



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

Propagación de las cepas MN y IIIB del VIH-1 en líneas de células T y análisis de la formación de sincicios.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

ANDREA CETINA PALMA



DIRECTOR DE TESIS:

DRA. LEONOR HUERTA HERNÁNDEZ

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.

1. Datos del alumno  
Apellido paterno  
Apellido materno  
Nombre(s)  
Teléfono  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad  
Carrera  
Número de cuenta

2. Datos del tutor  
Grado  
Nombre(s)  
Apellido paterno  
Apellido materno

3. Datos del sinodal 1  
Grado  
Nombre(s)  
Apellido paterno  
Apellido materno

4. Datos del sinodal 2  
Grado  
Nombre(s)  
Apellido paterno  
Apellido materno

5. Datos del sinodal 3  
Grado  
Nombre(s)  
Apellido paterno  
Apellido materno

6. Datos del sinodal 4  
Grado  
Nombre(s)  
Apellido paterno  
Apellido materno

7. Datos del trabajo escrito.  
Título

Número de páginas  
Año

1. Datos del alumno  
Cetina  
Palma  
Andrea  
55 43 54 82  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
304588666

2. Datos del tutor  
Doctora  
Leonor  
Huerta  
Hernández

3. Datos del sinodal 1  
Doctora  
Rosa Elena  
Sarmiento  
Silva

4. Datos del sinodal 2  
Doctora  
María Luisa  
Escobar  
Sánchez

5. Datos del sinodal 3  
Doctor  
Benito  
Estrada  
Mena

6. Datos del sinodal 4  
M. en C  
María de los Remedios Josefina  
Ramírez  
Rangel

7. Datos del trabajo escrito  
Propagación de la cepa MN y IIB del VIH-1 en líneas de células T y análisis de la formación de sincicios

82 p  
2013

## Agradecimientos

A mis papás por darme siempre su apoyo incondicional y lo más importante, por confiar en mí. Por rescatarme de mi propia obscuridad. Por ser mi faro en el océano.

A mi hermana por tratar de entender mis cambios de humor, ataques de pánico, desapego social, arranques violentos y lapsos de depresión profunda sin razón aparente. Estos, como consecuencias al escribir una tesis de licenciatura, y sé, que el que este leyendo esto y haya tenido la oportunidad de escribir una, se sentirá totalmente identificado conmigo.

A mi abuelito Rogelio, por introducirme al magnífico mundo científico al presentarme "*Cazadores de microbios*" de Paul de Kruif, y mostrarme que siempre debe ponderar el pensamiento analítico y crítico de la vida misma, pero sin olvidar su lado mágico y "misterioso", como lo llamaría él. Sin duda, mí artista bohemio perdido en este periodo contemporáneo, un alma vieja en un mundo minimalista.

A todas las personas que me ayudaron a llevar acabo este proyecto de investigación del departamento de Inmunología, del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Sin ellos no lo hubiera podido hacer. A César Cortes Rubio, por ser mi tutor y enseñarme desde como pipetear, hasta como separar células CD4+ de leucopacks. Por su paciencia y tiempo, durante todo este proyecto; a Israel Torres por sus consejos, a Isabel Ruelas por ser mi compañera en los experimentos que compartimos, por todos los análisis en el citómetro a destiempo que realizamos, siempre corriendo, al grado de que ya nos conocían los de seguridad; principalmente al jefe de citometría del IIB, Carlos Castellanos por su ayuda y sus constantes consejos que sin ellos jamás hubiéramos obtenidos datos cuantificables. Así como a la Dra. Leonor Huerta, tutora de esta tesis por darme este proyecto.

Muchísimas gracias a Ricardo Ávila, por todo su apoyo en el laboratorio, por siempre escucharnos a Isabel y a mí en los experimentos largos y pesados; por conseguir los reactivos y materiales que descubríamos que nos faltaban, 20 minutos antes de utilizarlos. Por siempre tener una actitud solidaria conmigo. Gracias.

Y al final solo me resta agradecer a mi hermosa e inmortal UNAM, por permitirme ser parte de ella y enamorarme de sus ideales y espíritu.  
Orgullosamente GOYA, orgullosamente UNAM.

## Abreviaturas

SFB	Suero Fetal Bovino
PHA	Fitohemaglutinina
UI	Unidades internacionales
CMSP	Células Mononucleares de la Sangre Periférica
rpm	Revoluciones por minuto
IL-2	Interleucina 2
VIH-1	Virus de la Inmunodeficiencia Humana 1
°C	Grados centígrados
INER	Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
SN	Sobrenadante
SNC	Suero neonatal de cabra
PFH	Paraformaldehido
PBS	Buffer de fosfato salino
BSL-2	Nivel de Bioseguridad 2
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
PE	Ficoeritrina
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
Fig.	Figura
ml	mililitro
μl	microlitro

ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
p24	Proteína 24
pg	picogramos
O.D	Densidad óptica
nm	Nanómetros
IR	Inicialmente reactiva
NR	No Reactiva
SB	Sustrato blanco
CN	Control negativo
SN	Sobrenadante
MN	Cepa MN del Virus de la Inmunodeficiencia Humana 1
IIIB	Cepa IIIB del Virus de la Inmunodeficiencia Humana 1
CP	Control Positivo
ng	Nanogramos
DI	Días de infección
hrs.	Horas
p#	Proteína viral
kDa	kiloDalton
Env	Proteína de envoltura
gp	Glicoproteína
NK	Célula asesina natural
mg	microgramos

## Índice

Resumen.....	5
Introducción.....	6
Virus de la Inmunodeficiencia Humana.....	6
Ciclo de replicación.....	7
Infección.....	8
Efectos citopáticos.....	9
Detección del VIH.....	10
Cuantificación por citometría de flujo de la fusión celular.....	11
Justificación.....	14
Objetivo.....	15
Objetivos particulares.....	15
Metodología.....	16
Medidas de Bioseguridad.....	16
Descongelación de las líneas celulares MT-2, H9 y Jurkat.....	16
Línea celular MT-2.....	16
Línea celular H9.....	16
Línea celular Jurkat.....	17
Infección en la línea celular MT-2.....	17
Infección en la línea celular H9.....	18
Cosecha del Sobrenadante de la infección.....	19
Reposición de la población celular.....	19
Infección de las líneas celulares MT-2 y Jurkat.....	19
Viabilidad celular para Jurkat.....	20
Infección modificada para la línea celular Jurkat y H9.....	20
Infección modificada para la línea celular Jurkat.....	21
Tinción intracelular para p24.....	24
Marcaje.....	24
Cocultivo.....	25

Cosecha.....	26
Fijación.....	27
Fusión celular.....	27
ELISA.....	27
Viabilidad celular.....	29
Citometría de flujo.....	29
Resultados.....	30
I. Propagación de las cepas MN y IIIB del VIH-1 en células H9.....	30
II. Cuantificación de antígeno p24.....	33
III. Caracterización de la infección con VIH en la línea celular MT-2.....	37
III.1 Ensayo de fusión entre células infectadas y no infectadas.....	41
de la línea celular MT-2	
IV. Comparación del aspecto de cultivos infectados de las líneas.....	46
celulares MT-2 y Jurkat	
V. Viabilidad celular de la línea celular Jurkat.....	50
VI. Ensayo de fusión entre células infectadas y no infectadas.....	52
de las líneas celulares Jurkat y H9	
VII. Infección de células Jurkat y tinción de antígeno viral p24 intracelular.....	60
VIII. Ensayo de fusión entre células Jurkat infectadas y no infectadas.....	62
IX. Formación de sincicios en cocultivos de células JLTRG.....	68
Discusión.....	71
Discusión de la infección en las diferentes líneas celulares.....	71
Discusión de la fusión celular en la diferentes líneas celulares.....	73
Conclusión.....	76
Referencias.....	77

## Resumen

El virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) infecta principalmente a células del sistema inmune (linfocitos T y monocitos/macrófagos). La expresión de las proteínas virales gp120 y gp41 en la membrana de las células infectadas, confiere a estas la capacidad para fusionarse con células T CD4+ (células blanco), formando sincicios. La presencia en la sangre de virus que tienen la capacidad de inducir fusión de linfocitos T in vitro, se asocia con la progresión a SIDA de los individuos infectados. Nuestro objetivo fue propagar las cepas IIB y MN del VIH-1, y establecer las condiciones experimentales para analizar cuantitativamente la formación de sincicios por citometría de flujo. Se realizaron cinéticas de infección y ensayos de formación de sincicios utilizando tres líneas celulares de linfocitos T CD4+ y las cepas MN y IIB del VIH-1. El protocolo de infección fue mejorado progresivamente introduciendo modificaciones como, la adición del policion polibren en el momento de la infección y el aumento de la cantidad de virus mediante la concentración del sobrenadante viral por ultrafiltración. El porcentaje de infección se midió utilizando la línea celular reportera JLTRG (59.38%) y dos inmunoensayos para detectar la proteína viral p24: un ELISA de sobrenadantes de cultivos infectados (siendo la mayor concentración, 333.87 pg/ml en la cepa IIB) y la tinción intracelular de células infectadas (22.58%). La determinación del porcentaje de células fusionadas se efectuó mediante una técnica previamente caracterizada consistente en la tinción de las células infectadas y no infectadas con los colorantes lipofílicos fluorescentes DiI (rojo) y DiO (verde), respectivamente. Después de mantenerlas en cocultivo, las células fusionadas se detectaron como partículas con fluorescencia mixta. En la línea MT-2 se produjo un alto nivel de muerte celular, la formación de sincicios fue muy extensa y la fusión celular no fue sensible a inhibidores clásicos (péptido T-20 o anticuerpos anti-CD4). En cambio, en las líneas Jurkat y H9 se observó un bajo nivel de muerte celular y los sincicios fueron abundantes y pequeños, con mayor número de sincicios en la línea H9. En estas células la formación de sincicios sí fue inhibida por T-20. Por lo que podemos concluir que, las líneas celulares MT-2, H9 y Jurkat tienen diferente susceptibilidad a los efectos citopáticos del virus y la fusión celular tuvo distinta sensibilidad al péptido T-20.

## Introducción

### Virus de la inmunodeficiencia humana

El virus de la inmunodeficiencia humana, también conocido por sus siglas como VIH, es un *Lentivirus* que pertenece a la familia *Retroviridae*. Algunas características de este género (*Lentivirus*) se observan en el cuadro 1. El VIH es un retrovirus ya que posee en su genoma ARN que se transcribe a ADN a través de la enzima viral transcriptasa reversa y posteriormente se integra al del organismo huésped (1). El VIH se descubrió debido a su asociación con el síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA), este síndrome se caracteriza por una reducción significativa de las células blanco CD4<sup>+</sup> y el desarrollo de diversas enfermedades oportunistas y cáncer (2).

Cuadro 1. Características comunes de los lentivirus

---

#### Clínicas

- \*Asociación con una enfermedad con un periodo de incubación largo
- \*Asociación con una deficiencia inmune
- \*Involucramiento del sistema hematopoyético
- \*Involucramiento del sistema nervioso
- \*Asociación con artritis autoinmune

#### Biológicas

- \*Específico de la especie del anfitrión
- \*Exógeno y no oncogénico
- \*Efecto citopático en ciertas células infectadas, p.e., sincicia (células multinucleadas)
- \*Infección de macrófagos –usualmente no citopático
- \*Acumulación de formas circulares no integradas de ADNc en células infectadas
- \*Infección latente o persistente de algunas células infectadas
- \*Morfología con nucleoide en forma de cono, al ser examinado por microscopia electrónica

#### Moleculares

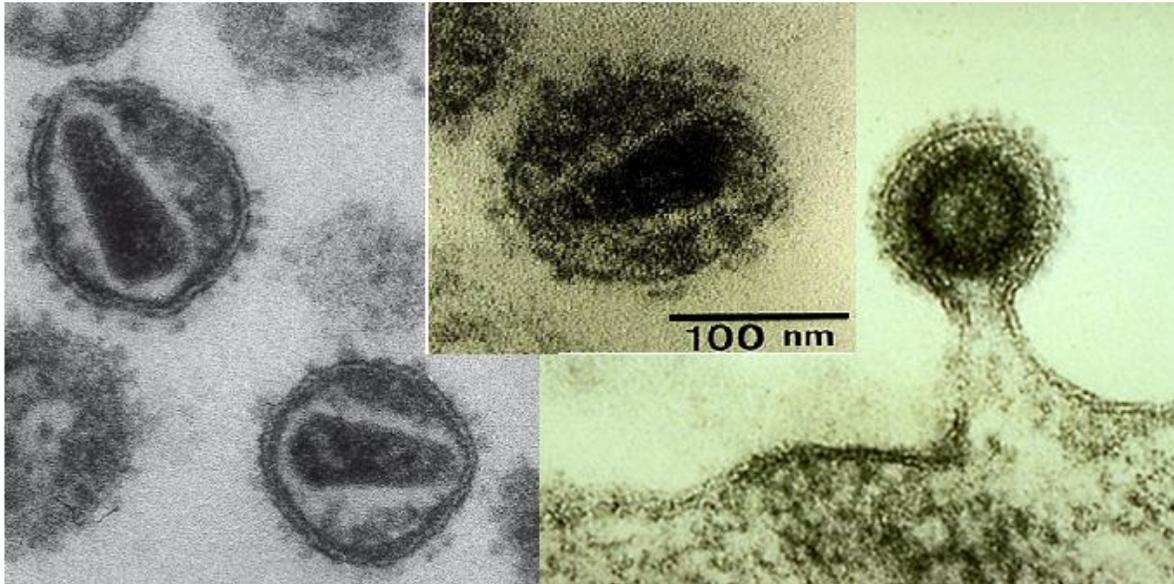
- \*Genoma grande (9kb)
  - \*Gen *gag* truncado: varias proteínas Gag procesadas
  - \*El gen de la envoltura está altamente glicosilado
  - \*Polimorfismos, particularmente en la región de la envoltura
  - \*Nuevo marco de lectura abierto en el genoma del virus que separa las regiones *pol* y *env*
- 

Levy, 2008. (3)

Existen dos tipos del virus de la inmunodeficiencia humana, llamados VIH-1 y VIH-2. El primero de ellos corresponde al virus descubierto originalmente, que recibió los nombres de LAV y HTLV-III por parte de los dos equipos que estaban investigando el agente etiológico del SIDA durante la primera mitad de la década de 1980. El VIH-1 es más virulento e infeccioso que el VIH-2 (4), y es el causante de la mayoría de infecciones por VIH en el mundo. El VIH-2 es menos contagioso y por ello se encuentra confinado casi exclusivamente a los países de África occidental (5). Ambos subtipos de VIH (1 y 2) son capaces de producir el síndrome de la inmunodeficiencia adquirida, sin embargo, el curso

clínico de VIH-2 parece ser más largo (6). El VIH-1 difiere con el VIH-2 en su capacidad de transmisión y en su patología (7).

El VIH tiene un diámetro aproximado de 100 a 120 nanómetros (microfotografía electrónica de barrido 1) con formas morfológicas heterogéneas, todos los virus infecciosos contienen la envoltura y tres proteínas estructurales de Gag: la matriz, la cápside y la nucleocápside; por convención, la proteína viral (p) se señala con un número a lado que corresponde a su tamaño en kiloDaltons (kDa) (8).



*Microfotografía electrónica de barrido. Se pueden observar partículas gemando en la superficie de un linfocito T. Levy, 2008 (3)*

En el cuadro 2 se pueden observar cada una de las proteínas del VIH y sus funciones, entre ellas se encuentra la proteína de la envoltura (*Env*). El producto primario del gen *env*, es la glicoproteína (gp) gp160, esta es la proteína precursora, la cual es dividida dentro de la célula en una proteína superficial externa de la envoltura, la gp120 y en una proteína transmembranal gp41. Ambos productos son componentes de las espículas presentes en la envoltura viral que participan en la penetración viral (9). Estas proteínas de la envoltura son transportadas a la superficie de la célula infectada donde la porción central y el amino terminal de la glicoproteína 41 se expresan en el interior del virión. El segmento del asa de la gp41 es fundamental para la fusión membranar, su región central se une a la gp120 externa de una forma no covalente, sobre todo en dos regiones hidrofóbicas en las terminales amino y carboxilo de la gp120 (10).

### Ciclo de replicación

El ciclo de replicación del VIH comienza cuando un virión se une a una célula blanco, las células CD4<sup>+</sup> de un linfocito T. Luego el virus fusiona su membrana con la membrana de la célula, después de la fusión el virus libera el ARN, su material genético dentro de la célula infectada. Una enzima del virus llamada transcriptasa inversa convierte la cadena simple de

ARN del virus en una doble cadena de ADN, este ADN nuevo del VIH entra al núcleo de la célula blanco donde otra enzima vírica, la integrasa, integra el ADN viral dentro del ADN de la célula infectada, este ADN del VIH integrado se denomina provirus, este provirus puede permanecer inactivo por varios años sin producir nuevas copias del VIH. Cuando la célula anfitriona recibe una señal de activación, el provirus usa una enzima llamada polimerasa del ARN para crear copias del material genómico del VIH y segmentos más cortos del ARN conocidos como ARN mensajero (ARNm). El ARNm se utiliza como modelo para la formación de cadenas largas de proteínas del VIH. Otra enzima del VIH llamada proteasa corta las cadenas largas de proteínas víricas en proteínas más pequeñas. A medida que las proteínas pequeñas del VIH se unen a las copias del material genético del ARN del virus, se ensambla una nueva partícula del virus. Una vez que el nuevo virus se ensambló éste gema de la célula infectada, durante esta gemación, el nuevo virus se lleva parte de la envoltura exterior de la célula, es decir parte de su membrana celular, a esta envoltura que actúa como recubrimiento, contienen glicoproteínas propias del VIH, estas glicoproteínas son necesarias para que el virus se una al CD4 y otros correceptores expresados en las células blanco. Las nuevas copias de VIH pueden ahora infectar a otras células blanco (11).

## Infección

El proceso de infección comienza con la unión de la glicoproteína superficial gp120 a los receptores celulares CD4<sup>+</sup> y correceptores de quimioquinas CXCR4 en los linfocitos o CCR5 en los macrófagos. Algunos virus podrían utilizar ambos correceptores en el momento de la infección. Los correceptores CCR5 y CXCR4 se fijan a cepas diferentes del VIH. Esta unión (receptores, correceptores y glicoproteínas) produce la activación del amino terminal de la subunidad transmembranal gp41 que promueve la fusión de las membranas del virión y de la célula blanco. La célula huésped produce moléculas de adhesión que aumentan significativamente la infectividad del virus que también es incorporado dentro de la envoltura del virión del VIH. Las células infectadas posteriormente expresan las gp120/gp41 en su superficie (12). La unión del virus de la inmunodeficiencia humana con el receptor CD4 probablemente conlleva a cambios conformacionales tanto en la molécula CD4 como en la gp120, la unión inicial parece ser en dos sitios del dominio CDR2 de CD4 y probablemente involucra epítomos no lineales de gp120 que entra en contacto con el sitio de unión del receptor CD4 a través de una estructura conformacional específica; el desplazamiento subsecuente de la molécula gp120 y/o el corte de la proteína de la envoltura por enzimas celulares causa otra alteración en la envoltura viral, esta alteración produce cambios conformacionales en gp120 y CD4 que le proporcionan a la envoltura viral sitios adicionales de unión con la superficie celular, tales como CXCR4, CCR5 u otros receptores (13).

El VIH además de encontrarse como una partícula libre infecciosa e infectar de esta forma a una célula, también puede transmitirse durante el contacto entre célula a célula. En este caso pueden formarse células multinucleadas (desde dos células) o células gigantes multinucleadas conocidos como sincisios, que se caracterizan por fusionar sus membranas celulares dos o más células, o en el otro caso puede existir este contacto entre célula y célula pero sin existir la fusión celular, esto es por adherencia provocado por moléculas adherentes como ICAM, por ejemplo. Se ha estimado que el mecanismo de infección más

exitoso es por contacto célula con célula en vez de partículas infecciosas libres, es hasta 100 veces más eficiente (14). La célula infectada por virus llega a ser más importante que la carga de virus infeccioso presente en la sangre; en pacientes asintomáticos la cantidad de virus libre infeccioso puede ser de 100 partículas infecciosas/ml de sangre (15), mientras que el número promedio de células infectadas por virus en estos individuos es alrededor de una célula en 1 000 células mononucleares de la sangre periférica (16).

### *Efectos citopáticos*

Existen varios procesos asociados con los efectos citopáticos del VIH, como la formación de sincisios, acumulación de ADN viral no integrado, liberación de virus que causa cambios en la integridad de la membrana celular, alteración de la permeabilidad de la membrana plasmática, disminución en la síntesis de lípidos de la membrana, inducción de la apoptosis, liberación de citocinas tóxicas por células infectadas y/o células no infectadas, destrucción por la respuesta inmunológica, muerte celular causada por proteínas virales (*gp120*, *gp41*, *Tat*, *Nef* y *Vif*), entre otros (17).

*In vitro*, el VIH causa dos tipos de efectos citopáticos, la formación de sincisios o células gigantes multinucleadas y lisis de células individuales. La lisis celular es causada cuando células individuales se infectan con el VIH llevando a cabo un proceso denominado degeneración en forma de globo (*balloon degeneration*, en inglés) provocado por un cambio en la permeabilidad de la membrana celular de estas células individuales infectadas, aumentando los cationes monovalentes ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ) intracelularmente, lo que provoca que la célula se hinche más allá de los límites de la integridad de su membrana y se lise. Un factor que comparten estos dos tipos de efectos citopáticos es que existe un aumento en el volumen celular (18). La muerte celular provocada por el VIH es causada por la fusión entre células infectadas y células no infectadas (formación de sincisios), necrosis y apoptosis (19), también se ha reportado que la muerte celular rápida puede ser el resultado del contacto normal entre células T  $\text{CD4}^+$  infectadas por el VIH y células T  $\text{CD4}^+$  no infectadas pero en ausencia de fusión celular y formación de células gigantes multinucleadas (20). Las cepas de virus formadoras de sincisios y las no formadoras de sincisios, virus CXCR4 (X4) y CCR5 (R5), respectivamente, fueron distinguidas inicialmente por ensayos de infección y fusión en líneas de células T con virus X4 (21). El papel de la *gp41* en la fusión celular ha sido apoyado por estudios que muestran la inducción de sincisios por *gp41* cuando ésta es expresada tanto en células  $\text{CD4}^+$  como  $\text{CD4}^-$ . La inducción vírica de fusión celular parece tener un gran significado en la patogénesis del SIDA. (22).

Cuadro 2. Proteínas del VIH y sus funciones

Proteínas	Nomenclatura	
	y tamaño (kDa)	Función
Gag	p24	Cápside (CA), proteína estructural
	p17	Proteína de la matriz (MA), miristilada
	p7	Proteína de la nucleocápside (NC); ayuda a la transcripción reversa
	p6	Papel en la gemación (dominio L)
Polimerasa (Pol)	p66, p51	Transcriptasa reversa (RT): ARNasa H –interior de la cápside
Proteasa (PR)	p10	Procesamiento postraduccional de proteínas virales
Integrasa (IN)	p32	Integración del ADNc viral
Envoltura (Env)	gp120	Superficie de la (SU), <sup>a</sup> proteína de la envoltura
	gp41	Proteína transmembranal (TM) <sup>b</sup> de la envoltura
Tat <sup>a</sup>	p14	Transactivación
Rev <sup>a</sup>	p19	Regulación de la expresión de ARNm viral
Nef	p27	Pleiotrópico, puede aumentar o disminuir la replicación del virus
Vif	p23	Incrementa la infectividad del virus y transmisión de célula a célula, ayuda en la síntesis de ADN proviral y/o en el ensamblaje del virión
Vpr	p15	Ayuda en la replicación del virus, transactivación
Vpu <sup>ab</sup>	p16	Ayuda en la liberación del virus interrumpe los complejos gp160:CD4
Vpx <sup>c</sup>	p15	Ayuda en la entrada y la infectividad
Tev <sup>a</sup>	p26	Actividades Tat/Rev

<sup>a</sup> No parece estar asociado dentro del virión.

<sup>b</sup> Solo esta presente con el VIH-1.

<sup>c</sup> Sólo codificado por VIH-2. Puede ser un duplicado de Vpr.

Durante la infección aguda, es decir, durante los primeros 7 a 14 días, se encuentra fácilmente el VIH infeccioso, pero pasando el tiempo, el nivel de virus presente en la sangre reduce drásticamente debido a una respuesta inmune antiviral activa. Después de la infección, la enfermedad avanza con la característica disminución de células CD4+ mientras que la concentración de virus infeccioso aumenta en la sangre (23). Para la detección de virus infeccioso en plasma, un procedimiento confiable es permitir una incubación del virus con las células blanco de al menos 24 horas (24), los aislados de VIH pueden distinguirse por sus efectos citopáticos, como su habilidad para inducir la fusión celular, se puede observar la degeneración de las células en forma de globo debido por cambios en la permeabilidad de su membrana celular y formar células gigantes multinucleadas en líneas celulares establecidas, por ejemplo la línea celular MT-2, o utilizando células mononucleares de la sangre periférica (CMSP) como células blanco (25).

### *Detección del VIH*

Existen muchos métodos para la detección del VIH, dependiendo del procedimiento que se utilice para medir el virus, puede aumentar o disminuir la sensibilidad para su detección. Esta detección puede ser en sangre y otros fluidos corporales. Sin embargo, no distinguen entre viriones infecciosos y los no infecciosos. Entre estos métodos se encuentra la detección del antígeno viral p24 por medio de ELISA (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) (26). La p24 del VIH es una proteína presente en la cápside, al detectar esta

proteína en cultivos infectados, nos indica que existe una replicación activa en las muestras infectadas, un ensayo confiable para la detección de este antígeno viral es la ELISA. La ELISA es un inmunoensayo en el cual un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo ligado a una enzima capaz de generar un producto detectable como cambio de color; en este inmunoensayo un anticuerpo primario reconoce al antígeno y que a su vez es reconocido por un anticuerpo secundario que lleva enlazado la enzima anteriormente mencionada. La aparición de colorantes permite medir indirectamente mediante espectrofotometría el antígeno en la muestra. Se usa en muchos laboratorios para determinar si un antígeno particular está presente en la muestra de sangre de un paciente, en otros fluidos corporales o en sobrenadantes de cultivos celulares (27). Otros métodos para detectar el VIH son la detección de ARN viral por medio de PCR y técnicas de PCR por competencia cuantitativas (28).

### Cuantificación por citometría de flujo de la fusión celular

En el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas se ha diseñado una estrategia experimental para abordar el estudio de la fusión celular, la cual se basa en el uso de líneas celulares linfocíticas humanas. Una de ellas, la Jurkat HXBc2 está transfectada establemente con el gene que codifica para las proteínas de fusión de una variante del VIH-1 altamente fusogénica. La Jurkat HXBc2 fue generada por Cao y colaboradores y contiene un sistema de expresión inducible dependiente de tetraciclina que permite la expresión del complejo Env (Figura 1) (29).

