



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Caracterización de heterocariones
linfocito-monocito inducidos por las
proteínas de fusión del VIH-1**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

P R E S E N T A:

David Martínez Méndez



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. LEONOR HUERTA HERNÁNDEZ**

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de datos del jurado

1. Datos del Alumno

Martínez
Méndez
David
0445555431390
Universidad Nacional Autónoma de
México
Facultad de Ciencias
Biología
40800133-3

2. Datos del tutor

Dra.
Leonor
Huerta
Hernández

3. Datos del sinodal 1

Dr.
Edmundo de Ibis
Lamoyi
Velázquez

4. Datos del sinodal 2

Dra.
Gohar
Gevorgyan

5. Datos del sinodal 3

Dra.
Rosa Elena
Sarmiento
Silva

6. Datos del sinodal 4

Dra.
María Luisa
Escobar
Sánchez

7. Datos del trabajo escrito

Caracterización de heterocariones linfocito-monocito inducidos por las proteínas de fusión del VIH-1
50
2013

Agradecimientos:

A la Dra. Leonor Huerta Hernández por aceptarme como su alumno, por su paciencia, su apoyo y su atención como mi tutora en todo momento.

A la Dra. Evelyn Rivera Toledo por sus enseñanzas e introducción a este proyecto.

Al Dr. Enrique Ortega Soto y a la Lic. Irma Ileana Licona Limón, por su colaboración en los experimentos de fagocitosis y sus comentarios al proyecto.

A los miembros del jurado, Doctores Edmundo Lamoyi, Gohar Gevorgyan, Rosa Elena Sarmiento y María Luisa Escobar, por su revisión y sus excelentes comentarios a esta tesis.

Índice

Abreviaturas.....	1
RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN.....	4
1. Antecedentes	4
2. Proteínas de fusión	5
3. Mecanismo de fusión de membranas.....	7
4. Policariones	8
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	17
HIPÓTESIS.....	17
OBJETIVO.....	17
OBJETIVOS PARTICULARES.....	18
METODOLOGÍA	19
2. Líneas celulares	19
3. Inducción de la expresión del complejo Env:.....	21
4. Marcaje	21
5. Ensayo de fusión	22
6. Análisis por citometría de flujo	23
7. Inmunofenotipificación.....	23
Ensayo de fagocitosis	25
8. Microscopía de fluorescencia	26
9. Análisis estadísticos	26

RESULTADOS	27
1. Inmunofenotipificación.....	27
2. Fagocitosis.....	33
3. Microscopía de fluorescencia	37
4. Adherencia a la placa de cultivo y cambio de morfología.	39
DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	41
PERSPECTIVAS.....	45
CONCLUSIONES.....	47
APÉNDICE	48
BIBLIOGRAFÍA.....	49

Abreviaturas

APC	Fluorocromo alofocianina
Dil	Perclorato de 1,1-dioctadecil-3,3,3 tetrametil-indocarbocianina
DiO	Perclorato de 3,3 –dioctadecil-oxacarbocianina
Env	Complejo de proteínas virales, gp120/gp41, expresadas en la envoltura del VIH
FRET	Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia.
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
SIV	Virus de la inmunodeficiencia en simios

RESUMEN

Las células infectadas con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) expresan en su membrana el complejo fusogénico molecular Env, compuesto por las glicoproteínas virales gp120 y gp41. La expresión de Env permite la fusión de las membranas citoplasmáticas de las células infectadas y de las células no infectadas CD4⁺ circundantes, llevando a la formación de policariones o sincicios. Se ha reportado frecuentemente la presencia de policariones infectados en los órganos linfoides y sistema nervioso central de individuos infectados con VIH.

Por otra parte, la presencia en la sangre de virus capaces de inducir la formación de sincicios en cultivos de las células T, se asocia a una pérdida acelerada de células T CD4⁺ y progresión a SIDA. El papel de los policariones durante la infección del VIH ha sido escasamente estudiado.

Linfocitos T y células del linaje monocito/macrófago interactúan estrechamente durante la respuesta inmune y ambas son blanco del VIH. Las proteínas Env podrían inducir estos tipos celulares a fusionarse y formar heterocariones.

Esta posibilidad ha sido estudiada anteriormente en nuestro laboratorio utilizando cocultivos de células de la línea linfocítica Jurkat que expresan el complejo Env, con células monocíticas de la línea THP-1, las cuales son CD4⁺/CXCR4⁺. Para detectar la formación de heterocariones, se utilizó el marcaje diferencial de los dos tipos celulares con los colorantes fluorescentes DiO (verde) y Dil (rojo) y el análisis por citometría de flujo de las células con fluorescencia mixta. Los resultados obtenidos mostraron que las proteínas de envoltura del VIH-1 son capaces de inducir la fusión monocito-linfocito. Sin embargo era importante caracterizar a los heterocariones resultantes en su fenotipo y actividad celular.

La presente tesis incluye la caracterización de los heterocariones formados *in vitro*, analizando la expresión de marcadores linfoides (CD3, CD28) y mieloides (CD32, CD68) después de 1, 2 y 3 días de cocultivo, así como su actividad fagocítica por medio de citometría de flujo y microscopía de fluorescencia. Para todos los ensayos se incluyó la adición del péptido sintético inhibidor de fusión T-20, para inhibir la fusión celular y para detener la incorporación de células adicionales en los heterocariones ya formados. De esta manera se determinó que la expresión los de marcadores de superficie durante 3 días de cocultivo, no se modificara debido a células recientemente incorporadas en los heterocariones.

Los resultados mostraron que los heterocariones expresaron los marcadores mieloides de manera estable y similar a la línea parental monocítica THP-1, mientras que la expresión de los marcadores linfoides se vio fuertemente reducida. Por otra parte, mediante un ensayo de fagocitosis dependiente de receptores Fc, mostramos que los heterocariones fueron capaces de fagocitar eritrocitos opsonizados. La capacidad fagocítica de los heterocariones también fue similar a la de la línea THP-1. En conjunto, los resultados obtenidos indican que las proteínas de fusión del VIH-1 inducen la formación de heterocariones con fenotipo mieloides estable, que poseen actividad fagocítica y presentan cambios morfológicos.

INTRODUCCIÓN

1. Antecedentes

El virus de inmunodeficiencia humana (VIH) pertenece a la subfamilia lentivirus de la familia Retroviridae y produce una infección crónica en el hospedero que lentamente inhabilita su sistema inmune. El VIH ataca principalmente a las células que expresan el receptor CD4 y un correceptor de quimiocinas de la familia CXC o CC (CXCR4 o CCR5 respectivamente). La presencia del correceptor es fundamental ya que se ha observado que la expresión de CD4, aunque requerida para la unión del virus a la célula, no es suficiente para una infección productiva en ausencia de estos correceptores (1).

Para que el VIH infecte a una célula, es indispensable la interacción del complejo Env con CD4 y correceptor. Esto permite el acercamiento de las membranas, la fusión de estas y la internalización de la capsida del VIH en la célula blanco. Una vez internalizado, las enzimas virales convierten el RNA viral en DNA y lo integran al material genético de la célula. Ésta sintetiza las proteínas virales necesarias para replicar nuevos viriones que tomarán una porción de la membrana de la célula y saldrán como nuevos virus (2).

Como consecuencia de la infección, la célula infectada expresa el complejo Env en su propia membrana, lo cual le confiere la capacidad de fusionarse con otras células CD4⁺ y formar células gigantes multinucleadas llamadas policariones (sincicios y heterocariones), (3,4,41).

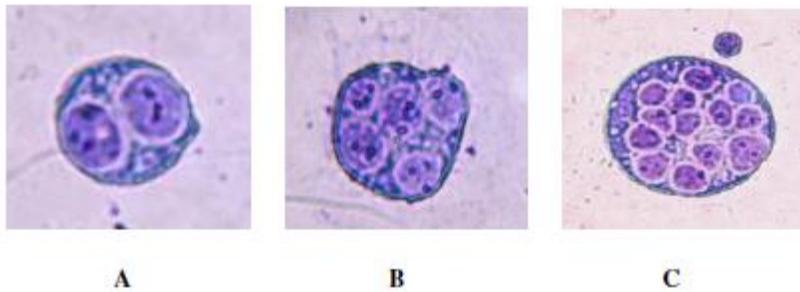


Figura 1. Sincicios generados *in vitro* por la fusión entre células Jurkat Env yCD4 despues de 5 horas de cocultivo. teñidos con Giemsa. Se puede apreciar la heterogeneidad de los sincicios generados. A) Sincicio binucleado. B) Sincicio con 5 núcleos. C) Célula multinucleada.). Figura utilizada con permiso de Elsevier Ltd. [ScientificWorldJournal] (35), copyright (2009).

2. Proteínas de fusión

Las proteínas que conforman el complejo de fusión Env son gp120 y gp41 (ver figura 2), las cuales están asociadas de manera no covalente en la envoltura viral y en la membrana de las células infectadas. La proteína gp120 presenta regiones variables y conservadas. Como se puede ver en la figura 2, las regiones variables se denominan V1 a V5. Algunos estudios han sugerido que estas regiones conservadas y variables en conjunto determinan la capacidad infecciosa y la formación de sincicios. La proteína gp120 también tiene sitios de glicosilación altos en manosa o carbohidratos de tipo complejo. Un factor potencial que influye en la interacción de Env con el receptor CD4 es el grado de glicosilación de gp120. En la actualidad se propone que este complejo Env se encuentra agrupado en trímeros (5,44, 45).

Para que este complejo promueva el acercamiento de membranas y la posterior internalización viral, es necesaria la interacción con el receptor CD4 y alguno de los correceptores CCR5 o CXCR4. (Figuras 3 y 4) (6, 7).

La proteína gp41 consta de una región extracelular, una transmembranal y un dominio citoplásmico. En el extremo amino-terminal de la gp41 se encuentra el péptido de fusión, una región rica en aminoácidos hidrofóbicos.

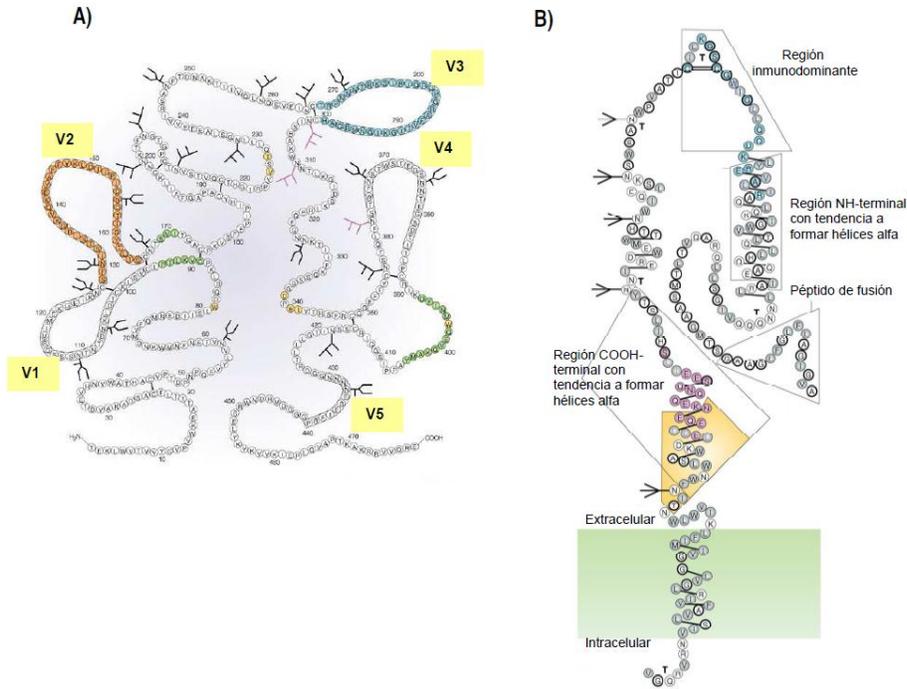


Figura 2. Modelos de las proteínas de envoltura viral gp120 (izquierda) y gp41. Se muestran las regiones de alta variabilidad de la gp120 (V1, V2, V3, V4, V5). Y las regiones de gp41 involucradas en el proceso de fusión de membranas. (7). Imagen adaptada con permiso de Elsevier Ltd: [AIDS Res Hum Retroviruses] (7), copyright (1989).

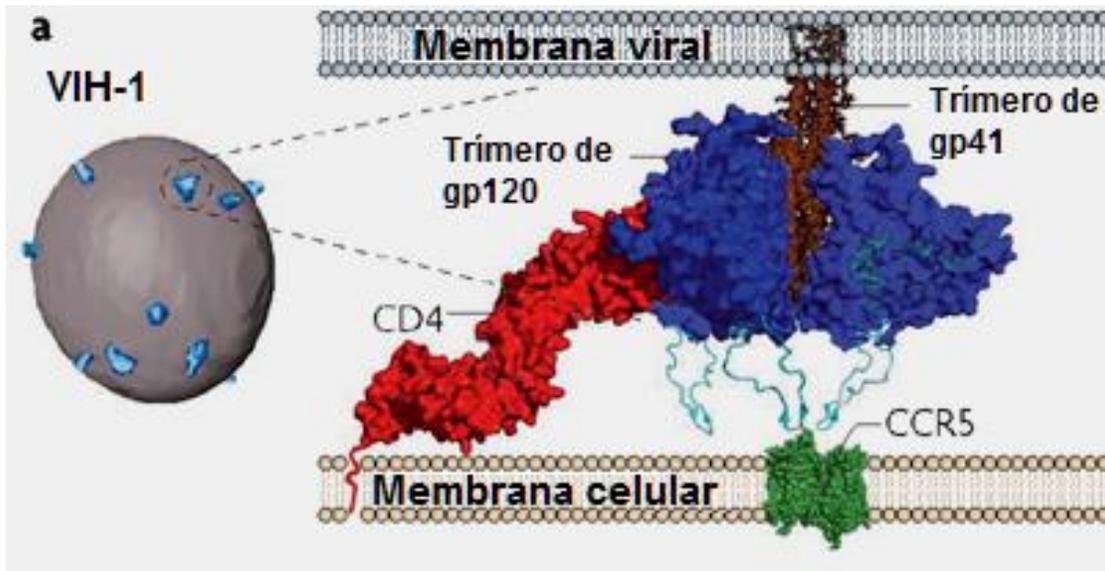


Figura 3. Reconstrucción de una partícula viral obtenida por tomografía crioelectrónica que muestra las espículas formadas por las proteínas de la envoltura viral interactuando con el receptor celular CD4 y el correceptor CCR5. Imagen adaptada con permiso de Macmillan Publishers Ltd: [Nature] (6), copyright (2006).

