



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA

**ESTUDIO DE LA ESTEQUIOMETRÍA DE LA FUSIÓN
CELULAR MEDIADA POR LAS PROTEÍNAS DE LA
ENVOLTURA DEL VIH Y SU RELEVANCIA COMO
MECANISMO PATOGENICO EN EL SIDA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

QFB. NAYALI A. LÓPEZ BALDERAS



MÉXICO, D.F.

2009



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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	Dr Ruy Pérez Tamayo
SECRETARIO	Dr. Carlos Larralde
VOCAL	Dra. Beatriz Gómez
VOCAL	José Moreno Rodríguez
VOCAL	Dr. Luis Padilla

ESTA TESIS SE DESARROLLÓ EN EL
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA, UNAM.

QFB. Nayali A. López Balderas
Sustentante

Dr. Carlos Larralde
Asesor de Tesis

Dra. Leonor Huerta
Co-asesora

**ESTA TESIS LA DEDICO A MI MADRE, SIN SU AYUDA NO
HABRÍA SIDO POSIBLE ESTE MOMENTO.**

**LA DEDICO A PABLO Y A PABLITO, CON QUIENES ES UN
PLACER COMPARTIR TODO, POR QUE ME IMPULSAN A
MEJORAR CADA DÍA, PERO SOBRE TODO POR QUE ME HACEN
MUY FELIZ.**

DECISIÓN

¿TE ACUERDAS DEL PRIMER PASO QUE DISTE Y CON QUE, HASTA
AHORA, SIGUES SIN PARAR?

VIDA

QUE LA ARENA DE MI PROPIO PENSAMIENTO CUBRA LAS
HUELLAS DE MIS PIES.

Perfiles, 1957

Pensamientos de Luz

Karol Wojtyła, Juan Pablo II

AGRADECIMIENTOS

- A toda mi familia por su apoyo y confianza.
- Al Dr. Carlos Larralde, por compartir su conocimiento y experiencia con nosotros.
- A los miembros de mi comité tutor: Dr. Edmundo Lamoyi y Dr. Jaime Más, por su disposición y tiempo para discutir los resultados, así como por brindarme su asesoramiento.
- A la Dra. Leonor Huerta, por su apoyo como codirectora durante la elaboración de éste proyecto, por su disposición para discutir los resultados, escuchar propuestas y brindarme consejos.
- A mis compañeros de laboratorio, Evelyn, Guillermo y Guadalupe, por su ayuda incondicional, compañía y apoyo durante estos años.
- Al Dr. Morales y su grupo por su apoyo.
- A CONACyT por la beca de Doctorado (No. de registro 186633) y la beca en el proyecto de investigación N° 61425.

- A la DGEP por la beca complementaria de Doctorado.
- A los investigadores asignados como Jurado por el tiempo dedicado a la revisión de esta Tesis.
- Al Dr. Gabriel Orozco Hoyuela y la Dra. Yamel S. Ugartechea por los videos en el microscopio confocal y la técnica de fotoblanqueamiento.
- A Carlos Castellanos por realizar la purificación de los sincicios.
- A la Dra. Carmen A. Ávila por su apoyo y ánimo.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	i
RESUMEN	4
ABREVIATURAS	8
INTRODUCCIÓN	12
1. MEMBRANAS BIOLÓGICAS.	
a. FUSIÓN DE MEMBRANAS BIOLÓGICAS.	12
b. MECANISMO DE FUSIÓN EN MEMBRANAS BIOLÓGICAS.	15
c. PROTEÍNAS FUSOGÉNICAS.	18
2. VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH-1) Y SIDA.	
a. DESCUBRIMIENTO DEL VIH.	22
b. CARACTERÍSTICAS DEL VIH-1.	26
c. CICLO DE REPLICACIÓN DEL VIH-1.	28
d. CURSO DE LA INFECCIÓN POR EL VIH-1.	30
e. BIOLOGÍA DE LOS AISLADOS DEL VIH-1.	34
3. FUSIÓN CELULAR EN LA INFECCIÓN DEL VIH-1.	
a. MECANISMO DE FUSIÓN MEDIADO POR LAS PROTEÍNAS Env DEL VIH-1.	37
b. FUSIÓN CELULAR EN LA INFECCIÓN POR EL VIH-1.	40
c. VIH-1 EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.	45
d. MODELO ANIMAL.	46

4. ESTUDIO DE LA FUSIÓN CELULAR.	
a. METODOLOGÍAS APLICADAS AL ESTUDIO DE LA FUSIÓN CELULAR.	48
b. CITOMETRÍA DE FLUJO Y FRET APLICADOS AL ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LA FUSIÓN CELULAR.	51
5. FUNCIONALIDAD DE LOS LINFOCITOS T CD4⁺.	
a) LINFOCITOS T CD4 ⁺ .	55
b) ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS T CD4 ⁺ .	56
c) FUNCIONALIDAD DE LAS CÉLULAS JURKAT (CD4 ⁺) Y SINCICIOS	57
d) INTERLEUCINA 2 (IL-2).	57
e) CD25: RECEPTOR DE IL-2 (IL-2R).	58
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	59
HIPÓTESIS.	60
OBJETIVOS.	61
JUSTIFICACIÓN.	62
MATERIALES Y MÉTODOS.	63
RESULTADOS.	
1. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO PARA CUANTIFICAR LA FUSIÓN CELULAR.	
a) CITOMETRÍA DE FLUJO Y MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.	74
b) EXPRESIÓN DE gp120 EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA.	77
c) DETECCIÓN DE FRET CON MICROSCOPIA CONFOCAL.	79

2. COMPOSICIÓN CELULAR DE LOS SINCICIOS.	
a) VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS DURANTE EL COCULTIVO.	83
b) ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN CELULAR DE LOS SINCICIOS.	87
3. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA COMPOSICIÓN DE LOS SINCICIOS.	
a) EFECTO DE LA PROPORCIÓN INICIAL EN LA COMPOSICIÓN CELULAR DE LOS SINCICIOS.	93
b) EFECTO DE LA EXPRESIÓN DE Env EN LA COMPOSICIÓN CELULAR DE LOS SINCICIOS.	97
4. FUNCIONALIDAD DE LOS SINCICIOS.	
a) ESTÍMULO DE ACTIVACIÓN EN LAS CÉLULAS JURKAT	103
b) EXPRESIÓN DE CD25 DESPUÉS DEL ESTÍMULO DE ACTIVACIÓN.	107
c) EXPRESIÓN DE IL-2 DESPUÉS DEL ESTÍMULO DE ACTIVACIÓN.	111
DISCUSIÓN DE RESULTADOS.	117
CONCLUSIONES.	126
BIBLIOGRAFÍA.	131
ANEXO1: CITOMETRIA DE FLUJO.	150
ANEXO2: FRET EN COLORANTES LIPOFILICOS.	152
ANEXO3: COLORANTES DE HIDROFÍLICOS.	155
ANEXO4: MITÓGENOS FARMACOLÓGICOS.	156
ANEXO 5. INMUNOPRECIPITACIÓN DE GP120.	158
ARTÍCULOS PUBLICADOS.	

RESUMEN

La fusión célula-célula es un acontecimiento esencial para diversos procesos biológicos. No obstante, la fusión inducida por proteínas virales es considerada un evento patogénico. En la infección por el VIH-1 los sincicios se observan en tejidos de pacientes y cultivos celulares infectados, además la aparición de cepas con una alta capacidad inductora de sincicios se ha relacionado con una rápida disminución de células CD4⁺ y progresión a SIDA. Nuestro grupo ha diseñado un método para estudiar la fusión dependiente de las proteínas Env del VIH-1, en el cual se emplean células Jurkat, las clonas HXBc2 y 522 (que expresan la proteína Env) y la clona E6-1 (CD4⁺). Las células se marcan diferencialmente con colorantes fluorescentes (verde y rojo), se colocan en cocultivo y los sincicios se cuantifican por citometría de flujo como partículas con fluorescencia mixta. El método permite analizar diversas propiedades en los sincicios y las células CD4⁺ y Env⁺ que quedan durante la reacción de fusión.

El objetivo de este trabajo fue realizar una caracterización de la composición celular de los sincicios y analizar las implicaciones derivadas de la fusión en la funcionalidad de los mismos. Se optimizó el método para cuantificar la fusión celular entre células linfocíticas T CD4⁺ inducida por el VIH-1. Se observó que en la mayor parte de sincicios cuantificados ocurre tanto mezcla de membranas como de contenidos celulares y que el 60% contiene sólo de 2-4 núcleos por lo que no existe un aumento considerable en su tamaño. Un 80-70% de los sincicios permanece viable después de 8 horas de cocultivo y el resto se encuentra en apoptosis temprana. En el análisis de la

composición celular se encontró que una célula Env⁺ puede fusionarse con más de una célula CD4⁺ provocando una disminución en la población de células CD4⁺ circundantes. La incorporación de células CD4⁺ a los sincicios aumentó al incrementarse la proporción inicial de células CD4⁺ en el cocultivo, como consecuencia los sincicios presentaron también un aumento en su tamaño y granularidad. El nivel de expresión de la proteína Env no afecta el reclutamiento de células CD4⁺ en los sincicios, más bien determina la cantidad de sincicios formados.

Al estudiar la funcionalidad celular de los sincicios, se encontró que un 30-35% responden al estímulo de activación expresando CD25 en la membrana plasmática y sintetizando IL-2; sin embargo, la respuesta de los sincicios no fue la suma de las células individuales, sino más bien semejante a la respuesta de las células Env⁺. Adicionalmente, los sincicios que más incorporan CD4⁺ tienen una respuesta al estímulo de activación disminuida, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa, por lo que concluimos que la composición celular no afecta la funcionalidad de los sincicios.

En este trabajo se demuestra que la fusión entre linfocitos T CD4⁺ mediada por las proteínas del VIH-1 a tiempos cortos de cocultivo genera sincicios pequeños que permanecen viables y funcionales, los cuales tienen la capacidad de responder a estímulos exógenos y participar en la comunicación intercelular, ya que podrían activar células circundantes.

ABSTRACT

Cell-cell fusion is essential for many biological processes. However, fusion induced by viral proteins is considered a pathogenic event. In HIV-1 infection syncytia are seen in tissue patients and in cell infected cultures, as well as the emergence of strains with a high capacity of inducing syncytia has been associated with a rapid decline in CD4⁺ cells and progression to AIDS. Our group has designed a method to study the fusion-dependent Env HIV-1 protein, in which Jurkat cells, the clones HXBc2 and 522 (expressing Env protein) and clone E6-1 (CD4⁺) are used. These cells are differentially marked with fluorescent dyes (green and red), are placed in coculture and syncytia are quantified by flow cytometry as double fluorescence particles. The method allows the analysis of a variety of properties in syncytia and in the CD4⁺ and Env⁺ remaining in the fusion reaction.

The aim of this study was to characterize the cellular composition of syncytia and analyze the implications in their functionality. The method was optimized for quantifying cell fusion between CD4⁺ T lymphocyte cells induced by HIV-1. It was observed that in most quantified syncytia take place both mixture of membranes and of cell contents. Sixty percent of syncytia contain only 2-4 nuclei, so do not have a considerable increase in size, 80-70% of syncytia remain viable after 8 hours of coculture and the rest are in early apoptosis. In the analysis of cellular composition it was found that one Env⁺ cell

could fuse with more than one CD4⁺ cells, causing a decrease in the surrounding population of CD4⁺ cells. The recruitment of CD4⁺ cells by syncytia is directly related to the initial ratio of CD4⁺ cells in coculture, showing a concomitant increase and, as a consequence, syncytia showed also an increase in their size and granularity. The level of expression of Env protein does not affect the CD4⁺ cell recruitment by syncytia; rather determine the amount of syncytia generated.

The study of cellular functionality of syncytia showed that 30-35% respond to the stimulus expressing CD25 in the plasma membrane and synthesizing IL-2; however, the response of syncytia was not the addition of individual cells, but rather was similar to the response to Env⁺ cells. Additionally, the response to activation stimulus from syncytia that recruit more CD4⁺ decreased, although the difference was not statistically significant, so we conclude that the cellular composition does not affect the functionality of syncytia.

This thesis demonstrates that fusion between CD4⁺ T lymphocytes mediated by HIV proteins in short coculture times, generates small syncytia that remain viable, functional, and have the capacity to respond to exogenous stimuli and participate in intercellular communication, which could activate surrounding cells.

ABREVIATURAS

- **ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- **AIM-V:** Medio enriquecido para linfocitos (GIBCO), sin suero fetal bovino
- **APC:** Alofocianina, Abs630nm/Em655nm, se detecta en el cuarto canal de fluorescencia
- **ARN:** Ácido ribonucleico
- **CD4⁺:** Células Jurkat de la clona E6-1, expresan CD4 y CXCR4.
- **CMFDA:** Di acetato de 5-clorometilfluoresceína. Colorante de citoplasma que emite fluorescencia verde.
- **CMTMR:**(5-(6)-(((4-clorometil) benzoil) amino) tetrametilrodamina. Colorante de citoplasma que emite fluorescencia roja.
- **Cy5:** Molécula fluorescente del grupo de la polimetina, emite fluorescencia en la región del rojo lejano (~650/670 nm)
- **Dil:** Perclorato de 1,1'-dioctadecil-3, 3,3',3'-tetrametilindocarbocianina. Colorante de membrana rojo.
- **DiO:** Perclorato de 3,3'-dioctadeciloxocarbocianina. Colorante de membrana verde.
- **DMSO:** Dimetilsulfóxido.
- **Env⁺ 522:** Línea celular 522F/Y, células Jurkat que expresan las proteínas gp120/gp41 del virus prototipo HXB clona 2 en su membrana, presentan una mutación en gp41 que no les permite fusionarse.

- **Env⁺ HXBc2:** Línea celular HXBc2, células Jurkat que expresa las proteínas gp120/gp41 del virus prototipo HXB clona 2 en su membrana.
- **FACS:** Clasificador células activado por fluorescencia, nombre común para referirse al citómetro de flujo.
- **FITC:** Isotiocianato de fluoresceína. Colorante fluorescente con una emisión en el espectro de luz visible verde
- **F_{max}:** Porcentaje de sincicios formados a 8 horas de cocultivo.
- **FRET:** Transferencia de energía. FRET por sus siglas en inglés fluorescence resonance energy transfer.
- **FSC:** Forward Scatter, detecta la dispersión del láser en un ángulo pequeño (0-10), es proporcional al **tamaño** de la partícula.
- **IL-2:** Interleucina 2
- **IL-2R:** Receptor para Interleucina 2
- **IMF:** Intensidad media de fluorescencia
- **IP:** Ioduro de Propidio
- **MHC II:** Complejo Principal de histocompatibilidad clase II
- **MT2:** Línea celular que proviene de un paciente adulto con leucemia de células T. Las células MT2 son productoras de partículas virales HTLV-1
- **MT4:** Línea celular que proviene de un paciente adulto con leucemia de células T, producen muy bajas cantidades del virus HTLV-1.
- **OMS:** Organización Mundial de la Salud
- **PBMC:** Células mononucleares de sangre periférica, por sus siglas en inglés Peripheral Blood Mononuclear Cell.

- **PBS:** Buffer de fosfatos
- **PMA:** Forbol 12-miristato, 13-acetato, PMA o TPA. Es un compuesto éster del forbol, tiene actividad promotora de tumores y como activador de la proteína cinasa C (PKC).
- **r:** Índice estequiométrico, representa el promedio de células CD4⁺ incorporadas en los sincicios por cada célula Env⁺.
- **R₀:** Proporción inicial de las células al inicio del cocultivo, se expresa como el cociente de CD4⁺/ Env⁺ del porcentaje inicial de las células. R₀>1 representa un mayor número de CD4⁺ y R₀ <1 representa una mayor cantidad de células Env⁺ al inicio.
- **RPMI 10:** Medio RPMI 1640 suplementado con antibióticos (penicilina (50U/mL) y estreptomina (50ug/mL) (Gibco)) más 10% de suero fetal bovino inactivado (Gibco).
- **SFB:** Suero fetal bovino
- **SHIV:** Virus quimera, en el genoma del provirus SIVmac se insertaron las secuencias que codifican para las proteínas Env, Rev, Vpu y Tat del VIH-1
- **SIDA:** Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
- **SIV:** Virus de la inmunodeficiencia de simios
- **SIVcpz, SIVsmm, SIV mac:** Cepas virales del Virus de la Inmunodeficiencia de Simios, las letras minúsculas indican la especie de simio que infecta.
- **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**).

- **TARc:** Tratamiento antirretroviral combinado, equivalente a el HAART, highly active antiretroviral therapy.
- **TCR:** Receptor de células T.
- **VIH-1:** Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1.
- **VIH-2:** Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 2.
- **Virus R5:** Virus VIH-1 que usan CCR5 como correceptor, tienen baja velocidad de replicación y **no forman sincicios** en cultivos de células T, se les considera macrófago-trópicas.
- **Virus X4:** Virus VIH-1 que usan CXCR4 como correceptor, tienen alta velocidad de replicación y **forman sincicios** en cultivos de células T, tienen tropismo por células T.
- **Virus X4R5:** Virus VIH-1 que pueden emplear CXCR4 y CCR5 como correceptor, pueden o no **formar sincicios** en cultivos de células T.

INTRODUCCIÓN

1. MEMBRANAS BIOLÓGICAS

FUSIÓN DE MEMBRANAS BIOLÓGICAS.

La primera célula se originó cuando las herramientas necesarias para llevar a cabo las tres funciones vitales se encontraron confinadas en una vesícula, estas son: poseer macromoléculas para copiar información, llevar a cabo funciones catalíticas específicas y transformar la energía del ambiente en energía química utilizable. Al ocurrir éstas funciones en conjunto se dio el salto a la vida y a la evolución (79). Después de 3.8 billones de años y a pesar de las diferentes funciones que pueden desempeñar, las membranas biológicas aún presentan una estructura común, son una bicapa de lípidos con proteínas estrechamente empaçadas por interacciones no covalentes, forman una barrera semipermeable que encierra a las células, define sus bordes y mantiene las diferencias entre el citosol y el medio extracelular (1).

Adicionalmente, en las células eucariontes las membranas permitieron compartimentar las funciones intracelulares mediante la formación de orgánulos, los cuales presentan diferente composición y funciones entre si y con el citosol. Así mismo, las proteínas contenidas en las membranas, hacen posibles muchas de las funciones celulares como son: actuar como receptores específicos, llevar a cabo el transporte de nutrientes, detritos, proteínas, iones y otras moléculas pequeñas,

participan en la transducción de señales, etc. Por tanto, es preciso mantener la integridad de las membranas, sin embargo, constantemente se llevan a cabo eventos de fusión y fisión entre membranas intracelulares y con la membrana plasmática, estos eventos regulan el tráfico molecular entre orgánulos, entre la célula y el medio exterior o incluso entre células vecinas (98). También puede ocurrir la fusión de las membranas plasmáticas entre dos o más células conduciendo a la formación de células multinucleadas, lo cual es un acontecimiento esencial para diversos procesos fisiológicos (23, 98).

De tal forma, se pueden clasificar los eventos de fusión de membranas biológicas en tres grupos (63):

1. Fusión de membranas intracelulares. Ocurre constantemente entre orgánulos y entre éstos y la membrana plasmática. La fusión puede ser homotípica si ocurre entre compartimientos iguales o bien heterotípica si ocurre entre compartimientos diferentes (98). Debe ser altamente específica y regulada tanto temporal como espacialmente, ya que de esto dependen el transporte endo y exocítico de la célula. Este tipo de fusión de membranas permite entre otras cosas la liberación de neurotransmisores, el transporte de receptores, y de moléculas de señalización a la membrana plasmática, las cuales son necesarias para la comunicación intracelular e intercelular (24, 64, 144).

2. Fusión de patógenos con membranas celulares. Un evento requerido por los virus envueltos para infectar a su célula blanco es la fusión de la membrana viral

con la membrana plasmática o membranas intracelulares (endosomas o lisosomas) de la célula huésped (52). Posteriormente, las células infectadas llevan a cabo la síntesis de proteínas virales y expresan las proteínas de la envoltura viral en su membrana plasmática. Esto les permite fusionarse con otras células no infectadas formando células multinucleadas o sincicios. Dicho evento ha sido considerado un evento patogénico de la infección viral (37).

3. Fusión célula-célula. La fusión entre células es el proceso por medio del cual dos o más células llegan a ser una por medio de la fusión de las membranas plasmáticas y mezcla de los citoplasmas. La capacidad de una célula de fusionarse con otra (fusogenicidad) esta restringida a ciertas estirpes celulares (36). No obstante, es esencial para diversos procesos como son: la fertilización de organismos reproducidos sexualmente (123, 132), la formación de tejidos como el músculo (66) y la placenta (59, 60), y en la diferenciación celular de los osteoclastos (3, 61). También ocurre durante la formación de células gigantes multinucleadas en procesos de inflamación crónica (54, 153) y como un evento patogénico asociado a infecciones virales (37). Asimismo, la fusión celular se ha asociado a la reparación de tejidos por medio de la fusión con células multipotenciales (109, 129, 149), en la reparación de daño en el sistema nervioso durante procesos de inflamación crónica (71), e incluso se considera que puede conferir malignidad o metástasis en ciertos tipos de cáncer (36, 152).

Los diferentes eventos de fusión de membranas pueden variar en cuanto al área de contacto requerida para iniciar la fusión así como en el tiempo necesario para concluir en la mezcla de contenidos (63).

MECANISMO DE FUSIÓN EN MEMBRANAS BIOLÓGICAS.

Los modelos con bicapas de lípidos (libres de proteínas) han sido una herramienta importante en el estudio de la fusión de membranas biológicas, ya que con base en los estudios teóricos y experimentales con bicapas de lípidos se generó un modelo que podría explicar los eventos necesarios para que dos membranas se fusionen, éste se basa principalmente en la hipótesis del “tallo de fusión” (Fig. 1) o hemifusión (26, 29, 82). Este modelo se puede resumir en al menos 5 etapas:

1) Acercamiento: Las bicapas deben aproximarse a distancias muy cortas. En esta etapa se requiere energía para remover las moléculas de agua entre las dos bicapas y vencer las fuerzas de repulsión entre las cabezas polares de los fosfolípidos (63,64).

2) Perturbación local: La cercanía de las bicapas no es suficiente para que ocurra la fusión, se requiere aplicar fuerzas externas para crear una perturbación local en los lípidos para que se inicie la fusión. Posteriormente, los lípidos se reorganizan con el propósito de minimizar la exposición de superficies no polares al medio acuoso (27).

3) Hemifusión o “tallo de fusión”: La perturbación local en la estructura de los lípidos permite que las monocapas externas la bicapa (monocapas cis) entren en contacto y se fusionen (63, 83), mientras que las capas internas o distales (trans) permanecen intactas. Ésta estructura se denomina “tallo de fusión” o hemifusión, una conexión inicial de lípidos entre las caras proximales de las membranas (27, 30, 82).

4) Expansión: El intermediario de hemifusión progresa a formar el diafragma de hemifusión. El modelo sugiere que el diafragma de hemifusión se expande radialmente hasta que la tensión lateral acumulada desestabiliza la estructura provocando la apertura de uno o varios poros de fusión pequeños que conducen a la fusión de las dos capas distales (29). Sin embargo, en estudios posteriores (141) se identificaron espacios hidrofóbicos vacíos (intersticios hidrofóbicos) que inevitablemente se formarían con el intermediario de hemifusión (Fig. 1). La generación de los espacios hidrofóbicos hace una contribución muy grande a la energía necesaria para formar el diafragma de hemifusión por lo que no podría llevarse a cabo en un sistema real. Se sugirió entonces que el sistema tiende a minimizar estos espacios por medio del doblaje de las capas distales llevándose a cabo una transición directa de la hemifusión al poro de fusión (141). Posteriormente, se propuso que los espacios vacíos son ocupados por el empaquetamiento oblicuo de las colas hidrofóbicas con respecto a la superficie de la membrana, y que esta inclinación de las colas podría tener un papel importante en el grado de libertad interno de las monocapas que permitiría liberar energía (Fig. 1). Con esta

reorganización, la energía se minimizaría hasta 4 veces, por lo que incrementa la probabilidad de que se lleve a cabo en sistemas reales (83, 84).

5) Formación del poro de fusión: La expansión del diafragma de hemifusión culmina con la fusión de las capas distales y se forma el poro de fusión, por lo tanto se establece una conexión acuosa entre los volúmenes inicialmente separados por las membranas opuestas (28).

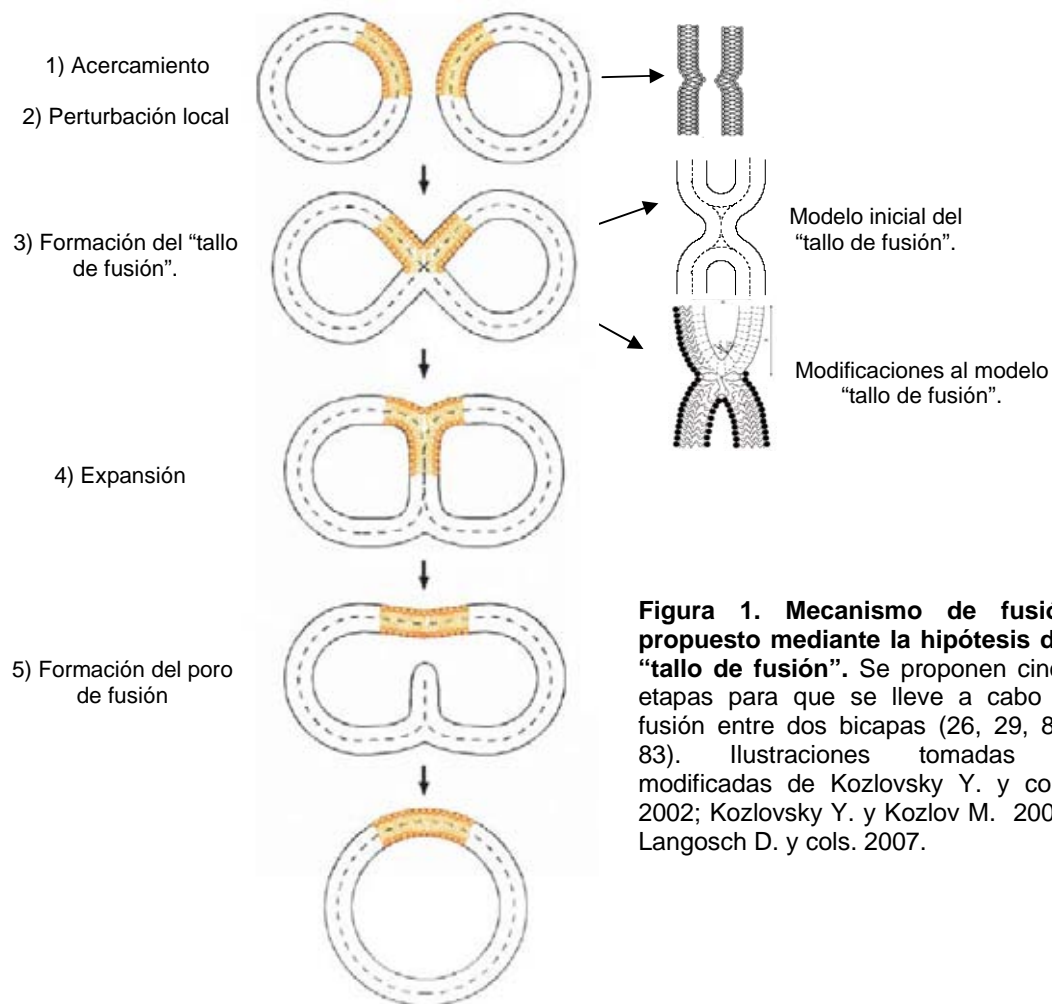


Figura 1. Mecanismo de fusión propuesto mediante la hipótesis del "tallo de fusión". Se proponen cinco etapas para que se lleve a cabo la fusión entre dos bicapas (26, 29, 82, 83). Ilustraciones tomadas y modificadas de Kozlovsky Y. y cols. 2002; Kozlovsky Y. y Kozlov M. 2002; Langosch D. y cols. 2007.

Se ha identificado el intermediario de hemifusión durante la fusión intracelular de vesículas (48, 98), en la fusión virus-célula (101) y en la fusión célula-célula mediada por proteínas virales (9, 122). Por lo tanto, se considera que el modelo de hemifusión proporciona un concepto coherente que podría explicar las etapas de transición en la fusión de membranas biológicas (27).

No obstante, las proteínas contenidas en las membranas biológicas podrían tener una importante intervención en las diferentes etapas de la fusión. Las proteínas fusogénicas que mejor se han caracterizado son las proteínas de fusión virales (Tabla 1a). Por el contrario, en el caso de la fusión célula-célula no mediada por proteínas virales, la identificación de las proteínas fusogénicas ha sido un proceso difícil, ya que podrían participar más de una proteína y cada una de éstas presentar funciones adicionales a la de mediar la fusión celular. Sin embargo, se han logrado identificar algunas proteínas esenciales en los diferentes eventos de fusión en mamíferos (Tabla 1b), principalmente en ratón y en humano (109).

PROTEÍNAS FUSOGÉNICAS.

Las proteínas implicadas en la fusión celular pueden dividirse en tres grupos:

- a) Las proteínas que participan antes de la fusión, relacionadas principalmente en la unión;
- b) Las proteínas mediadoras de fusión, aquellas que inducen la formación del poro de fusión y que se les ha denominado fusogénicos, por último,
- c) Las proteínas que conducen a la extensión del poro de fusión y llevan a cabo la mezcla de las membranas (110).

Se ha propuesto que las proteínas fusogénicas deben presentar cinco características: 1) Ser esenciales en la fusión celular, 2) Expresarse en el sitio y tiempo de fusión, 3) Ser capaces de fusionar células que normalmente no lo hacen, 4) Formar sincicios cuando son expresadas por células heterólogas y 5) Formar sincicios en sistemas in vitro (110).

Las proteínas de fusión virales (Tabla 1a) son las que más se han estudiado, éstas catalizan la fusión por medio de cambios conformacionales irreversibles, en algunas se ha identificado una región hidrofóbica de más o menos 15 aminoácidos usualmente enriquecida de residuos alanina y glicina, la cual se ha denominado péptido de fusión (77, 115). Se propone que al insertarse en la membrana de la célula blanco el péptido de fusión genera un desorden en los lípidos de la monocapa, el cual permite iniciarla fusión de las capas externas (108, 117). También se propone que los cambios conformacionales que ocurren en las proteínas virales generan la energía necesaria para inducir la fusión de las membranas (98).

En la fusión no mediada por proteínas virales no se ha determinado el mecanismo exacto de fusión ni se han identificado con certeza las proteínas involucradas en cada etapa de la fusión, aunque se observó que ciertas proteínas están relacionadas con más de un evento de fusión o bien algunas de ellas pertenecen a la misma familia de proteínas. Por lo cual se ha propuesto que podría existir un mecanismo en común entre los diversos eventos de fusión (109).

a) Proteínas de Fusión Virales		
Clasificación	Características	Familias de virus
Clase I	Son heterotrimeros en estado metaestable, presentan dominios con estructura de α -hélices, el péptido de fusión se encuentra no expuesto.	Retrovirus (HIV), Coronavirus, Ortomixovirus y Paramixovirus
Clase II	Se encuentran como homo o heterodímeros en estado metaestable, predominan los dominios con estructura de láminas β .	Flavivirus y Togavirus
Clase III	Exhiben dominios tanto de α -hélices como de láminas β .	Rhabdovirus y Herpesvirus
b) Proteínas de Fusión en Mamíferos (humano y ratón principalmente)		
Proteínas	Características	Evento de fusión
Fertilina (ADAM-2)	Familia ADAM	Fusión de espermatozoide-óvulo.
CD9	Familia Tetraspanina	Fusión de espermatozoide-óvulo., formación de osteoclastos y fusión de mioblastos
DC-STAMP	Receptor de 7 asas transmembranales	Fusión entre macrófagos, formación de osteoclastos.
Sincitina-1	Proteína Env del retrovirus endógeno HERV-W	Formación del sinciotrofoblasto.
Izumo	Súper familia de las Ig, proteína transmembranal tipo I	Fusión de espermatozoide-óvulo.
Meltrina α (ADAM-12)	Familia ADAM	Formación de osteoclastos y fusión de mioblastos
ARP	Familia CRISP	Fusión de espermatozoide-óvulo,
CD81	Familia Tetraspanina	Fusión de espermatozoide-óvulo, formación de osteoclastos y fusión de mioblastos
SIRP α (MFR)	Súper familia de las Ig. Se une a CD47	Fusión entre macrófagos
CD44	Receptor de hialuronan	Fusión entre macrófagos
Sincitina-2	Proteína Env del retrovirus endógeno FRD	Formación del sinciotrofoblasto
CD47	Súper familia de las Ig, Proteína asociada a integrinas.	Fusión de espermatozoide-óvulo, fusión entre macrófagos, formación de osteoclastos
Ciritestina (ADAM-3)	Familia ADAM	Fusión de espermatozoide-óvulo,
ADAM 9	Familia ADAM	Fusión entre macrófagos
CD200 y CD200R	Súper familia de las Ig	Formación de osteoclastos

Tabla 1. Proteínas fusogénicas. a) Proteínas virales implicadas en la fusión virus-célula y **b)** Proteínas asociadas a los eventos de fusión célula-célula presentes en mamíferos. Revisadas en detalle en las siguientes referencias: (4,54, 59-61, 66, 132, 153, 156).

En este contexto, se han propuesto dos hipótesis que intentan explicar el mecanismo de fusión entre membranas biológicas. La primera de ellas, se apoya en el modelo de hemifusión y sugiere que las proteínas podrían participar al promover la proximidad de las membranas, al provocar la curvatura y remodelación de las membranas, al regular la composición de lípidos, por ejemplo se ha observado que la translocación de la fosfatidilserina a la capa externa de la membrana es necesaria para ciertos sistemas de fusión celular (94), o al ajustar las proteínas necesarias en la capa externa de la membrana para iniciar la fusión (28, 31). Sin embargo, ésta hipótesis considera que la formación del diafragma de hemifusión y la apertura del poro de fusión se lleva a cabo en un ambiente puramente lipídico. La segunda hipótesis considera que las proteínas podrían además generar poros de fusión proteicos (62, 98).

Debido a que la fusión de membranas al igual que la fusión entre bicapas de lípidos se ve afectada por la composición de las monocapas se apoya más la hipótesis del modelo de hemifusión (26, 28). Por ejemplo, se encontró que la lisofosfatidilcolina (LC) inhibe la formación del intermediario de hemifusión en bicapas lipídicas (133), y si se añade lisofosfatidilcolina la reacción de fusión, ya no se detecta la formación del poro de fusión (30). Adicionalmente, la formación del poro de fusión se ve favorecida por la presencia de lípidos con una curvatura positiva en las monocapas distales (25).

Por lo tanto, la fusión de membranas biológicas se podría resumir de la siguiente manera: a) Las proteínas de unión colocarían las membranas a una distancia entre 10-20nm, mediante el reconocimiento y unión a su receptor (Fig. 2a). No obstante, esta región aún estaría llena de proteínas (incluyendo las de la unión), por lo tanto se debe crear una zona libre de proteínas, lo cual podría ser mediado por las interacciones entre la membrana y las proteínas de citoesqueleto (Fig. 2b). Después del acercamiento de las membranas, las monocapas deben ponerse en contacto (Fig. 2c) para que pueda formarse el intermediario de hemifusión (Fig. 2d). Estos eventos podrían ser favorecidos por la inserción del péptidos de fusión en la membrana blanco como se ha propuesto en las proteínas virales (31), así como por el plegamiento de las proteínas fusogénicas que permitirían el contacto entre las monocapas externas. Las proteínas también podrían influir en la composición de lípidos e incrementar la concentración de los que favorezcan la formación de hemifusión, como los lípidos de curvatura negativa (26, 28).

Finalmente, se forma el poro de fusión ya sea por la tensión en las membranas o mediante proteínas de citoesqueleto (Fig. 2e), permitiendo la mezcla de los contenidos celulares (Fig. 2f). Se ha considerado que las proteínas de fusión podrían generar la energía necesaria para colocar a las membranas en contacto, así como generar el estrés y la tensión lateral para avanzar del diafragma de hemifusión al poro de fusión por medio de la reorganización de las proteínas o interacciones proteína-proteína (31, 98).

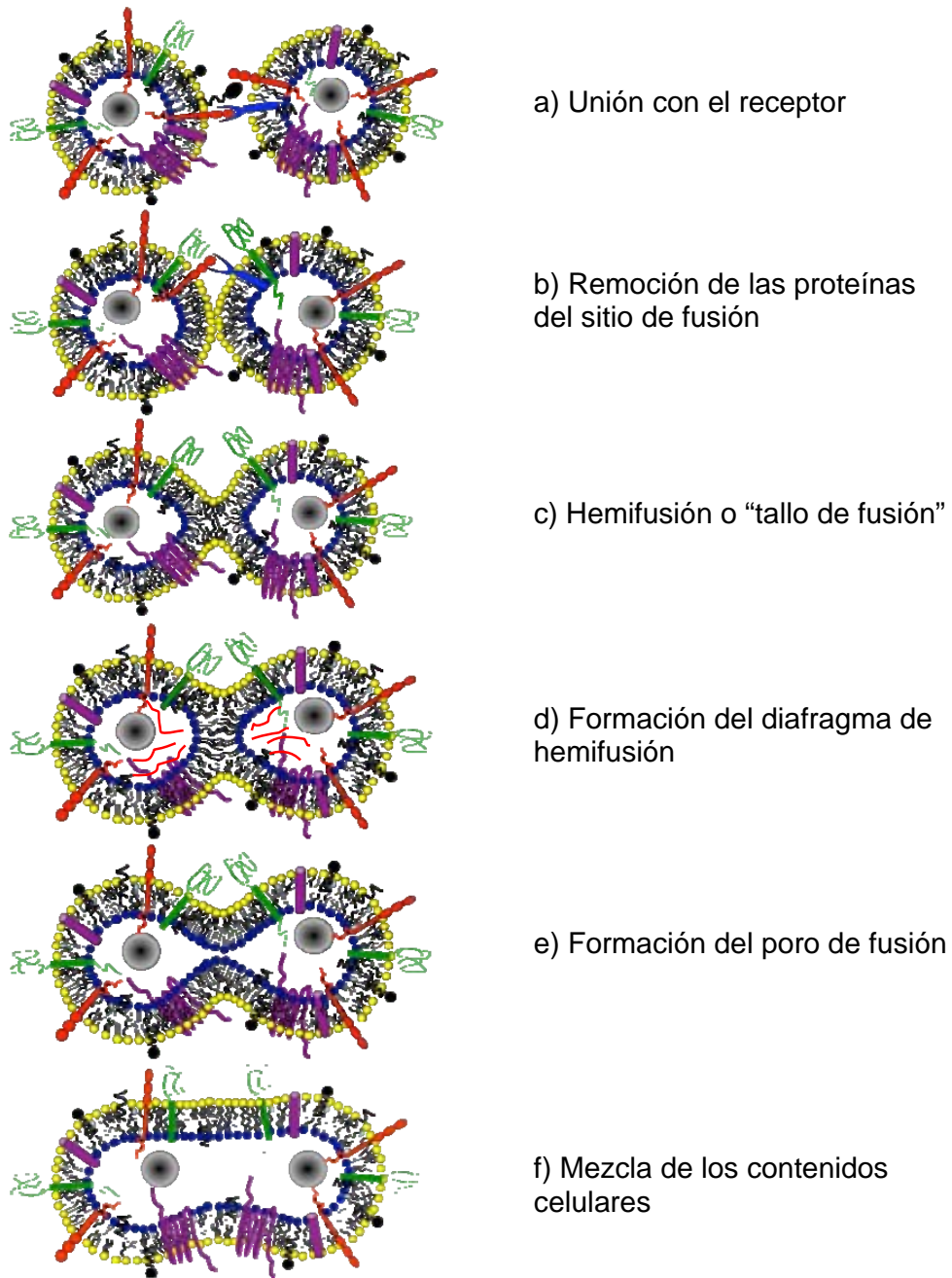


Figura 2. Fusión entre dos células. El modelo propone que la fusión se lleva a cabo en un ambiente puramente lipídico. Las proteínas ayudarían en la unión, el acercamiento y probablemente con una perturbación inicial en los lípidos (péptidos de fusión) para permitir el contacto de las monocapas (a, b), otras podrían ayudar en la expansión del diafragma de hemifusión (d) o influir en la composición de lípidos en la zona de fusión. Ilustración basada en la propuesta de Chernomordik, L. y cols. 2006, 2008 (28, 31).

2. VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH-1) Y SIDA

DESCUBRIMIENTO DEL VIH-1.

El Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (VIH-1) infecta células CD4⁺, la infección se caracteriza por la disminución de células CD4⁺ en mucosas, por una progresiva pérdida y disfuncionalidad de linfocitos T CD4⁺. En la etapa final de la infección se produce el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA).

En 1981, el CDC (Centro para el Control y Prevención de Enfermedades) reconoció los primeros casos de SIDA en Estados Unidos, no obstante fue hasta 1983 que se aisló de un individuo con linfadenopatía generalizada un virus con características morfológicas de retrovirus y con una actividad de transcriptasa inversa, el cual se identificó como el agente causal del SIDA (5), éste hecho fue confirmado por dos grupos más durante 1984. En 1986, se identificó otro virus en pacientes de África que habían desarrollado SIDA, por lo cual este mismo año los virus aislados se renombraron como virus de la inmunodeficiencia humana, VIH-1 y VIH-2, ya que el segundo es genéticamente diferente en más del 40% al VIH-1 (revisado en (87)). Tanto el VIH-1 como el VIH-2 son virus que se originaron de primates africanos que cruzaron la barrera de las especies, del virus SIVcpz (de chimpancés) se originó el VIH-1 y del SIVsmm (de los mangabeye gris) se originó el VIH-2 (69, 139). Sin embargo, el VIH-1 es el principal agente causal del SIDA alrededor del mundo y ha sido clasificado en tres subtipos: M (principal), N (nuevo) y

O (atípico). El subgrupo M es el más común y se divide en 9 subclases en base a diferencias del genoma viral (A-D, F-H, J y K).

La pandemia del VIH-1 sigue constituyendo uno de los desafíos más importantes en enfermedades infecciosas para la salud pública. Según el reporte de la OMS a diciembre de 2006 habían ocurrido más de 25 millones de muertes alrededor del mundo. Hasta diciembre de 2007, vivían en el mundo 33.2 millones (30.6-36.1) de personas infectadas con el VIH, de las cuales aproximadamente 22 millones (20.5-23.6) son originarias de África Subsahariana (67% de la población vive infectada por el VIH-1). Asimismo, cada día más de 6800 personas contraen la infección y más de 5700 fallecen a causa del sida. Durante el año 2007, la OMS reportó que la prevalencia mundial de la infección ha mantenido un mismo nivel, ya que se logró una reducción del número de nuevas infecciones anuales. El número de personas que vive con la infección está aumentando debido a que se han logrado períodos más prolongados de supervivencia, por lo cual se observa una reducción en la mortalidad asociada al VIH.

En México, según las estimaciones más recientes del CENSIDA han muerto 70 mil personas por SIDA y aproximadamente 121 mil personas viven infectadas con el VIH (200 mil, según las estimaciones de la OMS). La principal vía de transmisión en personas de 15 \geq años sigue siendo la transmisión sexual.

CARACTERÍSTICAS DEL VIH-1.

El VIH-1 pertenece a la familia *Retroviridae* y al género *Lentivirus*. La partícula viral está rodeada por una membrana lipoproteica proveniente de la célula hospedera en la cual se insertan 72 complejos de las glicoproteínas de envoltura Env. La membrana rodea la cápside que a su vez encierra al genoma viral (dos hebras de ARN monocatenario positivo), junto con las enzimas: proteasa, transcriptasa inversa e integrasa (35)(Fig. 3).

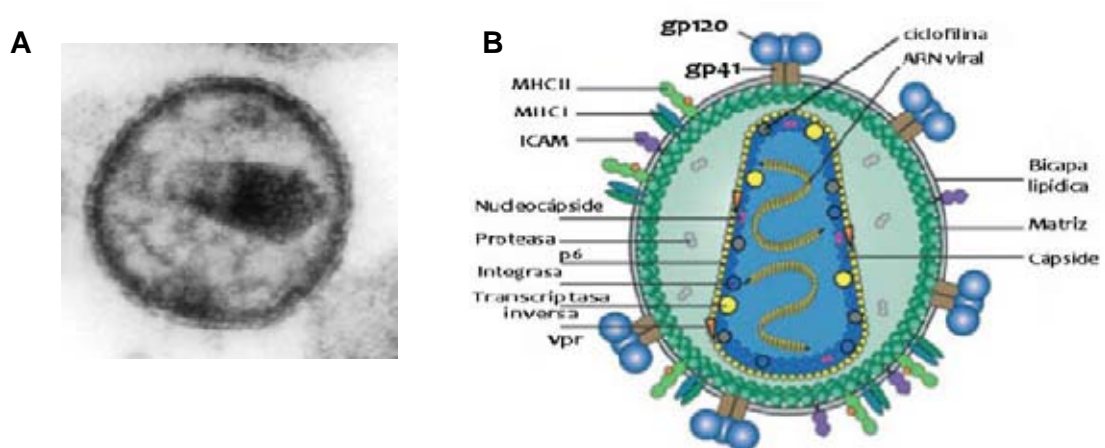


Figura 3. El virus de la inmunodeficiencia Humana. A) Microscopía electrónica del VIH-1, tomada de Oreste JM, 2002, (112). B) Estructura propuesta para la partícula viral del VIH-1, ilustración tomada y modificada de Phogat, S. y cols., 2007 (120).

El genoma del VIH-1 (Fig. 4) contiene nueve genes, tres que codifican precursores poliprotéicos: gag de proteínas estructurales (proteínas de la nucleocápside), pol (genes replicativos), y env (glicoproteínas de envoltura gp120/gp41); dos genes codifican proteínas reguladoras: tat y rev; y el resto codifican proteínas accesorias: vif, nef, vpr o vpx para el VIH-2 (35).

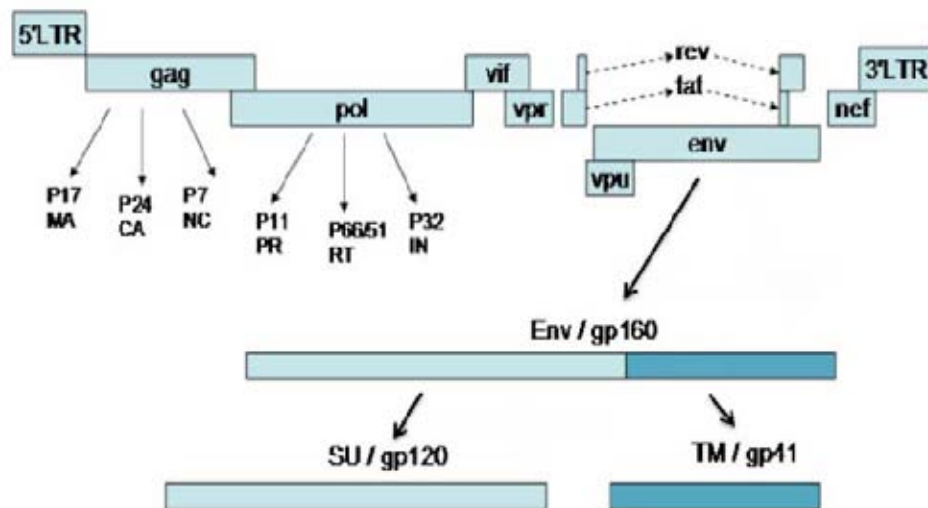


Figura 4. Organización del genoma del VIH. El genoma codifica las proteínas estructurales gag: MA matriz, CA cápside, NC Nucleocápside; proteínas necesarias en la replicación viral: PR Proteasa, RT transcriptasa inversa, IN integrasa; proteínas de envoltura Env (gp120 y gp41), proteínas reguladoras: tat y rev y proteínas accesorias vif, vpr, nef, vpu o vpx. Ilustración tomada y modificada de Costin, JM.2007 (21).

Durante más de 25 años de investigación desde que se identificó al VIH-1, se han llevado a cabo grandes esfuerzos para comprender la patogénesis de la infección (87). Sin embargo, hasta el momento no se ha elucidado un mecanismo único o de mayor relevancia que provoque la pérdida sustancial y disfuncionalidad de células CD4⁺ que conduce finalmente al SIDA, ya que parece ser un proceso multifactorial influenciado por factores inmunológicos, genéticos, virales y ambientales (2). Algunos de los mecanismos que podrían contribuir a la muerte y mal funcionamiento de las células CD4⁺ son: la muerte por infección viral, muerte mediada por células CD8⁺, la activación crónica, falta de regeneración en médula ósea, etc. Asimismo, se han considerado algunas consecuencias indirectas de la infección que adicionalmente podrían provocar la muerte de células CD4⁺, entre los que se han identificado la apoptosis inducida por proteínas virales y la formación de sincicios (2, 87, 99).

CICLO DE REPLICACIÓN.

Los virus envueltos deben fusionar su membrana viral con la membrana de la célula blanco para poder introducir su genoma en el citoplasma e iniciar su ciclo de replicación. Para que se lleve a cabo la infección por el VIH-1, las proteínas de la envoltura viral Env (gp120/gp41) se unen al CD4 y al correceptor para catalizar la fusión con la membrana plasmática y liberar la cápside en el citoplasma (Fig. 6). Posteriormente, el genoma viral se libera al remover el core (o proteínas de la cápside) y se inicia la transcripción inversa de la cadena sencilla de ARN viral de la cual se genera un híbrido ARN-ADN viral; el ARN original es degradado por la ribonucleasa H y enseguida se inicia la síntesis de la cadena de ADN complementario para generar una cadena doble de ADN viral. Consecutivamente, el ADN viral es importado al núcleo y se integra en el genoma de la célula huésped mediante la integrasa viral. Recientemente, se ha observado que el virus requiere de los microtúbulos en el citoplasma para llegar al núcleo. Una vez integrado el genoma viral (provirus) la replicación es lenta, sin embargo factores transcripcionales de la célula estimulan la transcripción del provirus y se generan ARN mensajeros virales que son exportados al citoplasma por la proteína viral Rev. En el citoplasma, los ribosomas celulares catalizan la producción de proteínas virales. Las proteínas de la envoltura viral son insertadas en la membrana plasmática de la célula e interaccionan con las proteínas de matriz para ensamblar una partícula viral, con dos cadenas sencillas de ARN viral, proteínas y enzimas. Al salir de la célula, el VIH se lleva la membrana plasmática que forma la envoltura viral. Las partículas liberadas

maduran por el procesamiento de los precursores proteicos por medio de la proteasa viral (35).