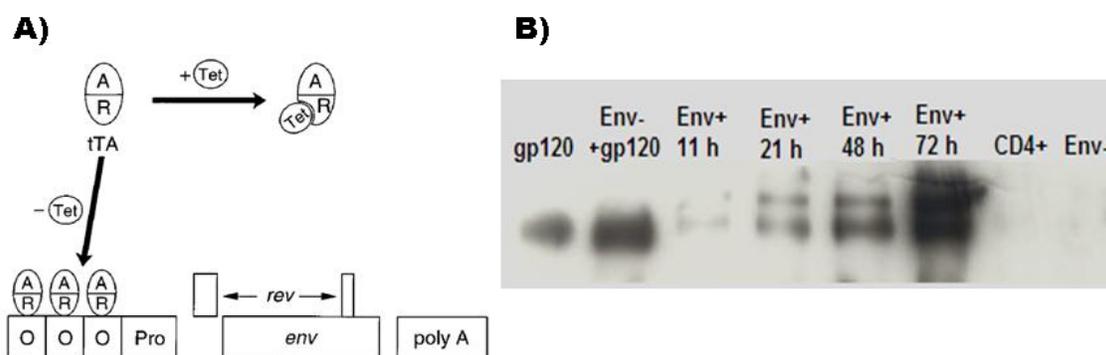


Figura 1. Expresión inducible del complejo Env del VIH en células Jurkat HXBc2. La línea celular linfoide está establemente transfectada con un sistema Tet-off que controla la expresión del gene env. A) Estructura del sistema de expresión inducible. La proteína híbrida tTA contiene un represor (R) dependiente de tetraciclina (Tet) fusionado a un activador (A) de la transcripción; el arreglo genético contiene el operador (O), éste une a tTA en ausencia de tetraciclina, lo que induce la transcripción del gen rev/env; ocasionando que las células se hagan Env<sup>+</sup>. B) La expresión del complejo Env aumenta progresivamente después de retirar la tetraciclina del cultivo celular, demostrado mediante el Wester Blot del Inmunoprecipitado del complejo Env; el seguimiento inició antes de retirar la tetraciclina [Env-] y después de 11, 21, 48 y 72 horas de haberla retirado; las primeras dos columnas [gp120 y Env(-) + gp120] son controles positivos con gp120 pura; CD4<sup>+</sup> es el control negativo de células no transfectadas, las Jurkat.(32)

Cuando se cocultivan con células que expresan los receptores reconocidos por el VIH (CD4 y receptor de quimiocinas), las células Env<sup>+</sup> se fusionan con ellas en pocas horas y forman células multinucleadas o sincicios. El análisis cuantitativo de la fusión se efectúa mediante un método original consistente en la tinción de las células antes de la fusión con

colorantes lipofílicos fluorescentes: rojo (DiI) para las células Jurkat Env<sup>+</sup> y verde (DiO) para las Jurkat (por ejemplo, ya que expresan los receptores CD4<sup>+</sup>/CXCR4). Una vez que la fusión ha tenido lugar, todas las células en el cocultivo son analizadas por citometría de flujo, de modo que es posible medir la proporción de células fusionadas (partículas con fluorescencia mixta), así como la proporción de las células no fusionadas de cada tipo (partículas de un solo color) en la población total (30). También se puede diferenciar entre las células fusionadas y las no fusionadas o agregados por medio de la presencia de FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer, por sus siglas en inglés*) es decir, del aumento en la fluorescencia roja de las células fusionadas. El método permite distinguir entre la señal producida por células agregadas pero no fusionadas y la debida a las células realmente fusionadas (Figura 2).

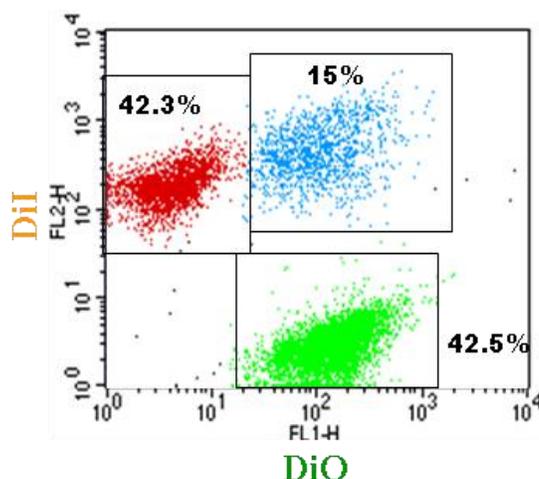


Figura. 2. Fusión celular entre linfocitos T analizada por citometría de flujo. Los sincicios se muestran en azul (cuadro superior derecho), corresponden a eventos con ambos fluoróforos. Las células Jurkat y Env<sup>+</sup> que no se han fusionado (eventos con un sólo fluoróforo) corresponde a los puntos rojos y verdes (cuadro superior derecho e inferior izquierdo), respectivamente.

El análisis matemático de los datos del porcentaje de células no fusionadas de cada color, facilita la estimación de la proporción en que ambos tipos celulares se reclutan en la población de sincicios. Para comprobar la mezcla de los contenidos citoplasmáticos en las partículas con fluorescencia mixta se utilizaron indicadores fluorescentes hidrofílicos en sustitución de los colorantes lipofílicos (29). La fusión medida por este procedimiento es sensible a anticuerpos monoclonales y policlonales anti-CD4, anti-gp120 y al péptido T-20, inhibidor de la infección por el VIH<sup>104, 115</sup>. El análisis por citometría de flujo facilita asimismo el estudio de las características funcionales de las poblaciones celulares (tanto las fusionadas como las no fusionadas) mediante el uso de colorantes fluorescentes adicionales (31). Así, se ha podido determinar que los sincicios de células T pueden mantener la expresión de receptores importantes que participan en la inducción de la respuesta inmune y son capaces de responder a estímulos de activación sintetizando interleucina 2 así como la expresión del receptor para interleucina 2 (32).

Una ventaja del análisis de la fusión celular por citometría de flujo, es que permite el análisis simultáneo de las células fusionadas y de las células que permanecieron sin fusionarse en el mismo pozo de cultivo. De este modo, es posible determinar también las características de las células que no fueron reclutadas en los sincicios y que permanecen en

la vecindad de las células fusionadas. La fusión celular inducida por las proteínas de la envoltura viral, genera *in vitro* una población heterogénea de sincicios que difieren en tamaño, composición celular, viabilidad, y propiedades funcionales. Así, la fusión de células del sistema inmune inducida por el VIH podría tener efectos variables sobre la replicación viral.

## **Justificación**

En esta tesis se desarrollaron diversos experimentos de infección utilizando dos cepas del VIH-1, MN y IIB. La finalidad de este proyecto fue estandarizar y optimizar un protocolo de infección con VIH-1 utilizando diferentes líneas de células T y observar los efectos citopáticos causados por la infección, así como medir por medio de citometría de flujo la fusión entre células infectadas con células no infectadas.

## **Objetivo**

Análisis cuantitativos de la fusión celular por citometría de flujo en líneas de células T inducida por la infección de la cepa MN y IIB del VIH-1.

### *Objetivos particulares*

- Propagar las cepas MN y IIB del VIH-1 en líneas de células T
- Optimizar el protocolo de infección con la finalidad de obtener un mayor porcentaje de células infectadas
- Demostrar que las líneas celulares se infectaron exitosamente
- Observar si las diferentes líneas celulares se infectan de la misma forma
- Cuantificar la fusión celular por medio de citometría de flujo

## Metodología

### *Medidas de Bioseguridad*

Al trabajar con un agente patógeno, en este caso el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) es necesario seguir protocolos que establecen reglas y estándares de bioseguridad que permiten el manejo adecuado y la reducción del riesgo biológico por exposición no intencional con material infeccioso, a niveles aceptables.

Siempre que se trabajó con el virus, es decir, cada vez que se manipuló alguna muestra infectada se utilizó doble bata, cubre boca, gafas, doble guante (el cual nunca salía de la campana de bioseguridad), protección en los zapatos, químicos desinfectantes, material absorbente, material desechable, contenedores específicos para agentes patógenos, un laboratorio BSL-2, todo el equipo para inactivar todos los desechos producidos en cada experimento y todos los requerimientos estipulados en el Manual de procedimientos de bioseguridad del Instituto de Investigaciones Biomédicas y de la UNAM.

### *Descongelación de las líneas celulares MT-2, H9 y Jurkat*

Se descongeló un criovial de cada una de las líneas celulares: MT-2, H9 y Jurkat; cada uno con  $1 \times 10^6$  células. Los crioviales se almacenan en nitrógeno líquido ( $-195.8 \text{ }^\circ\text{C}$ ) para la conservación de las mismas.

Se descongeló cada uno de los crioviales por medio de baño María ( $37^\circ\text{C}$ ), utilizando lentes, guantes y bata como protección y campana de flujo laminar, posteriormente, se colocó en un tubo de 15 ml. para cada línea celular 8 ml. de medio de lavado (RPMI caduco +10% SFB) atemperado a  $37^\circ\text{C}$  y se agregó el contenido del criotubo correspondiente gota a gota, para evitar un choque térmico; se resuspendió varias veces con pipeta y se centrifugó a 1150 rpm por 3 min., se descartó el sobrenadante y se agregaron 5 ml. del medio de crecimiento correspondiente a cada línea celular en botellas T25 con filtro.

### *Línea celular MT-2*

Línea linfoblástica T humana, crece en suspensión formando grandes racimos y contienen endógenamente el HTLV-1. Derivada de sangre del cordón umbilical cocultivada con células de un paciente con leucemia de células T aguda. Carecen del receptor CCR5 y sólo presentan el receptor CXCR4. La línea celular MT-2 es utilizada en ensayos de infección con VIH para detectar aislados formadores de sincisios (SI) y aislados no formadores de sincisios (NSI) (34).

Medio de crecimiento: RPMI 1640 + 2mM L-Glutamina + 10% Suero Fetal Bovino (SFB). Se mantuvo el cultivo en  $2-9 \times 10^5$  células/ml. a 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$ .

### *Línea celular H9*

Esta línea celular se caracteriza por tener una morfología linfoblástica humana, posee CD4. Crece en suspensión formando pequeños agregados aislados. Seleccionada por la capacidad de aislar y producir constantemente altos niveles de VIH-1 de pacientes con SIDA.

Para su crecimiento, se suplementó el medio de cultivo RPMI 1640 con 5  $\mu$ l de gentamicina/ ml de medio y 10% de Suero Fetal Bovino. El RPMI se resuplementó con L-glutamina (2mM) 100  $\mu$ l / ml de medio cuando se descongeló la línea celular y se mantuvo esta concentración durante dos semanas, posteriormente se bajó a 50  $\mu$ l / ml de medio durante 1 semana y pasado este tiempo, el cultivo celular se suplementó con 25  $\mu$ l de L-glutamina / ml de medio. Se mantuvieron los cultivos con concentraciones celulares entre 500,000 células/ml hasta 2,000,000 células/ml. (se sugiere  $5 \times 10^5$ ). Todos los cultivos celulares se mantuvieron agregando medio fresco o reemplazando el medio por centrifugación subsecuente a resuspender en medio fresco, renovando el medio cada 2 a 4 días y se mantuvo a 37 °C a 5% de CO<sub>2</sub>.

#### *Línea celular Jurkat*

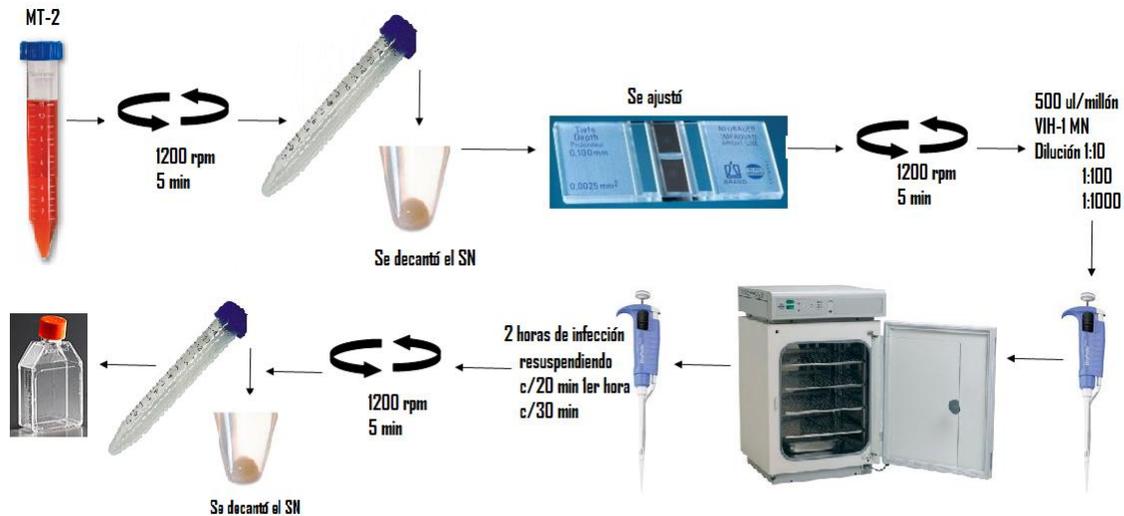
También conocida como línea celular E6 o Jurkat E6.1, es una línea celular humana obtenida de una muestra de sangre con leucemia, con morfología linfoblástica, expresa CD4 y CXCR4 en su membrana celular. Crece en suspensión formando pequeños agregados.

Medio de crecimiento: RPMI 1640 + 2mM L-Glutamina + 10% Suero Fetal Bovino (SFB). Se mantuvo el cultivo a 3-9 x 10<sup>6</sup> células/ml. a 5% CO<sub>2</sub> a 37°C.

#### *Infección en la línea celular MT-2*

Se pasaron las MT-2 que se encontraban creciendo de forma normal a un tubo de 50 ml y se centrifugó a 1200 rpm durante 5 minutos, al término del tiempo, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1ml de su medio de crecimiento, con la ayuda de la cámara de Neubauer se ajustó la suspensión celular a  $5 \times 10^6$  células en un tubo de 15 ml. Posteriormente se centrifugó a 1200 rpm por 3 minutos y se decantó el sobrenadante. El pellet debe quedar con la menor cantidad de medio posible, así que después de decantar se usó una micropipeta, y con mucho cuidado de no tocar el pellet, retiramos la mayor cantidad de medio posible. Tomamos el criovial con VIH-1 MN y lo descongelamos a baño María, limpiando el criovial con una sanita con alcohol al 70% antes de meterlo a la campana de bioseguridad. Para preparar la dilución 1:10 se tomaron 900  $\mu$ l de RPMI 1640 + 100  $\mu$ L de sobrenadante de VIH-1, una vez preparada esta dilución se tomaron 100  $\mu$ l de 1:10 + 900  $\mu$ l de RPMI 1640 para obtener la dilución 1:100, y de ésta (1:100) se tomaron 100 $\mu$ l + 900  $\mu$ l de RPMI 1640 y se obtuvo la dilución 1:1000. Tomamos 500  $\mu$ l de la dilución del sobrenadante con VIH-1 correspondiente y lo agregamos a las células, resuspendiendo con la micropipeta y colocamos el tubo con las células y el virus en la incubadora durante 2 horas a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> de tal forma, que el tubo quedó inclinado (lo colocamos recargando la tapa del tubo en una gasa estéril). Giramos  $\frac{1}{4}$  de vuelta la tapa del tubo para que hubiera intercambio gaseoso entre el interior del tubo y el ambiente de la incubadora. Cada 20 minutos se sacó el tubo de la incubadora, habiendo cerrado antes la tapa, para resuspender las células. Al término de las 2 horas, centrifugamos a 1500 rpm por

10 minutos decantando el sobrenadante posteriormente. El pellet debe quedar con la menor cantidad de medio posible (Esquema 1), así que después de decantar usamos una micropipeta, y con mucho cuidado de no tocar el pellet, tomamos la mayor cantidad de medio posible desechándolo. Resuspendimos el pellet en 5 ml del medio de crecimiento de esta línea celular, luego pasamos las células a una botella T-25 y mantuvimos el cultivo en la incubadora a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> en posición vertical. Al colocar los cocultivos se agregó a los pozos correspondientes los inhibidores de fusión T-20 y α-CD4, 4 μl de una dilución 1:1000 del inhibidor T-20 a una concentración final de 2 μg/ml, y 10 μl de una dilución 1:100 de α-CD4.



*Esquema 1. Diagrama de flujo de la infección en la línea celular MT-2. En todas las infecciones realizadas en las tres líneas celulares, se llevó a cabo este mismo protocolo como base, solo se modificó el tiempo de infección, el uso del polication polibren y concentración del sobrenadante viral. Estas modificaciones se realizaron en los últimos experimentos realizados con la línea celular H9 y Jurkat.*

### *Infección en la línea celular H9*

Se propagó el VIH-1 MN y IIB. Se resuspendieron varias veces las células y se colocó la cantidad suficiente de suspensión celular que contenga  $5 \times 10^6$  células en un tubo de 15 ml, se centrifugó a 1200 rpm por 3 minutos y posteriormente, se decantó el sobrenadante; el pellet debe quedar con el menor volumen de medio posible, así que, después de decantar se usó una micropipeta y con mucho cuidado de no tocar el pellet, se tomó la mayor cantidad de medio posible y se desechó. Se tomó el criovial con VIH-1 (MN y IIB) y se descongeló en baño María (limpiando con una sanita con alcohol antes de meterlo a la campana) tomamos 500 μl de la solución con VIH-1 MN y IIB, es decir, 100 μl /millón de células y se agregó a las células, resuspendiendo con la micropipeta, se mantuvo el tubo con las células y el virus en la incubadora durante 2 horas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> de tal forma, que el tubo quedó inclinado girando ¼ de vuelta la tapa del tubo para que hubiera intercambio gaseoso entre el interior del tubo y el ambiente de la incubadora, sacando cada 20 minutos el tubo de la incubadora, habiendo cerrado antes la tapa, para resuspender las células que se hayan asentado. Al pasar las dos horas se centrifugó y decantó (con micropipeta se eliminaron los excedentes de sobrenadante), posteriormente se agregó medio RPMI 1640

suplementado al 10% de SFB y 15% de glutamina en la incubadora a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> en posición vertical.

#### *Cosecha del Sobrenadante de la infección*

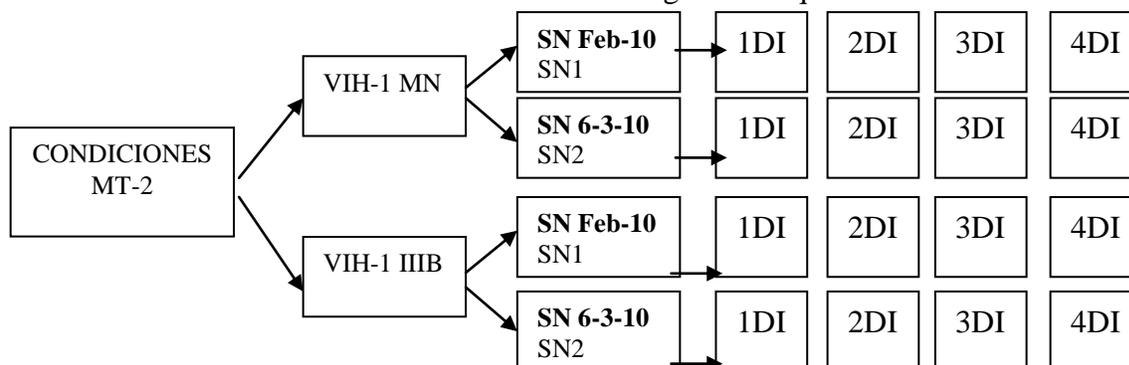
Se cosechó sobrenadante de los días 4°,7°,11°,14°, 18°, 21°, 25° y 28° de infección, obtenidos de la cinética de infección con duración de cuatro semanas; 30 minutos antes de cosechar se colocaron en posición vertical las botellas que contenían las células infectadas de la línea celular H9 (MN y IIIB) para dejar que sedimentaran las células en el fondo, una vez que transcurrió el tiempo, se sacaron de la incubadora con mucho cuidado para no resuspender las células asentadas, con una pipeta se tomó la mitad del volumen contenido en la botella (si no se movió demasiado la botella, el medio que se tomó no debe contener células) y se colocó en un tubo para centrifugar a 2000 rpm por 10 minutos; con una micropipeta se tomaron alícuotas de 1 ml del sobrenadante (teniendo cuidado de no tocar el fondo del tubo para no llevarse el sedimento) colocándolo en criotubos debidamente rotulados. A la botella de cultivo celular se le agregó la misma cantidad de medio RPMI-10 suplementado con 15% de glutamina que se extrajo al inicio.

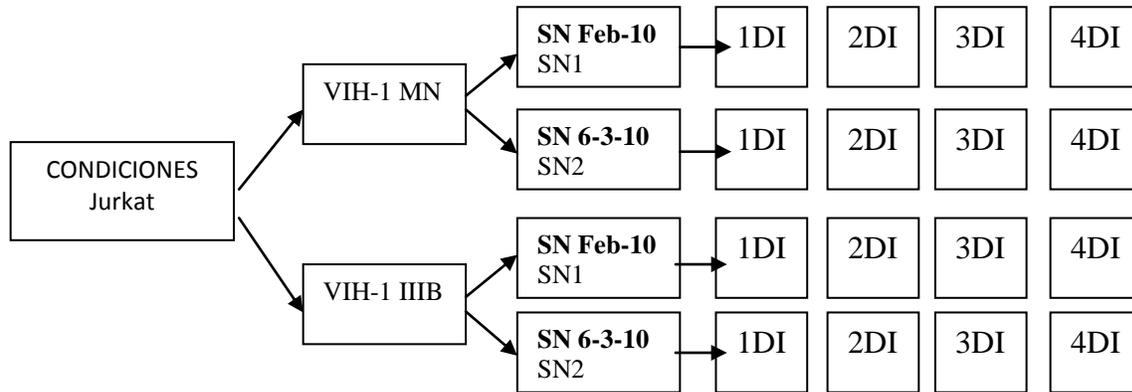
#### *Reposición de la población celular*

Una vez a la semana se repuso al cultivo celular la población original de células ( $5 \times 10^6$ ) H9 nuevas (no infectadas) para reponer las células que murieron por la infección y poder propagar el virus durante 4 semanas.

#### *Infección de las líneas celulares MT-2 y Jurkat*

Se llevó a cabo una cinética de infección de 4 días (4DI), en donde se observó por medio de un microscopio invertido efectos citopáticos, es decir, la formación de sincicios (35), formación de *ballon degeneration* que es la pérdida de la integridad de la membrana celular y como consecuencia la muerte celular (36) observada por medio de azul tripán, causados por la infección con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana 1 (VIH-1), utilizando 2 sobrenadantes (SN) diferentes obtenidos de cinéticas de infección con la línea celular MT-2, Febrero del 2010 (SN1) y 6 de Marzo del 2011 (SN2) para dos cepas de VIH-1 (MN y IIIB). La infección se realizó al colocar en tubos de 50 ml las células MT-2 y Jurkat, se centrifugó a 1200 rpm por 5 min a 25 °C, se ajustaron las células para cada población y cada condición (se contaron con azul tripán y cámara de Neubauer), se infectó con los sobrenadantes de VIH-1. Como se muestra en el siguiente esquema.





Se infectó con 1 ml de VIH-1 por millón de células, se mantuvo en la incubadora a 37°C y se resuspendió cada 20 minutos durante dos horas. Se lavó 1 vez con medio RPMI suplementado y se decantó eliminando con una micropipeta el exceso de sobrenadante para dejar la menor cantidad posible y se dejaron las células en botellas. Se mantuvo el cultivo celular con medio RPMI 1640 + 10% SFB. Se colocaron en placas de 48 pozos, cada condición con su duplicado.

#### *Viabilidad celular para Jurkat*

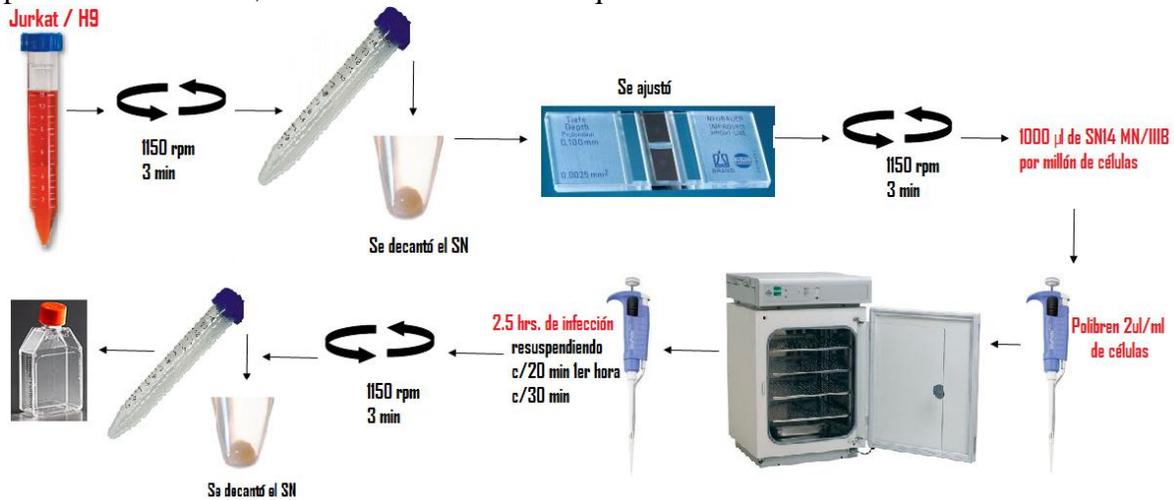
Se midió la viabilidad de cada condición por medio de azul tripán. Se contó con la cámara de Neubauer la población total, es decir, las células vivas y las células muertas.

#### *Infección modificada para la línea celular Jurkat y H9*

Se infectó con VIH-1 MN y IIIB a las líneas celulares H9 y Jurkat. Para la infección se utilizó el sobrenadante (SN) cosechado el día 14, obtenido de la cinética de infección con duración de 30 días de las H9, es decir, el sobrenadante 14 (SN14) de las células infectadas con VIH-1 MN y IIIB respectivamente.

Se ajustaron  $5 \times 10^6$  células de cada línea celular para cada virus, se colocaron en tubos de 15 ml. y se centrifugaron a 1150 rpm por 3 minutos, posteriormente se decantó el medio y con una gasa estéril se limpió cualquier rastro de medio; ésto con el fin de asegurar que sólo quede el pellet de células en el tubo de 15 ml, después se rotuló cada tubo con el tipo de célula que contenía y el virus con el que se infectaría; el virus se descongeló a baño María a 37°C, una vez en estado líquido, con una micropipeta se resuspendió varias veces el criovial para homogenizar los sobrenadantes, se agregó 5 ml a cada uno de los tubos, es decir, 1000 µl de SN14 MN/IIIB por cada millón de células blanco; con una punta de 1 ml se resuspendió cada tubo para deshacer el pellet y homogenizar el virus con las células, después agregamos el polication polibren a una concentración de 2µg/ml de células y posteriormente, se colocaron en la incubadora a 37°C a 5% de CO<sub>2</sub> y se colocaron los tubos en una gradilla girando ¼ de vuelta la tapa del tubo para que hubiera intercambio gaseoso entre el interior del tubo y el ambiente de la incubadora, sacando el tubo de la incubadora para resuspender las células, cada 20 minutos (la primera hora) y después cada 30 minutos hasta lograr 2.5 hrs de infección.

Al término de las dos horas y media de infección, se centrifugó a 1150 rpm durante 3 minutos y luego se decantó cada tubo (con micropipeta se eliminaron los excedentes de sobrenadante), posteriormente, se agregó 5 ml. del medio de crecimiento correspondiente para la línea celular, como se muestra en el esquema 2.



Esquema 2. Diagrama de flujo de la infección modificada en las líneas celulares Jurkat y H9. En rojo se observan las modificaciones realizadas en el protocolo de infección.

### Infección modificada para la línea celular Jurkat

En este experimento, se trató de optimizar la infección modificando la concentración de partículas virales presentes en el sobrenadante y el polication polibren. Para aumentar la concentración de las partículas virales utilizamos los tubos Amicon® Ultra 100K, éstos son unidades de ultrafiltración por centrifugación y tiene la capacidad de concentrar hasta 80 veces la muestra deseada, el tiempo de procesamiento típico es de 15 a 60 minutos, dependiendo de qué tan concentrada se desee la muestra. En el experimento pasado (Infección modificada para la línea celular Jurkat y H9) utilizamos 2ug/ml de células de polibren para la infección, en este experimento se aumentó a 8ug/ml de células.

Primero se ajustaron las células Jurkat con azul tripán y cámara de Neubauer:

DiI (para infectar)  $\rightarrow 2 \times 10^6$

DiI (no infectadas)  $\rightarrow 3 \times 10^6$

DiO (células blanco)  $\rightarrow 3 \times 10^6$

Se marcaron con el colorante correspondiente, con DiO las células Jurkat blanco (células blanco), con 25ul de una dilución 1:30, y con DiI se marcaron dos poblaciones en paralelo, las células Jurkat para infectar y otras DiI Jurkat que no se iban a infectar, cada una con 8ul de una dilución 1:10. Al término del marcaje, se resuspendió cada población celular en su medio de crecimiento correspondiente y se colocaron en botellas T25 en la incubadora a 37°C a 5% CO<sub>2</sub>.

Al día siguiente se llevó a cabo la infección, primero esterilizamos el tubo Amicon® Ultra 100K en luz UV por 15 minutos, posteriormente, colocamos 15 ml del SN 14 de la cepa IIB dentro del tubo Amicon® Ultra 100K y se centrifugó por 15 minutos a 5,000 rpm a 22°C. Al término del tiempo, en el dispositivo de ultrafiltración, con punta de 200ul resuspendimos varias veces el concentrado final descargando en cada ocasión sobre las

paredes del filtro, con la finalidad de recuperar la mayor cantidad de muestra, recuperamos el total de 250ul, es decir, de un volumen inicial de 15 ml pudimos concentrarlo en 250ul, este sería el concentrado del SN 14 de la cepa IIB utilizado para la infección.

