progresión a SIDA (apéndice 1) (34,61).

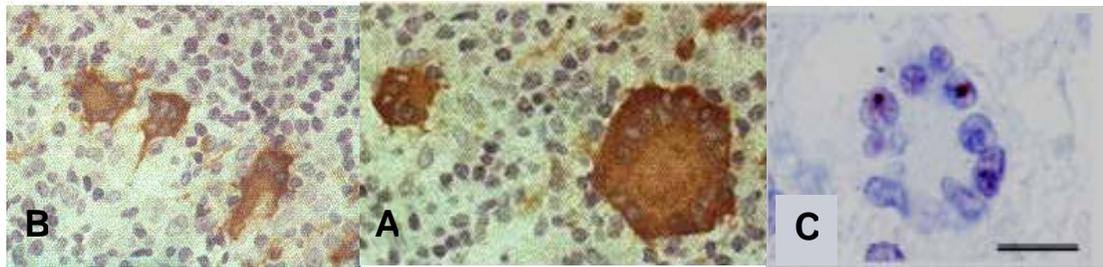


Figura 5. Sincicios en pacientes infectados con VIH-1. A). Sección de cerebro de paciente infectado con VIH-1, mostrando sincicios. B). Aumento de sincicio en cerebro de paciente infectado con VIH-1 y C). Sincicio presente en una sección de la corteza frontal de paciente con encefalitis asociada a la infección por VIH-1.

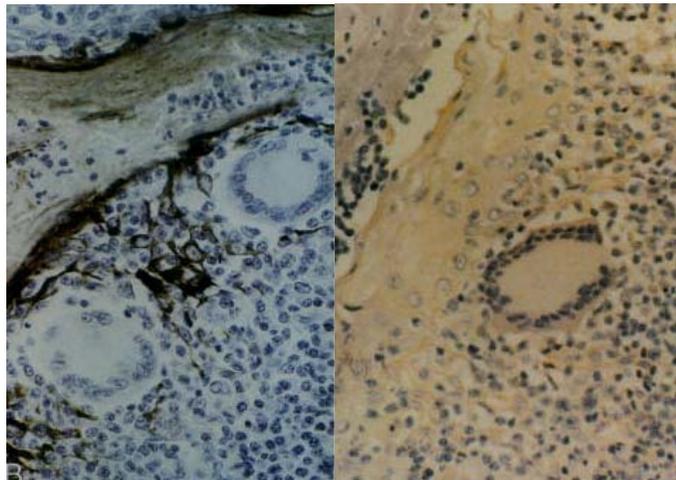


Figura 6. Típica células gigantes multinucleadas (sincicios) en amígdala de paciente infectado con el VIH-1.

4.6. Citometría de flujo aplicada a cuantificar la fusión celular

La citometría de flujo es un método eficaz para evaluar diferentes características de las células, como por ejemplo su tamaño, granularidad o fluorescencia, además de ser cuantitativo, sensible y reproducible.

En el laboratorio de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas se ha diseñado un método nuevo para cuantificar la fusión celular basado en la tinción de las células con colorantes lipofílicos fluorescentes. Las células se marcan diferencialmente con colorantes tipo carbocianinas que emiten fluorescencia roja (DiI) y verde (DiO), que se distribuyen principalmente en la membrana plasmática. Las

células fusionadas son detectadas como partículas con fluorescencia mixta (Figura 7) (37,38).

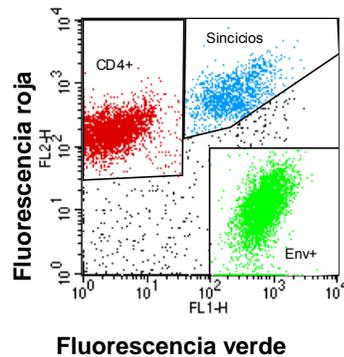


Figura 7. Células Jurkat marcadas con colorantes lipofílicos fluorescentes. Análisis por citometría de flujo de cocultivos de células Env⁺ y CD4⁺ teñidas con Dil (rojas) y DiO (verdes). En azul se muestran los sincios. En este modelo de fusión celular se cocultivan células Jurkat (HXBc2) establemente transfectadas con el gen *env* del VIH-1, que expresa el complejo glicoprotéico gp120/gp41, con células Jurkat (E6) que expresan la molécula CD4 y el correceptor CXCR4 (5). La fusión celular se manifiesta en las primeras horas de cocultivo, con la formación de células gigantes multinucleadas (sincios). Un análisis cualitativo se determinó la fusión celular alcanzando un porcentaje entre el 18% a las 5 horas de cocultivo (36). Utilizando el microscopio óptico, se encontró una excelente relación entre los sincios y las células no fusionadas determinada por microscopía óptica y citometría de flujo. Así mismo se observó que los sincios contienen diferente cantidad de núcleos (Figura 8), además un 64% de los sincios son pequeños y contienen 4 núcleos y una pequeña población de los mismos contiene 9 núcleos o más (38).

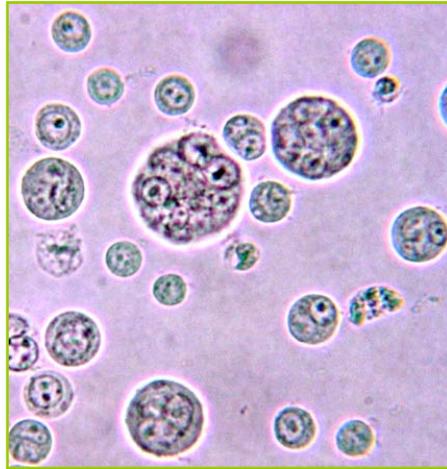


Figura 8. Diversidad de sincicios generados en cocultivos de células Jurkat CD4⁺ y Env⁺. Aumento 400X (38).

Con este método se observó el efecto del suero de individuos seropositivos al VIH sobre la fusión celular, relacionándolo con indicadores clínicos. En estadios asintomáticos, prevalecen anticuerpos inhibidores de la fusión (IgG) que disminuyen cuando los pacientes progresan a SIDA. En este último periodo, una fracción de los sueros tuvo un efecto promotor de la fusión, actividad relacionada con anticuerpos IgM. Estos efectos del suero de pacientes infectados se relaciona con el estadio clínico de los pacientes y la progresión a SIDA (36).

Por otro lado el método es eficiente para discriminar entre células agregadas y células fusionadas en una población celular a través de FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia) donde el FRET se manifiesta como un promotor de la intensidad de fluorescencia roja (DiI) en las células dobles fluorescentes, también se evaluó el efecto inhibitorio de la fusión celular de el anticuerpo monoclonal anti-CD4 y el péptido T-20 o Enfuvirtide (péptido derivado de la glicoproteína gp41 que inhibe la fusión celular ya que interacción con el correceptor en linfocitos y monocitos) (23,38,84).

También se encontró que se incorporan en un mayor número las células blanco CD4⁺ por cada célula que expresa las proteínas virales dentro del sincicio,

indicando un mecanismo de amplificación del daño al sistema inmune debido a la fusión celular (51).

Por otro lado se observó que la fusión celular reduce la expresión de los receptores CD4, CXCR4 e ICAM-1 en los sincicios, manteniendo cantidades elevadas de los receptores CD3, CD28 y LFA-1, lo que sugiere que podrían conservar su capacidad para activarse. En las células no fusionadas se encontró una reducción en la expresión de CD4 y CXCR4, lo que podría afectar su capacidad para responder frente a estímulos antigénicos (66).

Estas observaciones indican un papel relevante de la fusión celular mediada por las proteínas de la envoltura del VIH-1 en la patogénesis del SIDA.

5. JUSTIFICACIÓN

La fusión celular es una consecuencia de la interacción de células infectadas que expresan las proteínas de la envoltura del VIH, con células no infectadas circundantes. Es considerada como un mecanismo subyacente en el daño a los linfocitos T CD4⁺ durante la infección por el VIH. El estudio de las consecuencias de la fusión celular sobre la dinámica poblacional de las células, es un índice de la magnitud potencial del efecto de la fusión celular sobre la función inmunológica.

6. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de formación de sincicios sobre la dinámica poblacional *in vitro* de dos líneas celulares linfocíticas que se fusionan entre sí a través de las proteínas de la envoltura del VIH.

6.1. Objetivos particulares

- ☞ Determinar el porcentaje de sincicios generados por la fusión de células linfocíticas tipo Jurkat Env⁺ y CD4⁺, durante 4 días de cocultivo.
- ☞ Determinar el número total de sincicios y células circundantes no fusionadas a lo largo del periodo de cocultivo.
- ☞ Determinar la viabilidad de los sincicios y células circundantes no fusionadas a lo largo de periodos largos del cocultivo.
- ☞ Efectuar un análisis preliminar de la capacidad proliferativa de las células en el cocultivo.

7. HIPÓTESIS

Los sincicios pueden subsistir en cultivo y modificar significativamente el equilibrio numérico y funcional de las poblaciones celulares en el microambiente.

8. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

8.1. Líneas celulares

8.1.1. Jurkat HXBc2 (4) (Env⁺): una línea de células linfocitarias obtenida de un paciente con leucemia linfoblástica aguda. Las células se encuentran establemente transfectadas utilizando un sistema de expresión inducible por tetraciclina. Se transfectan con dos plásmidos diferentes, el primero, contiene los genes *env* (gen que codifica para las proteínas de la envoltura, permite la interacción con el receptor CD4 y la fusión de membrana) y *rev* (gen regulador del transporte y procesamiento del ARNm) 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. 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 la tetraciclina se encuentra presente, se une a la proteína tTA obstaculizando su unión al operador e inhibiendo la expresión del gen *env* (Figura 9), esta es usada para modular la expresión de los genes *env* y *rev* del HIV-1 específicamente para la expresión del complejo gp120/gp41. Los genes virales son provenientes de la cepa HXBc clona 2 del VIH-1, una cepa viral trópica a linfocitos altamente fusogénica. Las célula transfectadas fueron donadas por el Dr. Sodroski (Harvard Medical School, Boston, Mass.) y las E6 por el Dr. Robin Weiss, a través del Programa de Reactivos de Referencia e Investigación en SIDA, (AIDS RRRP, por sus siglas en inglés), Institutos Nacionales de Salud, Estados Unidos.

Las células HXBc2 y 522 se mantuvieron en botellas T-75 (Cellstar) con medio RPMI (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FSB) (Gibco), penicilina (100 U/ml) y estreptomina (100 µg/ml) (Gibco). A estas células se les adicionó tetraciclina (1µg/ml) para inhibir la expresión de las glicoproteínas virales además de, geneticina (G418) (200µg/ml) e higromicina (200µg/ml) (Gibco) para mantener la selección de las células transfectadas. Se incubaron a 37 ° C en una atmósfera del 5% de CO₂. El medio se cambia totalmente cada tres días.

8.3. Inducción de la expresión de las proteínas gp120/gp41

Para inducir la expresión de *env* en las células HXBc2 y 522, se les retiró la tetraciclina del medio de cultivo de la siguiente manera: las suspensiones celular se colocaron en tubos de 50 ml, se centrifugaron 3 minutos a 1150 rpm para retirar el medio de cultivo, se lavaron 2 veces con 40 ml de PBS 1X y se resuspendieron en medio RPMI suplementado, se adicionó geneticina e higromocina, en las concentraciones indicadas en la sección 8.2. Se incubaron por 3 días sin tetraciclina antes del ensayo de fusión a 37 ° C y una atmósfera del 5% de CO₂.

En lo sucesivo se denominará Env⁺ a las células HXBc2 que han sido inducidas a expresar el gen *env* y por lo tanto sintetizan las proteínas gp120/gp41 de la envoltura del VIH-1.

8.4. Preparación de los colorantes

Se prepararon soluciones concentradas de Dil y DiO diluyendo 3.5 mg de colorante en 1ml de DMSO estéril, ambos colorantes se sonicaron para su solubilización completa. Para el marcaje celular se prepararon diluciones de 1:10 de Dil y 1:30 de DiO en DMSO estéril. Las soluciones se almacenaron protegidas de la luz a temperatura ambiente.

8.5. Marcaje celular

Las células se marcaron un día antes del ensayo de fusión, transfiriéndolas a un tubo de 15 ml y se centrifugaron durante 3 minutos a 1150 rpm para eliminar el medio

de cultivo. Las células se resuspendieron en 1 ml de medio RPMI suplementado y se ajustaron contando las células en hematocitómetro en una dilución 1:10 de azul tripano, para tener una concentración de $5-15 \times 10^6$ células/ml de medio. Las células Env⁺ se marcaron con 15 μ l de DiO dilución 1:30 por cada ml de suspensión celular, y las CD4⁺ se marcaron con 7 μ l de Dil dilución 1:10 por cada mililitro de suspensión celular. Se incubaron en agitación constante y suave durante 15 minutos a temperatura ambiente. Protegidas de la luz.

Posteriormente se centrifugaron durante 3 minutos a 11500 rpm, se descartó el sobrenadante, se removió el exceso de colorante y se lavaron dos veces con 10 volúmenes más de medio RPMI. Finalmente se colocaron nuevamente en RPMI suplementado, agregando higromicina y geneticina en las concentraciones indicadas en la sección 8.2. Se mantuvieron en ausencia de tetraciclina para mantener la expresión de las proteínas virales. Se incubaron toda la noche a 37 ° C en una atmósfera del 5% de CO₂.

8.6. Ensayo de fusión celular

Las células marcadas se transfirieron a tubos de 15 ml y centrifugaron a 1150 rpm durante 3 minutos, se resuspendieron en el medio libre de suero AIM-V (Gibco), se ajustaron con un hematocitómetro usando una dilución 1:10 en azul tripano, para tener una concentración de 0.2×10^6 células/0.1 ml de medio.

En una placa de 48 pozos se colocaron 200 μ l de la suspensión de células CD4⁺ y 200 μ l de células Env⁺ (0.2×10^6 células y 0.4×10^6 células) en los pozos correspondientes. Colocándose los controles de cada tipo celular. Las células se mezclan cuidadosamente en el pozo.

Las células se cosecharon a los tiempos establecidos de cocultivo. Se retiraron de los pozos con una punta de 1000 μ l, se colocaron en tubos para citometría de 5 ml (Falcon) y se lavaron con 2ml de PBS 1X, se descartó el sobrenadante, absorbiendo el

exceso de PBS en papel y se resuspendieron en un volumen final de 500 μ l de PBS 1X.

Se adicionaron los reactivos para cuantificación de números absolutos, viabilidad y proliferación según lo indicado en los respectivos protocolos (perlas TruCOUNT, BrdU-APC, yoduro de propidio y 7-AAD), para posteriormente adquirirse en el citómetro de flujo.

8.7. Análisis por citometría de flujo

Las células se analizaron en un citómetro de flujo modelo FACScalibur (Becton-Dickinson) con lámpara de xenón de excitación a 488 nm, utilizando el programa Cell-Quest (Becton Dickinson). Ajustando la compensación utilizando células marcadas.

Se capturaron 10000 eventos y 500 perlas fluorescentes de los tubos correspondientes, con registro de tamaño (FSC-H), granularidad (SSC-H), fluorescencia verde (FL1-H), fluorescencia roja (FL2-H), yoduro de propidio, anexina V-Cy5 y 7-AAD (FL3-H) y perlas TruCOUNT y BrdU-APC (FL4-H).

Para disminuir la cantidad de agregados celulares, las células se disociaron utilizando una pipeta automática justo antes de la captura.

8.8. Cuenta en números absolutos de células viables

Después de cosechar a los tiempos establecidos, las células se lavaron con 2 ml de PBS 1X, se resuspendieron en 500 μ l de PBS 1X y se adicionaron 100 μ l de suspensión de perlas TruCOUNT y 5 μ l de yoduro de propidio. Se incubaron durante 15 minutos protegidas de la luz a temperatura ambiente, para finalmente adquirirse en el citómetro de flujo.

Cada tubo de perlas TruCOUNT conteniendo 5000 fue reconstituido en 1ml de PBS 1X; de esta suspensión se adicionaron 100 μ l a cada tubo de células (4972

perlas). Las perlas fluorescen en FL-1, FL-2, FL-3 y FL-4 del citómetro de flujo. Para no interferir con los detectores que ocupan nuestras poblaciones celulares Env⁺, CD4⁺ y sincicios, se capturaron un cierto número de perlas, que en este caso fueron 500, en el canal FL4.

El número absoluto de células se determinó calculando un factor, que se obtiene dividiendo el número de perlas totales entre el número de perlas adicionado a la muestra, multiplicando el resultado por el total de eventos capturados por el citómetro de flujo. En nuestro caso, este factor fue de $5000/500=10$, de modo que el número de células capturado junto con las 500 perlas, se multiplicó por 10 para obtener su número absoluto.

8.9. Incorporación de BrdU y 7-AAD

Se diluyó la BrdU a 1mM en DPBS estéril. Se adicionaron 10 µl/ml de BrdU 32X (1mM), 40 minutos antes de cada cosecha, a los pozos correspondientes. Se cosecharon las células, transfiriendo cada pozo a tubos para citometría de 5 ml (Falcon) y se lavaron con 2 ml de PBS 1X.

Para fijar y permeabilizar se adicionaron 100 µl de solución fijadora (cytofix/cytoperm), se incubaron durante 30 minutos en hielo. Las células se lavaron con 1ml de solución de lavado (perm/wash) 1X y centrifugaron a 1150 rpm, desechando el sobrenadante.

Se adicionaron 100 µl de solución fijadora (cytoperm plus), para una re-fijación, se incubaron durante 10 minutos en hielo. Se lavaron con 1ml de solución de lavado (perm/wash) 1X y se centrifugaron a 1150 rpm, desechando el sobrenadante. Para otra fijación se adicionaron 100 µl de solución fijadora (cytofix/cytoperm), se incubaron durante 5 minutos en hielo. Se lavaron con 1ml de solución de lavado (perm/wash) 1X y se centrifugaron a 1150 rpm, desechando el sobrenadante.

Para el tratamiento con DNAsa, se adicionaron 100 μ l de DNAsa diluida (300 μ g/ml) por tubo y se incubaron durante una hora a 37 ° C. Se lavaron con 1ml de solución de lavado (perm/wash) 1X y se centrifugaron a 1150 rpm, desechando el sobrenadante. Se adicionaron 50 μ l de anti-BrdU, se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron con 1ml de solución de lavado (perm/wash) 1X y centrifugaron a 1150 rpm, desechando el sobrenadante.

Para determinar la cantidad relativa de ADN se adicionaron 20 μ l de 7-AAD, se incubaron durante 15 minutos en oscuridad. Finalmente se capturaron en el citómetro de flujo

8.10. Microscopía óptica

Se realizaron los ensayos de fusión en placas de 48 pozos. Se retiraron de la incubadora a las 24 horas de cocultivo. Depositando dos pozos en un portaobjetos. Se dejaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se fijaron con alcohol al 70%, para proceder a la tinción.

Unas células se tiñeron con Giemsa diluida al 5% y otras con Fucsina diluida al 5% durante 1 minuto. Se lavaron con agua bidestilada retirando el exceso de colorante, para proceder a la observación y la toma de las fotografías correspondientes.

8.11. Inhibición de la fusión celular con anti-CD4

Se adicionaron 8 μ l de anti-CD4 (1 μ g/ml) a los cocultivos, 30 minutos antes de realizar el ensayo de fusión, a células CD4⁺ pasados esos 30 minutos se adicionaron las células Env⁺ y se cocultivaron incubándose a 37 ° C en una atmósfera de 5% de CO₂. A las 9, 48 y 96 horas, según lo requiera el cocultivo se fue adicionando medio nuevo y también 8 μ l de anti-CD4 (1 μ g/ml).

Las células se cosecharon a los tiempos establecidos de cocultivo y se retiraron de los pozos con una punta de 1000 μ l, se colocaron en tubos para citometría de 5 ml (Falcon) y se lavaron una vez con 2ml de PBS 1X, se descartó el sobrenadante,

absorbiendo el exceso de PBS en papel y se resuspendieron en un volumen final de 500 μ l de PBS 1X y se capturaron en el citómetro de flujo.