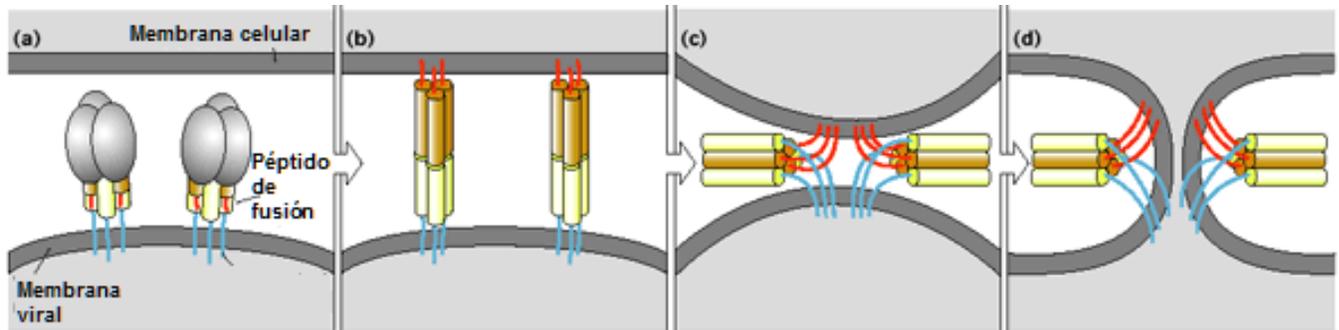


Figura 4. Modelo de Fusión de membranas inducida por el complejo Env. Imagen adaptada de Chernomordik et al 2008. Imagen adaptada con permiso de Macmillan Publishers Ltd: [Nat Struct Mol Biol] (8), copyright (2008).

3. Mecanismo de fusión de membranas

La interacción de un trímero de gp120 con el receptor celular CD4 y un correceptor activa el complejo Env y provoca la fusión de las membranas del virus y la célula blanco. La interacción de gp120 con un correceptor (CCR5 o CXCR4) promueve cambios conformacionales en la estructura trimérica de gp41, exponiendo su péptido de fusión, el cual se inserta en la membrana celular (figura 4). Posteriormente la proteína gp41 promueve el acercamiento de las membranas y la formación de un poro que permite la internalización de la cápside viral a la célula (8).

La fusión de membranas viral y celular es susceptible a la inhibición por medio de anticuerpos (anti-CD4, anti-gp41, anti-gp120) y a péptidos sintéticos (T-20, C34) análogos a regiones de gp120 y gp41 que inhiben cambios conformacionales del complejo Env (43).

4. Policariones

Diversos estudios han revelado la presencia de policariones en biopsias de tejido linfático de pacientes asintomáticos infectados con el VIH y de individuos que murieron por SIDA así como en chimpancés infectados con el virus de inmunodeficiencia en simios (SIV). También se encontraron sincicios derivados de macrófagos en cerebro y médula espinal de pacientes infectados con el VIH (9-18).

Resulta entonces de gran interés la presencia de policariones en órganos que sufren deterioro conforme los pacientes progresan a SIDA.

El papel de los policariones en la infección por el VIH ha sido escasamente estudiado.

Hay evidencias que sugieren que los policariones podrían tener relevancia en la patogénesis del VIH actuando como reservorios virales que facilitan la replicación viral (29, 30), produciendo citosinas inflamatorias y provocando daño a tejidos, actuando como sitios favorables para la recombinación genética del virus, reduciendo el número de células del sistema inmune disponibles y llevándolas a apoptosis. También se ha relacionado la presencia de policariones en pacientes con su progresión a SIDA (18, 19, 22, 23, 25,27).

Hay evidencias de que los policariones encontrados *in vivo* presentan los marcadores de la línea de los macrófagos. Otros estudios sugieren presencia de marcadores provenientes de células dendríticas (18, 22, 23, 24).

También se ha reportado la presencia de linfocitos multinucleados en órganos linfoides. Los linfocitos T y células de la línea monocito macrófago expresan los receptores y correceptores necesarios para la infección por VIH y son el blanco principal de este virus (25).

Estudios *in vitro* de formación de sincicios por fusión celular realizados en nuestro laboratorio, han mostrado que la fusión celular es un proceso heterogéneo, obteniendo policariones de diferente tamaño y composición celular (33, 34).

Los linfocitos T y las células del linaje monocito/macrófago expresan los receptores para VIH (CD4 y molécula correceptora) y son los blancos principales del virus (36). Es posible que células infectadas que expresan el complejo Env interactúen con células CD4⁺ del mismo o diferente linaje celular y formen sincicios o heterocariones *in vivo*. Los heterocariones podrían conservar o modificar el fenotipo proporcionado por las células parentales (37, 40).

Para examinar esta posibilidad en nuestro laboratorio se ha estudiado ampliamente la formación de sincicios *in vitro* y también la formación de heterocariones utilizando células Jurkat que expresan de manera estable el complejo viral de fusión Env (células Env⁺) y monocitos o linfocitos que expresan el receptor CD4. Las células Env⁺ y CD4⁺ son marcadas con los marcadores lipofílicos fluorescentes DiO y Dil, respectivamente, y son cocultivadas durante un mínimo de 5 horas. Los cocultivos son analizados por citometría de flujo para detectar heterocariones, los cuales se manifiestan como células con fluorescencia mixta. (33-35).

En nuestro sistema experimental se han utilizado diversos criterios para distinguir estas células fusionadas y células agregadas. Uno es la manifestación de FRET en las células con fluorescencia mixta, un fenómeno en el que el espectro de emisión del colorante DiO se traslapa con el de absorción del colorante Dil (ver apéndice) y aumenta la energía de éste y su fluorescencia, lo cual sólo ocurre a distancias muy cortas. Como consecuencia, la fluorescencia roja está incrementada en las células fusionadas con respecto a las no fusionadas (36). Otros criterios son el aumento de tamaño y granularidad de las células con fluorescencia mixta e inhibición de fusión en grupos control.

El fenotipo y la actividad celular de los heterocariones formados *in vitro* por las líneas celulares monocíticas y linfocíticas, no han sido ampliamente caracterizados.

La determinación de la funcionalidad de los heterocariones es de gran interés para nosotros para determinar su potencial biológico en la infección por el VIH.

Resultados obtenidos previamente en el laboratorio, muestran que hasta 20% de las células en los cocultivos corresponden a heterocariones. Un cálculo de la composición celular de la población de heterocariones, sugiere que la relación linfocito-monocito es 1:1 en la población a las 48 horas de cocultivo. La fusión no se lleva a cabo cuando se utilizan células Env⁺ no fusogénicas o cuando se adiciona inhibidor específico de la fusión antes del cocultivo (el péptido sintético T-20, el cual interfiere con el cambio conformacional que sufre gp120 al contacto con el receptor CD4 de la célula blanco) (Ver figuras 5 y 6) (41).

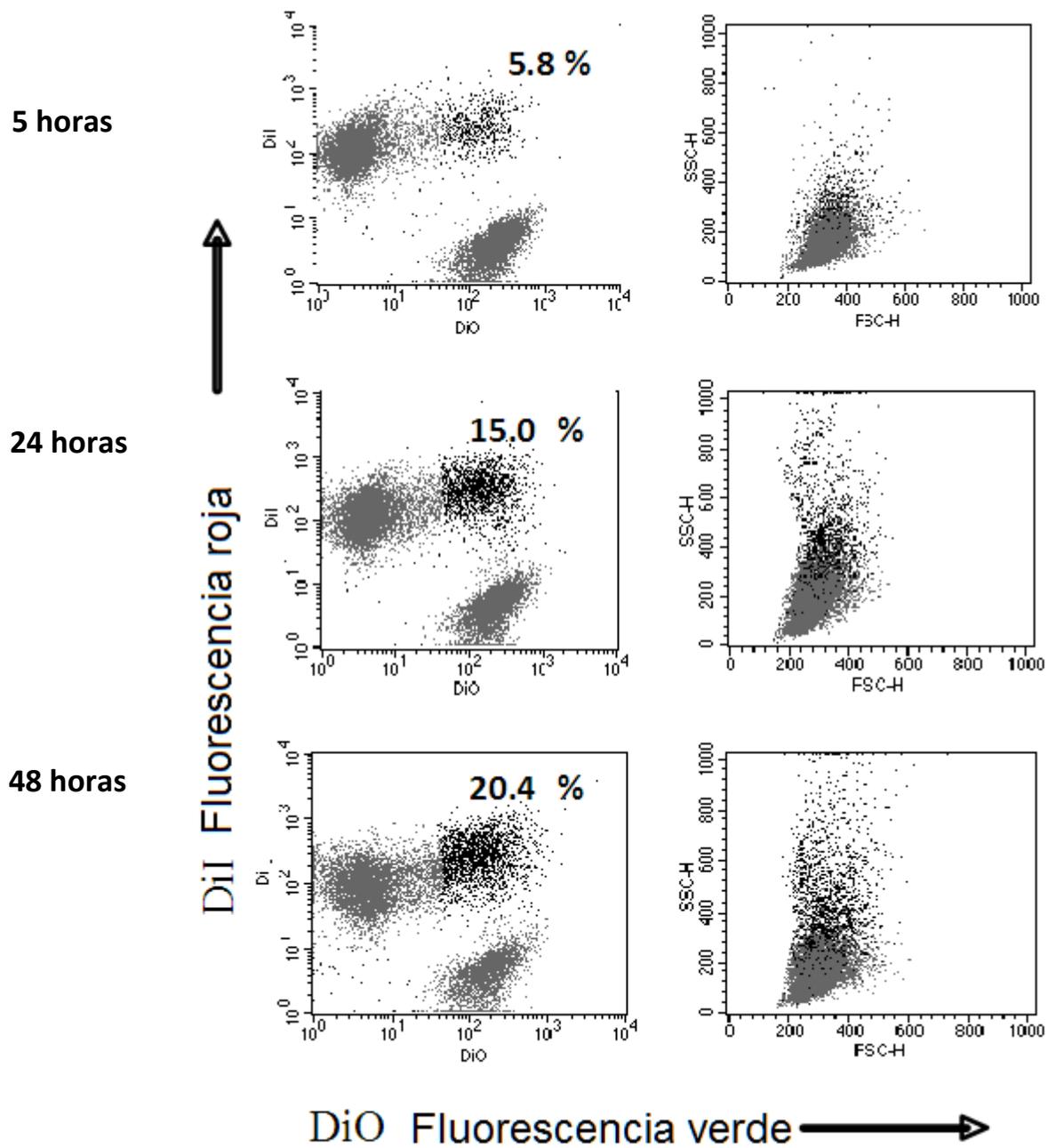


Figura 5. Porcentaje de fusión celular a 3 diferentes tiempos (5, 24 y 48 horas). Imagen adaptada con permiso de Elsevier Ltd. [Exp Mol Pathol] (41), copyright (2011).

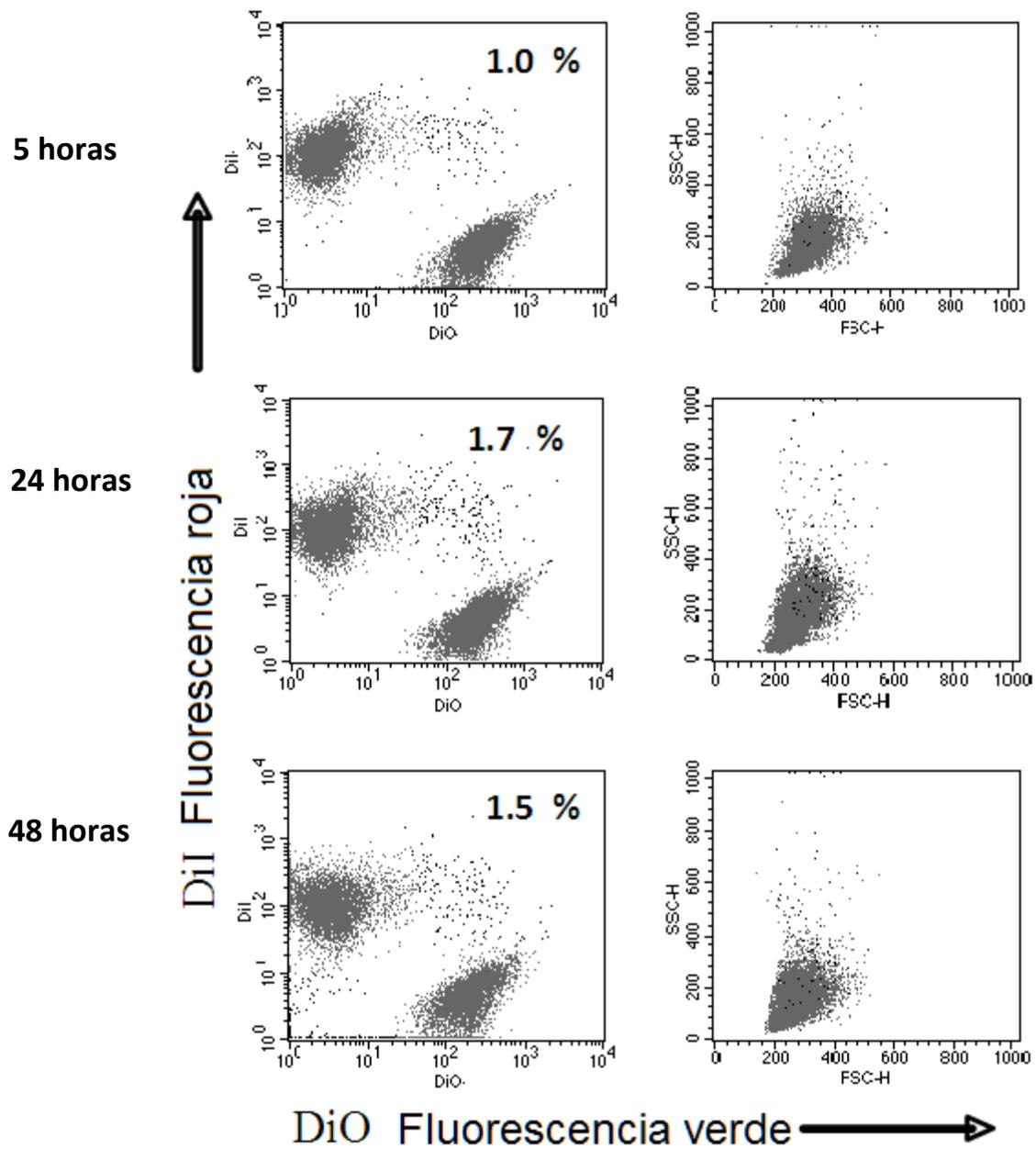


Figura 6. Inhibición de fusión celular utilizando el péptido sintético T-20. Imagen adaptada con permiso de Elsevier Ltd: [Exp Mol Pathol] (41), copyright (2011).

Resultados preliminares habían mostrado también que los marcadores mieloides CD32 y CD68 se expresaban eficientemente en los heterocariones obtenidos después de un día de cocultivo, mientras que la expresión de los marcadores linfoides CD28 y CD3 fué escasa (Figura 7 y Ref. 41). Sin embargo, el análisis de la expresión de estos marcadores a diferentes tiempos de cocultivo era necesario para determinar la estabilidad del fenotipo de los heterocariones.