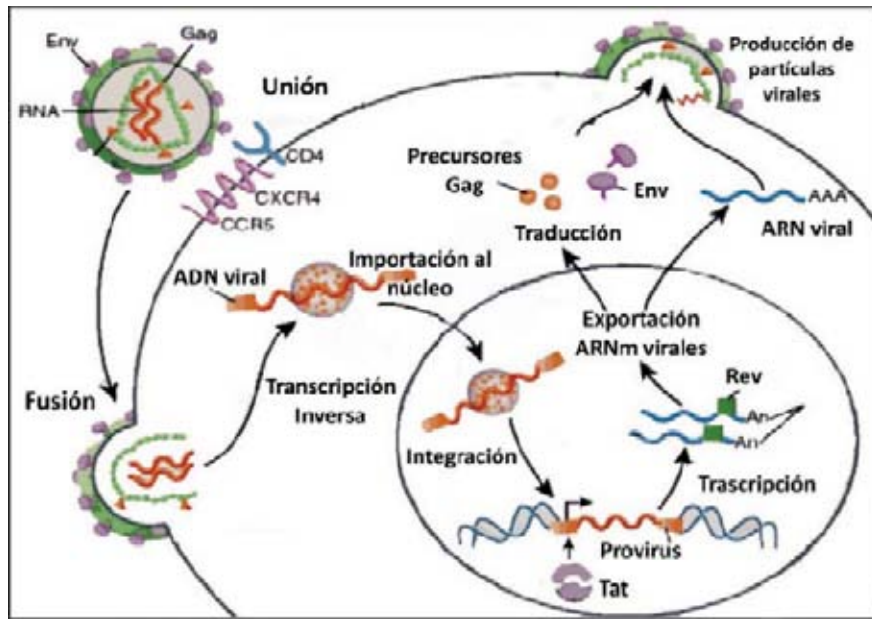


Figura 6. Ciclo de replicación del VIH-1. Después de la unión con el receptor y correceptor se produce la fusión de la membrana viral con la membrana de la célula blanco. Se libera el genoma en el citoplasma e inicia la transcripción inversa para generar el ADN viral que se importa al núcleo y se integra al genoma de la célula hospedera. Se inicia la transcripción de ARN mensajeros virales que se exportan al citoplasma mediante la proteína viral Rev y se traducen a proteínas. En la membrana plasmática se ensamblan y liberan las partículas virales. Ilustración tomada y modificada de Stevenson, M. 2003 (146).

La actividad del genoma viral (provirus) está influenciada por el estado de activación y tiempo de vida media de la célula. La replicación viral es más rápida y eficiente en linfocitos T CD4⁺ activados, sin embargo también puede integrarse en células que se encuentran en reposo y permanecer en estado latente (143). Adicionalmente, se ha reportado que gp120 puede iniciar señalización celular que favorece un estado de activación que contribuye a infección viral (142).

CURSO DE LA INFECCIÓN POR EL VIH-1.

El VIH-1 se encuentra libre o en células infectadas en las mucosas y sangre de los pacientes infectados, por lo cual la transmisión del virus puede ocurrir principalmente por las siguientes rutas: el contacto sexual sin protección, por transfusión de sangre o en el trasplante de órganos; por compartir material de inyección no esterilizado y mediante la transmisión materno-fetal.

El curso de la infección con el VIH-1 en ausencia de un tratamiento antirretroviral se divide en tres etapas: infección primaria (o aguda), infección crónica (asintomática) y progresión a la enfermedad (SIDA).

El curso de la infección varía enormemente entre los individuos infectados (Fig. 5), mientras que algunos progresan a SIDA a partir de 6 meses de la infección aguda otros pueden mantenerse incluso sin tratamiento hasta por 25 años con una cuenta normal de células CD4⁺, sin que a la fecha se conozcan las bases de dichas diferencias

Infección aguda

Esta etapa abarca aproximadamente los primeros 2 a 3 meses después de que un individuo es inicialmente expuesto al VIH, en la que ocurren importantes procesos patogénicos de la infección como la diseminación viral a otros compartimientos, lo cual provoca la generación de reservorios virales en células CD4⁺ de memoria no activadas y la destrucción de linfocitos CD4⁺.

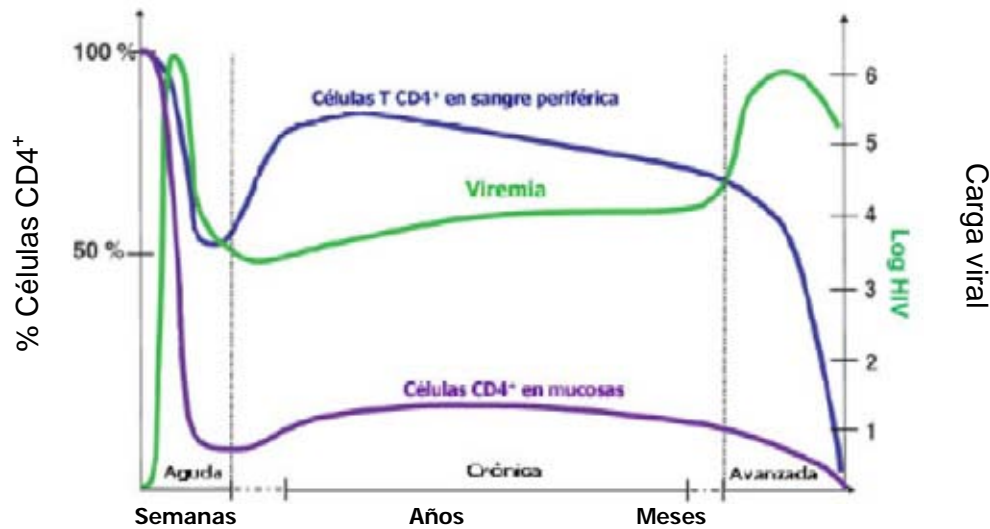


Figura 5. Curso de la infección del VIH en ausencia de tratamiento. Se muestran los porcentajes de dos poblaciones de linfocitos T CD4⁺ (mucosas y en sangre periférica) y el nivel de virus en circulación durante el curso de la infección (viremia). En cada etapa se indica el periodo aproximado de duración. Ilustración tomada y modificada de Grossman, Z. Y cols., 2006, (51).

Durante los primeros días y hasta tres semanas después de la infección se presenta una viremia alta y una disminución notable en la cantidad de linfocitos CD4⁺ en circulación. Sin embargo, la respuesta inmune celular del huésped controla la alta replicación y se produce una recuperación de las células CD4⁺ en circulación, aunque nunca al nivel previo a la infección (Fig. 5). La viremia disminuye hasta alcanzar el punto de equilibrio viral, y el nivel que alcanza es un importante factor de predicción del índice de progresión de la enfermedad (102). De los estudios de cohorte y longitudinales realizados (104, 35) se observó que la media de la carga viral disminuye generalmente a un valor cercano a 30,000 copias/ml después de los 6-12 meses del inicio de la infección, pacientes con medias de carga viral menores (alrededor de 12,000 copias/ml) presentaron progresión lenta, mientras que con mayor carga viral (60,000 copias/ml) mostraron progresión rápida a SIDA. De tal

forma que comparados con pacientes con carga viral entre 5,000-10,000 (progresión lenta), los pacientes con carga viral mayor a 30,000 presentan un riesgo 5 veces más alto de progresar a SIDA en los siguientes 5 años, y los pacientes con carga viral mayor a 100,000 tienen una probabilidad 10 veces más alta de desarrollar SIDA en el mismo tiempo (103). De tal forma, el curso de la infección puede predecirse en los primeros 6 a 12 meses con base en la carga viral y a la cuenta de células CD4⁺ en circulación (103).

En esta etapa, el tejido linfóide asociado a mucosa en el intestino es una de las áreas más afectadas. En los modelos de infección con el SIV en macacos se observó que en el intestino se presenta una alta tasa de infección en células CD4⁺ de memoria (activadas y en reposo), lo que probablemente genera el pico de replicación viral observado. También se observó que entre un 30-60% de los linfocitos CD4⁺ infectados desaparecen dentro de los primeros 4 días de infección (Revisado en 22). En humanos también se observó que el tejido linfóide asociado a mucosa en el intestino presenta la mayor pérdida de linfocitos CD4⁺ en todas las etapas de la infección. La población más vulnerable son los linfocitos T CD4⁺ CCR5⁺ ya que más de la mitad de estas células se pierden, lo que provoca que el paciente entre en la fase de infección crónica con un menor repertorio de células CD4⁺ (13,14).

En esta etapa, la viremia induce síntomas no específicos en un 50-70% de los individuos como son: fiebre, erupción cutánea, faringitis, dolor de cabeza, artralgias, mialgias, pérdida de peso y una linfadenopatía generalizada. Los síntomas pueden

desaparecer entre la tercera o cuarta semana en muchos de los pacientes. En las pruebas de laboratorio se puede presentar linfopenia y disminución en la cuenta de números absolutos de células CD4⁺, así como aumento en la cantidad de células CD8⁺ activadas.

Infección crónica

Después de controlar la infección, se entra en un periodo asintomático, en donde los niveles de virus en circulación se estabilizan y se establece la infección crónica. No obstante, el virus sigue replicándose a una alta tasa en otros tejidos (113), lo que lleva a una constante destrucción y reemplazo de linfocitos T CD4⁺, puede presentarse una disminución gradual en las células CD4⁺ en sangre o permanecer estables hasta que se presenta una disminución rápida. Alrededor del 1% de los pacientes pueden tener una progresión a SIDA muy rápida (1-2 años), lo cual es más frecuente con los virus inductores de sincicios (virus X4), mientras que otros pacientes pueden permanecer con niveles de células CD4⁺ normales hasta por 10-25 años (103).

En ésta etapa muchos pacientes pueden presentar fatiga, linfadenopatía y eventos clínicos menores como infecciones orales por el virus de Epstein Bar, candidiasis oral y vaginal, herpes zoster y otras alteraciones dermatológicas. Conforme avanza la enfermedad, la pérdida de peso y sudoración nocturna son más comunes.

Fase avanzada.

Los pacientes con cuentas de células $CD4^+ \geq 500$ células/mm³ rara vez presentan infecciones oportunistas, pero conforme las células disminuyen aumenta la incidencia de candidiasis oral, infecciones por neumococo, tuberculosis, reactivación de herpes simple y varicela zoster. La disminución de las células $CD4^+$ en circulación por debajo del umbral de 200-300 células/mm³ se acompaña generalmente por un incremento en la carga viral y aparición de las infecciones oportunistas y malignidades. Por debajo de 200 células/mm³ ya se presentan infecciones que ponen en riesgo la vida, como son neumonía por pneumocistis, esofagitis por cándida, histoplasmosis diseminada, encefalitis por toxoplasma, etc. Las infecciones diseminadas por *Mycobacterium avium*, la reactivación de citomegalovirus y criptosporosis ya son indicativas de una pérdida sustancial de células $CD4^+$ por debajo de 50 células/mm³.

BIOLOGÍA DE LOS AISLADOS DEL VIRUS HIV-1.

El receptor primario para el VIH es la molécula CD4, una proteína de 58 kDa miembro de la súper familia de inmunoglobulinas (Ig). CD4 estabiliza la interacción entre el receptor de células T (TCR) en la superficie del linfocito T y el complejo principal de histocompatibilidad clase II (MHC II) en las células presentadoras de antígeno. Los aminoácidos importantes para la unión con gp120 (aa 40-55) traslapan con el sitio de unión de CD4 con su ligando natural (MHC II).

La proteína CD4 se expresa en linfocitos T CD4⁺, en precursores de células T; en eosinófilos, monocitos, macrófagos, células dendríticas y células de la microglía. No obstante, para poder infectar a las células CD4⁺, el VIH requiere adicionalmente de un correceptor, los receptores de quimiocinas CXCR4 y CCR5 se han identificado cómo los principales correceptores empleados por el virus *in vivo*, aunque se ha reportado que podrían utilizar otros receptores de quimiocinas (125). Por lo tanto, a excepción de los eosinófilos el resto de las células CD4⁺ pueden ser infectadas por el VIH (49, 146).

El tipo de correceptor que emplea el VIH-1 es un factor importante para definir el tropismo celular del virus, se asocia con la velocidad de replicación *in vitro* y con la capacidad de formar o no sincicios con linfocitos T CD4⁺ (Tabla 2).

Los virus R5 emplean generalmente CCR5 como correceptor, pueden replicar en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y en macrófagos, pero no en linfocitos T CD4⁺ vírgenes o líneas celulares de linfocitos T CD4⁺. En contraste, los virus X4 usan CXCR4 como correceptor, replican fácilmente en linfocitos T CD4⁺ así como en PBMC (20, 125).

Se ha observado que las cepas R5 son la que establecen la infección y predominan en las etapas tempranas (19), por lo cual al inicio de la infección se presenta solo una disminución moderada de linfocitos CD4⁺ en sangre periférica, ya que el 80-90% son células CD4⁺ virgen y solo expresan CXCR4. Mientras que las cepas X4 generalmente emergen durante el curso de la infección y el surgimiento de

éstas se asocian un incremento en la tasa de pérdida de las células CD4⁺ y progresión a SIDA (81, 127).

Si bien, ambos tipos de virus (R5 y X4) pueden infectar y formar sincicios en cultivos de PBMC (93), solamente los virus X4 tienen la capacidad de inducir la formación de sincicios en cultivos de células CD4⁺ aisladas o líneas celulares como las MT2 que sólo expresan CXCR4 (7).

Además, existen virus con la capacidad de emplear ambos correceptores (virus R5X4) o bien usan CXCR4 para infectar tanto macrófagos como linfocitos T CD4⁺ (50), éstos virus también pueden formar sincicios con células CD4⁺.

Propiedades Biológicas de los Aislados del VIH-1						
Cepa de virus	Replicación en PBMC	Replicación en Macrófagos	Replicación en células T CD4 ⁺		Tasa de replicación <i>in vitro</i>	Fenotipo inductor de sincicios (<i>in vitro</i>)
			Virgen	Memoria		
Virus X4	+	-/+	+	+	Rápida/alta	++
Virus R5	+	+	-	+	Lenta/baja	-
Virus X4R5	+	+	+	+	Rápida/alta	+

Tabla 2. Propiedades biológicas de los virus aislados en la infección del VIH-1. El tropismo celular de los virus se ha relacionado con el tipo de correceptor que emplea, la velocidad de replicación y capacidad de inducir sincicios *in vitro*. Tomada y modificada de Regoes R. Y cols., 2005, (125).

Adicionalmente, los virus R5 inducen un mayor incremento que los virus X4 en la expresión de ARN mensajeros de proteínas asociadas con la polimerización de actina y con cascadas de activación asociada al TCR en linfocitos CD4⁺ en reposo, lo cual podría favorecer la replicación viral y ser la causa por la cual los virus R5

predominen en el establecimiento de la infección y en las etapas tempranas de la enfermedad (142).

Debido a que el fenotipo de las proteínas Env puede cambiar durante la infección, es importante analizar las cepas predominantes en los pacientes para determinar el inicio y pronóstico del tratamiento antirretroviral (154) así como para el desarrollo de fármacos inhibidores (50).

3. FUSIÓN CELULAR EN LA INFECCIÓN DEL VIH-1.

MECANISMO DE FUSION MEDIADO POR LAS PROTEÍNAS DEL VIH-1.

Las proteínas de la envoltura del VIH-1 (Env) son sintetizadas a partir del precursor gp160, el cual es glicosilado y experimenta oligomerización en el retículo endoplásmico donde se asocia no covalentemente formando homotrímeros. Posteriormente, los homotrímeros son transportados al aparato de Golgi donde son proteolíticamente escindidos para generar el complejo glicoproteico maduro; un heterotrímero formado por tres subunidades de superficie (SU) gp120 y tres subunidades transmembranales(TM) gp41 (Revisado en 45, 131).

La subunidad gp120 (Fig. 7A) es altamente glicosilada, se divide en cinco regiones variables (V1-5) y cinco constantes (C1-5), y es aquí en donde se encuentran los sitios de unión a CD4 y al correceptor (Fig. 7D). La subunidad

transmembranal gp41 se divide en: ectodominio, región transmembranal y la cola citoplásmica. En el ectodominio se encuentra el péptido de fusión, las regiones hepta repetidas HR-1 y -2, un loop y la región externa próxima a la membrana (Fig. 7B). Las subunidades gp120 y gp41 se asocian no covalentemente y se expresan en la membrana de las células hospederas (Fig. 7C).

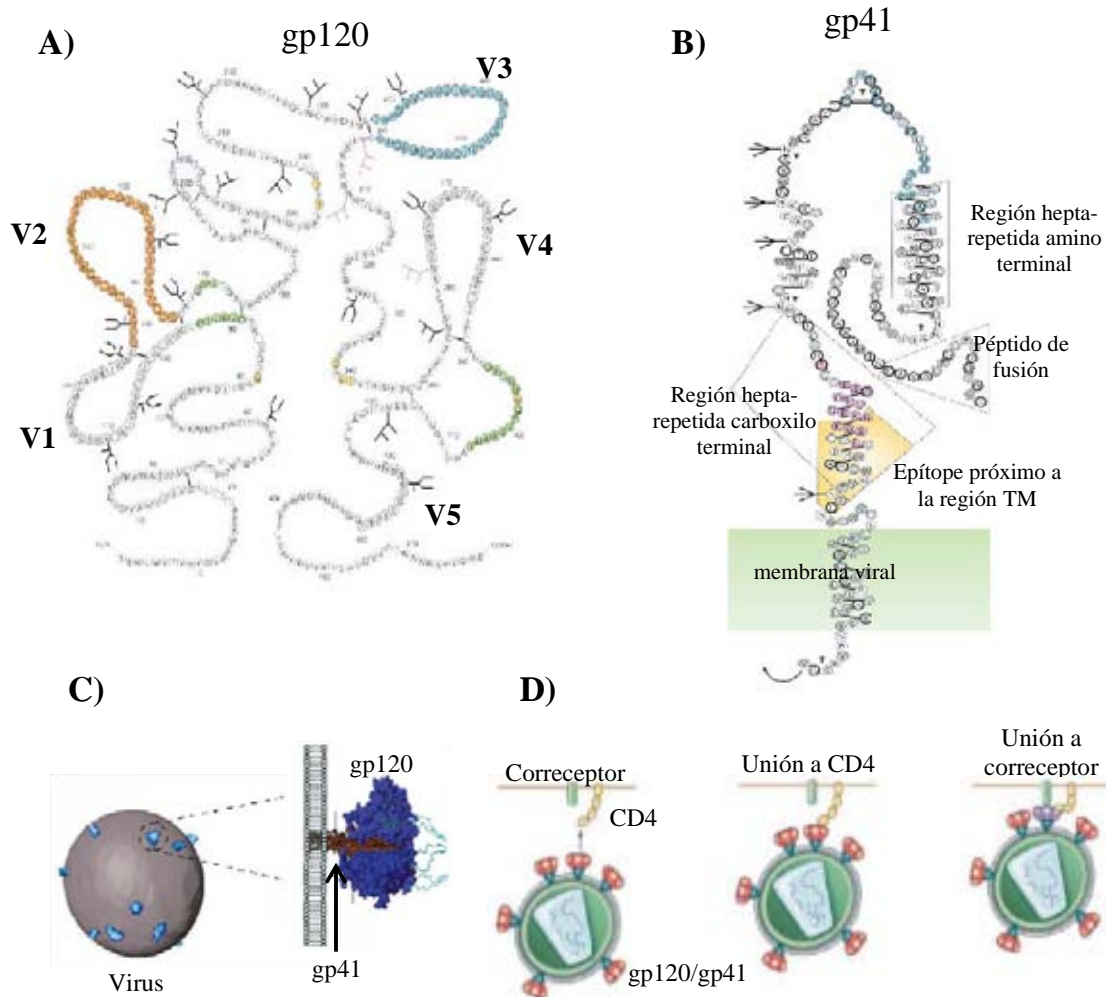


Figura 7. Proteínas de la envoltura viral del VIH-1 (Env). **A).** Estructura lineal propuesta para gp120, se indican las regiones variables (V 1-5). **B).** Estructura lineal propuesta para gp41, se indican las regiones hepta-repetidas, el péptido de fusión. **C).** Complejo tridimensional de los heterotrimeros Env en la membrana viral o en la membrana plasmática de células infectadas. **D).** En la subunidad de superficie se encuentran los sitios de unión a CD4 y a el correceptor. Ilustraciones tomadas y modificadas de: Karlsson HG. y cols., 2008 (75); Zolla-Pazner S., 2004 (158); Liu J. y col.,2008 (91).

La fusión de membranas mediada por las proteínas Env del VIH se lleva a cabo por interacciones secuenciales (Fig. 8), donde se pueden identificar los siguientes eventos: (a) Interacción de la subunidad de superficie gp120 con el receptor CD4 (otras moléculas de adhesión podrían estar colaborando con las primeras interacciones sin ser específicas); (b) La unión con CD4 induce cambios estructurales y conformacionales en gp120 que le permiten ahora interactuar con el correceptor (receptor de quimiocinas), formando un complejo ternario (gp120-CD4-correceptor), (c) Éste suceso induce cambios conformacionales en gp41, se despliegan los dominios HR1 y HR2 (hepta repetidas) y se expone el péptido de fusión que se inserta en la membrana de la célula blanco generando una estructura intermedia que atraviesa las dos membranas y se denomina pre-horquilla, (d) Posteriormente, se disocia gp120 de gp41 y el intermediario puede formar el complejo de fusión trimérico helicoidal al colocar las regiones HR-2 en orientación antiparalela contra las regiones HR-1, generando un paquete de seis hélices, se propone que desde éste momento se reclutan varias subunidades gp41, (e) En la última etapa se propone que un reclutamiento coordinado de trímeros gp41 formando el complejo trimérico helicoidal (una estructura extremadamente estable), es lo que finalmente crea el poro de fusión, permitiendo que ocurra la fusión entre las dos membranas (44, 45, 100, 32).

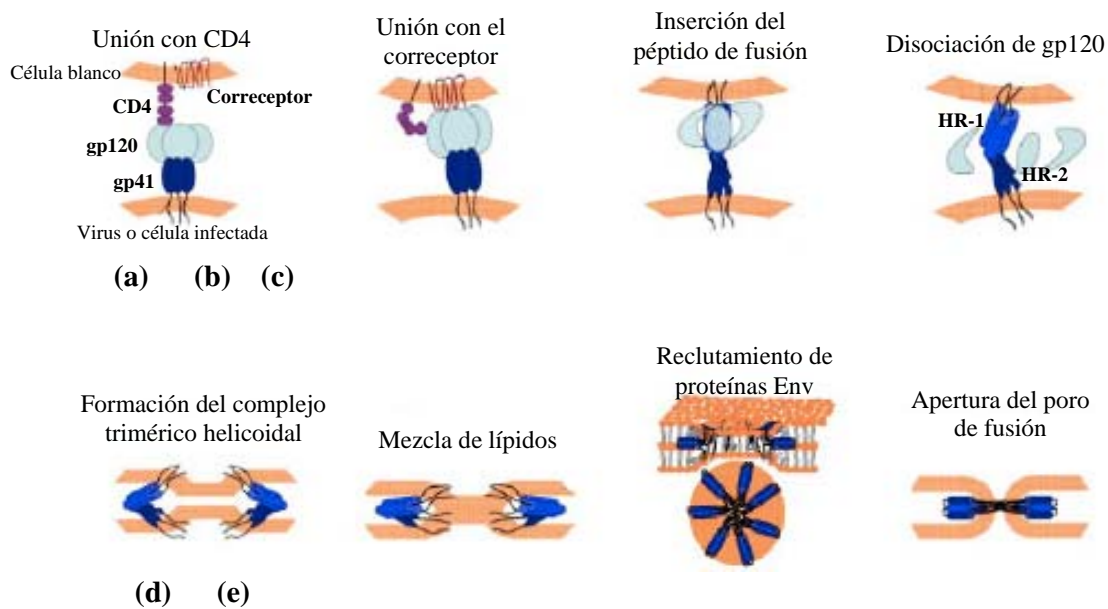


Figura 8. Mecanismo de fusión mediado por las proteínas Env. Es un proceso secuencial que involucra la unión con CD4 (a), la unión con el correceptor (b), formación de la pre-horquilla (c), disociación de gp120 y formación del complejo trimérico helicoidal en gp41 (d), el cual permite a establecer el contacto entre las membranas para iniciar la fusión, formar el intermediario de hemifusión y finalmente crear el poro de fusión (d). Tomado y modificado de Chien, M.P., 2009 (32)

FUSIÓN CELULAR EN LA INFECCIÓN POR EL VIH-1.

Las células infectadas por el VIH expresan las proteínas de la envoltura viral (gp120/gp41) en su membrana plasmática, las cuales les permiten interactuar y fusionarse con células CD4⁺ no infectadas (88). Se propone que ésta interacción inicia con la formación de la denominada sinapsis viral mediada por la unión de CD4 y el correceptor (CCR5 o CXCR4) con el complejo gp120/gp41 en células infectadas. Esta interacción puede desencadenar en diferentes eventos: a) permite la transmisión de virus de una célula a otra; b) se puede presentar un proceso de

hemifusión en el que hay mezcla de lípidos sin llegar a formarse el poro de fusión, provocando la muerte de las células implicadas o bien, c) se lleva a cabo la fusión de las membranas conduciendo a la formación de células multinucleadas (72, 121, 134).

Las células multinucleadas (sincicios) se observan frecuentemente en cultivos celulares infectados por el VIH-1 (88, 143), así como en tejido linfoide, médula espinal y cerebro de pacientes infectados (Fig. 9 y Tabla 3). La formación de sincicios se relaciona con el reclutamiento y muerte de células CD4⁺ no infectadas, en consecuencia se considera un efecto citopático indirecto que podría contribuir a la disminución de células T CD4⁺ (99, 146).

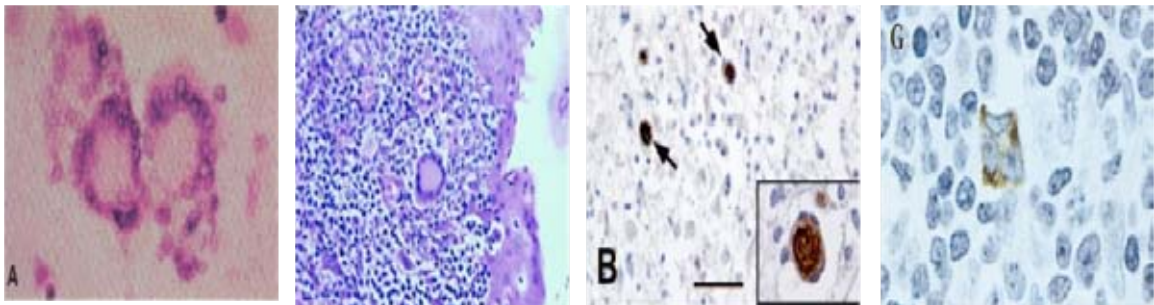


Figura 9. Sincicios observados en tejidos de pacientes infectados con el VIH. A) Sincicio observado en cerebro, se detectó ARN viral (80). B) Sincicio observado en amígdalas, tinción hematoxilina-eosina (34). C) Sincicio observado en cerebro, positivo para p24 (107). D) Sincicio observado en nódulo linfoide, positivo para p24, morfología semejante a linfocito T (111).

Los sincicios observados *in vivo* y en cultivos celulares infectados expresan antígenos virales (proteína viral p24), por lo que son considerados sitios de replicación viral activa (42, 112, 128), incluso se ha considerado que los sincicios son la mayor fuente de replicación y liberación de virus en cultivos, ya que se

observó que los sincicios expresan mayor cantidad de proteína viral p24 (mayor intensidad media de fluorescencia), y liberan mayor cantidad de virus (cuantificados por microscopía electrónica de transferencia) que las células individuales (148). Así mismo, al inhibir la formación de sincicios en un cultivo infectado por medio del anticuerpo monoclonal antiCD4 se redujo de tres a cinco veces la cantidad de virus en el sobrenadante (33).

También se observó que los sincicios pueden albergar un mayor número de provirus que las células individuales lo cual favorece la recombinación y genera diversidad viral (145).

Respecto al tiempo que los sincicios permanecen viables se han generado diversas opiniones. A partir de estudios *in vitro* algunos consideran a los sincicios como entidades desordenadas que mueren rápidamente por apoptosis (40, 117-119, 136). Otros han reportado que son entidades bien estructuradas y viables por un periodo de hasta 90 horas en cultivos infectados, donde además observaron que no hay relación entre el tiempo que permanecen viables y el tamaño que adquieren (148).

Sin embargo, además de ser considerados reservorios virales, no se conoce con certeza la composición celular de los sincicios o bien, si los sincicios observados *ex vivo* mantienen su función celular o si adquieren nuevas propiedades que favorezcan al virus o afecten a las células circundantes (Tabla 3).

Referencia	Tejidos estudiados	Principales hallazgos
Amendola A. y cols. (1996). PNAS. 93:11057-62	Nódulo linfoide axilar	Sincicios que expresan la proteína transglutaminasa tTG (apoptosis)
Dargent JL. y cols. (2000). Mod Phatol, 13:1293	Tejido linfoide Amígdalas y adenoides 21 pacientes	64% con sincicios. CD68 ⁺ , 3A5, MHC II ⁺ (en 10 de 11 muestras), S-100 ⁺ (5 de 12 muestras), p24 ⁺ (7 de 9 muestras)
Eilbott D. y cols. (1989) PNAS. 86:3337	Médula espinal, cerebro	Sincicios en zonas de severo daño de tejido, infectados por el VIH, expresan marcadores de macrófagos
Frankel S. (1997) Am J Pathol, 155:89	Amígdalas y adenoides, mucosa nasofaríngea 14 pacientes	El 100% presentan sincicios, gran parte son pequeños (2-4 núcleos), 100% p24 ⁺ , algunos con morfología de linfocitos T.
Rinfret A, (1991), AJP, 138(2)421-26:	Amígdalas y adenoides, 2 pacientes	Abundantes sincicios infectados por el VIH, S100 ⁺ , lisozima ⁺
Budka H, (1986), Acta Neuropathol. 69:253-258	Cerebro, 7 pacientes	Sincicios fácilmente identificados en 2 pacientes, en otros 5 ocasionales, expresan marcadores de macrófagos y algunos positivos para CD45
Frankel S. (1996), Science 272:115	Amígdalas y adenoides. 13 pacientes	Sincicios con pocos núcleos y células gigantes, p24 ⁺ , S100 ⁺ , p55 ⁺ .
Orenstein JM (2000)	Nódulo linfoide y amígdala, 5 pacientes	Sincicios con morfología de linfocitos (hasta 5 núcleos), p24 ⁺ .
Nardacci R, (2005) Am J Pathol, 167: 695-704	Corteza frontal, 17 pacientes.	Sincicios en un 35% de pacientes, p24 ⁺ , 50% de los sincicios muestran fragmentación de DNA (apoptosis), correlacionen de daño en materia blanca y porcentaje de sincicios en la muestra.
Orenstein JM (1999), Ultrastruct Pathol, 23:79-91.	Amígdalas y adenoides, 9 pacientes.	Expresan p55 y S100, presentes en 20% de muestras HIV negativas
Koenig S, (1986), Science 233: 1089-93	Cerebro, 2 pacientes	Sincicios con morfología de macrófagos, altamente productores de virus

Tabla 3. Sincicios observados en tejidos de pacientes infectados con el VIH. Se citan algunas de las referencias que reportaron la presencia de sincicios en tejidos de pacientes infectados con el VIH, así como los hallazgos más relevantes.

De los estudios realizados (*post mortem*) en cerebro de pacientes infectados se observó que un 50% de los sincicios se encuentran en apoptosis (107), pero se desconoce el tiempo de vida media de los mismos. Por lo tanto, es necesario analizar si conservan las funciones que tenían las células antes de fusionarse durante el tiempo que permanecen viables y analizar el papel que tienen en la patogénesis de la infección por el VIH-1.

Por otra parte, las cepas con capacidad inductora de sincicios en linfocitos CD4⁺ (cepas X4) se asocian con mayores efectos patogénicos en el huésped, ya que inducen una mayor disminución de precursores y de células T CD4⁺, así como inducen un mayor porcentaje de apoptosis de células T CD4⁺ no infectadas (espectadoras) que los observados con virus R5. Estos hallazgos han sido observados en modelos animales (14, 74), en cultivos de tejido linfoide *ex vivo* (62, 116), así como en estudios *in vivo* (8, 53, 95).

Como se mencionó, las cepas de virus R5 son las que establecen la infección y predominan en las etapas asintomáticas de la enfermedad, mientras que las cepas X4 (inductoras de sincicios) predominan en las etapas avanzadas de la infección (19, 138). Adicionalmente, en un 50% de pacientes infectados sin tratamiento se observó que el cambio de fenotipo viral de R5 a X4 en las cepas presentes en circulación, precedió a un rápido declive en el cuenta de células CD4⁺ y progresión a SIDA (75), por ello la aparición de cepas X4 se asocia con un mal pronóstico de la enfermedad (20, 81, 138, 150).

Asimismo, aún cuando no se presenta un cambio de fenotipo de R5 a X4, se observan diferencias en la capacidad infectiva de las cepas R5 de etapas avanzadas de la enfermedad, lo cual ha sido asociado a una mayor capacidad fusogénica de los virus (45).

También se estudió el efecto de los anticuerpos presentes en el suero de pacientes infectados por el VIH-1 en la fusión celular generada *in vitro*, y se encontró que hay una relación directa entre la capacidad de inhibir la fusión y la cuenta de células CD4⁺, mientras que hay una relación indirecta con la carga viral. Se observó que los anticuerpos que inhiben la fusión provienen de pacientes en etapas tempranas e intermedias de la enfermedad, mientras que los sueros sin efecto en la fusión o que incluso la incrementan, provienen de pacientes en la etapa avanzada de la enfermedad (55).

VIH-1 EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.

El VIH-1 entra al SNC desde las etapas tempranas de la infección (6), probablemente por medio de linfocitos y monocitos infectados de circulación, hipótesis que se ha denominado: caballo de Troya (49). Sin embargo, se presentan desordenes neurológicos en las etapas avanzadas de la enfermedad (73). Previo a la aplicación del tratamiento antiretroviral combinado (TARc), entre 20-30% de los pacientes en etapa avanzada de la enfermedad presentaban alteraciones motoras, de comprensión y de conducta, lo que se denominó demencia asociada a VIH-1

(HAD por sus siglas en ingles: HIV-associated dementia), en su forma más severa, la demencia puede dejar al paciente en estado casi vegetativo, su característica particular es la encefalitis asociada a VIH-1 (HIVE), donde se observan células gigantes multinucleadas (probablemente de la fusión de macrófagos y células de la microglía), astrogliosis, infiltración de macrófagos, activación de microglía y daño de materia blanca (49, 73). Con la entrada del TARc la incidencia disminuyó (a 10%) al igual que la severidad de los síntomas (49).

No se conoce con certeza cual es el papel de los sincicios en la patogénesis, aunque se ha reportado que pueden afectar a células circundantes, debido a que en la cercanía de macrófagos activados y de sincicios se observaron neuronas en apoptosis (46). Adicionalmente, se encontró una correlación entre la presencia de sincicios y daño en materia blanca en los pacientes con encefalitis (107).

MODELO ANIMAL.

La infección por el Virus de la inmunodeficiencia de simios (SIV) ocurre al menos en 36 especies de monos y chimpancés, pero con poca patogenicidad para la mayor parte de sus huéspedes naturales (69). No obstante, existen reportes de chimpancés y monos mangabeye que desarrollaron una inmunodeficiencia severa después de vivir infectados con el SIV por más de 15 años, éstos presentaron una disminución en la cuenta de células CD4⁺, alta carga viral, linfomas de células B y

formación de células gigantes multinucleadas en tejido linfoide, cerebro e intestino (90).

Del virus SIV se origino el virus SIVmac, que al infectar macacos produce una disminución de CD4⁺ y cambios histológicos de los órganos linfoides semejantes a los encontrados en los humano con SIDA. En el tejido linfoide de los monos es frecuente encontrar células gigantes multinucleadas e incluso pueden desarrollar encefalitis. Debido a que los macacos no son infectados por el VIH-1 se ha empleado como modelo la infección con un virus quimera: el SHIV (Las proteínas Env, Rev, Vpu, y Tat del VIH-1 son clonados en el genoma del provirus del SIVmac). Al inicio de la infección con este virus no se produce enfermedad en los macacos, pero después de pases seriados se pueden generar variantes patógenas que provocan una profunda disminución de células CD4⁺ y una enfermedad semejante al SIDA (90).

Al estudiar la infección con dos virus SHIV, uno de ellos con la envoltura de un virus X4 (HXBc2) y el segundo con la envoltura de un virus dual X4R5 (cepa 89.6), no provocaron disminución de células CD4⁺, ni evidencia de enfermedad en los animales. Sin embargo, después de pases seriados *in vivo* se generaron variantes patógenas que provocaron una rápida y profunda disminución en la cuenta de células CD4⁺ y SIDA (70, 126, 140). Las mutaciones responsables de la disminución de CD4⁺ se encontraron en el gen Env (18). Adicionalmente en la cepa del virus X4R5 (89.6), las mutaciones le confirieron mayor capacidad fusogénica y una mayor afinidad por el correceptor (38, 39).

4. ESTUDIO DE LA FUSIÓN CELULAR

METODOLOGÍAS APLICADAS AL ESTUDIO DE LA FUSIÓN CELULAR.

La fusión de virus envueltos ha sido estudiada por medio de ensayos biológicos de infectividad, hemólisis o con la formación de sincicios mediante ensayos *in vitro* con células infectadas o células transfectadas para expresar los genes que codifican para las proteínas fusogénicas. Generalmente, la formación de sincicios se monitorea mediante la mezcla de lípidos o de moléculas solubles en los citoplasmas (10, 11).

Para cuantificar la formación de sincicios se han aplicado diversas técnicas. La microscopía óptica por ejemplo, fue ampliamente utilizada para estudiar efectos citopáticos en cultivos virales detectando la presencia de células gigantes multinucleadas (67). Sin embargo la cuantificación requiere considerable tiempo en la cuenta visual de los sincicios y solo se consideran los que tuvieron un incremento considerablemente en su tamaño (148, 157).

La microscopía electrónica ha sido crucial para determinar si la mezcla de lípidos realmente concluye en fusión y no en la desintegración de las células participantes, así como para el análisis detallado de cambios estructurales en los sincicios (10, 16, 148). No obstante, los mayores problemas con ésta técnica es la

posibilidad generar artefactos debido a la preparación del espécimen y la dificultad de realizar una cuantificación, así como no poder realizar ensayos en fresco (10).

Asimismo, se han desarrollado ensayos en los cuales se emplean genes reporteros para la expresión de ciertas moléculas (114) o substratos fluorescentes (89) que se identifican y/o cuantifican después de que se mezclan los contenidos celulares. Estas técnicas tienen limitaciones al cuantificar la extensión de la fusión y no permiten un continuo monitoreo de la reacción, sino más bien un efecto final (11). Además, no permiten un estudio detallado de las células durante el cocultivo o de las características de los sincicios.

Otra herramienta ampliamente usada en el estudio de la fusiones el empleo de colorantes fluorescentes, ya que la fluorescencia se puede monitorear por diversos instrumentos se han generado diversas técnicas para cuantificar la fusión célula-célula, como por ejemplo mediante espectrofluorómetros (76), microscopia de fluorescencia (17) y por citometría de flujo (4, 56, 57,130).

El empleo de análogos de lípidos fluorescentes, permite aprovechar ciertas propiedades de las membranas para detectar la colocación o dilución de la concentración de los colorantes en los sincicios (11), también se pueden analizarlas interacciones entre los colorantes como son: redistribución de fluorescencia (self-quenching), reducción de fluorescencia “dequenching” o la transferencia de energía (FRET por sus siglas en inglés: fluorescence resonance energy transfer).

Adicionalmente se ha estudiado la mezcla de colorantes fluorescentes citoplásmicos monitoreando la colocalización por microscopia de fluorescencia (12, 157), por microscopia confocal (43) y por citometría de flujo (130).

La citometría de flujo (Anexo 1) es una técnica multiparamétrica, que permite examinar simultáneamente un gran número de parámetros de cada una de las células que se analizan así como la relación entre los parámetros de una célula y los de otras. En el estudio de la fusión celular, permite monitorear diversas propiedades de los sincicios, así como de las células que quedan sin fusionar (Rivera-Toledo y cols, en preparación).

Además del empleo de colorantes fluorescentes, se han reportado otros métodos que emplean la citometría de flujo para cuantificar la fusión celular mediante la unión específica de anticuerpos (136) o por medio del análisis de la cantidad de DNA en las células (137, 157).

Por otra parte, algunos citómetros de flujo tienen la capacidad de separar poblaciones de células, lo cual ha permitido llevar a cabo una separación de sincicios para analizar cambios en la expresión (119) o estudios de funcionalidad (López-Balderas y cols, en preparación).

CITOMETRÍA DE FLUJO Y FRET APLICADOS AL ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LA FUSIÓN CELULAR.

La citometría de flujo es una técnica multiparamétrica que lleva a cabo el análisis fenotípico de poblaciones celulares, requiere un instrumento especializado, el citómetro de flujo. Su fundamento se basa en hacer pasar una suspensión de células alineadas de una en una a través de una región iluminada por un láser focalizado. El impacto de cada célula con el rayo de luz produce señales que corresponden a diferentes parámetros, éstas son recolectadas por distintos detectores que las convierten en señales eléctricas, las cuales posteriormente son digitalizadas para permitir la medida simultánea de varios parámetros en una misma célula.

Las señales producidas por la interacción de las células con el láser son de dos tipos: a) Señales de dispersión, resultan en un cambio de dirección en el espacio pero no cambia la longitud de onda, éstas dependen del tamaño de la célula, núcleo y complejidad interna (granularidad). En el citómetro de flujo se miden dos señales de dispersión, la luz dispersada en un ángulo menor a 20° llamada FSC (forward scatter channel), que es proporcional al tamaño de la partícula, y la luz dispersada en ángulo recto denominada SSC (side scatter channel) que es proporcional a la complejidad interna de la partícula (granularidad), y b) Señales de Fluorescencia, el citómetro de flujo utiliza diferentes canales de fluorescencia para analizar emisiones procedentes de sondas o fluorocromos situados en la célula,

siendo la cantidad de fluorescencia emitida proporcional a la cantidad de componentes fluorescentes presentes de la partícula.

En nuestro grupo de trabajo se diseñó y optimizó un método para cuantificar la fusión celular mediada por las proteínas de la envoltura del VIH-1, éste combina la citometría de flujo con la detección de FRET (56, 57), lo cual permite llevar a cabo la distinción entre sincicios verdaderos y agregados (Anexo 2).

Se emplean células linfocíticas Jurkat, la clona E6-1 se emplea como célula blanco ya que tiene un fenotipo $CD4^+ CXCR4^+$. Las clonas HXBc2 y 522 F/Y (Env^+) son células Jurkat E6-1 que fueron transfectadas para expresar mediante un sistema inducible por ausencia de tetraciclina (16) los genes *env* (gp120/gp41) y *rev* de un virus prototipo X4 del VIH-1 (cepa HXB clona 2). La línea 522 F/Y: expresa una mutante del complejo gp120-gp41, presenta un cambio en la fenilalanina 522 por tirosina lo cual afecta la funcionalidad del péptido de fusión en gp41 y no pueden fusionarse con otras células, mientras que la línea celular HXBc2 expresa el complejo gp120-gp41 funcional y puede fusionarse con células $CD4^+$ (16).

Previo al ensayo de fusión, las células se marcan diferencialmente con los colorantes lipofílicos fluorescentes DiO y Dil que emiten fluorescencia verde y roja respectivamente; las células $CD4^+$ se marcan de rojo y las Env^+ de verde, posteriormente se colocan en cocultivo a $37^\circ C$ y se analizan por citometría de flujo.

En el cocultivo se generan células multinucleadas que pueden ser observadas por microscopía de luz (Fig. 10A,B), por microscopía de fluorescencia (Fig. 10D) o confocal (Fig. 10C).

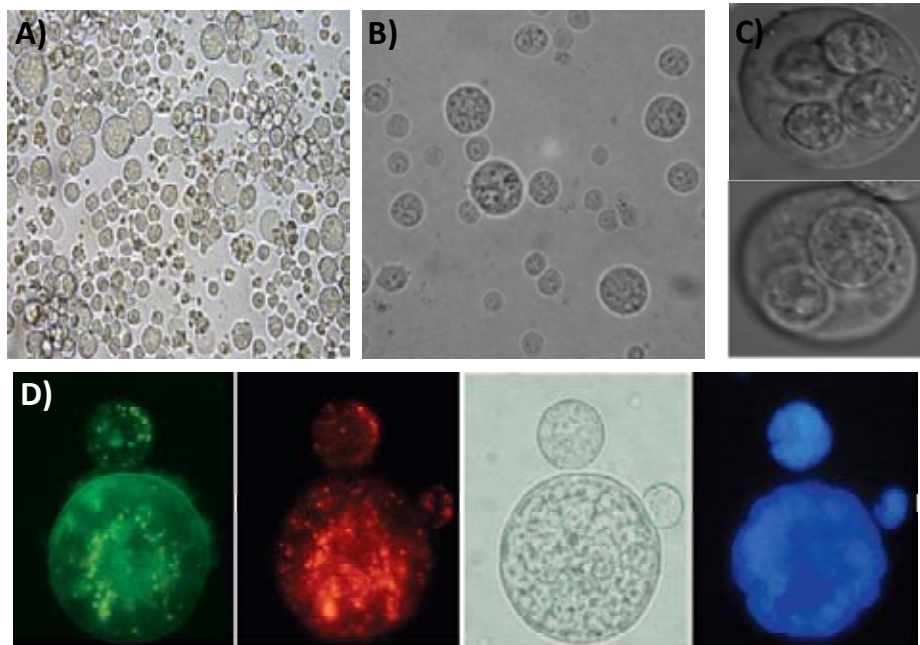


Figura 10. Visualización de los sincicios por microscopía. Análisis. A) Visualización por microscopía de luz de un cocultivo en el pozo. **B)** Visualización por microscopía de luz de las células de un cocultivo que se recolectó para ser analizado. **C)** Visualización por microscopía confocal de dos sincicios. **D).** Visualización por microscopía de fluorescencia de células recolectadas de un cocultivo. El tamaño es muy heterogéneo.

Al analizar los cocultivos por citometría de flujo se generan graficas de puntos donde se pueden observar tres subpoblaciones de partículas de acuerdo a su emisión de fluorescencia: células $CD4^+$ y Env^+ que no se fusionaron (emiten fluorescencia roja y verde respectivamente) y los sincicios, los cuales se observan como partículas con ambas fluorescencias (roja y verde). El porcentaje de sincicios obtenido generalmente representa entre un 10-20% de las células en cocultivo,

también se pueden cuantificar y analizar las células $CD4^+$ y Env^+ que quedaron sin fusionar a través del tiempo (Fig.11A).

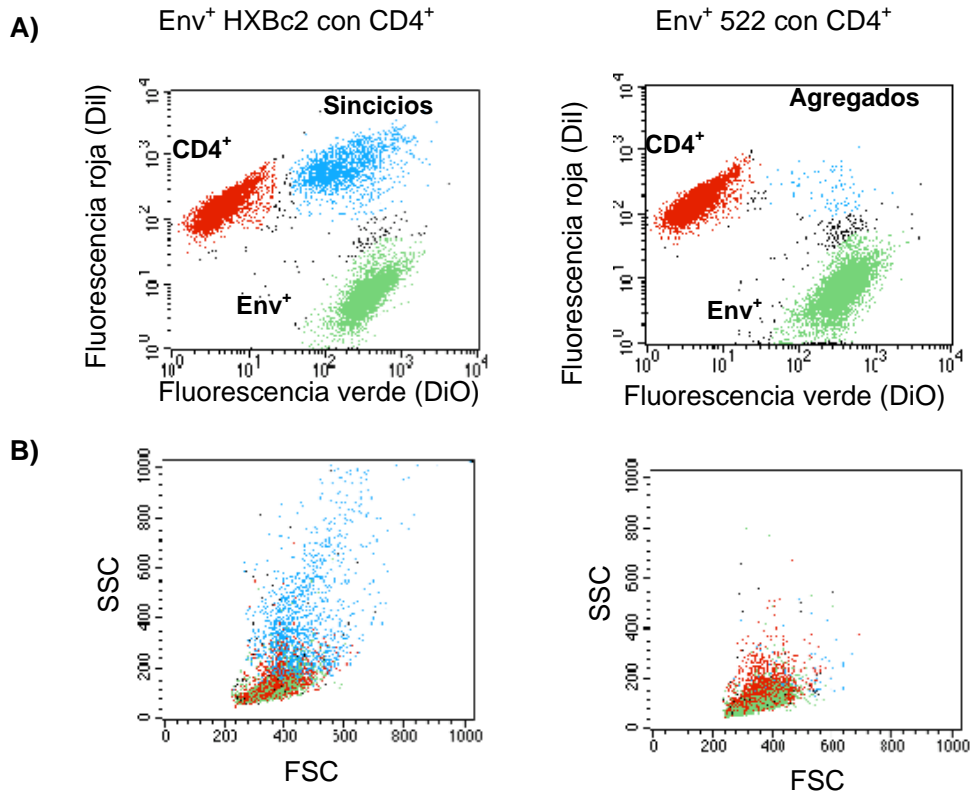


Figura 11. Análisis por citometría de flujo de los cocultivos de células HXBc2 con $CD4^+$ y 522 con $CD4^+$. A) Análisis de fluorescencia de las poblaciones en los dos tipos de cocultivo. B) Patrón de tamaño y granularidad de las poblaciones en los dos tipos de cocultivo. Las células $CD4^+$ que quedaron sin fusionarse se muestran en rojo, las Env^+ en verde y los sincicios en azul.