9. RESULTADOS

9.1. Aspecto general de las células fusionadas en cocultivos de células Jurkat Env⁺ y CD4⁺

En cocultivos de células Jurkat Env⁺ y CD4⁺, la fusión celular se manifiesta con la formación de células gigantes multinucleadas (sincicios) los cuales son visibles al microscopio de luz. Las figuras 10-13 muestran el aspecto de los sincicios después de 24 horas de cocultivo, en los que se pueden apreciar células con un contenido variable de núcleos, rodeadas de células individuales. En un examen general se observó que el número de núcleos distinguibles dentro de los sincicios varió entre 2 y 13. Con frecuencia las células individuales se observaron adheridas a las células gigantes, o bien en proceso de fusión con las mismas como puede observarse en la figura 12. (Figuras 10, 11, 12, 13).

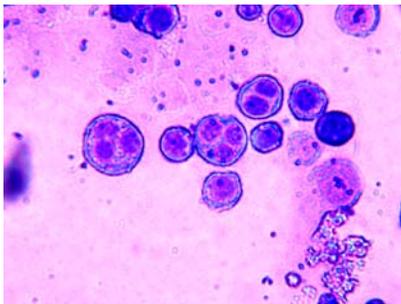


Figura 10. Sincicios de 2 y 3 núcleos tinción con Giemsa 40X

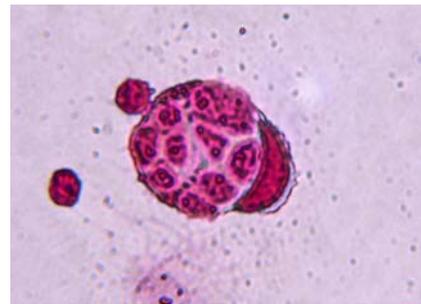


Figura 11. Sincicio con 9 núcleos y células circundantes no fusionadas, tinción con Fucsina 40X.

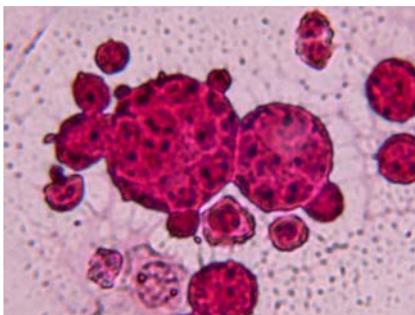


Figura 12. Sincicios fusionándose y células circundantes fusionándose y células individuales, tinción con Fucsina 40X.



Figura 13. Sincicio con 13 núcleos y célula individual, tinción con Giemsa 40X.

9.2. Determinación del porcentaje de fusión celular

Para el análisis cuantitativo de la fusión celular, las células Env⁺ y CD4⁺ se marcaron diferencialmente con colorantes lipofílicos fluorescentes DiO (fluorescencia verde) y Dil (fluorescencia roja), respectivamente. Las células se cocultivaron en proporción 1:1 en placas de 48 pozos durante 3 y 4 días y se analizaron por citometría de flujo. Por este medio, es posible evaluar el tamaño relativo (FSC-H), la granularidad (SSC-H) y las fluorescencias verde (FL1-H) y roja (FL2-H) de las poblaciones celulares, tanto en células fusionadas como no fusionadas circundantes.

La figura 14 muestra el análisis de fluorescencia de un cocultivo de 8 horas. Los sincicios corresponden a las partículas con fluorescencia mixta, mientras que las células individuales no fusionadas, poseen un solo color. El tamaño y granularidad de las células con fluorescencia mixta es mayor al de las células de un sólo color, como se muestra en la figura 15 (Figuras 14 y 15). La población con fluorescencia mixta no se genera en cocultivos de células CD4⁺ con células Env⁺ no fusogénicas (522), las cuales expresan las proteínas gp120/gp41 pero son incapaces de fusionarse (Figuras 16 y 17).

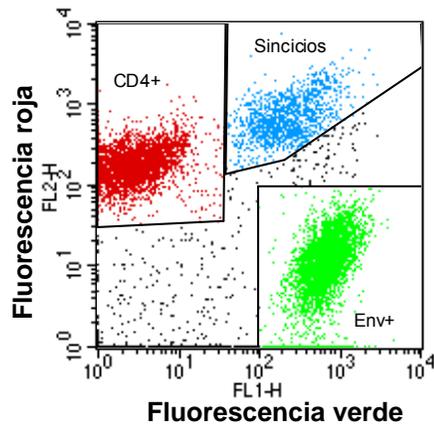


Figura 14. Análisis por citometría de flujo de cocultivos de células Env⁺ y CD4⁺ teñidas con DiI y DiO, respectivamente. En azul se muestran los sincios.

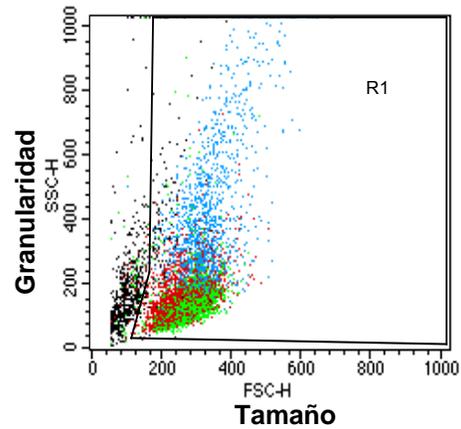


Figura 15. Distribución del tamaño y la granularidad de las poblaciones celulares mostradas en la figura 14.

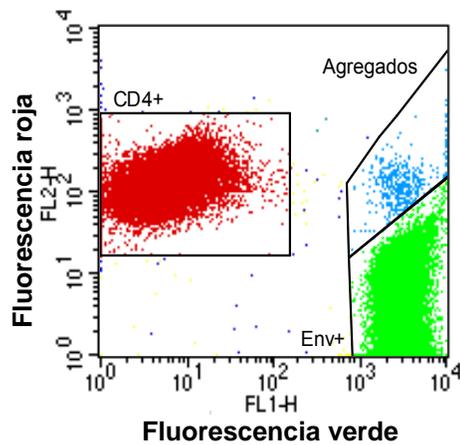


Figura 16. Análisis por citometría de flujo de cocultivos de células Env⁺ no fusogénicas (522) y CD4⁺ teñidas con DiO y DiI, respectivamente. En azul se muestran los sincios.

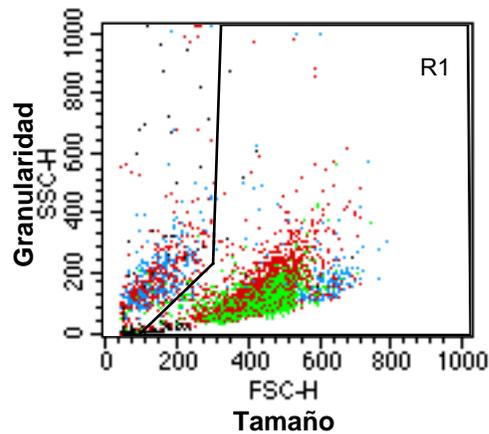


Figura 17. Distribución del tamaño y la granularidad de las poblaciones celulares mostradas en la figura 16.

Las gráficas de las figuras 14 y 16 son representativas de los resultados obtenidos en cocultivos de 8 horas, en los cuales se obtuvo un porcentaje de sincicios del 18 % y 2% respectivamente.

9.3. Determinación del número absoluto de células viables en experimentos de fusión celular

Para estudiar la dinámica celular durante varios días de cultivo, se cuantificó el número absoluto de células de cada población mediante un método basado en citometría de flujo de 4 colores: las células Env⁺ y CD4⁺ se marcaron con los colorantes fluorescentes vitales DiO (fluorescencia verde) y Dil (fluorescencia roja), respectivamente. Después del cocultivo, las poblaciones celulares se analizaron, identificando los sincicios generados y las células que permanecieron no fusionadas como partículas con fluorescencia mixta y de un solo color, como se mostró en la sección anterior. El número absoluto de células se determinó en base a un número fijo y conocido de perlas fluorescentes adicionadas a los tubos de citometría conteniendo la suspensión celular a analizar. Estas perlas se contabilizaron en el detector FL4. El número de células se obtiene multiplicando las células contabilizadas por un factor dado por el número de perlas capturas sobre el número de perlas totales adicionadas (estrategia experimental).

La determinación de eventos absolutos se efectuó excluyendo células no viables, las cuales se identificaron por su incorporación de yoduro de propidio, detectado en la fluorescencia FL-3. La densidad celular en cocultivos y en monocultivos control se mantuvo constante y se adicionó medio fresco regularmente a todos los pozos.

A continuación, se muestra las gráficas utilizadas para determinar el número absoluto de células viables en experimentos de fusión celular, así como en monocultivos control.

Las figuras 18 y 19 muestran la gráficas de fluorescencia de las células CD4⁺ control (en monocultivo) teñidas con Dil y su gráfica correspondiente de tamaño vs. granularidad (FSC-H vs. SSC-H). En la figura 20 se muestra la exclusión de células no viables (positivas para IP) para el mismo monocultivo. Las perlas fluorescentes se detectaron en FL-4 (Figura 21).

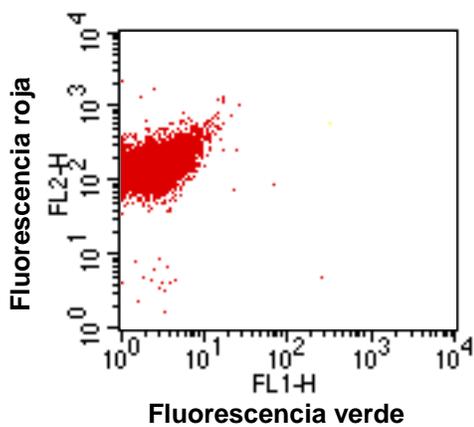


Figura 18. Células CD4⁺ detectadas en FL-2.

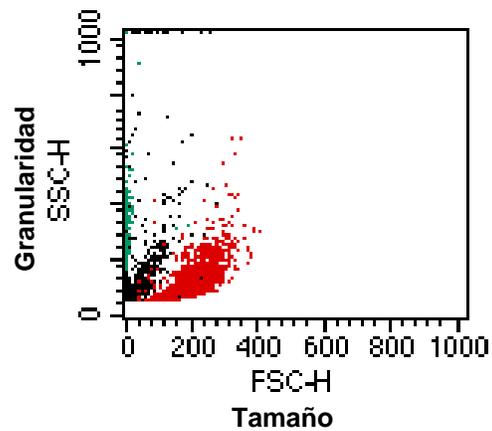


Figura 19. Tamaño vs. granularidad de células CD4⁺.

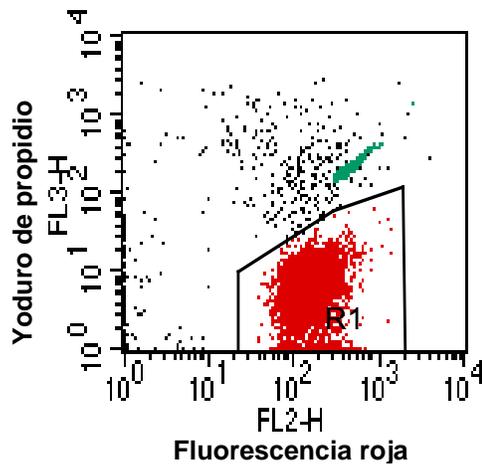


Figura 20. Exclusión de células CD4⁺ no viables.

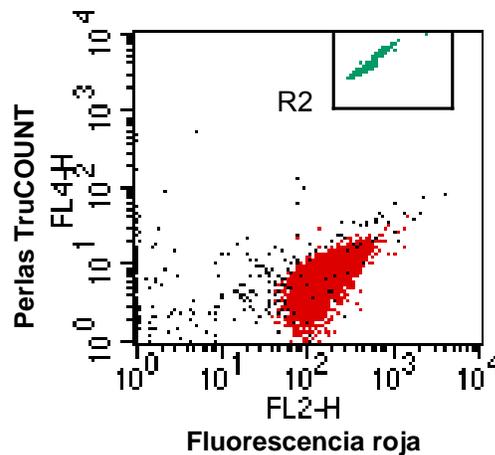


Figura 21. Selección de la región correspondiente a las perlas fluorescentes.

Las células Env⁺ control teñidas con DiO se muestran en las figuras 22 y 23, en las cuales se aprecia su fluorescencia y su perfil de tamaño vs. granularidad, respectivamente. En la figura 24 se muestra la exclusión de células no viables (positivas para IP) para el mismo cultivo. Las perlas fluorescentes se detectaron en FL-4 (Figura 25).

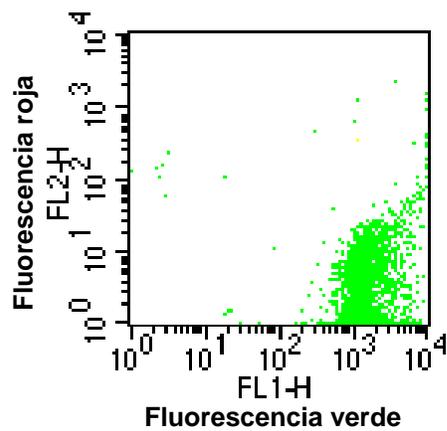


Figura 22. Gráfica de fluorescencia de las células Env⁺ control.

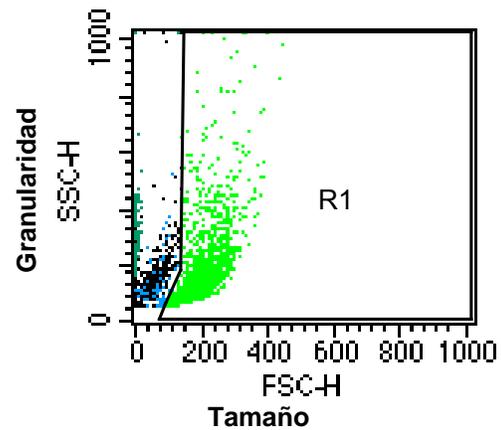


Figura 23. Gráfica de tamaño vs. granularidad de células Env⁺.

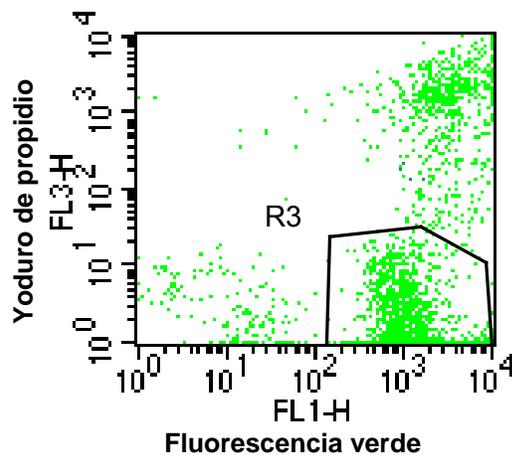


Figura 24. Exclusión de células Env⁺ no viables.

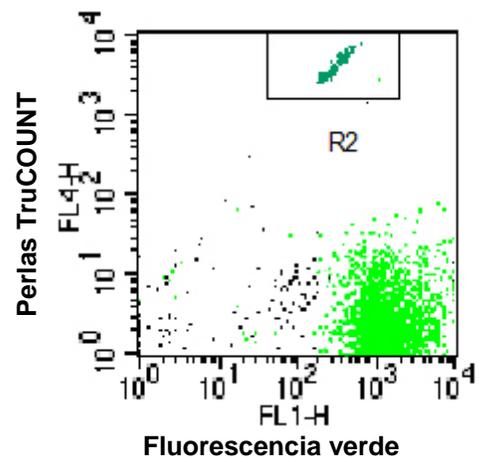


Figura 25. Determinación de la región de perlas fluorescentes en FL-4

A continuación se muestra el análisis de los cocultivos. En la gráfica de puntos en la cual aparecen tres poblaciones celulares: células CD4⁺ no fusionadas (rojas), células Env⁺ no fusionadas (verdes) y sincicios (doblemente fluorescentes, en azul). Las figura 26 muestran el patrón de fluorescencia y la figura 27 el de tamaño vs. granularidad.

En la figura 28 se muestra la discriminación de las células no viables por su incorporación de yoduro de propidio, cuya fluorescencia roja puede ser detectada en el canal FL3. La figura 30 muestra el aspecto de las gráficas utilizadas para determinar el porcentaje de células viables de cada población, una vez excluidas las células no viables (comparar con la fig. 26). La región utilizada para la cuantificación de las perlas fluorescentes se muestra en la figura 29.

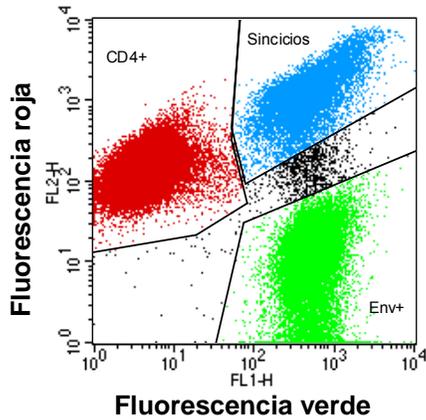


Figura 26. Gráfica de fluorescencia para los cocultivos, mostrando en diferentes colores las tres poblaciones celulares: CD4⁺ no fusionadas, Env⁺ no fusionadas y sincios.

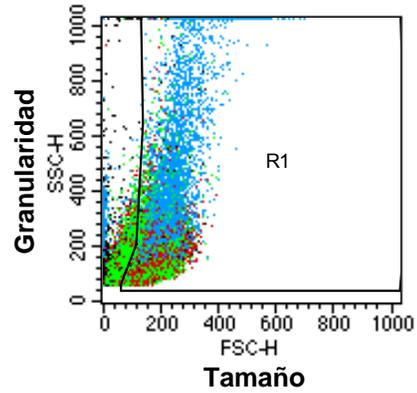


Figura 27. Gráfica de tamaño vs. granularidad del cocultivo mostrado en la figura 26.

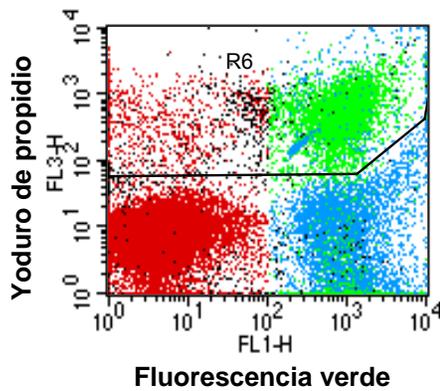


Figura 28. Gráfica en donde se muestra la exclusión de células CD4⁺ no fusionadas, Env⁺ no fusionadas y sincios no viables en FL1-FL3, mostrando la detección de células que incorporan yoduro de propidio.

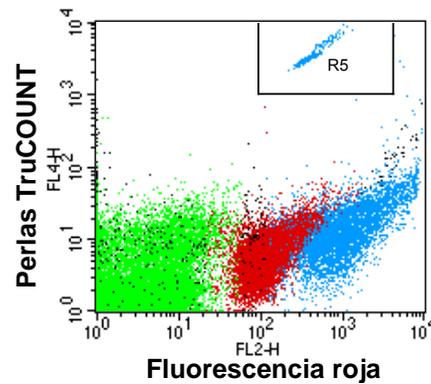


Figura 29. Cocultivo en FL2-FL4, mostrando la región correspondiente a las perlas fluorescentes.

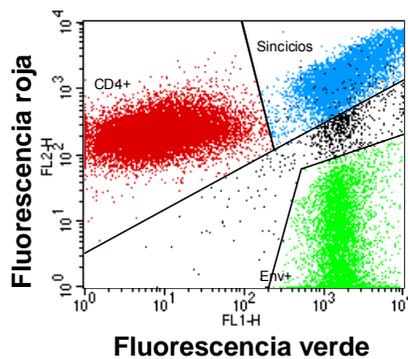


Figura 30. Cuantificación de las poblaciones celulares en cocultivos en donde se han excluido células no viables.

