



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD  
TRANSCRIPCIONAL DEL VIH-1 EN SINCICIOS  
DE CÉLULAS T CD4<sup>+</sup>**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADA EN BIOLOGÍA

PRESENTA

ISABEL RUELAS GALINDO

DIRECTORA DE TESIS

DRA. LEONOR HUERTA HERNÁNDEZ



MÉXICO, D.F.

2015



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.

<p><b>1. Datos del alumno</b></p> <p>Apellido paterno  Apellido materno  Nombre (s)  Teléfono  Universidad Nacional Autónoma de México  Facultad  Carrera  Número de cuenta</p>	<p>Ruelas  Galindo  Isabel  55-39-92-15-02    Ciencias  Biología  30525659-3</p>
<p><b>2. Datos del tutor</b></p> <p>Grado  Nombre (s)  Apellido paterno  Apellido materno</p>	<p>Doctora  Leonor  Huerta  Hernández</p>
<p><b>3. Datos del sinodal 1</b></p> <p>Grado  Nombre (s)  Apellido paterno  Apellido materno</p>	<p>Doctora  Perla Mariana  Del Río  Estrada</p>
<p><b>4. Datos del sinodal 2</b></p> <p>Grado  Nombre (s)  Apellido paterno  Apellido materno</p>	<p>Doctor  Benito  Estrada  Mena</p>
<p><b>5. Datos del sinodal 3</b></p> <p>Grado  Nombre (s)  Apellido paterno  Apellido materno</p>	<p>Doctora  Mónica  Viveros  Rogel</p>
<p><b>6. Datos del sinodal 4</b></p> <p>Grado  Nombre (s)  Apellido paterno  Apellido materno</p>	<p>Doctora  Evelyn  Rivera  Toledo</p>
<p><b>7. Datos del trabajo escrito</b></p> <p>Título    Número de páginas  Año</p>	<p>Análisis de la actividad transcripcional del VIH-1 en sincicios de células T CD4<sup>+</sup>    90  2015</p>

*Para mis padres, quienes gracias al apoyo y a la educación que me brindaron he podido vencer los obstáculos de la vida.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi mamá, por sus consejos y su apoyo incondicional.

A mi papá, porque a pesar de mi cambio de decisión siguió apoyándome en mi trayectoria universitaria.

A mis hermanos, a quienes admiro y son un gran ejemplo para mí.

A Luis, por su compañía y apoyo.

A mi tutora la Dra. Leonor Huerta, por mostrarme el camino hacia la investigación.

A Andrea Cetina, por haberme enseñado las técnicas básicas para mi tesis y haber sido una excelente compañera de trabajo.

A Ricardo Hernández Ávila, por apoyarme en el trabajo del laboratorio siempre que lo necesitaba.

A Carlos Castellanos, por su disposición de enseñarme a utilizar la citometría de flujo.

A mi segunda casa, la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), donde no solo me desarrollé académicamente si no también personal y deportivamente.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) por abrirme las puertas a la investigación.

Al Doctor Carlos Larralde, por la beca otorgada a través del Sistema Nacional de Investigadores (SNI).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), a través del proyecto CB-2010 152946.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), a través del proyecto PAPIIT IA200414.

“Un hecho no se convierte en realidad más que por el significado y la importancia que nosotros le damos.”

-Michael Ende

## ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABREVIATURAS.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
I. ANTECEDENTES.....	6
II. ANTECEDENTES DIRECTOS.....	22
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	25
IV. HIPÓTESIS.....	25
V. OBJETIVOS.....	25
VI. METODOLOGÍA.....	26
VII. RESULTADOS.....	35
VIII. DISCUSIÓN.....	65
IX. CONCLUSIONES.....	72
X. ANÉXOS.....	73
XI. REFERENCIAS.....	77

## RESUMEN

De una forma análoga a la fusión virus-célula, las células infectadas con el VIH tienen la capacidad de fusionarse con células no infectadas, formando sincicios, los cuales son células gigantes multinucleadas que se han observado en tejidos de pacientes infectados con el VIH. La importancia de la formación de sincicios es aún desconocida, aunque se ha encontrado una relación entre su formación, la disminución de células T CD4<sup>+</sup> y la progresión al SIDA.

Se analizó la actividad transcripcional del VIH-1 en sincicios de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, mediante el uso de la línea celular reportera JLTRG transfectada con el gen *gfp* acoplado a la secuencia TAR bajo el control de la LTR viral.

Se determinaron los niveles de expresión de los receptores CD4 y CXCR4, así como el nivel de infección del VIH-1 y la detección de sincicios por el microscopio invertido. Para titular la concentración de virus se utilizó una metodología que se basa en el uso de este tipo de células reporteras. La infección de las células se confirmó mediante la coexpresión de GFP y p24 intracelular. Por último, se estableció un protocolo para inducir la formación de sincicios y su detección por citometría de flujo mediante el uso de fluorocromos lipofílicos. Se observó que los sincicios formados presentaron un incremento de la actividad transcripcional de la LTR viral.

Este trabajo establece las bases para el análisis de la actividad transcripcional del VIH-1 en sincicios mediante el uso de la línea celular reportera JLTRG y la citometría de flujo.

## ABREVIATURAS

VIH-1/-2: Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1/tipo 2

VIS: Virus de la Inmunodeficiencia Simia

SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

ARN: ácido ribonucleico

ADN: ácido desoxirribonucleico

TR: transcriptasa reversa

LTR: repeticiones largas de los extremos

TAR: región de la respuesta transactivadora

RRE: elemento de respuesta a Rev

ARN<sub>m</sub>: ácido ribonucleico mensajero

RTC: complejo de la retrotranscripción

IN: integrasa

PR: proteasa

MA: matriz

CA: cápside

PIC: complejo de preintegración

LFA: antígeno de función del leucocito

ICAM: molécula de adhesión intercelular

IL: interleucina

TNF: factor de necrosis tumoral

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad

FRET: transferencia de energía entre fluorocromos

GFP: proteína verde fluorescente

UI/ml: unidades infecciosas por mililitro

SFB: suero fetal bovino

PBS: buffer fosfato salino

FACS: por sus siglas en ingles *Fluorescence-activated cell sorting*

PFA: paraformaldehído

HR1/HR2: repetición heptad 1/repetición heptad 2

NMWL: límite de peso molecular nominal

APC: alofocianina

IMF: intensidad media de fluorescencia

PE: ficoeritrina

MOI: por sus siglas en ingles *Multiplicity of infection*

h.p.i.: horas post-infección

## INTRODUCCIÓN

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) pertenece al género *Lentivirus* de la familia Retroviridae, la cual se caracteriza por la transcripción del genoma viral de ARN a ADN dentro de la célula, a través de la enzima viral transcriptasa reversa (TR), y su inserción al genoma celular (revisado en Levy, 2008). Este virus provoca una infección crónica en el hospedero que gradualmente afectará a su sistema inmune provocando el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) (revisado en Strauss y Strauss, 2008). En 2013, cerca de 35.3 (32.2-38.8) millones de personas estaban infectadas con el VIH (UNAIDS, 2013). La dificultad de erradicar completamente al VIH del hospedero se debe principalmente a que la TR es muy propensa a cometer errores provocando mutaciones que confieren la capacidad de evasión a la respuesta inmune, al desarrollo de resistencia a los antirretrovirales y a la producción de cepas con mayor virulencia y replicación (Granados *et al.*, 2009; revisado en Faye, 2001 y Levy, 2008). Esta evasión se puede deber a la recombinación durante la transcripción reversa de las dos hebras de ARN del VIH (Josefsson *et al.*, 2011) o también por la generación de reservorios virales desde etapas muy tempranas de la infección. Las células T CD4<sup>+</sup> de memoria infectadas latentemente son el principal reservorio viral y representan uno de los mayores obstáculos para eliminar la infección, pues presentan una alta resistencia a las terapias antirretrovirales (revisado en Pierson *et al.*, 2000).

El principal blanco del VIH son las células T CD4<sup>+</sup> y los macrófagos, aunque en las células T la infección es más eficiente debido a que la célula puede estar activada, provocando su muerte y llevando a una citopatología extensa, o incluso mantenerse latente en células T de memoria (revisado en Strauss y Strauss, 2008).

La infección de las células inicia con el proceso de fusión de las membranas viral y celular. El virus se aproxima a la célula y hay una interacción de la proteína viral de envoltura gp120 con la molécula de superficie celular CD4 causando un cambio conformacional en gp120. Subsecuentemente, ésta proteína se une al correceptor CXCR4 (revisado en Tamamis y Floudas, 2013) o CCR5 (Cormier *et al.*, 2000). El reconocimiento molecular de los correceptores lleva a una serie de cambios conformacionales y a la exposición de la proteína de envoltura gp41, formándose un dominio de fusión (revisado en Carrasco, 2004 y Levy, 2008). Este proceso provoca la interacción de las capas externas de las membranas lipídicas viral y celular, formándose el poro de fusión y la fusión completa de las membranas, concluyendo con la entrada de la cápside viral al citoplasma (revisado en Huerta *et al.*, 2002, Levy, 2008, Murakami *et al.*, 2004 y Strauss y Strauss, 2008).

De las consecuencias producidas por la infección, se encuentran la muerte celular, la toxicidad directa del VIH y de sus proteínas, la apoptosis, la activación celular, la inducción de muerte celular por superantígenos y la formación de sincicios (revisado en Levy, 2008).

La formación de sincicios se plantea como una forma análoga a la fusión virus-célula, las células infectadas con el VIH tienen la capacidad de fusionarse con células no infectadas, formando sincicios, los cuales son células gigantes multinucleadas (también llamadas policariontes) que se han observado en biopsias de tejido linfoide (Rinfret *et al.*, 1991) y en tejidos obtenidos *post mortem* de cerebro (Teo *et al.*, 1997), médula espinal (Eilbott *et al.*, 1989) y pulmón (Donaldson *et al.*, 1994) de pacientes asintomáticos infectados con el VIH o con SIDA (revisado en Teo *et al.*, 1997), aunque en su mayoría son detectados solo en la etapa tardía del SIDA. El papel de la formación de sincicios en la patogénesis del SIDA es aún desconocido, aunque se ha encontrado una relación entre su formación, la disminución de células T CD4<sup>+</sup> y la progresión al SIDA (Blaak *et al.*, 2000; Connor *et al.*, 1993; Tersmette *et al.*, 1989).

Posibles consecuencias de la formación de sincicios son muerte celular *in vitro*, la disminución de células T en sangre, la función como reservorios virales, la recombinación viral, la formación de heterocariontes (modificación del fenotipo celular), y el aumento de la replicación viral (revisado en Huerta *et al.*, 2009).

De acuerdo con estudios previos, sólo se ha reportado que la actividad transcripcional del VIH en sincicios aumenta (Chowdhury *et al.*, 1992), aunque la heterogeneidad de los sincicios (López *et al.*, 2007) puede llevar a una diferencia en esta actividad, de manera que se pueden tener sincicios que producen alta cantidad de virus o incluso podría haber sincicios que presenten una latencia viral, y de manera análoga, se ha encontrado que las células individuales infectadas en estado latente son resistentes a terapias antirretrovirales, lo que lleva a que la infección se mantenga crónica (Zhang *et al.*, 1999).

Este proyecto se basa principalmente en describir cómo es la actividad transcripcional del VIH-1 en sincicios de células T CD4<sup>+</sup>, de manera que se estableció un protocolo para el análisis *in vitro* de la actividad transcripcional del VIH-1 en sincicios de linfocitos T CD4<sup>+</sup>/CXCR4<sup>+</sup>, mediante el uso de la línea celular reportera JLTRG; línea estable transfectada con el gen de la proteína GFP acoplado a la secuencia TAR bajo el control de la LTR viral, y su expresión es dependiente de la proteína viral Tat.

Previamente, se determinaron los niveles de expresión de los receptores CD4 y CXCR4 en la línea celular JLTRG, así como el nivel de infección del VIH-1 y la detección de sincicios por el microscopio invertido. Para titular la concentración de virus se utilizó una metodología que se basa en el uso de este tipo de células reporteras. La infección de las células se confirmó mediante la coexpresión de GFP y p24 intracelular. Por último, se estableció un protocolo para inducir la formación de sincicios y su detección por citometría de flujo mediante el uso de fluorocromos lipofílicos. Se confirmó la presencia de sincicios por citometría de flujo cuando presentaron fluorescencia mixta, GFP, FRET y un aumento en el tamaño y la granularidad celular.

Este trabajo establece las bases para el análisis de la actividad transcripcional del VIH-1 en sincicios mediante el uso de la línea celular reportera JLTRG y la citometría de flujo.

## I. ANTECEDENTES

### I.1 El virus de la inmunodeficiencia humana y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida

#### I.1.1 Generalidades del VIH y del SIDA

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), identificado por primera vez en 1983, es el agente causal del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) perteneciente al género *Lentivirus* de la familia *Retroviridae*, la cual presenta la característica de transcribir el genoma de ARN a ADN dentro de la célula a través de la enzima viral transcriptasa reversa (TR) (revisado en Levy, 2008).

Existen dos tipos de VIH en humanos, el VIH-1 y el VIH-2, los cuales se sugiere que originaron de diferentes virus de inmunodeficiencia simia (VIS): el VIH-1 se originó del VIS<sub>cps</sub> (chimpancé) y el VIH-2 del VIS<sub>simm</sub> (mangabey ahumado) (revisado en Strauss y Strauss, 2008). Sus estructuras genómicas son similares, pero pueden ser distinguidas por su secuencia particularmente de la glicoproteína de envoltura (revisado en Levy, 2008). Ambos virus provocan una infección crónica en el hospedero que gradualmente afectará a su sistema inmune causando el SIDA (revisado en Strauss y Strauss, 2008).

Con base en el genoma viral completo, actualmente existen cuatro grupos de VIH-1 llamados M, O, N y P, y ocho grupos de VIH-2 (de la A a la H). Del grupo M se han reconocido nueve subtipos y son nombrados de la A a la D, de la F a la H, J y K; del grupo O se han identificado algunos subtipos y muy pocos del grupo N (revisado en Levy, 2008). El grupo P es el descrito más recientemente en el 2009. Fue aislado en una mujer de Camerún y está más relacionado con una cepa del virus de inmunodeficiencia del gorila (Plantier *et al.*, 2009). Aún no se ha identificado algún subtipo del VIH-2.

El VIH presenta una alta tasa de mutación debido a que la TR es muy propensa a cometer errores, lo que le permite al virus evadir la respuesta inmune del hospedero, desarrollar resistencia a los antirretrovirales, así como favorecer la producción de cepas con mayor virulencia y una replicación más rápida (Granados *et al.*, 2009; revisado en Faye, 2001; y en Levy, 2008). Esta evasión se puede deber también a la recombinación durante la transcripción reversa de las dos hebras de ARN del VIH-1, las cuales tienen que ser genéticamente diferentes para generar un ADN viral híbrido. Los viriones con dos hebras de ARN genéticamente distintas se generan cuando la célula se infecta por dos o más virus genéticamente distintos. Se ha observado que la mayoría de las células T CD4<sup>+</sup> (una de las células blanco del VIH-1) de pacientes infectados contienen solo una copia de ADN del VIH-1, esto indicaría un limitado potencial de recombinación (Josefsson *et al.*, 2011).

El VIH presenta un marcado tropismo hacia macrófagos y células T CD4<sup>+</sup>, aunque la infección en éstas últimas es más eficiente debido a que la célula T puede estar activada, provocando su muerte y llevando a una citopatología extensa, o incluso mantenerse latente en células T de memoria (revisado en Strauss y Strauss, 2008).

El curso de la infección por el VIH comienza con una infección aguda que se caracteriza por una disminución de la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, una respuesta inmune por parte de las células T CD8<sup>+</sup> y una producción de anticuerpos, restringiendo así la replicación viral y reduciendo la carga viral en la sangre sin poder eliminar completamente al virus e impidiendo que el número de células T CD4<sup>+</sup> alcance los niveles de preinfección (revisado en Pantaleo y Fauci, 1996). La disminución de células T CD4<sup>+</sup> puede deberse a mecanismos como son la lisis por la salida de viriones, destrucción de las células por linfocitos CD8<sup>+</sup> y activación de complemento (revisado en Flint *et al.*, 2004). La siguiente fase es una infección crónica, durante la cual el virus continúa replicándose activamente, especialmente en los ganglios linfáticos asociados a intestino (GALT por sus siglas en inglés, *Gut-Associated Lymphoid Tissue*) los cuales también actúan como reservorios virales mientras el sistema inmune continúa combatiendo la infección (Anton *et al.*, 2003; revisado en Pantaleo y Fauci, 1996). Durante esta fase, la replicación del virus provoca una disminución constante en el número de células T CD4<sup>+</sup> y mutaciones continuas del virus (revisado en Strauss y Strauss, 2008). Por último la infección crónica progresa al SIDA, la cual se caracteriza por una disminución notable en la población de células T CD4<sup>+</sup> (menos de 200 células/ $\mu$ l) incapaz de establecer una respuesta inmune que controle la replicación del VIH (revisado en Levy, 2008; y en Strauss y Strauss, 2008), además se presenta una alta probabilidad de infecciones oportunistas, particularmente neumonía por *Pneumocystis jirovecii (carinii)*, aparición de tumores malignos (como sarcoma de Kaposi y linfoma de células B) y alteraciones en las funciones inmune, neurológica y gastrointestinal. El tiempo de progresión al SIDA es variado aunque el promedio es de 10 años en pacientes que no reciben tratamiento antirretroviral (revisado en Levy, 2008) (**figura 1**).

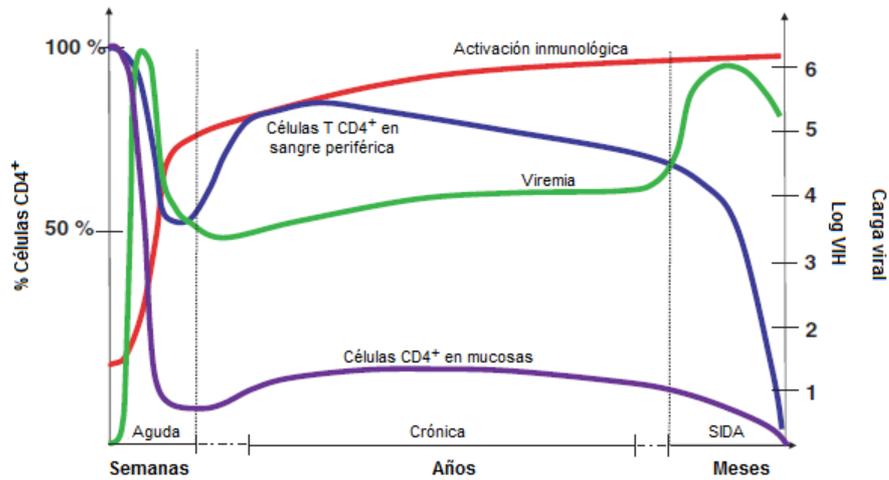


Figura 1. **Curso de la infección del VIH y su progresión al SIDA.** Porcentajes de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (en mucosas y sangre periférica) y nivel de virus en circulación (viremia) durante el curso de la infección. En cada etapa se muestra el tiempo de duración. Ilustración tomada y modificada de Grossman *et al.*, 2006.

### I.1.2 Estructura y genoma del VIH

El virión del VIH mide cerca de 100 a 120 nm de diámetro. Los virus infecciosos presentan una envoltura compuesta de una bicapa lipídica con numerosas espículas (complejo glicoproteico Env), proteínas reguladoras, estructurales y accesorias (revisado en Levy, 2008; y en Flint *et al.*, 2004). En la **figura 2** se observa la estructura de un virión y su mapa genómico.

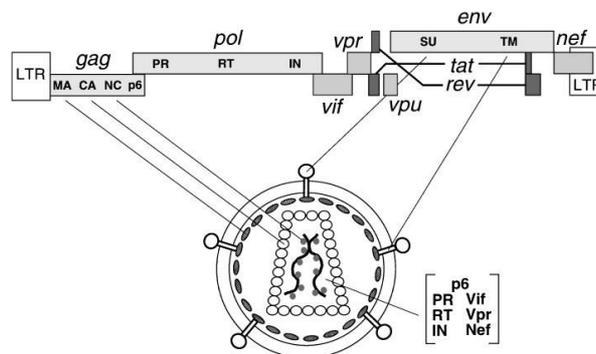


Figura 2. **Organización del mapa genómico y del virión del VIH-1.** Ilustración tomada de Frankel y Young, 1998.

El VIH-1 presenta dos copias de ARN monocatenario de 9.2 kb con sitios de lectura abiertos que se codifican para varias proteínas virales. Cuando el ARN viral se retrotranscribe a ADN y se integra al genoma de la célula se convierte en un provirus, el cual está delimitado en ambos extremos por las secuencias de nucleótidos denominadas LTR (por sus siglas en inglés *long terminal repeat*). Las LTR se han dividido en tres regiones funcionales U3, R y U5 (**figura 3**). La región R contiene a la secuencia que codifica para TAR, la cual es parte de los ARNs virales nacientes a los que se les une la proteína viral Tat para hacer eficiente la actividad de la ARN polimerasa II ayudando a la iniciación de la transcripción y a la elongación. La región U5 contiene sitios de unión para factores de transcripción y la región U3 contiene a la región promotora, sitios de unión para factores de transcripción y una región modulable por diversos factores de transcripción (revisado en Hernández, 2011).

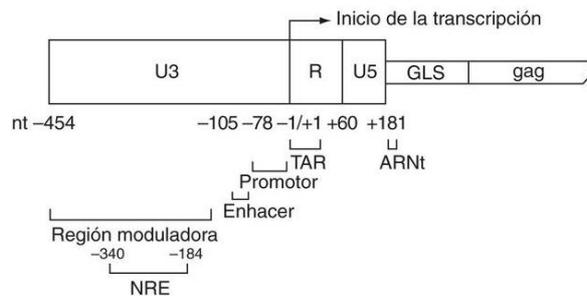


Figura 3. Estructura de la LTR en el VIH-1 y secuencia **leader gag (GLS)**. Se indican los pares de bases y posiciones que comprende cada región y el inicio de la transcripción. Ilustración tomada de Ramírez *et al.*, 2005.

Entre las LTR se encuentran los genes virales *gag*, *pol* y *env*. *Gag* y *pol* codifican para las proteínas estructurales y enzimas utilizadas en el ciclo replicativo, respectivamente. *Env* codifica para las proteínas de la envoltura (gp120 y gp41) implicadas en el reconocimiento y la fusión del virus con la célula blanco, los genes *tat* y *rev* codifican para proteínas que regulan la replicación viral. Por último los genes *nef*, *vif*, *vpr* y *vpu* codifican para proteínas accesorias implicadas en la modulación de la replicación viral; *tat*, *rev* y *nef* son los primeros genes en transcribirse (revisado en Flint *et al.*, 2004; en Hernández, 2011; y en Huerta *et al.*, 2009). En la **tabla I.1** se muestran las proteínas virales y sus funciones principales.

El transcrito primario del VIH es un ARNm que presenta procesos de escisión y empalme para producir diversos ARNm subgenómicos responsables de la síntesis de las proteínas virales (revisado en Levy, 2008).

Tabla I.1 Proteínas del VIH y sus funciones

Proteínas	Nomenclatura y tamaño (kDa) <sup>a</sup>	Función
Gag	p24	Cápside, proteína estructural
	p17	Proteína de la matriz, miristilada
	p7	Proteína de la nucleocápside; ayuda a la transcripción reversa
	p6	Papel en la gemación (dominio L)
Polimerasa	p66, p51	Transcriptasa reversa: ARNasa H -interior de la cápside
Proteasa	p10	Procesamiento postraducciona de proteínas virales
Integrasa	p32	Integración del ADNc viral
Envoltura	gp120	Superficie <sup>b</sup> de la proteína de la envoltura
	gp41	Proteína transmembranal <sup>c</sup> de la envoltura
Tat <sup>b</sup>	p14	Transactivación
Rev <sup>b</sup>	p19	Regulación de la expresión de ARNm viral
Nef	p27	Pleiotrópico, puede incrementar o disminuir la replicación del virus
		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
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>b,c</sup>	p16	Ayuda en la liberación del virus, interrumpe los complejos gp160:CD4 y degradación de CD4 <sup>e</sup>
Vpx <sup>d</sup>	p15	Ayuda en la entrada y la infectividad
Tev <sup>b</sup>	p26	Actividades Tat/Rev

Cuadro tomado y modificado de Levy, 2008.

<sup>a</sup> Los números designan tamaño en kDa.

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

<sup>c</sup> Sólo está presente con VIH-1

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

<sup>e</sup> (revisado en Flint *et al.*, 2004)

### I.1.3 Ciclo replicativo viral

Los virus envueltos, como el VIH, entran a las células después de su unión y fusión de las membranas celular y viral (**figura 4**). En términos generales, la partícula viral infecciosa se une a la célula blanco mediante la unión de la proteína de envoltura gp120 a un receptor de superficie (CD4 o algún receptor alternativo), esto lleva a un cambio conformacional en gp120 que provoca la unión con un correceptor (CXCR4,

CCR5 u otros receptores). Posterior a estas uniones y cambios conformacionales, hay una interacción del dominio de fusión de gp41 con el receptor de fusión en la superficie celular, induciendo la fusión de las membranas celular y viral permitiendo así la entrada del complejo de la retrotranscripción (CRT) al citoplasma, compuesto del ARN asociado a proteínas virales (TR, IN, PR, Nef, MA, CA, Vif y proteínas celulares acarreadas). El CRT es acarreado hasta la periferia del núcleo mediante su interacción con proteínas del citoesqueleto. Como siguiente paso, ocurre la iniciación de la retrotranscripción del genoma viral a una doble cadena de ADN y es hasta que esta retrotranscripción se completa, cuando la cápside se desensambla. Posterior a la descapsidación, se forma el complejo de preintegración (PIC), el cual es el ADN viral asociado con las proteínas TR, IN, Vpr, MA y CA. El PIC logra entrar al núcleo gracias a sus interacciones con proteínas celulares, posteriormente la proteína viral IN integra el ADN viral al genoma de la célula, convirtiéndose en un provirus, con el cual la infección se vuelve permanente y el provirus se puede mantener latente. A partir del provirus se generan los ARNm que se traducen en todas las proteínas y nuevos ARN genómicos virales (revisado en Faye, 2001; y en Hernández, 2011).

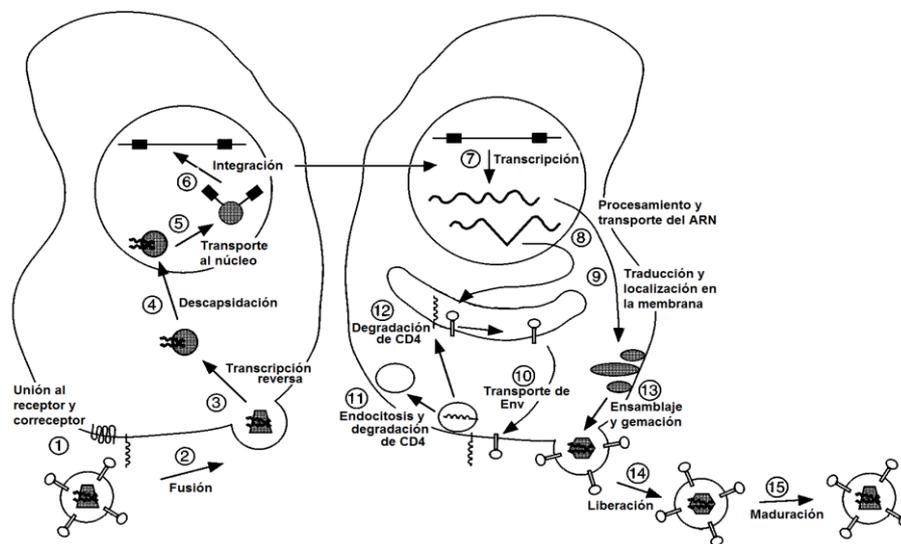


Figura 4. Ciclo de replicación del VIH-1. Ilustración tomada y modificada de Frankel y Young, 1998.

Una vez que se ha dado la integración, al igual que el genoma del hospedero, el provirus interacciona con las proteínas nucleares, lo que permite que sea un gen

inducible que es afectado por señales de activación o represión. La transcripción comienza cuando la proteína reguladora conocida como NF- $\kappa$ B/Rel se une a los LTR del provirus para activar a la ARN polimerasa II y causar la transcripción del provirus a ARN (revisado en Faye, 2001; y en Hernández, 2011).

Después de que el ADN proviral hizo copias complementarias de ARN, ésta cadena será convertida en ARNm para sintetizar proteínas de regulación necesarias para la producción del VIH. Otras cadenas de ARN formaran el genoma viral. Tanto los ARNm como el ARN que conformarán el genoma viral migrarán hacia el citoplasma, donde se sintetizarán las proteínas y se ensamblará el virión envolviendo a su genoma. Por último, el virión saldrá a través de la membrana celular con la incorporación de los complejos glicoproteicos Env y otras proteínas presentes en la superficie celular (revisado en Faye, 2001). Posterior a la liberación, los viriones van madurando mediante escisiones proteolíticas de las poliproteínas Gag y Gag-Pol (Wieggers *et al.*, 1998). Los viriones inmaduros que son liberados tienen baja capacidad de fusionarse con células blanco, y se ha encontrado que el procesamiento de la proteína Gag y su desunión de gp41, libera el impedimento de la fusión (Murakami *et al.*, 2004; Wyma *et al.*, 2000).

La expresión del receptor CD4 se reduce generalmente después de que ha ocurrido una replicación viral y su restauración puede ocurrir con una reducción de la producción del VIH-1 por un inhibidor de Tat o por respuestas anti-VIH mediadas por células T CD8<sup>+</sup>. Se sabe que CD4 no necesariamente se internaliza durante la infección y no está claro el(los) mecanismo(s) involucrado(s) en la expresión alterada de este receptor de superficie, algunos de estos mecanismos que modulan a la proteína CD4 son su asociación con gp160 en el retículo endoplásmico, disociación del complejo CD4:gp160, degradación de CD4 por Vpu, modulación negativa por Nef (degradación de CD4 en lisosomas), bloqueo de la transcripción y traducción del ARNm de CD4, enmascaramiento por gp120 y remoción de CD4 de la superficie celular por viriones en replicación (revisado en Levy, 2008).

#### **I.1.4 Sinapsis virológica**

Además de entrar a las células como partículas infecciosas libres, el VIH puede transmitirse durante el contacto célula a célula (**figura 5**). La sinapsis virológica provee una transferencia segura y eficiente de las partículas virales desde una célula infectada a una no infectada, en este proceso las membranas celulares pueden llegar a fusionarse, produciendo sincicios (Chen *et al.*, 2007; Jolly *et al.*, 2004).

