



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

EFFECTO DE LA ACTIVACIÓN SOBRE LA FUSIÓN DE LINFOCITOS T
INDUCIDA POR LAS PROTEÍNAS DE LA ENVOLTURA DEL VIH

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIOL. CÉSAR NOÉ CORTÉS RUBIO

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:

DRA. LEONOR HUERTA HERNÁNDEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

COMITÉ TUTOR:

DRA. ROCIO GABRIELA TIRADO MENDOZA
FACULTAD DE MEDICINA
DR. EDUARDO GARCÍA ZEPEDA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

MÉXICO, D.F. JUNIO, 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 10 de Diciembre de 2012, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **CORTES RUBIO CESAR NOE** con número de cuenta **302032345** con la tesis titulada **"EFECTO DE LA ACTIVACION SOBRE LA FUSION DE LINFOCITOS T INDUCIDA POR LAS PROTEINAS DE LA ENVOLTURA DEL VIH"**, realizada bajo la dirección de la **Dra. Leonor Huerta Hernández**:

| | |
|-------------|---------------------------------------|
| Presidente: | DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO |
| Vocal: | DR. LUIS PADILLA NORIEGA |
| Secretario: | DRA. ROCIO GABRIELA TIRADO MENDOZA |
| Suplente: | DR. HECTOR ENRIQUE ESPINOSA ARCINIEGA |
| Suplente: | DR. SANTIAGO AVILA RIOS |

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 03 de Abril de 2013.

M. del Coro Arizmendi
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada y por el fondo SEP-CONACYT, a través del proyecto 152946.

A la Dirección General de Asuntos del personal académico de la UNAM, proyecto PAPIIT IN209811-3.

A los miembros del Comité Tutorial:

- Dra. Leonor Huerta Hernández
- Dr. Eduardo García Zepeda
- Dra. Rocio Gabriela Tirado Mendoza

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A todos los profesores, casi innumerables que me formaron desde mi etapa básica y profesional.

Al Dr. Carlos Larralde Rangel por permitirme ser un integrante de su grupo.

A la Dra. Leonor Huerta Hernández, por su tiempo y asesoría.

Al banco de sangre del Instituto Nacional de Pediatría, Dra. Dinora Aguilar Escobar, Jefa del departamento de Banco de Sangre y al M. en C. Guillermo Escamilla Guerrero, Jefe del laboratorio del Banco de Sangre.

Al banco de sangre del Hospital Regional Lic. Adolfo López Mateos, Dr. Enrique Payns Borrego, Jefe del Banco de Sangre.

Al Q.F.B. Carlos Castellanos Barba por su capacitación en el uso del citómetro de flujo.

Al Dr. Miguel Tapia Rodríguez por su asistencia en la unidad de microscopía.

Al Dr. Rafael Saavedra Duran, por el préstamo de material.

A los miembros del jurado Dr. Enrique Ortega Soto, Dr. Luis Padilla Noriega, Dra. Rocio G. Tirado Mendoza, Dr. Héctor E. Espinosa Arciniega y al Dr. Santiago Ávila Ríos por sus valiosas críticas y recomendaciones hacia mi trabajo.

A Dra. Nayali López Balderas, Dra. Evelyn Rivera Toledo, Dr. Guillermo Gómez Icazbalceta y M. en C. Lupita Sandoval González por su tiempo, entrenamiento, asesoría, paciencia y amistad.

A todos mis compañeros del laboratorio, Biol. Israel Torres Castro, Q.F.B Israel Hernández de Luna, Andrea Cetina Palma, David Martínez Méndez, Isabel Ruelas Galindo, Marcela Esquivel Velázquez, Mariana Díaz Zaragoza y al Técnico Ricardo Hernández Ávila por su amistad y asistencia durante los experimentos.

A mis padres Manuel y Luisa y hermanos Ivette, Manuel, Javier y Edith por apoyarme en todas mis decisiones.

ÍNDICE

| | |
|--|---------------|
| ÍNDICE DE ABREVIATURAS | Pág.7 |
| RESUMEN | Pág.8 |
| ABSTRACT | Pág.9 |
| INTRODUCCIÓN | |
| • Estructura del VIH..... | Pág.10 |
| • Entrada del virus a la célula hospedera..... | Pág.12 |
| • Integración..... | Pág.13 |
| • Transcripción del genoma viral..... | Pág.14 |
| • Ensamblaje y liberación del virus..... | Pág.14 |
| • Glicoproteínas de la envoltura viral: gp120 y gp41..... | Pág.16 |
| • Fusión célula-célula: Formación de sincicios..... | Pág.19 |
| • Sincicios <i>in vivo</i> | Pág.22 |
| • Sistema Nervioso Central..... | Pág.23 |
| • Amígdalas (Adenoides y Palatinas)..... | Pág.24 |
| • Ganglios linfáticos..... | Pág.25 |
| • Activación de los linfocitos T..... | Pág.26 |
| • La complejidad de la activación inmune crónica durante la infección por el VIH..... | Pág.31 |
| • Activación <i>in vitro</i> | Pág.33 |
| ANTECEDENTES | Pág.36 |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | Pág.37 |
| OBJETIVO | Pág.38 |
| OBJETIVOS EXPERIMENTALES | Pág.38 |
| HIPÓTESIS | Pág.39 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | |
| • Líneas celulares..... | Pág.40 |
| • Separación de PBMCs..... | Pág.41 |
| • Purificación de células T CD4+ por selección negativa..... | Pág.42 |
| • Criopreservación de linfocitos T CD4+ purificados de PBMCs..... | Pág.42 |
| • Cultivo de líneas celulares..... | Pág.43 |
| • Inducción de la expresión de proteínas de envoltura..... | Pág.43 |
| • Activación: PMA-ionomicina y anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas..... | Pág.44 |
| • Tinción con colorantes fluorescentes vitales..... | Pág.45 |
| • Ensayo de fusión e inhibición..... | Pág.45 |
| • Inmunofluorescencia directa..... | Pág.46 |
| • Viabilidad celular..... | Pág.47 |
| • Adquisición y análisis..... | Pág.47 |
| RESULTADOS | Pág.50 |
| CASO 1: Activación de células Jurkat (CD4+) con PMA-ionomicina | |
| • 1.1 Efecto sobre la expresión de marcadores de superficie..... | Pág.51 |
| • 1.2 Efecto sobre la viabilidad..... | Pág.55 |
| • 1.3 Efecto sobre la fusión celular..... | Pág.55 |

| | |
|---|----------------|
| • 1.4 Análisis del tamaño y granularidad de sincicios..... | Pág.58 |
| Caso 2: Activación de PBMCs con PMA-ionomicina | |
| • 2.1 Efecto sobre la expresión de marcadores de superficie | Pág.60 |
| • 2.2 Efecto sobre la viabilidad | Pág.62 |
| • 2.3 Efecto sobre la fusión celular | Pág.63 |
| • 2.4 Análisis del tamaño y granularidad de sincicios | Pág.64 |
| Caso 3: Activación de PBMCs con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas | |
| • 3.1 Determinación de CD4 y CD3..... | Pág.66 |
| • 3.2 Efecto sobre la expresión de marcadores de superficie | Pág.66 |
| • 3.3 Efecto sobre la viabilidad | Pág.69 |
| • 3.4 Efecto sobre la fusión celular | Pág.70 |
| • 3.5 Análisis del tamaño y granularidad de sincicios | Pág.72 |
| Caso 4: Activación de linfocitos T CD4+ (purificados de PBMCs) con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas (congelados y descongelados) | |
| • 4.1 Efecto sobre la expresión de marcadores de superficie | Pág.74 |
| • 4.2 Efecto sobre la viabilidad | Pág.80 |
| • 4.3 Efecto sobre la fusión celular | Pág.81 |
| Caso 5: Activación de linfocitos T CD4+ (purificados de PBMCs) con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas (frescos) | |
| • 5.1 Efecto sobre la expresión de marcadores de superficie | Pág.85 |
| • 5.2 Efecto sobre la viabilidad | Pág.91 |
| • 5.3 Efecto sobre la fusión celular | Pág.92 |
| • 5.4 Análisis del tamaño de los sincicios..... | Pág.97 |
| DISCUSIÓN..... | Pág.99 |
| • El estímulo con PMA-ionomicina..... | Pág.101 |
| • El estímulo con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas | Pág.102 |
| • Trabajos previos sobre el efecto de la activación sobre la expresión de marcadores de superficie..... | Pág.104 |
| • CD25, CD54 y CD184..... | Pág.104 |
| • CD3..... | Pág.105 |
| • CD4..... | Pág.105 |
| • CD54..... | Pág.107 |
| • Las células T CD4+ específicas para el VIH..... | Pág.108 |
| • Translocación microbiana y activación bystander..... | Pág.108 |
| CONCLUSIONES..... | Pág.113 |
| APÉNDICE..... | Pág.114 |
| • Receptores estudiados en este trabajo | |
| • CD4..... | Pág.114 |
| • CD184 (CXCR4)..... | Pág.115 |
| • CD54 (ICAM-1)..... | Pág.115 |
| • CD25 (IL-R α)..... | Pág.118 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | Pág.119 |

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

- **A:** Activados.
- **7-AAD:** 7-amino-actinomicina D.
- **AIM-V:** Medio de cultivo libre de suero.
- **APCs:** Células Presentadoras de Antígenos (por sus siglas en inglés).
- **APC:** Fluorocromo alofocianina.
- **BSA:** Albúmina Sérica Bovina (por sus siglas en inglés).
- **DAG:** Diacilglicerol.
- **DMSO:** Dimetil Sulfoxido.
- **DII:** Perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametil-indocarbocianina.
- **DIO:** Perclorato de 3,3'-dioctadecil-oxocarbocianina.
- **DPBS:** buffer de fosfatos salino de Dulbecco.
- **Env+:** Complejo de proteínas de la envoltura del VIH (gp120 y gp41).
- **FACS:** Clasificador celular activado por fluorescencia (por sus siglas en inglés). Citometría de flujo.
- **FSC-H:** Dispersión frontal de un haz de luz al incidir sobre una partícula (tamaño).
- **GALT:** Tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal (por sus siglas en inglés).
- **HAART:** Terapia antirretroviral altamente activa (por sus siglas en inglés).
- **ICAM-1:** Molécula de Adhesión Intercelular-1 (CD54).
- **IFM:** Índice de Fluorescencia Media.
- **LPS:** Lipopolisacárido.
- **NA:** No Activados.
- **PBMCs:** Células Mononucleares de la Sangre Periférica (por sus siglas en inglés).
- **PKC:** Proteína cinasa C.
- **PLC γ :** Fosfolipasa C gamma.
- **PMA:** Forbol 12-miristato 13-acetato.
- **RE:** Retículo Endoplásmico.
- **RPMI:** Medio de cultivo celular .
- **SFB $_i$:** Suero Fetal Bovino inactivo.
- **SI:** Virus inductor de sincicios (por sus siglas en inglés).
- **SIDA:** Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida.
- **SMAC:** Complejo supramolecular de activación.
- **SNC $_i$:** Suero Normal de Cabra inactivo.
- **SSC-H:** Dispersión lateral de un haz de luz al incidir sobre una partícula (granularidad).
- **T-20:** Enfuvirtida.
- **TLRs:** Receptores tipo Toll (por sus siglas en inglés).
- **VIH:** Virus de la Inmunodeficiencia Humana.

RESUMEN

Las células infectadas por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) expresan en su membrana las proteínas de la envoltura viral (complejo gp120/gp41 o Env), adquiriendo la capacidad para fusionarse con células sanas que portan el receptor CD4 y un receptor para quimiocinas, formando sincicios. Se ha propuesto que la fusión celular podría constituir uno de los mecanismos subyacentes en la pérdida de linfocitos T CD4⁺ característica del SIDA; aunque también podría inducir otros efectos, tales como alteraciones en las propiedades inmunológicas de las células fusionadas y cambios en la replicación viral. Por otra parte, la activación inmunológica tiene un papel preponderante en la patogénesis del SIDA, ya que se relaciona con la replicación del virus, la disminución en el número de células CD4⁺ en la sangre, y con la progresión de la enfermedad. La estimulación *in vitro* de linfocitos T con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas provee un mecanismo de estimulación que es similar al que se induce durante la presentación de antígenos en la respuesta inmune adaptativa. En este trabajo investigamos si la activación leucocitaria modifica la capacidad de los linfocitos T CD4⁺ para fusionarse con células Jurkat que expresan las glicoproteínas del gen *env* del VIH. Para este propósito, estimulamos linfocitos T CD4⁺ ya sea con PMA-ionomicina o con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas. Mediante citometría de flujo se analizaron los cambios en la expresión de los receptores CD3, CD4, CD25 (IL-2R α), CD54 (ICAM-1) y CD184 (CXCR4) debido al estímulo. La formación de sincicios producidos por la fusión linfocito-linfocito se realizó mediante cocultivos de linfocitos T CD4⁺ marcados con el colorante DiI (fluorescente en rojo) con la línea celular linfocítica transfectada con el gene *env* del VIH, marcadas con el colorante DiO (fluorescente en verde). Los sincicios fueron identificados como células con fluorescencia mixta. Los dos tipos de estímulo produjeron diferentes efectos en las células T CD4⁺. El estímulo con PMA-ionomicina disminuyó la expresión del receptor CD4 y una consecuente inhibición de la fusión celular; en cambio el estímulo con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 provocó un aumento en la expresión de CD4 y CD54 (ICAM-1) además de aumentar el porcentaje de fusión celular. Los resultados indican que diferentes tipos de estímulo *in vitro* causan distintos efectos sobre la fusión celular. Dado que la estimulación con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas es similar a la estimulación por células presentadoras de antígeno, proponemos que la activación linfocitaria durante la respuesta inmune adaptativa puede inducir un alto nivel de formación de sincicios debido al incremento de la expresión de CD4 y de moléculas de adhesión.

ABSTRACT

The cells infected by the human immunodeficiency virus (HIV) expressing in their membrane the viral envelope proteins (gp120/gp41 complex or Env), acquiring the ability to fuse with normal cells bearing the CD4 receptor and a receptor for chemokines forming syncytia. It has been proposed that cell fusion could be one of the mechanisms underlying in the loss of CD4⁺ T lymphocytes characteristic of AIDS but could also alter the immunological properties of the fused cells as well as viral replication. The immune activation has a role in the pathogenesis of AIDS, as it is related to replication of the virus, the decrease in the number of CD4 + cells in blood, and disease progression. The *in vitro* stimulation of T lymphocytes with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies coupled to magnetic beads provide a mechanism of stimulation that is similar to that induced by antigen presentation during an adaptative immune response. We investigated if leukocyte activation modifies the ability of CD4⁺ T lymphocytes to fuse with HIV-1 envelope expressing Jurkat cells. For this purpose, CD4⁺ T lymphocytes were stimulated either PMA-ionomycin or anti-CD3 and anti-CD28 antibodies coupled to magnetic beads. By flow cytometry were analyzed changes in receptor expression CD3, CD4, CD25 (IL-2R α), CD54 (ICAM-1) and CD184 (CXCR4) due to the stimulus. The syncytia formation produced by the fusion lymphocyte-lymphocyte was performed by co-cultures of CD4⁺ T cells labeled with the dye DiI (fluorescent red) with the cell line lymphocytic transfected with the *env* gene of HIV, labeled with the dye DiO (fluorescent green). The syncytia were identified as cells with mixed fluorescence. The two types of stimulus produced different effects on CD4⁺ T cells. Stimulation with PMA-ionomycin induced a decreased expression of CD4 and an almost inhibition of cell fusion, whereas the stimulation with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies caused an increase of CD4 and CD54(ICAM-1) expression, also of increased the percentage of cell fusion. Results indicate that different types of *in vitro* stimulus, cause different effects on cell fusion. Since the stimulation with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies coupled to magnetic beads is similar to the stimulation by antigen presenting cells, we propose that the lymphocyte activation during the adaptative immune response can induce a high level of syncytium formation due to increased expression of CD4 and adhesion molecules.

“El conocimiento de los detalles moleculares, bioquímicos, biológicos y estructurales han convertido al VIH en uno de los patógenos mejor conocidos en la historia” S. Ávila y G. Reyes

INTRODUCCIÓN

“¿Cómo un virus que consiste en 10 000 nucleótidos puede ser tan exitoso para evadir el control del sistema inmune humano?”: S. Rowland-Jones

Estructura del VIH

El *Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1* (VIH-1) es una especie que pertenece al género de los *Lentivirus*, a la subfamilia *Orthoretrovirinae*, dentro de la familia *Retroviridae* (Comité Internacional de Taxonomía de Virus, por sus siglas en inglés ICTV).

Como otros retrovirus prototípicos, el VIH es un virus envuelto que posee un genoma formado por dos hebras de ARN monocatenario positivo que tiene la capacidad de transcribir su genoma a ADN en la célula hospedera mediante la enzima llamada transcriptasa inversa (Knipe D., *et al* 2006).

El VIH comparte los tres genes característicos que codifican para las proteínas estructurales y enzimas requeridas para infecciones productivas con todos los retrovirus: *gag* (gen antígeno grupo-específico), que codifica para las proteínas de la cápside y nucleocápside virales, *pol* (polimerasa), que codifica para las enzimas virales y *env* (envoltura) que codifica para las glicoproteínas de la envoltura viral (Knipe D., *et al* 2006) (**Fig. 1**).

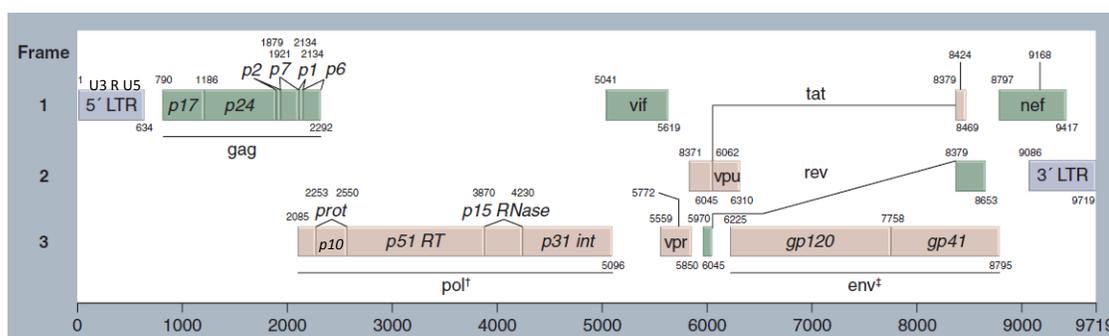


Fig. 1: Representación esquemática de la organización genómica del VIH-1. El VIH tiene un genoma retroviral característico que incluye tres genes principales, *gag*, *pol* y *env*, que codifican para las proteínas estructurales. Los tres marcos de lectura codificantes se representan junto con sus marcos abiertos de lectura (rectángulos). La posición en el genoma se numera de acuerdo a la cepa de referencia HXB2. Los números pequeños en la esquina superior izquierda de cada rectángulo indican el inicio del gen, mientras que los números en la parte inferior derecha indican la última posición del codón de término. En los extremos del genoma se encuentran las regiones largas terminales de repetición (LTR) que incluyen el sitio de inicio de la transcripción (R), contienen regiones promotoras (U3) y de unión de factores de transcripción celulares (U5), así como regiones que favorecen la dimerización y encapsidamiento del genoma viral dentro de los viriones. *p17*–matriz, *p24*–cápside, *p7*–nucleocápside, *Prot*–proteasa, *RT*–transcriptasa inversa, *Int*–integrasa, *gp120*– glicoproteína de superficie y *gp41*–glicoproteína transmembranal (Castro E., *et al* 2012).

Vistos en el microscopio electrónico, los viriones del VIH son partículas envueltas de 100 a 120 nm de diámetro, con morfología heterogénea y una cápside de forma cónica (Kuznetsov Y., *et al* 2003). Dentro de la cápside viral se encuentran dos copias (generalmente, pero no necesariamente idénticas) del genoma viral de aproximadamente 9.3 kb (Freed E., *et al* 2007; Levy J., 2007).

El virus adquiere una envoltura lipídica al salir de la célula infectada, la cual contiene a las proteínas virales codificadas por *env*. Las proteínas virales Env provienen de la proteólisis realizada por enzimas celulares (Furinas) de la glicoproteína precursora gp160 llevada a cabo en el Aparato de Golgi (Hallenberger S., *et al* 1992). La proteólisis de gp160 origina a gp120 (SU), una glicoproteína externa y gp41 (TM), una glicoproteína transmembranal (McCune J., *et al* 1988). En conjunto, gp120 y gp41 se ensamblan en trímeros para formar las espículas características de la envoltura del virus (Zhu P., *et al* 2006) (**Fig. 2**). Las espículas son fundamentales para la unión del virus a células blanco del hospedero y para la entrada del virus en ellas mediante la fusión de la membrana viral con la membrana de la célula hospedera. Gp120, la proteína con más alta variabilidad del VIH, contiene los motivos de unión a CD4, receptor característico del virus en células blanco, CCR5 y CXCR4, que son los correceptores más importantes para la entrada del virus. El ensamblaje de los nuevos viriones ocurre en balsas lipídicas, lo cual se refleja en una alta razón molar colesterol/fosfolípidos en la envoltura viral (Aloia R., *et al* 1993).

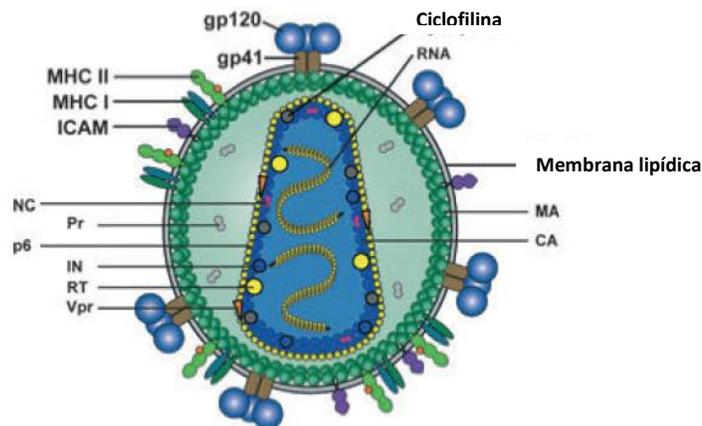


Fig 2. Representación esquemática de una partícula del VIH-1. Dos copias de ARN genómico se encuentran empaquetadas dentro de la partícula. Las enzimas virales como: la transcriptasa inversa (RT), la integrasa (IN) y la proteasa (Pr) además de las proteínas estructurales como: la cápside

(CA), la nucleocápside (NC), la matriz (MA) y P6 se encuentran dentro de la partícula junto con la proteína reguladora viral Vpr y la proteína celular ciclofilina. El virus está envuelto por una membrana lipídica derivada de la célula del hospedero en la que trímeros de la glicoproteína transmembranal viral gp41 se insertan. Tres monómeros de la glicoproteína de envoltura gp120 se asocian no covalentemente con gp41. Varias proteínas celulares también se incorporan en la membrana viral, incluyendo el MHC de clase I y II e ICAM-1 (Phogat S., et al 2007).

Entrada del virus a la célula hospedera

El VIH se une a las células blanco del hospedero a través de la molécula CD4, la cual funciona como receptor principal del virus (Levy J., 2007). Así, el VIH puede infectar a linfocitos T ayudadores CD4+, células CD4+ del linaje de los macrófagos y a algunas poblaciones de células dendríticas (mieloides, plasmacitoides y derivadas de monocitos) (Klatzmann D., et al 1984; Gartner S., et al 1986; Engering A., et al 2002). El CD4 se une a la glicoproteína de superficie viral gp120, lo que induce cambios conformacionales en la proteína viral que expone los dominios de unión a un gran grupo de receptores de quimiocinas, los cuales funcionan como correceptores del virus (Myszka D., et al 2000). Estos correceptores del virus contienen siete dominios transmembranales y señalizan a través de proteínas G (Berger E., et al 1999). Más de una docena de receptores de quimiocinas han sido implicados como correceptores del virus, sin embargo, dos son los más usados en el hospedero: CCR5 (Cheng C., et al 1997) y CXCR4 (Berger E., et al 1999).

La resolución de la estructura cristalina del núcleo de la glicoproteína gp120 ha mostrado que existen dos grandes dominios denominados externo e interno, unidos por la llamada hoja beta conectora (Kwong P., et al 1998). El sitio de unión a CD4 en gp120 incluye una parte del dominio externo y la hoja beta conectora, y está rodeado de regiones altamente glicosiladas. El sitio de unión a los correceptores del VIH en gp120 involucra al asa V3, lo que es consistente con la influencia de esta parte de gp120 en el tropismo del virus (Kwong P., et al 1998).

La unión secuencial de CD4 y los receptores de quimiocinas a gp120 desata cambios conformacionales que exponen el dominio de fusión de gp41, la proteína transmembranal de la envoltura viral (Moore J., et al 1990; Sattentau Q., et al 1991). La proteína gp41 contiene dos dominios HR (por sus siglas en ingles Heptad Repeats), uno en la región N-terminal y otro en la región C-terminal, denominados

HR1 y HR2 respectivamente. Las regiones HR1 y HR2 de gp41 tienen una estructura helicoidal del tipo “coiled coil”. Al igual que gp120, gp41 se asocia en trímeros para formar la región transmembranal de las espículas virales. En el extremo N-terminal de gp41 se localiza el péptido de fusión. Después de la unión de gp120 a CD4 y los correceptores de quimiocinas, el dominio de fusión se expone y se proyecta hacia la célula hospedera de manera parecida a un arpón (Moore J., *et al* 1990; Sattentau Q., *et al* 1991). Esto trae como consecuencia el acercamiento e interacción de HR1 y HR2 de las tres moléculas de gp41 asociadas, para formar una estructura en forma de racimo con seis hélices antiparalelas (Melikyan G., *et al* 2000). Este movimiento, permite el acercamiento de la membrana viral a la membrana celular y provoca su fusión, liberando al virus en el interior de la célula (Chan D., *et al* 1998) (**Fig. 3**).

El único inhibidor de fusión que ha sido aprobado para el tratamiento de individuos infectados por el VIH-1, es el péptido sintético T-20 (Jamjian M., *et al* 2004). T-20 es un péptido sintético formado por 36 aminoácidos, es parte de la familia de los péptidos C, al ser análogo al dominio HR2 de la región C-terminal de gp41 (aminoácidos 127-162). T-20, compite con HR2 para interaccionar con HR1 en el dominio N terminal de gp41, impidiendo la formación del racimo de seis hélices necesario para la fusión de la membrana viral con la membrana celular (Moyle G., 2003; Jamjian M., *et al* 2004; Hardy H., *et al* 2004).

Se ha demostrado que las cápsides completas viajan hacia el núcleo dirigidas en un principio por microtúbulos y posteriormente por filamentos de actina en las proximidades del núcleo. Movimientos lentos dirigidos por actina llevan a las cápsides a encallar en los poros nucleares (**Fig. 3**). La transcripción inversa del genoma viral ocurre en el llamado complejo de retrotranscripción (RTC) dentro de la cápside, en el poro nuclear. Una vez retrotranscrito el genoma viral y en el ámbito del poro nuclear, ocurre la descapsidación (Arhel N., *et al* 2007).

Integración

Para establecer una infección productiva, el ADN viral debe integrarse en un cromosoma de la célula hospedera a través de la enzima integrasa (Cullen B., 2001). Esta enzima remueve inicialmente dos nucleótidos de los extremos del genoma viral

(originalmente con extremos romos), para después catalizar la reacción de transferencia de hebra de ADN, generando un corte escalonado en el ADN del hospedero y uniendo el ADN viral al ADN del hospedero (Freed E., *et al* 2007).

Los sitios de integración en los cromosomas de la célula hospedera son importantes para el virus, ya que influyen en la expresión eficiente del genoma viral. En general, se ha observado que la mayoría de los provirus se integran en sitios transcripcionalmente activos de la cromatina celular, lo que favorece una expresión eficiente de los genes virales después de la integración (Bor Y., *et al* 1996; Schroder A., *et al* 2002).

Transcripción del genoma viral

El LTR del VIH contiene secuencias promotoras y potenciadores (enhancers) con sitios de unión para varios factores de transcripción y una señal de poliadenilación (Jones K., *et al* 1986; Nabel G., *et al* 1987; Peterlin B., *et al* 2003).

La región U3 del LTR, más adelante del sitio de inicio de la transcripción (R), incluye al iniciador (Inr), la caja TATA y tres sitios Sp1 y su principal función es el reclutamiento de la ARN polimerasa II (RNAPolII) para el inicio de la transcripción de los genes virales. Más allá de la región promotora se encuentra el potenciador (enhancer), que une factores de transcripción presentes en el núcleo de células activadas, como NF-kB, NFAT y proteínas de la familia ETS (Peterlin B., *et al* 2003). Por lo tanto hay coordinación entre la transcripción viral y la activación celular (Lawn S., *et al* 2001).

Además la proteína tat del VIH-1 funciona como un activador de la transcripción. Tat se une a una estructura en forma de horquilla, conocida como elemento de respuesta a la transactivación (TAR), localizada en el extremo 5' del LTR del ARN viral en la región R (Roy S., *et al* 1990).

Ensamblaje y liberación del virus

Estudios con microscopía electrónica han mostrado que el ensamblaje y salida del VIH ocurre predominantemente en la membrana plasmática. Sin embargo, también está claro que en algunos tipos de células (principalmente monocitos/

macrófagos), el ensamblaje y gemación de los viriones ocurre en compartimientos intracelulares definidos como endosomas tardíos o cuerpos multivesiculares (MVB) (Orenstein J., *et al* 1988; Pelchen- Matthews A., *et al* 2004) (**Fig. 3**).

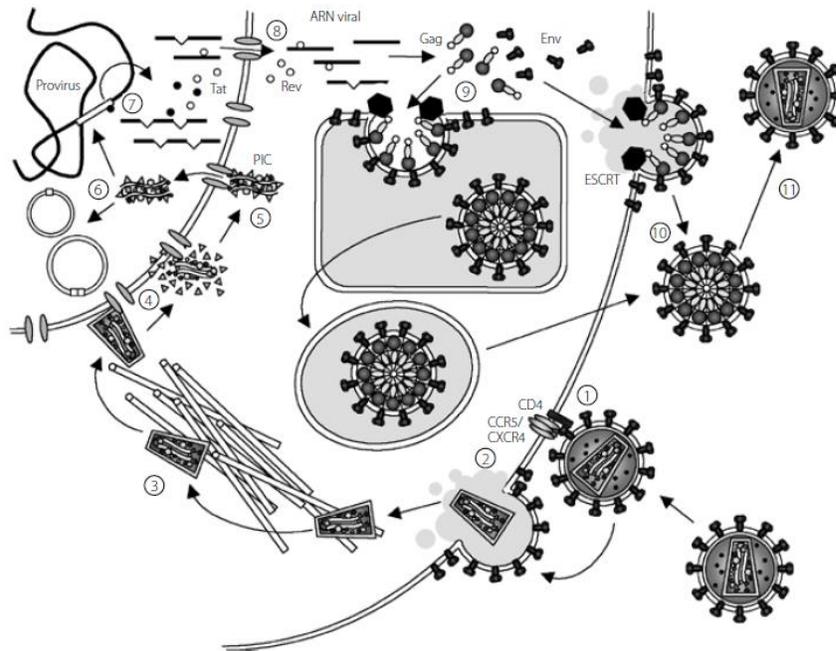


Fig. 3: Ciclo de replicación del VIH.

1) Al unirse gp120 a CD4, receptor principal del VIH en células del hospedero, ocurren cambios conformacionales en gp120 que exponen sus dominios de unión al correceptor. Los receptores de quimiocinas CCR5 y CXCR4 funcionan como los principales correceptores del virus.

2) La unión del correceptor causa otro cambio conformacional que expone el dominio de fusión en gp41, a través del cual se unen las membranas celular y viral, permitiendo la entrada del virus a la célula.

3) Entrada de la cápside viral (asociada al ARN viral) al citoplasma. La cápside viaja a través de microtúbulos para anclarse en el poro nuclear.

4) Al ocurrir la transcripción inversa del genoma viral y formarse el ala central de ADN, ocurre la descapsidación y se forma el complejo de preintegración (PIC), incluyendo a MA, RT, IN y Vpr.

5) El PIC es transportado al interior del núcleo gracias a señales de localización nuclear en MA, IN y Vpr.

6) Una vez en el núcleo, el ADN viral puede integrarse en la cromatina de la célula por la actividad de la integrasa. Alternativamente, el ADN viral puede permanecer en forma episomal como círculos de dos LTR, círculos de un LTR, y formas circulares rearrregladas. Estas formas episomales no generan infecciones productivas.

7) Una vez integrado, el genoma viral es transcrito, produciéndose ARN con múltiples eventos de corte y empalme (splicing) en etapas tempranas. Estos ARN tempranos originan a las proteínas reguladoras Tat, Rev y Nef. Tat funciona como transactivador de la transcripción de los genes virales, permitiendo la formación de transcritos largos. En etapas tardías de la transcripción se forman ARN con uno o sin ningún evento de corte y empalme, los cuales originan a las proteínas estructurales Gag, Pol y Env así como a las proteínas accesorias Vif, Vpr y Vpu.

8) Los ARN tardíos son transportados al citoplasma por Rev, evitando así los eventos de corte y empalme.

9) Los precursores de las proteínas estructurales y los genomas virales se ensamblan en balsas lipídicas en membranas de endosomas tardíos o en la membrana plasmática. MA se dirige a las membranas por su característica miristilación.

10) Para la salida de nuevos viriones de la célula, el virus usurpa a los sistemas ESCRT, ordenadores del tránsito intracelular de vesículas. Gracias a interacciones con proteínas celulares ESCRT y a la contribución de la proteína viral Vpu, los nuevos viriones pueden gemar hacia el exterior a partir de la membrana plasmática o gemar hacia el lumen de cuerpos multivesiculares (MVB), para después ser liberados por fusión de estas vesículas con la membrana plasmática.

11) Los nuevos viriones deben madurar para ser infecciosos. La proteasa viral lleva a cabo este proceso cortando las poliproteínas Gag y Gag-Pol, para generar proteínas maduras. Salida de los viriones a través de la membrana con la incorporación de las glicoproteínas de la envoltura y otras proteínas presentes en la superficie celular (Revisado en Ávila S., et al en Córdova J., et al 2009).

Glicoproteínas de la envoltura viral gp120 y gp41

Gp160, es una proteína integral de membrana tipo 1, que desempeña un papel crítico en la infección viral (Allan J., et al 1983). Gp160 sufre proteólisis mediante proteasas celulares originando dos subunidades, la subunidad gp120 soluble, y la subunidad gp41 que contiene el dominio transmembranal, ambas subunidades se encuentran asociadas no covalentemente (Land A., et al 2001).

Las glicoproteínas de la envoltura son el único componente de VIH requerido para la fusión entre las membranas del virus y la célula blanco (Land A., et al 2001) y son el blanco principal para el sistema inmune del huésped ya que la mayor parte de los anticuerpos neutralizantes en el suero de humanos infectados con el VIH-1 son dirigidos contra gp160 (Robey W., et al 1985), pero también la respuesta citotóxica de los linfocitos T CD8+ va dirigida contra células que expresan péptidos de varias proteínas del VIH, incluyendo envoltura, reversotranscriptasa, Gag y algunas proteínas accesorias (Tat, Rev, Vif y Nef) (McMichael A., et al 2001; Cao J., et al 2003).

Todas las proteínas destinadas a ser transportadas a través de la vía secretora comienzan su viaje por la membrana del retículo endoplásmico (RE) (Land A., et al 2001). Estas proteínas contienen una señal específica que las dirige a la membrana del RE, llamada péptido señal (Martoglio B., et al 1998). El péptido señal de gp160, contiene cinco aminoácidos cargados positivamente (Li Y., et al 1996). Tan pronto como la cadena nascente de la proteína entra al lumen del RE, comienza a plegarse, los enlaces disulfuro se forman y la proteína se glicosila (Land A., et al 2001).

El medio oxidante en el lumen del RE promueve la formación de los enlaces disulfuro, que pueden estabilizar la estructura tridimensional de la proteína durante y / o después del plegado (Segal M., *et al* 1992). Gp160 tiene 10 enlaces disulfuro; nueve se encuentran en gp120 y uno en gp41 (Earl P., *et al* 1991).

Tan pronto como el residuo de asparagina, en la secuencia consenso N-X-S / T (donde X es cualquier aminoácido excepto prolina) de gp160 emerge dentro del lumen del RE, el oligosacárido GlcNAc2Man9Glc3 es añadido en bloque por una oligosacaril transferasa. Inmediatamente después de la unión del oligosacárido a la cadena naciente, los tres residuos de glucosa terminales se cortan y es seguido por la eliminación de uno o dos residuos de manosa (Land A., *et al* 2001).

Se conoce que algunos sitios de glicosilación tipo N no son necesarios para el plegamiento de gp160, ya que en ausencia de la glicosilación conservan la capacidad para unirse a CD4 y de inducir sincicios (Hemming A., *et al* 1994) y también formas no glicosiladas de gp120 generadas, ya sea por delección de la secuencia señal de gp120 del VIH-1 o por síntesis en la presencia de tunicamicina (Elbein A., 1984) fallan a la unión con CD4 (Li Y., *et al* 1993).

La importancia de los glicanos para el plegamiento y estructura de gp160 no es sorpresa, teniendo en cuenta su contribución a la masa total de la proteína (casi el 50% en gp120 (Land A., *et al* 2001) (**Fig. 4a**). Gp160 contiene ~30 sitios potenciales de glicosilación tipo N, la mayoría de los cuales se utilizan (Leonard C., *et al* 1990) (**Fig. 4**).

Cuando las proteínas contienen glicanos tipo N dentro de aproximadamente sus primeros 50 residuos estas interactúan con calnexina y calreticulina antes de su subsecuente unión a BiP u otras chaperonas (Molinari M., *et al* 2000). Las chaperonas y enzimas de plegamiento, como BiP, calnexina, calreticulina y PDI, ayudan al plegamiento de gp160 y gp120 (Earl P., *et al* 1991; Otteken A., *et al* 1996). Las proteínas chaperonas por tanto constituyen el sistema de control de calidad en el RE (Land A., *et al* 2001).

Cuando gp160 está completamente plegada se vuelve competente para unirse a CD4 (Fennie C., *et al* 1989). Esto ya sucede en el RE desde que la asociación gp160-

CD4 conduce a la retención de CD4, y su regulación negativa de CD4 en la superficie celular (Kawamura I., *et al* 1989).

Cuando gp160 ha alcanzado su conformación nativa y se ha trimerizado, ésta es transportada al aparato de Golgi, donde la proteína se escinde en gp120 y gp41 (Land A., *et al* 2001; Stein B., *et al* 1990; Moulard M., *et al* 2000). Es de destacar que una fracción de gp120 se libera al medio en forma de monómero (Land A., *et al* 2001).

El gen *env* muestra un alto nivel de variación de secuencia (Hahn B., *et al* 1985), lo que se pone de manifiesto en la existencia de cinco regiones variables (V1-V5) separadas por cinco regiones conservadas (C1-C5) en la glicoproteína gp120 (Modrow S., *et al* 1987; Willey R., *et al* 1986). Las estructuras ramificadas indican sitios potenciales de glicosilación tipo N (**Fig 4**).

La molécula gp41 está formada por 3 dominios: un dominio extracelular (ectodominio), un dominio transmembranal y un dominio intracelular. En el dominio extracelular (extremo N terminal), se localiza el péptido de fusión formado por 16 residuos de aminoácidos hidrofóbicos (Kamath S., *et al* 2002). En ese mismo dominio se encuentran las regiones NHR y CHR (α hélices, conformadas por residuos hidrofóbicos y representadas como redes modificadas de hélices alternando 3 y 4 aminoácidos por vuelta conectados por líneas únicas), que pueden interactuar entre sí para formar un haz de seis hélices (6HB, también conocido como un trímero de heterodímeros), una conformación del núcleo de fusión de gp41 (**Fig. 4b**) (Wang J., *et al* 2011).

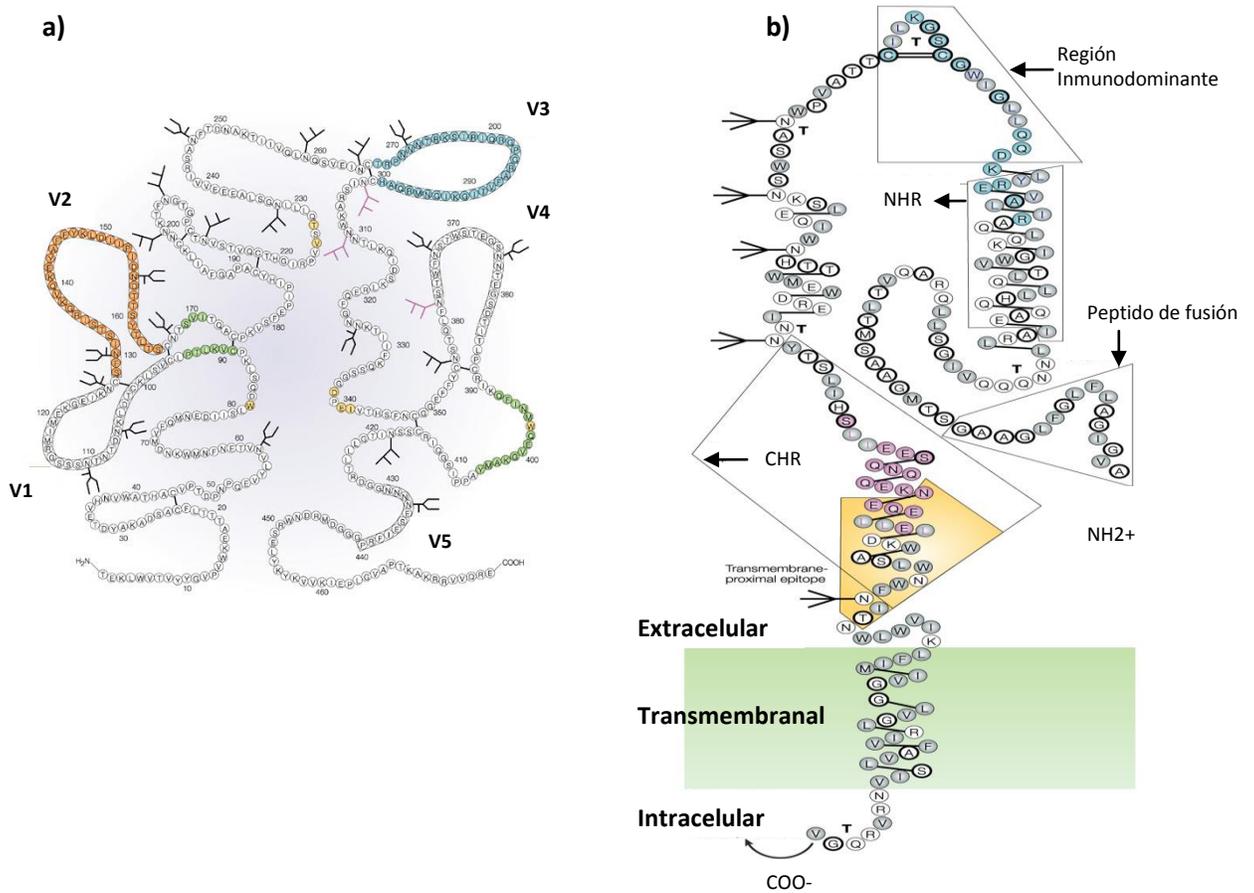


Fig. 4. a) Esquema bidimensional que muestra la estructura de gp120, se muestran las regiones variables (V1-V5), 25 sitios potenciales de glicosilación (estructuras ramificadas) y 9 puentes disulfuro. b) Esquema de la estructura de gp41, formado por tres dominios: dominio extracelular, dominio transmembranal y dominio intracelular. El dominio extracelular, esta formado por tres regiones importantes: la región del péptido de fusión, la región de hélice C y la región de hélice N. Notar que gp41, posee 5 sitios potenciales de glicosilación y un puente disulfuro (Zolla-Pazner S., 2004).