Se puede advertir que el ensayo de fusión celular es compatible con la cuantificación de eventos absolutos mediante el uso de perlas fluorescentes y con la exclusión de células no viables mediante el marcaje con yoduro de propidio.

Por conveniencia, cada tubo de perlas fluorescentes, conteniendo 49,723 perlas, se resuspendió en 1 ml de PBS; de esta suspensión se adicionaron 100 μ l (4,972 perlas) a los tubos conteniendo las células. Para el análisis por citometría de flujo se capturaron 500 perlas por muestra.

Es notable que los sincicios tienen una fluorescencia roja aproximadamente 3 veces mayor (en promedio) que las células rojas que permanecen no fusionadas (figura 14). Este efecto es debido a transferencia de energía de la fluorescencia (FRET) entre los colorantes DiI y DiO. Trabajo previo en el laboratorio mostró que la manifestación de FRET constituye una evidencia de la mezcla de los colorantes fluorescentes en las membranas de las células fusionadas. El FRET permite distinguir las células fusionadas de agregados celulares (38). En este trabajo, las poblaciones celulares consideradas como sincicios siempre manifestaron FRET.

9.4. Dinámica de las poblaciones celulares en experimentos de fusión de 3 y 4 días

Inicialmente se muestran los resultados de un primer experimento en donde se monitoreó simultáneamente el número absoluto de células en cultivos control y en cocultivo durante 3 días. En todos los casos, los puntos representan el promedio de determinaciones hechas por triplicado. Todos los cultivos se mantuvieron en medio especial para linfocitos, libre de suero AIM-V. En estos cocultivos el número inicial de células en los controles fue de 0.4×10^6 células en cada pozo y en los cocultivos se adicionaron 0.2×10^6 células de cada tipo celular. En estas condiciones se mantuvo la misma densidad celular en los cocultivos y en los monocultivos control.

La figura 31A muestra que las células $CD4^+$ control se duplicaron constantemente, mientras que las Env^+ no incrementaron su número e incluso disminuyeron paulatinamente, con una ligera recuperación después de las 50 horas.

La figura 31B muestra la dinámica de las poblaciones celulares fusionadas y no fusionadas en los cocultivos. La generación de sincicios se manifiesta en dos fases: una en las primeras horas, manteniéndose constante aproximadamente un día, y una segunda etapa que llega a un máximo a los 2 días. Después de esta segunda fase, el número de sincicios disminuye debido a muerte celular, como lo muestra el incremento de partículas doblemente fluorescentes que incorporan yoduro de propidio (Figura 32).

El crecimiento mostrado por las células $CD4^+$ en el cocultivo (Figura 31B), contrasta con el observado en el cultivo control. En el cocultivo, el número máximo de estas células alcanzó solamente la tercera parte del obtenido en el cultivo control. Por otro lado, las células Env^+ , al igual que su respectivo control, no mostraron cambios significativos en su número.

La figura 31C muestra la relación del número absoluto de células $CD4^+$ al tiempo i (T_i), con respecto a su número inicial (T_0) en el cultivo control, el cocultivo y el ajuste de las curvas. Se observa que mientras el número de las células $CD4^+$ control se incrementa más de 10 veces con respecto a su número original, en el cocultivo las células $CD4^+$ solamente alcanzan el triple de su número original.

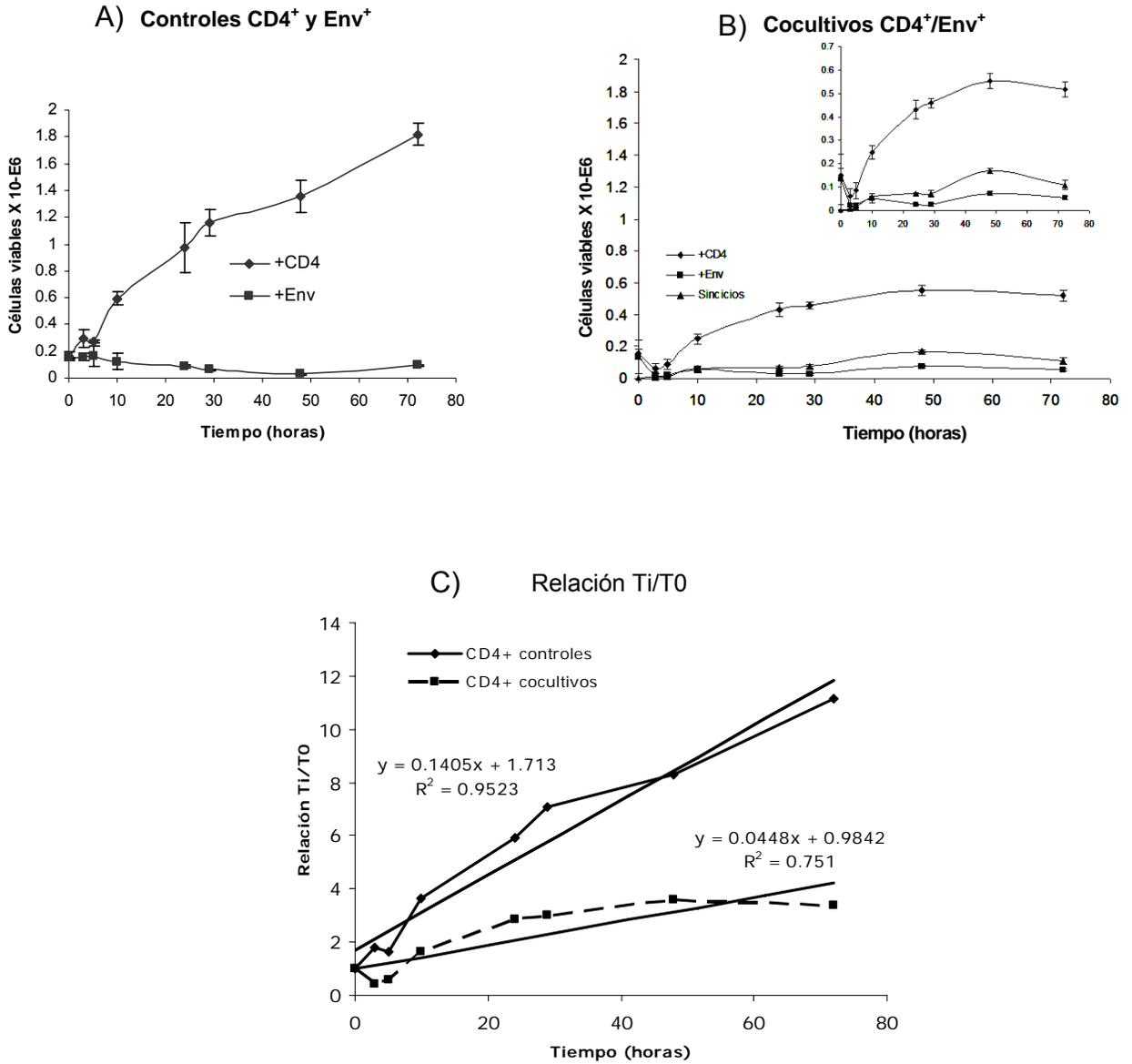


Figura 31. (A y B) Número absolutos de células viables en cultivos controles y cocultivos respectivamente. (C) Relación del número absoluto de células CD4⁺ al tiempo i (Ti), con respecto a su número inicial (T0) en cultivo control y en cocultivo (Ajuste de curva), donde la diferencia entre las dos líneas fue de 2.9.

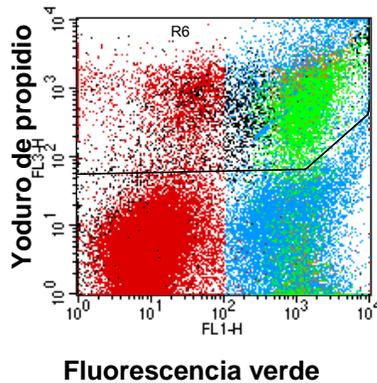


Figura 32. Cocultivo de 24 horas mostrando la detección de células fusionadas y no fusionadas que incorporan yoduro de propidio.

Los resultados de un segundo experimento, esta vez de 4 días de duración, se muestran en las Figuras 33A-D. Al igual que en el experimento anterior, el número inicial de células en los controles fue de 0.4×10^6 células en cada pozo y en los cocultivos se adicionaron 0.2×10^6 células de cada tipo celular, con el objeto de mantener la densidad celular constante.

En esta ocasión, las células $CD4^+$ control mostraron un crecimiento en 2 etapas: la inicial en las primeras 10 horas, seguida por una meseta, y un crecimiento rápido entre las 50 y 70 horas, seguida por una segunda meseta. Después de 4 días, el número de estas células fue de 4 veces el número inicial. Como se mostrará mas adelante, un patrón similar de proliferación de las células $CD4^+$ se reproducirá en los experimentos subsecuentes. El número de las células Env^+ control disminuyó durante las primeras horas, mostrando un ligero crecimiento después de 2 días de cultivo.

La figura 33B muestra la dinámica de las poblaciones celulares fusionadas y no fusionadas en los cocultivos. El número de sincicios formados fue aproximadamente el mismo que en el experimento anterior y ocurrió en una sola fase, alcanzando un porcentaje de fusión celular del 22.7% a las 24 horas (Figura 33D). Posteriormente el número de sincicios decae ligeramente, manteniéndose constante durante 4 días. El

crecimiento de las células CD4⁺ en el cocultivo se dio en dos fases, aunque, después de 4 días, su número se triplicó con respecto al número inicial.

La figura 33C muestra la relación del número absoluto de células CD4⁺ al tiempo i (T_i), con respecto a su número inicial (T_0) en el cultivo control, el cocultivo y el ajuste de las curvas, en donde se observa la diferencia entre el crecimiento de las células CD4⁺ en los cocultivos con respecto al cultivo control. La figura 33D muestra el porcentaje de cada tipo celular, donde puede notarse que el mayor porcentaje de fusión (22.7%) se obtuvo a las 2 horas de iniciado el cocultivo.

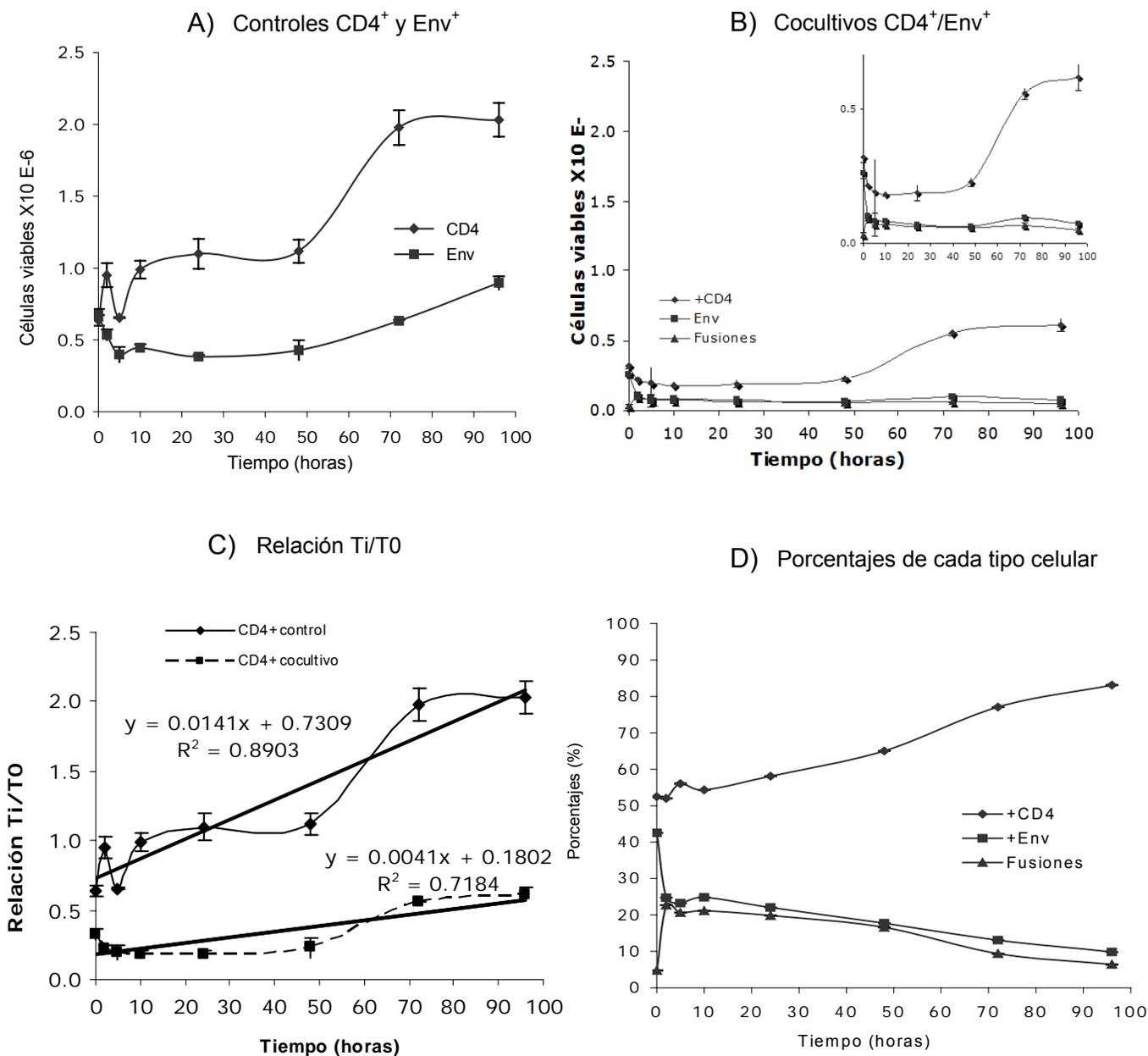


Figura 33. (A y B) Número absoluto de células viables en cultivos controles y cocultivos respectivamente. (C) Relación del número absoluto de células CD4⁺ al tiempo i (Ti), con respecto a su número inicial (T0) en cultivo control y en cocultivo. (D) Porcentaje de cada tipo celular en el cocultivo. (Ajuste de líneas). La diferencia entre las velocidades de replicación de células CD4⁺ con respecto a las células CD4⁺ no fusionadas fue de 3.4.

En los dos experimentos mostrados, la densidad celular en los cultivos control y en los cocultivos se mantuvo constante. Sin embargo, dado que las células Env⁺ no tienen capacidad proliferativa, se consideró que el escaso crecimiento de las células CD4⁺ en los cocultivos podría deberse en parte a la menor densidad de células con capacidad proliferativa. Se decidió por lo tanto efectuar experimentos en los que el número inicial de células CD4⁺ fuera igual en los pozos control y los cocultivos (4 X 10⁶ células/pozo).

En las figuras 34 a 35 se muestran los resultados de 2 experimentos efectuados en estas condiciones. En ambos se observa que la proliferación de las células CD4⁺ control se produjo en dos fases y su crecimiento fue mayor que el de las células CD4⁺ no fusionadas, como sucedió en experimentos anteriores. Por otra parte, en el cultivo control y en el cocultivo las células Env⁺ mostraron un leve o nulo incremento en su número, respectivamente.

El número de sincicios obtenido en el experimento mostrado en la figura 34B, fue mayor que en experimentos previos (21% a las 2 horas de cocultivo y 35% a los 4 días) (Figuras 34B y D), probablemente debido a la mayor cantidad de células Env⁺ y CD4⁺ colocadas en el cocultivo.

Es preciso notar que en el experimento mostrado en la figura 35A a D, la cantidad de células Env⁺ colocadas en el cocultivo fue mucho menor al requerido. A pesar de este error, se obtuvo un máximo de 16% de formación de sincicios.

En ambos experimentos las células CD4⁺ en cocultivo mostraron un nivel de proliferación por debajo del de las células CD4⁺ control (Figuras 34C y 35C). La tasa de disminución del crecimiento de las células CD4 varió entre 2.4 y 4.0 en los distintos experimentos.

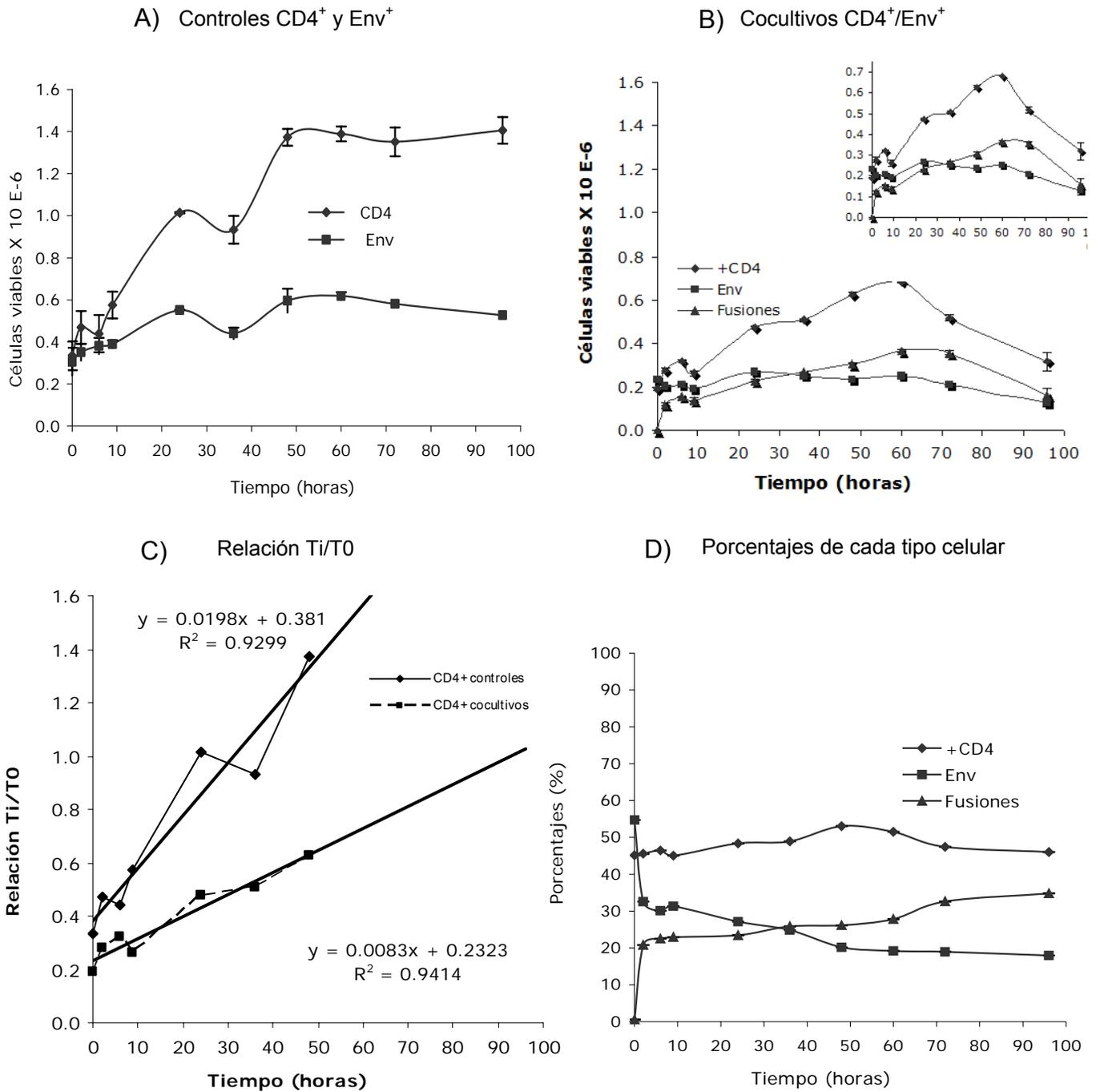


Figura 34. (A y B) Número absoluto de células viables en cultivos controles y cocultivos respectivamente. (C) Relación del número absoluto de células CD4⁺ al tiempo i (Ti), con respecto a su número inicial (T0) en cultivo control y en cocultivo. (D) Porcentaje de cada tipo celular en el cocultivo. (Ajuste de curva), donde la diferencia entre las dos líneas fue de 2.4.