Al analizar el tamaño (FSC) y granularidad (SSC) de los sincicios (Fig. 11B, en azul), se observa que una fracción tiene un patrón de tamaño y granularidad muy semejante al que presentan las células no fusionadas (en rojo y verde), por lo cual un análisis por medio del incremento en su tamaño es insuficiente, ya que no se podrían cuantificar el total de los sincicios generados (Fig. 11B).

Con las células no fusogénicas (522) se obtienen 2-3% de dobles positivas (Fig. 11A). Sin embargo presentan un patrón de tamaño y granularidad diferente: la mayor parte son más grandes que las no fusionadas sin incrementar su granularidad (Fig. 11B, en azul).

Este método, permite cuantificar la formación de sincicios en forma precisa y rápida. La fusión es específicamente inhibida por el anticuerpo monoclonal anti-CD4, por sueros de pacientes infectados por el VIH-1 (55) y por el péptido inhibidor T-20 (57), que actualmente es aceptado como tratamiento contra la infección por VIH. Asimismo, nos permite estudiar tanto la expresión de diferentes marcadores de superficie (Rivera-Toledo y cols, en preparación), como la viabilidad y proliferación en cada una de las poblaciones a través del tiempo (Huerta y cols, en preparación).

5. FUNCIONALIDAD DE LOS LINFOCITOS T CD4⁺.

LINFOCITOS T CD4⁺.

Los linfocitos constituyen cerca del 20-40% de los glóbulos blancos en sangre periférica, circulan continuamente en sangre y linfa y son capaces de migrar entre los tejidos y órganos linfoides. Pueden dividirse en tres tipos en base a sus funciones y componentes de la membrana plasmática: Linfocitos B, linfocitos T y células NK. Los linfocitos T pueden dividirse en T cooperadores (Th) que expresan

CD4 o T citotóxicos (Tc) que expresan CD8, a su vez éstos pueden existir en diferente estado funcional como células virgen, efectoras o de memoria (65).

ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS T CD4⁺

La activación de los linfocitos T CD4⁺ se produce por la interacción del complejo TCR-CD3 con un antígeno procesado y unido a moléculas MHC II en una célula presentadora de antígeno, ésta interacción es complementada por proteínas accesorias presentes en ambas células. El resultado de estas interacciones son una serie de señales intracelulares que culminan en el núcleo, resultando en la transcripción de genes y una cascada de eventos bioquímicos que induce la entrada al ciclo celular y la diferenciación de las células.

Los productos derivados por los genes activados se clasifican en tres: a) Inmediatos, se expresan de 0.5-1 hrs. después del reconocimiento del antígeno y codifican para factores de transcripción, b) Tempranos, se expresan en la primera o segunda hora después del reconocimiento del antígeno, codifican para interleucinas, receptores de interleucinas y otras numerosas proteínas, y c) Tardíos, son expresadas más de 2 días después del reconocimiento y codifican para varias moléculas de adhesión.

La activación de los linfocitos puede estudiarse *in vitro* mediante el empleo de mitógenos farmacológicos o anticuerpos monoclonales, los cuales inducen

señalización y proliferación en las células. Como por ejemplo la PHA, PMA, ionomicina o bien se pueden emplear los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28.

FUNCIONALIDAD DE LAS CÉLULAS JURKAT (CD4⁺) Y SINCICIOS.

Las células Jurkat E6-1 son una línea celular de linfocitos humanos T CD4⁺ que secretan IL-2 después de un estímulo de activación con mitógenos farmacológicos como la PHA, PMA, con la combinación de PMA más ionomicina, o bien con anticuerpo monoclonal anti-CD3. Estos estímulos inducen además la expresión de marcadores de activación en la membrana plasmática como CD25 (cadena alfa del receptor de IL-2) y CD69 (Lectina tipo-C, molécula inductora de activación), también se induce la síntesis y secreción de otras citocinas como IFN γ (47, 147, 155).

De tal manera que para estudiar la funcionalidad de los sincicios se evaluará su capacidad de responder a un estímulo de activación con mitógenos farmacológicos por medio de la síntesis de IL-2 y de la expresión de CD25 en la membrana plasmática.

INTERLEUCINA 2

La interleucina 2 es una citocina producida predominantemente por células CD4⁺ activadas y en menor extensión por células CD8⁺ activadas, células NK, NKT y células dendríticas activadas. La secreción de IL-2 y la unión a su receptor inducen

proliferación y diferenciación de las células. Los requerimientos de IL-2 son diferentes para cada subpoblación de células T, ya que se ha observado que es muy importante para el desarrollo y homeostasis de las células Treg así como en la respuesta de las células de memoria (97).

CD25: RECEPTOR DE IL-2(IL-2R).

El receptor de interleucina-2 (IL-2R) consiste de tres subunidades, IL-2R α (CD25), IL-2R β (CD122) y la cadena gama común γ c (CD132); las tres son proteínas transmembranales que se unen no covalentemente para formar el receptor de alta afinidad a IL-2. La subunidad γ c es expresada en todas las células hematopoyéticas; CD122 es subunidad de los receptores para IL-2 e IL-15 y se expresa constitutivamente en progenitores linfoides, en células NK, NKT, CD8⁺ de memoria y Treg, es inducida en prácticamente todos los linfocitos T activados (58). La subunidad CD25 se expresa en las células efectoras de manera transitoria y en las células Treg naturales CD4⁺FoxP3⁺. Por lo tanto solo las células CD4⁺FoxP3⁺ y las células CD4⁺ y CD8⁺ activadas coexpresan las tres cadenas del receptor de IL-2 (65, 97).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En nuestro grupo de trabajo se diseñó un método para cuantificar la fusión celular mediada por las proteínas de la envoltura del VIH-1, en el cual células Jurkat $CD4^+$ y Env^+ se marcan diferencialmente con colorantes fluorescentes lipofílicos, se colocan en cocultivo y los sincicios se cuantifican como partículas con fluorescencia mixta en el citómetro de flujo (56, 57) (Fig. 11). En el análisis por citometría de flujo (Fig. 12), se observó un incremento en la intensidad de fluorescencia roja de los sincicios respecto a la intensidad de fluorescencia que tienen las células $CD4^+$ sin fusionar, este incremento no se presenta en la intensidad de fluorescencia verde (proviene de las células Env^+).

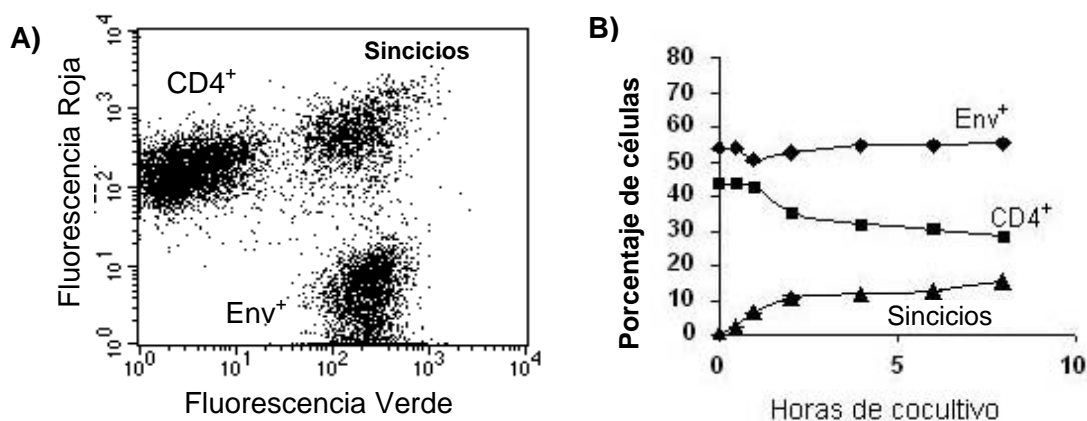


Figura 12. Análisis por citometría de flujo del cocultivo de células Env^+ y $CD4^+$. A) Gráfica de puntos del cocultivo de células $CD4^+$ con Env-HXBc2, los sincicios se detectan como partículas positivas para las dos fluorescencias. Se observa un incremento en la intensidad de fluorescencia roja pero no en la fluorescencia verde. B) Cinética de fusión: Porcentajes de las células sin fusionar y sincicios formados a través del tiempo, las $CD4^+$ disminuyen más que las células Env^+ .

Adicionalmente, al analizar los cambios en el porcentaje de células que quedan sin fusionar a través del tiempo (Fig. 12B), se observó que la población de células CD4⁺ generalmente disminuye más que la población de células Env⁺. Ambos hechos se asocian a que en los sincicios hay una mayor incorporación de células CD4⁺ que de células Env⁺.

Éste acontecimiento podría ser relevante en la patogénesis de la infección por el VIH-1 ya que podría estar contribuyendo en la disminución de células CD4⁺ o bien tener alguna implicación en la funcionalidad de los sincicios.

HIPÓTESIS

De la fusión *in vitro* entre células linfocíticas humanas mediada por las proteínas del VIH-1, se generan sincicios biológicamente funcionales que incorporan una mayor cantidad de células CD4⁺ que células Env⁺.

OBJETIVO GENERAL

Analizar la composición relativa y funcionalidad de los sincicios generados de la fusión entre células linfocíticas mediada por las proteínas Env del VIH-1.

Adicionalmente, al analizar los cambios en el porcentaje de células que quedan sin fusionar a través del tiempo (Fig. 12B), se observó que la población de células CD4⁺ generalmente disminuye más que la población de células Env⁺. Ambos hechos se asocian a que en los sincicios hay una mayor incorporación de células CD4⁺ que de células Env⁺.

Éste acontecimiento podría ser relevante en la patogénesis de la infección por el VIH-1 ya que podría estar contribuyendo en la disminución de células CD4⁺ o bien tener alguna implicación en la funcionalidad de los sincicios.

HIPÓTESIS

De la fusión *in vitro* entre células linfocíticas humanas mediada por las proteínas del VIH-1, se generan sincicios biológicamente funcionales que incorporan una mayor cantidad de células CD4⁺ que células Env⁺.

OBJETIVO GENERAL

Analizar la composición relativa y funcionalidad de los sincicios generados de la fusión entre células linfocíticas mediada por las proteínas Env del VIH-1.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la composición celular relativa de los sincicios formados a partir de la fusión entre células linfocíticas humanas mediada por las proteínas de VIH-1 (estequiometría de la fusión).
2. Analizar los factores que influyen en la incorporación de un mayor número de células CD4⁺ en los sincicios:
 - ♦ Determinar el efecto de cambios en la proporción inicial de los reactantes en la estequiometría de la fusión.
 - ♦ Estudiar el efecto del nivel de expresión de Env en la estequiometría de la fusión.
3. Analizar si los sincicios son entidades funcionales capaces de responder a un estímulo de activación con mitógenos.
 - ♦ Examinar si los sincicios son capaces de expresar CD25 y sintetizar IL-2 después de un estímulo de activación con ionomicina y PMA.
 - ♦ Estudiar si el estímulo de activación afecta la viabilidad de los sincicios.
 - ♦ Analizar si la composición celular de los sincicios influye en su capacidad de responder al estímulo de activación.

JUSTIFICACION

Hace más de 25 años que se identificó al VIH-1 como el agente causal del SIDA pero aún no se conocen con precisión los eventos que originan la pérdida y disfuncionalidad de los linfocitos CD4⁺. Durante la infección no sólo mueren células CD4⁺ infectadas, sino que hay mecanismos indirectos que afectan además células no infectadas, como la formación de sincicios. Los sincicios son característicos de los cultivos celulares infectados, se aprecian en los tejidos de los pacientes y se les considera un evento citopático debido a que se asume que la inestabilidad la célula multinucleada induce finalmente apoptosis, afectando incluso a células espectadoras. Además la aparición de cepas inductoras de sincicios en linfocitos T se relaciona con una acelerada pérdida de células CD4⁺ y progresión a SIDA. No obstante, poco se conoce de los factores que influyen en la formación de sincicios, de las características morfológicas, fenotípicas y funcionales de las células multinucleadas resultantes. Por lo tanto, se llevo a cabo un estudio para conocer la heterogeneidad en tamaño y complejidad interna, composición celular relativa y funcionalidad de los sincicios obtenidos mediante las proteínas Env del VIH-1.

MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas celulares

Se emplearon células linfocíticas Jurkat. La clona E6-1, se empleó como célula blanco ya que tiene un fenotipo CD4⁺ CXCR4⁺. Las líneas celulares HXBc2 y 522 F/Y son células E6-1 que fueron transfectadas para expresar de manera inducible y funcional los genes *env* (gp120/gp41) y *rev* de un virus prototipo X4 del VIH-1, la cepa HXB clona 2 (HXBc2). La expresión es regulada mediante un sistema inducible por ausencia de tetraciclina (16). La línea 522 F/Y: expresa una mutante del complejo gp120-gp41, presenta un cambio en la fenilalanina 522 por tirosina, lo que afecta la funcionalidad del péptido de fusión (gp41) y no puede fusionarse, mientras que la línea células HXBc2 expresa las proteínas funcionales y puede fusionarse con células CD4⁺ (16).

Las líneas celulares humanas MT2 Y MT4 derivaron de un paciente adulto con leucemia de células T. Las células MT2 son productoras de partículas virales HTLV-1, mientras que las MT4 producen muy bajas cantidades del virus.

Todas las líneas celulares se obtuvieron a través del AIDS Research Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH (AIDSRRRP NIAID).

Cultivo celular

Las células se mantuvieron en botellas T-75 (Cellstar) con medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (Gibco), penicilina

(50U/mL) y estreptomina (50ug/mL) (Gibco). La incubación se llevó a cabo a 37°C con 5% de CO₂.

A las líneas celulares HXBc2 y 522F/Y se les adicionó tetraciclina (1ug/mL) para inhibir la expresión de las glicoproteínas, geneticina (G418, 200ug/mL, Gibco) e higromicina (200ug/mL, Invitrogen) para seleccionar las células transfectadas.

Inducción de la expresión de las proteínas gp120/gp41

La expresión de Env (gp120/gp41) se indujo retirando la tetraciclina del medio de cultivo, para ello las células se colocaron en condiciones de esterilidad en tubos para centrifuga de 50ml (Corning), se centrifugaron 3 minutos a 1150 rpm para retirar el medio de cultivo. Se lavaron 2 veces con 40mL de PBS y se resuspendieron en RPMI 10 con los antibióticos geneticina (G418, 200ug/mL) e higromicina (200ug/mL) pero sin tetraciclina, se incubaron en éstas condiciones tres días antes del ensayo de fusión.

Marcaje de células

Las células Env⁺ que fueron inducidas 48hrs antes y las células CD4⁺ se marcan al menos 12 horas previas al ensayo de fusión. Se colocaron en tubos de 15ml (Falcon) o de 50 ml (Corning), se centrifugaron 3 min. a 1150 rpm para eliminar el medio de cultivo y se ajustaron a una concentración de 5-15x10⁶ células/mL de medio. Las células Env⁺ se marcaron de verde (DiO o CMFDA) y las CD4⁺ de rojo (Dil o CMTMR) siguiendo el protocolo de marca para cada tipo de colorante que se desee emplear.

Colorantes lipofílicos: Se utilizaron dos colorantes fluorescentes lipofílicos tipo carbocianina (Anexo 2): DiO: Perclorato de 3,3'-dioctadeciloxacarbocianina (Abs/Em 484/501) y Dil: Perclorato de 1,1'-dioctadecil-3, 3,3',3'-tetrametilindocarbocianina (Abs/Em 549/565), Molecular Probes (Eugene, OR). Las soluciones concentradas se prepararon disolviendo 3.5 mg de colorante en 1mL de DMSO, a partir de éstas se hicieron diluciones 1:10 que se mantuvieron a temperatura ambiente y protegidas de la luz. Las células se resuspendieron en medio RPMI 10 y se les adicionó el colorante, a las células Env⁺ se les adicionó de 15-35uL/mL de DiO dilución 1:10, mientras que las CD4⁺ se marcaron con 7-11uL/mL de Dil 1:10, se incubaron en agitación constante durante 15 min. a temperatura ambiente y protegidas de la luz y se lavaron dos veces con 10-20ml de RPMI 10. Finalmente, se colocaron nuevamente las células Env⁺ en RPMI 10 con antibióticos excepto tetraciclina, mientras las células CD4⁺ se resuspendieron en medio suplementado. Se incubaron toda la noche a 37°C con 5% de CO₂.

Colorantes hidrofílicos: Se utilizaron los colorantes CTFDA: CellTracker Green (Abs/Em 492/516) y CTTMR: CellTracker Orange (Abs/Em 540/566), que emiten fluorescencia verde y roja respectivamente, Molecular Probes (Invitrogene). Las soluciones concentradas se prepararon disolviendo la sal del colorante CellTracker Green en 50µl de DMSO y se preparó una dilución 1:10 (0.1µM), mientras que para el colorante CellTracker Orange se disolvió la sal en 500 µl de DMSO y se preparó una dilución 1:10 (0.1µM). Las diluciones y soluciones concentradas se mantuvieron en congelación.

Las células se resuspendieron en medio AIM-V libre de suero (GIBCO), a las células Env⁺ se les adicionó 3uL/mL de CTFDA 0.1µM, mientras que las CD4⁺ se marcaron con 60µL/mL de CTTMR 0.1µM. Se incubaron 40 min. bajo condiciones de cultivo (37°C con 5% de CO₂), se lavaron dos veces con AIM-V precalentado a 37°C y se colocaron nuevamente en botellas T-75 en RPMI 10 con antibióticos excepto tetraciclina para las células Env⁺ y medio RPMI 10 para las células CD4⁺. Se incubaron toda la noche a 37°C con 5% de CO₂.

Marcaje para microscopía de fluorescencia: Se mantuvieron los protocolos de marca para cada tipo de colorante, pero se incrementaron algunas de las concentraciones. En los colorantes de membrana, se emplearon 10-15 veces más de DiO y la misma concentración Dil. Para los colorantes de citoplasma se emplearon 5µM para el CTFDA y 15µM para el CTTMR.

Ensayo de fusión

Para el ensayo de fusión, las células previamente marcadas con los colorantes fluorescentes verde y rojo se centrifugaron 3 min. a 1150 rpm y se resuspendieron en medio libre de suero AIM-V (Gibco) a una concentración de 0.4x10⁶células/0.2 mL de medio. En una placa de 96 pozos de fondo plano (Falcon) se colocaron 100µL de las suspensiones celulares (CD4⁺ y Env⁺). El cocultivo se incubó a 37°C con 5% de CO₂, después de los tiempos establecidos de cocultivo se cosecharon las células de cada pozo con la micropipeta de 1ml y se depositaron en tubos para FACS (BD Pharmingen), se lavaron en 2ml de PBS y se resuspendieron en un volumen final de 300 µL de amortiguador para FACS (BD Pharmingen), se

analizaron inmediatamente en el citometro de flujo FACScan o FACScalibur (Becton Dickinson). Se capturaron 10,000 eventos de cada muestra y se analizaron mediante el software Cell Quest. En el análisis se excluyó la región de restos celulares.

Durante todos los ensayos se emplearon como controles negativos cocultivos con la línea celular Env-522 y con el anticuerpo monoclonal anti-CD4 (22.22 µg/mL, BD Pharmingen) que se preincubó 40 minutos a 37°C con las células CD4⁺ antes de adicionar las células Env⁺. Los ensayos se realizaron por duplicado.

Ensayo de fusión con diferentes proporciones iniciales.

Siguiendo el protocolo del ensayo de fusión, se colocaron en la placa de 96 o 48 pozos diferentes volúmenes (Tabla 4) de las suspensiones celulares (CD4⁺ y Env⁺). Se mantuvo un volumen final constante de 200ul (o 400µl en placa de 48 pozos) para mantener la misma densidad celular (Tabla 4). Se incubaron a 37° con 5% de CO². Las proporciones iniciales (R₀) se establecieron como el cociente del porcentaje inicial de células CD4⁺ entre el porcentaje inicial de las células Env⁺.

Proporción inicial (R₀)	Volumen de CD4⁺	Volumen de Env⁺
0.1	20µL	180µL
0.5	66µL	133µL
1	100µL	100µL
2	133µL	66µL
10	180µL	20µL

Tabla 4. Diferentes proporciones iniciales. Volúmenes de suspensión celular colocados en los pozos para obtener diferentes proporciones iniciales.

Ensayo de viabilidad.

La viabilidad se determinó por medio de la incorporación de yoduro de propidio (Sigma) o de 7-actinomicina D (eBiosciencias), junto con la unión de anexina-V acoplada a Cy5 (BD Pharmingen). Estos reactivos se emplearon para detectar apoptosis celular temprana, apoptosis tardía y muerte celular por necrosis (135, 151). Las células en cocultivo se colectaron de los pozos, se lavaron con 2ml de PBS y se resuspendieron en 300µM de la solución de unión para anexina V (BD Pharmingen). Se agregaron 3µL de yoduro de propidio (50µg/ml) y 3µL de anexina V conjugada con Cy5, protegidas de la luz se incubaron durante 10 min. a temperatura ambiente y se capturaron inmediatamente en el FACScalibur. Como control positivo se emplearon células incubadas 6 horas con camptotecina, un inductor de apoptosis.

Ensayo de activación con mitógenos farmacológicos.

Los mitógenos que se emplearon son:

PHA (Fitohemaglutinina): Se preparó una solución a una concentración 1µg/µl. Las células se incubaron en una concentración 5µg/ml de PHA por 5 hrs. a 37°C (Roche) en medio AIM-V con 0.5% de SFB.

PMA: Se preparó una solución concentrada en DMSO a 2mg/ml, posteriormente se preparó una dilución 1:10 de la cual se realizó nuevamente una dilución 1:1000, esta fue la solución de trabajo (Sigma).

Ionomicina: Se preparó una solución concentrada de 5mg/ml, de la cual se realizó una dilución 1:5 para obtener la solución de trabajo a 100µg/ml, (Sigma).

Las estructuras químicas y características se pueden consultar en el Anexo 4.

Estímulo de activación para inducir la expresión de CD25: Como la expresión de CD25 se induce sólo con el estímulo de PMA no fue necesario cambiar las condiciones del cocultivo. Las células (CD4⁺ y Env⁺) en monocultivo o en cocultivo se incubaron por dos horas a 37°C en medio AIM-V. Posteriormente, se adicionó 25µl de la solución de trabajo de PMA, 0.4µl de la solución de trabajo de ionomicina y 0.5% de SFB, se complementó con medio AIM-V a un volumen final de 250µl, se incubaron por 5 hrs. más a 37°C.

Estímulo de activación para inducir la expresión de IL-2: Las células CD4⁺ requieren además de PMA una mayor concentración de Ca²⁺ intracelular y de SFB para expresar IL-2. Por lo cual se cambiaron las condiciones de cocultivo. Las células (CD4⁺ y Env⁺) en monocultivo o en cocultivo se incubaron por dos horas a 37°C en medio RPMI 10. Posteriormente, se adicionó 25µl de la solución de trabajo de PMA, 2µl de la solución de trabajo de ionomicina y se complementó con medio RPMI 10 a un volumen final de 250µl, se incubaron por 4 hrs. más a 37°C.

Inmunofluorescencia Indirecta (Expresión de gp120).

Se colocaron las células que expresan las proteínas Env en tubos de 15ml (Falcon), se centrifugaron 3 min. a 1150rpm decantando el medio, se lavaron con 2ml de solución de lavado (PBS + azida de sodio (NaN₃) 0.1%). Se contaron y ajustaron a 1 X 10⁶ células/50 µL en solución de marca (PBS + azida de sodio 0.1 % + BSA 1%), se colocaron 50µL de la suspensión celular en tubos de FACS y se

adicionó 50µL del anticuerpo primario anti-gp120 policlonal de conejo (dilución 1:200), se incubaron 40 min. en hielo. Posteriormente, se lavaron dos veces con 1mL de solución de lavado y se resuspendieron en 100µl de la dilución (1:100) de anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de conejo acoplado a FITC (Zymed laboratorios, Invitrogen), se incubaron 45min en hielo y se lavaron dos veces con 1mL de solución de lavado. Finalmente, se resuspendieron en 500µL de amortiguador para FACS y se analizaron inmediatamente en el citometro de flujo. Como control negativo se usaron las células HXBc2 y 522 sin inducir.

Inmunofluorescencia Directa (Expresión de CD4 y CD25).

La expresión de CD25 se indujo después de las 5 hrs. de estímulo con PMA, mientras que la expresión de CD4 se detectó en células sin estímulo, ya su expresión disminuye drásticamente después del estímulo con PMA.

Se colocaron las células en tubos de 15ml, se centrifugaron 3 min. a 1150 rpm (1100rpm si son cocultivos) y se decantó el medio. Se lavaron las células con 2ml de la solución de lavado (PBS + azida de sodio (NaN₃) 0.1%), se contaron y ajustaron a 1×10^6 en 50 µL en solución de marca (PBS + azida de sodio 0.1 % + NCS 2%). Se colocaron 50µL de la suspensión celular en tubos de FACS, se les adicionó 20µL de anti-CD4 acoplado a APC o anti-CD4 acoplado a PE si son células sin marca (BD Pharmingen), mientras que para el anticuerpo anti-CD25 acoplado a APC (BD Pharmingen), se adicionaron 3µl por cada 1×10^6 células. Se colocó también el control de isotipo (BD Pharmingen) para excluir la fluorescencia de fondo. Se incubaron por 30 min. en hielo. Posteriormente se lavaron dos veces con 1mL de solución de lavado y se resuspendieron en 300µL de amortiguador para FACS. Se

analizaron inmediatamente en el citometro de flujo. Como control positivo para la expresión de CD25 se utilizaron las células MT4.

Detección de citocinas intracelulares (Expresión de IL-2)

La expresión de IL-2 se indujo por medio de un estímulo con PMA (Sigma) e ionomicina durante 6 hrs. Para evitar la secreción de IL-2 se incubaron las últimas 4 hrs. del estímulo de activación en presencia de monensina (Golgi stop, BD Biosciences), un inhibidor del transporte vesicular trans-Golgi que permite retener la IL-2 en vesículas intracelulares y favorece la detección de un mayor número de células que expresan IL-2 por citometría de flujo (147).

Después del estímulo las células se fijaron con paraformaldehído y se permeabilizaron. Se colocaron en tubos de 15ml, se centrifugaron 3 min. a 1150 rpm (1100rpm si son cocultivos) para decantar el medio. Se lavaron las células con 2ml de solución de lavado (PBS + azida de sodio (NaN₃) 0.1%) y se resuspendieron en 200µL de paraformaldehído al 4% (Sigma) precalentado previamente a 37°C, se incubaron 10 min. a temperatura ambiente, se adicionó 500µl de solución de marca "Perm Wash buffer" (PBS, SFB 2%, saponina 0.2%; BD Biosciences) y se centrifugaron y decantaron. Se resuspendieron en 800µl de la solución de marca y se incubaron por 20 min. a 4°C, posteriormente se centrifugaron y se resuspendieron en 50µl de la solución de marca conteniendo el anticuerpo anti IL-2 (4µl de anticuerpo por cada millón de células), se colocó también el control de isotipo. Con el anticuerpo se incubaron 30min en hielo, se lavaron dos veces con 1mL de

solución de marca y se resuspendieron en 300µL del amortiguador para FACS. Se analizaron inmediatamente en el FACScalibur.

Calculo del porcentaje de respuesta al estímulo.

El porcentaje de expresión inducido por el estímulo de activación se obtuvo colocando una región a la derecha del control de isotipo. Al porcentaje obtenido con el anticuerpo anti-IL-2 o anti CD25 se le restó el porcentaje obtenido con el anticuerpo de isotipo, ésta operación se realizó también en las células sin estímulo. Finalmente, al porcentaje obtenido con estímulo se le restó el obtenido sin estímulo. En la figura 13 se muestran los histogramas de fluorescencia de una población de sincicios en los que se analizó la expresión de CD25.

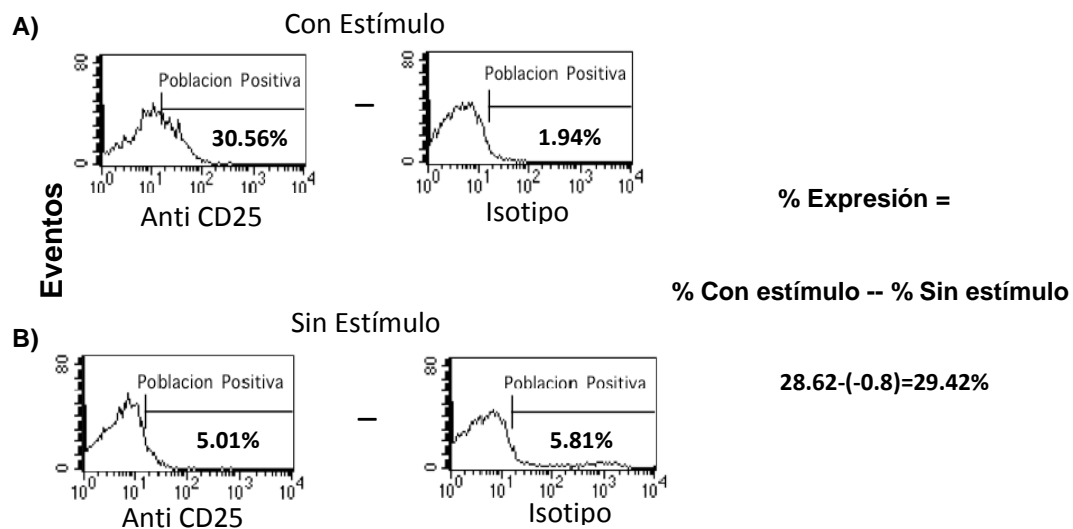


Figura 13. Cálculo del porcentaje de expresión inducido por el estímulo de activación. Histogramas de fluorescencia obtenidos de sincicios. Se muestra la región que se aplicó a los cuatro histogramas. Al porcentaje de células positivas con anti-CD25 se le resta el porcentaje obtenido con el control de isotipo (unión inespecífica). Finalmente al porcentaje de expresión en sincicios con estímulo (A) se le resta el porcentaje obtenido sin estímulo (expresión basal) (B). Se aplicó para obtener tanto el porcentaje de expresión de CD25 como de IL-2. Recomendado por BD Biosciences.

Análisis de la intensidad de fluorescencia.

Se obtuvo la relación de la media geométrica de la intensidad de fluorescencia del anticuerpo (anti-IL-2 o anti CD25) entre su control de isotipo, el resultado mostró las veces que se incrementó la intensidad de fluorescencia después del estímulo. Del cociente se esperaba un valor cercano a uno para las células sin estímulo y mayor a uno en las células con estímulo. Se promediaron los diferentes valores obtenidos en los experimentos independientes y se comparó el promedio de las células con estímulo respecto a su control sin estímulo mediante una prueba de T, o bien mediante una prueba ANOVA para comparar el promedio de los sincicios de diferentes R_0 .

RESULTADOS

1. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO PARA CUANTIFICAR LA FUSIÓN CELULAR

Nuestro grupo de trabajo diseñó un método para cuantificar la fusión celular mediada por las proteínas de la envoltura del VIH-1 (56, 57). Se emplean líneas celulares Jurkat: las líneas HXBc2 y 522 (Env⁺) y la clona E6 (CD4⁺CXCR4⁺). Las células se marcan diferencialmente con colorantes fluorescentes (Env⁺ de verde y las CD4⁺ de rojo), se colocan en cocultivo y los sincicios son cuantificados por citometría de flujo como partículas con fluorescencia mixta (Fig.11).

CITOMETRÍA DE FLUJO Y MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.

Durante el desarrollo de mi proyecto de doctorado colaboré con el grupo al llevar acabo una mejor caracterización del modelo de fusión, lo cual permitió resaltar las ventajas de la citometría de flujo sobre otras técnicas para cuantificar la fusión celular.

Convencionalmente, la fusión celular se estudia por microscopía de luz y de fluorescencia, ya que permiten observar células multinucleadas y confirmar la colocalización de colorantes fluorescentes. Por lo tanto, para demostrar que el método es igualmente eficaz se cuantificó el porcentaje de sincicios formados empleando paralelamente la citometría de flujo y la microscopia de fluorescencia.

El ensayo de fusión (Materiales y Métodos) se llevó a cabo cocultivando por 5 horas células CD4⁺ y Env⁺ (200,000 de cada una), las cuales se marcaron previamente con colorante fluorescentes.

Como se muestra en la tabla 5, el porcentaje de sincicios obtenidos así como el porcentaje de células CD4⁺ y Env⁺ que quedaron sin fusionar fue muy semejante entre ambos métodos.

	Microscopía	FACS
CD4 ⁺	45.1%	41.3%
Env ⁺	34%	36.4%
Sincicios	21.0%	20.8%

Microscopía: se contaron 58 campos con un total de 856 células

Tabla 5. Análisis de la fusión celular por citometría de flujo y microscopía de fluorescencia. Se muestran los porcentajes obtenidos de cada subpoblación después de 5 horas de cocultivo (57).

Adicionalmente, el análisis por microscopía de fluorescencia permitió determinar el número de núcleos contenidos en los sincicios mediante un marcador fluorescente de ácidos nucleicos (Hoechst 33342, Molecular probe, Invitrogene). Relevantemente, se encontró que el 60% de los sincicios sólo contienen entre 2-4 núcleos (57), por lo cual su tamaño no siempre se incrementa (Fig.14A).

El análisis por citometría de flujo mostró que la mayor parte de los sincicios no presentan un aumento importante en su tamaño, ya que el patrón de distribución está muy superpuesto con el de las células no fusionadas (Fig.14B).

El patrón de granularidad de los sincicios si presentó un incremento considerable, sólo una pequeña fracción se encuentran ligeramente superpuestos con la granularidad de las células sin fusionar (Fig.14B).

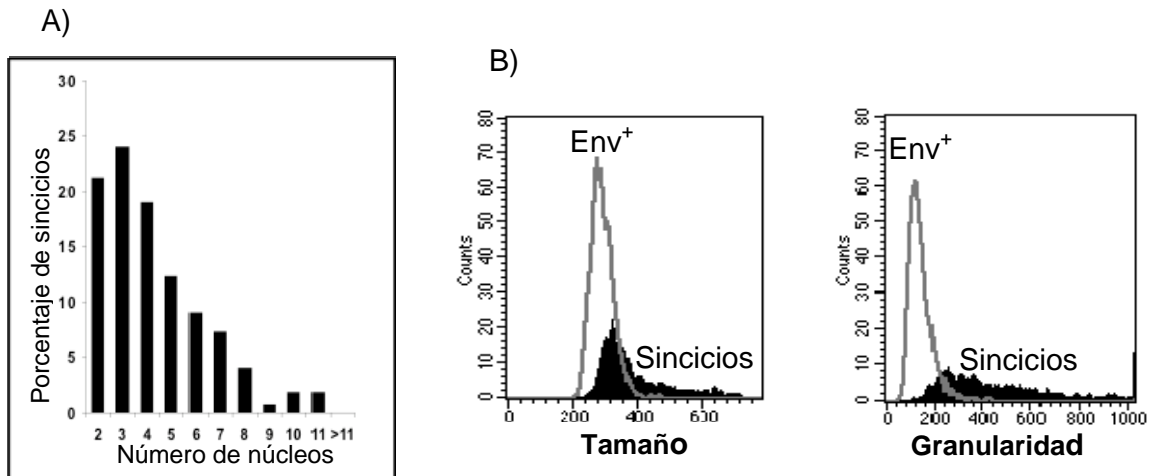


Figura 14. Análisis de las características de los sincicios.A) Distribución del número de núcleos contenidos en los sincicios. **B)** Distribución de tamaño y granularidad de los sincicios (en negro) superpuesta con la distribución de las células Env⁺ no fusionadas en gris (57).

Estos resultados demostraron que el método proporciona resultados semejantes a los obtenidos por microscopía de fluorescencia, con la ventaja de que se reducen drásticamente los tiempos de captura y análisis de las muestras mediante el citómetro de flujo. Así mismo, el patrón de tamaño de los sincicios concuerda con el análisis del número de núcleos que contienen, ya que la mayor parte (60%) no contiene más 4 núcleos por lo que no presentan un aumento considerable de tamaño. Sin embargo, la granularidad (complejidad interna) parece ser un mejor parámetro para diferenciar los sincicios respecto a células individuales, ya que se presentó un notable aumento debido a que contienen más de un núcleo.

EXPRESION DE gp120 EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA.

Las líneas celulares HXBc2 y 522 expresan las proteínas de envoltura (Env) del VIH-1 (las células 522 presentan una mutación en gp41), la expresión se controla mediante un sistema inducible asociado a tetraciclina. La expresión de Env se induce cuando la tetraciclina (tet) es retirada del medio de cultivo (16).

Cao y cols., determinaron por inmunoprecipitación que el máximo nivel de expresión de las proteínas Env se obtiene a los tres días de cultivo sin tetraciclina. En nuestro grupo se obtuvo un resultado semejante inmunoprecipitando gp120 de las proteínas totales. La expresión aumento gradualmente respecto al tiempo de inducción en las células HXBc2 y 522 (Anexo 5).

Sin embargo, la expresión las proteínas Env a nivel de membrana plasmática en éstas células no se había reportado. Por tal motivo, se establecieron las condiciones para detectar en la membrana plasmática la expresión de gp120 (subunidad de superficie del complejo Env). Se utilizó un suero policlonal de conejo anti-gp120 y el análisis de la expresión se realizó por citometría de flujo.

En la figura 15 se muestra la población positiva para la expresión de gp120 presente en las células HXBc2 y 522 en las que se indujo la expresión por 72 hrs. No se observó unión del anticuerpo en las células sin inducir ni en las células CD4⁺.

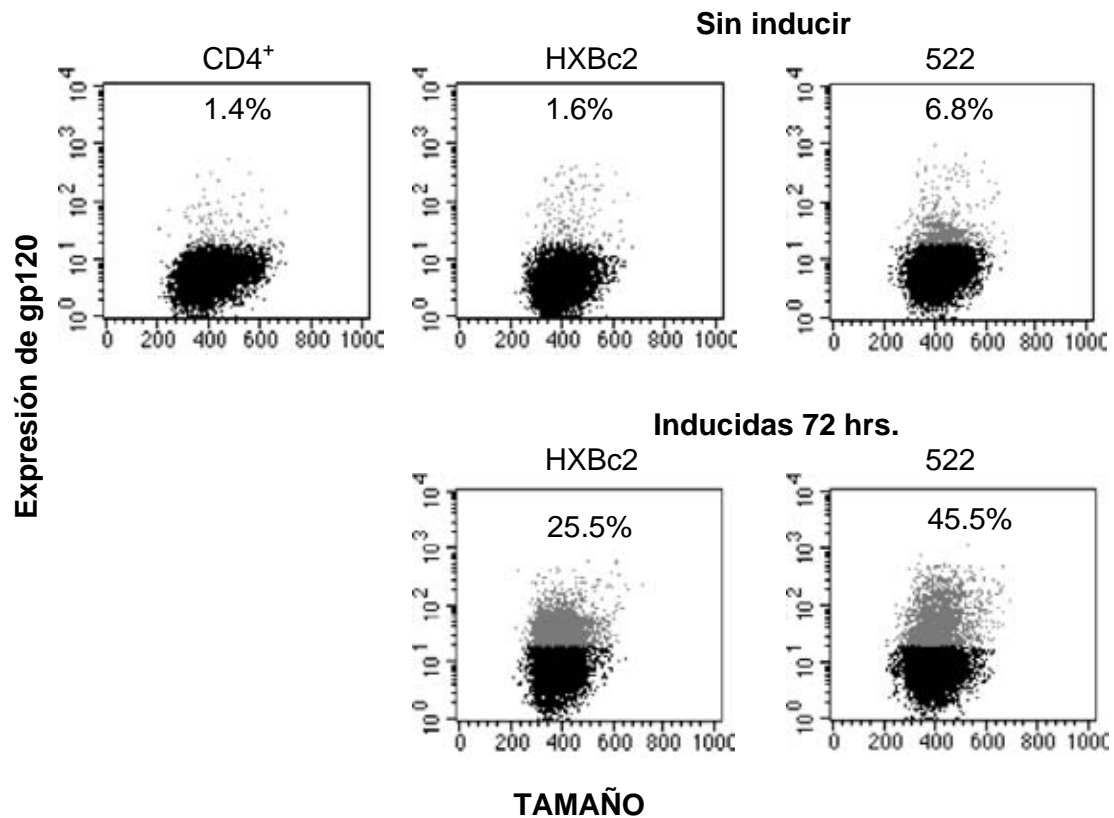


Figura 15. Expresión de gp120 (Env). Graficas de puntos del tamaño contra la señal de expresión de gp120. En la parte superior se muestran las células HxBc2 y 522 sin inducir y las células CD4⁺ (controles negativos). En la parte inferior las células inducidas por 72 hrs. Se realizó una inmunofluorescencia indirecta con anticuerpo de conejo anti-gp120 y un anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de conejo acoplado a FITC. Se estableció la señal negativa con los controles de isotipo y células sin marca, en cada gráfica se muestra el porcentaje de células positivas en color gris.

Al analizar las medias geométricas de intensidad media de fluorescencia (IMF) se observa un claro aumento en las medias de las células HxBc2 y 522 inducidas.

Células	CD4 ⁺	Hx Sin Induc.	HxInduc.	522 Sin Induc.	522 Induc.
IMF	5.4	4.5	11.6	7.1	14.3

Tabla 6. Intensidad media de fluorescencia (IMF) de la expresión de gp120. Se observa un aumento en las células inducidas (Env⁺) respecto a los controles negativos (células CD4⁺ y células sin inducir).

DETECCIÓN DE FRET POR MICROSCOPIA CONFOCAL.

Si dos colorantes fluorescentes se encuentran muy próximos, pueden interaccionar y provocar cambios en su intensidad de emisión de fluorescencia, como por ejemplo: una reducción sin cambiar su espectro de emisión (“quenching”) o una transferencia de energía (FRET por sus siglas en inglés Fluorescent resonance energy transfer). El FRET se presenta cuando la emisión de un fluorocromo (donador) se traslapa con la absorción de otro (aceptor), es un proceso altamente dependiente de la distancia que existe entre las moléculas de fluorocromos, ya que deben encontrarse a una distancia de entre 10-100nm para que se lleve a cabo. El FRET provoca un incremento en la intensidad de fluorescencia emitida por el aceptor y frecuentemente una reducción en la emisión del donador sin cambiar la longitud de onda de las emisiones (124).

El FRET ha sido empleado constantemente para monitorear la fusión célula-célula o virus-célula, detectándose las emisiones de fluorescencia generalmente mediante espectrofluorómetros o por microscopia de fluorescencia (11).

Previamente se demostró mediante la citometría de flujo que ocurre FRET entre los colorantes lipofílicos DiO/Dil y que ocurre cuando ambos colorantes se encuentran en la misma membrana plasmática como en los sincicios (57). Esto nos permitió utilizar el FRET para diferenciar sincicios reales de agregados, ya que solo en los sincicios se presenta colocalización de los colorantes y provoca el aumento en la intensidad de fluorescencia roja (Anexo 2). Dado que el FRET puede ser

estudiado también por microscopía confocal, se realizó el análisis de los sincicios mediante la técnica de fotoblanqueamiento, lo cual nos permitió demostrar la equivalencia de los resultados obtenidos con el citometro de flujo.

En la figura 16 se muestra el análisis tridimensional por microscopía confocal de un sincicio. Se observa que la distribución de los colorantes no es homogénea sino en microdominios, además la mayor parte de los colorantes se localiza en el interior de la célula y se observan zonas en donde no hay colocación (machas rojas o verdes).

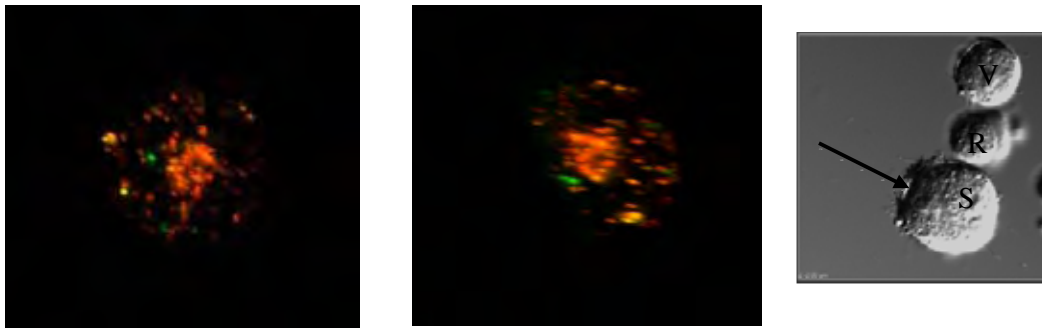


Figura 16. Reconstrucción tridimensional de un sincicio. Se analizaron los canales de fluorescencia verde y roja en un microscopio confocal, con el objetivo 40X. En el extremo derecho se observa el sincicio (S) del que se realizo la reconstrucción y dos células emiten fluorescencia roja (R) y verde (V). Las células se cocultivaron por 2 hrs y se marcaron 12 hrs. antes de la fusión.

Durante el fotoblanqueamiento se seleccionó una región en células multinucleadas, a la cual se dirigió una sobreexcitación con el láser de 530 (para sobreexcitar al marcador rojo) y provocar que la emisión de fluorescencia roja se apague. Al apagarse la fluorescencia roja (aceptor) se observó un incremento en la intensidad de fluorescencia verde (donador), debido a que ya no absorbían su emisión de fluorescencia.

En la figura 17 se muestran las intensidades de fluorescencia promedio (roja y verde) provenientes de la región seleccionada en un sincicio respecto al tiempo de fotoblanqueamiento. Se puede observar un cruce de las intensidades de fluorescencia después de los 50 segundos, debido a que al apagarse la fluorescencia roja permite que la fluorescencia verde incremente su intensidad de emisión.

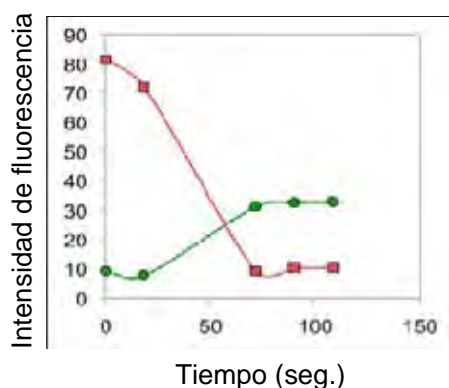


Fig. 17. Cambios en la intensidad de emisión de fluorescencia durante el fotoblanqueamiento. En círculos se muestra la emisión de fluorescencia verde y en cuadros la emisión de fluorescencia roja. Cuando el rojo se apaga se presenta el incremento en la fluorescencia verde.

En la figura 18 se muestra el sincicio seleccionado y la región donde se dirigió el láser de excitación de 530nm. Se muestran las emisiones de fluorescencia iniciales (tiempo cero) y los cambios observados secuencialmente durante el fotoblanqueamiento. En la fotografía del tiempo de 1min. y 18 seg. se observa que desaparece la emisión de fluorescencia roja e incrementa la intensidad de fluorescencia verde emitida. Este resultado demostró que en los sincicios se presenta el FRET entre los colorantes lipofílicos. Cabe mencionar que no en todas los sincicios ni en todas las regiones seleccionadas se pudo observar el FRET, debido a que los colorantes no siempre están colocados.

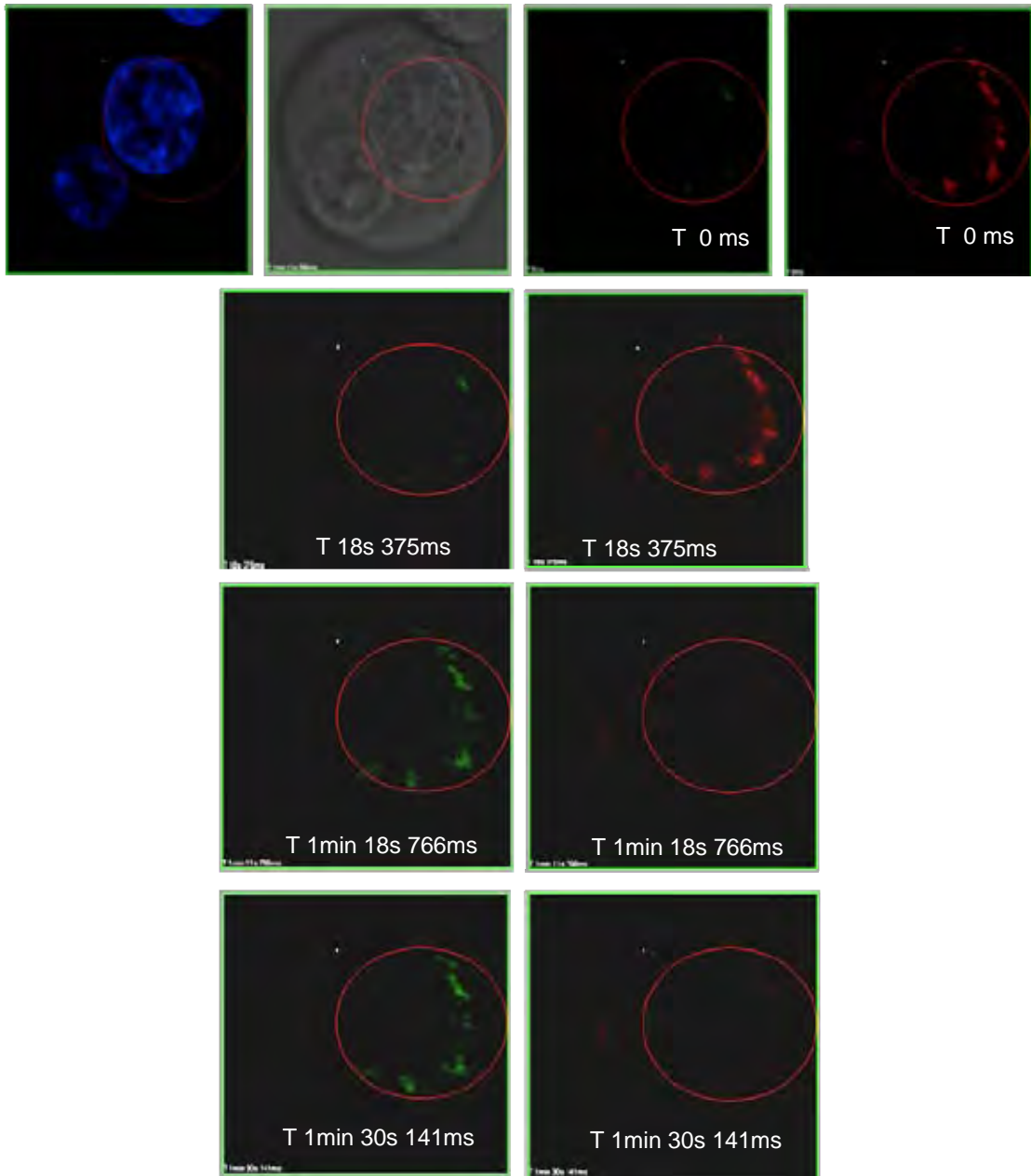


Figura 18. Fotografías de la secuencia del fotoblanqueamiento. En la parte superior se muestran los canales de fluorescencia analizados. En la parte inferior se muestran las fotos de diferentes tiempos del fotoblanqueamiento. En la imagen de 1min 18s, se observa que la intensidad de emisión de la fluorescencia verde aumenta en el momento que se apaga.