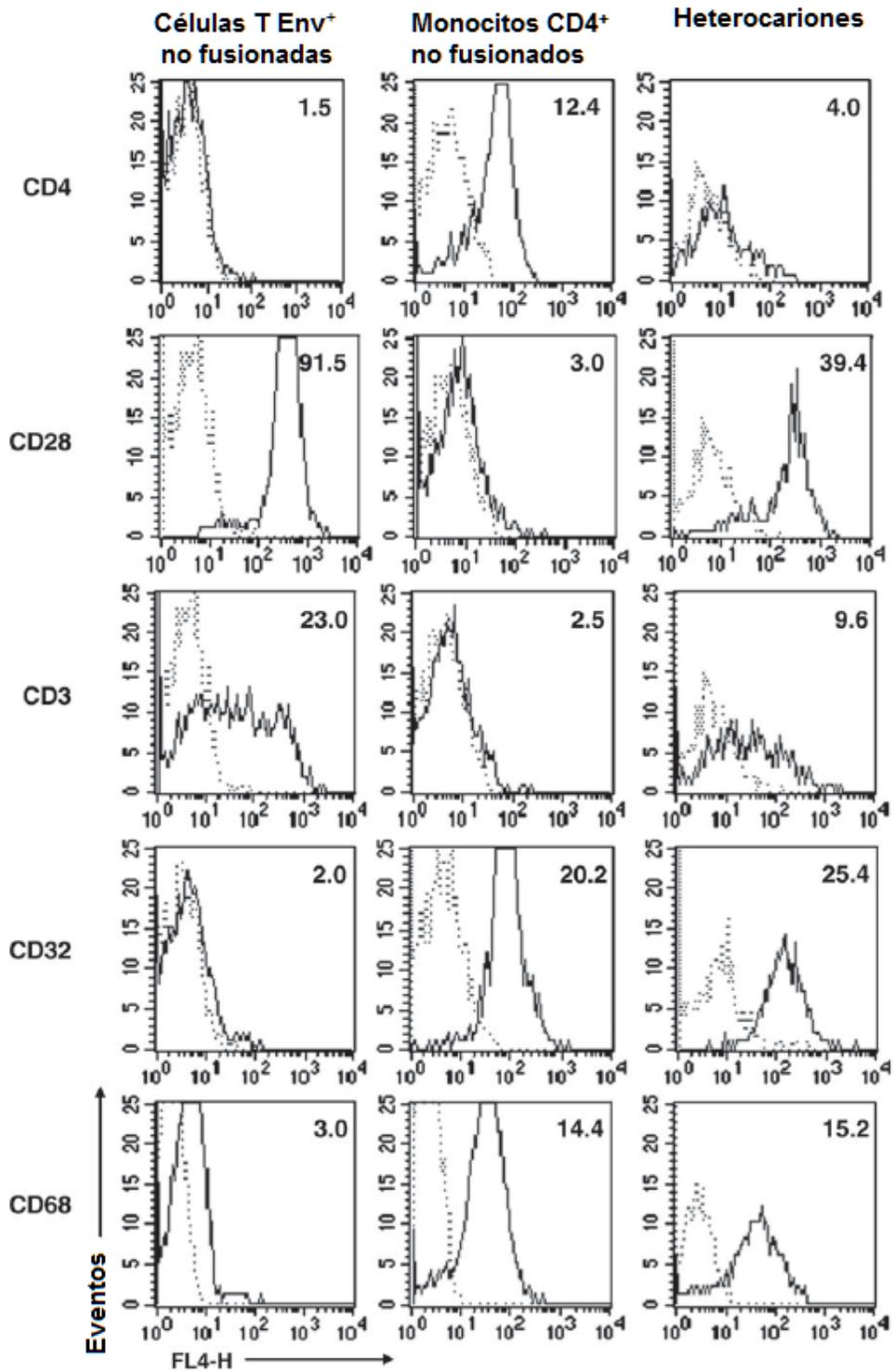


Figura 7. Intensidad de fluorescencia para los marcadores linfoides y mieloides analizados. (41). La línea clara representa al respectivo control con pegado inespecífico. Los números representan la intensidad media de la fluorescencia. Imagen adaptada con permiso de Elsevier Ltd. [Exp Mol Pathol] (41), copyright (2011).

En observaciones preliminares al microscopio de luz, se observó que en los cocultivos donde había formación de heterocariones, consistentemente se presentaban células alargadas y aparentemente adheridas a las placas de cultivo, mientras que en los cocultivos en donde se utilizaron de células Env+ no fusogénicas (células 522F/Y), no se observaron células con esta morfología (figura 8). Fué entonces evidente que había necesidad de determinar si las células con apariencia diferente correspondían a heterocariones.

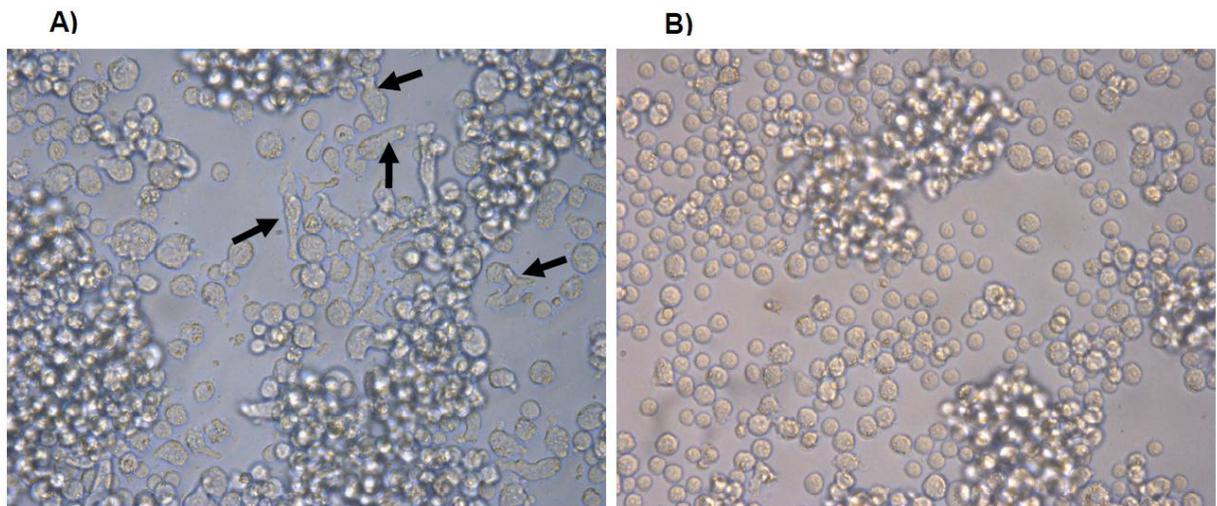


Figura.8. Cambios morfológicos que ocurren en cocultivos donde hay fusión heterotípica. A) cocultivo entre monocitos y células Env⁺ fusogénicas. B) Cocultivo entre monocitos y células Env⁺ no fusogénica. Imagen utilizada con permiso de Elsevier Ltd: [Exp Mol Pathol] (41), copyright (2011).

También se analizó previamente la viabilidad de los heterocariones formados hasta las 96 horas mediante una doble tinción con 7-amino-actinomicina y Anexina-V (marcadores de apoptosis). Se observó que a las 96 horas los heterocariones presentaban una viabilidad del 50% similar a la de las células linfocíticas no fusionadas, mientras que las células monocíticas presentaron una viabilidad por arriba del 90% (Tabla 1).

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

Tabla 1. Viabilidad de los heterocariones, y las células no fusionadas. Tabla utilizada con permiso de Elsevier Ltd: [Exp Mol Pathol] (41), copyright (2011).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado que células T que expresan las proteínas de fusión del VIH-1 son capaces de fusionarse con células monocíticas CD4⁺. Los heterocariones así formados mostraron un fenotipo predominantemente mieloide

El conocimiento de la estabilidad del fenotipo mieloide de los heterocariones, así como la determinación de su funcionalidad, son importantes para determinar el potencial biológico de la fusión linfocito-monocito en la infección por el VIH-1

HIPÓTESIS

Los heterocariones formados *in vitro* por la fusión de células linfocíticas y monocíticas expresarán establemente hasta 72 horas los marcadores correspondientes a un fenotipo predominantemente mieloide. En congruencia, mostrarán una actividad fagocítica similar a la de células monocíticas.

OBJETIVO

Caracterizar fenotípica y funcionalmente a los heterocariones formados *in vitro* por las líneas celulares THP-1 (CD4⁺, monocítica) y HxBc2 (Env⁺, linfocítica).

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Inducir fusión celular *in vitro* utilizando cocultivos de la línea monocítica THP-1 y la línea linfocítica HXBc2, determinando el porcentaje de fusión durante 24 horas y el efecto de la adición de T-20.
2. Analizar la expresión de los marcadores CD3, CD28 (linfocíticos), CD32 y CD68 (monocíticos) a 24, 48 y 72 horas de cocultivo, utilizando el péptido inhibidor T-20 para evitar la modificación del fenotipo debido a la incorporación de nuevas células a los heterocariones.
3. Determinar si los heterocariones tienen actividad fagocítica en un ensayo de fagocitosis dependiente de receptores Fc.
4. Observar por microscopía de fluorescencia la actividad fagocítica de los heterocariones.
5. Examinar la morfología de los heterocariones por microscopía de fluorescencia

METODOLOGÍA

1. Anticuerpos utilizados (marca “BD Pharmingen™”)

Purified Mouse anti-CD68 (Cat. 556059 BD).

APC goat anti-mouse Ig (Cat. 550826 BD).

Anti-CD32-APC (Cat. 559769 BD).

APC mouse IgG_{2bk} Isotype control (Cat. 555745 BD).

Anti- CD3-APC (Cat. 340440).

Anti- CD28-APC (Cat. 559770).

APC mouse IgG₁ Isotype control (Cat. 555751).

2. Líneas celulares

HXBc2: Línea celular Jurkat, transfectada para expresar las proteínas de membrana gp120/gp41 del VIH. Esta línea celular proviene de la transfección estable de células Jurkat E6-1 con 2 plásmidos diferentes, uno contiene los genes *env* y *rev* de la cepa HXBc2 del VIH-1 acoplados al operador de tetraciclina y a una secuencia de resistencia a higromicina. El segundo cuenta con el activador VP16 del citomegalovirus unido a un represor dependiente de tetraciclina y a una secuencia de resistencia a geneticina para su expresión constitutiva. En ausencia de tetraciclina se induce la expresión del complejo proteico viral gp120/gp41. (Figura 9) (47).

522 F/Y: Célula transfectada con un plásmido que contiene el gen *env* del VIH pero presenta una sustitución F/Y (de fenilalanina-tirosina) en la posición 522, en el NH2 terminal de gp41 y es no fusogénica (47).

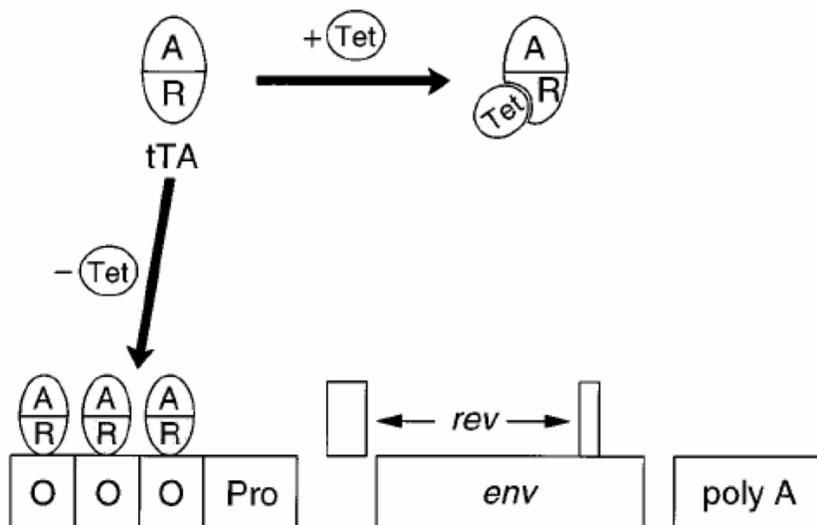


Figura 9. Sistema inducible de la síntesis de las proteínas gp120 y gp41 (Env) en las células 522 y HXBc2. La proteína tTA (que contiene al activador VP16 y un represor tet) se une al operador tet en ausencia de tetraciclina activando río arriba al promotor de citomegalovirus y la expresión del gen *env* (Pro). Imagen Utilizada con permiso de Elsevier Ltd: [J Virol] (47), copyright (1996).

Las células monocíticas THP-1 (CD4⁺ /CXCR4⁺), fueron obtenidas del ATCC (American Type Culture Colection).

Las células HXBc2 (Hx) y 522 F/Y (Env⁺) y THP-1 (CD4⁺), se cultivan en suspensión en botellas T-75, con medio RPMI, suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado. Las células Env⁺ son cultivadas con de 1 µL/mL de tetraciclina, 4 µL/mL de higromicina y 4 µL/mL de geneticina. Los cultivos se mantienen a 37 °C con 5% de CO₂ (47).

Las células CD4⁺ son cultivadas en presencia de 100U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 2 mM de L-glutamina, 100 µM de aminoácidos no esenciales y 1 mM de piruvato de sodio.

3. Inducción de la expresión del complejo Env:

Se transfirieron las células Hx y 522 a tubos de 50 mL y se centrifugaron a 1150 rpm por 3 minutos.

Se decantó el sobrenadante y se adicionó 40 mL de PBS 1X estéril (1 Mm NaH₂PO₄, 5.6 Mm Na₂HPO₄, 126 Mm NaCl, pH 7.2), se resuspendió y se volvió a centrifugar y decantar. Después de repetir el lavado 2 veces, las células se transfirieron a nuevas botellas y se resuspendieron en medio RPMI suplementado con los antibióticos (higromicina y geneticina (4 µl/ml).

Se incubaron las células a 37°C con 5% de CO₂ (máximo 3 días para la expresión de las glicoproteínas gp120/gp41 del VIH).

4. Marcaje

Las células se centrifugaron a 1150 rpm por 3 min para decantar el sobrenadante.

Se resuspendieron en RPMI suplementado, se tomaron 10 µl que se colocan en un tubo eppendorf (no estéril) con 90 µl de azul tripano.

Se realizó un conteo celular por medio de microscopia en hemocitómetro para ajustar a un máximo de 5-15 X 10⁶ células viables en 1 mL.

Se adicionaron los colorantes de membrana lipofílicos fluorescentes, DiO (perclorato de 3,3'-dioctadeciloxacarbocianina), fluorescente en verde, Dil (perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina), fluorescente en rojo y DID (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanina perclorato) fluorescente en naranja usando las siguientes cantidades: (Dil 1:10 (rojo)= 5 o 9 µL/mL de medio (THP-1) DiO 1:30 (verde)=15 µL/mL medio

(Hx/522) DID stock 5µL/mL) (Hx/522) (ver figura 10). Las células se resuspendieron y se incubaron por 15 y 20 min con agitación moderada y después se lavaron 2 veces con RPMI de lavado.

Se centrifugaron 3 min a 1150 rpm y se retira el sobrenadante. Se resuspendieron en RPMI suplementado, agregando los antibióticos a las HX y 522.