El VIH se puede unir a muchos tipos celulares utilizando receptores específicos de la superficie celular (p.e., DC-SIGN) o a través de la unión de complejos inmunes del VIH a receptores celulares (p.e., CD21 y CD35), transfiriendo el virus a las células blanco susceptibles, como las células T CD4<sup>+</sup> a través de uniones célula-célula o a través de lectinas de tipo C. El virus unido a estas células no infectadas puede ser más estable e infeccioso que el virus sin células (revisado en Levy, 2008). Un ejemplo de la transferencia del virus por un contacto célula-célula, es la propuesta de que los linfocitos CD4<sup>+</sup> se infectan en cuanto tienen contacto con las células dendríticas foliculares durante su paso a través de los centros germinales linfoides. Resultando en una infección constante de células T, y su eventual disminución. Estas células T que están infectadas, posteriormente se vuelven circulantes y pueden diseminar la infección de forma sistémica (Bhoopat *et al.*, 2006).

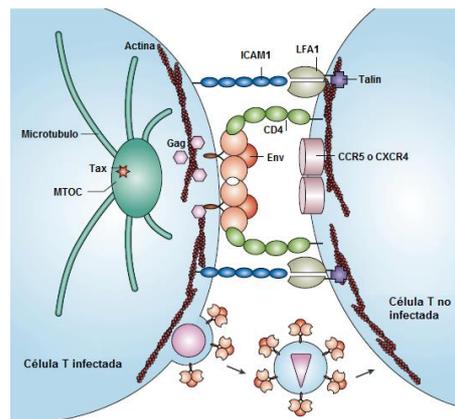


Figura 5. **Sinapsis virológica.** Ilustración tomada y modificada de Sattentau, 2008.

La interacción de moléculas de adhesión también es importante en la sinapsis virológica. Durante la liberación de los viriones, la molécula ICAM-1 es incorporada a la membrana viral a través de interacciones con la proteína Pr55 Gag. ICAM-1 interacciona con LFA-1, la cual está presente en la célula blanco. Esta interacción puede incrementar la infección, diseminación y la formación de sincicios (Jolly *et al.*, 2004; revisado en Levy, 2008).

## I.2 Fusión virus-célula

### I.2.1 Componentes principales de la fusión virus-célula

Las proteínas de la envoltura se derivan de una glicoproteína precursora de 160 kDa, gp160, la cual es procesada en el aparato de Golgi, donde se le adicionan cadenas ricas en azúcares. El corte proteolítico de la gp160 se lleva a cabo a través de la endoproteasa celular furina durante su transporte a la membrana celular, generando la forma madura de la proteína superficial externa gp120 y la proteína transmembranal gp41, las cuales están asociadas a través de interacciones no covalentes. La proteína viral gp120 contiene el(los) sitio(s) para el acoplamiento del(los) receptor(es) celular(es) y los principales dominios de los anticuerpos neutralizantes. Tanto la gp120 como la gp41 presentan una gran variabilidad en la secuencia primaria entre los diferentes subtipos del VIH-1 (Chertova *et al.*, 2002; Granados *et al.*, 2009; revisado en Levy, 2008).

La membrana viral contiene de 7 a 14 espículas o complejos glicoproteicos Env (gp120/gp41), y cada espícula está formada por tres moléculas de gp120 y tres de gp41. En el virión maduro del VIH-1, gp120 y gp41 actúan en conjunto para catalizar la fusión entre las membranas del virus y de la célula blanco, resultando en la liberación de la cápside viral en el citoplasma (Chertova *et al.*, 2002; Murakami *et al.*, 2004).

La molécula CD4, el receptor primario para el VIH-1, está compuesta por un segmento transmembranal que se une a un segmento largo extracelular y a una cola corta citoplásmica. La parte extracelular está compuesta de cuatro regiones con dominio de inmunoglobulina (D1 a D4) (**figura 6**) (revisado en Harrison, 1993).

La gp120 está compuesta por 5 regiones variables (V1 a V5) y 5 regiones constantes (C1 a C5) (revisado en Granados *et al.*, 2009). Su estructura tridimensional se ha dividido en región interna, hoja puente y región externa. La región interna se une a otras proteínas gp120 y la hoja puente sirve de unión de la región interna con la región externa (**figura 6**). La estructura conformacional del complejo glicoproteico de envoltura, en particular de gp120, es importante para la unión de CD4, ya que pequeños cambios en la proteína, como el patrón de glicosilación, pueden afectar la unión del virus a la molécula CD4 así como el tropismo (revisado en Hernández, 2011; y en Levy, 2008).

Además de la unión del virus con el receptor CD4, este último presenta cambios conformacionales que ayudan a la entrada del VIH a través de interacciones más efectivas con correceptores en la superficie celular. También activa vías de señalización y la subsecuente expresión de citocinas y quimiocinas que pueden influir en el proceso de la infección (revisado en Levy, 2008).

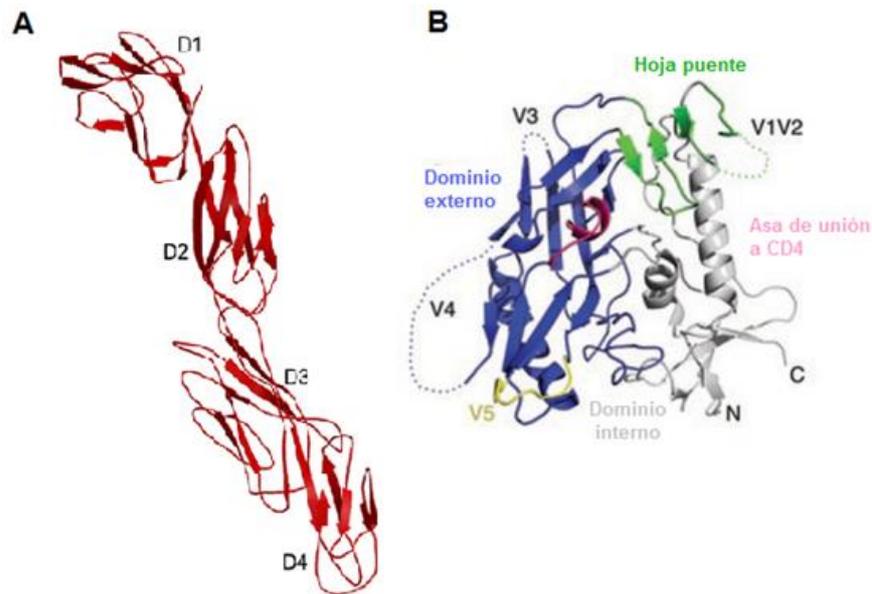


Figura 6. Estructuras tridimensionales de las proteínas CD4 y gp120. (A) Receptor celular CD4 con sus cuatro dominios extracelulares (D1 a D4). Ilustración tomada y modificada de Li *et al.*, 2010. (B) Proteína de envoltura gp120 con sus cinco regiones variables (las regiones constantes fueron deletadas para facilitar la cristalización de la parte central de la molécula). Ilustración tomada y modificada de Diskin *et al.*, 2010.

La interacción del virus con correceptores permite un mayor acercamiento de la envoltura viral a la membrana celular, produciendo más interacciones y cambios conformacionales. El virus utiliza distintos correceptores dependiendo del tipo celular; la línea de macrófagos y células T activadas y de memoria presentan un receptor para  $\beta$  quimiocinas llamado CCR5 y la línea de células T vírgenes y un subconjunto de células T de memoria presentan un receptor llamado CXCR4 para  $\alpha$  quimiocinas. La necesidad de diferentes correceptores se debe a mutaciones en la proteína gp120 de la superficie del VIH. El requerimiento de un correceptor tiene importantes implicaciones patológicas del VIH (revisado en Davenport *et al.*, 2002; en Levy, 2008; y en Strauss y Strauss, 2008).

Existen dos tipos de virus que pueden distinguirse por el tipo de correceptor que reconocen, R5 para el correceptor CCR5 y X4 para el correceptor CXCR4. También se han identificado aislados del VIH con tropismo dual (R5/X4), que son tanto macrófago-trópicos como trópicos hacia líneas celulares T, y pueden usar cualquiera de los dos correceptores dependiendo de su densidad relativa en la célula (revisado en Levy, 2008).

Estudios del curso natural de la infección del VIH sugieren que los virus R5 dominan las etapas tempranas de la infección, durante la cual se ha observado una alta producción viral que se atribuye a que las células T de memoria presentan una alta tasa de división celular. Los virus X4 al tener un tropismo hacia células T vírgenes, las cuales

presentan una baja tasa de división celular, no tienen una producción viral significativa en las etapas tempranas, pero se ha observado que su división celular en la etapa tardía de la infección aumenta volviéndose más significativa la infección por los virus X4 en esta etapa, además están asociados con la disminución de las células T CD4<sup>+</sup> y la progresión al SIDA (revisado en Davenport *et al.*, 2002).

Además de los correceptores, la célula blanco presenta moléculas de adhesión que mejoran significativamente la infectividad del virus, y que son incorporadas en la envoltura del VIH-1, como son MHC, LFA-1 $\alpha$  e ICAM-1, -2, -3 (revisado en Huerta *et al.*, 2002; y en Levy, 2008). En la **figura 7** se muestran los principales componentes de la interacción virus-célula.

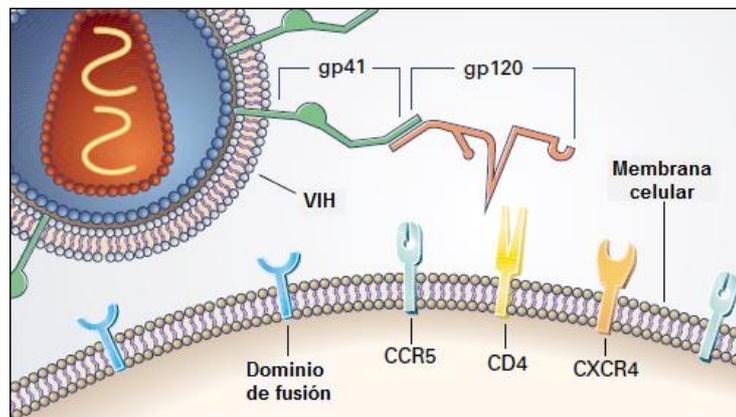


Figura 7. Componentes principales de la interacción virus-célula. Ilustración tomada y modificada de Levy, 1996.

### I.2.2 Eventos de la fusión virus-célula

Como inicio del proceso de fusión, el virus se aproxima a la célula y hay una interacción de la región C4 de la proteína de superficie gp120 con el dominio D1 de la molécula de superficie celular CD4. Cuando la proteína gp120 interactúa con CD4 causa un cambio conformacional en gp120 que aumenta la exposición del tercer asa de la región variable (V3). Subsecuentemente, la proteína gp120 a través de su asa V3 se une al dominio amino-terminal del segundo asa extracelular (ECL2) de CXCR4 (revisado en Tamamis y Floudas, 2013) (**figura 8**). En el caso del correceptor CCR5, el asa V3 se une al dominio amino terminal de la primera región extracelular (Cormier *et al.*, 2000).

El reconocimiento molecular de los receptores de quimiocina por el asa V3 lleva a una serie de cambios conformacionales y a la exposición de la proteína transmembranal gp41, formándose en el extremo amino terminal un ectodominio (o dominio de fusión) en bucle de seis hélices (6HB) que se une a un péptido de fusión en la superficie celular (revisado en Carrasco, 2004; y en Levy, 2008) (**figura 8**). A este proceso le podría seguir un cambio conformacional en CD4, así como una disociación de gp120 de la superficie del virión, ocasionando la mezcla de las capas externas de las membranas lipídicas viral y celular, proceso llamado hemifusión. Posteriormente, se forma el poro de fusión y la mezcla completa de las membranas viral y celular. Este proceso de fusión concluye con la entrada de la cápside viral al citoplasma (revisado en Huerta *et al.*, 2002; en Levy, 2008; en Murakami *et al.*, 2004; y en Strauss y Strauss, 2008) (**figura 9**).

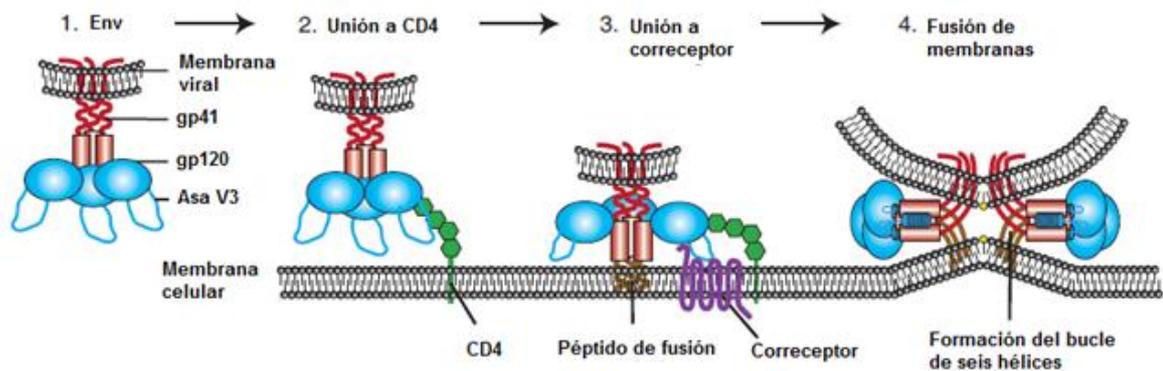


Figura 8. Inicio de la fusión virus-célula. Pasos iniciales previos a la fusión de membranas viral y celular. Ilustración tomada y modificada de Wilen *et al.*, 2012.

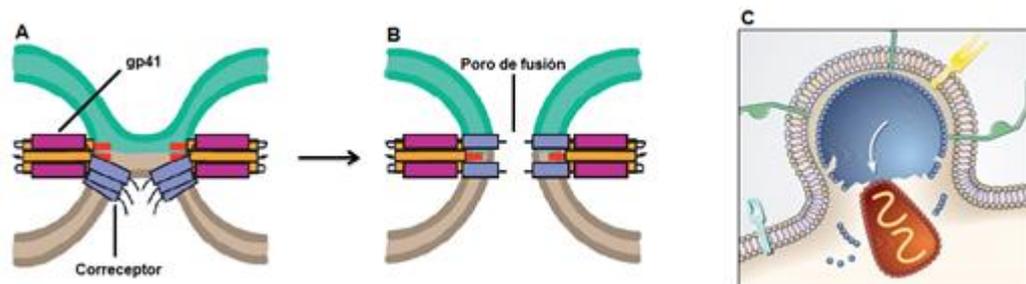


Figura 9. Fusión de membranas viral y celular. (A) Proceso de hemifusión, (B) formación del poro de fusión y (C) entrada de la cápside viral al citoplasma. Ilustraciones tomadas y modificadas de Jardetzky y Lamb, 2004 (A-B) y de Levy, 1996 (C).

### I.3 Formación de sincicios inducida por el VIH

#### I.3.1 Características de los sincicios

Los sincicios son células gigantes multinucleadas o policariontes, y se han observado en biopsias de tejido linfoide (Rinfret *et al.*, 1991) y en tejidos obtenidos *post mortem* de cerebro (Teo *et al.*, 1997) (**figura 10**), medula espinal (Eilbott *et al.*, 1989) y pulmón (Donaldson *et al.*, 1994) de pacientes asintomáticos infectados con el VIH o con SIDA, aunque en su mayoría son detectados sólo en la etapa tardía del SIDA. La importancia de la formación de sincicios en la patogénesis del SIDA es aún desconocida, aunque se ha encontrado una relación entre su formación, la disminución de células T CD4<sup>+</sup> y la progresión al SIDA (Blaak *et al.*, 2000; Connor *et al.*, 1993; Tersmette *et al.*, 1989).

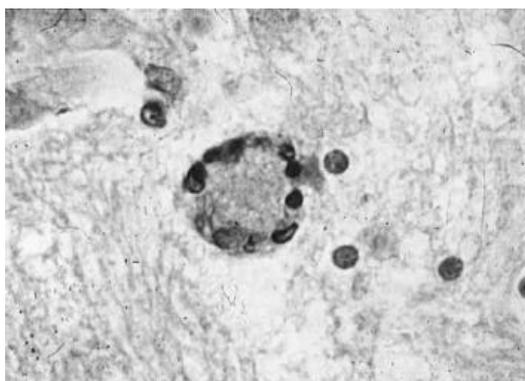


Figura 10. Sincicio en cerebro de paciente con SIDA. Los núcleos se observan como masas densas redondas o alargadas. Tinción de hematoxilina-eosina. Ilustración tomada de Teo *et al.*, 1997.

Los sincicios difieren estructural y funcionalmente (**figura 11**), pueden estar formados por células de origen mieloide (monocitos) y/o linfoide (linfocitos) y se ha propuesto que funcionan como reservorios para el virus. Entre las posibles consecuencias por la formación de sincicios se encuentra la muerte celular *in vitro*, la recombinación del virus a partir de diferentes cepas, el aumento de la replicación viral, la formación de heterocariontes (modificación del fenotipo celular), la disminución de células T en sangre, y la producción de citocinas inflamatorias acompañada con daño tisular (revisado en Huerta *et al.*, 2009).

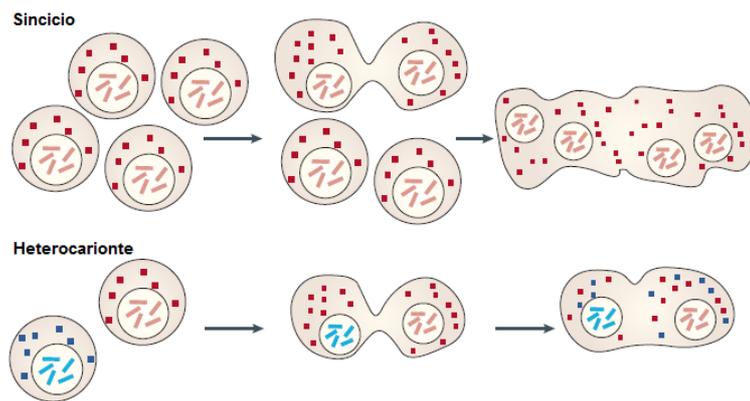


Figura 11. Tipo de célula derivada por la fusión. Células de la misma línea se fusionan para dar lugar a un sincicio o de diferentes líneas que dan lugar a un heterocariote. Ilustración tomada y modificada de Ogle *et al.*, 2005.

Se ha observado que los sincicios llegan a ser viables y funcionales (Rivera *et al.*, 2010), contiene una alta cantidad de material genético y presentan actividad de síntesis del ADN. También, se ha encontrado una reducción del contenido de ADN, llevando a la posibilidad de la producción de sincariones, los cuales son células fusionadas que tienen un núcleo en común y la capacidad de proliferar (revisado en Torres *et al.*, 2010).

Se especula que la supervivencia de los sincicios puede depender de diversos factores, tales como la composición celular y el estado del ciclo celular en el que se encuentren las células participantes al momento de la fusión (Torres *et al.*, 2010).

El tamaño, la complejidad celular y el promedio de composición celular (proporción de CD4<sup>+</sup>/Env<sup>+</sup>) de los sincicios formados *in vitro*, varía en relación al tiempo y a las proporciones iniciales de las células participantes, así como a una amplia heterogeneidad que puede resultar en una variedad de resultados biológicos (López *et al.*, 2007). La mayoría de los sincicios formados contiene pocos núcleos (de dos a cuatro) y presentan un tamaño similar al de las células no fusionadas (López *et al.*, 2007), los cuales *in vivo* podrían entrar a circulación y pasar desapercibidos por técnicas convencionales, como es el marcador CD4 que se ve parcial o totalmente reducido en los sincicios (Rivera *et al.*, 2005).

Se mencionó anteriormente que se distinguen dos tipos de VIH-1 dependiendo del correceptor de quimiocina que utilizan, los R5 y X4. Los primeros además de reconocer al correceptor CCR5 y ser principalmente macrófago-trópicos, no son inductores de sincicios (NSI por sus siglas en inglés, *non-syncytium-inducer*), en cambio los X4 que reconocen al correceptor CXCR4 y ser células T-trópicos son inductores de sincicios (SI por sus siglas en inglés *syncytium-inducer*). También se ha visto que la inducción de

sincicios en las células T está relacionada con mutaciones en las regiones variables 2 y 3 (V2 y V3) de la proteína viral de envoltura gp120, las cuales le confieren una carga neta positiva que favorece la interacción con el correceptor de quimiocina CXCR4 (Locher *et al.*, 2005).

### **I.3.2 Formación de sincicios**

El primer mecanismo que se planteó para la formación de sincicios, involucra la fusión entre células no infectadas con infectadas mediante un mecanismo análogo al de la fusión virus-célula, en donde participa el complejo glicoproteico Env y el receptor celular CD4. Este mecanismo está descrito como “fusión desde adentro”, y es el que presenta una mayor descripción en la literatura. Se refiere a la expresión del complejo glicoproteico de envoltura viral en la superficie de las células infectadas que permite la fusión con células CD4 vecinas no infectadas (Lifson *et al.*, 1986; Sodroski *et al.*, 1986) (**figura 12**).

Actualmente se ha propuesto otro mecanismo por el cual se forman sincicios, conocido como “fusión desde afuera”. Se ha observado que se forman sincicios en ausencia de la replicación del VIH y de la expresión génica, en este caso las partículas virales crean una especie de puente entre dos células no infectadas que promueven su fusión. Otra forma de que se de este mecanismo podría deberse a la fusión de la membrana viral con la membrana celular, que lleva a que el complejo glicoproteico de envoltura viral se difunda libremente en la superficie de la bicapa lipídica de las células blanco provocando la fusión con células CD4, asemejándose al primer mecanismo (Clavel y Charneau, 1994) (**figura 12**).

Está muy bien establecido que la formación de sincicios mediante la sinapsis virológica es muy poco probable debido a que la proteína Env sintetizada es internalizada (endocitosis vía clatrina) en el momento en que llega a la membrana de la célula infectada para remover de la superficie el exceso de esta proteína que no está asociada a la proteína viral Gag, lo que puede prevenir la muerte prematura de la célula infectada por los efectos citopáticos o evadir la respuesta inmune. También puede ser reclutada y empaquetada mediante la interacción del dominio MA de Pr55<sup>Gag</sup> con la cola citoplásmica de gp41 para su incorporación como trímeros de heterodímeros en la superficie de las partículas virales. Este último proceso previene la fusión de la célula infectada con la no infectada, pues la proteína Gag al estar inmadura en la célula infectada reprime la fusión mediante Env, y este impedimento se mantiene hasta que Gag es procesado en los viriones liberados (Blot *et al.*, 2003; Byland *et al.*, 2007; Egan *et al.*, 1996). La

participación de diversos factores celulares también se ha relacionado con la incorporación de Env en los viriones (Murakami *et al.*, 2000). MA es liberada después de que el segmento amino-terminal de Pr55<sup>Gag</sup> es procesado durante la etapa temprana de maduración del VIH-1. MA tiene diversos papeles en el ciclo de vida del virus, uno de ellos es estabilizar la interacción de la glicoproteína gp41 con gp120 e incorporar estas glicoproteínas en las partículas virales nacientes (Davis *et al.*, 2006).

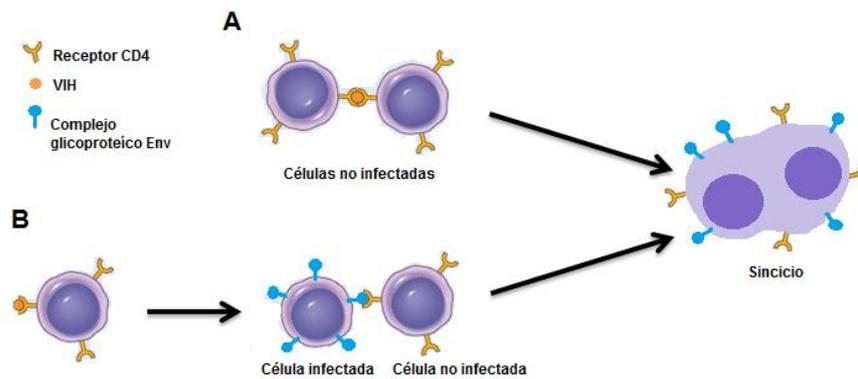


Figura 12. Mecanismos para la formación de sincicios. (A) Fusión desde afuera: un virión del VIH forma una especie de puente entre dos linfocitos CD4<sup>+</sup> no infectados. (B) Fusión desde adentro: infección de un linfocito CD4<sup>+</sup> con el VIH y expresión del complejo Env en su membrana, el cual reconoce al receptor CD4 de un linfocito CD4<sup>+</sup> no infectado. Ambos mecanismos llevan a la formación de sincicios.

Además, durante la sinapsis virológica, se ha encontrado que el VIH-1 coopera con proteínas de la membrana celular llamadas tetraspaninas para prevenir la fusión célula-célula, es decir, estas proteínas tienen un papel de coordinar la fusión y es necesaria la presencia de Gag y el reclutamiento de Env (Weng *et al.*, 2009). También se ha encontrado que las tetraspaninas en células no infectadas inhiben la inducción de la fusión célula-célula por el VIH-1 (Gordon *et al.*, 2006).

En la fusión desde afuera, se ha observado que la inactivación de la proteasa del VIH-1 suprime la habilidad de que los viriones induzcan la fusión célula-célula, sugiriendo que al no procesarse la proteína Gag y mantenerse unida a gp41, esta no puede presentar su cambio conformacional para unirse al receptor CD4, por lo que la fusión se suprime (Murakami *et al.*, 2004).

Además de las interacciones descritas anteriormente, gp120, CD4 y CXCR4, la interacción entre las moléculas de adhesión ICAM-1 y LFA-1 juega un papel importante en la formación de sincicios inducida por el VIH-1 (Barbeau *et al.*, 1998).

## II. ANTECEDENTES DIRECTOS

### II.1 Métodos para la detección de sincicios *in vitro*

Se han desarrollado diversas metodologías para la detección de sincicios y pruebas de inhibidores de fusión. Entre estos métodos se encuentra el uso de líneas celulares genéticamente modificadas que expresan el complejo glicoproteico Env y células blanco CD4<sup>+</sup> para estudiar los mecanismos de la fusión. Otros métodos como la microscopía que sirve, entre otras cosas, para estimar los parámetros cuantitativos de los sincicios formados (número y diversidad), la microscopía de fluorescencia que ayuda a detectar la transferencia de fluorocromos, el ensayo de transferencia de energía entre fluorocromos (FRET), el uso de genes reporteros y la citometría de flujo (revisado en Huerta *et al.*, 2002).

El FRET es un proceso físico dependiente de la distancia entre dos fluorocromos, en la cual un fotón absorbido por el fluorocromo donador puede ser transferido a la energía del fluorocromo aceptor. Esto es posible si el espectro de emisión del donador se traslapa con el espectro de excitación del aceptor, provocando un aumento en la energía del aceptor. El FRET puede ser una medida precisa de la proximidad molecular a distancias angstrom (1-10 nm), y proporciona un medio para detectar la mezcla de lípidos durante la fusión de las membranas (Keller *et al.*, 1977; revisado en Sekar y Periasamy, 2003). En la **figura 13** se muestra como el espectro de emisión y el de excitación de los fluorocromos lipofílicos que se utilizaron para la realización de los experimentos de formación de sincicios se traslapan, indicando que en este ensayo es posible la detección de FRET.

La citometría de flujo es una técnica que se basa en el paso de las células en suspensión a través de un capilar para su análisis individual, a través del cual se incide un haz de luz para medir simultáneamente múltiples características físicas como el tamaño relativo de la célula, la granularidad o complejidad interna, así como la intensidad relativa de fluorescencia. Tiene como base la habilidad de hacer mediciones cuantitativas y multiparamétricas en un número estadísticamente adecuado de células para definir las propiedades de una población celular o de las subpoblaciones que la componen. Para llevar a cabo lo anterior, el aparato necesita de un sistema combinado de flujo, óptica y electrónica. El sistema de flujo introduce y restringe a las células para su análisis individual, el sistema óptico excita a la muestra, y el sistema electrónico colecta a través de detectores la luz dispersada y la fluorescencia, convirtiendo la señal óptica en una señal electrónica que digitaliza para el análisis en computadora (BD Immunocytometry Systems, 1995).

La citometría de flujo permite un mayor análisis cuantitativo, objetivo y preciso, y se basa en el marcaje de las células participantes en la fusión. Además, permite cuantificar de manera precisa y rápida los sincicios, determinar su tamaño y complejidad, y posibilita diferenciarlos de los agregados por la presencia de la fluorescencia mixta que detecta el citómetro de flujo y la presencia del FRET. También ha sido útil para probar los efectos de los inhibidores de fusión como anticuerpos monoclonales (e.j. anti-CD4) y péptidos inhibidores (e.j. T-20), así como la búsqueda de marcadores moleculares, factores celulares o características biológicas de interés (revisado en Huerta *et al.*, 2002, 2009; y en López, 2007).

A la fecha, no es claro si la formación de sincicios es benéfica para la replicación viral. En algunas referencias, estas células multinucleadas pueden producir una tasa alta de viriones (Chowdhury *et al.*, 1992), así como su elevada formación en cocultivos de linfocitos infectados y no infectados, y la producción de virus infecciosos a cortos tiempos antes de su muerte (Sylwester *et al.*, 1997), en contra parte, se ha encontrado una participación del VIH-1 con tetraspaninas que previenen esta formación de sincicios (Weng *et al.*, 2009).

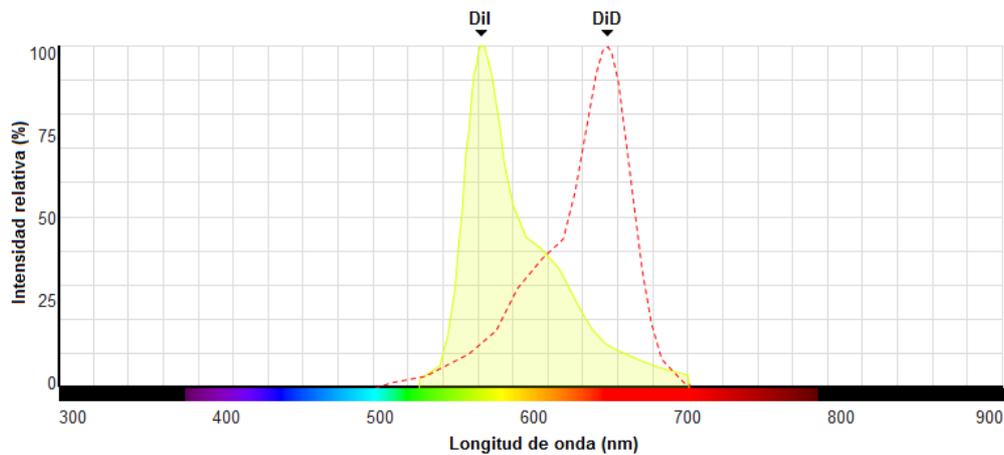


Figura 13. Espectro de emisión y de excitación de los fluorocromos lipofílicos Dil y DiD. La línea continua corresponde al espectro de emisión del fluorocromo Dil y la línea punteada corresponde al espectro de excitación del fluorocromo DiD. Como podemos observar ambos espectros se traslapan, lo que indica una transferencia de energía del fluorocromo Dil al fluorocromo DiD. Obtenido de Fluorescence SpectraViewer (<http://www.lifetechnologies.com>).

