



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**PROPIEDADES FISIOLÓGICAS DE HETEROCARIONES  
FORMADOS POR LA FUSIÓN DE CÉLULAS T Y  
MACRÓFAGOS MEDIANTE LAS PROTEÍNAS DE LA  
ENVOLTURA DEL VIH**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE**

**DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

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

**M. en C. EVELYN RIVERA TOLEDO**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. CARLOS LARRALDE RANGEL**

**MÉXICO D.F., 2011**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Carlos Larralde por su asesoría durante el desarrollo de este proyecto de investigación.

A la Dra. Leonor Huerta por su apoyo, comentarios y sugerencias durante el desarrollo y publicación del presente trabajo.

Al Dr. Edmundo Lamoyi, miembro del comité tutorial, por sus comentarios acertados y sugerencias.

Al Dr. Ricardo Lascurain, miembro del comité tutorial, por sus comentarios enriquecedores al presente trabajo.

A la Bióloga Patricia Espinosa Cueto por su asesoría para el cultivo óptimo de las células THP-1.

Al Q.F.B. Carlos Castellanos por su apoyo técnico para realizar la separación de poblaciones celulares mediante citometría de flujo.

Al Dr. Guillermo Gómez Icazbalceta por sus comentarios a la presente tesis.

A CONACYT por la beca 204870

Al jurado de examen de grado:

Presidente	Dra. Beatriz Gómez García
Vocal	Dr. Luis Enrique Soto Ramírez
Vocal	Dra. Laura Cecilia Bonifaz Alfonzo
Vocal	Dr. Luis Padilla Noriega
Secretario	Dr. Carlos Larralde Rangel

## **DEDICATORIA**

A Dios, por la fuerza que me infunde cada día.

A mis padres Javier Rivera y Guadalupe Toledo, al mismo tiempo que a mis hermanos Martín, Rosy, Angie, Javier y Mario por su apoyo, confianza y amor.

A mis cinco sobrinos por hacerme sonreír

A mis amigos de la Facultad de Química y al M. en C. Ernesto Acosta por su amistad incondicional.

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

# ÍNDICE

<b>I. Resumen</b> .....	7
<b>II. Introducción</b> .....	8
2.1 Generalidades.....	8
2.2 Estructura del VIH.....	9
2.3 Ciclo de replicación .....	11
2.4 Proteínas de la envoltura viral gp120/gp41 .....	12
2.5 Mecanismo de fusión de membranas.....	14
2.6 Células susceptibles a la infección por el VIH.....	15
2.7 Fusión célula-célula <i>in vitro</i> .....	17
2.8 Fusión celular <i>in vivo</i> .....	18
2.9 Fusión celular mediada por las proteínas Env y su relación con el desarrollo del SIDA.....	19
2.10 Características de las células multinucleadas.....	21
2.11 Antecedentes sobre el estudio de la fusión homotípica mediante la técnica de citometría de flujo.....	22
<b>III. Planteamiento del Problema</b> .....	24
<b>IV. Preguntas</b> .....	24
<b>V. Objetivos</b> .....	25
5.1 Objetivo general.....	25
5.2 Objetivos particulares.....	25
<b>VI. Materiales y Métodos</b> .....	26
6.1 Líneas celulares.....	26
6.2 Cultivo celular.....	27

6.3 Inducción de la expresión de proteínas Env.....	27
6.4 Tinción celular .....	28
6.5 Ensayo de fusión celular e inhibición de la fusión .....	28
6.6 Análisis por citometría de flujo .....	29
6.7 Análisis de la expresión de receptores (fenotipo).....	29
6.8 Cálculo de la estequiometría de la fusión.....	30
6.9 Análisis de la viabilidad celular .....	31
6.10 Microscopía de fluorescencia.....	31
6.11 Enriquecimiento de la población de heterocariones mediante citometría de flujo y estimulación con PMA-ionomicina.....	32
6.12 Análisis estadístico.....	32
<b>VII. Resultados.....</b>	<b>33</b>
7.1 Análisis por citometría de flujo de la fusión linfocito-monocito, inducida por las proteínas Env del VIH-1 .....	33
7.1.1 Formación de células doble fluorescentes con alta complejidad citoplásmica.....	33
7.1.2 Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) en la población de células doble fluorescentes.....	36
7.2 Detección de heterocariones por microscopía de fluorescencia.....	38
7.3 Efecto de inhibidores de la fusión celular mediada por las proteínas Env del VIH-1 sobre la formación de heterocariones .....	38
7.4 Viabilidad de los heterocariones.....	40
7.5 Composición celular de los heterocariones.....	41
7.6 Análisis de la expresión de receptores.....	43
7.7 Respuesta de los heterocariones al estímulo con PMA-ionomicina.....	46
7.8 Cambios morfológicos en los cocultivos donde ocurre la formación de los heterocariones.....	47

<b>VIII. Discusión de resultados</b> .....	49
8.1 Evidencia de la fusión heterotípica linfocito-monocito <i>in vitro</i> , mediada por las proteínas Env del VIH-1.....	49
8.2 Fenotipo de los heterocariones linfocito-monocito .....	51
<b>IX. Conclusiones</b> .....	54
<b>Apéndices</b> .....	55
<b>Referencias</b> .....	57
<b>Artículos publicados</b> .....	71

## ABREVIATURAS

7-AAD	7-amino-actinomicina D
APC	Fluorocromo alofocianina
Células NK	Células asesinas naturales
Dil	Perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametil-indocarbocianina
DiO	Perclorato de 3,3'-dioctadecil-oxacarbocianina
Env	Complejo de proteínas virales, gp120/gp41, expresadas en la envoltura del VIH
FRET	Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia.
FSC-H	Dispersión frontal de un haz de luz al incidir sobre una partícula.
IFM	Índice de fluorescencia media
kDa	Kilodalton
PKC	Enzima proteína cinasa C
PMA	Forbol 12-miristato-13-acetato, activador de la enzima PKC
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SNC	Sistema nervioso central
SSC-H	Dispersión lateral de un haz de luz al incidir sobre una partícula.
TNF-alfa	Factor de necrosis tumoral alfa
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana

## I. RESUMEN

Las células infectadas por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) expresan en su membrana a las proteínas virales gp120/gp41 (Env), lo que les permite interactuar y fusionarse con células CD4<sup>+</sup> generando células multinucleadas o policariones. Se ha reportado de manera frecuente, la presencia de células multinucleadas en el tejido linfoide y en el sistema nervioso central de pacientes infectados por el virus. Sin embargo, aún no se ha definido la composición celular y el papel que desempeñan las células multinucleadas en la patogénesis del SIDA. En el presente trabajo, se reporta evidencia de la fusión heterotípica linfocito-monocito *in vitro*, en cocultivos entre células T Jurkat que expresan a las proteínas Env del VIH y monocitos CD4<sup>+</sup> de la línea celular THP-1. A través de un método caracterizado previamente, basado en la tinción de las células Env<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> con colorantes fluorescentes en verde y rojo, respectivamente, se encontró que los cocultivos entre ambos tipos de células generan hasta un 20% de células doble fluorescentes después de 48 horas de incubación. Esta población doble fluorescente es producto de la fusión linfocito-monocito y no de la fagocitosis de células T por parte de los monocitos, ya que no se genera cuando el cocultivo se lleva a cabo con células T que expresan una mutante no fusogénica de las proteínas Env. Además, la formación de heterocariones es inhibida por un anticuerpo monoclonal dirigido contra el receptor CD4 y por el péptido sintético T-20 que inhibe la fusión dependiente de Env, indicando que la fusión es mediada por la molécula CD4 y por las proteínas virales gp120/gp41. El 50% de los heterocariones mantuvo su viabilidad después de 4 días de cocultivo, mientras que la población restante incorporó los reactivos 7-amino-actinomicina D y Anexina V, indicando su muerte por apoptosis.

Por otro lado, se estudió la expresión de moléculas características de ambos linajes celulares, tales como CD3 y CD28 como marcadores linfoides, así como CD4, CD32 y CD68 como marcadores expresados por los monocitos. Los resultados mostraron que el receptor CD4 es apenas detectado en la membrana de los heterocariones y que la expresión de los marcadores linfoides CD3 y CD28 se reduce de manera importante. En cambio, la expresión de los marcadores mieloides CD32 y CD68 se mantiene constante. Asimismo, se observó que el tratamiento con PMA y ionomicina es capaz de inducir la expresión de CD25 en un 87% de células T Env<sup>+</sup> no fusionadas, mientras que únicamente el 22% de los heterocariones conserva la capacidad para responder frente a este estímulo de activación, a pesar de que se encuentran principalmente formados por células T. Estos resultados sugieren que la fusión linfocito-monocito podría ocurrir *in vivo* durante la infección por el VIH. Sin embargo, la identificación de las células multinucleadas como heterocariones podría verse limitada debido a la expresión predominante del fenotipo mieloides, evitando de esta manera, conocer la importancia y contribución de la fusión heterotípica en el daño a la funcionalidad de las células T CD4<sup>+</sup>.

## II. INTRODUCCIÓN

### 2.1. Generalidades

El síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) fue descrito por primera vez en 1981 en las ciudades de Nueva York y Los Ángeles, al presentarse un elevado número de casos de sarcoma de Kaposi y de neumonías ocasionadas por *Pneumocystis carinii* en individuos jóvenes sin antecedentes previos de enfermedades asociadas con inmunosupresión (Quagliarello, 1982; Jaffe et al., 1983). Las lesiones cutáneas por sarcoma de Kaposi eran generalizadas y más agresivas que las lesiones típicas detectadas en pacientes de la tercera edad, reduciendo el tiempo de sobrevivencia a menos de 20 meses. Además, se observaban casos frecuentes de resistencia al tratamiento contra *Pneumocystis carinii* con los fármacos de primera línea, así como coinfecciones con microorganismos oportunistas (Quagliarello, 1982; Jaffe et al., 1983). En todos los casos, el perfil inmunológico de los pacientes mostraba una deficiencia importante en la capacidad proliferativa de las células linfoides en respuesta a mitógenos, una reducción de hasta el 80% en la cuenta de células T cooperadoras CD4+, así como un estado de anergia en las células T de memoria (Hersh et al., 1984). Este daño en el sistema inmunológico explicaba la susceptibilidad a los patógenos oportunistas y a las neoplasias que provocaban una tasa de mortandad de alrededor del 40% en los casos detectados durante los dos primeros años de la epidemia (Quagliarello, 1982). En 1983, un grupo multidisciplinario de investigadores del Instituto Pasteur identificó al agente causal del síndrome como un retrovirus con tropismo por linfocitos T, al que más tarde se le denominó virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Barre-Sinoussi et al., 1983).

A treinta años de los primeros casos del SIDA, la epidemia por el VIH continúa siendo uno de los principales problemas de salud pública, dado el incremento continuo en el número total de personas que viven infectadas con el virus a nivel mundial. Los últimos datos epidemiológicos reportados por el Programa Conjunto sobre VIH/SIDA de las Naciones Unidas y la Organización Mundial de la Salud (UNAIDS epidemic update, 2009), indican que actualmente existen 33.4 millones de personas infectadas por el VIH alrededor del mundo, lo que representa un incremento del 14% con respecto al año 2001. El reciente acceso al tratamiento antirretroviral en algunas comunidades de alta incidencia, ha logrado avances en la prevención de nuevas infecciones y en la reducción del número de muertes anuales relacionadas con SIDA. Sin embargo, en la región del África sub-Sahariana, que contribuye con el 67% de los casos totales de infección por el VIH (22.4 millones), únicamente tres millones de personas tienen acceso a los fármacos antiretrovirales. De esta manera, aunque la terapia farmacológica ha favorecido la reducción en el número de nuevos casos, así como prolongado y

mejorado la calidad de vida de los pacientes, su limitado acceso a comunidades de bajo ingreso económico y su ineficacia para eliminar definitivamente al virus, hacen imprescindible encontrar nuevas estrategias para solucionar el problema de infección por el VIH.

Una parte importante de la investigación sobre el VIH/SIDA se encuentra enfocada en el estudio de las proteínas virales y sus receptores celulares como mediadores de la interacción virus-hospedero, con el propósito de entender los mecanismos de patogénesis y los posibles blancos de intervención terapéutica (Stevenson, 2003). A partir de estos estudios, se sabe que las glicoproteínas de la envoltura viral gp120/gp41 o Env, además de permitir el ingreso del virus al citoplasma mediante la fusión de las membranas viral y celular, tienen un papel relevante en los efectos citopáticos observados *in vitro* en cultivos de células T CD4<sup>+</sup>, particularmente por la formación de células multinucleadas o policariones (fig. 1) (Lifson et al., 1986a y b; Sodroski et al., 1986; Sylwester et al., 1997). Asimismo, se ha encontrado que la actividad fusogénica de estas glicoproteínas, correlaciona de manera directa con la pérdida acelerada de células T CD4<sup>+</sup> *in vivo* y la progresión hacia el SIDA (Karlsson et al., 1994; Koot et al., 1993). Estudios histológicos han revelado que el tejido linfoide de los individuos infectados está particularmente afectado en cuanto a su estructura y a la presencia irregular de células multinucleadas. El daño en la estructura de los ganglios linfáticos es característica de los estados avanzados de infección y se ha vinculado recientemente con la pérdida progresiva de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y a mecanismos anormales de deposición de colágena y fibrosis (Stevenson 2003; Estes et al., 2008). En cuanto al papel y la composición de las células multinucleadas detectadas *in vivo*, son pocos los estudios orientados para evaluar estos aspectos sin embargo, por los hallazgos mencionados, se ha sugerido que la fusión celular podría contribuir como uno de los mecanismos daño celular durante la infección por el VIH.

En las siguientes secciones se describen algunos aspectos relacionados con la estructura y función del VIH, enfocados hacia el entendimiento del proceso de fusión de membranas inducida por las proteínas de la envoltura viral y sus posibles implicaciones como mecanismo de daño celular.

## **2.2. Estructura del VIH**

El virus de la inmunodeficiencia humana se encuentra clasificado dentro la subfamilia *Lentivirinae* de la familia *Retroviridae*. (Haase, 1986). Los lentivirus son caracterizados por establecer períodos prolongados de infección antes de que los hospederos manifiesten síntomas clínicos. En el

caso del VIH, se ha encontrado que los individuos afectados pueden tardar un promedio de 10 años antes de mostrar síntomas clínicos del SIDA (Barker et al., 1998).

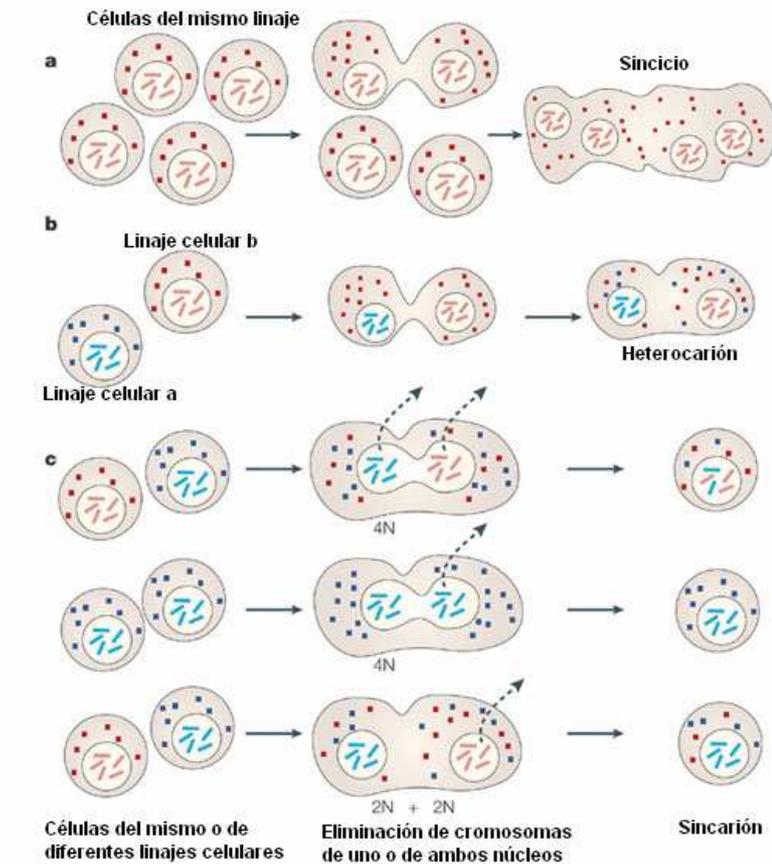


Figura 1. Tipos de células producidas por fusión. La fusión celular origina células denominadas de manera general como policariones o células multinucleadas. De acuerdo al linaje celular o al contenido de cromosomas se pueden clasificar en: a) Sincicios, cuando se fusionan células del mismo linaje, b) heterocariotes, cuando se fusionan células de diferentes linajes, c) sincariotes, cuando la fusión entre células del mismo o de diferente linaje produce una célula con un solo núcleo. Los sincariotes se pueden generar por la eliminación de un núcleo completo, o bien, por la fusión entre los núcleos y la subsiguiente eliminación de cromosomas. Figura tomada de Ogle et al., 2005.

El genoma del VIH consta de dos cadenas idénticas de RNA de cadena sencilla con polaridad positiva y se encuentra como un complejo de ribonucleoproteínas dentro de la cápside, aunado a las enzimas proteasa, integrasa y transcriptasa inversa (fig. 2). La proteína viral p17 se ensambla en una estructura denominada matriz que rodea a la cápside y mediante un dominio miristilado se inserta en la parte interna de la bicapa lipídica que recubre finalmente al virus. La membrana viral presenta el

trímero de glicoproteínas gp120/gp41 en forma de espículas, que participa durante el proceso de reconocimiento e infección de la célula hospedera (Haseltine, 1991; Wang et al., 2000).

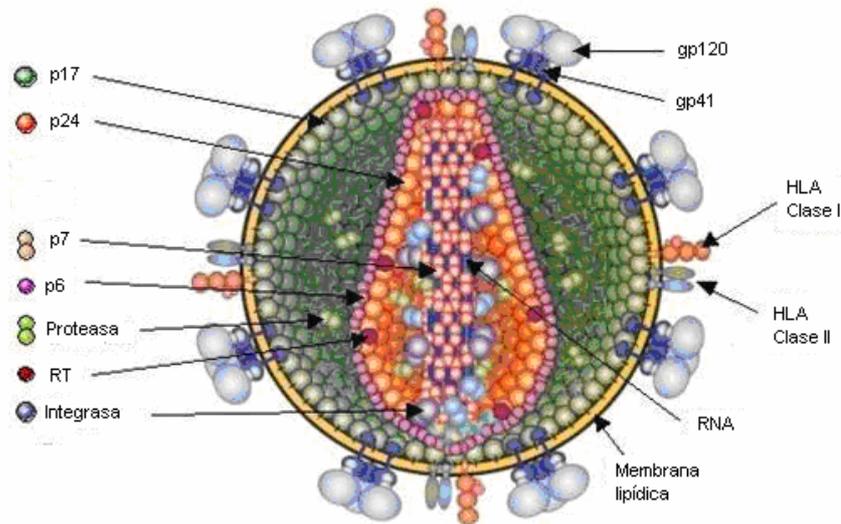


Figura 2. Estructura del virus de la inmunodeficiencia humana. Se ha reportado que en la envoltura viral además de localizarse a las proteínas gp120/gp41, se han encontrado proteínas provenientes de la célula hospedera, tales como ICAM-1 y HLA I y II.

### 2.3. Ciclo de replicación

El ciclo de replicación del VIH puede ser visto como una secuencia de pasos regulados por la interacción entre proteínas virales y celulares. Inicialmente, la proteína viral gp120 reconoce al receptor primario CD4 y a un correceptor que puede ser CXCR4 o CCR5 en la membrana de la célula hospedera (Haseltine, 1991). Esta interacción promueve cambios conformacionales tanto en gp120 como en gp41 favoreciendo el acercamiento, contacto y fusión de las membranas viral y celular, permitiendo el acceso del virus a la célula (Fig. 3). En el ambiente citoplásmico, la estructura de la cápside es conservada durante la transcripción inversa del RNA que genera el DNA viral de doble cadena (Arhel et al., 2007). A lo largo de este proceso, la cápside es transportada por la actina y la red de microtúbulos hacia la vecindad de la membrana nuclear en donde ocurre la disociación de las proteínas p24, liberando al complejo de preintegración cuya composición, aunque aún no bien definida, consta principalmente del DNA viral, las proteínas p6, p17, Vpr y las tres enzimas virales (Suzuki 2007). Las secuencias de localización nuclear presentes en las proteínas p17 e integrasa, favorecen el uso de

la maquinaria celular para el transporte del complejo hacia el interior del núcleo (Bukrinskaya, 2007), permitiendo la interacción del DNA del VIH con el genoma de la célula hospedera y su integración predominante en regiones no codificantes de genes transcripcionalmente activos (Han et al., 2004; Schröder et al., 2002). Posteriormente, los mRNA virales son traducidos para generar proteínas que son ensambladas en nuevos virus a nivel de la membrana plasmática, particularmente en regiones ricas en colesterol (balsas lipídicas) (Nguyen and Hildreth, 2000). Finalmente, los virus son liberados mediante un proceso similar al de exocitosis en el que la proteína viral p6 interacciona con proteínas del tráfico vesicular como ESCRT y AP-1 (Bukrinskaya, 2007), dando lugar a virus recubiertos por un fragmento de la membrana de la célula hospedera.

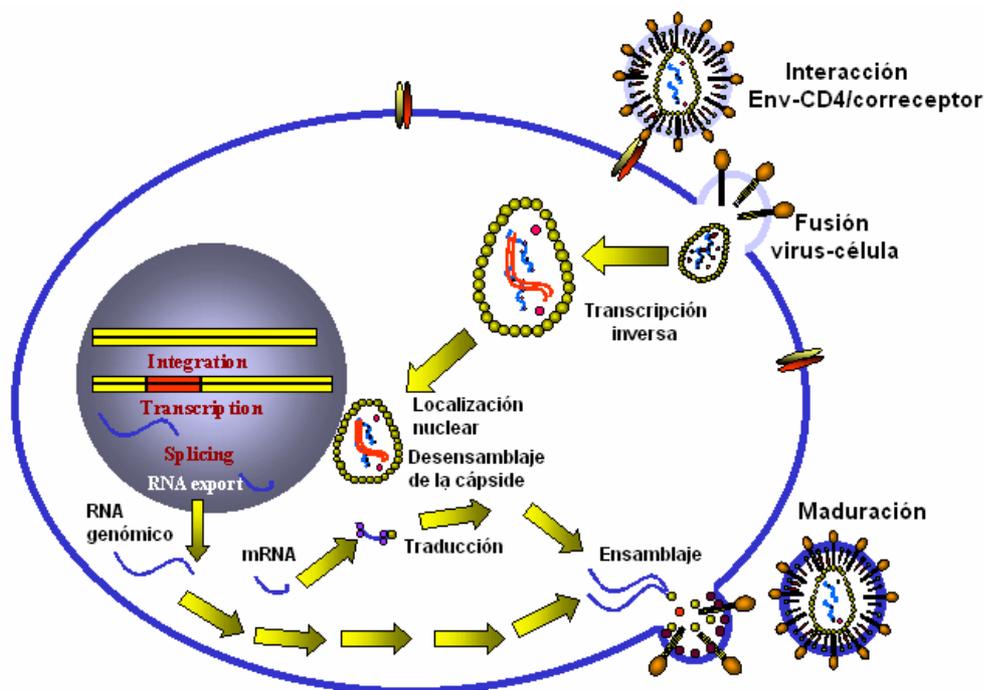


Figura 3. Ciclo de replicación del VIH. Ver texto.

#### 2.4. Proteínas de la envoltura viral gp120/gp41

Las proteínas de la envoltura viral gp120/gp41 tienen un papel esencial durante la etapa inicial del proceso de infección y son codificadas por el gen *env* como una proteína precursora de 88 kDa. Dentro del retículo endoplásmico, el precursor es sujeto a N-glicosilación en los residuos de asparagina contenidos en los motivos Asn-X-Ser y Asn-X-Thr (Scanlan et al, 2007), adquiriendo una masa

aparente de 160 kDa (gp160). Estudios bioquímicos han demostrado que dentro del retículo endoplásmico, la gp160 adquiere la conformación que la hace competente para interactuar con el receptor CD4 y más tarde se oligomeriza principalmente en trímeros (Earl et al., 1991; Center et al., 2002). En su forma trimérica, la glicoproteína es transportada hacia el aparato de Golgi (Earl et al, 1991), donde enzimas de la familia de las convertasas catalizan su escisión en las subunidades gp120 y gp41, que se mantienen asociadas por interacciones de tipo no covalentes (Kido et al., 1993). Finalmente, el complejo es transportado hacia la membrana plasmática donde la gp41 se encuentra como una proteína transmembranal, asociada con la subunidad de superficie gp120 (Moulard and Decroly, 2000).

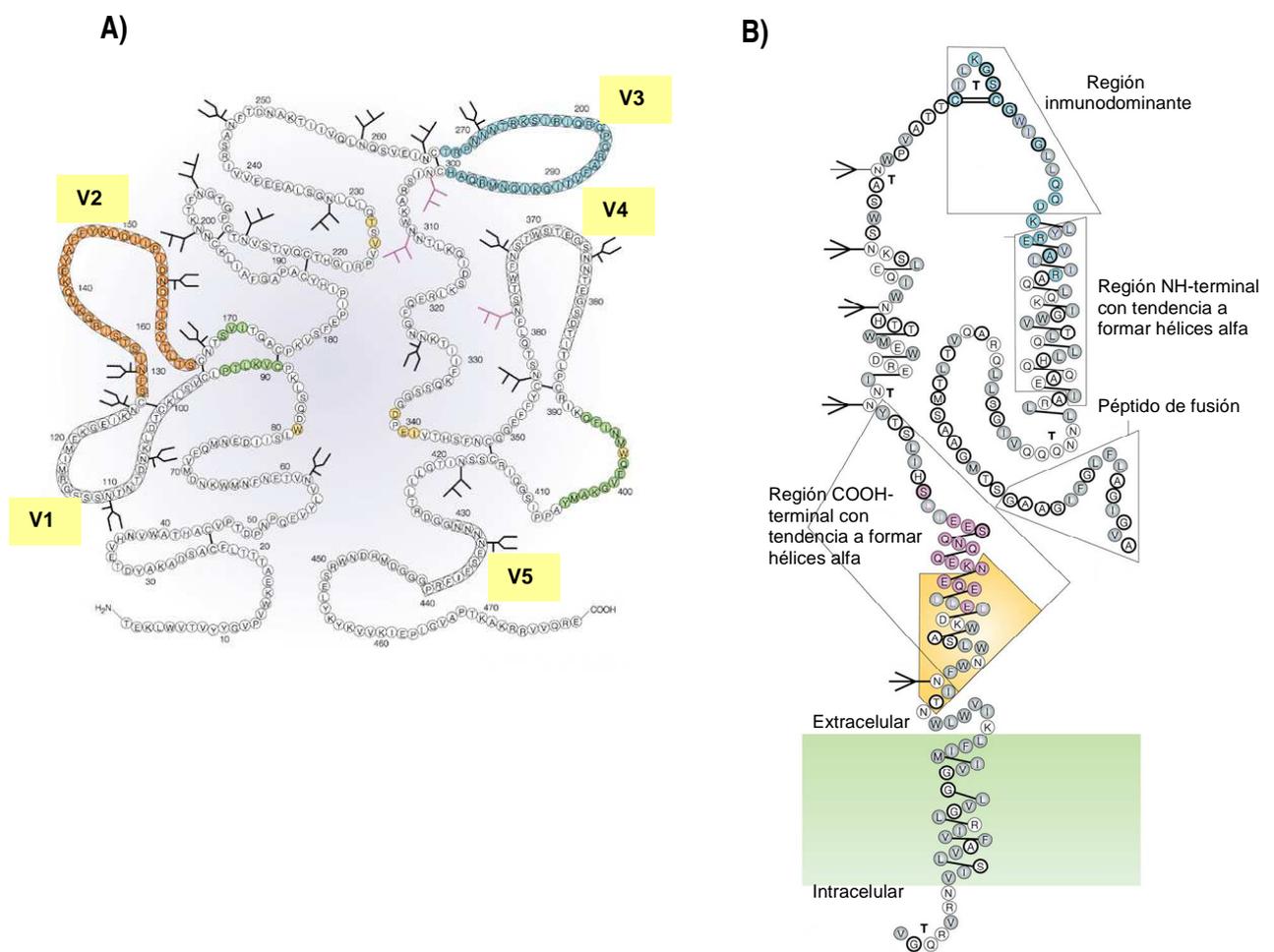


Figura 4. Estructura de las proteínas de la envoltura del VIH, A) gp120 y B) gp41. Se muestran las regiones de alta variabilidad de la gp120 y los sitios de unión a carbohidratos como la manosa (ramificaciones en negro). Asimismo, se señalan las principales regiones en la estructura de la gp41 que participan en el proceso de fusión de membranas (ver texto). Figura tomada de Zolla-Pazner, 2004.

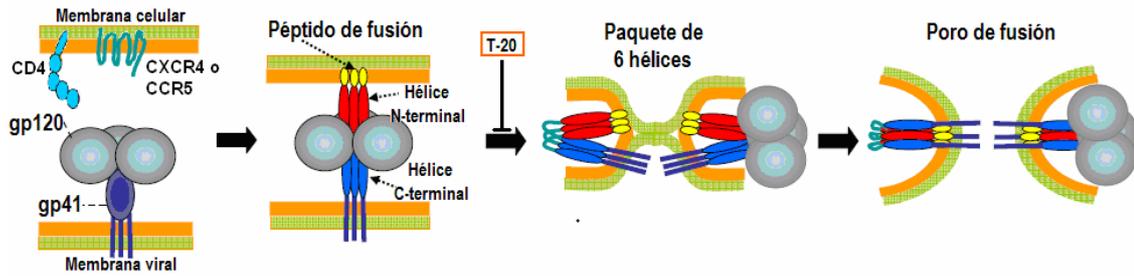
El análisis estructural de las proteínas de la envoltura indica que gp120 se encuentra organizada en cinco regiones altamente variables entre cepas virales V1-V5 (fig. 4A), interespaciadas

con cinco regiones constantes C1-C5 (Leonard et al., 1990; Rizzuto et al., 1998; Zolla-Pazner, 2004). En tanto, la estructura de gp41 consta de una región extracelular o ectodominio, una región transmembranal y un dominio citoplásmico (fig. 4B). El extremo N-terminal de la región extracelular de gp41 cuenta con una secuencia rica en aminoácidos hidrofóbicos denominada péptido de fusión, la cual es seguida por un dominio con motivos de aminoácidos con tendencia a formar hélices alfa del tipo “abcdefg”, en donde las posiciones “a” y “d” corresponden a residuos hidrofóbicos. Un segundo dominio helicoidal del mismo tipo se localiza en la región C-terminal del ectodominio (Eckert and Kim, 2001).

## **2.5. Mecanismo de fusión de membranas**

El primer evento que activa a las proteínas Env para fusionar las membranas viral y celular, consiste en la interacción del trímero de gp120 con su receptor primario, CD4 (fig. 5A). Estudios por cristalografía de rayos X han mostrado que CD4 se asocia a una cavidad dentro de gp120 donde se establecen interacciones electrostáticas e hidrofóbicas con aminoácidos de varios dominios (Kwong et al., 1998), induciendo cambios en la conformación de la proteína viral. El uso de anticuerpos monoclonales ha permitido determinar que el sitio de unión al correceptor se localiza en la región V3 de gp120 y se expone o forma, después de la interacción con CD4 (Gallo et al., 2003). La unión al correceptor promueve cambios conformacionales adicionales en la estructura trimérica de gp41, exponiendo al péptido de fusión que, por su carácter hidrofóbico, se inserta en la membrana de la célula hospedera formando un puente con la membrana viral. Este intermediario expone a las hélices N-terminales y a las C-terminales del trímero de gp41 en una conformación extendida que posteriormente sufre un colapso hasta formar un paquete de 6 hélices que acerca a las membranas (Chernomordik and Kozlov, 2008; Melikyan, 2008). Existe evidencia de la formación de un estado de “hemifusión” en donde de manera reversible, interaccionan únicamente las capas externas de las membranas (Fig. 5B., Melikyan et al., 2005). La expansión lateral de los lípidos en contacto permite que las capas internas interaccionen entre sí formando un diafragma, que con el avance de la mezcla de los lípidos, se rompe hasta crear un poro que permite el ingreso de la cápside viral a la célula (fi. 5A).

**A)**



B)

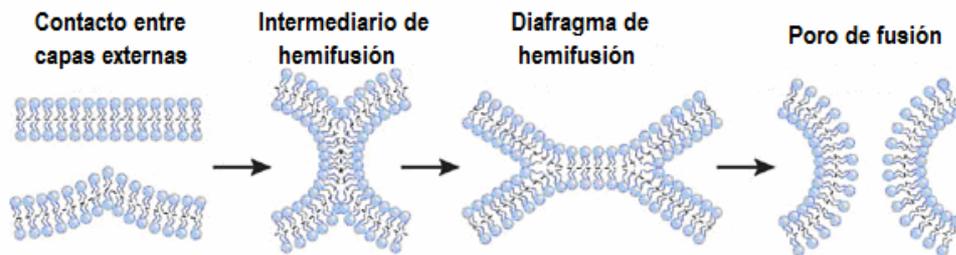


Figura 5. A) Mecanismo de fusión de membranas inducido por las proteínas de la envoltura del VIH, gp120/gp41. Péptidos sintéticos análogos a las secuencias de las hélices alfa amino- y carboxilo-terminales (como el T-20), son capaces de unirse a estas regiones e inhibir el progreso de la fusión. B) Estado intermedio durante el proceso de fusión de membranas (hemifusión) en el que únicamente interactúan las membranas externas de las bicapas lipídicas. Figuras modificadas de Melikyan, 2008; Chernomordik and Kozlov, 2008.

La fusión de membranas inducida por las proteínas gp120/gp41 es susceptible a la inhibición por los anticuerpos anti-gp120, anti-gp41 y/o anti-CD4. Adicionalmente, existen péptidos sintéticos análogos a las regiones helicoidales N- y C-terminales de gp41 (T-20 y C34) que son capaces de bloquear la formación del paquete de 6 hélices que acerca a las membranas (Jacobs et al., 2008). Por lo tanto, estos péptidos son capaces de inhibir la infección de células en cultivo y como en el caso del T-20 (Enfuvirtide), pueden ser utilizados durante el tratamiento antirretroviral en pacientes infectados.

## 2.6. Células susceptibles a la infección por el VIH

La susceptibilidad de las células a la infección por el VIH depende de la expresión de la molécula CD4 y de receptores para quimiocinas que participan como correceptores obligados (Broder and Collman, 1997), principalmente CXCR4 (Feng et al., 1996) y CCR5 (Alkhatib et al., 1996). Los

aislados virales han sido clasificados de acuerdo al uso del correceptor en virus X4, dependientes de CXCR4, y virus R5, dependientes de CCR5. Algunas cepas son denominadas X4/R5 por su capacidad para utilizar ambos correceptores, mientras que otras pueden utilizar a las moléculas CCR3 y CCR2 de manera alternativa a CCR5 (Doranz, 1996).