Nuevamente se muestra una ventaja de la citometría de flujo, ya que por microscopia confocal se deben analizar individualmente a los sincicios, y no en todas las regiones seleccionadas se presenta FRET, debido a que los colorantes lipofílicos no siempre colocalizan ya que se distribuyen en microdominios (78), como se observó en la reconstrucción 3D del sincicio. Mientras que el citómetro de flujo determina el promedio de la intensidad de fluorescencia de las partículas analizadas y se observa el claro aumento en la fluorescencia roja de los sincicios debido al FRET (57). Cabe resaltar que la similitud en porcentajes de sincicios obtenidos y demostrar el FRET por ambos métodos, brinda confiabilidad para aplicar el método por citometría de flujo en el estudio cuantitativo de la fusión celular incluso de otros sistemas, ya que el FRET permite descartar la agregación de la fusión verdadera (57) que puede ser importante fuente de error en algunos modelos (43).

2. COMPOSICIÓN CELULAR DE LOS SINCICIOS

VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS DURANTE EL COCULTIVO.

Con la finalidad de examinar si el porcentaje de células CD4⁺ disminuye en el cocultivo debido a muerte celular y no a una incorporación en los sincicios, se analizó la viabilidad a través del tiempo de las tres poblaciones presentes en el cocultivo (sincicios, CD4⁺ y Env⁺ no fusionadas).

En cada subpoblación del cocultivo (Fig. 19A) se analizó el porcentaje de células que no unen anexina V (indicador de apoptosis) ni incorporan ioduro de propidio IP (indicador de necrosis). Después de 8 horas de cocultivo no hubo disminución considerable en la viabilidad de las células. Sin embargo, en el cocultivo de células HXBc2 con CD4⁺ es mayor el porcentaje de células no viables que en el cocultivo de células no fusogénicas 522 con CD4⁺.

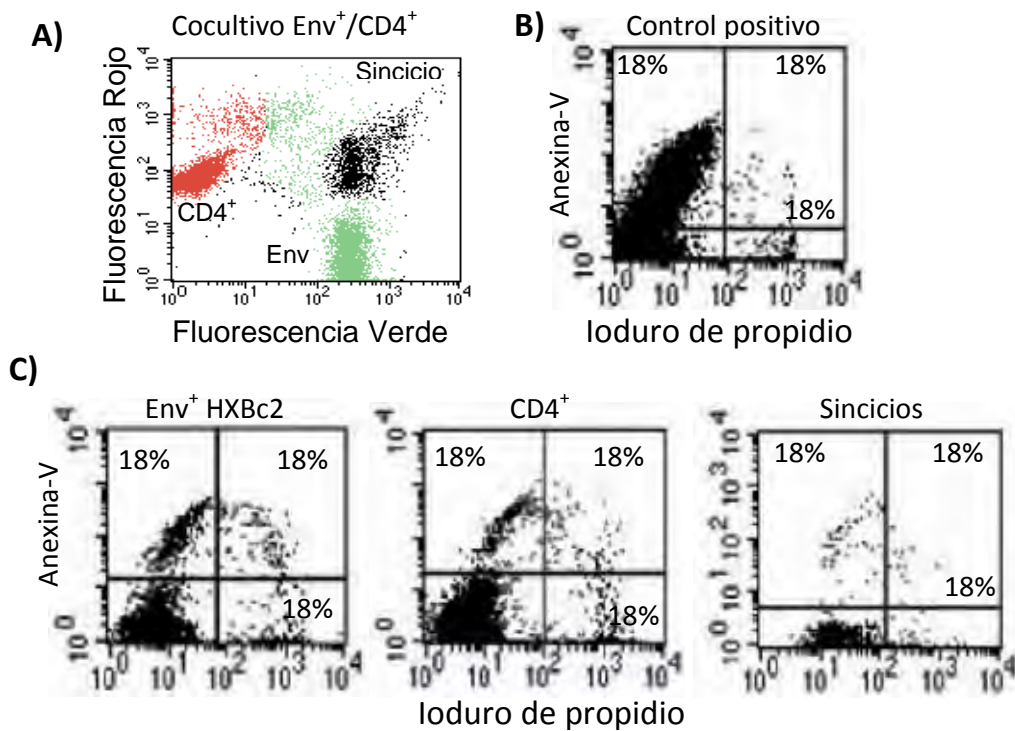


Figura 19. Viabilidad de las células en cocultivo. **A)** Gráfica de puntos del cocultivo HXBc2/CD4⁺, se muestran las tres subpoblaciones analizadas, CD4⁺ en rojo, Env en verde, y sincicios en negro. **B)** Control positivo, células CD4⁺ incubadas con camptotecina, se observa claramente una población que une anexina-V (se indujo apoptosis). **C)** Análisis de viabilidad de las subpoblaciones del cocultivo, Env⁺, CD4⁺ y sincicios. Se muestran los porcentajes de las células en apoptosis (positivas para anexina-V) y las que mueren por necrosis (positivas para IP), el resto son células viables.

En el cocultivo de células CD4⁺ con Env⁺ 522 (no hay formación de sincicios), la viabilidad es casi de 95% en ambos tipos de células (Fig. 20B); mientras que en el cocultivo HXBc2 con CD4⁺ disminuye en ambos a 87-85% (Fig. 20A), esta disminución se debe a un aumento en el porcentaje de células que unen anexina V (células en apoptosis temprana).

Estos resultados mostraron que la formación de sincicios indujo una disminución en el porcentaje de viabilidad de células CD4⁺ circundantes, ya que en el control de células CD4⁺ en monocultivo se observa una viabilidad aproximada de 95% (Fig. 20C), semejante a la obtenida en el cocultivo con células 522 (no se forman sincicios), pero en el cocultivo con Env⁺HXBc2 disminuyó a 87-85%. Por lo tanto podemos concluir que el cocultivo con células que expresan la proteína Env no afecta su viabilidad pero si la presencia de sincicios.

La viabilidad de las células Env⁺ (HXBc2 y 522) en cocultivo es semejante a sus respectivos controles en monocultivo; para las HXBC2 se obtuvo un 90% en el control y 85% en el cocultivo, mientras que para las células 522 se obtuvo 95% de viabilidad en ambos (Fig. 20C).

En los controles en monocultivo, la viabilidad de las células Env⁺ HXBc2 es la que más disminuye. Este hecho ya ha sido reportado en otros sistemas, ya que se ha observado que la expresión de las proteínas Env del VIH-1 es perjudicial para la célula (16, 86).

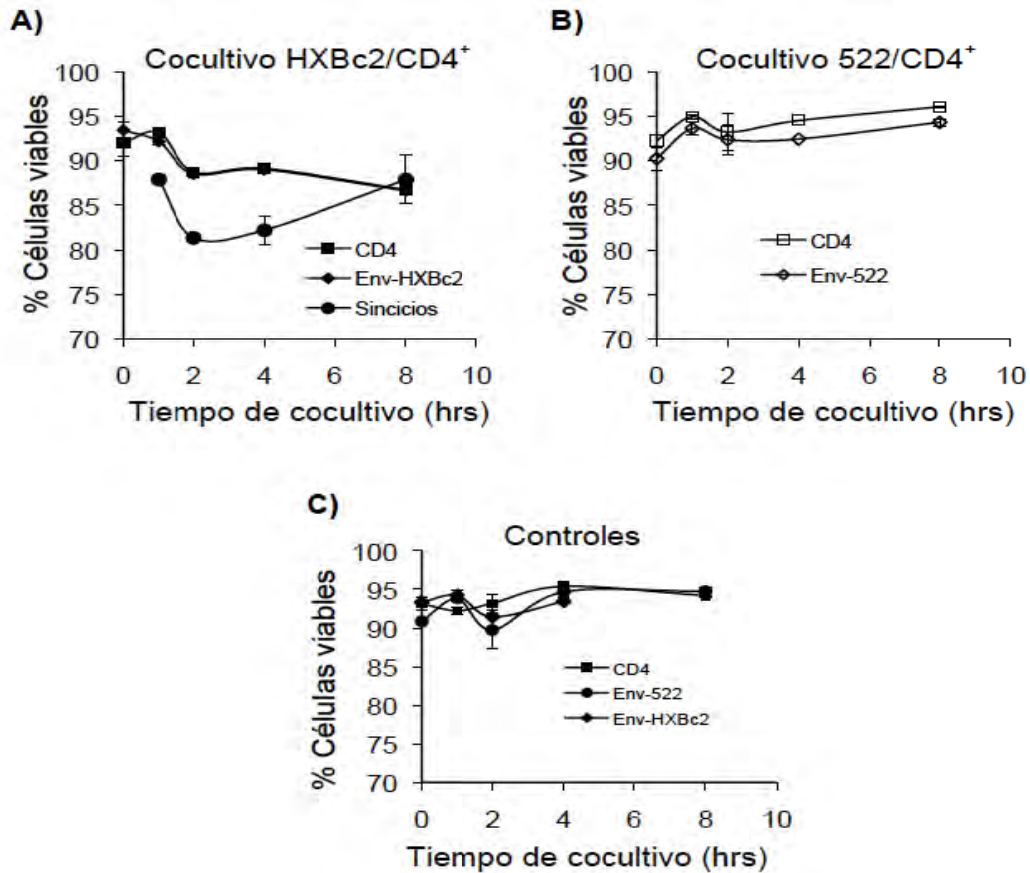


Figura 20. Viabilidad de las células en cocultivo. **A)** Porcentaje de viabilidad de las células que quedan sin fusionar en el cocultivo HXBc2/CD4⁺, se muestra también la viabilidad de los sincicios. **B)** Porcentaje de viabilidad de las células del cocultivo 522/CD4⁺. **C)** Porcentaje de viabilidad de los controles en monocultivo. Promedio de dos duplicados y el error estándar. Es un experimento representativo de tres experimentos independientes.

Relevantemente, no hay diferencia entre la viabilidad de las células CD4⁺ y las Env⁺ en cocultivo (Fig. 20A), por lo que se puede concluir que no disminuyen las células CD4⁺ debido a muerte celular, sino por su incorporación en los sincicios.

Adicionalmente, más del 80% de sincicios permanecieron viables después de 8 horas de incubación (Fig. 20A), mientras que el 20% restante solo unen anexina V debido a que se encuentran en apoptosis temprana.

ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN CELULAR RELATIVA DE LOS SINCICIOS.

La fusión celular estudiada en este modelo es homotípica (solo linfocitos T CD4⁺), sin embargo los resultados preliminares indican que las células CD4⁺ se incorporan más a los sincicios, por lo que fue necesario determinar su composición celular relativa, es decir de cuantas células CD4⁺ por cada Env⁺ se conforman los sincicios. En nuestro grupo de trabajo se cuenta con una ecuación que permite estimar la composición celular relativa de los sincicios (Fig. 21), para aplicar la ecuación se requiere conocer el porcentaje inicial de las células CD4⁺ y Env⁺, el porcentaje de sincicios generados y el porcentaje de células que quedan sin fusionarse a cierto tiempo de cocultivo (92). Esta ecuación se diseñó mediante un modelo matemático, basado en simulaciones teóricas de los cambios en los porcentajes de células sin fusionar a través del tiempo, suponiendo que se incorporan diferentes cantidades de células CD4⁺ a los sincicios. Con esta ecuación se obtiene un índice estequiométrico (*r*) que representa el promedio de células CD4⁺ incorporadas en los sincicios por cada célula Env⁺.

$$r = \frac{R_0 - (1 + R_0) (CD4^+)_i}{f_i}$$

*R*₀ = Porcentaje inicial de células CD4⁺ entre el porcentaje inicial de Env⁺

CD4: Porcentaje de células sin fusionar al tiempo (i) de cocultivo dividido en 100.

r = Promedio de CD4⁺ incorporadas a los sincicios por cada Env⁺

*f*_i: Porcentaje de sincicios generados al tiempo (i) de cocultivo dividido en 100.

Figura 21. Cálculo del índice estequiométrico. Se basa en simulaciones teóricas, se requiere conocer la proporción inicial de las células y los porcentajes de las tres poblaciones en determinado tiempo. Asume que las células no se mueren durante el cocultivo y que no se replican (92).

En la figura 22A se muestra una cinética de fusión de 8 horas de cocultivo, al aplicar la ecuación en los tiempos indicados (Fig. 22B), se obtiene un índice estequiométrico de 2, significa que en promedio se incorporaron a los sincicios dos células CD4⁺ por cada célula Env⁺(2:1).

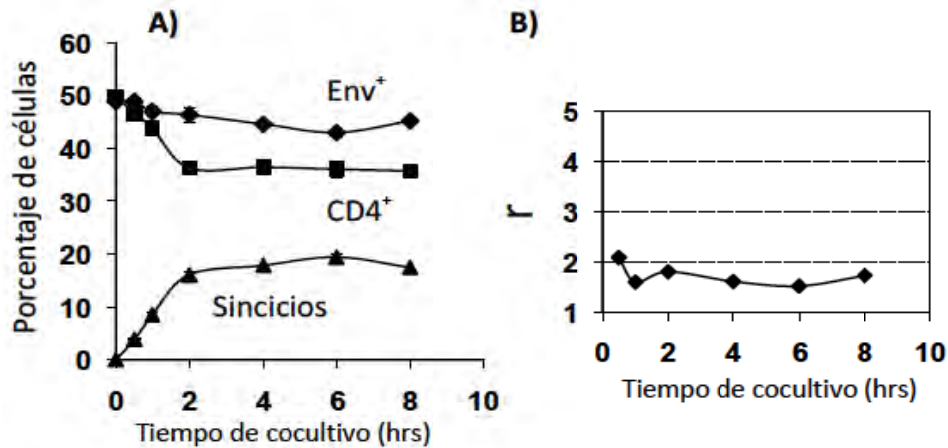


Figura 22. Índice estequiométrico. A) Porcentaje de sincicios y células sin fusionar en una cinética de fusión de 8 hrs. de cocultivo. Disminuyen más las células CD4⁺ B) Índice estequiométrico obtenido con la ecuación para cada tiempo del cocultivo, el valor representa que en promedio se incorporaron 2 células CD4⁺ por cada Env⁺ en los sincicios.

Por otro lado, también se puede estimar la composición celular relativa de los sincicios por medio del incremento en las intensidades medias de fluorescencia, sin embargo se requieren colorantes fluorescentes en los que no se presente FRET. Se seleccionaron para ello los colorantes hidrofílicos CTFDA y CTCMR, que fluorescen verde y rojo respectivamente. Estos colorantes (Anexo 3) son moléculas hidrofóbicas que se incorporan en las células donde son procesados por enzimas celulares y los convierten en moléculas hidrofílicas, por lo cual ya no puedan atravesar la membrana plasmática y permanecen en el citoplasma de la célula.

Se encontró que no se presenta FRET con los colorantes citoplasmáticos al encontrarse en la misma célula, ya que al analizar (por citometría de flujo) células CD4⁺ que se marcaron con el colorante rojo e inmediatamente después con diferentes concentraciones del colorante verde (Fig. 23A), no se presentaron aumento en la intensidad media de fluorescencia roja (Fig.23B); a diferencia de lo observado en los colorantes de membrana, en donde las células con ambos colorantes mostraron un incremento notable en la intensidad de fluorescencia roja (Anexo 2).

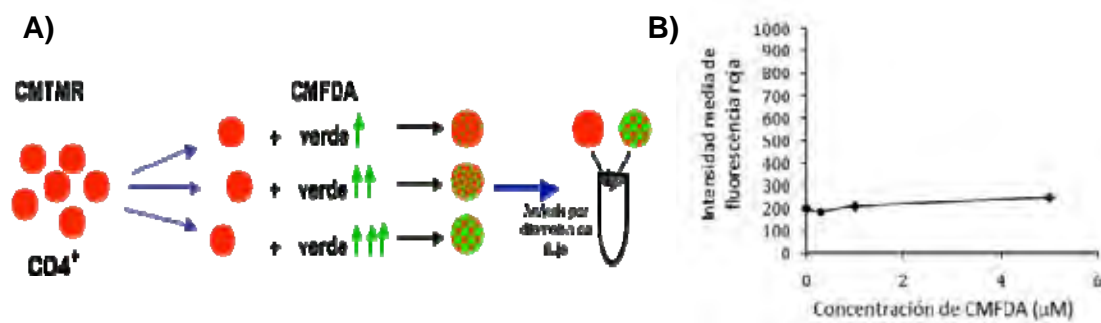


Fig. 23. Colorantes hidrofílicos fluorescentes. A) Esquema del experimento para demostrar que no se presenta FRET. B) Intensidad de fluorescencia roja de las células que se marcaron con ambos colorantes, la concentración de verde se aumento hasta 5μM (13 veces mas de la concentración que se emplea normalmente). No se observa incremento en la intensidad de fluorescencia roja de las células.

Posteriormente se llevó a cabo el ensayo de fusión bajo el mismo protocolo, las células CD4⁺ se marcaron de rojo y las Env⁺ de verde, y después del cocultivo se analizaron por citometría de flujo. Adicionalmente, se realizó un estudio por microscopia de fluorescencia marcando además los núcleos con el colorante de ácidos nucleicos Hoechst 33342. En la figura 24 se muestran imágenes del análisis microscópico, se indican con flechas sincicios que emiten fluorescencia roja y verde, con diferente tamaño y número de núcleos.

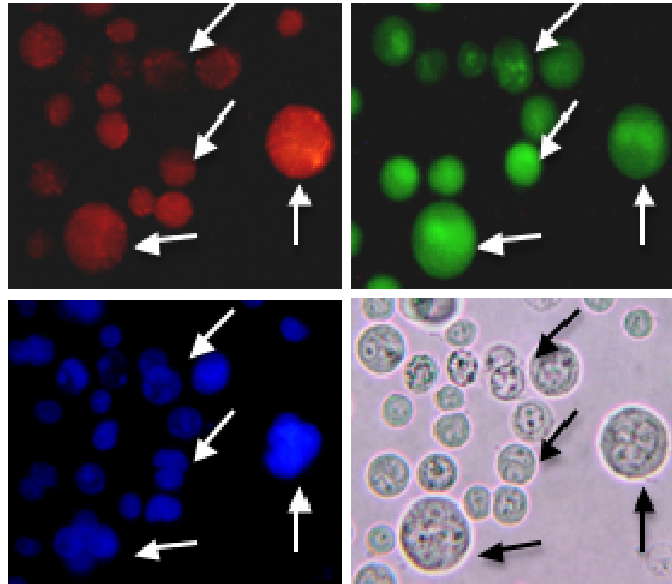


Figura 24. Microscopía de fluorescencia del cocultivo HXBc2/CD4⁺. Se muestra el campo claro seleccionado, con flechas se indican los sincicios que emiten fluorescencia tanto en rojo como en verde y que contienen al menos dos núcleos (azul). Se observa nuevamente un tamaño muy heterogéneo en los sincicios.

Del análisis por citometría de flujo se observó que el porcentaje de sincicios obtenido con los colorantes de citoplasma es siempre de 1 a 3% menor que el obtenido con los colorantes de membrana (Fig. 25C). Lo cual indica que en la mayor parte de las partículas dobles positivas cuantificadas por citometría de flujo se lleva a cabo mezcla de citoplasmas y solo un bajo porcentaje de partículas dobles fluorescentes se genera solo por mezcla de membranas (hemifusión). Este hecho en conjunto con el FRET demostró que se cuantifican sincicios verdaderos.

El porcentaje de agregados obtenidos en el cocultivo con células 522 (Fig. 25B) y la inhibición con el anticuerpo monoclonal anti-CD4 (Fig. 25D) son muy semejantes con ambos tipos de colorantes.

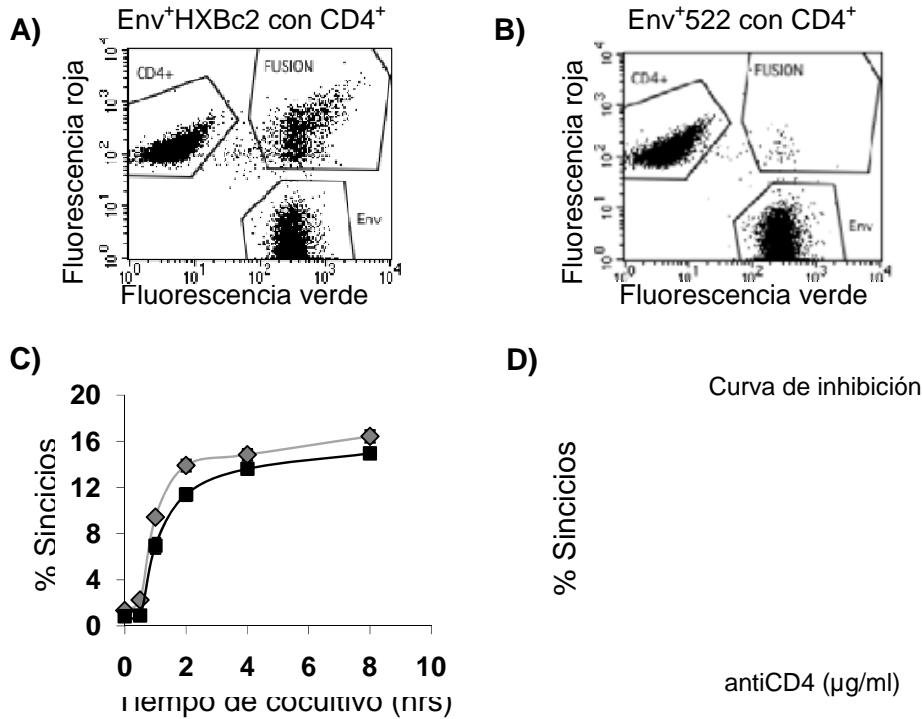
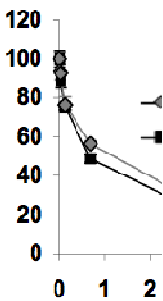


Figura 25. Fusión celular empleando colorantes hidrofílicos. **A)** Gráfica de puntos del análisis por citometría de flujo del cocultivo HXBc2/CD4⁺, se indica el porcentaje de sincicios obtenido. **B)** Gráfica de puntos del cocultivo 522/CD4⁺, se indica el porcentaje de agregados obtenidos. **C)** Cinética de fusión, cocultivos en paralelo empleando células marcadas con colorantes de citoplasma y de membrana. **D)** Curva de inhibición con anticuerpo anti-CD4 empleando células marcadas con colorantes de citoplasma y de membrana.

Al analizar la intensidad media de fluorescencia de los sincicios, no se observó el incremento en la fluorescencia roja de toda la población (Fig. 25A) como se observó con los colorantes de membrana (52). Sin embargo, una fracción de los sincicios tiene una intensidad de fluorescencia roja mayor a la que tienen las células CD4⁺ no fusionadas.

La composición celular relativa de los sincicios al analizar el número de veces que aumentó la intensidad media de fluorescencia roja y verde, respecto a la que tenían las células CD4⁺ y Env⁺ al inicio del cocultivo.



En la figura 26A se muestran las gráficas de puntos al inicio del cocultivo, así como de las subpoblaciones generadas después de 8 horas de incubación, se obtuvo un 16% de fusión. Al analizar los cambios en la intensidad media de fluorescencia de los sincicios se observó que solo la fluorescencia roja aumentó, mientras que la fluorescencia verde fue muy similar a la que tenían las células Env⁺ al inicio del cocultivo (Fig. 26B). El incremento en la fluorescencia roja de los sincicios fue aproximadamente de 2.5 veces, indicando que las células CD4⁺ se incorporaron a los sincicios en una proporción de 5 CD4⁺ por cada 2 células Env⁺.

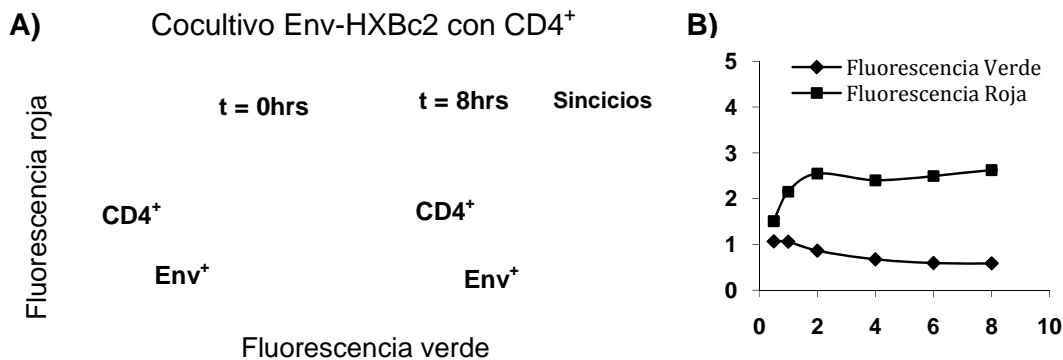
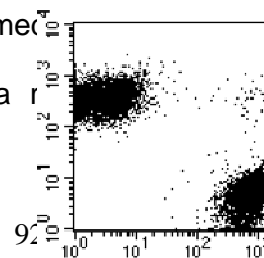


Figura 26. Análisis de la intensidad media de fluorescencia. **A)** Gráficas de puntos del cocultivo de células HXBc2/CD4⁺ al inicio y después de 8 horas de incubación. **B)** Cambios en la intensidad media de fluorescencia (IMF) verde y roja de los sincicios a través del tiempo. La relación se obtuvo dividiendo la fluorescencia roja y verde de los sincicios al tiempo indicado, entre la intensidad de fluorescencia roja y verde de las células CD4⁺ y Env⁺ al inicio del cocultivo. La fluorescencia roja se incrementó 2.5 veces, indicando una composición celular relativa de 5CD4⁺:2Env⁺.

Estos resultados mostraron que no se afecta la extensión ni la especificidad de la fusión celular al emplear colorantes hidrofílicos, además permiten llevar a cabo el análisis de la composición celular relativa de los sincicios mediante las intensidades medias de fluorescencia, aunque es una composición celular promedio ya que no todos los sincicios presentan un aumento en la fluorescencia



(composición 1CD4⁺:1Env⁺), pero el promedio de toda la población se incrementa por los sincicios que sí incorporan más CD4⁺.

3. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA COMPOSICIÓN CELULAR RELATIVA DE LOS SINCICIOS.

EFFECTO DE LA PROPORCIÓN INICIAL DE LAS CÉLULAS CD4⁺ Y Env⁺ EN LA COMPOSICIÓN CELULAR RELATIVA DE LOS SINCICIOS.

La formación de sincicios y su composición celular podrían verse afectados por diversos factores como son: la cantidad de células CD4⁺ y Env⁺ disponibles; la expresión de los receptores CD4 y CXCR4 y de las proteínas Env, las características de la célula blanco como su estado de activación y estirpe celular, etc. En este sentido, se decidió evaluar el efecto de la disponibilidad de células (CD4⁺ y Env⁺), tanto en la cantidad como en la composición celular relativa de los sincicios. Para lo cual se colocaron cocultivos en paralelo en los que la cantidad inicial de células CD4⁺ fue distinta: desde tener 10 veces más CD4⁺ que Env⁺, hasta el caso contrario tener 10 veces menos CD4⁺ que Env⁺ (Tabla 4, Materiales y métodos). Las diferentes proporciones iniciales (R_0) se establecieron como el cociente del porcentaje inicial de las células CD4⁺ entre el porcentaje de las células Env⁺ (Fig. 27).

Para cada cocultivo con diferente proporción inicial (R_0) se analizó: el porcentaje de sincicios formados a través del tiempo, el porcentaje máximo obtenido

a 8 horas de cocultivo, el tamaño y granularidad de los sincicios, el índice estequiométrico, y el incremento en la intensidad de fluorescencia roja de los sincicios obtenidos empleando células marcadas con colorantes de citoplasma.

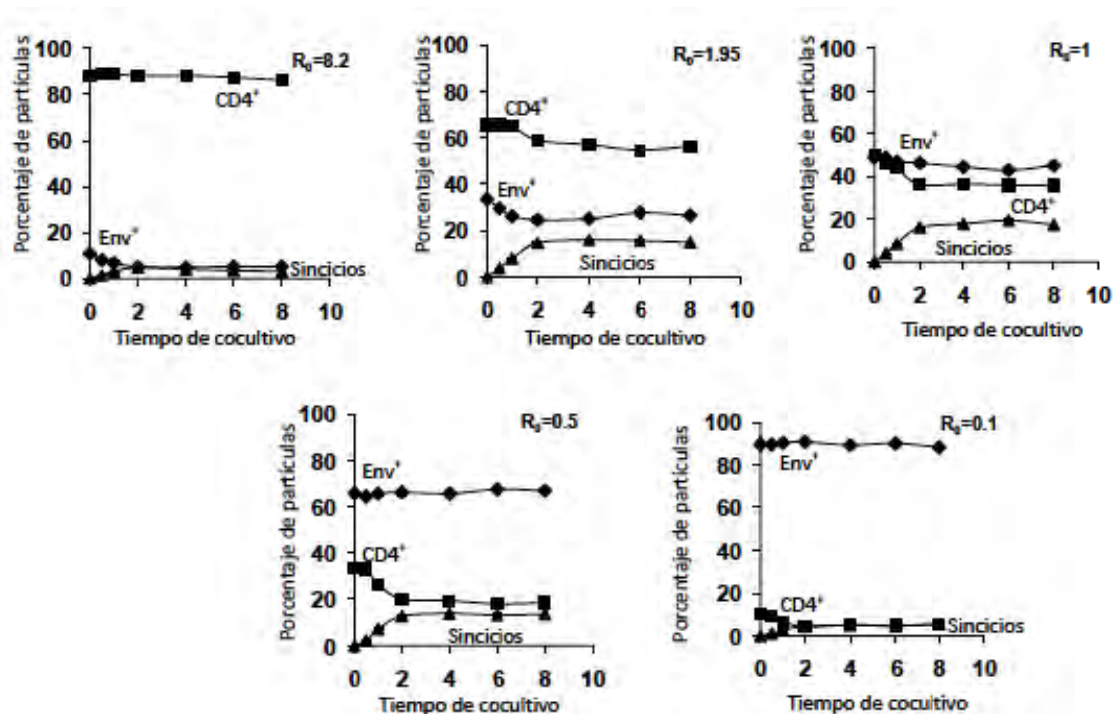


Figura 27. Cocultivos con diferentes proporciones iniciales (R_0). Se colocaron cocultivos en paralelo en los cuales se cambió la cantidad inicial de las células reactantes conservando la densidad celular (400,000 células/pozo). El porcentaje máximo de fusión de obtienen entre las 2-3 hrs. de incubación en todas las proporciones iniciales.

El análisis del porcentaje máximo de sincicios formados después de 8 hrs de cocultivo ($F_{\text{máx.}}$) respecto a la R_0 se muestra en la figura 28A, en negro se muestran los valores obtenidos con células que se marcaron con los colorantes lipofílicos DiO/Dil y en gris los valores que se obtuvieron con células que se marcaron con los colorantes de citoplasma. Se observó que el porcentaje más alto

se obtuvo en la proporción uno a uno ($R_0=1$), al cambiar la cantidad inicial de cualquiera de las células reactantes ($CD4^+$ o Env^+), el porcentaje de sincicios formados disminuye.

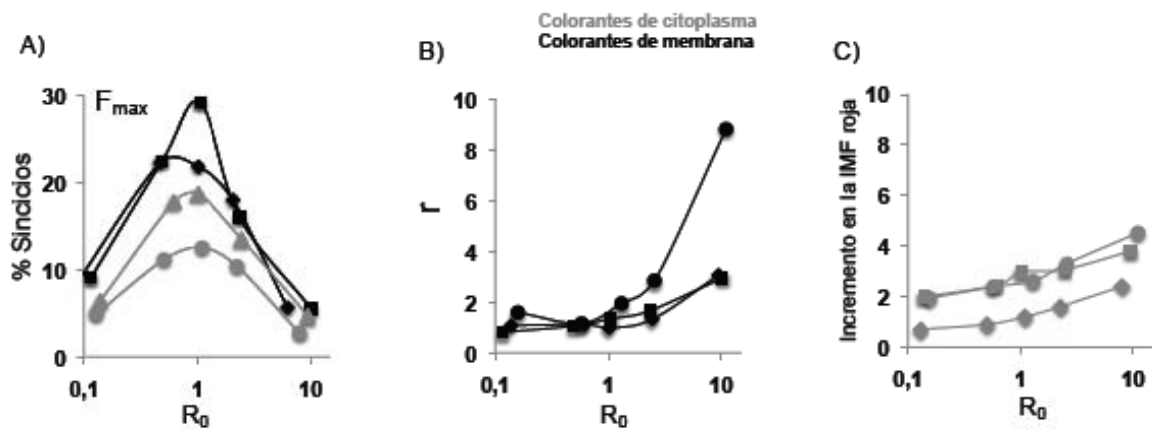


Fig. 28. Efecto de la proporción inicial en la composición celular relativa de los sincicios. A) Porcentaje de sincicios obtenido con diferentes proporciones iniciales en 4 experimentos independientes. **B)** Índice estequiométrico de las cinéticas respecto a la proporción inicial (R_0) en tres experimentos independientes, la incorporación de $CD4^+$ a los sincicios aumenta conforme aumenta la R_0 . **C)** Incremento en la intensidad media de fluorescencia roja (IMF) respecto a la R_0 en tres experimentos independientes (empleando los colorantes de citoplasma).

Al obtener el índice estequiométrico (por medio del ecuación) y al analizar el incremento en la intensidad media de fluorescencia (Fig. 28B y C), se observó una mayor incorporación de células $CD4^+$ en los sincicios respecto al incremento en las proporciones iniciales (R_0), cuando el porcentaje inicial de $CD4^+$ es mayor que el de Env^+ . La composición celular relativa obtenida es diferente entre cada experimento (incluso entre experimentos donde se empleó el mismo tipo de colorantes), sin embargo la tendencia observada siempre es la misma, la incorporación de células $CD4^+$ aumenta conforme hay más células $CD4^+$ al inicio del cocultivo, es decir aumenta respecto a la R_0 .

La media de tamaño y granularidad de los sincicios (después de 8 hrs. de cocultivo) también aumentan respecto a la R_0 , es decir la incorporación de un mayor número de células $CD4^+$ genera un aumento en su tamaño y granularidad (Fig. 29A y B). Adicionalmente, el tamaño y granularidad de los sincicios también aumentan respecto al tiempo de cocultivo en todas las proporciones analizadas (92). El incremento en la granularidad es mucho más claro que el de tamaño, por lo que se puede considerar un buen parámetro para analizar la complejidad de los sincicios, ya que presentan una mayor dispersión de luz debido a los núcleos que contienen.

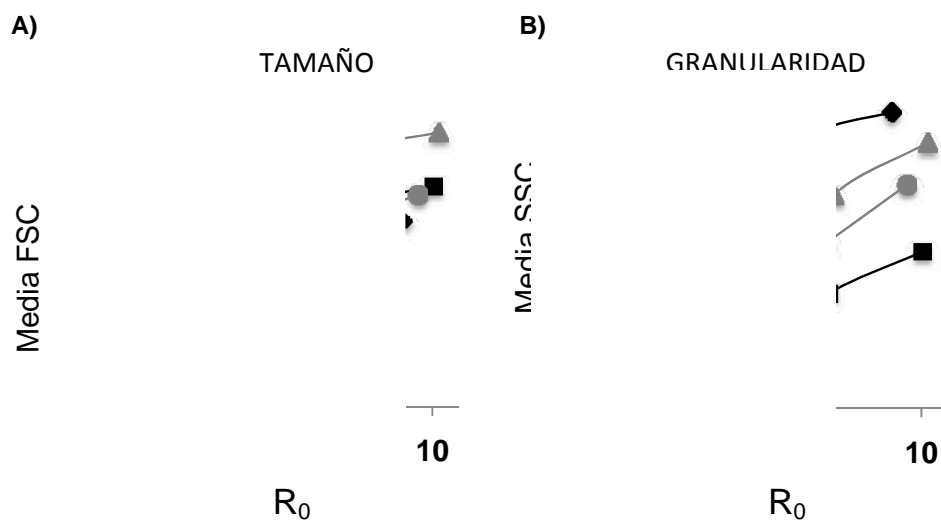


Figura 29. Efecto de la proporción inicial en el tamaño y granularidad de los sincicios. **A)** Media de tamaño (FSC) de los sincicios formados después de 8 horas de cocultivo en las distintas proporciones iniciales. **B)** Media de granularidad (SSC) de los sincicios formados después de 8 horas de cocultivo en las distintas proporciones iniciales. En ambos parámetros se observa un incremento respecto a la R_0 . Se muestra el comportamiento de 4 experimentos independientes. En gris se muestra la cinética donde se emplearon colorantes de citoplasma y en negro las cinéticas con colorantes de membrana.

Cabe mencionar que las desviaciones estándar del tamaño y granularidad en todas las proporciones iniciales también aumentan respecto al tiempo de cocultivo y respecto a la proporción inicial, mostrando que las poblaciones son cada vez más heterogéneas (aumenta el rango de las medias) en tamaño y granularidad.

EFFECTO DE LA EXPRESIÓN DE Env EN LA COMPOSICIÓN CELULAR RELATIVA DE LOS SINCICIOS.

Cao y cols, reportaron que el máximo de expresión de Env se obtiene a los tres días de cultivo sin tetraciclina. En nuestro grupo de trabajo se obtuvo un resultado semejante, ya que al realizar una inmunoprecipitación de gp120 de las proteínas totales de las células Env⁺, se observó un incremento de la proteína gp120 conforme aumentó el tiempo de inducción (Evelyn Rivera, 2006) tanto para las HXBc2 como para las 522 (Anexo 5).

Por lo tanto, para evaluar si la expresión de Env afecta la composición de los sincicios, se indujo a diferentes tiempos la expresión de Env en las células HXBc2 y 522 (16,24, 48 y 72 hrs). Las células inducidas se colocaron en cocultivo con las células CD4⁺ en diferentes proporciones iniciales y se evaluaron las propiedades de los sincicios. Así mismo, se evaluó la expresión de Env (gp120) a nivel de membrana plasmática por medio de una inmunofluorescencia indirecta.

En la figura 30, se puede observar que en ambas líneas celulares se detecto la expresión de gp120 en un nivel detectable a las 24 horas de inducción. Sin embargo, el porcentaje de células HXBc2 que expresan gp120 ya no aumenta entre 24 y 72 horas de inducción, mientras que en las células 522 el porcentaje de expresión de gp120 va aumentando gradualmente entre 2-3% respecto al tiempo de inducción. No hay expresión detectable en las células sin inducir.

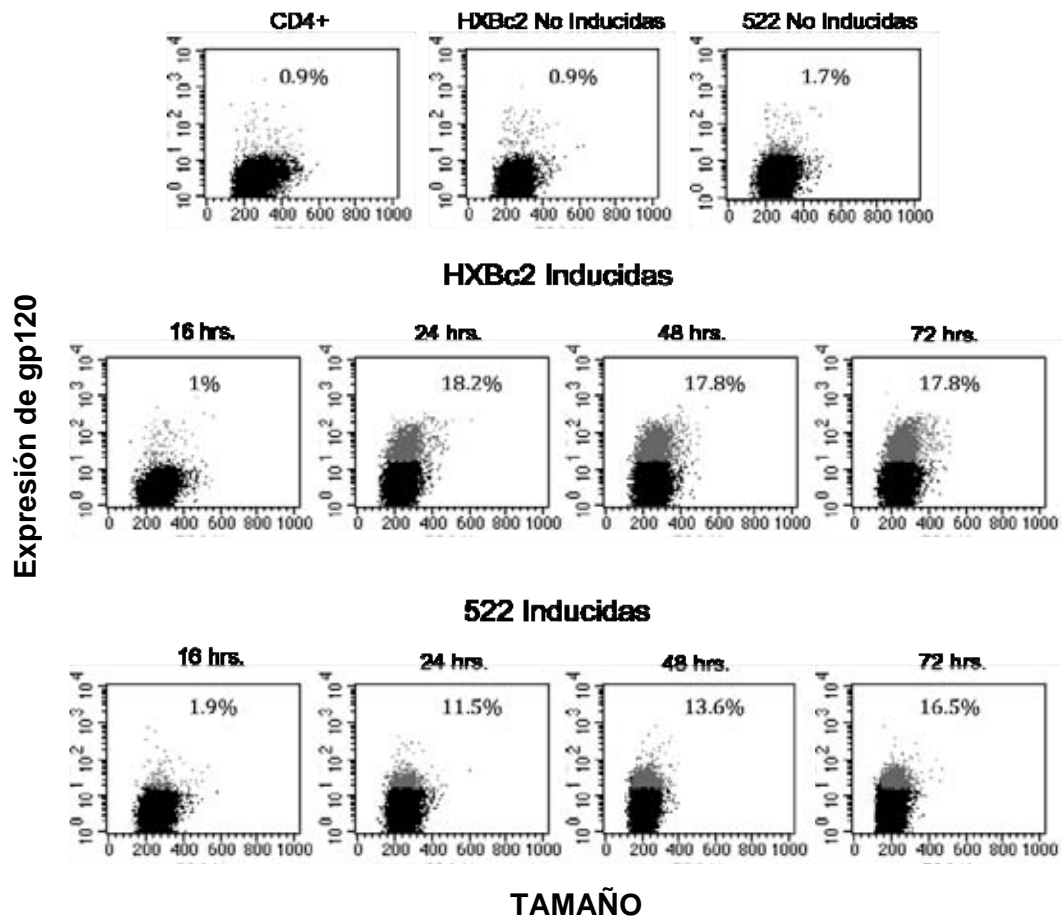


Figura 30. Expresión de gp120 respecto al tiempo de inducción. Gráficas de puntos de tamaño contra la expresión de gp120, la cual se detectó por medio de la emisión de fluorescencia verde del anticuerpo secundario. La expresión de gp120 se detectó a partir de las 24 hrs. de inducción en ambas células (HXBc2 y 522). En las HXBc2 el porcentaje entre 24 y 72 hrs. es muy semejante. Se observó un comportamiento similar en un segundo experimento.

En la figura 31B se puede observar que entre 16 y 24-72 hrs de inducción hay una diferencia significativa en el nivel de expresión de gp120 provocando un claro aumento en el porcentaje de sincicios generado, con células de 16 hrs de inducción se obtuvieron 3.8%, mientras que con células inducidas por 72 hrs se obtuvieron 11% de sincicios (Fig. 31B). Cabe resaltar que a 16 hrs el nivel de expresión de gp120 no es detectable, pero el porcentaje siempre es mayor al porcentaje de agregados obtenidos con las células 522 (Fig. 31A). Por lo tanto la cantidad de sincicios obtenidos se relaciona con la expresión de Env.

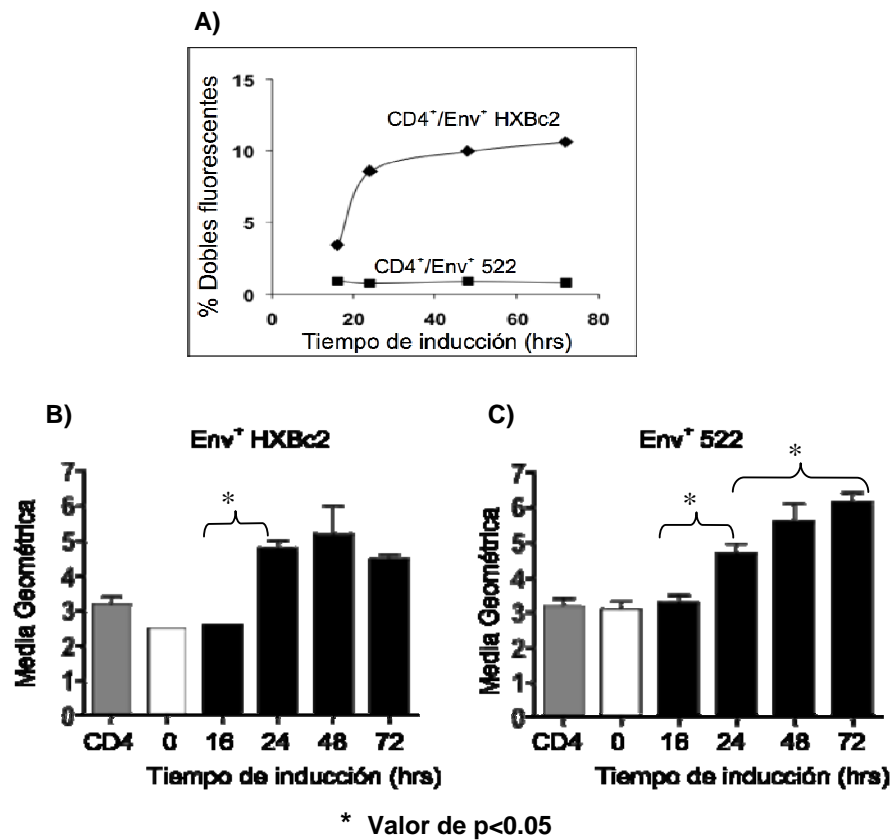


Figura 31. Expresión de gp120 en células con diferentes tiempos de inducción. A) Porcentaje de los sincicios obtenidos después de 5 hrs. de cocultivo con células HXBc2 de diferente tiempo de inducción. **B)** Medias geométricas de la expresión de gp120 células HXBc2 y 522 de diferente tiempo de inducción. Solo son estadísticamente diferentes en las células 522.

Al analizar la intensidad media de fluorescencia se encontró que en las células HXBc2 no hay diferencia significativa entre 24, 48 y 72 horas de inducción (Fig. 31B), mientras que en las 522 existe una diferencia significativa entre 24 y 72 hrs de inducción (Fig. 31C).

Estos, resultados, demuestran que la expresión entre las dos líneas celulares Env⁺ es diferente, probablemente por variación en el proceso de transfección o por que la expresión de la proteína funcional se asocia a una disminución de la viabilidad de las células (16, 86).

También mostraron que la expresión a nivel de membrana en las células HXBc2 es diferente a lo que se observa por medio de la inmunoprecipitación de proteínas totales. Cao y cols, reportaron que el máximo de expresión se obtiene a los tres días de cultivo sin tetraciclina, y en nuestro grupo de trabajo se obtuvo un resultado semejante (Anexo 5) al realizar la inmunoprecipitación de gp120 de las proteínas totales, el incremento fue gradual conforme aumentó el tiempo de inducción, tanto en las células HXBc2 como en las 522 (Evelyn Rivera, 2006). Sin embargo, en la membrana plasmática de las células HXBc2 la expresión de gp120 llega a su máximo desde las 24 horas de inducción tanto en porcentaje como en intensidad de fluorescencia, mientras que en las células 522 el porcentaje de expresión y el incremento en la media de intensidad de fluorescencia aumentó poco pero si fue gradual respecto al tiempo de inducción.

Para analizar el efecto de la expresión de Env en la composición celular relativa, se compararon las características de los sincicios obtenidos en cocultivos con diferentes proporciones iniciales, se compararon 16, 24 y 72 hrs, ya que hay diferencia significativa entre 16 y 24 hrs, y 72 hrs es el tiempo que siempre se emplea en los ensayos de fusión.

Al analizar las propiedades de los sincicios se encontró que el porcentaje aumentó notablemente entre las 16 y 24 hrs de inducción, al igual que la expresión de gp120, mientras que entre 24 y 72 hrs la diferencia es menor (Fig. 32A). Nuevamente, el porcentaje más alto de sincicios se obtuvo en la $R_0=1$, en todos los tiempos de inducción. El índice estequiométrico y el incremento en la intensidad media de fluorescencia roja de los sincicios también aumentaron respecto a la R_0 , pero no se observó ninguna diferencia respecto a la expresión de Env (32 B y C).