## II.2 Sistemas de células reporteras

El diseño de sistemas de células reporteras se ha utilizado, entre otros contextos, para monitorear la actividad de la LTR del VIH-1 mediante la expresión de genes reporteros acoplados corriente abajo a la secuencia LTR 5' viral. Este método permite detectar la infección del VIH en cultivos celulares de manera rápida (de 1 a 6 días dependiendo el inóculo), fácil y precisa, también permite cuantificar las células infectadas a través del tiempo, determinar rápidamente el título viral, y estudiar el efecto de los agentes antirretrovirales (Gervaix *et al.*, 1997; Kutsch *et al.*, 2004).

En este trabajo se utilizaron como sistemas de células reporteras linfocitos T CD4<sup>+</sup>/CXCR4<sup>+</sup> transfectados con el gen reportero *gfp*, que codifica para la proteína GFP, bajo el control de la LTR viral. Posterior a una infección con el VIH-1 de estas células, se puede detectar la presencia de GFP por microscopía de fluorescencia o citometría de flujo. La alta y continua producción de GFP parece ser requerida para la detección de la fluorescencia, una situación análoga a la producción viral (Gervaix *et al.*, 1997). Además, estas células al expresar los receptores CD4 y CXCR4, son susceptibles a fusionarse con células Env<sup>+</sup> o infectadas con el VIH-1 (expresando en su membrana el complejo Env) de manera que pueden formar sincicios.

### **III. PREGUNTA DEL PROYECTO**

¿Cómo es la actividad transcripcional del VIH-1 en sincicios de células T CD4<sup>+</sup>?

### **IV. HIPÓTESIS**

La actividad transcripcional del VIH-1 en sincicios de células T CD4<sup>+</sup> se relaciona directamente con la producción de la proteína GFP, la cual se espera aumente respecto a las células infectadas no fusionadas.

### **V. OBJETIVOS**

Objetivo general

Analizar la actividad transcripcional del VIH-1 en sincicios de células T CD4<sup>+</sup>, utilizando un sistema celular reportero basado en la expresión de la proteína GFP.

Objetivos particulares

- Determinar los niveles de expresión de los receptores celulares CD4 y CXCR4 en las tres líneas celulares reporteras.
- Determinar el nivel de infección del VIH-1 en las tres líneas celulares reporteras y detectar la formación de sincicios por el microscopio invertido.
- Titular la concentración de virus en la línea celular JLTRG.
- Determinar la coexpresión de GFP y p24 en la línea celular JLTRG.
- Establecer un protocolo para inducir la formación de sincicios mediados por la infección del VIH-1 en la línea celular JLTRG y su detección por citometría de flujo.

## VI. METODOLOGÍA

### VI.1 Medidas de bioseguridad

Es necesario seguir protocolos que establecen reglas y estándares de bioseguridad que permitan el manejo adecuado y la reducción del riesgo biológico por exposición no intencional con material infeccioso, en este caso el VIH.

Durante la manipulación de muestras infectadas se utilizó doble bata (desechable), cubre boca, gafas, doble guante (el cual nunca salía de la campana de bioseguridad), protección en los zapatos, químicos desinfectantes, material absorbente y desechable, contenedores específicos para agentes patógenos y un laboratorio BSL-2.

La manipulación de los desechos producidos están estipulados en el Manual de procedimientos de bioseguridad del Instituto de Investigaciones Biomédicas y de la UNAM.

### VI.2 Líneas celulares

Las líneas celulares utilizadas fueron JLTRG, CEM-GFP y Rev-CEM. La primera línea celular proviene de la línea celular Jurkat, mientras las dos últimas provienen de la línea celular CCRF-CEM. Tanto CCRF-CEM como Jurkat son linfoblastos humanos de sangre periférica provenientes de pacientes con leucemia linfoblástica aguda. Estas líneas celulares tienen la característica de ser líneas inmortales, lo que facilita su propagación en cultivo celular ([www.abcam.com](http://www.abcam.com)).

Todas las líneas celulares utilizadas en los experimentos fueron donadas por el *NIH AIDS Reagent Program* (EU): la línea celular CEM-GFP de Jacques Corbeil; la línea celular Rev-CEM de Yuntao Wu y Jon W. Marsh; y la línea celular JLTRG de Olaf Kutsch. Al inicio de este proyecto se propagaron las líneas celulares en medio RPMI suplementado al 10 % de SFB y al 1 % de penicilina y estreptomina. A las células CEM-GFP se les agregó adicionalmente glutamina al 1 % y geneticina al 1 %. Para su crecimiento se incubaron a 37°C con 5 % de CO<sub>2</sub>.

La transcripción del gen reportero *gfp* en la línea celular CEM-GFP además de ser dependiente a la proteína Tat, presenta una expresión constitutiva, esto debido a las características de la LTR viral y de la zona de integración del plásmido reportero. La LTR del VIH-1 puede ser activada por diferentes citocinas y factores de transcripción (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-2, IL-6 y NF $\kappa$ B) que inducen la activación de células T, de manera que la proliferación de estas células puede inducir la expresión del gen reportero sin que haya una infección. Posterior a la infección con el VIH-1 de las células CEM-GFP, la

fluorescencia se ve aumentada en comparación con las células no infectadas debido a la producción de Tat (Gervaix *et al.*, 1997) o por la activación de las células (Wu *et al.*, 2007).

A diferencia de CEM-GFP, la línea celular JLTRG no presenta expresión constitutiva del gen reportero, por lo que su expresión es totalmente dependiente a la infección con el VIH y a la síntesis de la proteína Tat (Kutsch *et al.*, 2004).

En la línea celular Rev-CEM, la expresión de GFP depende de la síntesis de las proteínas virales tempranas Rev y Tat (Wu *et al.*, 2007). En la construcción del plásmido (**figura 14**), el gen reportero está acoplado a la secuencia RRE, donde se une la proteína viral Rev, y en ausencia de la infección del VIH-1 el provirus reportero sufre transcripción basal generando un solo mensajero que es rápidamente cortado y empalmado, resultando en la remoción del marco de lectura de la GFP. Para la expresión del gen reportero es necesaria la presencia de la proteína Rev y Tat del VIH-1, y la generación de transcritos no empalmados que son llevados al citosol, esta dependencia dual contribuye a una mayor rigurosidad para la expresión de GFP (Wu *et al.*, 2007).



Figura 1. Construcción reportera dependiente de Rev. El vector incluye cuatro segmentos separados del genoma del VIH. El extremo 5' del vector consiste en la 5' de la LTR del VIH, el sitio donador de corte y empalme 1, D1, y una porción del marco de lectura abierto de *gag* que incluye a la señal de empaquetamiento. El segundo segmento del VIH es del exón de *tat/rev1* que incluye al sitio aceptor de corte y empalme 5, A5, y al sitio donador de corte y empalme 4, D4. El tercer segmento del ADN del VIH es del exón de *env* y abarca el RRE, y el sitio aceptor de corte y empalme 7, A7. El último segmento incluye toda la LTR 3' junto con una pequeña parte del marco de lectura de *nef*. Ilustración tomada de Wu *et al.*, 2007.

### VI.3 Determinación de la expresión de CD4 y CXCR4 en las líneas celulares CEM-GFP, Rev-CEM y JLTRG.

Se realizaron experimentos de inmunofluorescencia directa para determinar el fenotipo CD4 y CXCR4 en las tres líneas celulares. Para ambos experimentos se siguió el mismo protocolo y todas las centrifugaciones se realizaron a 238 x g por 3 minutos.

Las suspensiones celulares se colocaron en tubos de centrifuga de 15 ml estériles (Corning, CentriStar) y se lavaron con PBS 1X/azida de sodio 0.1 %, resuspendiendo en PBS 1X/azida de sodio 0.1 %/SFB 2 %.

Para ajustar la concentración celular se realizó una dilución 1:10 de la suspensión celular con azul tripan y se contaron las células a través de un microscopio invertido utilizando un hemocitómetro (el ajuste celular de los siguientes experimentos se realizó con la misma metodología). Se colocaron  $5 \times 10^5 / 50 \mu\text{l}$  células en tubos de ensayo de polipropileno de fondo redondo o tubos de FACS (BD Falcon) y se les adicionó el anticuerpo monoclonal correspondiente, marcado con el fluorocromo APC, como se muestra en la **tabla VI.1**.

Transcurrido el tiempo de incubación, para eliminar el anticuerpo no unido, se lavó una vez con PBS 1X/azida de sodio 0.1 % centrifugando en frío (4°C). Por último, las células se resuspendieron en PBS 1X/azida de sodio 0.1 % y se mantuvieron en hielo hasta ser analizados en el citómetro de flujo.

Tabla VI.1. Anticuerpos monoclonales y tiempo de incubación.

Anticuerpo	Receptor	Incubación
10 $\mu\text{l}$ del anticuerpo de ratón $\alpha$ -CD4 humano APC (BD Pharmingen)	CD4	Refrigeración en hielo y oscuridad durante 30 minutos
10 $\mu\text{l}$ del anticuerpo de ratón IgG1 $\kappa$ -APC (BD Pharmingen)	control de isotipo para CD4	Refrigeración en hielo y oscuridad durante 30 minutos
10 $\mu\text{l}$ del anticuerpo de ratón $\alpha$ -CD184 humano APC (BD Pharmingen)	CXCR4	Incubación a temperatura ambiente y oscuridad durante 30 minutos
10 $\mu\text{l}$ del anticuerpo de ratón IgG2 $\alpha$ $\kappa$ -APC (BD Pharmingen)	control de isotipo para CXCR4	Incubación a temperatura ambiente y oscuridad durante 30 minutos

Los datos obtenidos se analizaron con el programa CellQuest y se calculó el índice de la intensidad media de fluorescencia (IMF) de los anticuerpos unidos a los receptores CD4 o CXCR4 y el porcentaje de células positivas para estos receptores. Utilizando la media geométrica, se obtuvo la diferencia de las IMF del anticuerpo  $\alpha$ -CD4 o  $\alpha$ -CXCR4 y el control de isotipo correspondiente. A partir de esta diferencia, se calculó el índice de la IMF respecto al isotipo control. Además, se obtuvo el porcentaje de la población total que se encontraba en esa diferencia.

## VI.4 Infección de líneas celulares

### Cepa del VIH-1

Las infecciones se realizaron con la cepa viral III<sub>B</sub>, obtenida a través del *NIH AIDS Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH* (EU) de Robert Gallo. Para estandarizar un protocolo de infección con el VIH-1, se probaron diferentes condiciones de infección como el uso de diversas diluciones del sobrenadante viral así como diferentes tiempos de infección. Esta cepa se propagó previamente en nuestro laboratorio y se utilizó un sobrenadante de la cepa III<sub>B</sub> propagado en la línea celular H9 (19/11/2010), con una concentración de p24 de 333.87 pg/ml (Cetina, 2013).

La cepa VIH-1<sub>III<sub>B</sub></sub> proviene de sangre periférica o médula espinal de pacientes con SIDA o enfermedades relacionadas. Esta cepa viral tiene una alta capacidad de replicarse en líneas celulares T humanas, parece estar bien adaptada para cultivos de células T *in vitro*, y utiliza como correceptor de la infección a CXCR4 por lo que pertenecen al tipo X4 (Popovic *et al.*, 1984a, 1984b; Ratner *et al.*, 1985).

### Reactivos

- **Polibreno.** Para favorecer la infección se utilizó polibreno (bromuro de hexadimetrina), un polication que facilita la adsorción del VIH, de manera que rodea a la célula con carga positiva (neutralizando cargas de repulsión entre el virión y la célula) atrayendo a las partículas virales (Coelen *et al.*, 1983). El polibreno se añade posterior al haber agregado el sobrenadante viral. Se utilizó a una dilución 1:100 (con PBS 1X estéril) de un stock de 0.1 g/ml, quedando una concentración para usar de 1 µg/µl.
- **T-20.** Para inhibir la infección se utilizó T-20 (DP178 o enfuvirtida), el cual es un péptido derivado de la región HR2 de gp41 (residuos 127 a 162) que inhibe la infección por el VIH-1 y la fusión célula-célula. Este péptido se une a la región HR1 de gp41 impidiendo la formación del complejo HR1-HR2 (Rimsky *et al.*, 1998). A partir de un stock de 98 mg/ml, se realizó una dilución 1:100 (con medio RPMI suplementado) quedando una concentración para usar de 0.98 µg/µl. Para cada experimento donde se utilizó T-20 se indica en el pie de figura la concentración final. Cada vez que se agregaba al cultivo medio RPMI suplementado, se agregaban 10 µl de la dilución de T-20

### Infección, cultivo y viabilidad celular

Las células se colocaron en tubos de 15 ml o placas de 48 pozos con fondo plano (BD Falcon), se agregó el sobrenadante viral y el polibreno. La suspensión se incubó por

2 horas y media a 37°C con 5 % de CO<sub>2</sub>, resuspendiendo cada 30 minutos. Al finalizar el tiempo de incubación, las células se lavaron y se resuspendieron en medio RPMI suplementado. Todos los lavados se realizaron a 239 x g por 3 minutos.

Después de la incubación, las células infectadas se colocaron en placas de 48 pozos con fondo plano o botellas para cultivo celular de 25 cm<sup>2</sup> con filtro estériles (Corning) y se incubaron a 37°C con 5 % de CO<sub>2</sub>.

La viabilidad celular se calculó mediante citometría de flujo. A partir de la población total se delineó una región que no incluía los eventos más pequeños (restos celulares) y se obtuvo el porcentaje de eventos que se interpretaron como células viables (ver **figura 1 de los anexos**).

### VI.5 Permeabilización del anticuerpo α-p24 e isotipo control y fijación celular

A los tres días de infección, las células JLTRG se lavaron 2 veces con PBS 1X/1 % de SFB, centrifugando a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se resuspendieron en 150 µl de la solución (a temperatura ambiente) Cytofix/Cytoperm (APC BrdUFlow Kit, BD Pharmingen) y se refrigeraron en hielo por 20 minutos. Esta solución contiene formaldehído, el cual ayuda a la fijación de las células. Finalizado éste tiempo, las células se lavaron 2 veces agregando buffer PermWash 1X (APC BrdUFlow Kit, BD Pharmingen) a 4°C; esta solución contiene SFB, saponina (para permeabilizar la membrana) y 0.09 % de azida de sodio (centrifugando en frío a 4°C). Para cada caso se agregaron los anticuerpos monoclonales como se muestra en la **tabla VI.2**.

Tabla VI.2. Anticuerpos monoclonales para la detección de p24 intracelular

Dilución del anticuerpo	Buffer PermWash 1X (µl)	Anticuerpo de ratón IgG1 KC57-PE (Beckman Coulter) (µl)	Detección
1:50	50	1	p24
1:160	160	1	p24
1:300	300	1	p24
Dilución del anticuerpo	Buffer PermWash 1X (µl)	Anticuerpo de ratón IgG1κ-PE (BD Pharmingen) (µl)	Detección
1:50	50	1	Control de isotipo
1:160	160	1	Control de isotipo
1:300	300	1	Control de isotipo

Todos los tubos se refrigeraron en hielo por 30 minutos en oscuridad. Al finalizar este tiempo, se procedió a lavar dos veces con buffer PermWash 1X a 4°C (centrifugando en frío a 4°C). Las células se resuspendieron en PBS 1X estéril y se analizaron las muestras en el citómetro de flujo.

## **VI. 6 Concentración del sobrenadante viral por ultrafiltración**

Para aumentar la concentración de las partículas virales se utilizó un filtro para centrífuga Amicon Ultra-15 para volúmenes máximos de 15 ml con filtro de corte de 100K (NMWL de 100,000). Este filtro permite que se recupere hasta el 90 % de la muestra procesada así como la capacidad de concentrar hasta 80 veces. El tiempo de procesamiento habitual es de 15 a 60 minutos, dependiendo del NMWL y de que tan concentrada se desee la muestra.

Se esterilizó el tubo Amicon Ultra-15 irradiando con luz ultravioleta por 10 minutos, posteriormente se agregó el sobrenadante viral a concentrar, se centrifugó a 4000 x g por 30 minutos y se recuperó el sobrenadante concentrado en un tubo estéril de 600 µl (Eppendorf). De 13.2 ml se obtuvieron 100 µl (concentrado aproximadamente 132X) a los cuales se les agregó 150 µl de medio RPMI suplementado para un total de 250 µl totales.

## **VI.7 Protocolo de cocultivo para cuantificación de la fusión celular**

### **Fluorocromos lipofílicos**

Las células que se analizaron por citometría de flujo se marcaron con fluorocromos de lipofílicos, para poder separar las poblaciones infectadas, no infectadas y sincicios. Para que la señal de la GFP fuera detectable, se utilizaron los fluorocromos lipofílicos (Vybrant, Life Technologies) Dil y DiD, los cuales difieren en cuanto a su espectro de excitación y emisión de fluorescencia; Dil se excita a 549 nm y emite a 565 nm, DiD se excita a 644 nm y emite a 665. La GFP presenta dos picos de excitación uno a 475 nm y otro a 395nm, emite a 509 nm.

El fluorocromo Dil se utilizó a una dilución de 1:10 (con DMSO) de un stock de 3.5 mg/ml, quedando a una concentración para usar de 0.35 mg/ml. El fluorocromo DiD se utilizó directo del stock de 1mM en solvente.

### **Marcaje de células**

Como inicio de los experimentos del cocultivo, un día antes de la infección, se marcaron con fluorocromos lipofílicos, las células participantes para la formación de sincicios; con DiD las células no infectadas y con Dil las células infectadas. Todos los lavados se realizaron a 239 x g por 3 minutos.

Las células se pasaron a un tubo para centrifuga de 15 ml estéril. Se centrifugó, se decantó y se ajustaron con medio RPMI no suplementado. Las células se repartieron en tubos de 15 ml estériles, agregando a uno el fluorocromo Dil a una concentración final de 0.03 mg/ml y al otro el fluorocromo DiD a una concentración final de 0.005 mM. Se resuspendieron los 2 tubos hasta homogeneizar los fluorocromos y se incubaron a temperatura ambiente, protegidos de la luz y con agitación moderada, el tubo con Dil se incubó por 15 minutos y el tubo con DiD se incubó por 20 minutos. Al finalizar el tiempo de incubación, se lavaron 2 veces con medio RPMI de lavado (medio RPMI no suplementado). Las células se resuspendieron en medio RPMI suplementado y se colocaron en botellas estériles para cultivo celular de 25 cm<sup>2</sup> con filtro. Las botellas se incubaron a 37°C con 5 % de CO<sub>2</sub> y se revisaron diariamente agregando medio RPMI suplementado cada día para mantener el nivel de nutrientes.

### **Inhibición de la fusión celular**

A los pozos en los que se colocó el cocultivo con T-20, primero se agregaron las células infectadas marcadas con Dil, posteriormente se agregó el T-20 a una concentración final de 0.047 µg/µl, se resuspendió, y se agregaron las células no infectadas marcadas con DiD.

### **Cocultivo**

Al concluir el tiempo de infección, en una placa se colocaron por duplicado 1X10<sup>5</sup> células/100 µl/pozo de las células infectadas marcadas con Dil más la misma cantidad de células no infectadas marcadas con DiD (es decir, a una proporción 1:1). Para los controles se colocó por duplicado la misma cantidad de células.

Se realizaron dos experimentos independientes de cocultivo, en el primero las células se infectaron por 2 y 3 días, y se realizaron cocultivos de 24 horas. En el segundo, las células se infectaron por 3 días y se realizaron cocultivos de 24, 48 y 72 horas, además a cocultivos de 24 horas, donde se había dejado que se formaran sincicios, se agregó T-20 a las 24 horas *in vitro* para evitar más infección, fusión e incorporación de células a los sincicios.

Al finalizar el tiempo de cocultivo, las células se fijaron con PFA al 2 % (la refrigeración fue por 40 minutos resuspendiendo a los 20 minutos).

### **VI.8 Fijación con PFA al 2 %**

Previo al análisis por citometría de flujo, las células se fijaron en PFA al 2%. Se colocaron en tubos de FACS, se lavaron con PBS 1X estéril y se resuspendieron en 250  $\mu$ l de PBS 1X más 250  $\mu$ l de PFA al 4 % para conseguir una concentración final de 2 % y se refrigeraron a 4°C por hora y media, se resuspendió cada 20 minutos la primera hora y se dejaron los último 30 minutos sin resuspender. Finalizando este tiempo, se centrifugó y se decantó. Por último, las células se resuspendieron en PBS 1X estéril y se mantuvieron en hielo hasta que se analizaron en el citómetro de flujo.

### **VI.9 Citometría de flujo**

Los datos se adquirieron con el citómetro FACSCalibur y Attune, para ambos citómetros al momento de captura se establecieron los parámetros de tamaño (FSC) y granularidad (SSC) para seleccionar a las células viables (sin restos celulares) de la muestra de células no infectadas (sin marca en el caso de p24 intracelular y cocultivos). También se ajustó la fluorescencia basal de la GFP de las células no infectadas hacia la intensidad baja y se realizó un umbral que separaba esta fluorescencia basal y la positiva, de manera que aproximadamente el 100 % de las células no infectadas se mantuviera por debajo del umbral de fluorescencia. Este ajuste se realizó de la misma manera para los fluorocromos PE (p24 intracelular), Dil y DiD. Todos los datos obtenidos por citometría de flujo se analizaron con el programa *CellQuest* o *Attune Cytometric Software*.

### **VI.10 Cálculo del título viral**

Con las condiciones iniciales de los cultivos, las diluciones del sobrenadante viral y los porcentajes de infección obtenidos (células GFP<sup>+</sup>), se adaptó la metodología de Grigorov *et al.* para calcular la titulación viral de la siguiente manera:

$$\text{Título (UI/ml)} = -\text{Ln } P(0) \times n/v$$

donde:

$P(0)$  = fracción de células no infectadas  
 $n$  = número de células en los pozos al momento de la infección  
 $v$  = volumen de sobrenadante viral

que para obtener  $P(0)$ :

$$N [n.i.] = \frac{\text{Número de células en un pozo}}{\text{en un pozo}} \times \left( 1 - \frac{(\% F^+ \text{ infectadas} - \% F^+ \text{ sin infección})}{(100 - \% F^+ \text{ sin infección})} \right)$$

$$P(0) = \frac{N [n.i.]}{\text{Número de células en un pozo}}$$

Las titulaciones virales se calcularon en todos los casos para el día 2 de infección, ya que este día fue donde se obtuvo la mayor correlación lineal de células GFP<sup>+</sup> con la dilución del sobrenadante viral. Se procuró promediar los títulos de tres diluciones del sobrenadante viral consecutivas (se tomaban los que presentaban una mayor distribución horizontal). Esta metodología tiene una sensibilidad de 10<sup>4</sup> UI/ml (Unidades Infecciosas por mililitro), por debajo de esta cifra los datos se consideran subestimados.

#### **VI.11 Análisis estadístico**

El análisis estadístico (ANOVA y la prueba de  $t$  de student) se realizó utilizando GraphPad Prism Software, Inc, San Diego CA).

## VII. RESULTADOS

### VII.1 Determinación de la expresión de CD4 y CXCR4 en las líneas celulares CEM-GFP, Rev-CEM y JLTRG.

Para el inicio de los experimentos de infección fue necesario determinar los receptores principales que participan en la infección por el VIH-1 en las tres líneas celulares reporteras. En la **figura 1** se observan los histogramas de la intensidad de fluorescencia de los anticuerpos  $\alpha$ -CD4 y  $\alpha$ -CXCR4 en cultivos de las tres líneas celulares. Para el receptor CD4 se observó una separación completa entre la fluorescencia del anticuerpo  $\alpha$ -CD4 y la del control de isotipo en las líneas celulares CEM-GFP y Rev-CEM, mientras que en la línea celular JLTRG no se observó esta separación completa. En cuanto al receptor CXCR4, solo se observó esta separación completa en la línea celular JLTRG, mientras que en las otras dos líneas celulares no.

En la **tabla 1** se muestran las diferencias significativas del porcentaje de células positivas y el índice de la IMF entre las tres líneas celulares. En los cultivos de las líneas celulares CEM-GFP y Rev-CEM más del 90 % de la población celular fue positiva para el receptor CD4, mientras que la línea celular JLTRG el porcentaje de células positivas fue aproximadamente de 80 %. En cuanto a su grado de expresión por célula, medido como el índice de la intensidad media de fluorescencia (IMF) del anticuerpo  $\alpha$ -CD4, los cultivos de CEM-GFP y Rev-CEM fueron los que mostraron la mayor expresión y el de menor fue el cultivo de JLTRG. La expresión del receptor CXCR4 presentó una mayor diferencia en la línea celular JLTRG respecto a las otras líneas celulares, siendo mayor tanto en el porcentaje de células positivas como en el índice de la IMF.

Tabla 1. Expresión de los receptores CD4 y CXCR4 en cultivos de las líneas celulares CEM-GFP, Rev-CEM y JLTRG<sup>a</sup>

	Porcentaje de células positivas		Índice de la IMF	
	CD4	CXCR4	CD4	CXCR4
CEM-GFP	95.3	36.5	55.2	6.1
Rev-CEM	99.2	89.6	47.7	18.2
JLTRG	77.5	98.4	14.9	54.9

<sup>a</sup> Cada dato es promedio de dos experimentos independientes.  
El valor *P* se obtuvo con una prueba de ANOVA de una vía seguida de una prueba de Tukey, \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01.

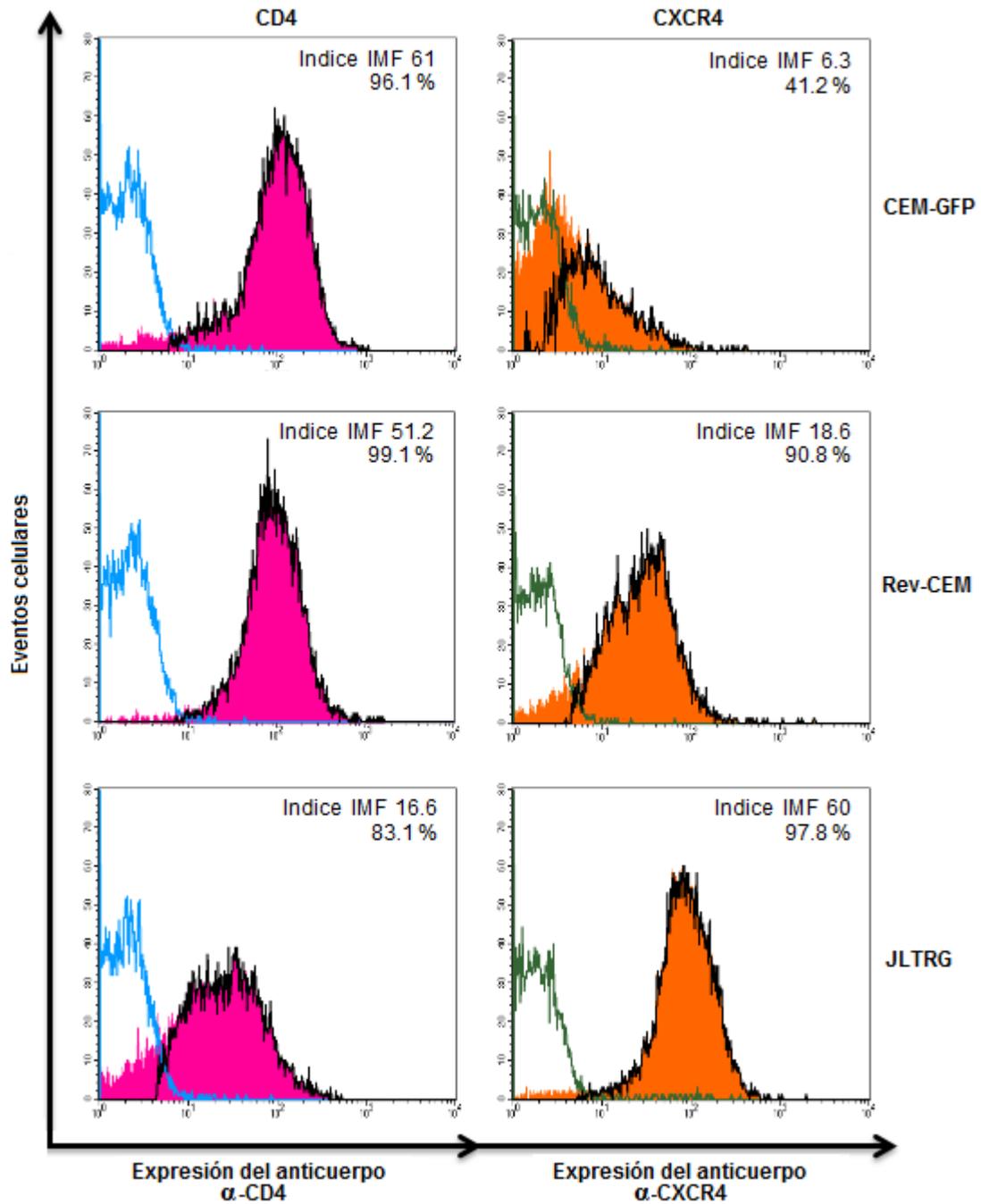


Figura 1. Expresión de los receptores CD4 y CXCR4 en cultivos de las líneas celulares CEM-GFP, Rev-CEM y JLTRG. En los histogramas se muestran las intensidades medias de fluorescencia (IMF) de los anticuerpos  $\alpha$ -CD4 (área rosa) y  $\alpha$ -CXCR4 (área naranja), y de los controles de isotipo para los receptores CD4 (línea azul) y CXCR4 (línea verde). La línea negra en cada histograma representa la diferencia entre el anticuerpo  $\alpha$ -CD4 o  $\alpha$ -CXCR4 y su isotipo control. Cada dato es promedio de dos experimentos independientes.

## VII.2 Titulación de la cepa viral IIB en las líneas celulares

Inicialmente fue importante realizar una titulación de la cepa viral IIB del VIH-1 en las tres líneas celulares reporteras para saber con cuánto virus se iba a infectar.

Las gráficas de puntos de la **figura 2** son representativas de los cultivos no infectados e infectados por tres días con un sobrenadante viral sin diluir. El cultivo infectado de CEM-GFP presentó un aumento de los restos celulares, del tamaño y de la granularidad celular, así como de la intensidad de fluorescencia de la GFP. En el caso del cultivo de Rev-CEM, no se observó un aumento de la fluorescencia cuando se infectó pero si de los restos celulares, del tamaño y de la granularidad celular. El aumento de la intensidad de fluorescencia de la GFP en el cultivo infectado de la línea celular JLTRG no causó un aumento de los restos celulares ni un cambio de la morfología celular.