Inicialmente se consideró que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> eran el blanco principal del VIH, dada la reducción selectiva de esta población celular en los individuos infectados. Sin embargo, se observó la capacidad del virus para infectar cultivos de células de origen mieloide, como monocitos/macrófagos y células dendríticas (Collmann et al., 2003; Roy and Wainberg, 1988) aunque estas últimas no siempre son competentes para establecer una infección productiva, posiblemente debido a la expresión de moléculas tipo lectina (ej. la Langerina) que capturan y conllevan a la degradación del virus dentro de organelos citoplásmicos (De Witte et al., 2007)

El análisis de la expresión de los receptores virales ha mostrado que los correceptores se expresan diferencialmente entre las poblaciones linfoides. Por ejemplo, los linfocitos vírgenes CD4<sup>+</sup>/CD45RA<sup>+</sup>, expresan principalmente CXCR4, mientras que los linfocitos de memoria CD4<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup>, expresan CCR5 (Bleul et al., 1997) y son susceptibles a la infección por virus X4 o R5, respectivamente. Por otro lado, los monocitos/macrófagos pueden expresar hasta 6 veces menos cantidad del receptor CD4 con respecto a las células linfoides (Lee et al., 1999), sin embargo, se mantienen susceptibles a la infección por virus R5 siempre y cuando tengan suficientes niveles de CCR5, ya que si la expresión del correceptor se reduce, la infectividad se torna altamente dependiente de CD4 (Platt et al., 1998). Estas observaciones realizadas en cultivos celulares, son congruentes con hallazgos de la infección diferencial de células linfoides y mieloides CD4<sup>+</sup> en tejidos de pacientes infectados por el VIH (Roy and Wainberg, 1988; Margolis et al., 1999; Stevenson and Gendelman, 1994).

Por otra parte, se han detectado variantes del VIH en individuos que se encuentran en etapas avanzadas de la infección, que son capaces de establecer infecciones productivas en células con baja o nula expresión de CD4 (Repits et al., 2008), incluyendo células B (Malkovský et al., 1988), microglía (Antinori et al., 2001), células NK (Chehimi et al., 1991), células epiteliales (Howell et al., 1997), entre otras. La infección productiva de células epiteliales de intestino que no expresan CD4, podría ser mediada por galactosilceramida, molécula propuesta como receptor primario alternativo para el virus (Fantini et al., 1993).

## 2.7. Fusión célula-célula *in vitro*

Estudios tempranos realizados en cultivos de células mononucleares de sangre periférica (Klatzmann et al., 1984) o en líneas de células T (Lifson 1986a), reportaron la formación de células multinucleadas o sincicios, como una manifestación característica de la citopatología inducida por el VIH (Lifson et al., 1986a y b). Esta capacidad es dada por la expresión de las proteínas Env en la membrana de la célula infectada (Lifson et al., 1986a), lo que le permite interactuar y fusionarse con células vecinas CD4<sup>+</sup>/correceptor<sup>+</sup>, a través de un mecanismo similar al de fusión virus-célula (fig 6). La incorporación de células sanas en los sincicios infectados y la muerte de estos últimos en períodos cortos de tiempo que van desde las 24 a las 96 horas, ha sugerido que la fusión inducida por las proteínas Env contribuye con la pérdida característica de los linfocitos CD4<sup>+</sup> en los individuos infectados por el VIH (Lifson et al., 1986a; Sylwester et al., 1997). Sin embargo, el tiempo de vida de los sincicios *in vitro* parece ser dependiente del linaje celular y de las condiciones del cultivo, ya que a diferencia de los linfocitos T, las células multinucleadas formadas a partir de células de origen mieloide (macrófagos y microglía), pueden permanecer viables y con una producción viral activa aún después de 2 meses de infección (Loannidis et al., 1995; Kornbluth et al., 1989; Gendelman et al., 1988).

Estudios realizados por Castedo y cols., han mostrado que la apoptosis es el mecanismo principal de muerte de las células multinucleadas formadas en cultivos celulares infectados por el VIH (Castedo et al., 2003; Perfettini et al., 2005). Se ha detectado que en un 50% de los sincicios ocurre la fusión entre núcleos como consecuencia de la interrupción de la mitosis. La inhibición del progreso del ciclo celular conlleva a la activación de cinasas que fosforilan al factor de transcripción p53, que tiene como blanco genes que codifican proteínas promotoras de la apoptosis por la ruta mitocondrial, tales como Bax y Puma (Ferri, et al., 2000a y b; Perfettini et al., 2005). La viabilidad prolongada de las células multinucleadas provenientes de la fusión entre macrófagos y microglía, podría deberse a su baja capacidad de división por mitosis, puesto que son células terminalmente diferenciadas (Hassan et al., 1994).

La interacción célula-célula mediada por gp120/gp41 puede no resultar en la fusión de las células involucradas, sino solo en contactos intercelulares reversibles (Ruggiero et al., 2008) a través de los cuales también puede llevarse a cabo la transmisión del virus, evitando su exposición al ambiente extracelular.

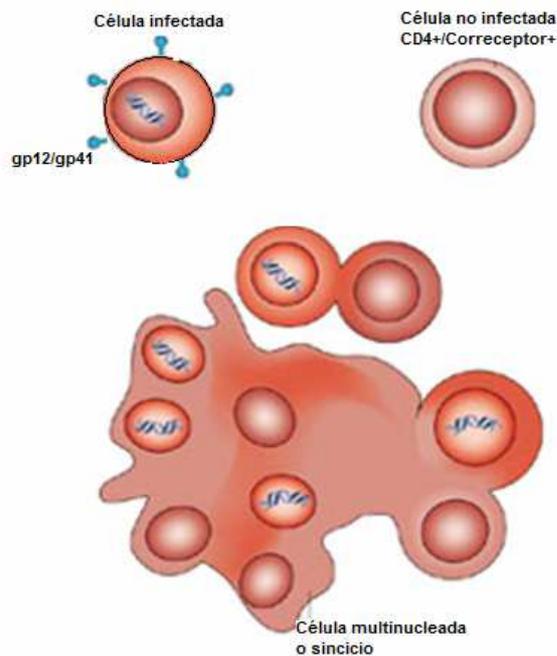


Figura 6. Fusión entre células infectadas por el VIH y células no infectadas que expresan CD4 y el correceptor adecuado para el virus. Figura modificada de Balzarini, 2007.

## 2.8. Fusión celular *in vivo*

Un porcentaje importante de los individuos infectados por el VIH (20-30%) pueden mostrar complicaciones asociadas a daños neurológicos durante el desarrollo del SIDA, cuyas manifestaciones clínicas pueden ser desde la falta de concentración y de memoria, hasta la reducción de las capacidades motoras (Ho DD et al., 1989; Gendelman et al., 1994). Existen evidencias de que el virus invade el sistema nervioso central desde etapas tempranas de la infección, ya que se han detectado síntomas de meningitis, así como antígenos virales en el fluido cerebroespinal al momento de la seroconversión (Kramer-Hammerle et al., 2005). Sin embargo, no se ha establecido si la infección temprana es eliminada o únicamente controlada por el sistema inmune, con un período de reactivación en etapas tardías (González-Scarano and Martín-García, 2005). La histopatología asociada al daño neurológico en los pacientes con el SIDA se caracteriza por la acumulación de macrófagos perivasculares y la presencia de células multinucleadas (Ryzhova et al., 2002). Se ha sugerido que la replicación del virus y la producción de proteínas virales con actividad citotóxica como Tat y Nef, así como la síntesis de citocinas inflamatorias como el TNF-alfa y la IL-1, son responsables de las

alteraciones neurológicas en los pacientes con el SIDA (Gendelman et al., 1994, Zhao et al., 2001). Cabe resaltar que las células multinucleadas de cerebro mantienen una replicación constante del virus y son activamente productoras de IL-1 (Zhao et al., 2001).

El tejido linfático es otro sitio de replicación viral activo aún durante el período asintomático de la infección. (Frankel et al., 1996; Soontorniyomkij et al., 1998). El análisis histopatológico realizado en muestras de amígdalas y adenoides, ha mostrado alteraciones morfológicas dependientes de la etapa de infección que comprenden desde la hiperplasia de los folículos linfoides hasta su involución, así como la presencia de células multinucleadas (Soontorniyomki et al., 1998; Ward et al., 1987). La tinción con anticuerpos anti-p24 y la detección de ácidos nucleicos virales por hibridación *in situ*, indican que las células multinucleadas se encuentran infectadas de manera predominante, en contraste con las células localizadas en áreas de células T (Frankel et al., 1996; Rinfret et al., 1991; Soontorniyomki et al., 1998). Las células dendríticas reticulares también son altamente reactivas a los anticuerpos anti-p24, pero existe controversia acerca de si los virus se encuentran únicamente asociados a su membrana plasmática o si establecen una infección productiva (Orenstein, 2008).

La infección por el virus de la inmunodeficiencia en simios (SIV por sus siglas en inglés) es un modelo que ha permitido avances importantes en la comprensión de la patogénesis del SIDA. Los hallazgos patológicos en este modelo coinciden de manera importante con la histología de pacientes humanos infectados por el VIH, principalmente en cuanto a la hiperplasia o involución de los folículos linfoides y la presencia de células multinucleadas en el SNC y ganglios linfáticos (Kaaya et al., 1993; Putkonen et al., 1992).

## **2.9. Fusión celular mediada por las proteínas Env y su relación con el desarrollo del SIDA**

La fusión celular es un proceso de suma importancia que permite que se lleven a cabo procesos biológicos durante el desarrollo, tales como la fecundación, la formación de la placenta, del músculo esquelético, así como el establecimiento de respuestas inmunes de tipo crónico frente a microorganismos e implantes ortopédicos (Ogle et al., 2005). A diferencia de este tipo de fusión celular inducida durante los procesos biológicos normales, la fusión celular mediada por proteínas virales durante la infección por virus envueltos, se ha asociado con el daño a las células involucradas.

En la década de los '90s, Koot y cols., establecieron un ensayo para evaluar la capacidad fusogénica del VIH proveniente de sangre periférica de los individuos infectados, basado en el cocultivo

de células mononucleares de sangre periférica con células de la línea linfocítica MT-2 (Koot et al., 1992). La aparición de células multinucleadas en los cocultivos debido a la presencia de virus con la capacidad para fusionar células, se asoció con la disminución acelerada de las células CD4<sup>+</sup> y la progresión a SIDA en el 70% de los individuos en un lapso de 30 meses (Koot et al., 1993). En otro estudio, se reportaron síntomas del SIDA en un período de 9 a 15 meses después del primer aislado viral inductor de sincicios (Tersmette et al., 1988). Los virus fusogénicos detectados por este ensayo se caracterizan por ser dependientes de CXCR4, ya que las células MT-2 no expresan CCR5. De esta manera, se ha determinado que aproximadamente en el 50% de los pacientes ocurre un cambio en el uso del correceptor por parte de los virus: en etapas tempranas de la infección los virus predominantes son del tipo R5, mientras que en etapas tardías predominan los virus X4 o R5/X4 (Blaak et al., 2000; Karlsson et al., 1994; Koot et al., 1992). No obstante, la persistencia de virus del tipo R5 en el 50% restante de la población infectada, es suficiente para inducir el desarrollo de la inmunodeficiencia (Etemad et al., 2009; Repits et al., 2008; Todd et al., 1995). Recientemente, se han realizados estudios para determinar los mecanismos patogénicos asociados con los virus R5 de los individuos que no presentan virus X4 y que progresan hacia el SIDA. En éstos, se ha mostrado que los virus R5 tardíos difieren de sus homólogos tempranos en cuanto a mayor capacidad para infectar células con baja o nula expresión de CD4 (principalmente macrófagos) (Gorry et al., 2002; Thomas et al., 2007), reducida susceptibilidad a los inhibidores de entrada e incremento en su capacidad de replicación (Repits et al., 2008). Adicionalmente, se ha mostrado que las proteínas Env clonadas a partir del genoma de virus R5 de individuos con el SIDA, presentan mayor capacidad para fusionar células *in vitro* que las proteínas Env de virus aislados durante la etapa asintomática (Sterjovski et al., 2007). Estudios de mutagénesis muestran que la asparagina 362 adyacente al sitio de unión de CD4 en la gp120 contribuye con el aumento en la capacidad fusogénica, posiblemente al incrementar la exposición del sitio de unión a CD4 y/o estabilizando la interacción Env-CD4 (Sterjovski et al., 2007).

Por otro lado, en el modelo con primates no humanos para el estudio del SIDA, se ha encontrado que los virus quiméricos que expresan los genes *tat*, *rev*, *vpu* y *env* del VIH en un fondo de SIV, replican de manera ineficiente y son poco patogénicos en macacos rhesus. Sin embargo, los pasajes seriales *in vivo* de estos virus incrementan su patogenicidad hasta provocar un estado característico del SIDA en pocas semanas. Las principales modificaciones a nivel molecular observadas en los virus recuperados a partir de los macacos enfermos, se encuentran en las regiones variables de la proteína gp120 y además contribuyen, al incremento en su capacidad fusogénica (Cayabyab et al., 1999; Etemad-Moghadam et al., 2000).

En resumen, la aparición de virus inductores de sincicios tanto X4 como R5 en etapas tardías de la infección, se asocia con la pérdida acelerada de células CD4<sup>+</sup> y el desarrollo del SIDA. El

incremento en la fusogenicidad de los virus tardíos podría contribuir en parte con la pérdida de las células CD4<sup>+</sup>.

## 2.10. Características de las células multinucleadas

Aunque no se ha determinado con claridad el papel que desempeñan las células multinucleadas presentes en tejido linfoide y del SNC de pacientes VIH<sup>+</sup>, se ha sugerido que las células fusionadas podrían participar en la patogénesis del SIDA como sitios de replicación activa donde el virus podría ser resguardado del efecto de los factores inmunes humorales (Budka, 1986; Frankel et al., 1996; Frankel et al., 1997); como células productoras de citocinas inflamatorias y promotoras de daños a los tejidos adyacentes (Zhao et al., 2001); como sitios de recombinación viral si se fusionan dos o más células infectadas con diferentes variantes del virus (Steain et al., 2008); reduciendo el número de células CD4<sup>+</sup> libres (Sylwester et al., 1997), y contribuyendo a la apoptosis de las células fusionadas (Perfettini et al., 2008).

Por otro lado, existen algunos trabajos enfocados en el estudio del fenotipo de las células multinucleadas a fin de conocer el linaje de las células propensas a fusionarse *in vivo* durante la infección por el VIH. De esta manera, se ha reportado que este tipo de células expresan marcadores de monocitos/macrófagos (Dargent et al., 2000; Eilbott et al., 1989; Orenstein and Wahl, 1999; Rinfret et al., 1991), aunque otros estudios reportan la expresión de receptores asociados a células dendríticas (Bhoopat et al., 2006; Frankel et al., 1996; Frankel et al., 1997). Asimismo, existe un trabajo en el que se observaron linfocitos multinucleados, de acuerdo con sus características morfológicas, en los que se detectó a la proteína viral p24 (Orenstein, 2000). Sin embargo, si consideramos que tanto células de origen mieloide como de origen linfoide expresan los receptores para el VIH, y que ambos tipos son susceptibles a la infección, entonces, además de la fusión homotípica, podría ocurrir la fusión entre células infectadas Env<sup>+</sup> y células no infectadas CD4<sup>+</sup> de diferentes linajes, generando heterocariones. Previamente, se ha reportado la fusión heterotípica entre líneas de células T y macrófagos infectados por el VIH (Crowe et al., 1992), así como entre células dendríticas y células T provenientes de explantes de piel, inoculados con el virus (Pope et al., 1994). A pesar de estas observaciones realizadas *in vitro*, no se ha reportado la expresión simultánea de marcadores mieloides y linfoides en las células multinucleadas detectadas *in vivo* (Frankel et al., 1996), aunque en realidad, esto ha sido escasamente estudiado. Por lo tanto, se ha considerado que la infección *in vivo* por el VIH, induce principalmente la fusión entre células de origen mieloide. Sin embargo, aún falta valorar mediante

ensayos *in vitro*, si la fusión entre células de diferente linaje genera células multinucleadas que conservan la expresión de ambos fenotipos celulares o si uno de ellos se expresa de manera dominante.

De acuerdo con estos antecedentes, en el presente trabajo se buscó determinar: a) si las proteínas Env del VIH tienen la capacidad para fusionar *in vitro*, linfocitos T Env<sup>+</sup> y monocitos CD4<sup>+</sup>, b) la viabilidad de las células fusionadas, c) la composición celular o estequiometría de los heterocariones linfocito-monocito, es decir, la relación linfocito:monocito en las células fusionadas y c) el nivel de expresión de receptores característicos de ambos linajes celulares en los heterocariones.

### **2.11. Antecedentes sobre el estudio de la fusión homotípica mediante la técnica de citometría de flujo.**

En nuestro laboratorio, se ha estudiado la fusión homotípica entre células T Jurkat transfectadas para expresar a las proteínas de la envoltura del VIH y células T Jurkat CD4<sup>+</sup>/CXCR4<sup>+</sup>, mediante la técnica de citometría de flujo. Las células son teñidas diferencialmente con colorantes lipofílicos fluorescentes en verde y rojo, respectivamente y cocultivadas durante 5 u 8 horas. Las células fusionadas son detectadas como partículas con fluorescencia verde y roja (doble fluorescentes), mientras que las no fusionadas permanecen como eventos con una sola fluorescencia (Figura 7A; Huerta et al., 2002). Asimismo, la citometría de flujo permite evaluar el tamaño relativo y la complejidad (granularidad) del citoplasma celular mediante la dispersión frontal (FSC-H) y la dispersión lateral (SSC-H) del haz de luz que incide sobre la célula analizada por el equipo, respectivamente. De esta manera, se ha encontrado que las células fusionadas presentan mayor granularidad que las células con una sola fluorescencia (fig. 7B). Adicionalmente, las células multinucleadas pueden ser discriminadas de los agregados celulares mediante el fenómeno de transferencia de energía por resonancia de la fluorescencia (FRET) (Huerta et al., 2006).

Esta metodología puede ser ampliada en un ensayo con tres o cuatro fluorescencias para determinar la viabilidad y/o la expresión de marcadores de membrana en las células cocultivadas (Rivera-Toledo et al., 2010). De tal forma, se ha determinado que durante la fusión homotípica la proporción inicial de las células Env<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> en cocultivo afecta el porcentaje, tamaño y composición celular de los sincicios (López-Balderas et al., 2007). También se ha observado que las células con mayor expresión del receptor CD4 se fusionan de manera selectiva, aunque esta molécula es indetectable en la membrana de los sincicios. En cambio, el rango de expresión de las moléculas CD3,

CD28, ICAM-1 y CXCR4 es mayor en la membrana de las células fusionadas con respecto a las células individuales no fusionadas. Asimismo, se ha observado que los sincicios son capaces de expresar CD25 e interleucina 2 (IL-2) en respuesta al estímulo con PMA-ionomicina, indicando que aún fusionadas, las células conservan su capacidad para responder a estímulos de activación (Rivera-Toledo et al., 2010).

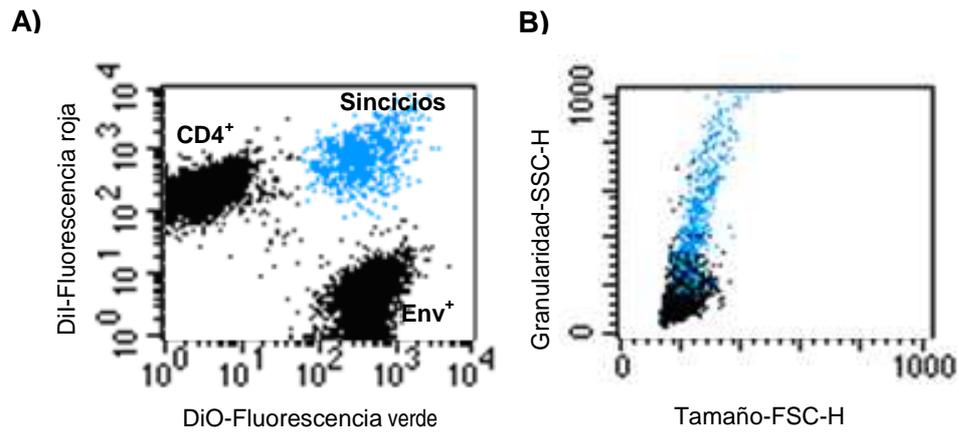


Figura 7. Análisis por citometría de flujo de la fusión homotípica entre células T Jurkat. A) Los cocultivos entre células Jurkat Env<sup>+</sup> fluorescentes en verde y células Jurkat CD4<sup>+</sup> fluorescentes en rojo, generan células doble fluorescentes que corresponden a las células fusionadas (población celular en color azul). B) Las células fusionadas se distribuyen en una región de mayor granularidad que las células con una sola fluorescencia.

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Durante la infección por el VIH, se ha encontrado que existe una correlación importante entre la detección en sangre periférica de variantes virales con alta capacidad para fusionar células *in vitro* y la pérdida acelerada de células T CD4<sup>+</sup> que conlleva a SIDA. Análisis histológicos del tejido linfoide y del sistema nervioso central de los individuos afectados, han revelado de manera frecuente la presencia de células multinucleadas. Estas observaciones han sugerido que el proceso de fusión célula-célula podría contribuir como uno de los mecanismos de daño durante la infección por el VIH.

Algunos trabajos orientados hacia el estudio del fenotipo de las células multinucleadas que se originan *in vivo*, han reportado que presentan marcadores de monocitos/macrófagos o bien, de células dendríticas. Sin embargo, considerando que tanto los linfocitos T cooperadores como las células de origen mieloide expresan a los receptores para el VIH y son susceptibles a la infección por el virus, es probable que pueda ocurrir la interacción y fusión entre células infectadas y no infectadas del mismo o de diferente linaje celular, dando lugar a sincicios, así como a heterocariones. En el caso de los heterocariones, podrían conservar el fenotipo de los dos tipos celulares, o bien, podrían mostrar dominancia de uno de ellos.

Hasta ahora, existe poca información acerca de la fusión heterotípica inducida por las proteínas Env del VIH y aún no se han caracterizado a los heterocariones generados por la fusión entre células linfoides y mieloides.

### IV. PREGUNTAS

¿Las proteínas Env del VIH pueden inducir la fusión entre células T y monocitos generando heterocariones?

¿La fusión heterotípica afecta las características fenotípicas y biológicas de las células involucradas?

## **V. OBJETIVOS**

### **5.1. OBJETIVO GENERAL**

1. Estudiar la fusión heterotípica linfocito-monocito inducida por las proteínas Env del VIH-1.

### **5.2. OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Determinar si células T de la línea Jurkat, transfectadas para expresar a las proteínas Env del VIH-1, son capaces de fusionarse con monocitos CD4<sup>+</sup> de la línea THP-1.
2. Evaluar la cinética de la viabilidad de los heterocariones y de las células no fusionadas que permanecen en cocultivo.
3. Determinar la composición celular (estequiometría) de los heterocariones
4. Evaluar la expresión de moléculas características de ambos linajes celulares como CD4, CD3, CD28, CD32 y CD68 tanto en los heterocariones, como en las células no fusionadas.
5. Estudiar la respuesta de los heterocariones frente a estímulos por mitógenos.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Líneas celulares

Las líneas celulares linfoides Jurkat, denominadas HXBc2 y 522F/Y, fueron obtenidas por medio del Dr. Joseph Sodroski, a través del programa AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAD, NIH. Ambas líneas celulares se encuentran transfectadas establemente para expresar el complejo protéico gp120/gp41 (Env) de la envoltura del VIH-1, bajo un sistema inducible basado en el operón de tetraciclina (fig. 8). Las células contienen un plásmido regulador que codifica para la proteína de fusión tTA, que es una combinación entre el represor de tetraciclina y el dominio C-terminal del activador transcripcional VP16 del virus simple del herpes (Cao, et al., 1996). Un segundo plásmido de respuesta, contiene secuencias del operador de tetraciclina acopladas al promotor mínimo de citomegalovirus humano y controlan la expresión de los genes *env* y *rev* del VIH-1 de la cepa X4 denominada, HXBc2. Los plásmidos, además contienen genes de resistencia a los antibióticos G418 e higromicina, respectivamente. De esta manera, la expresión de los genes virales se encuentra reprimida en presencia de la tetraciclina (Cao, et al., 1996).

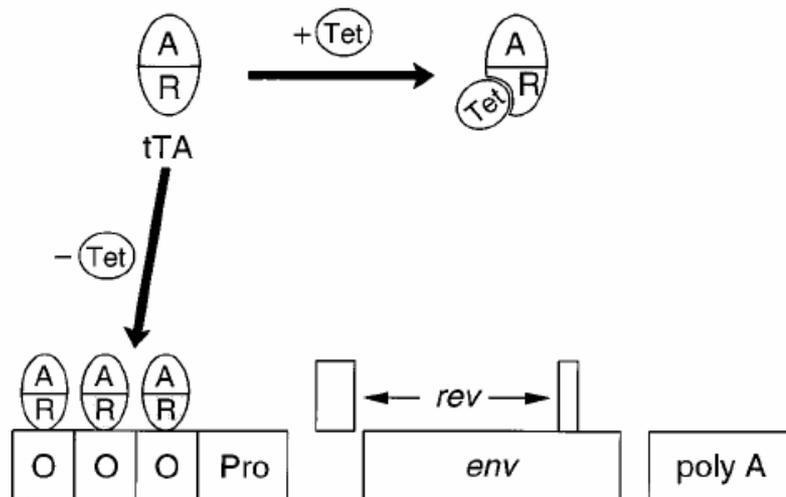


Figura 8. Estructura del sistema para la expresión inducible de las proteínas Env del VIH-1. La proteína tTA está compuesta por el activador VP16 ( A ) y por el represor de tetraciclina ( R ). La unión de la proteína tTA al operador de tetraciclina promueve la expresión de las proteínas virales gp120/gp41. Cuando la tetraciclina se encuentra presente, se une a la proteína tTA evitando su interacción con la región promotora e inhibiendo la expresión del gen *env*.

A diferencia de las células HXBc2, la línea celular 522F/Y expresa una mutante del gen *env* con una sustitución F/Y en el aminoácido 522 localizado en el péptido de fusión de gp41, afectando negativamente su capacidad para inducir la fusión de membranas (Cao, et al., 1996; Huerta et al., 2009). La expresión de las proteínas Env por parte de las líneas celulares HXBc2 y 522F/Y, ha sido determinada previamente por técnicas de inmunoprecipitación y citometría de flujo (Cao, et al., 1996; Huerta et al., 2009). La línea celular monocítica THP-1 (CD4<sup>+</sup>/CXCR4<sup>+</sup>), fue obtenida del ATCC (American Type Culture Collection).

## **6.2. Cultivo celular**

Las líneas celulares HXBc2 (células T Env<sup>+</sup> fusogénicas) y 522F/Y (células T Env<sup>+</sup> no-fusogénicas), fueron cultivadas en medio RPMI 1640 (Gibco BRL) suplementado con suero fetal bovino (Gibco BRL) al 10%, 60 U/ml de penicilina y 60 µg/ml de estreptomycin. Los antibióticos de selección G418 e higromicina, se agregaron a una concentración final de 200 µg/ml, además de 1 µg/ml de tetraciclina para inhibir la expresión de las proteínas Env. Todos los cultivos se mantuvieron a 37°C en presencia de CO<sub>2</sub> al 5%. El medio de cultivo se reemplazó cada 3 días centrifugando las células a 1,150 rpm durante 3 minutos y agregando medio fresco junto con los antibióticos de selección y la tetraciclina.

Las células THP-1 (monocitos CD4<sup>+</sup>), se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino al 10%, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin, 2 mM de L-glutamina, 100 µM de aminoácidos no esenciales y 1 µM de piruvato de sodio (todos los reactivos de Gibco BRL). El medio de cultivo se reemplazó cada 3 o 4 días centrifugando las células a 1,150 rpm durante 3 min y resuspendiéndolas en medio fresco, procurando mantener la suspensión celular a una densidad menor a 0.25 x 10<sup>6</sup> monocitos /ml.

## **6.3. Inducción de la expresión de las proteínas Env**

Para inducir la expresión de las proteínas virales en las células T Env<sup>+</sup> fusogénicas y no-fusogénicas, la tetraciclina fue eliminada de los cultivos mediante 2 lavados con 40 ml de PBS. Posteriormente, las células se incubaron en medio RPMI 1640 suplementado y adicionado con los

antibióticos de selección, pero en ausencia de tetraciclina. Después de 48 horas de inducción, las células se tiñeron con colorantes fluorescentes como se describe en la sección siguiente. Las células teñidas se cultivaron un día más hasta alcanzar un período final de 3 días en ausencia de tetraciclina, tiempo en el que se ha reportado un máximo en la expresión de las proteínas Env (Cao, et al., 1996; Huerta et al., 2009).

#### **6.4. Tinción celular**

El colorante fluorescente en rojo, perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametil-indocarbocianina (DiI) y el colorante fluorescente en verde, perclorato de 3,3'-dioctadecil-oxacarbocianina (DiO) (Molecular Probes, Eugene, OR), se utilizaron para marcar a los monocitos CD4<sup>+</sup> y a las células T Env<sup>+</sup>, respectivamente. Se prepararon soluciones stock de ambos colorantes a una concentración de 3.5 mg/ml en dimetil-sulfóxido, a partir de las cuales se hicieron diluciones 1:30 de DiO y 1:10 de DiI, en el mismo disolvente. Después de 48 horas en ausencia de tetraciclina, las células T Env<sup>+</sup> se contaron y ajustaron a 5-15x10<sup>6</sup>/ml de RPMI 1640 suplementado y se adicionaron con 16 µl de DiO, dilución 1:30. Por otro lado, los monocitos CD4<sup>+</sup> se contaron y ajustaron a 5-15x10<sup>6</sup>/ml de RPMI 1640 suplementado y se adicionaron con 8 µl de DiI, dilución 1:10. Las células se incubaron en agitación rotatoria lenta, durante 18 minutos a temperatura ambiente y se lavaron 2 veces con 10 volúmenes de medio RPMI para eliminar el colorante no incorporado. Las células teñidas se incubaron durante toda la noche en sus medios de cultivo correspondientes.

#### **6.5. Ensayo de fusión celular e inhibición de la fusión**

Para inducir la fusión heterotípica entre células de origen linfoide y células de origen mieloide, las células T Env<sup>+</sup> marcadas con DiO (fusogénicas o no-fusogénicas) y los monocitos CD4<sup>+</sup> marcados con DiI, se cocultivaron en proporción 1:1 en placas para cultivo de 48 pozos, agregando 400,000 células de cada tipo, en un volumen final de 800 µl de medio libre de suero, AIM-V (Gibco, BRL). Las placas con los cocultivos se incubaron durante 5, 24 o 48 horas a 37°C en presencia de CO<sub>2</sub> al 5%. Las células se cosecharon a partir de los pozos agitando los cocultivos cuidadosamente con una micropipeta, se colocaron en tubos para citometría de flujo (Becton-Dickinson) con 2 ml de PBS y se

lavaron por centrifugación a 1,150 rpm durante 3 min. Finalmente, los cocultivos se resuspendieron en 1ml de buffer para citometría de flujo (BD Biosciences).

Para los ensayos de inhibición de la fusión, los monocitos CD4<sup>+</sup> se preincubaron durante 30 minutos en presencia de T-20 (Enfuvirtide) o del anticuerpo monoclonal anti-CD4 de la clona RPA-T4 (BD Biosciences), a concentraciones finales de 0.001, 0.01, 0.1, 1.0, 10 y 50 nM. El cocultivo de los monocitos CD4<sup>+</sup> con las células T Env<sup>+</sup> en presencia de los inhibidores, se analizó después de 24 horas de incubación.

## **6.6. Análisis por citometría de flujo**

La formación de células doble-fluorescentes (heterocariones) fue analizada mediante un citómetro de flujo FACScalibur (Becton-Dickinson), equipado con una lámpara de argón (488 nm) y con un diodo de emisión roja (635 nm). Con la finalidad de compensar correctamente y evitar la interferencia de la autofluorescencia, se utilizaron como control células no marcadas. Para optimizar la separación de las señales fluorescentes verde y roja, se utilizaron células teñidas no cocultivadas, durante el proceso de compensación.

Los agregados celulares se disociaron justo antes de la adquisición de las muestras, resuspendiendo suavemente las células con ayuda de una micropipeta. Se adquirieron 10,000 eventos en total y se analizaron mediante el programa CellQuest (Becton-Dickinson), construyendo gráficas de puntos con los parámetros de tamaño (FSC-H) y granularidad (SSC-H) y gráficas de fluorescencia roja-Dil (FL2-H) contra fluorescencia verde-DiO (FL1-H) para discriminar entre células no fusionadas (células con fluorescencia verde o roja) y células fusionadas (doble-fluorescentes).

## **6.7. Análisis de la expresión de receptores (fenotipo)**

Para evaluar la expresión de receptores, las células cocultivadas durante 5 o 24 horas se cosecharon en tubos para citometría de flujo y se lavaron en 2 ml de PBS frío, adicionado con azida de sodio al 0.1% (buffer de lavado). Se prepararon soluciones con anticuerpos monoclonales anti-CD4, anti-CD28, anti-CD3 y anti-CD32, conjugados con el fluorocromo alofococianina (APC) (BD Pharmingen, San Jose CA), agregando 20 µl del anticuerpo/10<sup>6</sup> células, en un volumen final de 100 µl de buffer de

tinción (PBS, azida de sodio al 0.1%, suero normal de cabra al 2%). Las células resuspendidas en la solución con el anticuerpo se incubaron en hielo durante 30 min. El anticuerpo no unido se eliminó centrifugando las muestras en presencia de 2 ml de buffer de lavado.

Para determinar la expresión intracelular de la molécula CD68, las células se fijaron con una solución de paraformaldehído al 4%, durante 15 minutos en hielo. Posteriormente, las células se permeabilizaron con saponina al 0.25%, durante 15 min a 37°C. Una vez permeabilizadas, las células se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-CD68 a una concentración de 0.5  $\mu\text{g}/10^6$  células en buffer de tinción, durante 30 min en hielo. Las muestras se lavaron y se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado a APC (APC-goat anti-mouse Ig), a una concentración de 0.25  $\mu\text{g}/10^6$  células, durante 30 minutos, bajo las condiciones mencionadas. Finalmente, las células se lavaron y resuspendieron en 1 ml de PBS-azida para ser evaluadas en el citómetro de flujo.

El análisis cuantitativo de la expresión de los receptores se llevó a cabo creando regiones para cada una de las 3 poblaciones celulares en las gráficas de fluorescencia (monocitos CD4<sup>+</sup> no fusionados, células T Env<sup>+</sup> no fusionadas y heterocariones, fig. 6) y construyendo para cada población histogramas de fluorescencia en el canal FL4-H, donde se detecta al fluorocromo APC. A partir de los histogramas, se determinó el índice de fluorescencia media (IFM), calculado como el cociente entre la intensidad media de fluorescencia del anticuerpo específico y la intensidad media de fluorescencia del control de isotipo correspondiente. En todos los casos se consideró la media geométrica de fluorescencia.