Posteriormente, tomamos los  $2 \times 10^6$  células Jurkat marcadas con DiI (para infectar) de la botella T25 y se pasaron a un tubo de 15 ml, se centrifugó y decantó el medio de cultivo y con una punta se quitó el exceso de sobrenadante que queda al decantar, dejando solamente el pellet celular.

Agregamos 400ul del medio de cultivo RPMI + 100ul del SN 14 IIB concentrado, con la finalidad de hacer una dilución 1:5, tomando en cuenta que por millón de células son 200ul de RPMI + 50ul SN viral concentrado. Agregamos 4ul de Polibren (8ug/ml de células) y Resuspendimos varias veces con punta azul. Colocamos el tubo con las células infectadas en la incubadora a 37°C a 5% de CO<sub>2</sub> girando  $\frac{1}{4}$  la tapa para permitir el intercambio de gases. Resuspendimos cada 20 min durante la primera hora de infección y posteriormente cada 30 minutos hasta cumplir las 2.5 hrs de infección. Al término de la infección, centrifugamos y retiramos el sobrenadante con punta sin tocar el pellet. Las células Jurkat infectadas se resuspendieron en 3 ml de su medio de crecimiento en botella T25 y se colocaron en la incubadora, como se observa en el esquema 3. Las células infectadas y no infectadas se checaban todos los días y se les agregó medio en caso de necesitarlo.

La finalidad de este experimento fue realizar la tinción intracelular para p24 y medir partículas con fluorescencia mixta de células con diferentes días de infección (dos y tres) y con un día de cocultivo.

Al día dos de infección se colocaron en placa de 48 pozos los primeros cocultivos, es decir, los correspondientes a dos días de infección (2DI) y un día de cocultivo, teniendo cada cocultivo una proporción 1:1 de células infectadas y no infectadas.

Los cocultivos se pusieron al pasar la mitad del volumen total de las botellas T25 a tubos de 15 ml, centrifugamos y decantamos el sobrenadante. Ajustamos cada una de las poblaciones para dejarlas a una densidad de 100,000 células/ml. Al colocar los pozos de cocultivos para las células infectadas, colocamos primero las células infectadas y posteriormente el T-20 (10ul de una dilución 1:100 a una concentración final de 50ug/ml), resuspendiendo varias veces y después se agregaron las células blanco (DiO no infectadas) resuspendiendo nuevamente.

Marcamos con plumón el diseño de la placa A (infectadas) y la placa B (no infectadas) sobre cada placa como se muestra a continuación:

PLACA A (Jurkat infectadas)

Jurkat coc 2DI	Jurkat coc 2DI	Jurkat coc 2DI+T- 20	Jurkat coc 2DI+T- 20	Jurkat DiI p24 2DI	Jurkat DiI p24 2DI		
Jurkat coc 3DI	Jurkat coc 3DI	Jurkat coc 3DI+T- 20	Jurkat coc 3DI+T- 20	Jurkat DiI p24 3DI	Jurkat DiI p24 3DI		

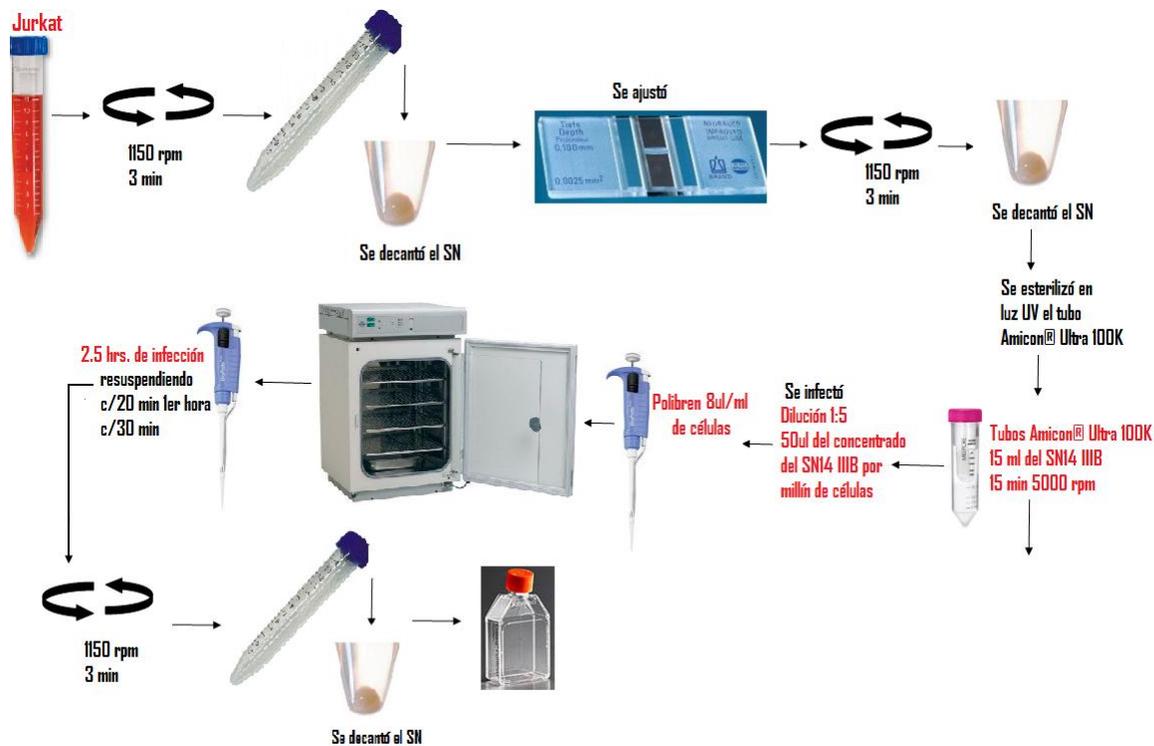
PLACA B (Control, no infectadas)

Jurkat DiI 2DI	Jurkat DiI 2DI	Jurkat DiO 2DI	Jurkat DiO 2DI	Jurkat MIX 2DI	Jurkat MIX 2DI	Jurkat SM	Jurkat SM
Jurkat DiI p24 2DI	Jurkat DiI p24 2DI						
Jurkat DiI 3DI	Jurkat DiI 3DI	Jurkat DiO 3DI	Jurkat DiO 3DI	Jurkat MIX 3DI	Jurkat MIX 3DI	Jurkat SM	Jurkat SM
Jurkat DiI p24 3DI	Jurkat DiI p24 3DI						

Al día siguiente se colocaron los cocultivos para el tercer día de infección (3DI) y un día de cocultivo, se tomó lo que quedaba en las botellas T25 de cada población celular, se centrifugó y decantó el sobrenadante, se ajustó cada población celular para dejarlas a una densidad de 100,000 células/ml y se colocaron los cocultivos.

Al concluir los tiempos de cocultivos deseados, cosechamos cada muestra para su análisis en el citómetro *Attune*, esto, al colocar cada muestra en tubos enumerados previamente con 2 ml de PBS 1X, centrifugando a 1150 rpm por 3 minutos a 22°C y decantando posteriormente. Fijamos con PFA al 2% por 40 minutos y al mismo tiempo realizar el protocolo de tinción intracelular para p24 a los pozos indicados.

Para las muestras que se fijaron: agregamos 250ul de PBS 1X + 250 ul de PFA 4%, resuspendimos cada 20 minutos, al término del tiempo, centrifugamos, decantamos resuspendiendo en 500 ul de PBS 1X en tubos eppendorf de 1.5 ml para su análisis en el citómetro *Attune*.



Esquema 3. Diagrama de flujo de la infección modificada en la línea celular Jurkat. En rojo se observan las modificaciones realizadas en el protocolo de infección.

### Tinción intracelular para p24

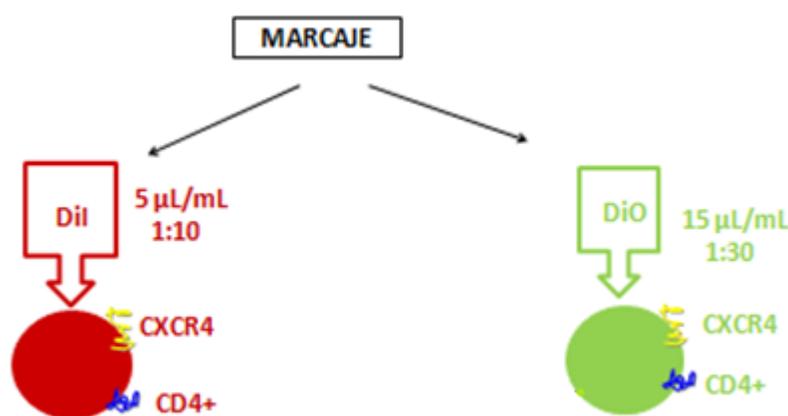
Para las muestras que se marcaron para p24 intracelular: pasamos las células de cada pozo a tubos de FACS, lavamos las células con 2 ml de PBS conteniendo 1% de SFB (a temperatura ambiente) y centrifugamos a 1150 rpm por 3 minutos, decantamos absorbiendo la gota sobre una gasa estéril y luego desechándola. Agregamos 250 µl de Cytifix/CytoPerm (BD, kit 554714) a temperatura ambiente con punta azul y resuspendimos 2 veces con la misma punta todos los tubos para evitar que las células se peguen, luego pasamos a hielo e incubamos por 20 minutos. Posteriormente lavamos agregando 3 ml de PermWash 1X frío, centrifugamos a 1150 rpm, 5 minutos a 22°C. Repetimos el lavado absorbiendo la gota al final con una gasa estéril y posteriormente desechándola. Agregamos 300 µl de PermWash 1X frío a todos los tubos y después agregamos 1 µl de anticuerpo anti-p24 (KC57) acoplado a FITC. Incubamos 30 minutos en hielo en la oscuridad. Al término del tiempo de incubación lavamos 2 veces con PermWash 1X a 4°C a 1150 rpm por 5 min. Resuspendimos en 500 µl de PBS 1X en tubos eppendorf para su análisis en el citómetro *Attune*.

### Marcaje

El colorante de membrana lipofílico DiI tiene una fluorescencia roja que se lee en el canal FL2 en el citómetro FACSCalibur, posee el fluorocromo ficoeritrina (PE). Mientras que el

colorante DiO tiene un color verde cuando fluoresce, se lee en el canal FL1 y es un isotiocianato de fluoresceína o FITC.

Se obtuvo el pellet de células, se resuspendió y se ajustaron para tener máximo de  $5-15 \times 10^6$  células en 1 ml de medio de crecimiento. Se adicionaron los colorantes de membrana: DiI 1:10 (fluorescencia rojo)= 5  $\mu\text{L}/\text{ml}$  de medio (células infectadas). Viable de 2-3 meses. DiO 1:10 (fluorescencia verde)=15  $\mu\text{L}/\text{ml}$  de medio (células no infectadas). Aumentar de 2-3  $\mu\text{L}/\text{ml}$  por cada semana después de preparación. Se homogenizó el colorante (se resuspendió), se incubó 15 min., protegidos de la luz, a temperatura ambiente con agitación moderada; se hizo dos lavados con 8 ml de medio RPMI de lavado, se centrifugó a 1150 rpm por 3 minutos y se decantó el sobrenadante. Para todas las cinéticas de infección, se marcaron las células un día antes de la infección, como se observa en el esquema 4.

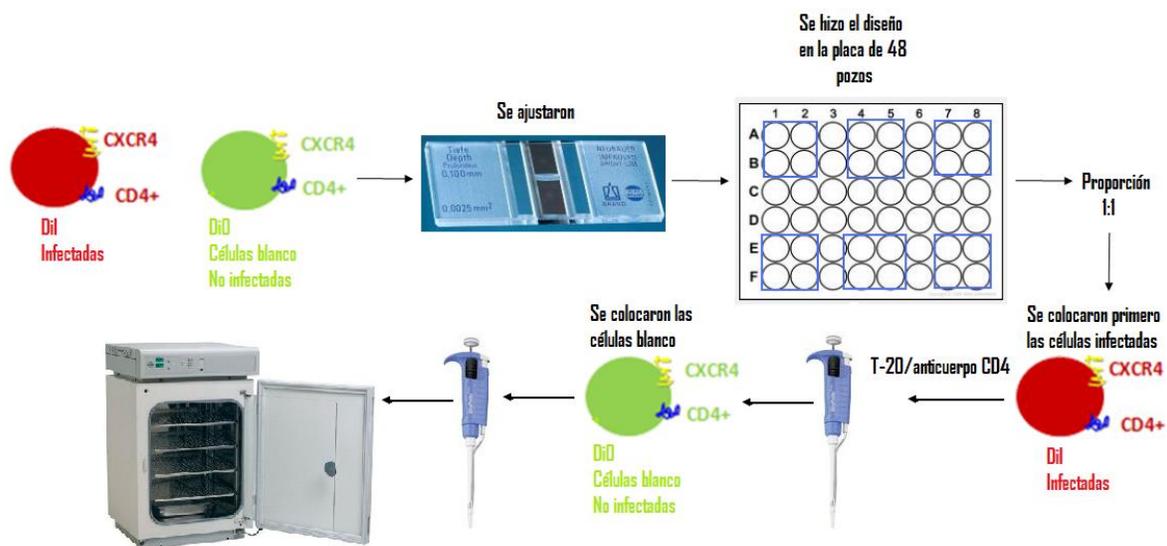


Esquema 4. Diagrama de flujo del marcaje con los colorantes lipofílicos DiI (rojo) y DiO (verde) en las líneas celulares MT-2, H9 y Jurkat.

### Cocultivo

Una vez marcadas las células con el colorante DiI, e infectadas las células de la línea celular deseada, se colocaron las células en cocultivo. Todos los cocultivos realizados fueron entre células de la misma línea celular y a una proporción 1:1.

El cocultivo consta de ajustar las distintas poblaciones celulares contenidas en el medio de crecimiento correspondiente contando con la cámara de Neubauer y azul tripán, después de tener el número de células infectadas (DiI) y no infectadas (DiO) necesarias para colocar los cocultivos, se hizo el diseño de la distribución (como se observa en el esquema 5) y especificación de cada pozo dibujando sobre la tapa de cada placa utilizada, siempre rotulando el tipo de virus y la línea celular. Se agregaron primero las células DiI en los pozos de la placa determinada y marcados anteriormente, una vez colocadas todas las células infectadas se adicionaron los inhibidores de fusión (T-20/ $\alpha$ -CD4) en los pozos correspondientes y se resuspendió varias veces, una vez realizado esto, se agregaron las células blanco marcadas con el colorante DiO.

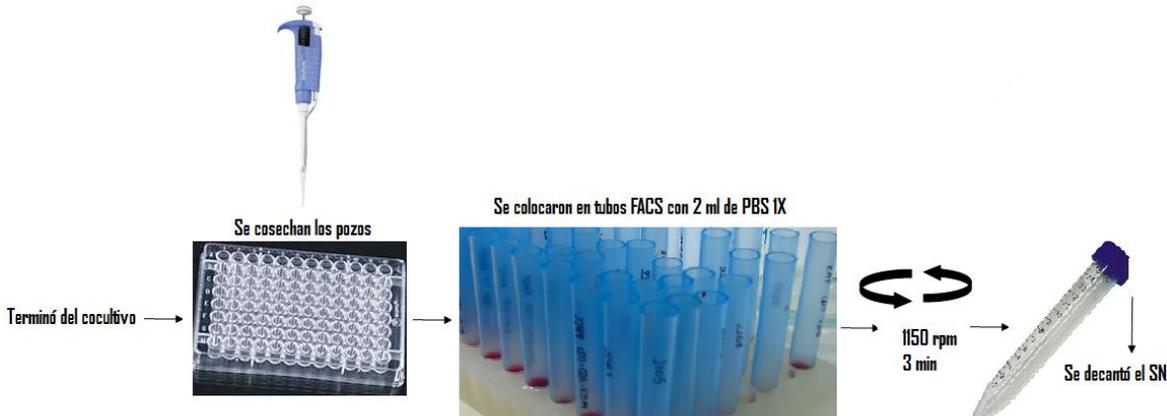


Esquema 5. Diagrama de flujo de cómo se colocan los cocultivos celulares.

### Cosecha

Al término de los tiempos de cocultivo, se cosecharon y fijaron las células para su posterior análisis en el citómetro de flujo.

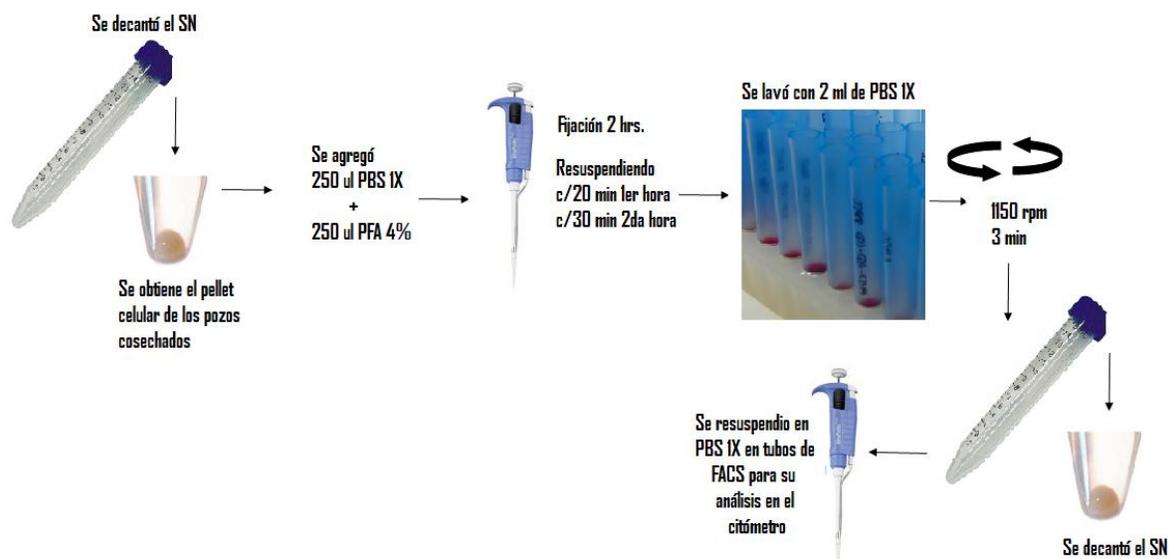
La cosecha consistió en rotular el número necesario de tubos de FACS (esquema 6), agregándole a cada uno 2 ml. de PBS 1X, posteriormente con una micropipeta de 1 ml. se resuspendió con cuidado el pozo que se iba a adquirir y se depositó en el tubo de FACS correspondiente. Se centrifugaron los tubos de FACS a 1150 rpm durante 3 minutos y se decantó el sobrenadante.



Esquema 6. Diagrama de flujo de cómo se cosecharon los pozos al término del tiempo de cocultivo.

## Fijación

Para poder analizar las muestras en el citómetro de flujo es necesario fijar las células por medidas de bioseguridad, este procedimiento se realiza posteriormente a la cosecha. Se fijó con paraformaldehído (PFH) al 2% durante 2 horas (esquema 7), resuspendiendo los tubos con punta de 1 ml cada 20 minutos durante la primera hora y cada 30 minutos la segunda hora; luego se lavó con 2 ml de PBS 1X y se resuspendió en buffer de FACS para su análisis en el citómetro.



Esquema 7. Diagrama de flujo de cómo se fijaron con PFA al 2% los pozos cosechados al término del cocultivo.

## Fusión celular

La fusión celular se cuantificó con la presencia de células con fluorescencia mixta, es decir, células positivas para DiI y para DiO. Células infectadas marcadas con DiI y células no infectadas marcadas con DiO.

## ELISA

Utilizamos el kit PerkinElmer HIV-1 p24 ELISA, número de catálogo NEK050. La ELISA se realizó para determinar la presencia de p24 y su concentración en los sobrenadantes obtenidos en la cinética de infección de la línea celular H9 con duración de 4 semanas.

Todos los reactivos fueron preparados de acuerdo a las instrucciones del protocolo y siguiendo todas las normas de seguridad necesarias para manejar todos los reactivos del kit. Como nuestras muestras problema fueron sobrenadantes cosechados de cinéticas de infección, no utilizamos los reactivos contenidos en el kit para la disrupción del complejo inmune, es decir, el complejo antígeno/anticuerpo presente en muestras de plasma o suero de pacientes infectados.

Los sobrenadantes estaban previamente congelados y almacenados a -20°C. Se descongeló a baño María todos los sobrenadantes.

Se mantuvieron los reactivos a temperatura ambiente (15-30°C), se preparó la solución de lavado 1X, todos los demás reactivos de trabajo se prepararon 15 minutos previos a su uso y en cantidades exactas para el ensayo en curso, esto, con la finalidad de no desperdiciar ningún reactivo del kit.

Primero se prepararon las muestras para la curva estándar al diluir, con el medio de crecimiento de la línea celular H9 limpio, el Control Positivo (CP) de 200 ng/ml.:

Curva estándar (pg/ml)	Tubo	Medio de cultivo limpio Diluyente (µl)	Agregar (µl)
4000	A	980	20 del Control positivo
100	B	975	25 tubo A
50	C	500	500 tubo B
25	D	500	500 tubo C
12.5	E	500	500 tubo D

Solo los tubos B-E (12.5 - 100 pg/ml) se utilizaron para correr la curva estándar.

Posteriormente se agregaron 20 µl de Tritón X-100 a todos los pozos excepto al sustrato blanco. Agregamos 200 µl del diluyente apropiado (medio de cultivo limpio) a los tres pozos designados para el control negativo. Agregamos 200 µl del tubo B y de las demás muestras correspondientes a la curva estándar (tubo C, D y E). Se resuspendió bien cada pozo con la ayuda de una micropipeta; se sello la placa con papel aluminio y se incubó por dos horas a 37°C.

Al término del tiempo de incubación se lavó la placa 6 veces con la solución de lavado 1X utilizando 300 µl /pozo. Antes de agregar el siguiente reactivo descartar los excedentes del buffer de lavado con una sanita. Agregamos 100 µl del anticuerpo detector a todos los pozos excepto al sustrato blanco. Sellamos la placa y se incubó por 60 minutos a 37°C.

Se volvió a lavar 6 veces con la solución o buffer de lavado y se descartó los excedentes también, se preparo Streptavidina HRP diluida a 1:100, se agregó 100 µl de esta dilución a todos los pozos excepto al sustrato blanco, sellamos la placa nuevamente e incubamos por 30 minutos a temperatura ambiente (15-30°C).

Posteriormente se lavó 6 veces, descartando todos los excedentes del buffer de lavado con una sanita, se agregó 100 µl de la solución sustrato OPD a todos los pozos incluyendo al sustrato blanco. Se selló la placa y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente (15-30°C) en la obscuridad. Al cumplir el tiempo de incubación se detuvo la reacción al agregar 100 µl de la Solución de paro a todos los pozos. Se leyó la placa a una longitud de onda de 490 o 492 nm, utilizando un filtro diferencial > 600 nm. La placa se analizó 15 minutos después de haber detenido la reacción.

### *Viabilidad celular*

Utilizamos el azul tripán para comprobar la viabilidad de las células en los experimentos.

El azul tripán es un colorante que en las células viables, es decir, con membrana intacta, no se incorpora y por el contrario, sí atraviesa la membrana de las células muertas.

### *Citometría de flujo*

Por medio de la unidad de citometría del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM se llevó a cabo el análisis de cada una de las muestras. Se utilizó el FACSCalibur, capaz de analizar hasta 4 colores diferentes y cuenta con dos láseres. Usa Cell Quest Pro como programa de adquisición. El FACSCalibur permite analizar muestras marcadas con los siguientes fluorocromos: FL1: FITC y FL2: PE.

También se utilizó el citómetro Attune rojo/azul para el análisis de algunos datos. Este citómetro de flujo consta de un láser rojo y uno azul, es capaz de detectar varios fluorocromos entre ellos FITC y PE. Se utilizó el programa Attune Cytometric Software versión 1.2.5 para el análisis de los datos.

## Resultados

### I. Propagación de las cepas MN y IIB del VIH-1 en células H9

#### *Condiciones generales*

\*Células: línea celular H9

\*Cepa viral: MN y IIB del VIH-1

\*Duración de la cinética de infección: 4 semanas

\*Dilución del sobrenadante viral: 100ul de sobrenadante sin diluir por millón de células

\*Tiempo de infección: 2 horas

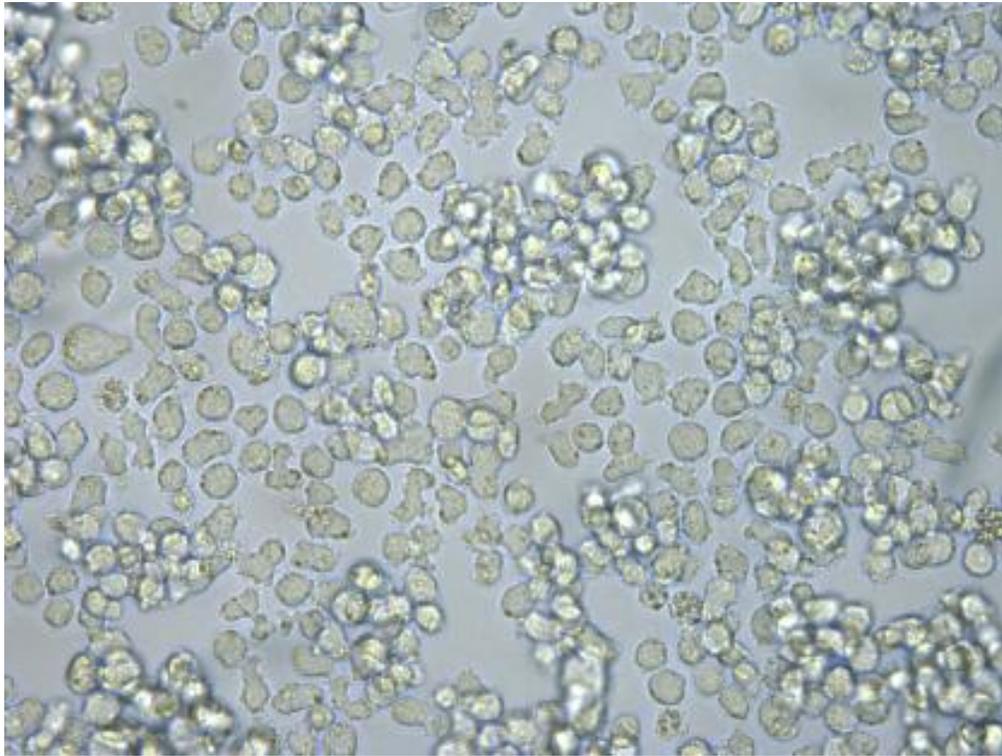
\*Polication: no

Se infectó la línea celular H9 durante 4 semanas, con la finalidad de propagar el virus y obtener al final sobrenadantes (SN) que utilizaríamos en experimentos futuros para infectar a otras líneas celulares.

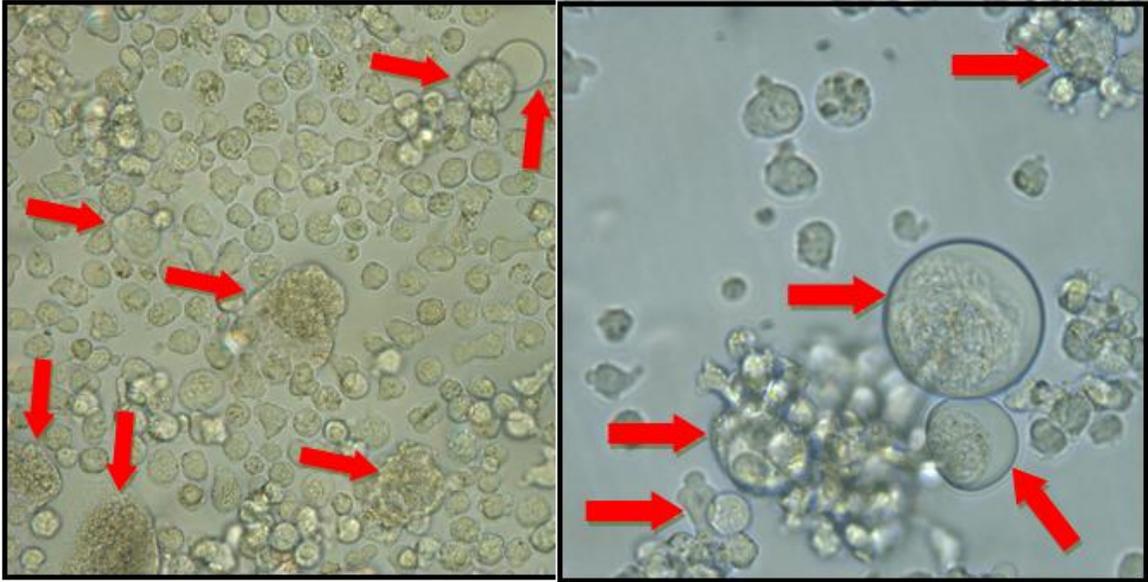
Infectamos con las cepas MN y IIB a las células H9 ( $5 \times 10^6$  de células por cada cepa) como se describe en Metodología, manteniendo una proporción de 100 ul de SN/millón de células. Cada 7 días se agregaron  $5 \times 10^6$  células H9 frescas, para reponer las células que morían durante la infección y poder seguir con la propagación del virus. Los días 4°, 7°, 11°, 14°, 18°, 21°, 25° y 28° cosechamos sobrenadantes de los cuales se hicieron alícuotas de 1 ml y se resguardaron en nitrógeno líquido.