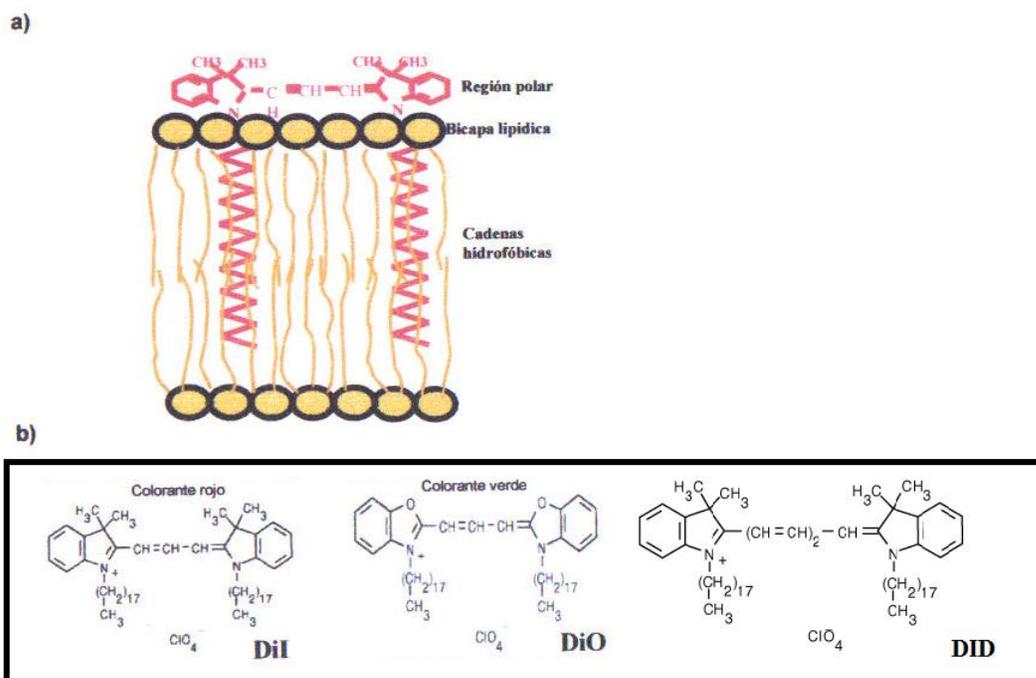


Figura 10. Estructura química de colorantes lipofílicos: Dil, DiO y DID. A) esquema de la inserción de las moléculas Dil, DiO y DID en la membrana celular. B) Estructura de las cabezas polares.

5. Ensayo de fusión

Para determinar el porcentaje de células doble fluorescentes se marcaron las células CD4⁺ con el colorante fluorescente de membrana Dil y las Env⁺ con DiO como se describió en la sección anterior.

Las células marcadas fueron cocultivadas por duplicado en placas de cultivo de 48 pozos, tomando 400,000 células de cada tipo marcado por pozo. La cuantificación de células

dobles fluorescentes se realizó por citometría de flujo a las 24 horas de cocultivo a 37 grados centígrados.

Para inhibir la fusión celular, se utilizó el péptido sintético T-20 que une a la proteína fusogénica gp120 e inhibe el cambio conformacional de gp41 requerido para la interacción de Env con el receptor celular CD4.

6. Análisis por citometría de flujo

El análisis de los heterocariones se realizó por citometría de flujo en el instituto de investigaciones biomédicas utilizando los equipos modelo FACSCan (Becton Dickinson), FACSCalibur (Becton Dickinson) y Attune (Applied Biosystems) y los programas de análisis Cell Quest (Becton Dickinson) y Attune citometric software (Applied Biosystems). Se capturaron 10,000 eventos para cada condición y se utilizaron células marcadas con un solo color para ajustar los parámetros iniciales del citómetro de flujo.

7. Inmunofenotipificación

Para determinar el fenotipo predominante en los heterocariones formados, se analizó la expresión de marcadores linfoides (CD3 y CD28) y mieloides (CD32 y CD68) por inmunofenotipificación por citometría de flujo utilizando los anticuerpos correspondientes acoplados al fluorocromo alofococianina (APC). Se tomaron 10 mL del cultivo de heterocariones sin marca, colocándolos en tubos de 15 mL, centrifugando y decantando.

En la siguiente tabla se describen los marcadores linfoides y mieloides analizados y su función:

Marcador celular	Tipos celulares que lo presentan	Función
CD3	Linfocitos T	Asociado con el TCR, promueve señales de activación vía TCR.
CD28	Linfocitos T	Coestimulación, proliferación y supervivencia, producción de citocinas y desarrollo de células T-Helper.
CD32	Monocitos, macrófagos, células NK, etc.	Receptor para inmunoglobulinas G. Citotoxicidad dependiente de anticuerpos mediada por células, fagocitosis.
CD68	Monocitos y Macrófagos	Homólogo humano de la macrosialina. Limpieza de restos celulares, promoción de fagocitosis, activación de macrófagos.

Tabla 2. Marcadores analizados en los ensayos de inmunofenotipificación y su función general. (Información adquirida del NCBI Gene).

Se lavaron con 1 mL de PBS 1X/Azida de sodio (0.1%) por 3 min, centrifugando a 2000 rpm y resuspendiendo en 1 mL de PBS 1X/Azida de sodio (0.1%)/SNC (2%), ajustando a 0.5×10^6 células en 50 μ L de PBS 1X/Azida de sodio (0.1%)/SNC (2%).

Se colocaron 50 μL de la suspensión ajustada en tubos de FACS en hielo. Se incubaron en hielo y oscuridad durante 30 min, eliminando el anticuerpo no unido lavando 1 vez con 2 mL de buffer (PBS/Azida de sodio 0.1%), centrifugando y resuspendiendo en 500 μL de PBS 1X/Azida de sodio 0.1%. Las muestras se analizaron en el citómetro de flujo FACSCalibur.

Ensayo de fagocitosis

Para evaluar la capacidad fagocítica de los heterocariones formados, se fusionaron las células CD4^+ sin marca con las células Env^+ marcadas con Dil (rojo), agregando después de 24 horas el inhibidor de fusión T-20 para evitar incorporación de nuevas células a los heterocariones

A las 48 horas, 2.5 millones de células de los pozos de cocultivos fueron centrifugados e incubados en presencia de 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de citocalasina-D a 200 μM (control de fagocitosis) o DMSO 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (vehículo de citocalasina-D). Se incubaron a 37 grados centígrados por 2 horas en tubos eppendorf de 1 mL.

Se lavaron los eritrocitos de carnero con 1mL de PBS BSA (0.1%) y se les agregó 300 μL (dilución 1:300) de anticuerpo anti-eritrocito monoclonal de conejo producido en el laboratorio, incubando 30 minutos en hielo. Se lavaron los eritrocitos con 1 mL de PBS y resuspendidos en 300 μL de PBS. Se les agregó 300 μL de biotina (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), incubando 20 minutos en hielo.

Se volvieron a lavar los eritrocitos y se les agregó streptoavidina-APC (300 μL de dilución 1:300) y se dejaron incubar 30 minutos en hielo.

Se lavaron los eritrocitos, se resuspendieron con las células del cocultivo y se dejaron incubar a 37 grados en tubos eppendorf de 1 ml. Se sometió a los heterocariones a un *shock*

hipotónico agregando 1 mL de agua doblemente desionizada por 10 segundos. Se analizaron los cocultivos incubados con los eritrocitos marcados en busca de heterocariones con fluorescencia mixta y positiva para el marcador fluorescente APC.

8. Microscopía de fluorescencia

Las células que fueron sometidas a ensayo de fagocitosis también fueron observadas por microscopía de fluorescencia. Se utilizó el microscopio confocal LSM 5 PASCAL (Zeiss).

Las células vivas (sin fijar) se colocaron en placa para muestras en fresco y se llevaron al cuarto de microscopía del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Se tomaron 60 fotografías para la fluorescencia verde, roja y APC. Para analizar el porcentaje de células los heterocariones con fluorescencia mixta se utilizó el programa Image J (NIH) y se realizó un conteo total de células para determinar el porcentaje de heterocariones.

9. Análisis estadísticos

En los ensayos de inmunofenotipificación se analizó la diferencia del índice de intensidad media de fluorescencia de grupos utilizando el análisis de varianza ($P=0.05$), utilizando el programa Sigma Stat (Systat Software). El índice de intensidad media de fluorescencia se obtuvo restando la intensidad media fluorescente del pegado específico del anticuerpo y la del control de isotipo, dividiendo entre la del isotipo. Se obtuvo la media geométrica de los índices de intensidad media fluorescente para su análisis estadístico.

RESULTADOS

1. Inmunofenotipificación.

Para analizar la expresión de marcadores linfoides y mieloides en los heterocariones, se realizaron ensayos de fusión utilizando los colorantes lipofílicos DiO (verde) y Dil (rojo) como se describió en la metodología. Después de analizar la fusión celular por citometría de flujo y su inhibición utilizando el péptido sintético T-20 (tabla 3 y figura 11), se inmunofenotipificaron los heterocariones y las células no fusionadas con anticuerpos monoclonales asociados al fluorocromo APC. Para descartar la posibilidad de que nuevas células incorporadas a los heterocariones pudieran modificar su fenotipo, se agregó el péptido inhibidor de fusión T-20 a los cocultivos después de 24 horas de incubación cuando se tenía un 12% de células fusionadas. Se analizó la intensidad de fluorescencia y el porcentaje de células que expresaron los marcadores linfoides y mieloides a 24, 48 y 72 horas de cocultivo, estandarizando los datos obtenidos.

Analizando el porcentaje de expresión de los marcadores, observamos que los heterocariones y monocitos no fusionados, presentan una tendencia similar de expresión (tabla 4).

Al analizar la intensidad de fluorescencia para cada marcador, también pudimos observar que la tendencia de los marcadores mieloides en los heterocariones es muy similar a la mostrada por los monocitos no incorporados (figuras 12, 13 y 14). La expresión de marcadores linfoides y mieloides en los heterocariones con péptido inhibidor T-20 fue similar al de los heterocariones sin inhibidor de fusión. De manera contrastante observamos que los marcadores linfoides se encuentran expresados en bajos niveles en comparación a la de los linfocitos que no se fusionaron.

La tendencia de intensidad de fluorescencia de los marcadores se mantuvo hasta las 72 horas de cultivo de heterocariones (figuras 13 y 14). Los resultados anteriores nos sugieren que los heterocariones conservan el fenotipo mielode aportado por los monocitos que se incorporaron, sin embargo el fenotipo linfoide correspondiente a los linfocitos, disminuye considerablemente.

Día	Cocultivo (porcentaje de fusión)	Cocultivo + T-20 (porcentaje de fusión control)
1	13.65	1.2
2	17.25	0.80
3	16.72	1.01 (figura 11)

Tabla 3. Porcentaje de células con fluorescencia mixta obtenidas en ensayo de inmunofenotipificación. Los datos representan la media geométrica de duplicados del porcentaje de fusión por día. Como control de fusión se agregó el péptido T-20 a pozos adicionales al momento de cocultivar las células.

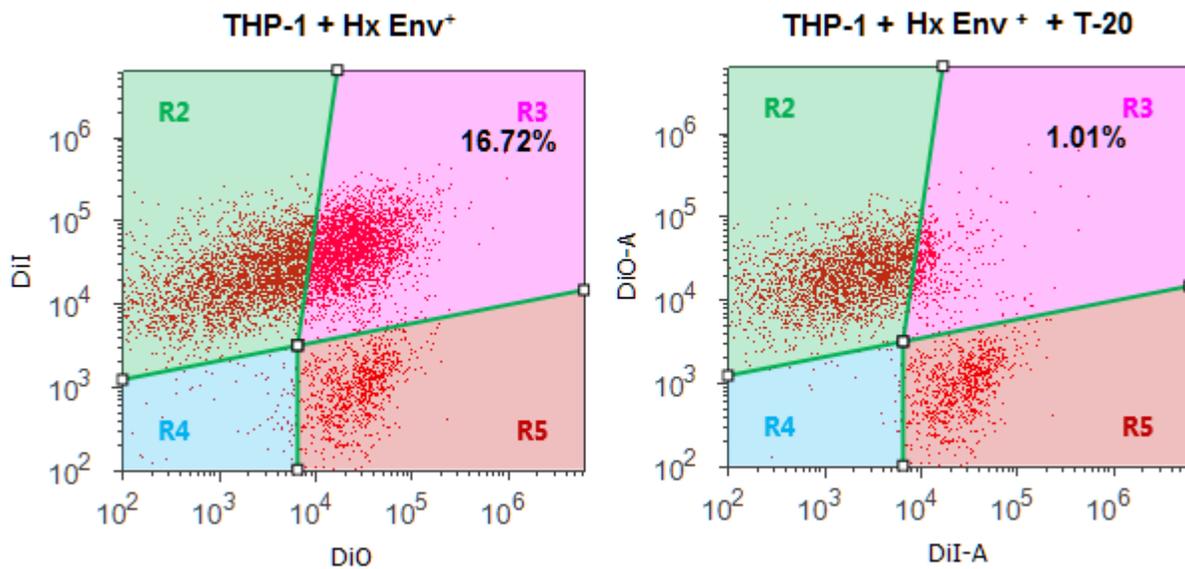


Figura 11. Ejemplo de control de fusión. Inhibición de la fusión celular utilizando el péptido sintético T-20.