### **6.8. Cálculo de la estequiometría de la fusión**

El número de células incorporadas en los policariones se puede estimar, considerando el número de células que permanecen sin fusionar en un tiempo determinado, con respecto al número inicial de células en el cocultivo. Aunque la información proporcionada por el citómetro de flujo no corresponde al número absoluto de las células sino a su porcentaje, este valor refleja el número de células que se incorporan en los policariones. En un trabajo previo realizado en el laboratorio, se derivó una ecuación que permite el cálculo de la proporción de células CD4<sup>+</sup> que se fusionan por cada célula T Env<sup>+</sup> (CD4<sup>+</sup>/Env<sup>+</sup>). Esta ecuación, depende del valor  $R_0$  (que denota a la proporción inicial de células verdes y rojas), así como del porcentaje de células fusionadas y no fusionadas obtenidas al tiempo  $i$  (López-Balderas et al., 2007). En el presente trabajo, el parámetro denominado coeficiente de fusión ( $r$ ), corresponde al promedio de células T Env<sup>+</sup> que se fusionan por cada monocito CD4<sup>+</sup>

( $r=Env^+/CD4^+$ ), dando lugar a los heterocariones, y adquiere el valor de 1 cuando los dos linajes celulares se fusionan en la misma proporción. El efecto de la presencia en exceso de una de las poblaciones celulares sobre la estequiometría de la fusión, se evaluó en cocultivos con proporciones iniciales 1:4, 1:1 y 4:1. El análisis se llevó a cabo después de un tiempo corto de incubación (5 horas), cuando el cambio en la proporción de las poblaciones en cocultivo no se ve afectado por la muerte o por la proliferación celular. Por lo tanto, en tiempos cortos de cocultivo, el cambio en las proporciones celulares pueden ser considerados como consecuencia de la fusión célula-célula (López-Balderas et al., 2007).

### **6.9. Análisis de la viabilidad celular**

La viabilidad de las poblaciones celulares en cocultivo se evaluó mediante la doble tinción con 7-amino actinomicina D (7-AAD) y Anexina-V acoplada al fluorocromo Cy5 (BD Pharmingen). Las células cocultivadas durante 5, 24, 48 y 96 h se cosecharon y lavaron con 2 ml de PBS. Posteriormente se resuspendieron en 800  $\mu$ l de buffer de unión (0.1 M HEPES pH 7.4, 14 M NaCl, 25 mM  $CaCl_2$ ) y se adicionaron 1  $\mu$ l de Anexina-V y 1  $\mu$ l 7-AAD / $10^5$  células. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente, protegidas de la luz durante 15 min antes del análisis por citometría de flujo.

En este ensayo, las células no apoptóticas son negativas para 7-AAD y Anexina-V, mientras que las células en apoptosis temprana son negativas para 7-AAD y positivas para Anexina-V. Las células en apoptosis tardía son positivas para ambos reactivos (Schmid et al., 1994; van Engeland et al., 1998). Para realizar una compensación correcta durante el análisis por citometría de flujo, se utilizaron células DiO-Env<sup>+</sup> y DiI-CD4<sup>+</sup> tratadas con 3.1  $\mu$ g/ml camptotecina (Sigma), durante 14 h a 37°C, como control positivo de apoptosis.

### **6.10. Microscopía de fluorescencia**

Para evaluar mediante la técnica de microscopía de fluorescencia la presencia de células multinucleadas en los cocultivos entre células T Env<sup>+</sup> fusogénicas y monocitos CD4<sup>+</sup>, se hizo una tinción con el colorante fluorescente Hoechst 33342 (Molecular Probes, Eugene, OR), a una concentración final de 10  $\mu$ M durante 15 minutos a 37°C. El análisis cuantitativo se realizó contando

cerca de 400 células totales y clasificándolas de acuerdo a su fluorescencia en monocitos CD4<sup>+</sup> no fusionados (rojas-monomucleadas), células T Env<sup>+</sup> no fusionadas (verdes-monomucleadas) y heterocariones (células verdes y rojas simultáneamente con 2 o más núcleos).

### **6.11. Enriquecimiento de la población de heterocariones mediante citometría de flujo y estimulación con PMA-ionomicina**

Para enriquecer a la población de heterocariones formados en cocultivos de 24 horas, las células fueron cosechadas y transferidas a tubos de 15 ml para ser lavadas con PBS y resuspendidas a una concentración final de 10<sup>6</sup> células/ml de PBS. La población de células doble-fluorescentes fue separada mediante un citómetro de flujo FACSaria (Becton Dickinson). De esta manera, se obtuvo una población de heterocariones enriquecida en un 76%.

La población enriquecida de heterocariones fue cultivada en medio libre de suero AIM-V a una densidad de 0.2X10<sup>6</sup> células/400 µl y adicionada con PMA a una concentración de 16 nM y ionomicina a una concentración de 268 nM, durante 14 horas. Bajo este estímulo de activación, se evaluó la expresión de la cadena de alta afinidad del receptor para la IL-2 mediante un anticuerpo anti-CD25 acoplado a APC. Como control, se incubaron bajo las mismas condiciones monocitos CD4<sup>+</sup> y células T Env<sup>+</sup> mantenidas en monocultivo.

### **6.12. Análisis estadístico**

La diferencia estadística entre grupos se determinó mediante el análisis de varianza ( $P < 0.05$ ), utilizando el programa Prisma (GraphPath Software, Inc).

## VII. RESULTADOS

### 7.1 Análisis por citometría de flujo de la fusión linfocito-monocito, inducida por las proteínas Env del VIH-1

#### 7.1.1 Formación de células doble fluorescentes con alta complejidad citoplásmica

Para el estudio *in vitro* de la fusión celular heterotípica mediada por las proteínas Env del VIH-1, entre células de origen mieloide y de origen linfoide, utilizamos a la línea celular linfocítica Jurkat que se encuentra transfectada para expresar a las proteínas virales gp120/gp41 (células T Env<sup>+</sup> fusogénicas), de manera semejante a como ocurre en una célula infectada por el virus. Asimismo, utilizamos células monocíticas de la línea THP-1 (monocitos CD4<sup>+</sup>) como células blanco, ya que expresan a las moléculas CD4 y CXCR4 que funcionan como receptor primario y correceptor para el VIH, respectivamente (ver figura 9).

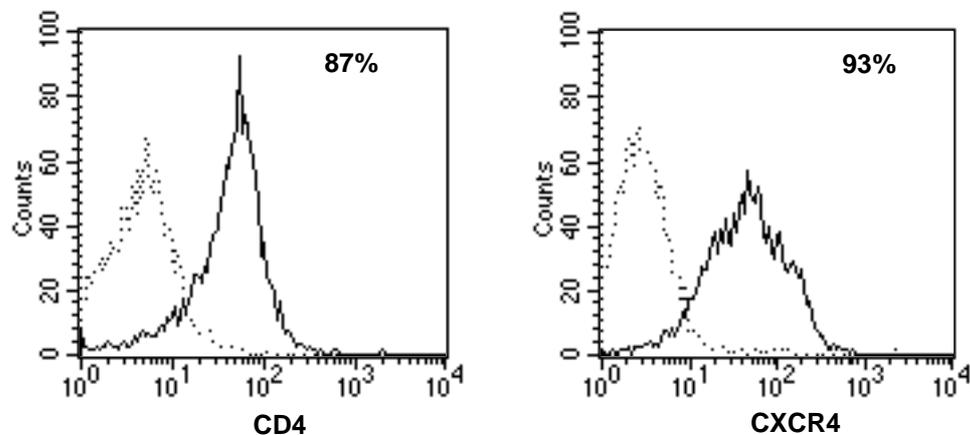


Fig 9. Expresión de las moléculas CD4 y CXCR4 en la membrana de monocitos de la línea celular THP-1. Se reporta el porcentaje de las células positivas para cada receptor. El histograma punteado corresponde al control de isotipo.

Las células T Env<sup>+</sup> fusogénicas marcadas con un colorante lipofílico fluorescente en verde (DiO-verde), se pusieron en cocultivo en proporción 1:1 con los monocitos CD4<sup>+</sup> marcados con un colorante lipofílico fluorescente en rojo (Dil-rojo). La fusión célula-célula fue cuantificada después de 5, 24, y 48 horas de cocultivo, mediante un método previamente caracterizado basado en la detección diferencial mediante citometría de flujo de células con fluorescencia verde y roja (doble fluorescentes), que corresponden a la población de células fusionadas, así como de células con una sola

fluorescencia, ya sea verde o roja, que corresponden a las poblaciones de células no fusionadas (Huerta et al., 2002; Huerta et al., 2009).

En las gráficas de fluorescencia roja contra fluorescencia verde de la figura 10A, se observa que después de 5 horas de cocultivo se formaron alrededor del 6% de células doble fluorescentes y esta población se incrementó con respecto al tiempo, hasta alcanzar un 20% después de 2 días de incubación.

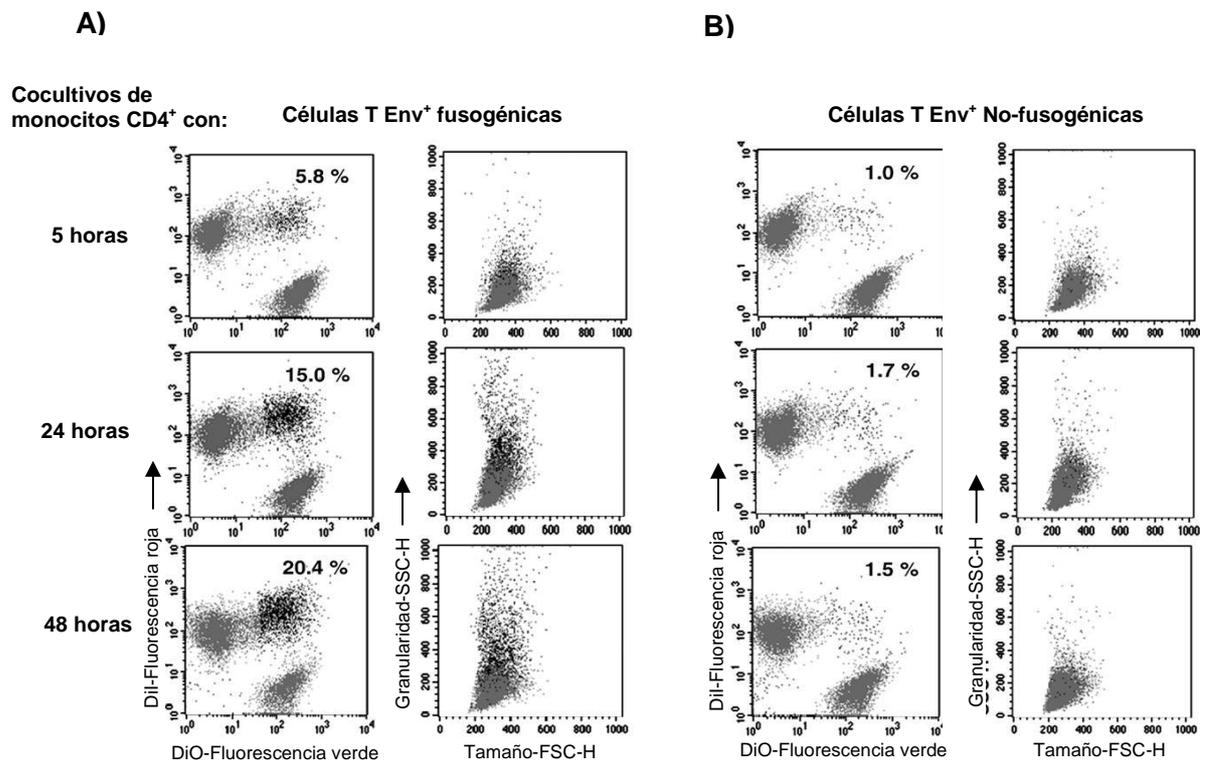


Fig 10. Formación de células doble fluorescentes en cocultivos entre monocitos CD4<sup>+</sup> marcados con un colorante fluorescentes en rojo y a) células T Env<sup>+</sup> fusogénicas o b) células T Env<sup>+</sup> no-fusogénicas, marcadas con un colorante fluorescentes en verde. Los cocultivos se incubaron durante 5, 24 y 48 horas y posteriormente se evaluaron mediante citometría de flujo. Para cada tipo de cocultivo se muestran las gráficas respectivas de granularidad (SSC-H) contra tamaño (FSC-H), en donde se resalta con puntos negros la distribución de las células doble fluorescentes.

De acuerdo con la señal SSC-H que describe la complejidad o granularidad del citoplasma celular, aproximadamente el 60% de las células doble fluorescentes presenta mayor granularidad que los monocitos CD4<sup>+</sup> no fusionados (representado en las gráficas de granularidad contra tamaño de la

figura 10A y en los histogramas de la figura 11A). En cambio, la distribución de tamaño de la población de células doble fluorescentes, relacionada con la señal FSC-H, se traslapa con la distribución de tamaño de los monocitos CD4<sup>+</sup> no fusionados (fig. 11B). Estos resultados sugieren que las células doble fluorescentes que presentan una complejidad citoplásmica semejante a la de las células individuales podrían ser fusiones pequeñas, mientras que las de mayor granularidad podrían corresponder a células multinucleadas que incorporaron un mayor número de células individuales.

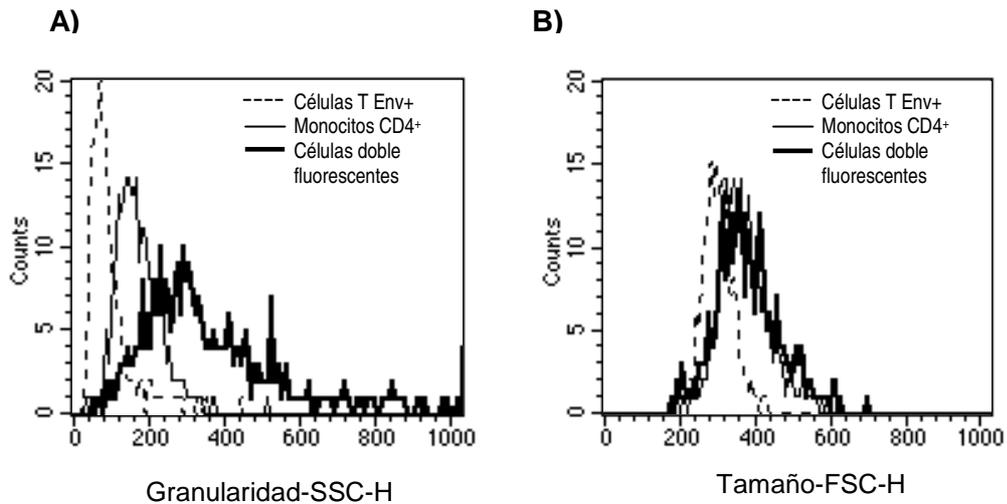


Fig 11. Distribución de a) granularidad (SSC-H) y b) tamaño (FSC-H), correspondiente a cada una de las tres poblaciones celulares en cocultivo: células T Env<sup>+</sup> no fusionadas, monocitos CD4<sup>+</sup> no fusionados y células doble fluorescentes.

El proceso de fagocitosis es característico de las células del linaje monocito/macrófago, aunque su eficiencia es dependiente del estado de diferenciación celular (Maródi et al., 1991). Se ha determinado que los monocitos, además de ser menos eficientes para fagocitar que los macrófagos, son altamente dependientes de opsoninas tales como anticuerpos y proteínas del sistema del complemento (Maródi et al., 1991). Para descartar que la formación de células doble fluorescentes en los cocultivos sea producto de la fagocitosis de células T por parte de los monocitos, se hicieron cocultivos entre los monocitos CD4<sup>+</sup> y células T Jurkat transfectadas con una mutante del gen *env* para expresar a la proteína gp41 con una mutación F/Y en el péptido de fusión (células T Env<sup>+</sup> no-fusogénicas). Previamente, se ha determinado que esta mutación afecta negativamente la capacidad de las proteínas virales para inducir la fusión de membranas (Cao et al., 1996; Huerta et al., 2009). De esta manera, la formación de células doble fluorescentes en cocultivos donde la fusión dependiente de Env no puede ocurrir, indicaría que los monocitos fagocitaron a las células T Env<sup>+</sup>. En la figura 10B, se

observa que los cocultivos entre monocitos CD4<sup>+</sup> y células T Env<sup>+</sup> no-fusogénicas, producen únicamente del 1 al 2% de células doble fluorescentes, aún después de 48 horas de incubación. Estos resultados indican que la formación de células doble fluorescentes no es producto de la fagocitosis de células T Env<sup>+</sup>, mientras que sí es dependiente de la capacidad fusogénica de las proteínas Env expresadas por las células T.

### *7.1.2 Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) en la población de células doble fluorescentes*

Anteriormente, en nuestro grupo de trabajo se observó que la fusión linfocito-linfocito produce sincicios con una intensidad de fluorescencia roja incrementada por lo menos 4 veces con respecto a la fluorescencia roja de las células no fusionadas, marcadas con el colorante Dil-rojo (Huerta et al., 2006). Este efecto podía deberse a la incorporación de muchas células rojas en los sincicios, o bien, a la transferencia de energía del colorante DiO-verde hacia el colorante Dil-rojo, dado que sus espectros de emisión y absorción, respectivamente, se encuentran traslapados (ver apéndice I). Al teñir de manera simultánea células T Jurkat CD4<sup>+</sup> con ambos colorantes, se observó el mismo incremento de la fluorescencia roja que se detectaba en las células fusionadas. El aumento de la intensidad de la fluorescencia roja fue directamente proporcional a la concentración del colorante DiO-verde utilizada para teñir a las mismas células. De esta manera, se comprobó que el incremento de la fluorescencia roja en los sincicios se debe principalmente a FRET (Huerta et al., 2006). Asimismo, la detección de FRET en células doble fluorescentes formadas en cocultivos entre células CD4<sup>+</sup> y células Env<sup>+</sup> teñidas de manera independiente con cada colorante, sugiere la fusión de las membranas que conlleva a la interacción entre los fluorocromos.

Por lo tanto, para apoyar la evidencia de la formación de heterocariones por la fusión de las membranas de monocitos CD4<sup>+</sup> y de células T Env<sup>+</sup> fusogénicas, se evaluó la aparición de FRET en la población de células doble fluorescentes. Para esto, se hicieron cocultivos entre células T Env<sup>+</sup> fusogénicas teñidas con concentraciones crecientes del colorante DiO-verde (5.2  $\mu$ M, 15.6  $\mu$ M y 31.2  $\mu$ M) y monocitos CD4<sup>+</sup> teñidos con una concentración constante del colorante Dil-rojo (3.1  $\mu$ M). En la figura 12A, se observa que la población de células doble fluorescentes (R1) se desplaza hacia una región de mayor intensidad de fluorescencia roja, conforme se incrementa la concentración del colorante verde. La figura 12B indica que este incremento fue de hasta 7 veces con respecto a la intensidad media de fluorescencia roja de los monocitos CD4<sup>+</sup> no fusionados, sugiriendo la producción

del FRET. En la figura 12A, también se puede observar una población de células doble fluorescentes negativas para el FRET, que comprende alrededor del 2% (R2) y que podría corresponder a agregados celulares.

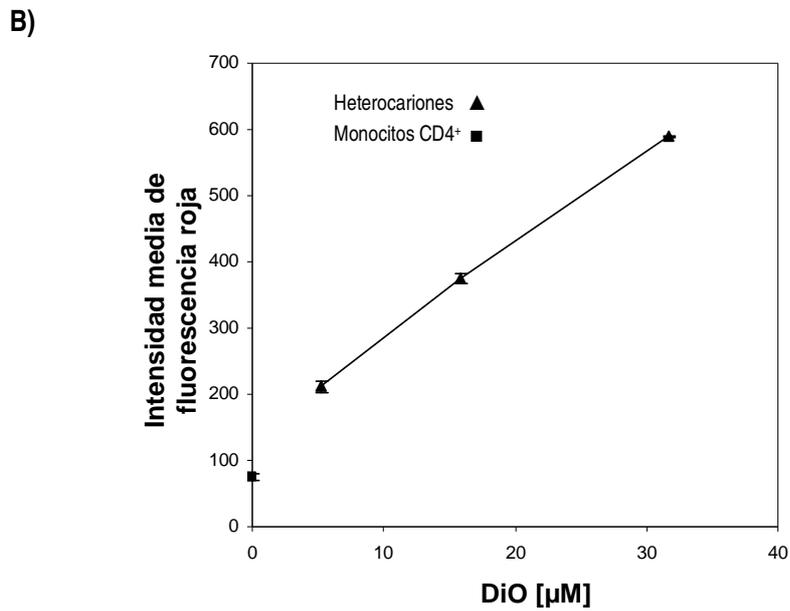
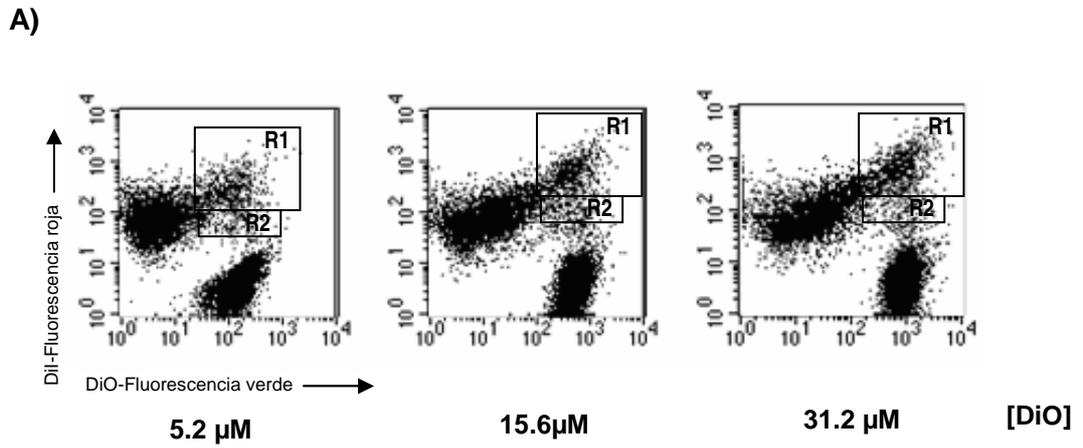


Fig 12. Intensidad media de fluorescencia roja en heterocariones formados en cocultivos de monocitos CD4<sup>+</sup> marcados con una concentración constante de Dil-rojo y células T Env<sup>+</sup> fusogénicas marcadas con diferentes concentraciones de DiO-verde. La media geométrica de la fluorescencia roja de los monocitos CD4<sup>+</sup> no fusionados fue de 73.

## 7.2. Detección de heterocariones por microscopía de fluorescencia

El análisis mediante microscopía de fluorescencia de los cocultivos entre células T Env<sup>+</sup> fusogénicas y monocitos CD4<sup>+</sup>, incubados durante 24 horas, reveló la presencia de células multinucleadas, con fluorescencia verde y roja (fig. 13), confirmando la generación de heterocariones. El porcentaje de células doble fluorescentes obtenidas por citometría de flujo fue congruente con el porcentaje de heterocariones obtenido mediante el conteo por microscopía de fluorescencia: 12.15% y 12.86%, respectivamente.

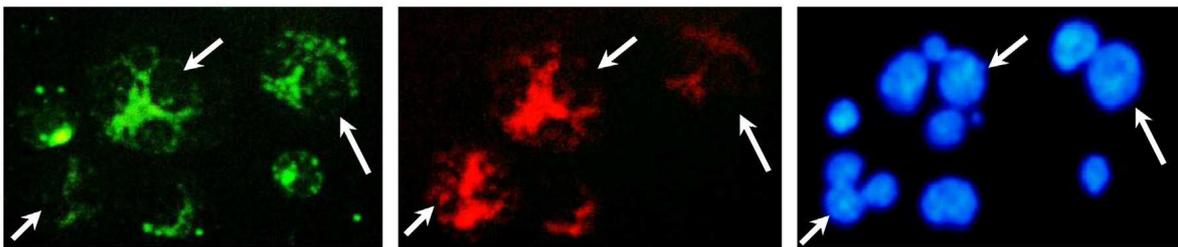


Fig 13. Microscopía de fluorescencia de cocultivos entre células T Env<sup>+</sup> (fluorescencia verde) y monocitos CD4<sup>+</sup> (fluorescencia roja) incubados durante 24 horas. Las células doble fluorescentes son indicadas con flechas. El DNA fue teñido con Hoechst 33342 (fluorescencia azul). Aumento: 40x.

## 7.3. Efecto de inhibidores de la fusión celular mediada por las proteínas Env del VIH-1 sobre la formación de heterocariones

Para determinar si la formación de heterocariones depende del receptor CD4 y de las proteínas de la envoltura del VIH, los monocitos CD4<sup>+</sup> fueron preincubados durante 30 minutos con el péptido sintético T-20 o con un anticuerpo monoclonal anti-CD4 que previamente se ha reportado como inhibidor del proceso de infección y de la fusión célula-célula mediado por Env (Hu et al., 2004; Sakamoto et al., 2003). Asimismo, el péptido T-20 de 36 aminoácidos, interfiere durante el proceso de fusión al unirse a la región N-terminal de la gp41 que tiende a formar hélices alfa (Furuta et al., 1998).

Los cocultivos entre monocitos CD4<sup>+</sup> y células T Env<sup>+</sup> fusogénicas o no-fusogénicas, en presencia de los inhibidores de la fusión, se analizaron mediante citometría de flujo después de 24 horas de incubación. La figura 14, muestra que tanto el anticuerpo anti-CD4 como el péptido T-20 son

capaces de inhibir la fusión heterotípica con una eficiencia semejante. El 50% de los heterocariones fue inhibido con una concentración ( $IC_{50}$ ) de 7.8 nM de anti-CD4 y con una concentración de 6.6 nM de T-20. En cambio, el bajo porcentaje de células doble fluorescentes que se forma en los cocultivos entre células T Env<sup>+</sup> no-fusogénicas y monocitos CD4<sup>+</sup>, no es afectado por los inhibidores, apoyando la hipótesis de que esta población corresponde a células agregadas de manera inespecífica y no a células fusionadas.

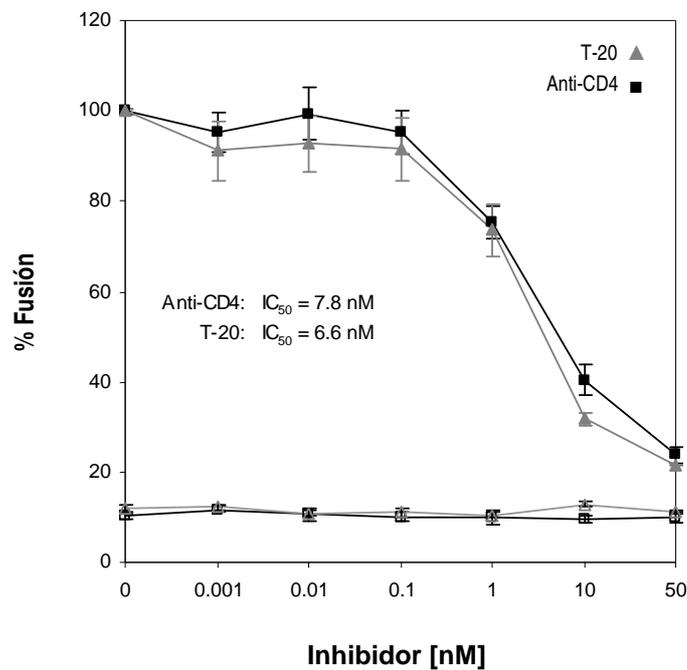


Fig 14. Inhibición de la fusión heterotípica mediante un anticuerpo monoclonal anti-CD4 y el péptido sintético T-20. Se reporta el porcentaje de fusión (células doble fluorescentes) en presencia de concentraciones crecientes de los inhibidores en cocultivos entre monocitos CD4<sup>+</sup> y células T Env<sup>+</sup> fusogénicas (símbolos rellenos) o células T Env<sup>+</sup> no fusogénicas (símbolos abiertos).

## 7.4 Viabilidad de los heterocariones

La pérdida de la integridad de la membrana y la muerte por apoptosis se determinó de manera simultánea tanto en los heterocariones como en las células no fusionadas, evaluando su capacidad para incorporar a la 7-aminoactinomicina D (7-AAD) y su unión a la Anexina-V (acoplada al fluorocromo Cy5), en un ensayo con cuatro fluorescencias. En la figura 15, se muestra el análisis mediante citometría de flujo de la viabilidad de cada una de las tres poblaciones celulares, en un cocultivo de 48 horas. En la tabla 1, se reporta la cinética de la viabilidad de las células en cocultivo, así como de células mantenidas en monocultivo (células control) por un período de 96 horas. Se puede observar que hay una pérdida progresiva de la viabilidad de los heterocariones a lo largo del tiempo de cocultivo, alcanzado un 50% después de 4 días de incubación. Durante las primeras 48 horas, la viabilidad de los heterocariones fue similar a la de las células T Env<sup>+</sup> no fusionadas, que también mostraron un porcentaje importante de muerte celular con respecto al tiempo de incubación. En cambio, la viabilidad de los monocitos CD4<sup>+</sup> no fusionados y de los monocitos control, se mantuvo por arriba del 90%.

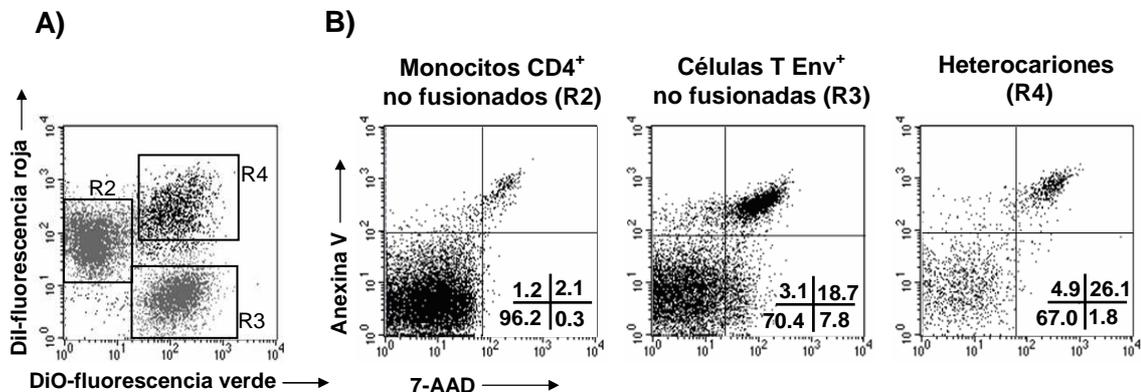


Fig 15. Análisis por citometría de flujo de la viabilidad de las células en cocultivo después de 48 horas de incubación. A) Selección de regiones para cada una de las tres poblaciones celulares. B) Análisis de cada región en cuanto a su porcentaje de incorporación de 7-AAD y/o Anexina-V. Las células que unen ambos reactivos se consideran como en apoptosis tardía.

Tabla 1. Viabilidad\* de los heterocariones, de las células no fusionadas y de las células control

Tiempo de cocultivo (h)	Células T Env <sup>+</sup>		Monocitos CD4 <sup>+</sup>		Heterocariones (%)
	Células T Env <sup>+</sup> Control (%)	No fusionadas (%)	Monocitos CD4 <sup>+</sup> Control (%)	no fusionados (%)	
0	91.1±1.3	90.8±1.4	97.6±2.0	96.6±2.7	-
5	95.6±1.9	95.2±2.1	96.8±0.8	96.2±0.3	83.7±1.2 <sup>c</sup>
24	85.9±4.8	88.2±4.1	97.8±0.1	94.3±2.0	77.6±1.1 <sup>c</sup>
48	75.0±6.5 <sup>a</sup>	79.8±9.3	96.8±0.6	94.7±1.7	68.2±1.9 <sup>c</sup>
96	72.3±0.3 <sup>a</sup>	67.0±0.8 <sup>a</sup>	89.4±1.7	93.2±0.1	50.3±0.3 <sup>b,c</sup>

\* Se reporta el porcentaje de células viables, es decir, negativas para la incorporación de 7-AAD y la unión de Anexina-V.

<sup>a</sup> P< 0.05 con respecto al tiempo cero de las mismas condiciones de cultivo

<sup>b</sup> P<0.05 con respecto a las células Env<sup>+</sup> no fusionadas a las 96 hrs

<sup>c</sup> P<0.001 con respecto a los monocitos CD4<sup>+</sup> no fusionados en el tiempo correspondiente

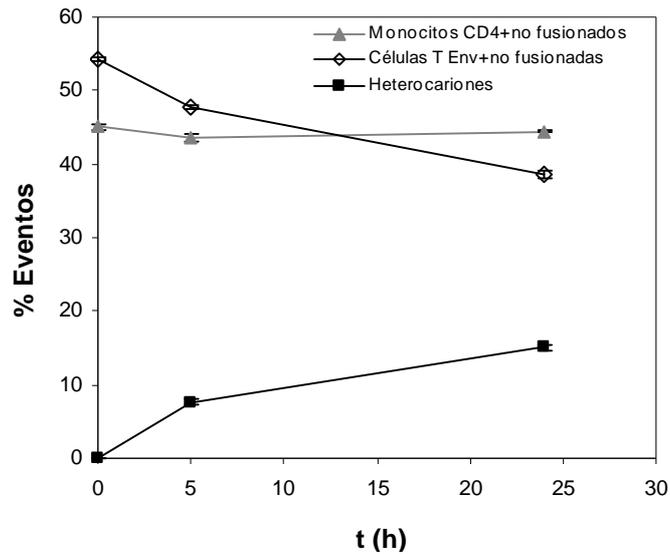
## 7.5. Composición celular de los heterocariones

Conforme avanza el tiempo de cocultivo, ocurre un cambio en el número de células verdes y rojas que se asocia con el progreso de la fusión. Este cambio, puede ser evaluado con respecto a la cantidad inicial de células que se colocan en el cocultivo y, mediante una expresión matemática derivada previamente en nuestro grupo de trabajo, se puede estimar la cantidad de células que se reclutan en los policariones (López-Balderas et al., 2007). Esta ecuación considera al valor  $R_0$ , que corresponde a la proporción inicial de células Env<sup>+</sup> : CD4<sup>+</sup> en el cocultivo, así como a los porcentajes de células fusionadas y no fusionadas al tiempo  $i$ . A través de estos valores obtenidos mediante el análisis por citometría de flujo, se determina finalmente el coeficiente de fusión  $r$ , que define a la relación Env<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>, es decir, a la cantidad de células Env<sup>+</sup> que se fusionan por cada célula CD4<sup>+</sup>. Cuando  $r$  adquiere el valor unitario indica que las células se fusionan en proporción 1:1. Para determinar si el coeficiente de fusión se afecta al colocar en exceso a una de las dos poblaciones celulares, se estudiaron cocultivos con proporciones iniciales Env<sup>+</sup> : CD4<sup>+</sup> aproximadas a 1:4, 1:1 y 4:1.

La figura 16A, muestra que el porcentaje de células Env<sup>+</sup> disminuye conforme ocurre la formación de heterocariones, mientras que el porcentaje de células CD4<sup>+</sup> permanece casi constante a lo largo del tiempo de cocultivo. Este comportamiento sugiere que las células T Env<sup>+</sup> se reclutan en mayor proporción que los monocitos CD4<sup>+</sup>. La figura 16B, muestra el valor del coeficiente de fusión  $r$  en función de la proporción inicial de los cocultivos,  $R_0$ . Se puede observar que las células T Env<sup>+</sup> se

fusionan en mayor proporción que los monocitos, aún cuando estos últimos se adicionan en exceso, tal como se observa en el caso donde  $R_0 = 0.25$  y  $r$  adquiere un valor aproximado a 1.5. Conforme aumenta el valor de  $R_0$ , se fusionan más células  $Env^+$  de tal forma que  $r$  puede alcanzar un valor aproximado de 4. Esto significa que en los cocultivos con proporciones iniciales 4:1 ( $R_0=4$ ), los heterocariones tienen una composición celular promedio de 4 células T  $Env^+$  por cada monocito  $CD4^+$ .