Fusión célula-célula: Formación de sincicios.

Schnittman S., *et al* utilizando la técnica de PCR cuatitativo, determinaron que el número de células T CD4⁺ infectadas por el VIH en sangre resultó ser mayor de 1/1 000 (0.1%) hasta mayor de 1/100 (1%) en pacientes sintomáticos (incluyendo la fase de SIDA) y menos de 1/10 000 (0.01%) hasta 1/1 000 (0.1%) en algunos pacientes asintomáticos (Schnittman S., *et al* 1990).

Las células infectadas por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) sintetizan y expresan en su membrana citoplasmática las proteínas de la envoltura

viral (complejo gp120/gp41 o Env) a partir del gene viral *env*. Estas moléculas confieren a las células infectadas la capacidad para interaccionar con células circundantes sanas que portan el receptor CD4 y un receptor para quimiocinas, conduciendo a la fusión entre las membranas plasmáticas de ambas células (Lifson J., *et al* 1986a; Lifson J., *et al* 1986b).

Las cepas inductoras de sincicios (SI) y no inductoras de sincicios (NSI), denominadas X4 y R5, respectivamente, fueron distinguidas inicialmente por la inducción de sincicios en líneas de células T infectadas con virus X4 (Koot M., *et al* 1992; Tateno M., *et al* 1988; Tersmette M., *et al* 1988).

Dentro de los primeros 5 años de la infección por el VIH, aproximadamente un 50% de los pacientes infectados tienen poblaciones detectables de virus inductores de sincicios (SI), un fenotipo ligado a el uso de CXCR4 (Connor R., *et al* 1997).

Los aislados X4 del VIH-1 recuperados de la sangre de individuos que se encuentran en etapas avanzadas de la enfermedad, tienen mayor capacidad para matar células CD4+ infectadas en cultivo, en comparación con las cepas aisladas en el periodo clínico asintomático. La muerte celular resulta de la formación de células multinucleadas, necrosis y apoptosis (Levy J., 2007).

Algunos investigadores han proporcionado evidencias de que la apoptosis o los procesos relacionados con la muerte celular pueden ser los principales mecanismos de la muerte de las células CD4+ y otras células en personas infectadas con VIH-1 (Garg H., *et al* 2006; Holm G., *et al* 2005; Li W., *et al* 2005; Micoli K., *et al* 2006). Otros estudios sugieren que la necrosis puede ser el mecanismo de muerte celular que refleja la lisis de células individuales (Cao J., *et al* 1996; Lenardo M., *et al* 2002; Plymale D., *et al* 1999). La lisis celular rápida puede ser resultado del contacto normal entre células CD4+ no infectadas y las células infectadas con VIH en ausencia de la formación de sincicios (Heinkelein M., *et al* 1995).

La inducción de apoptosis por gp120 soluble fue caracterizada por Trushin S., *et al* quienes demostraron que la unión de gp120 soluble a CXCR4 provocó la apoptosis de células T CD4+ humanas. La apoptosis se evitó por el uso del inhibidor de CXCR4 llamado AMD3100 ó con el anticuerpo anti-CXCR4 llamado 12G5. Este trabajo demuestra que la muerte por apoptosis puede ocurrir por el contacto de una

proteína viral soluble a células CD4⁺/CXCR4⁺ en ausencia de virus (Trushin S., *et al* 2007).

La formación de células gigantes multinucleadas es la primera señal de la infección por el VIH en las células mononucleares de la sangre periférica (PBMCs) en cultivo y puede aparecer dentro de los primeros 2-3 días. Posteriormente se observa degeneración de las células en forma de globo, probablemente como resultado de cambios en la permeabilidad de la membrana y producción de nuevas partículas virales (Lifson J., *et al* 1986a; Lifson J., *et al* 1986b; Sodroski, J., *et al* 1986). La fusión célula-célula en cultivo puede observarse desde las primeras dos horas (Tang S., *et al* 1990) y puede monitorearse por la redistribución de colorantes fluorescentes (Dimitrov D., *et al* 1991; Weiss C., *et al* 1996).

La fusión célula-célula depende de la temperatura (37° C) (Frey S., *et al* 1995), no requiere de la síntesis de ADN, ARN o proteínas celulares (Hansen J., *et al* 1989; Tang S., *et al* 1990), involucra a los carbohidratos de la superficie celular (Hansen J., *et al* 1989; Matthews T., *et al* 1987; Tang S., *et al* 1990), glicolípidos (Dragic T., *et al* 1995), requiere de la expresión de CD4, de la formación de complejos gp120/CD4 (Frey S., *et al* 1995; Tang S., *et al* 1990) e involucra moléculas de adhesión de la superficie celular (p. eg. LFA-1) (Hildreth J., *et al* 1989; Sato A., *et al* 1994).

No está claro, si el proceso de formación de sincicios es similar a la fusión entre el virus y la célula (algunos anticuerpos monoclonales anti-CD4 no bloquean la unión del virus con las células, pero previenen la fusión célula-célula) (Celada F., *et al* 1990; Healey D., *et al* 1990; Trunch A., *et al* 1991).

Se considera que además de las proteínas de fusión virales y sus receptores específicos, otras proteínas de la membrana celular como la integrina LFA-1 (Hildreth J., *et al* 1989) participan en la fusión célula-célula. Anticuerpos monoclonales dirigidos a esta proteína de superficie celular, bloquean la agregación celular y/o la formación de sincicios. Los anticuerpos dirigidos a LFA-1 no previenen la infección del virus (Pantaleo G., *et al* 1991).

Los sincicios generados *in vitro* sufren degeneración estructural y apoptosis (Castedo M., *et al* 2003; Ferri K., *et al* 2000; Perfettini J., *et al* 2005), por lo cual se

considera que la fusión celular podría constituir uno de los mecanismos subyacentes en la pérdida de linfocitos T CD4⁺ característica del SIDA (Levy J., 2007).

La formación de sincicios inducida por el VIH puede tener varias consecuencias entre las que se encuentran: muerte celular *in vitro*, depleción de células T en la sangre, liberación por transferencia célula a célula del virus en puntos de fusión locales, formación de reservorios de replicación viral, recombinación de diferentes cepas virales, modificación de la funcionalidad celular y aumento de la replicación viral (Revisado en Huerta L., *et al* 2009).

En nuestro laboratorio hemos analizado la formación de sincicios y heterocariones (producidos por la fusión linfocito-linfocito y linfocito-monocito, respectivamente) en cocultivos de líneas celulares linfocíticas transfectadas con el gene *env* del VIH y líneas celulares CD4⁺. Utilizando citometría de flujo, se ha mostrado que la fusión celular inducida por las proteínas de fusión del VIH es un proceso altamente heterogéneo, en el cual se generan sincicios y heterocariones que difieren en tamaño, composición celular, viabilidad y fenotipo (Burke A., *et al* 1994; Sharer L., *et al* 1985; Koenig S., *et al* 1986; Teo I., *et al* 1997; Huerta L., *et al* 2002; Huerta L., *et al* 2006; Huerta L., *et al* 2009). Estos estudios señalan que las células fusionadas constituyen una fuente de variabilidad funcional, cuyos efectos pueden incidir en el sistema inmune y en la replicación viral.

Sincicios *in vivo*

Los sincicios pueden provenir de la fusión de monocitos, linfocitos, y/o células dendríticas. Esto ha sido evidenciado tanto por la localización anatómica, como por la expresión de marcadores fenotípicos en células multinucleadas observadas en cortes histológicos de cerebro (macrófagos), amígdalas (dendríticas) y ganglios linfáticos (linfocitos) y también en sangre (Frankel S., *et al* 1996; Orenstein J., 2000; Bhoopat L., *et al* 2006; Koenig S., *et al* 1986; Bell J., 2004; Cherner M., *et al* 2002). Las cepas inductoras de sincicios se detectan en aproximadamente 50% de los individuos dentro de los primeros 5 años de la infección por el VIH y su presencia se asocia con una aceleración de la pérdida de linfocitos CD4⁺ y la progresión al síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (Blaak H., *et al* 2000; Connor, R., *et al* 1993;

Connor, R., *et al* 1997; Koot M., *et al* 1993; Fouchier R., *et al* 1996; Miedema F., *et al* 1994; Furrer H., *et al* 1998; Etemad-Moghadam B., *et al* 2001). La fusión celular podría constituir uno de los mecanismos subyacentes a la pérdida de linfocitos T CD4+, pero de ninguna manera quiere decir que pueda ser el mayor contribuidor que explique la pérdida.

Los protocolos de investigación sobre el VIH consideran a los pacientes progresores como aquellos que tienen una cuenta baja de células T CD4 en sangre (<200 células/ μ L), una alta carga viral en plasma (>10 000 copias/mL), además de no estar sometidos a tratamiento antirretroviral (Schweneker M., *et al* 2008).

Por otra parte, se ha reportado frecuentemente la observación de células multinucleadas en el cerebro, la médula espinal y ganglios linfáticos de individuos infectados con VIH, aun cuando estos pacientes se encontraban en la fase asintomática de la enfermedad (Frankel S., *et al* 1996; Ward J., *et al* 1987; Budka H., 1986 ; Racz P., *et al* 1986; Burke A., *et al* 1994; Sharer L., *et al* 1985; Koenig S., *et al* 1986; Teo I., *et al* 1997; Amendola A., *et al* 1996; Orenstein J., 2000; Rinfret A., *et al* 1991), indicando que la fusión celular puede ocurrir *in vivo* y que las células multinucleadas pueden permanecer viables en diversos tejidos de los individuos infectados.

Sincicios en el Sistema Nervioso Central

El VIH-1 puede penetrar el sistema nervioso central tempranamente, después de la infección sistémica inicial, como lo reflejan los antígenos virales y anticuerpos presentes en el fluido cerebroespinal en toda la fase presintomática y la meningitis o meningoencefalitis en el momento de la seroconversión. Es de suponer que el virus persiste en el sistema nervioso central durante décadas (Kramer-Hammerle S., *et al* 2005).

Los cerebros de los individuos infectados por el VIH-1 muestran varias anomalías neuropatológicas como: atrofia cerebral, infiltración de macrófagos y linfocitos, pérdida de subpoblaciones neuronales específicas, pérdida de sinapsis y dendritas, pérdida de mielina que rodea los axones neuronales, daño axonal y la activación de la microglia con formación de nódulos microgliales y la formación de

células gigantes multinucleadas por la fusión de macrófagos (Koenig S., *et al* 1986; Bell J., 2004; Cherner M., *et al* 2002).

Mediante el uso de técnicas de cocultivo para el aislamiento del virus, la hibridación *in situ*, inmunocitoquímica y microscopía electrónica de transmisión, pudo ser identificado el tipo celular importante que soporta la replicación del VIH en el tejido cerebral de individuos infectados. Los macrófagos mononucleados y multinucleados activamente sintetizan el ARN viral y producen progenie de virus en el cerebro de los pacientes. Los macrófagos infectados del cerebro pueden servir como un reservorio del virus y como un vehículo para la diseminación viral en el huésped infectado (Koenig S., *et al* 1986).

El VIH-1 entra a estas células a través del receptor CD4 y mediante el correceptor CCR5 (Kramer-Hammerle S., *et al* 2005). La microglía y los macrófagos residentes son las principales células productoras de VIH-1 en el cerebro (Anderson E., *et al* 2002; Kaul M., *et al* 2001). La acumulación de macrófagos perivasculares (Budka H., 1991) sugiere infiltración de monocitos de la sangre (Pulliam L., *et al* 1997; Fischer-Smith T., *et al* 2004, 2001), que puede más tarde incrementar el número de macrófagos activados en el cerebro. Estas observaciones indican que las células activadas pueden tener un importante papel en iniciar y sostener el daño neuronal inducido por el VIH (Kramer-Hammerle S., *et al* 2005).

Sincicios en Amígdalas (adenoides y palatinas)

Para investigar posibles sitios adicionales de replicación viral, Frankel S., *et al* examinaron muestras de tejido linfóide adenoidal de individuos en su mayoría asintomáticos para SIDA, en donde un análisis microscópico más detallado reveló agrandamiento de folículos linfoides (área de células B) y células gigantes multinucleadas. Las células infectadas y los sincicios multinucleados fueron positivos para p24 y también expresaron los marcadores de células dendríticas S100 y p55. En estas células predominantemente, el VIH-1 se replica *in situ*. Estos autores, proponen que en la mucosa adenoidal se promueve la interacción de células T con células dendríticas que son activadas repetidamente por el estímulo persistente en la nasofaringe. (Frankel S., *et al* 1996).

Frankel S., *et al* revisaron las amígdalas nasofaríngeas y amígdalas palatinas de pacientes infectados con VIH-1. La mayoría de las células p24 positivas, fueron pequeñas y multinucleadas. La mayoría de estos sincicios, fueron dobles positivos para ARN viral y para la proteína S100, marcador de *células dendríticas*. En amígdalas palatinas, los sincicios infectados S100+ fueron localizados en las invaginaciones o criptas. El tejido linfoide faríngeo puede contribuir a la replicación viral crónica, ya que todos los pacientes estaban crónicamente infectados (Frankel S., *et al* 1997).

Sincicios en Ganglios linfáticos.

Se ha estimado que en algunos individuos asintomáticos, la infección por VIH es 100 veces más prevalente en nodos linfáticos que en sangre periférica (Blackbourn D., *et al* 1996; Nuovo G., *et al* 1994; Pantaleo G., *et al* 1993a; Pantaleo G., *et al* 1993).

En un trabajo Nuovo G., *et al* encontraron que los ganglios linfáticos de pacientes con una infección asintomática de VIH-1, mostraron centros germinales expandidos donde un 20% de las células dendríticas CD21+ y de un 5-80% de las células CD4+ contenían DNA viral en comparación con un 1-11% de las células CD4+ en sangre periférica (Nuovo G., *et al* 1994). A medida que la infección progresa, las células CD4+ son depletadas, los folículos son destruidos y la arquitectura del nodo linfático se va destruyendo por la deposición de colágeno, contribuyendo aun más a la depleción de células CD4+ (Schacker T., *et al* 2002).

Orenstein J., buscó identificar la presencia de efectos citopáticos de linfocitos *in vivo* producto de la infección por VIH en tejido linfoide. Por análisis de microscopía electrónica de transmisión de las suspensiones preparadas a partir de los ganglios linfáticos evidenció tanto la replicación y la fagocitosis de partículas del VIH por los macrófagos. La inmunohistoquímica reveló linfocitos p24 positivos y restos celulares p24 positivos dentro del citoplasma de macrófagos paracorticales. En la paracorteza, linfocitos multinucleados p24 positivos con hasta 5 núcleos fueron encontrados. La hibridación *in situ* para el RNA del VIH en combinación con inmunohistoquímica para HAM56 (un marcador específico de macrófagos) evidenció a macrófagos

coteñidos en la paracorteza. Por lo tanto, los linfocitos VIH positivos, experimentan lisis en tejido linfoide y los restos celulares son fagocitados por macrófagos, donde se puede replicar el VIH. Este trabajo representa la primera evidencia directa de que algunos de los linfocitos VIH positivos se fusionan *in vivo* en los ganglios linfáticos para formar células multinucleadas pequeñas. Sin embargo, el autor discute este resultado con lo demostrado posteriormente, donde las células gigantes sincitiales no expresan el VIH y tampoco son de origen linfoide, si no más bien se trata de células dendríticas foliculares (Orenstein J., 2000).

Activación de los linfocitos T

En las células del sistema inmune, la señalización por calcio es esencial para diversas funciones celulares incluyendo: proliferación, diferenciación, apoptosis, funciones efectoras y transcripción de genes. (Hogan P., *et al* 2003; Lewis R., 2007; Hogan P., *et al* 2007). A continuación se describe como la presentación de antígenos induce la elevación de la concentración de calcio intracelular en los linfocitos T.

La activación de los linfocitos T cooperadores (T_H) durante la respuesta inmune adaptativa se inicia por la interacción del complejo TCR-CD3, con un complejo de péptido y MHC II en una célula que presenta el antígeno. La activación también requiere de la actividad de moléculas accesorias incluidos los correceptores CD4 y CD8. Estas interacciones activan muchas vías intracelulares y de transducción de señal diferentes entre las que se encuentran las vías mediadas por PKC, las vías mediadas por Ca^{2+} y las vías mediadas por proteínas G pequeñas (Goldsby R., *et al* 2005; Oh-hora M., *et al* 2008) (**Figs. 5 y 6**).

Además de las señales mediadas por el receptor de célula T y sus moléculas accesorias relacionadas (señal 1, que involucra el reconocimiento del antígeno), la activación de la célula T_H , requiere una señal coestimuladora (señal 2), proporcionada por la célula que presenta el antígeno. La señal coestimuladora se induce habitualmente por interacción entre moléculas de la familia B7 en la membrana de la APC con CD28 en la célula T_H (Goldsby R., *et al* 2005; Abbas A., *et al* 1999; Bretscher P., 1999) (**Fig. 5**).

El hecho de que la afinidad del TCR por su péptido afín / MHC es muy baja sugiere que durante la interacción célula T-APC, otras interacciones ligando-receptor pueden ser necesarias para aumentar la eficiencia de la activación. Por ejemplo, la activación de células T por APCs es extremadamente ineficiente en ausencia de interacciones entre la integrina LFA-1 en la células T y su ligando ICAM-1 en la APC (Dubey C., *et al* 1996) (**Fig. 5**).

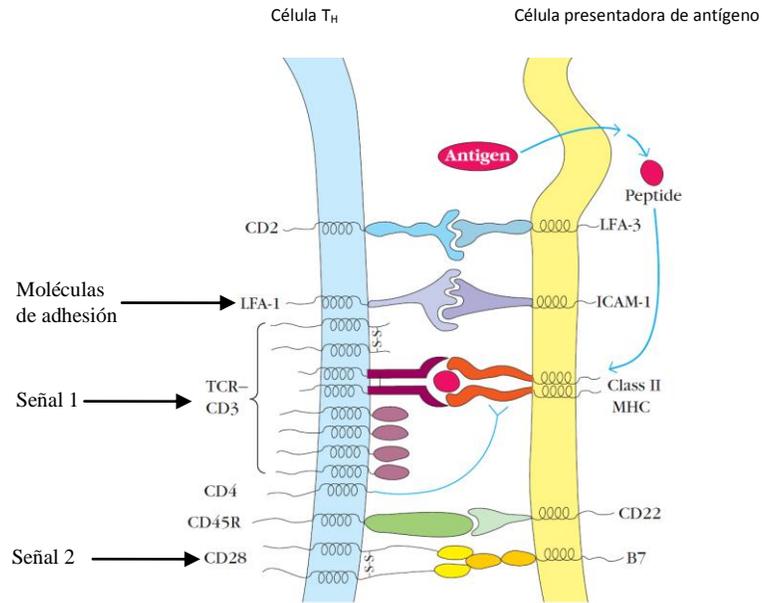


Fig. 5: Diagrama de las interacciones entre una célula TH y una célula presentadora de antígeno (APC). En el diagrama se enfatizan la señal 1 (TCR-P-MHCII y CD4-MHCII), la señal 2 (CD28-B7) y las moléculas de adhesión (LFA1-ICAM1) (Goldsby R., *et al* 2005)

Existe un largo debate sobre si el TCR y CD28 inducen distintas vías de señalización (modelo cualitativo) o si las vías de señalización empleados por ambos sistemas de receptores se sobrelapan totalmente (modelo cuantitativo) (Acuto O., *et al* 2003). Apoyo al modelo cuantitativo de señalización proviene de un estudio de microarreglos, mostrando que la estimulación a través del TCR indujo la expresión de miles de genes en células T primarias, la cual se amplifica (o suprime) en diversos grados por la coestimulación debida a CD28, pero ningún gen es inducido solamente por la coestimulación (Diehn M., *et al* 2002).

Con imágenes estáticas de conjugados de células T-APC se ha definido una estructura que se denomina "SMAC" o complejo supramolecular de activación (Monks C., *et al* 1998). Esta estructura se organiza para formar una región central (c-SMAC), que contienen altas concentraciones de TCR-CD3 y CD28, así como de intermediarios en la señalización de PKC θ , y una región periférica (denominado p-SMAC), rica en integrina LFA-1 (Monks C., *et al* 1998).

La activación del receptor de células T (TCR) conduce al reclutamiento y activación de proteínas tirosina-kinasas y a la formación de complejos de proteínas de andamiaje por proteínas adaptadoras, lo cual resulta en la fosforilación de tirosinas y la activación de la fosfolipasa C (PLC- γ 1) por ZAP-70 (Feske S., 2007; Scharenberg A., *et al* 2007 and Turner H., *et al* 1999).

Como resultado de la activación de la PLC- γ 1, la concentración intracelular de iones Ca²⁺ se incrementa a través de dos procesos interdependientes: la liberación del Ca²⁺ almacenado en el retículo endoplásmico al citoplasma, como resultado de la unión de inositol trifosfato (IP3) a los receptores de IP3, seguido de la entrada de Ca²⁺ a través de canales en la membrana plasmática, llamados CRAC (calcium release activated channels). El agotamiento de Ca²⁺ en RE abre canales CRAC, que permiten la constante entrada de Ca²⁺ extracelular en la célula (Oh-hora M., *et al* 2008) (**Fig. 6**). Ésta última constituye la mayor vía de aumento de calcio intracelular (Oh-hora M., *et al* 2008). Se han identificado a dos reguladores esenciales de la función de los canales CRAC (STIM y ORAI) (Oh-hora M., *et al* 2008) (**Fig. 6**).

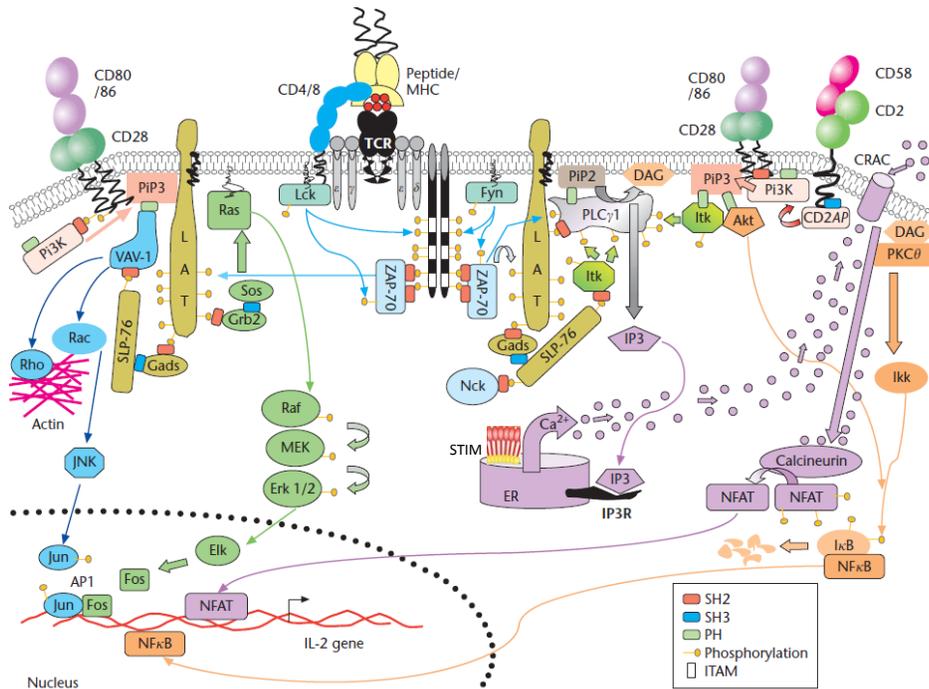


Fig 6. : Activación de los linfocitos T. La unión del antígeno/MHC al receptor de células T (TCR) desencadena la activación de las proteínas tirosina-quinasas, tales como LCK y ZAP70, que eventualmente resulta en la fosforilación y la activación de la PLC- γ 1. La PLC- γ 1 hidroliza el fosfolípido de membrana PIP2 en IP3 y DAG. El IP3 se une a su receptor (IP3R), que permite la salida de Ca^{2+} del almacén en el retículo endoplásmico (RE). Los sensores de Ca^{2+} en el RE, STIM1 y STIM2 sienten la reducción en el almacén de Ca^{2+} en el RE a través de sus extremos N-terminal localizados en el lumen del RE. Cuando el Ca^{2+} se disocia, STIM se agregan en pequeños grupos en la membrana del RE e inducen la entrada de Ca^{2+} extracelular a través de los canales CRAC. La entrada de Ca^{2+} eleva la concentración de Ca^{2+} intracelular y activa la vía de calcineurina-NFAT, así como regula la vía Ras-MAPK (Valitutti S., et al 2005; Oh-hora M., et al 2008).

Como resultado, varias proteínas de señalización dependientes de Ca^{2+} y sus factores de transcripción son activados, incluyendo la fosfatasa calcineurina y NFAT (factor nuclear de células T activadas), CaMK (cinasa dependiente de Ca^{2+} - calmodulina) y CREB (proteína de unión al elemento de respuesta de AMP-cíclico), MEF2 (factor potenciador de los miocitos 2), que actúa tanto por la vía calcineurina y CaMK y NFκB (factor nuclear κB). Al mismo tiempo, la producción de DAG activa a la cinasa de proteínas que activa la vía mitogénica (MAPK) y a la proteína cinasa C (PKC), que a su vez conducen a la activación de los factores de transcripción AP-1 (un complejo transcripcional formado por c-Jun y c-Fos) y NFκB (Karin M., et al 2005; Schulze-Luehrmann J., et al 2006) (**Fig. 6**).

Por lo tanto, la señal 1 induce un rápido aumento en la concentración del Ca^{2+} citoplásmico que detiene el movimiento de las células T (función a corto plazo; minutos) y les permite establecer la sinapsis inmunológica, un proceso que es crucial para la función a largo plazo (Bhakta N., *et al* 2005; Negulescu P., *et al* 1996; Turner H., *et al* 1999; Pipkin M., *et al* 2007).

Las funciones a largo plazo (horas) en la señalización por Ca^{2+} incluyen la proliferación de linfocitos, la expresión de genes asociados a la activación, funciones efectoras como la producción de citocinas y quimiocinas, la diferenciación de las células T naive en efectoras o de memoria, y el establecimiento de anergia en ausencia de coestimulación (estado de no respuesta antigénica) (Hogan P., *et al* 2003).

PKC θ , es un miembro de la familia de cinasas de serina-treonina. La familia PKC, puede ser clasificada dentro de 3 categorías: 1) PKC clásicas (α , BI, BII, γ), 2) PKC nuevas (δ , ϵ , η , θ) y 3) PKC atípicas (ζ , ι/λ). La clasificación se basa en las características estructurales de la región regulatoria N-terminal de las diferentes isoformas. Las PKC clásicas contienen un dominio C1 que une **DAG y éster de forbol** (en condiciones experimentales) y un dominio C2 que interacciona con fosfolípidos aniónicos de manera dependiente de Ca^{2+} . Las PKC nuevas tienen un pseudodominio C2 que no une Ca^{2+} , y un dominio C1 que une **DAG y éster de forbol** y las PKC atípicas carecen del dominio C2 y tienen un dominio C1, no respondedor a DAG. El dominio cinasa (región C terminal) de las diferentes PKCs muestra diferencias sutiles en la especificidad por sus sustratos (Nishikawa K., *et al* 1997).

La activación de las PKCs clásicas ocurre en un proceso de 2 pasos. En el primero, el incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular induce la unión de Ca^{2+} a la región C2 de la proteína y causa un cambio conformacional que promueve la asociación de la proteína con la membrana plasmática (Grobler J., *et al* 1996). Lo siguiente es la unión del DAG residente en la membrana al dominio C1 de la PKC, reteniendo la proteína en la membrana e induciendo un cambio conformacional que libera las interacciones autoinhibitorias entre el dominio regulador y el dominio cinasa, permitiendo el acceso al sustrato (Oancea E., *et al* 1998). Las interacciones autoinhibitorias son mediadas por la presencia de un motivo pseudosustrato en el

dominio regulador que es reconocido por la región cinasa. Los ésteres de forbol entre ellos PMA pueden superar el requerimiento de unión a Ca^{2+} al dominio C2 e inducir una traslocación intensa de las PKCs clásicas a la membrana (Oancea E., *et al* 1998).

En contraste a las PKC clásicas, la traslocación a la membrana y la activación alostérica de las PKC nuevas es presumiblemente iniciada por la unión a DAG o forbol ésteres, a la región C1. Después de la inserción a la membrana, todas las PKCs pueden interactuar con sus sustratos o proteínas adaptadoras hasta que son inactivadas ya sea por la degradación metabólica del DAG o por rotura proteolítica por la calpaina (Sato K., *et al* 2001).

La actividad de las PKCs, puede ser regulada por otras cinasas, como en el caso de PKC θ , la cual es fosforilada por Lck. La fosforilación en el loop de activación puede ser llevada por PDK1 (Dutil E., *et al* 1998) o por otras PKCs (Rybin V., *et al* 2003). La fosforilación del loop de activación (o más preciso las cargas negativas), es requerido para la actividad cinasa de PKC θ (Liu Y., *et al* 2002). Existen evidencias que demuestran que PKC α y PKC θ , cooperan en la activación de NF κ B y AP-1 (Trushin S., *et al* 2003; Sedwick C., *et al* 2004).

Los genes que se expresan en células T_H, como resultado de la estimulación, se pueden agrupar en 3 categorías: genes de expresión inmediata (c-Fos, c-Myc, c-Jun, NFAT y NF-Kb), genes tempranos (IL-2, IL-2R, IL-3, IL-6, IFN γ) y genes de expresión tardíos que codifican para moléculas de adherencia (VLA-1, VLA-2, VLA-3, VLA-4, VLA-5 e ICAM-1) (Goldsby R., *et al* 2005).

La complejidad de la activación inmune crónica durante la infección por el VIH.

Una fuerza importante que dirige la progresión de la enfermedad causada por el VIH-1 es la activación inmune crónica (Haas A., *et al* 2011). La activación inmune crónica se caracteriza por presentar un sistema inmune hiperactivado, que incluye la activación aberrante del sistema inmune adaptativo comprendiendo a las células T y B (Grossman Z., *et al* 2006). En el caso de las células T, esta se manifiesta por un incremento en el número de células T con un fenotipo activado (Gougeon M., *et al* 1996) y un recambio incrementado de las células T (Hazenberg M., *et al* 2003; Mohri H., *et al* 2001). La apoptosis de células T inducida por la activación o el agotamiento

y la alteración de la homeostasis de células T (Hellerstein M., *et al* 1997; Kovacs J., *et al* 2001) son consecuencias que contribuyen a la inmunodeficiencia.

Los siguientes son considerados como factores potenciales que contribuyen a la activación inmune crónica en la infección por VIH-1: a) Efecto directo de proteínas del VIH (gp120 y nef) (revisado en Huerta L., y Cortés C. 2011; Simmons A., *et al* 2001), b) Respuesta inmune innata y adaptativa al VIH (pDC y CTLs) (Boasso A., *et al* 2008; Asquith B., *et al* 2006), c) Desregulación en el balance de células T en sangre periférica y en la mucosa del tracto gastrointestinal ($\downarrow T_{H17} / \uparrow nTreg$) (Kanwar B., *et al* 2010), d) Depleción y disfunción de células T reguladoras CD4+ (Pandrea I., *et al* 2008), e) Estimulación mediante los TLRs, vía ligandos de TLRs presentes en el VIH (señalización mediante TLR8) (Chang J., *et al* 2009; Haas A., *et al* 2011) y mediante la translocación de productos microbianos a través de la mucosa intestinal dañada (señalización mediante TLR2, TLR4, TLR5 y TLR9) (Chang J., *et al* 2009; Kanwar B., *et al* 2010; Haas A., *et al* 2011), f) Co-infecciones con otros patógenos diferentes al VIH (Diedrich C., *et al* 2011), g) Activación Bystander (Haas A., *et al* 2011) y h) Evolución viral y aparición de virus inductores de sincicios (X4), los cuales infectan a células T CD4+ naive, timocitos y células T CD4+ de memoria central y son mejor reconocidos por el sistema inmune que los virus R5 (Connor R., *et al* 1997; Rowland-Jones S., 2003; Regoes R., *et al* 2005).

Dependiendo del tipo de estímulo por el cual las células T se activan en la fase crónica de la infección se distinguen 2 tipos de activación: 1) La activación de las células T por antígenos específicos mediante la interacción TCR-MHC y posterior estimulación por factores como gp120/CD4, TLRs y citocinas proinflamatorias (Haas A., *et al* 2011) y 2) La activación bystander y proliferación homeostática en ausencia de señalización por el TCR (vía nef, TLRs, citocinas proinflamatorias y citocinas homeostáticas) (Haas A., *et al* 2011).

El ciclo de replicación del VIH (Lawn S., *et al* 2001), la reducción de las células T CD4+ (infectadas y no infectadas) (Leng Q., *et al* 2001; Sousa A., *et al* 2002) y la progresión de la enfermedad se correlacionan con la activación inmunológica (Ascher M., *et al* 1990; Douek D., *et al* 2003; Grossman Z., *et al* 2002). La presentación antigénica resulta en la activación y expansión clonal de células T CD4+

de memoria CD45RO+, que constituye un pool de células blanco susceptibles a la propagación del VIH y es aquí donde el virus se replica preferencialmente (Lawn S., *et al* 2001).

A pesar de una extensa investigación, las contribuciones relativas de los distintos mecanismos que pueden provocar la activación aberrante de células T durante la infección crónica por el VIH-1 así como las especificidades antigénicas asociadas siguen siendo incompletamente entendidas y son un asunto de mucho debate y especulación (Haas A., *et al* 2011).

Por lo tanto, la patogénesis del SIDA es un fenómeno complejo que tiene como componente importante a la activación inmune crónica (Haas A., *et al* 2011).

Activación *in vitro*:

Los linfocitos T de sangre periférica no estimulados producen poco o nada de citocinas, por lo que la estimulación de linfocitos T *in vitro* es usada extensamente para facilitar la expansión y el estudio de la función de células T. Moléculas mitogénicas como lectinas y anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD28 promueven una proliferación policlonal mientras que el antígeno específico produce una respuesta monoclonal u oligoclonal (Munck Petersen C., *et al* 1992; Trickett A., *et al* 2003).

El forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) estimula a las células T por la activación directa de la PKC (Kay J., 1991). Sin embargo, la estimulación con este agente lleva a una rápida regulación negativa en la expresión de CD4 en la membrana (Munck Petersen C., *et al* 1992). El estimular a linfocitos T con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas provee un mecanismo más parecido al fisiológico que los tradicionalmente usados como PHA, Con A y PMA-ionomicina. Las células T pueden eficientemente expandirse usando los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 inmovilizados (Levine B., *et al* 1996).

Diehn M., *et al* compararon los programas transcripcionales inducidos en células T primarias de sangre completa de donadores sanos por la estimulación con a) PMA (25ng/mL) + ionomicina (1µM), b) PHA (5 µg/mL), c) anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas, d) anticuerpos anti-CD3 acoplados a perlas

magnéticas y e) anticuerpos anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas. Las células fueron expuestas a estos estímulos durante (0, 1, 2, 6, 12, 24, y 48 h), tras lo cual el ARN fue extraído y se analizaron mediante el uso de microarreglos de DNA donde se representan aprox. 18 000 genes (Alizadeh A., *et al* 2000). Los programas de expresión génica evocados por los anticuerpos anti-CD3 acoplados a perlas magnéticas, anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas, PHA y PMA-ionomicina fueron muy similares. Un grupo diverso de más de 3 000 genes (17% de todos los genes representados en el microarreglo) mostraron prominentes cambios de expresión génica (en al menos 3 veces), un 57% de estos fueron inducidos y el 43% reprimidos (Diehn M., *et al* 2002).

La similitud entre los cambios inducidos por la coestimulación con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas y los inducidos por la PMA-ionomicina destacan la importancia crítica de la vía de señalización de calcio y la vía de la PKC en el programa de activación de células T (Diehn M., *et al* 2002).

Docenas de genes que codifican para mediadores inmunes como las citocinas y quimiocinas, receptores de citocinas, moléculas de adhesión celular, así como de moléculas citotóxicas efectoras, como granzima B, granulicina, y FasL, fueron inducidos durante este programa. La inducción de estos últimos factores proapoptóticos se esperaba que promovieran la muerte celular, sin embargo, se observó sólo modesta muerte celular durante el transcurso de 48 h en este experimento y de acuerdo con los informes anteriores (Van Parijs L., *et al* 1998; Van Parijs L., *et al* 1996; Diehn M., *et al* 2002).

La regulación observada de Fas, FasL, y genes que actúan río abajo de Fas indica cómo las células T coestimuladas pueden protegerse a sí mismas de sus propias capacidades letales. Curiosamente, mientras que la coestimulación de células T dramáticamente indujo FasL, Fas no fue inducido. Del mismo modo, el factor antiapoptótico Bcl2 fue inducido, mientras que su antagonista, BID, fue reprimido. La caspasa 8, que activa BID fue también reprimida. Por lo tanto, esta coordinación en el programa transcripcional puede servir para proteger a las células T contra la apoptosis dependiente de fasL, mientras que les permite usar FasL para matar a otros blancos celulares (Chang H., *et al* 2000; Diehn M., *et al* 2002).

Muchos de los genes cuyos productos están implicados en la transducción de las señales del TCR fueron reprimidos por la activación de células T. Estos genes incluyen la fosfolipasa C, LAT, LCK, TRIM, y ζ CD3, así como los genes que codifican las subunidades del TCR. Este descubrimiento es consistente con informes publicados que demuestran la internalización rápida y la degradación del TCR en la estimulación (Mirami Y., *et al* 1987; Diehn M., *et al* 2002). Por otra parte, esta regulación negativa de los componentes del TCR podría reflejar una transición de células T en reposo, cuya maquinaria de comunicación en la superficie celular se dedica a la exploración de antígeno, a células T estimuladas, cuyas proteínas de superficie se dedican principalmente a funciones efectoras y a la comunicación con otras células mediada por citocinas (Diehn M., *et al* 2002).

Aunque la activación inmunológica en respuesta a organismos invasores es esencial para montar una respuesta efectiva del huésped, paradójicamente ésta puede también proporcionar un ambiente inmunológico que conduce la replicación viral y la progresión de la enfermedad en personas infectadas con VIH (Lawn S., *et al* 2001).

ANTECEDENTES

Trabajos previos sobre el efecto de la activación *in vitro* sobre la fusión celular mediada por las proteínas de la envoltura del VIH.

En la literatura hay pocos artículos acerca del efecto de la activación de células CD4+ sobre la fusión. Los estímulos utilizados fueron PHA (Gowda S., *et al* 1989; Mohaghehpour N., *et al* 1991; Zaitseva M., *et al* 2005), PMA (Chowdhury I., *et al* 1990; Golding H., *et al* 1994) o con anti LFA-1 (Barbeau B., *et al* 1998) y el posterior cocultivo con células Env+ transfectadas (Gowda S., *et al* 1989; Mohaghehpour N., *et al* 1991; Golding H., *et al* 1994; Barbeau B., *et al* 1998; Zaitseva M., *et al* 2005) o células infectadas (Gowda S., *et al* 1989; Chowdhury I., *et al* 1990; Golding H., *et al* 1994; Barbeau B., *et al* 1998).

En los estudios mencionados, la evaluación y cuantificación del fenómeno de fusión celular se efectuó principalmente por microscopía (Gowda S., *et al* 1989; Mohaghehpour N., *et al* 1991; Golding H., *et al* 1994; Barbeau B., *et al* 1998), mientras que otros utilizaron citometría de flujo (Zaitseva M., *et al* 2005), medidor de diámetro celular (Chowdhury I., *et al* 1990) o luminómetro (Barbeau B., *et al* 1998).

En los trabajos donde estimularon previamente con PHA o anti-LFA-1 se observó un aumento en la formación de sincicios (Gowda S., *et al* 1989; Mohaghehpour N., *et al* 1991; Barbeau B., *et al* 1998; Zaitseva M., *et al* 2005), mientras que cuando las células se estimularon previamente con PMA hubo una disminución en la formación de sincicios (Chowdhury I., *et al* 1990; Golding H., *et al* 1994). Por lo tanto, estos estudios tempranos ya documentaron que distintos tipos de estimulación “*in vitro*” tenían distintos efectos sobre la formación de sincicios inducida por las proteínas de fusión del VIH.

Diehn M., *et al* compararon los programas transcripcionales inducidos por la estimulación con PMA-ionomicina, PHA y anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas en células T de la sangre de donadores sanos mediante microarreglos (donde fueron representados 18 000 genes)(Diehn M., *et al* 2002). Este trabajo tan completo tienen dos limitantes por su propia naturaleza del estudio: el primero es que el análisis se centró únicamente en genes que incrementaron o disminuyeron su expresión en al menos 3 veces. Cambios menos pronunciados en los genes se consideraron no relevantes y el segundo es que no todo el ARN se convierte finalmente a proteína

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las células infectadas por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) expresan en su membrana las proteínas de la envoltura viral (complejo gp120/gp41 o Env), adquiriendo la capacidad para fusionarse con células sanas que portan el receptor CD4 y un receptor para quimiocinas, formando sincicios. Durante la infección por el VIH, se ha encontrado que existe una alta correlación entre la detección en sangre periférica de variantes virales con alta capacidad para inducir la formación de sincicios en cultivos de linfocitos T CD4+ y la progresión a SIDA. Análisis histológicos han revelado la presencia de sincicios infectados en cerebro y ganglios linfáticos de individuos con infección por el VIH. Estas observaciones sugieren que la fusión entre células infectadas y no infectadas podría contribuir al daño del sistema inmune durante la infección por este virus.

Se conoce que la activación de los linfocitos T CD4+ favorece la replicación viral y que el uso de mitógenos promueve la obtención de altos títulos virales *in vitro*, ya que la activación favorece la integración y la transcripción viral. Sin embargo el papel de la activación en la entrada del virus a las células no es claro, ya que la literatura reporta que distintos métodos de estimulación *in vitro* pueden tener distintos efectos sobre la fusión de membranas inducida por las proteínas de la envoltura viral.

La estimulación *in vitro* de linfocitos T con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas provee un mecanismo de estimulación que es similar al que se induce durante la presentación de antígenos en la respuesta inmune adaptativa. Actualmente se desconoce el efecto de la activación *in vitro* con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 sobre la fusión mediada por las proteínas de la envoltura del VIH-1. El análisis de tal efecto constituye el principal objetivo de éste trabajo. La activación obtenida se evaluará en base a la expresión de los marcadores de activación CD25 y CD54, determinando también la expresión de otros marcadores importantes como CD3, CD4 y CD184, así como la viabilidad celular. En la literatura no hay reportes en donde se evalúen de manera simultánea a estos marcadores durante la activación celular, además que muchos trabajos no determinaron la viabilidad celular después de la activación. Por otra parte, el análisis de la formación de sincicios se evaluará cuantitativamente por citometría de flujo en contraste con reportes de la literatura en donde la formación de sincicios se evaluó de manera cualitativa.