En la figura 1 se puede observar las células H9 no infectadas. Esta línea celular crece en suspensión y muestran la formación de agregados cuando se encuentran creciendo satisfactoriamente, como se puede observar en la imagen.

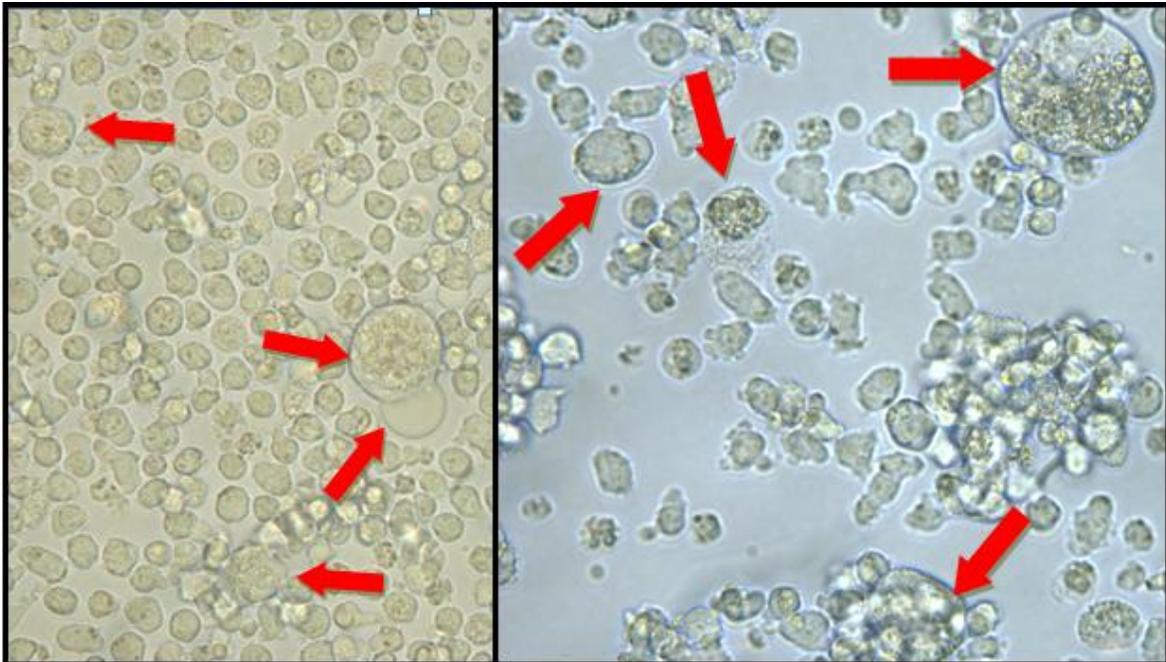
En la figura 2 y 3, se pueden observar células H9 infectadas con VIH-1, cepas MN y IIB, las fotos se tomaron de la misma forma que la imagen anterior. Las flechas rojas que se observan muestran células gigantes, muchas de las cuales denotan un claro efecto citopático. Este efecto se observó a partir del día dos de infección.



*Fig.1. Células H9 no infectadas, 40X. Se observa que esta línea celular forma pequeños agregados cuando se encuentran creciendo satisfactoriamente.*



*Fig. 2. Células H9 dos días post-infección con VIH-1 MN, 40X. Las flechas rojas señalan células gigantes.*



*Fig. 3. Células H9 dos días post-infección con VIH-1 IIB, 40X. Las flechas rojas señalan células gigantes.*

## II. Cuantificación de antígeno p24

Realizamos un ensayo de ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, por sus siglas en inglés), con la finalidad de detectar el antígeno p24 del VIH, que es la proteína estructural de la cápside, en los sobrenadantes que se obtuvieron en la cinética de infección de la línea celular H9.

Se escogieron los sobrenadantes de los días 14, 18 y 21 para cada cepa viral. Como se puede observar en la figura 4, los dos primeros pozos de la fila A son los controles negativos (color transparente) y los de la fila B son los sustratos blanco (color transparente). Los pozos de las filas C a F corresponden a los pozos de la curva estándar con su respectivo duplicado (color amarillo). Para las muestras problema utilizamos dos diluciones de los sobrenadantes 1:2000 y 1:5000. Los pozos correspondientes a la dilución más baja, es decir en donde había más antígeno viral, son los pozos que se ven en café. En ellos no pudimos obtener ningún dato por la concentración tan alta que había de antígeno viral. Los únicos valores que pudimos analizar fueron los que se encontraban en la mayor dilución 1:5000 (color amarillo, debajo de los pozos color café).

Los valores promedio de la absorbancia de la curva estándar y de las muestras problema (fig.5) se graficaron, colocando en el eje “y” los valores de la absorbancia y en el eje “x” los valores de la concentración de p24 pg/mL (fig.6). En la tabla mostrada en la figura 7, se muestra la concentración de p24 en los sobrenadantes. Se observa que la concentración más alta de antígeno se obtuvo al día 14 de infección para ambas cepas virales

Inicialmente se obtuvo el valor de corte (fig.8). El valor obtenido fue de 0.1668. Se comparó con el promedio de cada muestra problema y si alguno de estos era menor al valor de corte se determinaba esa muestra como no reactiva (NR), pero por si el contrario, la muestra comparada era mayor al Cutoff, esa muestra se consideraba como inicialmente reactiva (IR) como se observa en la figura 9.



Fig.4. Resultado de la Placa de ELISA PerkinElmer para la detección de p24 del VIH-1 en los SN de las células H9.

```

bradford *.PLA 1 2 22.02.2012 18:25:43
sesión:
  Sesión: bradford *
  Formato placa: 96 pocillos
  Área: A1 - H4
  Tipo de medición: 0 Única
  Modo de medición: 1 Precisión
  Longitud de onda (nm): 490

  Temp. requerida (°C): NO
  Agitación: 0 NO
  Duración (hh:mm:ss): 00:00:20
  velocidad: 1 Medio

Análisis:
  Instrumento: Multiskan GO 1.00.38|
  N° de serie: 1510-00149C
  Hora de inicio: 22.02.2012 18:23:38
  Hora de fin: 22.02.2012 18:24:08
  Temperatura de inicio: 22.8
  Temperatura de fin: 22.8

Datos: 490 nm
  1 2 3 4
A 0.0754 0.0911 #.#### #.####
B 0.0884 0.0947 #.#### #.####
C 1.3425 1.4265 #.#### #.####
D 0.9130 0.8350 #.#### #.####
E 0.5140 0.4873 #.#### #.####
F 0.3033 0.2868 1.1132 1.2150
G #.#### #.#### 0.7009 0.8913
H #.#### #.#### 0.9474 0.2746
  
```

Fig.5. Lectura obtenida del espectrofotómetro. Se muestran los valores de absorbancia obtenidos para los SN de los días 14, 18 y 21 para ambas cepas (MN y IIB) dentro del recuadro rojo.

## Reactividad de la muestra

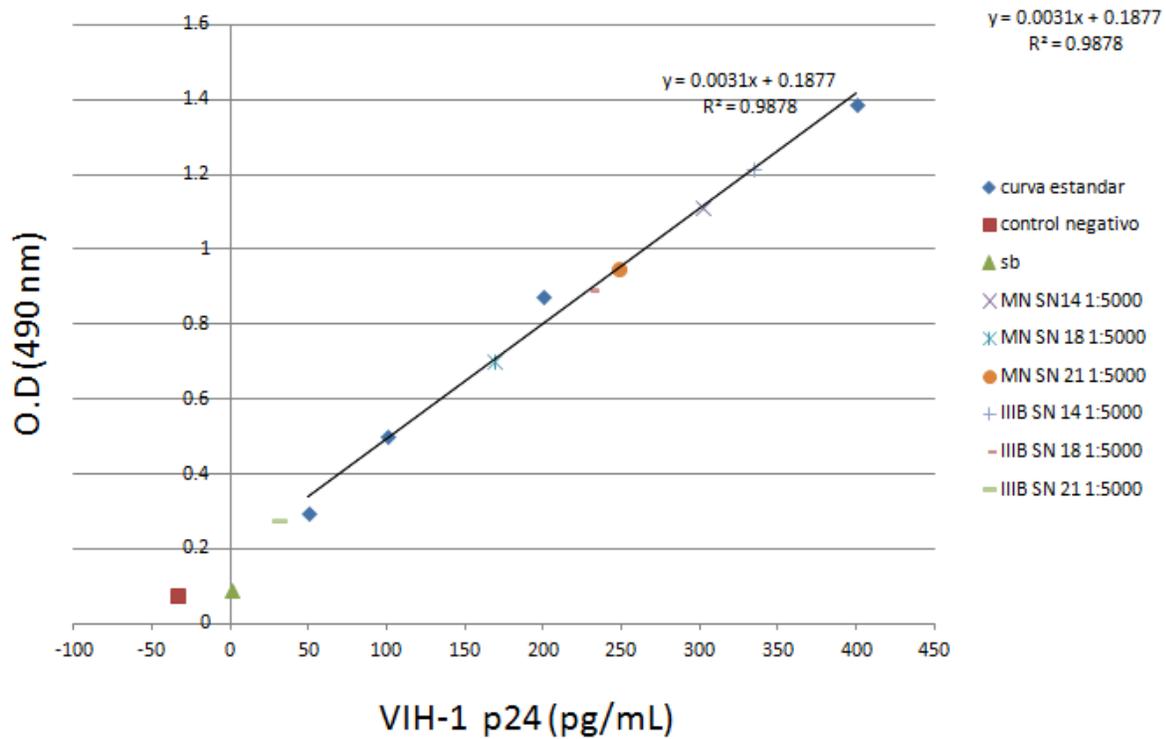


Fig.6. Gráfica de la curva estándar y las muestras problema del ELISA para la detección de p24 del VIH-1. En el eje de la y se muestra la absorbancia y en el de la x la concentración pg/mL. Los rombos azules representan las concentraciones de p24 de la curva estándar, el cuadro rojo representa el control negativo, el triángulo verde al sustrato blanco, mientras que los valores restantes representan las concentraciones obtenidas de las muestras problema.

CURVA ESTANDAR		Sobrenadante	Concentración de p24	
Concentración de p24 (pg/ml)	Absorbancia	Virus	Día	(pg/ml)
50	0.29	MN	14	301.03
100	0.50	MN	18	168.03
200	0.87	MN	21	247.54
400	1.38	IIB	14	333.87
		IIB	18	229.45
		IIB	21	30.51

Fig.7. Tablas que muestran los valores de p24 pg/ml de la curva estándar (izquierda) y de los SN de la cepa MN y IIB del día 14, 18 y 21 (derecha) cosechados de células H9.

## Reactividad de la muestra

Se calculó el Cutoff :

Promedio CN + Promedio SB

$$0.0914 + 0.0754 = 0.1668$$

- O.D. de la muestra < Cutoff **No reactiva (NR)**
- O.D. de la muestra > Cutoff **Inicialmente reactiva (IR)**

*Fig.8. Calculó del valor de Cutoff y los parámetros establecidos para saber la reactividad de las muestras problema.*

$$\text{Cutoff} = 0.1668$$

O.D. H9 MN SN 14 → 1.1132 IR  
O.D. H9 MN SN 18 → 0.7009 IR  
O.D. H9 MN SN 21 → 0.9474 IR  
O.D. H9 IIIB SN 14 → 1.215 IR  
O.D. H9 IIIB SN 18 → 0.8913 IR  
O.D. H9 IIIB SN 21 → 0.2746 IR

*Fig.9. Valores obtenidos de la absorbancia de cada una de las muestras problema, todas son inicialmente reactivas (IR).*

### III. Caracterización de la infección con VIH en la línea celular MT-2

La línea celular MT-2 se utilizó en el pasado para caracterizar a las cepas virales como inductoras de sincicios o no inductoras de sincicios, es decir, para determinar su tropismo hacia el correceptor CXCR4 (20). Dado que en presente trabajo se buscaba establecer un ensayo de citometría de flujo para cuantificar la formación de sincicios, se optó por utilizar esta línea celular.

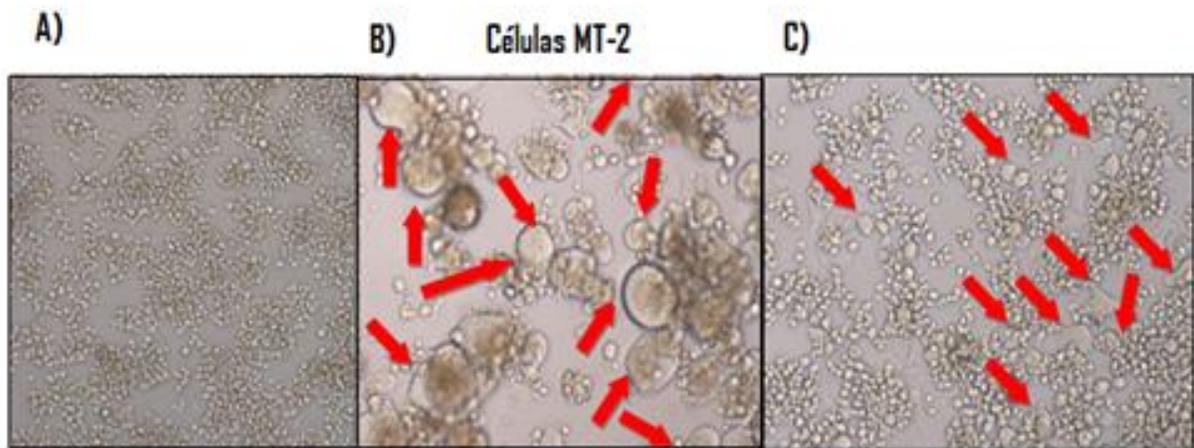
Se realizó una cinética de infección a diferentes concentraciones de antígeno p24 en las células MT-2. La técnica utilizada para medir la infección viral fue la citometría de flujo usando un anticuerpo monoclonal anti-gp120 que reconoce a la proteína viral gp120 presente en la membrana celular de células infectadas.

Inicialmente, se infectaron células MT-2 y se observaron al microscopio para determinar la formación de sincicios, como se observa en la figura 10.

En la figura 11 se muestran los histogramas de células MT-2 a los 4 días post-infección con la cepa MN. Cada histograma representa una dilución diferente, en la dilución 1:10 se obtuvo un 34.58% de células positivas para la gp120 y teniendo una intensidad media de fluorescencia (MFI, por sus siglas en inglés) de 7.1 (inciso A), en el inciso B se muestran los datos obtenidos de la dilución 1:100, con un 22.45% de células positivas para la gp120 y una MFI de 6.5, en la dilución 1:1000 se obtuvo un porcentaje de células positivas para la gp120 de 20.99% y una MFI de 5.6 en el inciso C, mientras que en la dilución más alta 1:5000 (solamente para este experimento se hizo esta dilución) en el inciso D se obtuvo un 17.96% de células positivas para la gp120 y una MFI de 5.6. La línea roja de cada histograma representa el control de células no infectadas, la línea verde representa a las células infectadas y la línea negra representa la diferencia entre ambas, es decir el porcentaje que se muestra de células positivas. Se puede observar que el porcentaje de células positivas para la gp120 va disminuyendo conforme la dilución va aumentando, igualmente se observa lo mismo con la MFI.

En la figura 12, se muestran los datos obtenidos en la determinación de la expresión de la gp120 en células MT-2 15 días post-infección con la cepa MN y IIIB. En el inciso A se observan células no infectadas (control) con un 12.7% de células positivas para la gp120 con una MFI de 4, en el inciso B, se muestran las células infectadas con la cepa IIIB con un 52.4% y una MFI de 73.1, mientras que en el inciso C se observan los datos obtenidos de las células infectadas con la cepa MN con un 33.2% de células positivas para la gp120 y una MFI de 33.2. Se observa que el valor de células positivas para la gp120 y la MFI son mayores en la cepa viral IIIB.

En esta cinética de 15 días de infección realizamos un ensayo de viabilidad celular medida por la unión de Anexina V para ambas cepas MN y IIIB, se observó un porcentaje de 61.7% de células positivas para Anexina V en las células infectadas con la cepa IIIB y un 28.6% en las células infectadas con VIH-1 MN. Por lo tanto, la cepa IIIB indujo un mayor porcentaje de apoptosis que la cepa MN en células MT-2.



*Fig.10. Fotos que muestran el aspecto de las células MT-2. A) células no infectadas, B) células infectadas con la cepa MN por dos días, C) células infectadas con la cepa IIB por dos días. Las flechas rojas indican células gigantes, 10X.*

### gp120 en células MT-2 infectadas 4 días con diferentes diluciones de sobrenadante de VIH-1 MN

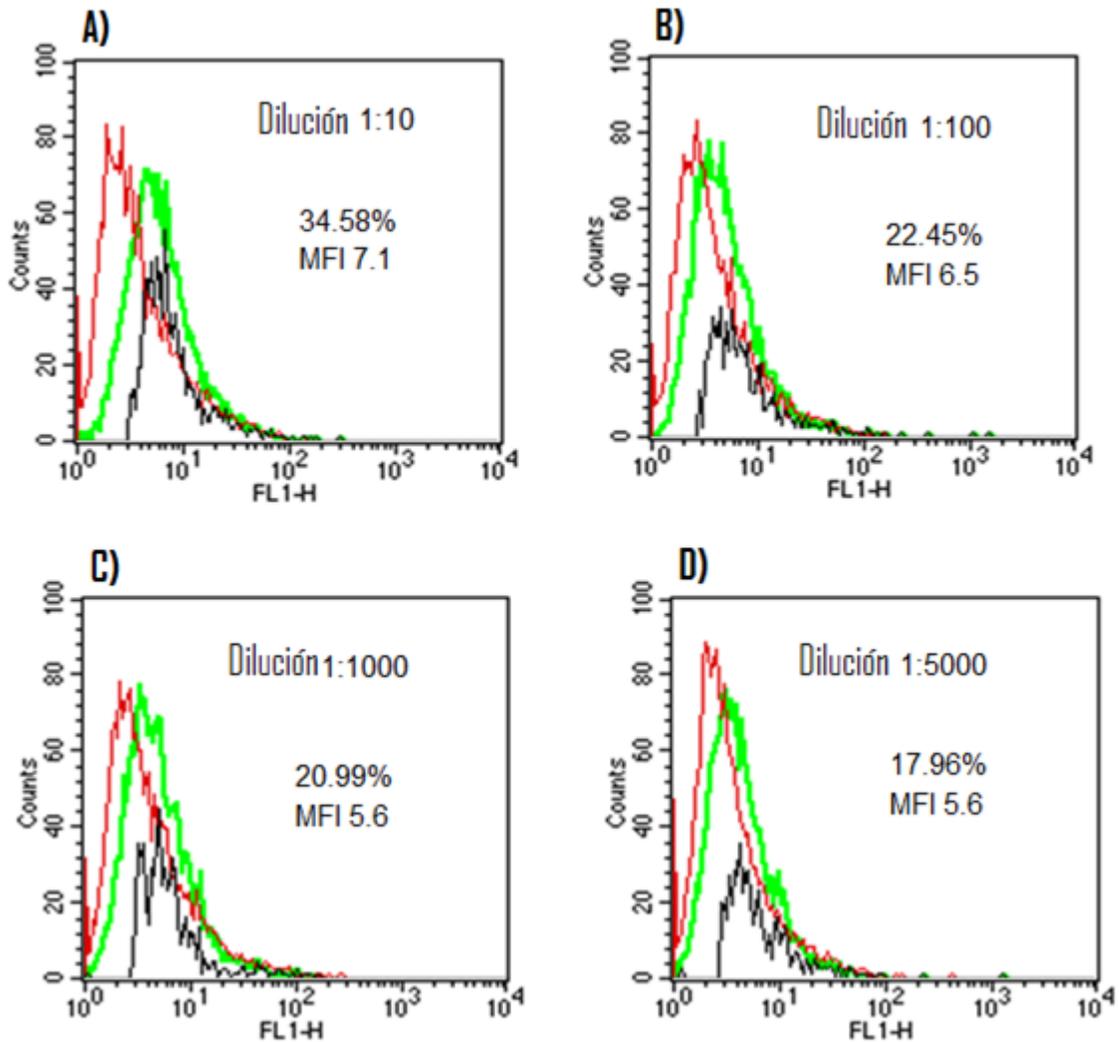


Fig.11. Histogramas que muestran los porcentajes de la glicoproteína vírica gp120 en células MT-2 infectadas cuatro días con diferentes diluciones de un sobrenadante de VIH-1 MN. A) Dilución 1:10, la línea roja representa al control no infectadas, la línea verde representa a las células infectadas y la línea negra representa la diferencia entre ambas, es decir el 34.58%, B) dilución 1:100, 22.45% (línea negra). C) dilución 1:1000, 20.99% (línea negra), D) dilución 1:5000, 17.96% (línea negra). La intensidad media de fluorescencia, la MFI (por sus siglas en inglés), es un parámetro que permite relacionar la cantidad de moléculas expresadas en cada célula analizada en el citómetro.

## gp120 en células MT-2 infectadas 15 días con sobrenadante viral sin diluir

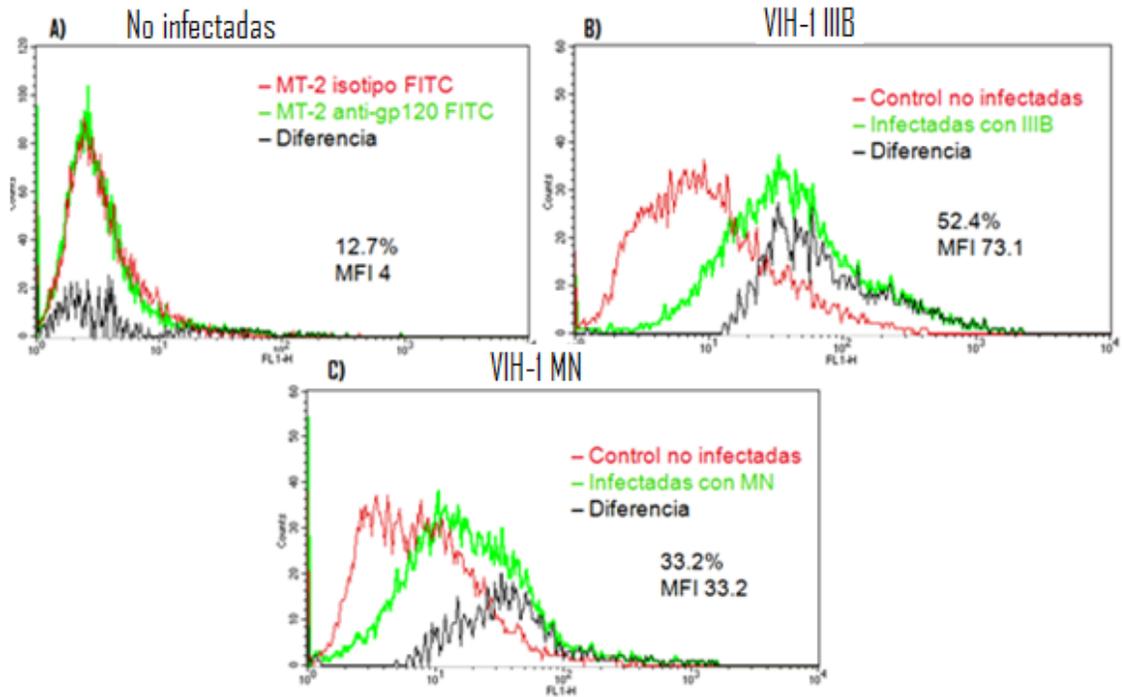


Fig.12. Histogramas que muestran los porcentajes de la glicoproteína vírica gp120 en células MT-2 infectadas 15 días con VIH-1 MN y IIB. A) células no infectadas, la línea negra representa la diferencia entre ambas, es decir el 12.7%, B) células infectadas con VIH-1 IIB, 52.4% (línea negra), C) células infectadas con VIH-1 MN, 33.2% (línea negra). La intensidad media de fluorescencia, la MFI (por sus siglas en inglés), es un parámetro que permite relacionar la cantidad de moléculas expresadas en cada célula analizada en el citómetro.

### III.I Ensayo de fusión entre células infectadas y no infectadas de la línea celular MT-2

#### Condiciones generales

\**Células*: línea celular MT-2

\**Cepa viral*: MN y IIIB del VIH-1

\**Duración de la cinética de infección*: 2 y 4 días para el experimento en donde se midió la fusión celular.

\**Dilución del sobrenadante viral*: 1:10, 1:100 y 1:1000, infectamos con 100ul de sobrenadante por millón de células

\**Tiempo de infección*: 2 horas

\**Inhibidores de fusión*: T-20 (4ul/pozo de una dilución 1:1000, 2ug/ml) y anticuerpo CD4

Con el propósito de cuantificar la fusión celular por citometría de flujo, se realizaron cocultivos de células MT-2 que fueron infectadas con el VIH, con células MT-2 no infectadas. Las células destinadas a infectarse se marcaron un día antes con el colorante DiI, mientras que las células blanco se marcaron con DiO. Los cocultivos se realizaron utilizando células que se infectaron durante 2 y 4 días.

Se prepararon 4 pellets celulares con  $5 \times 10^6$  células MT-2 y se infectaron con 500ul de las diluciones 1:10, 1:100 y 1:1000. De VIH-1 MN crecido en células MT-2 (MN/MT-2). Se utilizaron como controles los inhibidores de fusión T-20 y anticuerpo anti-CD4 y se agregaron en el momento de colocar los cocultivos. Primero se colocaron las células infectadas marcadas un día antes con DiI, posteriormente el inhibidor correspondiente y luego se agregaron las células blanco marcadas con DiO.

En la figura 13 se puede observar una gráfica de puntos que muestra los porcentajes de las partículas con fluorescencia mixta (eje y) en células MT-2 infectadas dos días con tres diluciones diferentes con la cepa MN y en diferentes tiempos de cocultivo (eje x). Los porcentajes más altos de partículas dobles fluorescentes (más de 25%) se obtuvieron con la dilución 1:10. Las demás diluciones produjeron porcentajes similares al control negativo a lo largo del tiempo. Se puede observar que el péptido de T-20 no inhibió la fusión.

En la figura 14 se muestran los porcentajes de partículas con fluorescencia mixta de células MT-2 con cuatro días de infección y diferentes tiempos de cocultivo. Los porcentajes más altos de partículas con fluorescencia mixta (entre 15 y 19%) son de la dilución 1:10 y su control con T-20, las demás diluciones y sus respectivos controles con T-20 tienen valores similares a lo largo del tiempo. Al igual que en el caso anterior, no se observa el efecto de inhibición de fusión con T-20.

En la figura 15 se observan dot plots de las células MT-2 no infectadas y colocadas en cocultivo por cuatro días. Se muestra el tamaño y granularidad de células no infectadas (inciso A), en el inciso B se observa un 7.2% de partículas con fluorescencia mixta. La detección de células con fluorescencia mixta que se obtuvieron en el cocultivo de células

MT-2 no infectadas, podría reflejar la fusión “espontánea” de estas células (39), o bien el intercambio de componentes lipídicos de la membrana entre las células (40).