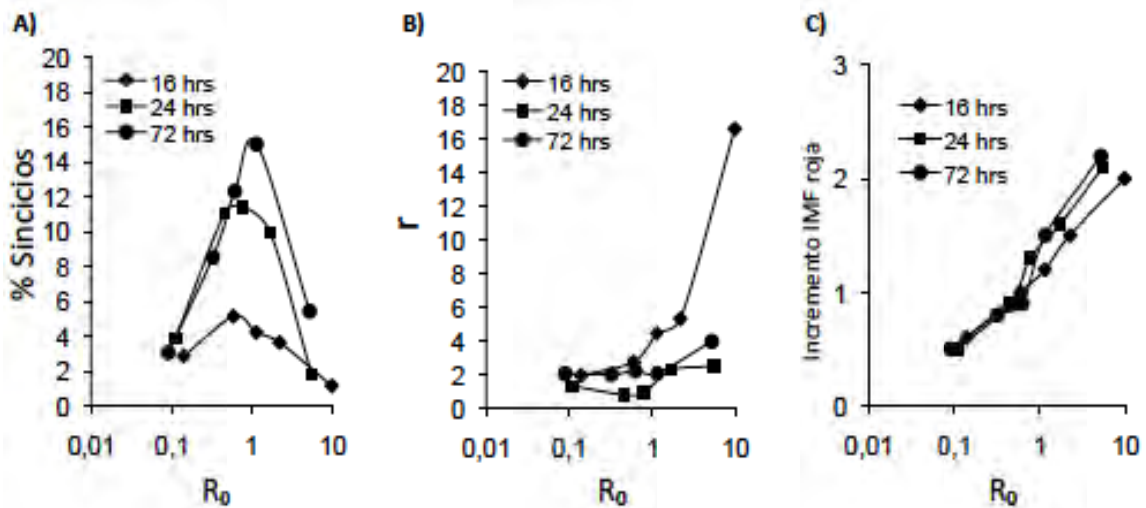


Figura 32. Efecto de la expresión de Env en la composición de los sincicios. Se colocaron cocultivos con diferentes proporciones iniciales (R_0) empleando células HXBc2 con diferentes tiempos de inducción (16, 24 y 72 hrs). **A)** Porcentaje de sincicios obtenidos después de 8 hrs. de cocultivo. **B)** Índice estequiométrico de los sincicios. **C)** Incremento en la IMF roja de los sincicios. Los datos son representativos de tres experimentos independientes

Al analizar el tamaño y granularidad de los sincicios, tampoco se observó alguna tendencia respecto a la expresión de Env, las medias solo aumentan respecto a la R_0 (Fig. 33 A y B).

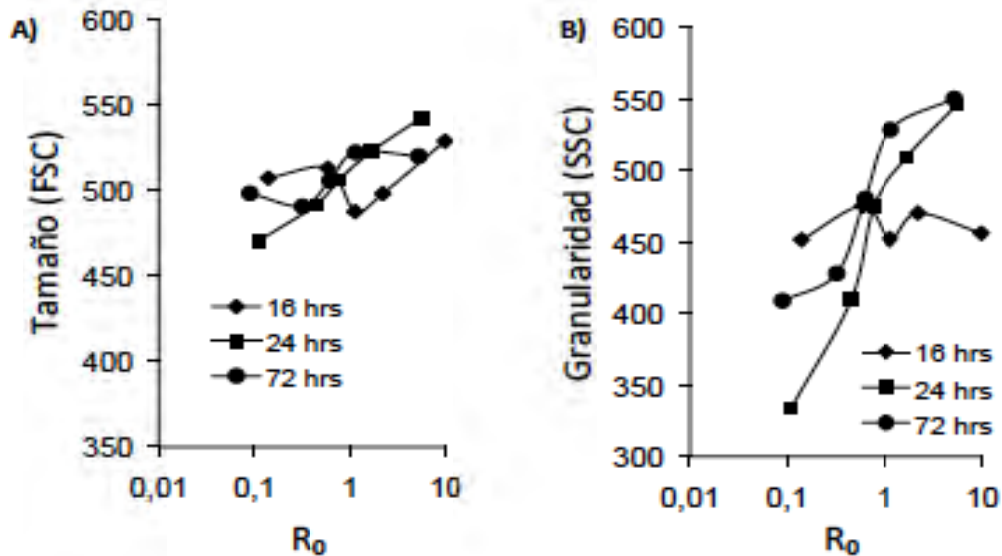


Figura 33. Efecto de la expresión de Env en el tamaño y granularidad de los sincicios. Se colocaron cocultivos con diferentes proporciones iniciales (R_0) empleando células HXBc2 con diferentes tiempos de inducción (16, 24 y 72hrs). **A)** Media de tamaño (FSC) de los sincicios. **B)** Media de granularidad (SSC) de los sincicios. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

Los resultados muestran que no se presentan diferencias asociadas a la expresión de Env, ni en la composición celular, ni en el tamaño y granularidad de los sincicios. Sólo se observaron diferencias en el porcentaje final de sincicios. También mostraron que a nivel de membrana plasmática la expresión de Env no es equivalente a lo que se observa en proteínas totales, ya que las células HXBc2 expresan el máximo desde las 24 hrs. de inducción, no aumentó respecto al tiempo de inducción.

4. FUNCIONALIDAD DE LOS SINCICIOS

ESTÍMULO DE ACTIVACIÓN EN LAS CÉLULAS JURKAT

Las células Jurkat E6-1 son una línea celular de linfocitos humanos T CD4⁺ que secretan IL-2 después de un estímulo de activación con mitógenos farmacológicos como la PHA, PMA y con la combinación de PMA más ionomicina, así como con anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD28. Estos estímulos inducen además la expresión de marcadores de activación en la membrana plasmática como CD25 (cadena alfa del receptor de IL-2) y CD69 (Lectina tipo-C, molécula inductora de activación), también se induce la síntesis y secreción de otras citocinas como IFN γ (47, 147, 155).

En nuestro modelo de fusión célula-célula, los sincicios son generados a partir de la fusión homotípica de las células Jurkat, por lo tanto su funcionalidad se evaluó al analizar la capacidad de responder a un estímulo de activación con mitógenos farmacológicos, y se analizó si la composición celular de los sincicios influye en su funcionalidad.

El estímulo con el mitógeno PHA (fitohemaglutinina) indujo un alto porcentaje de apoptosis en las células y generó un alto porcentaje de falsos dobles positivos, tanto en cocultivos entre células CD4⁺, como en cocultivos con las células Env⁺ (HXBc2 y 522) por lo que se decidió no emplear éste estímulo (Fig. 34).

A) Efecto de la PHA en el porcentaje de partículas dobles fluorescentes		
	Sin estímulo	Con PHA (1µg/ml)
CD4 ⁺ rojas/CD4 ⁺ verdes	2.2%	12.4%
CD4 ⁺ con Env ⁺ HXBc2	11%	21%
CD4 ⁺ con Env ⁺ 522	0.9%	12.7%

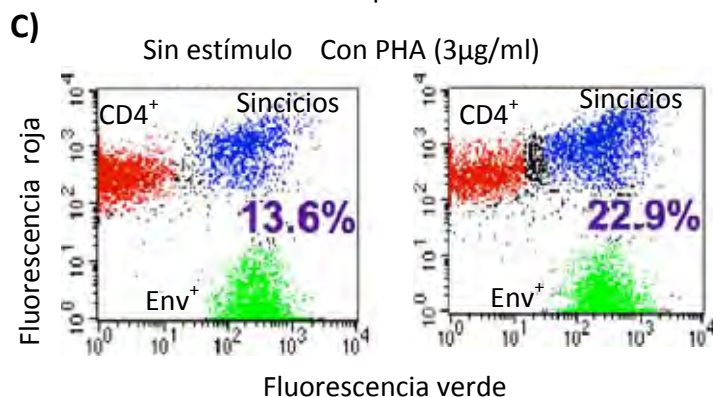
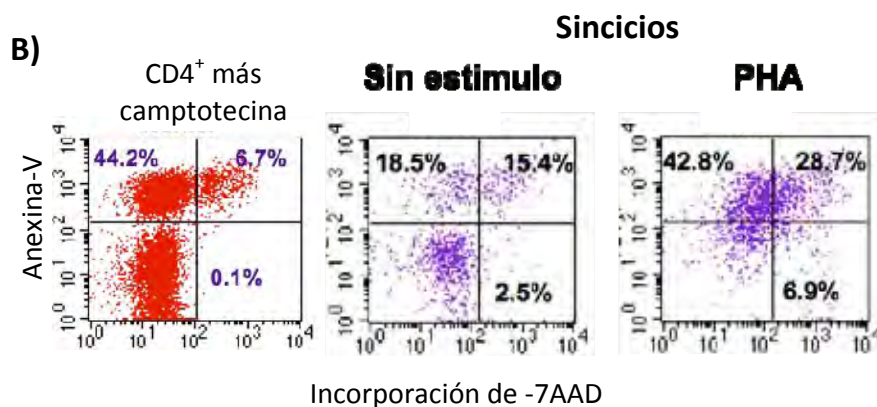


Figura 34. PHA en la fusión celular. **A)** Tabla con los porcentajes de dobles fluorescentes en diferentes cocultivos, en todos los casos hubo un incremento. **B)** Análisis de la viabilidad de los sincicios con y sin PHA, se muestra el control positivo de células CD4⁺ incubadas por 4 hrs con camptotecina. La PHA afecta la viabilidad de los sincicios y de las demás células. **B)** Gráfica de puntos de un cocultivo CD4⁺ con HXBc2, con y sin PHA.

Por consiguiente, se empleó el estímulo de activación PMA más ionomicina. Se evaluaron sincicios purificados (por citometría de flujo, FACSaria) y sincicios en cocultivos con diferentes proporciones iniciales, en los cuales los sincicios presentan diferente composición celular y además están presentes las células CD4⁺ y Env⁺ que quedaron sin fusionarse (Fig. 35).

El estímulo de activación incrementó la agregación celular tanto en el cocultivo como en los sincicios purificados (Fig. 35). También se observa que los sincicios purificados no son muy grandes, ya que se cocultivaron solo de 2 a 3 hrs. Durante la purificación de los sincicios, se obtuvieron casi 1.5×10^6 células, con una pureza del 86-96% (Fig. 35B). La pureza en los experimentos de expresión de CD25 fue $92.2\% \pm 3.1$ y en los experimentos de expresión de IL-2 fue $92.8\% \pm 1.5$.

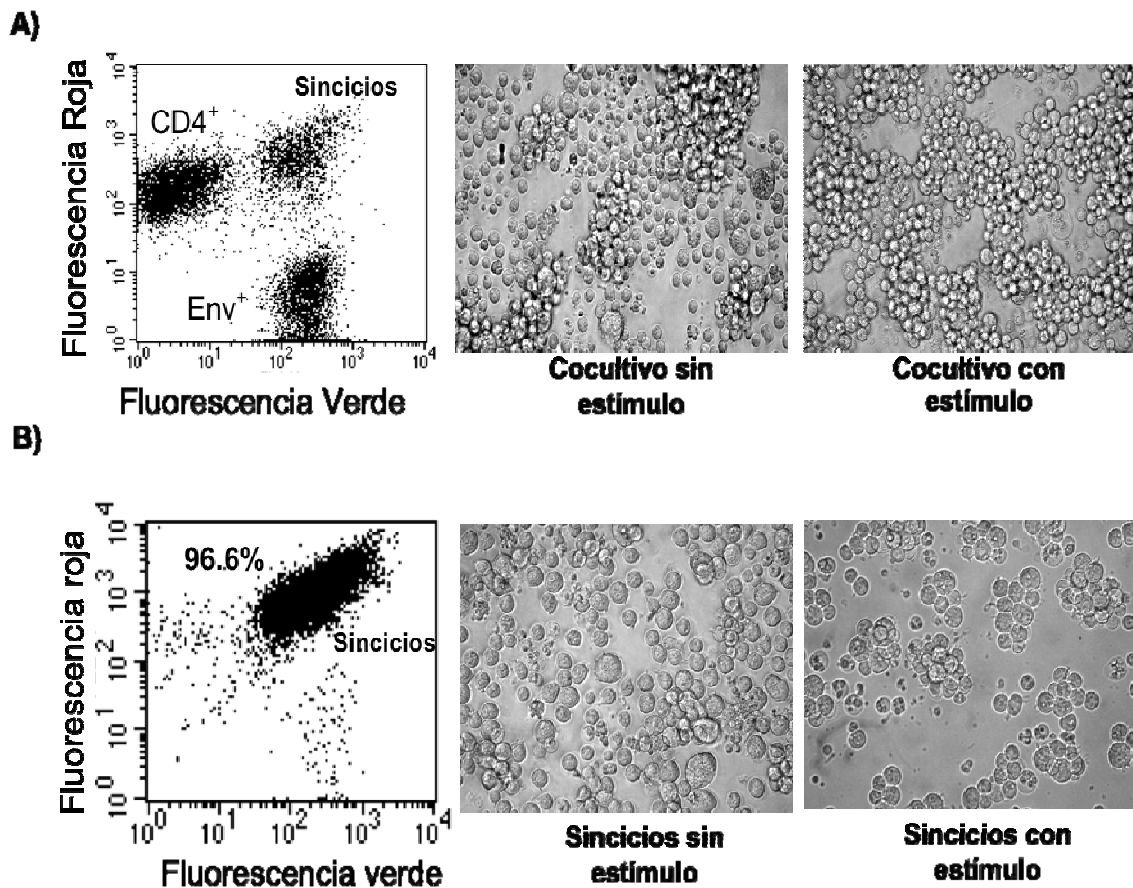


Figura 35. Análisis de la funcionalidad de los sincicios. **A)** Después de dos horas de cocultivo se adicionó el estímulo de activación directamente al pozo, en donde hay células sin fusionar y sincicios, se incubaron por 5-6 hrs más a 37°C. **B)** Después de 2-3 horas de cocultivo se realizó la purificación de la población de sincicios (por FACS), se lavaron y colocaron en placas para adicionarles el estímulo de activación que se mantuvo por 5-6 hrs a 37°C.

Los sincicios en cocultivo se colocaron en tres diferentes proporciones iniciales (R_0), el promedio de las R_0 obtenidas de los experimentos independientes se muestran en la tabla 7, tanto para los cocultivos empleados para analizar la expresión de CD25 como de IL-2. Se muestra también el valor del índice estequiométrico (r) y la cantidad equivalente de células $CD4^+$ y Env^+ incorporadas en los sincicios. Se observó que la incorporación de células $CD4^+$ si aumentó al incrementarse la R_0 . Por lo tanto los sincicios evaluados en cocultivo si presentan diferente composición celular relativa.

Cocultivos con diferentes proporciones iniciales ($R_0 = \%CD4^+ \text{ inicial} / \%Env^+ \text{ inicial}$)					
Expresión de CD25			Expresión de IL-2		
R_0	r	Proporción $CD4^+/Env^+$ incorporadas en los sincicios	R_0	r	Proporción $CD4^+/Env^+$ incorporadas en los sincicios
0.17	0.6	3 $CD4^+$: 5 Env^+	0.25	0.77	3 $CD4^+$: 4 Env^+
1.08	1.04	1 $CD4^+$: 1 Env^+	1.2	1.26	5 $CD4^+$: 4 Env^+
5.73	1.51	3 $CD4^+$: 2 Env^+	5.5	2.99	3 $CD4^+$: 1 Env^+

Tabla 7. Proporciones iniciales en cocultivos y composición celular relativa de los sincicios. Muestra el promedio de las proporciones iniciales empleadas para obtener sincicios en cocultivo con diferente composición celular. Se promediaron 5 experimentos independientes tanto para la expresión de CD25 como en la expresión de IL-2. Del valor del índice estequiométrico obtenido (r) se obtuvo la equivalencia al número de células incorporadas en los sincicios. La incorporación de células $CD4^+$ aumento respecto a la R_0 .

EXPRESIÓN DE CD25 DESPUÉS DE UN ESTÍMULO DE ACTIVACIÓN.

La expresión óptima de CD25 se obtuvo en cocultivos en medio AIM-V más el siguiente estímulo de activación: PMA 20ng/ml, ionomicina 0.2 μ M, y 0.5% SFB.

El estímulo no afectó la viabilidad de las células, como se puede observar en la figura 36 el porcentaje de células viables no disminuye después del estímulo de activación en ninguna de las células. Cabe resaltar que desde las dos horas de cocultivo (previo a la adición del estímulo) hay un 30% de sincicios que unen anexina V (se encuentran en apoptosis temprana), sin embargo el porcentaje de sincicios en apoptosis no aumento después del estímulo de activación.

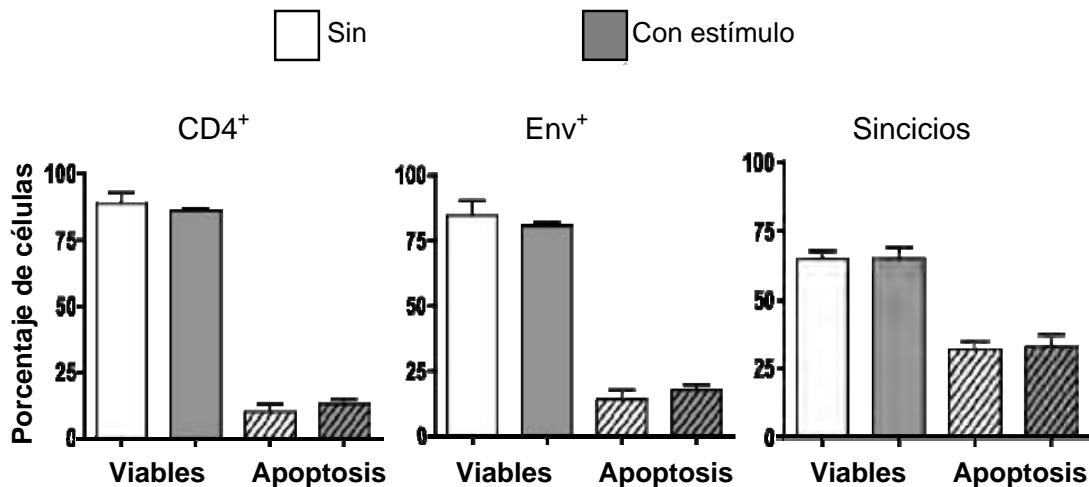


Figura 36. Efecto del estímulo de activación en la viabilidad de las células. Después de dos horas de cocultivo se adicionó el estímulo de activación, se incubó por 5 hrs más a 37°C. En ningún caso disminuyó la viabilidad después del estímulo. Las barras lisas indican el porcentaje de células que no unen anexina V ni incorporan 7AAD, mientras que las barras con líneas inclinadas muestran el porcentaje de células que une anexina V (apoptosis temprana).

El estímulo tampoco aumentó el porcentaje de sincicios obtenido (Fig. 37A) y sólo se presentó una ligera disminución en el tamaño y granularidad de sincicios en la R_0 mayor a uno en casi todos los experimentos (Fig. 37B y C).

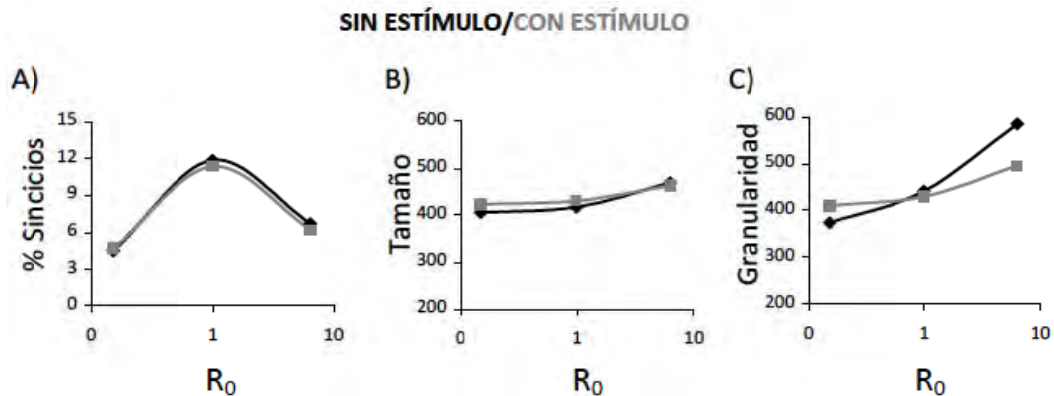


Figura 37. Efecto del estímulo de activación en la cantidad, tamaño y granularidad de los sincicios. A). Porcentaje de sincicios obtenidos en 3 diferentes proporciones iniciales, en gris se muestra al porcentaje obtenido en cocultivos con estímulo de activación y en negro los cocultivos sin estímulo. El estímulo no afectó el porcentaje de sincicios obtenidos, B) Tamaño y C) Granularidad de los sincicios obtenidos de los cocultivos sin estímulo (en negro) y con estímulo de activación (en gris), solo en la R_0 mayor a uno hay una disminución.

El estímulo de activación sí indujo la expresión de CD25 en los tres tipos de células: $CD4^+$, Env^+ y sincicios. En la figura 38 se muestran los histogramas de fluorescencia de los controles en monocultivo como de los sincicios purificados y en cocultivo. Se puede observar que sólo en las células con estímulo hay una población positiva para la expresión de CD25. El anticuerpo anti-CD25 está acoplado al colorante fluorescente APC, por lo que se detecta en el cuarto canal de fluorescencia

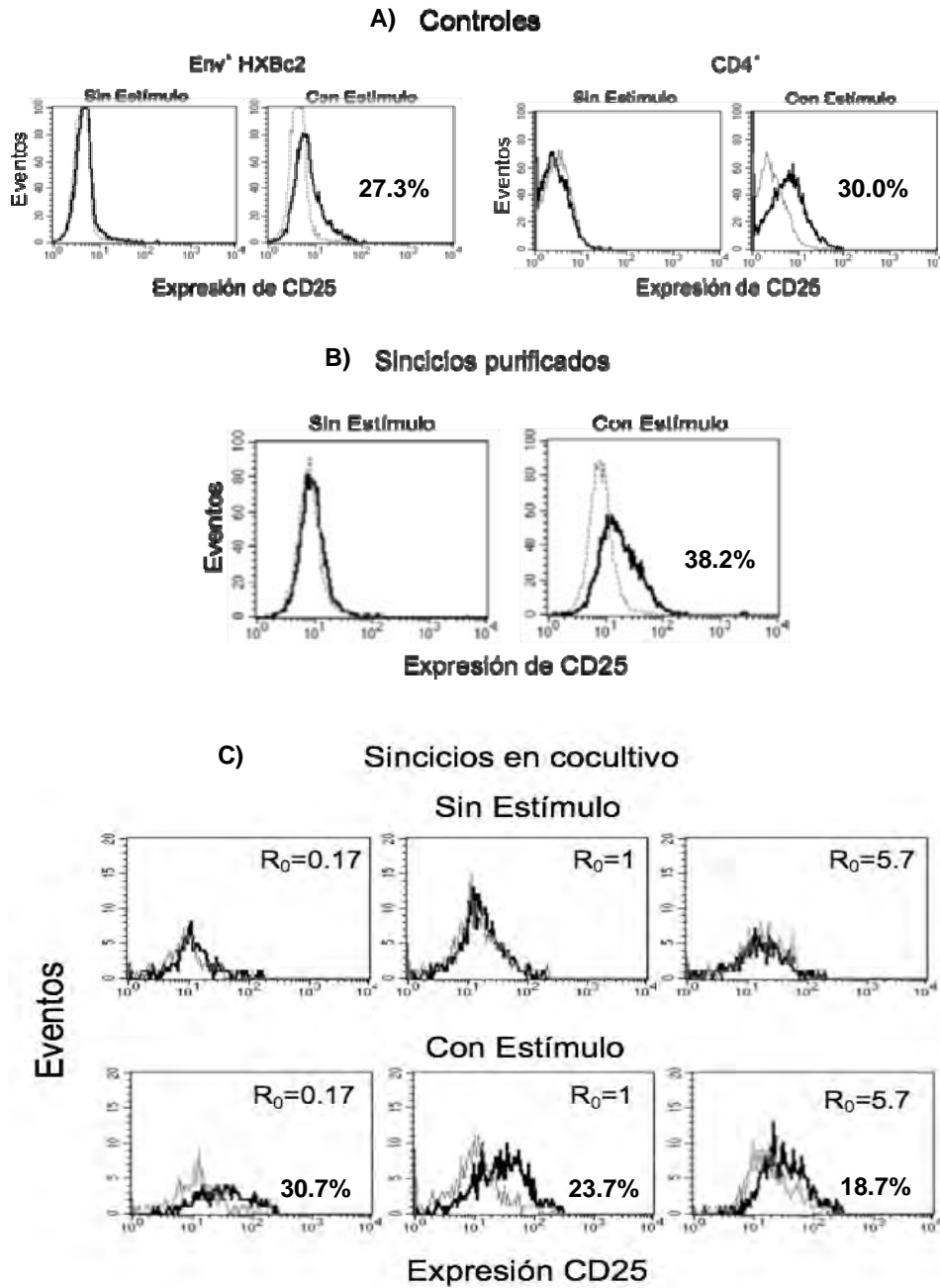


Figura 38. Histogramas de fluorescencia de células con y sin estímulo de activación. A) Controles en monocultivo colocados en cada experimento. **B)** Sincicios purificados con y sin estímulo. **C)** Sincicios en cocultivo con tres diferentes R_0 . Las células incubadas con el anticuerpo anti CD25 se muestran en negro y las células incubadas con el control de isotipo (anticuerpo irrelevante) en gris. En los tres tipos de células el estímulo de activación indujo la expresión de CD25. El experimento es representativo de 5 experimentos en cocultivo y 4 experimentos de sincicios purificados.

El porcentaje de expresión de CD25 inducido por el estímulo de activación se obtuvo del promedio de 5 experimentos independientes para sincicios en cocultivos con diferentes R_0 y de 4 experimentos con sincicios purificados. En la figura 39 se observa que las células Env^+ tienen el porcentaje más alto de expresión de CD25, mientras que células $CD4^+$ presentan el menor porcentaje de expresión.

El porcentaje de expresión de los sincicios (30-35%) no es la suma de la expresión de las células individuales, más bien es muy similar a la expresión de las células Env^+ . Adicionalmente, en los sincicios en cocultivo (Fig. 39C) se observó que el porcentaje disminuyó en la $R_0=5.7$, aunque la diferencia no es estadísticamente significativa al comparar las medias de las tres R_0 .

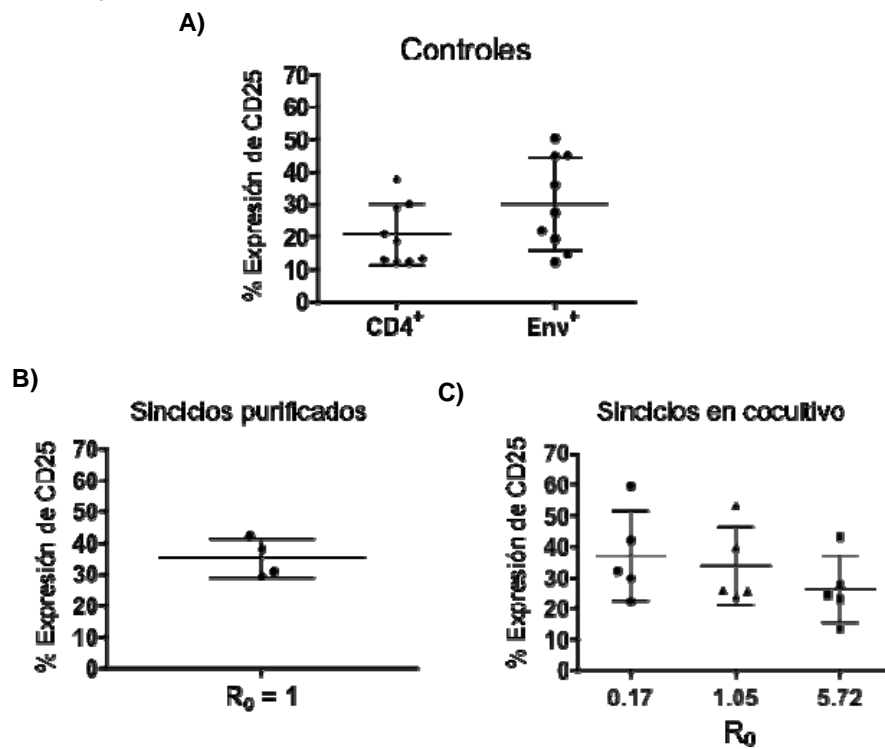


Figura 39. Porcentaje de células que expresan CD25 después del estímulo de activación. A) Porcentaje de expresión de los controles en monocultivo. **B)** Porcentaje de expresión en los sincicios purificados. **C)** Porcentaje de expresión de los sincicios en cocultivo con tres diferentes proporciones iniciales. Se observó una disminución en el porcentaje de sincicios que expresan CD25 en el cocultivo de la $R_0=5.72$, sin embargo no fue estadísticamente significativa.

Al analizar el incremento en la intensidad media de fluorescencia (media geométrica) en las células con y sin estímulo (Fig. 40), se observa que los sincicios en cocultivo son los que presentaron el incremento más alto, los sincicios purificados y las Env⁺ tuvieron un incremento similar, mientras que las CD4⁺ son las que menos incrementaron su intensidad de fluorescencia. El incremento en la media de fluorescencia respecto a las células sin estímulo, fue estadísticamente significativo en todas las células.

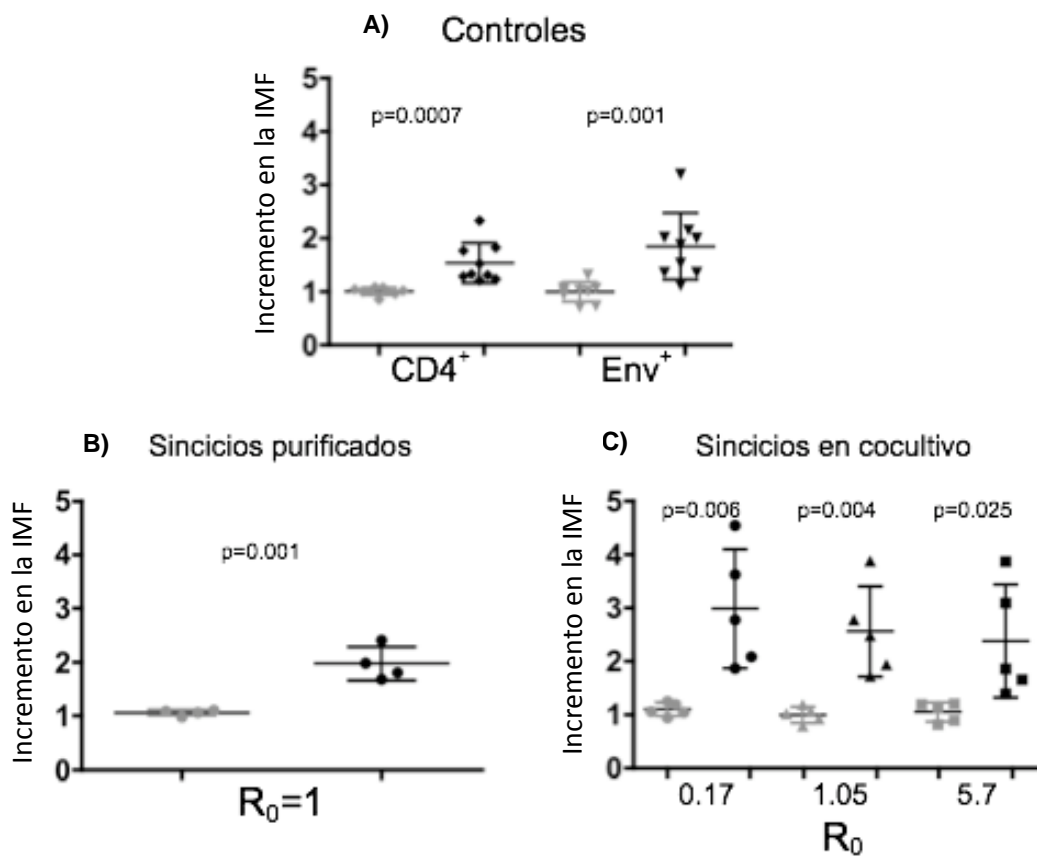


Figura 40. Incremento en la intensidad de fluorescencia de las células con y sin estímulo. **A)** Incremento en la media de intensidad de fluorescencia de los controles en monocultivo. **B)** Incremento en la media de los sincicios purificados. **C)** Incremento en la media de los sincicios en cocultivo con tres diferentes R₀. El incremento más alto se observa en los sincicios en cocultivo. Al comparar el incremento en la intensidad de fluorescencia entre células con y sin estímulo se encontró (para todas las células) una diferencia estadísticamente significativa. La comparación entre células con y sin estímulo se llevo a cabo con una prueba de T.

Así mismo, en los sincicios en cocultivo (Fig. 40C) se observa que el incremento de la media de fluorescencia disminuye en la $R_0=5.7$, sin embargo la diferencia tampoco es significativa. Por lo tanto, no hay diferencia en la expresión de CD25 en los sincicios con diferente composición celular.

EXPRESIÓN DE IL-2 DESPUÉS DEL ESTÍMULO DE ACTIVACIÓN.

Bajo el estímulo de activación empleado en la expresión de CD25 en medio AIM-V, solo se logró una expresión significativa de IL-2 en las células Env^+ (Tabla 8). Por lo cual fue necesario cambiar las condiciones de activación, se ha reportado que el estímulo en medio RPMI suplementado con SFB al 10% por 6 hrs a 37°C induce un 26% de expresión de IL-2 en las células Jurkat (147).

	% Respuesta	Incremento en la MIF
Env^+	21.3%	1.5 ($p=0.04$)
$CD4^+$	4.5%	1.3 ($p=0.35$)
Sincicios	9.16%	1.4 ($p=0.19$)

Tabla 8. Expresión de IL-2. Se muestra el porcentaje de expresión incremento en la intensidad media de fluorescencia (IMF) en los tres tipos de células. Sólo las células Env^+ tuvieron un incremento estadísticamente significativo. El estímulo fue el empleado para inducir la expresión de CD25 (PMA 20ng/ml, ionomicina 0.2 μ M, y 0.5% SFB).

Para usar el estímulo de activación en medio RPMI y SFB al 10% se evaluaron primero los efectos de emplear el medio RPMI 10 en los parámetros de la fusión, ya que siempre se han realizado los ensayos en medio AIM-V libre de suero.

El análisis mostró que en el cocultivo en medio RPMI hubo una ligera disminución en el porcentaje de fusión (1-2%) respecto al que se obtiene con medio AIM-V, la disminución se observó tanto a 5 hrs de cocultivo (Fig. 41) como en cocultivos con diferentes proporciones iniciales (no se muestra). Con las células no

fusogénicas (522) no se generaron falsos dobles positivos y se inhibió con la misma concentración de anticuerpo monoclonal anti-CD4 empleada con medio AIM-V (Fig. 41). Ya que el medio RPMI 10 no altera los parámetros fundamentales de la fusión celular, se procedió a llevar a cabo el estímulo de activación en este medio de cultivo.

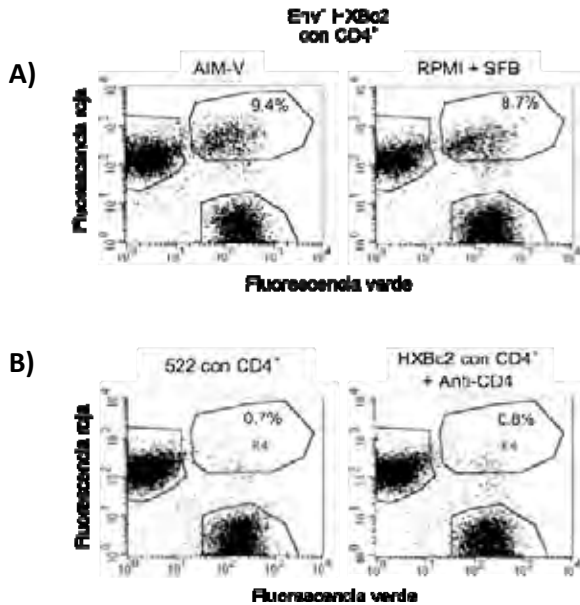


Figura 41. Comparación de cocultivos con medio AIMV y RPMI con SFB 10%. A) El porcentaje de sincicios disminuyó un poco con medio RPMI. **B)** El porcentaje de agregados fue semejante al obtenido con AIM-V, e inhibición con la misma concentración de anticuerpo monoclonal anti-CD4.

El estímulo de activación en medio RPMI: PMA 20ng/ml, 1µM de ionomicina y 10% SFB por 6hrs, no afectó la viabilidad en ninguna de las células. Nuevamente se observó que un 30-35% de los sincicios se encuentran en apoptosis temprana (unen anexina V) pero este porcentaje no aumentó después del estímulo de activación. Así mismo, el porcentaje de sincicios obtenido tampoco se vio afectado y por ende tampoco la estequiometría de la fusión. Nuevamente se observó una disminución en el tamaño y granularidad de los sincicios en la $R_0=5.5$ (No mostrado).

El estímulo de activación indujo la síntesis de IL-2 en los tres tipos de células, en la figura 42 se muestran los histogramas de fluorescencia de las células con y sin estímulo.

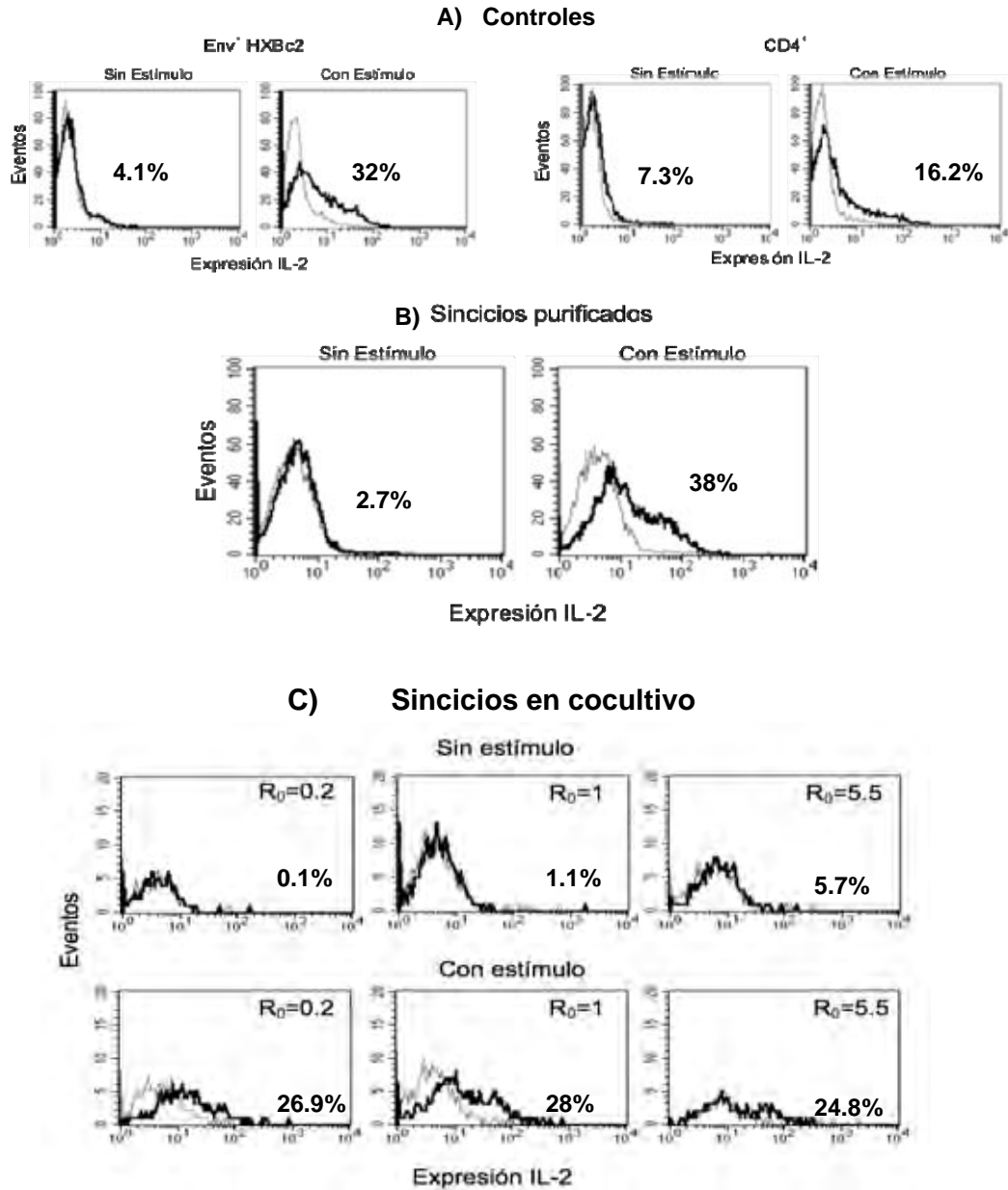


Figura 42. Histogramas de fluorescencia de células con y sin estímulo de activación.
A). Controles en monocultivo colocados en cada experimento. **B)** Sincicios purificados con y sin estímulo. **C)** Sincicios en cocultivo con tres diferentes R_0 . Las células incubadas con el anticuerpo anti IL-2 se muestran en negro y las células incubadas con el control de isotipo (anticuerpo irrelevante) en gris. En los tres tipos de células se indujo la expresión de IL-2. El experimento es representativo de 5 experimentos en cocultivo y 2 de sincicios purificados con duplicados.

El porcentaje de expresión de IL-2 inducido por el estímulo de activación se obtuvo del promedio de 5 experimentos de sincicios en cocultivo con diferentes R_0 y 2 experimentos con duplicados en sincicios purificados. En el análisis se observó que las células $CD4^+$ presentan el menor porcentaje de expresión IL-2 (Fig. 43A). Es importante mencionar, que aún sin estímulo las células $CD4^+$ tienen una expresión basal de IL-2 más alta que las otras células (3-8%), lo cual provoca que al hacer la resta para obtener el porcentaje de expresión inducido por el estímulo de activación (% con estímulo - % sin estímulo) el valor disminuya aún más. Los sincicios tanto en cocultivo como purificados tienen una expresión de IL-2 semejante a la que tienen las células Env^+ (Fig. 43B y C). Nuevamente, el porcentaje de expresión de IL-2 en los sincicios de la $R_0=5.5$ es menor, sin embargo la diferencia respecto al promedio de los sincicios con las otras R_0 no fue estadísticamente significativo

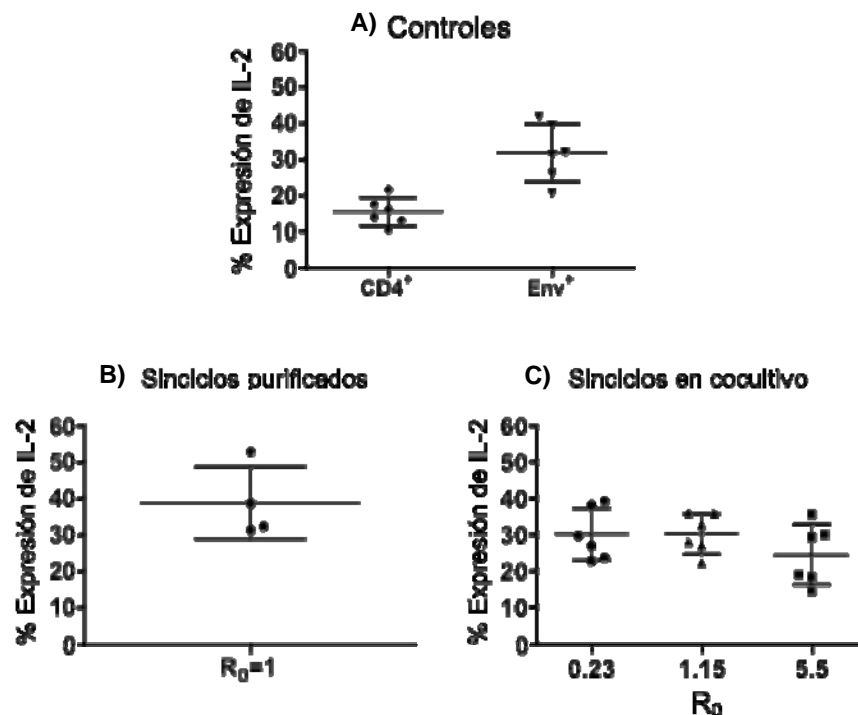


Figura 43. Porcentaje de células que expresan IL-2 después del estímulo de activación. A) Porcentaje de expresión de lo controles en monocultivo. **B)** Porcentaje de expresión en los sincicios purificados. **C)** Porcentaje de expresión de los sincicios en cocultivo con tres diferentes proporciones iniciales. La expresión en los sincicios no es la suma de las células independientes. Se observa una disminución en el porcentaje de sincicios que expresan IL-2 en el cocultivo de la $R_0=5.5$, sin embargo no es estadísticamente significativa.

Al analizar el incremento en la intensidad media de fluorescencia se observó que las células $CD4^+$ sin estímulo presentan una media más alta que la que presentan los otros tipos de células, debido a la expresión basal de IL-2 (3-8%) lo cual provoca que la relación de la intensidad de fluorescencia del anti-IL-2 entre el isotipo da un valor mayor a uno, sin embargo al comparar las células sin estímulo y con estímulo la diferencia fue estadísticamente significativa (Fig. 44).

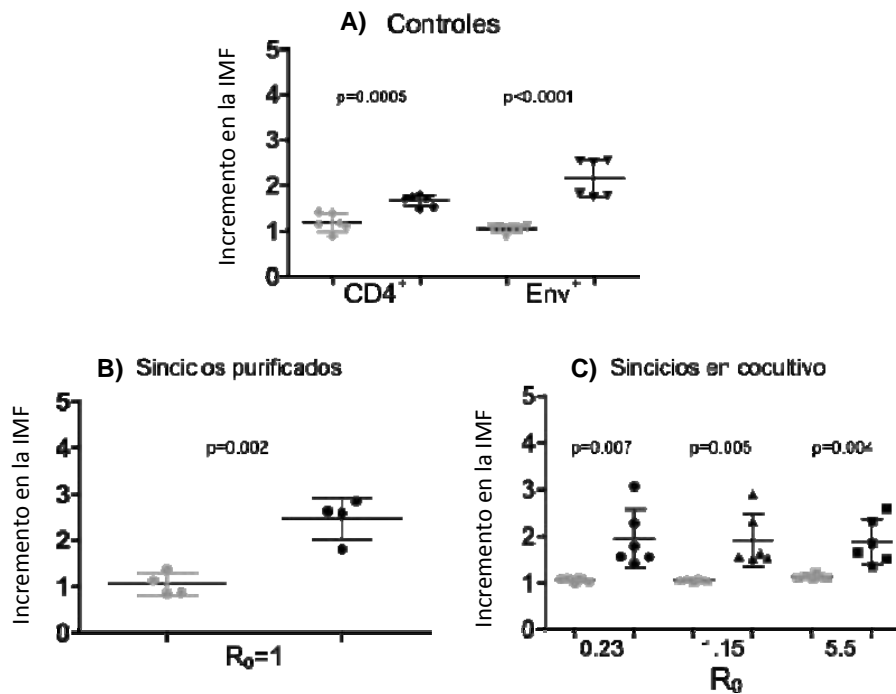


Figura 44. Incremento en la intensidad media de fluorescencia (IMF) de las células con y sin estímulo. A) Incremento en los controles en monocultivo. **B)** Incremento en los sincicios purificados. **C)** Incremento en los sincicios en cocultivo con tres diferentes R_0 . Al comparar el incremento entre células con y sin estímulo se encontró (para todas las células) una diferencia estadísticamente significativa, el incremento más alto se observó en los sincicios en cocultivo. La comparación entre células con y sin estímulo se llevo acabo con una prueba de T.

Estos resultados demuestran que los sincicios son capaces de responder al estímulo de activación y sintetizan IL-2, y que la composición celular relativa no tienen efecto en el porcentaje de expresión ni en la cantidad de IL-2 sintetizada.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Optimización del Método para Cuantificar la Fusión Celular.

Nuestro grupo de trabajo ha diseñado y optimizado un método para cuantificar la fusión celular. El método combina el FRET con la citometría de flujo para cuantificar sincicios. Se obtuvieron resultados semejantes al compararlo con una técnica de estudio convencional, la microscopía de fluorescencia, y el análisis se lleva a cabo en menor tiempo, puede descartar agregados o falsos dobles fluorescentes, así como cuantificar sincicios que no presentan un aumento considerable en su tamaño. El método puede ser aplicado a otros sistemas de fusión, ya que otra de las ventajas de la citometría de flujo es que permite emplear diversos tipos de marcadores fluorescentes, como los colorantes de citoplasma (130), anticuerpos específicos para las células participantes (136) o bien colorantes lipofílicos (56, 57), lo cual ayuda a las necesidades que pueden presentarse en diferentes sistemas o a las necesidades del análisis.

En nuestro sistema se encontró que el 60% de los sincicios no contienen más de cuatro núcleos y que no presentan un aumento considerable en su tamaño. Este hecho también ha sido reportado, pues se observó que el tamaño de los sincicios generados *in vitro* puede muy heterogéneo y que podrían requerirse bastantes células para aumentar su tamaño (157). También se observó en tejidos de pacientes infectados, que los sincicios generados de la fusión entre linfocitos T contienen pocos núcleos y no presentan un aumento considerable en su tamaño, lo cual hace difícil su identificación sin algún marcador específico (111).

Al emplear los colorantes hidrofílicos (citoplasma) (92) confirmamos que en la mayor parte de las partículas dobles positivas se lleva a cabo mezcla de contenidos celulares, por lo que se puede concluir que sólo un bajo porcentaje de dobles positivos (1-3%) se generan de procesos de hemifusión (9, 46). La hemifusión es un proceso en donde la fusión no se completa hasta formar el poro de fusión, pero al estar en contacto las caras externas de la membrana, se presenta un intercambio de lípidos lo que provoca que las células emitan ambas fluorescencias.

Viabilidad de los sincicios.

En este trabajo se demostró que las células CD4⁺ no disminuyen debido a muerte celular sino que están siendo incorporadas en los sincicios. Existen un reporte en el cual cuantifican la fusión mediada por las proteínas Env del VIH-1 empleando células infectadas (136, 137), y detectan también la disminución de las células CD4⁺ durante las primeras 24 horas de cocultivo. Sin embargo, esta disminución se asoció automáticamente a una destrucción de células CD4⁺ mediada por la fusión celular, ya que consideraron que los sincicios mueren rápidamente a pesar de que no se realizaron estudios de viabilidad para confirmar esa suposición. Por lo tanto, es probable que en cultivos infectados las células Env⁺ también puedan fusionarse con más de una célula CD4⁺. La capacidad de reclutamiento de células CD4⁺ podría estar influenciada por el tropismo de las proteínas Env o tener relación con su efecto citopático, ya que un aumento en la capacidad fusogénica tanto de virus X4 como R5 se asocia a una mayor patogenicidad (45).