OBJETIVO

Determinar si la activación de los linfocitos T CD4+ modifica su capacidad para fusionarse con células que expresan las glicoproteínas del gen *env* del VIH.

OBJETIVOS EXPERIMENTALES:

Analizar el efecto de la activación de los linfocitos T CD4+ usando PMA-Ionomicina o anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas, sobre:

- a) La expresión de CD4, CD3, CD25(IL-2R α), CD184 (CXCR4) y CD54 (ICAM-1).
- b) Su viabilidad
- c) Su fusogenicidad con células Jurkat que expresan las proteínas de la envoltura del VIH (células Env+): Porcentaje de sincicios, tamaño y granularidad de estos.

Los efectos de la activación se determinaran sobre células de la línea Jurkat, células mononucleares de la sangre periférica (PBMCs) de donadores sanos y linfocitos T CD4+ de la sangre periferica purificados en columnas magnéticas por selección negativa.

HIPÓTESIS

La activación de los linfocitos T CD4+ inducirá cambios en su susceptibilidad para fusionarse con linfocitos T que expresan las proteínas de la envoltura del VIH. Tales cambios se correlacionarán con la expresión de receptores de membrana implicados en la fusión.

MATERIALES Y MÉTODOS:

Líneas celulares:

Las líneas celulares linfoides Jurkat, llamadas HXBc2 y 522F/Y, fueron donadas por el Dr. Joseph Sodroski, a través del programa AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAD, NIH. Las dos líneas se encuentran transfectadas establemente para expresar el complejo proteico gp120/gp41 (Env) de la envoltura del VIH-1, bajo un sistema inducible basado en el operón de tetraciclina (Fig. 7).

Las células contienen un plásmido regulador que codifica para la proteína de fusión tTA, que es una combinación del represor de tetraciclina con el dominio C-terminal del activador transcripcional VP16 del virus del herpes (Cao J., *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 geneticina e higromicina, respectivamente. De este modo la expresión de los genes virales se encuentra reprimida en presencia de tetraciclina (Cao J., *et al* 1996) (Fig. 7).

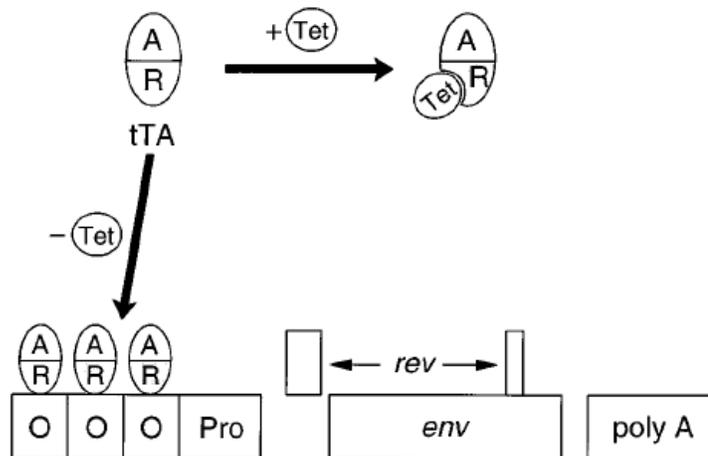


Fig. 7. Estructura del sistema para la expresión inducible de las proteínas Env del VIH-1. La proteína tTA esta compuesta por el activador VP16 (A) y por el represor de tetraciclina (R). La unión de la proteína tTA al operador de tetraciclina promueve la expresión de las proteínas virales gp120/gp41. 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* (Cao J., *et al*, 1996).

La diferencia entre la línea celular HXBc2 y 522 F/Y es que ésta última expresa una mutante del gen *env*, con una sustitución F/Y (fenilalanina por tirosina) en la posición 522 localizada en el péptido de fusión de gp41, de tal forma son incapaces de inducir la fusión de membranas (Cao J., *et al* 1996; Huerta L., *et al* 2009).

La expresión de las proteínas Env en las líneas celulares HXBc2 y 522F/Y, ha sido determinada por técnicas de inmunoprecipitación y citometría de flujo (Cao J., *et al* 1996; Huerta L., *et al* 2009).

La línea celular linfocítica Jurkat E6-1 (CD3+/CD4+/CXCR4+), fue obtenida del ATCC (American Type Culture Collection), obtenida de sangre periférica de un caso de leucemia linfoblástica de células T aguda.

Separación de PBMCs:

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) fueron aisladas por centrifugación en gradiente de Ficoll-Paque Plus (GE, Uppsala Suecia). Antes de comenzar la separación, se colocó a temperatura ambiente el Ficoll y el paquete leucocitario (buffy coat) dentro de la incubadora a 37°C. Todos los pasos fueron realizados en condiciones de esterilidad dentro de una campana de flujo laminar clase II y con pipetas desechables. Se revolvió la sangre venosa periférica con la pipeta para homogenizar y en un tubo de 50 mL se hizo una mezcla, agregando 10 mL de sangre y 15 mL de DPBS (solución amortiguadora salina de fosfatos de Dulbecco) y se homogenizó.

En un tubo de 50 mL, se colocaron 18 mL de Ficoll, se inclinó y se agregó la mezcla muy lentamente. Se centrifugó 40 min. (25 °C, Vel. 1450 rpm con freno y acelerador=1). Se quitó el plasma (interfase superior) con una pipeta y se colocó el anillo de PBMCs (±8 mL) en 20 mL de DPBS. Se centrifugó 5 min. a 1200 rpm (con freno y acelerador normal), se decantó y se despegó el botón. Se realizaron 4 lavados con 20 mL de DPBS hasta que el líquido estuvo transparente. Se resuspendió el botón en 20 mL de DPBS y se tomaron 5 µL de suspensión (PBMCs+DPBS) en 195 µL azul tripan (1:40) y se procedió a contar en una cámara Neubauer.

Purificación de células T CD4 por selección negativa

Una vez determinado el número de células totales, se centrifugó la suspensión celular a 300g durante 10 minutos, posteriormente se quitó el sobrenadante con una pipeta y se resuspendió el pellet en 40µL de buffer MACS (AutoMACS rinsing solution and MACS BSA Stock solution) (desgasificado, PBS PH 7.2, 0.5% de albúmina sérica bovina (BSA) y 2 Mm EDTA) (MACS, Miltenyi Biotec, EU) por cada 10^7 células totales. Utilizando el kit de aislamiento de células T CD4+ (MACS, Miltenyi Biotec Auburn, EU), se añadieron 10µL del coctel de anticuerpos acoplados a biotina por cada 10^7 células totales, se mezcló bien y se incubó durante 5 minutos en el refrigerador (2-8°C). Después se añadieron 30µL de buffer MACS por cada 10^7 células totales y se agregaron 20µL de microperlas anti-biotina por cada 10^7 células totales, se mezcló bien y se incubaron durante 10 minutos en el refrigerador (2-8°C). Se ajustó el volumen a un mínimo de 500µL de buffer MACS.

Para la separación magnética, se utilizó una columna LS (MACS, Miltenyi Biotec, EU). Se colocó la columna en el campo magnético de un separador MACS. Se preparó la columna enjuagando con 3 mL de buffer MACS y se desechó el líquido. Posteriormente, se aplicó la suspensión celular sobre la columna, permitiendo que las células pasaran a través de la columna y se colectó el efluente residual como fracción de células no marcadas, lo que representa la fracción enriquecida de células T CD4+. Por último, se lavó la columna 3 veces adicionando 3 mL de buffer MACS, agregando el buffer cada vez que el depósito de la columna quedó vacío. Se recogió todo el efluente en el mismo tubo, todo este efluente representó las células CD4+ enriquecidas.

Criopreservación de linfocitos T CD4+ purificados de PBMCs (SOLO PARA EL CASO 4)

Congelación: Los linfocitos T CD4+ purificados de PBMCs, fueron contados y ajustados a 10×10^6 células/mL en un medio de congelación constituido por 90% de SFB_i, 5% de medio RPMI suplementado al 10% de SFB_i y 5% de DMSO dentro de un criotubo de polipropileno. El congelamiento fue gradual, la primera hora a -20°C,

la segunda hora a -70°C y después los viales fueron transferidos a nitrógeno líquido a -120°C .

Descongelación: El criotubo fue transferido del nitrógeno líquido al hielo y después a un recipiente con agua a 37°C (descongelación rápida). Se limpió el criotubo con etanol al 70% (para desinfectar) y se adicionó gota a gota 1 mL de medio RPMI suplementado. Posteriormente en un tubo de 15 mL que contenía 8 mL de medio RPMI, se agregó la suspensión celular gota a gota (la dilución gradual del DMSO evita estrés osmótico). Se centrifugó a 1200 rpm durante 7 min y se descartó el sobrenadante. Después, las células fueron resuspendidas en medio RPMI suplementado con 20% de SFB_i a una densidad de 5×10^6 células/mL y se incubaron a 37°C durante 16 h (fase de descanso). Transcurriendo ese tiempo, las células fueron centrifugadas y crecidas en medio RPMI suplementado con 10% SFB_i y 40 UI de IL-2/mL. Las células se encontraban en condiciones para ensayos funcionales.

Cultivo de Líneas celulares

Las líneas celulares HXBc2 y 522 F/Y (denominadas Env+) se cultivaron en suspensión en botellas T-75, con medio RPMI (Gibco, Carlsbad, California, EU) suplementado con 10% de SFB_i (Gibco, Carlsbad, California, EU), 50 U/mL de penicilina y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ estreptomina (Gibco, Carlsbad, California, EU). Las células Env⁺ también fueron cultivadas en presencia de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de tetraciclina, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de higromicina y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de geneticina. Los cultivos se mantuvieron a 37°C con 5% de CO_2 (Rivera E., 2006).

Las células Jurkat E6 (denominadas CD4+) se cultivaron en suspensión en botellas T-75, con medio RPMI (Gibco, Carlsbad, California, EU) suplementado con 10% de SFB_i (Gibco, Carlsbad, California, EU), 50 U/mL de penicilina y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ estreptomina (Gibco, Carlsbad, California, EU) (Rivera E., 2006).

Inducción de la expresión de proteínas de envoltura

En condiciones de esterilidad, las células Env+, se colocaron en tubos para centrífuga de 50 mL, se lavaron 2 veces con 40 mL de PBS 1X estéril (1 mM NaH_2PO_4 , 5.6 mM Na_2HPO_4 , 126 mM NaCl, pH 7.2) a 1150 rpm durante 3 minutos,

con la finalidad de retirar la tetraciclina. Por último se resuspendieron en medio RPMI suplementado (1×10^6 células/mL) y adicionando 200 $\mu\text{g/mL}$ de geneticina y 200 $\mu\text{g/mL}$ de higromicina. Se incubaron a 37 °C con 5% de CO_2 durante 2 días para la expresión de las proteínas gp120/gp41 del VIH (Rivera E., 2006).

Activación: PMA-Ionomicina y anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas.

Los linfocitos T CD4+ (recién separados, en el caso de los provenientes de donadores sanos) y no marcados fueron divididos en partes iguales y se tuvieron 2 condiciones (activados y no activados). La activación consistió en el tratamiento con 10 ng/mL de PMA y 1 $\mu\text{g/mL}$ de ionomicina durante 5 horas ó las células fueron cultivadas en presencia de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas (Gibco, Carlsbad, California, EU) de la siguiente forma. El vial contenía un total de 80×10^6 de perlas en un volumen de 2mL. Las perlas fueron lavadas antes de usarse, para esto fueron resuspendidas dentro de su vial durante 30 segundos (vortex) y se transfirió el volumen deseado de perlas a un tubo. Se añadió un volumen igual de buffer ó por lo menos 1 mL y se mezcló con el vórtex durante 5 segundos, se colocó el tubo dentro del campo magnético de un imán durante 1 minuto y se descartó el sobrenadante. Se retiró el tubo del imán y se resuspendieron las perlas en el mismo volumen en que se encontraban inicialmente ahora con medio de cultivo.

Para la activación de células T humanas, se comenzó con 10×10^6 células T purificadas en 5 mL de medio RPMI para células purificadas (RPMI suplementado con 10% de SFB_i y 40 UI rIL-2) y dentro de un pozo de una placa de 6 pozos. Se añadió 750 μL de perlas para obtener una relación de 1:3 célula-perlas. La placa, se incubó a 37°C y con 5% CO_2 durante 3 días. Para aplicaciones de citometría de flujo se quitaron las perlas antes de realizar una tinción, para esto se colocó la suspensión celular que contenía las perlas en un tubo y éste sobre el campo magnético de un imán durante 1-2 minutos para separar las perlas de la solución y se transfirió el sobrenadante que contenía las células activadas a un pozo de una placa de 6 pozos. Se cultivaron a una concentración de 1×10^6 células/mL de medio RPMI para células purificadas. Se incubaron a 37°C y con 5% CO_2 durante una semana.

Tinción con colorantes fluorescentes vitales.

Las células fueron marcadas con los colorantes lipofílicos fluorescentes, DiO (Perclorato de 3,3'-dioctadeciloxocarbocianina, Molecular Probes), fluorescente en color verde y DiI (Perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina, Molecular Probes), fluorescente en color rojo. Para su uso se prepararon soluciones stock concentradas disolviendo 3.5 mg de colorante por mL de dimetil sulfóxido estéril (DMSO). A partir de éstas se hicieron diluciones 1:10 en el mismo disolvente. Estas diluciones se utilizaron para marcar las células y permanecieron útiles durante 4 meses. Las soluciones stock fueron remplazadas cada año (Rivera E., 2006).

Doce horas previas al ensayo de fusión, las células Env+ de un día de inducción y las células CD4+ fueron ajustadas a una concentración que va de $5-15 \times 10^6$ células/mL de medio RPMI. A las células Env+ se les adicionó 5 μ L/mL de DiO 1:10 (esta concentración aumenta 2 microlitros por cada semana sucesiva a la preparación de la dilución del colorante, ya que la intensidad de fluorescencia obtenida en las células marcadas va decayendo) y a las células CD4+ se les adicionó 5 μ L/mL de DiI 1:10 (se puede usar la misma concentración de DiI, durante 2 o 3 meses para marcar las células, ya que su fluorescencia es más estable), protegidas de la luz se incubaron con agitación moderada durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron 2 veces con 10 volúmenes de medio RPMI y se mantuvieron en cultivo en el mismo medio. Para las células Env+ además se les adicionó 200 μ g/mL de geneticina y 200 μ g/mL de higromicina. Se incubaron a 37 °C con 5% de CO₂ (Rivera E., 2006).

Ensayo de fusión celular e inhibición.

Las células Jurkat Env+ marcadas y Jurkat CD4+ (activadas y no activadas) marcadas se resuspendieron en medio de cultivo especial para linfocitos libre de suero (AIM-V, Gibco, Carlsbad, California, EU) (Nota: Para los experimentos donde se utilizaron células CD4+ purificadas de PBMCs, éstas se resuspendieron en medio RPMI para células purificadas (RPMI suplementado con 10% de SFB_i y 40 UI rIL-2). La suspensión celular se ajustó a una concentración de 2×10^6 células/mL. Para inducir la formación de sincicios, en una placa de 96 pozos de fondo plano se colocaron en cocultivo 100 μ L por pozo de suspensión de células CD4+ y 100 μ L por pozo de

células Env+. Las suspensiones celulares fueron constantemente resuspendidas con la micropipeta para que en cada pozo mantenga una proporción igual de células blanco CD4+ y células Env+ (1:1). La placa se incubó durante 5 horas a 37 °C con 5% de CO₂. Como controles de especificidad de la fusión celular, se incluyeron pozos en los que se adicionó los inhibidores anti-CD4 de la clona RPA-T4 (BD Biosciences, San Jose, California, EU) y el péptido sintético T-20 (Enfuvirtida, Fuzeon) (Trimeris/Roche, Basilea, Suiza) a una [48 ng/mL] que al ser análogo al dominio HR2 de la región C- terminal de gp41 (aminoácidos 127-162). T-20, compite con HR2 para interactuar con HR1 en el dominio N terminal de gp41, impidiendo la formación del racimo de seis hélices necesario para la fusión de la membrana viral con la membrana celular (Moyle G., 2003; Jamjian M., *et al* 2004; Hardy H., *et al* 2004).

En tubos para citometría con 2 mL de PBS, las células se cosecharon de cada pozo con una micropipeta usando puntas de 1mL y se adicionaron en el tubo, para ser lavadas 1 vez, centrifugando a 1150 rpm durante 3 minutos. Se decantó el sobrenadante y se resuspendieron en 350µL de buffer para citometría de flujo (FacsFlow, Becton Dickinson) (Rivera E., 2006).

Inmunofluorescencia directa

Se evaluó los cambios en la expresión de marcadores de superficie importantes en la fisiología de las células T y en la infección por VIH, para esto las suspensiones de células CD4+ no activadas y activadas a diferentes tiempos fueron colocadas en tubos de 15mL y centrifugadas a 1150 rpm durante 3 minutos (en el caso de Jurkat) y a 1200 rpm durante 4 minutos (en el caso de CD4+ purificadas de PBMCs), se decantaron y se lavaron con 1 mL de buffer de lavado (PBS 1X/NaN₃⁻ 0.1%), se centrifugaron y se decantaron por segunda ocasión. Se realizó un ajuste a 500 000 células/50 µL de buffer de tinción (PBS 1X/NaN₃⁻ 0.1%/SNC_i 2%). Posteriormente, se le agregaron 50 µL de la suspensión celular ajustada a tubos de FACS y estos fueron colocados en una hielera a 4°C. Se les adicionaron 10 µL (20 µL/1x10⁶ células) de uno de los siguientes anticuerpos (BD Pharmingen): CD4 (dominio D1, epitopes CDR1 y CDR3)-IgG1k APC de ratón (BD Biosciences, San Jose, California,

EU), que corresponde a un correceptor para la activación de células T y receptor del VIH, CD184 (CXCR4)-IgG2ak APC de ratón (BD Biosciences, San Jose, California, EU)*, que corresponde a un receptor de quimiocinas y correceptor para el VIH y CD54 (ICAM-1)-IgG1k APC de ratón (BD Biosciences, San Jose, California, EU), que corresponde a una molécula de adhesión. Control de Isotipo IgG1k APC de ratón (BD Biosciences, San Jose, California, EU) e IgG2ak APC de ratón (BD Biosciences, San Jose, California, EU)*. De los siguientes anticuerpos se les adicionó 2.5µL (5 µL/1x10⁶ células): CD3 (cadena epsilon)-IgG1k APC de ratón (BD Biosciences, San Jose, California, EU), que corresponde a un marcador de linfocitos T y CD25 (IL-2Rα)-IgG1k APC de ratón (BD Biosciences, San Jose, California, EU), que corresponde a un marcador de activación tardío. Se incubaron en hielo (excepto CD184 y su control de isotipo) y oscuridad durante 30 minutos y se eliminó el anticuerpo no unido lavando con 2 mL de buffer de lavado. Finalmente las células se resuspendieron en 500µL de buffer de lavado y la fluorescencia de todos los anticuerpos fue detectada en el canal FL-4 del citómetro de flujo FACS Calibur.

*NOTA: La inmunofluorescencia directa para CD184 y su control de isotipo, se realizó en células frescas y a temperatura ambiente.

Viabilidad celular:

La viabilidad celular, se determinó por citometría de flujo. En tubos para citometría de flujo se colocó una suspensión ajustada de 400 000 células en 300 µL de buffer de FACS y se agregaron 3 µL de 7AAD (BD Biosciences, San Jose, California, EU). Se incubaron 20 minutos en oscuridad y fueron posteriormente leídas.

Adquisición y análisis

Las células resuspendidas en el buffer adecuado fueron adquiridas y analizadas mediante un citómetro de flujo Becton-Dickinson modelo FACS Calibur que cuenta con 2 láseres, 1 laser de Argón (488nm) y 1 laser diodo rojo (635nm), utilizando el programa Cell-Quest Pro (Becton Dickinson). El análisis se realizó sobre 10 000

eventos adquiridos construyendo gráficas de puntos, tanto de tamaño contra granularidad (escala lineal) o de fluorescencias (escala logarítmica).

En el caso de la fusión celular, se construyó una gráfica de tamaño contra granularidad (FSC/SSC) y sobre esta se dibujó una región R1 (región de células viables), teniendo cuidado de hacer esta región lo más alta posible en el eje (SSC) para incluir la mayoría de los sincicios formados. Posteriormente se construyeron gráficas de fluorescencias (FL-1/FL-2), se movieron los detectores y se compensó de tal forma que se pudieran distinguir 3 poblaciones de células diferentes: las CD4+ (rojas) no fusionadas, las Env+ (verdes) no fusionadas y los sincicios como células con fluorescencia mixta. El programa Cell-Quest Pro (Becton Dickinson) a través de la herramienta “Estadística” nos proporcionó el porcentaje de sincicios y el tamaño y granularidad de estos (células viables doble fluorescentes).

En el caso de la viabilidad, se construyó una gráfica de tamaño contra granularidad (FSC/SSC) y sobre esta se dibujó una región R1 amplia (región de células viables con algunos restos celulares). Posteriormente se construyeron gráficas de tamaño contra FL-3, canal donde se lee la 7AAD (FSC/FL-3), se movieron los detectores y se capturó. El programa Cell-Quest Pro (Becton Dickinson) a través de la herramienta “Estadística” nos proporcionó el porcentaje de células viables, aquellas negativas para 7-AAD.

Para detectar la unión de anticuerpos acoplados a APC (aloficocianina), con el programa Cell-Quest Pro, se construyó una gráfica de tamaño contra granularidad (FSC/SSC) y sobre esta se dibujó una región R1 (región de células viables). Posteriormente se construyeron histogramas para FL-4 y a través de la herramienta “Estadística” nos proporcionó el porcentaje de células positivas así como la media geométrica tanto del anticuerpo específico como del control de isotipo, de esta forma fue posible calcular el índice de fluorescencia media (IFM).

IFM= Intensidad media de fluorescencia del anticuerpo específico/Intensidad media de fluorescencia del control de isotipo.

Se consideró la media geométrica de la fluorescencia por ser un parámetro adecuado para analizar distribuciones en escala logarítmica, este parámetro se relaciona con el número de receptores por célula. El índice de fluorescencia nos

proporcionó el número de veces que está incrementada la fluorescencia de los positivos con respecto al control de isotipo.

Para el análisis del tamaño y la granularidad de los sincicios (**casos 1, 2 y 3**). Se construyeron histogramas de FSC (tamaño) y SSC (granularidad) a partir del gate (R1 and R4), considerando a los sincicios como viables y dobles fluorescentes. Los valores de tamaño y granularidad fueron obtenidos de los valores de FSC y SSC respectivamente. Los valores corresponden a unidades arbitrarias.

Para la cuantificación del tamaño de los sincicios en el **caso 5**, las imágenes fueron analizadas con el programa QCapture Pro 6.0. Previamente se calibró el programa con perlas magnéticas de 4.5µm de diámetro, se eligió el objetivo con el que fueron tomadas las fotos (10x ó 20x) y se procedió a realizar mediciones de diámetro. Se consideraron como sincicios aquellas células que poseían un volumen superior a la suma de volúmenes dado entre un linfocito T CD4+ y una célula Jurkat Env+.

Para los **casos 1, 3, 4 y 5** se tomaron fotografías de los monocultivos y cocultivos con el microscopio de luz (Leica DMIL) a un aumento de 10x.

Para el **caso 4 y 5** se tomaron fotografías de los cocultivos con el microscopio invertido de fluorescencia (Microscopio Invertido Olympus IX71) a un aumento de 10x.

RESULTADOS

Este trabajo tuvo como objetivo el analizar el efecto de la activación de células T CD4+ usando PMA-Ionomicina o anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas. Los efectos de la activación se determinaron sobre células de la línea Jurkat (CD4+), células mononucleares de la sangre periférica (PBMCs) de donadores sanos y linfocitos T CD4+ de la sangre purificados en columnas magnéticas por selección negativa.

Los resultados fueron divididos en cinco casos, que a continuación se enlistan:

Caso 1: Activación de células Jurkat (CD4+) con PMA-ionomicina.

Caso 2: Activación de células mononucleares de la sangre periférica (PBMCs) con PMA-ionomicina.

Caso 3: Activación de células Mononucleares de la Sangre Periferica (PBMCs) con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas.

Caso 4: Activación de linfocitos T CD4+ (purificados de PBMCs) con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas (congelados y descongelados).

Caso 5: Activación de linfocitos T CD4+ (purificados de PBMCs) con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas (frescos).

En todos los casos, se determinó el efecto de la activación sobre:

- a) la expresión de marcadores de superficie: CD4 (correceptor para la activación de células T y receptor primario del VIH), CD3 (marcador de linfocitos T), CD25 (la subunidad α del receptor de IL-2, es un marcador de activación tardío), CD184 (receptor de quimiocina CXCR4, correceptor del VIH) y CD54 (es la molécula de adhesión ICAM-1, inducible durante la activación y se encuentra en la región p-SMAC).
- b) su viabilidad (las células viables no incorporan 7AAD).
- c) y su fusogenicidad con células Jurkat que expresan las proteínas de fusión del VIH-1, a las cuales se les denominará en lo subsecuente células Env+.

CASO 1: ACTIVACIÓN DE CÉLULAS JURKAT (CD4+) CON PMA-IONOMICINA

1.1 Efecto sobre la expresión de marcadores de superficie.

Las células Jurkat (CD4+) fueron estimuladas con una combinación de PMA e ionomicina (PMA-ionomicina), probandose el efecto de dos concentraciones: el estímulo A1 10 ng/mL de PMA y 1µg/mL de ionomicina o el estímulo A2 5ng/mL de PMA y 0.5µg/mL de ionomicina durante 5 horas. Se analizó la expresión de CD4, CD25 y CD54 a diferentes tiempos después de retirar el estímulo (0.2, 2, 5 y 8 días) por inmunofluorescencia directa.

Para demostrar que el estímulo funcionó y las células fueron activadas revisamos el aumento en la expresión de dos marcadores de superficie que son CD25 y CD54 (marcadores inducibles durante el proceso de activación celular).

Se hace incapie en los resultados obtenidos al día 2, ya que fue el día en que los marcadores CD25 y CD54 tuvieron su mayor incremento.

Las células Jurkat (CD4+) activadas (A1) al día 2, muestran un 26.56% de células positivas para CD25 mientras que las células Jurkat (CD4+) no activadas (NA) al día 2 muestran un 1.21% de células que expresan CD25 (**Figs. 8e y 9f**). Respecto a su IFM las células Jurkat (CD4+) A1 al día 2, muestran un 4.15 mientras que las células Jurkat (CD4+) NA al día 2 muestran un 2.82 (**Figs. 8f y 9f**).

Las células Jurkat (CD4+) activadas (A1) al día 2, muestran un 50.33% de células positivas para CD54 mientras que las células Jurkat (CD4+) no activadas (NA) al día 2 muestran un 33.09% de células que expresan CD54 (**Figs. 8c y 9d**). Respecto a su IFM las células Jurkat (CD4+) A1 al día 2, muestran un 3.45 mientras que las células Jurkat (CD4+) NA al día 2 muestran un 2.56 (**Figs. 8d y 9d**).

Los resultados anteriores nos muestran que las células Jurkat (CD4+) efectivamente se activaron. Nos preguntamos después si el estímulo tenía un efecto sobre el marcador de superficie CD4.

Las células Jurkat (CD4+) activadas (A1) al día 2, muestran un 6.57% de células positivas para CD4 mientras que las células Jurkat (CD4+) no activadas (NA) al día 2 muestran un 58.6% de células que expresan CD4 (**Figs. 8a y 9b**). Respecto a su IFM

(Índice de fluorescencia media), las células Jurkat (CD4+) A1 al día 2, muestran un 4.62 mientras que las células Jurkat (CD4+) NA al día 2 muestran un 5.96 (**Figs. 8b y 9b**).

En resumen, los resultados muestran que el estímulo de PMA-ionomicina (ambas concentraciones) en las células Jurkat (CD4+), provocó una disminución tanto en el porcentaje de células positivas como en el índice de fluorescencia media de CD4 (**Figs. 8a, 8b, 9a y 9b**), pero un aumento tanto en porcentaje de células positivas como en el índice de fluorescencia media de CD25 (**Figs. 8e, 8f y 9f**) y CD54 (**Figs. 8c, 8d y 9d**).

PORCENTAJE DE CELULAS POSITIVAS

INDICE DE FLUORESCENCIA MEDIA

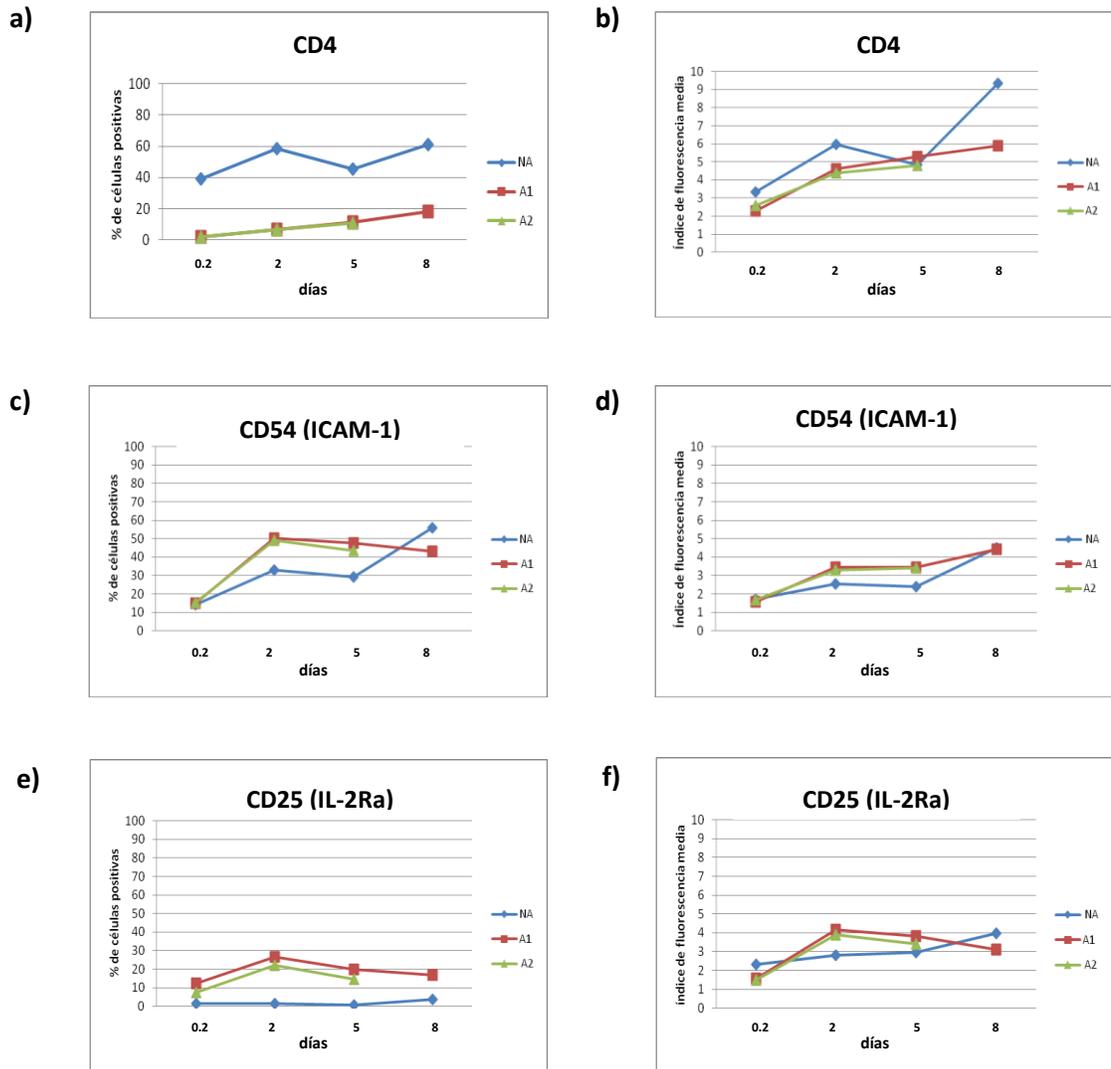


Fig.8 : Efecto de la activación de las células Jurkat (CD4+) con PMA-ionomicina sobre la expresión de marcadores de superficie. Se determinó la expresión de los marcadores de superficie CD4, CD25(IL-2Ra) y CD54(ICAM-1) en células No Activadas (NA) y Activadas (A) a diferentes tiempos.

a-f: Las células Jurkat (CD4+) fueron estimuladas con PMA-ionomicina. Se probaron dos concentraciones de los activadores (A1 y A2). El estímulo A1 10 ng/mL de PMA y 1µg/mL de ionomicina o el estímulo A2 5ng/mL de PMA y 0.5µg/mL de ionomicina durante 5 horas. Se analizó la expresión de CD4, CD25 y CD54 a diferentes tiempos después de retirar el estímulo. Las graficas muestran porcentaje de células positivas (**a, c, e**) e índice de fluorescencia media, IFM (**b, d, f**). Datos obtenidos de un experimento. NA, A1 y A2 son independientes y simultaneos.

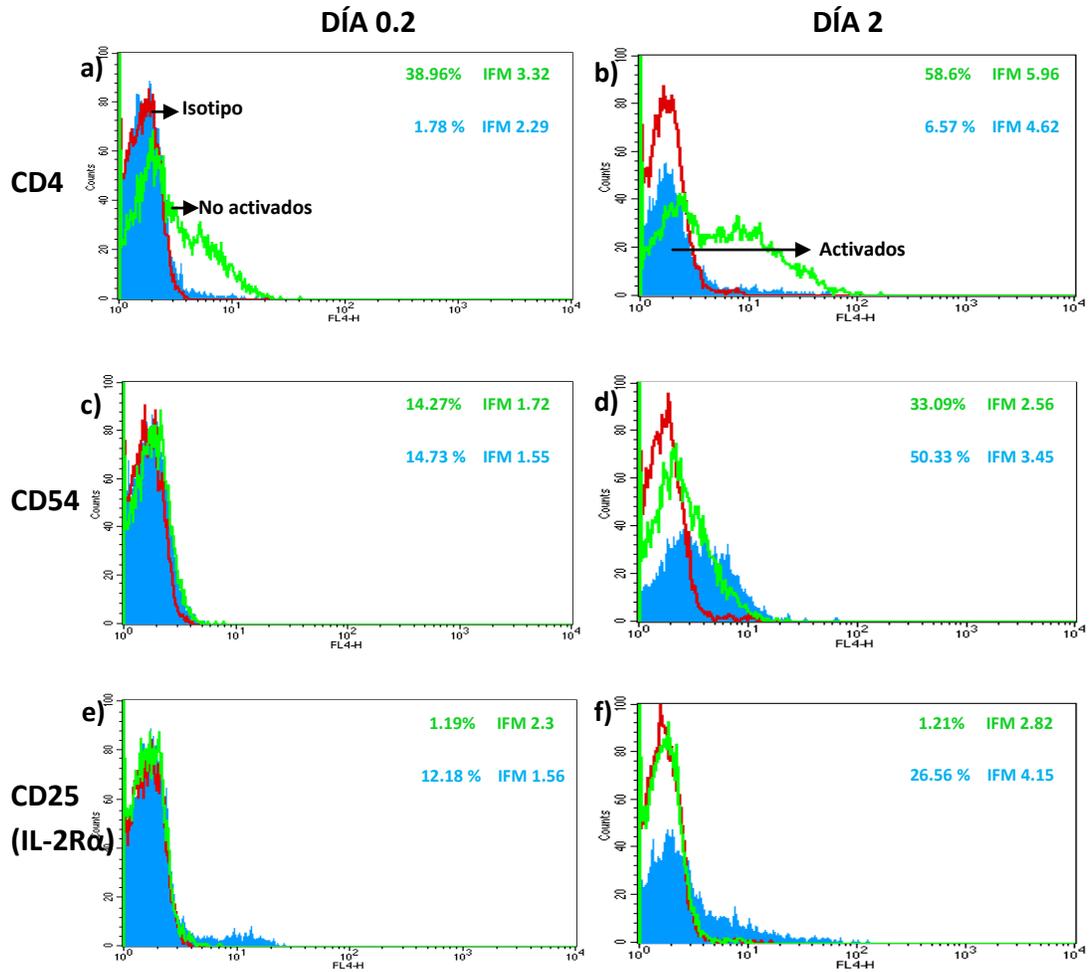


Fig.9 : Efecto de la activación de las células Jurkat (CD4+) con PMA-ionomicina sobre la expresión de marcadores de superficie (histogramas sobrelapados). Los datos de la figura 8 se representaron ahora mediante histogramas. Se hace énfasis únicamente en dos tiempos (0.2 días y 2 días). La curva **verde**, representa la expresión del marcador en células Jurkat No activadas, la curva **azul**, representa la expresión en células Jurkat Activadas (A1) y en **rojo** el control de isotipo. En la parte superior derecha de cada histograma se encuentran los porcentajes de células positivas y el Índice de fluorescencia media para cada curva.

1.2 Efecto de la activación sobre la viabilidad de células Jurkat (CD4+)

Para conocer si la viabilidad de las células Jurkat (CD4+) se vió afectada por la activación mediante PMA-ionomicina, se evaluó la viabilidad de las células Jurkat (CD4+) No activadas (NA) y activadas (A) a diferentes tiempos después de retirar el estímulo (0.2, 2, 5 y 8 días). El estímulo empleado fue PMA-ionomicina a dos concentraciones. El estímulo A1 10 ng/mL de PMA y 1µg/mL de ionomicina o el estímulo A2 5ng/mL de PMA y 0.5µg/mL de ionomicina durante 5 horas. Se consideraron viables las células negativas para 7AAD (ver materiales y métodos).

Los resultados muestran que las células Jurkat (CD4+) tratadas con PMA-ionomicina (con ambas concentraciones), tuvieron una menor viabilidad que el control, sin embargo es de resaltarse que en su punto más bajo de viabilidad, registrado al día 2, esta es cercana al 80% (**Fig. 10**). Por tanto concluimos que el estímulo no disminuyó de manera importante la viabilidad como se requería y tampoco existieron diferencias en la viabilidad ya sea por el empleo del estímulo A1 o A2.

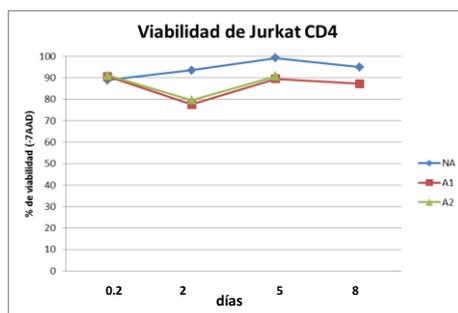


Fig. 10 Efecto de la activación sobre la viabilidad de células Jurkat (CD4+). Se evaluó la viabilidad de células Jurkat No activadas (NA) y activadas (A) a diferentes tiempos después de retirar el estímulo. El estímulo empleado fue PMA -ionomicina. El estímulo A1 10 ng/mL de PMA y 1µg/mL de ionomicina o el estímulo A2 5ng/mL de PMA y 0.5µg/mL de ionomicina durante 5 horas. Se consideraron viables las células negativas para 7AAD. Datos obtenidos de un experimento. NA, A1 y A2 son independientes y simultáneos.

1.3 Efecto de la activación de células Jurkat CD4+ sobre la fusión con células Jurkat Env+

Las células Jurkat (CD4+) No activadas (NA) y Activadas(A), fueron marcadas con DiI y cocultivadas con células Env fusogénicas (**Figs. 11a y 11b**) o células Env* no fusogénicas (**Figs. 11c y 11d**) marcadas con DiO. Para inducir la formación de sincicios, se colocaron células CD4+ y Env en proporción 1:1. Las placas fueron

incubadas a 37 °C con 5% CO₂ durante 5 horas y evaluadas a diferentes tiempos después del retiro del estímulo (0.2, 2 y 8 días). El estímulo empleado fue 10 ng/mL de PMA y 1µg/mL de ionomicina durante 5 horas. Como controles de especificidad de la fusión celular, se incluyeron pozos en los que se adicionaron los inhibidores anti-CD4 y el péptido sintético T-20 (Enfuvirtida) [48 ng/mL].

T-20, es un péptido sintético aprobado para uso clínico, pertenece a la familia de los péptidos C, al ser análogo al dominio HR2 de la región C- terminal de gp41 (aminoácidos 127-162). T20, compite con HR2 para interaccionar con HR1 en el dominio N terminal de gp41, impidiendo la formación del racimo de seis hélices necesario para la fusión de la membrana viral con la membrana celular (Moyle G., 2003; Jamjian M., *et al* 2004; Hardy H., *et al* 2004).

Se hace énfasis en el porcentaje de fusión obtenidos al día 2, para relacionarlos con la expresión de marcadores de superficie en ese mismo día.

Los resultados muestran que los cocultivos formados por células Jurkat (CD4+) A (activadas) y células Jurkat Env+ (fusogénicas) fusionan menos (obteniéndose un 0.66% al día 2) comparado con los cocultivos formados por células Jurkat (CD4+) NA (No activadas) y células Jurkat Env+ (fusogénicas) (obteniéndose un 14.69% al día 2) (**Figs. 11b y 11a**). Es importante resaltar que la fusión celular registrada es casi completamente inhibible mediante la adición de anti-CD4 o con el péptido sintético T-20 (**Figs. 11c y 11d**), lo cual corrobora que se trata de verdaderos sincicios que son producto de la fusión celular.