	Marcadores linfoides				Marcadores mieloides			
	CD3 porcentaje		CD28 porcentaje		CD32 porcentaje		CD68 porcentaje	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD
Linfocitos	76.05	3.79	86.76	2.72	23.99	0.50	30.59	0.19
Monocitos	24.09	0.32	28.76	3.84	82.77	0.39	88.34	0.15
Heterocariones	24.01	0.21	24.03	2.10	84.53	0.25	89.04	0.12
Heterocariones + T-20	23.45	0.40	21.34	1.23	80.45	0.56	86.90	0.56

Tabla 4. Porcentaje de expresión de marcadores linfoides y mieloides en los cocultivos de células Env⁺ y THP-1. Promedio de expresión de 3 ensayos a 48 horas de cocultivo. Media geométrica y desviación estándar (SD)

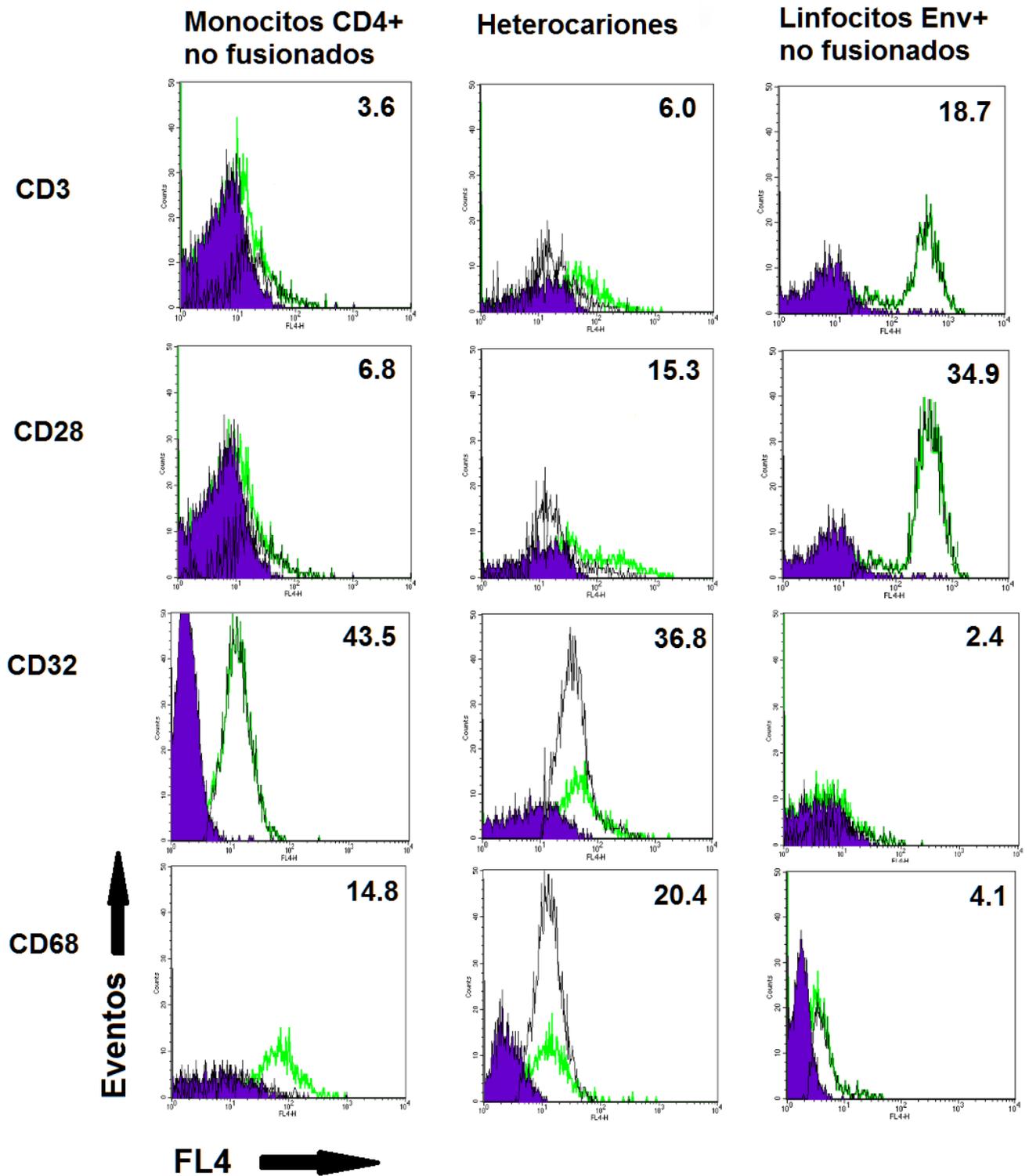


Figura 12. Intensidad de fluorescencia para marcadores linfoides y mieloides analizados a las 48 horas de cocultivo con adición de T-20. En morado se representa el anticuerpo control isotipo (pegado inespecífico).

Marcadores linfoides

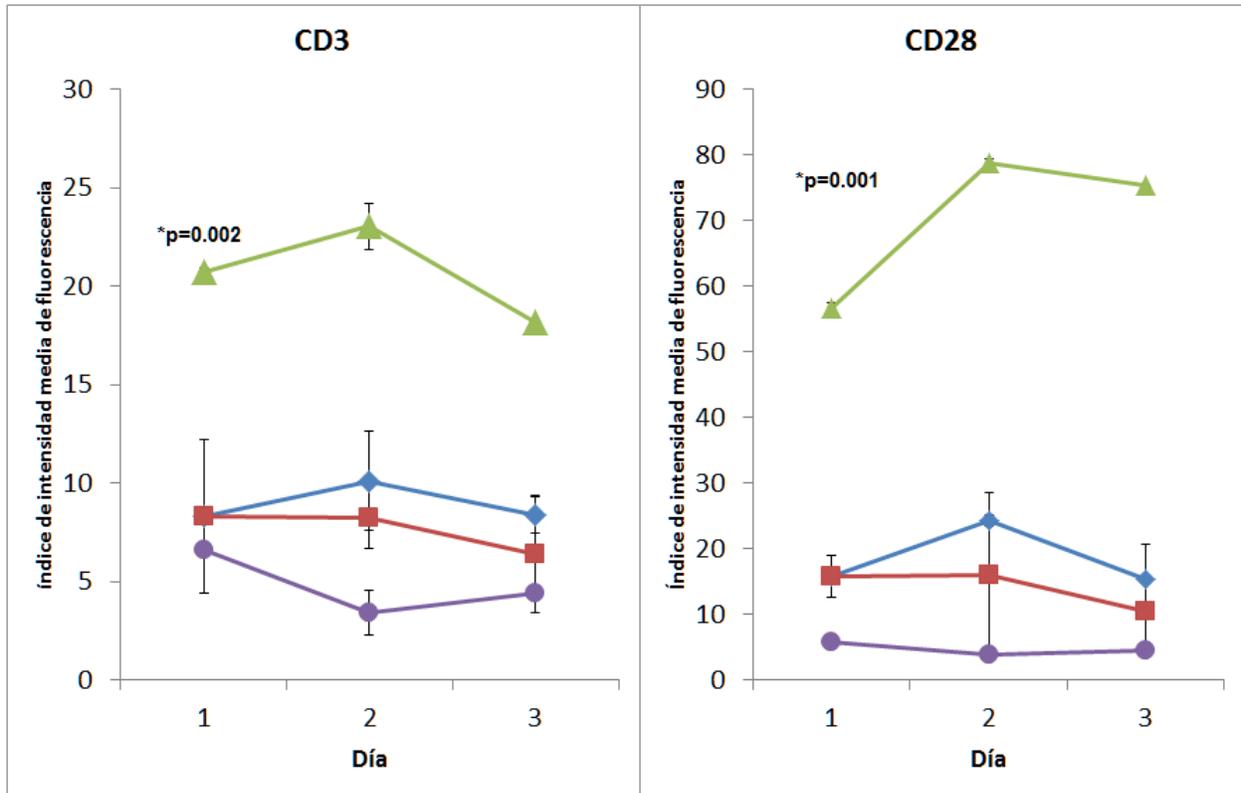


Figura 13. Promedio de los índices de intensidad media de fluorescencia y desviaciones estándar para los marcadores linfoides analizados hasta 3 días. La línea verde con triángulos ▲ representa a los linfocitos no fusionados. La línea azul con rombos ◆ representa a los heterocariones sin T-20. La línea roja con cuadrados ■ representa los heterocariones con T-20. La línea morada con círculos ● representa a los monocitos no fusionados.

Marcadores mieloides

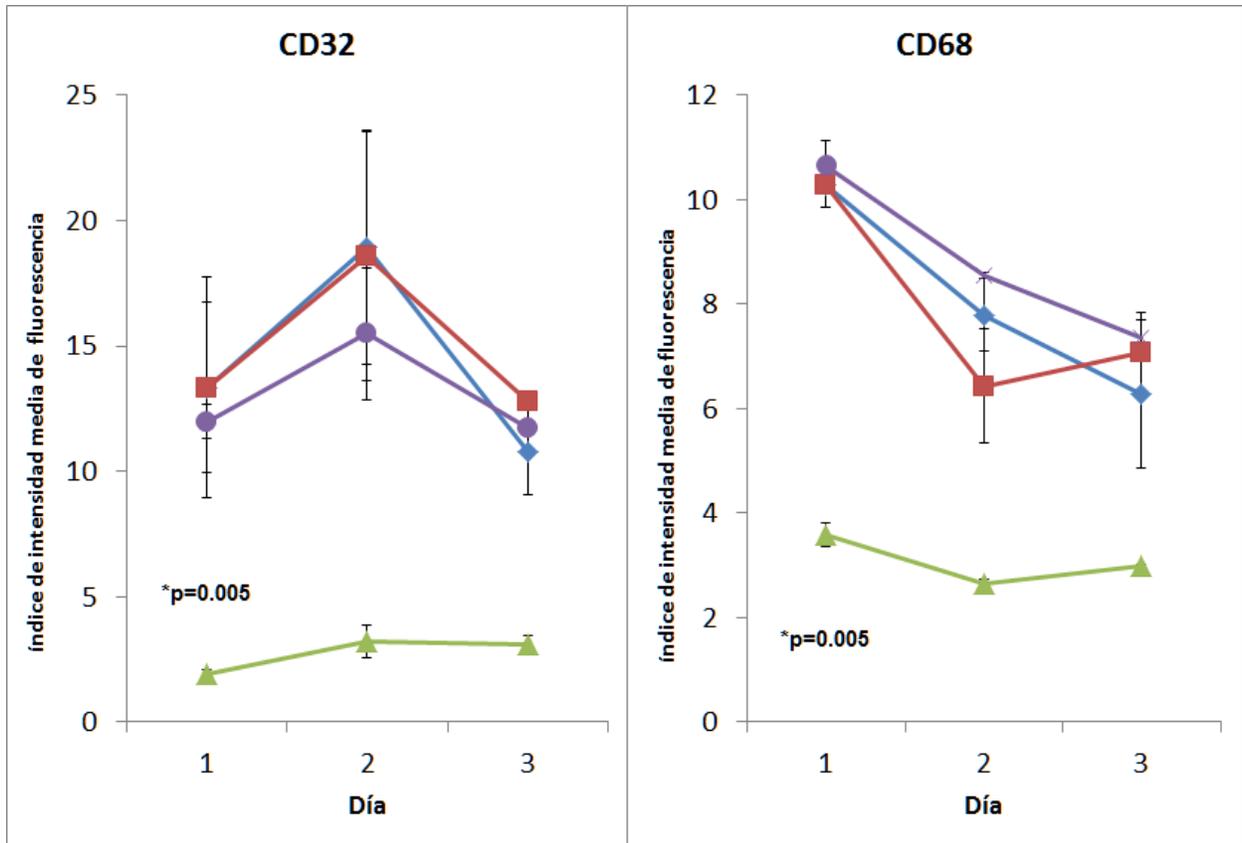


Figura 14. Promedios de los índices de intensidad media de fluorescencia y desviaciones estándar para los marcadores mieloides analizados hasta 3 días. La línea verde con triángulos ▲ representa a los linfocitos no fusionados. La línea azul con rombos ◆ representa a los heterocariones sin T-20. La línea roja con cuadrados ■ representa los heterocariones con T-20. La línea morada con círculos ● representa a los monocitos no fusionados.

2. Fagocitosis

Dados los resultados anteriores, fue de nuestro interés estudiar la actividad fagocítica de los heterocariones, ya que los monocitos presentan una alta actividad fagocítica.

Para analizar esta posibilidad, los heterocariones formados fueron puestos en contacto con eritrocitos de carnero biotinilados y opsonizados. Estos eritrocitos fueron marcados con estreptoavidina acoplada al fluorocromo APC. Los eritrocitos no fagocitados fueron removidos del medio de cultivo por medio de un *shock* hipotónico con agua desionizada.

Posteriormente se analizaron los heterocariones por citometría de flujo en búsqueda de células con fluorescencia mixta que presentaran incorporación de APC el cual se detectó en el canal de fluorescencia FL-4.

Como control negativo se utilizó citocalasina-D, un metabolito que inhibe la polimerización de actina de citoesqueleto y por lo tanto inhibe la fagocitosis. También como control, se incubaron los heterocariones con eritrocitos a 4 grados centígrados para inhibir el metabolismo celular y por lo tanto la actividad fagocítica.

Los resultados obtenidos mostraron que en promedio un 50% de los heterocariones presentan actividad fagocítica, en un porcentaje similar al de las células THP-1 (figuras 15 y 16, tabla 5). Esto resulta interesante, ya que la actividad fagocítica de los heterocariones no se ve disminuida en comparación a la de los monocitos precursores, reiterando una dominancia del fenotipo mieloide en los heterocariones. Como era de esperar los linfocitos no presentaron actividad fagocítica (figura 15). También observamos que en los heterocariones tratados con citocalasina-D y temperatura de 4 grados centígrados, hubo una inhibición de la actividad fagocítica (figura 16).

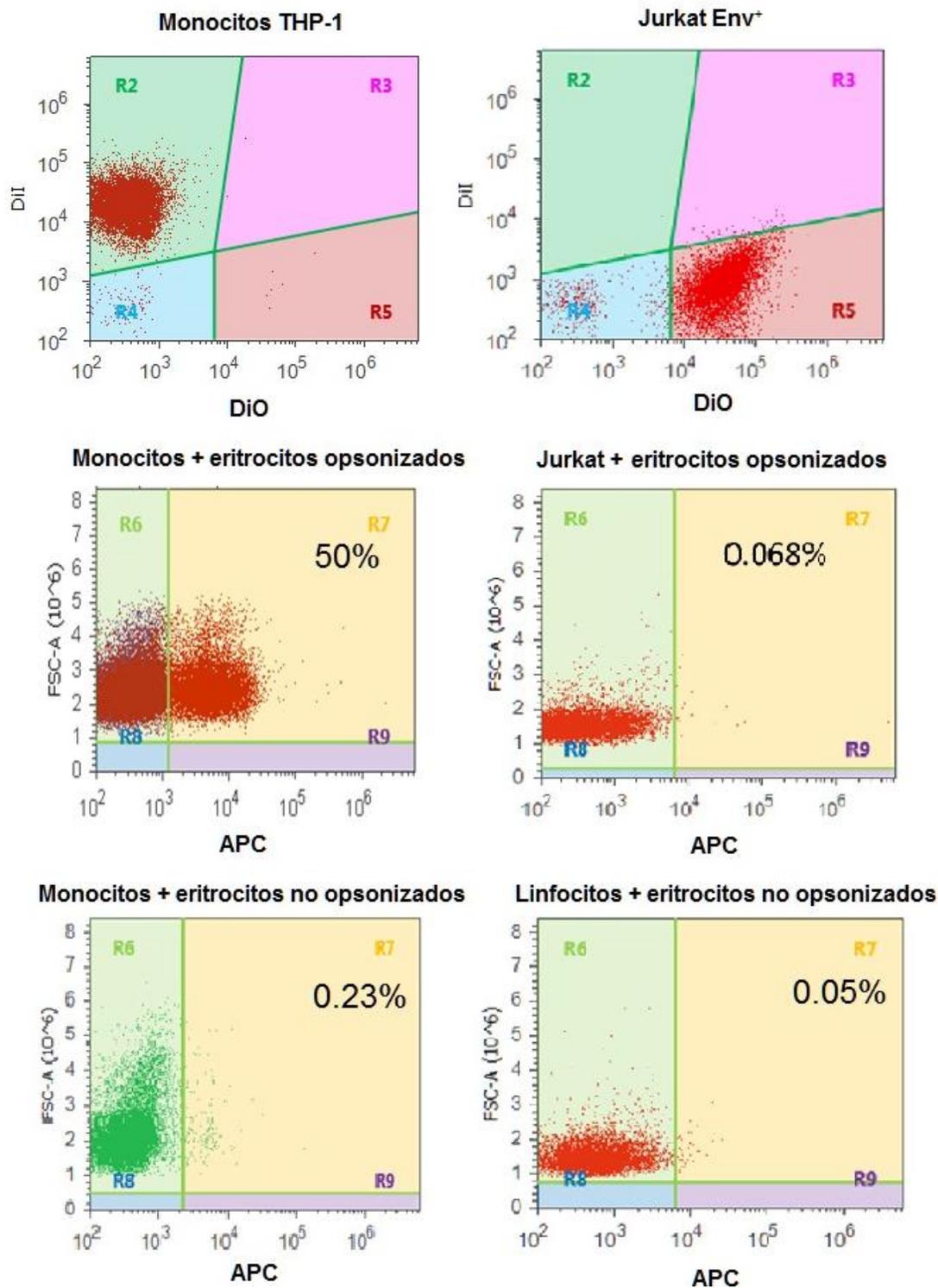


Figura 15. Análisis por citometría de células monocíticas THP-1 y Jurkat Env⁺ sometidas a ensayo de fagocitosis. En los 2 cuadros superiores se analiza la fluorescencia roja (DiI) contra la verde (DiO) para los monocitos y los linfocitos. En los cuadros restantes se analiza la internalización de eritrocitos teñidos con APC en los monocitos y linfocitos. Se observó un 50% de monocitos positivos para APC.