Así mismo, se observó una disminución de la viabilidad de las células sin fusionar en el cocultivo en donde hay formación de sincicios. Éste suceso también ha sido observado en otros sistemas, en donde se presenta una disminución en la viabilidad de células circundantes (85, 86). Por lo tanto, se corroboró una disminución en la viabilidad de las células CD4⁺ circundantes, asociada a la presencia de los sincicios y no sólo a la expresión las proteínas Env.

También se encontró que lo mayor parte de los sincicios permanecen viables (70-85%) y el resto se encuentra en apoptosis temprana, a diferencia de otros sistemas en donde se considera que la mayor parte de los sincicios son entidades desordenadas que mueren rápidamente por apoptosis (41, 118). Cabe mencionar, que en la apoptosis temprana aún se consideran metabólicamente estables ya que no presentan alteraciones en la membrana plasmática (no incorporan IP o 7-AAD). En los estudios post mortem, se observó que un 50% de los sincicios en el SNC se encuentran en apoptosis, sin embargo tampoco se conoce cual es el tiempo vida media de éstos (106).

También en otros modelos se ha observado que los sincicios generados *in vitro* no mueren rápidamente, incluso se observó que pueden seguir aumentando su tamaño si se colocan nuevas células CD4⁺ y permanecer viables hasta por 90hrs de cocultivo. Asimismo, la viabilidad fue independiente del tamaño de los sincicios (148). Este hecho demuestra que la viabilidad de los sincicios depende de cada sistema y de las células empleadas en cada momento, sin embargo en todos los sistemas hay un lapso de tiempo en el que los sincicios son entidades viables, con la

capacidad de responder a cambios en el microambiente o contribuir con la infección viral.

Composición Celular Relativa de los Sincicios.

Al comparar las estimaciones de la composición celular relativa (estequiometría de la fusión) con ambos métodos (ecuación y colorantes de citoplasma) se observó una gran discrepancia en los valores obtenidos, sin embargo ambos coinciden en que las células CD4⁺ se incorporan preferentemente en los sincicios. Si bien, ambos métodos tienen sus limitantes pueden usarse de forma complementaria y en un mismo cocultivo, ya que la ecuación obtiene la estequiometría de la fusión mediante las células que quedan sin fusionar y la intensidad de fluorescencia se obtiene directamente de los sincicios.

La incorporación preferencial de células CD4⁺ a los sincicios, podría tener relación con la patogénesis de la infección por VIH-1, ya que una célula infectada (Env⁺) podría reclutar varias células CD4⁺ no infectadas para formar un sincicio, el cual moriría en un periodo de tiempo variable, o bien podría actuar como un secuestrador de células CD4⁺ impidiéndoles desarrollar su función inmunológica, incluso las podría reclutar para adquirir alguna función que favorezca a la replicación viral.

La incorporación de células CD4⁺ a los sincicios aumentó conforme había una mayor cantidad de éstas al inicio del cocultivo, como consecuencia los sincicios que más incorporan CD4⁺ también son los de mayor tamaño y granularidad. De tal

manera, que a pesar de ser fusión homotípica puede generarse heterogeneidad de tamaño y composición celular en los sincicios. Los resultados sugieren que *in vivo* la heterogeneidad podría ser aún mas alta debido a la variación en la cantidad de células presentes a través del tiempo en los diferentes nichos donde hay replicación viral, así como por las variaciones en las cepas de virus presentes en un individuo, y principalmente por los diferentes estirpes celulares que podrían participar en la formación de sincicios. Asimismo, la heterogeneidad en composición celular podría afectar la funcionalidad celular y su viabilidad.

Por otro lado, podría ser que la capacidad de incorporar más de una célula CD4 al sincicio también dependa de las propiedades de Env, ya sea de su tropismo o de la afinidad por el receptor o correceptor, debido a que éstos parámetros influyen en la capacidad fusogénica de los virus (85). Las células HXBc2, expresa la proteína Env de un virus prototipo X4, no conocemos como se comportaría una cepa R5 con su respectiva célula blanco o si esta propiedad cambia en las cepas de virus aisladas de los pacientes en las diferentes etapas de la infección.

Efecto de la expresión de Env en la composición de los sincicios.

Se observó que la expresión a nivel de membrana plasmática en las células HXBc2 es diferente a lo que se observó en el total de proteínas por medio de inmunoprecipitación (un incremento gradual de la proteína gp120 conforme aumenta el tiempo de inducción) (Anexo 5, 16), ya que la expresión de gp120 llega a su máximo desde las 24 horas de inducción tanto en porcentaje como en intensidad de fluorescencia, mientras que en las células 522 si se presenta un aumento gradual

respecto al tiempo de inducción. Esta diferencia podría deberse a diversas causas, a) variaciones en la transfección, aunque las células son cultivadas con los antibióticos necesarios para seleccionar sólo a las células que expresan los plásmidos; b) diferencias en el procesamiento del ARN mensajero o en la traducción a proteína, aunque en la inmunoprecipitación de proteínas totales se observa un incremento en gp120 a través del tiempo de inducción en ambas (Anexo 5), por lo que el mensajero si se traduce gradualmente a proteína, c) diferencias en el transporte a la membrana plasmática. Sin embargo, Cao y cols., reportan que no observaron diferencias en el procesamiento ni en la unión al CD4 y correceptor en la gp120 expresada por las células 522, d) efecto de la expresión de proteínas Env funcionales, ya que se ha asociado a daño y muerte en las células que la expresan (15, 80), por lo cual probablemente la expresión en la membrana de las células HXBc2 sea controlada desde tiempos cortos para evitar que disminuya la viabilidad u otras alteraciones, ya que también presentan pérdida de proliferación al expresar las proteínas Env (Huerta y cols., en preparación).

Cabe mencionar, que no alcanzamos a estudiar el efecto que tiene el nivel de expresión de CD4 en la composición de los sincicios, sin embargo se observó que las células HXBc2 inducidas por 16 hrs que generan entre un 3-8% de sincicios con la células Jurkat E6, si se cultivan con las células MT2 (una línea celular CD4⁺) se obtiene un 7% de sincicios pero con un tamaño mucho mayor que los que se observan con las Jurkat E6, incluso de los sincicios originados con células inducidas 72 hrs. Esta diferencia, podría asociarse con el nivel de expresión de

CD4, ya que el 100% de las células MT2 expresan CD4 en mayor cantidad que las Jurkat (con 50% expresión).

De esta forma, se muestra que ambas proteínas (CD4 y Env) requieren estar en un nivel mínimo necesario para iniciar la fusión celular. Sin embargo, parece que la cantidad de sincicios obtenidos esta principalmente determinada por el nivel de expresión de Env, pero no tiene algún efecto en la composición celular relativa ni en el tamaño de los sincicios, propiedades que parece estar principalmente influenciada por la cantidad de células CD4⁺ y la expresión de CD4.

Estudio de la Funcionalidad de los Sincicios.

Fisiológicamente, la formación de sincicios se asocia con la necesidad de coordinar y potencializar cierta actividad, como la síntesis de HGH en el sinciotrofoblasto (60), la reabsorción de hueso en los osteoclastos o la fagocitosis en las células gigantes multinucleadas durante los procesos de inflamación crónica (153). Sin embargo, en la fusión de células ya diferenciadas mediada por proteínas virales, se desconoce el efecto de la fusión en la funcionalidad celular. Se considera que puede ser patogénico ya que las células involucradas generalmente no tienen la capacidad o necesidad de fusionarse para llevar a cabo su función, así mismo se postula que al entrar en el ciclo celular se induce la apoptosis del sincicio ya que no pueden dividirse (36, 37).

En nuestro sistema se seleccionaron sincicios tempranos (con solo 2-3 hrs. de haberse formado), por lo que se consideró que su funcionalidad aún no se ve

alterada por procesos como la fusión de núcleos o entrada al ciclo celular, y por lo tanto todos los núcleos en el sincicio se encontrarían funcionales, además la mayor parte de éstos se encuentran viables.

En los ensayos, se observó que un 30-35% sincicios son capaces de responder a estímulos de activación, expresando CD25 en la membrana y sintetizando IL-2, responden al estímulo estando aislados o en presencia de otras células. Sin embargo, la expresión de CD25 e IL-2 en los sincicios (de una $R_0=1$) con una composición celular relativa 1:1, nunca fue a suma de las células individuales, más bien la expresión fue semejante a la que tienen las células Env⁺.

La expresión de CD25 e IL-2 en las células CD4⁺ siempre es menor que en las Env⁺, lo que probablemente se deba a que los cultivos no han sido sincronizados y se encuentran en diferente fase del ciclo celular. En las células Env⁺ se ha observado que no hay células en fase S, se encuentran arrestadas en G1 (61.5%) o G2/M (27.9%), mientras que las células CD4⁺ tienen un 35.2% de células en fase S, 36.4% en G1 y 14.6% en G2/M (manuscrito en preparación, Huerta L. y cols, en preparación). Así que, las células CD4⁺ tienen un porcentaje de células en las cuales la síntesis de proteínas esta disminuida (fase S).

En relación al fenotipo de expresión en los sincicios, parece ser que predomina el de las células Env⁺ debido a dos cosas, a) la expresión se favorece en los núcleos que no están en fase S del ciclo celular y b) la incorporación de células CD4⁺ en proliferación, dado que en ensayos preliminares se observó que los

sincicios incorporan un marcador de síntesis de DNA, por lo que posiblemente están incorporando preferencialmente a las CD4⁺ que se encuentran en fase S. Por lo tanto la síntesis de proteínas esta favorecida en células Env⁺ así como en los núcleos de éstas dentro del sincicio.

A pesar de que el estímulo de activación incrementa considerablemente la agregación celular no se alteró el porcentaje de sincicios generados. Probablemente por que la expresión de CD4 en las células que quedan sin fusionar es menor del que presentan las células al inicio del cocultivo (Rivera y cols., en preparación) y por que se ha reportado (y se reprodujo en nuestro sistema) una disminución en la expresión de CD4 debido al estímulo con PMA, por lo tanto el nivel de CD4 en las células seguramente ya no es el necesario para iniciar la fusión y por eso no hay formación de más sincicios.

Por otro lado, la composición celular de los sincicios no afectó de manera significativa la expresión de CD25 e IL-2 en los sincicios, aun que si hay una disminución en los promedio de expresión en los sincicios de la proporción inicial mayor a uno ($R_0 = 5.5$ y 5.7), los cuales incorporaron más células CD4⁺.

CONCLUSIONES

Optimización del Método para Cuantificar la Fusión Celular.

- ♦ La citometría de flujo nos permite cuantificar la fusión mediada por las proteínas del VIH-1 de manera rápida y precisa, siendo los resultados muy semejantes a los obtenidos mediante la cuantificación por microscopía de fluorescencia. También permite evaluar el efecto de inhibidores y el estudio simultáneo de las diferentes subpoblaciones celulares en el cocultivo.
- ♦ Se comprobó por microscopía confocal que en los sincicios se lleva a cabo el FRET empleando los colorante lipofílicos DiO/Dil. Por lo tanto, es correcto considerar que la citometría de flujo permite descartar los agregados de los sincicios verdaderos mediante este parámetro.
- ♦ Empleando los colorantes de citoplasma se demostró que en la mayor parte de partículas con ambas fluorescencias se lleva a cabo mezcla de citoplasmas (son sincicios verdaderos), mientras que un bajo porcentaje de los sincicios (1-3%) se genera probablemente por eventos de hemifusión.
- ♦ En este sistema la mayor parte de los sincicios, contienen de 2 a 4 núcleos, por lo que su tamaño no se incrementa considerablemente.

- ♦ En éste sistema, el máximo de fusión obtenido de cinéticas con diferentes proporciones iniciales se alcanza desde las primeras horas de cocultivo (2-3 hrs.).

Expresión de Env.

- ♦ La expresión de Env a nivel de membrana en las células HXBc2 no mostró un aumento gradual respecto al tiempo de cocultivo, sino que llega a su máximo de expresión desde las 24 horas de inducción.
- ♦ En las células 522 si hay un incremento gradual en el porcentaje de células que expresan gp120 y en la media de fluorescencia a través del tiempo de inducción.
- ♦ La expresión de Env no afecta la composición, tamaño y granularidad de los sincicios, sino que influye principalmente en la cantidad de sincicios obtenidos.

Viabilidad de las células en cocultivo.

- ♦ Las células CD4⁺ en cocultivo presentan un porcentaje de viabilidad semejante al de las células Env⁺ por lo que su disminución no se debe a muerte celular, sino a su incorporación en los sincicios.

- ◆ En el cocultivo con células Env⁺ HXBc2, la viabilidad de las células CD4⁺ no fusionadas es menor que en el cocultivo con las células 522 (no fusogénicas). Por lo tanto la formación de sincicios afecta a células circundantes.
- ◆ El porcentaje de células Env⁺ HXBc2 viables es menor que los porcentajes de células viables que las células Env⁺ 522 y las CD4⁺, lo cual se asocia con la expresión de gp120 funcional.
- ◆ A estos tiempos de cocultivo la mayor parte de los sincicios (70-80%) permanecen viables.

Composición celular relativa de los sincicios.

- ◆ Las células CD4⁺ son incorporadas en mayor proporción a los sincicios que las células Env⁺, esto se determinó mediante la ecuación y por el incremento en la fluorescencia roja de los sincicios.
- ◆ La incorporación de células CD4⁺ a los sincicios se incrementa conforme aumenta la cantidad de células CD4⁺ al inicio del cocultivo.

- ♦ El tamaño y granularidad de los sincicios, se incrementa conforme aumenta la cantidad de células CD4⁺ al inicio del cocultivo como consecuencia de la mayor incorporación de células CD4⁺.
- ♦ El mayor porcentaje de sincicios se obtuvo con la proporción inicial 1:1.

Análisis de la funcionalidad.

- ♦ El estímulo de activación no afecta la viabilidad de los tres tipos de células: CD4⁺, Env⁺ y Sincicios.
- ♦ El estímulo de activación indujo la expresión de CD25 y de IL-2 en los tres tipos de células: CD4⁺, Env⁺ y Sincicios.
- ♦ Las células CD4⁺ tienen la expresión de CD25 e IL-2 más baja, tanto en el porcentaje de células que la expresan como en la cantidad de proteína expresada.
- ♦ Al analizar el efecto de la composición celular de los sincicios en la expresión de CD25 e IL-2, se encontró que la intensidad media de fluorescencia y el porcentaje de expresión disminuye en los sincicios de la R₀ mayor a uno (5.7, y 5.5). Sin embargo, la diferencia no fue estadísticamente significativa.

- ♦ Las células CD4⁺ tienen una expresión basal de IL-2 de entre 3-8% al cultivarse en el medio RPMI con 10% de SFB, un porcentaje generalmente más alto que en las células Env y sincicios.
- ♦ La expresión de IL-2 y CD25 de los sincicios tanto en cocultivo ($R_0=1$) como purificados no es la suma de la expresión de las células individuales, sino que es muy semejante a lo que expresan las células Env⁺.
- ♦ Los sincicios son capaces de responder a estímulos de activación independientemente de su composición celular, si se encuentran aislados o en presencia de otras células.
- ♦ La fusión entre linfocitos T CD4⁺ (Jurkat) mediada por las proteínas del VIH-1, a tiempos cortos de cocultivo genera sincicios pequeños que permanecen viables y funcionales. Los sincicios tienen la capacidad de responder a estímulos exógenos y participar en la comunicación intercelular, ya que podrían activar células circundantes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alberts B, ed. 2002. *Molecular Biology of The Cell*: Garland Science. 1463 pp.
2. Appay V, Sauce D. 2008. Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. *J Pathol* 214: 231-41
3. Bar-Shavit Z. 2007. The osteoclast: a multinucleated, hematopoietic-origin, bone-resorbing osteoimmune cell. *J Cell Biochem* 102: 1130-9
4. Bar S, Alizon M. 2004. Role of the ectodomain of the gp41 transmembrane envelope protein of human immunodeficiency virus type 1 in late steps of the membrane fusion process. *J Virol* 78: 811-20
5. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, et al. 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220: 868-71
6. Bell JE. 2004. An update on the neuropathology of HIV in the HAART era. *Histopathology* 45: 549-59
7. Berger EA, Doms RW, Fenyo EM, Korber BT, Littman DR, et al. 1998. A new classification for HIV-1. *Nature* 391: 240
8. Blaak H, van't Wout AB, Brouwer M, Hooibrink B, Hovenkamp E, Schuitemaker H. 2000. In vivo HIV-1 infection of CD45RA(+)CD4(+) T cells is established primarily by syncytium-inducing variants and correlates with the rate of CD4(+) T cell decline. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 1269-74

9. Blanco J, Barretina J, Clotet B, Este JA. 2004. R5 HIV gp120-mediated cellular contacts induce the death of single CCR5-expressing CD4 T cells by a gp41-dependent mechanism. *J Leukoc Biol* 76: 804-11
10. Blumenthal R, Clague MJ, Durell SR, Epand RM. 2003. Membrane fusion. *Chem Rev* 103: 53-69
11. Blumenthal R, Gallo SA, Viard M, Raviv Y, Puri A. 2002. Fluorescent lipid probes in the study of viral membrane fusion. *Chem Phys Lipids* 116: 39-55
12. Borges M, Bose P, Frank HG, Kaufmann P, Potgens AJ. 2003. A two-colour fluorescence assay for the measurement of syncytial fusion between trophoblast-derived cell lines. *Placenta* 24: 959-64
13. Brenchley JM, Price DA, Douek DC. 2006. HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe? *Nat Immunol* 7: 235-9
14. Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, Price DA, Taylor JH, et al. 2004. CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* 200: 749-59
15. Camerini D, Su HP, Gamez-Torre G, Johnson ML, Zack JA, Chen IS. 2000. Human immunodeficiency virus type 1 pathogenesis in SCID-hu mice correlates with syncytium-inducing phenotype and viral replication. *J Virol* 74: 3196-204
16. Cao J, Park IW, Cooper A, Sodroski J. 1996. Molecular determinants of acute single-cell lysis by human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 70: 1340-54

17. Castedo M, Perfettini JL, Andreau K, Roumier T, Piacentini M, Kroemer G. 2003. Mitochondrial apoptosis induced by the HIV-1 envelope. *Ann N Y Acad Sci* 1010: 19-28
18. Cayabyab M, Karlsson GB, Etemad-Moghadam BA, Hofmann W, Steenbeke T, et al. 1999. Changes in human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins responsible for the pathogenicity of a multiply passaged simian-human immunodeficiency virus (SHIV-HXBc2). *J Virol* 73: 976-84
19. Connor RI, Ho DD. 1994. Human immunodeficiency virus type 1 variants with increased replicative capacity develop during the asymptomatic stage before disease progression. *J Virol* 68: 4400-8
20. Connor RI, Sheridan KE, Ceradini D, Choe S, Landau NR. 1997. Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1--infected individuals. *J Exp Med* 185: 621-8
21. Costin JM. 2007. Cytopathic mechanisms of HIV-1. *Virology* 4: 100
22. Chase A, Zhou Y, Siliciano RF. 2006. HIV-1-induced depletion of CD4+ T cells in the gut: mechanism and therapeutic implications. *Trends Pharmacol Sci* 27: 4-7
23. Chen EH, Grote E, Mohler W, Vignery A. 2007. Cell-cell fusion. *FEBS Lett* 581: 2181-93
24. Chen EH, Olson EN. 2005. Unveiling the mechanisms of cell-cell fusion. *Science* 308: 369-73
25. Chernomordik LV, Frolov VA, Leikina E, Bronk P, Zimmerberg J. 1998. The pathway of membrane fusion catalyzed by influenza hemagglutinin:

- restriction of lipids, hemifusion, and lipidic fusion pore formation. *J Cell Biol* 140: 1369-82
26. Chernomordik LV, Kozlov MM. 2003. Protein-lipid interplay in fusion and fission of biological membranes. *Annu Rev Biochem* 72: 175-207
27. Chernomordik LV, Kozlov MM. 2005. Membrane hemifusion: crossing a chasm in two leaps. *Cell* 123: 375-82
28. Chernomordik LV, Kozlov MM. 2008. Mechanics of membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol* 15: 675-83
29. Chernomordik LV, Melikyan GB, Chizmadzhev YA. 1987. Biomembrane fusion: a new concept derived from model studies using two interacting planar lipid bilayers. *Biochim Biophys Acta* 906: 309-52
30. Chernomordik LV, Zimmerberg J. 1995. Bending membranes to the task: structural intermediates in bilayer fusion. *Curr Opin Struct Biol* 5: 541-7
31. Chernomordik LV, Zimmerberg J, Kozlov MM. 2006. Membranes of the world unite! *J Cell Biol* 175: 201-7
32. Chien MP, Lin CH, Chang DK. 2009. Recruitment of HIV-1 envelope occurs subsequent to lipid mixing: a fluorescence microscopic evidence. *Retrovirology* 6: 20
33. Chowdhury MI, Koyanagi Y, Suzuki M, Kobayashi S, Yamaguchi K, Yamamoto N. 1992. Increased production of human immunodeficiency virus (HIV) in HIV-induced syncytia formation: an efficient infection process. *Virus Genes* 6: 63-78

34. Dargent JL, Lespagnard L, Kornreich A, Hermans P, Clumeck N, Verhest A. 2000. HIV-associated multinucleated giant cells in lymphoid tissue of the Waldeyer's ring: a detailed study. *Mod Pathol* 13: 1293-9
35. David M Knipe Eej, ed. 2006. *Fields Virology, Vols. 2: Wolters Kluwer, Lippincott Williams and Wilkins*
36. Duelli D, Lazebnik Y. 2003. Cell fusion: a hidden enemy? *Cancer Cell* 3: 445-8
37. Duelli D, Lazebnik Y. 2007. Cell-to-cell fusion as a link between viruses and cancer. *Nat Rev Cancer* 7: 968-76
38. Etemad-Moghadam B, Rhone D, Steenbeke T, Sun Y, Manola J, et al. 2001. Membrane-fusing capacity of the human immunodeficiency virus envelope proteins determines the efficiency of CD⁴ T-cell depletion in macaques infected by a simian-human immunodeficiency virus. *J Virol* 75: 5646-55
39. Etemad-Moghadam B, Sun Y, Nicholson EK, Fernandes M, Liou K, et al. 2000. Envelope glycoprotein determinants of increased fusogenicity in a pathogenic simian-human immunodeficiency virus (SHIV-KB9) passaged in vivo. *J Virol* 74: 4433-40
40. Ferri KF, Jacotot E, Blanco J, Este JA, Zamzami N, et al. 2000. Apoptosis control in syncytia induced by the HIV type 1-envelope glycoprotein complex: role of mitochondria and caspases. *J Exp Med* 192: 1081-92
41. Ferri KF, Jacotot E, Geuskens M, Kroemer G. 2000. Apoptosis and karyogamy in syncytia induced by the HIV-1-envelope glycoprotein complex. *Cell Death Differ* 7: 1137-9

42. Frankel SS, Tenner-Racz K, Racz P, Wenig BM, Hansen CH, et al. 1997. Active replication of HIV-1 at the lymphoepithelial surface of the tonsil. *Am J Pathol* 151: 89-96
43. Gabrijel M, Repnik U, Kreft M, Grilc S, Jeras M, Zorec R. 2004. Quantification of cell hybridoma yields with confocal microscopy and flow cytometry. *Biochem Biophys Res Commun* 314: 717-23
44. Gallo SA, Finnegan CM, Viard M, Raviv Y, Dimitrov A, et al. 2003. The HIV Env-mediated fusion reaction. *Biochim Biophys Acta* 1614: 36-50
45. Garg H, Blumenthal R. 2008. Role of HIV Gp41 mediated fusion/hemifusion in bystander apoptosis. *Cell Mol Life Sci* 65: 3134-44
46. Gelbard HA, James HJ, Sharer LR, Perry SW, Saito Y, et al. 1995. Apoptotic neurons in brains from paediatric patients with HIV-1 encephalitis and progressive encephalopathy. *Neuropathol Appl Neurobiol* 21: 208-17
47. Geppert TD, Wacholtz MC, Patel SS, Lightfoot E, Lipsky PE. 1989. Activation of human T cell clones and Jurkat cells by cross-linking class I MHC molecules. *J Immunol* 142: 3763-72
48. Giraudo CG, Hu C, You D, Slovic AM, Mosharov EV, et al. 2005. SNAREs can promote complete fusion and hemifusion as alternative outcomes. *J Cell Biol* 170: 249-60
49. Gonzalez-Scarano F, Martin-Garcia J. 2005. The neuropathogenesis of AIDS. *Nat Rev Immunol* 5: 69-81

50. Goodenow MM, Collman RG. 2006. HIV-1 coreceptor preference is distinct from target cell tropism: a dual-parameter nomenclature to define viral phenotypes. *J Leukoc Biol* 80: 965-72
51. Grossman Z, Meier-Schellersheim M, Paul WE, Picker LJ. 2006. Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys. *Nat Med* 12: 289-95
52. Harrison SC. 2008. Viral membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol* 15: 690-8
53. Hazenberg MD, Otto SA, Hamann D, Roos MT, Schuitemaker H, et al. 2003. Depletion of naive CD4 T cells by CXCR4-using HIV-1 variants occurs mainly through increased T-cell death and activation. *AIDS* 17: 1419-24
54. Helming L, Gordon S. 2007. The molecular basis of macrophage fusion. *Immunobiology* 212: 785-93
55. Huerta L, Gomez-Icazbalceta G, Soto-Ramirez L, Viveros-Rogel M, Rodriguez R, et al. 2005. Human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) envelope-dependent cell-cell fusion modulation by HIV-positive sera is related to disease progression. *J Gen Virol* 86: 1961-6
56. Huerta L, Lamoyi E, Baez-Saldana A, Larralde C. 2002. Human immunodeficiency virus envelope-dependent cell-cell fusion: a quantitative fluorescence cytometric assay. *Cytometry* 47: 100-6
57. Huerta L, Lopez-Balderas N, Larralde C, Lamoyi E. 2006. Discriminating in vitro cell fusion from cell aggregation by flow cytometry combined with fluorescence resonance energy transfer. *J Virol Methods* 138: 17-23

58. Hughes-Fulford M, Sugano E, Schopper T, Li CF, Boonyaratanakornkit JB, Cogoli A. 2005. Early immune response and regulation of IL-2 receptor subunits. *Cell Signal* 17: 1111-24
59. Huppertz B, Bartz C, Kokozidou M. 2006. Trophoblast fusion: fusogenic proteins, syncytins and ADAMs, and other prerequisites for syncytial fusion. *Micron* 37: 509-17
60. Huppertz B, Borges M. 2008. Placenta trophoblast fusion. *Methods Mol Biol* 475: 135-47
61. Ishii M, Saeki Y. 2008. Osteoclast cell fusion: mechanisms and molecules. *Mod Rheumatol* 18: 220-7
62. Jackson MB, Chapman ER. 2006. Fusion pores and fusion machines in Ca²⁺-triggered exocytosis. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 35: 135-60
63. Jahn R, Lang T, Sudhof TC. 2003. Membrane fusion. *Cell* 112: 519-33
64. Jahn R, Sudhof TC. 1999. Membrane fusion and exocytosis. *Annu Rev Biochem* 68: 863-911
65. Janeway CA, ed. 2001. *Immunobiology*: Garland Science
66. Jansen KM, Pavlath GK. 2008. Molecular control of mammalian myoblast fusion. *Methods Mol Biol* 475: 115-33
67. Japour AJ, Fiscus SA, Arduino JM, Mayers DL, Reichelderfer PS, Kuritzkes DR. 1994. Standardized microtiter assay for determination of syncytium-inducing phenotypes of clinical human immunodeficiency virus type 1 isolates. *J Clin Microbiol* 32: 2291-4

68. Jekle A, Keppler OT, De Clercq E, Schols D, Weinstein M, Goldsmith MA. 2003. In vivo evolution of human immunodeficiency virus type 1 toward increased pathogenicity through CXCR4-mediated killing of uninfected CD4 T cells. *J Virol* 77: 5846-54
69. Joag SV. 2000. Primate models of AIDS. *Microbes Infect* 2: 223-9
70. Joag SV, Li Z, Foresman L, Stephens EB, Zhao LJ, et al. 1996. Chimeric simian/human immunodeficiency virus that causes progressive loss of CD4+ T cells and AIDS in pig-tailed macaques. *J Virol* 70: 3189-97
71. Johansson CB, Youssef S, Koleckar K, Holbrook C, Doyonnas R, et al. 2008. Extensive fusion of haematopoietic cells with Purkinje neurons in response to chronic inflammation. *Nat Cell Biol* 10: 575-83
72. Jolly C, Sattentau QJ. 2004. Retroviral spread by induction of virological synapses. *Traffic* 5: 643-50
73. Jones G, Power C. 2006. Regulation of neural cell survival by HIV-1 infection. *Neurobiol Dis* 21: 1-17
74. Kaneshima H, Su L, Bonyhadi ML, Connor RI, Ho DD, McCune JM. 1994. Rapid-high, syncytium-inducing isolates of human immunodeficiency virus type 1 induce cytopathicity in the human thymus of the SCID-hu mouse. *J Virol* 68: 8188-92
75. Karlsson Hedestam GB, Fouchier RA, Phogat S, Burton DR, Sodroski J, Wyatt RT. 2008. The challenges of eliciting neutralizing antibodies to HIV-1 and to influenza virus. *Nat Rev Microbiol* 6: 143-55

76. Keller PM, Person S, Snipes W. 1977. A fluorescence enhancement assay of cell fusion. *J Cell Sci* 28: 167-77
77. Kielian M, Rey FA. 2006. Virus membrane-fusion proteins: more than one way to make a hairpin. *Nat Rev Microbiol* 4: 67-76
78. Klausner RD, Wolf DE. 1980. Selectivity of fluorescent lipid analogues for lipid domains. *Biochemistry* 19: 6199-203
79. Koch AL, Silver S. 2005. The first cell. *Adv Microb Physiol* 50: 227-59
80. Koenig S, Gendelman HE, Orenstein JM, Dal Canto MC, Pezeshkpour GH, et al. 1986. Detection of AIDS virus in macrophages in brain tissue from AIDS patients with encephalopathy. *Science* 233: 1089-93
81. Koot M, Keet IP, Vos AH, de Goede RE, Roos MT, et al. 1993. Prognostic value of HIV-1 syncytium-inducing phenotype for rate of CD4+ cell depletion and progression to AIDS. *Ann Intern Med* 118: 681-8
82. Kozlov MM, Markin VS. 1983. [Possible mechanism of membrane fusion]. *Biofizika* 28: 242-7
83. Kozlovsky Y, Chernomordik LV, Kozlov MM. 2002. Lipid intermediates in membrane fusion: formation, structure, and decay of hemifusion diaphragm. *Biophys J* 83: 2634-51
84. Kozlovsky Y, Kozlov MM. 2002. Stalk model of membrane fusion: solution of energy crisis. *Biophys J* 82: 882-95
85. LaBonte JA, Patel T, Hofmann W, Sodroski J. 2000. Importance of membrane fusion mediated by human immunodeficiency virus envelope glycoproteins for lysis of primary CD4-positive T cells. *J Virol* 74: 10690-8

86. Laurent-Crawford AG, Krust B, Riviere Y, Desgranges C, Muller S, et al. 1993. Membrane expression of HIV envelope glycoproteins triggers apoptosis in CD4 cells. *AIDS Res Hum Retroviruses* 9: 761-73
87. Levy JA. 2006. HIV pathogenesis: knowledge gained after two decades of research. *Adv Dent Res* 19: 10-6
88. Lifson JD, Feinberg MB, Reyes GR, Rabin L, Banapour B, et al. 1986. Induction of CD4-dependent cell fusion by the HTLV-III/LAV envelope glycoprotein. *Nature* 323: 725-8
89. Lineberger JE, Danzeisen R, Hazuda DJ, Simon AJ, Miller MD. 2002. Altering expression levels of human immunodeficiency virus type 1 gp120-gp41 affects efficiency but not kinetics of cell-cell fusion. *J Virol* 76: 3522-33
90. Ling B, Apetrei C, Pandrea I, Veazey RS, Lackner AA, et al. 2004. Classic AIDS in a sooty mangabey after an 18-year natural infection. *J Virol* 78: 8902-8
91. Liu J, Bartesaghi A, Borgnia MJ, Sapiro G, Subramaniam S. 2008. Molecular architecture of native HIV-1 gp120 trimers. *Nature* 455: 109-13
92. Lopez-Balderas N, Huerta L, Villarreal C, Rivera-Toledo E, Sandoval G, et al. 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 Res* 123: 138-46
93. Lusso P. 2006. HIV and the chemokine system: 10 years later. *EMBO J* 25: 447-56

94. Lyden TW, Ng AK, Rote NS. 1993. Modulation of phosphatidylserine epitope expression by BeWo cells during forskolin treatment. *Placenta* 14: 177-86
95. Maas JJ, Gange SJ, Schuitemaker H, Coutinho RA, van Leeuwen R, Margolick JB. 2000. Strong association between failure of T cell homeostasis and the syncytium-inducing phenotype among HIV-1-infected men in the Amsterdam Cohort Study. *AIDS* 14: 1155-61
96. Mahajan VS, Leskov IB, Chen JZ. 2005. Homeostasis of T cell diversity. *Cell Mol Immunol* 2: 1-10
97. Malek TR. 2008. The biology of interleukin-2. *Annu Rev Immunol* 26: 453-79
98. Martens S, McMahon HT. 2008. Mechanisms of membrane fusion: disparate players and common principles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 543-56
99. McCune JM. 2001. The dynamics of CD4+ T-cell depletion in HIV disease. *Nature* 410: 974-9
100. Melikyan GB. 2008. Common principles and intermediates of viral protein-mediated fusion: the HIV-1 paradigm. *Retrovirology* 5: 111
101. Melikyan GB, Barnard RJ, Abrahamyan LG, Mothes W, Young JA. 2005. Imaging individual retroviral fusion events: from hemifusion to pore formation and growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 8728-33
102. Mellors JW, Kingsley LA, Rinaldo CR, Jr., Todd JA, Hoo BS, et al. 1995. Quantitation of HIV-1 RNA in plasma predicts outcome after seroconversion. *Ann Intern Med* 122: 573-9

103. Mellors JW, Munoz A, Giorgi JV, Margolick JB, Tassoni CJ, et al. 1997. Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection. *Ann Intern Med* 126: 946-54
104. Mellors JW, Rinaldo CR, Jr., Gupta P, White RM, Todd JA, Kingsley LA. 1996. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* 272: 1167-70
105. Nakayama T, Yamashita M. 2008. Initiation and maintenance of Th2 cell identity. *Curr Opin Immunol* 20: 265-71
106. Nardacci R, Antinori A, Kroemer G, Piacentini M. 2005. Cell death mechanisms in HIV-associated dementia: the involvement of syncytia. *Cell Death Differ* 12 Suppl 1: 855-8
107. Nardacci R, Antinori A, Larocca LM, Arena V, Amendola A, et al. 2005. Characterization of cell death pathways in human immunodeficiency virus-associated encephalitis. *Am J Pathol* 167: 695-704
108. Nieva JL, Agirre A. 2003. Are fusion peptides a good model to study viral cell fusion? *Biochim Biophys Acta* 1614: 104-15
109. Ogle BM, Cascalho M, Platt JL. 2005. Biological implications of cell fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 567-75
110. Oren-Suissa M, Podbilewicz B. 2007. Cell fusion during development. *Trends Cell Biol* 17: 537-46
111. Orenstein JM. 2000. In vivo cytolysis and fusion of human immunodeficiency virus type 1-infected lymphocytes in lymphoid tissue. *J Infect Dis* 182: 338-42

112. Orenstein JM, Wahl SM. 1999. The macrophage origin of the HIV-expressing multinucleated giant cells in hyperplastic tonsils and adenoids. *Ultrastruct Pathol* 23: 79-91
113. Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, Butini L, Montroni M, et al. 1993. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature* 362: 355-8
114. Pare ME, Gauthier S, Landry S, Sun J, Legault E, et al. 2005. A new sensitive and quantitative HTLV-I-mediated cell fusion assay in T cells. *Virology* 338: 309-22
115. Peisajovich SG, Shai Y. 2003. Viral fusion proteins: multiple regions contribute to membrane fusion. *Biochim Biophys Acta* 1614: 122-9
116. Penn ML, Grivel JC, Schramm B, Goldsmith MA, Margolis L. 1999. CXCR4 utilization is sufficient to trigger CD4+ T cell depletion in HIV-1-infected human lymphoid tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 663-8
117. Perfettini JL, Castedo M, Nardacci R, Ciccocanti F, Boya P, et al. 2005. Essential role of p53 phosphorylation by p38 MAPK in apoptosis induction by the HIV-1 envelope. *J Exp Med* 201: 279-89
118. Perfettini JL, Castedo M, Roumier T, Andreau K, Nardacci R, et al. 2005. Mechanisms of apoptosis induction by the HIV-1 envelope. *Cell Death Differ* 12 Suppl 1: 916-23
119. Perfettini JL, Roumier T, Castedo M, Larochette N, Boya P, et al. 2004. NF-kappaB and p53 are the dominant apoptosis-inducing transcription factors elicited by the HIV-1 envelope. *J Exp Med* 199: 629-40

120. Phogat S, Wyatt RT, Karlsson Hedestam GB. 2007. Inhibition of HIV-1 entry by antibodies: potential viral and cellular targets. *J Intern Med* 262: 26-43
121. Piguet V, Sattentau Q. 2004. Dangerous liaisons at the virological synapse. *J Clin Invest* 114: 605-10
122. Podbilewicz B. 2006. Cell fusion. *WormBook*: 1-32
123. Primakoff P, Myles DG. 2007. Cell-cell membrane fusion during mammalian fertilization. *FEBS Lett* 581: 2174-80
124. Rasnik I, McKinney SA, Ha T. 2005. Surfaces and orientations: much to FRET about? *Acc Chem Res* 38: 542-8
125. Regoes RR, Bonhoeffer S. 2005. The HIV coreceptor switch: a population dynamical perspective. *Trends Microbiol* 13: 269-77
126. Reimann KA, Li JT, Veazey R, Halloran M, Park IW, et al. 1996. A chimeric simian/human immunodeficiency virus expressing a primary patient human immunodeficiency virus type 1 isolate env causes an AIDS-like disease after in vivo passage in rhesus monkeys. *J Virol* 70: 6922-8
127. Richman DD, Bozzette SA. 1994. The impact of the syncytium-inducing phenotype of human immunodeficiency virus on disease progression. *J Infect Dis* 169: 968-74
128. Rinfret A, Latendresse H, Lefebvre R, St-Louis G, Jolicoeur P, Lamarre L. 1991. Human immunodeficiency virus-infected multinucleated histiocytes in oropharyngeal lymphoid tissues from two asymptomatic patients. *Am J Pathol* 138: 421-6

129. Rodic N, Rutenberg MS, Terada N. 2004. Cell fusion and reprogramming: resolving our transdifferences. *Trends Mol Med* 10: 93-6
130. Roumier T, Castedo M, Perfettini JL, Andreau K, Metivier D, et al. 2003. Mitochondrion-dependent caspase activation by the HIV-1 envelope. *Biochem Pharmacol* 66: 1321-9
131. Roux KH, Taylor KA. 2007. AIDS virus envelope spike structure. *Curr Opin Struct Biol* 17: 244-52
132. Rubinstein E, Ziyat A, Wolf JP, Le Naour F, Boucheix C. 2006. The molecular players of sperm-egg fusion in mammals. *Semin Cell Dev Biol* 17: 254-63
133. Sapir A, Avinoam O, Podbilewicz B, Chernomordik LV. 2008. Viral and developmental cell fusion mechanisms: conservation and divergence. *Dev Cell* 14: 11-21
134. Sattentau Q. 2008. Avoiding the void: cell-to-cell spread of human viruses. *Nat Rev Microbiol* 6: 815-26
135. Schmid I, Uittenbogaart CH, Giorgi JV. 1994. Sensitive method for measuring apoptosis and cell surface phenotype in human thymocytes by flow cytometry. *Cytometry* 15: 12-20
136. Schols D, Pauwels R, Baba M, Desmyter J, De Clercq E. 1989. Syncytium formation and destruction of bystander CD4+ cells cocultured with T cells persistently infected with human immunodeficiency virus as demonstrated by flow cytometry. *J Gen Virol* 70 (Pt 9): 2397-408

137. Schols D, Pauwels R, Desmyter J, De Clercq E. 1990. Flow cytometric method to monitor the destruction of CD4+ cells following their fusion with HIV-infected cells. *Cytometry* 11: 736-43
138. Schuitemaker H, Koot M, Kootstra NA, Dercksen MW, de Goede RE, et al. 1992. Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: progression of disease is associated with a shift from monocyctotropic to T-cell-tropic virus population. *J Virol* 66: 1354-60
139. Sharp PM, Shaw GM, Hahn BH. 2005. Simian immunodeficiency virus infection of chimpanzees. *J Virol* 79: 3891-902
140. Si Z, Cayabyab M, Sodroski J. 2001. Envelope glycoprotein determinants of neutralization resistance in a simian-human immunodeficiency virus (SHIV-HXBc2P 3.2) derived by passage in monkeys. *J Virol* 75: 4208-18
141. Siegel DP. 1993. Energetics of intermediates in membrane fusion: comparison of stalk and inverted micellar intermediate mechanisms. *Biophys J* 65: 2124-40
142. Sirois M, Robitaille L, Sasik R, Estaquier J, Fortin J, Corbeil J. 2008. R5 and X4 HIV viruses differentially modulate host gene expression in resting CD4+ T cells. *AIDS Res Hum Retroviruses* 24: 485-93
143. Sodroski J, Goh WC, Rosen C, Campbell K, Haseltine WA. 1986. Role of the HTLV-III/LAV envelope in syncytium formation and cytopathicity. *Nature* 322: 470-4

144. Sollner TH. 2004. Intracellular and viral membrane fusion: a uniting mechanism. *Curr Opin Cell Biol* 16: 429-35
145. Steain MC, Wang B, Saksena NK. 2008. The possible contribution of HIV-1-induced syncytia to the generation of intersubtype recombinants in vitro. *AIDS* 22: 1009-17
146. Stevenson M. 2003. HIV-1 pathogenesis. *Nat Med* 9: 853-60
147. Sundstrom S, Ota S, Dimberg LY, Masucci MG, Bergqvist A. 2005. Hepatitis C virus core protein induces an anergic state characterized by decreased interleukin-2 production and perturbation of mitogen-activated protein kinase responses. *J Virol* 79: 2230-9
148. Sylwester A, Murphy S, Shutt D, Soll DR. 1997. HIV-induced T cell syncytia are self-perpetuating and the primary cause of T cell death in culture. *J Immunol* 158: 3996-4007
149. Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, et al. 2002. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 416: 542-5
150. Tersmette M, Lange JM, de Goede RE, de Wolf F, Eeftink-Schattenkerk JK, et al. 1989. Association between biological properties of human immunodeficiency virus variants and risk for AIDS and AIDS mortality. *Lancet* 1: 983-5
151. van Engeland M, Nieland LJ, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP. 1998. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 31: 1-9

152. Vignery A. 2005. [Macrophage fusion: are somatic and cancer cells possible partners?]. *Med Sci (Paris)* 21: 1070-5
153. Vignery A. 2008. Macrophage fusion: molecular mechanisms. *Methods Mol Biol* 475: 149-61
154. Weiser B, Philpott S, Klimkait T, Burger H, Kitchen C, et al. 2008. HIV-1 coreceptor usage and CXCR4-specific viral load predict clinical disease progression during combination antiretroviral therapy. *AIDS* 22: 469-79
155. Weiss A, Wiskocil RL, Stobo JD. 1984. The role of T3 surface molecules in the activation of human T cells: a two-stimulus requirement for IL 2 production reflects events occurring at a pre-translational level. *J Immunol* 133: 123-8
156. Weissenhorn W, Hinz A, Gaudin Y. 2007. Virus membrane fusion. *FEBS Lett* 581: 2150-5
157. Wunschmann S, Stapleton JT. 2000. Fluorescence-based quantitative methods for detecting human immunodeficiency virus type 1-induced syncytia. *J Clin Microbiol* 38: 3055-60
158. Zolla-Pazner S. 2004. Identifying epitopes of HIV-1 that induce protective antibodies. *Nat Rev Immunol* 4: 199-210

ANEXO 1. CITOMETRIA DE FLUJO

La citometría de flujo es una herramienta indispensable en la clínica y en la investigación ya que es una técnica multiparamétrica, ofrece información simultánea de varios parámetros de cada una de las células que se analizan así como de su relación con las del resto de la población analizada.

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

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

1. Señales de dispersión: Resultan de la interacción de la luz con una partícula produciendo un cambio de dirección (no de longitud de onda) en todas las direcciones del espacio. La dispersión depende del tamaño de la célula, núcleo y granularidad del interior de la célula. Se miden dos fracciones de dispersión: a) la luz dispersada en un ángulo pequeño (0-20°) llamada FSC (Forward Scatter), que es proporcional al tamaño de la partícula, y b) la luz dispersada en ángulo recto llamada SSC (Side Scatter) que es proporcional a la complejidad interna de la partícula (granularidad).

2. Señales de Fluorescencia: detectan señales de fluorescencia procedentes de fluorocromos situados en la célula, siendo la cantidad de fluorescencia emitida proporcional a la cantidad de componentes fluorescentes presentes de la partícula.

Un análisis por citometría de flujo permite conocer cuales y cuantos miembros de la población celular unen anticuerpos o presentan una marca fluorescente de interés. Mientras que un clasificador celular activado por fluorescencia (FACS por sus siglas en inglés Fluorescence-activated cell sorter) es una adaptación del citómetro de flujo que permite separar poblaciones celulares de acuerdo con el tipo de marca fluorescente y con la magnitud en que lo hacen. Esta técnica se realiza mediante la desviación diferencial de las células con campos electromagnéticos, cuya intensidad y dirección varían de acuerdo con la intensidad medida de la señal fluorescente.

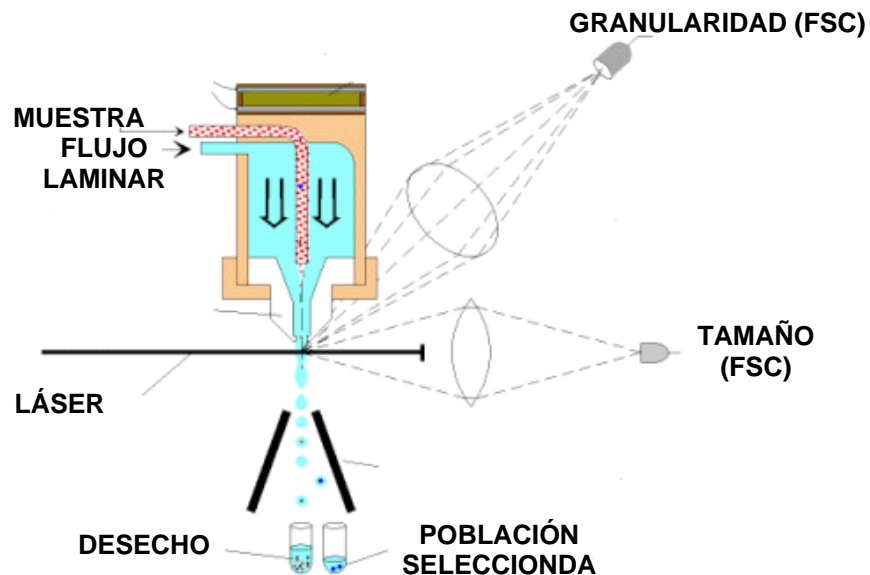


Figura 45. Componentes de un citómetro de flujo y la aplicación de FACS (separación de células).

ANEXO 2. COLORANTES LIPOFÍLICOS Y FRET.

Los colorantes lipofílico tipo carbocianina son colorantes que con un estructura semejante a la de los fosfolípidos de las membranas, con una cabeza polar (estructura química responsable de la emisión de fluorescencia) que esta unida a una cola de lipofílica de 18 carbonos que le permite insertarse en las membranas (Axel 1979).

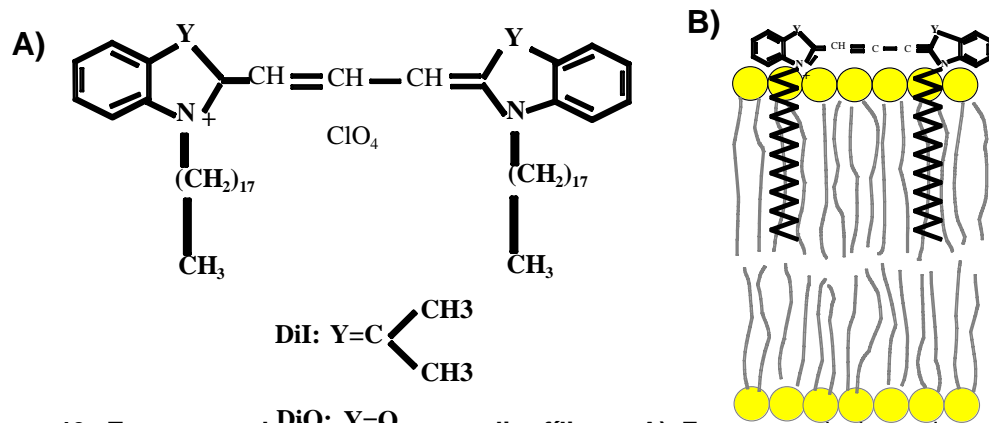


Figura 46. Estructura de los colorantes lipofílicos. A) Estructura de los colorantes lipofílicos, solamente difieren en la posición Y. B) La cola de carbonos les permite insertarse en las membranas plasmáticas.

El espectro de emisión del colorante lipofílico DiO se encuentra traslapado con el espectro de absorción del colorante lipofílico DiI (Fig. 47). Por esta razón cuando los colorantes se encuentran a una distancia de entre 10-100nm se presenta una transferencia de energía del verde (donador) al rojo (aceptor), lo cual provoca un aumento en la emisión de fluorescencia roja y generalmente una disminución en la emisión de fluorescencia verde.