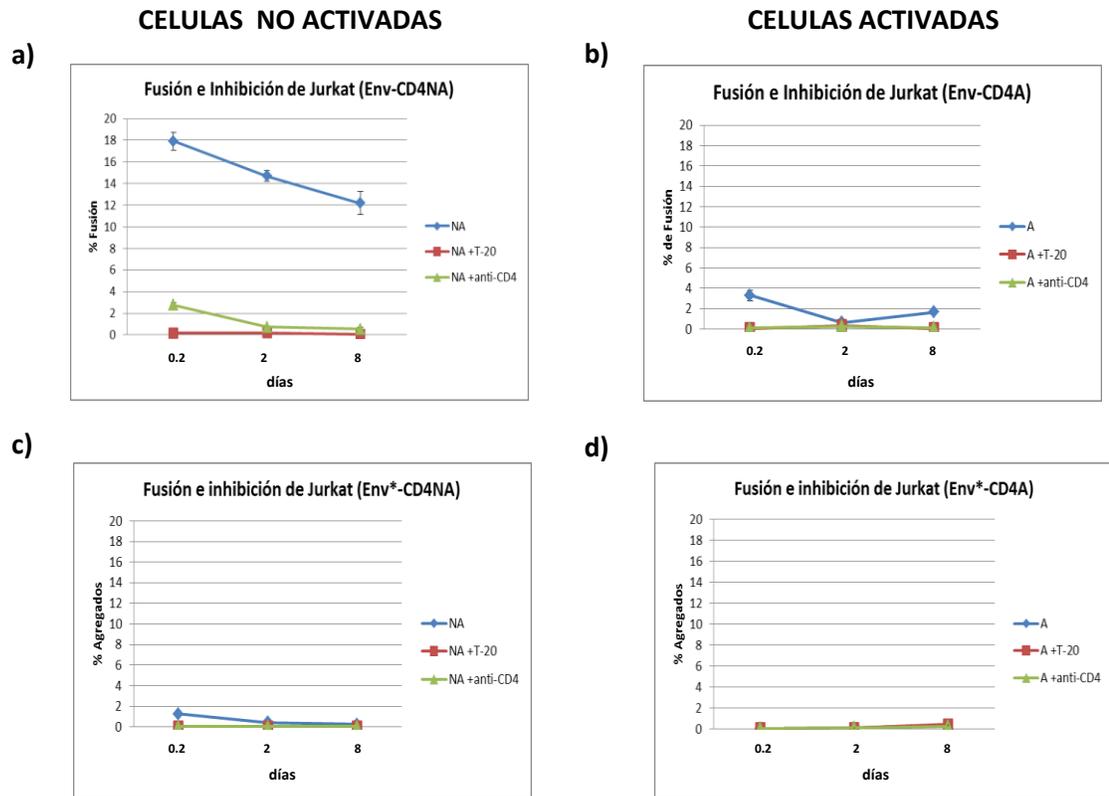


Fig. 11. Efecto de la activación de las células Jurkat (CD4+) sobre la fusión con células Jurkat (Env+). Como controles de especificidad de la fusión celular, se incluyeron pozos en los que se adicionaron los inhibidores anti-CD4 y el péptido sintético T-20 (Enfuvirtida) [48 ng/mL]. Las células Jurkat (CD4+) No activadas (NA) y Activadas(A), fueron marcadas con DiI y cocultivadas con células Jurkat Env fusogénicas o células Jurkat Env* no fusogénicas marcadas con DiO. Para inducir la formación de sincicios, se colocaron células CD4+ y Env en proporción 1:1. Las placas fueron incubadas a 37 °C con 5% CO₂ durante 5 horas y evaluadas a diferentes tiempos después del retiro del estímulo (10 ng/mL de PMA y 1µg/mL de ionomicina durante 5 horas).

- a) Cocultivo de células Jurkat Env fusogénica con células Jurkat CD4 NA, b) Cocultivo de células Jurkat Env fusogénica con células Jurkat CD4 A, c) Cocultivo de células Jurkat Env no fusogénica con células Jurkat CD4 NA, d) Cocultivo de células Jurkat Env no fusogénica con células Jurkat CD4 A. Datos obtenidos de un experimento. Cada punto representa la media ± error estándar. NA y A son independientes y simultáneos.

La **Fig. 12** muestra el aspecto de los cocultivos formados por células Jurkat (CD4+) no activadas o activadas con células Jurkat (Env+). Los cocultivos formados por células Jurkat (CD4+) NA, tienden al día 2 a formar muchos sincicios pequeños, pero bien identificables a un aumento 10x, sin embargo los cocultivos formados por células Jurkat (CD4+) A, tienden al día 2 a formar sincicios aparentemente pequeños y poco abundantes, muy difíciles de ser identificados a un aumento de 10x. El uso de T-20 y anti-CD4 respectivamente, fueron capaces de inhibir casi totalmente la

formación de sincicios tanto en cocultivos con células Jurkat (CD4+) A y NA. Las imágenes concuerdan con los datos obtenidos por citometría respecto a porcentaje (**Fig. 11**) y tamaño (**Fig. 13a**) de los sincicios.

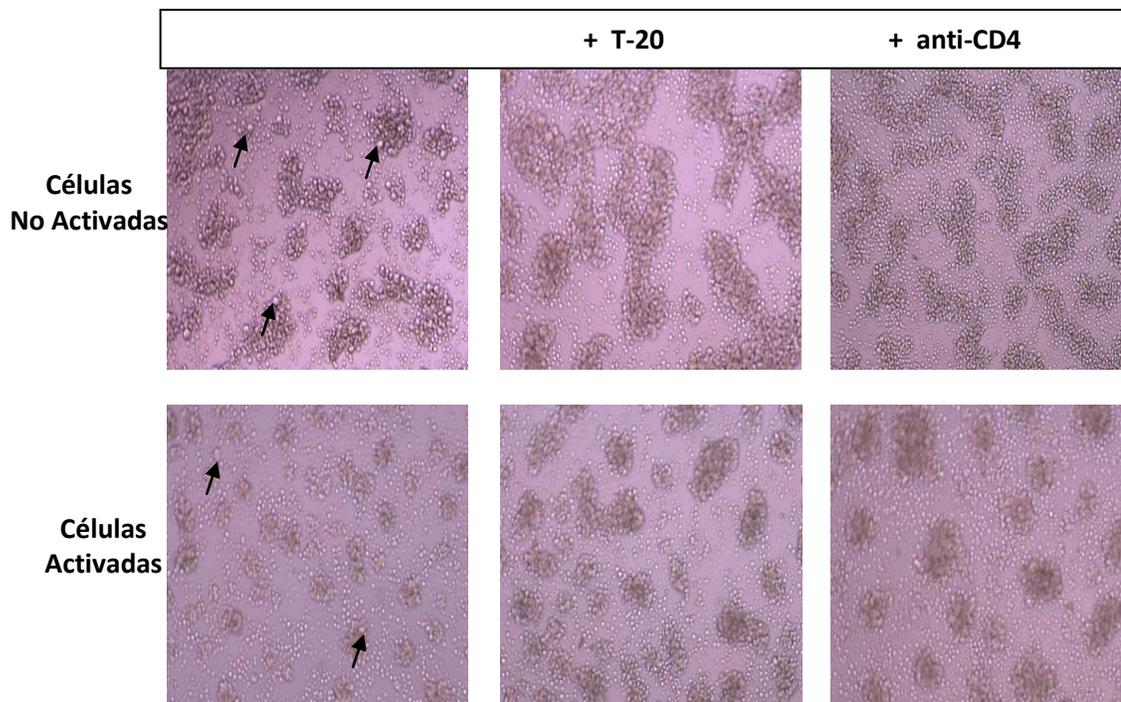


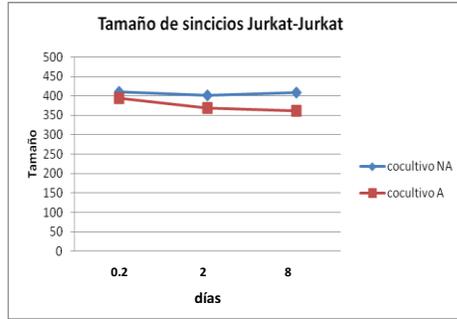
Fig. 12: Aspecto de los cocultivos de células Jurkat (CD4+) no activadas (NA) o Activadas (A), con células Jurkat (Env+) fusogénicas al día 2. Los sincicios son señalados mediante una flecha. Aumento 10x.

1.4 Análisis del tamaño y granularidad de sincicios formados por la fusión Jurkat CD4+ con células Jurkat Env+.

Nos preguntamos si existía diferencia respecto a su tamaño y granularidad entre los sincicios formados por células Jurkat (CD4+) no activadas y activadas (mediante PMA -ionomicina).

Se analizó el tamaño y la granularidad de los sincicios generados en cocultivos de células Jurkat (Env+) fusogénicas con células Jurkat (CD4+) activadas o no activadas. Los resultados muestran que los sincicios formados por células Jurkat (CD4+) activadas son mas pequeños (**Fig. 13a**) y menos granulosos (menor complejidad interna) (**Fig. 13b**) que aquellos formados por células Jurkat (CD4+) no activadas.

a)



b)

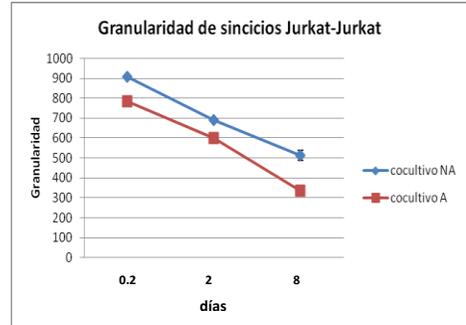


Fig. 13. Tamaño y granularidad de los sincicios generados en cocultivos de células Jurkat Env+ fusogénicas con células Jurkat CD4+ activadas o no activadas. a) tamaño de sincicios, b) granularidad de sincicios. Datos obtenidos de un experimento. Cada punto representa la media \pm error estándar. NA y A son independientes y simultáneos. Los valores de tamaño y granularidad fueron obtenidos de los valores de FSC y SSC respectivamente. Los valores corresponden a unidades arbitrarias.

CASO 2: ACTIVACIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFERICA (PBMCs) CON PMA-IONOMICINA.

2.1 Efecto sobre la expresión de marcadores de superficie.

Las PBMCs, fueron obtenidas por centrifugación en gradiente de ficoll e incubadas durante una noche. Posteriormente las PBMCs fueron estimuladas con 10 ng/mL de PMA y 1µg/mL de ionomicina durante 6 horas. Se analizó la expresión de CD4, CD25 (IL-2R α) y CD184 (CXCR4) al retirar el estímulo por inmunofluorescencia directa.

Para demostrar que el estímulo funcionó y las células fueron activadas revisamos el aumento en la expresión del marcador de superficie CD25 (marcador inducible durante el proceso de activación celular).

Las PBMCs activadas (A) durante 6 horas, muestran un 32.58% de células positivas para CD25 mientras que las PBMCs no activadas (NA) muestran un 25.43% de células que expresan CD25 (**Figs.14a y 15c**). Respecto a su IFM (Indice de fluorescencia media), las PBMCs A durante 6 horas, muestran un 2.64 mientras que las PBMCs NA muestran un 3.82 (**Figs.14b y 15c**).

El aumento en la expresión de CD25 (en porcentaje) nos demuestra que las PBMCs se activaron. Nos preguntamos después si el estímulo tenía un efecto sobre los marcadores de superficie CD4 y CD184 (CXCR4).

Las PBMCs activadas (A) durante 6 horas, muestran un 48.3% de células positivas para CD4 mientras que las PBMCs no activadas (NA) muestran un 51.10% de células que expresan CD4 (**Figs.14a y 15a**). Respecto a su IFM, las PBMCs A durante 6 horas, muestran un 12.87 mientras que las PBMCs NA muestran un 61.66 (**Figs. 14b y 15a**).

Las PBMCs activadas (A) durante 6 horas, muestran un 34.8% de células positivas para CD184 mientras que las PBMCs no activadas (NA) muestran un 48.6% de células que expresan CD184 (**Figs. 14a y 15b**). Respecto a su IFM, las PBMCs A durante 6 horas, muestran un 3.21 mientras que las PBMCs NA muestran un 4.68 (**Figs. 14b y 15b**).

En resumen los resultados muestran que el estímulo de PMA-ionomicina sobre PBMCs, provocó una disminución tanto en el porcentaje de células positivas como en el índice de fluorescencia media de CD4 (Figs. 14a, 14b y 15a) y CD184 (Figs. 14a, 14b y 15b), pero un modesto aumento en el porcentaje de células positivas CD25 (Figs. 14a y 15c).

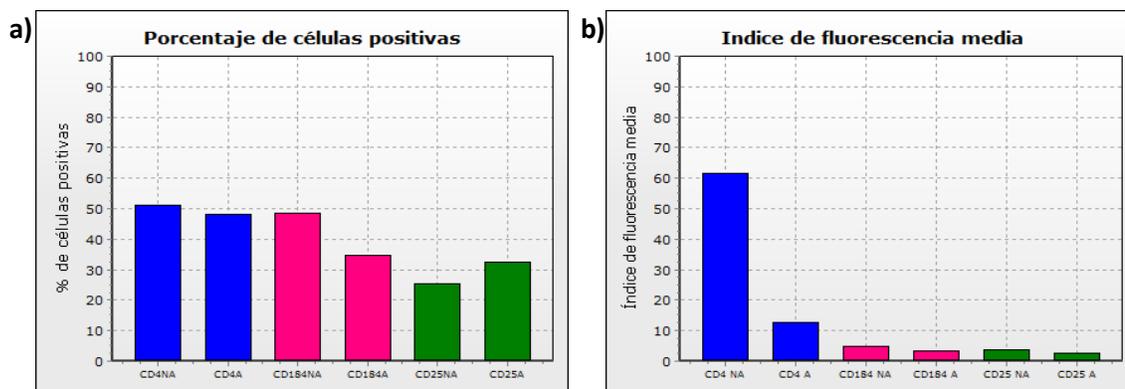


Fig.14 : Efecto de la activación de PBMCs con PMA-ionomicina sobre la expresión de marcadores de superficie: Se determinó, la expresión de marcadores de superficie CD4, CD25(IL-2R α) y CD184(CXCR4) en PBMCs No Activadas (NA) y Activadas (A).

Las PBMCs, fueron obtenidas por centrifugación en gradiente de ficoll e incubadas durante una noche. Las PBMCs fueron estimuladas con 10 ng/mL de PMA y 1 μ g/mL de ionomicina durante 6 horas. Se revisaron los marcadores CD4, CD25 y C184 al retirar el estímulo. **a)** porcentaje de células positivas, **b)** índice de fluorescencia media, IFM. Datos obtenidos de un experimento. La barra representa la media \pm error estándar. NA y A son independientes y simultaneos.

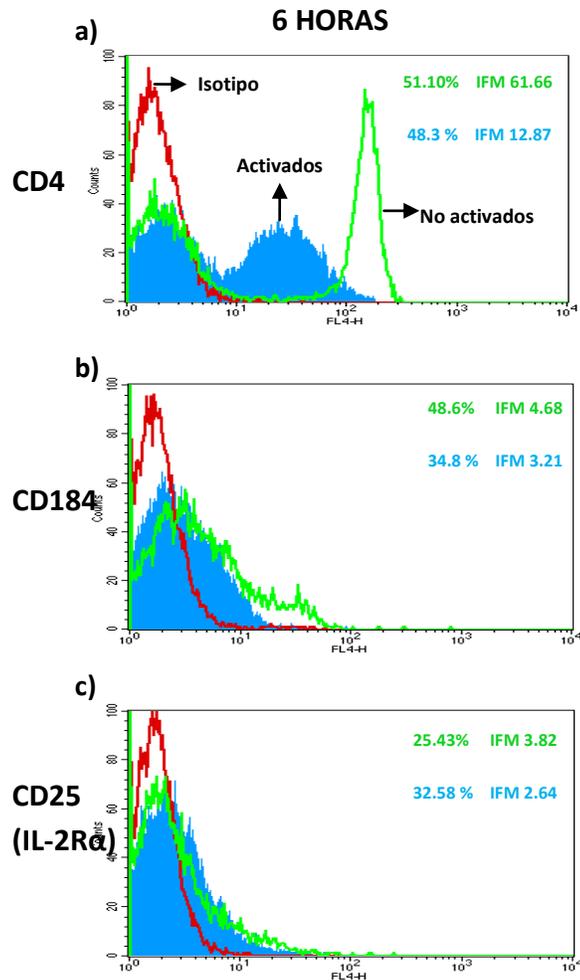


Fig.15 : Efecto de la activación de PBMCs con PMA-ionomicina sobre la expresión de marcadores de superficie (histogramas sobrelapados). Los datos de la figura 14 se representaron ahora mediante histogramas. La curva verde, representa la expresión del marcador en PBMCs No activadas, la curva azul, representa la expresión en PBMCs Activadas y en rojo el control de isotipo. En la parte superior derecha de cada histograma se encuentran los porcentajes de células positivas y el Índice de fluorescencia media para cada curva.

2.2 Efecto de la activación sobre la viabilidad de PBMCs

Para conocer si la viabilidad de las PBMCs se vio afectada por la activación mediante PMA-ionomicina, se evaluó la viabilidad de las PBMCs No activadas (NA) y activadas (A) después de retirar el estímulo. El estímulo empleado fue 10 ng/mL de PMA y 1 μ g/mL de ionomicina durante 6 horas. Se consideraron viables las células negativas para 7AAD (ver materiales y métodos). La **Fig. 16** muestra que las PBMCs tratadas con PMA-ionomicina, tuvieron una viabilidad del 55.03%, en contraste con el control NA que tuvo una viabilidad del 89.9%. El estímulo de PMA-ionomicina sobre PBMCs resultó ser muy fuerte, debido a que afectó la viabilidad de manera

significativa. Esto fue debido ya sea a la naturaleza del estímulo o a la sensibilidad de las PBMCs recién separadas, ya que como podemos observar el aumento en la expresión del marcador de superficie CD25 (Figs. 14a y 15c) no fue muy notorio. Debido a unos ensayos previos con otras concentraciones del estímulo una más alta y una más baja y al poco éxito obtenido, se decidió analizarlas únicamente a las 6 horas y no hacer un seguimiento.

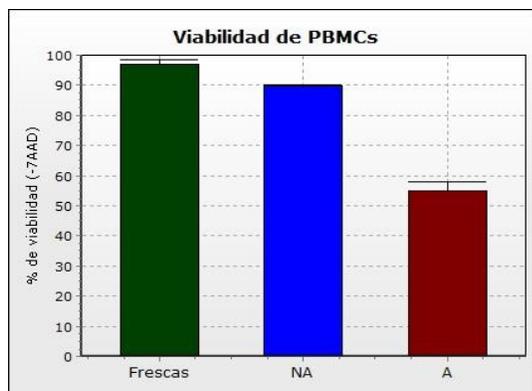


Fig. 16 Efecto de la activación sobre la viabilidad de PBMCs. Se evaluó la viabilidad de PBMCs No activadas (NA) y activadas (A) después de retirar el estímulo. El estímulo empleado fue 10 ng/mL de PMA y 1µg/mL de ionomicina durante 6 horas. Se consideraron viables las células negativas para 7AAD. Datos obtenidos de un experimento. La barra representa la media ± error estándar. NA y A son independientes y simultáneos.

2.3 Efecto de la activación de PBMCs sobre la fusión con células Jurkat Env+

Las PBMCs No activadas (NA) y Activadas (A), fueron marcadas con DiI y cocultivadas con células Jurkat Env+ fusogénicas marcadas con DiO. Para inducir la formación de sincicios, se colocaron PBMCs y células Env en proporción 1:1. Las placas fueron incubadas a 37 °C con 5% CO₂ durante 5 horas y posteriormente evaluadas. El estímulo empleado fue 10 ng/mL de PMA y 1µg/mL de ionomicina durante 6 horas. Como controles de especificidad de la fusión celular, se incluyeron pozos en los que se adicionaron los inhibidores anti-CD4 y el péptido sintético T-20 (Enfuvirtida) [48 ng/mL].

Los resultados muestran que los cocultivos formados por PBMCs A (activadas) y células Jurkat Env+ (fusogénicas) fusionan menos (obteniéndose un 2.3%) comparado con los cocultivos formados por PBMCs NA (No activadas) y células

Jurkat Env+ (fusogénicas) (obteniéndose un 5.33%) (**Fig. 17**). Es importante resaltar que la fusión celular registrada es casi completamente inhibible mediante la adición de anti-CD4 o el péptido sintético T-20 (**Fig. 17**), lo cual corrobora que se trata de verdaderos sincicios que son producto de la fusión celular.

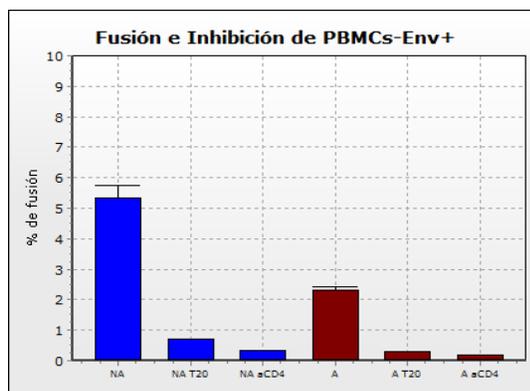


Fig. 17. Efecto de la activación de PBMCs sobre la fusión con células Env+. Como controles de especificidad de la fusión celular, se incluyeron pozos en los que se adicionó los inhibidores anti-CD4 y el péptido sintético T-20 (Enfuvirtida) [48 ng/mL]. Las PBMCs No activadas (NA) y Activadas(A), fueron marcadas con DiI y cocultivadas con células Jurkat Env+ fusogénicas marcadas con DiO. Para inducir la formación de sincicios, se colocaron PBMCs y Env en proporción 1:1. Las placas fueron incubadas a 37 °C con 5% CO₂ durante 5 horas y posteriormente evaluadas. El estímulo empleado fue 10 ng/mL de PMA y 1µg/mL de ionomicina con una duración del estímulo de 6 horas. Datos obtenidos de un experimento. La barra representa la media ± error estándar. NA y A son independientes y simultáneos.

2.4 Análisis del tamaño y granularidad de sincicios formados por la fusión de PBMCs con células Jurkat Env+

La **Fig. 18** muestra que los sincicios formados por PBMCs activadas son del mismo tamaño (**Fig. 18a**), pero menos granulosos (menor complejidad interna) (**Fig. 18b**) que aquellos formados por PBMCs no activadas.

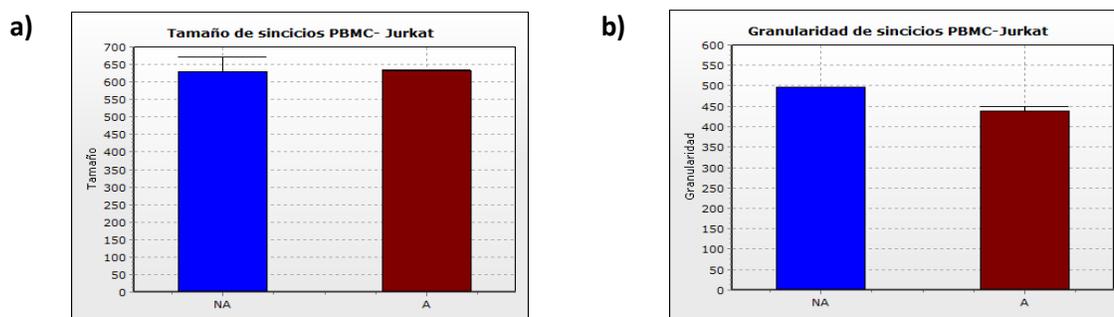


Fig. 18. Tamaño y granularidad de los sincicios generados en cocultivos de células Jurkat Env+ fusogénicas con PBMCs activadas o no activadas. El estímulo empleado fue 10 ng/mL de PMA y

1 μg/mL de ionomicina con una duración del estímulo de 6 horas a) tamaño de los sincicios b) granularidad de los sincicios. Datos obtenidos de un experimento. La barra representa la media ± error estándar. NA y A son independientes y simultáneos. Los valores de tamaño y granularidad fueron obtenidos de los valores de FSC y SSC respectivamente. Los valores corresponden a unidades arbitrarias.

CASO 3: ACTIVACIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE LA SANGRE PERIFÉRICA (PBMCs) CON ANTICUERPOS ANTI-CD3 Y ANTI-CD28 ACOPLADOS A PERLAS MAGNÉTICAS.

3.1 Determinación de CD4 y CD3 en PBMCs

Las PBMCs, fueron obtenidas por centrifugación en gradiente de ficoll e inmediatamente se evaluó en estas células, la expresión de los marcadores CD4 y CD3 por inmunofluorescencia directa. Los resultados muestran un 53.6% de células CD4+ con un índice de fluorescencia media de 81.34, mientras que un 66.4% fueron CD3+, con un índice de fluorescencia media de 142.22 (**Fig. 19**).

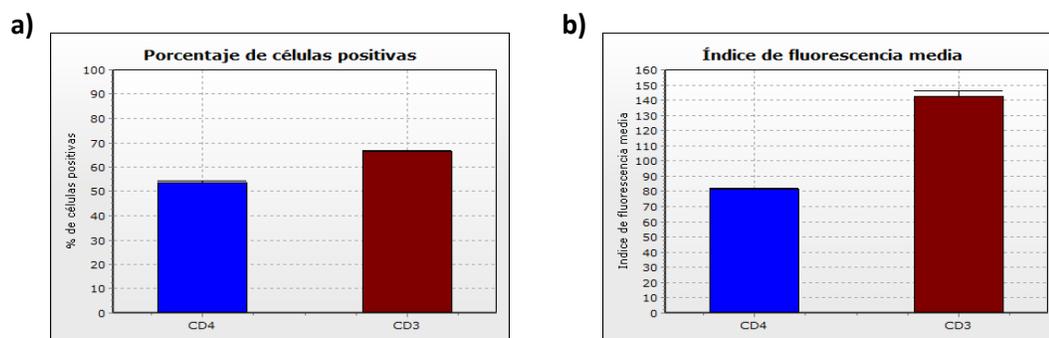


Fig. 19: Determinación de CD4 y CD3 en PBMCs al tiempo 0. Las PBMCs, fueron obtenidas por centrifugación en gradiente de ficoll e inmediatamente se evaluó la expresión de los marcadores CD4 y CD3. **a)** Porcentaje de células positivas, **b)** Índice de fluorescencia media, IFM. Datos obtenidos de dos experimentos. La barra representa la media \pm la desviación estándar.

3.2 Efecto sobre la expresión de marcadores de superficie.

Las PBMCs fueron estimuladas con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas en proporción 2.5:1(perlas:célula) durante 3 días. Se analizó la expresión de CD4, CD25 y CD54 por inmunofluorescencia directa, inmediatamente después de retirar las perlas, que corresponde al día 3, tres días posteriores al retiro de las perlas que corresponde al día 6 y seis días posteriores al retiro de las perlas, que corresponde al día 9. También fueron determinados los mismos marcadores en PBMCs NA a los mismos tiempos.

Para demostrar que el estímulo funcionó y las células fueron activadas revisamos el aumento en la expresión de dos marcadores de superficie que son CD25 y CD54 (marcadores inducibles durante el proceso de activación celular).

Se hace incapie en los resultados obtenidos al día 3 para CD54 y al día 6 para CD4 y CD25, ya que fueron estos días en los que los marcadores antes mencionados tuvieron su mayor incremento.

Las PBMCs activadas (A) al día 6, muestran un 93.56% de células positivas para CD25 mientras que las PBMCs no activadas (NA) al día 6 muestran un 12.4 % de células que expresan CD25 (**Figs. 20c y 21d**). Respecto a su IFM (Índice de Fluorescencia Media), las PBMCs A al día 6, muestran un 98.87 mientras que las PBMCs NA al día 6 muestran un 14.04 (**Figs. 20d y 21d**).

Las PBMCs activadas (A) al día 3, muestran un 95.46% de células positivas para CD54 mientras que las PBMCs no activadas (NA) al día 3 muestran un 79.93% de células que expresan CD54 (**Figs. 20e y 21e**). Respecto a su IFM, las PBMCs A al día 3, muestran un 47.89 mientras que las PBMCs NA al día 3 muestran un 9.39 (**Figs. 20f y 21e**).

Los resultados anteriores nos muestran que las PBMCs efectivamente se activaron. Nos preguntamos después si el estímulo tenía un efecto sobre el marcador de superficie CD4.

Las PBMCs activadas (A) al día 6, muestran un 81.54% de células positivas para CD4 mientras que las PBMCs no activadas (NA) al día 6 muestran un 51.92% de células que expresan CD4 (**Figs. 20a y 21b**). Respecto a su IFM, las PBMCs A al día 6, muestran un 104.8 mientras que las PBMCs NA al día 6 muestran un 42.72 (**Figs. 20b y 21b**).

En resumen los resultados muestran que el estímulo con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas sobre PBMCs provocó un aumento tanto en el porcentaje de células positivas como en el índice de fluorescencia media de los marcadores CD4 (**Figs. 20a, 20b y 21b**), CD25 (**Figs. 20c, 20d y 21d**) y CD54 (**Figs. 20e, 20f y 21e**).

PORCENTAJE DE CÉLULAS POSITIVAS

ÍNDICE DE FLUORESCENCIA MEDIA

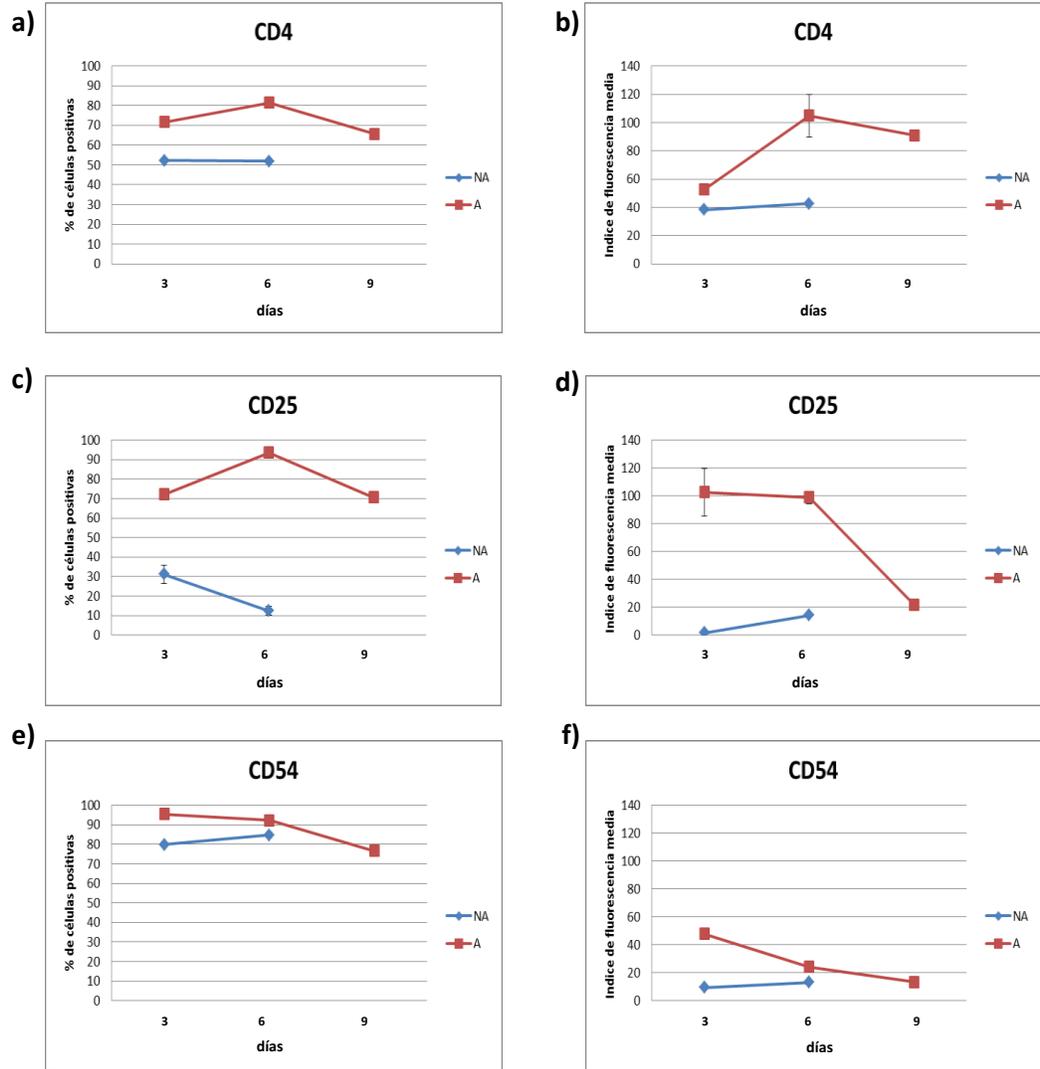


Fig. 20: Efecto de la activación de PBMCs con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas sobre la expresión de marcadores de superficie : Se determinó la expresión de marcadores de superficie CD4, CD25(IL-2R α), y CD54(ICAM-1) en PBMCs No Activadas (NA) y Activadas (A) a diferentes tiempos.

a-f: Las PBMCs fueron estimuladas con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas en proporción 2.5:1(perlas:celula) durante 3 días. Se analizó la expresión de CD4, CD25 y CD54 inmediatamente después de retirar las perlas (día 3), 3 días posteriores al retiro (día 6) y seis días posteriores al retiro de las perlas (día 9). Las gráficas muestran porcentaje de células positivas (a,c,e) e índice de fluorescencia media, IFM (b, d, f). Datos obtenidos de dos experimentos. Cada punto representa la media \pm la desviación estándar. NA y A son independientes y simultáneos.

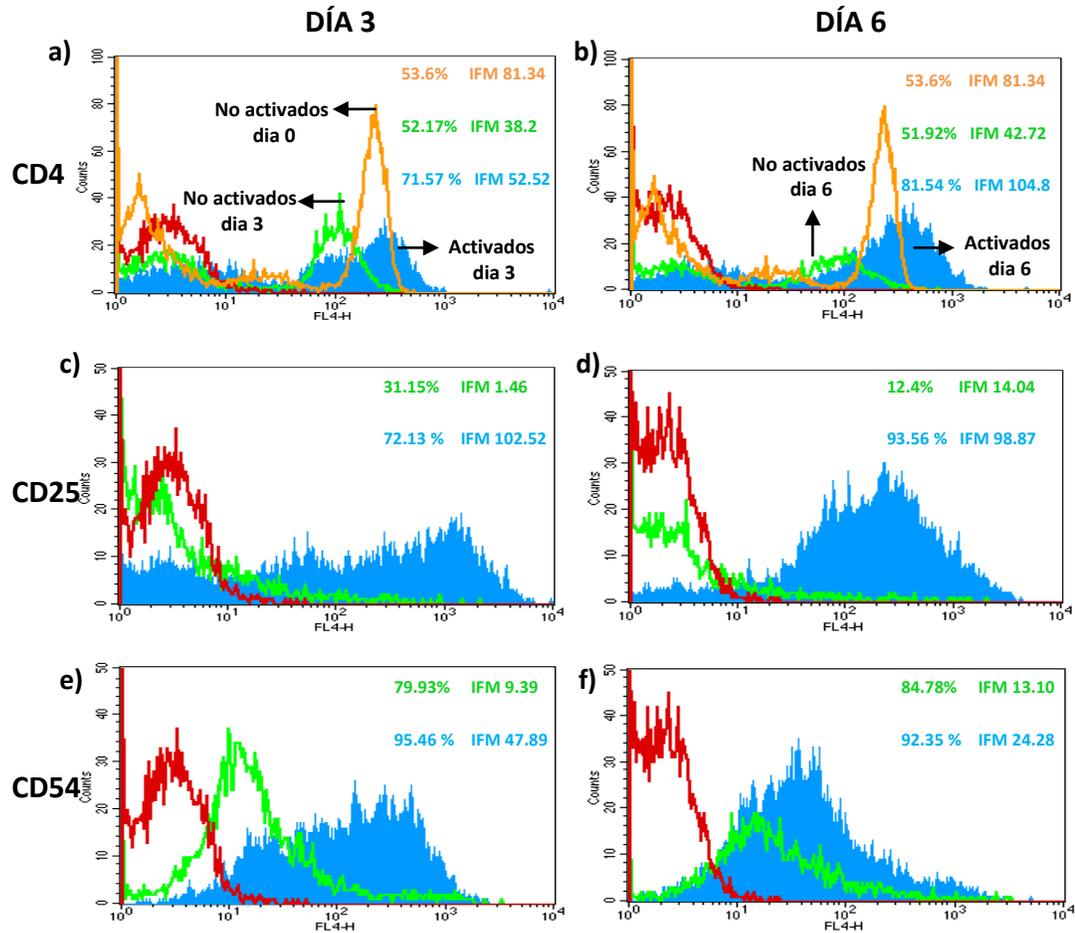


Fig. 21: Efecto de la activación de PBMCs con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas sobre la expresión de marcadores de superficie (histogramas sobrelapados). Experimento representativo de dos. La curva **naranja** representa la expresión del marcador en PBMCs No activadas al día 0. La curva **verde**, representa la expresión del marcador en PBMCs No activadas (al día 3 o al día 6, según sea el caso), la curva **azul**, representa la expresión en PBMCs Activadas (al día 3 o al día 6, según sea el caso) y en **rojo** el control de isotipo. En la parte superior derecha de cada histograma se encuentran los porcentajes de células positivas y el Índice de fluorescencia media para cada curva.

3.3 Efecto de la activación sobre la viabilidad de PBMCs

Para conocer si la viabilidad de las PBMCs se vio afectada por la activación mediante anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas, se evaluó la viabilidad de las PBMCs No activadas (NA) y activadas (A). El estímulo empleado fue anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas en proporción 2.5:1(perlas:célula) durante 3 días. El tiempo cero corresponde a la viabilidad de las PBMCs recién separadas por gradiente de ficoll. La viabilidad de las PBMCs NA y A

fueron además revisadas a diferentes tiempos, al día 3, inmediatamente después de retirar el estímulo, al día 6, tres días después de retirar el estímulo, y al día 9, seis días después de retirar el estímulo. Se consideraron viables, las células negativas para 7AAD (ver materiales y métodos).

Los resultados muestran que las PBMCs tratadas con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas tuvieron una viabilidad del 79.4% al día 3, en contraste con el control NA que tuvo una viabilidad del 85.2% al día 3 (**Fig. 22**). El estímulo no disminuyó de manera importante la viabilidad como se requería y por tal motivo se decidió hacer el seguimiento a varios días. Es importante notar, que la viabilidad de las PBMCs NA decrece al transcurrir el tiempo, mientras que la viabilidad de las PBMCs A se incrementa y se estabiliza al transcurrir el tiempo.

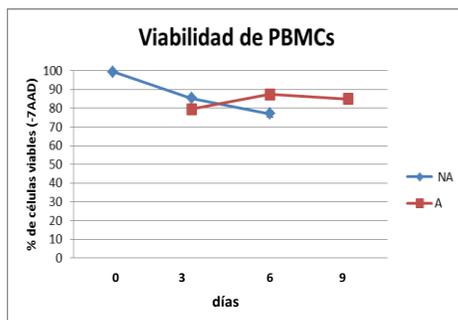


Fig. 22. Efecto de la activación sobre la viabilidad de PBMCs. Se evaluó la viabilidad de PBMCs No activadas (NA) y activadas (A) a diferentes tiempos. El estímulo empleado fue anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas en proporción 2.5:1(perlas:célula) durante 3 días. Se revisó la viabilidad al tiempo cero (inmediatamente después de la separación de PBMCs por gradiente de ficoll), al día tres (inmediatamente después de retirar las perlas), al día seis (3 días posteriores al retiro de las perlas) y al día 9 (6 días posteriores al retiro de las perlas). Se consideraron viables las células negativas para 7AAD. Datos obtenidos de dos experimentos. Cada punto representa la media \pm la desviación estándar. NA y A son independientes y simultaneos.

3.4 Efecto de la activación de PBMCs sobre la fusión con células Jurkat Env+

Las PBMCs No activadas (NA) y Activadas (A), fueron marcadas con DiI y cocultivadas con células Jurkat Env+ fusogénicas marcadas con DiO. Para inducir la formación de sincicios, se colocaron PBMCs y células Jurkat Env+ en proporción 1:1. Las placas fueron incubadas a 37 °C con 5% CO₂ durante 5 horas y evaluadas a diferentes tiempos: al día 3, inmediatamente después de retirar el estímulo, al día 6, tres días posteriores al retiro del estímulo y al día 9, seis días posteriores al retiro del

estímulo. El estímulo empleado fue anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas en proporción 2.5:1 (perlas: célula) durante 3 días. Como control de especificidad de la fusión celular, se incluyeron pozos en los que se adicionaron el péptido sintético T-20 (Enfuvirtida) [48 ng/mL].

Se hace énfasis en el porcentaje de fusión obtenido al día 3, ya que a este día, CD54 tuvo su máxima expresión y también a este día se registro el máximo porcentaje de fusión celular en el cocultivo con PBMCs activadas.

Los resultados muestran que los cocultivos formados por PBMCs A (activadas) y células Jurkat Env+ (fusogénicas) fusionan más (obteniéndose un 10.04%, al día 3) comparado con los cocultivos formados por PBMCs NA (No activadas) y células Jurkat Env+ (fusogénicas) (obteniéndose un 6.07%, al día 3) (**Fig. 23b y 23a**). Es importante resaltar que la fusión celular registrada es casi completamente inhibible mediante la adición del péptido sintético T-20 (**Fig. 23a y 23b**), lo cual corrobora que se trata de verdaderos sincicios que son producto de la fusión celular.

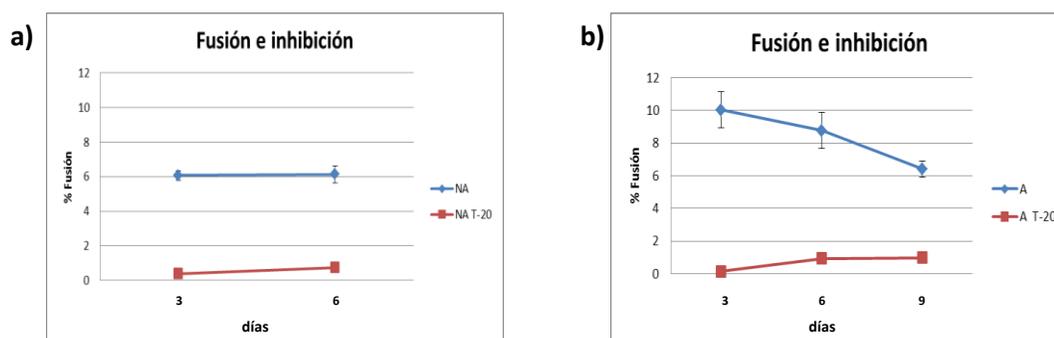


Fig. 23. Efecto de la activación de PBMCs sobre la fusión con células Jurkat Env+. Como control de especificidad de la fusión celular, se incluyeron pozos en los que se adicionaron el péptido sintético T-20 (Enfuvirtida) [48 ng/mL]. Las PBMCs No activadas (NA) y Activadas (A), fueron marcadas con DiI y cocultivadas con células Jurkat Env+ fusogénicas marcadas con DiO. Para inducir la formación de sincicios, se colocaron células PBMCs y Env+ en proporción 1:1. Las placas fueron incubadas a 37 °C con 5% CO₂ durante 5 horas y evaluadas a diferentes tiempos después del retiro del estímulo (anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas en proporción 2.5:1(perlas: célula) durante 3 días).

- a) Cocultivo de células Jurkat Env+ fusogénicas con PBMCs NA, b) Cocultivo de células Jurkat Env+ fusogénicas con PBMCs A. Datos obtenidos de dos experimentos. Cada punto representa la media \pm la desviación estándar. NA y A son independientes y simultaneos.

La **Fig. 24**, muestra el aspecto de los cocultivos de PBMCs no activadas o activadas con células Jurkat Env+ fusogénicas. Los cocultivos formados por PBMCs A, tienden al día 3 a formar muchos sincicios pequeños, pero bien identificables a un aumento 10x, sin embargo los cocultivos formados por PBMCs NA, tienden al día 3 a formar sincicios aparentemente muy pequeños y poco abundantes, muy difíciles de ser identificados a un aumento de 10x (**Fig. 24**). Las imágenes concuerdan con los datos obtenidos por citometría respecto a porcentaje (**Fig. 23a y 23b**) y tamaño (**Fig. 25a**) de los sincicios.