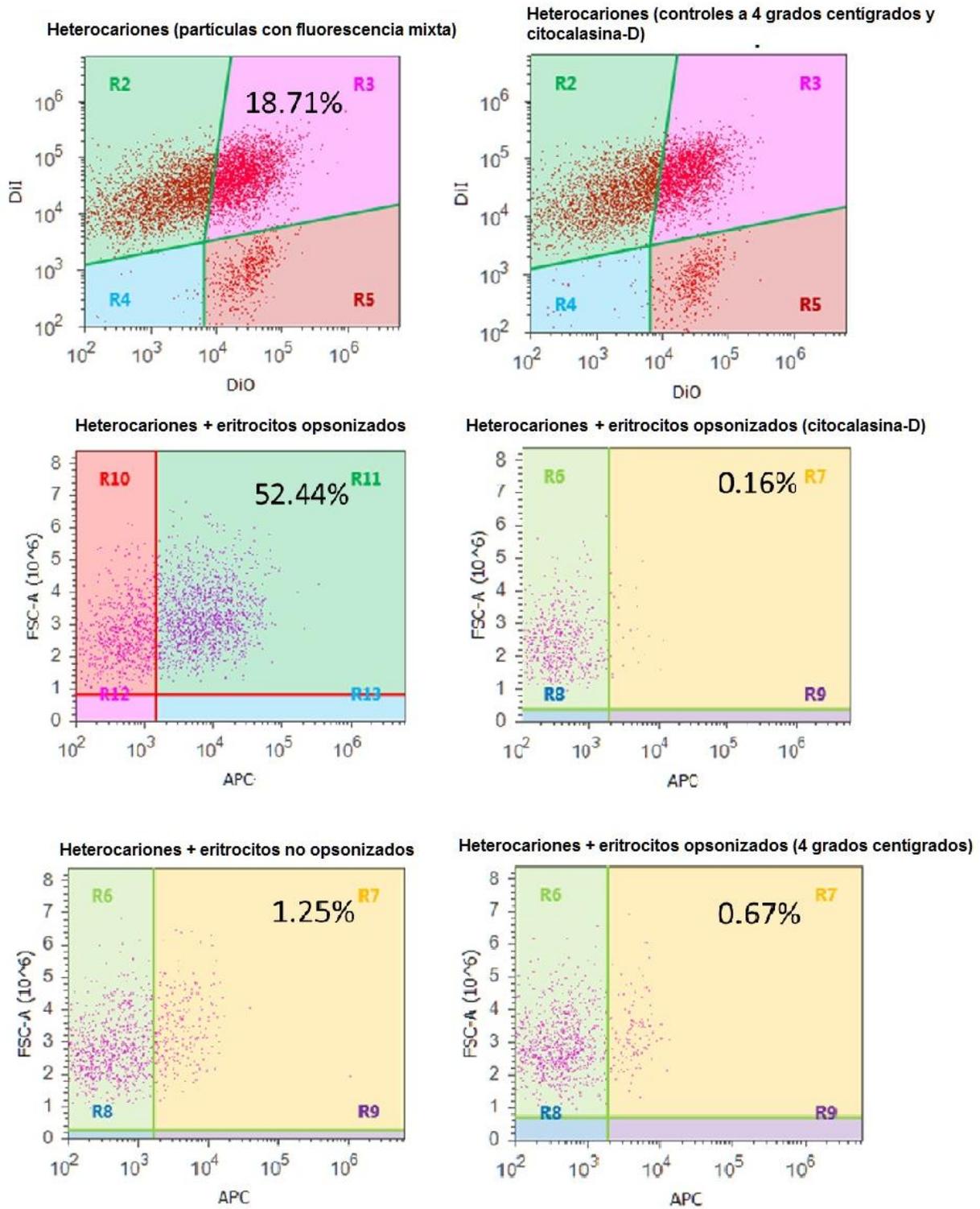


Figura 16. Análisis por citometría de flujo de los heterocariones sometidos a fagocitosis y sus controles. En los 2 cuadros superiores se analiza el porcentaje de células con fluorescencia mixta en los cocultivos (positivas para Dil y DiO). En los cuadros restantes se analiza la internalización de eritrocitos (marcados con APC) por las células con fluorescencia mixta.

	Eritrocitos opsonizados		Eritrocitos no opsonizados	
	Media geométrica	Desviación estándar	Media geométrica	Desviación estándar
Monocitos	51.04 %	6.30	1.37 %	0.12
Linfocitos	0.57 %	0.13	0.48 %	0.34
Heterocariones	47.02 %	4.33	2.18 %	0.05
Control 4 grados	0.51 %	0.03		
Control Cit-D	0.17 %	0.01		

Tabla 5. Porcentaje de actividad fagocítica en células monocíticas y linfocíticas no fusionadas, heterocariones y controles. Se presenta la media geométrica de datos obtenidos en 3 diferentes ensayos de fagocitosis con duplicados y su desviación estándar.

3. Microscopía de fluorescencia

Los heterocariones utilizados en los experimentos de fagocitosis, fueron también observados por microscopía de fluorescencia en busca de imágenes que soportaran los datos obtenidos en citometría de flujo.

Como era esperado se observaron los heterocariones doble fluorescentes con eritrocitos marcados en su interior (figuras 17 y 18).

Pudimos observar también que el número de eritrocitos fagocitados es heterogéneo lo cual nos sugiere que los heterocariones presentan diferentes niveles de actividad fagocítica.

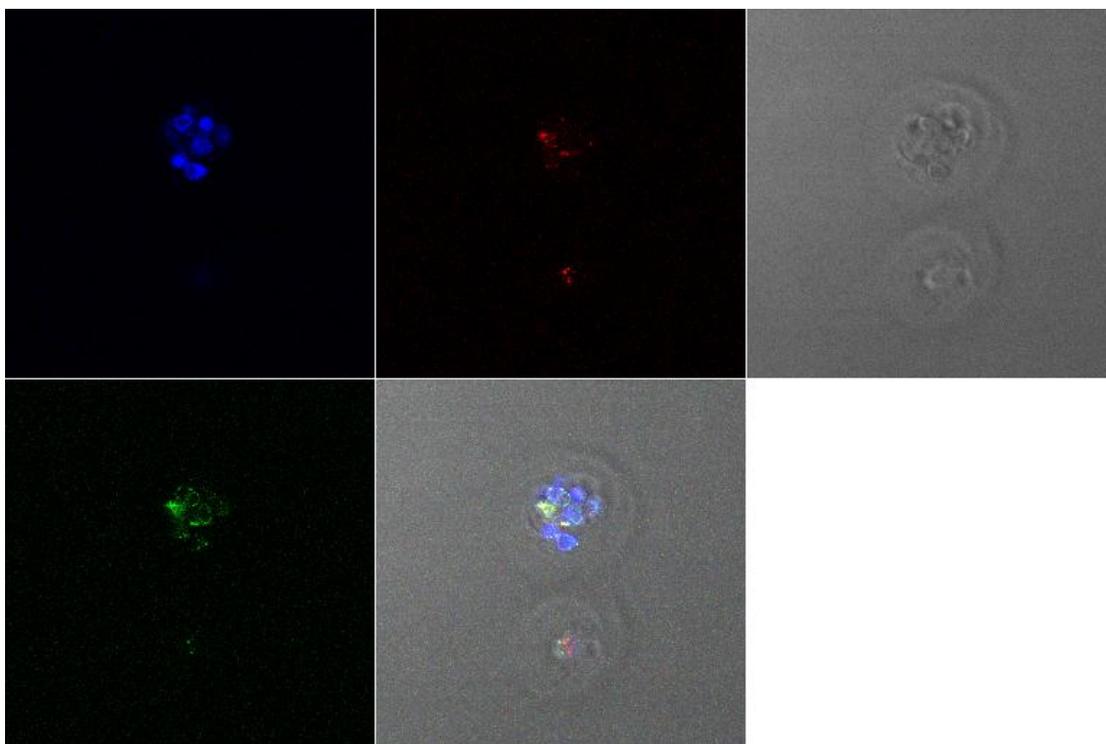


Figura 17. Heterocarión conteniendo eritrocitos en su citoplasma, captado por microscopía de fluorescencia. En azul se muestran los eritrocitos marcados con APC. Los colores rojo y verde corresponden a la fluorescencia de los colorante DiI y DiO respectivamente. La foto de campo claro (arriba a la derecha) muestra que hay dos células. La que está en posición superior ha fagocitado eritrocitos, mientras que la inferior no.

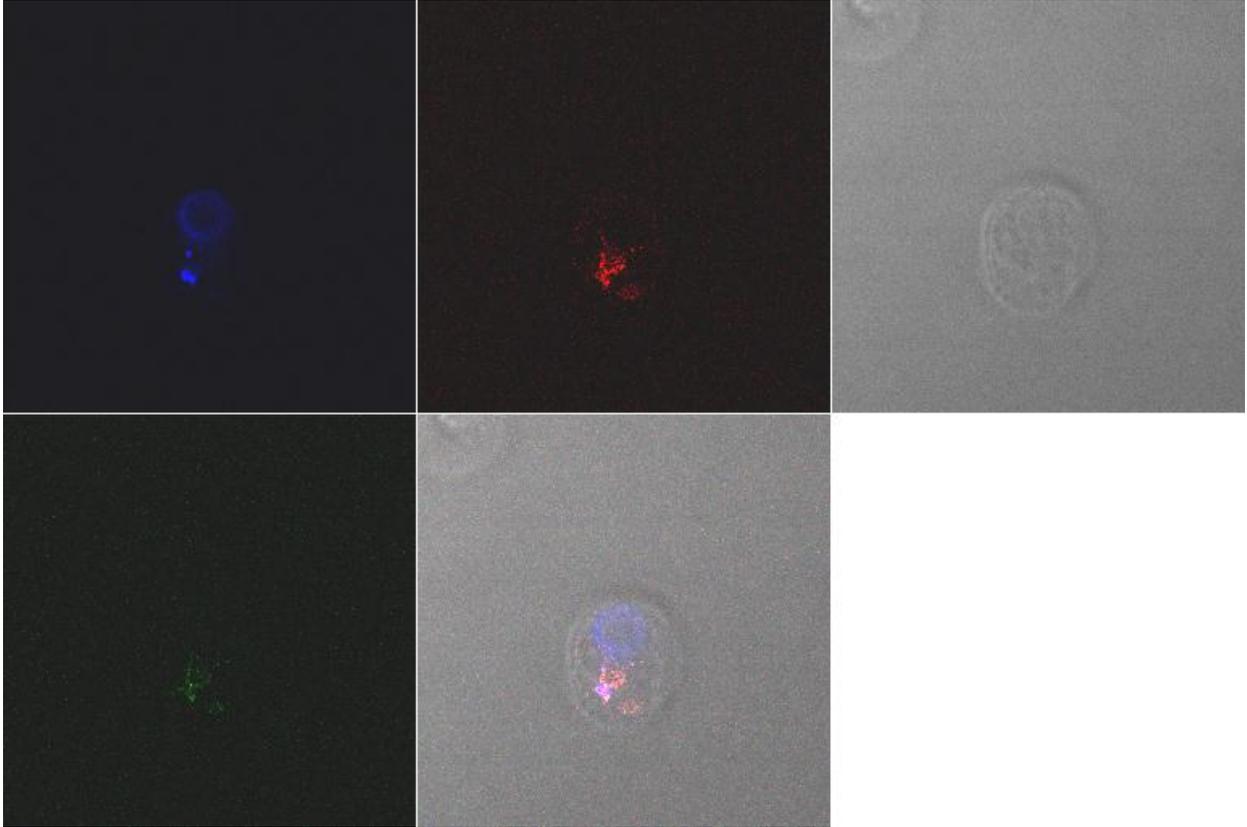


Figura 18. *Heterocarion* conteniendo eritrocitos en su citoplasma, captado por microscopia de fluorescencia.

4. Adherencia a la placa de cultivo y cambio de morfología.

Adicionalmente observamos que los heterocariones formados presentaban tendencia a pegarse al fondo de la placa de cultivo y cambiar su morfología. Este fenómeno resulta similar al cambio morfológico que sufren los monocitos al diferenciarse en macrófagos. Dada esa observación, fue de nuestro interés analizar esta tendencia de adhesión y posible diferenciación. Para ello se realizó un experimento preliminar en el que se formaron heterocariones y se incubaron con fragmentos de vidrio borosilicato para permitir adherencia.

Posteriormente se observaron por microscopia en busca de células aparentemente adheridas al vidrio y con fluorescencia mixta. Al analizar las fluorescencias observamos que del total de heterocariones en la placa, el 54% presentan aparente adherencia (tabla 6) y cambio en su morfología (figura 19). Esto coincide con el porcentaje obtenido de células que presentan actividad fagocítica. Existe la posibilidad de que la fusión celular sea también un estímulo de diferenciación en el caso de los heterocariones. Es necesario investigar esta posibilidad a fondo. Como se puede ver en la figura 19, los heterocariones encontrados presentan una morfología y tamaño heterogéneos. Pudimos observar heterocariones con forma alargada o estrellada, así como pequeños y redondos.