En la **figura 3** se muestran las gráficas del porcentaje de células GFP<sup>+</sup> durante una cinética de infección de 1, 2 y 3 días con diferentes diluciones del sobrenadante viral. Se observa que los cultivos infectados de CEM-GFP y JLTRG presentaron una progresión esperada de la infección al día dos y tres, conforme se aumentó la concentración viral, el porcentaje de células GFP<sup>+</sup> aumentó de manera lineal (valor de R<sup>2</sup> mayor a 0.9). Los cultivos infectados de Rev-CEM no presentaron un aumento en el porcentaje de células GFP<sup>+</sup>. Tanto los cultivos infectados de CEM-GFP y JLTRG no presentaron un aumento en el porcentaje de células GFP<sup>+</sup> al día 1 de infección, pero a partir del día 2, este porcentaje comenzó a aumentar llegando a un máximo al día 3 de infección con el sobrenadante viral sin diluir (15.9 % de CEM-GFP y 14.3 % de JLTRG). A pesar de que los cultivos infectados de CEM-GFP tuvieron un porcentaje mayor de células GFP<sup>+</sup>, los cultivos infectados de JLTRG presentaron un índice de la IMF de GFP más grande (**figura 2 de los anexos**).

La titulación viral se calculó para el día 2 de infección. En los cultivos infectados de CEM-GFP y JLTRG se obtuvieron  $4.3 \times 10^4$  UI/ml y  $4.5 \times 10^4$  UI/ml respectivamente. No se calculó la titulación viral para los cultivos de Rev-CEM ya que no presentaron infección.

Los porcentajes de viabilidad celular se muestran en la **figura 4** y se observa que los cultivos de CEM-GFP al no presentar infección en el día 1, la viabilidad no se vio afectada, mientras que al día 2 de infección el porcentaje de viabilidad decae en los cultivos infectados, recuperándose al día 3. La baja viabilidad del cultivo no infectado de CEM-GFP al día 2 se atribuye a la alta densidad celular.

Debido a que los cultivos infectados de Rev-CEM no presentaron células GFP<sup>+</sup>, el porcentaje de viabilidad se mantuvo alto. Se observa que al día 2 de infección la viabilidad de los cultivos infectados de las tres líneas celulares disminuye y al día 3 se

recupera, esto podría ser debido a la liberación del virus al día 2 para el comienzo de un nuevo ciclo de infección.

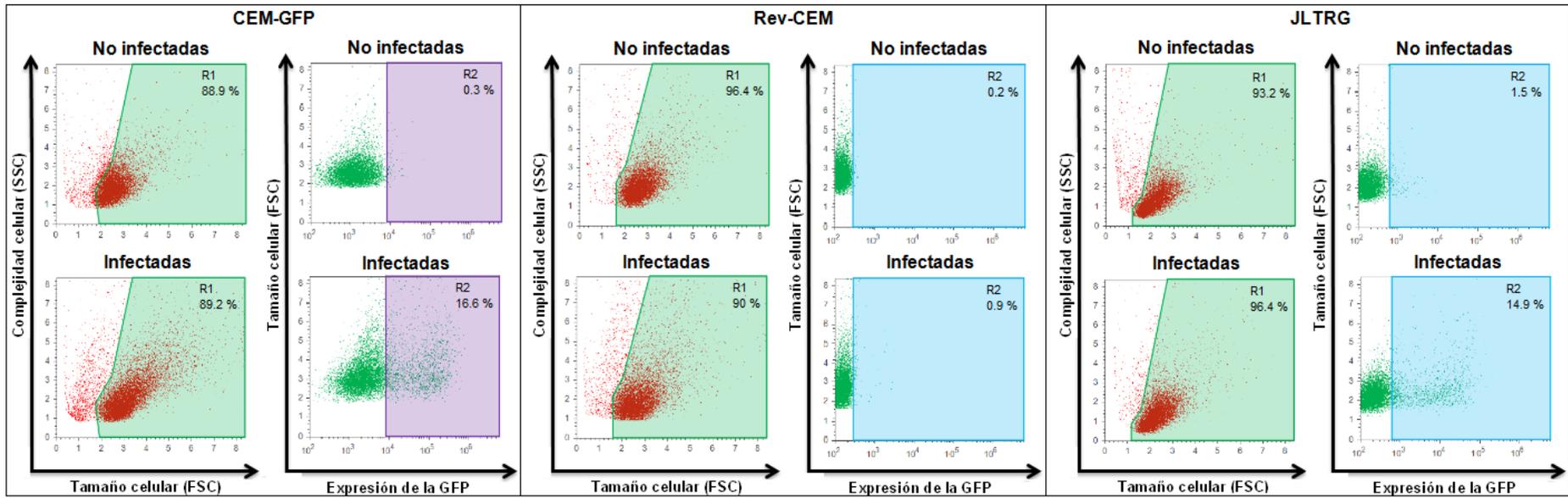


Figura 2. Las gráficas de puntos mostradas son representativas de cultivos no infectados e infectados de las tres líneas celulares por 3 días con una MOI de 0.04. Las regiones R1 pertenecen a los eventos tomados como células viables y a partir de éstas regiones se construyeron las gráficas de la derecha. Las regiones R2 corresponden a las células GFP<sup>+</sup> (células infectadas). Los porcentajes de las regiones se muestran en cada gráfica. Se infectaron  $9 \times 10^5$  células/tubo utilizando polibreno a una concentración final de 0.003  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , incubando por 2 horas y media (resuspendiendo cada 30 minutos).

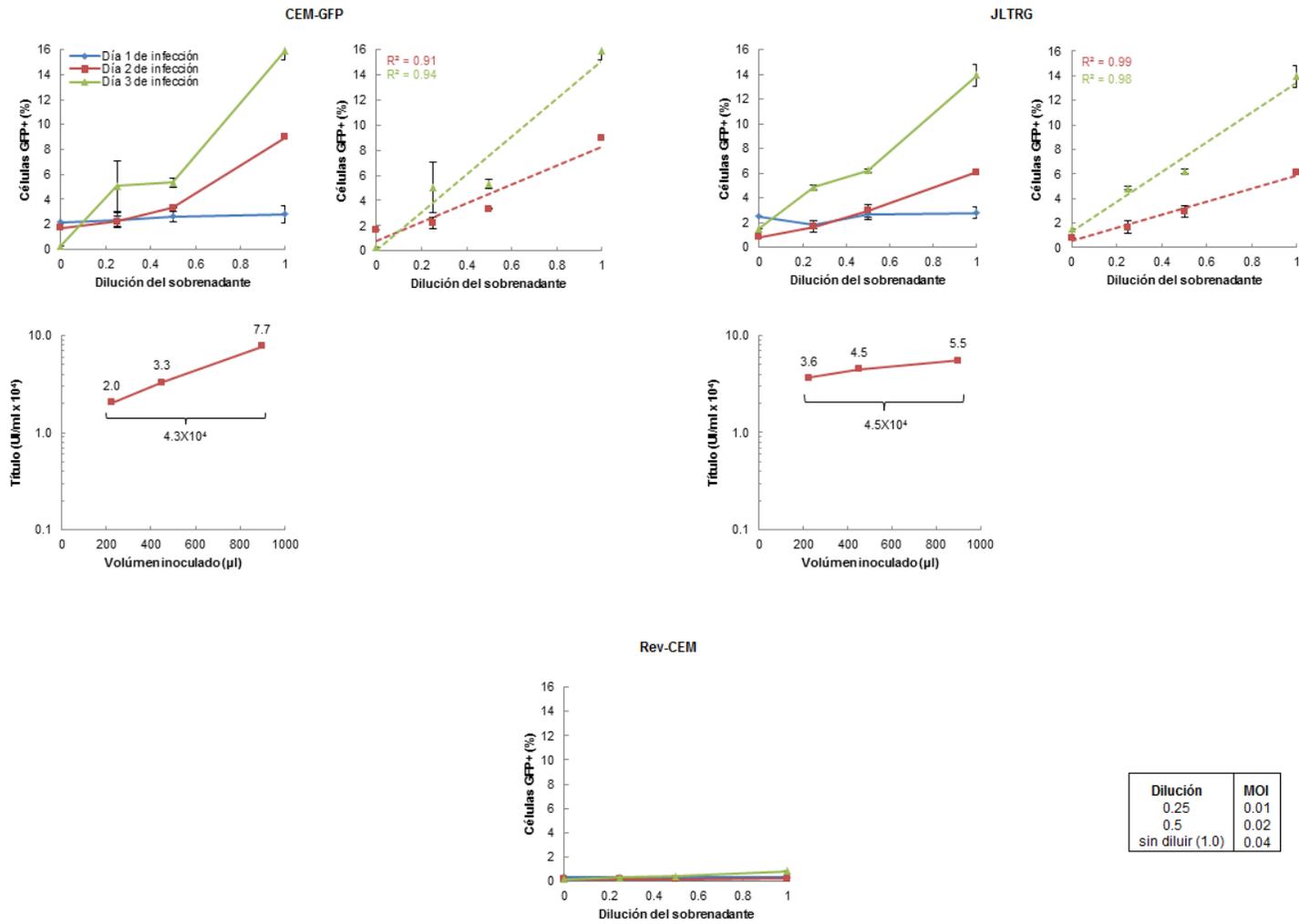


Figura 3. Gráficas en escala lineal del porcentaje de células GFP<sup>+</sup> (células infectadas) con sus respectivas regresiones lineales y titulación viral. El porcentaje de células GFP<sup>+</sup> se obtuvo a partir de cuántos eventos de las regiones R1 (figura 2) presentaron la señal de la GFP. La titulación viral se calculó para el día 2 de infección. El cero en el eje x corresponde al control no infectado. Se muestra la desviación promedio de dos experimentos independientes. Los cultivos de las tres líneas celulares se infectaron por 1, 2 y 3 días con MOIs de 0.01, 0.02 y 0.04. Se infectaron  $9 \times 10^5$  células/tubo utilizando polibreno a una concentración final de 0.003  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , incubando por 2 horas y media (resuspendiendo cada 30 minutos).

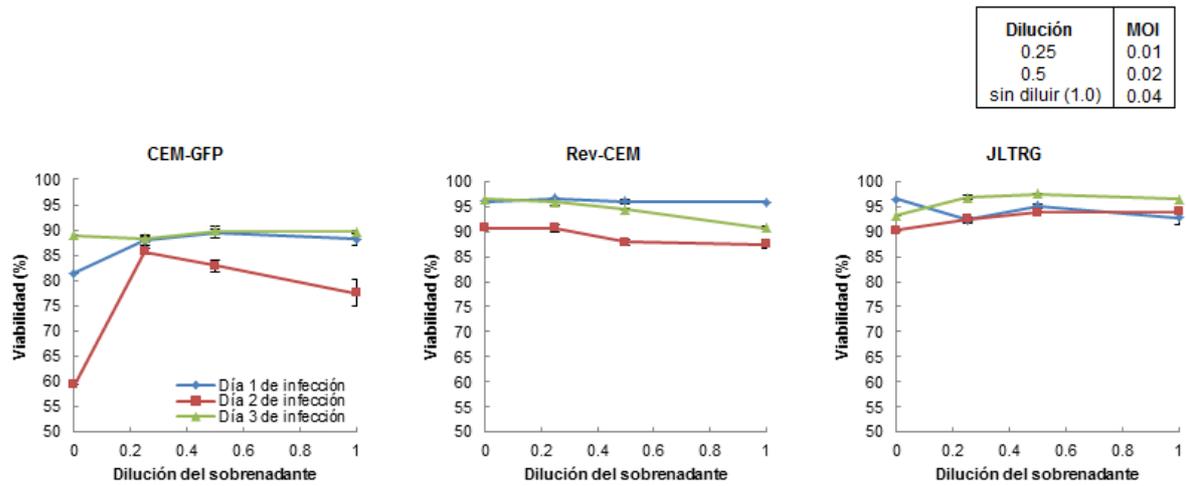


Figura 4. Gráficas en escala lineal del porcentaje de viabilidad celular por citometría de flujo. El porcentaje de viabilidad se obtuvo a partir del número de eventos de las regiones R1 (figura 2) respecto a los eventos totales. El cero en el eje x corresponde al control no infectado. Se muestra la desviación promedio de dos experimentos independientes. Los cultivos de las tres líneas celulares se infectaron por 1, 2 y 3 días con MOIs de 0.01, 0.02 y 0.04. Se infectaron  $9 \times 10^5$  células/tubo utilizando polibreno a una concentración final de  $0.003 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ , incubando por 2 horas y media (resuspendiendo cada 30 minutos).

### VII.3 Infección de las líneas celulares con la cepa viral IIB e inhibición de la infección con el péptido T-20

Para este experimento además de analizar el grado de infección en los cultivos de las tres líneas celulares por 3 y 4 días, se realizaron pruebas de arresto de la infección e inhibición de la fusión celular con el péptido T-20 que se agregó a los cultivos al día 2 de la infección, esto para impedir un segundo ciclo de infección y formación de sincicios.

En la **figura 5** se muestran las gráficas de puntos representativas de cultivos no infectados, cultivos infectados por 4 días con una MOI de 0.04 y cultivos infectados con T-20. Tanto los cultivos infectados de CEM-GFP como de JLTRG presentaron un aumento de los restos celulares, del tamaño y de la granularidad celular, así como de la intensidad de fluorescencia de la GFP cuando se infectaron. En los cultivos infectados con T-20 se observa que no hubo un aumento de los restos celulares ni un cambio en la morfología celular y se observa un menor porcentaje de células GFP<sup>+</sup> comparado con los cultivos infectados sin T-20. En el cultivo infectado de Rev-CEM se observa un aumento de los restos celulares, del tamaño y de la granularidad celular aunque presentó poco aumento de la intensidad de fluorescencia de la GFP, por lo que solo se observó el efecto del T-20 en los restos celulares y en la morfología celular.

Las gráficas de la **figura 6** representan el porcentaje de células GFP<sup>+</sup> y viabilidad durante una cinética de infección por 3 y 4 días con diferentes diluciones del sobrenadante viral. Se observa que la cinética de infección de los cultivos de CEM-GFP decayó conforme se aumentó la concentración del sobrenadante viral, aunque fueron los que presentaron mayor porcentaje de células GFP<sup>+</sup>, siendo su máximo (45.8 %) al día 4 de infección con una MOI de 0.02. Los cultivos infectados de JLTRG presentaron menor porcentaje de infección, teniendo su máximo (32.3 %) de infección al día 4 con una MOI de 0.04. A diferencia de los cultivos infectados de CEM-GFP y de JLTRG, los cultivos infectados de Rev-CEM presentaron un bajo porcentaje de células GFP<sup>+</sup>. El efecto del T-20 se puede observar claramente en los cultivos infectados con T-20 de CEM-GFP y de JLTRG, pues el porcentaje de células GFP<sup>+</sup> dejó de aumentar. El porcentaje de inhibición de infección del T-20 en las células CEM-GFP fue aproximadamente de 24 % al día tres de infección, mientras que al día cuatro fue de 49 %. La línea celular JLTRG presentó aproximadamente 10 % de inhibición de la infección al día tres, y al día cuatro fue de 49 %.

Al igual que en el experimento pasado, a pesar de que los cultivos infectados de CEM-GFP tuvieron un mayor porcentaje de células GFP<sup>+</sup>, los cultivos de JLTRG presentaron un índice de la IMF de GFP más grande (**figura 3 de los anexos**; para observar la fluorescencia de la GFP en las tres líneas celulares después de la infección por microscopio de fluorescencia, revisar la **figura 4 de los anexos**).

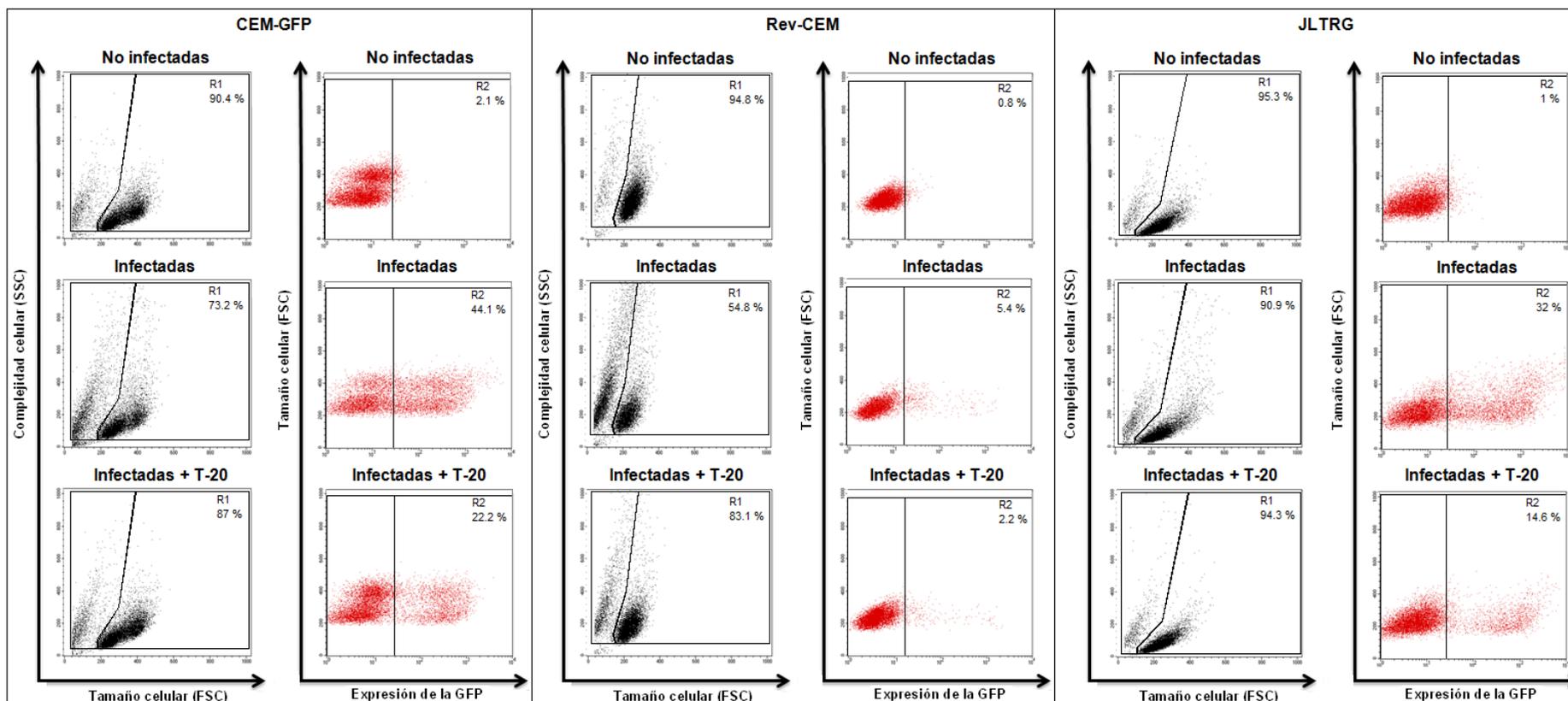


Figura 5. Las gráficas de puntos mostradas son representativas de cultivos no infectados e infectados de las tres líneas celulares por 4 días con una MOI de 0.04. Las regiones R1 pertenecen a los eventos tomados como células viables y a partir de éstas regiones se construyeron las gráficas de la derecha. Las regiones R2 corresponden a las células GFP<sup>+</sup> (células infectadas). Los porcentajes de las regiones se muestran en cada gráfica. El T-20 fue agregado a las 48 h.p.i a una concentración final de .001 µg/µl (dilución 1:1000 del stock original). Se infectaron 9X10<sup>5</sup> células/pozo utilizando polibreno a una concentración final de 0.003 µg/µl, incubando por 2 horas y media (resuspendiendo cada 30 minutos).

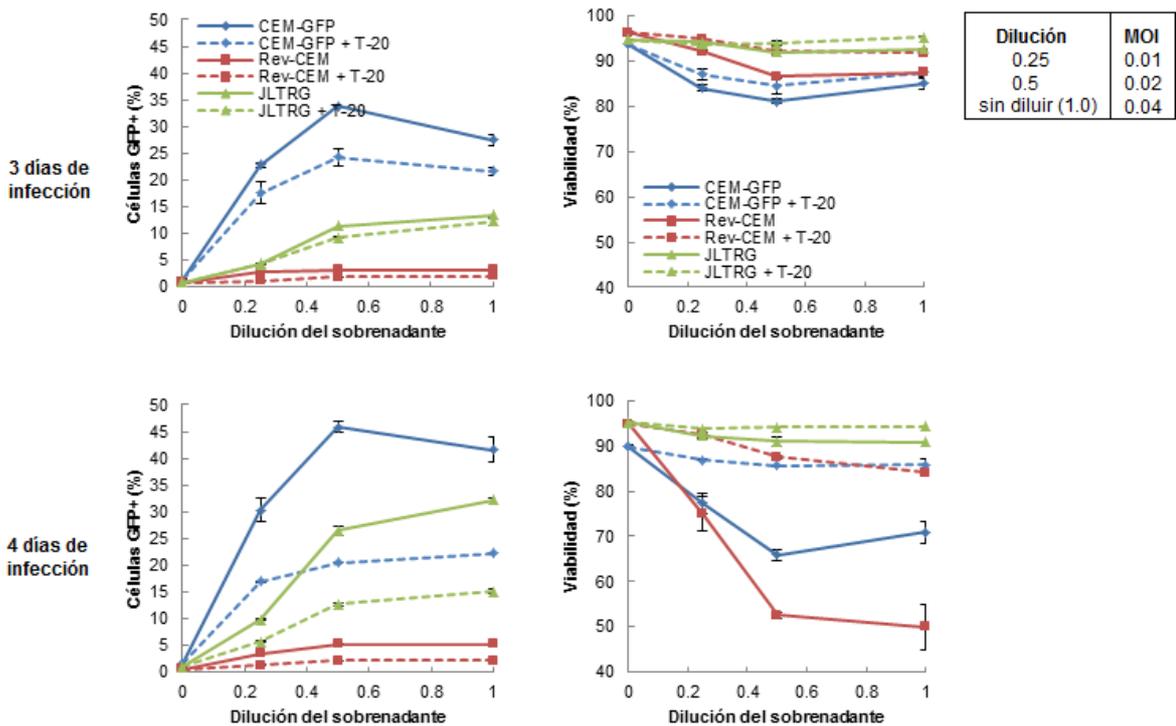


Figura 6. Gráficas en escala lineal del porcentaje de células GFP<sup>+</sup> (células infectadas) y de la viabilidad. Los porcentajes de células GFP<sup>+</sup> y de viabilidad se obtuvieron a partir de cuántos eventos de las regiones R1 (figura 5) presentaron la señal de la GFP y el número de eventos respecto a los eventos totales, respectivamente. El cero en el eje x corresponde al control no infectado. Se muestra la desviación promedio de dos experimentos independientes. Los cultivos de las tres líneas celulares se infectaron por 3 y 4 días con MOIs de 0.01, 0.02 y 0.04. El T-20 fue agregado a las 48 h.p.i a una concentración final de .001 µg/µl (dilución 1:1000 del stock original). Se infectaron 9X10<sup>5</sup> células/pozo utilizando polibreno a una concentración final de 0.003 µg/µl, incubando por 2 horas y media (resuspendiendo cada 30 minutos).

El porcentaje de viabilidad celular de los cultivos infectados de las tres líneas celulares al día 3 de infección se mantuvo mayor a 80 %, pero al día 4, la viabilidad de los cultivos de CEM-GFP y Rev-CEM se vio afectada, en cambio, los cultivos infectados de JLTRG mantuvieron su viabilidad arriba de 90 %. Otro efecto del T-20 es que al haber inhibido la infección, la viabilidad de los cultivos infectados de las tres líneas celulares al día 3 y 4 de infección se mantuvo por arriba de 85 % (figura 6).

En la figura 7 se muestran fotografías de sincicios y la inhibición de la fusión celular con T-20 en los cultivos infectados de las tres líneas celulares por 4 días con una MOI de 0.04. Se puede observar que los sincicios son diferentes entre la línea celular CEM-GFP y JLTRG, así como la inhibición de su formación al añadir T-20. Aunque la línea celular Rev-CEM no presentó un alto porcentaje de infección (figura 6), si presentó sincicios al día 3 de infección (figura 5 de los anexos), y se puede observar que al día 4 estos sincicios son granuloso (figura 7), posiblemente debido a muerte celular, mientras que al día 3 se observa su membrana bien definida.

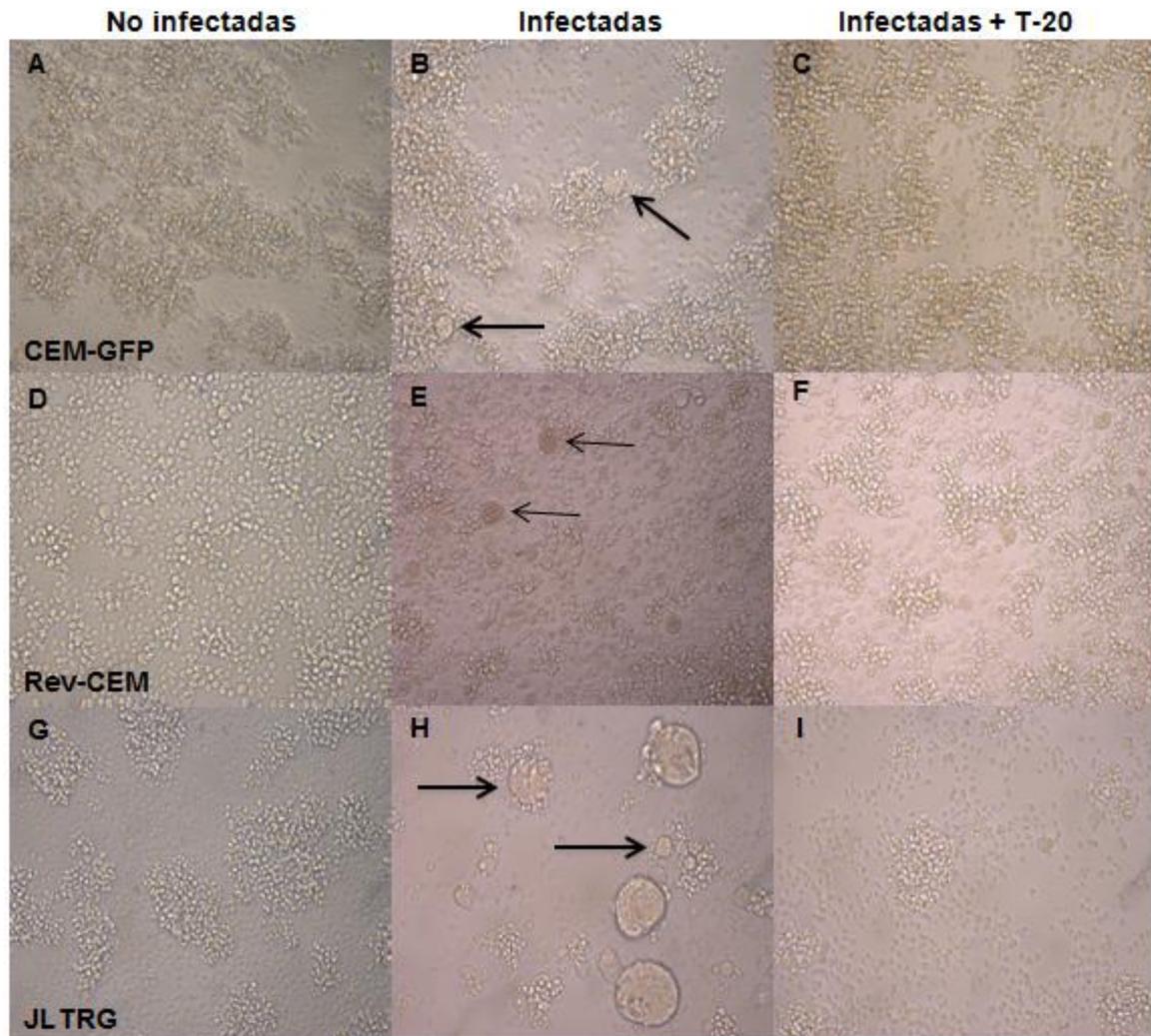


Figura 7. Fotografías a 20X tomadas con el microscopio invertido de los cultivos de las líneas celulares CEM-GFP (A-C), Rev-CEM (D-F) y JLTRG (G-I). A, D y G representan los cultivos no infectados, B, E y H representan los cultivos infectados por 4 días con una MOI de 0.04, y C, F e I muestran los cultivos infectados con T-20 agregado a las 48 h.p.i a una concentración final de .001  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (dilución 1:1000 del stock original). Se infectaron  $9 \times 10^5$  células/pozo utilizando polibreno a una concentración final de 0.003  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , incubando por 2 horas y media (resuspendiendo cada 30 minutos).

#### **VII.4 Detección de p24 intracelular en la línea celular JLTRG**

En los experimentos anteriores de infección con un sobrenadante viral de la cepa IIIB del VIH-1, se obtuvo que los cultivos infectados de JLTRG presentaron un alto porcentaje de células GFP<sup>+</sup> a cortos tiempos, la viabilidad celular se mantuvo alta y se observaron sincicios después de una infección, por lo que se eligió esta línea celular para establecer un modelo de estudio de los sincicios.

Para corroborar que todas las células GFP<sup>+</sup> estuvieran infectadas, se realizó una detección de p24 intracelular al día 3 de infección con una MOI de 0.02. En la **figura 12** se observan las gráficas de puntos, representativas del experimento de p24 intracelular. En el cultivo infectado se observa un aumento de los restos celulares, del tamaño y de la granularidad celular, así como de la intensidad de fluorescencia de la GFP. Prácticamente el 75 % de células GFP<sup>+</sup> son también p24<sup>+</sup>, corroborando de que están infectadas, y el 25 % restante correspondería a células GFP<sup>+</sup> que posiblemente se infectaron tardíamente y no han producido p24. También se observa que existen células que solo fueron p24<sup>+</sup>, indicando que son células que no se infectaron y probablemente la proteína p24 que se encuentra de manera intracelular fue endocitada.