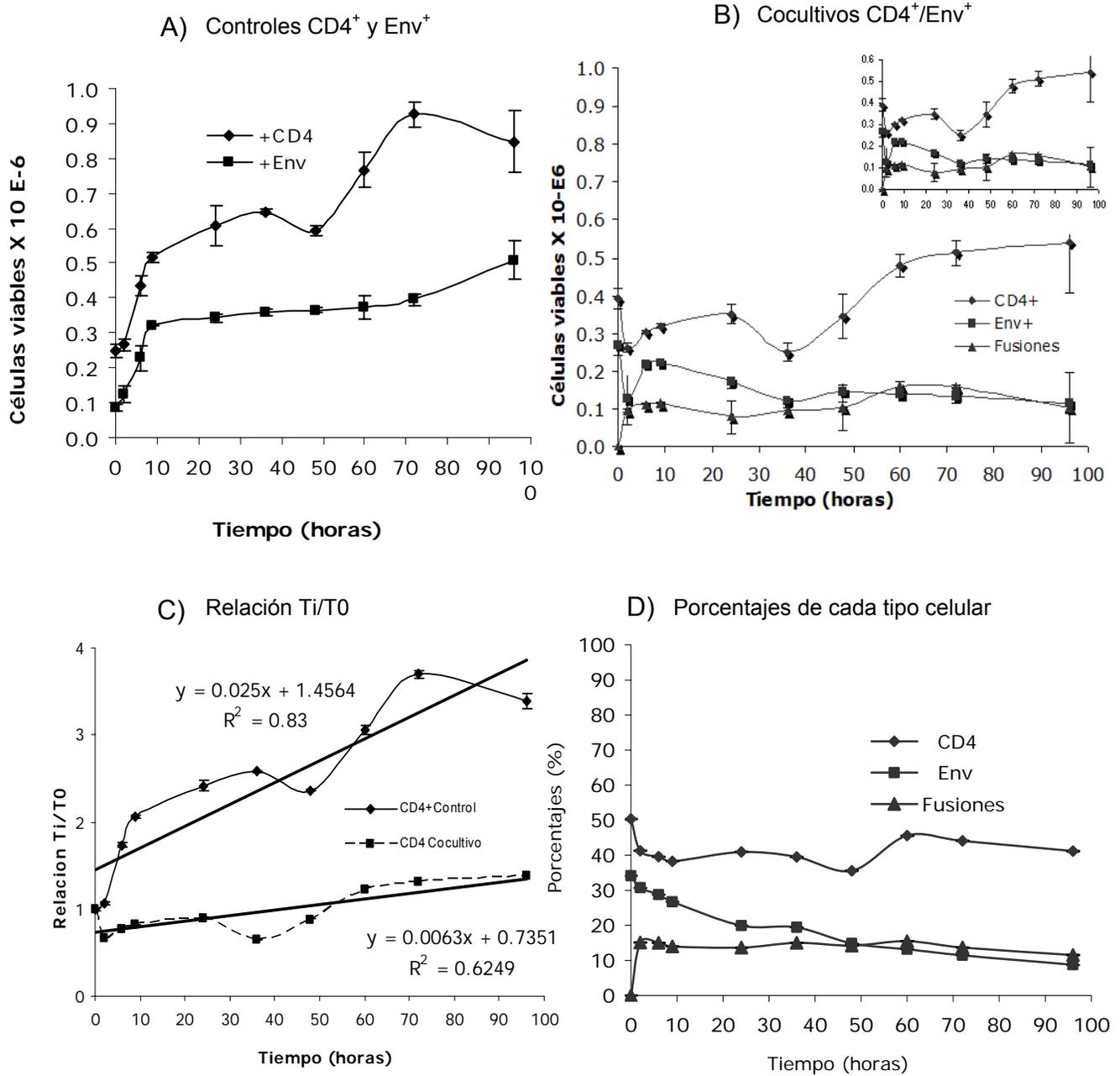


Figura 35. (A y B) Número absoluto de células viables en cultivos controles y cocultivos respectivamente. (C) Relación del número absoluto de células CD4⁺ al tiempo i (Ti), con respecto a su número inicial (T0) en cultivo control y en cocultivo. (D) Porcentaje de cada tipo celular en el cocultivo. (Ajuste de curva), donde la diferencia entre las dos líneas fue de 4.

9.5. Viabilidad de las poblaciones celulares en cultivos de tiempos largos

En las secciones anteriores, las gráficas de la cinética de las poblaciones celulares en los cultivos corresponden a los números absolutos de células viables, determinadas por su exclusión de yoduro de propidio.

A continuación se muestra el porcentaje que representan las células viables con respecto al total de las células (viables + no viables). Este parámetro se obtuvo considerando el número de células que excluyeron yoduro de propidio con respecto a todas las partículas, con excepción de los restos celulares (Figura 27). Los cambios en el porcentaje de viabilidad ilustran la evolución de la integridad celular en el tiempo.

El análisis se aplicó a los últimos dos experimentos mostrados en la sección anterior.

En la figura 36A y 37A se muestra que las células CD4⁺ control mantienen una viabilidad cercana a la inicial del 90 % aun después de 4 días de cocultivo. Las células Env⁺ control decaen de 90% a 80% (10%) de viabilidad después de 4 días.

En los cocultivos, las células CD4⁺ no fusionadas mantienen una viabilidad cercana a la original un 90% hasta los 4 días. Las células Env⁺ no fusionadas presentan un ligero decaimiento en la viabilidad del 90% al 80 % hasta los 4 días. Los sincicios son 90% viables durante las primeras 24 horas, pasado este tiempo experimentan una pequeña disminución en su viabilidad hasta el 75% durante los 4 días, esta viabilidad de las poblaciones celulares se observa en los dos experimentos analizados

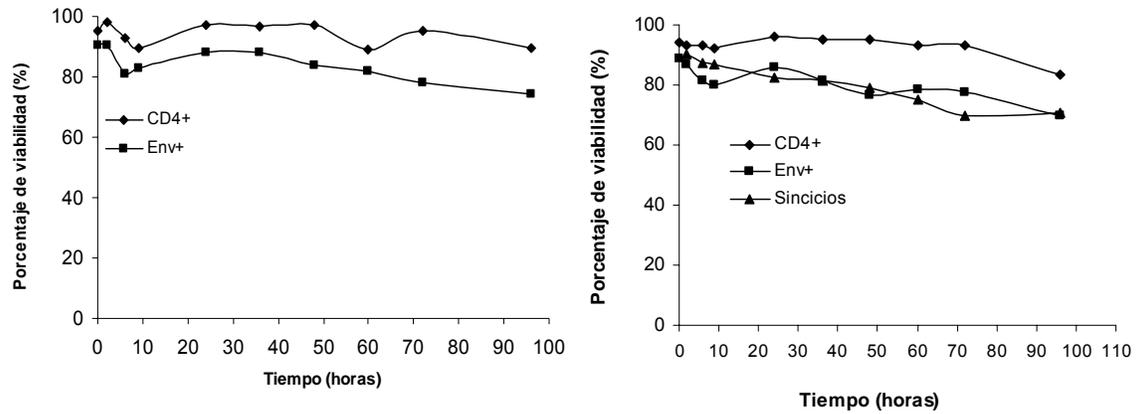


Figura 36. Viabilidad celular. A) Células CD4⁺ y Env⁺ controles. B) Células CD4⁺ no fusionadas, Env⁺ no fusionadas y sincicios.

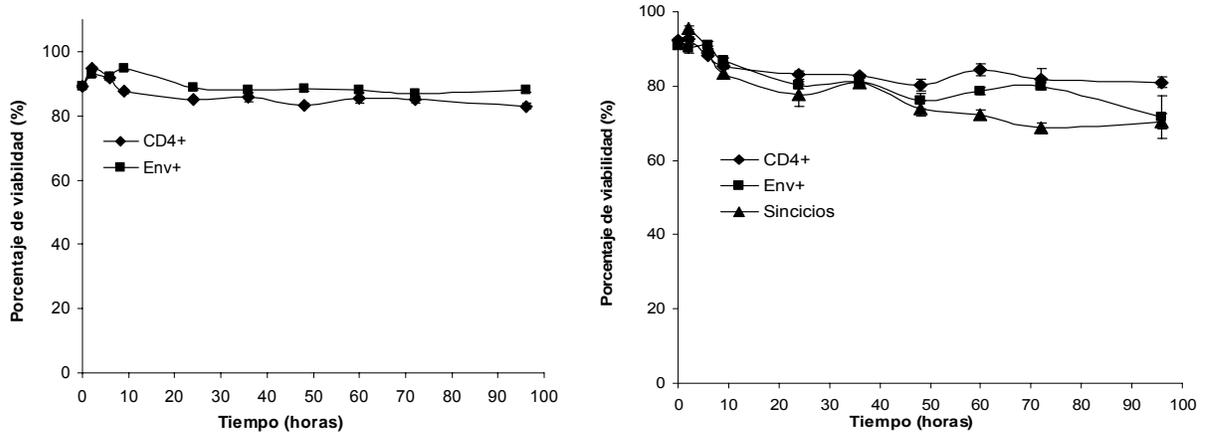


Figura 37. Viabilidad celular. A) Células CD4⁺ y Env⁺ controles. B) Células CD4⁺ no fusionadas, Env⁺ no fusionadas y sincicios.

9.6. Análisis del tamaño y la granularidad de las poblaciones en experimentos de fusión celular.

Para evaluar el tamaño y la granularidad de los sincicios, se crearon los histogramas correspondientes a tamaño y granularidad donde se sobreponen los histogramas de las células control (CD4⁺ y Env⁺), sobre el histograma de los sincicios. Para determinar el tamaño y la granularidad con respecto a las células control, como puede observarse en las figuras 38 y 40.

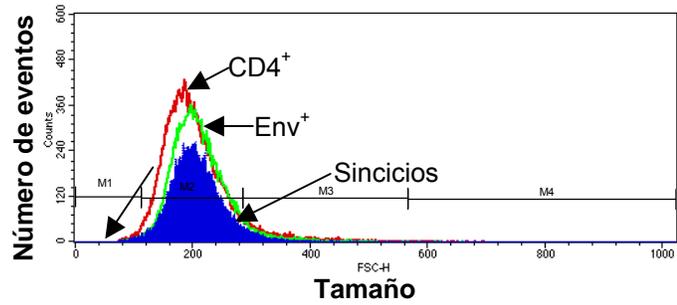


Figura 38. Histogramas de células CD4⁺/Env⁺ cocultivadas, durante 4 días. Tamaño de los sincicios (FSC-H) en relación a los de las células control. Se muestran 4 rangos de tamaño (M1-M4).

El análisis del tamaño de los sincicios, en periodos largos de cocultivo se muestra en la figura 39. Estos resultados son representativos de 3 experimentos reportados anteriormente.

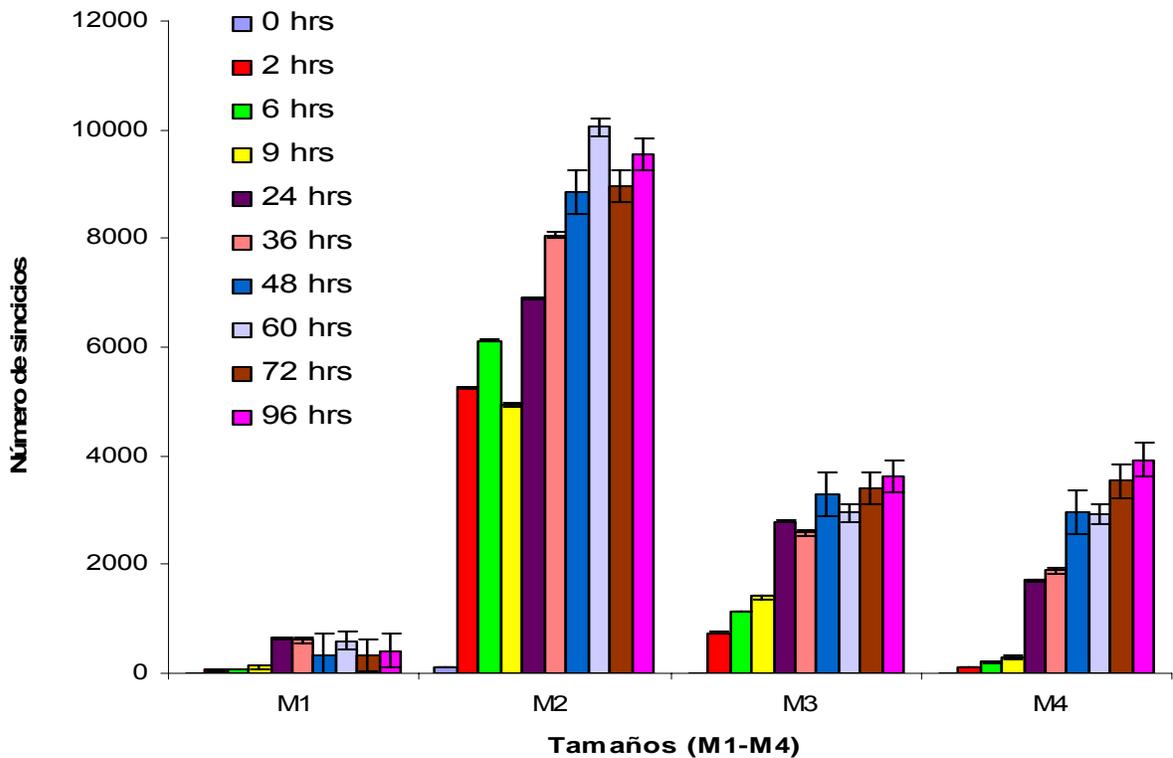


Figura 39. Análisis del tamaño de los sincicios en cocultivos de tiempo largo. Se muestra el número de sincicios, que tuvieron tamaños dentro de los rangos mostrados en la figura 38.

Se puede observar que aproximadamente el 60% de los sincicios son pequeños y se encuentran en el rango de las células control (Figura 39).

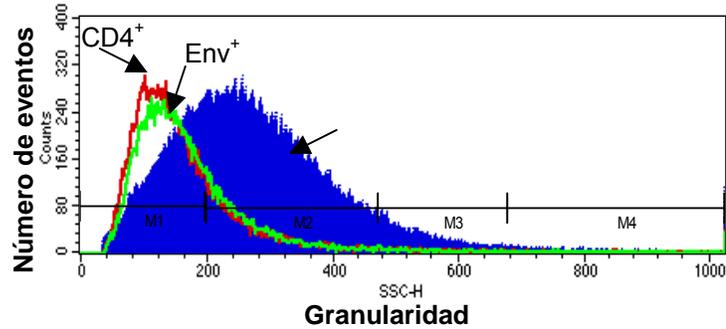


Figura 40. Histogramas de células $CD4^+/Env^+$ cocultivadas, durante 4 días. Granularidad de los sincicios (SSC-H) en relación a los de las células control. Se muestran 4 rangos de tamaño (M1-M4).

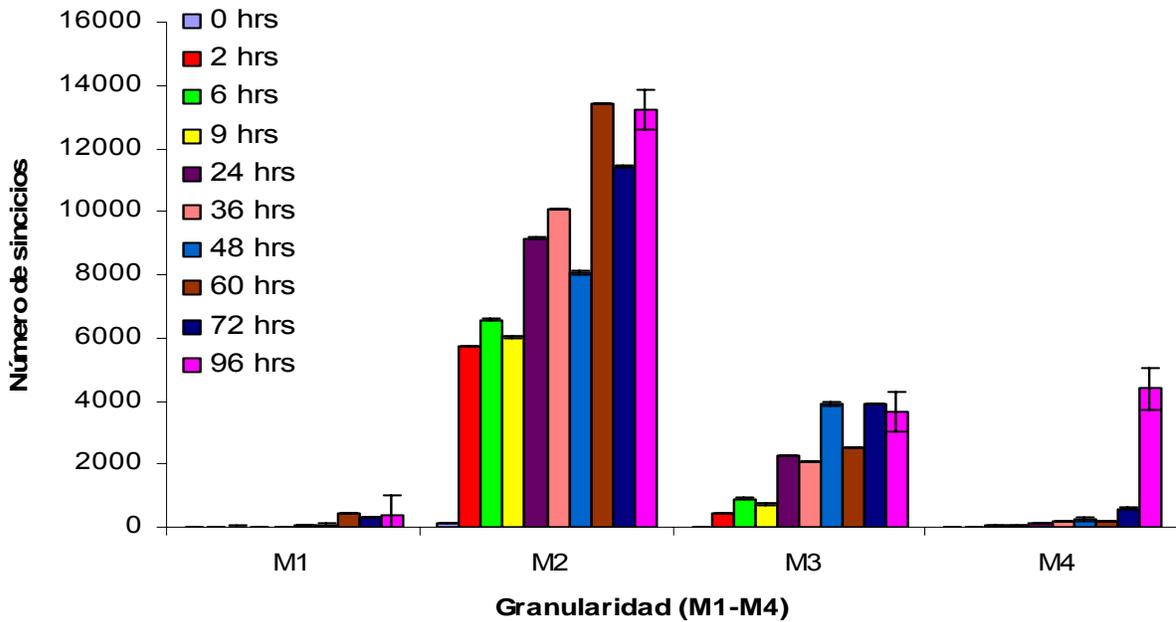


Figura 41. Análisis de granularidad de los sincicios en cocultivos de tiempo largo. Se muestra el número de sincicios, que tuvieron tamaños dentro de los rangos mostrado en la figura 40.

En contraste con el tamaño, la granularidad de la mayoría los sincicios, alrededor del 60% es mucho mayor, con respecto a las células control (Figura 41).

9.7. Inhibición de la fusión celular con anti-CD4

Para mostrar que las partículas doblemente fluorescentes detectadas después de varios días de cultivo corresponden efectivamente a sincicios, se determinó el efecto de un anticuerpo anti-CD4 con conocida capacidad inhibitoria de la fusión celular mediada por las proteínas de la membrana del VIH *in vitro*. Las células CD4⁺ se incubaron con el anticuerpo a una concentración de 1 μg/ml durante 30 minutos antes de establecer el cocultivo. Durante los días siguientes se adicionaron nuevas cantidades del anticuerpo, manteniéndose a la misma concentración (1 μg/ml).

En cocultivos de tiempos largos se realizó la inhibición de la fusión celular con anti-CD4 adicionando 8 μl (1 μg/ml) del anticuerpo a las 0, 9, 48 y 96 horas de cocultivo, obteniendo una inhibición de la fusión celular del 91% a las 9 y 48 horas y una inhibición celular del 81% a las 96 horas (Figura 42).

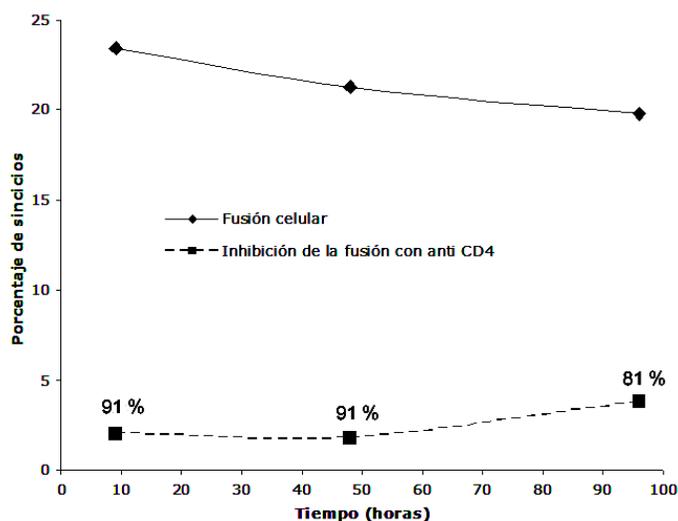


Figura 42. Inhibición de la formación de sincicios con un anticuerpo anti-CD4.

9.8. Estudios preliminares del ciclo celular durante la formación de sincicios

Para determinar el efecto de la fusión sobre la proliferación de las poblaciones celulares, se determinó la capacidad de incorporación de un análogo de la timina, la bromodeoxiuridina (BrdU), junto con la incorporación de 7-amino-actinomicina D (7-AAD) como indicador de la cantidad relativa de ADN. En estos experimentos se dio un pulso de BrdU de 40 minutos a 37° C, previo a la cosecha de las células para su análisis por citometría de flujo.