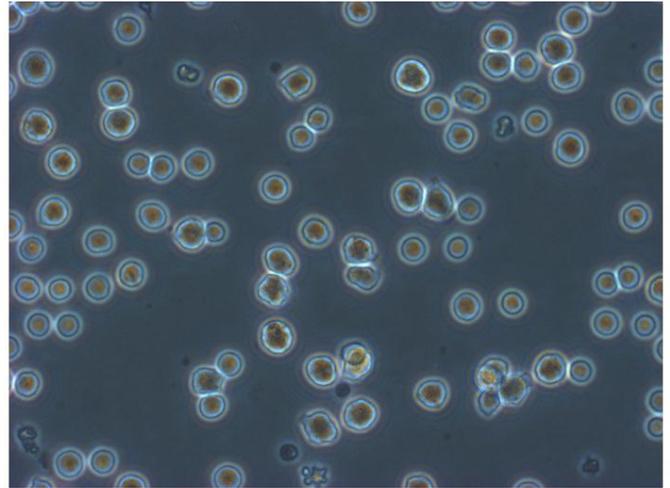
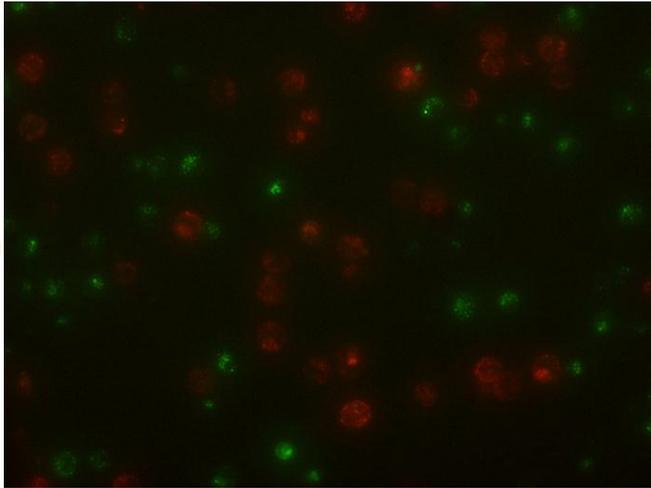
Células totales	Heterocariones totales	Heterocariones con morfología alterada y aparente adherencia	Linfocitos verdes no incorporados	Monocitos rojos no incorporados
1260	162 (12.85%)	88 (54.32%)	614 (48.73%)	484 (38.41%)

Tabla 6. Conteo total de heterocariones y células no fusionadas.

Fluorescencias verde y roja

Campo claro

Cocultivo de células Jurkat Env⁻ 522 no fusogénicas con células monocíticas THP-1



Cocultivo de células Jurkat Env⁺ fusogénicas y células monocíticas THP-1

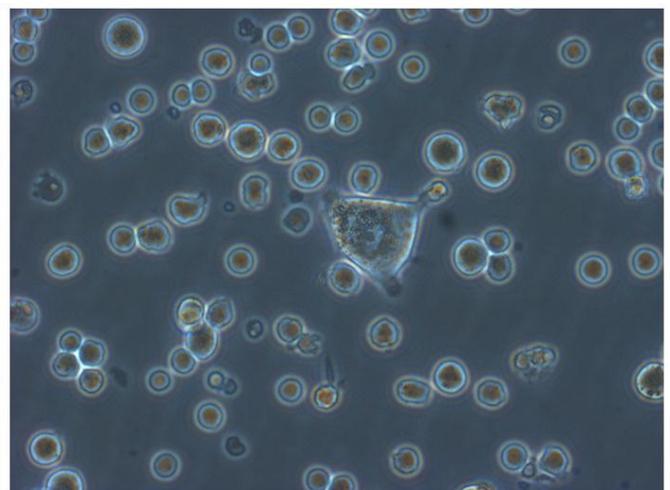
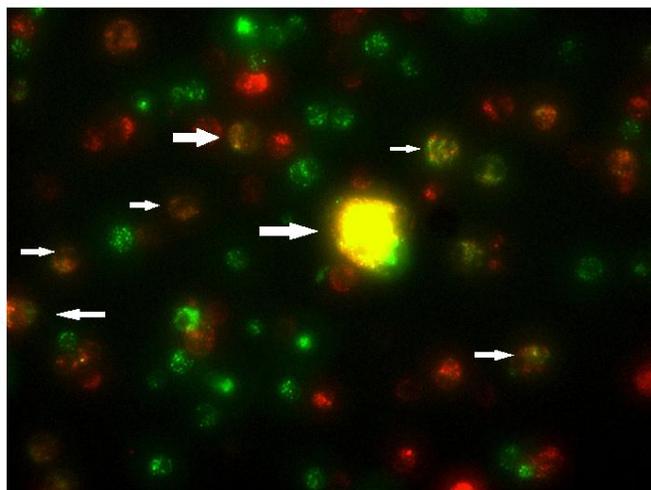
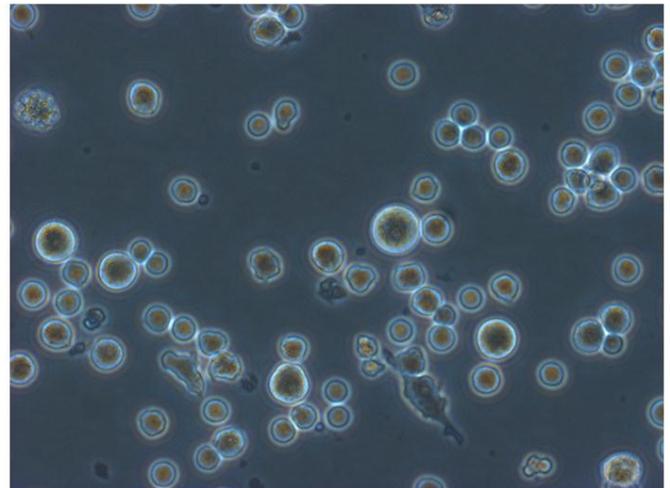
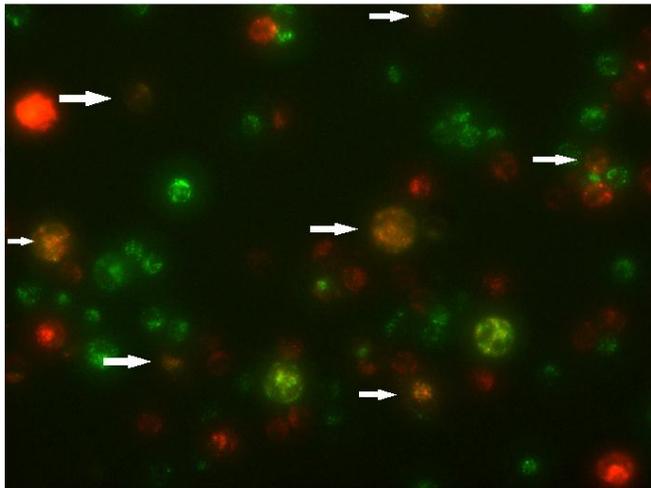


Figura 19. Detección de los heterocariotes por microscopía de fluorescencia y aspecto de los cocultivos en microscopía de campo claro. Se muestran 2 campos en donde se observan células fusionadas, detectadas mediante la superposición de los colores verde y rojo, produciendo un tono amarillo. Los heterocariotes muestran una morfología alterada y aparente adhesión parcial a la placa de cultivo (columna de campo claro). Se observan células con morfología alargada que sugiere adhesión a la placa de cultivo. Las flechas blancas señalan a los heterocariotes de color naranja.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En la actualidad los estudios sobre la presencia e importancia de los policariones en la infección por el VIH son muy escasos. A pesar de ello, se ha sugerido que las células fusionadas pueden tener un papel importante en la patogénesis y progresión a SIDA. Como se mencionó en la introducción, estudios previos han demostrado la presencia de policariones en tejidos de individuos infectados. Asimismo, la presencia de virus inductores de sincicios en la sangre de los pacientes, se asocia con progresión a SIDA. En algunos estudios, el análisis de las moléculas expresadas por los policariones, ha sugerido un origen mielóide (22 – 25).

En nuestro laboratorio se ha estudiado ampliamente la fusión de células linfocíticas que expresan las glicoproteínas de la envoltura del VIH (células Env⁺), con células linfocíticas CD4⁺. En estos estudios se ha caracterizado ampliamente un método de citometría de flujo para el estudio cuantitativo de la fusión celular (ver introducción).

Previamente, Rivera-Toledo y colaboradores demostraron que las células linfocíticas Env⁺ son capaces de fusionarse con células de la línea monocítica THP-1 (41). Las evidencias de la fusión fueron: a) el cocultivo de células THP-1 teñidas con DiI y células Env⁺ teñidas con DiO, produce células con fluorescencia mixta que además muestran mayor tamaño y granularidad que las células individuales, b) las células con fluorescencia mixta muestran una mayor fluorescencia roja que las células CD4⁺ individuales, indicando transferencia de energía de la fluorescencia (FRET) entre los colorantes, c) el cocultivo de células THP-1 con células Env⁺ no fusogénicas, no generó células con fluorescencia mixta, d) la formación de las células con fluorescencia mixta fue inhibida por el péptido inhibidor T-20 y por un anticuerpo monoclonal anti-CD4, e) las células con fluorescencia mixta mostraron la expresión tanto de marcadores monocíticos como linfocíticos.

En dichos estudios previos además se observó que: a) a las 24 de cocultivo, los heterocariones mostraron una expresión de marcadores de superficie compatible con un fenotipo predominante mielóide, b) los heterocariones mantuvieron una viabilidad del 50% después de 4 días de cocultivo, c) la presencia de células alargadas y aparentemente adheridas al fondo de la placa de cultivo.

En el presente trabajo se caracterizó ampliamente a los heterocariones, determinando la expresión de marcadores linfoides y mieloides hasta por 3 días, estudiando su actividad biológica (fagocitosis) y caracterizando la identidad de las células que presentaron el cambio morfológico descrito antes.

Como se pudo observar en los resultados mostrados, obtuvimos heterocariones cocultivando células monocíticas CD4⁺ y linfocíticas Env⁺. Al analizar los cocultivos por citometría de flujo, pudimos observar el fenómeno de FRET en las células con fluorescencia mixta, un criterio que nos sirve para diferenciar fusiones de agregados, como se mostró previamente (36). El fenómeno de FRET entre los colorantes utilizados, indica que ha ocurrido mezcla de los lípidos de la membrana de ambas células, lo cual constituye una evidencia de la formación de heterocariones.

Como se pudo apreciar en los resultados de inmunofenotipificación, los heterocariones cultivados hasta 72 horas conservaron la expresión de los marcadores mieloides CD32 y CD68. En contraste, se observó una disminución considerable de la expresión de los marcadores linfoides CD3 y CD28. En los cocultivos es posible que la incorporación de nuevas células a los heterocariones ya formados modifique constantemente la expresión de los marcadores de superficie. Con el propósito de permitir la estabilización del fenotipo de estas células, se agregó el péptido inhibidor T-20 a los cocultivos después de permitir la fusión celular. En presencia de T-20 los heterocariones mostraron una tendencia hacia la menor expresión de los marcadores

linfoides, aunque la diferencia con los heterocariones sin T-20 no fue significativa. Sin embargo esta tendencia sugiere que el bloqueo de la fusión de células adicionales, indujo una reducción mayor de la expresión de los marcadores linfoides en los heterocariones, mientras que la expresión de los marcadores mieloides se mantuvo alta y constante. Esto nos sugiere que durante la infección por el VIH, se podrían generar heterocariones linfocito-monocito que conserven el fenotipo de los monocitos parentales, sin mostrar evidencias de su origen como células fusionadas.

Los resultados de los experimentos de fagocitosis mostraron que el 50% de los heterocariones tuvo actividad fagocítica dependiente de receptores Fc. Este porcentaje fue muy similar al de los monocitos CD4+ precursores (51%). En conjunto con los resultados de inmunofenotipificación, estos resultados muestran que el fenotipo mieloides es fuertemente dominante en los heterocariones.

Para determinar si los heterocariones modifican su morfología con respecto a las células no fusionadas, se realizó un experimento preliminar en el cual las células cocultivadas conteniendo heterocariones, se transfirieron a otra placa de cultivo agregando fragmentos de vidrio de borosilicato para promover adherencia. Por microscopía de fluorescencia mostramos que las células alargadas y aparentemente adheridas al fondo de la placa de cultivo son heterocariones, ya que presentaron fluorescencia mixta. Sin embargo, no todos los heterocariones tuvieron esta morfología. Pudimos observar también heterocariones redondos o alargados de tamaño menor (similares a las células no fusionadas), así como heterocariones grandes, alargados o estrellados, aparentemente adheridos al fondo de la placa. Por lo tanto, los heterocariones mostraron una gran heterogeneidad morfológica. En general, 50% de los heterocariones mostraron una morfología claramente distinta a la de las células individuales.

Existe la posibilidad de que el 50% de heterocariones que fagocitaron correspondan a los monocitos que presentaron una morfología diferente. Es necesario investigar esta posibilidad a futuro. Además es interesante que los monocitos no fusionados también presentaron un 50% de fagocitosis. Este porcentaje de fagocitosis podría ser una propiedad de los monocitos, la cual es mantenida por los heterocariones.

La morfología alargada y la adhesión al fondo de la placa de cultivo, nos recuerdan al comportamiento de los monocitos activados (46). Esta observación plantea la posibilidad de que la fusión celular actúe como un estímulo de diferenciación en una subpoblación de heterocariones. Esta activación podría deberse a la interacción de las glicoproteínas del complejo Env con receptores del sistema inmune innato como los de tipo Toll 4 (TLR4). Diversos estudios han mostrado que este receptor reconoce las glicoproteínas Env del Virus sincicial respiratorio (RSV), así como del Virus de tumor mamario en ratones (MMTV) (48). Este reconocimiento tiene como consecuencia la activación celular y secreción de citosinas proinflamatorias por la vía de NF- κ B. Es posible que el complejo Env del VH-1 sea también reconocido por el TLR4 o algún otro receptor de tipo Toll, sin embargo no existen estudios al respecto.

PERSPECTIVAS

De acuerdo los resultados mostrados en esta tesis, consideramos que sería importante estudiar el destino del VIH en los heterocariones así como el posible comportamiento pro inflamatorio y migratorio de los heterocariones frente a estímulos de activación como LPS. Esta información sería de gran importancia para poder comprender a nivel integral la dinámica de la patogénesis del VIH, así como el destino de los heterocariones y sus posibles papeles en la progresión a SIDA.

Diversos estudios han descrito que pacientes infectados con el VIH y que se encuentran en la fase crónica de la enfermedad, presentan translocación de antígenos bacterianos del intestino al torrente sanguíneo. Esto provoca una activación descontrolada del sistema inmune de los pacientes. Estudios recientes han mostrado correlación entre la translocación microbiana que sufren los individuos infectados por VIH en etapas crónicas y la activación de monocitos por interacción con lipopolisacarido (LPS). Dichos estudios sugieren que los monocitos activados crónicamente migran al SNC, y pueden causar demencia asociada a VIH (HAD) (42).

No existen estudios sobre el efecto de la translocación microbiana en heterocariones formados por células del linaje mieloide, sin embargo es importante estudiar esta posibilidad, ya que la formación de heterocariones con actividad migratoria, podría representar una vía de propagación viral efectiva hacia el sistema nervioso central. Es importante analizar esta posibilidad en estudios futuros.