A)



B)

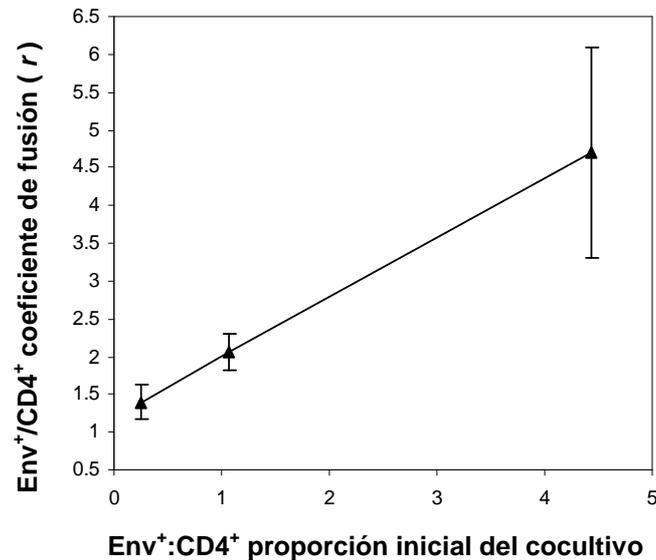


Fig. 16. Composición celular o estequiometría de los heterocariones. A) Cinética de los porcentajes de células fusionadas y no fusionadas en cocultivos de monocitos  $CD4^+$  y células T  $Env^+$  fusogénicas. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes. B) Coeficiente de fusión o índice estequiométrico  $r$  para cocultivos con diferentes proporciones iniciales ( $R_0$ )  $Env^+ : CD4^+$ . El análisis se llevó a cabo después de 5 horas de cocultivo. En este caso, cada punto representa el promedio de tres experimentos independientes.

## 7.6 Análisis de la expresión de receptores

Para determinar si la fusión entre células de origen mieloide y linfoide genera heterocariones que conservan la expresión de moléculas características de ambos linajes celulares, se llevó a cabo el análisis del fenotipo en las tres poblaciones de células en cocultivo. En forma paralela, se analizó el fenotipo de monocitos CD4<sup>+</sup> y células T Env<sup>+</sup> mantenidas en cultivos independientes, como un control de la expresión normal de receptores, sin efecto del cocultivo. Las moléculas de membrana CD3 y CD28 fueron analizadas como marcadores linfoides, mientras que CD4 y CD32 se evaluaron como marcadores expresados por los monocitos. Asimismo, se evaluó la presencia del antígeno intracelular CD68 que ha sido considerado como un marcador mieloide, ya que es expresado en muy bajo nivel por células de origen linfoide (Holness et al., 1993; Pulford et al., 1990). En la tabla 2, se indica el porcentaje de células positivas para cada marcador y en la figura 17 se reporta el índice de fluorescencia media (IFM) como un parámetro relacionado con el nivel de expresión o bien, la cantidad de moléculas expresadas.

**Tabla 2.** Porcentaje de células cocultivadas o en monocultivo (control), que expresan a los diferentes marcadores mieloides y linfoides<sup>a</sup>

Antígeno	MonocitosCD4 <sup>+</sup>		Células T Env <sup>+</sup> fusogénicas		Heterocariones
	Control	Cocultivados	Control	Cocultivados	
	%	%	%	%	%
CD4	87.7 ± 2.9	79.5 ± 3.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	44.1 ± 5.4
CD28	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	98.0 ± 0.9	98.6 ± 0.8	89.4 ± 4.7
CD3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	58.2 ± 6.1	57.0 ± 7.3	52.3 ± 10.0
CD32	93.1 ± 1.6	94.9 ± 2.2	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	95.8 ± 0.8
CD68	87.3 ± 2.0	89.6 ± 4.8	45.0 ± 10.3	45.1 ± 7.4	89.2 ± 5.8

<sup>a</sup> Los cocultivos y monocultivos se analizaron después de 24 horas de incubación. Los resultados reportados representan a la media ± SD de 3 experimentos independientes

A partir de la tabla 2, se observa que las moléculas CD3 y CD28 se encuentran ausentes en la membrana de los monocitos, mientras que CD4 y CD32 no son expresados por las células T Env<sup>+</sup>. En tanto, CD68 se expresa en ambos tipos de células, aunque en mayor cantidad y por un mayor porcentaje de monocitos CD4<sup>+</sup>. Al comparar los porcentajes de células no fusionadas y células control positivas para cada receptor, se puede observar que no hubo cambios por efecto del cocultivo. En el caso de los heterocariones, también se observa que coinciden los porcentajes de células no fusionadas y control con los porcentajes de heterocariones positivos para los receptores CD28, CD3 y CD32. Además, se puede notar que el porcentaje de heterocariones que expresan a la molécula CD68 coincide con el porcentaje de monocitos CD68<sup>+</sup>.

Aunque el receptor CD4 es normalmente expresado por los linfocitos T cooperadores, se puede observar que esta molécula no se encuentra presente en la membrana de las células T Env<sup>+</sup> (tabla 2). Este resultado es consistente con reportes previos en los que las células infectadas por el VIH-1, o transfectadas para expresar a las proteínas gp120/gp41, carecen de la expresión de CD4 a nivel de la membrana plasmática (Cao et al., 1996; Crise et al., 1990; Rivera-Toledo et al., 2010; Stevenson et al., 1988). Por lo tanto, en nuestro modelo de estudio, la expresión de CD4 se encuentra restringida a la población de monocitos. De acuerdo con la tabla 2, mientras que el 88% de los monocitos es positivo para CD4, a las 24 horas de cocultivo tan solo el 44.1% de los heterocariones expresa esta molécula con una IFM $\approx$ 4, lo que equivale a una tercera parte del nivel de expresión detectado en los monocitos no fusionados y control (IFM  $\approx$  12).

Por otro lado, cuando se evaluó el nivel de expresión de los receptores linfoides CD3 y CD28 en la membrana de los heterocariones, se encontró una reducción del 64.3% y del 58.6%, respectivamente, con respecto a las células T Env<sup>+</sup> no fusionadas y control. En cambio, el nivel de expresión de los marcadores mieloides CD32 y CD68, se conservó entre los heterocariones y los monocitos CD4<sup>+</sup> no fusionados y control. La figura 18 muestra el análisis estadístico de los cambios en el nivel de expresión de los marcadores linfoides y mieloides en los heterocariones, con respecto a las células control después de 6 y 24 horas de cocultivo.

En resumen, se puede resaltar que el nivel de expresión de los marcadores linfoides se encuentra reducido de manera importante en la membrana de los heterocariones.

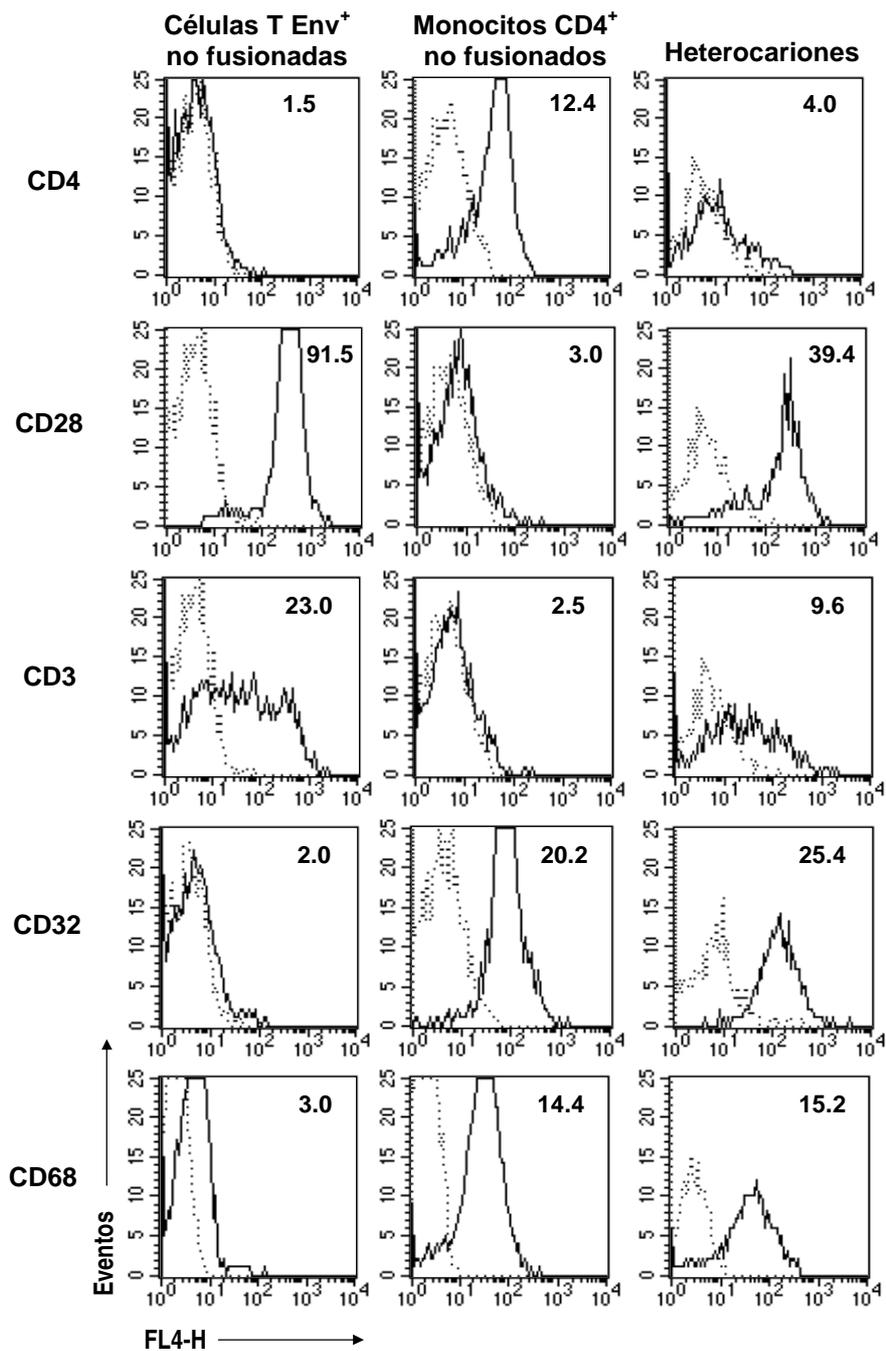


Fig. 17. Expresión de marcadores linfoides y mieloides en cada una de las tres poblaciones celulares presentes en cocultivos incubados durante 24 horas. Se reporta la intensidad de fluorescencia media (IFM). La línea punteada corresponde al control de isotipo.

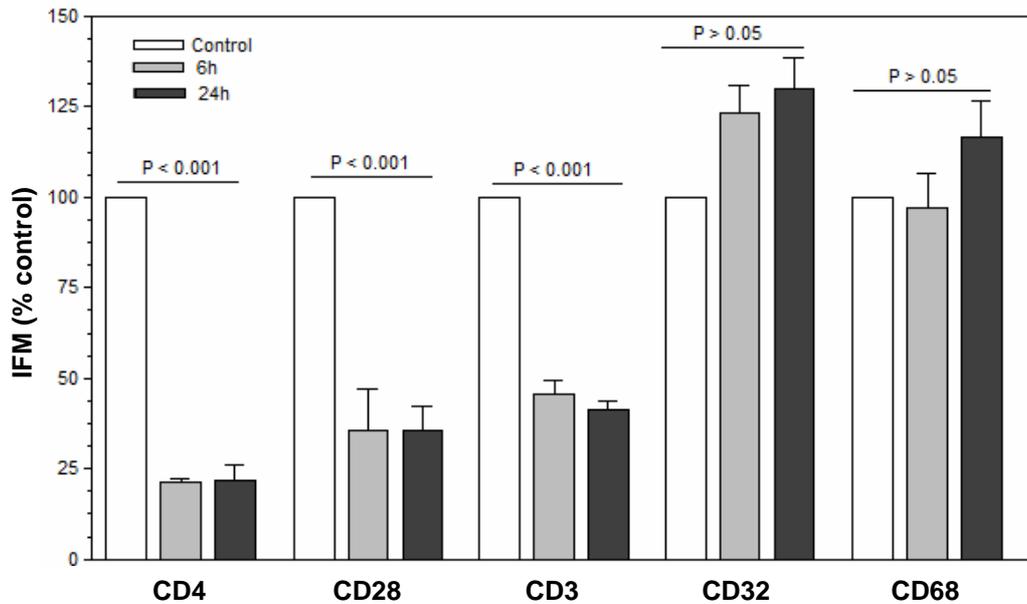


Fig. 18. Niveles de expresión de las moléculas CD4, CD28, CD3, CD32 y CD68 en los heterocariones formados después de 6 y 24 horas de cocultivo. La IFM está expresada como el porcentaje de fluorescencia en los heterocariones con respecto a las células control. Los resultados se reportan como la media±SD de tres experimentos independientes. Los valores de P se calcularon mediante el análisis de varianza.

### 7.7. Respuesta de los heterocariones al estímulo con PMA-ionomicina

La síntesis de la cadena alfa que forma parte del receptor para la IL-2 (CD25), es un evento que ocurre de manera temprana durante la activación de células de origen linfóide (Abraham and Weiss, 2004). Previamente, se ha reportado que las clonas E6 y HXBc2 de la línea celular Jurkat, expresan CD25 en respuesta a varios agentes químicos, incluyendo la combinación del éster de forbol PMA y un ionóforo de calcio como la ionomicina (Abraham and Weiss, 2004; Rivera-Toledo et al., 2010). Considerando que los heterocariones expresan bajos niveles de los marcadores linfoides CD3 y CD28, se llevó a cabo un ensayo para evaluar su capacidad para expresar el marcador de activación CD25. Para esto, los heterocariones fueron enriquecidos en un 75% mediante citometría de flujo y posteriormente fueron tratados con PMA-ionomicina. En forma paralela, se corrieron ensayos con células T Env<sup>+</sup> y monocitos CD4<sup>+</sup> en monocultivo, tratados bajo las mismas condiciones que las células fusionadas. Después de 14 horas, se analizó la expresión de CD25 mediante inmunofluorescencia directa. La figura 19, muestra que el 87.2±3.1% de las células T Env<sup>+</sup> control expresa a la molécula

CD25, mientras que tan solo se expresa en el  $22.0 \pm 1.6\%$  de los heterocariones. Con respecto al nivel de expresión, se observó que los heterocariones expresan aproximadamente 5 veces menor cantidad de CD25 que las células T Env<sup>+</sup>. No se observó expresión de CD25 en los monocitos CD4<sup>+</sup>.

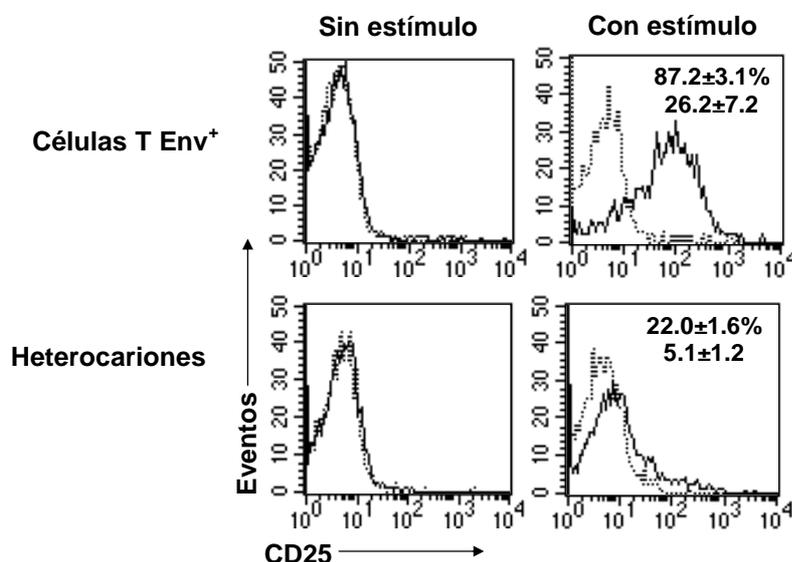


Fig. 19. Efecto del estímulo con PMA-ionomicina sobre la expresión de CD25 en la membrana de heterocariones enriquecidos por citometría de flujo y células T Env<sup>+</sup>. Se reporta el porcentaje de células positivas con su respectiva IFM. Los resultados corresponden a la media ± SD de dos experimentos independientes.

### 7.8 Cambios morfológicos en los cocultivos donde ocurre la formación de los heterocariones

La diferenciación de los monocitos CD4<sup>+</sup> de la línea THP-1 en macrófagos, puede ser inducida mediante el tratamiento con PMA o vitamina D3. Este tratamiento induce cambios fenotípicos y funcionales, tales como el incremento del volumen del citoplasma con respecto al núcleo, mayor adhesión, el aumento de la capacidad fagocítica y la regulación negativa de marcadores de membrana como el TLR-2 y CD14 (Daigneault et al., 2010).

El análisis por microscopía de luz de los cocultivos entre monocitos CD4<sup>+</sup> y células T Env<sup>+</sup> fusogénicas y no fusogénicas, reveló la presencia de numerosas células alargadas, aparentemente adheridas a las placas de cultivo, únicamente en los cocultivos donde se generan los heterocariones.

En cambio, las células de los cocultivos con células T Env<sup>+</sup> no fusogénicas, mantuvieron una forma esférica y se mantuvieron principalmente en suspensión (fig. 20).

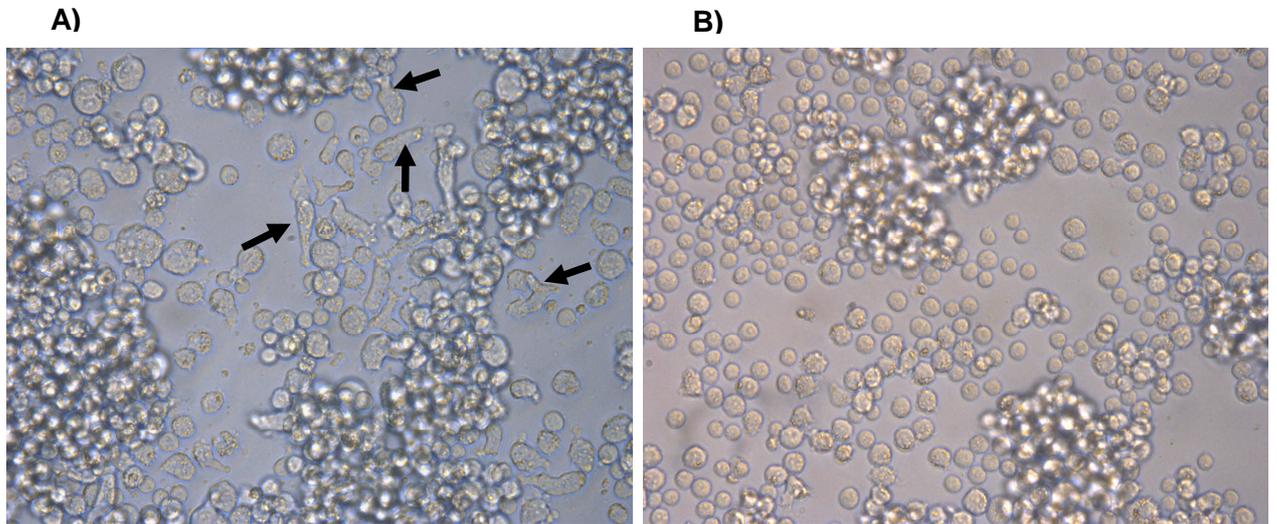


Fig. 20. Cambios morfológicos en los cocultivos donde ocurre la fusión heterotípica. Cocultivos entre monocitos CD4<sup>+</sup> y A) células T Env<sup>+</sup> fusogénicas o B) células Env<sup>+</sup> no fusogénicas. Se resaltan con flechas algunas de las células con morfología extendida.

## VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La formación de células multinucleadas durante la infección por el VIH es un evento que ha sido ampliamente observado tanto en cultivos *in vitro* de linfocitos T, como en el tejido linfoide y del sistema nervioso central de pacientes afectados por el virus (Frankel et al., 1986; Klatzmann et al., 1984; Lifson et al., 1986; Ryzhova et al., 2002). Aunque existen pocos trabajos orientados hacia el estudio del papel que desempeñan estas células fusionadas, se ha sugerido que podrían participar durante la patogénesis del SIDA (Budka et al., 1986; Perfettini et al., 2008; Steain et al., 2008; Zhao et al., 2001). El análisis de los receptores expresados por las células multinucleadas presentes en tejidos, ha sugerido que son originadas por la fusión entre células del linaje mieloide (Bhoopat et al., 2006; Dargent et al., 2000; Frankel et al., 1996; Orenstein and Wahl, 1999), a pesar de que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> son uno de los blancos principales del virus. El presente trabajo de investigación, reporta evidencia de la fusión heterotípica entre monocitos CD4<sup>+</sup> y células T Env<sup>+</sup>, que produce heterocariones con una baja expresión de marcadores linfoides (CD3, CD28, CD25), pero con una expresión conservada de marcadores mieloides (CD32, CD68).

### **8.1. Evidencia de la fusión heterotípica linfocito-monocito *in vitro*, mediada por las proteínas Env del VIH-1**

Previamente, algunos estudios realizados *in vitro* han mostrado que la fusión entre células de diferentes linajes puede llevarse a cabo durante la infección por el VIH. Por ejemplo, en uno de ellos se reportó que los macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica son susceptibles a la infección por el VIH y que, al igual que las células linfoides, expresan en su membrana plasmática las proteínas virales gp120/gp41, lo que les confiere la capacidad para fusionarse con líneas de células T CD4<sup>+</sup> no infectadas (Crowe et al 1992). En caso, se observó que la interacción entre células dendríticas y linfocitos T derivados de piel humana, favorece de manera importante la replicación del VIH-1 sin la necesidad de un estímulo exógeno, y que esta interacción es propensa a la formación de heterocariones en donde ocurre principalmente la producción del virus (Pope et al, 1994). En ambos reportes, el método para estudiar la fusión celular fue la microscopía de fluorescencia o de campo claro.

En el presente trabajo, la fusión heterotípica linfocito-monocito fue evaluada mediante un ensayo cuantitativo por citometría de flujo, que ha sido aplicado previamente para el estudio de la

fusión homotípica linfocito-linfocito, dependiente de las proteínas Env del VIH-1 (Huerta et al., 2002; Huerta et al., 2006; López-Balderas et al., 2007; Rivera-Toledo et al., 2010). De esta manera, se reunió evidencia de que las células doble fluorescentes formadas en los cocultivos entre células T Env<sup>+</sup> fluorescentes en verde y monocitos CD4<sup>+</sup> fluorescentes en rojo, corresponden a verdaderos heterocariones. La posible formación de células doble fluorescentes debida a la fagocitosis de células T por parte de los monocitos, fue descartada cuando se observó que esta población no se genera cuando los monocitos CD4<sup>+</sup> son cocultivados con células T que expresan una mutante no fusogénica de las proteínas Env. Además, mediante ensayos de inhibición se determinó que tanto el receptor CD4 como las proteínas Env expresadas en la membrana de las células T, son responsables de la formación de las células doble fluorescentes. Las concentraciones del péptido T-20 y del anticuerpo anti-CD4 capaces de inhibir el 50% de la fusión heterotípica, fueron congruentes con las concentraciones reportadas para la inhibición de la fusión virus-célula y célula-célula (Hu et al., 2004; Liu et al., 2005). La detección de FRET entre los colorantes DiO y Dil en las células doble fluorescentes, indica que ocurrió la mezcla de las membranas teñidas con cada uno de ellos, apoyando la evidencia de que esta población celular corresponde a heterocariones. Finalmente, el análisis de los cocultivos mediante microscopía de fluorescencia, confirmó la presencia de células multinucleadas con fluorescencia verde y roja cuyo porcentaje coincidió con el obtenido mediante la técnica de citometría de flujo.

Una ventaja de la citometría de flujo es que, además de proporcionar datos cuantitativos de las poblaciones celulares analizadas, también permite evaluar parámetros cualitativos tales como el tamaño, basado en el diámetro de la partícula analizada (señal FSC-H) y la granularidad, dependiente de la complejidad del citoplasma celular (señal SSC-H). En el caso de los heterocariones, se encontró que la media de la distribución de la granularidad es mayor que la media correspondiente a las células no fusionadas, tal como se esperaría después de la fusión entre dos o más células. Sin embargo, la media de la distribución del tamaño (señal FSC-H) no mostró incremento alguno y se mantuvo semejante a la distribución de tamaño de los monocitos CD4<sup>+</sup> no fusionados. Esta discrepancia entre los dos parámetros, se puede explicar por las características propias de los detectores para las señales FSC-H y SSC-H (ver apéndice II). Mientras que un incremento pequeño en el diámetro celular no produce un aumento importante en la señal FSC-H, el evidente incremento en la señal SSC-H se debe a la alta sensibilidad del detector a los cambios en el índice de refracción celular (Robinson et al., 2003). Estos resultados son acordes con las observaciones realizadas por microscopía de fluorescencia, que indican que una gran proporción de las células doble fluorescentes tienen entre 2 y 3 núcleos, sugiriendo que la mayoría de las células fusionadas son pequeñas.

## 8.2. Fenotipo de los heterocariones linfocito-monocito

Como era de esperarse, la fusión entre células mieloides y linfoides genera células que expresan moléculas de ambos linajes celulares. El hallazgo de que el porcentaje de heterocariones que expresa CD3, CD28, CD32 y CD68 es semejante al porcentaje de las células individuales positivas para cada receptor, indica que el proceso de reclutamiento celular durante la fusión es de tipo aleatorio, e independiente de estos receptores. Sin embargo, se encontró que ocurre una reducción importante en la cantidad de moléculas linfoides CD3 y CD28 en la membrana de los heterocariones (de acuerdo con la IFM), con respecto a las células no fusionadas. En cambio, los niveles de expresión de los marcadores mieloides CD32 y CD68 se mantuvieron constantes. Estos resultados sugieren que después de la fusión linfocito-monocito puede activarse un proceso de regulación negativa específico para los marcadores linfoides. Una explicación alternativa podría ser que durante el proceso de fusión, se reclutan principalmente aquellas células T con bajos niveles de expresión de CD3 y CD28. Sin embargo, no se detectó en la población de células T Env<sup>+</sup> no fusionadas una disminución selectiva de células con baja expresión de CD3 o CD28. Por el contrario, las distribuciones de fluorescencia correspondientes a las células no fusionadas y a las células control, mostraron traslapamiento en el caso de ambos receptores.

Con respecto al receptor CD4, se observó que es expresado por el 90% de los monocitos, mientras que las células T Env<sup>+</sup> son negativas para el mismo; por lo tanto, solo puede ser adquirido por los heterocariones a partir de las células mieloides. Sin embargo, se encontró que el contenido de CD4 en las células fusionadas está reducido de manera importante, con respecto a los monocitos CD4<sup>+</sup> control y no fusionados, tanto en porcentaje como en la IFM.

Aunque en este trabajo no se estudiaron los mecanismos responsables de la reducción de la expresión de los receptores, se ha descrito que las células infectadas por el VIH o transfectadas para la expresión de Env, tienen una expresión reducida de CD4 debido a la formación de complejos CD4-gp160 en el retículo endoplásmico, que evitan el transporte de este receptor hacia la membrana plasmática (Crise et al., 1990). La fusión entre las células T Env<sup>+</sup>/CD4<sup>-</sup> y los monocitos CD4<sup>+</sup> podría favorecer la formación de complejos intracelulares Env-CD4 reduciendo la expresión de CD4 en la membrana de los heterocariones. Por otro lado, se ha descrito que durante el proceso de fusión de membranas la gp120 se puede disociar del complejo tri-molecular de fusión (CD4-Env-correceptor) quedando en forma soluble y con la capacidad para interactuar con el CD4, favoreciendo su internalización (Amadori et al., 1992; Cefai et al., 1992; Geleziunas et al., 1994). De esta manera, también es posible considerar que la interacción entre la forma soluble de gp120 y CD4, podría afectar

la unión del anticuerpo anti-CD4 utilizado para evaluar su expresión, o bien, inducir su internalización evitando finalmente su detección en la membrana de los heterocariones.

El receptor CD4 participa en la respuesta quimiotáctica dependiente de PKC frente a la IL-16 (Parada et al., 1996), tanto en células mieloides como en linfoides (Center et al, 1996). Asimismo, se ha reportado que la interacción entre CD4 y la IL-16 puede inhibir la activación de células T en presencia de su antígeno específico (Ogasawara et al, 1999) evitando en consecuencia, la replicación del VIH cuando se estudian células infectadas (Maciaszek et al., 1999). Por lo tanto, la fusión entre linfocitos T infectados con el VIH y monocitos CD4<sup>+</sup>, podría generar heterocariones CD4<sup>-</sup> resistentes a la superinfección por el VIH y además, refractarios a la quimiotaxis frente a la IL-16 y a la actividad antiviral de esta citocina. El hecho de que entre el 70 y el 90% de los monocitos de sangre periférica expresan el receptor CD4 (Kazazi, et al 1989; Tuttle et al., 1998), sugiere que podrían ser susceptibles a la fusión mediada por las proteínas gp120/gp41 durante su infiltración en tejidos.

La participación de las células T en la formación de heterocariones *in vivo*, podría ser difícil de determinar como consecuencia de la baja o nula expresión de los marcadores linfoides. En general, ha sido poco frecuente la búsqueda de receptores linfoides durante el análisis del fenotipo de las células multinucleadas presentes en tejidos de pacientes. Hasta ahora, varios trabajos han mostrado la expresión de marcadores de origen mieloides como HAM-56, RCA-1, MAC-387, CD68, S-100, HLA-DR y lisozima (Dargent et al., 2000; Eilbott et al., 1989; Orenstein and Wahl, 1999; Rinfret et al., 1991), mientras que un solo trabajo reportó la ausencia de CD3 en células multinucleadas presentes en adenoides de pacientes, las cuales fueron identificadas como sincicios derivados de células dendríticas. (Frankel et al., 1996). Estas observaciones no descartan la posibilidad de que ocurra la fusión entre linfocitos infectados y monocitos/macrófagos en sitios de inflamación, en donde ocurre una importante infiltración celular. Sin embargo, la falta de expresión de los marcadores linfoides podría afectar su identificación como heterocariones.

Anteriormente, reportamos que la fusión homotípica entre células T Env<sup>+</sup> y células T CD4<sup>+</sup> genera sincicios que conservan la expresión de sus marcadores linfoides, así como la capacidad para expresar CD25 e IL-2 en respuesta al estímulo con PMA-ionomicina (Rivera-Toledo et al., 2010). Por el contrario, bajo el mismo estímulo de activación, los heterocariones expresaron niveles muy bajos de CD25 con respecto a las células T Env<sup>+</sup> no fusionadas, sugiriendo la pérdida del fenotipo linfoides a pesar de que las células T se fusionan en mayor proporción que los monocitos (ver análisis de la estequiometría). Asimismo, la expresión conservada de los marcadores mieloides CD32 y CD68 indica que el fenotipo mieloides podría ser dominante después de la fusión. Los cambios morfológicos en algunas células presentes en los cocultivos donde ocurre la fusión heterotípica, sugiere que precisamente son los heterocariones quienes adquieren una forma extendida. Esta hipótesis es

apoyada por la observación de que los cultivos de células doble fluorescentes enriquecidas mediante citometría de flujo, contienen principalmente células con forma extendida. Aún así, es necesario llevar a cabo estudios funcionales para determinar si realmente ocurre el predominio del fenotipo mieloide sobre el linfocito.

Bajo nuestras condiciones experimentales, el 50% de los heterocarios permanece viable después de 4 días de cocultivo. De manera interesante, se encontró que la cinética de viabilidad de los heterocarios es semejante a la cinética de las células T Env<sup>+</sup>, sugiriendo que la señal de muerte es iniciada en las células T y puede ser transferida a los heterocarios en donde continúa al proceso de apoptosis.

Este trabajo, sugiere un posible origen heterólogo para las células multinucleadas detectadas en tejidos de individuos infectados por el VIH. Sin embargo, se requiere realizar otros estudios para determinar los mecanismos responsables del cambio en el fenotipo y la funcionalidad de los heterocarios, a fin de entender las implicaciones de estas células multinucleadas en la patogénesis del SIDA.

## IX. CONCLUSIONES

1. Las células T Jurkat que expresan a las proteínas Env del VIH, son capaces de fusionarse *in vitro* con monocitos CD4+/CXCR4+ de la línea THP-1.
2. La fusión heterotípica linfocito-monocito es mediada por las proteínas Env del VIH y por el receptor CD4.
3. Los heterocariones se encuentran compuestos principalmente por células T Env+.
4. El 50% de los heterocariones se mantiene viable después de 4 días de cocultivo.
5. Los heterocariones expresan marcadores linfoides y mieloides.
6. La fusión linfocito-monocito induce la reducción de la cantidad de receptores linfoides CD3 y CD28, expresados por los heterocariones.
7. Los heterocariones tienen una capacidad reducida para expresar a la molécula CD25 en respuesta al estímulo de activación con PMA-ionomicina.
8. Los marcadores mieloides CD32 y CD68 son conservados por los heterocariones, sugiriendo un predominio del fenotipo mieloide.
9. En este trabajo, se sugiere que la fusión linfocito-monocito podría ocurrir *in vivo* durante la infección por el VIH, generando heterocariones con un fenotipo mieloide.

## APÉNDICE I

### ESPECTROS DE EMISIÓN-ABSORCIÓN

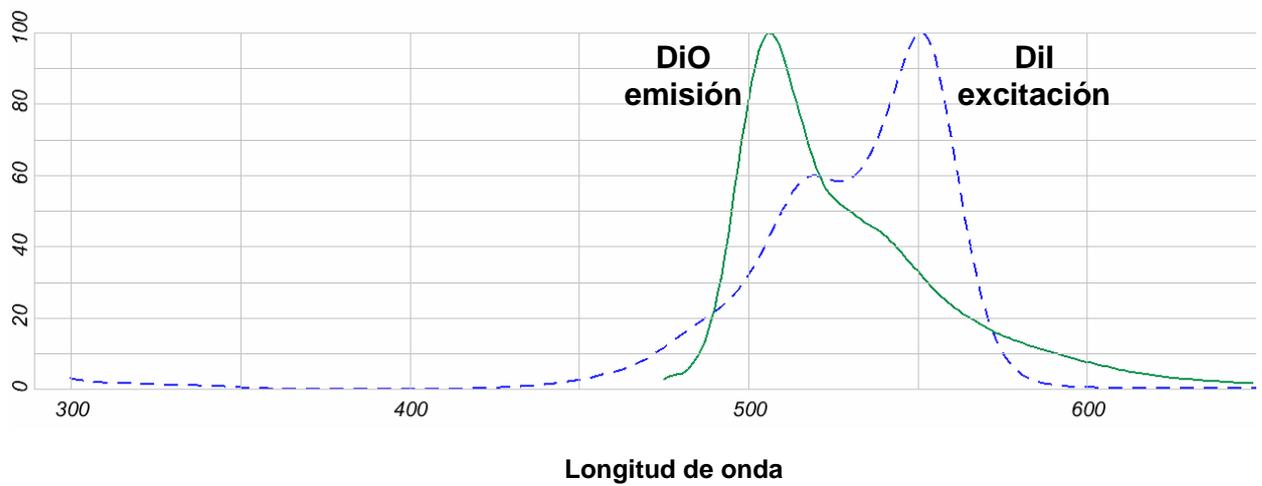


Figura 21. Espectro de emisión del colorante fluorescente DiO-verde y espectro de absorción del colorante fluorescente Dil-rojo. Se observa el traslape entre ambos espectros, lo que explica el fenómeno de FRET. Cuando los colorantes se encuentran a distancias muy cortas, la energía emitida por el DiO puede ser absorbida por el Dil, mostrando mayor intensidad de fluorescencia roja.