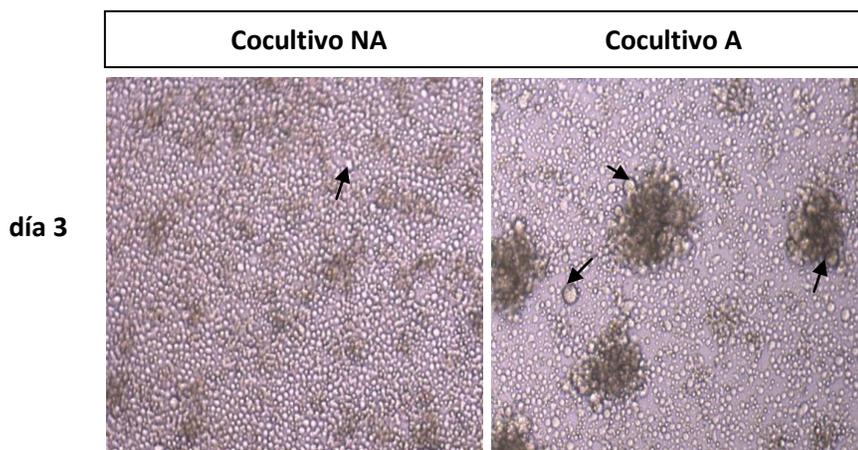


Fig. 24: Aspecto de los cocultivos de PBMCs (NA) o Activadas (A), con células Jurkat (Env+) fusogénicas al día 3. Los sincicios son señalados mediante una flecha. Aumento 10x.

3.5 Análisis del tamaño y granularidad de sincicios formados por la fusión de PBMCs con células Jurkat Env+.

Nos preguntamos si existía diferencia respecto a su tamaño y granularidad entre los sincicios formados por PBMCs no activadas y activadas (anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas).

Se analizó el tamaño y la granularidad de los sincicios generados en cocultivos de células Jurkat Env+ fusogénicas con PBMCs no activadas o activadas. Los resultados muestran que los sincicios formados por PBMCs activadas son mas grandes (**Fig. 25a**), y mas granuloso (mayor complejidad interna) (**Fig. 25b**) que aquellos formados por PBMCs no activadas.

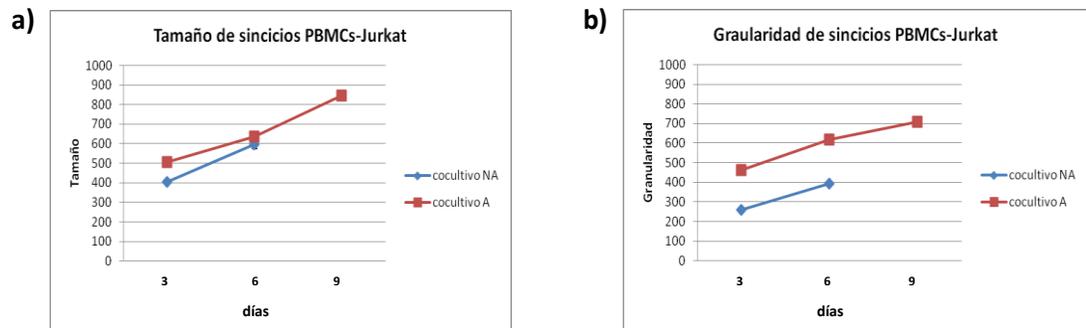


Fig. 25. Tamaño y granularidad de los sincicios generados en cocultivos de células Jurkat Env+ fusogénicas con células PBMCs no activadas o activadas. Datos obtenidos de dos experimentos. Cada punto representa la media \pm la desviación estándar. NA y A son independientes y simultáneos.

CASO 4: ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS T CD4+ (PURIFICADOS DE PBMCs) CON ANTICUERPOS ANTI-CD3 Y ANTI-CD28 ACOPLADOS A PERLAS MAGNÉTICAS (CONGELADOS Y DESCONGELADOS).

4.1 Efecto sobre la expresión de marcadores de superficie.

Las PBMCs fueron obtenidas por centrifugación en gradiente de ficoll y los linfocitos T CD4+ fueron purificados por selección negativa. La pureza fue determinada por la expresión de los marcadores CD4 y CD3 por inmunofluorescencia directa. Los resultados muestran un 99.26% de células CD4+ (**Figs. 26a tiempo 0 y 27a**) con un índice de fluorescencia media de 80.83 (**Figs. 26b tiempo 0 y 27a**), mientras que un 99.5% fueron CD3+ (**Figs. 26c tiempo 0 y 27c**), con un índice de fluorescencia media de 166.6 (**Figs. 26d tiempo 0 y 27c**). La viabilidad registrada fue >96% al día 0 (**Fig. 28, tiempo 0**).

Los linfocitos T CD4+ purificados fueron congelados en nitrógeno líquido durante 4 semanas, posteriormente los linfocitos T CD4+ fueron descongelados y crecidos durante 16h con medio RPMI suplementado con 20% de SFB_i. Después de ese tiempo, fueron centrifugados y crecidos en medio RPMI suplementado con 10% de SFB_i y 40 UI de IL-2/mL.

Los linfocitos T CD4+, fueron estimulados con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas en proporción 3:1 (perlas:célula) durante 3 días. Se analizó la expresión de CD4, CD25, CD54, CD184 y CD3 por inmunofluorescencia directa, inmediatamente después de retirar el estímulo, correspondiente al día 3 y tres días posteriores al retiro del estímulo, correspondiente al día 6.

Para demostrar que el estímulo funcionó y las células fueron activadas revisamos el aumento en la expresión de dos marcadores de superficie que son CD25 y CD54 (marcadores inducibles durante el proceso de activación celular).

Se hace incapie en los resultados obtenidos al día 3 para todos los marcadores de superficie, ya que a este día, CD25 y CD54 tuvieron una alta expresión en linfocitos T CD4+ activados.

Los linfocitos T CD4+ activados (A) al día 3, muestran un 94.93% de células positivas para CD25 mientras que los linfocitos T CD4+ NA al día 3 muestran un 3.69% de células que expresan CD25 (**Figs.26e y 27e**).Respecto a su IFM los linfocitos T CD4+ A al día 3, muestran un 60.39 mientras que los linfocitos T CD4+ NA al día 3 muestran un 2 (**Figs.26f y 27e**).

Los linfocitos T CD4+ activados (A) al día 3, muestran un 98.57% de células positivas para CD54 mientras que los linfocitos T CD4+ NA al día 3 muestran un 45.05% de células que expresan CD54 (**Figs.26g y 27g**).Respecto a su IFM los linfocitos T CD4+ A al día 3, muestran un 44.89 mientras que los linfocitos T CD4+ NA al día 3 muestran un 3.88 (**Figs.26h y 27g**).

Los resultados anteriores nos muestran que los linfocitos T CD4+ efectivamente se activaron. Nos preguntamos después si el estímulo tenía un efecto sobre los marcadores de superficie CD4, CD3 y CD184.

Los linfocitos T CD4+ activados (A) al día 3, muestran un 99.57% de células positivas para CD4 mientras que los linfocitos T CD4+ NA al día 3 muestran un 98.12% de células que expresan CD4 (**Figs.26a y 27a**).Respecto a su IFM los linfocitos T CD4+ A al día 3, muestran un 61.16 mientras que los linfocitos T CD4+ NA al día 3 muestran un 23.99 (**Figs. 26b y 27a**).

Los linfocitos T CD4+ activados (A) al día 3, muestran un 97.68% de células positivas para CD3 mientras que los linfocitos T CD4+ NA al día 3 muestran un 98.82% de células que expresan CD3 (**Figs.26c y 27c**).Respecto a su IFM los linfocitos T CD4+ A al día 3, muestran un 42.97 mientras que los linfocitos T CD4+ NA al día 3 muestran un 44.53 (**Figs.26d y 27c**).

Los linfocitos T CD4+ activados (A) al día 3, muestran un 18.95% de células positivas para CD184 mientras que los linfocitos T CD4+ NA al día 3 muestran un 20.16% de células que expresan CD184 (**Figs.26i y 27i**).Respecto a su IFM los linfocitos T CD4+ A al día 3, muestran un 2.7 mientras que los linfocitos T CD4+ NA al día 3 muestran un 2.4 (**Figs.26j y 27i**).

En resumen los resultados muestran que el estímulo de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas sobre linfocitos T CD4+, provocó un aumento tanto en el porcentaje de células positivas como en el índice de fluorescencia

media de los marcadores CD25 (**Figs. 26e,26f, 27e y 27f**) y CD54 (**Figs. 26g,26h, 27g y 27h**), un aumento únicamente en el índice de fluorescencia media de los marcadores CD4 (**Figs. 26b y 27b**).

PORCENTAJE DE CÉLULAS POSITIVAS

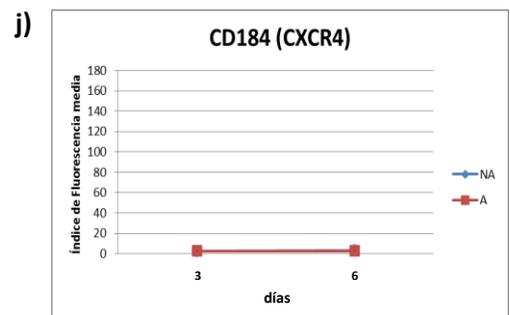
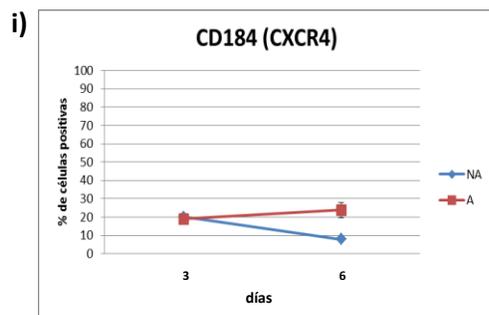
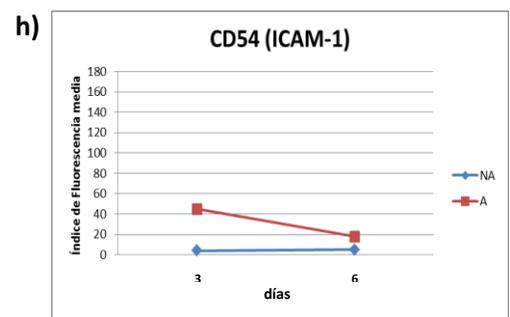
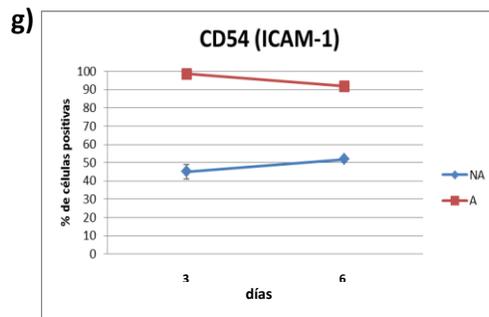
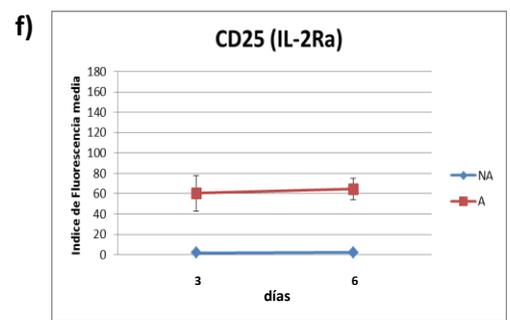
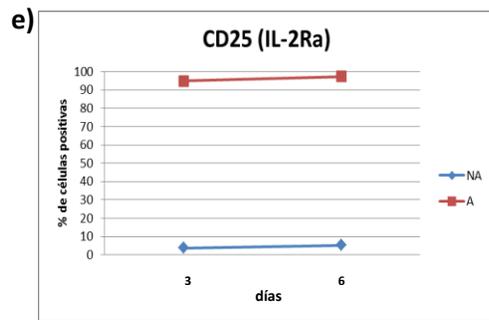
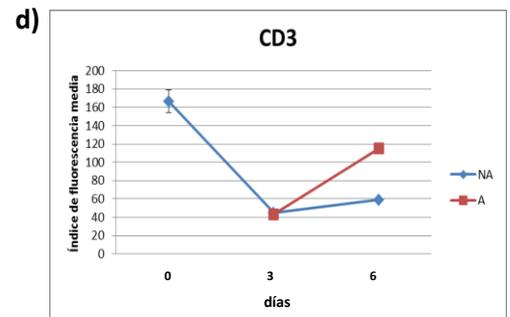
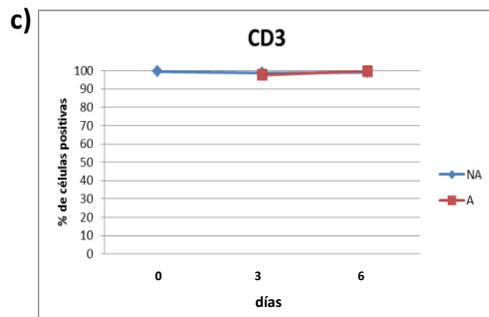
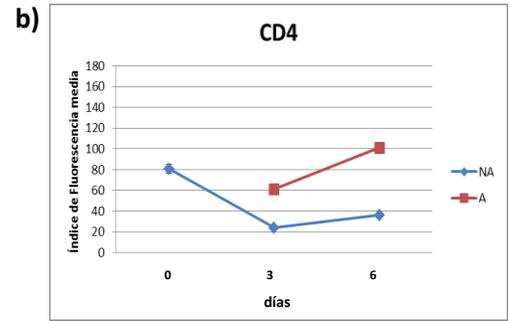
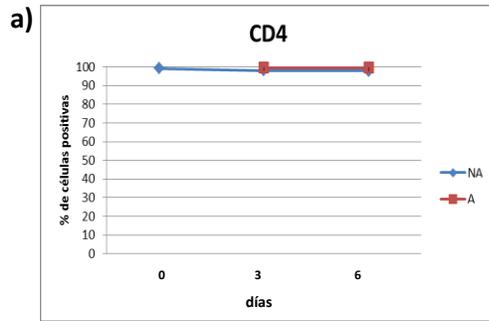
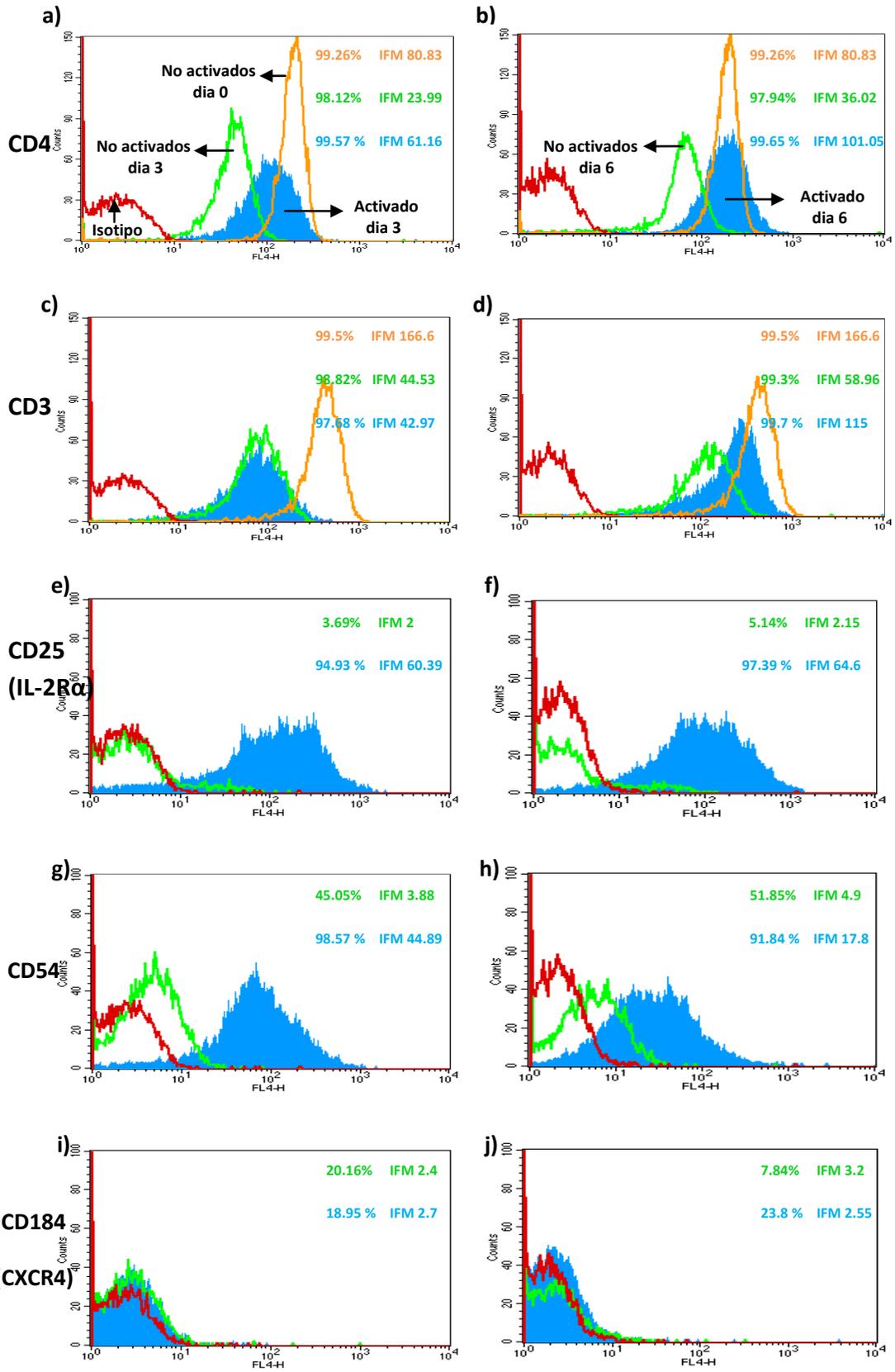


Fig. 26: Efecto de la activación de linfocitos T CD4+ (purificados de PBMCs) con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas sobre la expresión de marcadores de superficie.: Se determinó la expresión de marcadores de superficie CD4, CD25(IL-2R α), CD184(CXCR4), CD54(ICAM-1) y CD3 en células No Activadas (NA) y Activadas (A) a diferentes tiempos.

a-j: Se purificaron linfocitos T CD4+ a partir de PBMCs por selección negativa, con una pureza >99% y viabilidad >96%. Los linfocitos T CD4+ purificados fueron congelados en nitrógeno líquido durante 4 semanas y posteriormente fueron descongelados y crecidos durante 16 horas con medio RPMI suplementado con 20% de SFB_i. Después de ese tiempo, fueron centrifugados y crecidos en medio RPMI suplementado con 10% de SFB_i y 40 UI de IL-2/mL. Los linfocitos T CD4+, fueron estimulados con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas en proporción 3:1 durante 3 días. Se revisaron los marcadores CD4, CD25, CD54, CD184 y CD3 inmediatamente después de retirar el estímulo (día 3) y tres días posteriores (día 6). Las graficas muestran porcentaje de células positivas (**a, c, e, g, i**) e índice de fluorescencia media, IFM (**b, d, f, h, j**). **nota: la pureza fue medida al tiempo 0 inmediatamente después de la selección negativa.** Datos obtenidos de un experimento. Cada punto representa la media \pm error estándar. NA y A son independientes y simultaneos.

DÍA 3

DÍA 6



*Fig. 27: Efecto de la activación de linfocitos T CD4+ (purificados de PBMCs) con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas sobre la expresión de marcadores de superficie (histogramas sobrelapados). Los datos de la figura 26 se representaron ahora mediante histogramas. La curva **naranja** representa la expresión del marcador en linfocitos T CD4+ No activados al día 0. La curva **verde**, representa la expresión del marcador en linfocitos T CD4+ No activados (al día 3 o al día 6, según sea el caso), la curva **azul**, representa la expresión en linfocitos T CD4+ Activados (al día 3 o al día 6, según sea el caso) y en **rojo** el control de isotipo. En la parte superior derecha de cada histograma se encuentran los porcentajes de células positivas y el Índice de fluorescencia media para cada curva.*

4.2 Efecto de la activación sobre la viabilidad de linfocitos T CD4+

Para conocer si la viabilidad de los linfocitos T CD4+ se vio afectada por la activación mediante anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas, se evaluó la viabilidad de los linfocitos T CD4+ No activados (NA) y activados (A).

Se purificaron linfocitos T CD4+ a partir de PBMCs por selección negativa, con una pureza >99% y viabilidad >96% (**Fig. 28 tiempo 0**). Los linfocitos T CD4+ purificados fueron congelados en nitrógeno líquido durante 4 semanas y posteriormente fueron descongelados y crecidos durante 16 horas con medio RPMI suplementado con 20% de SFB_i. Después de ese tiempo, fueron centrifugados y crecidos en medio RPMI suplementado con 10% de SFB_i y 40 UI de IL-2/mL. Los linfocitos T CD4+, fueron estimulados con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas en proporción 3:1 (perlas:célula) durante 3 días. La viabilidad de los linfocitos T CD4+ NA y A fueron además revisados a dos tiempos, al día 3, inmediatamente después de retirar el estímulo y al día 6, tres días posteriores al retiro del estímulo. Se consideraron viables, las células negativas para 7AAD (ver materiales y métodos).

Los resultados muestran que los linfocitos T CD4+ tratados con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas, tuvieron una viabilidad del 79.43% al día 3, en contraste con el control que tuvo una viabilidad del 88.2% al día 3 (**Fig. 28**). El estímulo no disminuyó de manera importante la viabilidad como se requería y por tal motivo se decidió hacer el seguimiento a varios días. Es importante notar, que la viabilidad de los linfocitos T CD4+ NA decrece al transcurrir el tiempo, mientras que la viabilidad de los linfocitos T CD4+ A se incrementa al transcurrir el tiempo.

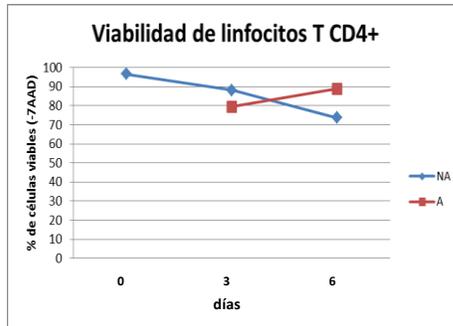


Fig. 28. Efecto de la activación sobre la viabilidad de linfocitos T CD4+. Se purificaron linfocitos T CD4+ a partir PBMCs por selección negativa, obteniéndose una pureza >99% y viabilidad >96%. Los linfocitos T CD4+ purificados fueron congelados en nitrógeno líquido durante 4 semanas y posteriormente fueron descongelados y crecidos durante 16 horas con medio RPMI suplementado con 20% de SFB_i. Después de ese tiempo, fueron centrifugados y crecidos en medio RPMI suplementado con 10% de SFB_i y 40 UI de IL-2/mL. Los linfocitos T CD4+, fueron estimulados con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas en proporción 3:1 (perlas: célula) durante 3 días. Se evaluó la viabilidad de linfocitos T CD4+ No activados (NA) y activados (A) a diferentes tiempos. Se consideraron como viables a las células negativas para 7AAD. Nota. El tiempo 0, corresponde a la viabilidad registrada después de la selección negativa. Datos obtenidos de un experimento. Cada punto representa la media ± error estándar. NA y A son independientes y simultáneos.

4.3 Efecto de la activación de linfocitos T CD4+ (purificados de PBMCs) sobre la fusión con células Jurkat Env+

Los linfocitos T CD4+ purificados a partir de PBMCs No activados (NA) y Activados (A), fueron marcados con DiI y cocultivados con células Jurkat Env+ fusogénicas marcadas con DiO. Para inducir la formación de sincicios, se colocaron linfocitos T CD4+ y células Jurkat Env+ fusogénicas en proporción 1:1. Las placas fueron incubadas a 37 °C con 5% CO₂ durante 5 horas y evaluadas a dos diferentes tiempos después del retiro del estímulo. El estímulo empleado fue anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas en proporción 3:1 (perlas: célula) durante 3 días. Como control de especificidad de la fusión celular, se incluyeron pozos en los que se adicionó el péptido sintético T-20 (Enfuvirtida) [48 ng/mL]. Por el gran tamaño de los sincicios y experiencia previa se decidió no pasarlos por el citómetro de flujo.

Se tomaron fotografías por microscopía de luz de los diferentes cocultivos (por duplicado) al día 3 y al día 6 (**Fig. 29**) y también con el microscopio invertido de fluorescencia de los diferentes cocultivos únicamente al día 3 (10x) (**Fig. 30**).

Para las fotografías tomadas por microscopía de luz, la cantidad de sincicios fue contada por cada campo, en los ocho diferentes campos y se obtuvo el promedio y el error estándar en cada caso para cada cocultivo. Los sincicios son señalados mediante una flecha (**Fig. 29**).

Se hace énfasis en la media de sincicios contados al día 3 y 6. El día 3 destaca debido a la alta expresión de CD54.

Los resultados muestran que los cocultivos formados por linfocitos T CD4+ activados (A), tienden al día 3 a formar muchos sincicios (media: 100), muy grandes en tamaño y por tanto también con una alta complejidad interna (granularidad) (**Figs. 29 y 30**). Los sincicios se distinguen muy bien porque muestran una membrana bien definida. Al día 6, como puede observarse los sincicios son más numerosos que al día 3 (media: 215), pero más pequeños (**Fig. 29**). Los cocultivos formados por linfocitos T CD4+ no activados (NA), tienden a formar muchos sincicios al día 3 (media: 110), muy pequeños y con baja complejidad interna (granularidad) (**Figs. 29 y 30**), al día 6 como se observa los sincicios son menos numerosos (media: 14) y más pequeños (**Fig. 29**). El uso del inhibidor T-20, fue capaz de inhibir casi totalmente la formación de sincicios tanto en cocultivos con células A y NA en ambos tiempos (**Figs. 29 y 30**), lo cual corrobora que se trata de verdaderos sincicios que son producto de la fusión celular.

Cocultivo de linfocitos T CD4+ con células Jurkat Env+

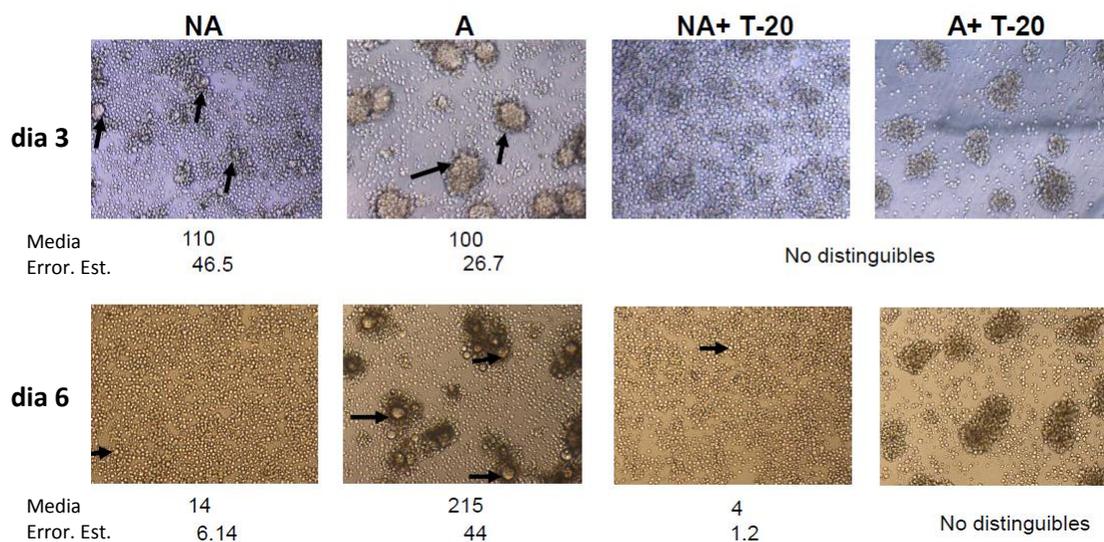


Fig. 29. Aspecto de los cocultivos formados por Linfocitos T CD4+ no activados (NA) o Activados (A) con células Jurkat (Env+) fusogénicas al día 3 y 6 (microscopía de luz). Los linfocitos T CD4+ purificados a partir de PBMCs No activados (NA) y Activados (A), fueron marcados con DiI y cocultivos con células Jurkat Env+ fusogénicas marcadas con DiO. Para inducir la formación de sincicios, se colocaron células CD4+ y Env fusogénicas en proporción 1:1. Las placas fueron incubadas a 37 °C con 5% CO₂ durante 5 horas y evaluadas a diferentes tiempos después del retiro del estímulo (anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas en proporción 3:1 (perlas: célula) durante 3 días). Como control de especificidad de la fusión celular, se incluyeron pozos en los que se adicionó el péptido sintético T-20 (Enfuvirtida) [48 ng/mL]. Los sincicios son señalados mediante una flecha. Por el gran tamaño de los sincicios y experiencia previa se decidió no pasarlos por el citómetro de flujo.

Fotografías tomadas por microscopía de luz (10x) de los diferentes cocultivos. La cantidad de sincicios fue contada por cada campo, en ocho diferentes campos (por duplicado) y se obtuvo el promedio y el error estándar en cada caso.

Cocultivo NA: Formado por Linfocitos T CD4+ purificados a partir de PBMCs y células Jurkat Env+ fusogénicas.

Cocultivo A: Formado por Linfocitos T CD4+ purificados a partir de PBMCs (activadas con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas) y células Jurkat Env+ fusogénicas. Datos obtenidos de un experimento. Se representa la media \pm error estándar. NA y A son independientes y simultáneos.

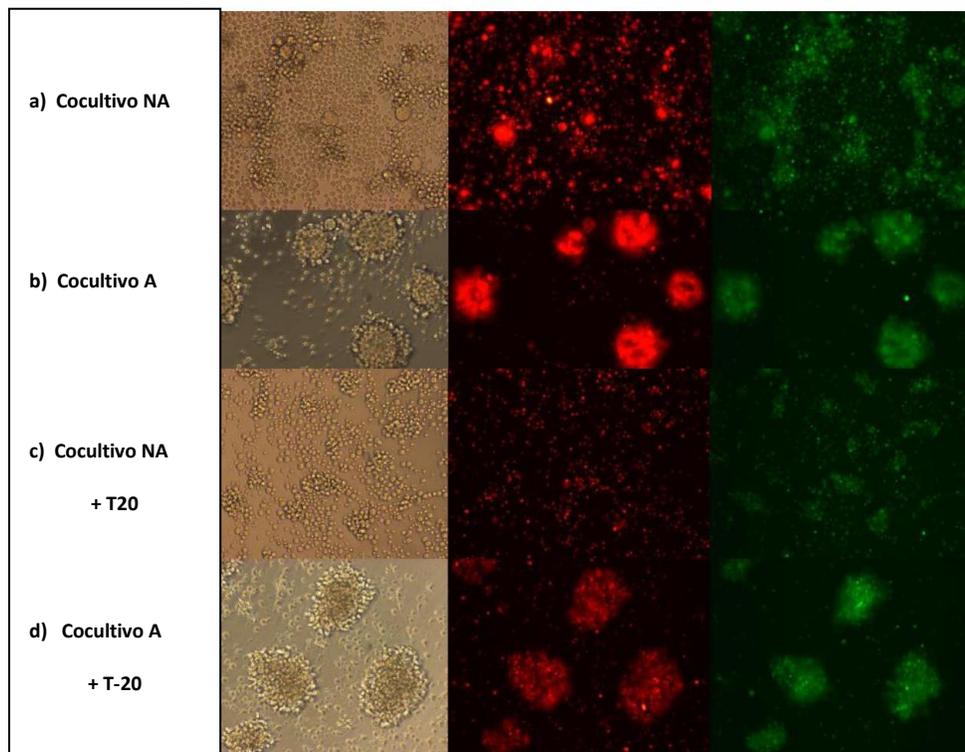


Fig.30. Aspecto de los cocultivos formados por Linfocitos T CD4+ no activados (NA) o Activados (A), con células Jurkat (Env+) fusogénicas al día 3 (microscopio invertido de fluorescencia 10x). a) Cocultivo de células Jurkat Env con linfocitos T CD4+ purificados a partir de PBMCs NA, b) Cocultivo de células Jurkat Env con linfocitos T CD4+ purificados a partir de PBMCs A, activadas previamente con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas en proporción 3:1 durante 3 días y cocultivo 5h. Como control de especificidad de la fusión celular, se incluyeron pozos en los que se adicionó el inhibidor, el péptido sintético T-20 (Enfuvirtida), c y d.

CASO 5: ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS T CD4+ (PURIFICADOS DE PBMCS) CON ANTICUERPOS ANTI-CD3 Y ANTI-CD28 ACOPLADOS A PERLAS MAGNÉTICAS (FRESCOS)



Fig. 31. *Linfocitos T CD4+ purificados a partir de PBMCS con 1 día de activación (anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas) (p). Se observa una polarización de la célula adquiriendo una morfología alargada. Se muestra el uropodo (trasero) (u) y frentes de migración (f). Aumento 40x.*

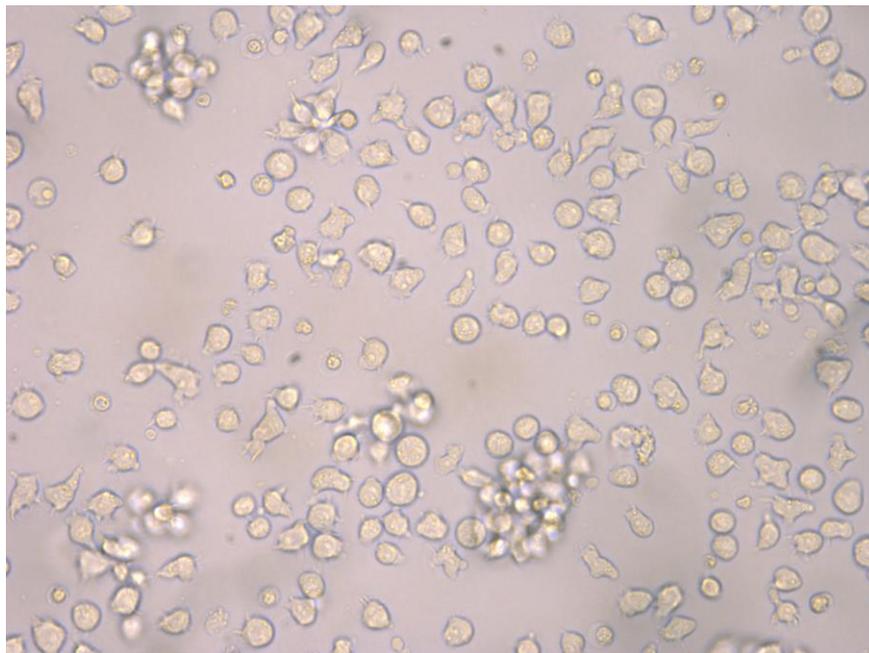


Fig. 32. *Linfocitos T CD4+ (purificados a partir de PBMCS) activados con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas al día 3. Notese que las células activadas son: más grandes, con mayor complejidad interna (más granulosa) y adquieren proyecciones de membrana. Aumento 40x.*

5.1 Efecto sobre la expresión de marcadores de superficie

Las PBMCs fueron obtenidas por centrifugación en gradiente de ficoll y los linfocitos T CD4⁺ fueron purificados por selección negativa. La pureza fue determinada por la expresión de los marcadores CD4 y CD3 por inmunofluorescencia directa. Los resultados muestran un 98% de células CD4⁺ (**Figs. 33a y 34a tiempo 0, naranja**) con un índice de fluorescencia media de 88.56 (**Figs. 33b y 34a tiempo 0, naranja**), mientras que un 99.25% fueron CD3⁺ (**Figs. 33c y 34c tiempo 0, naranja**), con un índice de fluorescencia media de 175.73 (**Figs. 33d y 34c tiempo 0, naranja**). La viabilidad registrada fue >97% al día 0 (**Fig. 35, tiempo 0**).

Se analizó la expresión de CD4, CD3, CD25, CD54 y CD184 al tiempo 0, inmediatamente después de la selección negativa (control, NA), ya que de esta forma nos proporcionaría la expresión de estos marcadores en el mismo día en que las células fueron aisladas del donador por lo que esperábamos encontrarlas en condiciones optimas.

Posteriormente los linfocitos T CD4⁺, fueron estimulados con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas en proporción 3:1 (perlas:célula) durante 3 días. Las células activadas fueron crecidas en medio RPMI suplementado con 10% SFB_i y 40 UI de IL-2/mL. Se analizó la expresión de CD4, CD3, CD25, CD54 y CD184 por inmunofluorescencia directa, inmediatamente después de retirar el estímulo, correspondiente al día 3 y tres días posteriores al retiro del estímulo, correspondiente al día 6 (Activadas, A).

La expresión de los marcadores de superficie en las células activadas al día 3 o 6, fueron comparados con la expresión en las células no activadas al tiempo 0.

Para demostrar que el estímulo funcionó y las células fueron activadas revisamos el aumento en la expresión de dos marcadores de superficie que son CD25 y CD54 (marcadores inducibles durante el proceso de activación celular).

Se hace incapie en los resultados obtenidos al día 3 porque a este día, los marcadores de superficie CD25 y CD54 tuvieron una alta expresión en linfocitos T CD4⁺ activados, sin embargo la expresión de CD4 se incrementó hasta el día 6.

Los linfocitos T CD4⁺ activados (A) al día 3, muestran un 97.09% de células positivas para CD25 mientras que los linfocitos T CD4⁺ no activados (NA) al día 0

muestran un 34.68% de células que expresan CD25 (**Figs. 33e y 34e**).Respecto a su IFM los linfocitos T CD4+ A al día 3, muestran un 137.9 mientras que los linfocitos T CD4+ NA al día 0 muestran un 6.19 (**Figs. 33f y 34e**).

Los linfocitos T CD4+ activados (A) al día 3, muestran un 97.64% de células positivas para CD54 mientras que los linfocitos T CD4+ no activados (NA) al día 0 muestran un 65.86% de células que expresan CD54 (**Figs. 33g y 34g**).Respecto a su IFM los linfocitos T CD4+ A al día 3, muestran un 130.28 mientras que los linfocitos T CD4+ NA al día 0 muestran un 5.51 (**Figs. 33h y 34g**).

Los resultados anteriores nos muestran que los linfocitos T CD4+ efectivamente se activaron. Nos preguntamos después si el estímulo tenía un efecto sobre los marcadores de superficie CD4, CD3 y CD184.

Los linfocitos T CD4+ activados (A) al día 6, muestran un 99.54% de células positivas para CD4 mientras que los linfocitos T CD4+ no activados (NA) al día 0 muestran un 98% de células que expresan CD4 (**Figs. 33a y 34b**).Respecto a su IFM los linfocitos T CD4+ A al día 6, muestran un 120.49 mientras que los linfocitos T CD4+ NA al día 0 muestran un 88.56 (**Figs. 33b y 34b**).

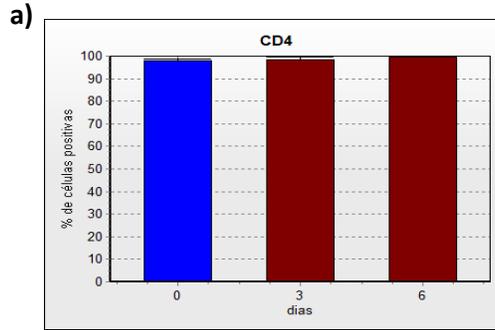
Los linfocitos T CD4+ activados (A) al día 3, muestran un 94.17% de células positivas para CD3 mientras que los linfocitos T CD4+ no activados (NA) al día 0 muestran un 99.25% de células que expresan CD3 (**Figs. 33c y 34c**).Respecto a su IFM los linfocitos T CD4+ A al día 3, muestran un 65.7 mientras que los linfocitos T CD4+ NA al día 0 muestran un 175.73 (**Figs. 33d y 34c**).

Los linfocitos T CD4+ activados (A) al día 3, muestran un 75.68% de células positivas para CD184 mientras que los linfocitos T CD4+ no activados (NA) al día 0 muestran un 67.97% de células que expresan CD184 (**Figs.33i y 34i**).Respecto a su IFM los linfocitos T CD4+ A al día 3, muestran un 18.23 mientras que los linfocitos T CD4+ NA al día 0 muestran un 6.06 (**Figs.33j y 34i**).