En la figura 16 se muestran los dot plots de las MT-2 infectadas por dos días con la cepa MN y con una dilución 1:10 del sobrenadante y colocadas en cocultivo por 4 días con células MT-2 no infectadas. La región analizada se muestra en el inciso A. En el inciso B se muestra el aspecto del análisis de la fusión, en donde se observa que hubo 25.4% de partículas con fluorescencia mixta. Con T-20 se obtuvo un valor similar (26.2%), inciso C, es decir, que el inhibidor no tuvo efecto.

Por lo tanto, el cocultivo de células infectadas y no infectadas de la línea MT-2 produce una gran cantidad de células fusionadas acompañadas de una gran mortalidad celular. La formación de sincicios detectada por citometría de flujo, no fue inhibida por el inhibidor T-20. Estos resultados los atribuimos a la alta adherencia intrínseca de las células MT-2, la cual se manifestó claramente en la formación de una cantidad considerable de agregados celulares en los análisis por citometría de flujo de las células no infectadas (fig.15).

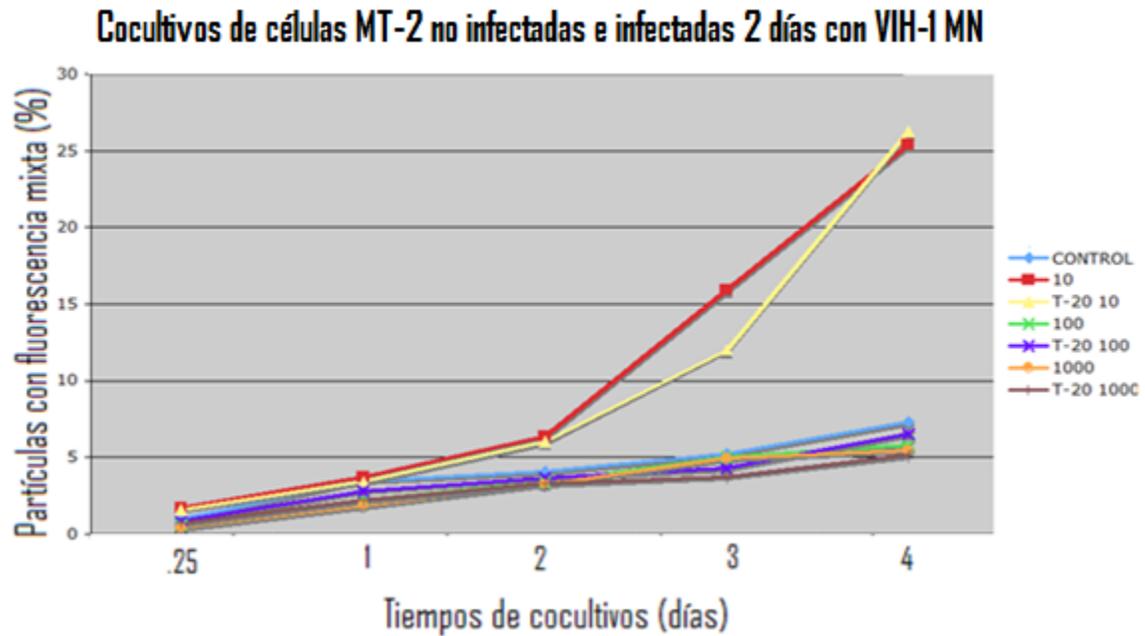


Fig.13. Gráfica de puntos, se muestran los datos obtenidos de la cinética de dos días de infección y diferentes tiempos de cocultivos de las células MT-2. Se observan los porcentajes de partículas con fluorescencia mixta en el eje y, mientras que en el eje x se observan los diferentes tiempos de cocultivo. Se indican las diluciones usadas para infectar y la adición de T-20. Se observa que en el cuarto día de cocultivo se obtuvo el mayor porcentaje de partículas con fluorescencia mixta en las células control con T-20 infectadas con la dilución 1:10 (línea amarilla).

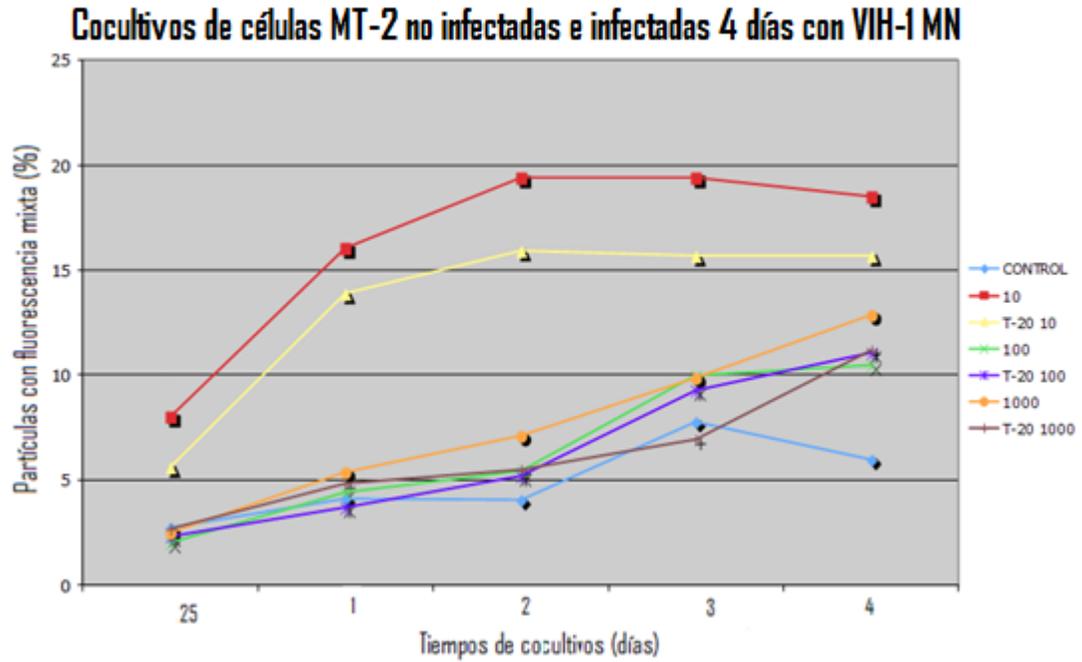
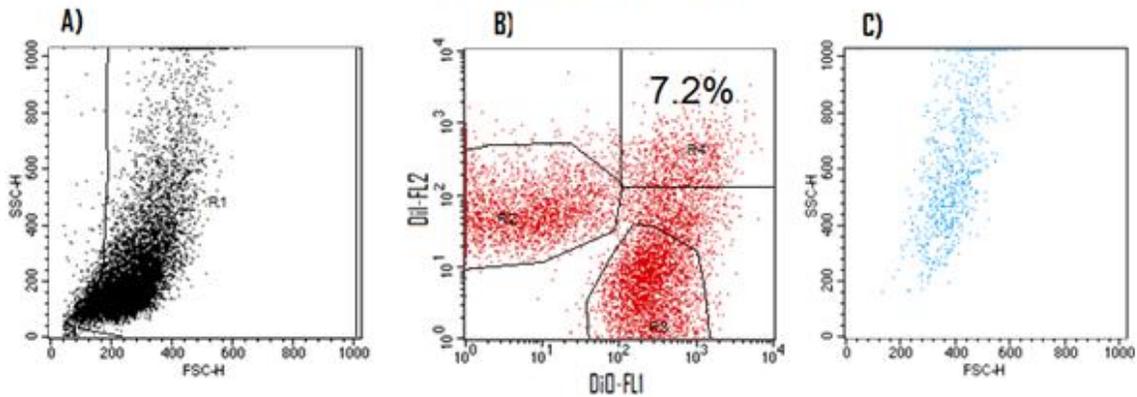


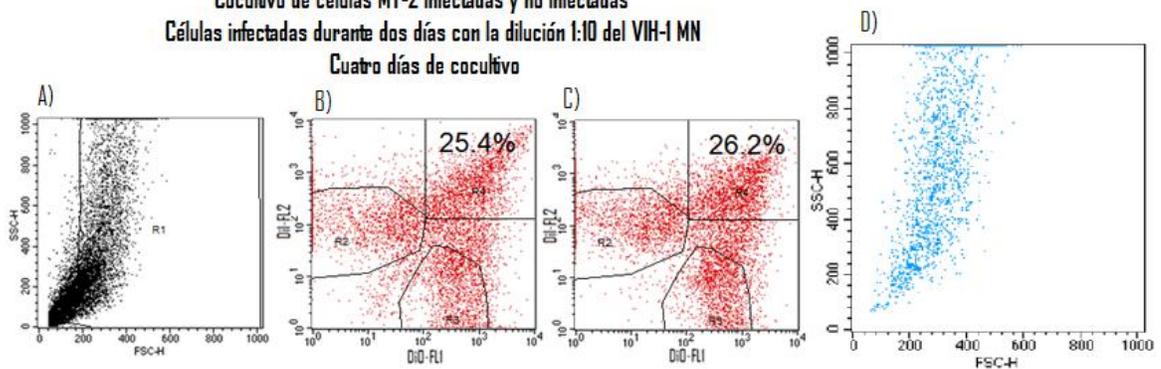
Fig.14. Gráfica de puntos, se muestran los datos obtenidos de la cinética de cuatro días de infección y diferentes tiempos de cocultivos de las células MT-2. Se observan los porcentajes de partículas con fluorescencia mixta en el eje y, mientras que en el eje x se observan los diferentes tiempos de cocultivo. Se indican las diluciones usadas para infectar y la adición de T-20. Se observa que en el cuarto día de cocultivo se obtuvo el mayor porcentaje de partículas con fluorescencia mixta en las células infectadas con la dilución 1:10 (línea roja).

**Cocultivo control (células no infectadas)**  
**Células MT-2 teñidas con DiI y DiO**  
**Cuatro días de cocultivo**



*Fig.15. Dot plots de células MT-2 no infectadas, A) se observa la región de células analizadas, en el eje y se gráfica el tamaño, y en el eje x la granularidad; B) se muestran células en cocultivo, marcadas con DiI, en el eje y, y marcadas con DiO en el eje x, se observa que hay un 7.2% de células con fluorescencia mixta y presentan un aumento en la fluorescencia roja (FRET), C) se muestra el tamaño y granularidad de las células MT-2 con fluorescencia mixta (7.2%). Estos cocultivos eran los controles negativos ya que no están infectados, así que por lo tanto, no esperábamos obtener partículas con fluorescencia mixta.*

**Cocultivo de células MT-2 infectadas y no infectadas**  
**Células infectadas durante dos días con la dilución 1:10 del VIH-1 MN**  
**Cuatro días de cocultivo**



*Fig.16. Dot plots de células MT-2 2 días post-infección. A) Se observa la región de células analizadas, en el eje y, se gráfica el tamaño, y en el eje x, la granularidad; B) se muestran células en cocultivo, marcadas con DiI, en el eje y, y marcadas con DiO en el eje x, se observa que hay un 25.4% de células con fluorescencia mixta, restándole el porcentaje obtenido del control negativo (7.2%) tenemos un porcentaje de 18.2% de fusión celular, y presentan un aumento en la fluorescencia roja (FRET), C) efecto del T-20. Se observa que no hay inhibición, D) tamaño y granularidad de las células MT-2 con fluorescencia mixta.*

#### **IV. Comparación del aspecto de cultivos infectados de las líneas celulares MT-2 y Jurkat**

##### **Condiciones generales**

\**Células*: línea celular MT-2 y Jurkat

\**Cepa viral*: MN y IIIB del VIH-1

\**Duración de la cinética de infección*: 4 días

\**Dilución del sobrenadante viral*: no usamos dilución, infectamos con 1000ul de sobrenadante sin diluir por millón de células

\**Tiempo de infección*: 2 horas

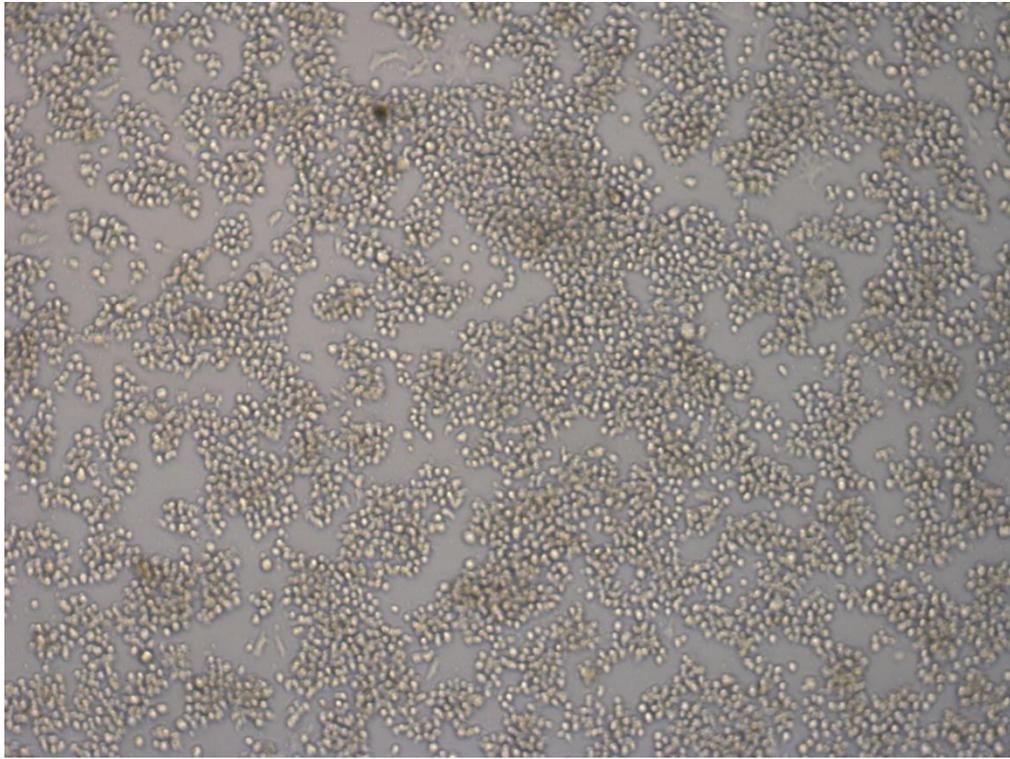
\**Polication*: no

Debido a que los datos obtenidos con las células MT-2, como el porcentaje de partículas con fluorescencia mixta en los controles negativos (se lo atribuimos a un alto nivel de expresión de moléculas de adhesión en la membrana celular) y a su alta muerte celular en cocultivos infectados, se optó por utilizar una línea celular diferente que muestra menor adherencia entre las células y una alta viabilidad celular. Por lo tanto, se decidió infectar células Jurkat y células MT-2 (como control positivo de la infección) simultáneamente y observar su aspecto al microscopio.

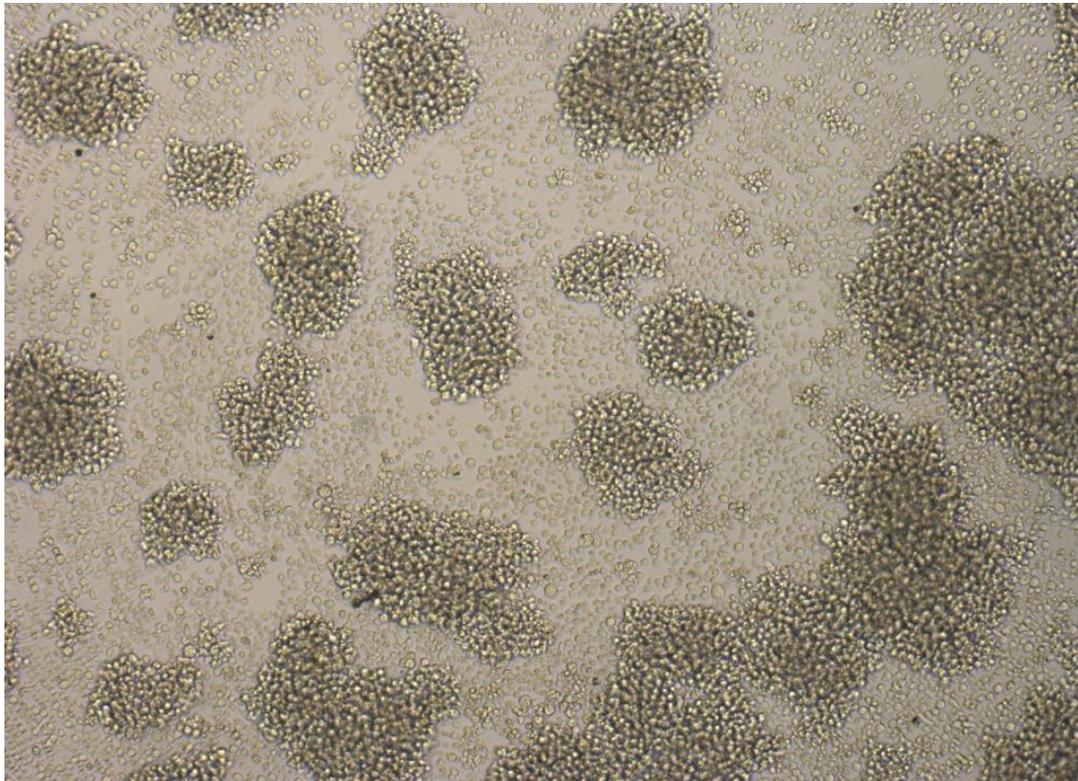
Se llevó a cabo una cinética de infección de 4 días (4DI), en donde se observó por medio de un microscopio invertido los efectos citopáticos característicos del VIH-1. Se observó la viabilidad de la línea celular Jurkat por medio de azul tripan durante los cuatro días de infección. Para infectar utilizamos 2 sobrenadantes (SN) diferentes obtenidos de cinéticas de infección con la línea celular MT-2 (Febrero del 2010 y 6 de Marzo del 2011) de dos cepas de VIH-1 (MN y IIIB). La infección de las líneas celulares MT-2 y Jurkat se realizó por separado pero paralelamente, es decir, al mismo tiempo y bajo las mismas condiciones.

En la figura 17 y 18 se muestran fotos tomadas con el microscopio invertido de cultivos celulares MT-2 y Jurkat, respectivamente, no infectados (controles) y a partir de la figura 19 hasta la 22 se observan cultivos de células MT-2 y Jurkat infectados con las cepas MN y IIIB en diferentes tiempos de infección. Las flechas rojas señalan células gigantes originadas por los efectos citopáticos característicos de la infección del virus de la inmunodeficiencia humana, las cuales se observaron a partir del segundo día de infección en ambas líneas celulares.

Estas observaciones indican que a nivel morfológico, las células MT-2 presentan mayores efectos citopáticos a los mismos tiempos de infección y cocultivos en comparación con la línea celular Jurkat.



*Fig.17. Aspecto de las células MT-2 no infectadas, 10X.*



*Fig.18. Aspecto de las células Jurkat no infectadas, 10X.*

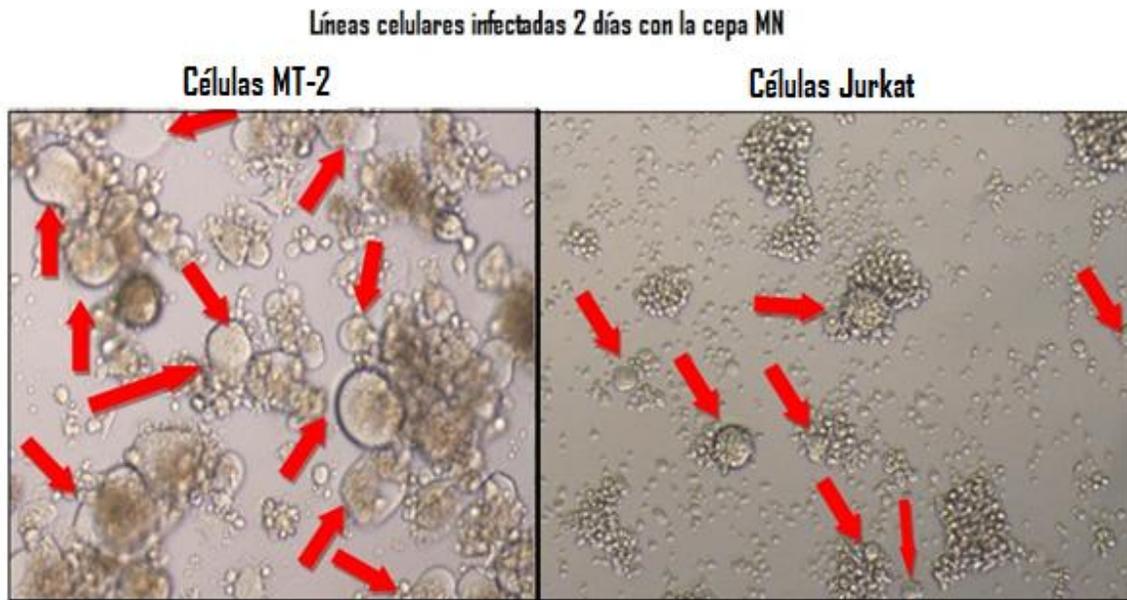


Fig. 19. Efecto Citopático. Células MT-2 y Jurkat infectadas 2 días con VIH-1 MN. Las flechas rojas indican células gigantes, 10X.

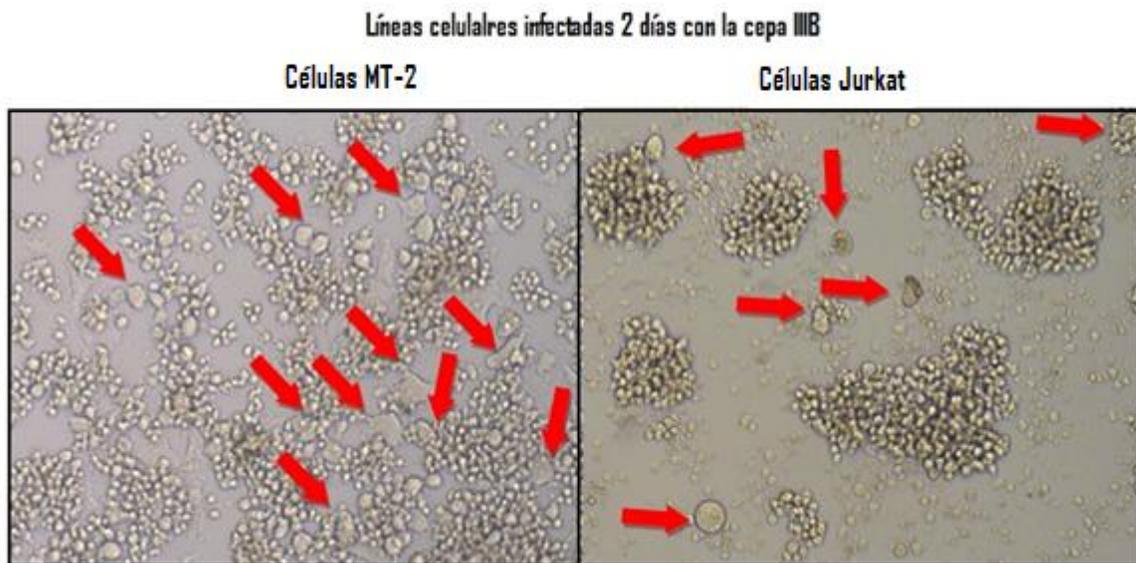


Fig. 20. Efecto Citopático. Células MT-2 y Jurkat infectadas 2 días con VIH-1 IIB. Las flechas rojas indican células gigantes, 10X.

Líneas celulares infectadas 4 días con la cepa MN

Células MT-2

Células Jurkat

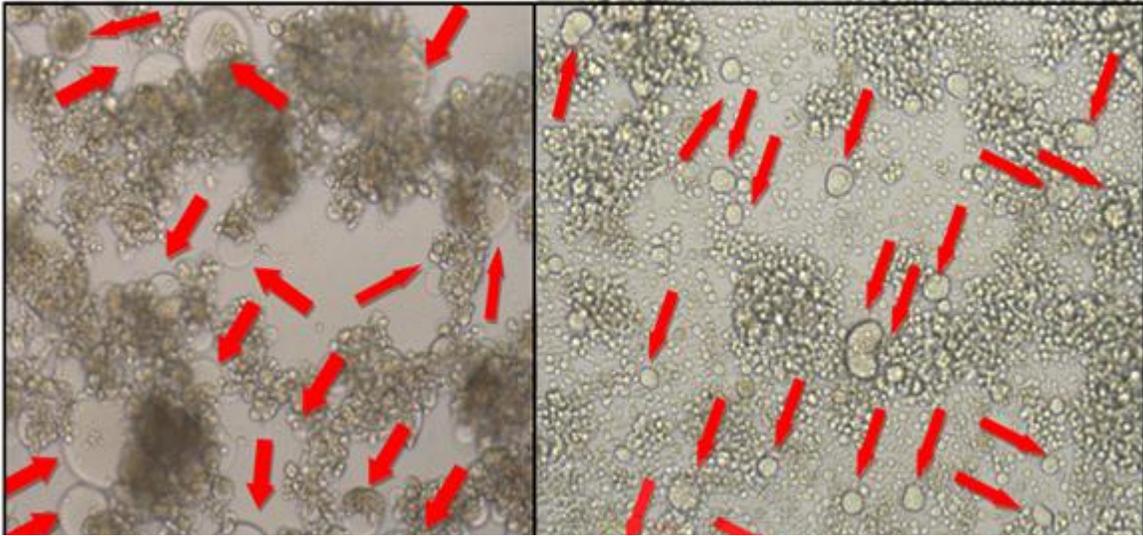


Fig. 21. Efecto Citopático. Células MT-2 y Jurkat infectadas 4 días con VIH-1 MN. Las flechas rojas indican células gigantes, 10X.

Líneas celulares infectadas 4 días con la cepa IIIB

Células MT-2

Células Jurkat

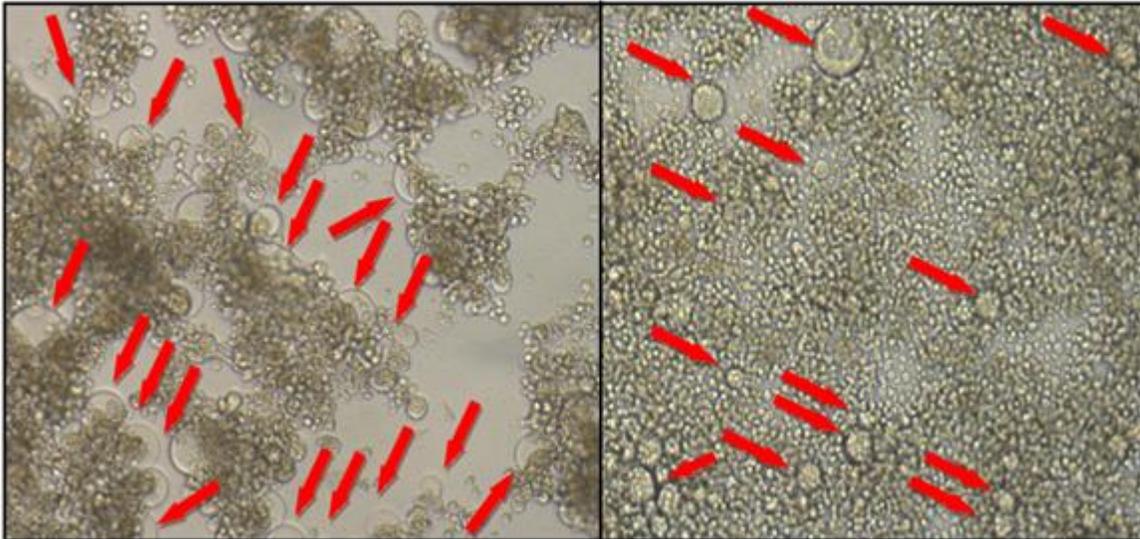


Fig. 22. Efecto Citopático. Células MT-2 y Jurkat infectadas 4 días con VIH-1 IIIB. Las flechas rojas indican células gigantes, 10X.

## V. Viabilidad celular de la línea celular Jurkat

### Condiciones generales

\**Células*: línea celular Jurkat

\**Cepa viral*: MN y IIB del VIH-1

\**Duración de la cinética de infección*: 4 días

\**Dilución del sobrenadante viral*: no usamos dilución, infectamos con 1000ul de sobrenadante sin diluir por millón de células

\**Tiempo de infección*: 2 horas

\**Polication*: no

Se midió la viabilidad de las células Jurkat infectadas y no infectadas por el método de exclusión de azul tripan. La figura 23 muestra que las células control tuvieron una viabilidad de entre 85 a 79%. Las células infectadas mostraron una ligera disminución de viabilidad en el día 2 post-infección. En los días subsiguientes la viabilidad de las células infectadas es muy similar a la de las células control.