Cabe destacar que no se ha analizado la viabilidad de los heterocariones a tiempos más largos de 72 horas. Dichos análisis serían más apropiados utilizando cultivos primarios de monocitos de sangre periférica, ya que las líneas utilizadas podrían presentar un comportamiento distinto. Analizar la viabilidad de heterocariones será de gran importancia, ya que el potencial de los heterocariones como reservorios virales se vería favorecido con periodos de vida largos.

CONCLUSIONES

1. El contacto entre células monocíticas CD4⁺ y linfocitos que expresan el complejo Env, conduce a la formación de heterocariones.
2. Estos heterocariones poseen un predominio del fenotipo mielóide aportado por los monocitos incorporados, perdiendo el fenotipo linfóide.
3. Los heterocariones también conservan la actividad fagocítica característica de los monocitos, que pudo ser observada por microscopía de fluorescencia.
4. Los heterocariones parecen presentar signos de diferenciación a macrófagos, cambiando su morfología y adhiriéndose a la superficie de la placa de cultivo.
5. Los resultados mostrados sugieren una gran posibilidad de que exista fusión celular linfocito-monocito en individuos infectados con VIH.

APÉNDICE

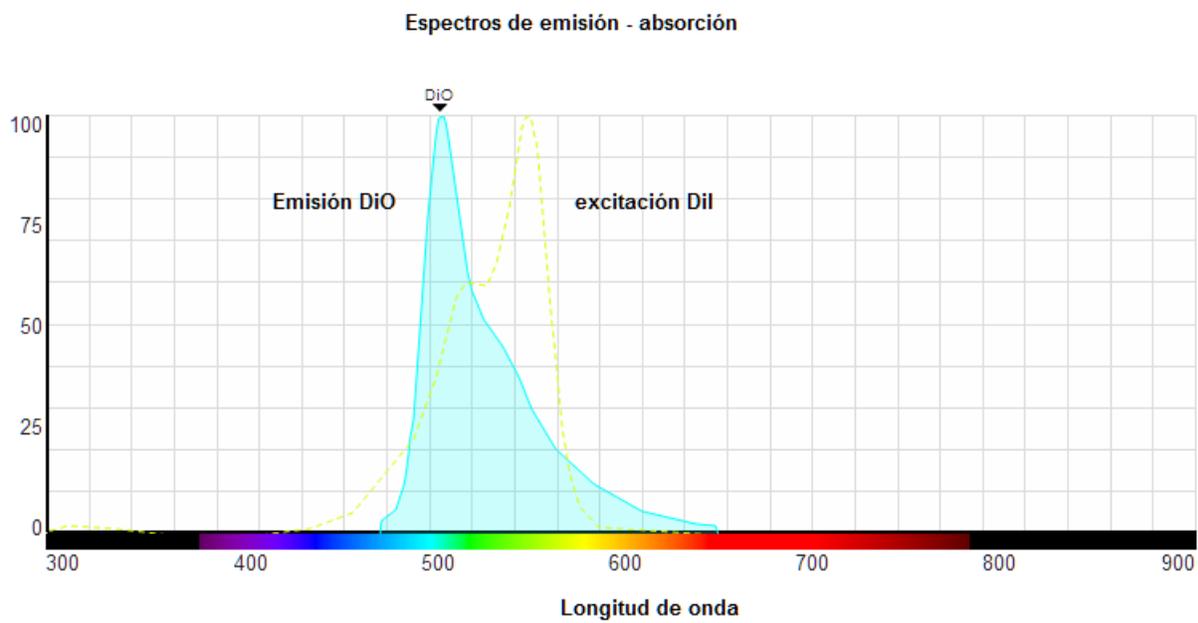


Figura 20. Espectros de emisión y absorción de los comolantes DiO (verde) y Dil (rojo). Se observa el traslape entre ambos espectros, lo que explica el fenómeno de FRET.

BIBLIOGRAFÍA

1. Higuera EA, Jaimes FA, Rugeles MT, Montoya CJ. In vivo effect of statins on the expression of the HIV co-receptors CCR5 and CXCR4. *AIDS Res Ther.* 2013 May 1;10(1):10.
2. Sattentau Q. Avoiding the void: cell-to-cell spread of human viruses. *Nat Rev Microbiol.* 2008 Nov;6(11):815-26.
3. Sodroski J, Goh WC, Rosen C, Campbell K, Haseltine WA. Role of the HTLV-III/LAV envelope in syncytium formation and cytopathicity. *Nature.* 1986 Jul 31-Aug 6;322(6078):470-4.
4. Lifson JD, Feinberg MB, Reyes GR, Rabin L, Banapour B, Chakrabarti S, Moss B, Wong-Staal F, Steimer KS, Engleman EG. Induction of CD4-dependent cell fusion by the HTLV-III/LAV envelope glycoprotein. *Nature.* 1986 Oct 23-29;323(6090):725-8.
5. Eckert DM, Kim PS. Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. *Annu Rev Biochem.* 2001;70:777-810.
6. Zhu P, Liu J, Bess J Jr, Chertova E, Lifson JD, Grisé H, Ofek GA, Taylor KA, Roux KH. Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes. *Nature.* 2006 Jun 15;441(7095):847-52.
7. Gallaher WR, Ball JM, Garry RF, Griffin MC, Montelaro RC. A general model for the transmembrane proteins of HIV and other retroviruses. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1989 Aug;5(4):431-40.
8. Chernomordik LV, Kozlov MM. Mechanics of membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol.* 2008 Jul;15(7):675-83. doi: 10.1038/nsmb.1455.
9. Koot M, Vos AH, Keet RP, de Goede RE, Dercksen MW, Terpstra FG, Coutinho RA, Miedema F, Tersmette M. HIV-1 biological phenotype in long-term infected individuals evaluated with an MT-2 cocultivation assay. *AIDS.* 1992 Jan;6(1):49-54.
10. Karlsson A, Parsmyr K, Sandström E, Fenyö EM, Albert J. MT-2 cell tropism as prognostic marker for disease progression in human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Clin Microbiol.* 1994 Feb;32(2):364-70.
11. Berger EA, Murphy PM, Farber JM. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol.* 1999;17:657-700.
12. Connor RI, Sheridan KE, Ceradini D, Choe S, Landau NR. Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1-infected individuals. *J Exp Med.* 1997 Feb 17;185(4):621-8.
13. Blaak H, van't Wout AB, Brouwer M, Hooibrink B, Hovenkamp E, Schuitemaker H. In vivo HIV-1 infection of CD45RA(+)CD4(+) T cells is established primarily by syncytium-inducing variants and correlates with the rate of CD4(+) T cell decline. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Feb 1;97(3):1269-74.
14. Connor RI, Mohri H, Cao Y, Ho DD. 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.* 1993 Apr;67(4):1772-7.
15. Fouchier RA, Meyaard L, Brouwer M, Hovenkamp E, Schuitemaker H. 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.* 1996 May 1;219(1):87-95.
16. Miedema F, Meyaard L, Koot M, Klein MR, Roos MT, Groenink M, Fouchier RA, Van't Wout AB, Tersmette M, Schellekens PT, et al. Changing virus-host interactions in the course of HIV-1 infection. *Immunol Rev.* 1994 Aug;140:35-72.
17. Furrer H, Wendland T, Minder C, Christen A, von Overbeck J, Grunow R, Pichler W, Malinverni RP. Association of syncytium-inducing phenotype of HIV-1 with CD4 cell count, viral load and sociodemographic characteristics. *AIDS.* 1998 Jul 30;12(11):1341-6.
18. Rinfret A, Latendresse H, Lefebvre R, St-Louis G, Jolicoeur P, Lamarre L. Human immunodeficiency virus-infected multinucleated histiocytes in oropharyngeal lymphoid tissues from two asymptomatic patients. *Am J Pathol.* 1991 Feb;138(2):421-6.
19. Dargent JL, Lespagnard L, Kornreich A, Hermans P, Clumeck N, Verhest A. HIV-associated multinucleated giant cells in lymphoid tissue of the Waldeyer's ring: a detailed study. *Mod Pathol.* 2000 Dec;13(12):1293-9.
20. Orenstein JM, Wahl SM. The macrophage origin of the HIV-expressing multinucleated giant cells in hyperplastic tonsils and adenoids. *Ultrastruct Pathol.* 1999 Mar-Apr;23(2):79-91.

21. Eilbott DJ, Peress N, Burger H, LaNeve D, Orenstein J, Gendelman HE, Seidman R, Weiser B. Human immunodeficiency virus type 1 in spinal cords of acquired immunodeficiency syndrome patients with myelopathy: expression and replication in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 May;86(9):3337-41.
22. Frankel SS, Wenig BM, Burke AP, Mannan P, Thompson LD, Abbondanzo SL, Nelson AM, Pope M, Steinman RM. Replication of HIV-1 in dendritic cell-derived syncytia at the mucosal surface of the adenoid. *Science*. 1996 Apr 5;272(5258):115-7.
23. Frankel SS, Tenner-Racz K, Racz P, Wenig BM, Hansen CH, Heffner D, Nelson AM, Pope M, Steinman RM. Active replication of HIV-1 at the lymphoepithelial surface of the tonsil. *Am J Pathol*. 1997 Jul;151(1):89-96.
24. Bhoopat L, Rithaporn TS, Khunamornpong S, Bhoopat T, Taylor CR, Thorner PS. 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*. 2006 Feb;19(2):255-63.
25. Orenstein JM. In vivo cytolysis and fusion of human immunodeficiency virus type 1-infected lymphocytes in lymphoid tissue. *J Infect Dis*. 2000 Jul;182(1):338-42.
26. Budka H. Multinucleated giant cells in brain: a hallmark of the acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Acta Neuropathol*. 1986;69(3-4):253-8.
27. Koenig S, Gendelman HE, Orenstein JM, Dal Canto MC, Pezeshkpour GH, Yungbluth M, Janotta F, Aksamit A, Martin MA, Fauci AS. Detection of AIDS virus in macrophages in brain tissue from AIDS patients with encephalopathy. *Science*. 1986 Sep 5;233(4768):1089-93.
28. Fais S, Burgio VL, Capobianchi MR, Gessani S, Pallone F, Belardelli F. The biological relevance of polykaryons in the immune response. *Immunol Today*. 1997 Nov;18(11):522-7.
29. Zhao ML, Kim MO, Morgello S, Lee SC. Expression of inducible nitric oxide synthase, interleukin-1 and caspase-1 in HIV-1 encephalitis. *J Neuroimmunol*. 2001 Apr 2;115(1-2):182-91.
30. Steain MC, Wang B, Saksena NK. The possible contribution of HIV-1-induced syncytia to the generation of intersubtype recombinants in vitro. *AIDS*. 2008 May 31;22(9):1009-17.
31. Sylwester A, Murphy S, Shutt D, Soll DR. HIV-induced T cell syncytia are self-perpetuating and the primary cause of T cell death in culture. *J Immunol*. 1997 Apr 15;158(8):3996-4007.
32. Perfettini JL, Nardacci R, Bourouba M, Subra F, Gros L, Séror C, Manic G, Rosselli F, Amendola A, Masdehors P, Chessa L, Novelli G, Ojcius DM, Siwicki JK, Chechlinska M, Auclair C, Regueiro JR, de Thé H, Gougeon ML, Piacentini M, Kroemer G. Critical involvement of the ATM-dependent DNA damage response in the apoptotic demise of HIV-1-elicited syncytia. *PLoS One*. 2008 Jun 18;3(6):e2458.
33. Huerta L, López-Balderas N, Larralde C, Lamoyi E. Discriminating in vitro cell fusion from cell aggregation by flow cytometry combined with fluorescence resonance energy transfer. *J Virol Methods*. 2006 Dec;138(1-2):17-23.
34. López-Balderas N, Huerta L, Villarreal C, Rivera-Toledo E, Sandoval G, Larralde C, Lamoyi E. In vitro cell fusion between CD4(+) and HIV-1 Env(+) T cells generates a diversity of syncytia varying in total number, size and cellular content. *Virus Res*. 2007 Feb;123(2):138-46.
35. Huerta L, López-Balderas N, Rivera-Toledo E, Sandoval G, Gómez-Icazbalceta G, Villarreal C, Lamoyi E, Larralde C. HIV-envelope-dependent cell-cell fusion: quantitative studies. *ScientificWorldJournal*. 2009 Aug 11;9:746-63.
36. Collman RG, Perno CF, Crowe SM, Stevenson M, Montaner LJ. HIV and cells of macrophage/dendritic lineage and other non-T cell reservoirs: new answers yield new questions. *J Leukoc Biol*. 2003 Nov;74(5):631-4.
37. Blau HM, Blakely BT. Plasticity of cell fate: insights from heterokaryons. *Semin Cell Dev Biol*. 1999 Jun;10(3):267-72.
38. Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, Meyer EM, Morel L, Petersen BE, Scott EW. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature*. 2002 Apr 4;416(6880):542-5.
39. Terranova R, Pereira CF, Du Roure C, Merckenschlager M, Fisher AG. Acquisition and extinction of gene expression programs are separable events in heterokaryon reprogramming. *J Cell Sci*. 2006 May 15;119(Pt 10):2065-72. Epub 2006 Apr 25. PubMed PMID: 16638804.
40. Ying QL, Nichols J, Evans EP, Smith AG. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature*. 2002 Apr 4;416(6880):545-8.

41. Rivera-Toledo E, Huerta L, Larralde C, Lamoyi E. Quantitative and phenotypic analyses of lymphocyte-monocyte heterokaryons induced by the HIV envelope proteins: Significant loss of lymphoid markers. *Exp Mol Pathol.* 2011 Apr;90(2):157-66.
42. Ancuta P, Kamat A, Kunstman KJ, Kim EY, Autissier P, Wurcel A, Zaman T, Stone D, Mefford M, Morgello S, Singer EJ, Wolinsky SM, Gabuzda D. Microbial translocation is associated with increased monocyte activation and dementia in AIDS patients. *PLoS One.* 2008 Jun 25;3(6):e2516.
43. Kwong PD, Wyatt R, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J, Hendrickson WA. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature.* 1998 Jun 18;393(6686):648-59.
44. Keller R, Peden K, Paulous S, Montagnier L, Cordonnier A. Amino acid changes in the fourth conserved region of human immunodeficiency virus type 2 strain HIV-2ROD envelope glycoprotein modulate fusion. *J Virol.* 1993 Oct;67(10):6253-8.
45. Morikawa Y, Moore JP, Wilkinson AJ, Jones IM. Reduction in CD4 binding affinity associated with removal of a single glycosylation site in the external glycoprotein of HIV-2. *Virology.* 1991 Feb;180(2):853-6.
46. Daigneault M, Preston JA, Marriott HM, Whyte MK, Dockrell DH. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS One.* 2010 Jan 13;5(1):e8668.
47. Cao J, Park IW, Cooper A, Sodroski J. Molecular determinants of acute single-cell lysis by human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* 1996 Mar;70(3):1340-54.
48. Boehme KW, Compton T. Innate sensing of viruses by toll-like receptors. *J Virol.* 2004 Aug;78(15):7867-73.