En resumen los resultados muestran que el estímulo de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas en linfocitos T CD4+ purificados y frescos provocó un aumento tanto en el porcentaje de células positivas como en el índice de fluorescencia media de los marcadores CD25 (**Figs. 33e, 33f, 34e y 34f**) y CD54 (**Figs. 33g, 33h, 34g y 34h**) a los días 3 y 6, un aumento únicamente en el índice de

fluorescencia media del marcador CD4 a los días 3 y 6 (**Fig. 33b, 34a y 34b**), una disminución en el índice de fluorescencia media de CD3 al día 3 (**Figs 33d y 34c**) y una recuperación parcial en el índice de fluorescencia media de CD3 al día 6 (**Fig. 33d y 34d**) además de un aumento en el índice de fluorescencia media de CD184 al día 3 (**Fig. 33j y 34i**)

PORCENTAJE DE CÉLULAS POSITIVAS



ÍNDICE DE FLUORESCENCIA MEDIA

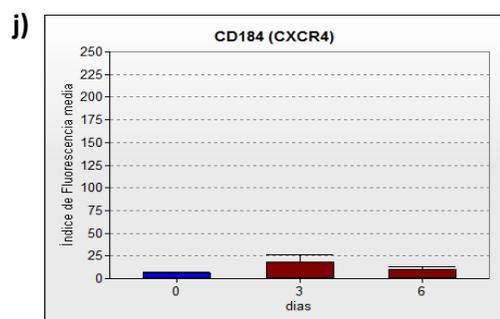
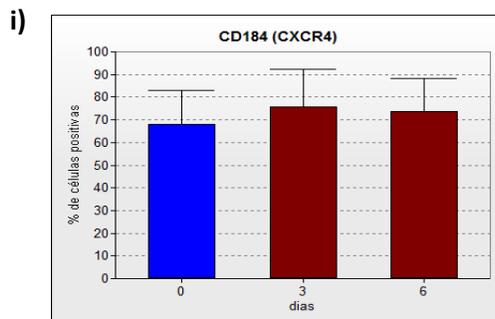
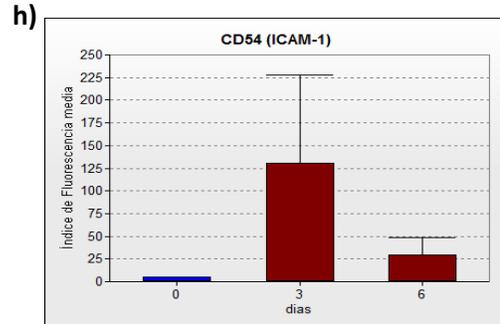
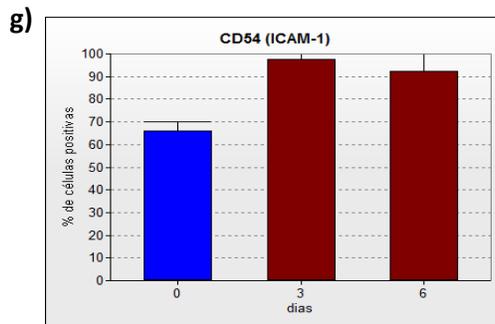
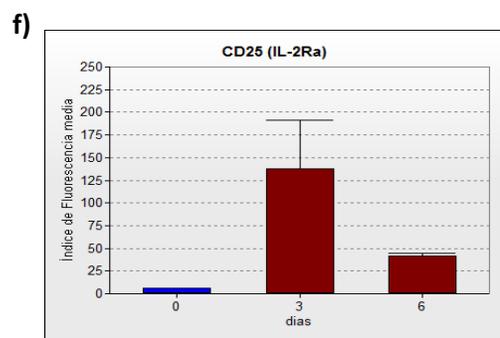
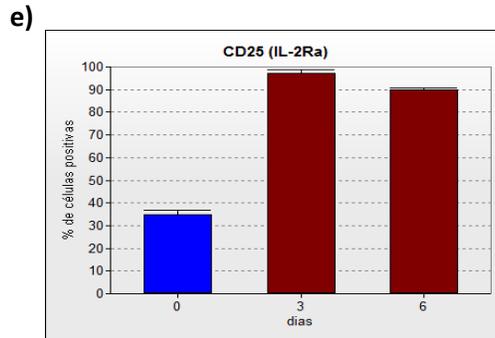
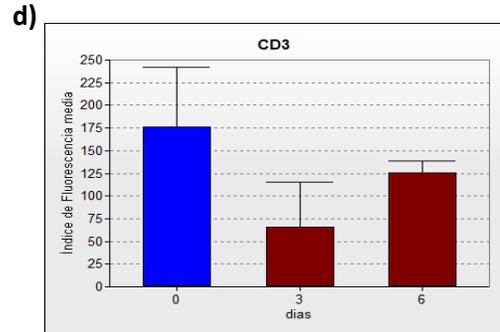
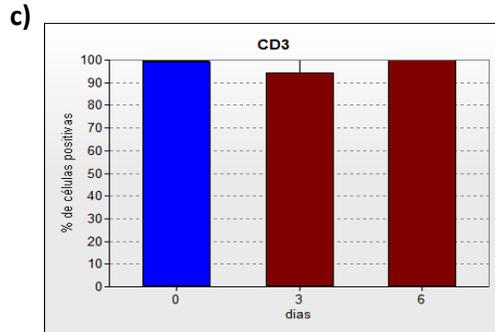
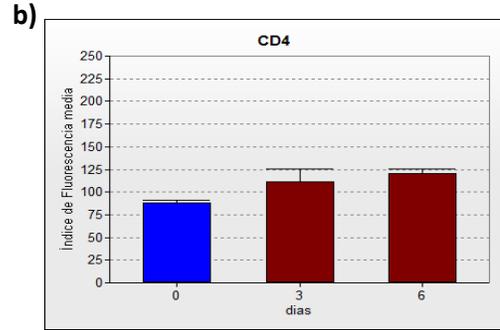


Fig. 33: Efecto de la activación de linfocitos T CD4+ (purificados de PBMCs) con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas sobre la expresión de marcadores de superficie: Se analizó la expresión de CD4, CD25(IL-2R α), CD184(CXCR4), CD54(ICAM-1) y CD3 en células No Activadas (NA) al día 0 y Activadas (A) inmediatamente después de retirar el estímulo (día 3) y tres días posteriores (día 6).

a-j: Fueron purificados linfocitos T CD4+ a partir de PBMCs por selección negativa, con una pureza > 98% y viabilidad del >97%. Los linfocitos T CD4+, fueron estimulados con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas en proporción 3:1 (perlas:célula) durante 3 días. Las células activadas fueron crecidas en medio RPMI suplementado con 10% de SFB_i y 40 UI de IL-2/mL. Se analizó la expresión de CD4, CD25, CD54, CD184 y CD3 inmediatamente después de ser obtenidas por selección negativa (No activadas, día 0) e inmediatamente después de retirar las perlas (día 3) y tres días posteriores (día 6). Las graficas muestran porcentaje de células positivas (**a,c,e,g, i**) e índice de fluorescencia media, IFM (**b,d,f,h,j**). Datos obtenidos de dos experimentos. La barra representa la media \pm desviación estándar.

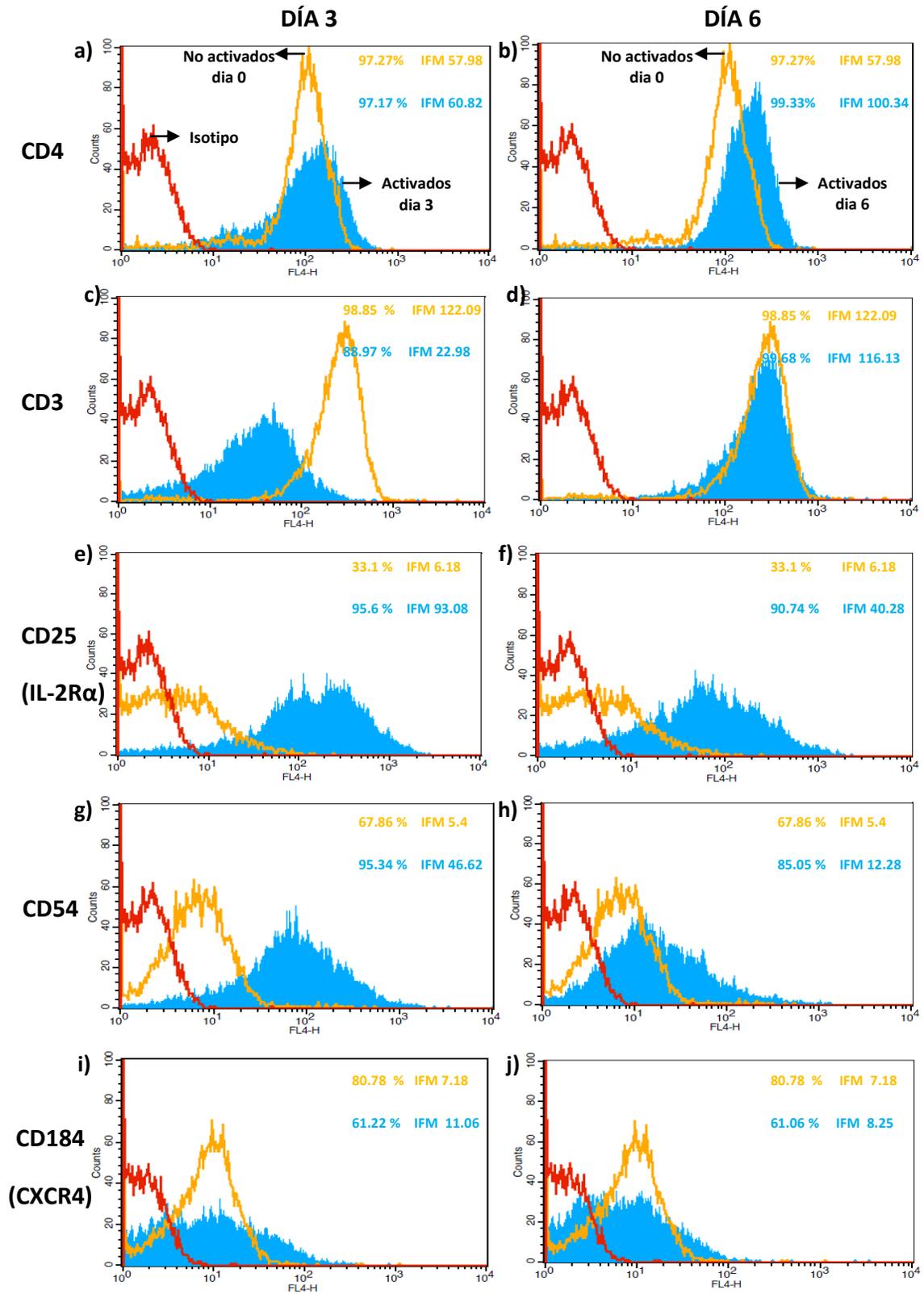


Fig. 34: Efecto de la activación de linfocitos T CD4+ (purificados de PBMCs) con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas sobre la expresión de marcadores de superficie

(*histogramas sobrelapados*). Experimento representativo de dos. La curva *naranja* representa la expresión del marcador en linfocitos T CD4+ No activados al día 0, la curva *azul*, representa la expresión del marcador en linfocitos T CD4+ Activados (al día 3 o al día 6, según sea el caso) y en *rojo* el control de isotipo. En la parte superior derecha de cada histograma se encuentran los porcentajes de células positivas y el Índice de fluorescencia media para cada curva. Los colores de estas leyendas, corresponden al color y significado del histograma.

5.2 Efecto de la activación sobre la viabilidad de linfocitos T CD4+ frescos

Para conocer si la viabilidad de los linfocitos T CD4+ se vio afectada por la activación mediante anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas, se evaluó la viabilidad de los linfocitos T CD4+ No activados (NA) y activados (A).

Se purificaron linfocitos T CD4+ a partir de PBMCs por selección negativa, con una pureza >98% y viabilidad >97% (**Fig. 35 tiempo 0**). Los linfocitos T CD4+, fueron estimulados con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas en proporción 3:1 (perlas:célula) durante 3 días. La viabilidad de los linfocitos T CD4+ A fue revisada a dos tiempos, al día 3, inmediatamente después de retirar el estímulo y al día 6, tres días posteriores al retiro del estímulo. Se consideraron viables, las células negativas para 7AAD (ver materiales y métodos).

Los resultados muestran que los linfocitos T CD4+ tratados con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas, tuvieron una viabilidad del 86.72% al día 3, en contraste con el control NA que tuvo una viabilidad del 97.57% al día 0 (**Fig. 35**). El estímulo no disminuyó de manera importante la viabilidad como se requería y por tal motivo se decidió hacer el seguimiento a varios días. Es importante notar, que la viabilidad de los linfocitos T CD4+ A permanece alta hasta el día 6, registrándose un 88.47%.

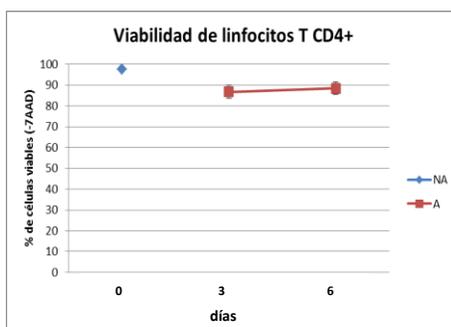


Fig. 35. Efecto de la activación sobre la viabilidad de linfocitos T CD4+ (frescos). Fueron purificados linfocitos T CD4+ a partir de PBMCs por selección negativa, con una pureza >98% y

viabilidad del >97% . Los linfocitos T CD4+, fueron estimulados con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas en proporción 3:1 durante 3 días. Se evaluó la viabilidad de Linfocitos T CD4+ No activados (NA), al día 0 (inmediatamente después de la selección negativa) y activados (A) después de retirar el estímulo (día 3 y 6). Se consideran como viables las células negativas para 7AAD. Datos obtenidos de dos experimentos. Cada punto representa la media \pm desviación estándar.

5.3 Efecto de la activación de linfocitos T CD4+ (frescos) sobre la fusión con células Jurkat Env+

Los linfocitos T CD4+ purificados a partir de PBMCs No activados (NA) y Activados (A), fueron marcados con DiI y cocultivados con células Jurkat Env+ fusogénicas marcadas con DiO. Para inducir la formación de sincicios, se colocaron células CD4+ y Env+ fusogénicas en proporción 1:1. Las placas fueron incubadas a 37 °C con 5% CO₂ durante **3 horas**, capturadas y fotografiadas al día 1, correspondiente al cocultivo NA y al día 3 y 6, correspondiente a cocultivos A. El estímulo empleado fue anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas en proporción 3:1 (perlas: célula) durante 3 días. Como control de especificidad de la fusión celular, se incluyeron pozos en los que se adicionó el péptido sintético T-20 (Enfuvirtida) [48 ng/mL].

Los cocultivos fueron capturados por citometría de flujo y además se tomaron fotografías con el microscopio invertido de fluorescencia (10x) a los días 1, 3 y 6 (**Figs. 36 y 37**). El día 3 destaca debido a la alta expresión de los marcadores de superficie CD25 y CD54.

Al día 1, los cocultivos NA fueron capturados en el citómetro FACS calibur, mientras que para los días 3 y 6, los cocultivos A fueron capturados en el citómetro Attune (que posee una apertura del capilar de mayor tamaño). En gráficas de puntos, se creó una región R3 (región amplia de células dobles fluorescentes) y una región región R6 (región de dobles fluorescentes con una fluorescencia roja no incrementada, correspondiente a agregados). El porcentaje de células dobles fluorescentes registrada en la región amplia R3, se le restó el porcentaje de agregados en la región R6, de esta forma fue obtenido el porcentaje de sincicios (región de dobles fluorescentes con una fluorescencia roja alta).

Los resultados muestran que en los cocultivos formados por linfocitos T CD4+ A al día 3, se formaron un 4.72% de sincicios (**Fig. 36**) y tienden a formar sincicios

muy grandes, y con gran complejidad interna (**Fig. 37**). Al día 6 se formaron un 5.54% de sincicios (**Fig. 36**), siendo estos más pequeños y con menor complejidad interna que al día 3 (**Fig. 37**). Al día 1 correspondiente a cocultivos con linfocitos T CD4+ NA, se formaron un 0.56% de sincicios (**Fig. 36**), siendo estos sincicios muy pequeños (**Fig. 37**).

En los cocultivos formados por linfocitos T CD4+ A + T-20, al día 3, se formaron un 1.51% de sincicios (**Fig. 36**) en cambio al día 6 se formaron un 1.61% de sincicios (**Fig. 36**), en contraste con el día 1 correspondiente a cocultivos formados por linfocitos T CD4+ NA+ T-20, se formaron un 0.03% de sincicios (**Fig. 36**). El péptido sintético T-20, fue capaz de inhibir la formación de sincicios tanto en cocultivos formados por linfocitos T CD4+ no activados y activados (**Figs. 36 y 37**) lo cual corrobora que se trata de verdaderos sincicios que son producto de la fusión celular.

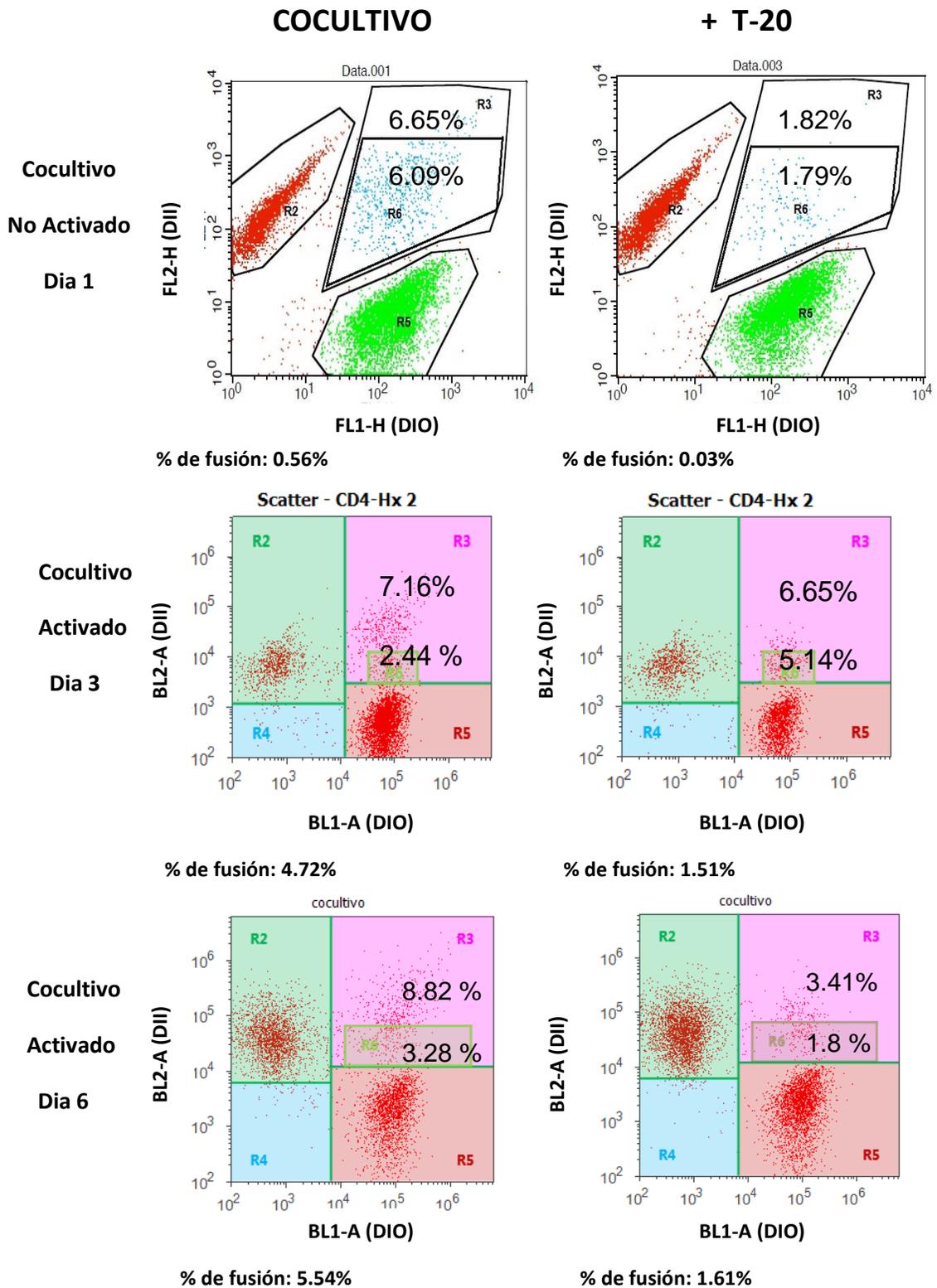


Fig.36 Efecto de la activación de linfocitos T CD4+ (frescos) sobre la fusión con células Jurkat Env+. Como control de especificidad de la fusión celular, se incluyeron pozos en los que se adicionó el péptido sintético T-20 (Enfuvirtida) [48 ng/mL]. Los linfocitos T CD4+ purificados a partir de PBMCs No activados (NA) y Activados (A), fueron marcados con DiI y cocultivados con células Jurkat Env+ fusogénicas marcadas con DiO. Para inducir la formación de sincicios, se colocaron

células CD4+ y Env+ fusogénicas en proporción 1:1. Las placas fueron incubadas a 37 °C con 5% CO2 durante 3 horas y evaluadas a diferentes tiempos después del retiro del estímulo (anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas en proporción 3:1 (perlas: célula) durante 3 días). Los sincicios fueron identificados como células con fluorescencia mixta y con una fluorescencia aumentada en FL2 o BL2-A (fluorescencia roja). Los cocultivos formados por linfocitos T CD4+ NA fueron capturados en el citometro FACS Calibur (día 1) y los cocultivos formados por linfocitos T CD4+ A fueron capturados en el citometro Attune (día 3 y día 6 respectivamente). El porcentaje de sincicios fue calculado mediante el porcentaje de células dobles fluorescentes en R3 y restándole el porcentaje de células dobles fluorescentes en R6 (agregados). Datos obtenidos de un experimento.

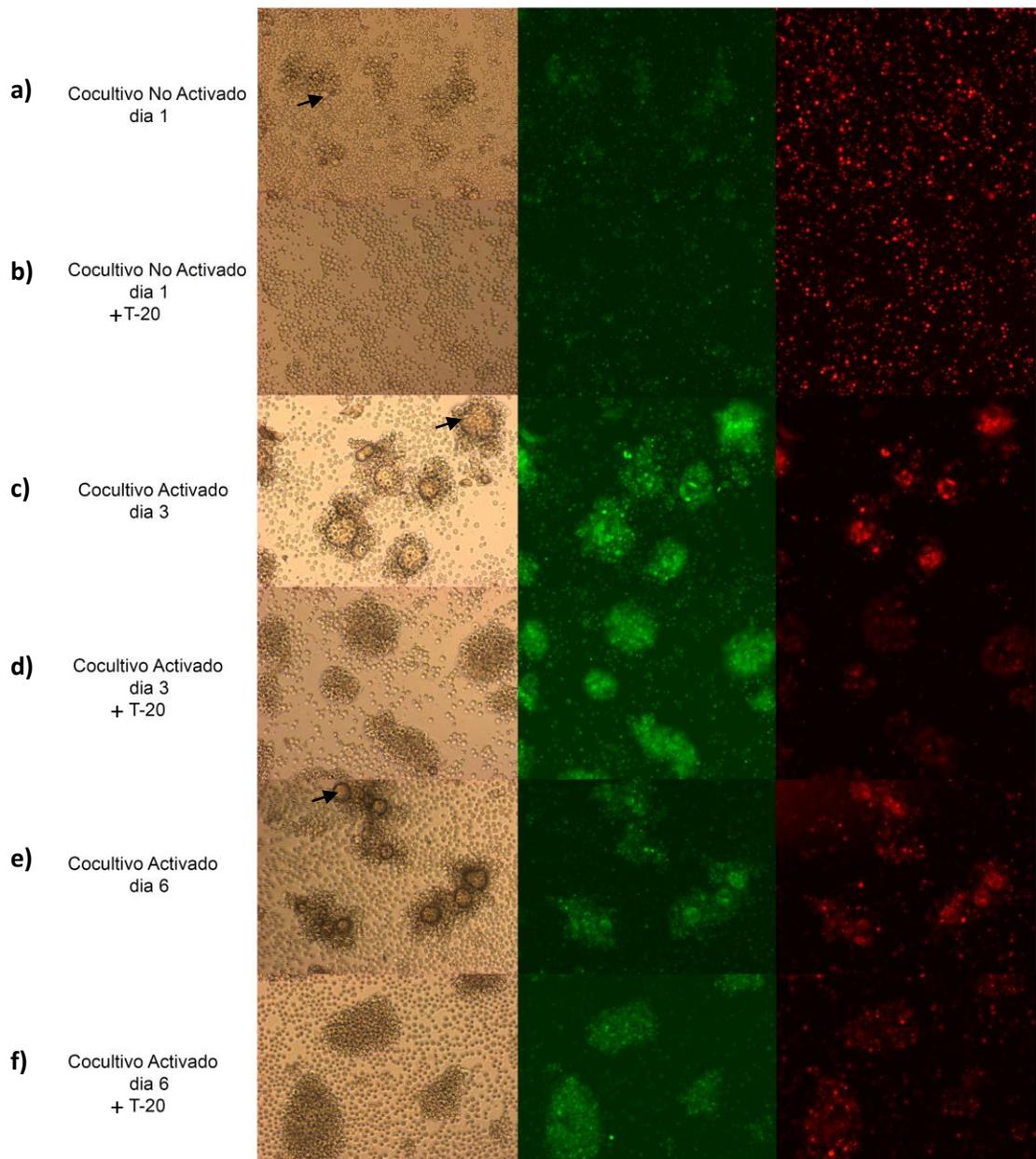


Fig. 37. Aspecto de los cocultivos formados por Linfocitos T CD4+ no activados (NA) o Activados (A) y células Jurkat (Env+) fusogénicas a los días 1, 3 y 6 (microscopio invertido de fluorescencia). Los linfocitos T CD4+ purificados a partir PBMCs No activados (NA) y Activados (A), fueron marcados con DiI y cocultivados con células Env+ fusogénicas marcadas con DiO. Para inducir la formación de sincicios, se colocaron células CD4+ y Env+ fusogénicas en proporción 1:1. Las placas fueron incubadas a 37 °C con 5% CO₂ durante 3 horas y evaluadas a diferentes tiempos después del retiro del estímulo (anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas en proporción 3:1 (perlas: célula) durante 3 días). Como control de especificidad de la fusión celular, se incluyeron pozos en los que se adicionó el péptido sintético T-20 (Enfuvirtida) [48 ng/mL]. Los sincicios son señalados mediante una flecha. Fotografías tomadas con el microscopio invertido de fluorescencia (10x).

- a) Cocultivo formado por células Jurkat Env+ fusogénicas y Linfocitos T CD4+ purificados NA (día 1, 12 horas posteriores a la selección negativa)*
- b) Cocultivo formado por células Jurkat Env+ fusogénicas y Linfocitos T CD4+ purificados NA + T-20 (día 1, 12 horas posteriores a la selección negativa)*
- c) Cocultivo formado por células Jurkat Env+ fusogénicas y Linfocitos T CD4+ purificados A, activadas previamente con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas en proporción 3:1 durante 3 días*
- d) Cocultivo formado por células Jurkat Env+ fusogénicas y Linfocitos T CD4+ purificados A, activadas previamente con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas en proporción 3:1 durante 3 días, + T-20*
- e) Cocultivo formado por células Jurkat Env+ fusogénicas y Linfocitos T CD4+ purificados A, seguimiento al día 6*
- f) Cocultivo formado por células Jurkat Env+ fusogénicas y Linfocitos T CD4+ purificados A, + T-20, seguimiento al día 6*

5.4 Análisis del tamaño de los sincicios formados por la fusión de linfocitos T CD4+ (frescos) con células Jurkat Env+.

Se tomaron fotografías por microscopía de luz de las células individuales (monocultivo) y de los diferentes cocultivos a los días 1, 3 y 6 en 6 campos diferentes.

Las imágenes fueron analizadas con el programa QCapture Pro 6.0. Previamente se calibró el programa con perlas magnéticas de 4.5µm de diámetro, se eligió el objetivo con el que fueron tomadas las fotos (10x ó 20x) y se procedió a realizar mediciones de diámetro. Los resultados muestran que los sincicios formados por linfocitos T CD4+ no activados al día 1 (Sincicios NA 1d), tuvieron un diámetro promedio de 22.31µm. Los sincicios formados por linfocitos T CD4+ activados al día 3 (Sincicios A 3d) tuvieron un diámetro promedio de 75.64µm, mientras que en los sincicios formados por linfocitos T CD4+ activados al día 6 (Sincicios A 6d), tuvieron un diámetro promedio de 40.63µm.

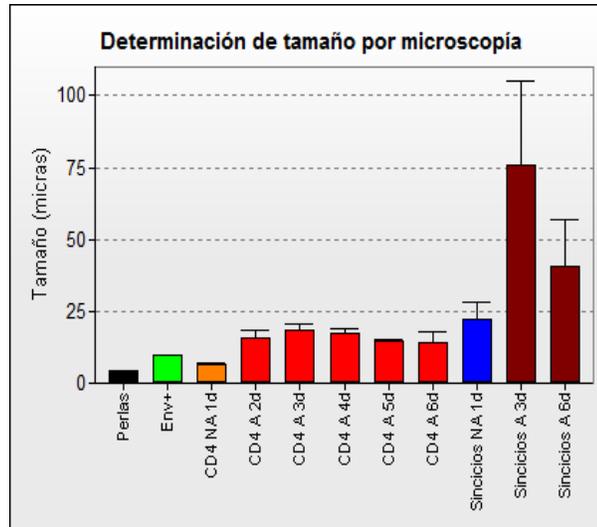


Fig. 38. Determinación del tamaño de los sincicios. Las imágenes fueron analizadas con el programa QCapture Pro 6.0. Se tomó como referencia para calibrar el programa a unas perlas de 4.5 μm de diámetro. Se consideraron como sincicios aquellas células que poseían un volumen superior a la suma de volúmenes dado entre un linfocito T CD4+ y una célula Jurkat Env+. Sincicios NA 1d (n=60), Sincicios A 3d (n=51) y Sincicios A 6d (n=102). Datos obtenidos de un experimento. La barra representa la media \pm error estándar.

DISCUSIÓN:

Las células infectadas por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) expresan en su membrana las proteínas de la envoltura viral (complejo gp120/gp41 o Env), adquiriendo la capacidad para fusionarse con células sanas que portan el receptor CD4 y un receptor para quimiocinas, formando sincicios. Durante la infección por el VIH, se ha encontrado que existe una alta correlación entre la detección en sangre periférica de variantes virales con alta capacidad para inducir la formación de sincicios en cultivos de linfocitos T CD4+ y la progresión a SIDA. Análisis histológicos han revelado la presencia de sincicios infectados en cerebro y ganglios linfáticos de individuos con infección por el VIH. Estas observaciones sugieren que la fusión entre células infectadas y no infectadas podría contribuir al daño del sistema inmune durante la infección por este virus.

En nuestro laboratorio hemos analizado la formación de sincicios y heterocariones (producidos por la fusión linfocito-linfocito y linfocito-monocito, respectivamente) en cocultivos de líneas celulares linfocíticas transfectadas con el gene *env* del VIH, con líneas celulares CD4+. Utilizando citometría de flujo, mostramos que los productos de la fusión celular inducida por las proteínas de fusión del VIH, son altamente heterogéneos, con diferencias en tamaño, composición celular, viabilidad y fenotipo. Estos estudios señalan que las células fusionadas pueden constituir una fuente de variabilidad funcional, cuyos efectos pueden incidir en el sistema inmune y en la replicación viral.

Por otra parte, la activación inmunológica tiene un papel preponderante en la patogénesis del SIDA. El ciclo de replicación del VIH (Lawn S., *et al* 2001), la reducción de las células T CD4+ (infectadas y no infectadas) (Leng Q., *et al* 2001; Sousa A., *et al* 2002) y la progresión de la enfermedad se correlacionan con la activación inmunológica (Ascher M., *et al* 1990; Douek D., *et al* 2003; Grossman Z., *et al* 2002). La presentación de antígenos resulta en la activación y expansión clonal de células T CD4+ de memoria CD45RO+, que constituye un pool de células blanco susceptibles a la propagación del VIH y es aquí donde el virus se replica preferencialmente (Lawn S., *et al* 2001).

Se conoce que la activación de los linfocitos T CD4+ favorece la replicación viral y que el uso de mitógenos promueve la obtención de altos títulos virales *in vitro*, ya que la activación favorece la integración y la transcripción viral. Sin embargo el papel de la activación en la entrada del virus a las células no es claro, ya que la literatura reporta que distintos métodos de estimulación *in vitro* pueden tener distintos efectos sobre la fusión de membranas inducida por las proteínas de la envoltura viral (Gowda S., *et al* 1989; Mohagheghpour N., *et al* 1991; Barbeau B., *et al* 1998; Zaitseva M., *et al* 2005; Chowdhury I., *et al* 1990; Golding H., *et al* 1994). En la mayoría de los trabajos revisados (ver ANTECEDENTES), se determinó que hubo un aumento en la expresión de los marcadores CD25 (cadena α del receptor para la IL-2) y CD54 (ICAM-1) debido al proceso de activación. En solo dos reportes se menciona un aumento en la expresión de CD4 debido a la activación, la cual en estos casos fue inducida por la presentación de antígenos específicos (Ridgway W., *et al* 1998; Novak E., *et al* 2001).

En este trabajo investigamos si la activación leucocitaria modifica la capacidad de los linfocitos T CD4+ para fusionarse con células Jurkat que expresan las glicoproteínas del gen *env* del VIH (células Env+). Para este propósito, estimulamos linfocitos T CD4+ ya sea con PMA-ionomicina o con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas. Mediante citometría de flujo se analizaron los cambios en la expresión de los receptores CD3, CD4, CD25 (IL-2R α), CD54 (ICAM-1) y CD184 (CXCR4) después de la activación. Los dos tipos de estímulo produjeron diferentes efectos en las células T CD4+. El estímulo de PMA-ionomicina disminuyó la expresión del receptor CD4 y una consecuente inhibición de la fusión celular; en cambio el estímulo con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 provocó un aumento en la expresión de CD4 y CD54 (ICAM-1) además de aumentar el porcentaje de fusión celular en 65.4% (en PBMCs). Este aumento en la fusión se observó usando tanto PBMCs como linfocitos T CD4+ purificados, mostrando que el aumento de la fusión se debió a cambios en las propiedades fusogénicas de las células y no a un aumento de su número debido a la proliferación. Los resultados indican que diferentes tipos de estímulo *in vitro* causan distintos efectos sobre la fusión celular.

Dado que la estimulación con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas sobre células T CD4+ primarias es similar a la estimulación por células presentadoras de antígeno, proponemos que la activación linfocitaria durante la respuesta inmune adaptativa puede inducir un alto nivel de formación de sincicios debido al incremento de la expresión de CD4 y de moléculas de adhesión.

El estímulo con PMA-ionomicina.

En el presente trabajo se muestra que el estímulo de PMA-ionomicina sobre células Jurkat CD4+ (**caso 1**), promueve una disminución de CD4 (tanto en porcentaje como en IFM) y un aumento en los marcadores CD25 y CD54 (tanto en porcentaje como en IFM). Respecto a la viabilidad, las células Jurkat CD4+ activadas mantienen una alta viabilidad, llegando a 80% al día 2. De manera congruente, obtuvimos una disminución del 95.5% en el porcentaje de fusión celular en aquellos cocultivos formados por células Jurkat CD4+ activadas al día 2. Estos sincicios formados por células Jurkat CD4+ activadas, fueron más pequeños y menos granulosos que los sincicios producidos en cultivos con células Jurkat CD4+ no activadas.

Utilizando PMA-Ionomicina para activar PBMCs (**caso 2**), se obtuvo una tendencia similar a la observada en las células Jurkat en cuanto a la expresión de receptores de membrana y al efecto sobre la fusión: una disminución importante en la expresión de CD4 y CD184 (tanto en porcentaje como en IFM) y un aumento en el marcador de activación CD25 (en porcentaje). El incremento de CD25 en las PBMCs fue menor que en las células Jurkat CD4+ (en porcentaje). También se hace notar que las células humanas ya contenían un nivel basal de CD25 (25.43%). La viabilidad de PBMCs activadas, fue muy baja, llegando a 55.03% a las 6 horas de estímulo. Los cocultivos formados por PBMCs activadas, registraron un menor porcentaje de fusión celular (56.84% menos que el cocultivo formado por PBMCs no activadas) a las 6 horas y tienen menor complejidad interna. Por lo tanto, la combinación de PMA-ionomicina tuvo un efecto similar en células Jurkat y en PBMCs con respecto a la expresión de CD4 y CD25 y también en la reducción de la fusión celular.

Baran J., *et al* reportaron que la estimulación de PBMCs con PMA (5 ng/mL)-Ionomicina(1 mM) provocó alteraciones importantes en la morfología celular, regulación negativa de CD4 y CD14, e indujo un perfil de citocinas Th1 (Baran J., *et al* 2001). Esto es congruente con la disminución en la expresión de CD4 encontrado en nuestros experimentos (**casos 1 y 2**).

El estímulo con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas

Comparamos el efecto de la activación de linfocitos T CD4+ con PMA-ionomicina, con el efecto de la activación utilizando anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas. La estimulación con los anticuerpos se aplicó a PBMCs y linfocitos T CD4+ purificados a partir de PBMCs. El efecto más notable fue el contraste entre la expresión de CD4 obtenida con los dos tipos de estímulos, ya que el estímulo de PMA-ionomicina disminuyó la expresión de CD4, en cambio el estímulo de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas incrementó la expresión de CD4, con respecto al nivel de las células no activadas.

En PBMCs (**caso 3**), el estímulo de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas produjo una mejor estimulación que la observada con PMA-ionomicina, manifestada en una mayor expresión de CD4, CD25 y CD54 (tanto en porcentaje como en IFM). Además, la estimulación con los anticuerpos no disminuyó de manera importante la viabilidad celular, como en el caso de la estimulación con PMA-ionomicina. En congruencia con el aumento en la expresión de CD4 y de ICAM-1, observamos en el cocultivo formado por células activadas un aumento en la fusión celular con respecto al cocultivo formado por células no activadas (un aumento del 65.4%) al día 3. Nótese que al existir muchos tipos celulares en las PBMCs, los sincicios son pequeños probablemente debido a la interferencia de células que no se fusionan. Los sincicios más grandes se presentan al día 3 de la activación. En general, los sincicios formados por PBMCs activadas fueron más grandes y tuvieron mayor granularidad que los sincicios formados por PBMCs no activadas.

El aumento en la fusión celular observado usando PBMCs activadas podría deberse a cambios en las propiedades fusogénicas de las células activadas o a un aumento de su número debido a la proliferación. Por otra parte nos preguntamos si la activación con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas indujo directamente el aumento en la expresión de CD4 en los linfocitos T ó bien si este aumento pudo ser debido a la influencia de células diferentes (por ejemplo, mediante la producción de citocinas).

Para contestar las preguntas anteriores decidimos activar linfocitos T CD4+ frescos purificados por selección negativa a partir de PBMCs (**caso 5**). Para estos experimentos se determinó la expresión de receptores de superficie en las células inmediatamente después de su purificación para tomarlo como control. Con este criterio, se eliminaron errores de interpretación derivados de la comparación con células que disminuyen la expresión de receptores de superficie y su viabilidad con el tiempo de cultivo.

En los linfocitos T CD4+ purificados, la estimulación con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas aumentó la expresión de CD4, CD184, CD25 y CD54 además de una disminución en CD3. La viabilidad de los linfocitos T CD4+ fue alta, llegando a 86.72% al día 3. Congruente con los datos anteriores, observamos en el cocultivo formado por células activadas un aumento en la fusión celular con respecto al cocultivo formado por células no activadas. Así mismo, los linfocitos activados generaron sincicios más grandes que los linfocitos no activados.

Por lo tanto, **el caso 5** muestra que el aumento en la fusión celular registrado en los cocultivos con células activadas se debe a cambios en las propiedades fusogénicas de estas y que el estímulo de anticuerpos indujo directamente el aumento en la expresión de CD4.

Se realizó un experimento con linfocitos T purificados, que fueron congelados a -120°C y posteriormente descongelados y activados con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas (**caso 4**). Fue evidente que la congelación y descongelación disminuyó la expresión basal de los marcadores CD4, CD3, CD25 y CD184 en células T CD4+ no activadas. La activación si incrementó la expresión de CD4, CD25, CD54 y CD184, sin embargo, los niveles de expresión de receptores de

membrana fueron menores que cuando se activan células T CD4+ frescas. Por lo tanto, no se recomienda el uso de células descongeladas puesto que este proceso reduce la expresión de marcadores importantes. Esta recomendación también es mencionada por Kreher C., *et al* 2003 y Costantini A., *et al* 2003, quienes recomiendan el uso de células descongeladas solamente para inducir la producción de citocinas. Por otra parte, los linfocitos T CD4+ descongelados y cultivados con una concentración subóptima de IL-2 (igual que las células activadas) paulatinamente disminuyen su viabilidad y por lo tanto no son un control adecuado para comparar los datos obtenidos con células activadas en experimentos en paralelo.

Trabajos previos sobre el efecto de la activación sobre la expresión de marcadores de superficie

CD25, CD54 y CD184

Mattioli I., *et al* estimularon células T humanas de la sangre periférica con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 solubles (no acoplados a perlas) durante 4 h., y realizó un análisis por microarreglos para conocer la expresión de genes inducidos por el estímulo. Utilizó un arreglo que contenía 110 genes humanos que codifican para proteínas que participan en el proceso de inflamación. El estudio solo consideró relevantes los genes cuya expresión mostró cambios mayores a 1.4 veces. Los genes para IFN γ , IL-2, IP-10, CD137, IL-2R α (CD25), IAP, IL-1 β , GM-CSF, MIP-1 β , TNF α , IL-1 α , IL-6, IKB- α , CD54 (ICAM-1), MSD, JunB, MIP-1 α , SCS-1, Pentraxina, INAP, IL-1RII y MTI-MMP aumentaron su expresión. En cambio CXCR4, IL-16 y RANTES disminuyeron su expresión. El presente trabajo concuerda con el de Mattioli I., *et al* ya que el estímulo de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas sobre PBMCs y linfocitos T CD4+ purificados aumentó la expresión de CD25 y CD54 (**casos 3, 4 y 5**). Sin embargo nuestros resultados discrepan a los de Mattioli I., *et al*, ya que obtuvimos un aumento en la expresión de CXCR4 (IFM) asociada a la activación (**Caso 5**).

CD3

En este trabajo, se observa que la activación de linfocitos T CD4+ con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas indujo una disminución en la expresión de la cadena épsilon (ϵ) de CD3, ya que los anticuerpos anti-CD3 utilizados tanto en las perlas de activación como en la inmunofluorescencia son específicos para la cadena ϵ (**caso 5**). Esta observación concuerda con Diehn M., *et al* que mostraron que muchos de los genes cuyos productos están implicados en la transducción de las señales del TCR fueron reprimidos por la activación de las células T. Estos genes incluyen la fosfolipasa C, LAT, LCK, TRIM, y ζ CD3, así como los genes que codifican las subunidades del TCR. Este descubrimiento es consistente con informes publicados que demuestran la internalización rápida y la degradación del TCR en la estimulación (Mirami Y., *et al* 1987; Diehn M., *et al* 2002). Por otra parte, esta regulación negativa de los componentes del TCR podría reflejar una transición de las células T en reposo, cuya maquinaria de comunicación en la superficie celular se dedica a la exploración de antígeno hacia células T estimuladas, cuyas proteínas de superficie se dedican principalmente a funciones efectoras y a la comunicación con otras células a través de citocinas (Diehn M., *et al* 2002).

CD4

Nuestro trabajo muestra que el estímulo de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas sobre PBMCs y linfocitos T CD4+ purificados indujo un incremento en la expresión de CD4 (**casos 3, 4 y 5**). Una revisión de la literatura muestra que el aumento en la expresión de CD4 debido a la activación ha sido ya descrito, aunque los reportes son escasos. Utilizando un modelo de ratones DBA/2 que poseen células T respondedoras a SWM (mioglobina de esperma de ballena), Ridgway W., *et al* demostraron que las células T específicas de antígeno incrementaron la expresión superficial de CD4 72h y 96h después del reconocimiento del antígeno. La población “CD4 high” expresó marcadores de memoria/activación que es compatible con células activadas recientemente (*CD45RB low*, *CD62L low*, *CD69 high* y *CD44 high*) a las 72 y 96h (Ridgway W., *et al* 1998). Posteriormente, Novak E., *et al* identificaron células T antígeno específicas “CD4

high” en PBMCs humanas, 4 días después de la estimulación con el antígeno específico (toxóide tetánico) o hemaglutinina. Las células “CD4 high” estaban en proliferación y tuvieron tamaño incrementado (Novak E., *et al* 2001). Los trabajos de Ridgway y Novak son de los pocos trabajos que demuestran un aumento en la expresión superficial de CD4 después del reconocimiento antigénico.

Ridgway W., *et al* propusieron que el aumento en la expresión de CD4 en respuesta a un antígeno peptídico podría ser una respuesta universal de las células T a la confrontación inicial con un antígeno nominal *in vivo*. El trabajo de Ridgway *et al* representa el primer reporte que demuestra un incremento en la expresión de CD4 en las células T, en respuesta a su antígeno (Ridgway W., *et al* 1998).

El papel de CD4 en la señalización por el TCR fue propuesto por Germain y colaboradores, utilizando el modelo de densidad de señalización agonista parcial. Germain sugirió que la baja o alta densidad de CD4 podría afectar el tiempo de disociación del TCR con el complejo péptido/MHC. En este modelo, la alta expresión de CD4 en la superficie aumentaría la avididad de la célula T con la APC (Konig R., *et al* 1996). Niveles de CD4 incrementados, durante la activación, podrían servir para mantener la sensibilidad de células T a la estimulación antigénica específica continua garantizando una fuerte respuesta proliferativa (Novak E., *et al* 2001).