## APÉNDICE II

### RESPUESTAS DE LOS DETECTORES DE LAS SEÑALES FSC-H Y SSC-H, EN FUNCIÓN DEL DIÁMETRO DE LA PARTÍCULA ANALIZADA

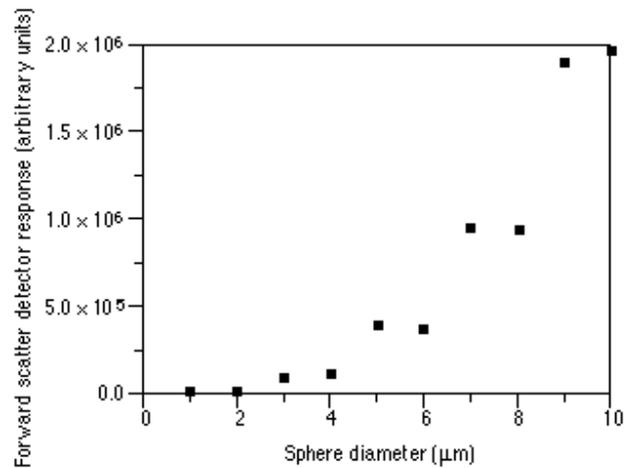


Figura 22. Respuesta del detector para FSC-H (forward scatter) en función del diámetro de las partículas analizadas. En este caso se trata de esferas de poliestireno. Nótese que no hay un incremento constante de la señal con respecto al diámetro de las esferas.

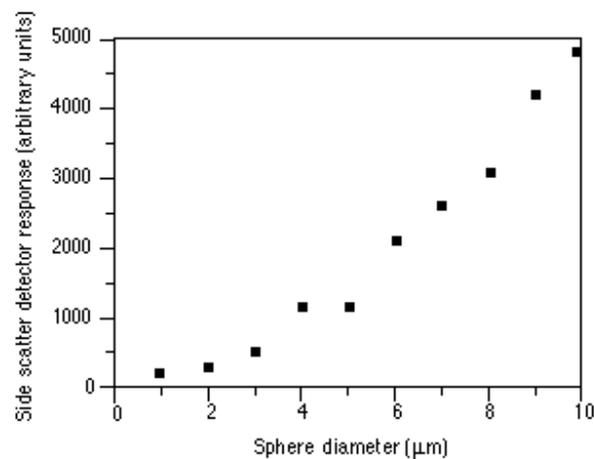


Figura 23. Respuesta del detector para SSC-H (side scatter) en función del diámetro de las partículas analizadas. En este caso se trata de esferas de poliestireno. Nótese el incremento constante de la señal con respecto al diámetro de las esferas (excepto para 4 y 5  $\mu\text{m}$ ).

## REFERENCIAS

Abraham R.T., Weiss A., 2004. Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signaling paradigm. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 301–308.

Alkhatib G., Combadiere C., Broder CC., Feng Y., Kennedy PE., Murphy PM., Berger EA., 1996. CC CKR5: A RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  Receptor as a Fusion Cofactor for Macrophage-Tropic HIV-1. *Science.* 272:955-1958

Amadori A., De Silvestro G., Zamarchi R., Veronese M.L., Mazza M.R., Schiavo G., Panozzo M., De Rossi A., Ometto L., Mous, J., et al., 1992. CD4 epitope masking by gp120/anti-gp120 antibody complexes. A potential mechanism for CD4+ cell function down-regulation in AIDS patients. *J. Immunol.* 148: 2709–2716.

Antinori A, Giancola ML, Alba L, Soldani F, Grisetti S., 2001. Cardiomyopathy and encephalopathy in AIDS. *Ann N Y Acad Sci.* 946:121-129.

Arhel NJ., Souquere-Besse S., Munier S., Souque P., Guadagnini S., Rutherford S., Prévost MC., Allen TD., Charneau P., 2007. HIV-1 DNA Flap formation promotes uncoating of the pre- integration complex at the nuclear pore. *EMBO J.* 26:3025-3037.

Balzarini J., 2007. Targeting the glycans of glycoproteins: a novel paradigm for antiviral therapy. *Nat Rev Microbiol.* 5:583-597

Barker E., Mackewicz CE., Reyes-Terán G., Sato A, Stranford SA., Fujimura SH., Christopherson C., Chang SY, Levy JA., 1998. Virological and Immunological Features of Long-Term Human Immunodeficiency Virus–Infected Individuals Who Have Remained Asymptomatic Compared With Those Who Have Progressed to Acquired Immunodeficiency Syndrome. *Blood.* 92:3105-3114.

Barré-Sinoussi F., Chermann JC., Rey F., Nugeyre MT., Chamaret S., Gruest J., Dauguet C., Axler-Blin C., Vézinet-Brun F., Rouzioux C., Rozenbaum W., Montagnier L., 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science.* 220:868-871.

Bhoopat L., Rithaporn TS., Khunamornpong S., Bhoopat T., Taylor CR., Thorner PS., 2006. Cell reservoirs in lymph nodes infected with HIV-1 subtype E differ from subtype B: identification by combined in situ polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *Mod. Pathol.* 19: 255–263.

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. *PNAS.* 97:1269–1274.

Bleul CC., Wu L., Hoxie JA., Springer TA., Mackay CR., 1997. The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *PNAS.* 94:1925-1930.

Broder CC., Collman RG., 1997. Chemokine receptors and HIV. *J Leukoc Biol.* 62:20-29.

Budka, H., 1986. Multinucleated giant cells in brain: a hallmark of the acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Acta Neuropathol.* 69:253–258.

Bukrinskaya A., 2007. HIV-1 matrix protein: A mysterious regulator of the viral life cycle. *Vir Res.* 124:1-11.

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.

Cayabyab M., Karlsson GB., Etemad-Moghadam BA., Hofmann W., Steenbeke T., Halloran M., Fanton JW., Axthelm MK., Letvin NL., Sodroski JG., 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.* 73:976-984.

Cefai D., Ferrer M., Serpente N., Idziorek T., Dautry-Varsat A., Debre P., Bismuth G., 1992. Internalization of HIV glycoprotein gp120 is associated with down-modulation of membrane CD4 and p56lck together with impairment of T cell activation. *J Immunol.* 149:285-294.

Center RJ., Leapman RD., Lebowitz J., Arthur LO., Earl PL., Moss B., 2002. Oligomeric Structure of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Protein on the Virion Surface. *J Virol.* 76: 7863–7867

Cehimi J, Bandyopadhyay S, Prakash K, Perussia B, Hassan NF, Kawashima H, Campbell D, Kornbluth J, Starr SE., 1991. In vitro infection of natural killer cells with different human immunodeficiency virus type 1 isolates. *65:1812-1822*

Chernomordik LV., Kozlov MM., 2008. Mechanics of membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol.* 15:675-683

Collman R.G., Perno C.F., Crowe SM., Stevenson M., Montaner L.J., 2003. HIV and cells of macrophage/dendritic lineage and other non-T cell reservoirs: new answers yield new questions. *J. Leukoc. Biol.* 74:631–634.

Crise B., Buonocore L., Rose, JK., 1990. CD4 is retained in the endoplasmic reticulum by the human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein precursor. *J. Virol.* 64:5585–5593.

Crowe SM., Mills J., Elbeik T., Lifson JD., Kosek J., Marshall JA., Engleman EG., McGrath M.S., 1992. Human immunodeficiency virus-infected monocyte-derived macrophages express surface gp120 and fuse with CD4 lymphoid cells in vitro: a possible mechanism of T lymphocyte depletion in vivo. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 65:143–151.

Daigneault M., Preston JA., Marriott HM., Whyte MK., Dockrell DH., 2010. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS One.* 5: e8668

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.* 13:1293–1299.

De Witte L., Nabatov A., Pion M., Fluitsma D., De Jong M, De Gruijl T., Piguet V., van Kooyk Y., Geijtenbeek TBH., 2007. Langerin is a natural barrier to HIV-1 transmission by Langerhans cells. *Nat Med.* 13:367-371.

Doranz BJ., Rucker J., Yi Y., Smyth RJ., Samson M., Peiper SC., Parmentier M., Collman RG., Doms RW., 1996. A Dual-Tropic Primary HIV-1 Isolate That Uses Fusin and the b-Chemokine Receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as Fusion Cofactors. *Cell*. 85: 1149–1158

Earl PL., Moss B., Doms RW., 1991. Folding, Interaction with GRP78-BiP, Assembly, and Transport of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Protein. *J Virol*. 65:2047-2055

Eckert DM., Kim PS., 2001. Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. *Annu Rev Biochem*. 70:777-810.

Eilbott DJ., Peress N., Burger H., LaNeve D., Orenstein J., Gendelman HE., Seidman R., Weiser B., 1989. Human immunodeficiency virus type 1 in spinal cords of acquired immunodeficiency syndrome patients with myelopathy: expression and replication in macrophages. *PNAS*. 86:3337–3341

Estes J., Baker JV., Brenchley JM., Khoruts A., Barthold JL., Bantle A., Reilly CS., Beilman GJ., George ME., Douek DC., Haase AT., Schacker TW., 2008. Collagen Deposition Limits Immune Reconstitution in the Gut. *J Infect Dis*. 198:456–464.

Etemad B., Fellows A., Kwambana B., Kamat A., Feng Y., Lee S., Sagar M., 2009. Human immunodeficiency virus type 1 V1-to-V5 envelope variants from the chronic phase of infection use CCR5 and fuse more efficiently than those from early after infection. *J Virol*. 83:9694-9708

Etemad-Moghadam B., Sun Y., Nicholson EK., Fernandes M., Liou K., Gomila R., Lee J., Sodroski J., 2000. Envelope glycoprotein determinants of increased fusogenicity in a pathogenic simian-human immunodeficiency virus (SHIV-KB9) passaged in vivo. *J Virol*. 74:4433-4440.

Fais S., Borghi P., Gherardi G., Logozzi M., Belardelli F., Gessani S., 1996. Human immunodeficiency virus type 1 induces cellular polarization, intercellular adhesion molecule-1 redistribution, and multinucleated giant cell generation in human primary monocytes but not in monocyte-derived macrophages. *Lab. Invest*. 75:783–790.

Fantini J, Cook DG, Nathanson N, Spitalnik SL, Gonzalez-Scarano F. 1993. Infection of colonic epithelial cell lines by type 1 human immunodeficiency virus is associated with cell surface expression of galactosylceramide, a potential alternative gp120 receptor. *PNAS*. 90: 2700-2704.

Feng Y., Broder CC., Kennedy PE., Berger EA., 1996. HIV-1 Entry Cofactor: Functional cDNA Cloning of a Seven-Transmembrane, G Protein- Coupled Receptor. *Science*. 272: 872-877

Ferri KF., Jacotot E., Blanco J., Este JA., Zamzami N., Susin SA., Xie Z., Brothers G., Reed JC., Penninger J.M., Kroemer G., 2000a Apoptosis control in syncytia induced by the HIV type 1-envelope glycoprotein complex: role of mitochondria and caspases. *J. Exp. Med.* 192:1081–1092.

Ferri KF., Jacotot E., Geuskens M., Kroemer G., 2000b. Apoptosis and karyogamy in syncytia induced by the HIV-1-envelope glycoprotein complex. *Cell Death Diff.* 7:1137-1139.

Frankel SS., Wenig B.M., Burke AP., Mannan P., Thompson LD., Abbondanzo SL., Nelson AM., Pope M., Steinman RM., 1996. Replication of HIV-1 in dendritic cell-derived syncytia at the mucosal surface of the adenoid. *Science* 272:115–117.

Frankel SS., Tenner-Racz K., Wenig BM., Hansen CH., Heffner D., Nelson AM., Pope M., Steinmam RM., 1997. Active replication of HIV-1 at the lymphoepithelial surface of the tonsil. *Am. J. Pathol.* 15:89–96.

Furuta RA., Wild CT., Weng Y., Weiss C.D., 1998. Capture of an early fusion-active conformation of HIV-1 gp41. *Nat. Struct. Biol.* 5:276–279.

Gallo SA., Finnegan CM., Viard M., Raviv Y., Dimitrov A., Rawat SS., Puri A., Durell S., Blumenthal R., 2003. The HIV Env-mediated fusion reaction. *Biochim Biophys Acta.* 16:36-50.

Geleziunas R., Bour S., Wainberg MA., 1994. Cell surface down-modulation of CD4 after infection by HIV-1. *FASEB J.* 8:593–600.

Gendelman HE., Lipton SA., Tardieu M., Bukrinsky MI., Nottet HS., 1994. The neuropathogenesis of HIV-1 infection. *J Leukoc Biol.* 56:389-398.

Gendelman HE., Orenstein JM., Martin MA., Ferrua C., Mitra R., Phipps T., Wahl LA., Lane HC., Fauci AS., Burke DS., 1988. Efficient isolation and propagation of human immunodeficiency virus on recombinant colony-stimulating factor 1-treated monocytes. *J Exp Med.* 167:1428-1441.

González-Scarano F., Martín-García J., 2005. The neuropathogenesis of AIDS. *Nat Rev Immunol.* 5:69-81.

Gorry PR., Taylor J., Holm GH., Mehle A., Morgan T., Cayabyab M., Farzan M., Wang H., Bell JE., Kunstman K., Moore JP., Wolinsky SM., Gabuzda D., 2002. Increased CCR5 affinity and reduced CCR5/CD4 dependence of a neurovirulent primary human immunodeficiency virus type 1 isolate. *J Virol.* 76:6277-6292.

Haase AT., 1986. Pathogenesis of lentivirus infections. *Nat.* 322:130-136

Han Y., Lassen K., Monie D., Sedaghat AR., Shimoji S., Liu X., Pierson TC., Margolick JB., Siliciano RF., Siliciano JD. 2004. Resting CD4+ T cells from human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected individuals carry integrated HIV-1 genomes within actively transcribed host genes. *J Virol.* 78:6122-6133.

Haseltine WA., 1991. Molecular biology of the human immunodeficiency virus type 1. *FASEBJ.* 5:2349-2360.

Hassan NF., Chehimi J., Ho WZ., Campbell DE., Douglas SD., 1994. Effect of hematopoietic growth factors on human blood monocytes/macrophages in in vitro culture. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1:620-625

Hersh EM., Mansell P., Reuben JM., Rios PWA., Newell GR., 1984. Immunological characterizations of patients with acquired immune deficiency syndrome, acquired immune deficiency syndrome-related symptom complex, and a related life-style. *Can Res.* 44:5894-5901.

Ho DD., Bredesen DE., Vinters HV., Daar ES., 1989. The acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) dementia complex. *Ann Intern Med.* 111:400-410.

Holness CL., Simmons DL., 1993. Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. *Blood.* 81:1607-1613

Howell AL, Edkins RD, Rier SE, Yeaman GR, Stern JE, Fanger MW, Wira CR. 1997. Human immunodeficiency virus type 1 infection of cells and tissues from the upper and lower human female reproductive tract. *J Virol.* 71: 3498-506.

Hu Q., Frank I., Williams V., Santos J., Watts P., Griffin G., Moore J., Pope M., Shattock R., 2004. Blockade of Attachment and Fusion Receptors Inhibits HIV-1 Infection of Human Cervical Tissue. *J Exp Med.* 199:1065-1075

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., 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.

Jacobs A., Garg H., Viard M., Raviv Y., Puri A., Blumenthal R., 2008. HIV-1 envelope glycoprotein-mediated fusion and pathogenesis: implications for therapy and vaccine development. *Vaccine.* 26:3026-3035.

Jaffe HW., Bregman DJ., Selik RM., 1983. Acquired Immune Deficiency Syndrome in the United States: The First 1,000. *J Infect Dis.* 148:339-345

Kaaya E., Li SL., Feichtinger H., Stahmer I., Putkonen P., Mandache E., Mgaya E., Biberfeld G., Biberfeld P., 1993. Accessory cells and macrophages in the histopathology of SIVsm-infected cynomolgus monkeys. *Res Virol.* 144:81-92.

Karlsson A, Parsmyr K, Sandström E, Fenyö EM, Albert J., 1994. MT-2 cell tropism as prognostic marker for disease progression in human immunodeficiency virus type 1. infection. *J Clin Microbiol.* 32:364-370.

Kazazi F., Mathijs JM., Foley P., Cunningham AL., 1989. Variations in CD4 expression by human monocytes and macrophages and their relationships to infection with the human immunodeficiency virus. *J. Gen. Virol.* 70:2661–2672.

Kido H., Kamoshita K., Fukutomi A., and Katunuma N., 1993. Processing Protease for gp160 Human Immunodeficiency Virus Type I Envelope Glycoprotein Precursor in Human T4+ Lymphocytes. Purification and characterization. *J Biol Chem.* 268:13406-13413

Klatzmann D., Barré-Sinoussi F., Nugeyre MT., Danquet C., Vilmer E., Griscelli C., Brun-Veziret F., Rouzioux C., Gluckman JC., Chermann JC., 1984. Selective tropism of lymphadenopathy associated virus (LAV) for helper-inducer T lymphocytes., *Science*. 225:59-63

Koenig S., Gendelman HE., Orenstein JM., Dal Canto MC., Pezeshkpour GH., Yungbluth M., Janotta F., Aksamit A., Martin MA., Fauci AS., 1986. Detection of AIDS virus in macrophages in brain tissue from AIDS patients with encephalopathy. *Science* 233,:1089–1093.

Koot M, Vos AH, Keet RP, de Goede RE, Dercksen MW, Terpstra FG, Coutinho RA, Miedema F, Tersmette M., 1992. HIV-1 biological phenotype in long-term infected individuals evaluated with an MT-2 cocultivation assay. *AIDS*. 6:49-54.

Koot M, Keet IP, Vos AH, de Goede RE, Roos MT, Coutinho RA, Miedema F, Schellekens PT, Tersmette M., 1993. Prognostic value of HIV-1 syncytium-inducing phenotype for rate of CD4+ cell depletion and progression to AIDS. *Ann Intern Med*. 118:681-688.

Kornbluth RS., Oh PS., Munis JR., Cleveland PH., Richman DD., 1989. Interferons and bacterial lipopolysaccharide protect macrophages from productive infection by human immunodeficiency virus in vitro. *J Exp Med*. 169:1137-1151

Kramer-Hämmerle S., Rothenaigner., Wolff H., Bell JE., Brack-Werner R., 2005. Cells of the central nervous system as targets and reservoirs of the human immunodeficiency virus. *Vir Res*. 111:194-213.

Kwong PD., Wyatt R., Robinson J., Sweet RW., Sodroski J., Hendrickson WA., 1998. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature*. 393:648-659.

Lee B., Sharron M., Montaner LJ., Weissman D., Doms RW., 1999. Quantification of CD4, CCR5, and CXCR4 levels on lymphocyte subsets, dendritic cells, and differentially conditioned monocyte-derived macrophages. *PNAS*. 96: 5215–5220.

Leonard CK., Spellman MW., Riddle L., Harris RJ., Thomas JN., Gregory TJ., 1990. Assignment of Intrachain Disulfide Bonds and Characterization of Potential Glycosylation Sites of the Type 1

Recombinant Human Immunodeficiency Virus Envelope Glycoprotein (gp120) Expressed in Chinese Hamster Ovary Cells. *J Biol Chem.* 265: 10373-10382.

Li Y., Kar AK., Sodroski J., 2009. Target Cell Type-Dependent Modulation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Capsid Disassembly by Cyclophilin A. *J Virol.* 83:10951-10962.

Lifson JD., Feinberg MB., Reyes GR., Rabin L., Banapour B., Chakrabarti S., Moss B., Wong-Staal F., Steimer K.S., Engleman EG., 1986a. Induction of CD4-dependent cell fusion by the HTLV-III/LAV envelope glycoprotein. *Nature* 323:725–728.

Lifson JD., Reyes GR., McGrath MS., Stein BS., Engleman EG., 1986b. AIDS retrovirus induced cytopathology: giant cell formation and involvement of CD4 antigen. *Science* 232: 1123–1127.

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.

Loannidis JP., Reichlin S., Skolnik PR., 1995. Long-term productive human immunodeficiency virus-1 infection in human infant microglia. *Am J Pathol.* 147:1200-1206.

Lopez-Balderas N., Huerta L., Villarreal C., Rivera-Toledo E., Sandoval G., Larralde C., Lamoyi, E., 2007. In vitro cell fusion between CD4(+) and HIV-1 Env(+) T cells generates a diversity of syncytia varying in total number, size and cellular content. *Virus Res.* 123:138–146.

Maciaszek JW., Parada NA., Cruikshank WW., Center DM., Kornfeld H., Viglianti GA., 1999. IL-16 represses HIV-1 promoter activity. *J. Immunol.* 158:5–8.

Malkovský M., Philpott K., Dalgleish AG., Mellor AL., Patterson S., Webster AD., Edwards AJ., Maddon PJ., 1988. Infection of B lymphocytes by the human immunodeficiency virus and their susceptibility to cytotoxic cells. *Eur J Immunol.* 18:1315-1321

Maródi L., Korchak HM, Johnston RB Jr., 1991. Mechanisms of host defense against *Candida* species. I. Phagocytosis by monocytes and monocyte-derived macrophages. *J Immunol.* 146:2783-2789.

Melikyan GB., Barnard RJO., Abrahamyan LG., Mothes W., Young JAT., 2005. Imaging individual retroviral fusion events: From hemifusion to pore formation and growth. *PNAS*. 102: 8728–8733

Melikyan GB., 2008. Common principles and intermediates of viral protein-mediated fusion: the HIV-1 paradigm. *Retrovirology*. 5:111

Moulard M., Decroly E., 2000. Maturation of HIV envelope glycoprotein precursors by cellular endoproteases. *Biochim Biophys Acta*. 1469:121-132

Nguyen DH., Hildreth JEK., 2000. Evidence for budding of human immunodeficiency virus type 1 selectively from glycolipid-enriched membrane lipid rafts. *J Virol*. 74:3264-3272.

Ogasawara, H., Takeda-Hirokawa, N., Sekigawa, I., Hashimoto, H., Kaneko, Y., Hirose, S., 1999. Inhibitory effect of interleukin-16 on interleukin-2 production by CD4+ T cells. *Immunology* 96: 215–219.

Ogle BM., Cascalho M., Platt JL., 2005. Biological implications of cell fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 6:567-575.

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.

Orenstein JM., 2000. In vivo cytolysis and fusion of human immunodeficiency virus type 1-infected lymphocytes in lymphoid tissue. *J. Infect. Dis*. 182:338–342.

Orenstein JM., 2008. Hyperplastic lymphoid tissue in HIV/AIDS: an electron microscopic study. *Ultrastruct Pathol*. 32:161-169.

Pantaleo G., Demarest JF., Vaccarezza M., Graziosi C., Bansal GP., Koenig S., Fauci AS., 1995. Effect of anti-V3 antibodies on cell-free and cell-to-cell human immunodeficiency virus transmission. *Eur. J. Immunol*. 25:226–231.

Parada NA., Cruikshank WW., Danis HL., Ryan TC., Center DM., 1996. IL-16- and other CD4 ligand-induced migration is dependent upon protein kinase C. *Cell Immunol*. 168:100–106.

Penn ML., Grivel JC., Schramm B., Goldsmith MA., Margolis L., 1999. CXCR4 utilization is sufficient to trigger CD41 T cell depletion in HIV-1-infected human lymphoid tissue. *PNAS*. 96: 663–668

Perfettini JL., Castedo M., Roumier T., Andreau K., Nardacci R., Piacentini M., Kroemer G., 2005. Mechanisms of apoptosis induction by the HIV-1 envelope. *Cell Death Differ*. 12:916-923.

Platt EJ., Wehrly K., Kuhmann SE., Chesebro B., Kabat D., 1998. Effects of CCR5 and CD4 cell surface concentrations on infections by macrophagetropic isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*. 72:2855-2864.

Pope, M., Betjes, M.G., Romani, N., Hirmand, H., Cameron, P.U., Hoffman, L., Gezelter, S., Schuler, G., Steinman, R.M., 1994. Conjugates of dendritic cells and memory T lymphocytes from skin facilitate productive infection with HIV-1. *Cell*. 78:389–398.

Pulford KA., Sipos A., Cordell JL., Stross WP., Mason DY., 1990. Distribution of the CD68 macrophage/myeloid associated antigen. *Int. Immunol*. 155: 973–980.

Putkonen P., Kaaya EE., Böttiger D., Li SL., Nilsson C., Biberfeld P., Biberfeld G., 1992. Clinical features and predictive markers of disease progression in cynomolgus monkeys experimentally infected with simian immunodeficiency virus. *AIDS*. 6:257-263

Quagliarello V., 1982. The Acquired Immunodeficiency Syndrome: Current Status. *The Yale Journal of Biology and medicine*. 55:443-452.

Repits J, Sterjovski J, Badia-Martinez D, Mild M, Gray L, Churchill MJ, Purcell DF, Karlsson A, Albert J, Fenyö EM, Achour A, Gorry PR, Jansson M., 2008. Primary HIV-1 R5 isolates from end-stage disease display enhanced viral fitness in parallel with increased gp120 net charge. *Virol*. 379:125-134.

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*. 138:421–426.

Rizzuto CD., Wyatt R., Hernández-Ramos N., Sun Y., Kwong PD., Hendrickson WA., Sodroski J., 1998. A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding. *Science*. 280:1949-1953.

Robinson JP., Darzynkiewicz Z., Dean PN., Dressler LG., Orfao A., Rabinovitch PS., Stewart CS., Tanke HJ., Wheelless LL., 2003. *Current Protocols in Cytometry*. John Wiley & Sons, New York. Unit 1.3.

Roy S., Wainberg A., 1988. Role of the Mononuclear Phagocyte System in the Development of Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS). *J Leukoc Biol*. 43:91-97.

Ruggiero E., Bona R., Muratori C., Federico, M., 2008. Virological consequences of early events following cell-cell contact between human immunodeficiency virus type 1-infected and uninfected CD4+ cells. *J. Virol*. 82:7773–7789.

Ryzhova EV., Crino P., Shawver L., Westmoreland SV., Lackner AA., González-Scarano F., 2002. Simian immunodeficiency virus encephalitis: analysis of envelope sequences from individual brain multinucleated giant cells and tissue samples. *Virology*. 297:57-67.

Sakamoto T., Ushijima H., Okitsu S., Suzuki E., Sakai K., Morikawa S., Müller W., (2003). Establishment of an HIV cell-cell fusion assay by using two genetically modified HeLa cell lines and reporter gene. *J Virol Methods*. 114:159-166.

Scanlan CN., Offer J., Zitzmann N., Dwek RA., 2007. Exploiting the defensive sugars of HIV-1 for drug and vaccine design. *Nature*. 446:1038-1045.

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.

Schröder AR., Shinn P., Chen H., Berry C., Ecker JR., Bushman F., 2002. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell*. 110:521-529

Sodroski J., Goh WC., Rosen C., Campbell K., Haseltine WA., 1986. Role of the HTLV-III/LAV envelope in syncytium formation and cytopathicity. *Nature* 322:470–474.

Soontornniyomkij V., Wang G., Kapadia SB., Achim CL., Wiley CA., 1998. Confocal microscopy assessment of lymphoid tissues with follicular hyperplasia from patients infected with human immunodeficiency virus type 1. *Arch Pathol Lab Med.* 122:534-538.

Stein MC., Wang B., Saksena NK., 2008. The possible contribution of HIV-1-induced syncytia to the generation of intersubtype recombinants in vitro. *AIDS.* 22:1009–1017.

Sterjovski J., Churchill MJ., Ellett A., Gray LR., Roche MJ, Dunfee RL., Purcell DF., Saksena N., Wang B., Sonza S., Wesselingh SL., Karlsson I., Fenyo EM., Gabuzda D., Cunningham AL., Gorry PR., 2007. Asn 362 in gp120 contributes to enhanced fusogenicity by CCR5-restricted HIV-1 envelope glycoprotein variants from patients with AIDS. *Retrovirology.* 4:89.

Stevenson M., Gendelman HE., 1994. Cellular and viral determinants that regulate HIV-1 infection in macrophages. *J Leukoc Biol.* 56: 278-288.

Stevenson M., Meier C., Mann A., Chapman N., Wasiak A., 1988. Envelope glycoprotein of HIV induces interference and cytolysis resistance in CD4+ cells: mechanism for persistence in AIDS. *Cell* 53:483–496

Stevenson M., 2003. HIV pathogenesis. *Nat Med.* 9:853-860

Suzuki Y., Craigie R., 2007. The road to chromatin - nuclear entry of retroviruses. *Nat Rev Microbiol.* 5:187-196.

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.

Tersmette M., de Goede RE., Al BJ., Winkel IN., Gruters RA., Cuypers HT., Huisman HG., Miedema F., 1988. Differential syncytium-inducing capacity of human immunodeficiency virus isolates: frequent detection of syncytium-inducing isolates in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. *J Virol.* 62:2026-2032.

Thomas ER., Dunfee RL., Stanton J., Bogdan D., Taylor J., Kunstman K., Bell JE., Wolinsky SM., Gabuzda D., 2007. Macrophage entry mediated by HIV Envs from brain and lymphoid tissues is determined by the capacity to use low CD4 levels and overall efficiency of fusion. *Virology*. 360:105-119.

Todd BJ., Kedar P., Pope JH., 1995. Syncytium induction in primary CD4+ T-cell lines from normal donors by human immunodeficiency virus type 1 isolates with non-syncytium-inducing genotype and phenotype in MT-2 cells. *J Virol*. 69:7099-7105

Tuttle DL., Harrison JK., Anders C., Sleasman JW., Goodenow MM., 1998. Expression of CCR5 increases during monocyte differentiation and directly mediates macrophage susceptibility to infection by immunodeficiency virus type 1. *J. Virol*. 72:4962–4969.

UNAIDS, epidemic update., 2009.

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.

Wang WK., Chen MY., Chuang CY., Jeang KT., Huang LM., 2000. Molecular biology of human immunodeficiency virus type 1. *J Microbiol Immunol Infect*. 33:131-140.

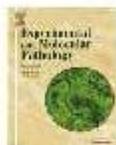
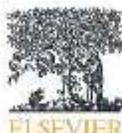
Ward JM., O'Leary TJ., Baskin GB., Benveniste R., Harris CA., Nara PL., Rhodes RH., 1987. Immunohistochemical localization of human and simian immunodeficiency viral antigens in fixed tissue sections. *Am J Pathol*. 127:199-205.

Wu P., Brand L., 1994. Resonance energy transfer: methods and applications. *Anal. Biochem*. 218:1–13.

Zhao ML., Kim MO., Morgello S., Lee SC., 2001. Expression of inducible nitric oxide synthase, interleukin-1 and caspase-1 in HIV-1 encephalitis. *J Neuroimmunol*. 115:182-191.

Zolla-Pazner S., 2004. Identifying epitopes of hiv-1 that induce protective antibodies. *Nat Rev*. 4:199-210.

# ARTÍCULOS PUBLICADOS



## Quantitative and phenotypic analyses of lymphocyte–monocyte heterokaryons induced by the HIV envelope proteins: Significant loss of lymphoid markers

Evelyn Rivera-Toledo, Leonor Huerta<sup>\*</sup>, Carlos Larralde, Edmundo Lamoyi

Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado postal 70228, Ciudad Universitaria, Distrito Federal, CP 04510, México

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 6 July 2010

Available online 24 November 2010

#### Keywords:

HIV  
Heterokaryons  
Cell–cell fusion  
Jurkat T cells  
THP-1 monocytes  
Giant cells  
Multinucleated cells  
CD4  
CD3  
CD25  
CD28  
CD32  
CD68

### ABSTRACT

Cells infected with the human immunodeficiency virus (HIV) can fuse with CD4<sup>+</sup> cells leading to the formation of multinucleated cells. The presence of multinucleated cells infected with HIV in tissues of patients has been documented, although their cellular composition and role in AIDS pathogenesis is still under study. Here, we present evidence of *in vitro* heterotypic lymphocyte–monocyte fusion in cocultures of lymphocytic Jurkat T cells expressing the HIV-1 gp120/gp41 glycoproteins (Env) and CD4<sup>+</sup> monocytic THP-1 cells. Using a previously characterized method that involves differential labeling of fusion partners with fluorescent probes and flow cytometry analysis after coculture, up to 20% of double fluorescent cells were detected in 48 h. This double fluorescent cell population was produced by heterotypic lymphocyte–monocyte fusion as it was not observed when Jurkat T cells expressing a mutant non-fusogenic Env protein were used. Heterokaryon formation was inhibited by an anti-CD4 monoclonal antibody and the HIV-fusion inhibitor peptide T-20. About 68% of heterokaryons remained alive and non-apoptotic after 2 days of coculture. In heterokaryons, CD4 was barely detectable and the expression of the CD3 and CD28 lymphoid markers was greatly reduced, whereas the expression of CD32 and the intracellular antigen CD68, both markers of monocytic cells, remained unchanged. In contrast with unfused T cells, heterokaryons only expressed very low levels of the lymphoid activation marker CD25 following treatment with PMA plus ionomycin. These studies point to the possible generation of lymphocyte–monocyte heterokaryons with a myeloid phenotype during HIV infection, with unknown consequences for AIDS pathogenesis.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

### Introduction

Cells infected by the human immunodeficiency virus (HIV) express the Env glycoprotein on their membrane, composed of the gp120 and gp41 subunits. These allow them to interact with uninfected CD4<sup>+</sup> and chemokine receptor<sup>+</sup> cells, promoting membrane fusion and the formation of multinucleated cells or polykaryons. Fusion between HIV-infected and non-infected lymphoid cells forming syncytia is a conspicuous event *in vitro* (Lisbon et al., 1986; Sodroski et al., 1986). The appearance in patients' blood of HIV strains able to induce fusion of lymphoid cells *in vitro*, associates with rapid CD4<sup>+</sup> T cell depletion and AIDS progression (Blaak et al., 2000; Karlsson et al., 1994; Koot et al., 1992). Histochemical analysis of lymphoid and central nervous system tissues from patients has revealed HIV-infected multinucleated cells in early and late stages of infection (Budka, 1986; Dargent et al., 2000; Koenig et al., 1986;

Rinfret et al., 1991). The role of multinucleated cells in HIV-infected patients is not clear. There is evidence suggesting that fused cells could play a role in HIV pathogenesis by acting as virological reservoirs supporting active viral replication (Budka, 1986; Frankei et al., 1996, 1997), by producing inflammatory cytokines along with tissue damage (Zhao et al., 2001), by acting as favorable sites for viral recombination (Steain et al., 2008), by reducing the number of free single CD4<sup>+</sup> cells (Sylwester et al., 1997) and by contributing to apoptosis of fused cells (Perletti et al., 2008). Regarding the cell type giving origin to multinucleated cells, it has been shown that they have macrophage lineage markers (Dargent et al., 2000; Elliott et al., 1989; Orenstein and Wahl, 1989; Rinfret et al., 1991), although other studies support a dendritic cell origin (Bhoopar et al., 2005; Frankel et al., 1996, 1997). Additionally, the presence of HIV p24-positive multinucleated lymphocytes in lymphoid tissues has been reported (Orenstein, 2000).