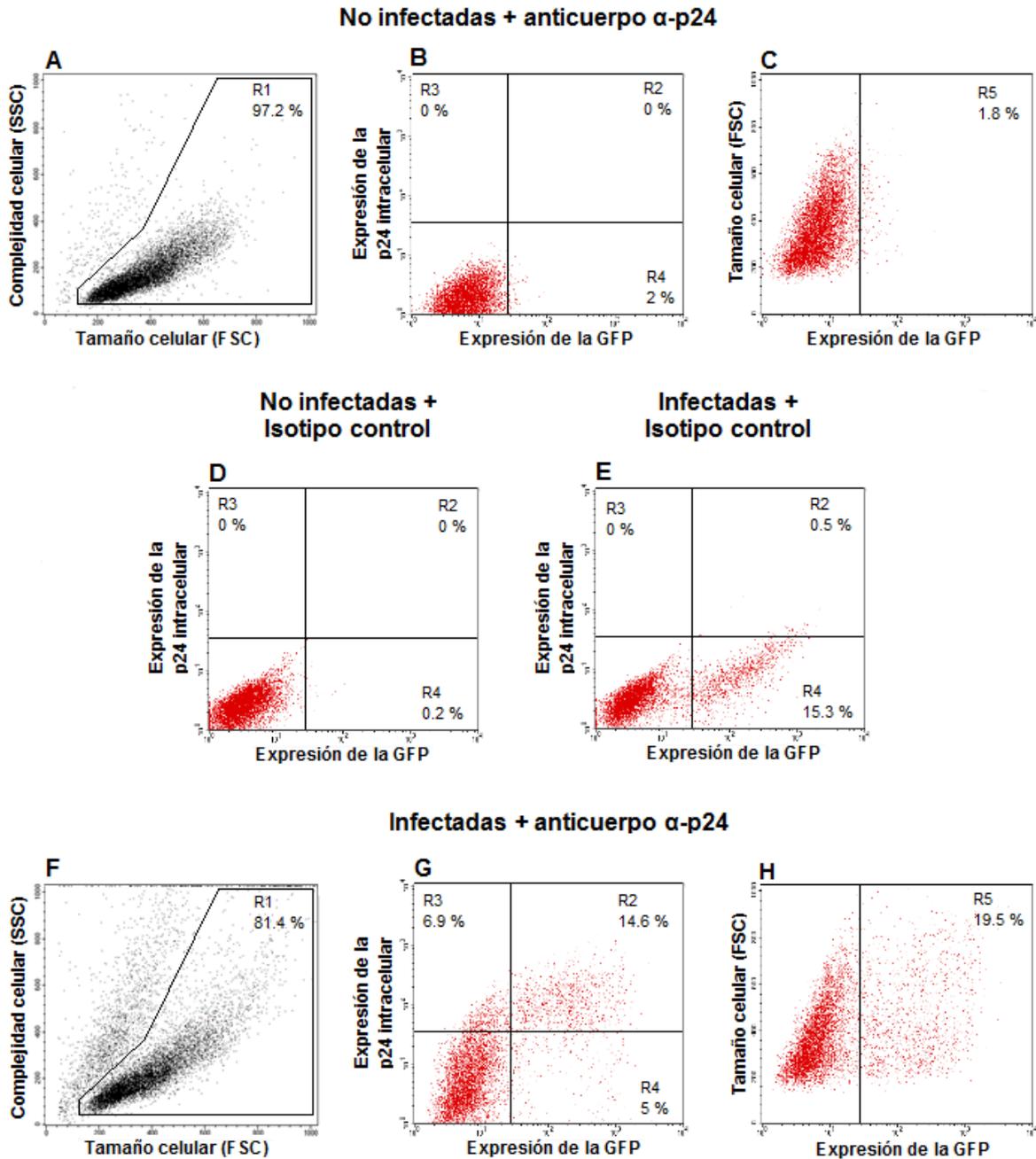


Figura 8. Las gráficas de puntos mostradas son representativas de cultivos no infectados e infectados incubados con la dilución 1:300 de los anticuerpos  $\alpha$ -p24 o isotipo control. Las regiones R1 pertenecen a los eventos tomados como células viables y a partir de éstas regiones se construyeron las gráficas de puntos rojos. Las regiones R3 corresponden a las células p24<sup>+</sup> GFP<sup>-</sup>, las regiones R4 corresponden a las células p24<sup>-</sup> GFP<sup>+</sup>, las regiones R2 corresponden a las células p24<sup>+</sup> GFP<sup>+</sup> y las regiones R5 corresponden a las células GFP<sup>+</sup> totales (células infectadas totales). Los porcentajes de las regiones se muestran en cada gráfica. Se infectaron  $1.5 \times 10^6$  células JLTRG/tubo por 3 días con una MOI de 0.02, utilizando polibreno a una concentración final de  $0.003 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ , incubando por 2 horas y media (resuspendiendo cada 30 minutos).

### VII.5 Comparación de la infección de un sobrenadante viral concentrado (por ultrafiltración) y no concentrado de la cepa IIIB.

Para la formación de sincicios, se estableció que la relación entre células infectadas y no infectadas en el cocultivo fuera de 1:1, por lo que fue necesario que el porcentaje de células GFP<sup>+</sup> fuera alto para aumentar la probabilidad de que una célula no infectada se encontrara con una infectada. Para aumentar este porcentaje de infección se concentró el sobrenadante viral de la cepa IIIB del VIH-1 por ultrafiltración y se comparó la infección con un sobrenadante viral no concentrado de la misma cepa al día 2 y 3 de infección.

En la **figura 9** se muestran las gráficas de puntos representativas de un cultivo no infectado, un cultivo infectado por 3 días con un sobrenadante viral sin diluir y un cultivo infectado con un sobrenadante viral concentrado. Ambos cultivos infectados presentaron un aumento de los restos celulares, del tamaño y de la granularidad celular, así como de la intensidad de fluorescencia de la GFP, aunque el sobrenadante concentrado presenta un índice de la IMF de GFP mayor que el no concentrado (**figura 6 de los anexos**).

Las gráficas de la **figura 10** muestran una cinética de infección por 2 y 3 días con diferentes diluciones de los sobrenadantes virales. Se puede observar que el porcentaje de infección con el sobrenadante concentrado es mayor al porcentaje de infección con el sobrenadante no concentrado. En ambos casos, la progresión de la infección aumenta de manera lineal ( $R^2$  mayor a 0.9).

La titulación viral se calculó en el día 2 de infección. Para el cultivo infectado con el sobrenadante no concentrado se obtuvo un título viral de  $1.5 \times 10^4$  UI/ml, y para el cultivo infectado con el sobrenadante viral concentrado por ultrafiltración se obtuvo un título viral de  $1.2 \times 10^6$  UI/ml.

Se puede observar en la **figura 11** que los porcentajes de viabilidad celular de los cultivos infectados con el sobrenadante viral no concentrado mantienen una viabilidad mayor a 85 % en todos los casos de infección. Por otro lado, la viabilidad de los cultivos infectados con el sobrenadante concentrado decae al día 2, pero se mantiene mayor a 70 %, y al día 3 se comienza a recuperar. A pesar de que el porcentaje de viabilidad decayó más en los cultivos infectados con el sobrenadante concentrado, la importancia se le dio al porcentaje de infección, por lo que se siguió utilizando para los siguientes experimentos la concentración por ultrafiltración.

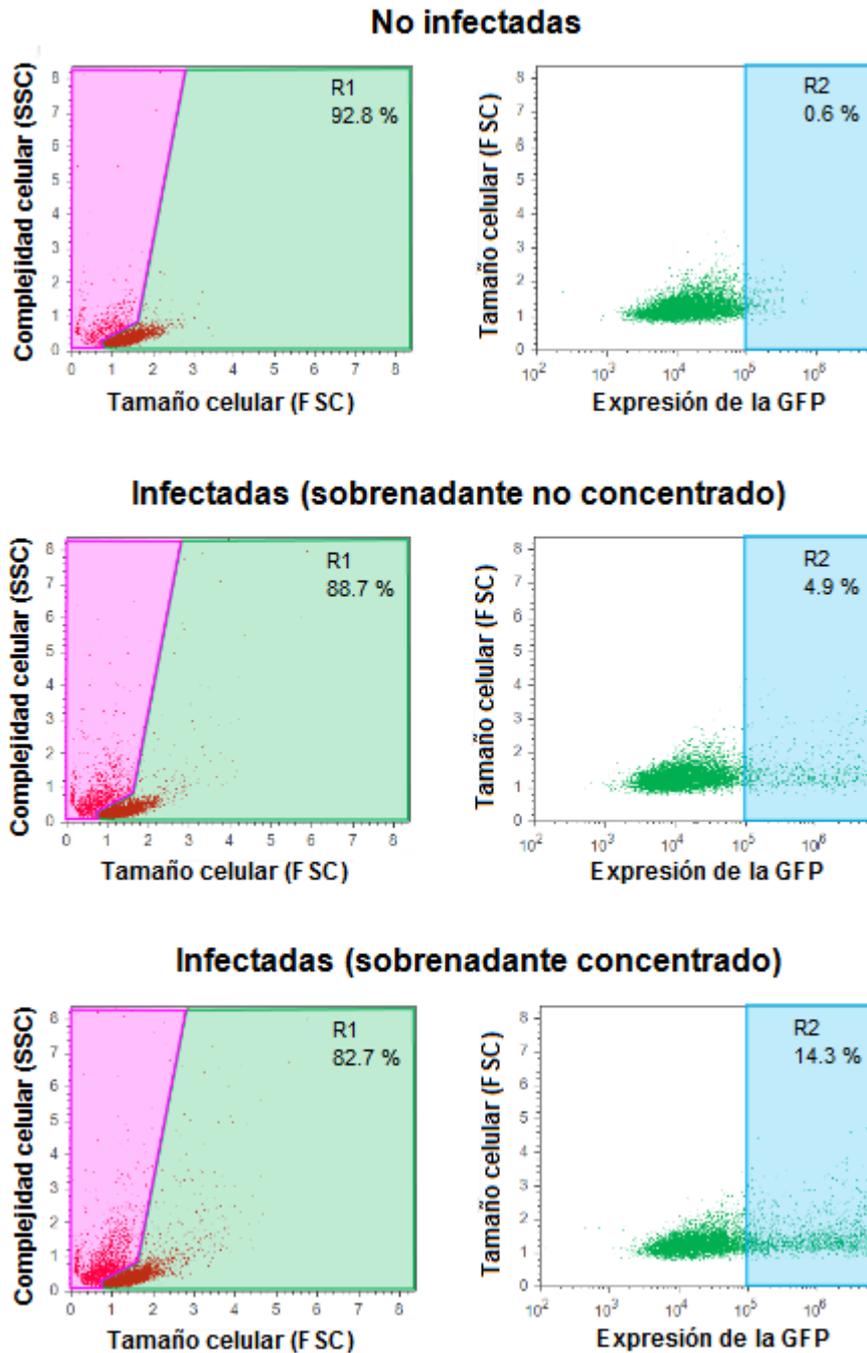


Figura 9. Las gráficas de puntos mostradas son representativas de cultivos no infectados e infectados de JLTRG por 3 días con un sobrenadante viral no concentrado (MOI de 0.015) y un sobrenadante concentrado por ultrafiltración (MOI de 0.06). Las regiones R1 pertenecen a los eventos tomados como células viables y a partir de éstas regiones se construyeron las gráficas de la derecha. Las regiones R2 corresponden a las células GFP<sup>+</sup> (células infectadas). Los porcentajes de las regiones se muestran en cada gráfica. Se infectaron  $1 \times 10^6$  células JLTRG/tubo utilizando polibreno a una concentración final de 0.005  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , incubando por 2 horas y media (resuspendiendo cada 30 minutos).

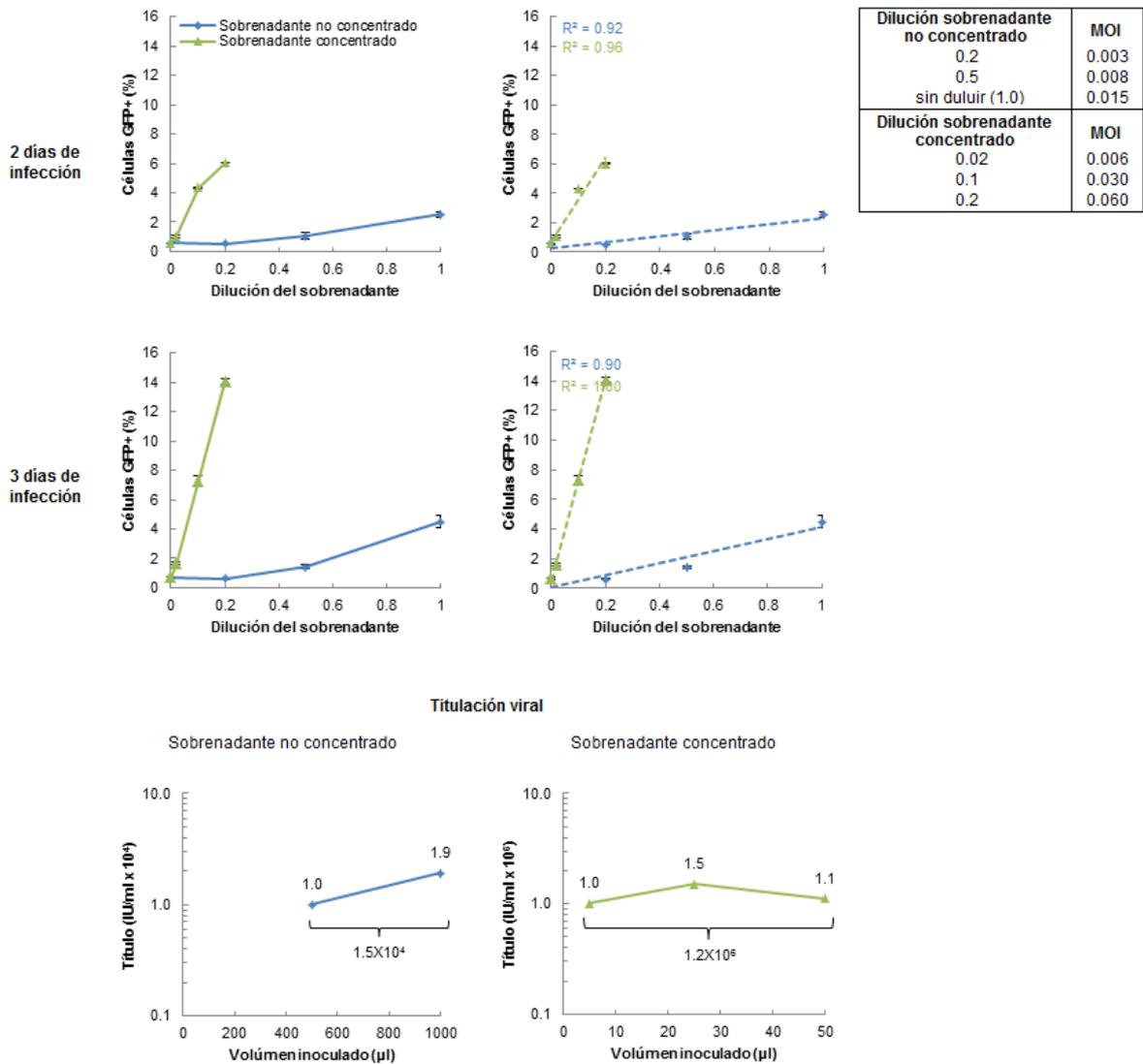


Figura 10. Gráficas en escala lineal del porcentaje de células GFP<sup>+</sup> (células infectadas) con sus respectivas regresiones lineales y titulación viral. El porcentaje de células GFP<sup>+</sup> se obtuvo a partir de cuántos eventos de las regiones R1 (figura 9) presentaron la señal de la GFP. El cero en el eje x corresponde al control no infectado. Se muestra la desviación promedio de dos experimentos independientes. Los cultivos de JLTRG se infectaron por 2 y 3 días con un sobrenadante viral no concentrado y concentrado por ultrafiltración. Del sobrenadante no concentrado se utilizaron MOIs de 0.003, 0.008 y 0.015, y del sobrenadante concentrado se utilizaron MOIs de 0.006, 0.030 y 0.060. Se infectaron 1X10<sup>6</sup> células JLTRG/tubo utilizando polibreno a una concentración final de 0.005 µg/µl, incubando por 2 horas y media (resuspendiendo cada 30 minutos). La titulación viral se calculó para el día 2 de infección

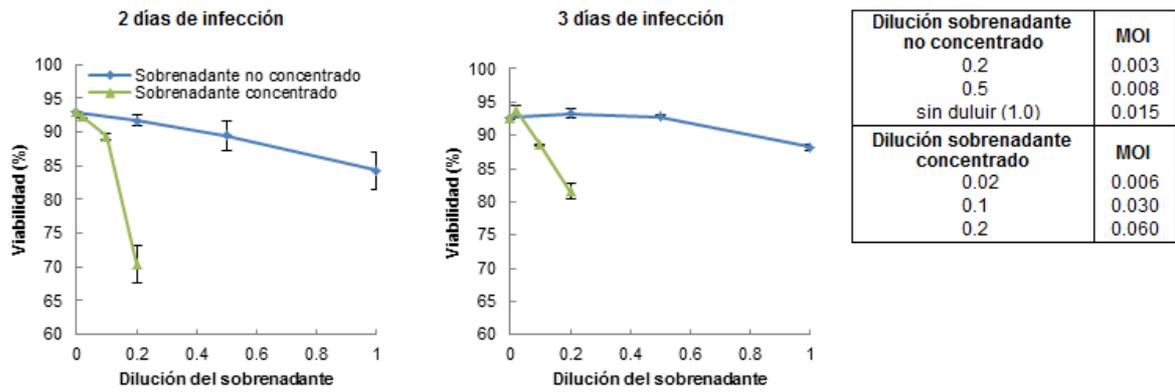


Figura 11. Gráficas en escala lineal del porcentaje de viabilidad celular por citometría de flujo. El porcentaje de viabilidad se obtuvo a partir del número de eventos de las regiones R1 (figura 9) respecto a los eventos totales. El cero en el eje x corresponde al control no infectado. Se muestra la desviación promedio de dos experimentos independientes. Los cultivos de JLTRG se infectaron por 2 y 3 días con un sobrenadante no concentrado y concentrado por ultrafiltración. Del sobrenadante no concentrado se utilizaron MOIs de 0.003, 0.008 y 0.015, y del sobrenadante concentrado se utilizaron MOIs de 0.006, 0.030 y 0.060. Se infectaron  $1 \times 10^6$  células JLTRG/tubo utilizando polibreno a una concentración final de  $0.005 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ , incubando por 2 horas y media (resuspendiendo cada 30 minutos).

## VII.6 Titulación de un sobrenadante viral de la cepa IIB concentrado por ultrafiltración

Al obtener mayor porcentaje de infección con el sobrenadante viral concentrado por ultrafiltración se decidió realizar la titulación del sobrenadante que se iba a utilizar para los experimentos de formación de sincicios. Las células JLTRG se infectaron por 2 días con la cepa viral IIB del VIH-1 utilizando un sobrenadante concentrado por ultrafiltración con diferentes diluciones.

En la **figura 12** se muestran las gráficas de puntos representativas de un cultivo no infectado y un cultivo infectado por 2 días con una MOI de 0.3. El aumento de la intensidad de fluorescencia de la GFP y del tamaño y de la granularidad celular en el cultivo infectado no causó un aumento de los restos celulares.

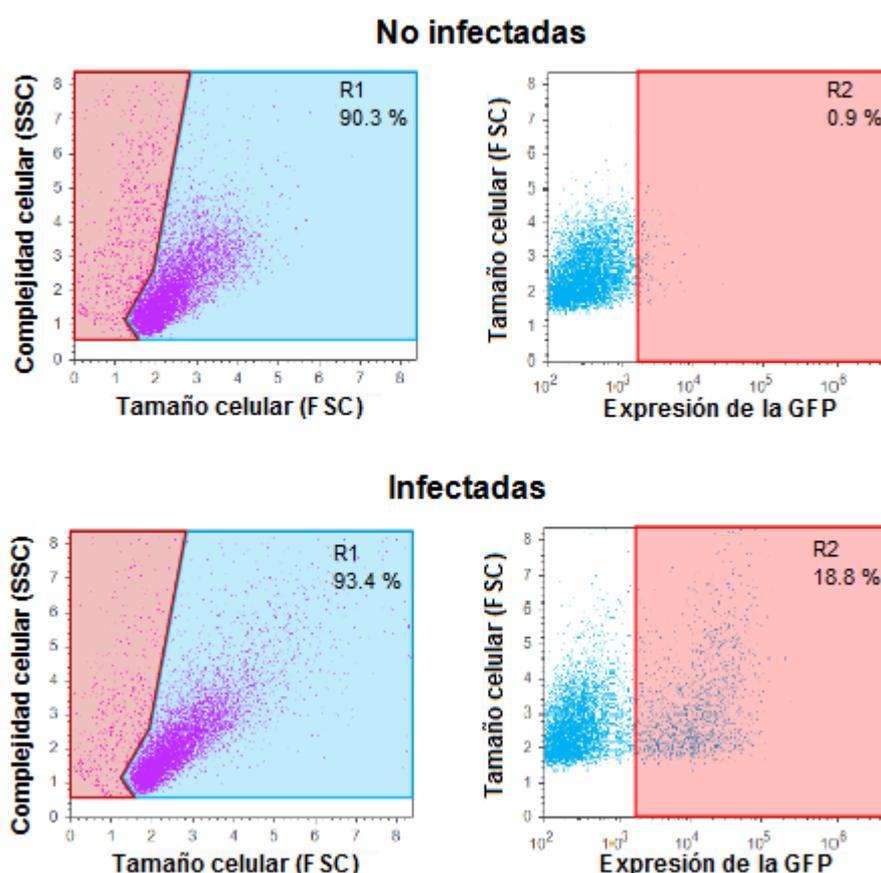


Figura 12. Las gráficas de puntos mostradas son representativas de un cultivo no infectado y un cultivo infectado de JLTRG por 2 días con un sobrenadante concentrado por ultrafiltración (MOI de 0.3). Las regiones R1 pertenecen a los eventos tomados como células viables y a partir de éstas regiones se construyeron las gráficas de la derecha. Las regiones R2 corresponden a las células GFP<sup>+</sup> (células infectadas). Los porcentajes de las regiones se muestran en cada gráfica. Se infectaron 1X10<sup>6</sup> células JLTRG/tubo utilizando polibreno a una concentración final de 0.008 µg/µl, incubando por 2 horas y media (resuspendiendo cada 20 minutos las primeras 2 horas y dejando la última media hora sin resuspender).

Las gráficas de la **figura 13** muestran la infección por 2 días con diferentes diluciones del sobrenadante viral concentrado y se observa que la infección tiene una correlación lineal ( $R^2$  de 0.96). El mayor porcentaje de células GFP<sup>+</sup> fue de 18.7 % con una MOI de 0.3. Por más que se aumentó la concentración del sobrenadante viral, la IMF de GFP ya no aumentó (**figura 7 de los anexos**).

Se obtuvo  $1.2 \times 10^6$  UI/ml en la titulación viral al día dos de infección. En cuanto a la viabilidad celular de los cultivos infectados, el porcentaje se mantuvo arriba de 90 %.

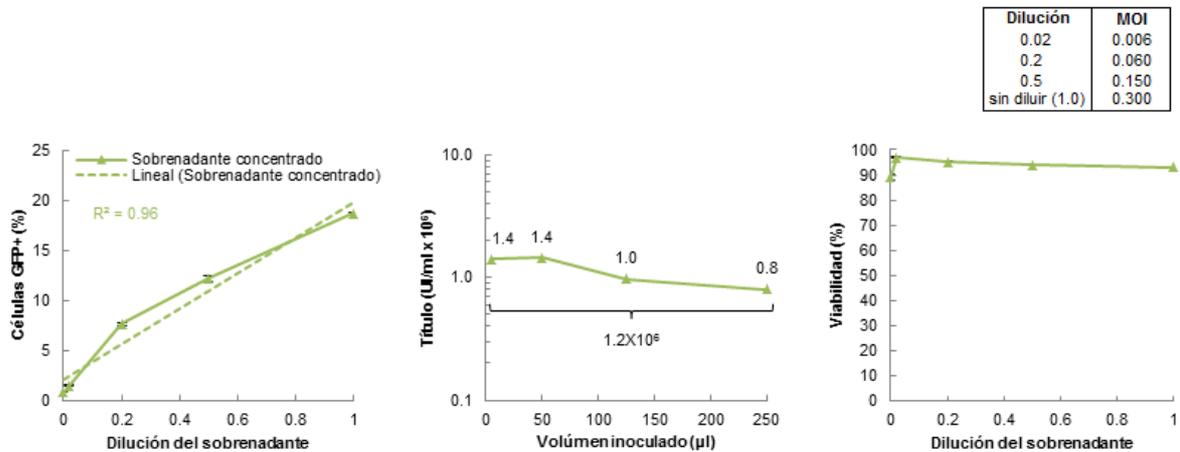


Figura 13. Gráficas en escala lineal del porcentaje de células GFP<sup>+</sup> (células infectadas) con su regresión lineal, titulación viral y porcentaje de viabilidad celular por citometría de flujo. El porcentaje de viabilidad se obtuvo a partir del número de eventos en las regiones R1 (figura 12), respecto a los eventos totales, y a partir de éstas se obtuvo el porcentaje de células que presentaron la señal de la GFP. El cero en el eje x corresponde al control no infectado. Se muestra la desviación promedio de dos experimentos independientes. Los cultivos de JLTRG se infectaron por 2 días con un sobrenadante concentrado por ultrafiltración y se utilizaron MOIs de 0.006, 0.06, 0.15, 0.3. Se infectaron  $1 \times 10^6$  células JLTRG/tubo utilizando polibreno a una concentración final de  $0.008 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ , incubando por 2 horas y media (resuspendiendo cada 20 minutos las primeras 2 horas y dejando la última media hora sin resuspender).

## VII.7 Formación de sincicios por 24 horas

Además de que los cultivos de JLTRG se infectaron de manera eficiente con la cepa viral IIIB del VIH-1 y su viabilidad no decayó después de la infección, se detectaron sincicios por el microscopio invertido. Para poder detectar estos sincicios formados mediante citometría de flujo, fue necesario marcar un grupo de células JLTRG con el fluorocromo DiD y otro grupo de células JLTRG con el fluorocromo Dil. Al día siguiente del marcaje, las células-Dil se infectaron por 2 y 3 días con una MOI de 0.06 utilizando un sobrenadante concentrado por ultrafiltración. A los 2 y 3 días de infección se colocaron los cocultivos de células-DiD y células infectadas-Dil en una proporción 1:1. Los cocultivos se analizaron a las 24 horas y los sincicios se detectaron como células con fluorescencia mixta (Dil-DiD).

Las gráficas de puntos de la **figura 14** son representativas de un cocultivo sin infección, un cocultivo con infección por 3 días (54.2 % de células Dil-GFP<sup>+</sup>) y un cocultivo con infección con T-20 (55 % de células Dil-GFP<sup>+</sup>) agregado antes de colocar en cocultivo las células DiD. No se observa un aumento de los restos celulares del cocultivo con infección (región R1), pero sí del tamaño y de la granularidad celular (región R1), así como de la intensidad de fluorescencia de la GFP (región R2), además se observa una población que presentó ambos fluorocromos Dil y DiD (células con fluorescencia mixta, región R3). Como se puede observar, esta población se encuentra recorrida hacia la derecha debido a que la intensidad de fluorescencia del fluorocromo DiD aumentó, esto se explicaría por la transferencia de energía entre fluorocromos (FRET). A diferencia de lo anterior, en el cocultivo con T-20 no se observó esta población con fluorescencia mixta (región R3) ni el aumento del tamaño y de la granularidad (región R1), además el porcentaje de células GFP<sup>+</sup> es menor al del cocultivo con infección sin T-20, esto indica que se logró un arresto de la infección (el porcentaje que se observa corresponde a la infección antes de la adición del T-20, región R2).

En la parte superior de la **figura 15** se presentan las gráficas de barras mostrando el porcentaje de fusión (izquierda) en los cocultivos (porcentaje de células con fluorescencia mixta, región R3 de la **figura 14**) y el porcentaje de sincicios GFP<sup>+</sup> (derecha). El cocultivo sin infección presentó al día 2 1.4 % de células con fluorescencia mixta y 1.2 % al día 3, estos porcentajes corresponden a agregados. En el cocultivo con infección con T-20 se observa que el porcentaje de células con fluorescencia mixta se mantiene entre 0.9 % al día 2 y 0.7 % al día 3 de infección, de igual manera estos porcentajes corresponden a agregados. Los porcentajes de fusión que se muestran para el cocultivo con infección sin T-20 corresponden a sincicios, de manera que se obtuvo 3.9 % al día 2 y 7 % al día 3 de infección. De estos porcentajes de fusión (sincicios) al día 2 de infección, 63.6 % fueron GFP<sup>+</sup> y al día 3 prácticamente todos los sincicios fueron GFP<sup>+</sup> (94.1 %). El porcentaje de

células con fluorescencia mixta GFP<sup>+</sup> correspondería a agregados de células-Dil GFP<sup>+</sup> con células-DiD no infectadas.

Las gráficas de puntos que se muestran en la parte inferior de la **figura 15** son representativas de las poblaciones del cocultivo con infección sin T-20 (células marcadas con el fluorocromo Dil y sincicios) al día 3 y se observa que solo los sincicios (población de células con fluorescencia mixta) presentaron un aumento del tamaño y de la granularidad celular. El porcentaje de viabilidad celular de las poblaciones de los cocultivos se mantuvo arriba de 90 % (datos no mostrados).

Para apreciar el efecto del FRET se graficó la IMF del fluorocromo DiD de las poblaciones del cocultivo con infección (células marcadas con el fluorocromo DiD y sincicios). Se observa en la **figura 16** que los sincicios, en ambos días, presentaron un aumento de la IMF del fluorocromo DiD.

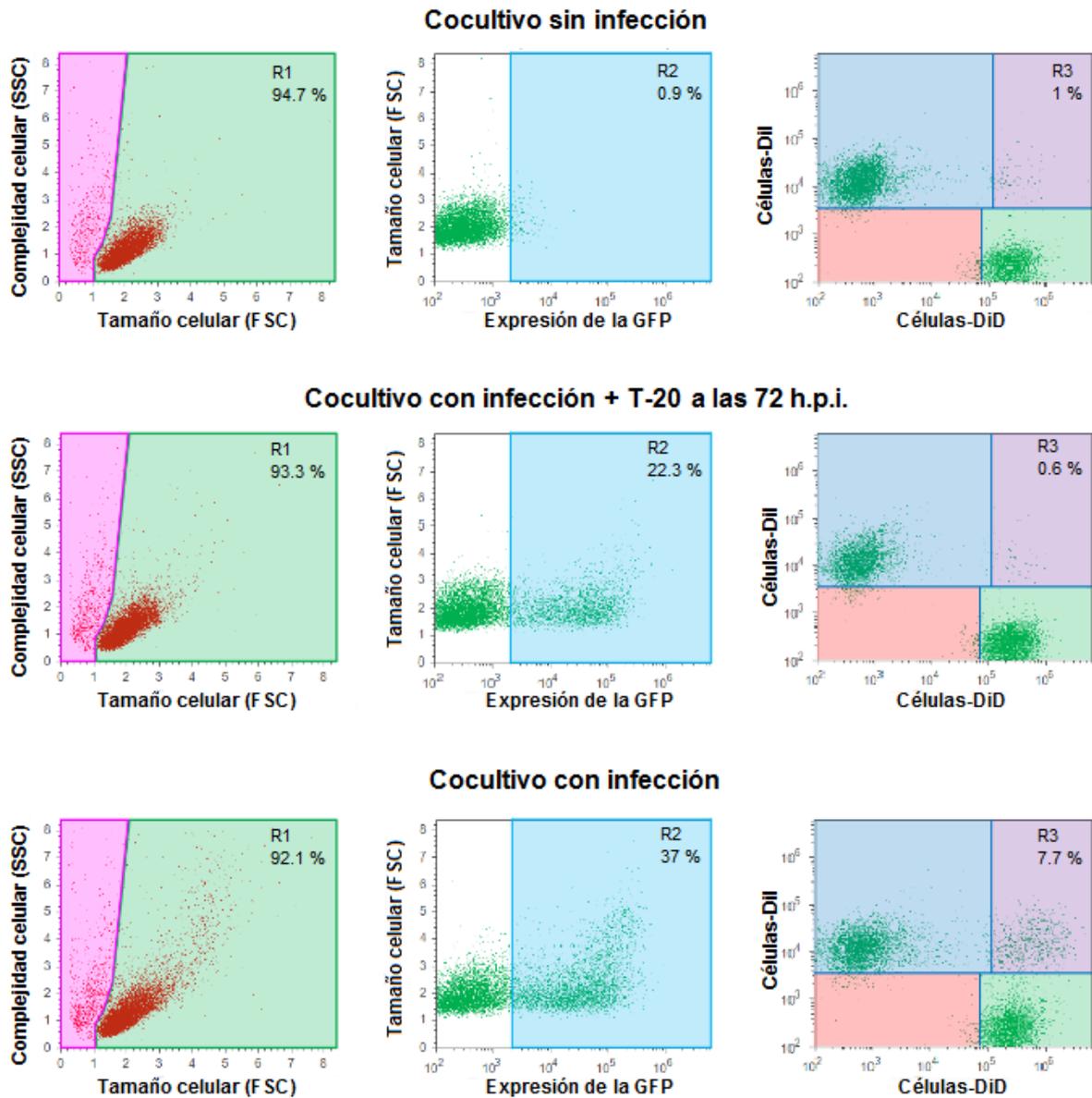


Figura 14. Las gráficas de puntos mostradas son representativas de cocultivos de 24 horas. Las regiones R1 pertenecen a los eventos tomados como células viables y a partir de éstas regiones se construyeron las gráficas de IF. Las regiones R2 corresponden a las células GFP<sup>+</sup> totales (células infectadas totales) y las regiones R3 corresponden a las células con fluorescencia mixta. Los porcentajes de las regiones se muestran en cada gráfica. Las células-DiI se infectaron con una MOI de 0.06 utilizando un sobrenadante concentrado por ultrafiltración. Los cocultivos se colocaron cuando las células-DiI cumplieron 3 días de infección y se dejaron por 24 horas. El T-20 fue agregado antes de colocar en cocultivo las células DiD (a las 72 h.p.i) a una concentración final de 0.047  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (dilución 1:1000 del stock original). Se infectaron  $2 \times 10^6$  células JLTRG/tubo utilizando polibreno a una concentración final de 0.008  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , incubando por 2 horas y media (resuspendiendo cada 20 minutos las primeras 2 horas y dejando la última media hora sin resuspender).