Las figuras 43 y 44 muestran los resultados para los cultivos control de células CD4⁺ y Env⁺. Puede observarse que las células CD4⁺ muestran un patrón característico de una línea celular en crecimiento: 36.4% en fase G1/G0, 35.2% en fase S y 14.6% en fase G2/M.

En contraste, las células Env⁺ no incorporan BrdU y muestran 63.3% de células en fase en G1/G0, 1.6% en fase S y 27.9% en G2/M. Estos datos indican un arresto del ciclo celular en la fase G1/G0.

También se manifiesta que alrededor del 6.1% de las células CD4⁺ controles y 2.4% de las células Env⁺ controles tienen un contenido de ADN mayor a 4n (regiones R6 + R7). Esta población puede consistir de agregados celulares o bien de células poliploides, las cuales son comunes en líneas celulares.

Controles

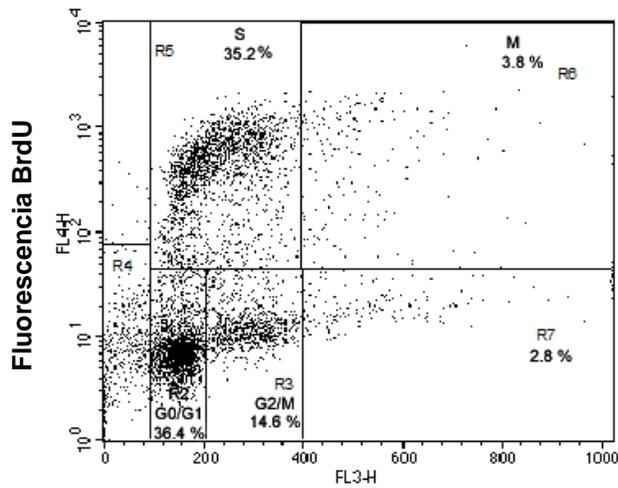


Figura 43. Ciclo celular. Células CD4⁺

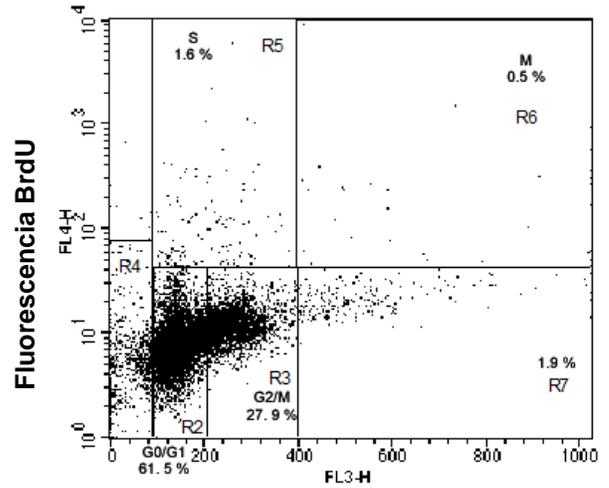


Figura 44. Ciclo celular. Células Env⁺

Cocultivo

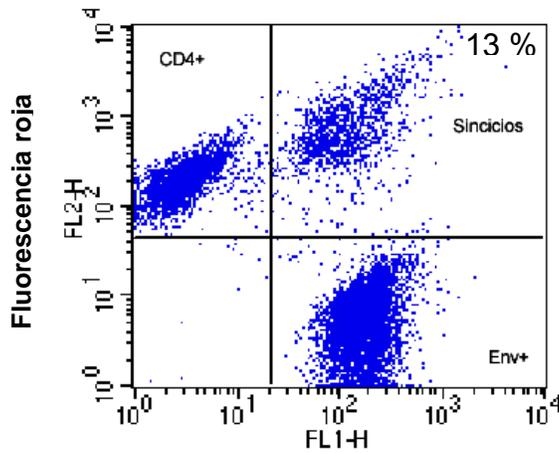


Figura 45. Cocultivo de 6 horas analizado en la figura 46.

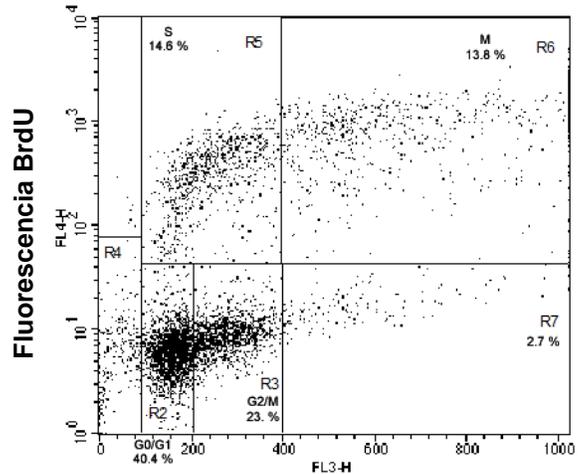


Figura 46. Ciclo celular. Cocultivo de 6 horas.

La figura 46 muestra la incorporación de BrdU y 7-AAD en las células del cocultivo de 6 horas mostrado en la figura 45. Los colorantes DiO y Dil no son retenidos por las células después de los procesos de fijación y permeabilización requeridos para la determinación de BrdU y 7-AAD. Por esta razón se muestra la

incorporación de BrdU y 7-AAD en las tres poblaciones celulares en conjunto (fusionadas y no fusionadas). La observación de estas gráficas indica que:

- El porcentaje de células cuyo contenido de ADN es mayor a $4n$ es mayor en el cocultivo (16.5%) (regiones R6 + R7), que en los cultivos control (6.1 y 2.4% para las células $CD4^+$ y Env^+ , respectivamente). Se deduce aproximadamente el 12% de las células poliploides en el cocultivo son sincicios.
- De las células en el cocultivo, 28.4% se encuentran en fase S y M (regiones R5 + R6 de la figura 46).
- Aproximadamente la mitad de las células en fase S son sincicios (región R6 de la figura 46)
- La mayor parte de los sincicios muestra replicación de ADN (región R6).
- La replicación de ADN en los sincicios es una actividad proveniente de las células $CD4^+$ fusionadas, ya que las células Env^+ no tienen esta actividad.
- Lo anterior indica la incorporación en los sincicios de células en replicación, o bien la replicación misma de los sincicios.

10. DISCUSIÓN

La determinación de las consecuencias de la fusión celular sobre la dinámica poblacional de los cocultivos, es un índice de la magnitud potencial del efecto de la fusión celular mediada por las proteínas de la envoltura del VIH-1 sobre la función inmunológica.

En el presente trabajo se evaluó la dinámica de la fusión celular durante 3 y 4 días, monitoreando el porcentaje de fusión celular, el número absoluto de las células fusionadas y no fusionadas y su viabilidad. Se realizó también un análisis preliminar del efecto del cocultivo sobre el ciclo celular.

10.1. Aspecto de los cocultivos de células Jurkat Env⁺ y CD4⁺

Las imágenes de microscopía de luz son una ilustración del fenómeno estudiado en esta tesis. Se muestra claramente la formación de sincicios, los cuales presentan un número variable de núcleos (2 a 13). La correspondencia entre el número de sincicios observado por microscopía y el cuantificado por citometría de flujo se ha estudiado previamente en el laboratorio. En esos estudios, se observó una correspondencia excelente entre ambos métodos en cuanto al número de células fusionadas y no fusionadas, y se describió la distribución del número de núcleos en los sincicios (51).

Además de la heterogeneidad de los sincicios, se observan células individuales libres y adheridas a los sincicios, así como células en proceso de fusionarse. También se observó fusión entre sincicios. Por lo tanto, la formación de sincicios *in vitro* incluye una variedad de procesos ocurriendo simultáneamente en el microambiente de las células que expresan las proteínas de la envoltura del VIH.

Este trabajo constituye un primer acercamiento al estudio de las consecuencias de la fusión, estudiando la dinámica poblacional de las células.

10.2. Determinación de números absolutos de células viables en experimentos de fusión celular

Dado que el estudio de poblaciones celulares por citometría de flujo usualmente se realiza capturando un número fijo de partículas (10,000), los datos obtenidos representan la proporción que ocupan las diferentes poblaciones dentro del total de las células en la muestra. Cuando se busca evaluar la dinámica de las poblaciones celulares en tiempos largos de cultivo, es factible esperar un nivel significativo de proliferación y/o muerte celular. En este caso, el porcentaje de las poblaciones celulares es modificado por la proliferación o muerte de las células. Estos eventos pueden darse de manera diferencial para las distintas poblaciones, dificultando la evaluación objetiva de la dinámica de las poblaciones celulares en el tiempo. Este inconveniente es aplicable a los estudios de formación de sincicios y en general a cultivos en donde se estudian cambios en la proporción de distintas poblaciones celulares.

Para determinar adecuadamente la dinámica de las poblaciones celulares durante la formación de sincicios durante varios días de cocultivo, se estableció un ensayo de 4 fluorescencias para determinar el número absoluto de células viables de cada tipo celular. Además de los colorantes DiI y DiO, en el ensayo se utilizó un número fijo de perlas fluorescentes adicionadas a cada tubo previamente al análisis en el citómetro de flujo, y yoduro de propidio para la discriminación de células muertas. Esta técnica resultó muy conveniente dado que permitió la cuantificación de números absolutos de los sincicios y las células no fusionadas verdes y rojas con buena reproducibilidad entre triplicados, aún después de 3 y 4 días de cocultivo. El procedimiento también permitió la identificación confiable de las células muertas de cada tipo, permitiendo descartarlas del análisis (85).

10.3. Cinética de crecimiento de las células CD4⁺ y Env⁺ en monocultivos

Los resultados muestran una dinámica similar de las células CD4⁺ y Env⁺ en los 4 experimentos realizados.

En número de células CD4⁺ se incrementó a través del tiempo. El crecimiento de estas células mostró siempre dos fases de crecimiento logístico. Aunque el aporte de medio de cultivo fresco se mantuvo constante durante todo el cultivo, este patrón de crecimiento indica el agotamiento de algún factor soluble en el medio, requerido para la continuación del crecimiento. Cabe señalar aquí que el cultivo se llevó a cabo en un medio especial para linfocitos libre de suero (AIM-V). Sin embargo, el ciclo celular de las células CD4⁺, determinado a las 6 horas de cultivo en el medio AIM-V tuvo un patrón normal, propio de una línea celular en crecimiento. El tiempo de duplicación en la fase inicial fue de 8-11 horas.

En cambio, las células Env⁺ mostraron un crecimiento muy escaso, lo cual puede ser debido a muerte celular, a falta de proliferación, o a ambos procesos. Los resultados de los experimentos de incorporación de BrdU y 7-AAD, así como la determinación de la viabilidad de estas células, son indicativos de que la falta de crecimiento es debida al arresto del ciclo celular específicamente en la fase G1/G0, y en grado menor a la muerte celular, ya que la viabilidad no decayó significativamente durante el periodo estudiado.

Cao y colaboradores observaron que después de 9 días de inducción de la expresión de Env en las células Jurkat HXBc2 (las mismas utilizadas aquí), las células mueren por necrosis, indicada por el hinchamiento mitocondrial con pérdida de crestas mitocondriales (5). Las causas de este efecto no han sido esclarecidas. Los autores propusieron que la expresión de las proteínas virales en el aparato de Golgi induciría eventos de fusión intracelular debido a la interacción de gp120/gp41 con CD4, generando poros en vesículas de Golgi. Estas vesículas se integrarían posteriormente a la membrana celular durante la exocitosis. La acumulación de daños subletales en la

membrana citoplásmica sobrepasaría eventualmente la capacidad de reparación de las células, causando su muerte (5).

Nuestras observaciones indican que el arresto del ciclo celular en las células Env⁺ es un evento previo a la necrosis. Una búsqueda bibliográfica mostró que a la fecha no existen reportes sobre el arresto del ciclo celular asociado a la expresión de las proteínas gp120/gp41 del VIH. En cambio, numerosos autores reportan que otra proteína viral (Vpr) tiene capacidad de arrestar el ciclo celular en la fase G2 (41).

Resultados recientes del laboratorio, muestran que la expresión de Env en las células 522F/Y (las cuales expresan una proteína mutante incapaz de inducir fusión), no evita la proliferación de estas células. Por lo tanto, la falta de proliferación, y probablemente el arresto del ciclo celular, se asocian a la actividad fusogénica de las proteínas virales. Estudios futuros podrían abordar el estudio de los procesos bioquímicos subyacentes en este efecto, así como sus consecuencias sobre la fisiología de las células linfocitarias y la infección por el VIH.

10.4. Cinética de las poblaciones celulares durante la formación de sincicios

Las partículas con fluorescencia mixta detectadas a lo largo de 4 días de cocultivo son efectivamente sincicios ya que: 1) poseen fluorescencia mixta, 2) su tamaño y granularidad es mayor con respecto a las células individuales, 3) su formación es inhibida por un anticuerpo anti-CD4, y 4) muestran transferencia de energía de la fluorescencia (FRET), manifestada por el aumento de la intensidad de fluorescencia roja con respecto a las células no fusionadas. Estas observaciones indican que es perfectamente asequible el estudio de la fusión celular durante varios días de cocultivo, mediante la metodología aquí utilizada.

La generación de sincicios es rápida y su número se mantuvo relativamente constante durante 4 días de cultivo, con una viabilidad de aproximadamente 75%. Dada esta observación es factible esperar que los sincicios puedan permanecer viables

durante periodos aún más largos. Durante este tiempo es probable que ejerzan actividades biológicas con efecto sobre las células y tejidos circundantes. Puesto que el criterio de viabilidad utilizado (exclusión de yoduro de propidio) solamente es indicativo de la integridad de la membrana celular, son necesarios estudios de actividad biológica para evaluar efectos específicos sobre la función de otras células.

La proliferación de las células CD4⁺ disminuye fuertemente cuando se cocultivan con las células Env⁺, no así su viabilidad. Se deduce que su disminución no se atribuye principalmente a muerte celular, sino a su incorporación en los sincicios y/o a una disminución de su capacidad proliferativa.

10.5. Estudios preliminares de ciclo celular durante la formación de sincicios

Los resultados del experimento de incorporación de BrdU y 7-AAD en las células cocultivadas, son compatibles con la interpretación de la mayor parte de los sincicios formados reclutaron células CD4⁺ que se encuentran en la fase S del ciclo celular. El reclutamiento de células en proceso de duplicación amplifica entonces el efecto negativo de la fusión celular sobre el número de células CD4⁺ circundantes. Ambos procesos (fusión e inhibición concomitante de la duplicación celular) producen como efecto neto una depleción drástica del número absoluto de células CD4⁺ en la vecindad de los sincicios. En un posible entorno *in vivo* es factible proponer que este efecto pueda relacionarse a la disminución de células CD4⁺ en el microambiente de tejidos en donde tuviera lugar la formación de sincicios, afectando la respuesta inmune local.

Otra causa posible de la disminución de células CD4⁺ es la inhibición de la proliferación por factores solubles liberados en el cocultivo. Este efecto podría analizarse determinando el efecto sobre la proliferación de las células CD4⁺, de medio condicionado obtenido del cocultivo.

11. CONCLUSIONES

- Los sincicios se generan rápidamente en los cocultivos y su número se mantiene aproximadamente constante durante 4 días. Durante este tiempo muestran una viabilidad no menor al 75%.
- La proliferación de las células CD4⁺ disminuye dramáticamente cuando se cocultivan con las células Env⁺. Puesto que la viabilidad de las células CD4⁺ no decae significativamente durante el cocultivo, su disminución no se atribuye a muerte celular, sino a su incorporación en los sincicios y/o a una disminución de su capacidad proliferativa.
- Los resultados del experimento de incorporación de BrdU y 7-AAD en las células cocultivadas, son compatibles con la interpretación de que una alta proporción de los sincicios reclutaron células CD4⁺ que se encuentran en la fase S del ciclo celular.
- Las células Env⁺ tienen nula capacidad proliferativa tanto en monocultivos como en cocultivo con las células CD4⁺. Los experimentos de incorporación de BrdU y 7-AAD indican que la expresión de Env induce un arresto en la fase G1/G0.
- Por lo tanto, la disminución dramática del número de células CD4⁺ en los cocultivos se relaciona a su incorporación en los sincicios y al reclutamiento de células que se encuentran en proceso de replicación.
- La cuantificación de las poblaciones celulares mediante el ensayo de 4 colores permite el estudio objetivo de la dinámica de la fusión celular durante periodos largos de cultivo.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas AK, Lichtman A y Pover JS. **2001**. Inmunología Celular y Molecular, Edición 4^a. Editorial McGraw-Hill Interamericana. México, D. F.
2. Aichelburg AC, Pett SL, and Cooper DA. **2002**. AIDS as world health problem. Encyclopedia of Life Sciences 1-7.
3. Amendola A, Gougeon M-L, Poccia F, Bondurand A, Fesus L and Placentini M. **1996**. Induction of “tissue” transglutaminase in HIV pathogenesis: Evidence for high rate apoptosis of CD4⁺ T lymphocytes and accessory cells in lymphoid tissues. Proceeding of the National Academy of Science USA 93:11057-11062.
4. Blaak H, van't Wout AB, Brouwer M, Hooibrink B, Hovenkamp E. and Schuitemaker H. **2000**. *In vivo* HIV-1 infection of CD45RA⁺CD4⁺ T cells is established primarily by syncytium-inducing variants and correlates with rate of CD4⁺ T cell decline. Proceeding of the National Academy of Science USA 97(3):1269-1274.
5. Cao J, Park I-W, Cooper A and Sodroski J. **1996**. Molecular determinants of acute single-cell lysis by Human Immunodeficiency Virus type 1. Journal of Virology 70(3):1340-1354.
6. Center for Diseases Control., **1981** Kaposi's Sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men. New York and California. Morbid, Mortal, Weekly Rep.30:305-308.
7. Chan DC and Kim PS. **1998**. HIV entry and its inhibition. Cell 93:681-684.
8. Chen EH and Olson EN. **2005**. Unveiling the mechanisms of cell-cell fusion. Science 308:369-373.
9. Chen EH, Grote E, Mohler W and Vignery A. **2007**. Cell-cell fusion. Federation of European Biochemical Societies 581:2181-2193.
10. Crowe SM, Mills J, Elbeik T, Lifson JD, Kosek J, Marshall JA, Engleman EG and McGrath MS. **1992**. Human immunodeficiency virus-infected monocyte-derived macrophages express surface gp120 and fuse with CD4 lymphoid cells *in vitro*: a possible mechanism of T lymphocyte depletion *in vivo*. Clinical Immunology and Immunopathology 65(2):143-151.

11. Cullen BR. **1992**. Mechanism of action of regulatory proteins encoded by complex retroviruses. *Microbiological Reviews* 56(3):375-394.
12. D'Souza MP, Cairns JS. and Plaeger SF. **2000**. Current evidence and future directions for targeting HIV entry: therapeutic and prophylactic strategies. *Journal of the American Medical Association* 284(2):215-222.
13. Dargent J-L, Lespagnard L, Kornreich A, Hermans P, Clumeck N and Verhest A. **2000**. HIV-associated multinucleated giant cells in lymphoid tissue of the Waldeyer's ring: a detailed study. *Modern Pathology* 13(12):1293-1299.
14. Derdeyn CA and Silvestri G. **2005**. Viral and host factors in the pathogenesis of HIV infection. *Current Opinion in Immunology* 17:366-373.
15. Dimitrov AS, Xiao X, Dimitroff DS and Blumenthal R. **2001**. Early intermediates in HIV-1 envelope glycoprotein-mediated fusion triggered by CD4 and co-receptor complexes. *The Journal Biological Chemistry* 276(32):30335-30341.
16. Doms RW. and Trono D. **2000**. The plasma membrane as a combat zone in the HIV battlefield. *Genes and Development* 14(21):2677-2688.
17. Doranz BJ, Baik SSW and Doms RW. **1999**. Use of a gp120 binding assay to dissect the requirements and kinetics of Human Immunodeficiency Virus fusion events. *Journal of Virology* 73(12):10346-10358.
18. Dore GJ and Cooper DA. **2001**. AIDS: clinical manifestations. *Encyclopedia of Life Science* 1-8.
19. Douek DC, Picker LJ and Koup RA. **2003**. T cell dynamics in HIV-1 infection. *Annual Review of Immunology* 21:265-304.
20. Duelli D and Lazebnik Y. **2003**. Cell fusion: A hidden enemy? *Cancer Cell* 3:445-448.
21. Eckert DM. and Kim PS. **2001**. Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. *Annual Review of Biochemistry* 70:777-810.
22. Eremin VF; Votjakov VI and Titov LP. **1998**. Some aspects of HIV infection. *Molecular Biology (Mosk)* 32(6):933-939.