Helper T lymphocytes and cells of the monocyte–macrophage lineage express receptors for HIV and are the main targets of the virus (Collman et al., 2003). It is conceivable that an Env-expressing infected cell may interact with the CD4 and coreceptor molecules on cells from the same or from a different lineage, so that homotypic and heterotypic cell–cell fusion between infected and uninfected cells of any of these types, could take place *in vivo*. In heterokaryons, the

<sup>\*</sup> Corresponding author. Immunology Department, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70228, Distrito Federal, C.P. 04510, México. Fax: +52 555 56 22 82 22-4472.

E-mail addresses: [evelyn\\_rto@yahoo.com.mx](mailto:evelyn_rto@yahoo.com.mx) (E. Rivera-Toledo), [leonorhh@biomedicas.unam.mx](mailto:leonorhh@biomedicas.unam.mx) (L. Huerta), [clarralde@prodigy.net.mx](mailto:clarralde@prodigy.net.mx) (C. Larralde), [lamoyi@biomedicas.unam.mx](mailto:lamoyi@biomedicas.unam.mx) (E. Lamoyi).

phenotype of both parental cells could be coexpressed or one of them may become dominant (Blau and Bakely, 1999; Terranova et al., 2006). Previous *in vitro* studies have shown HIV-mediated fusion between dendritic cells (Pope et al., 1994) or monocyte-derived macrophages (Crowe et al., 1992) with T cells.

*In vitro* studies of syncytia formation by fusion of lymphocytic cells showed that cell–cell fusion is a highly heterogeneous process, generating syncytia populations with a wide range of sizes and cellular composition (Huerta et al., 2006; López-Balderas et al., 2007). We have proposed that the fate and biological significance of fused is related to the type, physiological status and relative proportion of the fusion partners composing the syncytia. These factors, along with the actual extent of fusion in a given compartment, would determine the effect of cell–cell fusion on viral replication, cell viability and function of the fused cells (Huerta et al., 2009; López-Balderas et al., 2007).

In previous reports, we have shown that the quantitative analysis of the *in vitro* fusion between HIV-1-envelope expressing and target lymphocytes can be performed with an assay combining flow cytometry with fluorescence resonance energy transfer (FRET) (Huerta et al., 2002, 2006; López-Balderas et al., 2007), using a pair of lipophilic probes for differential labeling of the fusion partners. This methodology can be extended to a triple color assay to enable detection of surface molecules on the fused cells (Rivera-Toledo et al., 2010). Here, we used this approach to explore the generation of heterokaryons produced by the fusion of Env-expressing T cells with CD4<sup>+</sup> monocytes, and to study their properties, focusing on the kinetics of heterokaryon generation, viability, fusion stoichiometry (cellular composition) and immunophenotype.

## Materials and methods

### Cell lines

HIV-1-Env transfected Jurkat T cell lines HXBc2 and 522 F/Y were obtained from Dr. Joseph Sodroski through the AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH. These cell lines are stably transfected with a regulator plasmid containing a tetracycline-dependent repressor sequence and with a response plasmid containing tetracycline operator sequences, linked to a human cytomegalovirus minimal promoter controlling the HIV-1 *env* and *rev* genes from the X4-tropic HXBc2 strain. The 522 F/Y cell line expresses a mutant Env protein with an F/Y substitution at a amino acid 522 located in the fusion peptide of gp41, which is unable to mediate membrane fusion (Cao et al., 1996). Expression of Env on HXBc2 and 522 F/Y cell lines, as determined by immunoprecipitation and flow cytometry assays, has been documented before (Cao et al., 1996; Huerta et al., 2009). The CD4<sup>+</sup>/CXCR4<sup>+</sup> THP-1 monocytic cell line (CD4<sup>+</sup> monocytes) was obtained from the American Type Culture Collection. In the following text, HXBc2 and 522 F/Y cells will be named fusogenic Env<sup>+</sup> T and non-fusogenic Env<sup>+</sup> T cells, respectively.

### Cell culture

Fusogenic and non-fusogenic Env<sup>+</sup> T cells were cultured in RPMI 1640 (Gibco BRL) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco BRL), 60 U/ml penicillin and 60 µg/ml streptomycin and 200 µg/ml of the selection antibiotics G418 and hygromycin. Cells were grown in the presence of 1 µg/ml of tetracycline, the Env expression suppressor (Cao et al., 1996). To induce Env expression, cells were washed twice with PBS to remove tetracycline and incubated for 2 days in RPMI-10 before labeling with fluorescent probes as described subsequently. Labeled cells were incubated for an additional 24 h before experiments. The growth medium for the CD4<sup>+</sup> monocytes was RPMI 1640 supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin,

100 µg/ml streptomycin, 2 mM l-glutamine, 100 µM nonessential amino acids and 1 mM sodium pyruvate.

### Cell labeling

The red fluorescent 1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI) and the green fluorescent 3,3'-dioctadecyl-oxa-carbocyanine perchlorate (DiO) lipophilic dyes (Molecular Probes, Eugene, OR), were used to label CD4<sup>+</sup> monocytes and Env<sup>+</sup> T cells, respectively, as described before (Huerta et al., 2002, 2006; López-Balderas et al., 2007). Briefly, after 48 h of tetracycline deprivation, 16 µl and 8 µl of a 3.5 mg/ml DiO or DiI solution in dimethyl sulfoxide (DMSO) were added to 5–15 × 10<sup>6</sup>/ml Env<sup>+</sup> T cells or CD4<sup>+</sup> monocytes resuspended in 1 ml of growth medium, respectively. Cell suspensions were incubated at room temperature in darkness for 18 min with gentle shaking, washed twice with ten volumes of culture medium and incubated overnight at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. In order to evaluate fluorescence resonance energy transfer (FRET) from DiO to DiI, different batches of fusogenic Env<sup>+</sup> T cells were labeled with increasing concentrations of DiO (5.2, 15.6 and 31.2 µM), whereas CD4<sup>+</sup> monocytes were labeled with a constant concentration of 3.1 µM of DiI (Huerta et al., 2006).

### Cell–cell fusion assay and flow cytometry

DiO-labeled Env<sup>+</sup> T cells and DiI-labeled CD4<sup>+</sup> monocytes were cocultured at a ratio of 1:1 (4 × 10<sup>5</sup> cells from each fusion partner), unless otherwise specified, in 48-well plates in 800 µl of AIM-V serum-free medium (Gibco) at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. Cocultures were analyzed for the presence of double fluorescent cells at 5, 24 or 48 h. For cell–cell fusion inhibition experiments, CD4<sup>+</sup> monocytes were preincubated for 30 min with the indicated concentrations of T-20 (Enfuvirtide) or anti-CD4 monoclonal antibody, clone RPA-T4 (BD Biosciences). The effect of the inhibitors was analyzed after 24 h of coculture. After coculture, cells were collected from plates, washed with PBS and analyzed by flow cytometry. Adjustment for autofluorescence was carried out using unlabeled cells. Single-labeled cells that were not cocultured were used to compensate for the optimal separation of red and green fluorescent signals. Loosely aggregated cells were dissociated by gently pipetting immediately before FACS analysis. Ten thousand events were collected (10,000 events) using a FACScalibur (BD Biosciences) equipped with a dual laser system emitting at 488 and 635 nm. DiI (-FL2-H) versus DiO (-FL1-H) fluorescence dot plots were created to discriminate between unfused (red or green single fluorescent) and heterotypically fused (double fluorescent) cells.

### Immunophenotyping

In order to determine receptor expression, cocultured cells were collected from wells and washed in 2 ml of cold PBS containing 0.1% sodium azide. Samples were stained at 4 °C for 30 min with allophycocyanin (APC)-conjugated monoclonal antibodies against human CD4, CD3, CD28 and CD32 receptors at concentrations according to the manufacturer's instructions (all antibodies were supplied by BD Pharmingen, San Jose CA). Staining solution included 2% normal calf serum to block nonspecific binding. To evaluate intracellular CD68 expression, samples were fixed at 4 °C for 15 min with 4% paraformaldehyde and permeabilized with 0.25% saponin at 37 °C for 15 min. Indirect immunofluorescence was performed by incubation with the anti-CD68 monoclonal antibody (0.5 µg/10<sup>6</sup> cells) for 30 min, washing once and adding the secondary antibody APC-goat anti-mouse Ig (0.25 µg/10<sup>6</sup> cells) for 30 min. Analysis was performed by gating the fused population and creating fluorescence histograms (APC-FL4-H) to determine percentage of positive cells and the respective geometric mean fluorescence intensity. The mean

fluorescence intensity index (MFI index) was calculated as the ratio of the geometric mean fluorescence intensity of the specific monoclonal antibody and the geometric mean fluorescence intensity of the isotype-matched control antibody.

#### Fusion stoichiometry calculation

Changes in the number of cells remaining unfused as fusion progresses,  $r$  relative to their initial amounts, can be used to calculate the number of cells recruited into syncytia in short-term experiments. Previously, we derived an expression that allows the calculation of the ratio of cells incorporated in the polykaryon population, using the coculture ratio value ( $R_0$ ) and the percentages of unfused and fused cells obtained at time  $t$  (López-Balderas et al., 2007). In this work, the fusion coefficient  $r$  denotes the Env<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> average ratio of cells recruited into heterokaryons, and has a value of 1 when the two fusion partners are equally fused. The effect of the presence of an excess of one of the fusion partners on fusion stoichiometry, was determined using Env<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> coculture ratios of 1:4, 1:1 and 4:1. Analysis was achieved at an early coculture time (5 h) when proliferation or cell death is negligible and changes in the fusion partner concentration can be considered as a consequence of cell–cell fusion (López-Balderas et al., 2007).

#### Apoptosis analysis

Double staining with Cy5-labeled-annexin V (Cy5-annexin V) and 7-AAD (both from BD Pharmingen, San Jose CA) was employed to evaluate subpopulations of cells undergoing apoptosis and those suffering loss of membrane integrity in cocultures of DiO-labeled Env<sup>+</sup> T cells and DiI-labeled CD4<sup>+</sup> monocytes. Cells washed with 2 ml of PBS were resuspended in 800  $\mu$ l of binding buffer (0.1 M HEPES pH 7.4, 14 M NaCl, 25 mM CaCl<sub>2</sub>). Annexin V and 7-AAD were added at a concentration of 1  $\mu$ l/10<sup>5</sup> cells and incubated at room temperature in darkness for 15 min before FACS analysis. In this assay, non-apoptotic cells are 7-AAD- and annexin V-negative cells, whereas early apoptotic cells are 7-AAD-negative and annexin V-positive. Cells in late apoptosis are positive for the two indicators (Schmid et al., 1994; van Engel et al., 1998). Proper separation of the 7-AAD and annexin V signals was obtained by compensation using DiO-labeled Env<sup>+</sup> and DiI-labeled CD4<sup>+</sup> single cells induced to apoptosis by previous incubation with camptothecin (Sigma), at 3.1  $\mu$ g/ml for 14 h at 37 °C.

#### Fluorescence microscopy

Cells from 24 h cocultures were treated with 10  $\mu$ M Hoechst 33342 (Molecular Probes, Eugene, OR) at 37 °C for 15 min to stain DNA, and the number of single red, single green, and double fluorescent multinucleated cells was determined by fluorescence microscopy.

#### Cell sorting and stimulation by PMA-ionomycin

Cells from 24 h cocultures were transferred to a centrifuge tube, washed once with PBS and finally resuspended in PBS at a concentration of  $1 \times 10^6$  cells/ml. The double fluorescent cell population was sorted using a FACSAria flow cytometer (Becton Dickinson). A 76% of heterokaryon enrichment was obtained. CD25 expression was induced by stimulation with 16 nM PMA and 268 nM ionomycin for 14 h in serum-free AIM-V medium. Control Env<sup>+</sup> T cells were stimulated in parallel. Adhered cells were detached by incubation with 0.1 mM EDTA in PBS for 10 min at 37 °C. Direct immunofluorescence with a monoclonal anti-CD25 antibody coupled to APC was performed as described before. In order to analyze viable cells, propidium iodide was added at a final concentration of 0.5  $\mu$ g/ml 15 min before flow cytometry analysis. Sixty five to seventy percent of heterokaryons were viable under these conditions.

#### Statistical analyses

Differences between groups were analyzed for significance by ANOVA ( $P < 0.05$ ), using GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc).

#### Results

##### Flow cytometry analysis of Env-mediated heterokaryon formation

Cell–cell fusion was studied in cocultures of HIV-Env-expressing Jurkat cells with THP-1 CD4<sup>+</sup> monocytes (denoted here as Env<sup>+</sup> T cells and CD4<sup>+</sup> monocytes, respectively). Fusion was quantified using a previously characterized method based on the differential labeling of fusion partners with the DiO and DiI lipophilic dyes, followed by the enumeration of the fused (double fluorescent particles) and unfused cells (single fluorescent particles) by flow cytometry. In this assay, FRET arises when a 488 nm laser light is used to excite the fluorochromes during analysis, causing a clear increase of the DiI-red fluorescence in fused but not in aggregated cells (Huerta et al., 2006).

About 6% of double fluorescent cells were detected in cocultures of DiO-labeled Env<sup>+</sup> T cells with DiI-labeled CD4<sup>+</sup> monocytes after 5 h. This percentage increased with time, reaching up to 20% after 2 days with most of double fluorescent cells (12 to 15%) arising in the first 24 h (Fig. 1A). In contrast, only a background level of double fluorescent cells (1 to 2%) was observed when monocytes were cocultured with Env<sup>+</sup> T cells expressing a mutant Env glycoprotein that is unable to mediate fusion, even after 2 days of coculture (Fig. 1B).

About 50% of the double fluorescent cells generated in cocultures of fusogenic Env<sup>+</sup> lymphocytes with CD4<sup>+</sup> monocytes exhibited higher granularity than single cells, as indicated by its SSC-H signal (Fig. 1A). However, the FSC-H signal of most of the double fluorescent particles overlaps with that of single monocytes. This apparent discrepancy is explained by the non-monotonic nature of the forward-scatter detector response, so that small increases in particle diameter do not produce important increments of the FSC-H signal, while the clear increment in the SSC-H signal is related to its high sensitivity to variations in the particle refractive index (Robinson et al., 2003).

To determine the mixing of membranes in double fluorescent cells, the appearance of FRET between the DiI and DiO lipophilic dyes was evaluated by incubation of DiI-CD4<sup>+</sup> monocytes with fusogenic Env<sup>+</sup> T cells labeled with increasing concentrations of DiO (Huerta et al., 2006). As shown in Fig. 2, the mean DiI-red fluorescence intensity increased up to 7 times with respect to that of the red cells that remained single fluorescent (unfused red cells) and the enhancement was proportional to the DiO concentration, an indication of FRET. A background of FRET-negative double fluorescent cell population was also generated, which comprised about 2% of total cells.

Double fluorescent cells containing two or more nuclei were observed under microscopic examination of cocultures, confirming the generation of heterokaryons (Fig. 3). The percentage of double fluorescent cells obtained by flow cytometry agreed with that obtained by cell counting under fluorescence microscopy (12.15% and 12.86%, respectively, for a 24 h coculture).

##### Inhibition of heterokaryon formation by an anti-CD4 mAb and the HIV fusion inhibitor T-20

Fig. 4 shows that heterokaryon formation was inhibited by an anti-CD4 monoclonal antibody that blocks cellular infection by HIV (Hu et al., 2004) and by T-20, a synthetic peptide that targets the N-terminal heptad repeat region of gp41 and specifically interferes with the fusion process (Furuta et al., 1998). Both molecules inhibited the heterotypic fusion with similar IC<sub>50</sub> values (7.8 and 6.6 nM, respectively). Double fluorescent cells formed in cocultures of CD4<sup>+</sup> monocytes with non-

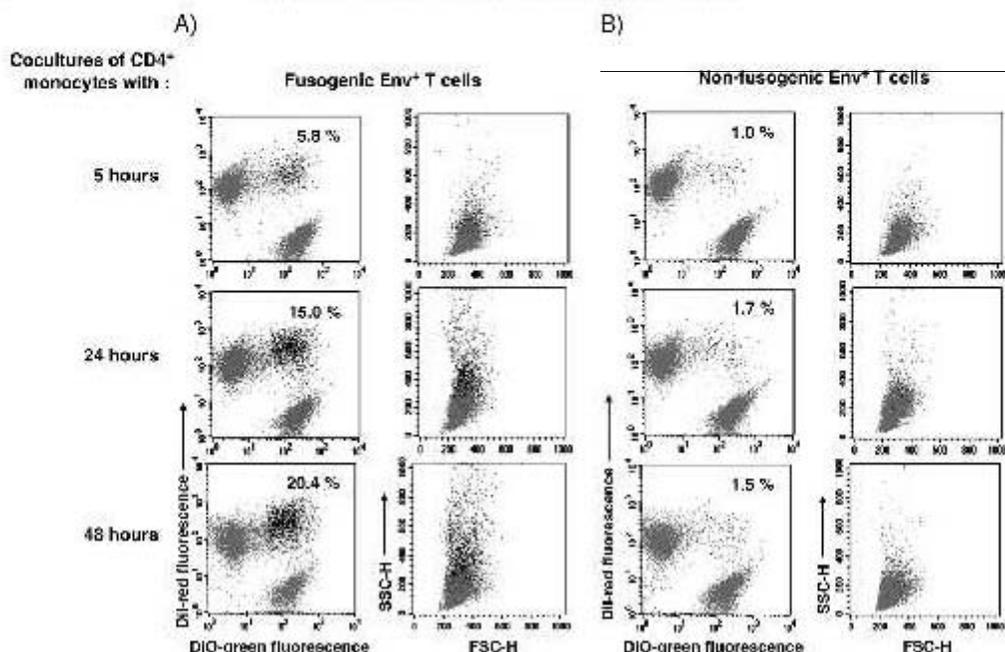


Fig. 1. FACS analysis of fusion between Jurkat Env<sup>+</sup> T cells and CD4<sup>+</sup> monocytes. A) Cocultures of fusogenic DIO-Env<sup>+</sup> T cells with D8-CD4<sup>+</sup> monocytes. B) Cocultures of non-fusogenic DIO-Env<sup>+</sup> T cells with D8-CD4<sup>+</sup> monocytes. Percent of double fluorescent cells (black dots) is indicated. Grey dots correspond to unfused cells. Plots on the right of each panel show size (FSC-H) versus granularity (SSC-H) profiles of unfused and fused cell populations. Representative data from four different experiments are shown.

fusogenic Env<sup>+</sup> T cells were unaffected by these molecules (Fig. 4), indicating that they corresponded to non-specifically aggregated cells.

#### Heterokaryon viability

Apoptosis and loss of membrane integrity were simultaneously determined on heterokaryons and unfused cells in cocultures, using the dual staining with Cy5-annexin V and 7-AAD in a four-color flow

cytometry assay (Fig. 5 and Table 1). Heterokaryons showed a progressive reduction in viability throughout the culture time. Sixty eight and fifty percent of heterokaryons remained negative for 7-AAD incorporation and annexin V-binding after 48 and 96 h of coculture, respectively (Fig. 5B). During the first 48 h, the heterokaryon's viability was similar to that of unfused cocultures as well as control monocultured Env<sup>+</sup> T cells, which also showed decreased viability with time. In contrast, the viability of the unfused and control CD4<sup>+</sup> monocytes remained higher than 90% (Table 1).

#### Heterokaryon cellular composition

To assess the overall cellular composition of heterokaryons, the Env<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> ratio of incorporation of fusion partners into syncytia, or stoichiometry coefficient  $r$ , was calculated on the basis of the percentage of fused cells and the change in the percentage of the red and green cells that remained unfused with respect to the initial coculture ratio (López-Balderas et al., 2007), at 5 h of coculture. Fig. 6A shows that the percentage of Env<sup>+</sup> T cells decreases after the first 5 h of coculture, when fused cells have appeared, whereas the percentage of the CD4<sup>+</sup> monocyte population shows only a minor change, suggesting the recruitment of a higher number of Env<sup>+</sup> T cells than CD4<sup>+</sup> monocytes into heterokaryons. Fig. 6B shows the stoichiometry coefficient  $r$  obtained in cocultures with different coculture ratios ( $R_0$ ). It can be seen that several Env<sup>+</sup> T cells are recruited per each CD4<sup>+</sup> monocyte, even in conditions where CD4<sup>+</sup> monocytes are in excess. The Env<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> ratio of recruitment into heterokaryons increased as the Env<sup>+</sup>:CD4<sup>+</sup> coculture ratio was raised. A four-fold excess of Env<sup>+</sup> T cells in cocultures results in heterokaryons with an average cellular composition of 4 Env<sup>+</sup> T cells per each CD4<sup>+</sup> monocyte.

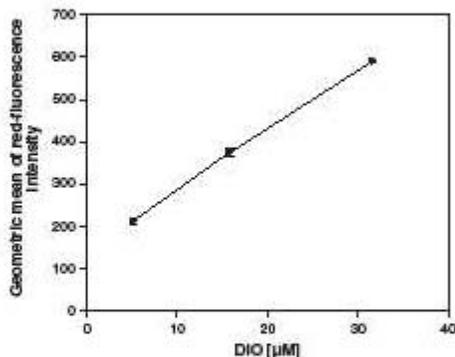


Fig. 2. D8-red fluorescence intensity of heterokaryons formed in cocultures of CD4<sup>+</sup> monocytes labeled with a single concentration of D8, with fusogenic Env<sup>+</sup> T cells labeled with increasing concentrations of DIO. The geometric mean of the red fluorescence intensity of unfused CD4<sup>+</sup> monocytes was 73. Results are shown as averages of duplicates from a representative experiment.

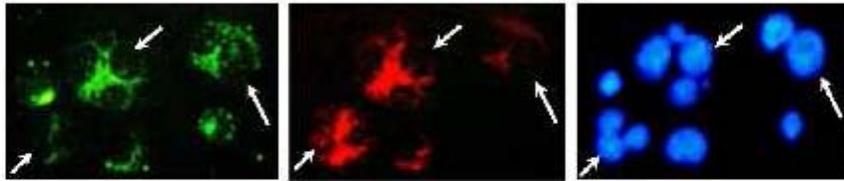


Fig. 3. Fluorescence microscopy of 24 h cocultures of DO-Env<sup>+</sup> T cells (green) and DO-CD4<sup>+</sup> monocytes (red). Double fluorescent heterokaryons are indicated by arrows. DNA was labeled with Hoechst 33342 (blue fluorescence). Magnification: 40 $\times$ .

#### Immunophenotypic analysis

The expression of surface molecules belonging to each of the fusion partners (CD3 and CD28, for lymphoid cells, and CD4 and CD32 for monocytic cells), as well as CD68, an intracellular antigen highly expressed in monocytes but poorly expressed in lymphocytes (Holness and Simmons, 1993; Pulford et al., 1990), was analyzed in heterokaryons and in cells that remained unfused in cocultures, as well as in control (monocultured) cells. The percentage of cells positive for each marker and their respective MFI index, which reflects the expression level are shown in Table 2 and Figs. 7 and 8, respectively. The percentage of heterokaryons expressing CD3, CD28, and CD32 was similar to those of cells that remained unfused in cocultures and to the respective control cells. Likewise, the percentage of CD68<sup>+</sup> heterokaryons was similar to that of control and unfused CD4<sup>+</sup> monocytes, the cell line expressing the higher percentage of cells positive for this marker. CD4, although normally present on T cells, was not expressed by Env<sup>+</sup> T cells, in agreement with previous observations (Cao et al., 1996; Crise et al., 1990; Rivero-Toledo et al., 2010; Stevenson et al., 1988). Thus, in our experimental system, expression of CD4 was restricted to monocytes; 88% of which were positive. After 24 h of coculture, only 44.1% of heterokaryons

expressed CD4. Analysis of the expression levels (Fig. 7) showed that CD4 is well expressed in both the unfused monocytes and in control cells (MFI index $\approx$ 12), whereas its expression on heterokaryons was barely detectable (MFI index=4). Conversely, the expression level of the lymphocyte CD28 and CD3 molecules in heterokaryons was clearly reduced (64.3 and 58.6%, respectively) in comparison with their levels on Env<sup>+</sup> cells that remained unfused and Env<sup>+</sup> control cells. In contrast, CD32 and CD68 molecules were expressed at the same level in heterokaryons and in monocytes that remained unfused, which showed MFI's similar to those of control monocultured cells (Fig. 7). Fig. 8 shows that these patterns of expression were similar after 6 and 24 h of coculture. Thus, heterokaryons show an important reduction in lymphocyte surface markers expression.

#### Response of heterokaryons to stimulation with PMA-ionomycin

Synthesis of the interleukin-2 receptor alpha chain (CD25) is an early event during the activation of cells from the lymphocyte lineage (Abraham and Weiss, 2004). In view of the reduced expression of the CD28 and CD3 T cell markers in heterokaryons, a study was conducted in order to determine their ability to express the T cell activation marker CD25. Cells of the Jurkat E6 clone, as well as the Jurkat Env<sup>+</sup> cells are able to express the IL-2R alpha chain (CD25) after stimulation with a variety of agents, including the combination of PMA and the calcium ionophore ionomycin (Abraham and Weiss, 2004; Rivero-Toledo et al., 2010). A 75% enriched population of heterokaryons was treated with PMA-ionomycin. Fig. 9 shows that 87.2  $\pm$  3.1% of control Env<sup>+</sup> T cells express the CD25 molecule, whereas only 22.0  $\pm$  1.6% of heterokaryons was CD25<sup>+</sup>, although with very low expression levels. Control CD4<sup>+</sup> monocytes were unable to express CD25 under similar conditions (data not shown).

#### Discussion

We show that Env<sup>+</sup> lymphoid cells can fuse with monocytes expressing the CD4 receptor forming heterokaryons in which the lymphocyte properties (CD3, CD28 and CD25 expression) are restricted, while preserving the expression of monocyte markers CD32 and CD68.

Previous *in vitro* studies indicated that fusion between cells from different lineages can occur during HIV infection. One report showed that the envelope viral proteins are expressed on the membrane of infected monocyte-derived macrophages and allow them to fuse with uninfected T cell lines (Crowe et al., 1992). In another work, it was found that the interaction of human skin dendritic cells with T lymphocytes provides a milieu for production of high amounts of virus without the need for previous stimulation of the T cells, and that heterokaryons formed by the fusion of these cells were the main source of production of HIV (Pope et al., 1994).

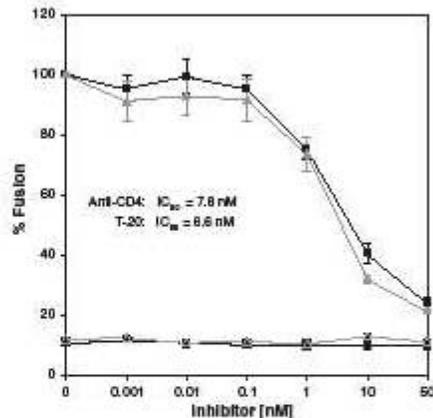


Fig. 4. Effect of an anti-CD4 monoclonal antibody (solid squares) and the fusion inhibitor peptide T-20 (solid triangles) on the fusion of CD4<sup>+</sup> monocytes with fusogenic Env<sup>+</sup> T cells. Non-specific cellular aggregates generated in cocultures of non-fusogenic Env<sup>+</sup> T cells with CD4<sup>+</sup> monocytes (open symbols) were not affected by the anti-CD4 monoclonal antibody and T-20. Each point is the average of two experiments carried out in duplicate.

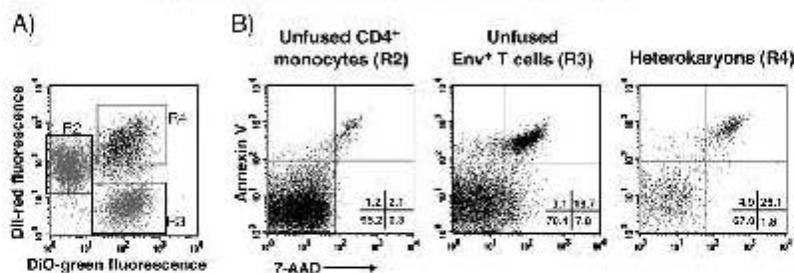


Fig. 5. Viability of heterokaryons. A) Gates corresponding to unfused CD4<sup>+</sup> monocytes (R2), unfused Env<sup>+</sup> T cells (R3) and heterokaryon (R4) populations were constructed in R2-H vs. R1-H dot plots. B) Annexin V binding and 7-AAD incorporation for each gate shown in A. The percentage of cells in each quadrant is shown. Results correspond to cocultures of 48 h and are representative of two independent experiments.

Table 1  
Viability of heterokaryons and cells remaining unfused in cocultures.

Coculture time (h)	Unfused Env <sup>+</sup> T cells (%)	Unfused CD4 <sup>+</sup> monocytes (%)	Heterokaryons (%)
0	90.8 ± 1.4 <sup>a</sup>	96.6 ± 2.7	–
5	95.2 ± 2.1	96.2 ± 0.3	83.7 ± 1.2 <sup>a</sup>
24	88.2 ± 4.1	94.3 ± 2.0	77.6 ± 1.1 <sup>a</sup>
48	79.8 ± 9.3	94.7 ± 1.7	68.2 ± 1.9 <sup>a</sup>
96	67.0 ± 0.8 <sup>b</sup>	93.2 ± 0.1	50.3 ± 0.3 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> The percentage of viable non-apoptotic cells is indicated, as evaluated by the simultaneous binding of 7-AAD and annexin V.

<sup>b</sup> P < 0.001, compared to unfused THP at the respective time.

<sup>c</sup> P < 0.05, compared to unfused Env<sup>+</sup> cells at time zero.

<sup>d</sup> P < 0.05, compared to unfused Env<sup>+</sup> cells at 96 h.

Here, lymphocyte–monocyte fusion was analyzed using a flow cytometry assay previously used for the quantitative study of lymphocyte–lymphocyte fusion mediated by the HIV-envelope protein (Huerta et al., 2002, 2005; López-Balderas et al., 2007; Rivera-Toledo et al., 2010). Several types of evidence indicate that double fluorescent cells are true heterokaryons. The possible generation of double fluorescent cells due to phagocytosis of Env<sup>+</sup> T cells by the CD4<sup>+</sup> monocytes was ruled out by the observation that double fluorescent cells do not arise when T cells expressing a mutant non-fusogenic Env protein

are cocultured with the CD4<sup>+</sup> monocytes, even after two days of coculture. Double fluorescent multinucleated cells were observed by microscopic examination and their numbers agree with those obtained by flow cytometry. Furthermore, the formation of double fluorescent cells was highly dependent on the receptors implicated in the HIV entry process, since it was inhibited by nanomolar concentrations of an anti-CD4 mAb and by the synthetic HIV fusion inhibitor peptide T-20. The production of double fluorescent cells corresponding to aggregated but not fused cells was minimized by the dissociation of attached cells in the cell suspensions by pipetting just before analysis in the flow cytometer. In addition, manifestation of FRET between DiI and DiO, which requires membrane mixing (Blumenthal et al., 2002) supports the notion that double fluorescent cells correspond to bona fide fused cells (Huerta et al., 2005).

As expected, after the mixing of cytoplasmic contents, heterokaryon population showed high cytoplasmic complexity (SSC-H signal), even though their size (FSC-H signal) remained similar to that of unfused cells. Fluorescence microscopy examination of cocultured cells showed that most of the double fluorescent cells contained two or three nuclei, suggesting that most fused cells were small.

As expected, cellular fusion led to the expression of surface molecules from both cell lineages. The observation that the percentage of heterokaryons expressing CD3, CD28, CD32 and CD68 was similar to those of the respective fusion partners, reflects a random

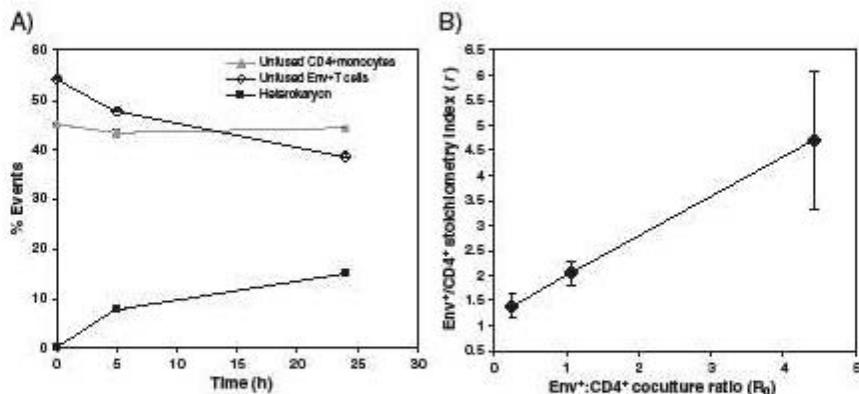


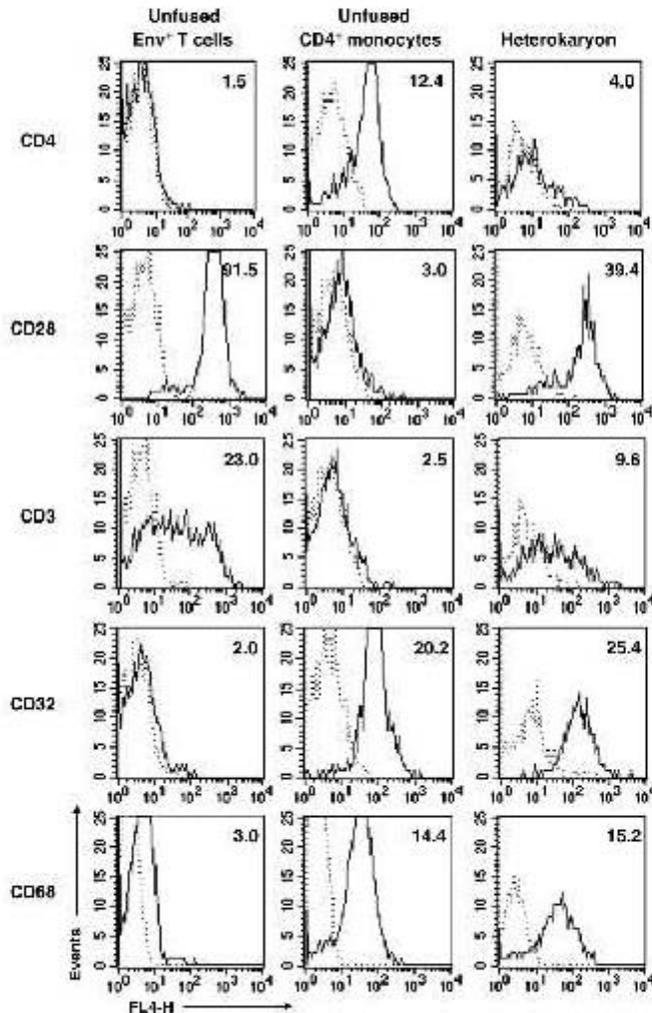
Fig. 6. Stoichiometry of heterotypic fusion. A) Kinetic analysis of the percentage of unfused and fused cells in cocultures of fusogenic Env<sup>+</sup> T cells with CD4<sup>+</sup> monocytes. Results are representative of three experiments. B) Stoichiometry index (r) for 5 h cocultures at three Env<sup>+</sup>:CD4<sup>+</sup> coculture ratios (R<sub>0</sub>). Each point is the average of three experiments carried out in duplicate.