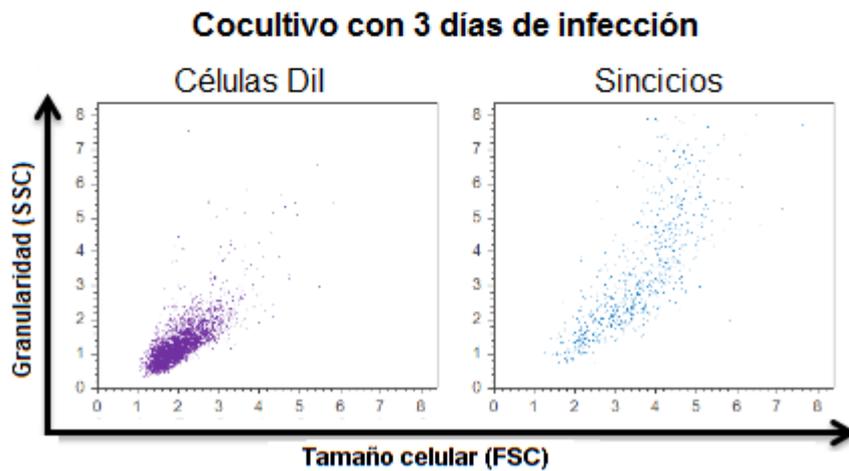
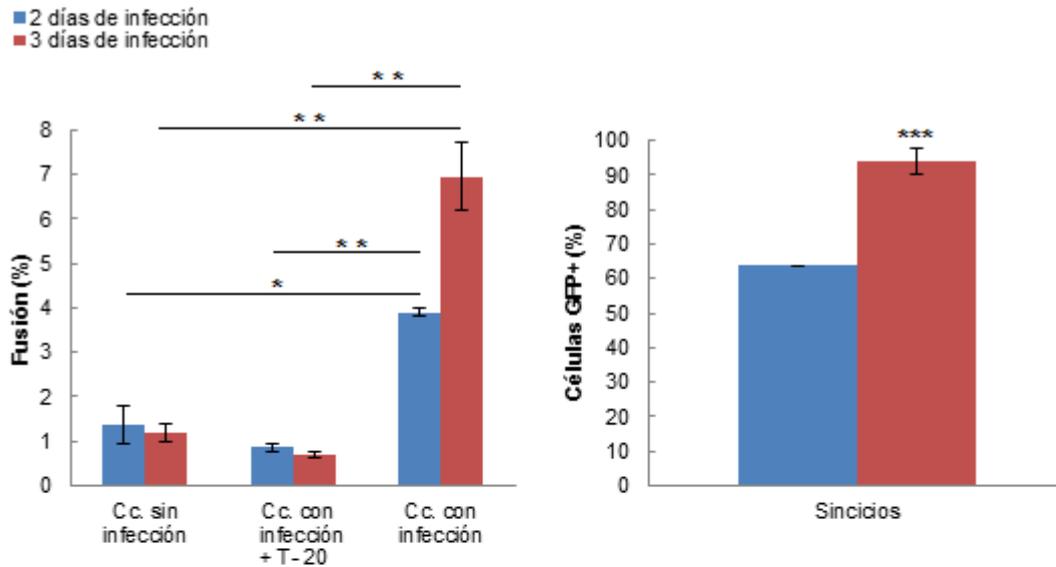


Figura 15. Gráficas de barras mostrando el porcentaje de fusión (izquierda) en los cocultivos y el porcentaje de sincicios GFP<sup>+</sup> (derecha). El porcentaje de fusión se obtuvo a partir del porcentaje de células con fluorescencia mixta correspondiente a las regiones R3 (figura 14) y el porcentaje de sincicios GFP<sup>+</sup> se obtuvo a partir del porcentaje de células de la región R3 (figura 14) que presentó la señal de la GFP. Se muestra la desviación promedio de dos experimentos independientes. Para el porcentaje de fusión, el valor *P* se obtuvo con una prueba de ANOVA de una vía seguida de una prueba de Tukey, \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01; para el porcentaje de células GFP<sup>+</sup>, el valor de *P* se obtuvo con una prueba de *t* de student (una cola), \*\*\**P* < 0.001. Las gráficas de puntos mostradas en la parte inferior representan a las poblaciones del cocultivo con infección al día 3. Las células-Dil se infectaron con una MOI de 0.06 utilizando un sobrenadante concentrado por ultrafiltración. Los cocultivos se colocaron cuando las células-Dil cumplieron 2 y 3 días de infección y se dejaron por 24 horas. El T-20 fue agregado antes de colocar en cocultivo las células DiD (a las 48 y 72 h.p.i) a una concentración final de 0.047 µg/µl (dilución 1:1000 del stock original). Se infectaron 2X10<sup>6</sup> células JLTRG/tubo utilizando polibreno a una concentración final de 0.008 µg/µl, incubando por 2 horas y media (resuspendiendo cada 20 minutos las primeras 2 horas y dejando la última media hora sin resuspender). (Cc.: cocultivo; h.p.i: horas post-infección)

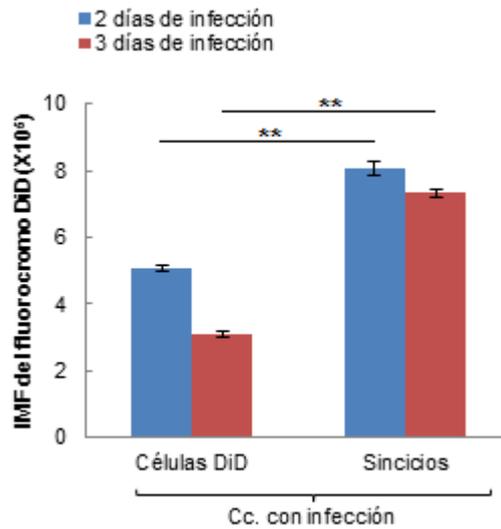


Figura 16. Gráfica de barras mostrando la IMF del fluorocromo DiD. Se muestra la desviación promedio de dos experimentos independientes. El valor  $P$  se obtuvo con una prueba de  $t$  de student (una cola),  $**P < 0.01$ . Las células-DiI se infectaron con una MOI de 0.06 utilizando un sobrenadante concentrado por ultrafiltración. Los cocultivos se colocaron cuando las células-DiI cumplieron 2 y 3 días de infección y se dejaron por 24 horas. El T-20 fue agregado antes de colocar en cocultivo las células DiD (a las 48 y 72 h.p.i.) a una concentración final de  $0.047 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  (dilución 1:1000 del stock original). Se infectaron  $2 \times 10^6$  células JLTRG/tubo utilizando polibreno a una concentración final de  $0.008 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ , incubando por 2 horas y media (resuspendiendo cada 20 minutos las primeras 2 horas y dejando la última media hora sin resuspender). (Cc.: cocultivo; h.p.i: horas post-infección)

## VII.8 Cinética de fusión con células infectadas durante 3 días

Debido a que se obtuvo un mayor porcentaje de fusión al realizar cocultivos con células infectadas durante 3 días, se decidió ese tiempo de infección y realizar una cinética de fusión de 24, 48 y 72 horas. Además, se permitió la formación de sincicios por 24 horas y se añadió T-20 a las 96 h.p.i para impedir que se formaran más sincicios o que se siguieran incorporando células, esto se realizó con la finalidad de observar la viabilidad y la actividad transcripcional del VIH-1 en estos sincicios.

En la **figura 17** se muestran las gráficas de puntos representativas de un cocultivo sin infección, un cocultivo con infección y T-20 (agregado antes de poner en cocultivo las células-DiD), un cocultivo de 48 horas con infección y un cocultivo de 48 horas con infección y T-20 a las 96 h.p.i (24 horas después de haber colocado el cocultivo). Se puede observar que en los cocultivos con infección los restos celulares no aumentaron (región R1) y se aprecia un aumento del tamaño y de la granularidad celular (región R1) en el cocultivo con infección sin T-20 y con T-20 a las 96 h.p.i., así como de la intensidad de fluorescencia de la GFP (región R2) y del porcentaje de células con fluorescencia mixta (región R3). En el cocultivo con infección y T-20, el porcentaje de células GFP<sup>+</sup> (región R2) que se observa corresponde a la infección de 3 días y no aumenta debido a la presencia del T-20, lo mismo ocurre con el porcentaje de agregados (células con fluorescencia mixta) (región R3) que se mantiene similar al del cocultivo sin infección.

En la **figura 18** se muestra en la parte superior izquierda el porcentaje de fusión (porcentaje de células con fluorescencia mixta, región R3 de la **figura 17**) de los cocultivos sin infección, con infección con T-20, sin T-20 y con T-20 a las 96 h.p.i. En este experimento se presentó un alto porcentaje de agregados tanto en el cocultivo sin infección como en el cocultivo con infección y T-20, aunque si hay una diferencia respecto al porcentaje de fusión del cocultivo con infección sin T-20 a las 24 horas de cocultivo. No hay una diferencia en el porcentaje de fusión entre los cocultivos infectados de 24 y de 48 horas (4.7 % y 5.1 %, respectivamente), y a las 72 horas disminuyó a 2.5 %, siendo similar a los porcentajes de agregados. En el cocultivo con T-20 a las 96 h.p.i, el porcentaje de fusión fue de 4 % a las 48 horas de cocultivo y no hay una diferencia respecto al porcentaje de agregados, y a las 72 horas de cocultivo este porcentaje decayó a 1.4 %. Tampoco hay una diferencia significativa entre el porcentaje de fusión de los sincicios sin T-20 y con T-20 a los tres tiempo de cocultivo. En la gráfica superior derecha de la **figura 18** se muestra el porcentaje de sincicios GFP<sup>+</sup> de los cocultivos infectados sin T-20 y con T-20 a las 96 h.p.i., resultando que más del 80 % de los sincicios formados presentaron la GFP, a excepción de los sincicios de 72 horas con T-20 a las 96 h.p.i., los cuales presentaron una disminución del porcentaje de sincicios GFP<sup>+</sup> respecto a los sincicios de 48 horas con T-20 a las 96 h.p.i.

Las gráficas de puntos que se muestran en la parte inferior de la **figura 18** son representativas de las poblaciones de células-DiI y sincicios de los cocultivos de 48 horas con infección sin T-20 y con T-20 a las 96 h.p.i., y se observa que solo los sincicios presentaron un aumento del tamaño y de la granularidad celular.

Las gráficas de barras de la **figura 19** muestran la IMF de la GFP en los sincicios (izquierda) y su porcentaje de viabilidad celular (derecha). Se observa que hubo un aumento de la IMF de la GFP en los sincicios con T-20 a las 96 h.p.i. respecto a los sincicios sin T-20, siendo mayor este aumento a las 72 horas de cocultivo. La viabilidad de los sincicios de los cocultivos de 24 horas se mantuvo arriba de 80 %, y conforme aumentaron las horas de cocultivo este porcentaje comenzó a decaer hasta aproximadamente 60 % a las 72 horas de cocultivo.

Al igual que en la **figura 16**, solo los sincicios mostraron un aumento de la IMF del fluorocromo DiD (**figura 20**).

En la **figura 21** se muestran fotografías de sincicios y la inhibición de la fusión celular con T-20 en los cocultivos de 48 horas infectados por 3 días. Se puede observar que los sincicios son de diferentes tamaños y se observa que los sincicios comienzan a morir en el cocultivo con T-20 a las 96 h.p.i. En el cocultivo con T-20 a las 72 h.p.i. se observa una completa inhibición de la fusión celular.

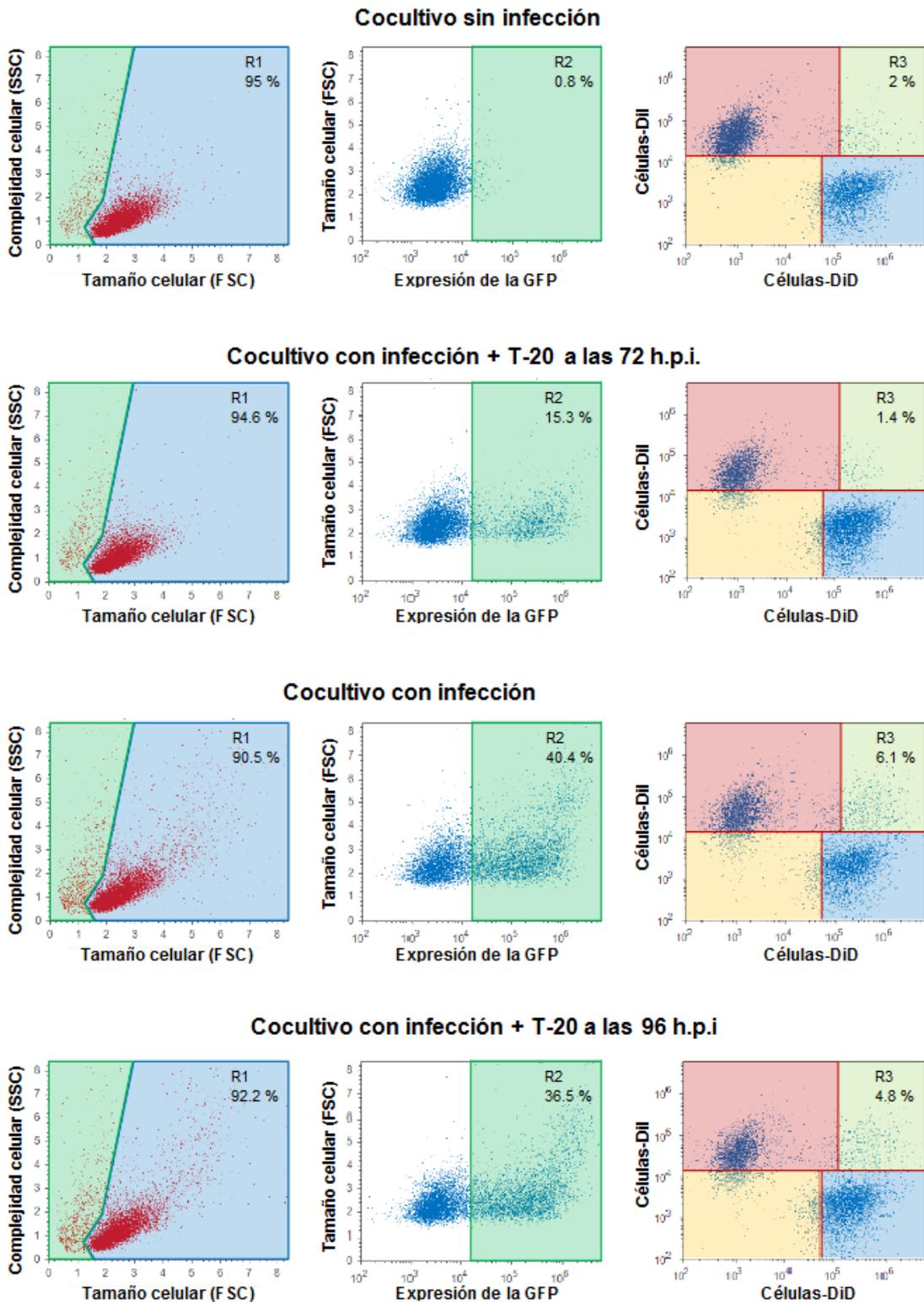
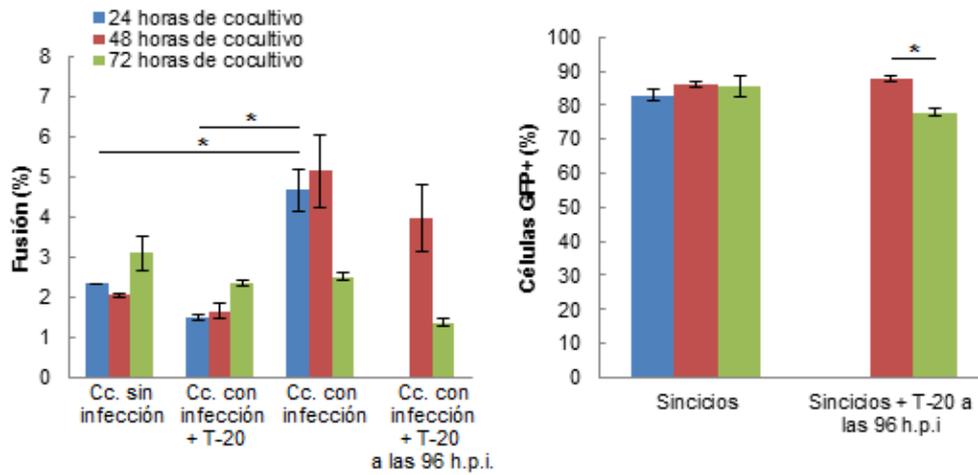
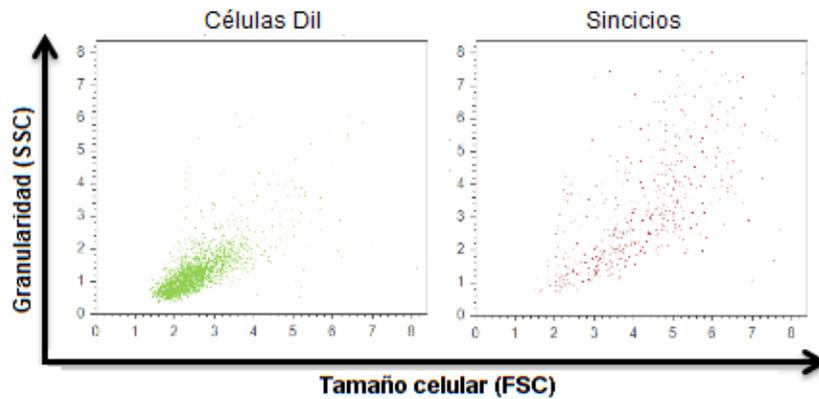


Figura 17. Las gráficas de puntos mostradas son representativas de cocultivos de 48 horas. Las regiones R1 pertenecen a los eventos tomados como células viables y a partir de éstas regiones se construyeron las gráficas de IF. Las regiones R2 corresponden a las células GFP<sup>+</sup> totales (células infectadas totales) y las regiones R3 corresponden a las células con fluorescencia mixta. Los porcentajes de las regiones se muestran en cada gráfica. Las células-DiI se infectaron con una MOI de 0.06 utilizando un sobrenadante concentrado por ultrafiltración. Los cocultivos se colocaron cuando las células-DiI cumplieron 3 días de infección y se dejaron por 48 horas. El T-20 se utilizó a una concentración final de 0.047  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (dilución 1:1000 del stock original), se agregó antes de colocar en cocultivo las células DiD (72 h.p.i.) y para detener la formación de sincicios a las 24 horas de cocultivo, el T-20 fue agregado a las 96 h.p.i. Se infectaron  $2.5 \times 10^6$  células JLTRG/tubo utilizando polibreno a una concentración final de 0.008  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , incubando por 2 horas y media (resuspendiendo cada 20 minutos las primeras 2 horas y dejando la última media hora sin resuspender).



### Cocultivos de 48 horas

#### Cocultivo con infección



#### Cocultivo con infección + T-20 a las 96 h.p.i.

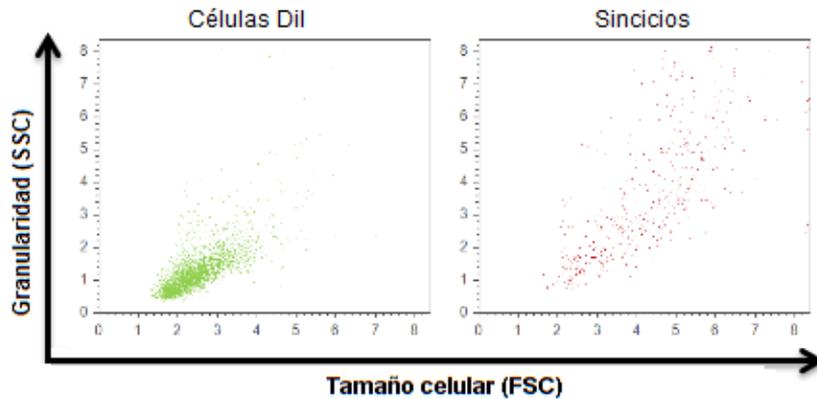


Figura 18. Gráficas de barras mostrando el porcentaje de fusión (izquierda) en los cocultivos y el porcentaje de sincicios GFP<sup>+</sup> (derecha). El porcentaje de fusión se obtuvo a partir del porcentaje de células con fluorescencia mixta correspondiente a las regiones R3 (figura 17) y el porcentaje de sincicios GFP<sup>+</sup> se obtuvo a partir del porcentaje de células de la región R3 (figura 17) que presentó la señal de la GFP. Se muestra la desviación promedio de dos experimentos independientes. El valor *P* se obtuvo con una prueba de ANOVA de una vía seguida de una prueba de Tukey, \**P* < 0.05. Las gráficas de puntos mostradas en la parte inferior representan a las células-DiI y sincicios de los cocultivos de 48 horas con infección. Las células-DiI se infectaron con una MOI de 0.06 utilizando un sobrenadante concentrado por ultrafiltración. Los cocultivos se colocaron cuando las células-DiI cumplieron 3 días de infección y se dejaron por 24, 48 y 72 horas. El T-20 se utilizó a una concentración final de 0.047 µg/µl (dilución 1:1000 del stock original), se agregó antes de colocar en cocultivo las células DiI (a las 72 h.p.i.) y para detener la formación de sincicios a las 24 horas de cocultivo, el T-20 fue agregado a las 96 h.p.i. Se infectaron 2.5X10<sup>6</sup> células JLTRG/tubo utilizando polibreno a una concentración final de 0.008 µg/µl, incubando por 2 horas y media (resuspendiendo cada 20 minutos las primeras 2 horas y dejando la última media hora sin resuspender). (Cc.: cocultivo; h.p.i: horas post-infección)

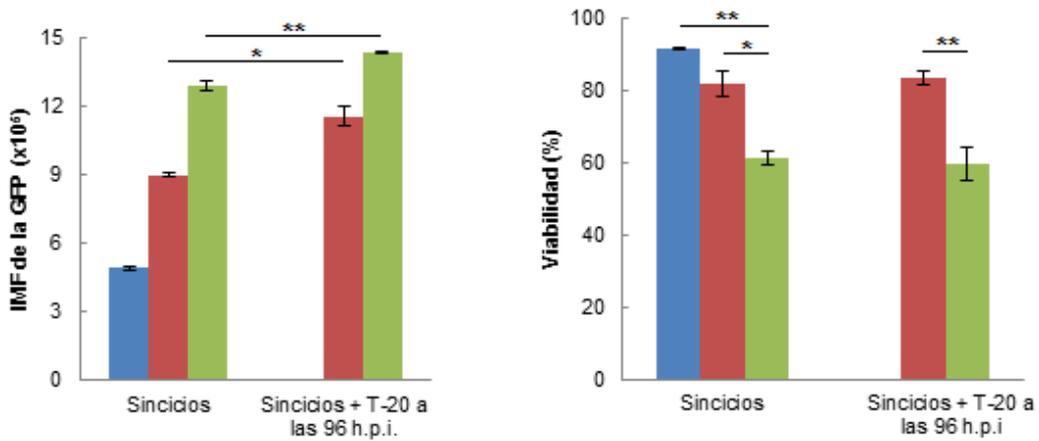


Figura 19. Gráficas de barras mostrando la IMF de la GFP en los sincicios (izquierda) y su porcentaje de viabilidad celular por citometría de flujo (derecha). La IMF de la GFP en los sincicios se obtuvo a partir de la región R3 (figura 17). El porcentaje de viabilidad celular se obtuvo a partir del número de eventos de las regiones R1 (figura 17) respecto a los eventos totales. Se muestra la desviación promedio de dos experimentos independientes. Para el porcentaje de viabilidad, el valor  $P$  se obtuvo con una prueba de ANOVA de una vía seguida de una prueba de Tukey,  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ; para la IMF de la GFP, el valor  $P$  se obtuvo con una prueba de  $t$  de student (una cola),  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ . Las células-Dil se infectaron con una MOI de 0.06 utilizando un sobrenadante concentrado por ultrafiltración. Los cocultivos se colocaron cuando las células-Dil cumplieron 3 días de infección y se dejaron por 24, 48 y 72 horas. El T-20 se utilizó a una concentración final de 0.047  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (dilución 1:1000 del stock original), se agregó antes de colocar en cocultivo las células DiD (a las 72 h.p.i.) y para detener la formación de sincicios a las 24 horas de cocultivo, el T-20 fue agregado a las 96 h.p.i. Se infectaron  $2.5 \times 10^6$  células JLTRG/tubo utilizando polibreno a una concentración final de 0.008  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , incubando por 2 horas y media (resuspendiendo cada 20 minutos las primeras 2 horas y dejando la última media hora sin resuspender). (Cc.: cocultivo; h.p.i: horas post-infección)

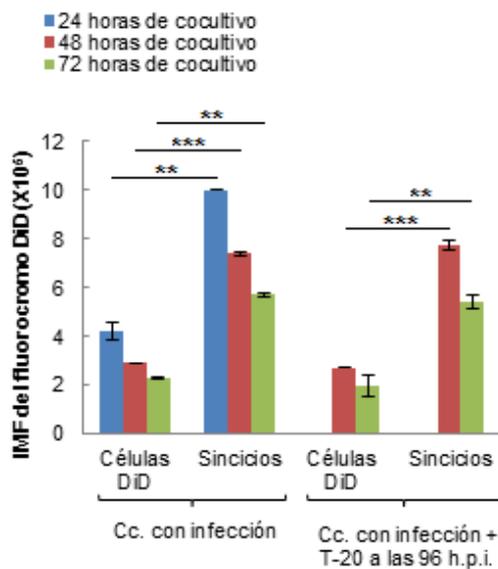


Figura 20. Gráfica de barras mostrando la IMF del fluorocromo DiD. Se muestra la desviación promedio de dos experimentos independientes. El valor  $P$  se obtuvo con una prueba de  $t$  de student (una cola),  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$ . Las células-Dil se infectaron con una MOI de 0.06 utilizando un sobrenadante concentrado por ultrafiltración. Los cocultivos se colocaron cuando las células-Dil cumplieron 3 días de infección y se dejaron por 24, 48 y 72 horas. El T-20 se utilizó a una concentración final de 0.047  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (dilución 1:1000 del stock original), se agregó antes de colocar en cocultivo las células DiD (72 h.p.i.) y para detener la formación de sincicios a las 24 horas de cocultivo, el T-20 fue agregado a las 96 h.p.i. Se infectaron  $2.5 \times 10^6$  células JLTRG/tubo utilizando polibreno a una concentración final de 0.008  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , incubando por 2 horas y media (resuspendiendo cada 20 minutos las primeras 2 horas y dejando la última media hora sin resuspender). (Cc.: cocultivo; h.p.i: horas post-infección)

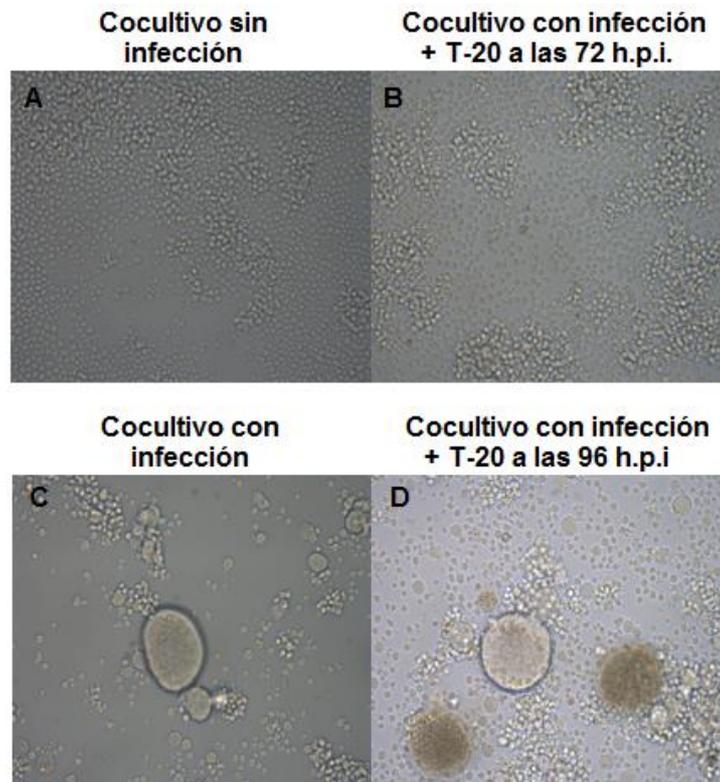


Figura 21. Fotografías a 20X tomadas con el microscopio invertido de cocultivos de 48 horas. (A) Cocultivo sin infección, (B) cocultivo con infección con T-20 a las 72 h.p.i., (C) cocultivo con infección, (D) cocultivo con infección con T-20 a las 96 h.p.i. Las células-DiI se infectaron con una MOI de 0.06 utilizando un sobrenadante concentrado por ultrafiltración. Los cocultivos se colocaron cuando las células-DiI cumplieron 3 días de infección y se dejaron por 48 horas. El T-20 se utilizó a una concentración final de 0.047  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (dilución 1:1000 del stock original), se agregó antes de colocar en cocultivo las células DiD (a las 72 h.p.i.) y para detener la formación de sincicios a las 24 horas de cocultivo, el T-20 fue agregado a las 96 h.p.i. Se infectaron  $2.5 \times 10^6$  células JLTRG/tubo utilizando polibreno a una concentración final de 0.008  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , incubando por 2 horas y media (resuspendiendo cada 20 minutos las primeras 2 horas y dejando la última media hora sin resuspender). (h.p.i: horas post-infección)

## VIII. DISCUSIÓN

La importancia de la formación de sincicios en la patogénesis del SIDA es aún desconocida, aunque se ha relacionado la capacidad de virus (proveniente de sangre) de fusionar linfocitos T *in vitro* con la disminución de células T CD4<sup>+</sup> y la progresión al SIDA (Blaak *et al.*, 2000; Connor *et al.*, 1993; Tersmette *et al.*, 1989). Trabajos anteriores han mostrado la detección y cuantificación de sincicios formados *in vitro* mediante el uso de dos fluorocromos lipofílicos y citometría de flujo (revisado en Huerta *et al.*, 2009). Esta forma de analizar la fusión celular (formación de sincicios) se puede complementar con el uso de células que contienen en su genoma la LTR del VIH-1 acoplada a un gen reportero (GFP), por lo que la expresión de las proteínas Tat y Rev durante la infección, inducen la producción de GFP, la cual se relaciona directamente con la actividad transcripcional del VIH-1 (Gervaix *et al.*, 1997; Kutsch *et al.*, 2004). De manera que combinando estas metodologías se podrá detectar la actividad transcripcional del VIH-1 en los sincicios.