23. Espona M, Ferrández O, Grau S y Carmona A. **2005**. Enfuvirtida: primer fármaco de una nueva familia de antirretrovirales. *Farmacia Hospitalaria* 29(6):375-388.
24. Estimación de CENSIDA con base en datos del Registro Nacional de casos de SIDA. **2005**. <http://www.salud.gob.mx/canasida/>.
25. Fackler OT and Peterlin BM. **2000**. Endocytic entry of HIV-1. *Current Biology* 10(16):1005-1008.
26. Fauci AS. **2003**. HIV and AIDS: 20 years of science. *Nature Medicine* 9(7):839-843.
27. Feng Y, Broder ChC, Kennedy PE and Berger EA. **1996**. HIV-1 entry cofactor: Functional cDNA cloning of seven-transmembrane, G-protein-coupled receptor. *Science* 272:872-877.
28. Finnegan CM, Berg W, Lewis GK. and DeVico AL. **2002**. Antigenic properties of the Human Immunodeficiency Virus transmembrane glycoprotein during cell-cell fusion. *Journal of Virology* 76(23):12123-12134.
29. Frankel SS, Wenig BM, Burke AP, Mannan P, Thompson LDR, Abbondanzo SL, Nelson AM, Pope M and Steinman RM. **1996**. Replication of HIV-1 in dendritic cell-derived syncytia at the mucosal surface of the adenoid. *Science* 272(528):115-117.
30. Frankel SS. Tenner-Racz K, Racz P, Wenig BM, Hansen ChH, Heffner D, Nelson AM, Pope M and Steinman RM. **1997**. Active replication of HIV-1 at the lymphoepithelial surface of the tonsil. *American Journal of Pathology* 15(1):89-96.
31. Geijtenbeek TBH, van Viet SJ, Engeing A, t Hart BA and van Kooyk Y. **2004**. Self-and nonself-recognition by C-type lectins n dendritic cells. *Annual Review of Immunology* 22:33-54.
32. Gottlieb MS. **2006**. Pneumocystis pneumonia Los Angeles 1981. *American Journal Puclic Health* 96(6):980-983.
33. Grant AD and De Cock KM. **2001**. *ABC of AIDS*. HIV infection and AIDS in the developing world. *British Medical Journal* 322:1475-1478.
34. Gummuluru S, Kewal-Ramani VN and Emerman M. **2002**. Dendritic cell-mediated viral transfer to T cells is required for Human Immunodeficiency

- Virus type 1 persistence in the face of rapid cell turnover. *Journal of Virology* 76(21):10692-10701.
35. Gummurulu S, Kinsey CM and Emerman M. **2000**. An *in vitro* rapid-turnover assay for Human Immunodeficiency Virus type 1 replication selects for cell-to-cell spread of virus. *Journal of Virology* 74(23):10882-10891.
 36. Huerta L, Gómez-Icazbalceta G, Soto-Ramírez L, Viveros-Rogel M, Rodríguez R, Fuentes L, Lamoyi E and Larralde C. **2005**. Human Immunodeficiency Virus 1 (HIV-1) envelope-dependent cell-cell fusion modulation by HIV-positive sera is related to disease progression. *Journal of General Virology* 86:1961-1966.
 37. Huerta L, Lamoyi E, Báez-Saldaña A. and Larralde C. **2002**. Human Immunodeficiency Virus envelope-dependent cell-cell fusion. A quantitative fluorescence cytometric assay. *Cytometry* 47:100-106.
 38. Huerta L, López-Balderas N, Larralde C and Lamoyi E. **2006**. Discriminating *in vitro* cell fusion from cell aggregation by flow cytometry combined with fluorescence resonance energy transfer. *Journal of Virological Methods*. 138:17-23.
 39. Hwang SS, Boyle TJ, Lyerly HK. and Cullen BR. **1992**. Identification of envelope V3 loop as the major determinant of CD4 neutralization sensitivity of HIV-1. *Science* 257(5069):535-537.
 40. Johnston ER, Zijenah LS, Mutetwa S, Kantor R, Kittinunvorakoon Ch and Katzenstein DA. **2003**. High frequency of syncytium-inducing and CXCR4-tropic viruses among Human Immunodeficiency Virus type 1 subtype C-infected patients receiving antiretroviral treatment. *Journal of Virology* 77(13):7682-7688.
 41. Jowett JBM, Planelles V, Poon B, Shah NP, Chen M-L and Chen IS. **1995**. The human immunodeficiency virus type 1 *vpr* gene arrests infected T cells in the G₂ + M phase of the cell cycle. *Journal of Virology* 69(10):6304-6313.
 42. Koenig S, Gendelman HE, Orestein JM, Dal Canto MC, Pezeshkpour GH, Yungbluth M, Janotta F, Aksamit A, Martin MA and Fauci AS. **1986**. Detection

- of AIDS virus in macrophages in brain tissue from AIDS patients with Encephalopathy. *Science* 233:1089-1093.
43. Krambovitis E, Zafiropoulos A, Baritaki S and Spandidos DA. **2004**. Simple electrostatic interaction mechanisms in the service of HIV-1 pathogenesis. *Scandinavian Journal of Immunology* 59:231-234.
 44. Kwa D, Vingerhoed J, Boeser-Nunnink B, Broersen S and Schuitemaker H. **2001**. Cytopathic effects of non-syncytium-inducing and syncytium-inducing Human Immunodeficiency Virus type 1 variants on different CD4⁺-T cell subsets are determined only by coreceptor expression. *Journal of Virology* 75(21):10455-10459.
 45. LaBonte JA, Madani N and Sodroski J. **2003**. Importance of membrane fusion mediated by HIV envelope glycoproteins for lysis of CD4⁺ T cells. *Journal of Virology* 74(22):10690-10698.
 46. LaBonte JA, Patel T, Hofmann W and Sodroski J. **2000**. Importance of membrane fusion mediated by Human Immunodeficiency Virus envelope glycoproteins for lysis of primary CD4-positive T cells. *Journal of Virology* 74(22):10690-10698.
 47. Levy JA. **2006**. HIV pathogenesis: knowledge gained after two decades of research. *Advances in Dental Research* 19:10-16
 48. Levy JA, Hoffman AD, Kramer SM, Landis JA, Shimabukuro JM and Oshino LM. **1984**. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San-Francisco patients with AIDS. *Science* 225:840-842.
 49. Lewin-Smith M, Wahl SM and Orestein JM. **1999**. Human immunodeficiency virus-rich multinucleated giant cells in the colon: a case report with transmission electron microscopy, immunocytochemistry, and *in situ* hybridization. *Modern Pathology* 12(1):75-81.
 50. Littman DR. 1998. Chemokine receptors: Keys to AIDS pathogenesis? *Cell* 93:677-680.
 51. López-Balderas N, Huerta L, Villarreal C, Rivera-Toledo E, Sandoval G, Larralde C and Lamoyi E. **2007**. *In vitro* cell fusion between CD4⁺ and HIV-

- 1 Env⁺ T cells generates a diversity of syncytia varying in total number, size and cellular content. *Virus Research* 123:138-146.
52. Maas JJJ, Gange SJ, Schuitemaker H, Coutinho RA, van Leeuwen R and Margolick JB. **2000**. Strong association between failure of T cell homeostasis and the syncytium-inducin phenotype among HIV-1-infected men in the Amsterdam cohort study. *AIDS* 14:1155-1161.
53. Masso M. **2003** DC-SIGN points the way to a novel mechanism for HIV-1 transmission. *Medscape General Medicine* 5(2):2-7.
54. McCune JM. **2001**. The dynamics of CD4⁺ T-cell depletion in HIV disease. *Nature* 410:974-979.
55. McDougal JS, Kennedy MS, Slich JM, Cort SP, Mawle A and Nicholson JKA. **1986**. Binding of HTLV-III/LAV to T4⁺ T cell by a complex of the 110K viral protein and the T4 molecule. *Science* 231(4736):382-385.
56. Minichiello SN, Magis C, Uribe P, Anaya L, and Bertozzi S. **2002**. The Mexican HIV/AIDS surveillance system: 1986-2001. *AIDS* 16(Suppl 3):S13-S17.
57. Montagnier L. **2002**. A history of HIV discovery. *Science* 298:1727-1728.
58. Nakamura T, Peng K-W, Vongpansawad S, Harvey M, Mizuguchi H, Hayakawa T, Cattaneo R and Russell SJ. **2004**. Antibody-targeted cell-fusion. *Nature Biotechnology* 22(3):331-336.
59. Nardacci R, Antinori A, Larocca LM, Arena V, Amendola A, Perfettini J-L, Kroemer G and Piacentini M. **2005**. Characterization of cell death pathways in Human Immunodeficiency Virus-associated Encephalitis. *American Journal Pathology* 167(3):695-704.
60. Ogle BM, Cascalho M and Platt JL. **2005**. Biological implications of cell fusion. *Nature Review Molecular Cell Biology* 6(7):1-9.
61. Orenstein JM. **2000**. *In vivo* cytolysis and fusion of Human Immunodeficiency Virus type 1-infected lymphocytes in lymphoid tissue. *The Journal Infectious Diseases* 182:338-342.
62. [Pantaleo G](#), [Graziosi C](#), [Demarest JF](#), [Cohen OJ](#), [Vaccarezza M](#), [Gantt K](#), [Muro-Cacho C](#) and [Fauci AS](#). 1994. Role of lymphoid organs in the

- pathogenesis of human immunodeficiency virus (HIV) infection. [Immunological Reviews](#) 140:105-130.
63. Phillips DM. **1994**. The role of cell-to-cell transmission in HIV infection. *AIDS* 8:719-731.
 64. Pötgens AJG, Schmitz U, Bose P, Versmold A, Kaufmann P and Frank H-G. **2002**. Mechanisms of syncytial fusion: A review. *Placenta* 23(Supplement A 16):S107-S113.
 65. Rinfret A, Latendresse H, Lefebvre R, St-Louis G, Jolicoeur P and Lamarre L. **1991**. Human Immunodeficiency Virus-infected multinucleated histiocytes in oropharyngeal lymphoid tissues from two asymptomatic patients. *American Journal of Pathology* 138(2):421-426.
 66. Rivera Toledo Evelyn. 2006 Fusión celular medida por las proteínas de la envoltura del VIH-1: Caracterización fenotípica y relevancia para la patogénesis del SIDA. Tesis de licenciatura. Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM.
 67. Rowland-Jones SL. **2003**. AIDS pathogenesis: what have two decades of HIV research taught us? *Nature Reviews Immunology* 3:343-348.
 68. Saha K, Volsky DJ and Matczak E. **1999**. Resistance against syncytium-inducing Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1) in selected CD4⁺ T cells from an HIV-1-infected nonprogressor: Evidence of novel pathway of resistance mediated by a soluble factor(s) that acts after virus entry. *Journal of Virology* 73(9):7891-7898.
 69. Sato H, Orestein J, Dimitrov D and Martin M. **1992**. Cell-to-cell spread of HIV-1 occurs within minutes and may not involve the participation of virus particles. *Virology* 186:712-724.
 70. Schiller C and Jassoy C. **2001**. Syncytium formation amplifies apoptotic signals: a new view on apoptosis in HIV infection *in vitro*. *Virology* 282:48-55.
 71. Shemer G, Kishore R and Podbilewicz B. **2000**. Ring formation drives invagination of the vulva in *Caenorhabditis elegans*: Ras, cell fusion, and cell migration determine structural fates. *Developmental of Biology* 221:233-248.

72. Shors AR. **2006**. The global epidemiology of HIV/AIDS. *Dermatologic Clinics* 24:413-420.
73. Shutt DC, Jenkins LM, Carolan EJ, Stapleton J, Daniels KJ, Kennedy RC and Soll DR. **1998**. T cell syncytia induced by HIV release, T cell chemoattractants: demonstration with a newly developed single cell chemotaxis chamber. *Journal Cell Science* 111(Pt 1):99-109.
74. Sierra S, Kupfer B and Kaiser R. **2005**. Basics of the virology of HIV-1 and its replication. *Journal of Clinical Virology*. 34:233-244
75. Sodroski J, Goh WCh, Rosen C, Campbell K and Haseltine WA. **1986**. Role of the HTLV-III/LAV envelope in syncytium formation and cytophaticity. *Nature* 322(6078):470-474.
76. Soto-Ramírez LE. **2004**. Mecanismos patogénicos de la infección por VIH1. *Revista de Investigación Clínica* 56(2):143-152.
77. Stevenson M. **2003**. HIV-1 pathogenesis. *Nature Medicine* 9(7):853-860.
78. Sullivan N, Sun Y, Sattentau Q, Tahali M, Wu D, Denisova G, Gershoni J, Robinson J, Moore J and Sodroski J. **1998**. CD4-induced conformational changes in the Human Immunodeficiency Virus type 1 gp120 glycoprotein: consequences for virus entry and neutralization. *Journal of Virology* 72(6):4694-4703.
79. Sylwester A, Murphy S, Shutt D and Soll DR. **1997**. HIV-induced T cell syncytia are self-perpetuating and the primary cause of T cell death in culture. *The Journal of Immunology* 158:3996-4007.
80. Trauneker A, Lüke W. and Karjalainen K. **1988**. Soluble CD4 molecules neutralize Human Immunodeficiency Virus type 1. *Nature* 331(6151):84-86.
81. Turner BG and Summers MF. **1999**. Structural Biology of HIV. *Journal Molecular Biology* 285:1-32.
82. UNAIDS/WHO. **2007**. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS) World Health Organization (WHO). AIDS epidemic update:ecember 75-79.
83. Veazey RS and Lackner AA. **2004**. Getting to the guts of HIV pathogenesis. *The Journal of Experimental Medicine* 200(6):697-700.

84. Vermeire K and Schols D. **2003**. Specific CD4 down-modulating compounds with potent anti-HIV activity. *Journal of Leukocyte Biology* 74:667-675.
85. Wigg AJ, Phillips JW, Whetland and Berry MN. **2003**. Assessment of cell concentration and viability of isolated hepatocytes using flow cytometry. *Analytical Biochemistry* 317:19-25.
86. Winkler Ch, Modi W, Smith MW, Nelson GW, Wu X, Carrington M, Dean M, Honjo T, Tashiro K, Yabe D, Buchbinder S, Vittinghoff E, Goedert JJ, O'Brien TR, Jacobson LP, Detels R, Donfield Sh, Willoughby A, Gomperts E, Vlahov D and Phair J. **1998**. Genetic restriction of AIDS pathogenesis by an SDF-1 chemokine gene variant. *Science* 279(5349):389-393.
87. Wu Y and Marsh JW. **2003**. Gene transcription in HIV infection. *Microbes and Infection* 5:1023-1027.
88. Yoffe B, Lewis DE, Petrie BL, Noonan ChA, Melnick JL and Hollinger FB. **1987**. Fusion as a mediator of cytolysis in mixtures of uninfected CD4⁺ lymphocytes and cells infected by Human Immunodeficiency Virus. *Proceeding of the National Academy of Science USA* 84:1429-1433.

13. ANEXOS

13.1 Anexo 1. Reactivos y soluciones:

- ☞ Medio RPMI-1640 (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (FSB Gibco); penicilina (50U/ml) y estreptomina (50 μ g/ml) (Gibco).
- ☞ Medio AIM-V para linfocitos libre de suero (Gibco)
- ☞ Penicilina (100U/l)
- ☞ Estreptomina (100 μ g/ml)
- ☞ Tetraciclina (1 μ g/ml).
- ☞ Geneticina (G418) (200 μ g/ml).
- ☞ Higromicina (200 μ g/ml).
- ☞ Colorantes lipofílicos fluorescentes tipo carbocianina:
 - Dil: perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3',3'-tetrametilindocarbocianina. Energías de excitación y emisión 549 y 565 nm (rojo). Molecular Probes (Eugene OR.)
 - DiO: perclorato de 3,3'-dioctadeciloxocarbocianina. Energías de excitación y emisión 484 y 501 nm (verde). Molecular Probes (Eugene OR.)
- ☞ Solución salina de fosfatos (PBS)
- ☞ Yoduro de propidio (Sigma)
- ☞ Dimetil sulfóxido (Sigma) (DMSO)
- ☞ Kit de perlas TruCOUNT™ Absolute Count Tubes (Becton Dickinson)
- ☞ Kit para la detección de bromodeoxiuridina (APC BrdU flow Kit)
- ☞ Solución salina de fosfatos dulbeco (DPBS)
- ☞ Azul tripano (Gibco)

13.2 Anexo 2. . ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Número estimado de personas que viven con VIH-1	13
Figura 2. Fusión célula-célula dependiente del complejo gp120/gp41	15
Figura 3. Fusión celular de membranas en la infección por VIH-1	17
Figura 4. Cultivo de células infectadas con virus de pacientes	18
Figura 5. Sincicios en pacientes infectados con VIH-1	19
Figura 6. Típicas células gigantes multinucleadas (sincicios)	20
Figura 7. Células Jurkat marcadas con colorantes lipofílicos fluorescentes	20
Figura 8. Diversidad de sincicios formados <i>in vitro</i>	21
Figura 9. Estructura del sistema para la expresión inducible de proteínas	27
Figura 10. Sincicio de 2 y 3 núcleos	34
Figura 11. Sincicio con 9 núcleos y células circundantes no fusionadas	34
Figura 12. Sincicios fusionándose	34
Figura 13. Sincicio con 13 núcleos	34
Figura 14. Análisis por citometría de flujo (células Env ⁺ y CD4 ⁺)	36
Figura 15. Distribución del tamaño y la granularidad en cocultivos	36
Figura 16. Análisis por citometría de flujo de cocultivos <i>in vitro</i>	36
Figura 17. Distribución del tamaño y la granularidad en cocultivos	36
Figura 18. Células CD4 ⁺ detectadas en FL-2	38
Figura 19. Tamaño vs. granularidad de células CD4 ⁺	38
Figura 20. Exclusión de células CD4 ⁺ no viables	38
Figura 21. Selección de perlas fluorescentes en cultivos de células CD4 ⁺	38
Figura 22. Gráfica de fluorescencia de células Env ⁺	39
Figura 23. Gráfica de tamaño vs. granularidad de células Env ⁺	39
Figura 24. Exclusión de células Env ⁺ no viables	39
Figura 25. Determinación de perlas fluorescentes en cultivos de células Env ⁺	39
Figura 26. Gráfica de fluorescencia para cocultivos	41
Figura 27. Gráfica de tamaño vs. granularidad de cocultivos	41
Figura 28. Exclusión de células no viables en cocultivos	41
Figura 29. Cocultivo en FL2-FL4 mostrando perlas fluorescentes	41
Figura 30. Cuantificación de las poblaciones celulares en cocultivos	41

Figura 31. Número absoluto de células viables, experimento 1	44
Figura 32. Cocultivo de 24 horas mostrando células que incorporaron IP	45
Figura 33. Número absoluto de células viables, experimento 2	47
Figura 34. Número absoluto de células viables, experimento 3	49
Figura 35. Número absoluto de células viables, experimento 4	50
Figura 36. Viabilidad celular (controles y cocultivos), experimento 3	52
Figura 37. Viabilidad celular (controles y cocultivos), experimento 4	52
Figura 38. Histograma de células CD4 ⁺ /Env ⁺ (tamaño)	53
Figura 39. Análisis del tamaño de los sincicios	53
Figura 40. Histograma de células CD4 ⁺ /Env ⁺ (granularidad)	54
Figura 41. Análisis de la granularidad de los sincicios	54
Figura 42. Inhibición de la formación de sincicios con anti-CD4	55
Figura 43. Ciclo celular. Células CD4 ⁺	57
Figura 44. Ciclo celular. Células Env ⁺	57
Figura 45. Gráfica de fluorescencia de cocultivo tiempo 6 horas	57
Figura 46. Ciclo celular. Células en cocultivo de 6 horas	57
Figura 47. Estructura propuesta para el VIH-1	77
Figura 48. Diagrama esquemático del curso de la infección por el VIH-1	79
Figura 49. Ciclo de replicación del VIH-1	81
Figura 50. Genoma del VIH-1	83

14. APÉNDICES

14.1. Apéndice 1.

Generalidades del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1)

El VIH-1 es una partícula esférica aproximadamente de 100-120 nm, pertenece a la familia *Retroviridae* y al género *Lentiviridae*, tiene una estructura de tres capas: la interna o nucleoide que contiene el material genético ARN, más nucleoproteínas y enzimas necesarias para replicarse, una capa icosaédrica y una envoltura que derivada de la célula huésped, donde se encuentran las proteínas de la envoltura viral además de los antígenos de histocompatibilidad de clase I y II que también derivan de la célula huésped (11,81).