**Table 2**  
Percentage of cells expressing the indicated CD antigens in control (monocultured), cocultured unfused cells, and heterokaryon populations.

Antigen	CD4 <sup>+</sup> monocytes		Fisogenic Env <sup>+</sup> T cells		Heterokaryons
	Control	Cocultured <sup>a</sup>	Control	Cocultured	
	%	%	%	%	
CD4	87.7 ± 2.9	79.5 ± 3.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	44.1 ± 5.4
CD28	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	98.0 ± 0.9	98.6 ± 0.8	89.4 ± 4.7
CD8	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	38.2 ± 6.1	57.0 ± 7.3	52.3 ± 10.0
CD32	93.1 ± 1.6	94.9 ± 2.2	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	95.8 ± 0.8
CD68	87.3 ± 2.0	89.6 ± 4.8	45.0 ± 10.3	45.1 ± 7.4	89.2 ± 5.8

<sup>a</sup> CD4<sup>+</sup> monocytes and fisogenic Env<sup>+</sup> T cells were cocultured 24 h before the analysis. Results are reported as the mean ± SD of three independent experiments.

cell recruitment process which is independent of these receptors. However, the reduced expression levels (e.g., the mean fluorescence intensity) of the lymphoid antigens CD3 and CD28 on heterokaryons, while CD32 and CD68, both markers of monocytic cells remained unchanged, suggests a differential post-fusion downregulation or internalization of the lymphoid surface molecules. Another possible explanation would be the preferential recruitment of lymphoid cells harboring lower levels of CD3 and CD28. However, no diminution of cells expressing low levels of CD3 or CD28 was observed in the lymphoid cells remaining unfused, since their fluorescence distribution overlapped precisely that of the control non-cocultured cells in all experiments ( $P=0.57$  and  $0.48$ , respectively) (data not shown).



**Fig. 7.** Phenotypic marker expression in heterokaryons and cells remaining unfused in 24h cocultures of Env<sup>+</sup> T lymphocytes and CD4<sup>+</sup> monocytes. Dotted line represents the isotype control. The MR index is shown. Results from a representative experiment are shown.

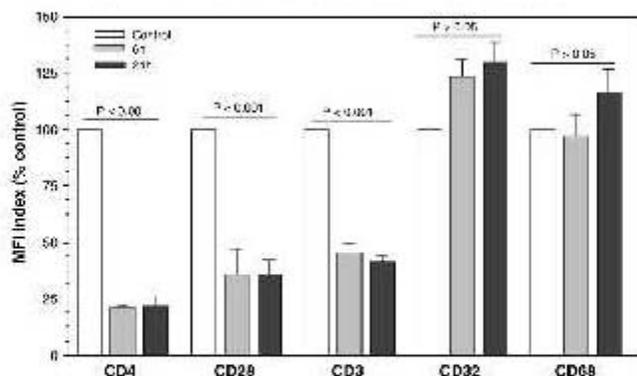


Fig. 8. Expression level of CD4, CD3, CD28, CD32 and CD68 in heterokaryons after 6 and 24 h of coculture. The MFI index is expressed as the percentage of fluorescence in heterokaryons compared to control cells. Results are the mean  $\pm$  SD of three experiments performed in triplicate. P values were calculated using one-way ANOVA.

Env<sup>+</sup> T cells are CD4<sup>+</sup>, so CD4 would be acquired by heterokaryons only from the monocytic partner. However, the CD4 content in heterokaryons was strongly reduced compared to that of CD4<sup>+</sup> monocytes, with regard to both the percentage of CD4<sup>+</sup> cells and the amount of receptors per cell, as indicated by the MFI index. Blocking CD4 by gp120 during the fusion process or a downmodulation of CD4 after interaction with soluble gp120, as reported for HIV-infected cells (Amadori et al., 1992; Gelezianus et al., 1994), could account for the scarce expression of CD4 on heterokaryons. CD4 mediates the response to the chemoattractive factor interleukin-16 (IL-16) in a PKC dependent pathway (Parada et al., 1996) in monocytes and CD4<sup>+</sup> T cells (Center et al., 1996). CD4 also mediates the CD4<sup>+</sup> T cell activation suppressor activity of IL-16 (Ogasawara et al., 1999). In addition, inhibition of HIV replication by IL-16 in CD4<sup>+</sup> T cells is also produced through interaction of this cytokine with CD4 (Madaszek et al., 1999). Fusion of HIV-infected T lymphocytes with CD4<sup>+</sup> monocytes would generate CD4<sup>+</sup> heterokaryons, which would be resistant to further HIV infection, and refractory to chemotaxis through IL-16 and to

the anti-viral activity of this cytokine. The presence of CD4 on 70% to 90% of human peripheral blood monocytes (Kazazi et al., 1989; Tuttle et al., 1998), would favor the probability of fusion in the tissue's infiltrates.

A low expression of lymphocyte markers would make it difficult to determine the participation of T cells in the formation of heterokaryons in vivo. Lymphocytic markers are not usually sought in phenotyping studies of HIV-infected multinucleated cells in patient tissues. Several reports have shown the expression of myeloid markers, such as HAM-56, RCA-1, MAC-387, CD68, S-100, HLA-DR and lysozyme by these cells (Dargent et al., 2000; Elliott et al., 1989; Orenstein and Wahl, 1999; Rinbet et al., 1991). The absence of CD3 was reported in multinucleated cells at the mucosal surface of the adenoid, which were identified as dendritic cell-derived syncytia (Frankel et al., 1996). The possibility remains that fusion of HIV-infected lymphoid and myeloid cells occurs at inflammation sites, where heavy infiltration of these cells arises, and that lymphoid markers are not evident in the resulting heterokaryons.

Previously, we showed that the expression of lymphoid surface molecules and the ability to express CD25 and synthesize IL-2 after PMA-ionomycin stimulation, is maintained in syncytia generated by the homotypic fusion of Env<sup>+</sup> T cells and CD4<sup>+</sup> Jurkat T cells (Rivera-Toledo et al., 2010). In contrast, the reduced expression of the CD3 and CD28 lymphoid molecules in heterokaryons, along with the very low expression of CD25 in response to the stimulation with PMA-ionomycin, indicates loss of the lymphocyte phenotype, even though lymphocytes are recruited in higher proportion than monocytes in heterokaryons, as indicated by the stoichiometry assessment. In addition, the observation that the level of expression of the monocyte markers CD32 and CD68 is maintained in heterokaryons indicates that the monocytic phenotype can become dominant following fusion, although it may be altered by the incorporation of lymphocyte components. Further functional studies are needed to establish this point.

In our experimental conditions, half of the heterokaryons remained viable and non-apoptotic even in 4 day cocultures. Notably, the kinetics of heterokaryon's viability paralleled that of the Env<sup>+</sup> T cells, indicating that the "death signal" initiated in Env<sup>+</sup> T cells may be transferred to heterokaryons and that these are not able to restrain it.

T helper lymphocytes and cells of the monocyte-macrophage lineage are essential during establishment of immune responses and they are also the main targets for HIV. Together, these observations implicate that heterokaryons formed by the fusion of HIV-infected T

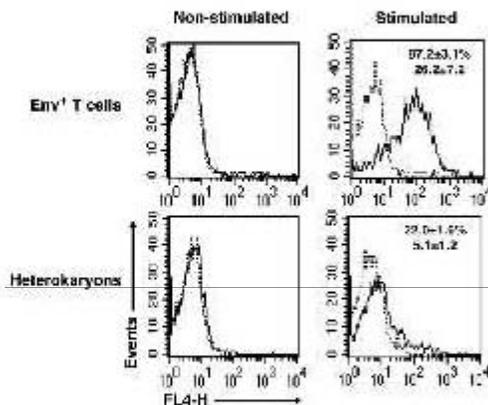


Fig. 9. Effect of stimulation with PMA-ionomycin on the expression of CD25 by Env<sup>+</sup> T cells and sorted heterokaryons. Percentage and MFI index of positive cells are shown. Data are mean and standard deviation from two experiments.

cells with monocyctic cells, would be essentially CD4<sup>+</sup> and thus refractory to the chemoattractive, activation suppressing and anti-viral activities of IL-16, and may include a high proportion of small heterokaryons along with multinucleated giant cells. In addition, they may provide a site for replication HIV strains.

This work suggests a possible heterologous origin for the multinucleated cells in HIV infection. Further characterization of the mechanism responsible for the phenotypic change and functional capabilities of heterokaryons is necessary to understand the implications of these entities for viral replication and immune response.

#### Acknowledgments

Jurkat-HXBc2(4) and Jurkat-522F/Y cells were obtained from Dr. Joseph Sodroski, and Jurkat Clone EG-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 de México (CONACYT), grant 61425 and the Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México, PAPIIT grant IN229307. Evelyn Rivera-Toledo was recipient of a fellowship from CONACYT. We thank Carlos Castellanos for help with cell sorting, Elizabeth Langley for critical review of the manuscript and Patricia Espinosa-Cueto for technical support.

#### References

Abraham, R.T., Weiss, A., 2004. Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signaling paradigm. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 301–308.

Anadol, A., De Silvestro, G., Zamauchi, R., Venesio, M.L., Mazza, M.R., Schiavo, G., Pasozzi, M., De Rossi, A., Omernik, L., Moss, J., et al., 1992. CD4 epitope masking by gp120/anti-gp120 antibody complexes: a potential mechanism for CD4+ cell function down-regulation in AIDS patients. *J. Immunol.* 148, 2709–2716.

Bhoopai, L., Rthaporn, T.S., Khanamornpong, S., Bhoopai, T., Taylor, C.R., Thorne, P.S., 2006. Cell reservoirs in lymph nodes infected with HIV-1 subtype E differ from subtype B: identification by combined *in situ* polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *Mod. Pathol.* 19, 255–263.

Blaik, H., van't Wout, A.B., Brozovic, M., Hooftink, B., Hovenkamp, E., Schuiltemaker, 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.

Blau, H.M., Staley, B.T., 1989. Plasticity of cell fate: insights from heterokaryons. *Semin. Cell Dev. Biol.* 10, 267–272.

Blumenthal, R., Gallo, S.A., Viard, M., Rawls, Y., Puri, A., 2002. Fluorescent lipid probes in the study of viral membrane fusion. *Chem. Phys. Lipids* 116, 39–55.

Budka, H., 1996. 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.

Center, D.M., Kozlowski, H., Cullishead, W.W., 1996. Interleukin 16 and its function as a CD4 ligand. *Immunol. Today* 17, 476–481.

Collman, R.C., Perno, C.F., Crowe, S.M., Stevenson, M., Mostaer, L.J., 2003. HIV and cells of macrophage/dendritic lineage and other non-T cell reservoirs: new answers yield new questions. *J. Leukoc. Biol.* 74, 631–634.

Cripe, S., Buonocore, L., Rose, J.K., 1990. CD4 is retained in the endoplasmic reticulum by the human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein precursor. *J. Virol.* 64, 5385–5393.

Crowe, S.M., Mills, J., Elliott, T., Lifson, J.D., Kozel, J., Marshall, J.A., Engleman, E.G., McGrath, M.S., 1992. Human immunodeficiency virus-infected monocyte-derived macrophages express surface gp120 and fuse with CD4 lymphoid cells *in vitro*: a possible mechanism of T lymphocyte depletion *in vivo*. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 65, 143–151.

Dargatzis, J., Lepagnard, L., Komreich, A., Hermans, P., Clumeck, N., Verheut, A., 2000. HIV-associated multinucleated giant cells in lymphoid tissue of the Waldeyer's ring: a detailed study. *Mod. Pathol.* 13, 1298–1299.

Elliott, D.J., Peress, N., Burger, H., LaVeie, D., Orenstein, J., Gendelman, H.E., Seidman, R., Weiser, B., 1989. Human immunodeficiency virus type 1 in spinal cords of acquired immunodeficiency syndrome patients with myelopathy: expression and replication in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 3337–3341.

Frankel, S.S., Wenig, B.M., Barlin, A.P., Mautner, P., Thompson, L., Albonazo, 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.

Frankel, S.S., Tenner-Klacz, K., Wenig, B.M., Hansen, C.H., Hoffman, 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.* 15, 89–96.

Farata, R.A., Wild, C.T., Wong, Y., Weiss, C.D., 1998. Capture of an early fusion-active conformation of HIV-1 gp41. *Nat. Struct. Biol.* 5, 276–278.

Geleziunas, R., Bour, S., Weinberg, M.A., 1994. Cell surface down-modulation of CD4 after infection by HIV-1. *FASEB J.* 8, 593–600.

Holmes, C.L., Simmons, D.L., 1993. Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. *Blood* 81, 1607–1613.

Hu, Q., Frank, L., Williams, V., Santos, J.J., Watts, P., Griffin, G.E., Moore, J.P., Pope, M., Shattock, R.J., 2004. Blockade of attachment and fusion receptors inhibits HIV-1 infection of human cervical tissue. *J. Exp. Med.* 199, 1065–1075.

Huerta, L., Lamoyi, E., Biez-Saldana, A., Larralde, C., 2002. Human immunodeficiency virus envelope-dependent cell-cell fusion: a quantitative fluorescence cytometric assay. *Cytometry* 47, 100–105.

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. Meth.* 138, 17–23.

Huerta, L., López-Balderas, N., Rivera-Toledo, E., Sandoval, G., Gómez-Izcalaceta, G., Villarreal, C., Lamoyi, E., Larralde, C., 2009. HIV-envelope-dependent cell-cell fusion: quantitative studies. *ScientificWorldJournal* 9, 745–763.

Karlsson, A., Parsony, K., Sandström, E., Feyo, E.M., Albert, J., 1994. MT-2 cell trogism as prognostic marker for disease progression in human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Clin. Microbiol.* 32, 354–370.

Kazzi, F., Mathijs, J.M., Foley, P., Cunningham, A.L., 1989. Variations in CD4 expression by human monocytes and macrophages and their relationships to infection with the human immunodeficiency virus. *J. Gen. Virol.* 70, 2661–2672.

Koenig, S., Gendelman, H.E., Orenstein, J.M., Dal Canto, M.C., Pozzashipour, G.H., Yungbluth, M., Janoff, F., Akamit, A., Martin, M.A., Fauci, A.S., 1986. Detection of AIDS virus in macrophages in brain tissue from AIDS patients with encephalopathy. *Science* 233, 1088–1093.

Koet, M., Vos, A.H., Koet, R.P., de Gordo, R.E., Dercksen, M.W., Terpstra, F.G., Coutinho, R.A., Miedema, F., Tenmeste, M., 1992. HIV-1 biological phenotype in long-term infected individuals evaluated with an MT-2 cocultivation assay. *AIDS* 6, 48–54.

Lifson, J.D., Reyes, G.R., McGrath, M.S., Stein, B.S., Engleman, E.G., 1986. AIDS retrovirus induced cytopathology: giant cell formation and involvement of CD4 antigen. *Science* 232, 1123–1127.

López-Balderas, N., Huerta, L., Villarreal, C., Rivera-Toledo, E., Sandoval, G., Larralde, C., Lamoyi, E., 2007. *In vitro* cell fusion between CD4(+) and HIV-1 Env(+) T cells generates a diversity of syncytia varying in total number, size and cellular content. *Virus Res.* 123, 130–146.

Maciazek, J.W., Parada, N.A., Czukhank, W.W., Center, D.M., Koenfeld, H., Vigliani, G.A., 1999. IL-16 represses HIV-1 promoter activity. *J. Immunol.* 158, 5–8.

Ogasawara, H., Takeda-Hirokawa, N., Seligawa, I., Hashimoto, H., Kaneko, Y., Hirao, S., 1999. Inhibitory effect of interleukin-16 on interleukin-2 production by CD4+ T cells. *Immunology* 96, 215–219.

Orenstein, J.M., 2000. *In vivo* cytotoxic and fusion of human immunodeficiency virus type 1-infected lymphocytes in lymphoid tissue. *J. Infect. Dis.* 182, 338–342.

Orenstein, J.M., Wahl, S.M., 1999. The macrophage origin of the HIV-expressing multinucleated giant cells in hyperplastic tonsils and adenoids. *Ultrastruct. Pathol.* 23, 79–91.

Parada, N.A., Czukhank, W.W., Davis, H.L., Ryan, T.C., Center, D.M., 1996. IL-16 and other CD4 ligand-induced migration is dependent upon protein kinase C. *Cell. Immunol.* 168, 100–105.

Perfettini, J.L., Nastacci, E., Boumaba, M., Sabio, F., Gros, L., Séric, C., Manic, G., Rosselli, F., Amendola, A., Madeiros, P., Chessa, L., Novelli, G., Ojcius, D.M., Swicki, J.K., Cherkhina, M., Aucilar, C., Requeno, J.R., de Thé, H., Gougeon, M.L., Piacentini, M., Kremer, G., 2008. Critical involvement of the ATM-dependent DNA damage response in the apoptotic demise of HIV-1-induced syncytia. *PLoS ONE* 3, e2458.

Pope, M., Betjes, M.G., Komati, N., Hirmann, H., Cameron, P.U., Hoffman, L., Gelezer, S., Schuler, G., Steinman, R.M., 1994. Conjugates of dendritic cells and memory T lymphocytes from skin facilitate productive infection with HIV-1. *Cell* 78, 389–398.

Pullford, K.A., Sipos, A., Cordeil, J.L., Stros, W.P., Mason, D.Y., 1990. Distribution of the CD68 macrophage/microglial associated antigen. *Int. Immunol.* 155, 973–980.

Rinfret, A., Latendresse, H., LeBlanc, R., St-Louis, G., Jolicoeur, P., Lamaire, L., 1991. Human immunodeficiency virus-infected multinucleated macrophages in oropharyngeal lymphoid tissues from two asymptomatic patients. *A. J. P.* 138, 421–426.

Rivera-Toledo, E., López-Balderas, N., Huerta, L., Lamoyi, E., Larralde, C., 2010. Decreased CD4 and wide-ranging expression of other immune receptors after HIV-envelope-mediated formation of syncytia *in vitro*. *Arch. Virol.* 155, 1205–1216.

Robinson, J.P., Dazykiewicz, Z., Dean, P.N., Dierker, L.G., Orfan, A., Rabinovitch, P.S., Stewart, C.S., Tatro, H.J., Wheelless, L.L., 2003. *Current Protocols in Cytometry*. John Wiley & Sons, New York Unit 1.3.

Schmid, I., Ultrasbogaard, C.H., Grogg, J.V., 1994. Sensitive method for measuring apoptosis and cell surface phenotype in human thymocytes by flow cytometry. *Cytometry* 15, 12–20.

Sodroski, J., Goh, W.C., Rosen, C., Campbell, K., Haselkine, W.A., 1986. Role of the HTLV-III/IV envelope syncytium formation and cytopathicity. *Nature* 322, 470–474.

Stein, M.C., Wang, B., Saksena, N.K., 2008. The possible contribution of HIV-1-induced syncytia to the generation of intersubtype recombinants *in vitro*. *AIDS* 22, 1009–1017.

Stevenson, M., Meier, C., Mann, A., Chapman, N., Wastak, A., 1988. Envelope glycoprotein of HIV induces interference and cytotoxic resistance in CD4+ cells: mechanism for persistence in AIDS. *Cell* 53, 483–486.

Sylwester, A., Murphy, S., Shurt, D., Sol, 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.

- Ternanova, R., Pereira, C.P., Du Roure, C., Meckenschläger, M., Fisher, A.G., 2005. Acquisition and extinction of gene expression programs are separate events in heterokaryon reprogramming. *J. Cell Sci.* 119, 2065–2072.
- Tuttle, D.L., Harrison, J.K., Anders, C., Sleasman, J.W., Goodnow, M.M., 1998. Expression of CCR5 increases during monocyte differentiation and directly mediates macrophage susceptibility to infection by immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 72, 4962–4969.
- van Engeland, M., Nieland, L.J., Ramaekers, F.C., Schutte, B., Reutelingsperger, C.P., 1998. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 31, 1–9.
- Zhao, M.L., Kim, M.G., Mosello, S., Lee, S.C., 2001. Expression of inducible nitric oxide synthase, interleukin-1 and caspase-1 encephalitis. *J. Neuroimmunol.* 115, 182–191.

## Decreased CD4 and wide-ranging expression of other immune receptors after HIV-envelope-mediated formation of syncytia in vitro

Evelyn Rivera-Toledo · Nayali López-Balderas ·  
Leonor Huerta · Edmundo Lamoyi ·  
Carlos Larralde

Received: 1 December 2009 / Accepted: 13 May 2010 / Published online: 28 May 2010  
© Springer-Verlag 2010

**Abstract** In human HIV infection, multinucleated cells (syncytia) are formed by fusion of HIV-infected cells with CD4<sup>+</sup> cells. In order to examine possible functional implications of syncytia formation for the immune response, the expression of important surface molecules by T-cell syncytia and surrounding cells that remain unfused (bystander cells) was analyzed in cocultures of HIV-Env- and CD4-expressing E6 Jurkat T cells. Fusion partners were differentially labeled with lipophilic probes, and syncytia and bystander cells were identified by flow cytometry. The cellular phenotype and response to activation stimulus after fusion were analyzed with antibodies coupled to third-party fluorochromes. Cocultured unfused E6 cells showed a marked decrease in CD4 expression, suggesting the selective recruitment of cells strongly expressing CD4 into syncytia. However, the incorporated CD4 was not detected in the syncytia, whereas the range of expression of CD28, ICAM-1, CXCR4 and CD3 was wider than that of unfused cells. Limited expression of CD4 in the bystander unfused population, as well as in the newly formed syncytia, would result in limitation of further viral entry and a failure to identify these cells, and it could partially contribute to functional impairment and a decrease in the number of CD4<sup>+</sup> T cells in AIDS. Most of

the syncytia were viable and expressed CD25 and IL-2 in response to activation by phorbol myristate acetate (PMA) and ionomycin. Thus, syncytia populations harboring widely heterogeneous levels of receptors would constitute a potential source of anomalous immune function.

### Introduction

Syncytia formation by the fusion of HIV-infected cells with uninfected targets is frequently observed in vitro [1, 2]. HIV viruses vary in their ability to induce syncytium formation in CD4<sup>+</sup> T cell cultures, but the presence of most fusogenic viral strains in the circulation of HIV-infected individuals associates with disease progression [3–11]. In vivo, biopsy and autopsy studies have shown that HIV-infected multinucleated cells, presumably formed by cell-cell fusion, are present in brain and lymphoid tissues of patients [12–15]. The observation that in vitro-formed syncytia collapse by apoptosis shortly after formation has led to the consideration that they may also be short-lived in vivo, thus contributing to the depletion of CD4<sup>+</sup> T cells [2, 16, 17]. Conversely, the presence of infected multinucleated cells in patients' tissues, even during the asymptomatic stage of the infection [13, 18], indicates that syncytia may survive in vivo, possibly affecting virus replication and the function of fused cells and surrounding tissues.

The syncytium-inducing ability of HIV-1 is mediated essentially by the envelope glycoproteins gp120 and gp41 expressed on the surface of infected cells. The exterior gp120 protein binds to the CD4 receptor, and subsequently to a chemokine receptor, mainly CXCR4 and CCR5. Binding of the chemokine receptor by gp120 triggers conformational changes in gp41 that eventually result in membrane fusion [19]. Additionally, cellular adhesion

E. Rivera-Toledo and N. López-Balderas contributed equally to this work and are listed as co-first authors.

E. Rivera-Toledo · N. López-Balderas · L. Huerta (✉) ·  
E. Lamoyi · C. Larralde  
Department of Immunology, Instituto de Investigaciones  
Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México,  
Apartado Postal 70228, Ciudad Universitaria,  
Distrito Federal C.P. 04510, Mexico  
e-mail: leonohh@biomedicas.unam.mx;  
larralde@servidor.unam.mx

molecules, such as the ICAM-1/LFA-1 system, participate in formation of syncytia by CD4<sup>+</sup> T cell lines [20–22].

We have developed a procedure for the quantitative study of HIV-envelope-mediated lymphocyte-lymphocyte fusion, based on an assay involving differential labeling of fusion cell partners with DiO and DiI fluorescent lipophilic probes, followed by flow cytometry analysis after coculture. The unfused cells appear as single fluorescent events, and the syncytia as doubly fluorescent particles [23]. It was shown that fluorescence resonance energy transfer (FRET) from DiO to DiI produces an increase of the red fluorescence in fused cells but not in cells aggregates, allowing the gating of a population of double fluorescent events composed of bona fide fused cells, the numbers of which agree with those counted by fluorescence microscopy [24]. By this assay, it was shown that HIV envelope proteins can induce a population of syncytia differing in size and cellular composition [25]. Thus, syncytia formation *in vitro* is a highly heterogeneous process, where a great proportion of small syncytia containing few nuclei (two to four) are generated along with giant cells [24, 25]. Such heterogeneity suggests a diversity of functional outcomes. Thus, the consequences of syncytia formation by cells from the immune system and their effect on neighboring tissues is in need of further exploration.

The expression of particular receptors on the membrane of lymphoid cells reflects their stage of differentiation and role in the immune response. T helper lymphocytes, one of the cell populations infected by the HIV, express receptors and costimulatory molecules for interaction with antigen-presenting cells as well as cytokine receptors essential for activation [26]. Using a three-color flow cytometry assay, we studied the expression of various receptors involved in signaling for activation, costimulation, signal transduction, and migration processes in syncytia and cells that remained unfused after the co-culture of two human lymphocytic Jurkat cell lines, one expressing CD4 and CXCR4 (E6 cells), and the other expressing a lymphotropic HIV envelope glycoprotein (Env<sup>+</sup> cells). The viability of the syncytia, the synthesis of IL-2, and the expression of the interleukin-2 receptor alpha chain (CD25) in response to activation by phorbol myristate acetate (PMA) and ionomycin were determined.

## Materials and methods

### Experimental design

T-cell syncytia were produced by coculturing HIV-1 Env-expressing cells with CD4<sup>+</sup> Jurkat T cells. Fusion partners were differentially labeled with lipophilic probes.

Double-labeled syncytia and surrounding cells that remained unfused (bystander cells) were identified by flow cytometry. Determination of the cellular phenotype of the syncytia and bystander cells was performed using antibodies coupled to the third-party fluorochromes allophycocyanine (APC) and peridinin-chlorophyll-protein complex (PerCP). The response of syncytia to an activation stimulus was determined by adding PMA plus ionomycin to the cocultures and to syncytia that had been purified by sorting. The response to stimulation was determined by the analysis of surface expression of CD25 and intracellular IL-2 production. Viability and apoptosis were determined by the incorporation of 7-amino-actinomycin D (7-AAD) and the binding of annexin V coupled to the Cy5 fluorochrome. A cell expressing a mutated Env glycoprotein (non-fusogenic Env<sup>+</sup> cells) that binds to CD4 but does not induce cell fusion [27, 28] was used as control.

### Cell lines and culture

Jurkat cell lines HXBc2(4) and 522F/Y, which are stably transfected with the *env* gene from the HIV-1 HXBc2 strain, and Jurkat E6-1 cells, were obtained through the AIDS Research and Reference Reagent Program. HXBc2(4) and 522F/Y cells carry a regulator plasmid that contains a tetracycline-dependent repressor sequence and a second plasmid containing the *env* and *rev* genes of the HIV-1 strain HXBc2 linked to tetracycline operator sequences and to a human cytomegalovirus minimal promoter. HXBc2 cells express a functional Env protein, while 522F/Y cells express a mutant Env protein containing an F/Y substitution at position 522 in gp41 and are unable to mediate membrane fusion [27]. The expression of the gp120 envelope protein on these cell lines has been demonstrated previously [27, 28]. These cell lines were chosen because they are derived from the same original leukemia isolate but differ in that E6 expresses CD4, but HXBc2(4) cells do not and react with CD4, mediating cell fusion [27]. E6-1 cells are CD4<sup>+</sup> and CXCR4<sup>+</sup>. HXBc2(4), 522F/Y and E6-1 cells will be denoted here as fusogenic Env<sup>+</sup>, non-fusogenic Env<sup>+</sup> and E6 cells, respectively.

Cell lines were cultured in RPMI (Gibco BRL, Rockville, MD) supplemented with 10% FBS (Gibco BRL), 50 U/ml penicillin and 50 U/ml streptomycin (RPMI-10), at 37°C, with 5% CO<sub>2</sub>. Fusogenic and non-fusogenic Env<sup>+</sup> cells were grown in the presence of 1 µg/ml tetracycline and selection antibiotics (200 µg/ml G418 and 200 µg/ml hygromycin) as described previously [27]. Expression of the gp120/gp41 viral Env protein was induced by washing cells twice with phosphate-buffered saline solution (PBS) to remove tetracycline and incubating in RPMI-10 with selection antibiotics for 3 days [27].

### Syncytium formation assay

E6 and Env<sup>+</sup> cells were labeled with DiI (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate) and DiO (3,3'-dioctadecyloxycarbocyanine perchlorate) lipophilic dyes, respectively, obtained from Molecular Probes (Eugene, OR). Cell labeling was performed the day before the fusion experiments. The labeling procedure has been described before [23–25], although the amounts of dyes used here were lower than in previous reports in order to avoid interference of the fluorescence of the lipophilic dyes with that of the antigen-specific fluorescent antibodies during flow cytometry analysis. Stock solutions of dyes (3.5 mg/ml) were prepared in dimethylsulfoxide (DMSO), and 5  $\mu$ l of a 1/27 dilution of the DiI stock and 20  $\mu$ l of a 1/30 dilution of the DiO stock was added to 5–15  $\times 10^6$  E6 or Env<sup>+</sup> cells, respectively, suspended in 1 ml of RPMI-10. After incubation for 15 min at room temperature with gentle shaking in the dark, cells were washed twice with ten volumes of RPMI-10 and resuspended in the same medium containing the selection antibiotics for overnight incubation.

Syncytium formation was induced by coculturing 2  $\times 10^5$  labeled cells from each fusion partner in a final volume of 0.2 ml of AIM-V serum-free medium (Gibco, BRL) in 96-well plates. Cocultures were incubated at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, for 2, 5 and 8 h. Control, monocultured labeled cells were maintained under the same conditions.

### Labeling for receptor expression analysis

To determine the expression of surface receptors in control and cocultured cells, direct staining with monoclonal antibodies was performed as follows: cells were collected from wells and transferred to FACS tubes. They were then washed with 2 ml of cold PBS containing 0.1% NaN<sub>3</sub> and resuspended in 50  $\mu$ l of staining buffer (cold PBS with 0.1% NaN<sub>3</sub> and 2% normal calf serum). APC-labeled anti-CD4, anti-CD28, anti-ICAM-1, anti-CXCR4, and

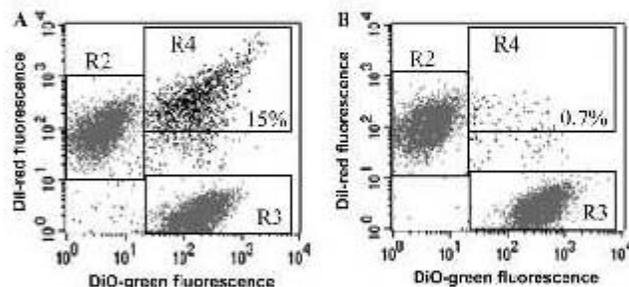
anti-CD25 monoclonal antibodies or PerCP-labeled anti-CD3 monoclonal antibody (BD Pharmingen, San Jose, CA) were added (20  $\mu$ l/10<sup>6</sup> cells), and the cells were incubated for 30 min at 4°C, as indicated by the provider. Incubation of cells with an isotype-matched control antibody was performed in all cases. Unbound antibody was removed by washing with 2 ml of cold 0.1% NaN<sub>3</sub> PBS; cells were resuspended in 500  $\mu$ l of FACSFlow buffer (Becton-Dickinson, San Jose, CA) and analyzed immediately by FACS. Data representative of several experiments are shown, as indicated in the text.

### Flow cytometry analysis of fusion and surface molecules

Analysis was performed on 10,000 events using a FAC-Scalibur flow cytometer (Becton-Dickinson, San Jose, CA) equipped with a dual-laser system emitting at 488 and 635 nm, using CellQuest software. Non-labeled cells were used for adjustment of autofluorescence, whereas compensation of the red and green signals was carried out using non-cocultured DiI- and DiO-labeled cells. Syncytia (double fluorescent cells), unfused E6 cells (red), and unfused Env<sup>+</sup> cells (green) were gated and quantified in FL1-H (DiO-green fluorescence) vs. FL2-H (DiI-red fluorescence) dot plots (Fig. 1a). Cell aggregates were dissociated by gently pipetting the cell suspensions just before FACS analysis. The percentage of cells that were positive for the different surface molecules and their respective geometric mean fluorescence intensities were evaluated for every gated population in the FL3-H (PerCP) or FL4-H (APC) channels. To control for spillover of the DiI fluorescence in FL3-H or FL4-H, a matched-isotype, irrelevant antibody was included in each analysis.

The mean fluorescence intensity index (MFI index) was defined as the ratio of the mean fluorescence intensity of the cells incubated with the specific monoclonal antibody to the mean fluorescence intensity of cells incubated with the isotype control.

**Fig. 1** Flow cytometry analysis of cocultures of Jurkat E6 cells with Jurkat Env<sup>+</sup> cells expressing a fusogenic (a) and a mutant non-fusogenic (b) HIV-1 envelope protein. R2 and R3 regions correspond to E6 and Env<sup>+</sup> cells, respectively, that remained unfused. R4 in a corresponds to the population of syncytia



### Cell sorting

Syncytium formation was induced by coculturing  $4 \times 10^5$  labeled cells from each labeled fusion partner in a final volume of 0.4 ml of AIM-V serum-free medium (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA), in 48-well plates. After 3 h of incubation, cells were transferred to a centrifuge tube, washed two times with phosphate-buffered saline (PBS), and resuspended in PBS at a concentration of  $2 \times 10^6$  cells/ml. The double fluorescent, FRET-positive population corresponding to syncytia [24] was sorted out at 4°C with using a FACSAria flow cytometer (Becton-Dickinson). About  $1.5 \times 10^6$  syncytia were obtained with 92–96% purity.

### Cell viability

Cocultured and monocultured control cells labeled with DiI and DiO, as well as sorted syncytia, were transferred to FACS tubes, washed with PBS and resuspended in binding buffer (BD Pharmingen) before the addition of 5  $\mu$ l of Cy5-Annexin V (BD Pharmingen) and 5  $\mu$ l of 7AAD (eBioscience, San Diego, CA). Cells were analyzed by flow cytometry after a 10-min incubation at room temperature. Syncytia and unfused E6 and Env<sup>+</sup> cell populations were gated in FL1-H vs. FL2-H dot plots as shown in Fig. 1a. 7-AAD and Cy5-Annexin V fluorescence was determined for each gated population in FL3-H and FL4-H channels, respectively. Non-apoptotic cells were identified as 7-AAD- and annexin V-negative cells, whereas early apoptotic cells were identified as 7-AAD-negative and annexin V-positive. Cells in late apoptosis were positive for both indicators [29, 30].