Estos resultados indican que la línea celular Jurkat mantiene un porcentaje alto de viabilidad celular a lo largo de esta cinética de infección, siendo cercana o mayor al 70% en el día 3 post-infección.

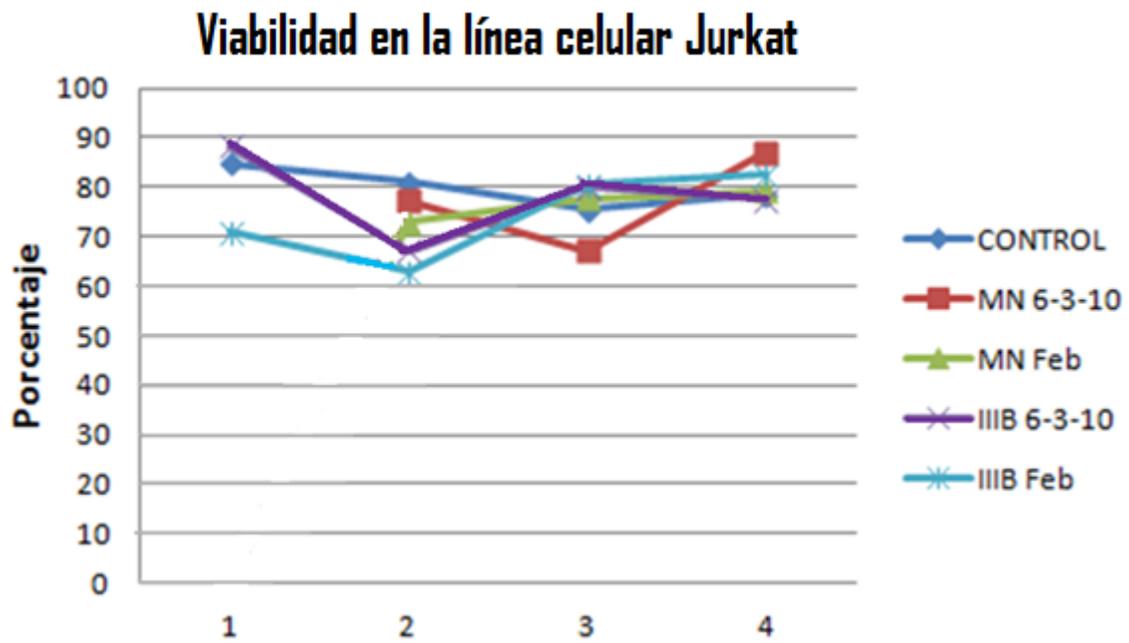


Fig. 23. Gráfica que muestra la viabilidad medida por azul tripan de las células Jurkat en la cinética de infección de cuatro días. En el eje de las y se observan los porcentajes de células vivas y en el de las x los días de infección.

## **VI. Ensayo de fusión entre células infectadas y no infectadas de las líneas celulares Jurkat y H9**

### **Condiciones generales**

\**Células*: línea celular H9 y Jurkat

\**Cepa viral: sobrenadante 14* MN y IIIB del VIH-1

\**Duración de la cinética de infección*: 4 semanas

\**Dilución del sobrenadante viral*: no usamos dilución, infectamos con 100ul de sobrenadante viral por millón de células

\**Tiempo de infección*: 2.5 horas

\**Polication*: polibren (2ug/ml de células a infectar)

\**Inhibidores de fusión*: T-20 (8ul/pozo de una dilución 1:100, 40ug/ml)

En este experimento se llevó a cabo la infección en paralelo de la línea celular H9 y de la línea celular Jurkat. La línea celular H9, crece también en suspensión y forma agregados celulares muy pequeños por lo que también la consideramos apropiada para los ensayos de fusión celular. La infección en la línea celular H9 y Jurkat se realizó en paralelo y los cocultivos se realizaron entre células de la misma línea celular, es decir, H9 con H9 y Jurkat con Jurkat.

Se marcaron las células un día antes de infectarse, se marcó con DiI las células que se infectarían y con DiO las células blanco de cada línea celular, posteriormente, infectamos la línea celular H9 y Jurkat con el VIH-1 MN y IIIB del sobrenadante del día 14, obtenido en la infección con las células H9 con una duración de 4 semanas.

Utilizamos el polication polibren e infectamos durante dos horas y media, posteriormente, colocamos los cocultivos de cada línea celular. En este experimento, los cocultivos se hicieron inmediatamente después de la infección.

Todos los cocultivos se colocaron a una proporción 1:1, posteriormente, permitimos que trascurrieran los días de infección deseados y cuando finalizó su tiempo de infección, en este caso 2 y 3 días, cosechamos, y después fijamos las muestras con paraformaldehído al 2% durante 2 horas resuspendiendo por pipeteo la primera hora cada 20 minutos y después cada 30 minutos hasta terminar el tiempo. Esto se hizo con el fin de evitar la fijación de agregados celulares que pudieran interferir con el análisis de la fusión celular.

Al colocar los cocultivos (cél. infectadas + célula no infectadas) correspondientes a T-20, se colocaron primero las células infectadas (DiI), luego se le agregó el inhibidor T-20 (a una concentración final de 40ug/ml), se resuspendió varias veces y posteriormente se agregaron las células blanco no infectadas (DiO). Debido a que la concentración de 2ug/ml usada con la línea celular MT-2 no hubo inhibición de la fusión celular decidimos aumentarla a 40ug/ml.

Todos los datos de este experimento fueron analizados en el citómetro de flujo Attune, utilizando el software específico descrito anteriormente. En el citómetro FACSCalibur el canal FL1 es donde se detecta el colorante DiO, en el Attune este mismo canal se llama BL1, mientras que el canal FL2 donde se reconoce el DiI en el Attune es el canal BL2.

En la figura 24, en la gráfica A, se puede observar un dot plot de células Jurkat no infectadas sin marca, en la gráfica B un dot plot de células marcadas con el colorante DiI y otro dot plot de células marcadas con DiO en la gráfica C. Al realizar el análisis en el citómetro de flujo de los cocultivos infectados con el VIH-1 MN de la línea celular Jurkat, obtuvimos en la región correspondiente a células con fluorescencia mixta (región color rosa) un 7.46% de células positivas como se muestra en la gráfica B de la figura 25. Así como se observa en la gráfica C de la misma figura, una muestra infectada y con el inhibidor de fusión T-20, obtuvimos un 6.45% de positivas para fluorescencia mixta. En las otras gráficas de dot plots (fig. 26) se muestran los datos obtenidos con el virus IIIB, se obtuvieron porcentajes de hasta 6.31% de células positivas para fluorescencia mixta pero un 5.31% de dobles fluorescentes en una muestra infectada y con el inhibidor de fusión T-20. Por lo tanto, podemos decir que hubo un poco de inhibición.

En la figura 27 se muestran dot plots de las células H9 sin marca (A), marcadas con DiI (B) y marcadas con DiO. Se pueden observar las células marcadas con algún colorante como poblaciones muy bien definidas. Con la línea Jurkat obtuvimos porcentajes altos de fusión celular a comparación de los porcentajes de fusión de las H9, como muestra la figura 28 y 29.

Todos los promedios de los porcentajes de fusión se muestran en la tabla (fig.30), como se puede observar el porcentaje de fusión más alto se obtuvo con la línea celular Jurkat de 9.4% en los 3 días de infección (3DI) con el virus IIIB.

En la figura 31, se observan los valores de la línea celular Jurkat, las barras azules representan, las células Jurkat en cocultivo con el virus MN mientras que la barra roja muestra los mismos cocultivos pero con T-20, en dos y tres días de infección. Las barras color verde y morado representan cocultivos de células Jurkat infectados con el virus IIIB y los mismos cocultivos más el inhibidor de fusión respectivamente igualmente en dos y tres días de infección.

Los porcentajes de fusiones en cocultivos con el inhibidor T-20 son menores en la línea H9 en comparación con las Jurkat como se puede ver en la gráfica de la figura 32, las barras color azul representan las células H9 en cocultivo con el virus MN, las barras rojas representan los mismos cocultivos de células H9 pero con el inhibidor de fusión en dos y tres días de infección, mientras que las barras color verde y morado representan cocultivos de células H9 infectados con el virus IIIB y los mismos cocultivos mas el inhibidor de fusión respectivamente, igualmente en dos y tres días de infección.

Se quiso observar si existía alguna tendencia del virus, ya sea MN o IIIB, sin importar que línea celular haya sido usada como célula blanco. Como se puede observar en la figura 33, sí existe una cierta tendencia en relación con el virus que se usó, en el caso del MN, se observa cómo con el transcurso del tiempo no hay un gran aumento en el porcentaje de fusiones (línea roja y azul) mientras que en el virus IIIB se puede observar cómo en ambas líneas celulares se dió casi el mismo incremento de porcentajes de células positivas para fluorescencia mixta con el tiempo (24 hrs).

El efecto inhibidor de T-20 fue muy débil en todos los casos. Ésto se debió probablemente a que el inhibidor se añadió al principio del cocultivo y pudo haber sido removido por las células en los días siguientes. En el siguiente experimento se realizaron modificaciones para superar este problema.

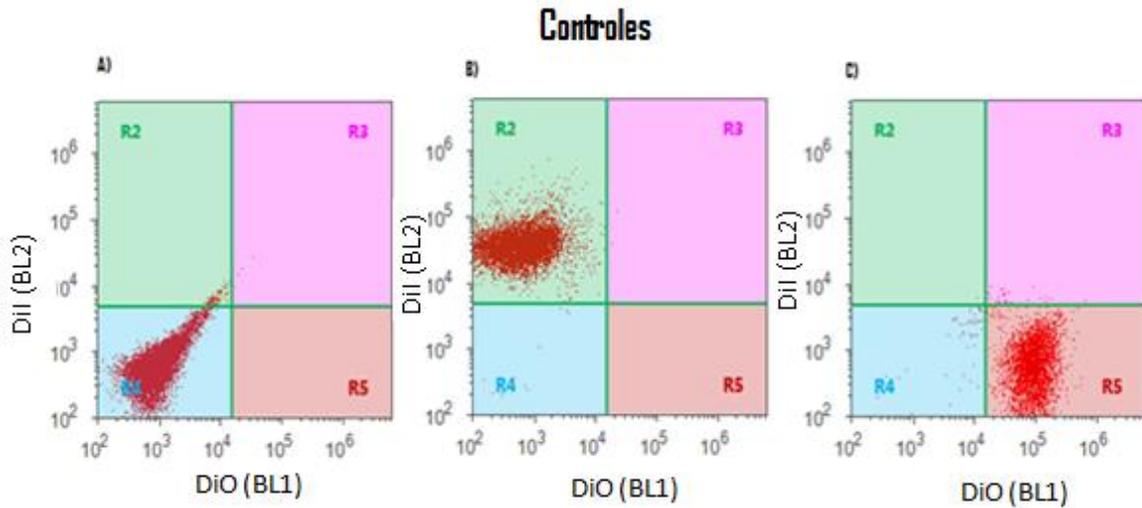


Fig.24. Dot plots de las células Jurkat, muestran células sin marca, es decir, sin ningún colorante y no infectadas (A), células infectadas marcadas con DiI (B) y células no infectadas marcadas con DiO (C).

### Cocultivos de células Jurkat no infectadas e infectadas con la cepa MN

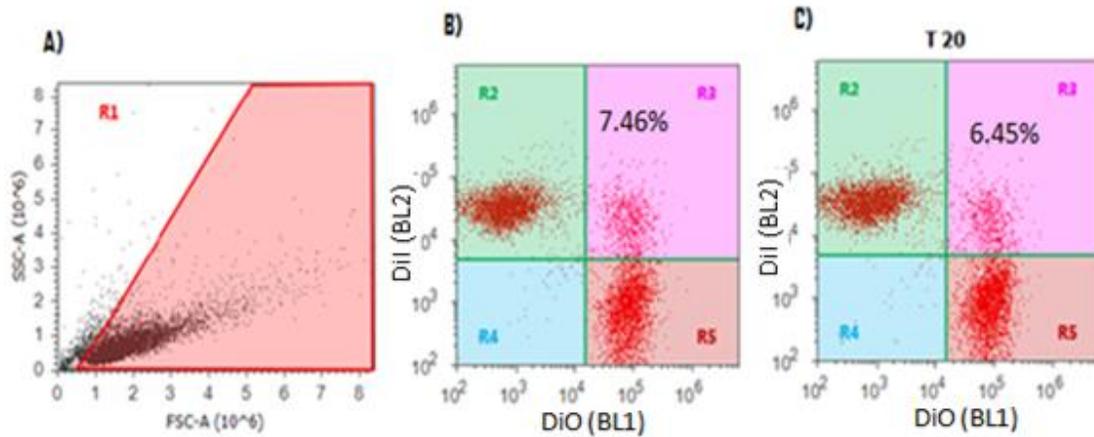


Fig.25. Dot plots de los cocultivos de las células Jurkat infectadas 2 días con VIH-1 MN con células no infectadas, A) población analizada, B) cocultivo de 2 días de infección, se observa un 7.46% de células con fluorescencia mixta, C) con la adición de T-20 se obtuvo 6.45% de células con fluorescencia mixta. Se observa que no hay una inhibición de la fusión celular en los cocultivos con T-20.

## Cocultivos de células Jurkat no infectadas e infectadas con la cepa III B

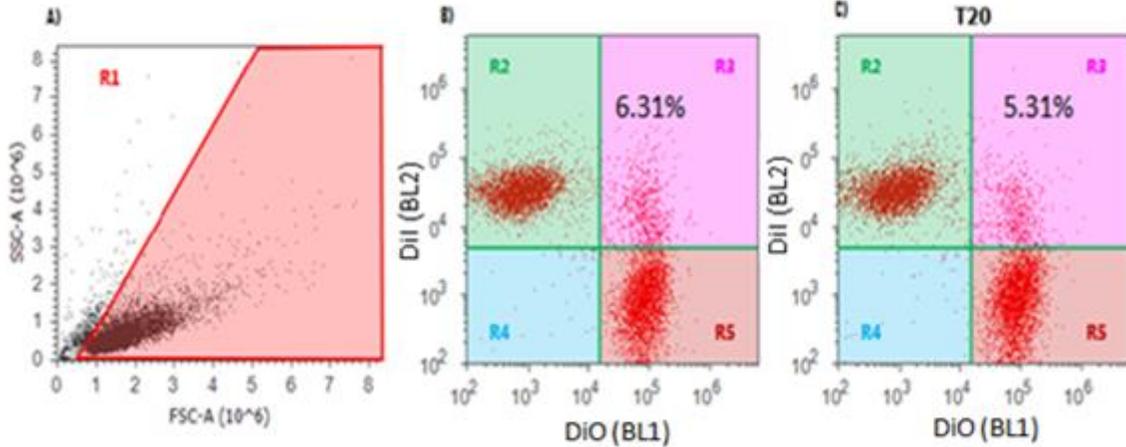


Fig.26. Dot plots de los cocultivos de las células Jurkat infectadas 2 días con VIH-1 III B y células Jurkat no infectadas, A) población analizada, B) cocultivo de 2 días de infección, se observa un 6.31% de células con fluorescencia mixta, C) con la adición de T-20 se obtuvo un 5.31% de células con fluorescencia mixta. Se observa que no hay una inhibición de la fusión celular en los cocultivos con T-20.

## Células H9

### Controles

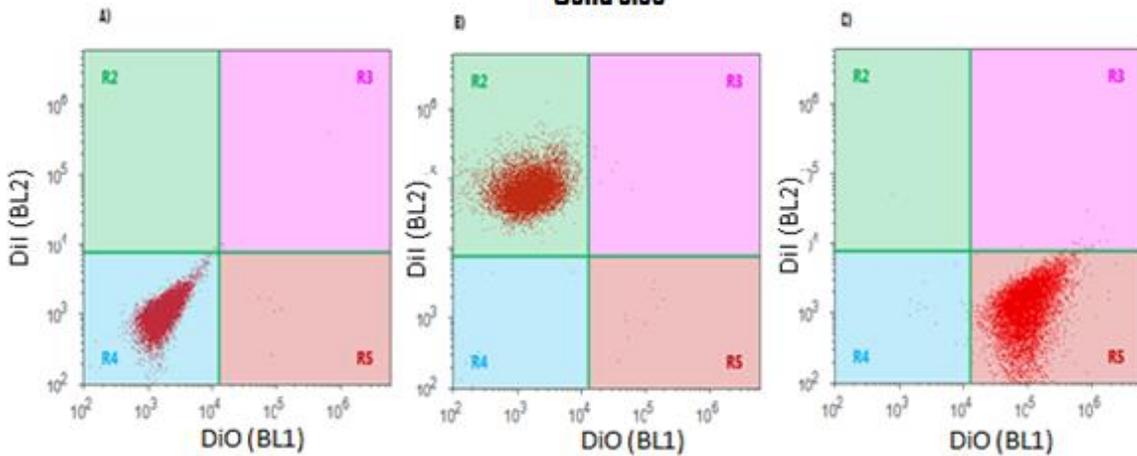


Fig.27. Dot plots de las células H9, muestran células sin marca, es decir, sin ningún colorante y no infectadas (A), células infectadas marcadas con DiI (B) y células no infectadas marcadas con DiO (C).

### Cocultivos de células H9 no infectadas e infectadas con la cepa MN

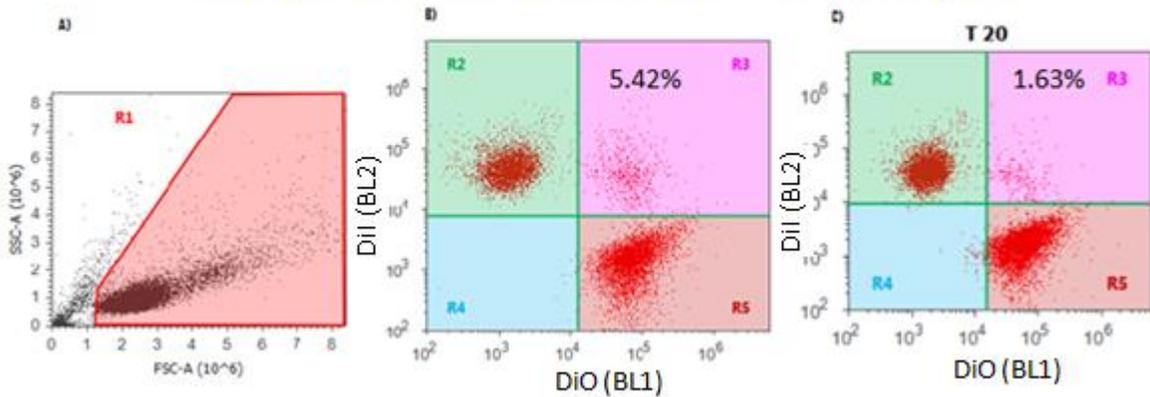


Fig.28. Dot plots de los cocultivos de las células H9 infectadas 2 días con VIH-1 MN con células H9 no infectadas, A) población analizada, B) cocultivo de 2 días de infección, se observa un 5.42% de células con fluorescencia mixta, C) con la adición de T-20 se obtuvo un 1.63% de células con fluorescencia mixta. Se observa que hay una mayor inhibición de la fusión celular en los cocultivos con T-20 en esta línea celular a comparación de las células Jurkat.

### Cocultivos de células H9 no infectadas e infectadas con la cepa IIB

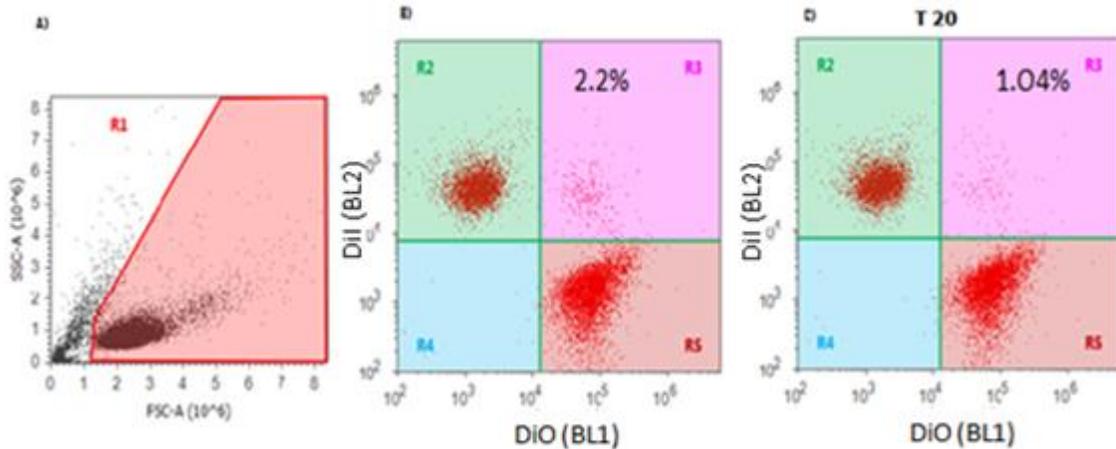


Fig.29. Dot plots de cocultivos de las células H9 infectadas 2 días con VIH-1 IIB y células H9 no infectadas, A) población analizada, B) cocultivo de 2 días de infección, se observa un 2.2% de células con fluorescencia mixta, C) con la adición de T-20 se obtuvo un 1.04% de células con fluorescencia mixta. Se observa que hay una mayor inhibición de la fusión celular en los cocultivos con T-20 en esta línea celular a comparación de las células Jurkat.

<b>2DI</b>	<b>% de Fusión Coc MN</b>	<b>% de Fusión Coc MN + T-20</b>	<b>% de Fusión Coc IIIB</b>	<b>% de Fusión Coc IIIB + T-20</b>
H9	4.8	2.9	2.1	1.9
Jurkat	7.2	7.23	6.2	5.5
<b>3DI</b>	<b>% de Fusión Coc MN</b>	<b>% de Fusión Coc MN + T-20</b>	<b>% de Fusión Coc IIIB</b>	<b>% de Fusión Coc IIIB + T-20</b>
H9	5.3	2.9	6.5	5.0
Jurkat	7.8	7.0	9.4	8.15

Fig.30. Tabla que muestra los promedios de los porcentajes de fusión obtenidos en la cinética de infección de dos (2DI) y tres días (3DI).

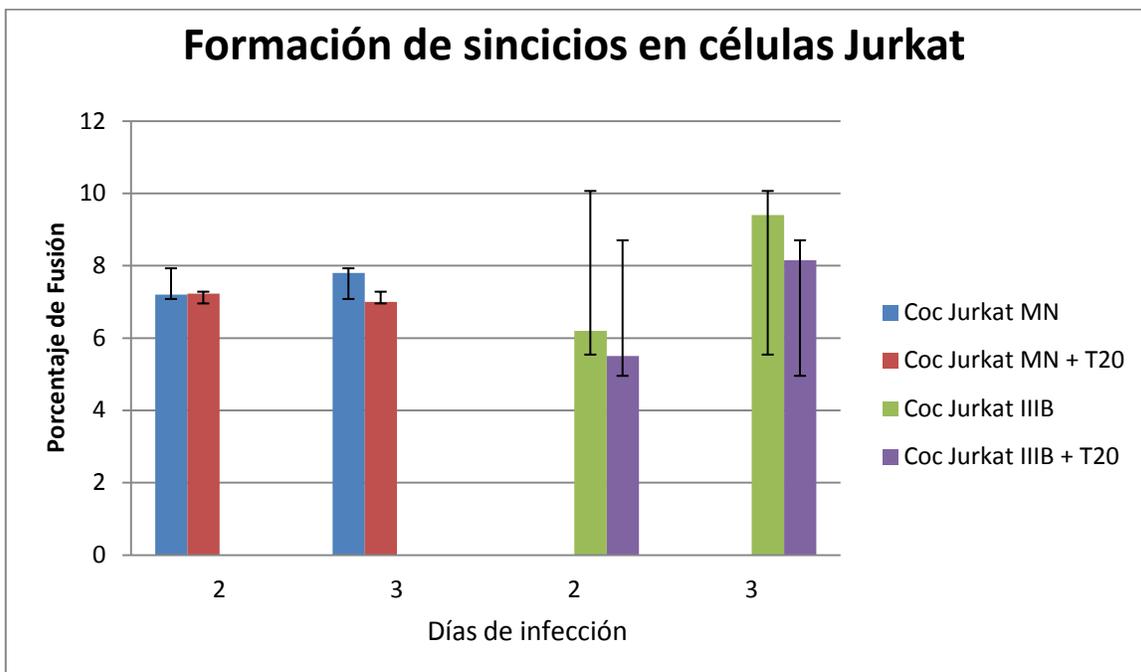


Fig.31. Gráfica con los porcentajes de fusión de la línea celular Jurkat. Se presenta en barras de color azul (Coc) y rojo (T-20) las Jurkat infectadas con MN y en barras de color verde (Coc) y morado (T-20) las Jurkat infectadas con IIIB. Se puede observar efecto del T-20 en ambas cepas.

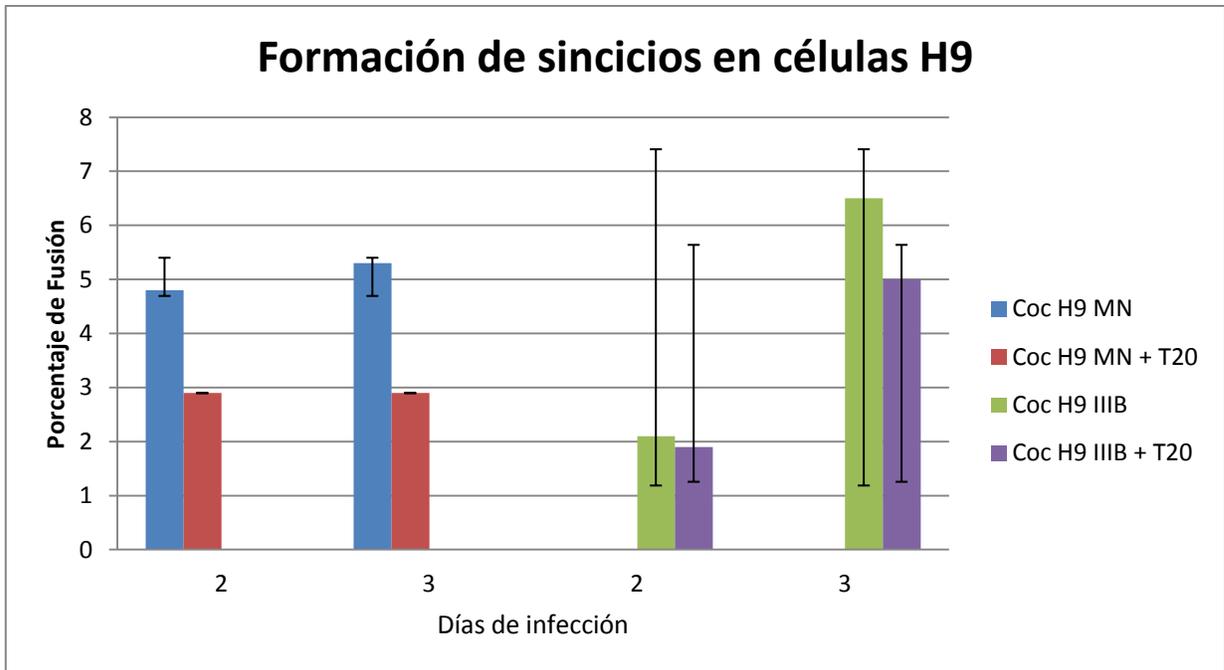


Fig.32. Gráfica con los porcentajes de fusión de la línea celular H9. Se presentan en barras de color azul (Coc) y rojo (T-20) las H9 infectadas con MN y en barras de color verde (Coc) y morado (T-20) las H9 infectadas con IIIB. Se puede observar que hay un mayor efecto del T-20 en la cepa MN.