En la membrana se encuentra localizada la glicoproteína extracelular gp120 y la proteína transmembranal gp41, que existen como un complejo no covalente, la gp120 constituye la superficie externa del virus presente en trímeros y tetrámeros, además contiene el sitio de unión al receptor celular y los principales dominio neutralizantes (Figura 47) (11,81).

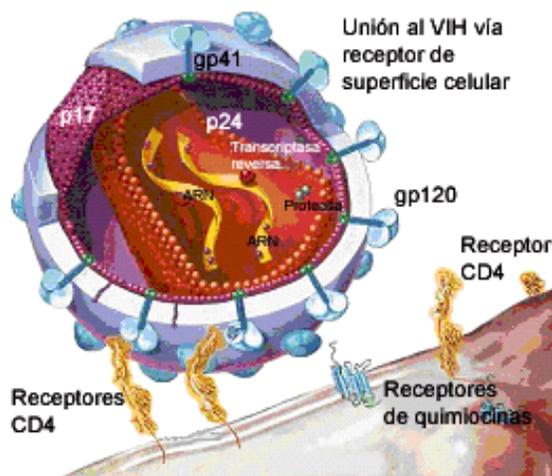


Figura 47. Estructura propuesta para el VIH-1.

El genoma del virus es ARN de cadena única formado por dos hebras idénticas, de polaridad positiva, que se replica mediante la acción de la transcriptasa inversa

(p55/p61) una enzima contenida en el virión, que cataliza la formación del virus en forma de doble cadena de ADN, que se integra en el genoma de la célula huésped, la endonucleasa (p32) y la proteína Gag unidora del ARN proviral (p9). A partir de este provirus se transcriben los ARN mensajeros que codificarán las proteínas correspondientes, que se unirán al ARN genómico viral, constituyendo las partículas inmaduras que emergen por gemación a través de la membrana celular (87).

Procesos patogénicos inducidos por el VIH-1

En la infección por VIH-1 se observan tres períodos:

1. La infección primaria, durante la cual el virus se disemina extensamente por los órganos linfoides, se caracteriza por altos niveles de carga viral, dura entre dos a seis semanas y se acompaña a menudo de síntomas inespecíficos, similares a los de otras infecciones virales agudas. Su paso a infección crónica coincide con la aparición de anticuerpos contra el VIH-1.
2. La infección crónica asintomática, de diez años de duración como media, se caracteriza por niveles de CD4⁺ relativamente estables, aunque con tendencia a descender progresivamente. En esta fase, la carga viral desciende mucho y puede incluso hacerse indetectable en sangre periférica por los métodos convencionales en algunos casos, pero el virus continúa su replicación en el tejido linfoide, pese a la presencia de anticuerpos neutralizantes y de linfocitos T citotóxicos (CTL) contra el virus (52).
3. Infección avanzada o SIDA: en ella los recuentos de CD4⁺ son inferiores a 200 por ml en sangre, la replicación viral se acelera, la actividad de los CTL anti-VIH desciende, se destruye la arquitectura linfática y se desarrollan infecciones oportunistas tales como: tuberculosis, septicemias bacterianas (*Salmonella*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium avium intracellulare*), enfermedades neurológicas (Encefalopatía y demencia), enfermedades tropicales, candidiasis, neumonía, cánceres, sarcoma de Kaposi, Linfoma No Hodgking entre otras (Figura 48) (14,18,43,67,74,77,83,87).

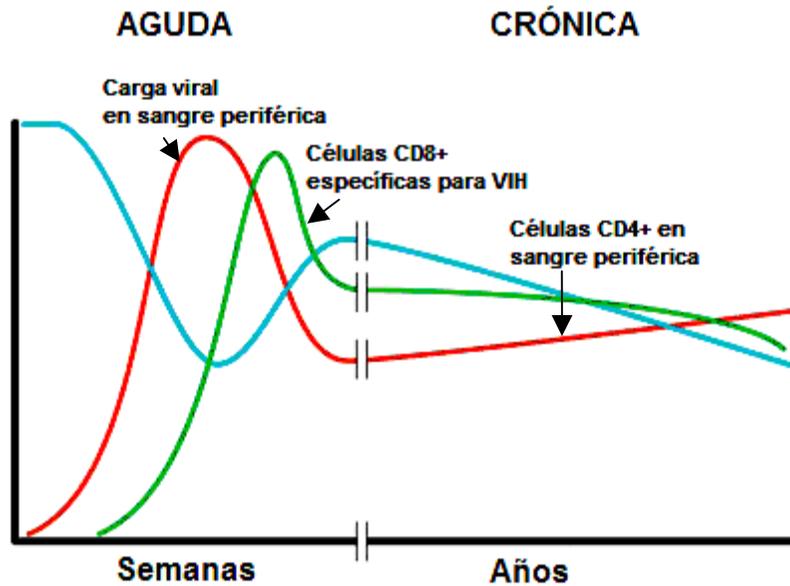


Figura 48. Diagrama esquemático del curso de la infección por VIH-1.

La fusión celular (célula-célula) se considera análoga a la fusión virus-célula y los sincicios son células gigantes multinucleadas resultado de la interacción de las proteínas de la envoltura viral (gp120/gp41 o Env) expresadas en las membranas de células infectadas, con correceptores específicos sobre la superficie de las células blanco (CD4 y un receptor de las familia de las quimiocinas, principalmente CCR5 o CXCR4) (10,12,34,75).

En etapas tardías de la enfermedad aparecen variantes del VIH-1 con una elevada capacidad para inducir la formación de sincicios *in vitro* y su presencia en la sangre se ha asociado a la progresión a SIDA (54). La capacidad del VIH para inducir la fusión de membranas celulares se relaciona con su habilidad para transmitirse de célula a célula en condiciones de alta densidad celular (55). Por otra parte, la fusión celular con formación de sincicios, puede desencadenar la muerte por apoptosis de linfocitos T CD4⁺ (37).

Variantes no inductoras de sincicios (NIS) son trópicas preferencialmente a macrófagos y utilizan el receptor 5 β-quimiocina como correceptor, en el 50% de los casos de los pacientes infectados con VIH-1 los que progresan a SIDA están

asociados con la emergencia de variantes inductoras de sincicios (SI), que utilizan el receptor 4 α -quimiocina (CXCR4). Las variantes SI preceden más rápido en la disminución de células T CD4⁺ y acelerada progresión a SIDA. Además las variantes de VIH-1 SI son generalmente consideradas más citopáticas que las variantes HIV-1 NIS (44).

El ciclo de replicación del VIH-1

1. Entrada, al igual que otros retrovirus, el ingreso del virus está mediado por las proteínas de envoltura (Env). La interacción de estas proteínas con receptores y correceptores celulares ocasiona un cambio conformacional en las proteínas de envoltura que permite la interacción de las dos membranas, para dar paso a la fusión de la membrana viral con la membrana celular, dando lugar a la entrada de la nucleocápside al citoplasma celular.
2. Síntesis de ADN, luego del ingreso de la nucleocápside al citoplasma celular el ARN viral inicia la retrotranscripción reversa para formar el ADN de doble cadena, que se transporta del núcleo.
3. Integración, consiste en la unión covalente entre el ADN proviral y el ADN celular, con la previa formación de un complejo de integración que es transportado al núcleo de la célula, como componente de un complejo de preintegración (PIC, por sus siglas en inglés). Esta reacción de integración es mediada por la enzima integrasa.
4. Transcripción, esta es llevada a cabo por la maquinaria de la célula infectada, pero involucra elementos de regulación del virus, que conduce a la síntesis de polipéptidos precursores de Gag, Pol y Env, que son transcritos exportados al citoplasma.

5. Síntesis de proteínas, la maduración de Env en el retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi y las proteínas Gag y Gag-Pol se realiza en polirribosomas libres en el citoplasma, para ser transportados a la membrana plasmática.
6. Ensamblaje, el VIH-1 se fusiona a la membrana de la célula blanco e invagina.
7. Gemación, en este momento brotan las partículas virales, rodeadas por la membrana celular, donde se insertan las glicoproteínas codificadas por Env. El virión que brota de la célula es inmaduro y no infeccioso y requiere clivajes mediados por la retrotranscriptasa reversa para formar virus maduros (Figura 49) (11,43,81).

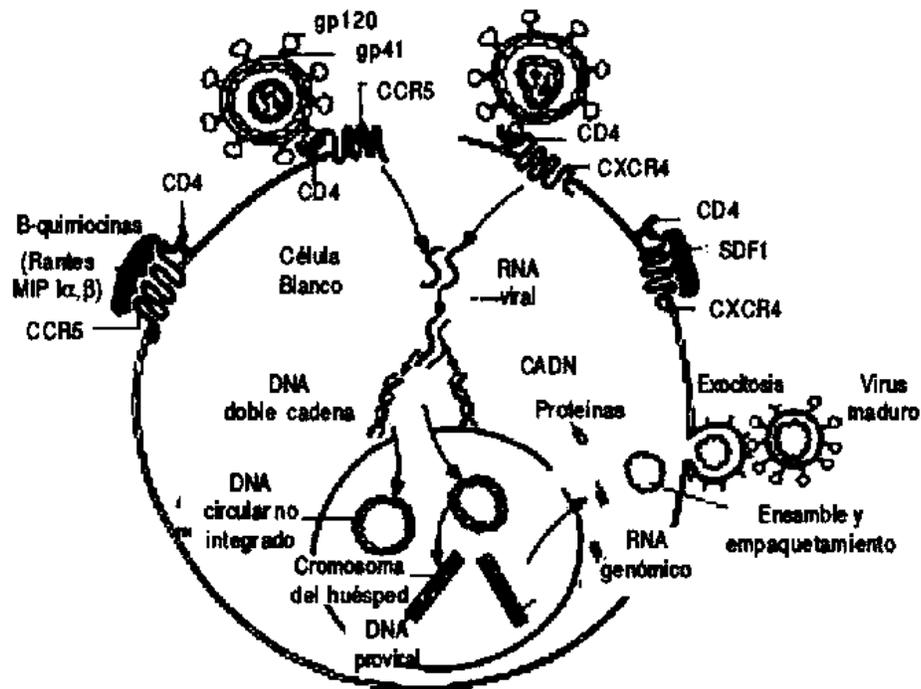


Figura 49. Ciclo de replicación del VIH-1 (76).

El genoma del VIH-1

El genoma del VIH-1 tiene dos regiones repetidas terminales (“long terminal repeats por sus siglas en inglés” LTR), tres genes conservados, *gag*, *pol* (proteínas de la cápside) y *env* (proteínas de la envoltura, gp120/gp41); contiene además cinco proteínas con actividad reguladora; *tat*, *rev/env*, *rev* y *nef*, y tres con función accesoria; *vif*, *vpu* y *vpr* que, junto con polimerasas celulares y factores de transcripción, son necesarias para la activación de la expresión génica viral (Figura 50) (87).

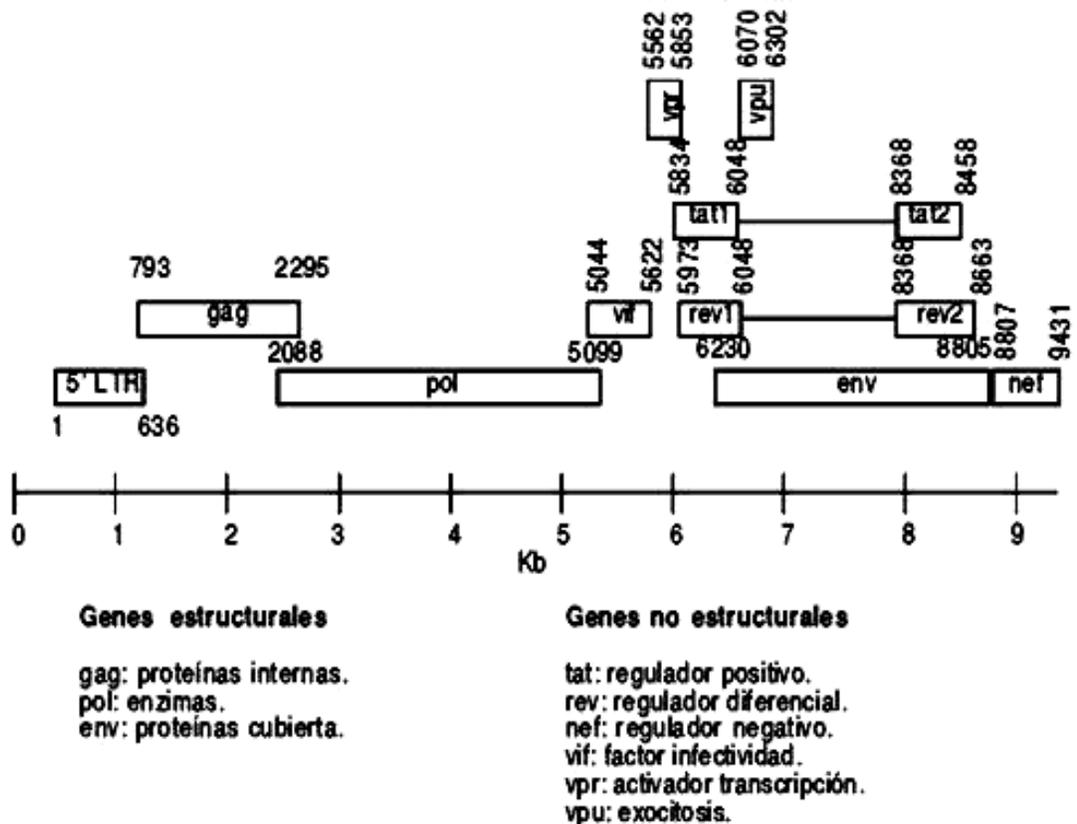


Figura 50. Genoma del VIH-1 (76).

Disminución de linfocitos T CD4⁺ y SIDA

El Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) representa la expresión clínica final de la infección por el VIH-1. Se caracteriza por la alteración de las funciones del sistema inmunológico, tanto de la respuesta específica como de la respuesta innata, lo cual puede deberse a diversas causas, entre las cuales se pueden mencionar:

1. La mayoría de las manifestaciones de inmunodeficiencias se debe a la pérdida de células T CD4⁺, se cree que la pérdida de estas, es la causa de que los pacientes con VIH-1 sean susceptibles a múltiples infecciones y neoplasias.

2. También puede deberse a alteraciones que son independientes de la disminución de los linfocitos T CD4⁺, es decir a alteraciones en la funcionalidad del sistema inmunológico en la infección por VIH-1 con recuentos normales de células T CD4⁺, tales como hiperactivación de la respuesta inmunológica, disminución de la actividad celular, la falta de capacidad del sistema inmune de reemplazar las células a la velocidad requerida, entre otras.

La reducción de CD4⁺ en la infección por VIH-1 se debe a efectos directos o indirectos, entre los primeros se tiene la lisis de células T CD4⁺ debido a la gemación viral, el efecto de la unión de gp120 recién sintetizado a CD4 lo que da lugar a la formación de células gigantes multinucleadas o sincicios letales, tanto para las células infectadas como las no infectadas por el VIH-1, grandes cantidades de ácidos nucleicos virales no funcionales tóxicos para las células, interferencia de la síntesis y expresión de proteínas celulares. Los efectos indirectos se caracterizan por la lisis indirecta a causa de una respuesta inmunitaria frente al VIH-1 (CTL), inhibición de la maduración en el timo de las células T CD4⁺ y apoptosis debida al entrecruzamiento del CD4 con la gp120 soluble (1).

Los linfocitos T CD4⁺ constituyen sin duda el principal blanco del VIH-1 (tropismo por linfocitos: células T CD4⁺ activadas, en fase G1 y quiascetes o en fase G0) (77). El VIH-1 se replica con una cinética muy agresiva en este tipo celular e induce una profunda inmunosupresión en el hospedero, secundaria tanto a la destrucción linfocitaria como a la interferencia con los mecanismos de activación linfocitaria, por lo que la fisiopatología del SIDA es un proceso extraordinariamente complejo en el que se encuentran involucrados mecanismos patológicos muy diversos, los cuales todavía no son completamente comprendidos.

Otros dos tipos celulares también pueden influir en la infección por VIH-1, estos son los fagocitos mononucleares y las células dendríticas foliculares. Los macrófagos son relativamente resistentes a los efectos citopáticos del VIH-1, probablemente debido a la necesidad de una elevada expresión de CD4 para la citotoxicidad inducida por el virus; sin embargo pueden infectarse por fagocitosis de otras células infectadas, o endocitosis mediada por el receptor Fc de los viriones VIH-1 recubiertos de anticuerpos. Aunque los macrófagos pueden infectarse, no son destruidos, pudiendo ser reservorios del virus. De hecho la cantidad de macrófagos infectados supera a la de los linfocitos T en diversos tejidos de pacientes infectados por el VIH-1.

Entre otras moléculas que son más específicas que pueden favorecer la patogenia, se ha descrito la existencia, en la superficie de células dendríticas (en tejido mucoso periférico de cerviz y recto), una serie de lectinas tipo C denominadas DC-SIGN (12,53) y L-SIGN que se unen de forma inespecífica al virus (31). Su interacción se produce a través de residuos de carbohidratos y no de estructuras conformacionales por lo que no tienen la especificidad que caracteriza a un receptor. Sin embargo, la unión del VIH-1 a estas lectinas facilita e incrementa la infección de las células circundantes (19,43,77).

14.2. Apéndice 2.

Glosario

Ácido desoxiribonucleico (ADN). Constituye el principal componente del material genético de la inmensa mayoría de los organismos, junto con el ARN, siendo el componente químico primario de los cromosomas y el material con el que los genes están codificados.

Ácido ribonucleico (ARN). Es un ácido nucleico, polímero lineal de nucleótidos formando una larga cadena. El eje de la cadena lo forman grupos fosfato y azúcares ribosa de forma alternativa del que toma su nombre. Los nucleótidos del ARN contienen el azúcar ribosa y entre sus bases nitrogenadas al uracilo. **Adenoides.** Son tejidos situados entre nariz y garganta, cuya función consiste en atrapar a los gérmenes que ingresan al organismo mediante la respiración. Debido a que dichos protectores se encuentran en contacto frecuente con microbios corren alto riesgo de infectarse y, de no recibir tratamiento, pueden presentarse sordera y asfixia.

Amígdalas. Estructuras nodulares que contienen una red de células reticulares y fibras que albergan linfocitos, macrófagos, granulocitos y mastocitos. Defienden el cuerpo contra antígenos que ingresan por las vías nasal y oral.