Muchos de los estudios anteriores de activación de células T utilizaron células Jurkat y fueron estimuladas con reactivos menos específicos, incluyendo lectinas, ionomicina, PMA-ionomicina y anticuerpos; en algunos de estos experimentos, CD4 disminuyó su expresión después de la activación. El resultado diferente en la expresión de CD4 tras la estimulación con un antígeno específico, con respecto a un agente activador policlonal refleja una diferencia fisiológica en el mecanismo de activación (Ridgway W., *et al* 1998). Varios estudios mostraron que algunos miembros de la familia de las proteínas cinasas C (PKCs) se activan con ésteres de forbol y con ionóforos de calcio como la ionomicina produciendo la señalización y la activación de células T. Posteriormente se hizo evidente que existen otros múltiples receptores celulares (aproximadamente 200 proteínas) que unen diacilglicerol (DAG) y ésteres de forbol (*in vitro*) (Lorenzo P., *et al* 2000). Por lo tanto, la activación con

PMA-ionomicina podría activar a un rango más amplio de proteínas que la activación inducida por antígenos específicos.

No existen referencias en donde se hayan estudiado en linfocitos los cambios en la expresión de CD4 a lo largo del ciclo celular. Martin C., *et al* se preguntaron si la expresión de CD4 variaba durante el ciclo celular y para tal propósito utilizaron una línea celular monocitoide que expresa CD4 (U 937 clona 16). Encontraron que la tasa de reaparición de CD4 fue máxima durante la fase S, seguido por un incremento en la expresión y en la densidad en la fase tardía S/G2. Por tanto, la expresión de CD4 en esta línea celular, es dependiente del ciclo celular (Martin C., *et al* 1991).

CD54 (ICAM-1)

Además de la estimulación mediada por el TCR, existen al menos otras dos formas en las que se puede inducir un aumento en la expresión de ICAM-1. 1) Mediante las citocinas producidas durante la activación de PBMCs (principalmente IFN γ y TNF α) y 2) Debido al estrés oxidativo. A continuación se comentan algunos de los trabajos al respecto.

Se conoce que las citocinas IFN γ y TNF α actúan sinérgicamente para incrementar la expresión de ICAM-1 (Jahnke A., *et al* 1995). Durante la estimulación de PBMCs ya sea con PMA-ionomicina (10ng/mL-1 μ g/mL respectivamente) o con anticuerpos solubles anti-CD3 y anti-CD28 (10ng/mL-5 μ g/mL respectivamente) se produjeron las citocinas IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN γ y TNF α desde las 3h hasta las 72h de estímulo. La secreción de estas citocinas fue mayor con PMA-ionomicina que con los anticuerpos solubles anti-CD3 y anti-CD28 a las 48h (Reddy M., *et al* 2004).

La pérdida en el balance de óxido-reducción lleva a un estado de estrés oxidativo (Dorado C., *et al* 2003), el cual conduce a la expresión de ICAM-1 (Roebuck K., *et al* 1999). La progresión de la enfermedad causada por el VIH se asocia con la disminución en los niveles de glutatión (GSH), el mayor antioxidante endógeno (Staal F., *et al* 1994; Staal F., *et al* 1992). Las alteraciones en los niveles de GSH afectan la actividad de las enzimas sensibles al potencial de óxido-reducción (quinasas y fosfatasa), lo cual a su vez influye en la transducción de señales celulares (Kanner S., *et al* 1992). En la activación inmune crónica, un desequilibrio en el balance de

óxido-reducción se asocia con mayores niveles de fosforilación basal y contribuye a una activación inmunológica deficiente. (Schweneker M., *et al* 2008).

Por tanto, si la infección crónica por el VIH-1 se asocia con niveles elevados de ligandos de receptores tipo Toll (TLR's) (Haas A., *et al* 2011), de citocinas proinflamatorias (Haas A., *et al* 2011) y de estrés oxidativo (Aquaro S., *et al* 2008) es de esperar que los linfocitos T activados de forma bystander posean una alta expresión de ICAM-1. La alta expresión de ICAM-1 capacitaría a las células para establecer interacciones estrechas y favorecería la fusión entre células infectadas por el VIH y células blanco.

Las células T CD4+ específicas para el VIH

La mayoría de las células T CD4+ activadas durante la fase crónica de la infección por el VIH no son específicas, esto es confirmado por un trabajo que comento a continuación.

Betts M., *et al* estudiaron la respuesta de las células T específicas para el VIH en 23 pacientes infectados y no tratados (17 de los cuales se encontraban en la fase crónica de la infección). Las PBMCs aisladas fueron incubadas con mezclas peptídicas de epítopes derivados del VIH (Gag, Pol, Env, Nef, Tat, Rev, Vif, Vpr y Vpu) en la presencia de anticuerpos coestimuladores (CD28 y CD49d). Analizaron el porcentaje de células CD3+/CD8-/CD69+/IFN γ + (células T CD4+ específicas para el VIH) que respondieron a cada mezcla de péptidos. La respuesta de las células T CD4+ específicas para el VIH fue presente en 21 pacientes, aunque fue muy baja (0.2-2.94% del total de linfocitos T CD4+) (Betts M., *et al* 2001).

Las células T CD4+ específicas para múltiples proteínas del VIH fueron detectadas en la mayoría de los pacientes infectados crónicamente, esto indica que las células T CD4+ específicas para el VIH son generadas y persisten durante el curso de la replicación viral en individuos no tratados (Betts M., *et al* 2001).

Translocación microbiana y activación bystander

La infección por el VIH causa una rápida y severa pérdida de células T CD4+ en el tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal (por sus siglas en inglés GALT)

además de fibrosis. Existiendo una recuperación lenta y parcial con el uso de la terapia antiretroviral altamente activa (por sus siglas en inglés HAART) (Brenchley J., *et al* 2004; Estes J., *et al* 2008; Ciccone E., *et al* 2010).

El daño en la mucosa intestinal y a su integridad inmunológica resulta en niveles plasmáticos elevados tanto de lipopolisacáridos (LPS) como de ADN bacteriano que codifica para el ARN ribosomal 16s (ARNr 16s). Ambos biomarcadores se correlacionan directamente tanto con la expresión de los marcadores de activación celular HLA DR y CD38 expresados en las células T CD8+ así como con un reducido restablecimiento en las células T CD4+ después del inicio de la HAART (Jiang W., *et al* 2009; Anselmi A., *et al* 2007; Brenchley J., *et al* 2006).

El LPS participa en la activación de monocitos después de interactuar con el TLR-4. En respuesta a esa interacción la célula secreta CD14 soluble (sCD14) en el plasma, sirviendo este como un biomarcador de la activación de los monocitos y correlacionando positivamente con el LPS (Brenchley J., *et al* 2006; Voss S., *et al* 2006; Kitchens R., *et al* 2005; Papanavvas E., *et al* 2009). Es de destacar que las células T CD4+ también expresan el TLR-4, pero son incapaces para responder a su ligando, el LPS (Komai-Koma M., *et al* 2004). Esto sugiere que los niveles incrementados de LPS en el plasma no pueden directamente traducirse a una activación incrementada de células T CD4+.

La activación incrementada de las células T CD8+ se correlaciona positivamente con la velocidad con la que se pierden las células T CD4+ debido a la apoptosis (Giorgi J., *et al* 1999; Cao W., *et al* 2009). El recuento de las células T CD8+/CD38+ no sólo predice la progresión de la enfermedad causada por el VIH a SIDA y muerte, también ofrece un valor predictivo independiente para la evaluación de la carga viral en plasma (VL) y del recuento de las células T CD4+ (Levacher M., *et al* 1992; Mocroft A., *et al* 1997; Liu Z., *et al* 1997).

En este trabajo, la activación de linfocitos T CD4+ con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas, produjo un aumento en la fusión celular al cocultivarlas con células que expresan las proteínas de fusión del VIH. Este efecto se manifestó en un mayor número de células fusionadas y en un incremento de su tamaño y complejidad celular. El incremento en la fusión celular es congruente con el aumento de la expresión de CD4 y de ICAM-1 (una molécula de adhesión que es inducible durante el proceso de activación celular).

La interacción de ICAM-1 con su ligando LFA-1 podría inducir la agregación celular observada en los cultivos de células activadas. Las células que expresan las glicoproteínas de la envoltura viral podrían interactuar con el agregado de células CD4 activadas, facilitando su fusión secuencial y la formación de sincicios de gran tamaño y con alta complejidad interna. Por lo tanto, el incremento de la fusión celular podría explicarse por un mayor número de interacciones entre gp120 y CD4. Por otra parte, la expresión de moléculas de adhesión favorecería el contacto estrecho entre las células, favoreciendo el establecimiento de interacciones específicas necesarias para la fusión (**Fig. 39**).

Para lograr cuantificar el porcentaje de fusión en el **caso 5**, decidimos incubar la placa durante 3 horas y las muestras fueron adquiridas utilizando el citómetro Attune, que permitió leer los cocultivos formados por células activadas ya que este citómetro posee un capilar de mayor tamaño que el FACs Calibur, y permite el paso de células alineadas e individuales. No hay evidencias que los sincicios formados de 3 horas se hayan roto durante la cosecha o la adquisición.

Con base en la literatura y en nuestros resultados proponemos algunas ideas para robustecer nuestro modelo de “efecto de la activación sobre la fusión” considerando algunos aspectos de la etapa crónica de la infección por el VIH.

- 1) El uso de células mononucleares de la sangre periférica de donadores sanos
- 2) La activación de PBMCs con una combinación de dos incisos :
 - a) Una baja concentración de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas (activando un 20% de los linfocitos T totales)*
 - b) Sobrenadantes de PBMCs activadas con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas*

c) El uso de ligandos de TLRs (estimular vía TLR2, TLR4, TLR5, TLR8 y TLR9)** (imitaría la translocación microbiana)

d) Coctel de citocinas proinflamatorias (TNF α , IL-6, IL-12 e IL-15)**.

3) Cocultivo de PBMCs activadas con células Jurkat Env+ (generaría sincicios).

*a y b son mutuamente excluyentes

**c y d son mutuamente excluyentes

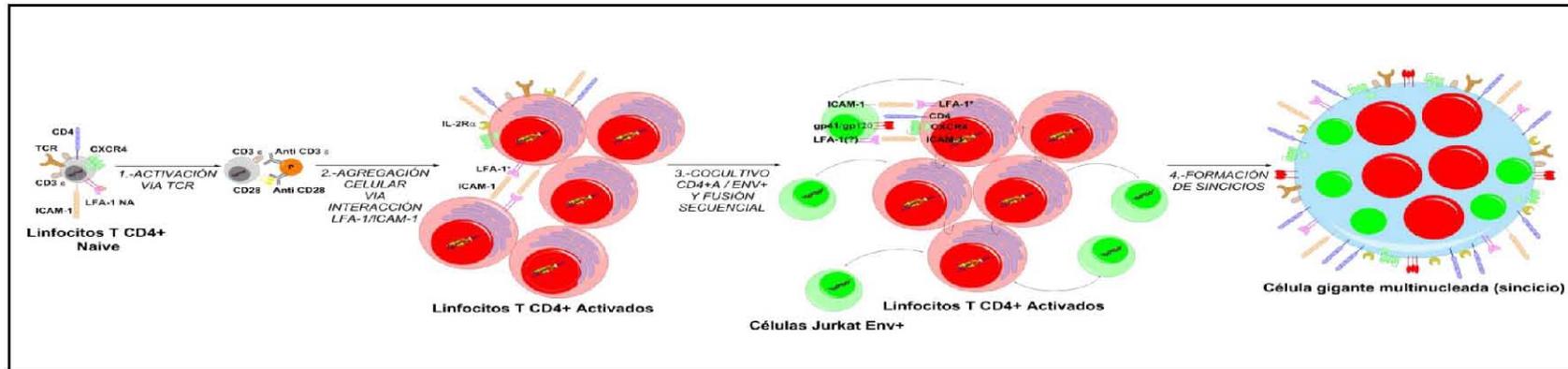


Fig. 39: Modelo propuesto sobre el efecto de la activación sobre la fusión celular.

El linfocito T naive (CD3+CD4+CXCR4+) expresa las moléculas de adhesión ICAM-1 y LFA-1 (LFA-1 NA que se encuentra en estado inactivo). El linfocito T naive es activado mediante los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas (p) (1). Los linfocitos T CD4 activados expresan la subunidad alfa del receptor para la IL-2 (CD25), además de una mayor expresión de los receptores CD4 e ICAM-1. Durante el proceso de activación celular LFA-1 NA sufre un cambio conformacional, generando una LFA-1* (activada). La activación favorece la interacción estrecha entre las células T CD4 activadas vía (LFA-1*/ICAM-1), formando agregados (2). Posteriormente las células T CD4+ Activadas fueron cocultivadas con células Jurkat Env+. Nótese las interacciones entre dichas células (gp120/gp41-CD4/CXCR4) y de (ICAM-1-LFA-1*) (3). Las evidencias nos hacen proponer que ocurre una fusión secuencial dada entre la interacción de las células Jurkat Env+ con el agregado celular, favoreciendo la formación de sincicios muy grandes (4). El modelo es propuesto en base a nuestros resultados y a otros trabajos en la literatura. (Imagen construida con el programa ChemBioDraw Ultra, ChemBioOffice2012, Perkin Elmer).

CONCLUSIONES

En este trabajo, la activación de linfocitos T CD4+ con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas, produjo un aumento en la fusión celular al cocultivarlas con células que expresan las proteínas de fusión del VIH. Este efecto se manifestó en un mayor número de células fusionadas y en un incremento de su tamaño y complejidad celular. El incremento en la fusión es congruente con el aumento de la expresión de CD4 y de ICAM-1 (una molécula de adhesión que es inducible durante el proceso de activación celular).

La interacción de ICAM-1 con su ligando LFA-1 podría inducir la agregación celular observada en los cultivos de células activadas. Las células que expresan las glicoproteínas de la envoltura viral podrían interactuar con el agregado de células CD4 activadas, facilitando su fusión secuencial y la formación de sincicios de gran tamaño y con alta complejidad interna. Por lo tanto, el incremento de la fusión celular podría explicarse por un mayor número de interacciones entre gp120 y CD4 facilitado por la expresión de moléculas de adhesión.

Nuestros resultados indican que la activación inducida a través del TCR promovería la formación de sincicios durante la infección por el VIH, debido al aumento de la expresión de CD4 y de moléculas de adhesión (ICAM-1). Es necesario realizar algunas modificaciones a nuestro modelo de “efecto de la activación sobre la fusión”, considerando algunos aspectos de la etapa crónica de la infección por el VIH.

APÉNDICE

Receptores estudiados en este trabajo

CD4

CD4 es una glicoproteína de superficie celular de 55 kDa, miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig). CD4 se expresa en células T restringidas a MHC II, algunos timocitos, monocitos/macrófagos y granulocitos. Funciona como un correceptor para la activación de células T, restringidas a MHC II. Es marcador de diferenciación tímica para células T y receptor para VIH (Goldsby R., *et al* 2005).

CD4 contiene 4 dominios externos tipo Ig, D1-D4 (también llamadas V1-V4) (370 a.a), una región transmembranal (26 a.a) y un tallo citoplásmico (38 a.a) (Bolen J. B., *et al* 1991). La región D1 media la unión a gp120 del VIH (Capon D., *et al* 1991). Los sitios de unión de CD4 a MHCII se encuentran en D1 y D2 (Fleury S., *et al* 1991).

CD4 se encuentra asociado no covalentemente a través de su dominio citoplásmico con la proteína tirosincinasa, p56 (Lck), miembro de la familia de tirosincinasas src (Veillette A., *et al* 1988). A través de mutagénesis sitio dirigida, se ha establecido que 2 residuos de cisteínas en el tallo citoplásmico de CD4 (posición 420 y 422) y 2 cisteínas en el NH2 terminal de Lck, (posición 20 y 23), son esenciales para la unión CD4-Lck.

Durante la activación de las células T, se activa la proteína cinasa C (PKC). PKC, fosforila en residuos de serina a CD4 en su dominio citoplásmico y CD4 es internalizado debido a la fosforilación y a la separación del complejo CD4-Lck (Weyand C., *et al* 1987).

La activación de PKC puede inducirse *in vitro* a través del éster de forbol llamado, 13-acetato de forbol 12-miristato (PMA) produciendo los mismos efectos antes mencionados, como la fosforilación en residuos de serina (Ser 408 , Ser 415 y Ser 431) del tallo citoplásmico de CD4 (Shin J., *et al* 1991). Como resultado de esto, CD4 se disocia de Lck y CD4 es reclutado por clatrina para la endocitosis (Sleckman B., *et al* 1989; Shin J., *et al* 1990; Pelchen-Matthews A., *et al* 1993).

Después de la endocitosis, algunas moléculas de CD4 internalizadas son liberadas a lisosomas para la degradación, mientras que otras moléculas se reciclan a la superficie de la célula T. (Pelchen-Matthews A., *et al* 1993). Por tanto el tratamiento con PMA regula negativamente (disminuye) el CD4 de la superficie celular (Pelchen-Matthews, A., *et al* 1993).

La fosforilación en residuos de serina de dominios citoplásmicos y la posterior internalización han sido ya demostrados como reguladores de la función de los receptores que poseen actividad intrínseca de tirosinasa (Sleckman B., *et al* 1992). No se ha demostrado que en los diferentes tipos de estimulación ya sea con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas magnéticas o la antígeno específica produzcan una regulación negativa en CD4.

CD184 (CXCR4)

CXCR4 es un miembro de la familia de proteínas con siete dominios transmembranales que incluye a muchos receptores de quimiocinas. El dominio amino terminal de CXCR4 está involucrado en la unión al VIH y la señalización intracelular no desempeña un papel importante en la entrada del virus (Potempa S., *et al* 1997). Parece que varios dominios de CXCR4 interactúan con VIH X4, pero especialmente la segunda asa extracelular (Lu Z., *et al* 1997). El asa V3 viral esta involucrada en la infección por virus X4 (Sakaida H., *et al* 1998). En las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs), el VIH-1 inductor de sincicios (IS) infecta y depleta a todos los subtipos de células T CD4+, incluyendo a las células T naive (Kwa D., *et al* 2001).

CD54 (ICAM-1)

La molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) es una glicoproteína transmembranal de 505 aminoácidos. ICAM-1 es un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Posee una masa molecular de 80 a 114 kDa, según su grado de glicosilación, que varía con el tipo celular y es expresada en la superficie de muchos tipos celulares incluyendo las células endoteliales, las células epiteliales, los queratinocitos y los fibroblastos, así como en las células T y B, células dendríticas,

macrófagos y eosinófilos. Se compone de una cadena glicoproteica con un core polipéptico de aproximadamente 55 kDa (Staunton D., *et al* 1988; Van de Stolpe A., *et al* 1996), una corta cola citoplásmica, una región transmembranal y cinco dominios extracelulares tipo inmunoglobulina. Los ligandos para ICAM-1 son las β 2 integrinas, tal como la molécula asociada a la función leucocitaria (LFA - 1:CD11a/CD18) y el antígeno de macrófagos (Mac-1:CR3, CD11b/CD18) y además el rinovirus (RV). La unión de ICAM-1 a su ligando tiene efectos profundos tanto en la adhesión celular (célula-célula y célula-MEC) que son críticas para la migración transendotelial de leucocitos como en la activación de células T, en la que la unión de ICAM-1 funciona como una señal coactivadora (Stanciu L., *et al* 1998; Van de Stolpe A., *et al* 1996; Zuckerman L., *et al* 1998).

ICAM-1 se expresa en un bajo nivel en células T en reposo y es constitutivamente ávido por LFA-1 (Buckle A., *et al* 1990; Dustin M., *et al* 1989; Wallace D., *et al* 1990). Un bajo porcentaje de células T en circulación expresan ICAM-1 en contraste con los altos niveles de expresión de LFA-1 (Louis R., *et al* 1997). La estimulación por mitógeno y la antígeno específica (Hviid L., *et al* 1993), las citocinas (IFN- γ IL-1 β , IL-2 y TNF- α) y artificialmente por medio de PMA (Buckle A., *et al* 1990; Van de Stolpe A., *et al* 1996; Shrikant P., *et al* 1994; Bassi V., *et al* 1995; Ballestas M., *et al* 1995; Roebuck K., *et al* 1999) y algunos virus (Andersson E., *et al* 1994; Ito M., *et al* 1995) pueden causar sobreexpresión de ICAM-1 en la superficie de células T. Por otra parte la molécula LFA-1 debe ser activada para mediar su función como receptor para ICAM-1 (Luo B., *et al* 2007). La forma inactiva de LFA-1 se une débilmente a su ligando, pero después de la activación de células T, LFA-1 sufre cambios conformacionales que incrementan su afinidad por ICAM-1. Bajo condiciones fisiológicas, la activación de LFA-1 se produce debido a la señal 1 (TCR-Péptido-MHCII) (Mor A., *et al* 2007).

La activación de células T requiere un compromiso del TCR por el antígeno y la interacción entre moléculas coestimuladoras en las células T y sus ligandos en las APCs (Springer T., 1990). La interacción entre ICAM-1 y su ligando LFA-1 puede ser bidireccional ya que ambos pueden ser expresados por las células T así como algunas APCs. Sin embargo, el papel de ICAM en la activación de células T, la

proliferación y la producción de citocinas se ha estudiado principalmente en el contexto de su expresión en la superficie de las APCs (Stanciu L., *et al* 1998).

Las principales vías de transducción de señales intracelulares involucradas en la regulación de la expresión de ICAM-1 incluyen: PKC, MAPK (ERK, JNK y p38), así como la señalización de NF-Kb (Ballestas M., *et al* 1995; Sippy B., *et al* 1996; Tamura D., *et al* 1998; Ghersa P., *et al* 1994; Yamaguchi Y., *et al* 1998; Jobin C., *et al* 1998; Cobb R., *et al* 1996). Importantes factores de transcripción nucleares para la activación de la expresión de ICAM-1 incluyen: AP-1, NF-kB, C/EBP, Ets, STAT, y Sp1 (Van de Stolpe A., *et al* 1996). La activación *In vitro* de células T por mitógenos aumenta gradualmente la expresión de ICAM-1 de un 15 a 80% en el transcurso de 2-3 días de cultivo (Schulz T., *et al* 1988).

En el contexto de la infección por el VIH, los receptores LFA-1 e ICAM-1 son incorporados en la envoltura de viriones que gemaron de células T CD4 primarias activadas que fueron capaces de soportar una replicación viral productiva (Bastiani L., *et al* 1997 y Capobianchi M., *et al* 1994). LFA-1 e ICAM-1 también desempeñan un papel fundamental en la transmisión viral de célula a célula ya que estas moléculas de adhesión son componentes integrales de la sinapsis virológica del VIH-1 (Jolly C., *et al* 2004; Jolly C., *et al* 2007), que sirve como el mecanismo principal para la transmisión del VIH-1 de célula a célula.

En un trabajo de Reddy M., *et al* encontraron que los sueros de los pacientes seropositivos a VIH tuvieron niveles elevados de CD54 soluble (Reddy M., *et al* 1993). Marodon G., *et al* investigaron los cambios en la expresión de moléculas de la superficie celular debido a la infección por VIH. Los linfocitos de sangre periférica fueron infectados *in vitro* con el virus reportero VIH-HSA. La expresión de la mayoría de las proteínas de la superficie celular estudiadas no fueron afectadas debido a la infección por VIH (HLA clase I, II, CD11a, CD18, CD25, CD27, CD28, CD29, CD30, CD31, CD38, CD44, CD45R0, CD49d, CD57, CD94, CD95, y CXCR4). La expresión de la molécula CD4 se perdió progresivamente y esta fue asociada con la pérdida de la expresión de CD62L, una molécula implicada en el homing de células T a los ganglios linfáticos. Por el contrario, las células T infectadas

productivamente con este virus reportero T-trópico fueron enriquecidas para CD54 y CCR5 (Marodon G., *et al* 1999).

Fujiwara M., *et al* demostraron que las células dendríticas foliculares (FDCs) no son las células blanco en la infección por VIH-1. Las FDCs podrían capturar las partículas virales en su superficie; sin embargo, la unión del VIH-1 a las FDCs fue fuertemente inhibida por la presencia de los anticuerpos monoclonales anti-CD54 (ICAM-1) y anti-CD11a (LFA-1), lo que sugiere que las moléculas de adhesión desempeñan un papel importante en la interacción entre el VIH-1 y las FDCs (Fujiwara M., *et al* 1999).

CD25 (IL-2R α)

El receptor de IL-2 (IL-2R) comprende 3 subunidades distintas (las cadenas α , β y γ). Las cadenas β y γ pertenecen a la clase de familia del receptor de citocinas I y contiene los elementos característicos CCCC y WSXWS, en tanto que la cadena α posee una estructura muy diferente y no es miembro de esta familia de receptores (Goldsby R., *et al* 2005).

El IL-2R ocurre en 3 formas que muestran diferentes afinidades por IL-2: IL-2R α (monomérico de afinidad baja), IL-2R $\beta\gamma$ (dimérico de afinidad intermedia) e IL-2R $\alpha\beta\gamma$ (trimérico de alta afinidad). Debido a que la cadena α sólo la expresan células T activadas, con frecuencia se denomina antígeno TAC (activación de células T). A menudo para identificar a IL-2R α en las células se utiliza un anticuerpo monoclonal llamado anti-TAC, que se une a la cadena α de 55 kDa (Goldsby R., *et al* 2005).

La transducción de señal por IL-2R requiere las cadenas β y γ , pero solo el receptor trimérico que también contiene la cadena α une IL-2 con una afinidad alta. Aunque la cadena γ se expresa de modo constitutivo en la mayor parte de las células linfoides, la expresión de las cadenas α y β es más restringida y aumenta de forma notable después de activar linfocitos en reposo por antígeno. Este fenómeno asegura que sólo las células T CD4⁺ y CD8⁺ activadas por antígeno expresen el IL-2R de afinidad alta y proliferen en respuesta a concentraciones fisiológicas de IL-2. Las células T activadas expresan alrededor de 5×10^3 receptores de alta afinidad y 10 veces más receptores de afinidad baja (Goldsby R., *et al* 2005).

BIBLIOGRAFÍA:

- Abbas A.**, and Sharpe A. (1999). T cell stimulation: an abundance of B7's. *Nature Medicine*. 5: 1345-1346.
- Acuto O.**, and Michel F.(2003). CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nature Reviews Immunology*. 3:939-951.
- Alizadeh A.**, Eisen M., Davis R., et al. (2000). Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 403: 503-511.
- Allan J.**, Lee T., McLane M., Sodroski J., Haseltine W., and Essex M. (1983). Identification of the major envelope glycoprotein product of HTLV-III. *Science*.228:1091-1094.
- Aloia R.**, Tian H., and Jensen F. (1993). Lipid composition and fluidity of the human immunodeficiency virus envelope and host cell plasma membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90:5181-5185.
- Amendola A.**, Gougeon M., Poccia F., Bondurand A., Fesus L., and Piacentini M. (1996). Induction of "tissue" transglutaminase in HIV pathogenesis: evidence for high rate of apoptosis of CD4+ T lymphocytes and accessory cells in lymphoid tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93: 11057-11062.
- Anderson E.**, Zink W., Xiong H., and Gendelman H. (2002). HIV-1- associated dementia: a metabolic encephalopathy perpetrated by virus infected and immune-competent mononuclear phagocytes. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 31(Suppl. 2): S43-S54.
- Andersson E.**, Christensen J., Marker O., and Thomsen A. (1994). Changes in cell adhesion molecule expression on T cells associated with systemic virus infection. *J. Immunol*. 152: 1237-1245.
- Anselmi A.**, Vendrame D., Rampon O., et al.(2007). Immune reconstitution in human immunodeficiency virus type 1-infected children with different virological responses to antiretroviral therapy. *Clin. Exp. Immunol*. 150:442-450.
- Aquaro S.**, Scopelliti F., Pollicita M., and Perno C., (2008). Oxidative Stress and HIV Infection: Target Pathways for Novel Therapies?. *Future HIV Therapy*. 2(4):327-338.
- Arhel N.**, Souquere-Besse S., Munier S., Souque P., Guadagnini S., Rutherford S., Prévost M., Allen T., and Charneau P. (2007). HIV-1 DNA Flap formation promotes uncoating of the pre-integration complex at the nuclear pore. *Embo J*. 26(12):3025-3037.
- Ascher M.**, and Sheppard H. (1990). AIDS as immune system activation. II. The panergic imnesia hypothesis. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 3:177-191.
- Asquith B.**, Edwards C., Lipsitch M., and McLean A. (2006). Inefficient cytotoxic T Lymphocyte mediated killing of HIV-1 Infected cells in vivo. *Plos Biology*. 4 (4):583-592.
- Ávila S.**, y Reyes G. (2009). *Virología del VIH: buscando nuevas estrategias antiretrovirales*, en Córdova J., et al editores (2009). 25 años de SIDA en México. Logros, desaciertos y retos. Segunda edición. Instituto Nacional de Salud Pública. Capítulo 8: 135-160.
- Ballestas M.**, and Benveniste E. (1995). Interleukin 1-beta- and tumor necrosis factor-alpha-mediated regulation of ICAM-1 gene expression in astrocytes requires protein kinase C activity. *Glia*.14:267-278.
- Baran J.**, Kowalczyk D., Ozóg M., and Zembala M. (2001). Three-Color Flow Cytometry Detection of Intracellular Cytokines in Peripheral Blood Mononuclear Cells: Comparative Analysis of Phorbol Myristate Acetate-Ionomycin and Phytohemagglutinin Stimulation. *Clin. Vaccine. Immunol*. 8(2):303-313.
- Barbeau B.**, Fortin J., Genois N., and Tremblay M. (1998). Modulation of Human Immunodeficiency Virus type 1 induced syncytium formation by the conformational state of LFA-1 determined by a New Luciferase Based Syncytium Quantitative Assay. *Journal of Virology*.72(9): 7125-7136.
- Bassi V.**, Vitale M., Feliciello A., De Riu S., Rossi G., and Fenzi G. (1995). Retinoic acid induces intercellular adhesion molecule-1 hyperexpression in human thyroid carcinoma cell lines. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 80: 1129-1135.
- Bastiani L.**, Laal S., Kim M., and Zolla-Pazner S. (1997). Host cell-dependent alterations in envelope components of human immunodeficiency virus type 1 virions. *J Virol*. 71: 3444-3450.
- Bell J.** (2004). An update on the neuropathology of HIV in the HAART era. *Histopathology*. 45 (6): 549-559.
- Berger E.**, Murphy P., and Farber J. (1999). Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism and disease. *Annu. Rev. Immunol*. 17: 657-700.
- Betts M.**, Ambrozak D., Douek D., Bonhoeffer S., Brenchley J., Casazza J., Koup R., and Picker L. (2001). Analysis of total human immunodeficiency virus (HIV)-specific CD4⁺ and CD8⁺ T-cell responses: relationship to viral load in untreated HIV infection. *J. Virol*. 75 (24):11983-11991
- Bhakta N.**, Oh D., and Lewis R. (2005). Calcium oscillations regulate thymocyte motility during positive selection in the three-dimensional thymic environment. *Nat Immunol*.6:143-151.
- Bhoopat L.**, Rithaporn T., Khunamornpong S., Bhoopat T., Taylor C., and Thorner P. (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., Brouwer M., Hooibrink B., Hovenkamp E., and Schuitemaker H. (2000). In vivo HIV- 1 infection of CD45RA(+)/CD4(+) T cells is established primarily by syncytium-inducing variants and correlates with the rate of CD4(+) T cell decline. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.97: 1269-1274.
- Blackbourn D.**, Mackewicz C., Barker E., Hunt T., Herndier B., Haase A., and Levy J. (1996). Suppression of HIV replication by lymphoid tissue CD8+ cells correlates with the clinical state of HIV infected individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93:13125-13130.
- Boasso A.**, and Shearer G. (2008).Chronic innate immune activation as a cause of HIV-1 immunopathogenesis. *Clin. Immunol*. 126(3): 235-242.
- Bolen J.**, Thompson P., Eiseman E., and Horak I. (1991) Expression and interactions of the Src family of tyrosine protein kinases in T-lymphocytes. *Ado. Cancer Res*. 57: 103-149.
- Bor Y.**, Miller M., Bushman F., and Orgel L. (1996). Target sequence preferences of HIV-1 integration complexes in vitro. *Virology*. 222:283-288.
- Brenchley J.**, Schacker T., Ruff L., et al. (2004). CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J. Exp. Med*. 200:749-759.

- Brenchley** J., Price D., Schacker T., et al. (2006). Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat. Med.* 12:1365–1371.
- Bretscher** P. (1999). A two step, two signal model for the primary activation of precursor helper T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 185-190.
- Buckle** A., and Hogg N. (1990). Human memory T cells express intercellular molecule-1 which can be increased by interleukin 2 and interferon- γ . *Eur. J. Immunol.* 20: 337–341.
- Budka** H. (1986). Multinucleated giant cells in brain: a hallmark of the acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Acta Neuropathol. (Berl.)*. 69:253-258.
- Budka** H. (1991). Neuropathology of human immunodeficiency virus infection. *Brain Pathol.* 1(3): 163–175.
- Burke A.**, Anderson D., Mannan P., et al. (1994). Systemic lymphadenopathic histology in human immunodeficiency virus-1-seropositive drug addicts without apparent acquired immunodeficiency syndrome. *Hum Pathol.* 25:248–256.
- Cao J.**, Park I., Cooper A., and Sodroski J. (1996). Molecular determinants of acute single cell lysis by human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 70:1340-1354.
- Cao J.**, McNevin J., Malhotra U., and McElrath M. (2003). Evolution of CD8+ T cell immunity and viral escape following acute HIV-1 infection. *J. Immunol.* 171(7):3837-3846.
- Cao W.**, Jamieson B., Hultin L., et al. (2009). Regulatory T cell expansion and immune activation during untreated HIV type 1 infection are associated with disease progression. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 25:183–191.
- Capobianchi M.**, Fais S., Castilletti C., Gentile M., Ameglio F., et al. (1994). A simple and reliable method to detect cell membrane proteins on infectious human immunodeficiency virus type 1 particles. *J. Infect. Dis.* 169: 886–889.
- Capon D.**, and Ward R. (1991). The CD4-gp120 interaction and AIDS pathogenesis. *Annu. Rev. Immunol.* 9: 649-678.
- Castedo M.**, Perfettini J., Andreau K., Roumier T., Piacentini M., and Kroemer G. (2003) Mitochondrial apoptosis induced by the HIV-1 envelope. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1010: 19–28.
- Castro E.**, Crandall K., and Pérez M. (2012). Genetic diversity and molecular epidemiology of HIV transmission. *Future Virology.* 7(3):239-252.
- Celada F.**, Cambiaggi C., Maccari J., Burastero S., Gregory T., Patzer E., Porter J., McDanal C., and Matthews T. (1990). Antibody raised against soluble CD4-gp120 complex recognizes the CD4 moiety and blocks membrane fusion without inhibiting CD4-gp120 binding. *J. Exp. Med.* 172:1143-1150.
- Chan D.**, and Kim P. (1998). HIV entry and its inhibition. *Cell.* 93(5):681-684.
- Chang H.**, and Yang X. (2000). Proteases for Cell Suicide: Functions and Regulation of Caspases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 821–846.
- Chang J.**, and Altfeld M. (2009). TLR-mediated immune activation in HIV. *Blood.* 113(2): 269-270.
- Cheng C.**, Liu R., Landau N., and Stamatatos L. (1997). Macrophage tropism of human immunodeficiency virus type 1 and utilization of the CC-CCR5 coreceptor. *J. Virol.* 71:1657-1661.
- Chernor M.**, Masliah E., Ellis R., Marcotte T., Moore D., Grant I., and Heaton R. (2002). Neurocognitive dysfunction predicts postmortem findings of HIV encephalitis. *Neurology.* 59:1563-1567.
- Chowdhury I.**, Koyanagi Y., Kobayashi S., Hamamoto Y., Yoshiyama H., Yoshida T., and Yamamoto N. (1990). The phorbol ester TPA strongly inhibits HIV-1 induced syncytia formation but enhances virus production: possible involvement of protein kinase C pathway. *Virology.* 176:126-132.
- Cicccone E.**, Read S., Mannon P., et al. (2010). Cycling of gut mucosal CD4+ T cells decreases after prolonged antiretroviral therapy and is associated with plasma LPS levels. *Mucosal Immunol.* 3:172–181.
- Cobb R.**, Felts K., Parry G., and Mackman N. (1996) Proteasome inhibitors block VCAM-1 and ICAM-1 gene expression in endothelial cells without affecting nuclear translocation of nuclear factor-kappa B. *Eur. J. Immunol.* 26: 839–845.
- Comité Internacional de Taxonomía de Virus.** <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2012>. Consultado el 2-05-2013.
- Connor R.**, Mohri H., Cao Y., and Ho D. (1993). Increased viral burden and cytopathicity correlate temporally with CD4+ T-lymphocyte decline and clinical progression in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *J. Virol.* 67:1772–1777.
- Connor R.**, Sheridan K., Ceradini D., Choe S., and Landau N. (1997). Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1-infected individuals. *J. Exp. Med.* 185(4):621-628.
- Costantini A.**, Mancini S., Giuliodoro S., Butini L., Regnery C., Silvestri G., and Montroi M. (2003). Effects of cryopreservation on lymphocyte immunophenotype and function. *Journal of Immunological Methods.* 278: 145-155.
- Cullen B.** (2001). Journey to the center of the cell. *Cell.* 105:697-700.
- Diedrich C.**, and Flynn J. (2011). HIV-1/mycobacterium tuberculosis coinfection immunology: How does HIV-1 exacerbate tuberculosis?. *Infect. Immun.* 79(4):1407-1417.
- Diehn M.**, Elizadeh A., Rando O., Long C., Stankunas K., Botstein D., Crabtree G., and Brown P. (2002). Genomic expression programs and the integration of the CD28 costimulatory signal in T cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99(18): 11796-11801.
- Dimitrov D.**, Golding H., and Blumenthal R. (1991). Initial stages of HIV-1 envelope glycoprotein mediated cell fusion monitored by a new assay based on redistribution of fluorescent dyes. *AIDS. Res. Hum. Retrovir.* 7:799-805.
- Dorado C.**, Rugerio C., y Rivas S. (2003). Estrés oxidativo y neurodegeneración. *Rev. Fac. Med. UNAM.* 46(6): 229-235.
- Donek D.**, Picker L., and Koup R. (2003). T cell dynamics in HIV-1 infection. *Annu. Rev. Immunol.* 21: 265-304.
- Dragic T.**, Picard L., and Alizon M. (1995). Proteinase resistant factors in human erythrocyte membranes mediate CD4 dependent fusion with cells expressing human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins. *J. Virol.* 69:1013-1018.
- Dubey C.**, and Croft M. (1996). Accessory molecule regulation of naive CD4 T cell activation. *Immunol. Res.* 15:114–125.
- Dustin M.**, and Springer T. (1989). T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature.* 341: 619–624.
- Dutil E.**, Toker A., and Newton A. (1998). Regulation of conventional protein kinase C isozymes by phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1). *Curr. Biol.* 8: 1366-1375.
- Earl P.**, Moss B., and Doms R. (1991). Folding, interaction with GRP78- BiP, assembly, and transport of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *J. Virol.* 65: 2047–2055.

- Elbein** A. (1984). Inhibitors of the biosynthesis and processing of N-linked oligosaccharides . *Crit. Rev. Biochem.* 16: 21–49.
- Engering** A., Van Vliet S., Geijtenbeek T., and Van Kooyk Y. (2002). Subset of DC-SIGN⁺ dendritic cells in human blood transmits HIV-1 to T lymphocytes. *Blood* .100: 1780-1786.
- Estes** J., Baker J., Brechley J., et al. (2008). Collagen deposition limits immune reconstitution in the gut. *J. Infect. Dis.* 198:456–464.
- Etemad-Moghadam** B., Rhone D., Steenbeke T., Sun Y., Manola J., Gelman R., Fanton J., Racz P., Tenner-Racz K., Axthelm M., Letvin N., and Sodroski J. (2001). Membrane-fusing capacity of the by 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(12): 5646-5655.
- Fennie** C., and Lasky L. (1989). Model for intracellular folding of the human immunodeficiency virus type 1 gp120, *J. Virol.* 63: 639–646.
- Ferri** K., Jacotot E., Blanco J., Este J., Zamzami N., Susin S., Xie Z., Brothers G., Reed J., Penninger J., and Kroemer G. (2000). 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** K., Jacotot E., Geuskens M., and Kroemer G. (2000). Apoptosis and karyogamy in syncytia induced by the HIV-1-envelope glycoprotein complex. *Cell Death Differ.* 7:1137–1139.
- Feske** S. (2007). Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 7: 690-702.
- Fischer-Smith** T., Croul S., Sverstiuk A., Capini C., L’Heureux D., Regulier E., Richardson M., Amini S., Morgello S., Khalili K., and Rappaport J. (2001). CNS invasion by CD14+/CD16+ peripheral blood-derived monocytes in HIV dementia: perivascular accumulation and reservoir of HIV infection. *J. Neurovirol.* 7(6): 528–541.
- Fischer-Smith** T., Croul S., Adeniyi A., Rybicka K., Morgello S., Khalili K., Rappaport J., Sverstiuk A., Capini C., L’Heureux D., Regulier E., Richardson M., and Amini S. (2004). Macrophage/microglial accumulation and proliferating cell nuclear antigen expression in the central nervous system in human immunodeficiency virus encephalopathy CNS invasion by CD14+/CD16+ peripheral blood-derived monocytes in HIV dementia: perivascular accumulation and reservoir of HIV infection. *Am. J. Pathol.* 164 (6), 2089–2099.
- Fleury** S., Lamarre D., Meloche S., Ryu S., Cantin C., Hendrickson W., and Sekaly R. (1991). Mutational analysis of the interaction site between CD4 and class II MHC: class II antigens contact CD4 on a surface opposite the gp120 binding site. *Cell.* 66: 1037-1049.
- Fouchier** R., Meyaard L., Brouwer M., Hovenkamp E., and Schuitemaker 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.
- Frankel** S., Wenig B., Burke A., Mannan P., Thompson L., Abbondanzo S., Nelson A., Pope M., and Steinman R. (1996) Replication of HIV-1 in dendritic cell-derived syncytia at the mucosal surface of the adenoid. *Science.* 272: 115–117.
- Frankel** S., Tenner-Racz K., Racz P., Wenig B., Hansen C., Heffner D., Nelson A., Pope M., and Steinman R. (1997). Active replication of HIV-1 at the Lymphoepithelial surface of the tonsil. *American Journal of Pathology.* 151(1): 89-96.
- Freed** E., et al. (2007). *Fields Virology.* DM Knipe: PM Howley, eds. Fifth ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.
- Frey** S., Marsh M., Günther S., Pelchen-Matthews A., Stephens P., Ortlepp S., and 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.
- Fujiwara** M., Tsunoda R., Shigeta S., Yokota T., and Baba M. (1999). Human Follicular Dendritic Cells Remain Uninfected and Capture Human Immunodeficiency Virus Type 1 through CD54-CD11a Interaction. *J. Virol.* 73 (5): 3603-3607.
- Furrer** H., Wendland T., Minder C., Christen A., Von Overbeck J., Grunow R., Pichler W., and Malinverni R. (1998). Association of syncytium-inducing phenotype of HIV-1 with CD4 cell count, viral load and sociodemographic characteristics. *AIDS.* 12:1341-1346.
- Garg** H., and Blumenthal R. (2006). HIV gp41 induced apoptosis is mediated by caspase 3 dependent mitochondrial depolarization, which is inhibited by HIV protease inhibitor nelfinavir. *J. Leukoc. Biol.* 79:351-362.
- Gartner** S., Markovits P., Markovitz D., Kaplan M., Gallo R., and Popovic M. (1986). The role of mononuclear phagocytes in HTLV-III/LAV infection. *Science.* 233(4760):215-219.
- Ghersa** P., Hooft van Huijsdijnen R., Whelan J., Cambet Y., Pescini R., and DeLamarer J. (1994). Inhibition of E-selectin gene transcription through a cAMP-dependent protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.* 269: 29129–29137.
- Giorgi** J., Hultin L., McKeating J., et al. (1999). Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage. *JID.* 179:859–970.
- Golding** H., Manischewitz J., Vujcic L., Blumenthal R., and Dimitrov D. (1994). The phorbol ester Phorbol Myristate Acetate inhibits Human Immunodeficiency Virus type 1 envelope mediated fusion by modulating an accessory components in CD4 expressing cells. *Journal of Virology.* 68 (3): 1962-1969.
- Goldsby** R., Kindt T., Osborne B., y Kuby J. (2005). *Inmunología.* Mc Graw Hill. México.
- Gougeon** M., Lecoer H., Duloust A., Enouf M., Crouvoiser M., Goujard C., Debord T., and Montagnier L. (1996). Programmed cell death in peripheral lymphocytes from HIV-infected persons: increased susceptibility to apoptosis of CD4 and CD8 T cells correlates with lymphocyte activation and with disease progression. *J. Immunol.* 156:3509–3520.
- Govda** S., Stein B., Mohaghehpour N., Benike C., and Engleman E. (1989). Evidence that T cell activation is required for HIV-1 entry in CD4+ lymphocytes. *The Journal of Immunology.* 142 (3):773-780.
- Grobler** J., Essen L., Williams R., and Hurley J. (1996). C2 domain conformational changes in phospholipase C-delta 1. *Nat. Struct. Biol.* 3: 788-795.
- Grossman** Z., Meier-Schellersheim M., Sousa A., Victorino R., and Paul W. (2002). CD4+ T cell depletion in HIV infection; are we closer to understanding the cause?. *Nat. Med.* 8: 319-323.
- Grossman** Z., Meier-Schellersheim M., Paul W., and Picker L. (2006). Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys. *Nat. Med.* 12:289–295.
- Haas** A., Zimmermann K., and Oxenius A. (2011). Antigen-Dependent and Independent mechanisms of T and B cell hyperactivation during Chronic HIV-1 infection. *Journal of Virology.* 85 (23):12102-12113.