### Activation of cells and analysis of CD25 and IL-2

Syncytia in cocultures or purified by sorting were stimulated by adding PMA plus ionomycin, and their response was analyzed by the surface expression of CD25 and intracellular IL-2 production by flow cytometry. In cocultures, the stimulus was added after 2 h, when the generation of syncytia had reached a maximum.

CD25 expression was induced by 5-h incubation with 20 ng/ml PMA and 0.2  $\mu$ M ionomycin in AIM-V medium supplemented with 0.5% FBS. Cells were washed with PBS and resuspended in staining buffer containing the monoclonal antibody anti-CD25 coupled to APC and incubated for 30 min at 4°C. Cells were then washed two times with PBS and analyzed immediately.

Synthesis of IL-2 was stimulated by incubation with 20 ng/ml PMA and 1  $\mu$ M ionomycin in RPMI-10 for 6 h. Monensin (1  $\mu$ M) was added to cells 4 h before collection. For analysis of intracellular IL-2, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min at room temperature

[31], washed and permeabilized with Perm Wash Buffer (BD Biosciences). Cells were then resuspended in the same buffer containing the monoclonal antibody anti IL-2 coupled to APC and incubated 30 min at 4°C. Isotype-matched control antibodies and non-stimulated cells were included in each experiment. Finally, cells were washed two times and resuspended in FACS buffer for flow cytometry analysis. In all experiments, monocultured control cells (E6 and fusogenic Env<sup>+</sup>) were stimulated under the same conditions and analyzed simultaneously.

The percentage of cells positive for CD25 and IL-2 and their respective geometric mean fluorescence intensities were evaluated in the FL4-H (APC) channel. The specific response of cells to activation was obtained by subtracting the percentage of the particles that were positive in the isotype control sample from the percentage that were positive in the anti-CD25- or anti-IL-2-stained sample. The MFI index was calculated as indicated for the analysis of surface molecules.

### Statistical analysis

Statistical analysis (ANOVA and student *t* tests) was performed using GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc, San Diego CA).

## Results

### Flow cytometry analysis of cell–cell fusion

Jurkat E6 and fusogenic Env<sup>+</sup> cells labeled with DiI and DiO lipophilic probes, respectively, were cocultured to induce fusion and then analyzed by flow cytometry as described previously [24, 25]. Figure 1 shows typical dot plots for the DiO and DiI fluorescence, as analyzed in the FL1-H and FL2-H channels, respectively. Twelve to fifteen percent of double fluorescent cells were obtained after 2 h, with no significant changes after 8 h. Figure 1a shows that the double fluorescent cells have an enhanced red fluorescence intensity (mean = 346) compared to that of the unfused red cell population (mean = 93). This is in agreement with fluorescence resonance energy transfer (FRET) from DiO to DiI, which was previously shown to arise in bona fide fused cells but not in aggregated cells [24]. As expected [24], the coculture of E6 cells with non-fusogenic Env<sup>+</sup> cells (Fig. 1b) only generates background levels of FRET-negative cell aggregates (0.7%).

### Expression of surface molecules after cell–cell fusion

After 2, 5 and 8 h of coculture, the expression of surface molecules was determined simultaneously on syncytia and

**Table 1** Percentage of cells expressing the indicated surface antigens on control monocultured cells, cocultured unfused cells, and populations of syncytia

Antigen	E6		Env <sup>+</sup>		Syncytia (%)
	Control (%)	Cocultured <sup>a</sup> (%)	Control (%)	Cocultured (%)	
CD4	51.7 ± 11.4	23.2 ± 3.7	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
CD28	92.8 ± 3.0	94.5 ± 3.3	96.7 ± 2.4	96.2 ± 3.1	88.2 ± 9.7
ICAM-1	49.4 ± 7.8	52.4 ± 6.7	79.5 ± 4.2	79.0 ± 5.1	70.9 ± 4.6
CXCR4	82.7 ± 6.0	83.7 ± 5.1	69.8 ± 8.3	71.8 ± 8.7	83.9 ± 0.4
CD3	93.4 ± 1.6	92.7 ± 0.2	62.4 ± 3.8	66.9 ± 3.7	97.1 ± 2.3

<sup>a</sup> E6 cells and Env<sup>+</sup> Jurkat cells were cocultured 8 h before the analysis

Data are reported as the mean ± SEM of the percentage of positive cells of three independent experiments

cells that remained unfused, using antibodies coupled to a third-party fluorochrome. The expression of these antigens was also determined in control monocultured cells maintained under the same conditions.

Figure 2 illustrates the detection of antibody fluorescence on cells from the R2, R3, and R4 gates in Fig. 1a, corresponding to the unfused E6, fusogenic Env<sup>+</sup> and syncytia populations, respectively. It was expected that if cells were non-selectively recruited into the syncytia population, the percentage of syncytia expressing the surface molecules should be similar to that of the fusion partner populations. Table 1 shows that, except for CD4, which was not detected on syncytia, no major changes were found in the percentage of syncytia expressing CD28, ICAM-1, CXCR4 and CD3 compared to the unfused cells. However, as shown Fig. 2, the width of the fluorescence intensity distributions was greatly increased in syncytia compared with that of the unfused cell populations. A measurement of this increase in the heterogeneity of surface molecule expression is provided by the standard deviation and the MFI index.

Seventy-three percent of control, monocultured E6 cells were positive for CD4 (Table 1), with an MFI of 15.6. In contrast, control fusogenic Env<sup>+</sup> cells were negative for CD4, as expected [27]. Lack of CD4 expression is commonly observed in HIV-1-infected and HIV-envelope-expressing cells, and this is known to be caused by retention of envelope-CD4 receptor complexes in the endoplasmic reticulum [27, 32, 33].

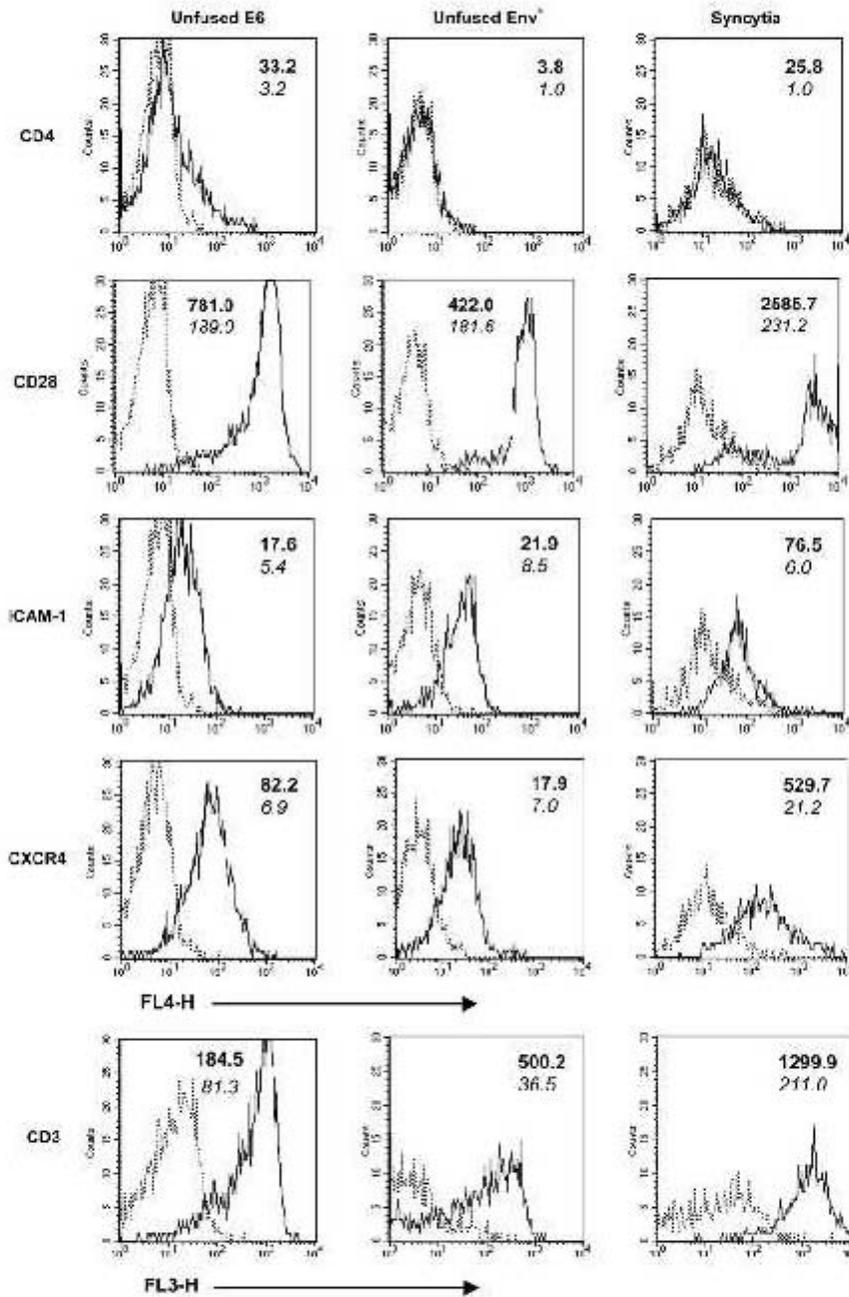
In cocultures, a rapid decline in the percentage of CD4<sup>+</sup> E6 cells was observed, decreasing by 51% after 8 h (Fig. 3a). Likewise, the level of this receptor (MFI index) on unfused E6 cells was 68% lower than that of control cells (Fig. 3b, c). Reduction of CD4 expression was not observed when E6 cells were cocultured with non-fusogenic Env<sup>+</sup> cells expressing a mutant gp41 Env protein unable to mediate fusion (Fig. 3a, b). No detectable expression of CD4 was observed on syncytia (Table 1; Fig. 2a).

#### Syncytia viability and expression of CD25 and IL-2 after activation

In agreement with previous observations [25], most of the syncytia in cocultures (70–85% in different experiments) did not show annexin V binding or 7-AAD incorporation (Fig. 4a). For some experiments (see below), syncytia were purified by cell sorting, resulting in a population consisting of 96% double fluorescent cells (Fig. 4b). The sorting procedure did not greatly affect the viability of the syncytia (Fig. 4c), since it was similar to that of syncytia in coculture.

Jurkat E6 cells release interleukin-2 (IL-2) after stimulation with phytohaemagglutinin (PHA), anti-CD3 antibodies, PMA and with a combination of PMA and a calcium ionophore, such as ionomycin. These stimuli also induce expression of the interleukin-2 receptor alpha chain (CD25) in the plasma membrane [34]. As expected, control monocultured fusogenic Env<sup>+</sup> and E6 cells were able to express CD25 (Fig. 5c, e) and produced IL-2 (Fig. 6c, e) in response to activation with PMA and ionomycin. The percentage and MFI index of fusogenic Env<sup>+</sup> cells expressing IL-2 were higher than those of E6 cells ( $p < 0.001$  and  $p < 0.01$ , respectively) (Fig. 6c, e).

Syncytia expressed CD25 and IL-2 in response to activation with PMA plus ionomycin either when the stimulus was added to cocultures after syncytia formation or when added to sorted syncytia (Figs. 5a, b; 6a, b). PMA plus ionomycin only induced a minor increase (5–7%) in early apoptotic syncytia, either in cocultures or in sorted syncytia (Fig. 4a, c). The percentage of syncytia responding to activation was similar to that of control monocultured fusogenic Env<sup>+</sup> cells (Figs. 5; 6c, d). The level of expression of CD25 and IL-2 in syncytia was also similar to that of control cells (Figs. 5; 6e, f). No expression of CD25 or IL-2 was observed on syncytia (Figs. 5; 6a, b) and individual cells in the absence of stimulation. The expression of CD25 and IL-2 by E6 and fusogenic Env<sup>+</sup> cells that remained unfused in cocultures did not differ



**Fig. 2** Expression of surface molecules on syncytia and on cells remaining unfused after coculture. Fluorescence histograms of specific antibodies labeled with third-party fluorochromes were obtained for the R2, R3 and R4 gates shown in Fig. 1. Dotted lines correspond to isotype controls. Boldface numbers indicate the standard deviation of the specific fluorescence distribution, whereas those in *italics* correspond to the MFI index (the ratio between the mean fluorescence intensity of the cells incubated with the specific monoclonal antibody and the mean fluorescence intensity of cells incubated with the isotype control). Data are representative of three experiments

significantly from that of control monocultured cells (data not shown).

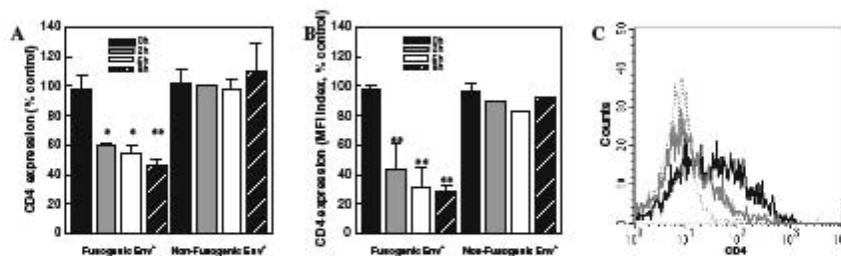
Previously, we showed that the cellular composition of syncytia is related to the coculture ratio of fusion partners, so that the average E6/Env<sup>+</sup> cell ratio of recruitment into syncytia and the size of the syncytia increase in cocultures where E6 cells are added in excess [25]. In order to determine the responsiveness of syncytia differing in cellular composition, activation was induced on syncytia obtained from cocultures differing fivefold in the initial proportion of fusion partners. Syncytia showed CD25 expression and synthesis of IL-2 under all conditions tested, and the level of response was also similar to that of control fusogenic Env<sup>+</sup> cells (data not shown).

## Discussion

The study of the consequences of HIV-induced fusion of immune-system cells may be important for a comprehensive understanding of HIV pathology. Here, we show that *in vitro* syncytium formation between E6 and fusogenic Env<sup>+</sup> cells is associated with a rapid reduction in the percentage of CD4<sup>+</sup> cells in the unfused, bystander E6

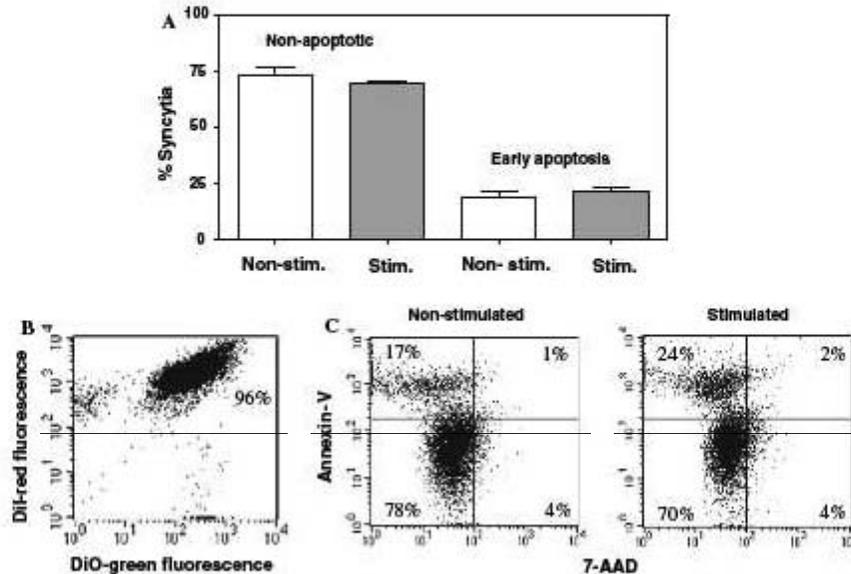
population. Such reduction was accompanied by the removal of cells with the highest levels of surface CD4, suggesting that these cells were preferentially incorporated into syncytia. This is in agreement with a requirement for multiple CD4 molecules for interaction with Env during fusion, as suggested previously [35, 36]. Alternatively, the blocking of CD4 by gp120 released from Env-expressing cells [37, 38] or a downmodulation of CD4 after interaction with soluble gp120 [39] could also account for the low expression of CD4 on the remaining unfused cells. However, reduction of CD4 expression was not seen in E6 cells cocultured with non-fusogenic Env<sup>+</sup> cells. Although spontaneous or CD4-induced shedding of gp120 is a well-known process [37, 38, 40, 41], we consider it unlikely that shedding of the gp120 protein from the Env<sup>+</sup> fusogenic cells, but not from the non-fusogenic Env<sup>+</sup> cell line, explains the CD4 decrease in bystander cells. The constructs used to transfect the fusogenic and non-fusogenic Env<sup>+</sup> cells carry the *env* gene from the same HIV HXBc2 strain [27, 42]. Furthermore, the properties of the Env molecules expressed by both cell types regarding gp160 processing, affinity for CD4, cell-surface expression, and particularly, the association between gp120 and gp41 and the supernatant concentration of gp120 (shed from gp120-expressing cells) are similar [27, 28, 42]. Therefore, we believe that the reduction of CD4 expression on bystander E6 cells in coculture with fusogenic Env<sup>+</sup> cells is related with the fusion process.

Generation of an uninfected CD4<sup>+</sup> T cell population due to selective pressure during HIV-induced syncytia formation *in vitro* was observed early on by Lifson et al. [1], who also showed that this population was able to further divide and become predominant in the culture. Here, we show that syncytia, along with cells remaining unfused after coculture, have very low or null levels of CD4 expression. If



**Fig. 3** Expression of CD4 by E6 cells remaining unfused after coculture with fusogenic Env<sup>+</sup> cells for the indicated time. The expression of CD4 by E6 cells cocultured with non-fusogenic Env<sup>+</sup> cells is also shown. a Percentage of CD4<sup>+</sup> cells. b CD4 expression level. Standard error (SEM) of three independent experiments is

shown. *P* values were obtained by one-way ANOVA test, \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01. c CD4 expression levels in E6 cells before coculture (black line) and in unfused bystander E6 cells from an 8-h coculture (continuous gray line). Dotted line corresponds to the isotype control



**Fig. 4** Analysis of viability of syncytia. **a** Percentage of apoptotic and non-apoptotic syncytia in unstimulated cocultures, or those stimulated with PMA plus ionomycin. The mean  $\pm$  SEM of two independent experiments is shown. **b** Analysis of syncytia purified by

sorting. **c** Apoptosis in stimulated and non-stimulated sorted syncytia. Viable, non-apoptotic syncytia appear in the *lower left quadrant*, whereas early apoptotic syncytia (annexin V-positive, 7-AAD-negative) appear in the *upper left quadrant*

operating during HIV infection *in vivo*, survival and proliferation of a T-cell subpopulation displaying low CD4 expression levels may contribute to the reduced CD4 expression observed in some patients with advanced disease [43]. Low CD4 expression would affect the efficiency of T-cell activation mediated by the TCR/CD3 complex, particularly in response to low-affinity ligands, where the binding of CD4 to cognate MHC molecules can stabilize the TCR–ligand interaction [44, 45]. This condition may be relevant during the massive infection of lymphoid organs in HIV-1-infected patients [46], where infected multinucleated cells have been observed in lymphocyte-rich areas [14]. On the other hand, reduction of CD4 expression on cells might impede their becoming infected by HIV viral particles or eventually favor the selection of CD4-independent viruses, which have been isolated from patients and may influence important aspects of AIDS pathogenesis [47–49].

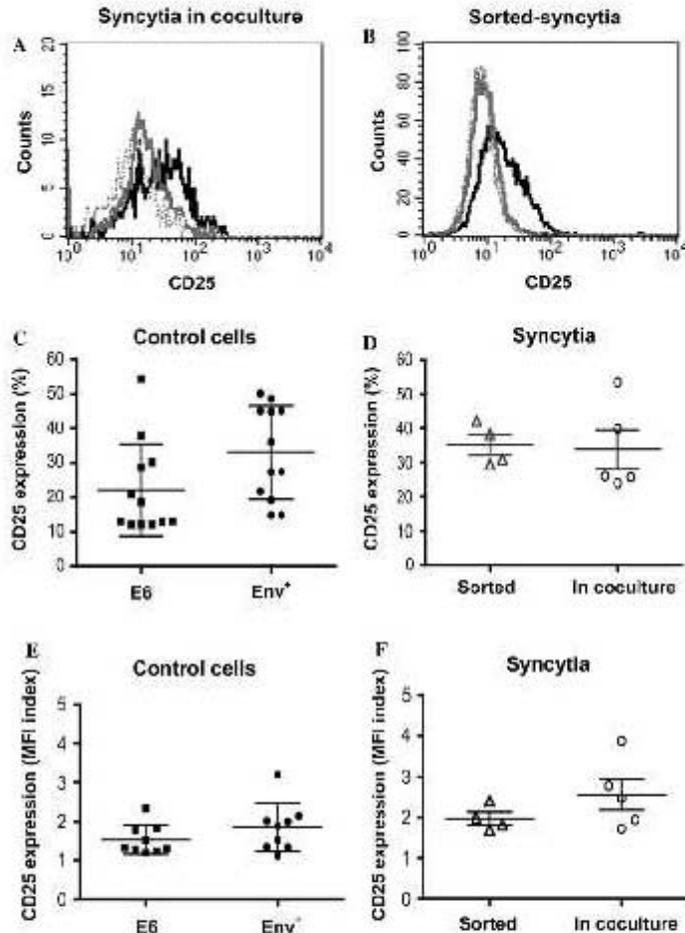
Binding of CD4 by gp120 during membrane fusion, followed by shedding of gp120 and the quick internalization of the gp120–CD4 complex [50] has been observed. This could account for the low expression of CD4 by

syncytia, in addition to the intracellular retention of envelope-CD4 receptor complexes, as mentioned above.

In previous studies, we observed that the greater proportion of syncytia generated *in vitro* contained few nuclei (two to four) and had a range of sizes similar to that of unfused cells [24, 25]. Small syncytia could even pass into circulation, where a reduced expression or blocking of the CD4 molecule would hinder their detection using common antibody-based techniques. Taken together, these observations suggest that most of the syncytia formed *in vivo* may go unnoticed because of their small size and that they would show low or null CD4 expression.

Under our experimental conditions, syncytia were viable and functional, in that they responded to stimulation with PMA and ionomycin by expressing CD25 and synthesizing IL-2. This was clearly manifested both by syncytia in coculture, where unfused cells are still present, and by syncytia cultured in isolation. Interestingly, the response of syncytia to stimulation was closer to that of the most responsive fusion partner (fusogenic Env<sup>+</sup> cells), indicating that syncytia may manifest significant levels of biological activity.

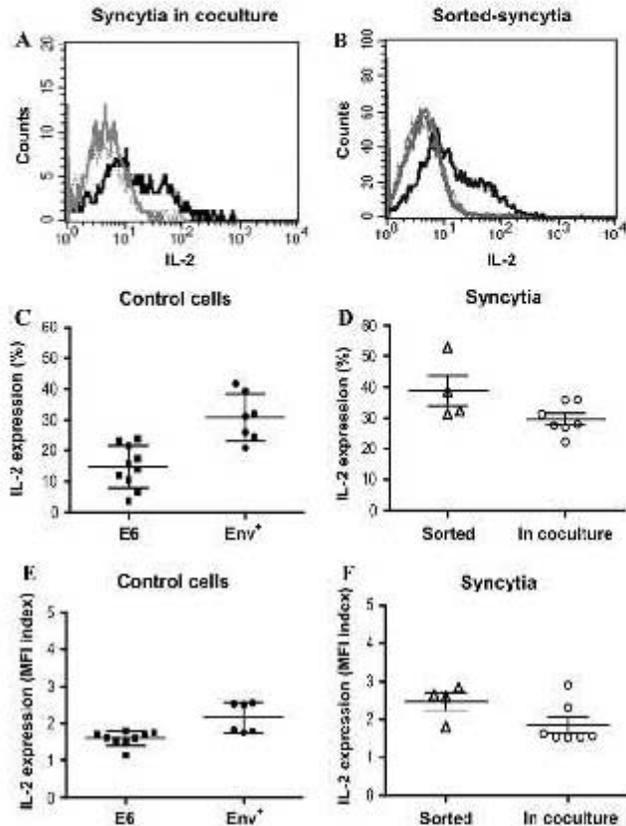
**Fig. 5** CD25 expression on syncytia and control cells after stimulation with PMA plus ionomycin. **a** Syncytia in coculture and **b** sorted syncytia. Stimulated and non-stimulated syncytia are shown in continuous black and gray lines, respectively. *Dotted lines* correspond to isotype controls. For cocultures, the fluorescence of the population in the R4 gate of Fig. 1a, corresponding to syncytia, is shown. **c** Effect of stimulation on the percentage of CD25<sup>+</sup> cells in control non-cocultured E6 and fusogenic Env<sup>+</sup> cells in different experiments. **d** Effect of stimulation, in coculture or after sorting, on the percentage of CD25<sup>+</sup> syncytia. Expression levels of CD25 on **(e)** stimulated control cells and **(f)** syncytia. The mean and standard error of independent experiments are shown



The wide distribution of the fluorescence intensity in the syncytium population reflects the generation of syncytia with a vast array of sizes, with the larger syncytia showing the highest fluorescence values (data not shown). On the other hand, the random acquisition of receptor units from the fusion partners would also expand the range of receptor expression levels on syncytia so that syncytia showing higher fluorescence than any of the fusion partners may be generated by fusions of "high-high" cells, whereas syncytia containing low levels of receptors may be generated through fusions of "low-low" cells. Thus, a broad range of CD3, CXCR4, ICAM-1 and CD28 expression levels would make syncytia a

heterogeneous substrate from which different fates and responses to the microenvironmental stimulus would be expected, including activation after stimulation, emigration and chemotaxis. The expression of CD3 molecules from different cells on the membranes of the syncytia raises the intriguing possibility that syncytia may become responsive to different antigens by acquiring TCR specificities from the fused cells in a manner similar to dual-receptor-expressing T cells [51]. The relevance of the changes in the expression of the T cell surface receptors described here for HIV disease would depend of the overall extent of cell-cell fusion *in vivo*, which has not been estimated.

**Fig. 6** Intracellular IL-2 expression in syncytia and control cells after stimulation with PMA plus ionomycin. **a** Syncytia in coculture and **b** sorted syncytia. Stimulated and non-stimulated syncytia are shown in continuous black and gray lines, respectively. Dotted lines correspond to isotype controls. **c** Effect of stimulation on the percentage of IL-2<sup>+</sup> cells in control non-cocultured E6 and fusogenic Env<sup>+</sup> cells in different experiments. **d** Effect of stimulation on the percentage of IL-2<sup>+</sup> syncytia when stimulated in coculture or after sorting. Expression levels of IL-2 in stimulated control cells (**e**) and syncytia (**f**). The mean and standard error of independent experiments are shown



**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 de México (CONACYT), grant 61425 and the Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México, grant IN229307. Evelyn Rivera-Toledo and Nayali López-Balderas were recipients of a fellowship from CONACYT. We appreciate the expert technical assistance of Carlos Castellanos with cell sorting.

**Conflict of interest statement** The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- Lifson JD, Reyes GR, McGrath MS, Stein BS, Engleman EG (1986) AIDS retrovirus induced cytopathology: giant cell formation and involvement of CD4 antigen. *Science* 232:1123–1127
- Sodroski J, Goh WC, Rosen C, Campbell K, Haseltine WA (1986) Role of the HTLV-III/LAV envelope syncytium formation and cytopathicity. *Nature* 322:470–474
- Berger EA, Murphy PM, Farber JM (1999) Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol* 17:657–700
- 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* 185:621–628
- 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 USA* 97:1269–1274
- Connor RI, Molri H, Cao Y, Ho DD (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
- Koot M, Keet IP, Vos AH, de Goede RE, Roos MT, Coutinho RA, Miedema F, Schellekens PT, Tersmette M (1993) Prognostic value of HIV-1 syncytium-inducing phenotype for rate of CD4+

- cell depletion and progression to AIDS. *Ann Int Med* 118:681–688
8. Fouchier RAM, Meynard L, Brouwer M, Hovenkam EY, Schmitzmaker H (1996) Broader tropism and higher cytopathicity for CD4+ T cells of a syncytium-inducing compared to a non-syncytium-inducing HIV-1 isolate as a mechanism for accelerated CD4+ T cell decline in vivo. *Virology* 219:87–95
  9. Miedema F, Meynard L, Koot M, Klein MR, Roes MT, Groenink M, Fouchier RA, Van't West AB, Tersmette M, Schellekens PT, Schmitzmaker H (1994) Changing virus-host interactions in the course of HIV-1 infection. *Immunol Rev* 140:35–72
  10. Furrer H, Wendland T, Minder C, Christen A, von Overbeck J, Grunow R, Fiebler W, Malinverni RP (1998) Association of syncytium-inducing phenotype of HIV-1 with CD4 cell count, viral load and sociodemographic characteristics. *AIDS* 12:1341–1346
  11. Etemad-Moghadam B, Rhone D, Steenbeke T, Sun Y, Manola J, Gelman R, Fenton JW, Racz P, Temmer-Racz K, Axthelm MK, Letvin NL, Sodroski J (2001) Membrane-fusing capacity of the human immunodeficiency virus envelope protein determines the efficiency of CD4+ T-cell depletion in macaques infected by a simian-human immunodeficiency virus. *J Virol* 75:5646–5655
  12. Nardacci R, Antonini A, Larooca LM, Arena V, Amendola A, Perfettini JL, Kroemer G, Raccanelli M (2005) Characterization of cell death pathways in human immunodeficiency virus-associated encephalitis. *Am J Pathol* 167:695–704
  13. Frankel SS, Temmer-Racz K, Racz P, Wenig BM, Hansen CH, Heffner D, Nelson AM, Pope M, Steinman RM (1997) Active replication of HIV-1 at the lymphoepithelial surface of the tonsil. *Am J Pathol* 151:89–96
  14. Orenstein JM (2000) In vivo cytolysis and fusion of human immunodeficiency virus type 1-infected lymphocytes in lymphoid tissue. *J Infect Dis* 182:338–342
  15. Teo I, Vearyard C, Barnes H, An SP, Jones M, Lantos PL, Lathet P, Shannak S (1997) Circular forms of unintegrated human immunodeficiency virus type 1 DNA and high levels of viral protein expression: association with dementia and multinucleated giant cells in the brains of patients with AIDS. *J Virol* 71:2928–2930
  16. Castedo M, Perfettini JL, Andraud K, Roumier T, Piacentini M, Kroemer G (2003) Mitochondrial apoptosis induced by the HIV-1 envelope. *Ann N Y Acad Sci* 1010:19–28
  17. Scheller C, Jassoy C (2001) Syncytium formation amplifies apoptotic signals: a new view on apoptosis in HIV infection in vitro. *Virology* 282:48–55
  18. 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
  19. Chan DC, Kim PS (1998) HIV entry and its inhibition. *Cell* 93:681–684
  20. Beaman PW, Nakamura GR (1994) Adhesion mediated by intercellular adhesion molecule 1 attenuates the potency of antibodies that block HIV-1 gp120-dependent syncytium formation. *AIDS Res Hum Retroviruses* 10:585–593
  21. Hildreth JE, Orenstein RJ (1989) Involvement of a leukocyte adhesion receptor (LFA-1) in HIV-induced syncytium formation. *Science* 244:1075–1078
  22. Pantaleo G, Butini L, Graziosi C, Poli G, Schnittman SM, Greenhouse I, Gallin JL, Fauci AS (1991) Human immunodeficiency virus (HIV) infection in CD4+ T-lymphocytes deficient in LFA-1: LFA-1 is required for HIV-mediated fusion but not for viral transmission. *J Exp Med* 173:511–514
  23. Huerta L, Lamoyi E, Baeza-Saldana A, Larralde C (2002) Human immunodeficiency virus envelope-dependent cell-cell fusion: a quantitative fluorescent cytometric assay. *Cytometry* 47:100–106
  24. 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
  25. López-Balderas N, Huerta L, Villarreal C, Rivera-Toledo E, Sandoval G, Larralde C, Lamoyi E (2007) In vitro cell fusion between CD4(+) and HIV-1 Env(+) T cells generates a diversity of syncytia varying in total number, size and cellular content. *Virus Res* 123:130–146
  26. Gascoigne NR, Zal T (2004) Molecular interactions at cell-antigen-presenting cell interface. *Curr Opin Immunol* 16:114–119
  27. Cao J, Park IW, Cooper A, Sodroski J (1996) Molecular determinants of acute single-cell lysis by human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 70:1340–1354
  28. Huerta L, López-Balderas N, Rivera-Toledo E, Sandoval G, Gómez-Izabalceca G, Villarreal C, Lamoyi E, Larralde C (2009) HIV-envelope-dependent cell-cell fusion: quantitative studies. *ScientificWorld J* 9:746–763
  29. Schmid I, Uttenbogaart CH, Giorgi JV (1994) Sensitive method for measuring apoptosis and cell surface phenotype in human thymocytes by flow cytometry. *Cytometry* 15:12–20
  30. 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
  31. Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM, Strober W (2001) Current protocols in immunology. Greene Publishing, Wiley, New York
  32. Crise B, Bannocoe L, Rose JK (1990) CD4 is retained in the endoplasmic reticulum by the human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein precursor. *J Virol* 64:5585–5593
  33. Stevenson M, Meier C, Mann A, Chapman N, Wasik A (1988) Envelope glycoprotein of HIV induces interference and cytolysis resistance in CD4+ cells: mechanism for persistence in AIDS. *Cell* 53:483–496
  34. Abraham RT, Weiss A (2004) Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signaling paradigm. *Nat Rev Immunol* 4:301–308
  35. Frey S, Marsh M, Günther S, Pelchen-Matthews A, Stephens P, Ortlepp S, Stegmann T (1995) Temperature dependence of cell-cell fusion induced by the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 69:1462–1472
  36. Iyengar S, Hildreth JE, Schwartz DH (1998) Actin-dependent receptor colocalization required for human immunodeficiency virus entry into host cells. *J Virol* 72:5251–5255
  37. Moore JP, McKenting JA, Weiss RA, Sattenau QI (1990) Dissociation of gp120 from HIV-1 virions induced by soluble CD4. *Science* 250:1139–1142
  38. Schneider J, Kaaden O, Copeland TD, Orrolián S, Hummann G (1986) Shedding and interspecies type sero-reactivity of the envelope glycoprotein gp120 of the human immunodeficiency virus. *J Gen Virol* 67:2533–2538
  39. Gelenimus B, Bour S, Wainberg MA (1994) Cell surface down-modulation of CD4 after infection by HIV-1. *FASEB J* 8:593–600
  40. Dimitrov DS, Hillman K, Manicewicz J, Blumenthal R, Golding H (1992) Kinetics of soluble CD4 binding to cells expressing human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *J Virol* 66:132–138
  41. Hart TK, Kimb R, Elless H, Sweet RW, Lambert DM, Petteway SR Jr, Leary J, Bagelski PJ (1991) Binding of soluble CD4 proteins to human immunodeficiency virus type 1 and infected cells induces release of envelope glycoprotein gp120. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:2189–2193
  42. Bergeson L, Sullivan N, Sodroski J (1992) Target cell-specific determinants of membrane fusion within the human immunodeficiency