Anticuerpo monoclonal. Anticuerpo IgM, principalmente producido por las células B-1, específico de las bacterias que son comunes en el entorno y en el tracto gastrointestinal. Los individuos normales presentan anticuerpos naturales en ausencia de cualquier dato de infección y estos anticuerpos actúan de mecanismos de defensa preformado contra los microorganismos que logran penetrar las barreras epiteliales. Algunos de estos anticuerpos presentan reacción cruzada con los antígenos AOB, y son responsables de las reacciones transfusionales.

Anticuerpo. Tipo de molécula glucoproteica, también denominada Ig, producida por los linfocitos B y que se une a antígenos, a menudo con un elevado grado de especificidad y afinidad.

Antígeno. Cualquier sustancia (casi siempre ajena). Molécula que se une de manera específica al anticuerpo o a un receptor de la célula T (TCR). Los antígenos que se unen a los anticuerpos son todas las clases de moléculas. Los TCR sólo se unen a fragmentos peptídicos de proteínas que forman un complejo con moléculas del MHC.

Aparato de Golgi. Un sistema que consta de apilamientos individuales de membranas próximas al retículo endoplásmico; participa en la glicosilación de proteínas y su ordenamiento para el transporte a diferentes localizaciones celulares.

Apoptosis. También llamas muerte celular programada (MCP), suicidio celular o muerte silenciosa. Proceso de muerte celular caracterizado por la escisión del ADN, la condensación y fragmentación del núcleo y la vesiculación de la membrana plasmática que provoca la fagocitosis de la célula sin inducir una respuesta inflamatoria. Este tipo de muerte celular es importante en el desarrollo de los linfocitos y en la regulación de la respuesta a los antígenos extraños (1).

Bicapa lipídica. Es la forma adoptada por la concentración de lípidos en que los ácidos grasos hidrofóbicos ocupan el interior y las cabezas polares se dirigen hacia el exterior.

Cápside. Es la envoltura proteínica externa de una partícula viral.

CD3. Complejo polipeptídico que contiene tres dímeros: un heterodímero gama-épsilon ($\gamma\epsilon$), un heterodímero épsilon-delta ($\gamma\delta$) y un homodímero zeta-zeta ($\zeta\zeta$) o un heterodímero zeta-eta ($\zeta\eta$). Se relaciona con el receptor de células T y funciona en la transducción de la señal.

CD4. Glucoproteína que sirve como correceptor en las células T restringidas a MHC clase II. La mayor parte de las células T cooperadoras es CD4⁺.

CD4⁺. Positivos únicos. Timocitos que expresan un correceptor CD4.

CD8. Proteína dimérica que sirve como correceptor en células T restringidas a MHC clase I. La mayor parte de las células T citotóxicas es CD8⁺.

Célula de memoria. Linfocito de vida prolongada que se generan después de encuentros con antígenos; se estimulan con más facilidad que los linfocitos vírgenes y median una *reacción inmunitaria* ante los encuentros ulteriores con el antígeno.

Célula dendrítica. Células accesorias inmunitarias derivadas de la médula ósea presentes en los tejidos epiteliales y linfoides que se caracterizan desde el punto de vista morfológico por delgadas proyecciones membranosas. Las células dendríticas actúan como células presentadoras de antígenos para los linfocitos T no estimulados, y son importantes para el inicio de las respuestas inmunitarias adaptativas a los antígenos proteicos

Célula T citotóxica (T_C). Célula T que destruye células blanco de manera específica según el antígeno.

Célula T cooperadora (T_H). Células T que son estimuladas por un antígeno para producir señales que fomentan las respuestas inmunitarias.

Células de la microglia. Tipo de macrófago que se encuentra en el sistema nervioso central.

Células dendríticas foliculares. Células presentes en los folículos linfoides que expresan receptores del complemento, receptores de Fc y ligando de CD40 y que tiene largas prolongaciones citoplasmáticas que forman un entramado esencial para la arquitectura de folículo linfoide. Las células dendríticas foliculares presentan antígenos en su superficie para el reconocimiento por las células B que expresan Ig de membrana de elevada afinidad durante el proceso de maduración de la afinidad.

Centro germinal. Región dentro de los ganglios linfáticos y el bazo donde ocurren la activación, la proliferación y la diferenciación de las células B. Los centros germinales son sitios de intensa mutación somática y selección de células B.

Ciclo celular. Es la división celular en la que una célula progenitora se divide en dos células hijas idénticas.

Citomegalovirus. El citomegalovirus (CMV), es una forma de Herpes virus; en humanos es conocido como Human herpesvirus 5 (HHV-5). Pertenece a la subfamilia Beta-herpesvirinae de la familia Herpesviridae.

Citometría de flujo. Método para el análisis del fenotipo de las poblaciones celulares que requieren un instrumento especializado (citómetro de flujo) que detecta la fluorescencia en células individuales en una suspensión y, por lo tanto, determina el número de células que expresan la molécula a la que se une la sonda fluorescente. Las suspensiones de células se incuban con anticuerpos marcados fluorescentemente o con otras sondas, y la cantidad de sonda unida por cada célula de la población se mide haciendo pasar la célula a través de un fluorímetro con un haz incidente generado por láser.

Citopático. Se denomina efecto citopático (ECP) a los cambios bioquímicos y moleculares, morfológicos y de viabilidad celular, visibles a microscopía óptica, causados durante el ciclo de replicación viral.

Citotóxicidad. Que destruye las células.

Complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Conjunto de genes que codifican las moléculas de superficie celular y que son necesarios tanto para la presentación de antígeno a las células T como para el rechazo rápido de injertos

Conjunto de diferenciación (CD). Colección de anticuerpos monoclonales que reconocen un antígeno que se encuentra en uno o varios tipos celulares diferenciados particulares. Cada uno de los antígenos que este conjunto de anticuerpos reconoce se denomina marcador CD y se le asigna un número de identificación único.

Diferenciación. Cambios de forma y fisiología celular asociados a la generación de tipos de células terminales de un órgano o tejido concretos.

Dimetil sulfóxido (DMSO). Este es un líquido incoloro importante disolvente polar, que disuelve los compuestos polares y no polares

Efecto citopático viral. Efectos dañinos de los virus sobre las células huésped que están causados por diversos mecanismos bioquímicos/moleculares y que son independientes de la respuesta inmunitaria del huésped al virus. Algunos virus ejercen un efecto citopático escaso, pero siguen causando enfermedad, ya que el sistema inmunitario reconoce las células infectadas y las destruye.

Endocitosis. Es el proceso celular, por el que la célula introduce en su interior moléculas grandes o partículas, las engloba e una invaginación de la membrana citoplasmática, formando una vesícula que se desprende e incorporarse al citoplasma.

Enzima. Proteína que acelera una reacción química específica en un sistema vivo.

Fase S. Es la segunda fase del ciclo en la que se produce la replicación o síntesis del ADN. Con la duplicación del ADN, el núcleo contiene el doble de proteínas nucleares y de ADN que al principio. Tiene una duración de unos 6-8 horas.

Fc (fragmento cristalino). Fragmento proteolítico de IgG que contiene solo las regiones carboxi terminales unidas por puentes disulfuro de las dos cadenas pesadas. El fragmento Fc también se utiliza para describir la región correspondiente de una molécula de Ig intacta que media funciones efectoras mediante la unión de receptores de la superficie celular o a la proteína del complemento C1q. (Los fragmentos Fc reciben este nombre porque tienden a cristalizar fuera de una solución).

Fenotipo. Es la expresión del genotipo en un determinado ambiente. Los rasgos fenotípicos incluyen rasgos tanto físicos como conductuales. Es importante destacar que el fenotipo no puede definirse como la "manifestación visible" del genotipo, pues a veces las características que se estudian no son visibles de un individuo, como es el caso de la presencia de una enzima.

Fisiopatología. La fisiopatología es el estudio de los procesos patológicos (enfermedades), físicos y químicos que tienen lugar en los organismos vivos durante la realización de sus funciones vitales. Estudia los mecanismos de producción de las enfermedades en relación a los niveles molecular, subcelular, celular, tisular, orgánico y sistémico o funcional.

Fluorocromo. Una molécula que emite fluorescencia cuando se le excita con luz de la longitud de onda adecuada

Folículo linfoide. Región rica en células B de un ganglio linfático o del bazo que es el sitio de proliferación y diferenciación de las células B inducidas por el antígeno. En las repuestas de células B dependientes de las células T a los antígenos proteicos, se forma un centro germinal en el interior de los folículos.

Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET, por sus siglas en inglés). Es la interacción que ocurre solo a muy corta distancia entre dos estados de excitación electrónica de dos moléculas fluorescentes en la que la longitud de onda de emisión de una de ellas coincide con la de excitación de la otra.

G1. Es el periodo del ciclo de las células eucarióticas entre la última mitosis y el comienzo de la replicación del ADN.

G2. Es el periodo del ciclo de las células eucarióticas entre el final de la replicación del ADN y el comienzo de la siguiente mitosis.

Ganglios linfáticos. Agregados nodulares encapsulados de pequeño tamaño de tejido rico en linfocitos, situados a lo largo de los conductos linfáticos de todo el organismo, en los que se inician las respuestas de inmunidad adaptativa a los antígenos transportados por la linfa.

Gen supresor de tumores. Gen que determina una proteína que suprime la aparición de tumores.

Gen. Es el segmento de ADN involucrado en producir una cadena polipeptídica; comprende regiones que preceden y siguen a la región codificadora (líder y cola) así como secuencias intermedias (intrones) entre segmentos codificadores individuales (exones).

Genoma. Material genético total contenido en el conjunto haploide de los cromosomas.

Glicano. Término genérico que se utiliza para denominar a una azúcar o azúcares ensamblados, en forma libre o unida a otra molécula. También se utiliza este término para denominar a los sacáridos o carbohidratos.

Glicoproteínas. Proteína con uno o más glicanos unidos covalentemente.

Glucoproteína de la envoltura (Env). Glucoproteína de membrana codificada por un retrovirus que se expresa en la membrana plasmática de las células infectadas o en la cubierta de membrana derivada de la célula huésped de las partículas virales. Las proteínas Env del VIH constan de las subunidades gp120 y gp41; se unen a la molécula CD4 y a los correceptores de la familia de quimiocinas de las células T y median la fusión de las membranas del virus y de la célula T (1).

Hiperplasia. Es el aumento de tamaño de un órgano o de un tejido, provocado debido a que sus células han aumentado en número. Puede producirse en los tejidos cuyas células se pueden multiplicar. Ocurre en forma fisiológica en las glándulas mamarias durante la lactancia, la hiperplasia del endometrio en el ciclo menstrual, la FSH hace crecer el endometrio y los estrógenos ováricos, el 14º día la progesterona detiene este crecimiento.

Homeostasis. En el sistema inmunitario adaptativo, mantenimiento de número constante y de la diversidad de repertorio de linfocitos, a pesar de la aparición de nuevos linfocitos y de la notable expansión de clones individuales que pueden producirse durante las respuestas a los antígenos inmunogénicos. La homeostasis se logra por medio de diversas vías reguladas de muerte e inactivación de los linfocitos.

Huésped. Es aquel organismo que alberga a otro en su interior o lo porta sobre sí, ya sea un parásito, un comensal o un mutualista.

In vitro. Se refiere a los experimentos con células vivas o componentes celulares que se realizan fuera del organismo intacto.

In vivo. Se refiere a experimentos que se realizan en un organismo vivo intacto.

Infección. Infección es el término clínico para la colonización de un organismo huésped por especies exteriores. En la utilización clínica del término infección, el organismo colonizador es perjudicial para el funcionamiento normal y supervivencia del huésped, por lo que se califica al microorganismo como patógeno.

Inmunidad. Protección contra la enfermedad, habitualmente infecciosa, mediada por un conjunto de moléculas, células y tejidos que reciben colectivamente el nombre de sistema inmunitario. En un sentido más amplio, el término “inmunidad” hace referencia a la capacidad de responder a las sustancias extrañas, tanto microorganismos como moléculas.

Inmunodeficiencia. Cualquier deficiencia en la respuesta inmune. Puede deberse a un defecto en la fagocitosis, en la reacción humoral o en la mediada por células.

Lectina tipo C. Clase de lectinas dependientes de calcio, que se identifican por tener una secuencia característica que contiene un dominio de reconocimiento constituido por carbohidratos.

Lectina. Proteína que reconoce específicamente y se une a un glicano sin catalizar una modificación en éste.

Leucemia linfoblástica. La leucemia linfoblástica aguda (LLA) en adultos es un tipo de cáncer por el cual la médula ósea fabrica demasiados linfocitos (un tipo de glóbulos blancos).

Línea celular. Población de células tumorales o normales cultivadas que se sometieron a *transformación* química o viral. Las líneas celulares pueden propagarse de manera indefinida en cultivo.

Linfocito no estimulado virgen. Linfocito B o T maduro que no se ha encontrado previamente con un antígeno

Linfocito T. Linfocito que madura en el timo y expresa un receptor de célula T, CD3 y CD4 o CD8. Se reconocen varias subpoblaciones distintas de células T.

Linfocito. Leucocito mononuclear que media la inmunidad humoral o celular.

Linfocitos T citotóxicos (CTL). Célula T efectora (casi siempre CD8⁺) que puede mediar la lisis de las células blanco que tienen péptidos antigénicos en complejo de una molécula de MHC. Casi siempre surge de una célula T_C activada por un antígeno.

Linfoma. Tumor maligno de los linfocitos T o B que suele originarse en los tejidos linfoides y extenderse entre ellos, pero que pueden diseminarse a otros tejidos. Los linfomas a menudo expresan características fenotípicas de los linfocitos normales de los que derivaron.

Macrófago. Leucocito fagocítico mononuclear que participa en la inmunidad adaptativa e innata. Hay muchos tipos de macrófagos; algunos son migratorios, mientras que otros están fijos en los tejidos.

Metástasis. La metástasis es la diseminación a órganos distantes de una infección o de un tumor primario maligno o cáncer, que ocurre generalmente por vía sanguínea o linfática.

Microambiente. En investigación *in vitro*, se refiere al conjunto de todas las condiciones e influencias externas que afectan un cultivo y el desarrollo del mismo.

Monocito. Leucocito fagocítico mononuclear que circula poco tiempo en la corriente sanguínea antes de migrar a los tejidos donde se convierte en *macrófago*.

Monoclonal. Derivado de una célula.

Mycobacterium. Genero de bacterias aerobias, muchas especies de las cuales pueden sobrevivir en el interior de los fagocitos y provocar enfermedad. La principal defensa del huésped frente a las micobacterias como *M. tuberculosis* es la inmunidad celular.

Necrosis. Tipo de muerte causada por daño a la célula. Cambio morfológico que acompaña a las células en grupos y que liberan grandes cantidades de componentes intracelulares al ambiente, lo que causa interrupción y atrofia del tejido.

Neoplasia. Es el proceso de proliferación anormal de células en un tejido u órgano que desemboca en la formación de un neoplasma.

Nódulo linfático. Son pequeñas agrupaciones celulares con forma de frijol que se encuentran en todo el cuerpo y se conectan mediante los vasos linfáticos.

Operón. Es una unidad de la expresión y regulación genética bacteriana, incluyendo genes estructurales y elementos de control en el ADN reconocido por el producto de un gen regulador.

Organogénesis. La Organogénesis es el conjunto de cambios que permiten que las capas embrionarias ectodermo, mesodermo y endodermo, se transformen en los diferentes órganos que conforman un animal. Debemos recordar, que antes de esto, ocurre la formación de órganos rudimentarios, quiere decir, la formación de órganos sin forma ni tamaño definido.

Osteoclasto. Es una célula multinucleada que degrada y reabsorbe hueso. Así como el osteoblasto, es implicado en el remodelación de hueso natural. Deriva de células hematológicas

Patogénesis. Capacidad de un microorganismo de causar enfermedad. Existen múltiples mecanismos que pueden contribuir a la patogenicidad, como la producción de toxinas, la estimulación de las respuestas inflamatorias del huésped y la alteración del metabolismo de la célula huésped.

Proliferación. Es una reproducción rápida de los tejidos. Las células del cáncer son sumamente prolíficas, con tasas altas de división y crecimiento celular.

Promotor. Es una región del ADN que participa en la unión del ARN polimerasa para iniciar la transcripción.

Proteína transmembranal. Es un componente de la membrana; una región hidrofóbica o regiones de la proteína residen en la membrana, y las regiones hidrofílicas están expuestas a uno o ambos lados de la membrana.

Quimiocina. Cualquiera de los diversos polipéptidos de bajo peso molecular secretados que median la *quimiotaxis* para diferentes leucocitos y regulan la expresión y la adhesividad de las *integrinas* leucocitarias.

Receptor. Receptor de la superficie de un linfocito que se une a un complejo antigénico, y que suministra señales necesarias para una activación óptima del linfocito. Las moléculas CD4 y CD8 son los correceptores de las células T que se unen a partes no polimórficas de la molécula del MHC al mismo tiempo que el TCR se une a los residuos polimórficos y al péptido unido.

Respuesta innata. El sistema inmunitario innato comprende las células y los mecanismos que defienden al huésped de la infección por otros organismos, de forma no específica.

Esto significa que las células del sistema innato reconocen, y responden a, patógenos de forma genérica, pero distinto al sistema inmunológico adaptativo, no confiere inmunidad a largo plazo o protectora al huésped.[1] El sistema inmunológico innato proporciona defensa inmediata contra la infección, y es encontrado en todas las clases de vida animal y vegetal.

RPMI. Medio de cultivo celular que contiene una mezcla de sales enriquecida con aminoácidos y otros componentes esenciales para el crecimiento celular.

Sarcoma de Kaposi. Lesión neoplásica caracterizada por múltiples nódulos azulados en la piel y hemorragias, es frecuente en los pacientes con SIDA.

Sarcoma. Tumor de tejido de sostén o conectivo.

Sincitiotrofoblasto. Es la capa celular periférica que recubre las vellosidades coriónicas y regula el pasaje transcelular de nutrientes, solutos y agua manteniendo el crecimiento fetal normal1-3.

Sincicio. También llamados células gigantes multinucleadas, masa de citoplasma conteniendo varios núcleos delimitados por una sola membrana, este es formado como resultado de la fusión de células o series incompletas de ciclos de división celular.

Síndrome de inmunodeficiencia adquirida SIDA. Deficiencia del sistema inmunitario que se adquiere tras el nacimiento, a consecuencia de una infección por el VIH-1, y no está relacionada con un defecto genético.

Suero. Porción líquida de la sangre que carece de células y factores de coagulación.

Terapia antirretroviral de alta actividad (HAART). Terapia de combinación para la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) consistente en inhibidores de la transcriptasa inversa y un inhibidor de la proteasa. La HAART reduce los títulos del virus en el plasma a niveles indetectables durante más de un año y lentifica la progresión a la enfermedad por VIH.

Timina. Base pirimídica que se encuentra en el ADN

Transcriptasa inversa. Enzima codificada por retrovirus, como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), que sintetiza una copia de ADN del genoma viral a partir de un molde genómico de ARN. La transcriptasa inversa purificada se usa extensamente en la investigación de biología molecular para la clonación de ADN complementario que codifique un gen de interés a partir del ARN mensajero. Los inhibidores de transcriptasa inversa se utilizan como fármacos para el tratamiento de la infección por VIH.

Transfección. La transfección consiste en la introducción de material genético externo en células eucariotas mediante vectores víricos u otras herramientas para la transferencia.

Viabilidad. Condición que hace posible la vida y el desarrollo de una célula.

Virón. Es la partícula física viral (de forma independiente de su capacidad de infectar células y reproducirse).

Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1). Retrovirus que infecta las células T CD4⁺ humanas y causa el síndrome de inmunodeficiencia humana (SIDA).

Virus. Microorganismo parásito intracelular obligado primitivo o partícula infecciosa que consta de un genoma de ácido nucleico sencillo empaquetado en una cápside proteica, en ocasiones rodeada de una envoltura de membrana. Muchos virus animales patógenos causan una amplia gama de enfermedades. Las respuestas inmunitarias humorales contra el virus pueden lograr bloquear la infección de las células, y las células NK y los CTL son necesarios para destruir las células ya infectadas.