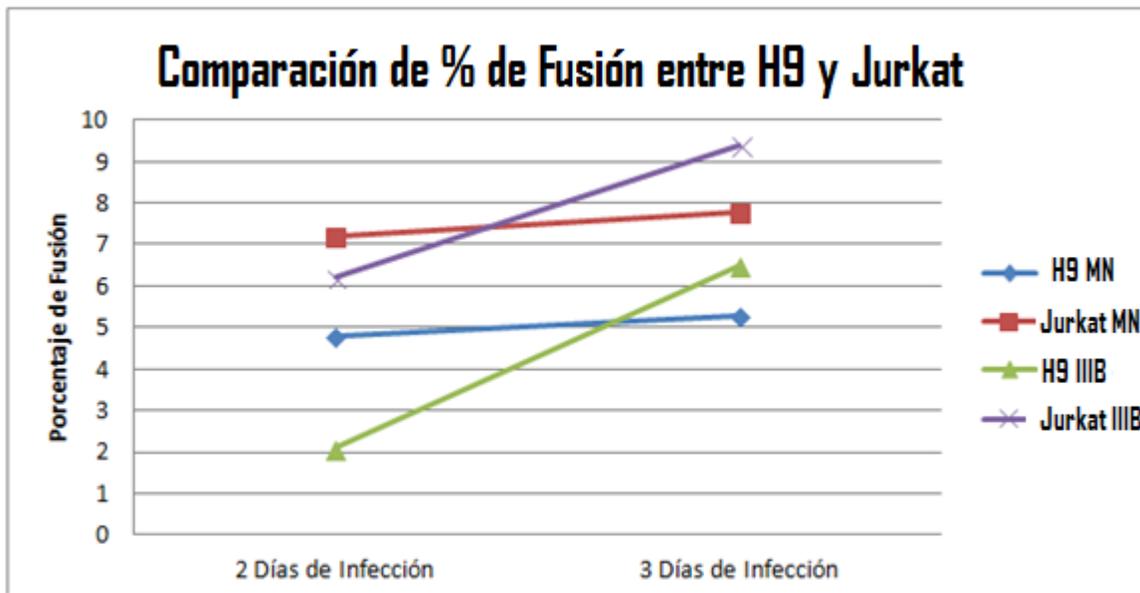


Fig.33. Gráfica en donde se compara los valores de los promedios de los porcentajes de fusión o dobles fluorescentes de los cocultivos infectados en ambas líneas celulares. Se puede observar una cierta tendencia en la misma cepa sin importar que línea celular se usó de célula blanco.

## VII. Infección de células Jurkat y tinción de antígeno viral p24 intracelular

### Condiciones generales

\**Células*: línea celular Jurkat

\**Cepa viral: sobrenadante 14* IIIB/H9 del VIH-1

\**Duración de la cinética de infección*: 3 días

\**Dilución del sobrenadante viral*: dilución 1:5 de sobrenadante concentrado en tubos Amicon ultra 100K (millón de células en 200ul de RPMI + 50ul del sobrenadante viral concentrado)

\**Tiempo de infección*: 2.5 horas

\**Policon*: polibren (8ug/ml de células a infectar)

\**Concentración del virus*: si, utilizando los tubos Amicon Ultra 100K

\**Inhibidores de fusión*: T-20 (10ul/pozo de una dilución 1:100, 50ug/ml)

Se realizó la tinción intracelular para detectar la proteína de la cápside p24 en las células infectadas, utilizando un anticuerpo anti-p24 (KC57) acoplado a FITC. Como control utilizamos células no infectadas. En la figura 34 se muestran los resultados obtenidos para la tinción de p24 en las células Jurkat infectadas durante 2 días. En el inciso A, se muestran las células “control” (no infectadas). En el inciso B, se muestran las células infectadas por dos días con un 11.24% de células positivas. Mientras que en el inciso C, se muestra un dot plot de tamaño y granularidad de ese 11.24% de células positivas. La tinción intracelular de p24 mostró un 22.58% de células positivas como se observa en el inciso E. Se observa que el tamaño y granularidad es mayor en ese 22.58% de células positivas al día 3 de infección a comparación de los observados a los dos días de infección (inciso C).

Se puede observar que el porcentaje de células positivas para p24 se duplica del día 2 al 3.

La tinción con p24 es muy conveniente porque permite determinar el número de células infectadas y se recomienda ampliamente para experimentos de fusión celular. El número de células p24<sup>+</sup> se duplicó en el día 3 con respecto al día 2.

## Tinción intracelular de p24 en células Jurkat infectadas

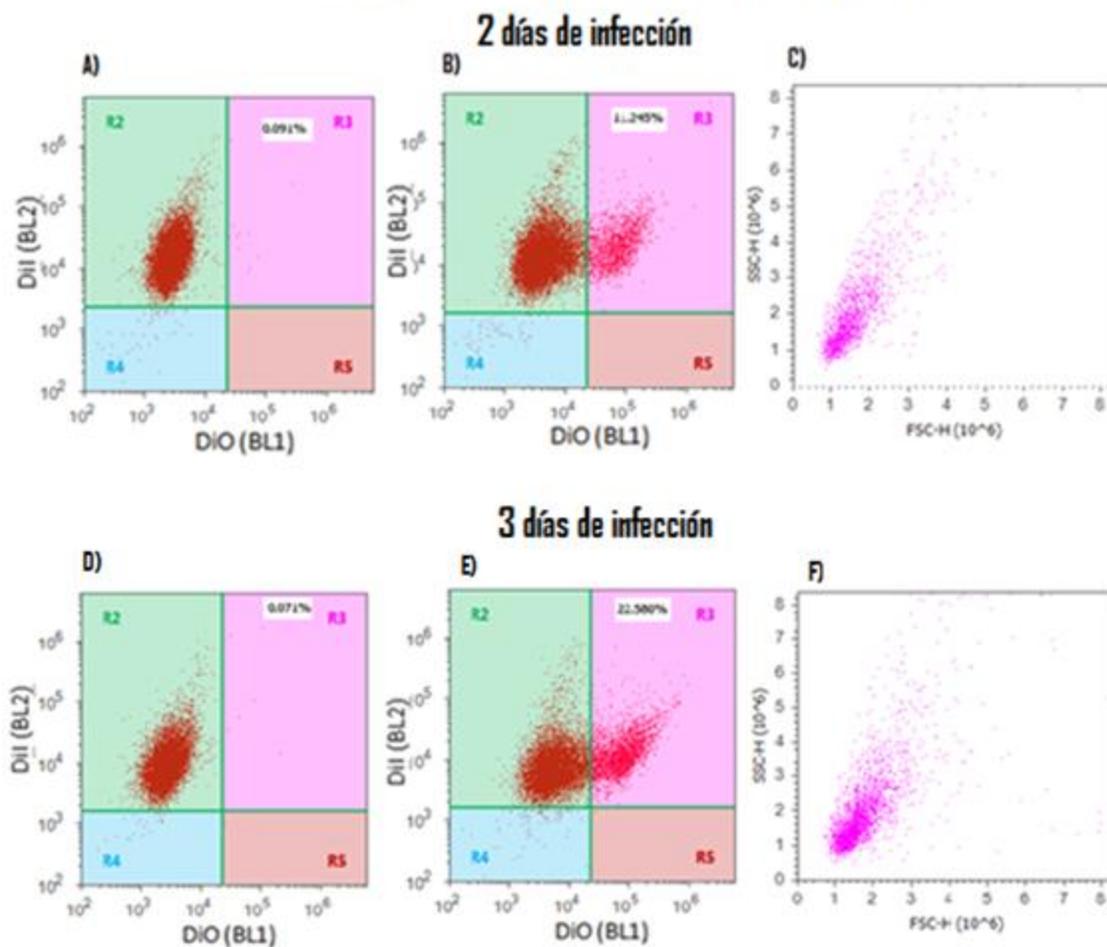


Fig.34. Dot plots de células tratadas para la tinción intracelular p24. En la parte superior se muestran las células infectadas por 2 días: A) células Jurkat no infectadas (control) y marcadas con DiI, 0.091% de células positivas para p24 intracelular, B) células infectadas por dos días (2DI), 11.245% de células positivas para p24 intracelular, C) células positivas para p24. En la parte inferior se muestran las células infectadas por 3 días: D) células Jurkat no infectadas (control) y marcadas con DiI, 0.071% de células positivas para p24 intracelular, E) células infectadas por tres días (3DI), 22.580% de células positivas para p24 intracelular, F) células positivas para p24, se muestra su tamaño en el eje de las x, y granularidad en el eje de las y.

## VIII. Ensayo de fusión entre células Jurkat infectadas y no infectadas

### Condiciones generales

\**Células*: línea celular Jurkat

\**Cepa viral: sobrenadante 14* IIB/H9 del VIH-1

\**Duración de la cinética de infección*: 3 días

\**Dilución del sobrenadante viral*: dilución 1:5 de sobrenadante concentrado en tubos Amicon ultra 100K (millón de células en 200ul de RPMI + 50ul del sobrenadante viral concentrado)

\**Tiempo de infección*: 2.5 horas

\**Polication*: polibren (8ug/ml de células a infectar)

\**Concentración del virus*: si, utilizando los tubos Amicon Ultra 100K

\**Inhibidores de fusión*: T-20 (10ul/pozo de una dilución 1:100, 50ug/ml)

Debido a que las células Jurkat muestran un buen nivel de viabilidad después de haber sido infectadas, decidimos utilizarlas para mejorar el protocolo de detección de células fusionadas por citometría de flujo.

En este experimento, se trató de aumentar la cantidad de células infectadas utilizando el SN 14 de la cepa IIB utilizado en el experimento anterior, en donde obtuvimos porcentajes de fusión más altos. Para aumentar la concentración de las partículas virales utilizamos tubos Amicon Ultra 100K, que sirven para concentrar una muestra por ultrafiltración (ver materiales y métodos). El tiempo de procesamiento típico es de 15 a 60 minutos, dependiendo de qué tan concentrada se desee la muestra.

Adicionalmente la concentración del polication polibren aumentó a 8ug/ml de células. La modificación más importante en este experimento fue que se permitió la infección de las células por 2 y 3 días ANTES de colocar los cocultivos con células no infectadas. Los cocultivos se mantuvieron 2 y 3 días más antes de ser analizados por citometría de flujo.

Para controlar que la tinción con los colorantes DiI y DiO fuera estable durante los días de incubación necesarios (4 días), se analizaron por citometría células teñidas y cocultivadas durante 24 horas.

En los incisos A, B y C de la figura 35, se pueden observar las poblaciones bien delimitadas de células Jurkat no infectadas, sin marca, es decir, sin ningún colorante, células Jurkat marcadas con DiO, y células Jurkat marcadas con DiI respectivamente. Y en el inciso D de la misma figura se muestra los cocultivos de 24 horas de células no infectadas pero marcadas con DiI y DiO (Mix) con un porcentaje de 0.54% de partículas con fluorescencia mixta, la región que se creó para detectar las partículas con fluorescencia mixta se delimitó por arriba del promedio de las células marcadas con DiI, ya que cuando se presentan partículas con fluorescencia mixta hay un aumento de la fluorescencia roja, conocido como FRET.

Los dot plots de las células infectadas por dos días y cocultivadas por 24 horas se observan en la figura 36. En el inciso A, se muestra la región analizada, en el inciso B, los cocultivos con un porcentaje de partículas con fluorescencia mixta de 1.48% y en el inciso C se observa el mismo cocultivo pero con el inhibidor de fusión T-20, con un 0.44% de partículas con fluorescencia mixta.

En la figura 37 se muestran los mismos cocultivos de 24 horas con dos días de infección pero con la región de células analizadas recorrida a la mitad de la misma, abarcando sólo las células más grandes (inciso A). Esta modificación de la región se hizo suponiendo que los sincicios que se pudieron formar serían de un tamaño y granularidad mayor a la media de la población total. En el inciso B se muestra el control de células no infectadas y marcadas con DiI y DiO colocadas en cocultivo, el cual muestra un 1.21% de partículas con fluorescencia mixta. En el inciso C se muestran los cocultivos con las células infectadas (5.62% de células con fluorescencia mixta). En el inciso D se muestra el efecto de la adición de T-20 (1.02% de células con fluorescencia mixta).

A partir de la figura 38 se muestran los datos obtenidos de las células infectadas y no infectadas por tres días colocadas en cocultivo por 24 horas. En esta figura se muestran los controles de tinción sin infectar, el inciso A, se muestran las células sin marca, mientras que en el inciso B se muestran las células blanco marcadas con DiO. En el inciso C se muestran las células marcadas con DiI y en el inciso D se muestra el Mix (cocultivo de células DiO y DiI) con un 0.41% de partículas con fluorescencia mixta.

En la figura 39 se muestran los dot plots de los cocultivos de las células infectadas por tres días con las células blanco no infectadas. En el inciso A se observa la región analizada. En el inciso B, se muestran los cocultivos con un 1.90% de partículas con fluorescencia mixta mientras que en el mismo cocultivo pero con el inhibidor T-20 se obtuvo un 0.27%. Para este día de infección también realizamos la modificación de la región como se realizó a los dos días de infección. En el control de células no infectadas obtuvimos un 0.98% de partículas con fluorescencia mixta (inciso B de la figura 40), mientras que en los cocultivos de células infectadas obtuvimos un 6.48% sin T-20 y un 0.95% en presencia del inhibidor (incisos C y D, respectivamente).

### Control de tinción en células Jurkat sin infectar

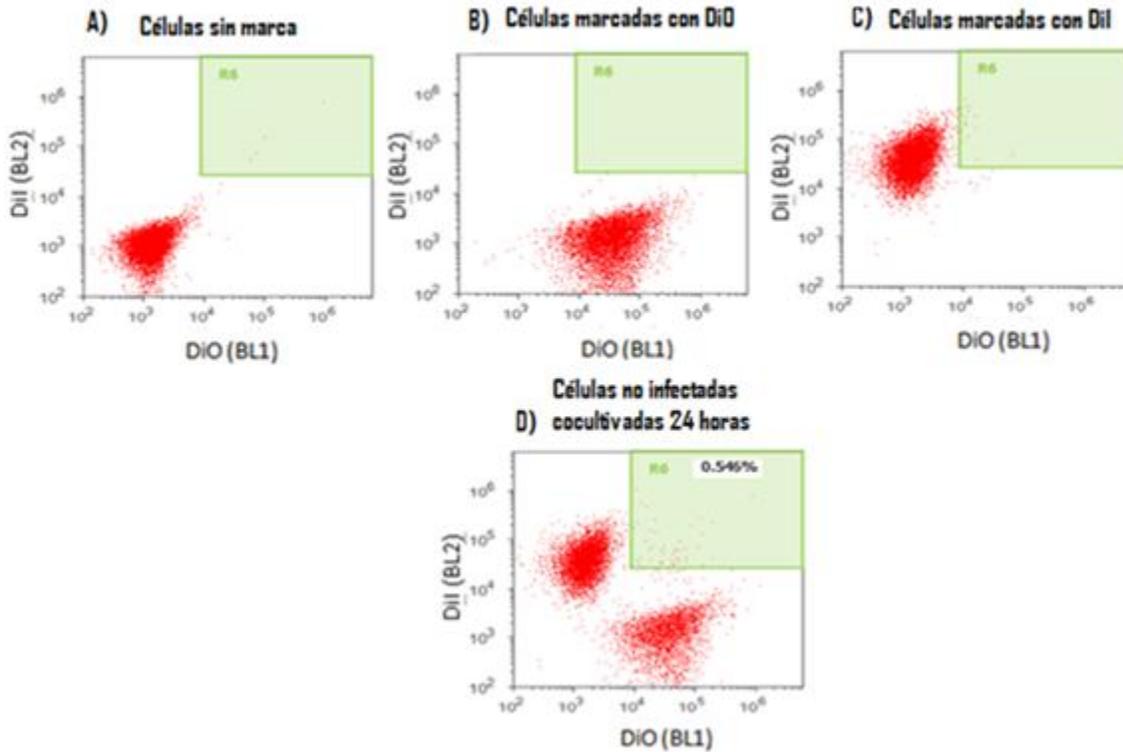


Fig.35. Dot plots de las células Jurkat no infectadas teñidas dos días (2D), A) células sin marca, B) células marcadas con DiO, C) células marcadas con DiI y D), células marcadas con DiO y DiI en cocultivo de 24 horas, se obtuvo un 0.54% de agregados celulares que se muestran en la región verde, esta región se delimitó por arriba del promedio de la población de células DiI para observar si hay FRET con la finalidad de poder distinguir entre agregados celulares y fusiones celulares.

### Células Jurkat infectadas 2 días cocultivadas con células no infectadas por 24 horas

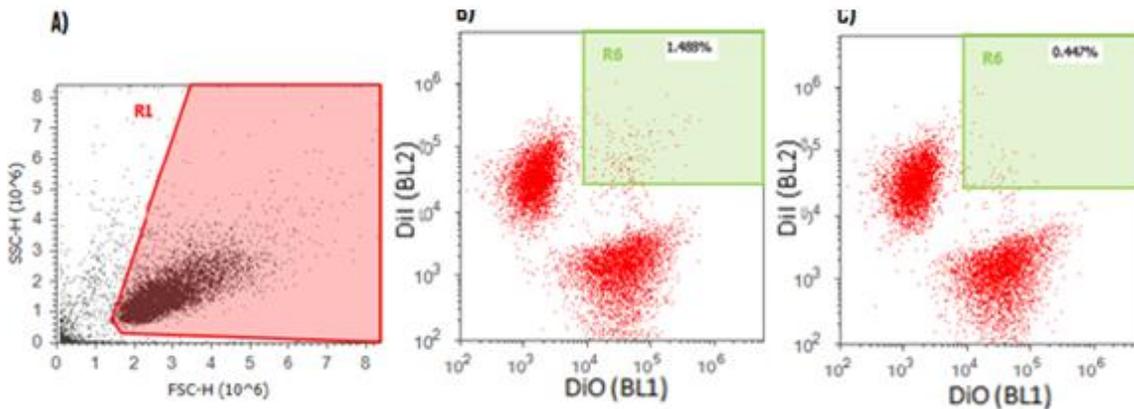


Fig.36. Dot plots de células en cocultivo infectadas (DiI) y no infectadas (DiO) por dos días (2DI) y 24 horas de cocultivo, A) región de células analizadas, B) cocultivo, muestra el porcentaje de partículas con fluorescencia mixta (1.488%), C) efecto de T-20 (0.447% de partículas con fluorescencia mixta).

## Células Jurkat infectadas 2 días cocultivadas con células no infectadas por 24 horas

### Región de células analizadas modificada

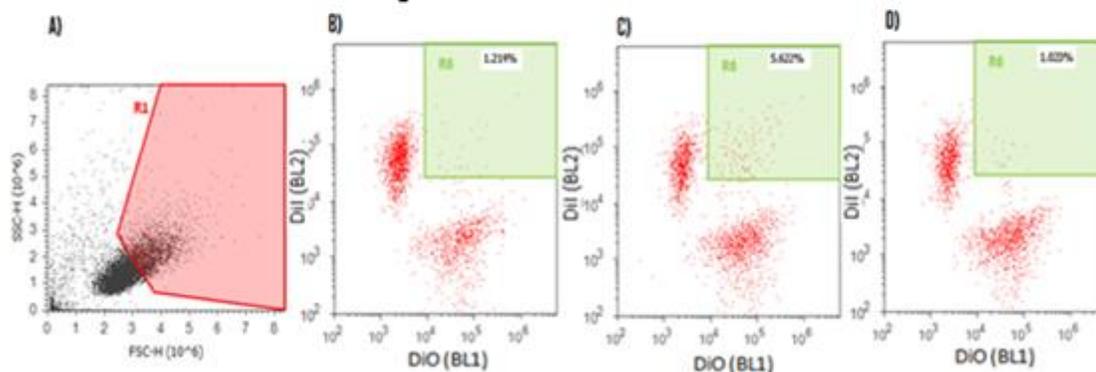


Fig.37. Dot plots de células Jurkat en cocultivo infectadas (DiI) y no infectadas (DiO) por dos días (2DI) con 24 horas de cocultivo y en donde la región de células analizadas esta justamente en la mitad de la población, considerando que los sincios que se pudieron haber formado serian de un tamaño y granularidad mayor a la media de la población total, A) se observa la región de células analizadas y la región modificada, B) células marcadas con DiI y células marcadas con DiO no infectadas pero en cocultivo de 24 horas, los agregados celulares se observan en la región R6 de color verde (1.214%), esta región se delimitó por arriba del promedio de la población de células DiI para observar si hay FRET con la finalidad de poder distinguir entre agregados celulares y fusiones celulares, C) células 2DI y células blanco en cocultivo de 24 hrs., la región verde muestra el porcentaje de partículas con fluorescencia mixta de 5.622%, D) células 2DI y células blanco en cocultivo de 24 hrs., con T-20, 1.020% de partículas con fluorescencia mixta.

### Control de tinción en células Jurkat sin infectar

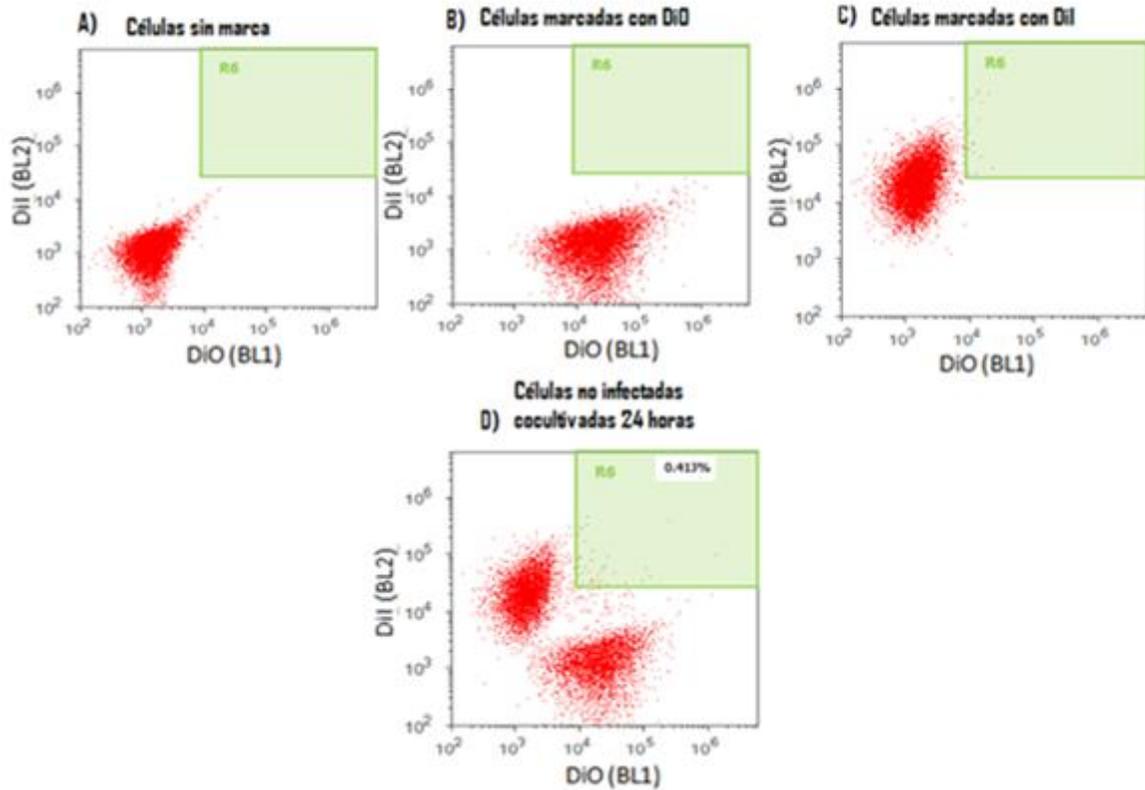


Fig.38. Dot plots de las células Jurkat tres días (3D) sin infectar, A) células sin marca, B) células marcadas con DiO, C) células marcadas con DiI y D), células marcadas con DiO y DiI en cocultivo de 24 horas, se obtuvo un 0.41% de agregados celulares que se muestran en la región verde, esta región se delimitó por arriba del promedio de la población de células DiI para observar si hay FRET con la finalidad de poder distinguir entre agregados celulares y fusiones celulares.

### Células Jurkat infectadas 3 días cocultivadas con células no infectadas por 24 horas

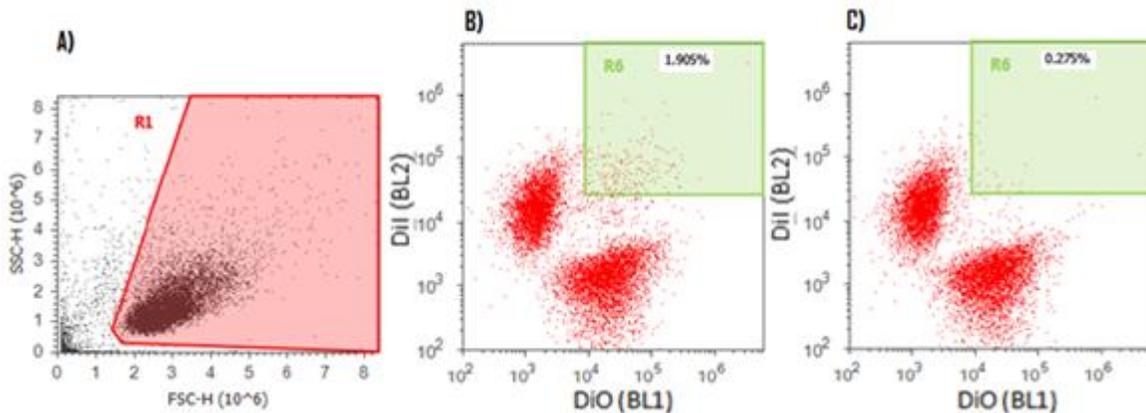


Fig.39. Dot plots de células Jurkat en cocultivo, infectadas (DiI) y no infectadas (DiO) por tres días (3DI) y 24 horas de cocultivo, A) se observa la región de células analizadas, B) células 3DI y células blanco en cocultivo de 24 hrs., la región verde muestra el porcentaje de partículas con fluorescencia mixta de 1.905%, C) células 3DI y células blanco en cocultivo de 24 hrs., con T-20, 0.275% de partículas con fluorescencia mixta.

### Células Jurkat infectadas 3 días cocultivadas con células no infectadas por 24 horas Región de células analizadas modificada

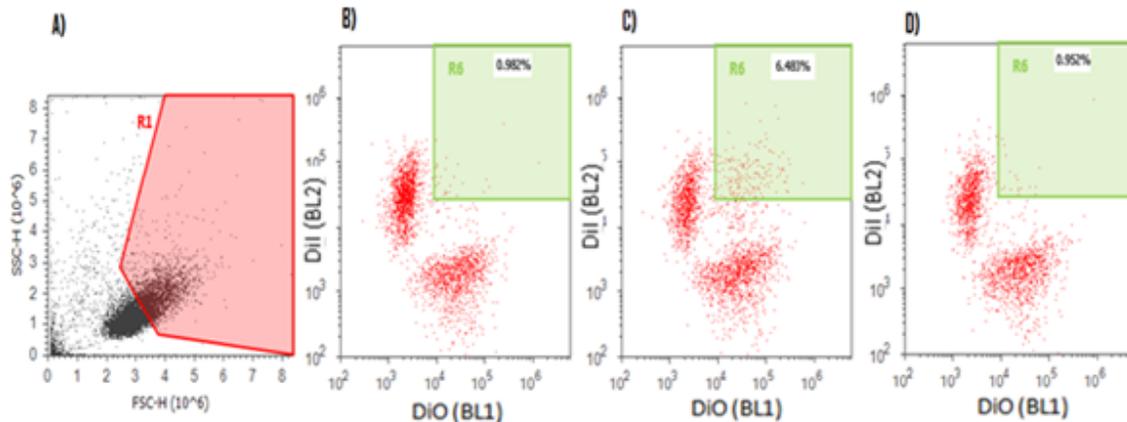


Fig.40. Dot plots de células Jurkat en cocultivo infectadas (DiI) y no infectadas (DiO) por tres días (3DI) con 24 horas de cocultivo y en donde la región de células analizadas está justamente en la mitad de la población, considerando que los sincios que se pudieron haber formado serían de un tamaño y granularidad mayor a la media de la población total, A) se observa la región de células analizadas y la región modificada, B) células marcadas con DiI y células marcadas con DiO no infectadas pero en cocultivo de 24 horas, los agregados celulares se observan en la región R6 de color verde (0.982%), esta región se delimitó por arriba del promedio de la población de células DiI para observar si hay FRET con la finalidad de poder distinguir entre agregados celulares y fusiones celulares, C) células 3DI y células blanco en cocultivo de 24 hrs., la región verde muestra el porcentaje de partículas con fluorescencia mixta de 6.483%, D) células 3DI y células blanco en cocultivo de 24 hrs., con T-20, 0.952% de partículas con fluorescencia mixta.