- Hahn** B., Gonda M., Shaw G., Popovic M., Hoxie J., Gallo R., and Wong-Staal F. (1985). Genetic diversity of the acquired immune deficiency syndrome virus HTLV-III: different viruses exhibit greatest divergence in their envelope genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:4813–4817.
- Hallenberger** S., Bosch V., Angliker H., Shaw E., Klenk H., and Garten W. (1992). Inhibition of furin mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160. *Nature*. 360:358–361.
- Hansen** J., Nielsen C., Nielsen C., Heegaard P., Mathiesen L., and Nielsen J. (1989). Correlation between carbohydrate structures on the envelope glycoprotein gp120 of HIV-1 and HIV-2 and syncytium inhibition with lectins. *AIDS*.3:635–641.
- Hardy** H., and Skolnik P. (2004). Enfuvirtide, a new fusion inhibitor for therapy of human immunodeficiency virus infection. *Pharmacotherapy*. 24(2):198–211.
- Hazenbergh** M., Otto S., Van Benthem B., Roos M., Coutinho R., Lange J., Hamann D., Prins M., and Miedema F. (2003). Persistent immune activation in HIV-1 infection is associated with progression to AIDS. *AIDS*.17:1881–1888.
- Healey** D., Dianda L., Moore J., McDougal J., Moore M., Estess P., Buck D., Kwong P., Beverley P., and Sattentau Q. (1990). Novel anti CD4 monoclonal antibodies separate human immunodeficiency virus infection and fusion of CD4+ cells from virus binding. *J.Exp. Med.*172:1233–1242.
- Heinkelein** M., Sopper S., and Jassoy C. (1995). Contact of human immunodeficiency virus type 1 infected and uninfected CD4+ T lymphocytes is highly cytolytic for both cells. *J. Virol.* 69:6925–6931.
- Hellerstein** M., and McCune J. (1997). T cell turnover in HIV-1 disease. *Immunity*. 7:583–589.
- Hemming** A., Bolmstedt A., Jansson B., Hansen J., Travis B., Hu S., and Olofsson S. (1994). Identification of three N-linked glycans in the V4-V5 region of HIV-1 gp120, dispensable for CD4 binding and fusion activity of gp120. *Arch. Virol.* 134:335–344.
- Hildreth** J., and Orentas R. (1989). Involvement of a leukocyte adhesion receptor (LFA-1) in HIV induced syncytium formation. *Science*. 244:1075–1078.
- Hogan** P., Chen L., Nardone J., and Rao A. (2003). Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev.*17:2205–2232.
- Hogan** P., and Rao A. (2007). Dissecting ICRAC, a store-operated calcium current. *Trends Biochem. Sci.* 32:235–245.
- Holm** G., and Gabuzda D. (2005). Distinct mechanisms of CD4+ and CD8+ T cell activation and bystander apoptosis induced by human immunodeficiency virus type 1 virions. *J. Virol.* 79:6299–6311.
- Huerta** L., Lamoyi E., Báez-Saldaña A., and Larralde C. (2002). Human immunodeficiency virus envelope-dependent cell-cell fusion: a quantitative fluorescence cytometric assay. *Cytometry*. 47:100–106.
- Huerta** L., Lopez-Balderas N., Larralde C., and Lamoyi E. (2006). Discriminating in vitro cell fusion from cell aggregation by flow cytometry combined with fluorescence resonance energy transfer. *J. Virol. Methods*. 138:17–23.
- Huerta** L., López-Balderas N., Rivera-Toledo E., Sandoval G., Gómez-Icazbalceta G., Villarreal C., Lamoyi E., and Larralde C. (2009). HIV-Envelope-Dependent Cell-Cell Fusion: Quantitative Studies. *TheScientificWorldJournal*. 9: 746–763.
- Huerta** L., and Cortés C. (2011). HIV Toxins: Gp120 as an Independent Modulator of Cell Function, in Dumais N.(Ed) (2011). HIV and AIDS-Updates on Biology, Immunology, Epidemiology and Treatment Strategies. INTECH. Chapter 3. pp. 69–96.
- Hviid** L., Felsing A., and Theander T. (1993). Kinetics of human T-cell expression of LFA-1, IL-2 receptor, and ICAM-1 following antigenic stimulation *in vitro*. *J. Clin. Lab. Immunol.*40: 163–171.
- Ito** M., Watanabe M., Kamiya H., and Sakurai M. (1995). Changes of adhesion molecule (LFA-1, ICAM-1) expression on memory T cells activated with cytomegalovirus antigen. *Cell Immunol.*160: 8–13.
- Jahnke** A., and Johnson J. (1995). Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) is synergistically activated by TNF-alpha and IFN-gamma responsive sites. *Immunobiol.* 193: 305–314.
- Jamjian** M., and McNicholl I. (2004). Enfuvirtide: first fusion inhibitor for treatment of HIV infection. *Am. J. Health Syst. Pharm.* 61(12):1242–1247.
- Jiang** W., Lederman M., Hunt P., et al. (2009). Plasma levels of bacterial DNA correlate with immune activation and the magnitude of immune restoration in persons with antiretroviral-treated HIV infection. *J. Infect. Dis.* 199:1177–1185.
- Jobin** C., Hellerbrand C., Licato L., Brenner D. and Sartor R. (1998). Mediation by NF-kappa B of cytokine induced expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in an intestinal epithelial cell line, a process blocked by proteasome inhibitors. *Gut*. 42: 779–787.
- Jolly** C., Kashefi K., Hollinshead M., and Sattentau Q. (2004) HIV-1 cell to cell transfer across an Env-induced, actin-dependent synapse. *J. Exp. Med.* 199:283–293.
- Jolly** C., Mitar I., and Sattentau Q. (2007). Adhesion molecule interactions facilitate human immunodeficiency virus type 1-induced virological synapse formation between T cells. *J. Virol.* 81: 13916–13921.
- Jones** K., Kadoonaga J., Luciw P., and Tjian R. (1986). Activation of the AIDS retrovirus promoter by the cellular transcription factor, Sp1. *Science*. 232:755–759.
- Kamath** S., and Wong T. (2002). Membrane structure of the Human Immunodeficiency Virus gp41 Fusion domain by Molecular Dynamics simulation. *Biophysical Journal*. 83: 135–143.
- Kanner** S., Kavanagh T., Grossmann A., Hu S., Bolen J., Rabinovitch P., and Ledbetter J. (1992). Sulfhydryl oxidation down-regulates T cell signaling and inhibits tyrosine phosphorylation of phospholipase C γ 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89:300–304.
- Kanwar** B., Favre D., and McCune J. (2010). Th17 and regulatory T cells: implications for AIDS pathogenesis. *Curr. Opin. HIV AIDS*. 5(2): 151–157.
- Karin** M., and Gallagher E. (2005). From JNK to pay dirt: jun kinases, their biochemistry, physiology and clinical importance. *IUBMB Life*.57:283–295.
- Kaul** M., Garden G., and Lipton S. (2001). Pathways to neuronal injury and apoptosis in HIV-associated dementia. *Nature*. 410(6831): 988–994.
- Kawamura** I., Koga Y., Oh-Hori N., Onodera K., Kimura G., and Nomoto K. (1989). Depletion of the surface CD4 molecule by the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus expressed in a human CD4+ monocytoid cell line. *J. Virol.* 63: 3748–3754.
- Kay** J. (1991). Mechanisms of T lymphocyte activation. *Immunology Letters*. 29: 51–54.

- Kitchens R.**, and Thompson P. (2005). Modulatory effects of sCD14 and LBP on LPS-host–cell interactions. *J. Endotoxin. Res.* 11:225–229.
- Klatzmann D.**, Barré-Sinoussi F., Nugeyre M., Danquet C., Vilmer E., Griscelli C., Brun-Veziret F., Rouzioux C., Gluckman J., and Chermann J. (1984). Selective tropism of lymphadenopathy associated virus (LAV) for helper-inducer T lymphocytes. *Science.* 225(4657):59–63.
- Knipe D.**, Ed. (2006). *Fields Virology.* Vol. 2. Wolters Kluwer. Lippincott Williams and Wilkins.
- Koenig S.**, Gendelman H., Orenstein J., Dal Canto M., Pezeshkpour G., Yungbluth M., Janotta F., Aksamit A., Martin M., and Fauci A. (1986). Detection of AIDS virus in macrophages in brain tissue from AIDS patients with encephalopathy. *Science.* 233:1089–1093.
- Komai-Koma M.**, Jones L., Ogg G., Xu D., and Liew F. (2004). TLR2 is expressed on activated T cells as a costimulatory receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101:3029–3034.
- Konig R.**, Fleury S., and Germain R. (1996). The structural basis of CD4-MHC class II interactions: coreceptor contributions to T cell receptor antigen recognition and oligomerization-dependent signal transduction. *Curr. Top Microbiol. Immunol.* 205:19–46.
- Koot M.**, Vos A., Keet R., De Goede R., Dercksen M., Terpstra F., Coutinho R., Miedema F., and 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 I., Vos A., De Goede R., Roos M., Coutinho R., Miedema F., Schellekens P., and 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.
- Kovacs J.**, Lempicki R., Sidorov I., Adelsberger J., Herpin B., Metcalf J., Sereti I., Polis M., Davey R., Tavel J., Falloon J., Stevens R., Lambert L., Dewar R., Schwartzentruber D., Anver M., Baseler M., Masur H., Dimitrov D., and Lane H. (2001). Identification of dynamically distinct subpopulations of T lymphocytes that are differentially affected by HIV. *J. Exp. Med.* 194:1731–1741.
- Kramer-Hammerle S.**, Rothenaigner I., Wolff H., Bell J., and Brack-Werner R. (2005). Cells of the central nervous system as targets and reservoirs of the human immunodeficiency virus. *Vir. Res.* 111:194–213.
- Kreher C.**, Dittrich M., Guerkov R., Boehm B., and Tary-Lehmann M. (2003). CD4+ and CD8+ cells in cryopreserved human PBMC maintain full functionality in cytokine ELISPOT assays. *Journal of Immunological Methods.* 278:79–93.
- Kuznetsov Y.**, Victoria J., Robinson W., and McPherson A. (2003). Atomic force microscopy investigation of human immunodeficiency virus (HIV) and HIV infected lymphocytes. *J. Virol.* 77:11896–11909.
- Kwa D.**, Vingerhoed J., Boeser-Nunnink B., Broersen S., and Schuitemaker H. (2001). Cytopathic Effects of Non-Syncytium-Inducing and Syncytium-Inducing Human Immunodeficiency Virus Type 1 Variants on Different CD4+ T-Cell Subsets Are Determined Only by Coreceptor Expression. *Journal of Virology.* 75(21):10455–10459.
- Kwong P.**, Wyatt R., Robinson J., Sweet R., Sodroski J., and Hendrickson W. (1998). Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature.* 393(6686):648–659.
- Land A.**, and Braakman I. (2001). Folding of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein in the endoplasmic reticulum. *Biochimie.* 83:783–790.
- Lawn S.**, Butera S., and Folks T. (2001). Contribution of Immune Activation to the Pathogenesis and Transmission of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *Clinical Microbiology Reviews.* 14 (4): 753–777.
- Lenardo M.**, Angleman S., Bounkeua V., Dimas J., Duvall M., Graubard M., Hornung F., Selkirk M., Speirs C., Trageser C., Orenstein J., and Bolton D. (2002). Cytopathic killing of peripheral blood CD4+ T lymphocytes by human immunodeficiency virus type 1 appears necrotic rather than apoptotic and does not require env. *J. Virol.* 76:5082–5093.
- Leng Q.**, Borkow G., Weisman Z., Stein M., Kalinkovich A., and Bentwich Z. (2001). Immune activation correlates better than HIV plasma viral load with CD4 T cell decline during HIV infection. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 27:389–397.
- Leonard C.**, Spellman M., Riddle L., Harris R., Thomas J., and Gregory T. (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.
- Levacher M.**, Hulstaert F., Tallet S., Ullery S., Pocardio J., and Bach B. (1992). The significance of activation markers on CD8 lymphocytes in human immunodeficiency syndrome: staging and prognostic value. *Clin. Exp. Immunol.* 90(3):376–382.
- Levine B.**, Mosca J., Riley J., Carroll R., Vahey M., Jagodzinski L., Wagner K., Mayers D., Burke D., Weislow O., St Louis D., and June C. (1996). Antiviral effect and ex vivo CD4+ T cell proliferation in HIV positive patients as a result of CD28 costimulation. *Science.* 272: 1939–1943.
- Levy J.** (2007). *Cytopathic properties of HIV.* In *HIV and the pathogenesis of AIDS.* 3rd, ASM Press, Washington DC.
- Levy J.** (2007). *HIV and the pathogenesis of AIDS.* Third ed. Washington, DC: ASM Press.
- Lewis R.** (2007). The molecular choreography of a store-operated calcium channel. *Nature.* 446:284–287.
- Li W.**, Galey D., Mattson M., and Nath A. (2005). Molecular and cellular mechanisms of neuronal cell death in HIV dementia. *Neurotox. Res.* 8:119–134.
- Li Y.**, Luo L., Rasool N., and Kang C. (1993). Glycosylation is necessary for the correct folding of human immunodeficiency virus gp120 in CD4 binding. *J. Virol.* 67:584–588.
- Li Y.**, Bergeron J., Luo L., Ou W., Thomas D., and Kang Y. (1996). Effects of inefficient cleavage of the signal sequence of HIV-1 gp120 on its association with calnexin, folding, and intracellular transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 9606–9611.
- Lifson J.**, Coutré S., Huang E., and Engleman E. (1986a). Role of envelope glycoproteins carbohydrate in human immunodeficiency virus (VIH) infectivity and virus induced cell fusion. *J. Exp. Med.* 164:2101–2106.
- Lifson J.**, Feinberg M., Reyes G., Rabin L., Banapour B., Chakrabarti S., Moss B., Wong-Staal F., Steimer K., and Engleman E. (1986) Induction of CD4-dependent cell fusion by the HTLV-III/LAV envelope. *Nature.* 323: 725–728.
- Lifson, J.**, Reyes G., McGrath M., Stein B., and Engleman E. (1986b). AIDS retrovirus induced cytopathology: giant cell formation and involvement of CD4 antigen. *Science.* 232:1123–1127.
- Liu Y.**, Graham C., Li A., Fisher R., and Shaw S. (2002). Phosphorylation of the protein kinase C- θ activation loop and hydrophobic motif regulates its kinase activity, but only activation loop phosphorylation critical to in vivo nuclear factor kappa B induction. *Biochem. J.* 361: 255–265.

- Liu Z., Cumberland W., Hultin L., Prince H., Detels R., and Giorgi J. (1997). Elevated CD38 antigen expression on CD8⁺ T cells is a stronger marker for the risk of chronic HIV disease progression to AIDS and death in the Multicenter AIDS Cohort Study than CD4⁺ cell count, soluble immune activation markers, or combinations of HLA-DR and CD38 expression. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* 16:83-92.
- Lorenzo P., Beheshti M., Pettit G., Stone J., and Blumberg P. (2000). The guanine nucleotide exchange factor RasGRP is a high affinity target for diacylglycerol and phorbol esters. *Mol. Pharmacol.* 57: 840-846.
- Louis R., Shute J., Biagi S., Stanciu L., Marrelli F., Tenor H., Hidi R., and Djukanović R. (1997). Cell infiltration, ICAM-1 expression, and eosinophil chemotactic activity in asthmatic sputum. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 155:466-472.
- Lu Z., Berson J., Chen Y., Turner J., Zhang T., Sharron M., Harley Jenks M., Wang Z., Kim J., Rucker J., Hoxie J., Peiper S., and Doms R. (1997). Evolution of HIV-1 coreceptor usage through interactions with distinct CCR5 and CXCR4 domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:6426-6431.
- Luo B., Carman C., and Springer T. (2007). Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu. Rev. Immunol.* 25: 619-647.
- Marodon G., Landau N., and Posnett D. (1999). Altered Expression of CD4, CD54, CD62L, and CCR5 in Primary Lymphocytes Productively Infected with the Human Immunodeficiency Virus. *AIDS Research and Human Retroviruses.* 15(2): 161-171.
- Martin C., Correale J., Kam-Hansen S., and Ehrnst A. (1991). Cell cycle-dependent expression of CD4 antigen in a monocytoïd cell line. *Scand. J. Immunol.* 34(4):483-489.
- Martoglio B., and Dobberstein B. (1998). Signal sequences: more than greasy peptides. *Trends Cell Biol.* 8: 410-415.
- Matthews T., Weinhold K., Lysterly H., Langlois A., Wigzell H., and Bolognesi D. (1987). Interaction between the human T cell lymphotropic virus type IIIB envelope glycoprotein gp120 and the surface antigen CD4: role of carbohydrate in binding and cell fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:5424-5428.
- Mattioli L., Dittrich-Breiholz O., Livingstone M., Kracht M., and Schmitz M. (2004). Comparative analysis of T-cell costimulation and CD43 activation reveals novel signaling pathways and target genes. *Blood.* 104(10): 3302-3304.
- McCune J., Rabin L., Feinberg M., Lieberman M., Kosek J., Reyes G., and Weissman I. (1988). Endoproteolytic cleavage of gp160 is required for the activation of human immunodeficiency virus. *Cell.* 53:55-67.
- McMichael A., and Rowland S. (2001). Cellular immune responses to HIV. *Nature.* 410: 980-987.
- Melikyan G., Markosyan R., Hemmati H., Delmedico M., Lambert D., and Cohen F. (2000). Evidence that the transition of HIV-1 gp41 into a six helix bundle, not the bundle configuration, induces membrane fusion. *J. Cell. Biol.* 151:413-423.
- Micoli K., Mamaeva O., Piller S., Barker J., Pan G., Hunter E., and McDonald J. (2006). Point mutations in the C terminus of HIV-1 gp160 reduce apoptosis and calmodulin binding without affecting viral replication. *Virology.* 344:468-479.
- Miedema F., Meyaard L., Koot M., Klein M., Roos M., Groenin, M., Fouchier R., Van't Wout A., Tersmette M., Schellekens P., and Schuitemaker H. (1994). Changing virus-host interactions in the course of HIV-1 infection. *Immunol. Rev.* 140: 35-72.
- Mirami Y., Samelson L., and Klausner R. (1987). Internalization and cycling of the T cell antigen receptor. *J. Biol. Chem.* 262:13342-13347.
- Mocroft A., Bofill M., Lipman M., et al. (1997). CD8⁺, CD38⁺ lymphocyte percent: a useful immunological marker for monitoring HIV-1-infected patient. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* 14 (2):158-162.
- Modrow S., Hahn B., Shaw G., Gallo R., Wong-Staal F., and De Wolf H. (1987). Computer-assisted analysis of envelope protein sequences of seven human immunodeficiency virus isolates: predictions of antigenic epitopes in conserved and variable regions. *J. Virol.* 61:570-578.
- Mohaghehpour N., Chakrabarti R., Stein B., Gowda S., and Engleman E. (1991). Early activation events render T cells susceptible to HIV-1 induced syncytia formation. *The journal of Biological Chemistry.* 266(11): 7233-7238.
- Mohri H., Perelson A., Tung K., Ribeiro R., Ramratnam B., Markowitz M., Kost R., Hurley A., Weinberger L., Cesar D., Hellerstein M., and Ho D. (2001). Increased turnover of T lymphocytes in HIV-1 infection and its reduction by antiretroviral therapy. *J. Exp. Med.* 194:1277-1287.
- Molinari M., and Helenius A. (2000). Chaperone selection during glycoprotein translocation into the endoplasmic reticulum. *Science.* 288: 331-333.
- Monks C., Freiberg B., Kupfer H., Sciaky N., and Kupfer A. (1998). Three dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature.* 395: 82-86.
- Moore J., McKeating J., Weiss R., and Sattentau Q. (1990). Dissociation of gp120 from HIV-1 virions induced by soluble CD4. *Science.* 250:1139-1142.
- Mor A., Dustin M., and Philips M. (2007). Small GTPases and LFA-1 reciprocally modulate adhesion and signaling. *Immunol. Rev.* 218: 114-125.
- Moulard M., and Decroly E. (2000). Maturation of HIV envelope glycoprotein precursors by cellular endoproteases, *Biochim. Biophys. Acta.* 1469:121-132.
- Moyle G. (2003). Stopping HIV fusion with enfuvirtide: the first step to extracellular HAART. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 51: 213-217.
- Munck Petersen C., Christensen E., Andresen B., and Moller B. (1992). Internalization, lysosomal degradation and new synthesis of surface membrane CD4 phorbol ester-activated T-lymphocytes and U937 cells. *Exp. Cell Res.* 201:160-173.
- Myszka D., Sweet R., Hensley P., Brigham M., Kwong P., Hendrickson W., Wyatt R., Sodroski J., and Doyle M. (2000). Energetics of the HIV gp120-CD4 binding reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 9026-9031.
- Nabel G., and Baltimore D. (1987). An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells. *Nature.* 326:711-713.
- Negulescu P., Krasieva T., Khan A., Kerschbaum H., and Cahalan M. (1996). Polarity of T cell shape, motility, and sensitivity to antigen. *Immunity.* 4:421-430.
- Nishikawa K., Toker A., Johannes F., Songyang Z., and Cantley L. (1997). Determination of the specific substrate sequence motifs of protein kinase C isozymes. *J. Biol. Chem.* 272: 952-960.
- Novak E., Masewicz S., Liu A., Lernmark A., Kwok W., and Nepom G. (2001). Activated human epitope-specific T cells identified by class II tetramers reside within a CD4 high, proliferating subset. *International Immunology.* 13(6): 799-806.

- Nuovo** G., Becker J., Burk M., Margiotta M., Fuhrer J., and Steigbigel R. (1994). In situ detection of PCR amplified HIV-1 nucleic acids in lymph nodes and peripheral blood in patients with asymptomatic HIV-1 infection and advanced stage AIDS. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 7:916-923.
- Oancea** E., and Meyer T., (1998). Protein kinase C as a molecular machine for decoding calcium and diacylglycerol signals. *Cell.* 95: 307-318.
- Oh-hora** M., and Rao A. (2008). Calcium signaling in lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* 20 (3): 250-258.
- Orenstein** J., Meltzer M., Phipps T., and Gendelman H. (1988). Cytoplasmic assembly and accumulation of human immunodeficiency virus type 1 and 2 in recombinant human colony stimulating factor 1 treated human monocytes: an ultrastructural study. *J. Virol.* 62 (8):2578-2586.
- Orenstein** J. (2000). In vivo cytolysis and fusion of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infected Lymphocytes in Lymphoid Tissue. *The Journal of Infectious Diseases.* 182:338-342.
- Otteken** A., Earl P., and Moss B. (1996). Folding, assembly, and intracellular trafficking of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein analyzed with monoclonal antibodies recognizing maturational intermediates. *J. Virol.* 70: 3407–3415.
- Pandrea** I., Gaufin T., Brenchley J., Gautam R., Monjure C., Gautam A., Coleman C., Lackner A., Ribeiro R., Douek D., and Apetrei C. (2008). Cutting Edge: Experimentally Induced Immune Activation in Natural Hosts of Simian Immunodeficiency Virus Induces Significant Increases in Viral Replication and CD4+ T Cell Depletion. *J. Immunol.* 181(10): 6687–6691.
- Pantaleo** G., Butini L., Graziosi C., Poli G., Schnittman S., Greenhouse J., Gallin J., and Fauci A. (1991). Human immunodeficiency virus (HIV) infection in CD4+ T lymphocytes genetically deficient in LFA-1: LFA is required for HIV mediated cell fusion but not for viral transmission. *J. Exp. Med.* 173:511-514.
- Pantaleo** G., Graziosi C., and Fauci A. (1993a). The role of lymphoid organs in the pathogenesis of HIV infection. *Semin. Immunol.* 5:157-163.
- Pantaleo** G., Graziosi C., Demarest J., Butini L., Montroni M., Fox C., Orenstein J., Kotler D., and Fauci A. (1993). HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature.* 362:355-358.
- Papasavvas** E., Pistilli M., Reynolds G., et al. (2009). Delayed loss of control of plasma lipopolysaccharide levels after therapy interruption in chronically HIV-1-infected patients. *AIDS.* 23:369–375.
- Pelchen-Matthews** A., Parsons I., and Marsh M. (1993). Phorbol ester-induced downregulation of CD4 is a multistep process involving dissociation from p56lck, increased association with clathrin-coated pits, and altered endosomal sorting. *J. Exp. Med.* 178(4):1209-1222.
- Pelchen-Matthews** A., Raposo G., and Marsh M. (2004). Endosomes, exosomes and Trojan viruses. *Trends Microbiol.* 12 (7):310-316.
- Perfettini** J., Castedo M., Roumier T., Andreau K., Nardacci R., Piacentini M., and Kroemer G. (2005) Mechanisms of apoptosis induction by the HIV-1 envelope. *Cell Death Differ.* 12(1): 916-923.
- Peterlin** B., and Trono D. (2003). Hide, shield and strike back: how HIV infected cells avoid immune eradication. *Nat. Rev. Immunol.* 3(2):97-107.
- Phogat** S., Wyatt R., and Karlsson G. (2007). Inhibition of HIV-1 entry by antibodies: potential viral and cellular targets. *J. Intern. Med.* 262(1):26-43.
- Pipkin** M., and Lieberman J. (2007). Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works. *Curr. Opin. Immunol.* 19:301–308.
- Plymale** D., Tang D., Comardelle A., Fermin C., Lewis D., and Garry R. (1999). Both necrosis and apoptosis contribute to HIV-1 induced killing of CD4 cells. *AIDS.* 13:1827-1839.
- Potempa** S., Picard L., Reeves J., Wilkinson D., Weiss R., and Talbot S. (1997). CD4 independent infection by human immunodeficiency virus type 2 strain ROD/B: The role of the N-terminal domain of CXCR4 in fusion and entry. *J. Virol.* 71:4419-4424.
- Pulliam** L., Gascon R., Stubblebine M., McGuire D., and McGrath M. (1997). Unique monocyte subset in patients with AIDS dementia. *Lancet.* 349(9053): 692–695.
- Racz** P., Tenner-Racz K., Kahl C., Feller A., Kern P., and Dietrich M. (1986). Spectrum of morphologic changes of lymph nodes from patients with AIDS or AIDS-related complexes. *Prog. Allergy.* 37:81–18.
- Reddy** M., and Grieco M. (1993). Elevated levels of soluble CD54 (ICAM-1) in human immunodeficiency virus infection. *Journal of Clinical Laboratory Analysis.* 7 (5) :269–272.
- Reddy** M., Eirikis E., Davis C., Davis H., and Prabhakar U. (2004). Comparative analysis of lymphocyte activation marker expression and cytokine secretion profile in stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures: an in vitro model to monitor cellular immune function. *Journal of Immunological Methods.* 293: 127-142.
- Regoes** R., and Bonhoeffer S. (2005). The HIV coreceptor switch: a population dynamical perspective. *TRENDS in Microbiology.* 13(6):269-277.
- Ridgway** W., Fassò M., and Fathman C. (1998). Following Antigen Challenge, T Cells Up-Regulate Cell Surface Expression of CD4 In Vitro and In Vivo. *J. Immunol.* 161:714-720.
- Rinfret** A., Latendresse H., Lefebvre R., St-Louis G., Jolicoeur P., and Lamarre L. (1991). Human Immunodeficiency virus infected multinucleated histiocytes in Oropharyngeal Lymphoid Tissues from two asymptomatic patients. *American Journal of Pathology.* 138(2):421-426.
- Rivera** Toledo E. (2006). Fusión celular mediada por las proteínas de la envoltura del VIH: Caracterización fenotípica y relevancia para la patogénesis del SIDA. Carlos Larralde Rangel (dir). México. UNAM. IIB. (Tesis de Maestría).
- Robey** W., Safai B., Oroszlan S., Arthur L., Gonda M., Gallo R., and Fischinger P. (1985). Characterization of envelope and core structural gene products of HTLV-III with sera from AIDS patients. *Science.* 228:593–955.
- Roebuck** K., and Finnegan A. (1999). Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression. *Journal of Leukocyte Biology.* 66: 876-888.
- Rowland-Jones** S. (2003). AIDS pathogenesis: what have two decades of HIV research taught us?. *Nature reviews.* 3:343-348.
- Roy** S., Dellling U., and Chen C. (1990). A bulge structure in HIV-1 TAR RNA is required for Tat binding and Tat-mediated trans-activation. *Genes Dev.* 4:1365-1373.

- Rybin V.**, Sabri A., Short J., Braz J., Molkentin J., and Steinberg S. (2003). Cross regulation of novel protein kinase C(PKC) isoform function in cardiomyocytes. Rol of PKC epsilon in activation loop phosphorylations and PKC delta in hydrophobic motif phosphorylations. *J. Biol. Chem.* 278:14555-14564.
- Sakaida H.**, Hori T., Yonezawa A., Sato A., Isaka Y., Yoshie O., Hattori T., and Uchiyama T. (1998). T tropic human immunodeficiency virus type 1 HIV derived V3 loop peptides directly bind to CXCR4 and inhibit T tropic HIV-1 infection. *J. Virol.* 72:9763-9770.
- Sato A.**, Balamuth F., Ugen K., Williams W., and Weiner D. (1994). Identification of CD7 glycoprotein as an accessory molecule in HIV-1 mediated syncytium formation and cell free infection. *J. Immunol.* 152: 5142-5152.
- Sato K.**, and Kawashima S. (2001). Calpain function in the modulation of signal transduction molecules. *Biol. Chem.* 382: 743-751.
- Sattentau Q.**, and Moore J. (1991). Conformational changes induced in the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein by soluble CD4 binding. *J. Exp. Med.* 174:407-415.
- Schacker T.**, Nguyen P., Beilman G., Wolinsky S., Larson M., Reilly C., and Haase A. (2002). Collagen deposition in HIV-1 infected lymphatic tissues and T cell homeostasis. *J. Clin. Investig.* 110:1133-1139.
- Scharenberg A.**, Humphries L., and Rawlings DJ. (2007). Calcium signalling and cell-fate choice in B cells. *Nat. Rev. Immunol.* 7:778-789.
- Schnittman S.**, Greenhouse J., Psallidopoulos M., Baseler M., Salzman N., Fauci A., and Lane H.(1990). Increasing viral burden in CD4+ T cells from patients with human immunodeficiency virus (HIV) infection reflects rapidly progressive immunosuppression and clinical disease. *Ann. Intern. Med.* 113(6):438-43.
- Schroder A.**, Shinn P., Chen H., Berry C., Ecker J., and Bushman F. (2002). HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell.* 110:521-529.
- Schulz T.**, Mitterer M., Neumayer H., Vogetseder W., and Dierich M. (1988). Involvement in the initiation of T cell responses and structural features of an 85-kDa membrane activation antigen. *Eur. J. Immunol.* 18:1253-1258.
- Schulze-Luehrmann J.**, and Ghosh S. (2006). Antigen-receptor signaling to nuclear factor kappa B. *Immunity.* 25:701-715.
- Schwenker M.**, Favre D., Martin J., Deeks S., and McCune J. (2008). HIV induced changes in T cell signaling Pathways. *The Journal of Immunology.* 180:6490-6500.
- Sedwick C.**, and Altman A. (2004). Perspectives on PKCθ in T cell activation. *Molecular Immunology.* 41: 675-686.
- Segal M.**, Bye J., Sambrook J., and Gething M. (1992). Disulfide bond formation during the folding of influenza virus hemagglutinin. *J. Cell Biol.* 118: 227-244.
- Sharer L.**, Cho E., and Epstein L. (1985). Multinucleated giant cells and HTLV-III in AIDS encephalopathy. *Hum. Pathol.* 16:760.
- Shin J.**, Doyle C., Yang Z., Kappes D., and Strominger J. (1990) Structural features of the cytoplasmic region of CD4 required for internalization. *EMBO J.* 9(2):425-434.
- Shin J.**, Dunbrack R., Lee S., and Strominger J. (1991). Phosphorylation-dependent down-modulation of CD4 requires a specific structure within the cytoplasmic domain of CD4. *J. Biol. Chem.* 266(16):10658-10665.
- Shrikant P.**, Chung I., Ballestas M., and Benveniste E. (1994) Regulation of intercellular adhesion molecule-1 gene expression by tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interferon-gamma in astrocytes. *J. Neuroimmunol.* 51: 209-220.
- Simmons A.**, Aluvihare V., and McMichael A. (2001). Nef triggers a transcriptional program in T cells imitating single-signal T cell activation and inducing HIV virulence mediators. *Immunity.* 14:763-777.
- Sippy B.**, Hofman F., Wright A., Wang J., Gopalakrishna R., Gundimeda U., He S., Ryan S., and Hinton D. (1996) Induction of intercellular adhesion molecule-1 by tumor necrosis factor-alpha through the 55-kDa receptor is dependent on protein kinase C in human retinal pigment epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37: 597-606.
- Sleckman B.**, Bigby M., Greenstein J., Burakoff S.J., and Sy M. (1989). Requirements for modulation of the CD4 molecule in response to phorbol myristate acetate. Role of the cytoplasmic domain. *J. Immunol.* 142(5):1457-1462.
- Sleckman B.**, Shin J., Igras V., Collins T., Strominger J., and Burakoff S. (1992). Disruption of the CD4-p56lck complex is required for rapid internalization of CD4. *J. Biol. Chem.* 267(16):7566-7570.
- Sodroski J.**, Goh W., Rosen C., Campbell K., and Haseltine W. (1986). Role of the HTLV-III/LAV envelope in syncytium formation and cytopathicity. *Nature.* 322: 470-474.
- Sousa A.**, Carneiro J., Meier-Schellersheim M., Grossman Z., and Victorino R. (2002). CD4 T cell depletion is linked directly to immune activation in the pathogenesis of HIV-1 y HIV-2 but only indirectly to the viral load. *J. Immunol.* 169: 3400-3406.
- Springer T.** (1990). Adhesion receptors of the immune system. *Nature.* 346: 425-434.
- Staal F.**, Roederer J., Israelski D., Bubp J., Mole A., McShane D., Deresinski S., Ross W., Sussman H., et al (1992). Intracellular glutathione levels in T cell subsets decrease in HIV infected individuals. *AIDS. Res. Hum. Retroviruses.* 8:305-311.
- Staal F.**, Anderson M., Staal G., Herzenberg L., Gitler C., and Herzenberg L. (1994). Redox regulation of signal transduction: tyrosine phosphorylation and calcium influx. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:3619-3622.
- Stanciu L.**, and Djukanovic R. (1998). The role of ICAM-1 on T- cells in the pathogenesis of asthma. *European Respiratory Journal.* 11: 949-957.
- Staunton D.**, Marlin S., Stratowa C., Dustin M., and Springer T. (1988). Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of the immunoglobulins and integrin supergene families. *Cell.* 52: 925-933.
- Stein B.**, and Engleman E. (1990). Intracellular processing of the gp160 HIV-1 envelope precursor. Endoproteolytic cleavage occurs in a cis or medial compartment of the golgi complex. *J. Biol. Chem.* 265: 2640-2649.
- Tamura D.**, Moore E., Johnson J., Zallen G., Aiboshi J., and Silliman C.(1998). p38 mitogen-activated protein kinase inhibition attenuates intercellular adhesion molecule-1 up-regulation on human pulmonary microvascular endothelial cells. *Surgery.* 124: 403-407; discussion 408.
- Tang S.**, and Levy J. (1990). Parameters involved in the cell fusion induced by HIV. *AIDS.* 4:409-414.
- Tateno M.**, and Levy J. (1988). MT 4 plaque formation can distinguish cytopathic subtypes of the human immunodeficiency virus (HIV). *Virology.* 167:299-301.
- Teo I.**, Veryard C., Barnes H., et al. (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.* 71:2928-2933.

- Tersmette M.**, De Goede R., Al B., Winkel I., Gruters R., Cuyper H., Huisman H., and 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.
- Trickett A.**, and Kwan Y. (2003). T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads. *Journal of Immunological Methods.* 275: 251-255.
- Truneh A.**, Buck D., Cassatt D., Juszczak R., Kassis S., Ryu S., Healey D., Sweet R., and Sattentau Q. (1991). A region in domain 1 of CD4 distinct from the primary gp120 binding site is involved in HIV infection and virus mediated fusion. *J. Biol. Chem.* 266:5942-5948.
- Trushin S.**, Pennington K., Carmona E., Asin S., Savoy D., Billadeau D., and Paya C. (2003). Protein kinase C alpha (PKC alpha) acts upstream of PKC theta to activate I kappa B kinase and NF kappa B in T lymphocytes. *Mol. Cell. Biol.* 23: 7068-7081.
- Trushin S.**, Algeciras-Schimmich A., Vlahakis S., Bren G., Warren S., Schnepfle D., and Badley A. (2007). Glycoprotein 120 binding to CXCR4 causes p38-dependent primary T cell death that is facilitated by, but does not require cell-associated CD4. *The Journal of Immunology.* 178(8): 4846-4853.
- Turner H.**, and Kinet J. (1999). Signalling through the high-affinity IgE receptor Fc epsilonRI. *Nature.* 402:B24-B30.
- Valitutti S.**, and Espagnolle N. (2005). Immunological Synapse. *Encyclopedia of life sciences.* 1-9.
- Van de Stolpe A.**, and Van der Saag P. (1996). Intercellular adhesion molecule-1. *J. Mol. Med.* 74: 13-33.
- Van Parijs L.**, Ibraghimov A., and Abbas A. (1996). The roles of costimulation and Fas in T cell apoptosis and peripheral tolerance. *Immunity.* 4(3): 321-328.
- Van Parijs L.** and Abbas A. (1998). Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science.* 280(5361): 243-248.
- Veillette A.**, Bookman M., Horak E., and Bolen J. (1988). The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck. *Cell.* 55(2):301-308.
- Voss S.**, Welte S., Fotin-Mleczek M., et al. (2006). A CD14 domain with lipopolysaccharide-binding and - neutralizing activity. *Chembiochem.* 7:275-286.
- Wallace D.**, and Beverley P. (1990). Phenotypic changes associated with activation of CD45RA+ and CD45RO+ T cells. *Immunology.* 69: 460-467.
- Wang J.**, Tong P., Lu L., Zhou L., Xu L., et al. (2011). HIV-1 gp41 Core with Exposed Membrane-Proximal External Region Inducing Broad HIV-1 Neutralizing Antibodies. *PLoS ONE* 6(3): e18233.
- Ward J.**, O'Leary T., Baskin G., Benveniste R., Harris C., Nara P., and Rhodes R. (1987). Immunohistochemical localization of human and simian immunodeficiency viral antigens in fixed tissue sections. *Am. J. Pathol.* 127:199-205.
- Weiss C.**, Barnett S., Cacalano N., Killeen N., Littman D., and White J. (1996). Studies of HIV-1 envelope glycoprotein mediated fusion using a simple fluorescence assay. *AIDS.* 10:241-246.
- Weyand C.**, Goronzy J., and Fathman C. (1987). Modulation of CD4 by antigenic activation. *J. Immunol.* 138(5):1351-1354.
- Willey R.**, Rutledge R., Dias S., Folks T., Theodore T., Buckler C., and Martin M. (1986). Identification of conserved and divergent domains within the envelope gene of the acquired immunodeficiency syndrome virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83:5033-5042.
- Yamaguchi Y.**, Matsumura F., Wang F., Akizuki E., Liang J., Matsuda T., Okabe K., Ohshiro H., Horiuchi T., Yamada S., Mori K., and Ogawa M. (1998). Neutrophil elastase enhances intercellular adhesion molecule-1 expression. *Transplantation.* 65:1622-1628.
- Zaitseva M.**, Romantseva T., Manischewitz J., Wang J., Goucher D., and Golding H. (2005). Increased CXCR4 dependent HIV-1 fusion in activated T cells: role of CD4CXCR4 association. *Journal of Leukocyte Biology.* 78(6): 1306-1317.
- Zhu P.**, Liu J., Bess J., Chertova E., Lifson J., Grise H., Ofek G., Taylor K., and Roux K. (2006). Distribution and three dimensional structure of AIDS virus envelope spikes. *Nature.* 441:847-852.
- Zolla-Pazner S.** (2004). Identifying epitopes of HIV-1 that induce protective antibodies. *Nature Reviews Immunology.* 4:199-210.
- Zuckerman L.**, Pullen L., and Miller J. (1998). Functional consequences of costimulation by ICAM-1 on IL-2 gene expression and T cell activation. *J. Immunol.* 160: 3259-3268.