En los sincicios los colorantes se encuentran colocalizados por lo que se observa un incremento de la fluorescencia roja, el incremento es independiente de la célula que tiene la marca roja, ya que si marcamos ahora a las Env con rojo también se presenta. Adicionalmente se observó que células CD4 que se marcaron de rojo e inmediatamente con diferentes concentraciones de verde presentaron un aumento en su fluorescencia roja, es decir el FRET se presenta cuando los dos colorantes se encuentran en la misma membrana.

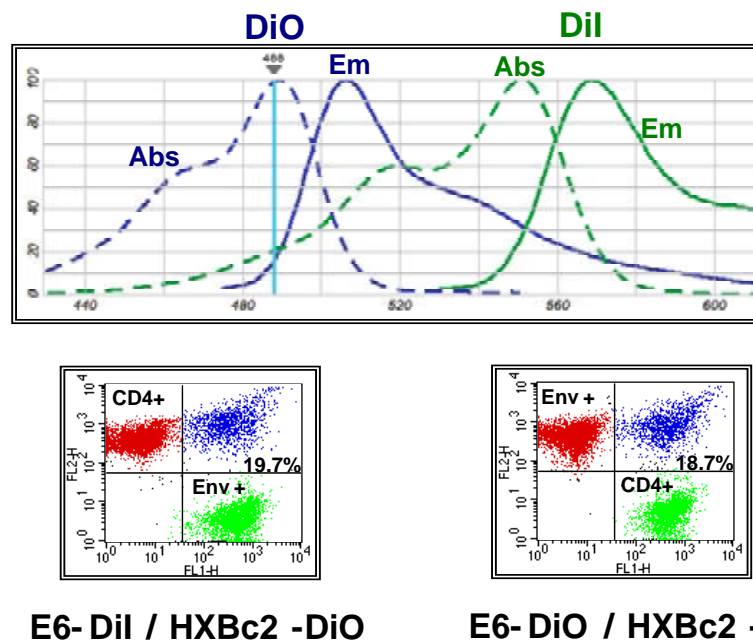


Figura 47. Espectros de emisión y absorción de los colorantes DiO y Dil A) Espectros de emisión/absorción del colorantes rojo (Dil) y del colorantes verde (DiO). **B)** Cocultivos en donde se intercambia la marca en las células, del lado derecho son las Env las que se marcaron de rojo. El incremento de la fluorescencia roja se presenta independientemente del tipo de células reactante marcada de rojo.

Al realizar una purificación de la población FRET positiva se observó que esta compuesta por células multinucleadas, mientras que en la población FRET negativa se observaron principalmente células mononucleares. Asimismo, solo la población FRET positivas se inhibió con el anticuerpo monoclonal anti CD4 y con el péptidos inhibidor de la fusión T20 (no mostrado)

El FRET se permite distinguir la agregación de la fusión real, por lo que la cuantificación es más precisa.

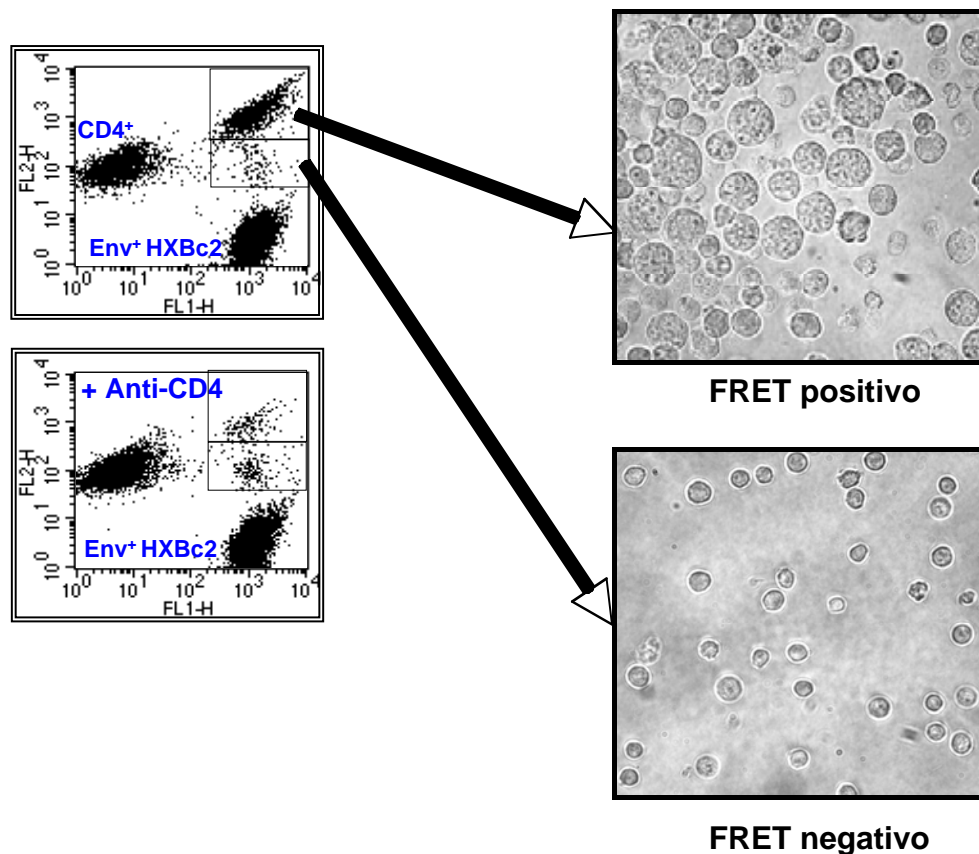


Figura 48. FRET y citometría de flujo en la cuantificación de sincicios A) Se pueden observar 2 poblaciones una f FRET positiva y una FRET negativa, solo la FRET positiva se inhibe con el anticuerpo monoclonal anti-CD4. B) Se realizó una purificación de las células FRET positivas y contienen células multinucleadas, mientras que la FRET negativa esta formada principalmente por células mononucleadas.

ANEXO 3. COLORANTES CITOPLÁSMICOS

Los colorantes CellTracker son colorantes fluorescentes derivados del clorometilo, difunden libremente en la membrana plasmática de células viables, en donde estereasas citosolicas rompen los grupos acetatos. Este proceso enzimático es necesario para generar la molécula fluorescente del colorante verde (CMFDA), el colorante rojo no requiere el procesamiento enzimático para activar su fluorescencia. Las células permanecen fluorescentes por al menos 24 hrs. y no se ven afectados por cambios en el pH.

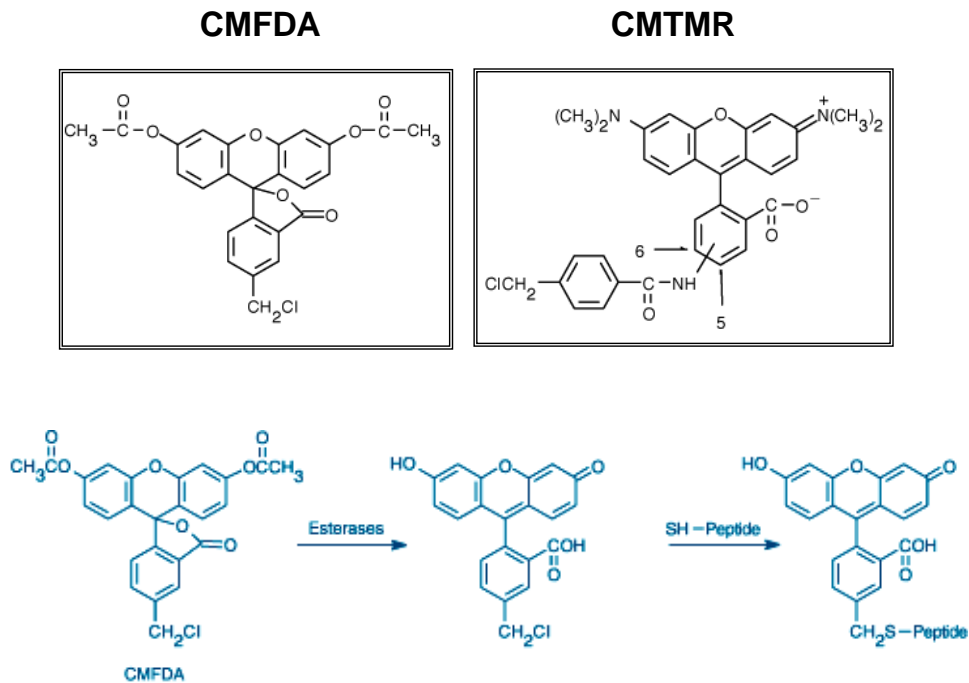
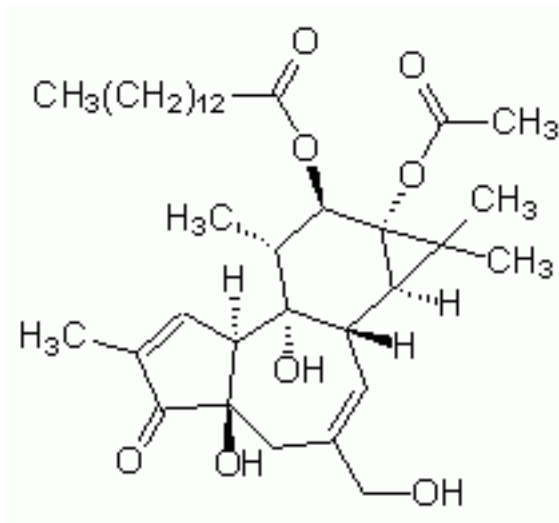


Figura 49. Colorantes hidrofílicos. A) Estructura química de los colorantes de citoplasma, **B)** Procesamiento de las moléculas de colorantes por las enzimas citosolicas, el colorante verde requiere el procesamiento para activar su fluorescencia, mientras que le colorante rojo no lo requiere, pero en ambos es necesario para que las moléculas ya no salgan de la célula

ANEXO 4. MITÓGENOS.

PMA.

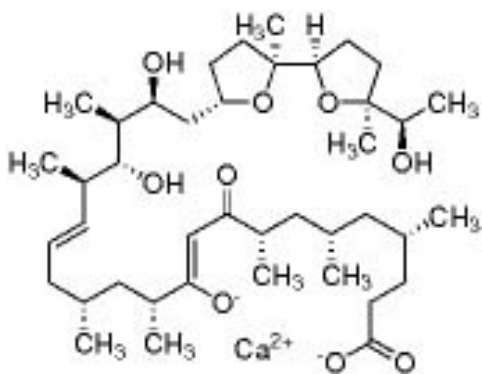
Forbol 12-miristato, 13-acetato, mejor conocido como PMA o TPA. Es un compuesto éster del forbol, que se obtiene del aceite de la planta crotón (*crotón tiglium*), tiene actividad promotora de tumores, y como activador de la proteína cinasa C (PKC) principalmente de las isoformas clásicas, induciendo la traducción de señales enzimáticas ya que es muy semejante a uno de los activadores naturales el Diacilglicerol (Sigma, cat: P8139).



Ionomicina.

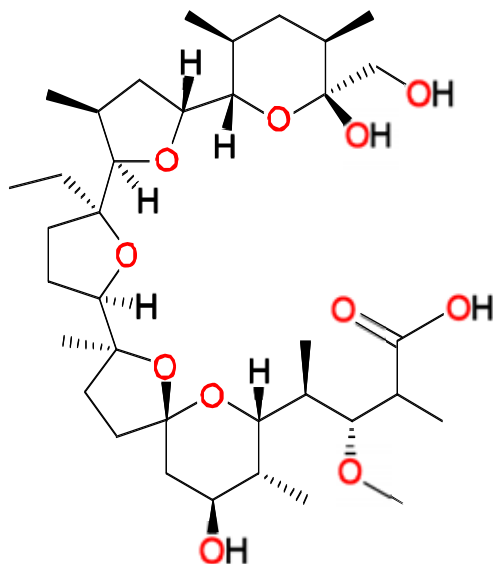
Es un antibiótico ionóforo producido por *Streptomyces conglobatus*, Une diversos cationes divalentes como el Ca^{2+} y al Pb^{2+} , sirve como un acarreador de ambos cationes. El flujo de calcio induce señalización intracelular que puede producir la

expresión de CD7 y la activación de PKC en linfocitos T, también puede inducir apoptosis. En conjunto con PMA estimula la producción de ciertas citocinas como interferon gama, IL-2, perforina e IL4 (Signa, cat: I3909).



Monensina

La adición de monensina (BD GolgiStop) a cultivos de linfocitos T activados bloquea el transporte de proteínas intracelulares, por lo que favorece la acumulación de proteínas como las citocinas en el complejo Golgi.



ANEXO 5. INMUNOPRECIPITACIÓN DE gp120.

Tomado de la Tesis de Evelyn Rivera Toledo para obtener el grado de Maestra en
Ciencias

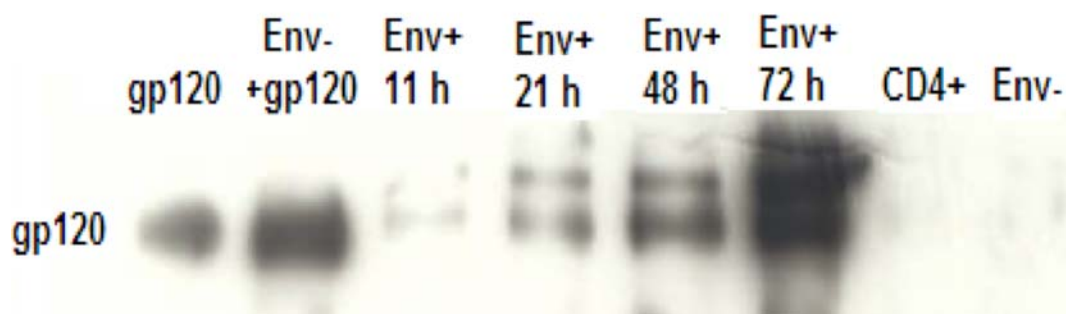


Figura 13. Western blot de un inmunoprecipitado obtenido con un anticuerpo policlonal anti-gp120 a partir de 20×10^6 células Env⁺ inducidas durante 11, 21, 48 y 72 horas (Env⁺) y no inducidas (Env-) para expresar el complejo viral gp120/gp41. Como control positivo se muestra la proteína gp120 pura adicionada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

Figura 50. Inmunoprecipitación de gp120.



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

N. López-Balderas^a, L. Huerta^{a,*}, C. Villarreal^b,
E. Rivera-Toledo^a, G. Sandoval^a, C. Larralde^a, E. Lamoyi^a

^a Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70228, Ciudad Universitaria, Distrito Federal, C.P. 04510, Mexico

^b Instituto de Física, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Distrito Federal, Mexico

Received 16 May 2006; received in revised form 22 August 2006; accepted 23 August 2006

Available online 2 October 2006

Abstract

Syncytia formation in HIV infections is driven by the virus fusion-active molecules (Env) interacting with membrane components of hosts cells. HIV-syncytia are usually interpreted as pathogenic entities and although they may potentially vary in size, numbers and types of constituent cells, little is known about the extent and significance of their diversity. Here, we describe numerically the cell population dynamics and the diversity of syncytia produced in the in vitro cell-fusion between two Jurkat T cell lines, one CD4⁺ and the other Env⁺. Cell-fusion partners were differentially stained with the lipophilic DiI and DiO, or with the cytoplasmic CMFDA and CMTMR tracers and syncytia showing double fluorescence were counted in a flow cytometer. The total number of syncytia formed, their size, cellular complexity and ratio of CD4⁺/Env⁺ cells recruited, varied significantly in relation with time of reaction and initial proportions of fusion partners. The considerable structural diversity of syncytia formed, in so limited an in vitro cell fusion reaction, suggests that a greater heterogeneity may be formed in the natural course of disease. Identification of the main determinants of syncytia diversity allows for a detailed study of the relation between the syncytia structure and function.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Cell fusion; Env; Virus envelope; Syncytia; Multinucleated cells; Giant cells; Flow cytometry; HIV

1. Introduction

Fusion of single cells leads to the formation of syncytia (also referred as multinucleated giant cells or polykaryons): a collection of two or more nuclei inside a single, continuous outer cell-membrane (Ogle et al., 2005). Complex physiological tasks, like those of the syncytium trophoblast (Gude et al., 2004) and regulation of embryonic development (Shemer and Podbilewicz, 2003), are accomplished by cells organized as syncytia: a hint of syncytia being perhaps optimal forms of cell organization to face complex demands. In pathological processes, syncytia of mononuclear cells are conspicuous histological entities often associated with chronic inflammation in a variety of infections involving viruses, bacteria and parasites (Fais et al., 1997; Murch et al., 1982). The role of syncytia in the host's management of the infection's challenge is not clear and may vary in each instance.

Differences in size and cellular composition raise the hypothesis that the net biological significance of cell fusion (i.e., harmful or useful) is associated with the syncytia's cellular composition, as well as with the nature and intensity of the challenge.

Syncytia are identified in cultures of HIV-infected T cells (Lifson et al., 1986; Sodroski et al., 1986) and found in lymphoid and brain tissues from HIV-1 infected individuals, where they may function as viral reservoirs or participate in the pathogenic mechanisms underlying CD4⁺ T cell depletion and immunodeficiency (Amendola et al., 1996; Budka, 1986; Castedo et al., 2003; Frankel et al., 1996; Koenig et al., 1986; Orenstein, 2000; Rinfret et al., 1991). Detection of syncytium-inducing virus in the circulation of HIV-infected patients is associated with an increased rate of CD4⁺ lymphocyte depletion and progression to AIDS (Blaak et al., 2000; Connor et al., 1993; Miedema et al., 1994) and the effect of serum antibodies on cell fusion associates with the clinical status of HIV-infected individuals (Huerta et al., 2005). Notwithstanding the pathogenic capacity that syncytia may have in HIV infection, the heterogeneity in time course, clinical manifestations and response of the patients

* Corresponding author. Tel.: +52 555 622 38 54; fax: +52 555 622 33 69.
E-mail address: leonorhh@biomedicas.unam.mx (L. Huerta).

to treatment (Hogan and Hammer, 2001a, b) hint to a network of complex events in operation during infection. The large numbers of structurally and functionally different syncytia that can be constructed by the combinatorial of different lymphoid and myeloid cells, infected and normal, may significantly contribute to the heterogeneity of pathogenesis in HIV infections.

The precise molecular mechanism of the HIV-mediated fusion reaction is under intense investigation. It involves the binding of receptors on the surface of lymphoid cells (CD4 and co-receptors) to fusion active molecules of viral origin (Env), followed by the proteins reorganization to form a sort of fusion machine incorporated in the membranes of the bound cells (Chen and Olson, 2005; Gallo et al., 2003). In contrast with the advanced understanding at the molecular level, the cell population dynamics (i.e., the time associated changes in the numbers of reacting cells and of the fusion products) involved in syncytia formation in HIV infection has been scarcely explored. The requirement of an initial binding step suggests that cell fusion follows the principles of mass action and hence the number and composition of the cell fusion products (i.e., syncytia) should be influenced by time of reaction, by the relative abundance of cell fusion partners and by the number of receptors on cell membranes. Differences in these parameters, along with the type and physiological state of the fusing cell partners, should produce quantitative and qualitatively diverse syncytia.

We tried constructing different HIV-related lymphoid syncytia to study their potentially different functions. In order to approach a quantitative description of the kinetics of the cell-fusion reaction in HIV infection, a reliable FACS-based method was developed to measure the cells and syncytia populations involved in the fusion of Env⁺ with CD4⁺ Jurkat cells when cocultured *in vitro*; the first mimicking an HIV infected cell and the second an uninfected CD4⁺ lymphocyte (Huerta et al., 2002, 2005, 2006). Herein, we show that the cell fusion reaction approaches a maximum in a few hours and does not include all the cells in the coculture. Significant differences were observed in the total number of syncytia produced as well as their size, granularity and the ratios of fusion partners incorporated ($r = \text{CD4}^+/\text{Env}^+$), which varied in relation with the initial proportions of the cell fusion partners and the coculture time. The calculation of r is based on a simple mathematical treatment of flow cytometry data at different coculture times.

2. Materials and methods

2.1. Cells

Jurkat E6-1 and transfected cell lines HXBc2(4) (Env⁺ cells) and 522F/Y containing an inducible tetracycline-dependent transactivator and the *env* gene from the HIV-1 HXBc2 strain coupled to a cytomegalovirus promoter and to tetracycline operator sequences (Cao et al., 1996), were obtained through the AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAD, NIH. HXBc2 (4) cell line express a functional gp120/gp41 glycoprotein, while 522F/Y cell line contains a mutant gene with a F/Y substitution at position 522 in gp41.

2.2. Fluorescent dyes

Membranes were stained with lipophilic red fluorescent DiI (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate) and green fluorescent DiO (3,3'-dioctadecyloxycarbocyanine perchlorate). Cytoplasmic staining was performed with CellTracker Green CMFDA (5-chloromethylfluorescein diacetate), and CellTracker Orange CMTMR (5-(and-6)-((4-chloromethyl) benzoyl) amino) tetramethylrhodamine. DNA staining was performed with Hoechst 33342. All dyes were obtained from Molecular Probes (Eugene, OR).

2.3. Cell culture

Env expressing Jurkat cell lines were grown in RPMI medium (Gibco BRL, Rockville, MD) containing 10% fetal bovine serum (Gibco BRL) (RPMI-10), 200 µg/ml of G418, 200 µg/ml of hygromycin, and 1 µg/ml of tetracycline. To induce *env* expression, cells were washed with PBS and cultured for 3 days in medium without tetracycline before fusion experiments (Cao et al., 1996). E6-1 cells were maintained in the same medium without the mentioned antibiotics.

2.4. Cell labelling and fusion assay

Labelling of cells with DiI and DiO was performed as described before (Huerta et al., 2002, 2006). Briefly, 11 µl of DiI or 20 µl of DiO working solutions were added to 1 ml of cells adjusted to 5–15 × 10⁶ cells/ml in RPMI-10, and incubated 15 min at room temperature protected from light. After washing two times with 10 volumes of RPMI-10, cells were resuspended in the same medium (adding hygromycin and G418 to transfected lines) and maintained overnight. For standard fusion experiments, 0.2 × 10⁶ labelled cells of each type were cocultured in a serum-free medium (AIM-V medium, Gibco BRL) and incubated at 37 °C, with 5% CO₂ for 5 or 8 h as indicated. For kinetic experiments, the proportion of fusion partners and incubation times were as indicated in the Figures. Finally, cells were collected from wells, washed with 3 ml of PBS, resuspended in 300 µl of FACSs buffer (Becton Dickinson) and analyzed immediately. Labelling with the cytoplasmic probes CellTracker Green CMFDA and CellTracker Orange CMTMR was similarly performed. Briefly, 1 ml of CD4⁺ or Env⁺ cells adjusted to 5–15 × 10⁶ cells/ml in AIM-V medium was incubated with 5 µM of CMTMR or with 0.3 µM of CMFDA for 30 min at 37 °C and 5.0% CO₂, then washed with fresh prewarmed medium and incubated for another 30 min at 37 °C. After washing with 10 volumes of AIM-V medium, cells were resuspended in RPMI-10 (adding hygromycin and G418 to transfected lines) and maintained overnight.

2.5. FACS and apoptosis analyses

Flow cytometry analysis was performed on 10,000 events captured in a FACScalibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA) using the CellQuest software (Becton Dickinson). Loosely aggregated cells were dissociated by gently pipetting

immediately before analysis. With this procedure, the amount of background double-colored aggregates was nearly constant at 1%. Single labelled cells that had not been cocultured were used for compensation in order to separate red and green fluorescent populations. FL1 (green), FL2 (red), SSC (side scatter) and FSC (forward scatter) parameters were collected. Cell debris were excluded from the analysis. Results shown are averages of duplicates.

Apoptosis was evaluated by flow cytometry (van Engelman et al., 1998) determining the binding of annexin V-Cy5 (BD Pharmingen) and propidium iodide (PI; Molecular Probes) incorporation into cells as follows: cocultured cells were collected from the plate, washed with 1 ml PBS and then resuspended in binding buffer (BD Pharmingen); annexin V-Cy5 and PI were added and after 10 min at room temperature in the dark cells were analyzed in the FACScalibur. As an apoptosis positive control, Jurkat E6-1 cells were incubated with camptothecin (Sigma) 4 μ M for 4 h at 37 °C before staining with annexin V-Cy5.

2.6. Fusion stoichiometry calculation

In this study, the stoichiometry coefficient of syncytia is defined as the incorporation ratio r of fusion partners in the population of syncytia formed in a given cell fusion reaction, $r = (\text{CD4}^+/\text{Env}^+)$.

In principle, a direct determination of r could be derived from the analysis of the relative fluorescence intensity of syncytia with respect to their unfused counterparts, given that the red and green fluorescence of each syncytium reflects the number of incorporated cells of each type. This approach is inexact when cells are stained with the lipophilic dyes DiI and DiO because red fluorescence is amplified due to fluorescence resonance energy transfer (FRET) and is not only due to a greater number of red cells incorporated in the syncytia (Huerta et al., 2006). On the other hand, an alternative estimation of r based on the red/green fluorescence intensity using the cytoplasmic probes CMFDA and CMTMR, which do not exhibit FRET in syncytia, is also inexact because these dyes do not allow the distinction of cellular aggregates from syncytia by flow cytometry.

Because of the above limitations of the fluorescent signals in estimating r , we devised a way to do so by measuring the changes in the relative concentrations of unfused red and green cells, after assuring that these changes were not due to proliferation or cell death. The rationale for this approach was that the incorporation of fusion partners into syncytia diminishes the absolute number of unfused cells of each population in a manner dependent on their relative recruitment into syncytia. Thus, we formulated a mathematical algorithm that relates r to the total number of syncytia and to the proportion of the two cell populations remaining unfused in a coculture at a given time. Fig. 1 shows numerical simulations of the changes in fused and unfused cell populations when fusion partners are recruited at different r s into syncytia and their initial coculture ratio R_0 was 1. When $r = 1$ the percentage of both fusion partners diminishes equally. However, when $r \neq 1$, the percentages of the fusion partners follow different patterns: while the percentage of unfused cells of the most recruited

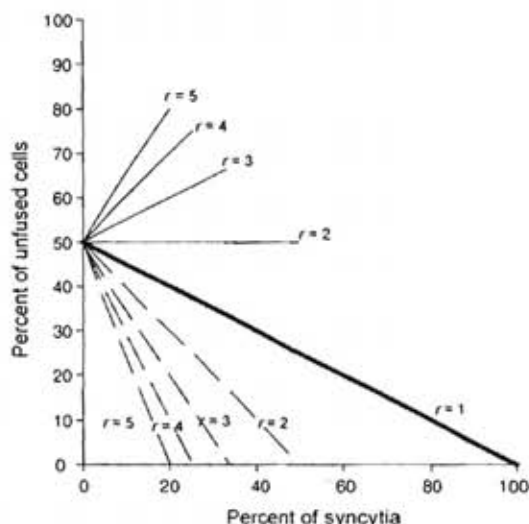


Fig. 1. Numerical simulation of incorporation of CD4^+ and Env^+ into syncytia at different ratios (r). Bold line represents the decay of the proportion of unfused cells from both fusion partners when they are equally recruited into syncytia (i.e., $r = 1$). Broken and continuous lines correspond to the changes in the percentage of unfused cells when r was fixed arbitrarily at values higher than 1 (from 2 to 5), as indicated. Broken lines correspond to the cell type which is incorporated in high proportion into syncytia, with the consequent decrease in their percentage as fusion progresses. Continuous lines correspond to the less incorporated cell type resulting in no change or increase in its percentage.

fusion partner decreases (with respect to its initial value), the percentage of the less recruited partner increases. The specific patterns followed by each cell population at $R_0 \neq 1$ are similar to the described above, but the starting point in the graphs are different. In the mathematical model, the absolute initial numbers of each fusion partner are denoted by $(\text{Env})_0$ and $(\text{CD4})_0$, so that the initial coculture ratio is $R_0 = (\text{CD4})_0/(\text{Env})_0$. As the reaction proceeds, the number of syncytia formed (F) increases from $F_0 = 0$ to F_i at the sampling time t_i . Assuming that n_i CD4^+ cells and m_i Env^+ cells have been recruited into syncytia at that time, it follows that the numbers of cells still unfused, denoted, respectively, by $(\text{CD4})_i$ and $(\text{Env})_i$, satisfy the relationships

$$(\text{CD4})_i = (\text{CD4})_0 - n_i F_i \quad (1)$$

$$(\text{Env})_i = (\text{Env})_0 - m_i F_i \quad (2)$$

The quantities actually determined by flow cytometry are cell population percentages. Therefore, we express Eqs. (1) and (2) in percentual terms by introducing the total number of cells at the sampling time t_i , $N_i = (\text{CD4})_i + (\text{Env})_i + F_i$, so that the percentages of unfused CD4^+ cells, unfused Env^+ cells, and syncytia are represented by $\{\text{cd4}\}_i = [(\text{CD4})_i/N_i] \times 100\%$, $\{\text{env}\}_i = [(\text{Env})_i/N_i] \times 100\%$, and $f_i = [F_i/N_i] \times 100\%$, respectively. Under the above condition Eqs. (1) and (2) were solved by assuming that at time t_i , n_i CD4^+ cells are recruited for each Env^+ cell ($m_i = 1$) to form a syncytium, thus yielding the relative incorporation coefficient:

$$n_i = \frac{R_0 - (1 + R_0)\{\text{cd4}\}_i}{f_i} \quad (3)$$

In the alternative situation, m_i Env⁺ cells are incorporated per each CD4⁺ cell. In this case, the proportion of unfused CD4⁺ cells exceeds its initial value $\{cd4\}_0$, and the parameter n_i becomes negative. This difficulty is overcome by now solving Eqs. (1) and (2) under the condition $n_i = 1$:

$$m_i = \frac{R'_0 - (1 + R'_0)\{env\}_i}{f_i} \quad (4)$$

with $R'_0 = (Env)_0/(CD4)_0$. Using (3) and (4), the whole stoichiometric process can be characterized by means of a single parameter, the median stoichiometric index, defined as $r_i = n_i$, when n_i CD4⁺ cells per Env⁺ cell are fused, and as $r_i = 1/m_i$ in the converse case. Notice that r_i is not necessarily an integer number. For example, $r_i = 1.5$ indicates a relative ratio CD4⁺/Env⁺ = 3:2, while $r_i = 0.66$ describes the converse case CD4⁺/Env⁺ = 2:3.

3. Results

3.1. Flow cytometry quantification of cell–cell fusion

We have previously shown that the quantitative study of cell–cell fusion can be approached by flow cytometry (Huerta et al., 2002, 2005, 2006). For the assay, the fusion partners (Env⁺ and CD4⁺ cells) are single labelled with the carbocyanine fluorescent lipophilic membrane dyes DiO (green) and DiI (red) and then cocultured: syncytia appear as a new population of double-fluorescent particles in FACS plots. To ascertain that the double fluorescent particles were not generated by transient mixing of cell membranes without complete fusion (Melikyan et al., 2005), cells were labelled with CMFDA and CMTMR hydrophilic cytoplasmic dyes (Wünschmann and Stapleton, 2000) in parallel experiments and fusion was determined also by flow cytometry (Roumier et al., 2003). The percentages of double fluorescent particles as well as the fusion kinetics obtained with both lipophilic and cytoplasmic dyes were similar (Fig. 2A, C and E). Also, similar size distributions (measured as the FSC parameter) were observed in the double fluorescent particles, half of which intersected with the larger half of the distribution of the individual fusion partners while the remaining fused particles were clearly larger than the unfused cells (Fig. 2F). As we have previously described (Huerta et al., 2002, 2006), only a background level of double fluorescent particles ($\approx 1\%$) are obtained when DiO-522F/Y cells carrying a mutant non-fusogenic HIV envelope protein are cocultured with DiI-CD4⁺ cells. This finding is confirmed here (Fig. 2B) and Fig. 2D shows that the same result was obtained with cytoplasmic dyes CMFDA and CMTMR in parallel experiments.

Further evidence that double fluorescent particles are fused cells is provided by the enhancement of the red fluorescence intensity due to fluorescence resonance energy transfer (FRET) when lipophilic dyes were used (Huerta et al., 2006). FRET arises when the emission spectrum of an energy donor overlaps with the absorption spectrum of an acceptor and constitutes a criterion for molecular proximity, as energy-donor and energy-acceptor molecules locate as close as 10 nm in a given compartment (Wu and Brand, 1994). We have recently shown that

FRET combined with flow cytometry allows the discrimination between true syncytia and aggregated cells (Huerta et al., 2006).

Microscopic examination of the cocultured cells showed double fluorescent syncytia of variable size containing two or more nuclei surrounded by a continuous membrane (Fig. 3). In agreement with the wide size distribution of syncytia (Fig. 2F) microscopic determination of nuclei content has shown that small syncytia, containing two to four nuclei accounts for 64% of the population. There were however, very large syncytia containing eight or more nuclei (Huerta et al., 2006). In addition, the numbers of syncytia determined by microscopy and by flow cytometry show an excellent agreement (Huerta et al., 2006). Taken together, these results demonstrate that most double fluorescent particles detected by flow cytometry in our cell fusion experiments were syncytia, that they varied significantly in size and that fused cells can be distinguished from aggregated cells.

3.2. Kinetics of cell incorporation into syncytia

To investigate whether a diversity of syncytia can be obtained under different experimental conditions, we studied the cell fusion kinetics, the ratio r of the fusion partners into syncytia, and their size and granularity, in a series of five assays differing in the initial proportion of fusion partners $R_0 = (CD4)_0/(Env)_0$ ranging from 0.1 to 10.

Fig. 4A shows the changes in the percentage of syncytia (double fluorescent, FRET-manifesting cells) and of the unfused CD4⁺ and Env⁺ cell populations during 8 h of coculture at $R_0 = 1$. Syncytia formation rapidly increased with time during the first 2 h to closely approximate a maximum (F_{max}) at 4 h. This kinetic pattern of syncytia formation was also observed in cocultures differing in R_0 , although different F_{max} values were obtained. The highest value of F_{max} was found at $R_0 = 1$ (Fig. 4C).

Syncytia formed are highly heterogeneous due to the incorporation of variable cell numbers and the recruitment of fusion partners at different ratios. Fig. 4A shows that, as the fusion progressed, the percent of unfused cells changed at similar rates, a first indication of equivalent numbers of CD4⁺ and Env⁺ cells being recruited into syncytia. A plot of r as a function of coculture time shows that, for $R_0 = 1$, r adopts a constant final value (r_f) of 1.4 from 1 to 8 h of coculture (Fig. 4B). For cocultures with R_0 s different from 1, r exhibited a less constant behavior during the first 2 h of coculture but stabilized after 4 h at a final asymptotic value r_f , with scarce changes thereafter. r_f increased with higher values of R_0 , reaching a maximum $r_f \approx 3$ at $R_0 = 10$ (Fig. 4D). Note that r_f was 3:1 when CD4⁺ cells were in a tenfold excess, while $r_f = 0.7$ (approximately 2 CD4⁺:3 Env⁺) when Env⁺ were in tenfold excess.

Calculation of the fusion stoichiometry by the mathematical approach used here, assumes that changes in the proportion of the three cell populations during coculture reflect fusion dynamics and excludes cell death and cell proliferation. Analysis of viability and apoptosis by propidium iodide incorporation and annexin V binding, respectively, did not show significant cell death in the 8 h of coculture (Fig. 5). On the other hand, Jurkat Env⁺ cells completely stop proliferation after being induced to synthesize HIV-envelope glycoproteins, and no significant repli-

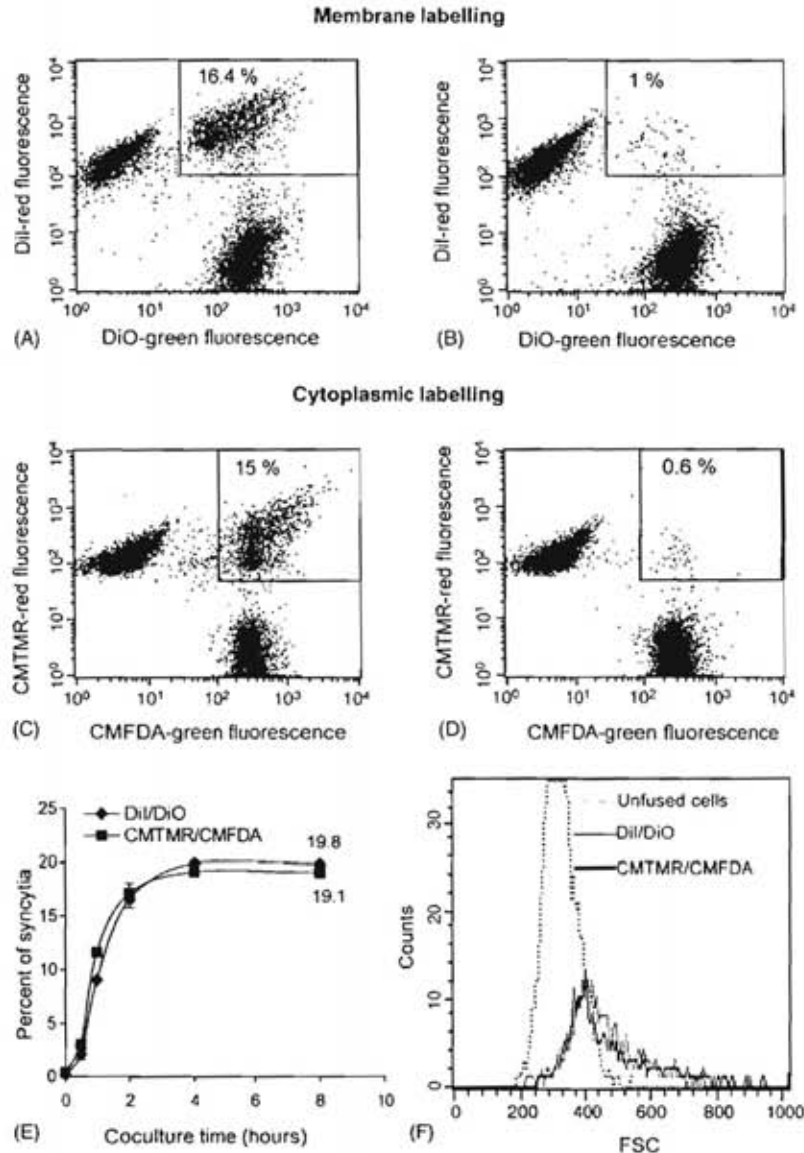


Fig. 2. Flow cytometry analysis of fusion between Env^+ and CD4^+ Jurkat cells after 8 h of coculture, using: (panels A and B) lipophilic and (panels C and D) cytoplasmic dyes. (Panel E) Kinetics of fusion and (panel F) FSC profile of syncytia.

cation of the Jurkat CD4^+ cells was seen, as indicated by the minimal changes in the percentage of these cells when cocultured with Env -expressing, non-fusogenic 522F/Y cells (data not shown).

The forward (FSC) and side scatter (SSC) intensities were used as indicators of syncytia size and cytoplasmic complexity or granularity (Huerta et al., 2006), respectively. Fig. 6 shows the evolution of the syncytia mean size and granularity with time of coculture, and their respective standard deviations as a measure of syncytia diversity. As expected, syncytia detected in the first half an hour had mean sizes and granularities greater than those of unfused cells. Later on, mean size and granularity increased with coculture time and with R_0 . Thus, larger syncytia were obtained with $R_0 = 10$, and the smallest ones with $R_0 = 0.1$. Standard deviations of the respective curves indicate the width

of the distributions of mean size and granularity. Clearly, standard deviations of granularity are greater than those of sizes and also more clearly increase with time of coculture, although both increase with higher R_0 .

4. Discussion

The aim of these experiments was to try to induce the formation of diverse syncytia of CD4^+ and Env^+ Jurkat T lymphoid cells, as a first step to investigate their possibly different biological significance. Indeed, substantial differences were found in the number, size and granularity of the formed syncytia, as well as in the ratios of the fusion partners recruited in the syncytia, which depend on time of coculture and the initial ratios of cell fusion partners.

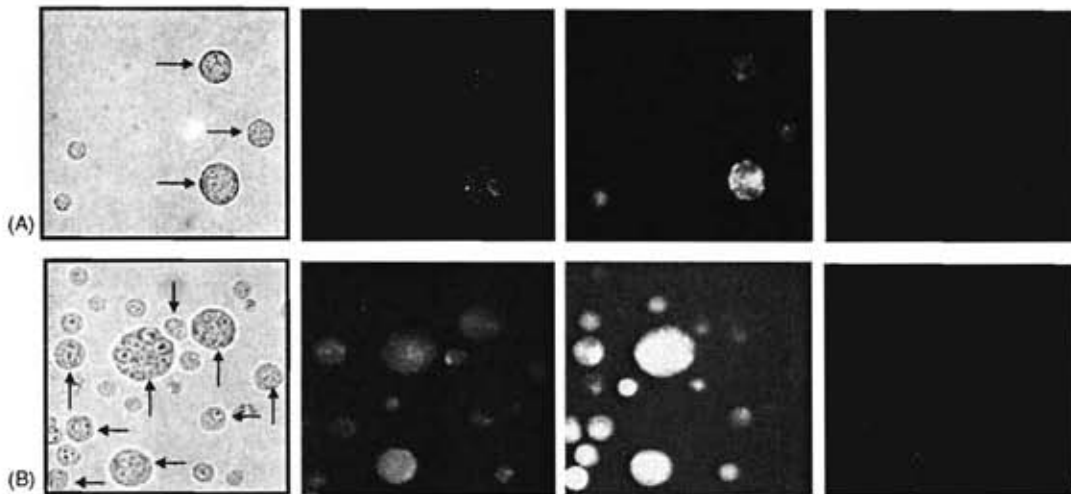


Fig. 3. Bright field and fluorescence microscopy of 5 h-cocultures of Env⁺ and CD4⁺ Jurkat cells stained with: (panel A) DiI and DiO lipophilic or (panel B) CMTMR and CMFDA cytoplasmic dyes. Double fluorescent syncytia are indicated by arrows. DNA was labeled with Hoechst 33342 (blue fluorescence).

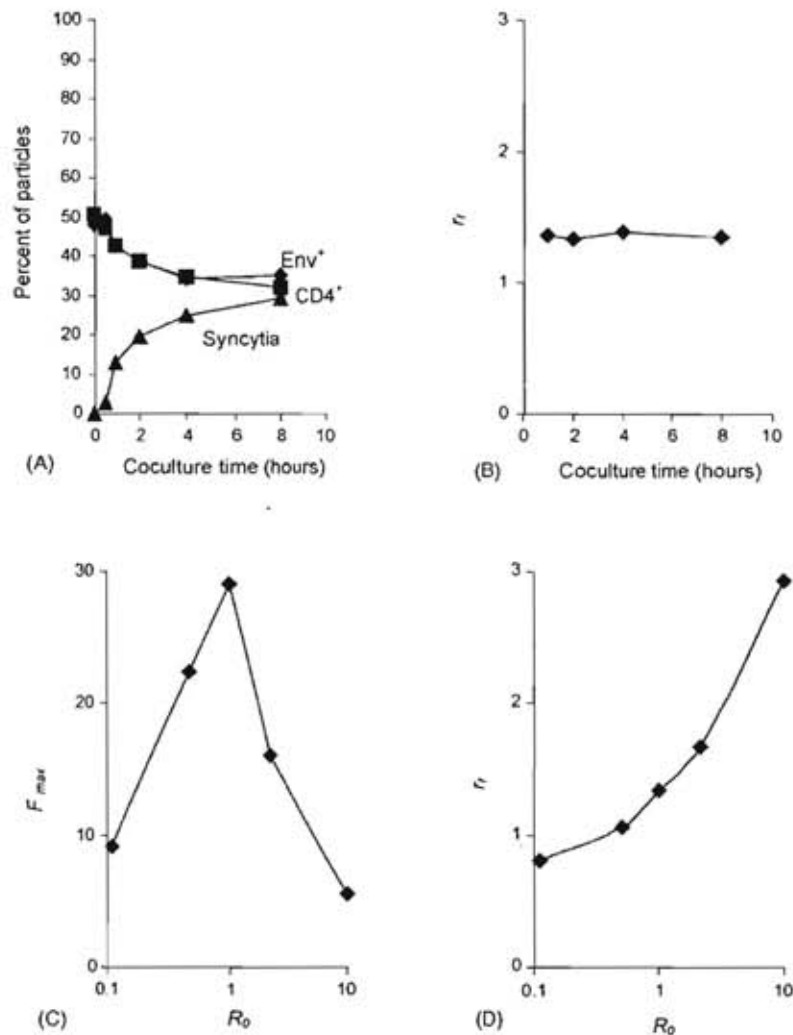


Fig. 4. Changes in the percentages of syncytia and unfused cells (panel A) and in the ratio r (CD4⁺/Env⁺) of incorporation of fusion partners into syncytia (panel B), at equal initial proportions of CD4⁺ and Env⁺ fusion partners ($R_0 = 1$). (Panel C) Relationship of F_{max} with R_0 and (panel D) relationship of r_f with R_0 .

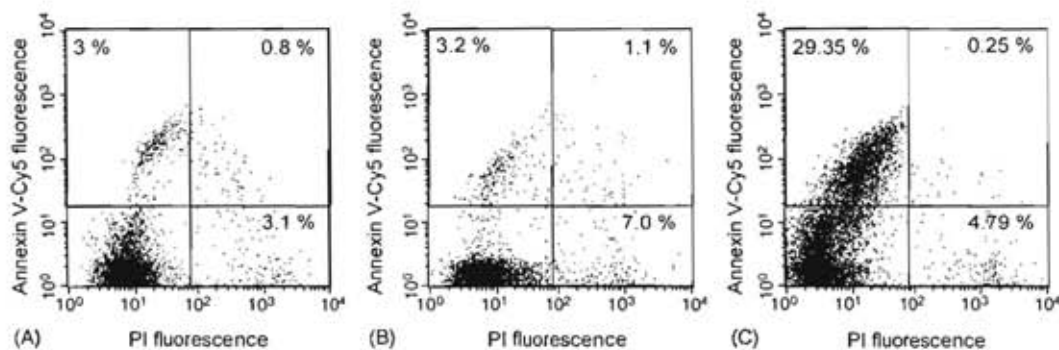


Fig. 5. Binding of annexin V-Cy5 and PI incorporation in cocultures of Env⁺ and CD4⁺ cells at $R_0 = 1$. (Panel A) At the beginning of coculture and (panel B) after 4 h. (Panel C) Apoptotic CD4⁺ cells incubated during 4 h with camptothecin.

That true syncytia were formed in these experiments is supported by the microscopic observation of numerous double fluorescent particles containing several nuclei surrounded by a continuous membrane (Huerta et al., 2006 and Fig. 3). Also,

in flow cytometry, FRET was documented in the double fluorescent particles, confirming lipid mixing as a result of cell membrane fusion (Huerta et al., 2006). Furthermore, that similar percentages of syncytia were obtained when cytoplasmic or

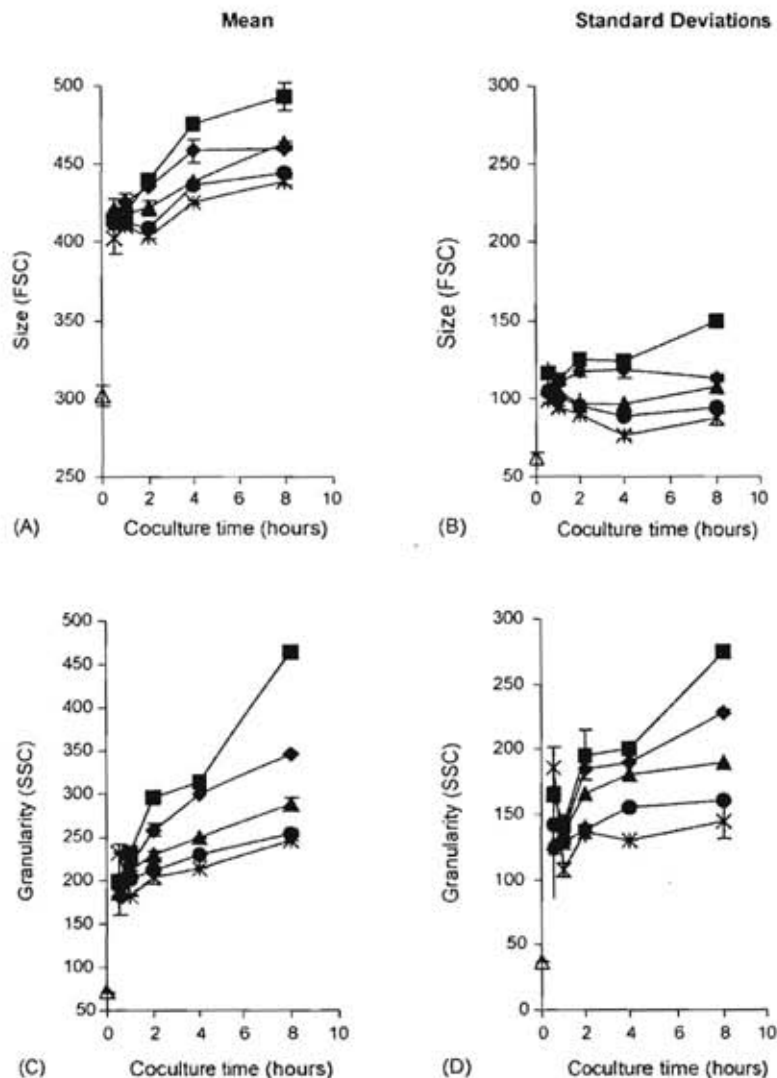


Fig. 6. Changes in syncytia size (FSC) and granularity (SSC) with R_0 and time of coculture. (■), $R_0 = 10$; (◆), $R_0 = 2.4$; (▲), $R_0 = 1$; (●), $R_0 = 0.5$; (*), $R_0 = 0.1$; (Δ), unfused CD4⁺ cells.

lipophilic dyes were used (Fig. 2), argues in favor of mixing of cell contents.