Una gran ventaja de las células reporteras, es que se puede detectar la infección del VIH en células individuales mediante la fluorescencia de la GFP por microscopía de fluorescencia o citometría de flujo; esta última herramienta es muy útil ya que la detección es automática, rápida y cuantitativa. Las células reporteras se han utilizado principalmente para la determinación de partículas infecciosas (titulación viral) (Gervaix *et al.*, 1997; Kutsch *et al.*, 2004). En el presente trabajo estas células se utilizaron además para determinar la replicación del VIH-1, en células individuales y en células fusionadas (sincicios).

Para obtener un modelo que nos permitiera la formación de sincicios, detectarlos por citometría de flujo y analizar la actividad transcripcional del VIH-1 en ellos, se probaron tres líneas celulares reporteras (CEM-GFP, Rev-CEM y JLTRG) las cuales se infectaron con la cepa viral IIIB del VIH-1. Aunque solo se confirmó la infección en las líneas celulares CEM-GFP y JLTRG, se comprobó la formación de sincicios en las tres líneas celulares (**figura 5 de los anexos**). Las líneas celulares CEM-GFP y JLTRG podrían haber presentado una formación de sincicios desde adentro (Lifson *et al.*, 1986), mientras que en la línea celular Rev-CEM podrían haber tenido una formación desde afuera (Clavel y Charneau, 1994) debido a la ausencia aparente de infección (**figura 6**).

A partir de lo anterior, se eligió a la línea celular JLTRG para la formación de sincicios, pues al infectarse por dos días presentó alto porcentaje de células GFP<sup>+</sup>, soportó la replicación viral sin disminución de su viabilidad, se logró titular el virus, y al microscopio se observaron más sincicios que en las otras líneas, de manera que resultó ser un buen modelo para estudiar la actividad transcripcional del VIH-1 en sincicios.

Para cerciorarse de que todas las células GFP<sup>+</sup> estuvieran infectadas se decidió observar la producción del antígeno p24 intracelular en la línea celular JLTRG, ya que la detección de esta proteína es considerada un marcador específico de la infección con el VIH. Como podemos observar en la **figura 8** prácticamente todas las células GFP<sup>+</sup> (%) fueron también p24<sup>+</sup>, indicando que en efecto las células que son productoras de GFP son también productoras de p24. La presencia de una población p24<sup>+</sup> GFP<sup>-</sup> se atribuye a células que internalizaron al virus por endocitosis, sin producir replicación viral. Se ha reportado que los virus que entran por endocitosis no tienen capacidad replicativa debido a un efecto de inhibición mediado por clatrininas (Ruggiero *et al.*, 2008).

Previamente a los experimentos de fusión, el virus se tituló mediante la cuantificación de las células GFP<sup>+</sup> a partir de la infección con diferentes diluciones del sobrenadante viral no concentrado y concentrado por ultrafiltración, en el primer caso la cuantificación de UI/ml se mantenía en 10<sup>4</sup> (**figura 3**), mientras que cuando se concentró, aumentó hasta 10<sup>6</sup> (**figura 13**), lo que indica que la concentración del sobrenadante viral por ultrafiltración fue eficiente.

La titulación viral se realizó adaptando la metodología de Grigorov (Grigorov *et al.*, 2011) a los experimentos de infección, la cual se basa en la cuantificación de células infectadas (células GFP<sup>+</sup>) detectadas por citometría de flujo. De acuerdo con esta metodología, el título viral se calcula a partir de la proporción de células infectadas (células GFP<sup>+</sup>), esto es, después de exponer cierto número de células reporteras a un cierto volumen de sobrenadante viral, asumiendo que una célula se infecta por una sola partícula viral. También es necesario permitir la infección durante el tiempo en el que solo haya habido una sola ronda de infección, o bien adicionando un inhibidor de la infección después de un tiempo determinado. Por otra parte es necesario tomar en cuenta que las células no hayan presentado replicación al momento de cuantificar las células GFP<sup>+</sup> ya que el cálculo del título viral incorpora el porcentaje de éstas en la población total.

El ciclo de infección del VIH-1 dura aproximadamente 24 horas (Mohammadi *et al.*, 2013) y en todos los casos los cálculos de las titulaciones se realizaron a las 48 horas de infección, por lo que para ese tiempo se supondría que las células proliferaron y probablemente hubo segundas rondas de infección. De acuerdo a los resultados mostrados en la **figura 6**, la línea celular CEM-GFP presentaría un ciclo de infección aproximadamente de 24 horas, pues se observa que el aumento del porcentaje de células GFP<sup>+</sup> entre los días 2 (cultivo con T-20 a las 48 h.p.i.) y 3 de infección (cultivo con infección sin T-20) hay un aumento aproximadamente de 10 % de células GFP<sup>+</sup>, y el mismo porcentaje aumenta del día 3 al 4 de infección. En cambio, en la línea celular JLTRG, el ciclo de infección es aproximadamente de 48 horas pues del día 2 (cultivo con T-20 a las 48 horas de infección) al 3 de infección (cultivo con infección sin T-20) no se

presentó un aumento del porcentaje de células GFP<sup>+</sup> y al día 4 de infección es cuando se observa el aumento de este porcentaje.

A pesar de que las células infectadas proliferan menos, es necesario mantener el número de células iniciales utilizando algún control como la afidicolina que inhibe la proliferación celular. Para evitar la segunda ronda de infección se utilizó el inhibidor T-20, como se muestra en la **figura 6**, y se observa una diferencia del porcentaje de células GFP<sup>+</sup> entre los cultivos infectados sin T-20 y con T-20 a las 48 h.p.i., por lo que el T-20 si detiene la infección.

El cálculo del título viral mediante éste método asume que los datos presentan una distribución de Poisson, que los porcentajes de células GFP<sup>+</sup> sean menores de 40 % y mayores a 0.5 %, y que los porcentajes de células infectadas disminuyan proporcionalmente las veces que se diluyó el sobrenadante viral. Además, en este método el sobrenadante viral agregado al cultivo no se remueve de los pozos hasta que se realice la fijación. El número de células que infectan son  $1 \times 10^5$  células/250  $\mu$ l, la infección se realiza en placas de 48 pozos y las diluciones del sobrenadante viral son seriadas. Después de las consideraciones mencionadas, por último se calcula el promedio de los títulos virales a partir de los resultados de tres diluciones seriadas consecutivas (que presenten la mayor similitud).

Este método es comparable con otros métodos de titulación (TCID<sub>50</sub>, PFU, qTR-PCR, qPCR y ELISA), teniendo una sensibilidad de detección de  $10^4$  UI/ml (Grigorov *et al.*, 2011), y presenta la ventaja de que detecta las partículas virales que son infecciosas de manera rápida y precisa, evitando la sobrestimación del número de células infectadas (virus unido a células).

De acuerdo con un modelo de fusión celular como el propuesto en esta tesis, podemos asegurar que hay una formación de sincicios si presentan: 1) fluorescencia mixta (presencia de los dos fluorocromos lipofílicos), 2) un aumento en el tamaño y la granularidad celular, 3) aumento de la fluorescencia roja en la población con fluorescencia mixta, respecto a la población de células solo rojas debido al FRET (Gómez-Icazabalceca *et al.*, en prensa) y 4) señal de la GFP. Las células que se presentan como sincicios en los dos experimentos de fusión celular mantienen estas condiciones por lo que se puede asegurar que la mayor parte de estas células corresponden a sincicios.

En el primer experimento de formación de sincicios se determinó el porcentaje de fusión. Las células marcadas con el fluorocromo Dil se infectaron por dos y tres días, y posteriormente se cocultivaron con las células no infectadas marcadas con el fluorocromo DiD durante 24 horas. Se observó un mayor porcentaje de fusión cuando las células se infectaron durante 3 días (**figura 15**). Esto se puede atribuir a que el porcentaje de

células-Dil GFP<sup>+</sup> aumentó de 20.9 a 54.2 % en el día 3 de infección (datos no mostrados), incrementando la posibilidad de que una célula infectada tenga contacto con una célula-DiD no infectada. La mayoría de las células con fluorescencia mixta (células fusionadas) presentaron la señal de la GFP.

Los sincicios formados en este experimento presentaron tanto la fluorescencia mixta como la señal de la GFP, aumento del tamaño y de la granularidad celular respecto a las células infectadas no fusionadas, así como la presencia de FRET (**figura 15 y figura 16**).

En el segundo experimento de formación de sincicios, las células marcadas con el fluorocromo Dil se infectaron por tres días, y se cocultivaron con células no infectadas marcadas con el fluorocromo DiD por 24, 48 y 72 horas. Además de determinar el porcentaje de fusión, se analizó la actividad transcripcional del VIH-1 de sincicios formados a 24, 48 y 72 horas, y de sincicios formados a 24 horas, a los cuales se les agregó el inhibidor de fusión T-20 (96 h.p.i.) para evitar tanto la incorporación de células adicionales en los sincicios ya formados y la formación de nuevos sincicios. Los resultados mostraron que, utilizando células infectadas durante 3 días, la fusión se acerca a su máximo a las 24 horas de cocultivo. El número de células fusionadas disminuyó a las 72 horas probablemente debido a apoptosis (Ferri *et al.*, 2000) (**figura 18**). En los sincicios de 24 horas con T-20, donde se impidió la fusión de nuevas células, el porcentaje de fusión también decayó entre las 48 y 72 horas. Las razones de este decaimiento pueden ser que la infección viral se extendió a las células marcadas con DiD, causando la regulación negativa de CD4 (García y Miller, 1991) lo que evitó la fusión; y la muerte de una gran proporción de los sincicios debido a la apoptosis (Ferri *et al.*, 2000) (**figura 19**).

La mayoría de los sincicios formados expresaron la GFP (**figura 18**), aunque los sincicios de 72 horas con T-20 a las 96 h.p.i. presentaron una disminución de este porcentaje de células GFP<sup>+</sup>, posiblemente también por el decaimiento de la viabilidad.

El porcentaje de viabilidad es medido a partir de los eventos totales obtenidos por citometría de flujo a los cuales se les restan los eventos que son considerados como restos celulares (ver **figura 1 de los anexos**). Se puede observar que los sincicios presentaron un decaimiento del porcentaje de viabilidad celular (aumento de los restos celulares) (**figura 19**), posiblemente por la vía de apoptosis, que es el destino más documentado de los sincicios *in vitro* (Ferri *et al.*, 2000), o también por lisis. Sin embargo, nuestros experimentos muestran que hay un pequeño porcentaje de sincicios viables a las 72 horas, esto debido a que la fusión célula-célula genera poblaciones de sincicios con una composición celular heterogénea, como el estado del ciclo celular en el que se encuentren las células participantes en el momento de la fusión (Torres *et al.*, 2014). El

porcentaje de viabilidad de los sincicios formados desde las 24 horas hasta las 72 horas decayó de 80 a 60 % (**figura 19**).

La IMF de la GFP en los sincicios con T-20 a las 96 h.p.i. fue mayor respecto a los sincicios sin T-20 (**figura 19**). En los sincicios que se les agregó T-20, la incorporación de más células no sería una explicación por la cual aumente la fluorescencia, de modo que si fuera este el caso, al haber varios núcleos de células infectadas la señal de la GFP aumentaría; una segunda opción, y la más factible, es que la actividad transcripcional de la LTR viral en los sincicios aumentó, con el aumento consecuente de la replicación del virus respecto a los sincicios que siguen incorporando células (Chowdhury *et al.*, 1992). La IMF de la GFP es un promedio de toda la población de sincicios, alrededor del cual hay una amplia variación de la intensidad de la fluorescencia, reflejando la heterogeneidad en la composición celular de los sincicios (López *et al.*, 2007). Esta heterogeneidad puede provocar los diferentes niveles de actividad transcripcional del gen de la GFP, así como el sitio de integración del genoma viral que puede alterar la tasa de transcripción de las proteínas del virus (Jordan *et al.*, 2001) afectando directamente la producción de la GFP.

Este aumento de la IMF de la GFP podría deberse a que los sincicios con T-20 que se mantuvieron viables, al dejar de incorporar más células, son de un tamaño menor a los sincicios sin T-20. La mayor proporción de sincicios generados *in vitro* contienen pocos núcleos (dos o cuatro) y presentan un tamaño similar al de las células no fusionadas (López *et al.*, 2007). Los sincicios pequeños posiblemente sean más estables en cuanto a mecanismos celulares como la replicación y la supervivencia. Las fusiones celulares dependientes a la proteína de la envoltura viral generan poblaciones de sincicios con una diversidad alta de la composición celular, las cuales podrían tener tiempos variados de supervivencia y capacidades funcionales (López *et al.*, 2007; Rivera *et al.*, 2010). *In vivo*, estos sincicios pequeños podrían incluso pasar en circulación, y debido a la reducción de la expresión o bloqueo de la molécula CD4 se dificultaría su detección con las técnicas convencionales basadas en anticuerpos (Rivera *et al.*, 2010).

Para poder diferenciar mejor entre agregados y sincicios a través del FRET, sería necesario mejorar el marcaje de las células, es decir, disminuir la intensidad de fluorescencia del fluorocromo DiD (que sea menor a la del fluorocromo Dil) y aumentar un poco la del fluorocromo Dil.

De igual manera, en este segundo experimento de fusión, los sincicios formados presentaron fluorescencia mixta, señal de la GFP, aumento del tamaño y de la granularidad celular respecto a las células infectadas no fusionadas, y la presencia del FRET (**figura 17**, **figura 18** y **figura 19**).

Recapitulando ambos experimentos, con más tiempo de infección se obtienen más células fusionadas y este porcentaje aumenta hasta las 48 horas de cocultivo, después de éste tiempo los sincicios decayeron y la infección se diseminó a las células DiD no infectadas, por lo que sería necesario mantener tiempos más cortos de cocultivo (24 horas).

En los experimentos mostrados, las diferencias del porcentaje de células GFP<sup>+</sup> (células infectadas) entre líneas celulares podrían deberse a la fase del ciclo celular en la que se encuentre la población (Gummuluru y Emerman, 1999), la expresión de los receptores CD4 y CXCR4, y la velocidad de transcripción del gen reportero. En la caracterización del receptor CD4 y del correceptor CXCR4 (**tabla 1** y **figura 1**) se observa una notable diferencia, en especial la alta expresión del correceptor CXCR4 en la línea celular JLTRG, esto puede ser una explicación del por qué la cepa viral IIIB del VIH-1 infecta mejor a esta línea celular que a Rev-CEM. Otro aspecto importante respecto a las diferencias del porcentaje de células GFP<sup>+</sup> entre líneas celulares es la construcción del gen reportero. De mayor a menor porcentaje de células GFP<sup>+</sup> producidas, la primera fue la línea celular CEM-GFP, seguida por las células JLTRG y por último las Rev-CEM. La expresión de la proteína GFP en la línea celular CEM-GFP, además de ser dependiente a la infección por el VIH-1, su expresión se puede activar por factores celulares que no dependen de ninguna proteína viral (Gervaix *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 2007). En cambio la expresión de la proteína GFP en la línea celular JLTRG es totalmente dependiente a la infección del VIH-1 y a la producción de Tat (Kutsch *et al.*, 2004). Rev-CEM es totalmente dependiente de Rev y Tat, las cuales son proteínas virales que no están presentes en la partícula viral infecciosa y son productos tempranos cuya transcripción es independiente de Tat. Ambas proteínas se unen a las secuencias virales específicas RRE y TAR, respectivamente, y esta dependencia dual contribuye a una mayor rigurosidad para la expresión de GFP (Wu *et al.*, 2007). Estas diferencias podrían llevar a un retraso en la producción de la GFP, como en la infección de la línea celular Rev-CEM a cinco días con la cepa viral MN/MT-2 (datos no mostrados), donde se observaron porcentajes hasta el día cinco de infección, de igual manera Wu *et al.* reportan porcentajes detectables de GFP en la línea celular Rev-CEM hasta el mismo tiempo de infección. Posiblemente se hubiera observado un porcentaje de infección con la cepa viral IIIB si la cinética de infección hubiera sido de mayor duración. De acuerdo a los índices de la IMF, que nos indica cómo está la actividad transcripcional de la LTR, podemos inferir que la línea celular JLTRG fue la que presentó mayor actividad transcripcional sobre las otras líneas, es decir, hay una mayor producción de virus. La expresión de la GFP en las líneas celulares reporteras es probablemente mediada por la zona de integración del plásmido reportero (Wu *et al.*, 2007).

Esta es la primera vez que se utiliza este modelo de célula reportera para analizar la actividad transcripcional del VIH-1 en sincicios. Estas células expresan los receptores celulares CD4 y CXCR4, por lo que no requieren de transfecciones adicionales. Además, al infectarse con el VIH-1 son capaces de expresar el complejo Env en la superficie de la membrana celular.

Se han utilizado otros modelos celulares para estudiar la formación de sincicios, aunque se han enfocado principalmente a caracterizar su formación, mediante la transfección de plásmidos que contienen el gen de alguna enzima catalítica, como la beta-galactosidasa (Pérez *et al.*, 1992) o de otro gen reportero como la luciferasa (Barbeau *et al.*, 1998), que pueden estar asociados a la LTR viral.

Otras variantes de células se han utilizado para expresar diferentes transgenes virales, como las que codifican para las proteínas del complejo Env (Huerta *et al.*, 2002) o en conjunto Tat, Rev y Env (Pérez *et al.*, 1992). También se han utilizado células transfectadas no linfocíticas para expresar al receptor CD4, a los correceptores CXCR4 o CCR5, o moléculas de adhesión (Gordón-Alonso *et al.*, 2006; Shieh *et al.*, 2000; Fortin *et al.*, 1999).

Los resultados obtenidos demuestran que este modelo, además de detectar y cuantificar sincicios, permite analizar la actividad transcripcional del VIH-1 en ellos de manera rápida y precisa mediante la citometría de flujo.

Por lo tanto, en este modelo, la infección *in vitro* por el VIH-1 de células linfocíticas que expresan de manera natural a los receptores CD4 y CXCR4 conlleva varios eventos principales que se observan durante una situación de infección *in vivo*.

Este modelo también permitirá analizar otros aspectos de la infección por el VIH-1, desde la caracterización de los sincicios así como sus funciones, su viabilidad, el ciclo celular que presentan, variaciones en la actividad transcripcional del VIH-1 y sus efectos citopáticos, con la finalidad de poder ampliar la información que se tiene acerca de ellos y sus posibles implicaciones en el SIDA.

## **IX. CONCLUSIONES**

Uno de los factores que llevó a una infección eficiente en la línea celular JLTRG fue su alta expresión del correceptor CXCR4.

La LTR viral en la línea celular JLTRG es completamente dependiente de la infección por el VIH-1 y no hay regiones inespecíficas que puedan inducir la producción de la GFP en células no infectadas, esto se corroboró mediante la detección de p24 intracelular, donde se observó que las células GFP<sup>+</sup> también fueron p24<sup>+</sup>.

La titulación viral en la línea celular JLTRG fue más eficiente que en la línea celular CEM-GFP a 2 días de infección utilizando el método de Grigorov *et al.*, el cual se estableció como un método alternativo para la cuantificación de las partículas infecciosas del VIH-1 de una manera eficiente.

La línea celular reportera JLTRG resultó ser un buen modelo para la formación de sincicios, los cuales se lograron detectar por citometría de flujo.

Se encontró que los sincicios presentaron un aumento de la IMF de la GFP, es decir, la actividad transcripcional del VIH-1 aumentó.

## X. ANÉXOS

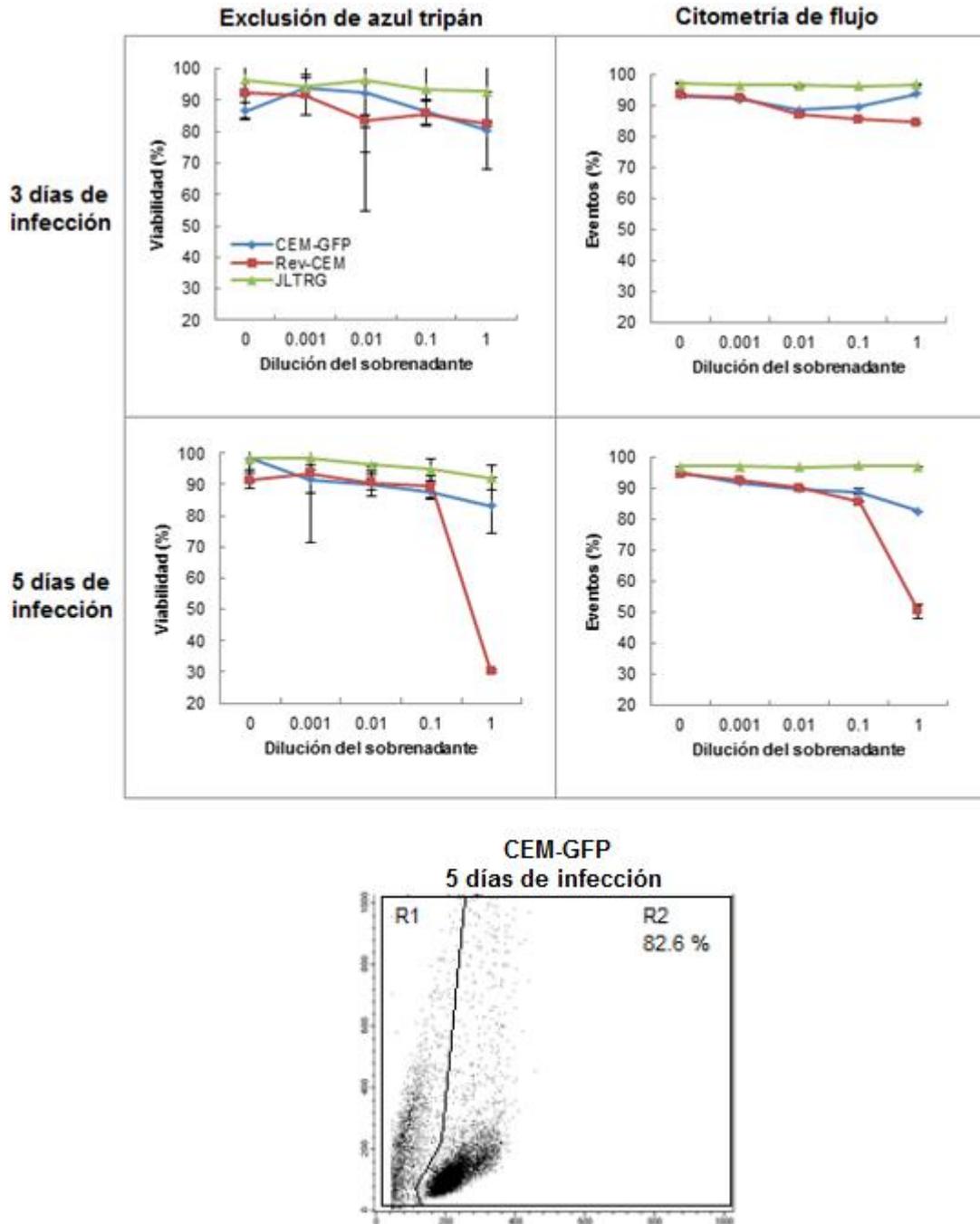


Figura 1. Gráficas en escala no lineal del porcentaje de viabilidad celular con azul tripan (gráficas de la izquierda) y por citometría de flujo (gráficas de la derecha). La obtención del porcentaje de viabilidad por citometría de flujo se muestra en la gráfica de puntos, de la cual se realizó la región R2 que incluía a los eventos considerados como células viables y excluía a los restos celulares mostrados dentro de la región R1. El porcentaje de viabilidad celular por azul tripan se explica en la metodología. El cero en el eje x corresponde al control no infectado. Cada punto es el promedio de los duplicados. Los cultivos de las tres líneas celulares se infectaron por 3 y 5 días con un sobrenadante viral de la cepa MN del VIH-1 utilizando diluciones de 1:1000, 1:100, 1:10 y sin diluir. Se infectaron  $4.5 \times 10^5$  células/pozo utilizando polibreno a una concentración final de  $0.003 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ , incubando por 2 horas y media (resuspendiendo cada 30 minutos).

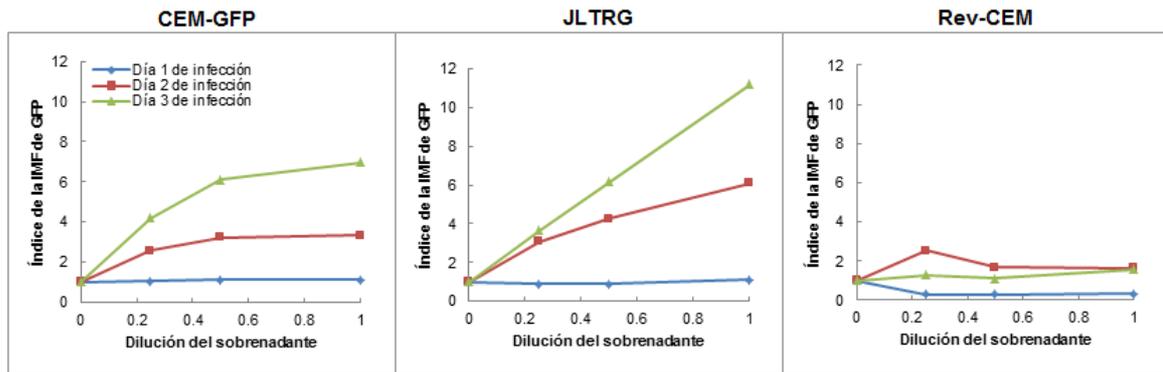


Figura 2. Gráficas en escala lineal mostrando el índice de la IMF de GFP. El índice muestra las veces que aumentó la IMF de la GFP en las poblaciones R2 (figura 2 del apartado de resultados) respecto a la IMF de la GFP de células GFP de un cultivo no infectado. El cero en el eje x corresponde al control no infectado. Cada punto es el promedio de los duplicados. Los cultivos de las tres líneas celulares se infectaron por 1, 2 y 3 días con MOIs de 0.01, 0.02 y 0.04. Se infectaron  $9 \times 10^5$  células/tubo utilizando polibreno a una concentración final de  $0.003 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ , incubando por 2 horas y media (resuspendiendo cada 30 minutos).

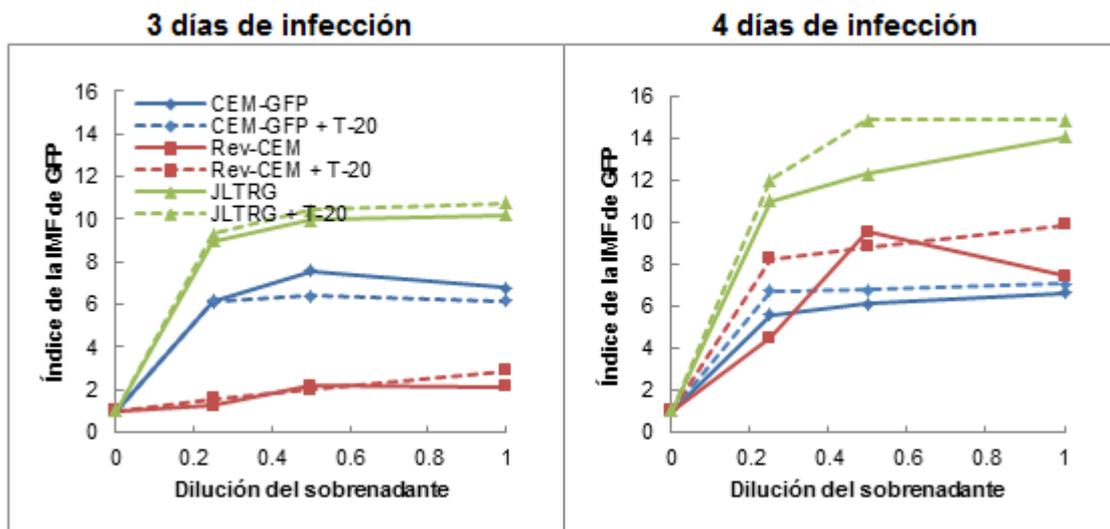


Figura 3. Gráficas en escala lineal mostrando el índice de la IMF de GFP. El índice muestra las veces que aumentó la IMF de la GFP en las poblaciones R2 (figura 5 del apartado de resultados) respecto a la IMF de la GFP de células GFP de un cultivo no infectado. El cero en el eje x corresponde al control no infectado. Cada punto es el promedio de los duplicados. Los cultivos de las tres líneas celulares se infectaron por 3 y 4 días con MOIs de 0.01, 0.02 y 0.04. El T-20 fue agregado a las 48 horas *in vitro* a una concentración final de  $.001 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  (dilución 1:1000 del stock original). Se infectaron  $9 \times 10^5$  células/pozo utilizando polibreno a una concentración final de  $0.003 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ , incubando por 2 horas y media (resuspendiendo cada 30 minutos).