## ***IX. Formación de sincicios en cocultivos de células JLTRG***

En paralelo con el experimento anterior se utilizó la línea celular reportera JLTRG la cual posee un gen reportero que expresa la proteína GFP en respuesta a la producción de la proteína Tat del VIH. Los protocolos utilizados fueron exactamente los mismos al igual que las condiciones. Este proyecto fue realizado por la estudiante de licenciatura Isabel Ruelas Galindo. Los datos que se obtuvieron en ese experimento los incluí con el objetivo de comparar los porcentajes de partículas con fluorescencia mixta y el porcentaje de células positivas para GFP utilizando una línea celular reportera.

En la figura 41 se observan dos tablas en donde se comparan los porcentajes de partículas con fluorescencia mixta obtenidos a los dos y tres días de infección y 24 horas de cocultivos en la línea celular reportera JLTRG y la línea celular Jurkat. Se observa que los porcentajes entre ellas son bastante diferentes, teniendo los porcentajes más altos en la línea celular reportera. En los cocultivos de 24 horas y dos días de infección en la línea celular JLTRG, se obtuvieron un 4.16% de partículas con fluorescencia mixta, mientras que en presencia del inhibidor T-20 se obtuvo un 0.89% y en el Mix (cocultivo de 24 horas de células no infectadas pero marcadas con DiI y DiO) fue de 1.43%.

También se midió la GFP producida por las células infectadas en estas condiciones, obteniendo un 10.97% de células positivas para GFP a los dos días de infección y 24 horas de cocultivo, y en su duplicado pero en presencia de T-20 se obtuvo un 10.58% (figura 42).

A los tres días de infección y 24 horas de cocultivos los porcentajes de partículas con fluorescencia mixta aumentaron a 7.99% y con T-20 bajó a 0.78%, mientras que en el Mix fue de 1.36%. Al medir la GFP producida por las células infectadas en estas condiciones, se obtuvo un 34.81% de células positivas para GFP a los tres días de infección y 24 horas de cocultivo, mientras que en presencia de T-20 fue de 21.24%, y en el Mix fue de 0.64% (figura 42).

Se recomienda permitir la infección durante 3 días antes de colocar los cocultivos. De éste modo se obtiene un nivel de fusión suficiente, el cual es inhibido exitosamente por T-20. También se sugiere que este inhibidor debe ser agregado al momento de iniciar los cocultivos.

Finalmente se muestra que diferentes líneas celulares (Jurkat y JLTRG) mostraron distintas susceptibilidades a la infección y niveles de formación de sincicios.

<b>Comparación del % de sincicios entre la línea celular JLTRG y la línea Jurkat</b>		
<b>2 días de infección y 24 horas de cocultivo</b>		
<b>MUESTRA</b>	<b>% de sincicios Células JLTRG</b>	<b>% de sincicios Células Jurkat</b>
Control (células no infectadas)	1.43	0.54
Células con fluorescencia mixta	4.16	1.48
Células con fluorescencia mixta con T-20	0.89	0.44
<b>3 días de infección y 24 horas de cocultivo</b>		
<b>MUESTRA</b>	<b>% de sincicios Células JLTRG</b>	<b>% de sincicios Células Jurkat</b>
Control (células no infectadas)	1.36	0.41
Células con fluorescencia mixta	7.99	1.90
Células con fluorescencia mixta con T-20	0.78	0.27

*Fig.41. Tabla que compara los porcentajes de partículas con fluorescencia mixta obtenidos en la línea celular reportera JLTRG y en la línea celular Jurkat a los 2 y 3 días de infección y 24 horas de cocultivo.*

<b>2 días de infección y 24 horas de cocultivo</b>	
<b>Línea celular reportera JLTRG</b>	
<b>MUESTRA</b>	<b>% de GFP</b>
Control (células no infectadas)	0.46%
Células infectadas	23.19%
Sincicios	10.97%
Sincicios con T-20	10.58%
<b>3 días de infección y 24 horas de cocultivo</b>	
<b>Línea celular reportera JLTRG</b>	
<b>MUESTRA</b>	<b>% de GFP</b>
Control (células no infectadas)	0.64%
Células infectadas	59.38%
Sincicios	34.81%
Sincicios con T-20	21.29%

*Fig.42. Tabla que contiene los porcentajes de las células positivas para la GFP obtenidos por la estudiante Isabel Ruelas Galindo. Cinética de infección utilizando las células reporteras JLTRG realizada en paralelo con la línea celular Jurkat.*

## Discusión

En esta tesis se desarrollaron diversos experimentos de infección utilizando dos cepas del VIH-1, MN y IIB. La finalidad de este proyecto fue estandarizar y optimizar un protocolo de infección con VIH-1 utilizando diferentes líneas de células T y observar los efectos citopáticos causados por la infección, así como medir por medio de citometría de flujo la fusión entre células infectadas con células no infectadas.

### *Discusión de la infección en las diferentes líneas celulares*

*In vitro*, el VIH causa dos tipos de efectos citopáticos, la formación de sincicios o células gigantes multinucleadas y lisis de células individuales. La lisis celular es causada cuando células individuales se infectan con el VIH llevando a cabo un proceso denominado degeneración en forma de globo (*balloon degeneration*, en inglés) provocado por un cambio en la permeabilidad de la membrana celular de estas células individuales infectadas, aumentando los cationes monovalentes ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ) intracelularmente, lo que provoca que la célula se hinche más allá de los límites de la integridad de su membrana y se lise. Un factor que comparten estos dos tipos de efectos citopáticos es que existe un aumento en el volumen celular (37). En todas las fotos mostradas en esta tesis, las células infectadas ya sea con la cepa MN o IIB, y en todas las líneas celulares utilizadas se observa claramente algún efecto citopático causado por la infección con VIH-1. También observamos por medio de microscopía óptica que los sincicios sufren hinchamiento y lisis de células individuales. Todas las líneas celulares que se utilizaron en esta tesis son aptas para realizar cinéticas de infección. En nuestro caso muy particular y por nuestro objetivo, llegamos a la conclusión de que la línea celular Jurkat es el mejor modelo para cuantificar por citometría de flujo la fusión celular. Mientras que las líneas celulares MT-2 y H9 son un excelente modelo para propagar el virus y cosechar sobrenadantes.

Como hemos mencionado anteriormente, la muerte celular, la formación de sincicios y la degeneración de la membrana con forma de globo o *balloon degeneration* (17) característico de la infección por el VIH-1, se observaron en las tres líneas celulares (MT-2, H9 y Jurkat). Señalado con flechas rojas en las diversas fotos presentes en la sección de resultados de esta tesis y fueron visibles al microscopio en todas las líneas celulares a partir del día 2 de infección como se observa en la figura 10 (células MT-2), en la figura 2 (células H9) y en la figura 19 (células Jurkat). También se observó la muerte de células individuales. Se sabe que la infección por VIH también puede asociarse con la apoptosis que resulta de la acción directa de las proteínas virales (por ejemplo, *Nef*, *Vpu*, *Vpr* y *Tat*), la unión de gp120 a la molécula CD4, desórdenes en la presentación de antígenos o por superantígenos. Como la glicoproteína 120, que puede inducir la muerte en cultivos celulares al añadirse de manera dosis-dependiente; así como la acumulación de la gp160 (proteínas de la envoltura gp120 y gp41 sin procesar por la proteasa) induce la muerte de células individuales, esta muerte celular esta ligada a apoptosis (41). También algunos estudios han sugerido que la gp120 en la superficie de células  $\text{CD4}^+$  (infectadas o no

infectadas) puede activar los componentes del complemento, lo que lleva a la muerte celular (42).

Al observar al microscopio los efectos citopáticos descritos anteriormente, quisimos cuantificar la gp120 presente en la membrana de células infectadas, para comprobar que las células habían sido infectadas con los sobrenadantes virales. Para este fin se utilizó la línea celular MT-2. Se observó que la expresión de gp120 en las células infectadas fue directamente proporcional a la dilución del sobrenadante viral (fig.11). También observamos diferentes porcentajes de expresión de la gp120 en las células infectadas por 15 días con la cepa MN y IIIB. Nuestros resultados sugieren que la cepa IIIB es más infecciosa, 52.4% de expresión de gp120 respecto a 33.2% en la cepa MN (fig.12).

Realizamos un ensayo de viabilidad celular medida por la unión de Anexina V a células MT-2 infectadas con las cepas MN y IIIB, se observó un porcentaje de 28.6% y 61.7% respectivamente. Por lo tanto, la cepa IIIB indujo un mayor porcentaje de apoptosis que la cepa MN en células MT-2.

Nuestro siguiente objetivo fue optimizar la infección y propagación del virus para obtener stocks de sobrenadantes virales. Para este fin, utilizamos la línea celular H9. En la literatura mencionan que para optimizar la infección, es decir, para aumentar la población de células infectadas es necesario adaptar el virus a la línea celular. Para esto se llevan a cabo múltiples rondas de infección (32). Esta fue la finalidad de la cinética de infección de 4 semanas realizada en la línea celular H9. Además, a lo largo de esta cinética de infección obtuvimos stocks de sobrenadantes virales de ambas cepas a diferentes tiempos (a los días 4°, 7°, 11°, 14°, 18°, 21°, 25° y 28°). Una vez obtenidos los stocks víricos realizamos un ELISA a esos sobrenadantes para detectar la proteína estructural del VIH p24, y determinar si la infección fue exitosa. A partir de las diversas concentraciones de p24 obtenidas por el ELISA se escogió el sobrenadante con la concentración más alta para utilizarlo en futuras cinéticas de infección. El sobrenadante IIIB del día 14 con un valor de 333.87 pg/ml de p24 fue el que contenía mayor concentración (fig.6) y el que se empezó a usar en las infecciones posteriores.

Con el objetivo de mejorar nuestro modelo experimental, introdujimos la línea celular Jurkat. Ya que esta línea presenta algunas diferencias respecto a la forma de crecimiento, en comparación con las células MT-2. Las diferencias radican en que las células MT-2 forman agregados o racimos celulares muy grandes, abundantes y las células son muy adhesivas entre sí (es por estas características que son utilizadas para propagar el virus), siendo esto un problema en la cuantificación de la fusión por citometría de flujo. Mientras que las células Jurkat forman agregados muy pequeños, menos abundantes y no presentan esa adhesividad entre sí cuando se encuentran creciendo normalmente. Realizamos una infección en paralelo con ambas líneas celulares, en donde las células MT-2 sirvieron como control de infección. Observamos que la línea celular Jurkat mantenía un buen porcentaje de viabilidad durante la cinética (fig. 23) y se observaron los efectos citopáticos esperados a los 2 días de infección (fig.19). Con este experimento confirmamos que la línea celular Jurkat se infectaba exitosamente al igual que la línea celular MT-2.

También utilizamos la línea celular Jurkat para realizar una tinción intracelular para detectar la p24 en células infectadas. Realizamos diversas modificaciones en este protocolo de infección: concentramos el sobrenadante viral por medio de unidades de ultrafiltración, aumentamos la concentración del polication polibren (8ug/ml de células) y del inhibidor T-20 y permitimos que las células se infectaran 2 y 3 días antes de colocarlas en cocultivos. Obtuvimos porcentajes de 11.24 y 22.58 al segundo y tercer día de infección (respectivamente) y un día de cocultivo, de células positivas para la p24 intracelular. Se puede observar que la población de células positivas se duplica del segundo al tercer día de infección, y que aumenta el tamaño y granularidad celular al tercer día (fig.34).

En resumen las mejores condiciones para obtener un nivel importante de células infectadas fueron: el uso del polication polibren (8ug/ml de células a infectar), el aumento en el tiempo de infección (2.5 hrs.), dejar las células infectadas en cultivo por dos o tres días antes de colocar los cocultivos celulares y la concentración de los sobrenadantes virales por ultrafiltración.

### ***Discusión de la fusión celular en las diferentes líneas celulares***

Dado que la línea celular MT-2 se usó originalmente para determinar la capacidad de los virus para inducir sincicios (25), inicialmente utilizamos esta línea celular para medir la fusión celular por citometría de flujo.

Se utilizaron los colorantes lipofílicos DiI y DiO para teñir las membranas celulares y poder cuantificar la fusión celular por citometría de flujo. Estos colorantes permanecen estables en las células por varios días y la señal fluorescente de las células teñidas se separa satisfactoriamente en los análisis por citometría de flujo (ver introducción). En cada experimento se muestran los controles de tinción. Las células no infectadas (células blanco) se tiñeron con DiO (canal FL1) y las células infectadas se tiñeron con el colorante DiI (canal FL2). La fusión celular se midió por la presencia de partículas con fluorescencia mixta, es decir, positivas para DiO y DiI.

Para la infección con la cepa MN y IIIB en la línea celular MT-2, utilizamos la proporción de 100ul de sobrenadante viral por cada millón de células a infectar. Utilizamos como controles de fusión celular el inhibidor clásico de fusión T-20 y un anticuerpo anti-CD4. Infectamos con tres diluciones diferentes, 1:10, 1:100 y 1:1000. El valor más alto de partículas con fluorescencia mixta los obtuvimos en la dilución 1:10 (25%). En las otras dos diluciones los valores de partículas con fluorescencia mixta no fueron significativos ya que eran similares al valor del control, es decir, del cocultivo de células no infectadas pero teñidas con ambos colorantes (Mix). Creemos que la concentración del inhibidor de fusión T-20 fue muy baja (2ug/ml de células) y por eso no inhibió la fusión entre células infectadas y no infectadas (fig.13). Sin embargo, cabe destacar que esta concentración de T-20 sí inhibe la fusión en un modelo de fusión, utilizando células Jurkat HxBc2 inducida por la proteína de la envoltura viral en nuestro laboratorio (30). Dejamos de utilizar el anticuerpo anti-CD4 ya que en vez de inhibir la fusión, la favorecía, suponemos que al poseer muchas moléculas de adhesión, como ICAM, el anticuerpo anti-CD4 se unía a una célula y por la proximidad entre las células podía unirse a otra más, favoreciendo una unión estrecha entre las células (datos no mostrados en esta tesis). Creemos que, la falta de

inhibición de la fusión celular por T-20 y anticuerpo anti-CD4 en esta línea, fue debido a la gran adhesividad celular, ya que estas células forman agregados muy grandes cuando se encuentran creciendo normalmente, probablemente debido a una alta expresión de moléculas de adhesión. Por lo tanto, las células MT-2 no resultaron adecuadas para la cuantificación de la fusión celular por citometría de flujo.

Dado lo anterior, en los siguientes experimentos, se utilizaron las líneas celulares Jurkat y H9. En trabajos previos del laboratorio, se había observado que las células Jurkat producen un nivel de agregación muy bajo, permitiendo la determinación entre células fusionadas y células agregadas. Además. La fusión entre células Jurkat que expresa Env, con células Jurkat normales, es fácilmente cuantificable por citometría (30).

Para obtener altos números de células infectadas, introdujimos el uso del polication polibren. Este polication aumenta la eficiencia de la infección al neutralizar las cargas de repulsión entre los viriones y el ácido siálico presente en la membrana de la célula blanco (33), utilizamos una concentración de 2ug/ml de células, y aumentamos 30 minutos más el tiempo de infección. También aumentamos la concentración de nuestro control de fusión, el péptido T-20. Estas modificaciones se realizaron en la cinética de infección con la línea celular Jurkat y H9. Obtuvimos porcentajes de partículas con fluorescencia mixta de hasta 9.4% en la línea celular Jurkat, mientras que el porcentaje más alto en la línea celular H9 fue de 6.5%. Hubo un nivel bajo de agregados. Los niveles de fusión fueron bajos y el efecto de T-20 fue parcial. Se observó una mayor inhibición en la línea celular H9 infectada con la cepa MN (fig.32).

Posteriormente, realizamos otra modificación al protocolo de infección, que fue la concentración de partículas virales por ultrafiltración del sobrenadante, aumento de la concentración del polication (de 2ug a 8ug/ml de células a infectar) y del péptido T-20(de 2ug a 50 ug/ml). Los porcentajes de fusión celular obtenidos en esta cinética fueron muy bajos (el mayor fue de 1.9% al tercer día, figura 39 inciso B). Dado que se espera que los sincicios tengan mayor tamaño y granularidad que las células no fusionadas se decidió analizar solamente una región de partículas mayor que la media de la población total (fig. 37 y 40). En esta región al tercer día (fig.40) se obtuvo un porcentaje de 6.48% de células fusionadas y la inhibición por T-20 fue de 85%.

Lo mismo se observó en la línea celular reportera JLTRG, en donde hubo casi un 99% de inhibición de la fusión celular utilizando T-20 (fig.41). También utilizando esta línea celular se midió el porcentaje de células positivas para GFP (células infectadas con replicación de las proteínas del virus). A los tres días de infección un 34.81% de células JLTRG eran positivas para GFP. Esta cinética se realizó en paralelo a la de la línea celular Jurkat. La línea celular Jurkat y JLTRG poseen cada una características específicas y propias de su línea celular pero ambas son células Jurkat, sugiriendo que pueden comportarse de una forma similar durante la infección. El uso de una línea celular reportera nos permitió corroborar que las células estaban infectadas con VIH-1.

Todas las modificaciones en los protocolos de infección fueron hechas con la finalidad de establecer las condiciones experimentales que permitieron la cuantificación de la fusión entre células infectadas y no infectadas por medio de citometría de flujo.

Concluimos que cada línea celular posee características específicas. Las diferencias entre cada línea celular, como puede ser, el nivel de expresión en la membrana celular de las moléculas necesarias para la infección, son determinantes en el momento de la infección y posteriormente, en la fusión celular. Sin embargo, todas las líneas celulares fueron susceptibles a la infección.

En resumen, las mejores condiciones para lograr una infección exitosa fueron:

- Sobrenadante viral concentrado
- Polibren (8ug/ml)
- Tiempo de incubación con el sobrenadante viral (2.5 horas)
- Tiempo de infección para observar la formación de sincicios (2 y 3 días)

Y las mejores condiciones para ensayos de fusión celular fueron:

- Células Jurkat (debido a sus características de crecimiento, baja adhesividad y buena viabilidad)
- Tiempo de infección (3 días) antes del cocultivo
- 24 horas de cocultivo entre células infectadas y no infectadas
- Tinción celular (células infectadas y no infectadas) un día antes de colocar los cocultivos, para que la marca del colorante sea alta y se separen las dos poblaciones
- Colorantes DiO (1:10 15ul/ml) y DiI (1:10 5ul/ml)

## Conclusión

Las infecciones realizadas en todos los experimentos fueron exitosas ya que siempre se observaron efectos citopáticos, como se muestran en las fotografías a lo largo de esta tesis. Además, se comprobó la presencia de la p24 mediante dos ensayos diferentes, uno por ELISA de sobrenadantes cosechados de cultivos de células infectadas a diferentes tiempos y otro por una tinción intracelular de células infectadas por medio de un anticuerpo específico anti-p24. También, al utilizar la línea celular reportera JLTR comprobamos que existió una replicación de proteínas virales en los cultivos infectados mediante la cuantificación de la proteína GFP.

Las cepas MN y IIIB del VIH-1 causan diferentes niveles de efecto citopático a las células blanco de diferentes líneas celulares. Cada cepa posee características cualitativas, como la abundancia y tamaño de los sincicios, y cuantitativas, como la viabilidad celular medida por el ensayo de exclusión de azul tripan y por Anexina V.

Se mejoró el protocolo de infección haciendo varias modificaciones a lo largo de esta tesis. El uso y aumento del polyclonal polibren y el uso de unidades de ultrafiltración Amicon100K para concentrar el virus en los sobrenadantes, entre otros, redujeron considerablemente los tiempos de incubación y elevaron el número de células infectadas. Estos cambios permitieron mejorar nuestro modelo experimental de fusión celular entre células infectadas y no infectadas.

Establecimos un protocolo para poder cuantificar la fusión celular por medio de citometría de flujo usando colorantes lipofílicos para marcar diferencialmente a las células. La fusión celular la cuantificamos como partículas con fluorescencia mixta, concluyendo que la fusión celular causada por la infección del VIH-1 se puede cuantificar exitosamente por medio de citometría de flujo.

Con los experimentos realizados en esta tesis podemos concluir que cada línea celular posee características específicas que las hace diferentes entre ellas. Creemos que estas diferencias son las causantes de la variedad de los resultados obtenidos con la infección con el VIH-1 MN y IIIB. Por ejemplo, el nivel de expresión de moléculas necesarias para que el virus infecte a la célula blanco, como CD4, CXCR4 y moléculas de adhesión, que son determinantes en el nivel de infección.

## Referencias

1. Coffin, J. M. (1992). Structure and classification of retroviruses, p. 19-50. In J.A. Levy (ed). The Retroviridae, vol. 1. Plenum Press, New York, N.Y.
2. Gottlier, M. S., J. E. Groopman, W. M. Weinstein, J. L. Fahey, R. Detels. (1983). The acquired immunodeficiency syndrome. *Ann. Intern. Med* 99:208-220.
3. Levy, Jay, A. (2008). El VIH y la pathogenesis del SIDA. P.23. ISBN 978-968-16-8585-0.
4. Gilbert, PB et al. (2003). Comparison of HIV-1 and HIV-2 infectivity from a prospective cohort study in Senegal. *Statistics in Medicine* **22** (4): pp. 573–593.
5. Reeves, J. D. and Doms, R. W (2002). Human Immunodeficiency Virus Type 2. *J. Gen. Virol.* 83 (Pt 6): pp. 1253–65.
6. Clavel, F., D. Guetard, F. Brun-Vezinet, S. Chamaret, M.-A. Rey. (1986). Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 233:343-346.
7. De Cock, K. M., G. Adjorilo, E. Ekpini, T.Sibailly, J. Kouadio, M. Maran, K. Brattegaard, K. M. Vetter, R. Doorly, y H. D. Gayle. (1993). Epidemiology and transmission of HIV-2: why there is no HIV-2 pandemic.
8. Gómez, C., y T. J. Hope. (2005). The ins and outs of HIV replication. *Cell Microbial.* 7:621-626.
9. McCune, J. M., L. B. Rabin, M. B. Feinberg, M. Lieberman, J. C. Kosek, G. R. Reyes, y I. L. Weissman. (1988). Endoproteolytic cleavage of gp160 is required for the activation of human immunodeficiency virus. *Cell* 53:55-67.
10. Pascual, R., M. R. Moreno, y J. Villalain. (2005). A peptide pertaining to the loop segment of human immunodeficiency virus gp41 binds and interacts with model biomechanism. *J. Virol.* 79:5142-5152.
11. InfoSIDA. (2005). Departamento de Salud y Servicios Humanos de Estados Unidos. <http://aidsinfo.nih.gov>.
12. White, J. M. (1990). Viral and cellular membrane fusion proteins. *Annu. Rev. Physiol.* 52:675-697.
13. Myszka, D. G., R. W. Sweet, P. Hensley, M. Brigham-Burke, P. D. Kwong, W. A. Hendrickson, R. Wyatt, J. Sodroski, y M. L. Doyle. (2000). Energetics of the HIV gp120-CD4 binding reaction.
14. Sato, H., J. Orenstein, D. Dimitrov, y M. Martin. (1992). Cell-to-cell spread of VIH-1 occurs within minutes and may not involve the participation of virus particles. *Virology* 186:712-724.
15. Ho, D. D., T. Moudgil, y M. Alam. (1989). Quantitation of human immunodeficiency virus type 1 in the blood of infected persons.
16. Bagasra, O., S., P. Hauptman, H. W. Lischner, M. Sachs, y R. J. Pomerantz. (1992). Detection of human immunodeficiency virus type 1 provirus in mononuclear cells by *in situ* polymerase chain reaction.
17. El VIH y la pathogenesis del SIDA. Jay A. Levy. México: FCE, INER, (2008).
18. Joshua M Costin. (2007). Cytopathic Mechanisms of HIV-1. *Virology Journal*,

19. Holm. G. H., y D. Gabuzda. (2005). Distinct mechanisms of CD4+ and CD8+ T cell activation and bystander apoptosis induced by human immunodeficiency virus type 1 virions.
20. Heinkelein, M., S. Sopper, y C. Jassoy. (1995). Contact of human immunodeficiency virus type 1 infected and uninfected CD4+ T lymphocytes is highly cytolytic for both cells.
21. Tersmette, M., R. E. Y. De Goede, J. M. Bert, I. N. Al, R. A. Winkel, H. T. C. Gruters, H. G. Huisman, y F. Miedema. (1988). Diferential syncytium-inducing capacity of human immunodeficiency virus isolates: frequent detection of syncytium-inducing isolates in patients with acquired immunodeficiency síndrome (AIDS)and AIDS-related complex.
22. Pérez, L. G., M. A. O'Donnell, y E. B. Stephens. (1992). The transmembrane glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 induces syncytium formation in the absence of the receptor binding glycoprotein.
23. Clark, S. J., M. S. Saag, W. D. Decker, S. Chambell-Hill, J. L. Roberson, P. J. Veldkamp, J. C. Kappes, B. H. Hahn, y G. M. Swaw. (1991). High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection.
24. Morgan, J. R., J. M. Ledoux, R. G. Snow, R. G. Tompkins, y M. L. Yarmush. (1995). Retrovirus infection: effect of time and target cell number.
25. Koot, M., A. H. V. Vos, R.P. M. Keet, R. E. y De Goede, M. W. Dercksen, F. G. Terpstra, R. A. Coutinho, F. Miedema, y M. Tersmette. (1992). HIV-1 biological phenotype in long-term infected individuals evaluated with an MT-2 cocultivation assay.
26. Goudsmit, J., J. M. A. Lange, D. A. Paul, y G. J. Dawson. (1987). Antigenemia and antibody titers to core and envelope antigens in AIDS, AIDS-related complex and subclinical human immunodeficiency virus infection.
27. Lequin R (2005). "Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)".
28. Merigan, T. C., R. L. Hirscha, A. C. Fisher, L. A. Meyerson, G. Gold-Stein, y M. A. Winters. (1996). The prognostic significance of serum viral load, codon 215 reverse transcriptase mutation and CD4+ T cells on progression of HIV disease in a double-blind study of thymopentin.
29. Cao J, Park IW, Cooper A, Sodrowski J. (1996) Molecular determinants of acute single-cell lysis by human immunodeficiency virus type 1.
30. Huerta L, Lamoyi E, Báez-Saldaña A, Larralde C. (2002) Human immunodeficiency virus envelope-dependent cell-cell fusion: a quantitative fluorescence cytometric assay.
31. Rivera-Toledo E, López-Balderas N, Huerta L, Lamoyi E, Larralde C. (2010) Decreased CD4 and wide-ranging expression of other immune receptors after HIV-envelope-mediated formation of syncytia in vitro.
32. Rivera-Toledo E. (2006) Tesis: Fusión celular mediada por las proteínas de la envoltura del VIH: caracterización fenotípica y relevancia para la patogénesis del SIDA. Maestría en Ciencias Biológicas, Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.
33. John R. Mascola, Mark K. Louder, Christine Winter, Ranjani Prabhakara, Stephen C. De Rosa, Daniel C. Douek, Brenna J. Hill, Dana Gabuzda, and Mario Roederer.(2002) Human Immunodeficiency Virus Type 1 Neutralization Measured by Flow Cytometric Quantitation of Single-Round Infection of Primary Human T Cells.
34. Howard E. Davis, Matthew Rosinski , Jeffrey R. Morgan and Martin L. Yarmush, et al. (2004). Charged Polymers Modulate Retrovirus Transduction via Membrane Charge Neutralization and Virus Aggregation.

35. HIV syncytium-inducing (MT-2) assay. (1997). ACTG Laboratory Technologist Committee. DAIDS Virology Manual for HIV Laboratories.
36. Richman, D.D., Bozzette. (1994). The impact of the syncytium-inducing phenotype of human immunodeficiency virus on disease progression.
37. T G Voss, C D Fermin, J A Levy, S Vigh, B Choi and R F Garry. (1996). Alteration of intracellular potassium and sodium concentrations correlates with induction of cytopathic effects by human immunodeficiency virus.
38. 1. Joshua M Costin. Cytopathic Mechanisms of HIV-1. (2007). *Virology Journal*, 4:100 doi: 10.1186/1743-422X-4-100.
39. Duelli D, Lazebnik Y. (2003). Cell fusion: a hidden enemy?. *Cancer Cell*
40. Niv MY. (2008).
41. Lu, Y. Y., Y. Koga, K. Tanaka, M. Sasaki, G. Kimura, y K. Nomoto. (1994). Apoptosis induced in CD4+ cells expressing gp160 of human immunodeficiency virus type 1
42. Susal, C., M. Kirschfink, M. Kropelin, V. Daniel, y G. Opelz. (1994). Complement activation by recombinant HIV-1 glycoprotein gp120.