Results show that HIV-env dependent syncytia formation is influenced by time of culture and by the relative initial abundance of fusion partners, in a manner roughly following the law of mass action in binding reactions, i.e., the reaction is specifically related to the molecular ligands on the cell's surface, it tends to an apparent equilibrium state, and the extent and composition of products are influenced by the relative initial concentrations of the reacting cells (Pauling et al., 1943).

Syncytia varied in the ratio of recruitment of fusion partners, or fusion stoichiometry, and in their size and cellular complexity. We are not aware of a procedure to numerically study such important statistical parameters in the composition diversity of a population of syncytia. Usually, only the number of total syncytia is counted under the microscope (Dimitrov et al., 1993), or the extent of fusion is estimated by the expression of reporter genes in the entire cell population (Rucker et al., 1997).

Our results show that fusion stoichiometry (r) varied in a way related to the relative abundance of fusion partners and time of coculture. Syncytia with a high r_f predominated when CD4⁺ cells were the most abundant, while syncytia with a low r_f (even less than 1) predominated when the proportion of Env⁺ cells increased. That $r_f \approx 3$ when $R_0 = 10$ might reflect that gp120/gp41 fusogenic complexes on Env⁺ cells are a limiting factor in syncytia formation dynamics. It would suggest that in early HIV infections, when CD4⁺ cells are abundant, the initial syncytia formed, although fewer, would have the chance to recruit more uninfected CD4⁺ lymphocytes than at later times, when these become scarce and $r_f < 1$. The functional significance of such disproportions of cell fusion partners in a population of syncytia remains to be elucidated.

Because no significant cell death was observed during the coculture time (Fig. 5), it was possible to estimate the stoichiometry on the basis of the changes in the proportion of each cell population over time. However, viability may decrease at longer incubation times or in different coculture systems (Blanco et al., 2004; Sylwester et al., 1997). Cell viability can be monitored in all cells in the coculture by the use of fluorescent cell death indicators, as shown in Fig. 5. Clearly, calculation of fusion stoichiometry as described here is only possible given that no significant cell death is observed.

Another source of error in the calculation of fusion stoichiometry could arise from homologous fusion between Env⁺ cells. However, no homologous fusion was detected when Env⁺ cells labeled separately with DiI and DiO were cocultured. This may be related to the undetectable levels of CD4 on Env⁺ cells (data not shown), which is in agreement with the down-modulation of this molecule observed in transfected Env-expressing and HIV-infected cells (Bour et al., 1994).

The highest values of F_{\max} were found at $R_0 = 1$, in congruence with 1:1 being the combination of two different partners that produces a maximal number of couples containing both cell fusion partners (Fig. 4C). The size of syncytia was also related with the initial proportion of CD4⁺ cells but in a more complex form involving time of coculture (Fig. 6). Larger syncytia were found when the proportions of CD4⁺ cells and time of reac-

tion were increased. This result indicates to a capacity of Env⁺ cells to bind up to three CD4⁺ cells. Additional increase in size could derive from syncytia–syncytia fusion bridged by membrane receptors left unbound after the formation of the initially smaller syncytia. In fact, the increase in syncytia size without significant changes in the percentage of fusion and r_f indicate that giant cells may generate by syncytia–syncytia fusion. On the other hand, in spite of the generation of large syncytia, a substantial amount (~50%) of small syncytia were observed at all culture conditions. Thus, it is possible that in HIV patients the formation of small syncytia is more frequent than usually recognized but they may go unnoticed on account of their small size (Orenstein, 2000).

That syncytia granularity increased more so than did their size can be explained by the fact that SSC intensity is sensitive to the number of nuclei and cytoplasm content inside the syncytia, while size is related to the syncytia diameter, which augments only slightly with each recruited cell. Thus, SSC is a better indicator of syncytia complexity than FSC.

Besides their descriptive value for the cell fusion reaction and potential application in the construction and isolation of different syncytia, our results raise some questions of interest in the fusion between two different partner cell lines: why was F_{\max} limited to a maximum of about 20% of all cells in the mixture?; is there fusion between syncytia after the fusion of single cells has reached an equilibrium?, and what determines the size of syncytia? The speculations that follow in answer to these questions highlight their importance and need for proper factual answers. F_{\max} is perhaps limited because of: (a) cellular heterogeneity in the partner cell lines, due to variability in the expression of the fusion-active proteins, either genetically determined by different numbers of transfected genes per cell or because of asynchronous cell cycles among the cell line members; (b) recruitment of cells by already formed syncytia, which result in new fusion events without an increase in the number of double fluorescent particles.

We speculate that the long course of HIV infections and the many options a complete organism provides to form syncytia between different cells, and at different relative concentrations, will likely result in greater syncytia diversity in vivo than that found in our experiments with only two cell lines in near equal relative initial proportions and cocultured for only 8 h. Since some of these conditions regulating syncytia formation and diversity actually change in vivo in the course of HIV infection, the total number and diversity of syncytia could be related to the clinical features of HIV disease, and their role controlled by its own rules of formation. Experimental proof of functional diversity, concomitant to structural diversity in HIV-related lymphoid syncytia is being sought.

Acknowledgments

Jurkat-HXBc2 (4) and Jurkat-522F/Y cells were obtained from Dr. Joseph Sodroski, and Jurkat Clone E6-1 cells from ATCC (Dr. Arthur Weiss), through the AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH. This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y

Tecnología (CONACYT) of México, grant 40413-M, and by Universidad Nacional Autónoma de México, PAPITT grant IN231303-3. Dr. C. Villarreal acknowledges financial support from Universidad Nacional Autónoma de México grant DGA-PAIN118606. N. López-Balderas, E. Rivera-Toledo and G. Sandoval were recipients of fellowships from CONACYT. We thank Drs. John H. Robinson for valuable discussions and criticisms and Elizabeth Langley for critical review of the manuscript.

References

- Amendola, A., Gougeon, M.L., Poccia, F., Bondurand, A., Fesus, L., Piacentini, M., 1996. Induction of "tissue" transglutaminase in HIV pathogenesis: Evidence for high rate of apoptosis of CD4⁺ T lymphocytes and accessory cells in lymphoid tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 11057–11062.
- Blaak, H., Van't Wout, A.B., Brouwer, M., Hooibrink, B., Hovenkamp, E., Schuitemaker, H., 2000. In vivo HIV-1 infection of CD45RA⁺CD4⁺ T cells is established primarily by syncytium-inducing variants and correlates with the rate of CD4⁺ T cell decline. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 1269–1274.
- Blanco, J., Barretina, J., Clotet, B., Este, J.A., 2004. R5 HIV gp120-mediated cellular contacts induce the death of single CCR5-expressing CD4 T cells by a gp41-dependent mechanism. *J. Leukoc. Biol.* 76, 804–811.
- Bour, S., Gelezianus, R., Wainberg, M.A., 1994. The role of CD4 and its down-modulation in establishment and maintenance of HIV-1 infection. *Immunol. Rev.* 140, 147–171.
- Budka, H., 1986. Multinucleated giant cells in brain: a hallmark of the acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Acta Neuropathol. (Berl.)* 69, 253–258.
- Cao, J., Park, I.W., Cooper, A., Sodroski, J., 1996. Molecular determinants of acute single-cell lysis by human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 70, 1340–1354.
- Castedo, M., Perfettini, J.L., Andreau, K., Roumier, T., Piacentini, M., Kroemer, G., 2003. Mitochondrial apoptosis induced by the HIV-1 envelope. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1010, 19–28.
- Chen, E.H., Olson, E.N., 2005. Unveiling the mechanisms of cell–cell fusion. *Science* 308, 369–373.
- Connor, R.I., Mohri, H., Cao, Y., Ho, D.D., 1993. Increased viral burden and cytopathicity correlate temporally with CD4⁺ T-lymphocyte decline and clinical progression in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *J. Virol.* 67, 1772–1777.
- Dimitrov, D.S., Broder, C.C., Berger, E.A., Blumenthal, R., 1993. Calcium ions are required for cell fusion mediated by the CD4-human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein interaction. *J. Virol.* 67, 1647–1652.
- Fais, S., Burgio, V.L., Capobianchi, M.R., Gessani, S., Pallone, F., Belardelli, F., 1997. The biological relevance of polykarions in the immune response. *Immunol. Today* 18, 522–527.
- Frankel, S.S., Wenig, B.M., Burke, A.P., Mannan, P., Thompson, L.D., Abbonando, S.L., Nelson, A.M., Pope, M., Steinman, R.M., 1996. Replication of HIV-1 in dendritic cell-derived syncytia at the mucosal surface of the adenoid. *Science* 272, 115–117.
- Gallo, S.A., Finnegan, C.M., Viard, M., Raviv, Y., Dimitrov, A., Rawat, S.S., Puri, A., Durell, S., Blumenthal, R., 2003. The HIV Env-mediated fusion reaction. *Biochim. Biophys. Acta* 1614, 36–50.
- Gude, N.M., Roberts, C.T., Kalionis, B., King, R.G., 2004. Growth and function of the normal human placenta. *Thromb. Res.* 114, 397–407.
- Hogan, C.M., Hammer, S.M., 2001a. Host determinants in HIV infection and disease. Part 1. cellular and humoral immune responses. *Ann. Intern. Med.* 134, 761–776.
- Hogan, C.M., Hammer, S.M., 2001b. Host determinants in HIV infection and disease. Part 2. Genetic factors and implications for antiretroviral therapeutics. *Ann. Intern. Med.* 134, 978–996.
- Huerta, L., Lamoyi, E., Báez-Saldaña, A., Larralde, C., 2002. Human immunodeficiency virus envelope-dependent cell–cell fusion: a quantitative fluorescence cytometric assay. *Cytometry* 47, 100–106.
- Huerta, L., Gómez-Icazbalceta, G., Soto-Ramírez, L., Viveros-Rogel, M., Rodríguez, R., Fuentes, L., Lamoyi, E., Larralde, C., 2005. Human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) envelope-dependent cell–cell fusion modulation by HIV-positive sera is related to disease progression. *J. Gen. Virol.* 86, 1961–1966.
- Huerta, L., López-Balderas, N., Larralde, C., Lamoyi, E., 2006. Discriminating in vitro cell fusion from cell aggregation by flow cytometry combined with fluorescence resonance energy transfer. *J. Virol. Methods* 138, 17–23.
- Koenig, S., Gendelman, H.E., Orenstein, J.M., Dal Canto, M.C., Pezeshkpour, G.H., Yungbluth, M., Janotta, F., Aksamit, A., Martin, M.A., Fauci, A.S., 1986. Detection of AIDS virus in macrophages in brain tissue from AIDS patients with encephalopathy. *Science* 233, 1089–1093.
- Lifson, J.D., Feinberg, M.B., Reyes, G.R., Rabin, L., Banapur, B., Chakrabarti, S., Moss, B., Wong-Staal, F., Steimer, K.S., Engleman, E.G., 1986. Induction of CD4-dependent cell fusion by the HTLV-III/LAV envelope glycoprotein. *Nature* 323, 725–728.
- Melikyan, G.B., Barnard, R.J.O., Abrahamyan, L.G., Mothes, W., Young, J.A.T., 2005. Imaging individual retroviral fusion events: from hemifusion to pore formation and growth. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 8728–8733.
- Miedema, F., Meyaard, L., Koot, M., Klein, M.R., Roos, M.T., Groenink, M., Fouchier, R.A., Van't Wout, A.B., Tersmette, M., Schellekens, P.T., 1994. Changing virus–host interactions in the course of HIV-1 infection. *Immunol. Rev.* 140, 35–72.
- Murch, A.R., Grounds, M.D., Marshall, C.A., Papadimitriou, J.M., 1982. Direct evidence that inflammatory multinucleate giant cells form by fusion. *J. Pathol.* 137, 177–180.
- Ogle, B.M., Cascalho, M., Platt, J.L., 2005. Biological implications of cell fusion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 567–575.
- Orenstein, J.M., 2000. In vivo cytolysis and fusion of human immunodeficiency virus type 1-infected lymphocytes in lymphoid tissue. *J. Infect. Dis.* 182, 338–342.
- Pauling, L., Campbell, D.H., Pressman, D., 1943. The nature of forces between antigen and antibody and of the precipitation reaction. *Physiol. Rev.* 23, 203–219.
- Rinfret, A., Latendresse, H., Lefebvre, R., St-Louis, G., Jolicœur, P., Lamarre, L., 1991. Human immunodeficiency virus-infected multinucleated histiocytes in oropharyngeal lymphoid tissues from two asymptomatic patients. *Am. J. Pathol.* 138, 421–426.
- Roumier, T., Castedo, M., Perfettini, J.L., Andreau, K., Métivier, D., Zamzami, N., Kroemer, G., 2003. Mitochondrion-dependent caspase activation by the HIV-1 envelope. *Biochem. Pharmacol.* 66, 1321–1329.
- Rucker, J., Doranz, B.J., Eninger, A.L., Long, D., Berson, J.F., Doms, R.W., 1997. Cell–cell fusion assay to study role of chemokine receptors in human immunodeficiency virus type 1 entry. *Methods Enzymol.* 288, 118–133.
- Shemer, G., Podbilewicz, B., 2003. The story of cell fusion: big lessons from little worms. *BioEssays* 25, 672–682.
- Sodroski, J., Goh, W.C., Rosen, C., Campbell, K., Haseltine, W.A., 1986. Role of the HTLV-III/LAV envelope in syncytium formation and cytopathicity. *Nature* 322, 470–474.
- Sylwester, A., Murphy, S., Shutt, D., Soll, D.R., 1997. HIV-induced T cell syncytia are self-perpetuating and the primary cause of T cell death in culture. *J. Immunol.* 158, 3996–4007.
- van Engelman, M., Nieland, L.J., Ramaekers, F.C., Schutte, B., Reutelingsperger, C.P., 1998. Annexin V-affinity assay: a review on apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 31, 1–9.
- Wu, P.G., Brand, L., 1994. Resonance energy transfer: methods and applications. *Anal. Biochem.* 218, 1–13.
- Wünschmann, S., Stapleton, J.T., 2000. Fluorescence-based quantitative methods for detecting human immunodeficiency virus type 1-induced syncytia. *J. Clin. Microbiol.* 38, 3055–3060.

Discriminating in vitro cell fusion from cell aggregation by flow cytometry combined with fluorescence resonance energy transfer

Leonor Huerta*, Nayali López-Balderas, Carlos Larralde, Edmundo Lamoyi

Department of Immunology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Apartado Postal 70228, Distrito Federal, C.P. 04510, Mexico

Received 8 March 2006; received in revised form 8 July 2006; accepted 13 July 2006

Available online 23 August 2006

Abstract

Expression of fusion proteins in the plasma membrane enables cells to bind and fuse with surrounding cells to form syncytia. Cell fusion can have important functional outcomes for the interacting cells, as syncytia formation does in AIDS pathogenesis. Studies on cell fusion would be facilitated by a quantitative method able to discriminate between cellular aggregates and bona fide fused cells in a cell population. Flow cytometry with fluorescence resonance energy transfer is applied here for analyzing fusion of HIV-1 envelope-expressing cells with CD4⁺ Jurkat cells. Fusion partners were labeled with the vital lipophilic fluorescent probes DiO (green) and DiI (red) and FRET is manifested by an enhancement of the DiI red fluorescence intensity in double fluorescent cells, thus allowing discrimination between fused and aggregated cells. The inhibitory effect of anti-CD4 monoclonal antibodies and the inhibitory peptide T-20 upon cell fusion were readily quantified by this technique. This method allows the distinction of fused and aggregated cells even when they are at low frequencies.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Cell fusion; Flow cytometry; FRET; Syncytia; T-20; Membrane fusion

1. Introduction

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 cells to form syncytia (Lifson et al., 1986; Sodroski et al., 1986). Although the relevance of cell-cell fusion for the pathogenesis of AIDS is unknown, evidences indicate that syncytia formation may be a mechanism for CD4⁺ T cell depletion (Andreau et al., 2004; Furrer et al., 1998; Miedema et al., 1994). Additionally, syncytia could constitute important sites for virus replication in brain and lymphoid tissues (Frankel et al., 1997; Raghavan et al., 1999). Other processes where cell fusion is important include the formation of placenta and muscle, malignant transformation and stem cell-induced tissue repair (Alvarez-Dolado et al., 2003; Ogle et al., 2005). It is possible that distinct physiological or pathological outcomes of cell fusion could originate from differences in the relative numbers of fused cells, their types and physiological states, the nature and degree

of alteration of the individual cell functions after fusion and from the stimuli from the microenvironment, all issues largely unattended.

Cell fusion has been studied using a number of assays, including reporter genes (Rucker et al., 1997) and spectrofluorometric measurement of fluorescent probe redistribution, such as fluorescence dequenching, photosensitized labeling, and fluorescence resonance energy transfer (FRET) (Blumenthal et al., 2002; Struck et al., 1981). Several of these methods provide a global estimation of fusion and others have been useful to monitor detailed kinetic changes in the lipid and cytosolic compartments allowing the study of fusion mechanism (Melikyan et al., 2005). However, studies on the cell population dynamics during cell fusion, investigation of their biological features, and the effect of fusion on surrounding cells, cannot be accomplished by these methods. Flow cytometry provides a quantitative approach which, combined with the analysis of functional markers, can be applied to study cell population fusion dynamics, determinants and consequences of cell fusion. However, the validity of this method can be compromised by mistaking cellular aggregates for fused cells (Gabrijel et al., 2004). In order to identify and quantify fused cells, a FACS-based method was developed using Jurkat lymphoid cells expressing HIV-1 envelope proteins,

* Corresponding author. Tel.: +52 555 622 38 54; fax: +52 555 622 33 69.
E-mail address: leonorhb@biomedicas.unam.mx (L. Huerta).

which fuse with neighbor CD4⁺ target cells by a mechanism analogous to the virus-cell fusion process. In this assay, fusion partners are stained with the lipophilic fluorescent dyes DiI (red) and DiO (green), and fused cells are detected as double fluorescent particles (Huerta et al., 2002). Since the emission and absorption spectra of these dyes overlap, FRET assays would allow the distinction between fused and aggregated cells. Here it is reported that fused cells consistently exhibit FRET while non-fused, aggregated cells do not, thus allowing the discrimination of cellular aggregates from bona fide fused cells by flow cytometry.

2. Material and methods

2.1. Cells

Jurkat cell lines HXBc2(4) and 522F/Y containing an inducible tetracycline-dependent transactivator and transfected with the *env* and *rev* genes from the HIV-1 HXBc2 strain coupled to a cytomegalovirus promoter and to tetracycline operator sequences. HXBc2(4) cell line expresses a functional gp120/gp41 glycoprotein, while the 522F/Y cell line contains a F/Y substitution at position 522 in gp41 that prevents fusion (Cao et al., 1996). Both transfected cell lines and Jurkat clone E6-1 (E6 cells), were obtained through the AIDS Research and Reference Reagent Program.

2.2. Cell culture

Transfected cells were grown in RPMI medium (Gibco BRL, Rockville, MD) containing 10% fetal bovine serum (Gibco BRL) (RPMI-10), 200 µg/ml of G418, 200 µg/ml of hygromycin, and 1 µg/ml of tetracycline. *Env* expression was induced by removal of tetracycline by washing cells with PBS, and culturing for 3 days in medium without tetracycline before the fusion experiments (Cao et al., 1996). Jurkat E6-1 cells were maintained in RPMI-10.

2.3. Fluorescent dyes

Red fluorescent DiI (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate) and green fluorescent DiO (3,3'-dioctadecyloxycarbocyanine perchlorate) were obtained from Molecular Probes (Eugene, OR). Maximal excitation and emission energies are 549/565 and 484/501 nm, respectively. Stock solutions of dyes (3.5 mg/ml) were prepared in dimethylsulfoxide (DMSO) as described (Huerta et al., 2002), and stored at room temperature protected from light. DiI stock can be used for 8 months. DiO stock should be prepared fresh monthly.

2.4. Cell labeling, fusion assay, nuclei counting and cell sorting

Cell labeling was performed the day before the fusion experiments (Huerta et al., 2002). To label cells with DiI, 8 µl of a 1/10 dilution of the DiI stock solution were added to 5–15 × 10⁶ cells suspended in 1 ml of RPMI-10. After incubation for 15 min at

room temperature in the dark, cells were washed twice with 10 volumes of RPMI-10, resuspended in the same medium (adding hygromycin and G418 to transfected lines) and cultured overnight at 37 °C, with 5% CO₂. To label cells with different concentrations of DiO (from 3.9 to 132 µM), appropriate aliquots of the stock solution (from 1 to 34 µl) were added to 5–15 × 10⁶ cells suspended in 1 ml of RPMI-10, and the same procedure described for DiI labeling was performed. Fusion experiments were performed by coculturing 2 × 10⁵ cells from each fusion partner in serum-free medium (AIM-V medium, Gibco BRL). Cocultures were incubated for 5 h at 37 °C, in 5% CO₂. Wells containing anti-CD4 mAb (Pharmingen) and a coculture of labeled non-fusogenic 522F/Y and E6 cells were always included as controls for fusion inhibition and cellular aggregation, respectively. When anti-CD4 mAb was used, it was added to E6 cells before the addition of HXBc2(4) cells. After coculture, cells were collected from plates, washed once with 2 ml of PBS, and analysed immediately by FACS. Adjustment for autofluorescence was carried out using non-labeled cells, whereas single-labeled cells that had not been cocultured were used for compensation of red and green signals. Loosely aggregated cells were dissociated by gently pipetting immediately before analysis of 10,000 events in a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA) using the CellQuest software (Becton Dickinson). Fusion and cell aggregation were determined after exclusion of cell debris. Results are shown as averages of duplicates.

For nuclei counting, cells were collected from plates after coculture, washed and incubated for 15 min at 37 °C with 1.5 µM of Hoechst 33342 dye (Molecular Probes). Nuclei were counted in triple-fluorescent cells.

Sorting of FRET-positive and FRET-negative double fluorescent cells was performed in a FACSAria flow cytometer (Becton Dickinson) using the FACSDiva software (Becton Dickinson). Cells were collected in Dulbecco's phosphate buffered saline containing 10% FBS and photographed immediately.

2.5. Fusion inhibitors

T-20 peptide (Fusion inhibitor from Roche) was obtained through the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program. Preparations of peptide solutions and concentration determination were carried out as indicated by the provider. Anti-CD4 mAb (RPA-T4 clone) was purchased from BD Pharmingen (San Diego, CA).

3. Results

Coculture of HIV-1 *Env*-expressing Jurkat HXBc2 cells with Jurkat E6 cells (denoted here as Env⁺ and CD4⁺ cells, respectively) leads to cell fusion and syncytia formation, manifested by the formation of multinucleated giant cells containing different numbers of nuclei (Fig. 1). Quantification of syncytia was accomplished by labeling the fusion partners with the lipophilic probes DiO (green) and DiI (red), followed by flow cytometry analysis once fusion takes place (Huerta et al., 2002). An excellent agreement was found between the numbers of

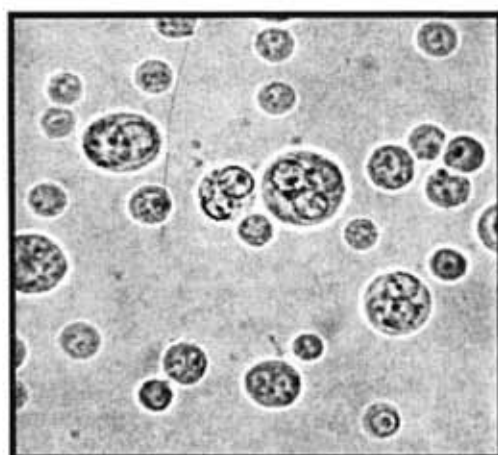


Fig. 1. Diversity of syncytia generated in cocultures of Jurkat CD4⁺ and Env⁺ cells. Magnification: 400 \times .

Table 1
Percentage of syncytia and single cells obtained by visual counting and flow cytometry

	Microscopy counting ^a	Flow cytometry ^b
Single red (CD4 ⁺)	45.1	41.3
Single green (Env ⁺)	34	36.4
Syncytia	21	20.8

^a Syncytia and single cells were identified as double and single fluorescent cells, respectively, in cocultures of DiI-CD4⁺ and DiO-Env⁺ cells. A total of 863 cells were analyzed in 58 microscope fields.

^b FACS quantitation was carried out on 10,000 events.

syncytia and unfused cells determined by microscopic counting and by flow cytometry (Table 1). Small syncytia, containing two to four nuclei, accounted for 64% of the total syncytia population. There was, however, a small population of large syncytia with nine or more nuclei (Fig. 2).

When analyzed by flow cytometry, double fluorescent cells consistently exhibited an increased red DiI fluorescence intensity relative to that of their non-fused counterparts. The enhancement of red fluorescence in syncytia was observed regardless which fusion partner was DiI-stained. Thus, in cocultures of DiI-CD4⁺ with DiO-Env⁺, and of DiO-CD4⁺ with DiI-Env⁺ cells,

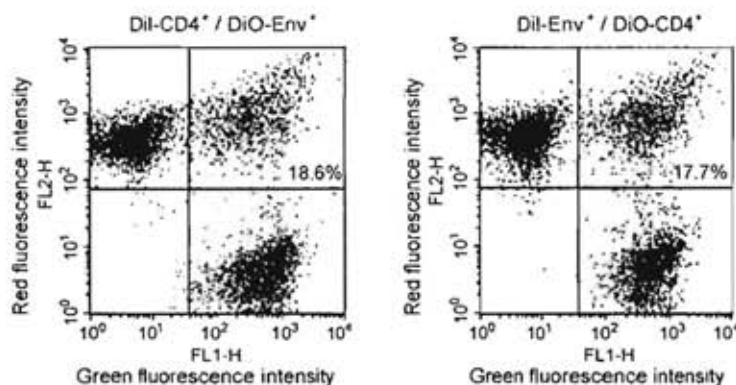


Fig. 3. FACS analysis of fusion between Env⁺ and CD4⁺ Jurkat cells labeled either with DiI (red) or DiO (green), as indicated. Note that red fluorescence in fused cells is enhanced with respect to that of the non-fused red cells regardless of the type of red-labeled cell.

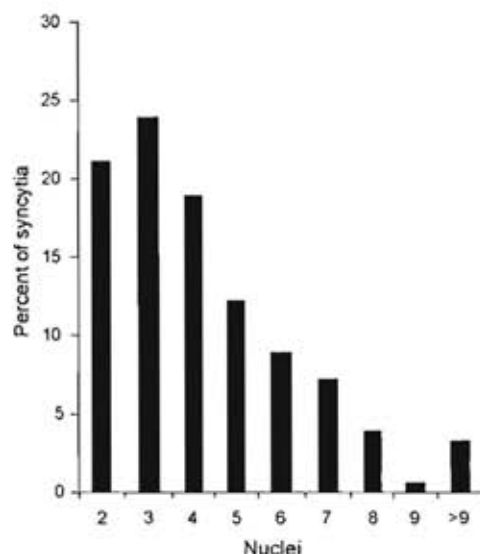


Fig. 2. Number of nuclei in syncytia formed in cocultures of DiI-CD4⁺ and DiO-Env⁺ cells. Nuclei were stained with the Hoechst 33342 dye and counted in 180 triple-fluorescent cells.

the double fluorescent particles showed an approximately three-fold increase in the average red fluorescence intensity over their red-only counterparts (Fig. 3). In both cases, the percentage of double fluorescent particles was quite similar (18.6 and 17.7%, respectively), and monoclonal antibody against CD4 diminished fusion to 3 and 2.7%, respectively (data not shown). This indicates that enhancement of red fluorescence in syncytia occurs regardless of the kind of the red-labeled cell and that fluorescent dyes do not influence the specificity of the cell fusion.

The enhancement of red fluorescence in fusion products could originate from incorporation of multiple red cells into syncytia relative to green cells, or to an energy transfer from DiO to DiI, or both. The emission spectrum of DiO and the absorption spectrum of DiI overlap extensively: DiO emission energy ranges between 480 and 650 nm, while excitation energy of DiI ranges between 450 and 585 nm (Molecular Probes, <http://www.probes.com>). Thus, fluorescence resonance energy transfer (FRET) could take place when dyes are located close

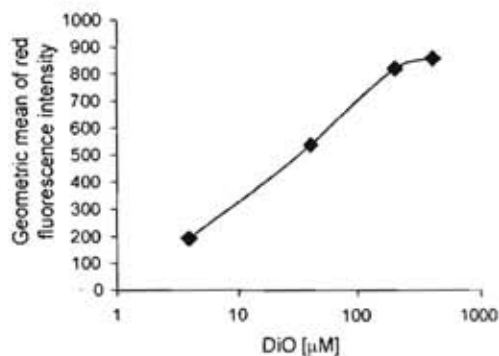


Fig. 4. Red fluorescence intensity of CD4⁺ cells labeled with 4 µM of DiI and with increasing concentrations of DiO, as indicated.

together in the same membrane compartment, increasing the red emission of DiI. To test this, DiI-labeled CD4⁺ cells were further stained with increasing concentrations of DiO and analyzed by FACS. The red DiI fluorescence intensities of double-stained cells were compared to that of DiI-CD4⁺ red-only cells. As can be seen in Fig. 4, the intensity of red fluorescence increased along with the amount of DiO incorporated, indicating FRET from DiO to DiI.

Labeling Env⁺ cells with a concentration of DiO higher than that used in experiments shown in Fig. 3 could potentiate FRET, providing a clearer distinction between fused and cellular aggregates. As shown in Figs. 5A and 6, two populations of double fluorescent cells were actually observed when DiI-labeled CD4⁺ cells were cocultured with Env⁺ cells labeled with high concentrations of DiO, ranging from 12 to 120 µM: one showing a red DiI-fluorescence enhancement, namely FRET-positive, and another with the same fluorescence intensity as non-fused cells, here denoted as FRET-negative. Incubation in the presence of an anti-CD4 mAb reduced the percentage of the FRET-positive population from 14 to 1.6% (90% inhibition) while the percentage of FRET-negative cells was not affected (Fig. 5B). When DiI-labeled CD4⁺ cells were cocultured with non-fusogenic DiO-labeled 522F/Y cells, only a small percentage of FRET-positive cells (0.4%) was detected. In this coculture, the percentage of FRET-negative particles remained 1.7% (Fig. 5C). FRET-positive and FRET-negative cells from a coculture similar to that in Fig. 5A were separated by cell sorting and examined by fluorescence microscopy; the double fluorescent FRET-positive cells consisted of syncytia, whereas, the FRET-negative population was composed of single-colored individual cells (Fig. 7). Thus, presence of FRET allows differentiation

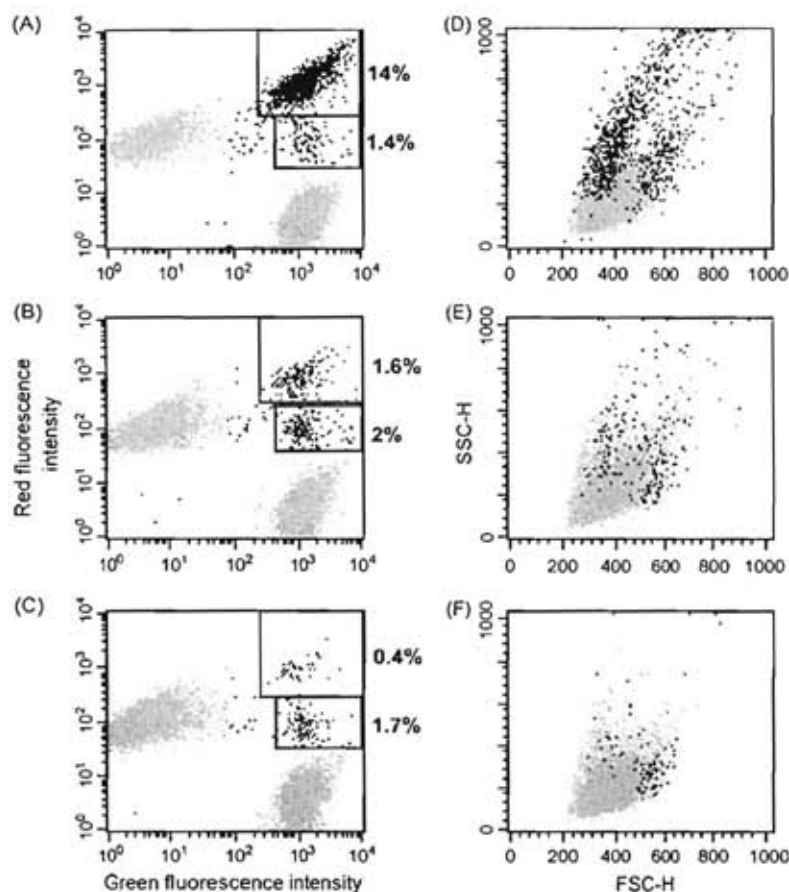


Fig. 5. Fluorescence and side vs. forward scatter profiles of FRET-positive (fused cells, upper region) and FRET-negative (cellular aggregates, lower region) in cocultures of DiI-CD4⁺ cells with: DiO-Env⁺ cells (A and D); DiO-Env⁺ cells plus 30 µg/ml anti-CD4 mAb, (B and E); and DiO-522F/Y cells (Jurkat cell carrying a non-fusogenic mutation in gp41) (C and F).

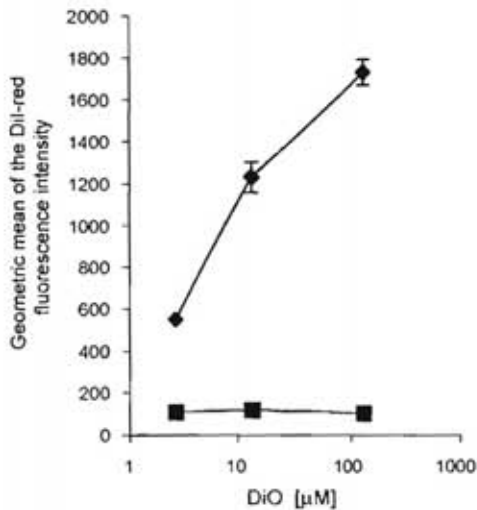


Fig. 6. Red fluorescence intensity of FRET-positive (fused cells) and FRET-negative (cellular aggregates) of double fluorescent particles generated in cocultures of DiI-CD4⁺ cells with Env⁺ cells labeled with increasing concentrations of DiO.

between fused cells and transiently aggregated cells in the flow cytometric assay. Syncytia showed an enhancement of red fluorescence intensity which positively correlated with the level of DiO incorporated in the Env⁺ cells, while red fluorescence intensity of cell aggregates was not modified (Fig. 6). The labeling of Env⁺ cells with high concentrations of DiO did not modify the percentages of fusion and aggregated cells nor the extent of inhibition by the anti-CD4 mAb (data not shown).

FRET-positive cells showed a wide distribution of size and granularity whereas the FRET-negative population only had greater size than single fluorescent cells (Fig. 5D–F). These plots also illustrate that a clear distinction between syncytia and unfused cells cannot be made on the basis of their size and granularity profiles because of the extensive overlap between fused and single cell populations caused by the high proportion of small syncytia.

Whether multiplicity of red cells in syncytia contributes to the increase in red fluorescence intensity observed was determined by fusion experiments performed with cells labeled with the

red and green cytoplasmic dyes CMTMR and CMFDA. These dyes do not give rise to FRET, since double labeling of single cells with CMTMR and increasing concentrations of CMFDA does not produce an increase of the CMTMR red fluorescence (data not shown). Simultaneous experiments performed with both cytoplasmic and lipophilic dyes, showed that the red intensity of fused cells relative to that of the respective red unfused cells is considerably higher when lipophilic DiI and DiO dyes are used (1.3 and 8.9 for cytoplasmic and lipophilic dyes, respectively). Thus, a large number of red cells in syncytia does not account for the observed increase in DiI fluorescence.

The FRET-based flow cytometry method was used to determine the sensitivity of the HIV-envelope dependent cell fusion assay to anti-CD4 mAbs and the fusion inhibitor T-20 peptide (Wild et al., 1994). T-20 strongly inhibited cell fusion with an IC₅₀ value of 1.7 nM (IC₉₀ = 9 nM). This was nearly 45 times lower than the molar concentration of the anti-CD4 mAb required to get the same level of inhibition (IC₅₀ = 75 nM, IC₉₀ > 200 nM). The percentage of cellular aggregates was not significantly affected by these compounds (Fig. 8).

4. Discussion

In FRET, the excited state energy from a donor is transferred to an acceptor fluorochrome. The increase in fluorescence intensity of the acceptor is the best indicator of FRET. The rate of energy transfer depends upon the extent of overlap of their respective emission and absorption spectra, the relative orientation of the donor and acceptor transition dipoles, and the distance between these molecules (Wu and Brand, 1994). Here it was shown that cell fusion and syncytia formation can be quantitated by flow cytometry and that the appearance of FRET is a useful criterion to distinguish true fusion from cellular aggregation. Double-labeling of a cell line with the two fluorescent lipophilic dyes DiI and DiO produced an enhancement of the DiI-red emission equal to that observed in fusion experiments, demonstrating that incorporation of DiO and DiI in the membrane of the same cell produces an energy transfer that can be detected by flow cytometry. Increasing the amount of DiO incorporated into the cell membrane produced a proportional enhancement of the DiI fluorescence in both double-labeled

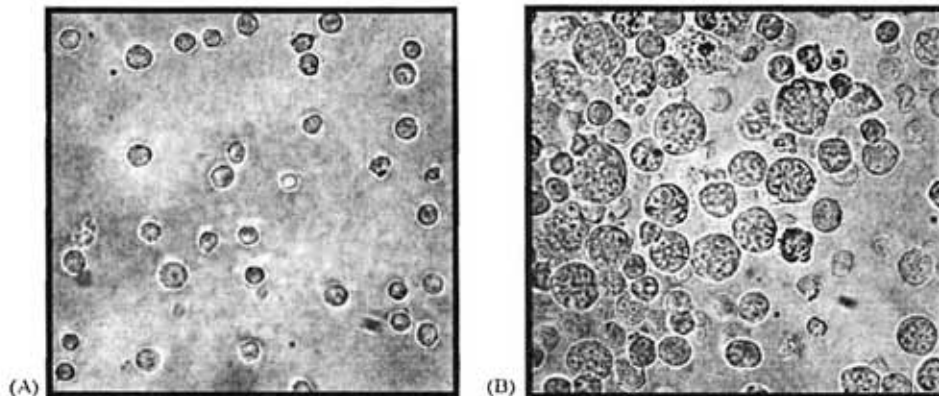


Fig. 7. Appearance of double fluorescent cells after sorting of (A) FRET-negative and (B) FRET-positive particles. Magnification: 400×.

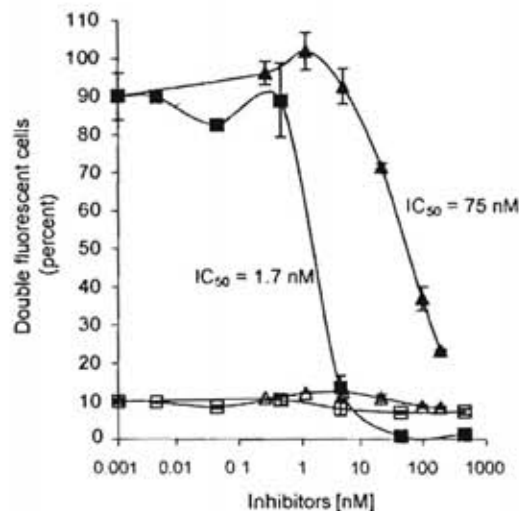


Fig. 8. Effect of the fusion inhibitor peptide T-20 (squares) and anti-CD4 monoclonal antibody (triangles) on cell fusion (solid symbols) and cellular aggregation (open symbols), as analyzed by the FRET-based flow cytometry method. Fused cells are sensitive to both inhibitors at different degrees, while aggregated cells are not appreciably affected.

single and fused cells, consistent with an increased excitation of the DiI molecule. FRET may be favored by the partition of DiI and DiO to detergent resistant microdomains in the cell membrane due to their two 18-carbon saturated fatty acid chains (Klausner and Wolf, 1980; Mukherjee et al., 1999).

The cell labeling procedure does not interfere with fusion specificity, as indicated by the fact that neither total fusion nor sensitivity to inhibition by the anti-CD4 mAb were altered by the labeling of cells with several fold increments of DiO. The small percentage of FRET-positive double fluorescent cells observed in cocultures of CD4⁺ with non-fusogenic 522F/Y cells, may be due to spontaneous fusion, a phenomenon that has been reported to occur at low levels in tumor cell lines (Duelli and Lazebnik, 2003).

The FRET-based flow cytometry method was useful to determine the inhibitory activities of an anti-CD4 mAb, which blocks the CD4 gp120-binding site (Esser et al., 2000), and the HIV gp41-binding peptide T-20, that hinders the gp41 transition to the fusogenic stage (Furuta et al., 1998). Both molecules blocked fusion in a dose dependent manner, with potencies differing by 45-fold. The IC₅₀ obtained here for the anti-CD4 mAb (RPA-T4 clone) was intermediate compared to other reported values using HeLa and CHO cells for Env-expression and reporter genes for fusion quantitation (Hong et al., 1999; Sakamoto et al., 2003). Additionally, the concentration of T-20 peptide required for cell fusion inhibition was quite similar to that required to inhibit cell fusion induced by a panel of prototypic HIV strains, as determined by counting of multinucleated giant cells (Wild et al., 1994) and monitoring of cell-to-cell transfer of a cytoplasmic dye by fluorescence microscopy (Liu et al., 2005). Thus, combination of flow cytometry and FRET provides a method with a similar degree of sensitivity compared to other current methodologies, allowing us to distinguish inhibition due to different mechanisms but with the advantages of technical simplicity and

non-ambiguous numerical quantification. Fusion efficiency can be determined (i.e., the actual percentage of syncytia in the cell population) and the study of cell population dynamics during cell fusion can be accomplished by tracking of the number of syncytia and unfused cells in a series of coculture wells analyzed successively. Furthermore, studies on the phenotypic features of both fused and unfused cells may be performed using antibodies coupled to third party fluorescent molecules. However, it is clear that homologous fusion (red–red or green–green cell fusion) cannot be detected simultaneously with heterologous fusion in this system, although it may be evaluated by coculture and FACS-analyses of cells of the same type that have been labeled with DiI and DiO.

FRET combined with flow cytometry has been applied in cellular biology to study nonrandom co-distribution of membrane proteins (Batard et al., 2002; Szöllösi and Damjanovich, 1994). In the present study, it is shown that FRET combined with flow cytometry can be used to discriminate between cell fusion and cellular aggregation.

Acknowledgments

Jurkat-HXBc2(4) and Jurkat-522F/Y from Dr. Joseph Sodroski, Jurkat Clone E6-1 cells from ATCC (Dr. Arthur Weiss), and T-20 (Fusion inhibitor from Roche), were obtained through the AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH. This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) of Mexico, grant 40413-M and Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM, grant IN231303-3. N. López-Balderas was recipient of a fellowship from CONACYT. We appreciate the help of Carlos Castellanos in cell sorting. We are indebted to Dr. Elizabeth Langley for critical review of the manuscript.

References

- Alvarez-Dolado, M., Pardal, R., Garcia-Verdugo, J.M., Fike, J.R., Lee, H.O., Pfeffer, K., Lois, C., Morrison, S.J., Alvarez-Buylla, A., 2003. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 425, 968–973.
- Andreu, K., Perfettini, J.L., Castedo, M., Métiévier, D., Scott, V., Pierrot, G., Kroemer, G., 2004. Contagious apoptosis facilitated by the HIV-1 envelope: fusion-induced cell-to-cell transmission of a lethal signal. *J. Cell Sci.* 117, 5643–5653.
- Batard, P., Szöllösi, J., Luescher, I., Cerottini, J.C., MacDonald, R., Romero, P., 2002. Use of phycoerythrin and allophycocyanin for fluorescence resonance energy transfer analyzed by flow cytometry: advantages and limitations. *Cytometry* 48, 97–105.
- Blumenthal, R., Gallo, S.A., Viard, M., Raviv, Y., Puri, A., 2002. Fluorescent lipid probes in the study of viral membrane fusion. *Chem. Phys. Lipids* 116, 39–55.
- Cao, J., Park, I.W., Cooper, A., Sodroski, J., 1996. Molecular determinants of acute single-cell lysis by human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 70, 1340–1354.
- Duelli, D., Lazebnik, Y., 2003. Cell fusion: a hidden enemy? *Cancer Cell* 3, 445–448.
- Esser, U., Speck, R.F., Deen, K.C., Atchison, R.E., Sweet, R., Goldsmith, M.A., 2000. Molecular function of the CD4 D1 domain in coreceptor-mediated entry by HIV type 1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 16, 1845–1854.

- Frankel, S.S., Tenner-Racz, K., Racz, P., Wenig, B.M., Hansen, C.H., Heffner, D., Nelson, A.M., Pope, M., Steinman, R.M., 1997. Active replication of HIV-1 at the lymphoepithelial surface of the tonsil. *Am. J. Pathol.* 151, 89–96.
- Furrer, H., Wendland, T., Minder, C., Christen, A., von Overbeck, J., Grunow, R., Pichler, W., Malinverni, R.P., 1998. Association of syncytium-inducing phenotype of HIV-1 with CD4 cell count, viral load and sociodemographic characteristics. *AIDS* 12, 1341–1346.
- Furuta, R.A., Wild, C.T., Weng, Y., Weiss, C.D., 1998. Capture of an early fusion-active conformation of HIV-1 gp41. *Nat. Struct. Biol.* 5, 276–279.
- Gabrijel, M., Repnik, U., Kreft, M., Grifc, S., Jeras, M., Zorec, R., 2004. Quantification of cell hybridoma yields with confocal microscopy and flow cytometry. *Bioch. Biophys. Res. Commun.* 314, 717–723.
- Hong, Y.L., Wu, L.H., Cui, M., McMaster, G., Hunt 3rd, S.W., Chung, F.Z., 1999. New reporter cell lines to study macrophage-tropic HIV envelope protein-mediated cell–cell fusion. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 15, 1667–1672.
- Huerta, L., Lamoyi, E., Bázquez-Saldaña, A., Larralde, C., 2002. HIV envelope-dependent cell–cell fusion: a quantitative fluorescence cytometric assay. *Cytometry* 47, 100–106.
- Klausner, R.D., Wolf, D.E., 1980. Selectivity of fluorescent lipid analogues for lipid domains. *Biochemistry* 19, 6199–6203.
- Lifson, J.D., Feinberg, M.B., Reyes, G.R., Rabin, L., Banapour, B., Chakrabarti, S., Moss, B., Wong-Staal, F., Steimer, K.S., Engleman, E.G., 1986. Induction of CD4-dependent cell fusion by the HTLV-III/LAV envelope glycoprotein. *Nature* 323, 725–728.
- Liu, S., Lu, H., Niu, J., Xu, Y., Wu, S., Jiang, S., 2005. Different from the HIV fusion inhibitor C34, the anti-HIV drug Fuzeon (T-20) inhibits HIV-1 entry by targeting multiple sites in gp41 and gp120. *J. Biol. Chem.* 280, 11259–11273.
- Melikyan, G.B., Barnard, R.J., Abrahamyan, L.G., Mothes, W., Young, J.A., 2005. Imaging individual retroviral fusion events: from hemifusion to pore formation and growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 8728–8733.
- Miedema, F., Meyaard, L., Koot, M., Klein, M.R., Roos, M.T.L., Groenink, M., Fouchier, R.A.M., Van't Wout, A.B., Tersmette, M., Schellekens, P.T.A., Shuitemaker, H., 1994. Changing virus–host interactions in the course of HIV-1 infection. *Immunol. Rev.* 140, 35–72.
- Mukherjee, S., Soe, T.T., Maxfield, F.R., 1999. Endocytic sorting of lipid analogues differing solely in the chemistry of their hydrophobic tails. *J. Cell Biol.* 144, 1271–1284.
- Ogle, B.M., Cascalho, M., Platt, J.L., 2005. Biological implications of cell fusion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 567–575.
- Raghavan, R., Cheney, P.D., Raymond, L.A., Joag, S.V., Stephens, E.B., Adany, I., Pinson, D.M., Li, Z., Marcario, J.K., Jia, F., Wang, C., Foresman, L., Berman, N.E., Narayan, O., 1999. Morphological correlates of neurological dysfunction in macaques infected with neurovirulent simian immunodeficiency virus. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 25, 285–294.
- Rucker, J., Doranz, B.J., Edinger, A.L., Long, D., Berson, J.F., Doms, R.W., 1997. Cell-cell fusion assay to study role of chemokine receptors in human immunodeficiency virus type 1 entry. *Methods Enzymol.* 288, 118–133.
- Sakamoto, T., Ushijima, H., Okitsu, S., Suzuki, E., Sakai, K., Morikawa, S., Muller, W.E., 2003. Establishment of an HIV cell–cell fusion assay by using two genetically modified HeLa cell lines and reporter gene. *J. Virol. Methods* 4, 159–166.
- Sodroski, J., Goh, W.C., Rosen, C., Campbell, K., Haseltine, W.A., 1986. Role of the HTLV-III/LAV envelope in syncytium formation and cytopathicity. *Nature* 322, 470–474.
- Struck, D.K., Hoekstra, D., Pagano, R.E., 1981. Use of resonance energy transfer to monitor membrane fusion. *Biochemistry* 20, 4093–4099.
- Szöllösi, J., Danjanovich, S., 1994. Mapping of membrane structures by energy transfer measurements. In: Danjanovich, S., Szollosi, J., Tron, L., Edidin, M. (Eds.), *Mobility and Proximity in Biological Membranes*. CRC Press Inc., Boca Raton, FL, pp. 49–108.
- Wild, C.T., Shugars, D.C., Greenwell, T.K., McDanal, C.B., Matthews, T.J., 1994. Peptides corresponding to a predictive alpha-helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 9770–9774.
- Wu, P., Brand, L., 1994. Resonance energy transfer: methods and applications. *Anal. Biochem.* 218, 1–13.