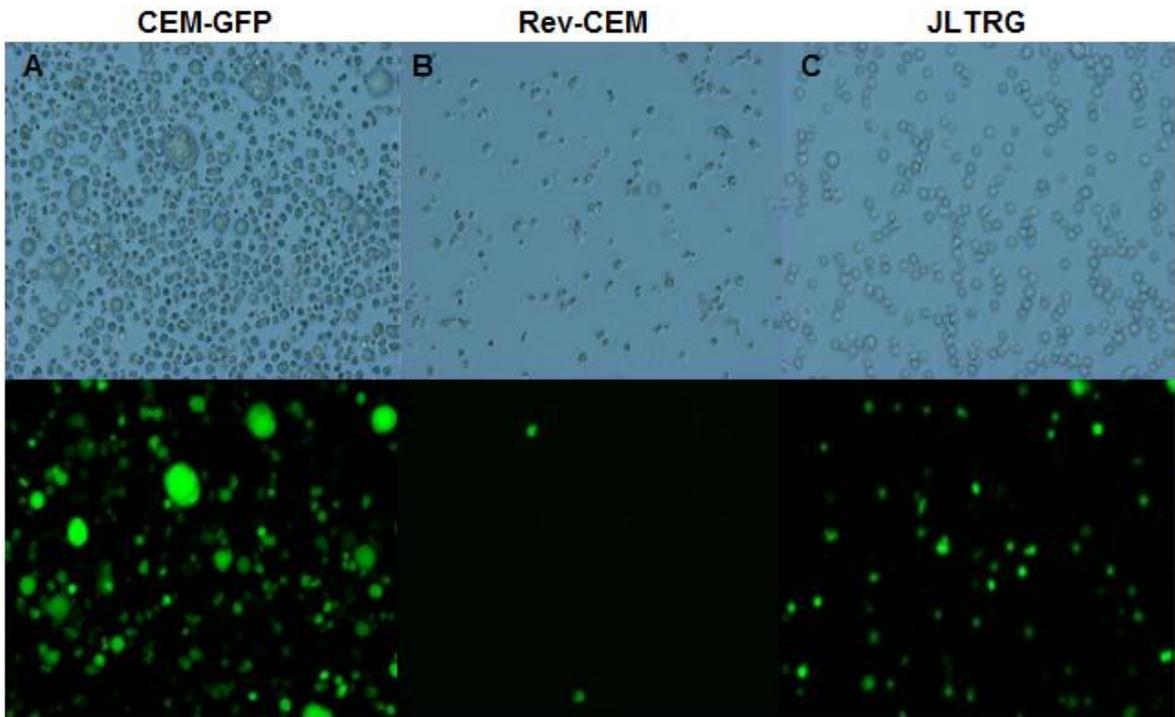


Figura 4. Fotografías tomadas con el microscopio invertido Olympus IX71A con un objetivo 20X en campo claro (imágenes superiores) y de fluorescencia (imágenes inferiores). Los cultivos de las tres líneas celulares se infectaron por 4 días con una MOI de 0.04. Se infectaron  $9 \times 10^5$  células/pozo utilizando polibreno a una concentración final de  $0.003 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ , incubando por 2 horas y media (resuspendiendo cada 30 minutos).

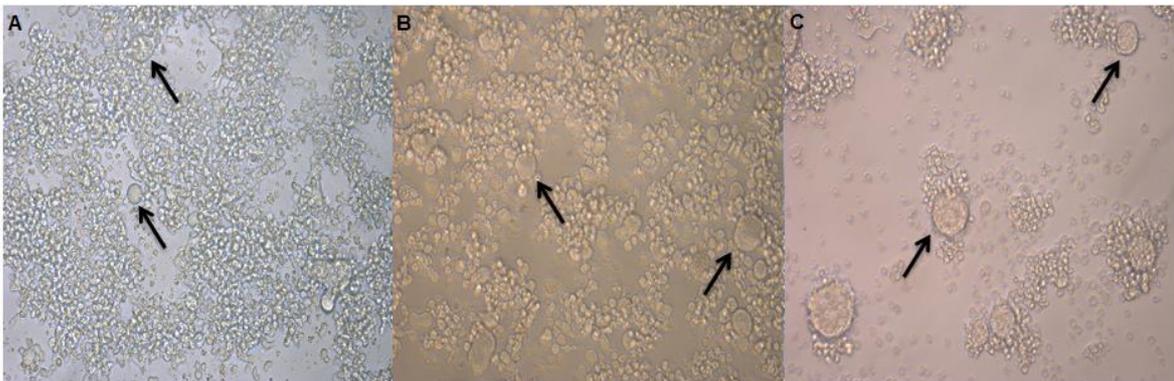


Figura 5. Fotografías a 20X tomadas con el microscopio invertido de los cultivos de las líneas celulares CEM-GFP (A), Rev-CEM (B) y JLTRG (C) infectados por 3 días con una MOI de 0.04, 0.01 y 0.02, respectivamente. Se infectaron  $9 \times 10^5$  células/pozo utilizando polibreno a una concentración final de  $0.003 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ , incubando por 2 horas y media (resuspendiendo cada 30 minutos).

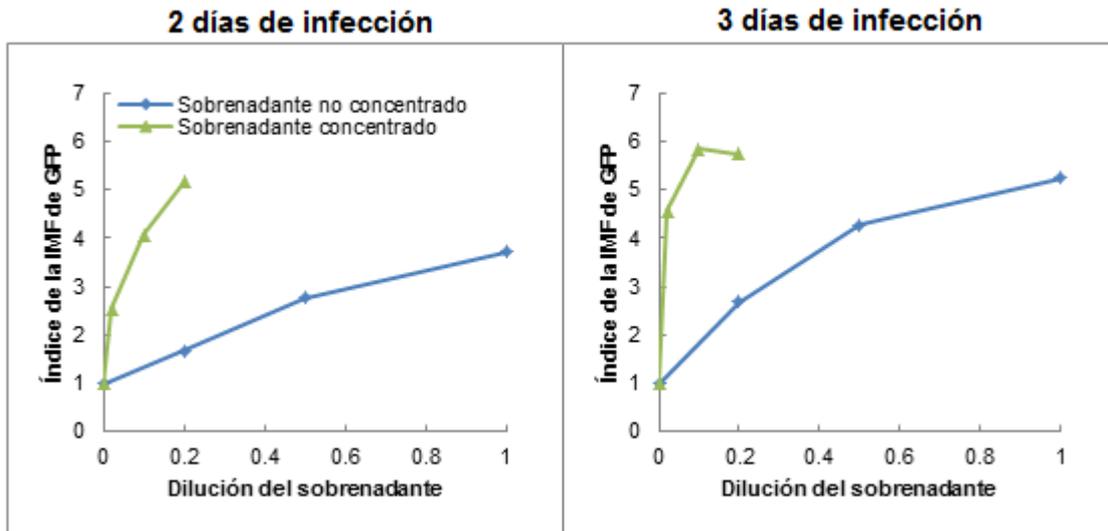


Figura 6. Gráficas en escala lineal mostrando el índice de la IMF de GFP. El índice muestra las veces que aumentó la IMF de la GFP en las poblaciones R2 (figura 9 del apartado de resultados) respecto a la IMF de la GFP de células GFP<sup>-</sup> de un cultivo no infectado. El cero en el eje x corresponde al control no infectado. Cada punto es el promedio de los duplicados. Los cultivos de JLTRG se infectaron por 2 y 3 días con un sobrenadante viral no concentrado y concentrado por ultrafiltración. Del sobrenadante no concentrado se utilizaron MOIs de 0.003, 0.008 y 0.015, y del sobrenadante concentrado se utilizaron MOIs de 0.006, 0.030 y 0.060. Se infectaron  $1 \times 10^6$  células JLTRG/tubo utilizando polibreno a una concentración final de 0.005  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , incubando por 2 horas y media (resuspendiendo cada 30 minutos). La titulación viral se calculó para el día 2 de infección

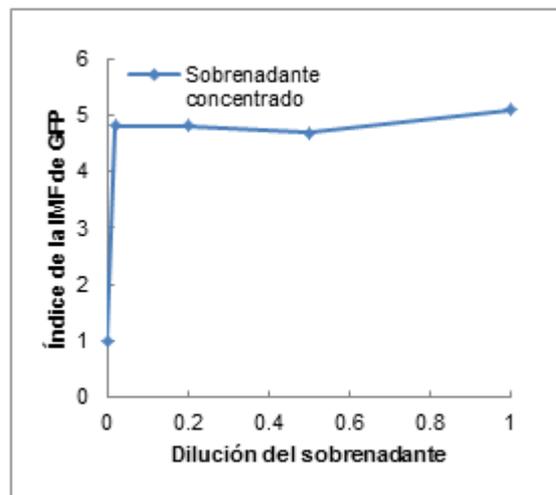


Figura 7. Gráficas en escala lineal mostrando el índice de la IMF de GFP. El índice muestra las veces que aumentó la IMF de la GFP en las poblaciones R2 (figura 12 del apartado de resultados) respecto a la IMF de la GFP de células GFP<sup>-</sup> de un cultivo no infectado. El cero en el eje x corresponde al control no infectado. Cada punto es el promedio de los duplicados. Los cultivos de JLTRG se infectaron por 2 días con un sobrenadante concentrado por ultrafiltración y se utilizaron MOIs de 0.006, 0.06, 0.15, 0.3. Se infectaron  $1 \times 10^6$  células JLTRG/tubo utilizando polibreno a una concentración final de 0.008  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , incubando por 2 horas y media (resuspendiendo cada 20 minutos las primeras 2 horas y dejando la última media hora sin resuspender).

## VII. REFERENCIAS

1. Anton, Peter A.; Mitsuyasu, Ronald T.; Deeks, Steven G.; Scadden, David T.; Wagner, Bridget; Huang, Christine; Macken, Catherine; Richman, Douglas D.; Christopherson, Cindy; Borellini, Flavia; Lazar, Richard y Hege, Kristen M. 2003. *AIDS* **17** (1): 53-63.
2. Barbeau, B.; Fortin, J.F.; Genois, N. y Tremblay, M.J. 1998. Modulation of Human Immunodeficiency Virus Type 1-Induced Syncytium Formation by the Conformational State of LFA-1 Determined by a New Luciferase-Based Syncytium Quantitative Assay. *Journal of Virology* **72** (9): 7125-7136.
3. Bhoopat L.; Rithaporn, T.S.; Khunamornpong, S.; Bhoopat, T.; Taylor, C.R. y Thorner, P.S. Cell Reservoirs in Lymph Nodes Infected with HIV-1 Subtype E Differ from Subtype B: Identification by Combined *in situ* Polymerase Chain Reaction and Immunohistochemistry. *Modern Pathology* **19**: 255–263.
4. Blaak, Hetty; van't Wout, Angélique B.; Brouwer, Margreet; Hooibrink, Berend; Hovenkamp, Egbert y Schuitemaker, Hanneke. 2000. *PNAS* **97** (3): 1269-1274.
5. Blot, G.; Janvier, K.; Le Panse, S.; Benarous, R. y Berlioz-Torrent, C. 2003. Targeting of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope to the *trans*-Golgi Network through Binding to TIP47 Is Required for Env Incorporation into Virions and Infectivity. *Journal of Virology* **77** (12): 6931-6945.
6. Byland, R.; Vance, P.J.; Hoxie, J.A. y Marsh, M. 2007. A Conserved Dileucine Motif Mediates Clathrin and AP-2-dependent Endocytosis of the HIV-1 Envelope Protein. *Molecular Biology of the Cell* **18**: 414-425.
7. Carrasco, Luis. 2004. *El virus del SIDA: un desafío pendiente* (pp. 105). España. Editorial Hélice.
8. Cetina Palma, Andrea. 2013. *Propagación de las cepas MN y IIIB del VIH-1 en líneas de células T y análisis de la formación de sincicios*. Tesis de Licenciatura, México: Universidad Nacional Autónoma de México.
9. Chen, P.; Hubner, W.; Spinelli, M.A. y Chen, B.K. 2007. Predominant mode of Human Immunodeficiency Virus Transfer Between T Cells is Mediated by Sustained Env-dependent Neutralization-resistant Virological Synapses. *Journal of Virology* **81** (22): 12582-125595.
10. Chertova, E.; Bess, J.W.; Crise, Jr. B.J.; Sowder, I.R.; Schaden, T.M.; Hilburn, J.M.; Hoxie, J.A.; Benveniste, R.E.; Lifson, J.D.; Henderson, L.E. y Arthur, L.O. 2002. Envelope Glycoprotein Incorporation, not Shedding of Surface Envelope Glycoprotein (gp120/SU), is the Primary Determinant of SU Content of Purified Human

Immunodeficiency Virus Type 1 and Simian Immunodeficiency Virus. *Journal of Virology* **76** (11): 5315–5325.

11. Chowdhury, I.H.; Koyanagi, Y.; Suzuki, M.; Kobayashi, S.; Yamaguchi, K. y Yamamoto, N. 1992. Increased Production of Human Immunodeficiency Virus (HIV) in HIV-induced Syncytia Formation: An Efficient Infection Process. *VIRUS GENES* **6** (1): 63-78.

12. Clavel, F. y Charneau, P. 1994. Fusion from Without Directed by Human Immunodeficiency Virus Particles. *Journal of Virology* **68** (2): 1179-1185.

13. Coelen, R.J.; Jose, D.G. y May, J.T. 1983. The Effect of Hexadimethrine Bromide (Polybrene) on the Infection of the Primate Retroviruses SSV1/SSAV1 and BaEV. *Archives of Virology* **75**: 307-311.

14. Connor, Ruth I.; Mohri, Hiroshim; Cao, Yunzhen y Ho, David D. 1993. Increased Viral Burden and Cytopathicity Correlate Temporally with CD4+ T-Lymphocyte Decline and Clinical Progression in Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Individuals. *Journal of Virology* **67** (4): 1772-1777.

15. Cormier, E.G.; Persuh, M.; Thompson, D.A.D.; Lin, S.W.; Sakmar, T.P.; Olson, W.C. y Dragic, T. 2000. Specific interaction of CCR5 amino-terminal domain peptides containing sulfotyrosines with HIV-1 envelope glycoprotein gp120. *PNAS* **97** (11): 5762-5767.

16. Davenport, M.P.; Zaunders, J.J.; Hazenberg, M.D.; Schuitemaker, H. y van Rij, R.P. 2002. Cell turnover and cell tropism in HIV-1 infection. *TRENDS in Microbiology* **10** (6): 275-278.

17. Davis, M. R.; Jiang, J.; Zhou, J.; Freed, E.O. y Aiken, C. 2006. A Mutation in the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Protein Destabilizes the Interaction of the Envelope Protein Subunits gp120 and gp41. *Journal of Virology* **80** (5): 2405–2417.

18. Becton Dickinson Immunocytometry Systems. 1995. FACS Training Manual.

19. Diskin, R.; Marcovecchio, P.M. y Bjorkman, P.J. 2010. Structure of a Clade C HIV-1 gp120 Bound CD4 and CD4-Induced Antibody Reveals Anti-CD4 Polyreactivity. *Nature Structural y Molecular Biology* **17** (5): 608-614.

20. Donaldson, Yvonne K.; Bell, Jeanne E.; Holmes, Eddie C.; Hughes, Elizabeth S.; Brown, Helen K. y Simmonds, Peter. 1994. In Vivo Distribution and Cytopathology of Variants of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Showing Restricted Sequence Variability in the V3 Loop. *Journal of Virology* **68** (9): 5991-6005.

21. Eilbott, David J.; Peress, Nancy; Burger, Harold; LaNeve, Debra; Orenstein, Jan; Gendelman, Howard E.; Seidman, Roberta y Weiser, Barbara. 1989. Human immunodeficiency virus type 1 in spinal cords of acquired immunodeficiency syndrome

patients with myelopathy: Expression and replication in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**: 3337-3341.

22. Egan, M.A.; Carruth, L.M.; Rowell, J.F.; Yu, X. y Siliciano, R.F. 1996. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Protein Endocytosis Mediated by a Highly Conserved Intrinsic Internalization Signal in the Cytoplasmic Domain of gp41 is Suppressed in the Presence of the Pr55gag Precursor Protein. *Journal of Virology* **70** (10): 6547–6556.

23. Faye, Hutchinson J. 2001. The biology and evolution of HIV. *Annu. Rev. Anthropol* **30**: 85-108.

24. Ferri, K.F.; Jacoto, E.; Blanco, J.; Esté, J.A.; Zamzami, N.; Susin, S.A.; Xie, Z.; Brothers, G.; Reed, J.C.; Penninger, J.M. y Kroemer, G. 2000. Apoptosis Control in Syncytia Induced by the HIV Type 1-Envelope Glycoprotein Complex: Role of Mitochondria and Caspases. *J. Exp. Med.* **192** (8): 1081-1092.

25. Flint, S.J.; Enquist, L.W.; Racaniello, V.R. y Skalka, A.M. 2004. *Principles of virology: molecular biology, pathogenesis, and control of animal viruses* (pp. 627). Estados Unidos. 2da. edición. Editorial ASM Press.

26. Fortin, Jean-François; Barbeau, Benoit; Hedman, Håkan; Lundgren, Erik y Tremblay, Michel J. 1999. Role of the Leukocyte Function Antigen-1 Conformational State in the Process of Human Immunodeficiency Virus Type 1-Mediated Syncytium Formation and Virus Infection. *Virology* **257**: 228-238.

27. Frankel, A.D. y Young, J.A.T. 1998. HIV-1: Fifteen Proteins and an ARN. *Annu. Rev. Biochem.* **67**: 1-25.

28. García, J.V. y Miller, A.D. 1991. Serine phosphorylation-independent downregulation of cell-surface CD4 by nef. *Nature* **350** (6318): 508-11.

29. Gervaix, A.; West, D.; Leoni, L.; Richman, D.; Wong-Staal, F. y Corbeil, J. 1997. A new reporter cell line to monitor HIV infection and drug susceptibility in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 4653-4658.

30. Gómez-Icazabalceta, G.; Lamoyi, E.; Ruiz-Rivera, M.B.; Cortés-Rubio, C.N.; Huerta, L. En prensa. *FRET in the analysis of in vitro cell fusion by flow cytometry*. En *Cell fusion*. Methods in Molecular Biology, Springer, Humana Press Science + Business Media Nueva York. Editorial Kurt Pfannkuche.

31. Gordon-Alonso, M.; Yanez-Mo, M.; Barreiro, O.; Alvarez, S.; Muñoz-Fernandez, M.A.; Valenzuela-Fernandez, A. y Sanchez-Madrid, F. 2006. Tetraspanins CD9 and CD81 Modulate HIV-1-induced Membrane Fusion. *J. Immunol.* **177**: 5129–5137.

32. Granados-González, V.; Piedrahita, L.D.; Martínez, M.; Genin, C.; Riffard, S. y Urcuqui-Inchima, S. 2009. Papel del dominio V1/V2 de la glicoproteína 120 del virus de

la inmunodeficiencia humana de tipo 1 en la inducción de anticuerpos neutralizantes. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **27** (9): 523-530.

33. Grigorov, B.; Rabilloud, J.; Lawrence, P. y Gerlier, D. 2011. Rapid Titration of Measles and Other Viruses: Optimization with Determination of Replication Cycle Length. *PLOS ONE* **6** (9): 1-12.

34. Grossman, Z.; Meier-Schellersheim, M.; Paul, W.E. y Picker, L.J. 2006. Pathogenesis of HIV Infection: What Virus Spares is as Important as What it Destroys. *Nature Medicine* **12** (3): 289-295.

35. Gummuluru, S. y Emerman, M. 1999. Cell cycle- and Vpr-mediated regulation of human immunodeficiency virus type 1 expression in primary and transformed T-cell lines. *Journal of Virology* **73**: 5422-5430.

36. Harrison, S.C. 1993. CD4: Structure and Interactions of an Immunoglobulin Superfamily Adhesion Molecule. *Accounts of Chemical Research* **26** (8): 449-453.

37. Hernández de Luna, Israel. 2011. *Estado actual del conocimiento de los eventos intracelulares que controlan la replicación del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en células del sistema inmune*. Tesis de Licenciatura, México: Universidad Nacional Autónoma de México.

38. Huerta, L.; Lamoyi, E.; Báez-Saldaña, A. y Larralde, C. 2002. Human Immunodeficiency Virus Envelope-Dependent Cell-Cell Fusion: A Quantitative Fluorescence Cytometric Assay. *Cytometry* **47**: 100-106.

39. Huerta, L.; López-Balderas, N.; Rivera-Toledo, E.; Sandoval, G.; Gómez-Icazbalceta, G.; Villareal, C.; Lamoyi, E. y Larralde, C. 2009. HIV-Envelope-Dependent Cell-Cell Fusion: Quantitative Studies. *The Scientific World JOURNAL* **9**: 746-763.

40. Jardetzky, T.S. y Lamb, R.A. 2004. A Class Act. *Nature* **427**: 307-308.

41. Jolly, C.; Kashefi, K.; Hollinshead, M. y Sattentau, Q.J. 2004. HIV-1 Cell to Cell Transfer across an Env-induced, Actin-dependent Synapse. *J. Exp. Med.* **199** (2): 283-293.

42. Jordan, A.; Defechereux, P. y Verdin, E. 2001. The site of HIV-1 integration in the human genome determines basal transcription activity and response to Tat transactivation. *The EMBO Journal* **20** (7): 1726-1738.

43. Josefsson, L.; King, M.S.; Makitalo, B.; Brännström, J.; Shao, W.; Maldarelli, F.; Kearney, M.F.; Hu, W.; Chen, J., Gaines, H., Mellors, J.W.; Albert, J.; Coffin, J.M. y Palmer, S.E. 2011. Majority of CD4<sup>+</sup> T cells from peripheral blood of HIV-1-infected individuals contain only one HIV DNA molecule. *PNAS* **108** (27): 11199-11204.

44. Keller, P.M.; Person, S. y Snipes, W. 1977. A Fluorescence Enhancement Assay of Cell Fusion. *J. Cell Sci.* **28**: 167-177.

45. Kutsch, O.; Levy, D.; Bates, P.; Decker, J.; Kosloff, B.; Shaw, G.; Priebe, W. y Benveniste, E. 2004. Bis-Anthracycline Antibodies Inhibit Human Immunodeficiency Virus Type 1 Transcription. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48** (5): 1652-1663.
46. Levy, J.A. 1996. Infection by Human Immunodeficiency Virus – CD4 is not Enough. *Clinical Implications of Basic Research* **335** (20): 1528-1530.
47. Levy, J.A. 2008. *El VIH y la patogénesis del SIDA* (pp. 21-112, 179). México. Editorial Fondo de Cultura Económica.
48. Li, Y.; Yin, Y. y Mariuzza, R.A. 2013. Structural and Biophysical Insights into the Role of CD4 and CD8 in T Cell Activation. *Frontiers in Immunology* **4** (206): 1-11.
49. Lifson, J.D.; Feinberg, M.B.; Reyes, G.R.; Rabin, L.; Banapour, B.; Chakrabarti, S.; Moss, B.; Wong-Staal, F.; Steimer, K.S. y Engleman, E.G. 1986. Induction of CD4-dependent cell fusion by the HTLV-III/LAV envelope glycoprotein. *Nature* **323**: 725-728.
50. Locher, C.P.; Witt, S.A.; Kassel, R.; Dowell, N.L.; Fujimura, S. y Levy, J.A. 2005. Differential effects of R5 and X4 human immunodeficiency virus type 1 infection on CD4<sup>+</sup> cell proliferation and activation. *Journal of General Virology* **86**: 1171-1179.
51. López-Balderas, N.; Huerta, L.; Villareal, C.; Rivera-Toledo, E.; Sandoval, G.; Larralde, C. y Lamoyi, E. 2007. In vitro cell fusion between CD4<sup>+</sup> and HIV-1 Env<sup>+</sup> T cells generates a diversity of syncytia varying in total number, size and cellular content. *Virus Research* **123**: 1-9.
52. Mohammadi, P.; Desfarges, S.; Bartha, I.; Joos, B.; Zangger, N.; Muñoz, M.; Günthard, H.F.; Beerwinkler, N.; Telenti, A. y Ciuffi, A. 2013. 24 Hours in the Life of HIV-1 in a T Cell Line. *PLOS Pathogens* **9** (1): 1-11.
53. Murakami, T. y Freed, E.O. 2000. The Long Cytoplasmic Tail of gp41 is Required in a Cell Type-dependent Manner for HIV-1 Envelope Glycoprotein Incorporation into Virions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97** (1): 343–348.
54. Murakami, T.; Ablan, S.; Freed, E.O. y Tanaka, Y. 2004. Regulation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Env-mediated Membrane Fusion by Viral Protease Activity. *Journal of Virology* **78** (2): 1026–1031.
55. Ogle, B.M.; Cascalho, M. y Platt, J.L. 2005. Biological Implications of Cell Fusion. *Nature* **6**: 567-575.
56. Pantaleo G. y Fauci, A. 1996. Immunopathogenesis of HIV Infection. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**: 825–854.
57. Perez, Lautaro G.; O'Donnell, Melissa A. y Stephens, Edward B. 1998. The Transmembrane Glycoprotein of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Induces Syncytium Formation in the Absence of Receptor Binding Glycoprotein. *Journal of Virology* **66** (7): 4134-4143.

58. Pierson, Theodore; McArthur, Justin y Siliciano, Robert F. 2000. RESERVOIRS FOR HIV-1: Mechanisms for Viral Persistence in the Presence of Antiviral Immune Responses and Antiretroviral Therapy. *Annu. Rev. Immunol.* **18**: 665-708.
59. Plantier, Jean-Christophe; Leoz, Marie; Dickerson, Jonathan E.; De Oliveira, Fabienne; Cordonnier, François; Lemée, Véronique; Damond, Florence; Robertson, David L. y Simon, François. 2009. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat. Med.* **15** (8): 871-872.
60. a) Popovic, M.; Read-Connole, E. y Gallo, R.C. 1984. T4 positive human neoplastic cell lines susceptible to and permissive for HTLV-III. *Lancet* **ii**: 1472-1473.
61. b) Popovic, M.; Sarngadharan, M.G.; Read-Connole, E. y Gallo, R.C. 1984. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* **224**: 497-500.
62. Ramírez, E. de A.; Soriano, V. y Holguín, A. 2005. Regulación de la transcripción en los diferentes subtipos del VIH-1. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **23** (3): 156-162.
63. Ratner, L.; Haseltine, W.; Patarca, R.; Livak, K.J.; Starcich, B.; Josephs, S.F.; Doran, E.R.; Rafalski, J.A.; Whitehorn, E.A.; Baumeister, K.; Ivanoff, L.; Petteway, S.R. Jr.; Pearson, M.L.; Lautenberger, J.A.; Papas, T.S.; Ghayab, J.; Chang, N.T.; Gallo, R.C. y Wong-Staal, F. 1985. Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. *Nature* **313**: 277-283.
64. Rimsky, L.T.; Shugars, D.C. y Matthews, T.J. 1998. Determinants of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Resistance to gp41-Derived Inhibitory Peptides. *Journal of Virology* **72** (2): 986-993.
65. Rinfret, Aline; Latendresse, Hélène; Lefebvre, René; St-Louis, Grégoire; Jolicoeur, Paul y Lamarre, Louis. 1991. Human Immunodeficiency Virus-infected Multinucleated Histiocytes in Oropharyngeal Lymphoid Tissues from Two Asymptomatic Patients. *American Journal of Pathology* **138** (2): 421-426.
66. Ruggiero, E.; Bona, R.; Muratori, C. y Federico, M. 2008. Virological Consequences of Early Events Following Cell-cell Contact between Human Immunodeficiency Virus Type 1-infected and Uninfected CD4 Cells. *Journal of Virology* **82** (16): 7773-7789.
67. Rivera-Toledo, E.; López-Balderas, N.; Huerta, L.; Lamoyi, E. y Larralde, C. 2010. Decreased CD4 and Wide-ranging Expression of other Immune Receptors after HIV-envelope-mediated Formation of Syncytia *in vitro*. *Arch. Virol.* **155**: 1205-1216.
68. Sattentau, Q. Avoiding the void: cell-to-cell spread of human viruses. *Nature Reviews* **6**: 815-826.

69. Sekar, Rajesh Babu y Periasamy, Ammasi. 2003. Fluorescence resonance energy transfer (FRET). *The Journal of Cell Biology* **160** (5): 629-633.
70. Shieh, Joseph T.C.; Martín, Julio; Baltuch, Gordon; Malim, Michael H. y González-Scarano, Francisco. 2000. Determinants of Syncytium Formation in Microglia by Human Immunodeficiency Virus Type 1: Role of the V1/V2 Domains. *Journal of Virology* **74** (2): 693-701.
71. Sodroski, J.; Goh, W.C.; Rosen, C.; Campbell, K. y Haseltine, W.A. 1986. Role of the HTLV-III/LAV Envelope in Syncytium Formation and Cytopathicity. *Nature* **322**: 470-474.
72. Strauss, James H. y Strauss, Ellen G. 2008. *Viruses and Human Disease* (pp. 11-15, 338, 234-237). Canadá. Editorial Elsevier.
73. Sylwester, A.; Murphy, S.; Shutt, D. y Soll, D.R. 1997. HIV-induced T Cell Syncytia Are Self-perpetuating and The Primary Cause of T Cell Death in Culture. *J. Immunol.* **158**: 3996–4007.
74. Tamamis, P. y Floudas, C.A. 2013. Molecular Recognition of CXCR4 by a Dual Tropic HIV-1 gp120 V3 Loop. *Biophysical Journal* **105**: 1502-1514.
75. Teo, I.; Veryard, C.; Barnes, H.; An, S.F.; Jones M.; Lantos, P.L.; Luthert, P. y Shaunak, S. 1997. Circular Forms of Unintegrated Human Immunodeficiency Virus Type 1 DNA and High Levels of Viral Protein Expression: Association with Dementia and Multinucleated Giant Cells in the Brains of Patients with AIDS. *Journal of Virology* **71** (4): 2928–2933.
76. Tersmette, Matthijs; Gruters, Rob A.; de Wolf, Frank; de Goede, Ruud E.Y.; Lange, Joep M.A.; Schellekens, Peter T.A.; Goudsmit, Jaap; Huisman, Han G. y Miedema, Frank. 1989. Evidence for a Role of Virulent Human Immunodeficiency Virus (HIV) Variants in the Pathogenesis of Acquired Immunodeficiency Syndrome: Studies on Sequential HIV Isolates. *Journal of Virology* **63** (5): 2118-2125.
77. Torres-Castro, I.; Cortés-Rubio, C.N.; Sandoval, S.; Lamoyi, E., Larralde, C. y Huerta, L. 2014. Flow Cytometry Analysis of Cell Population Dynamics and Cell Cycle During HIV-1 Envelope-mediated Formation of Syncytia in vitro. *In vitro Cell. Dev. Biol.* **50**: 453-463.
78. UNAIDS, “Global Reports – UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2013” (UNAIDS, Geneva, 2013).
79. Weng, J.; Krementsov, D.N.; Khurana, S.; Roy, N.H. y Thali, M. 2009. Formation of Syncytia is Repressed by Tetraspanins in Human Immunodeficiency Virus Type 1-Producing Cells. *Journal of Virology* **83** (15): 7467-7474.

80. Wiegers, K.; Rutter, G.; Kottler, H.; Tessmer, U.; Hohenberg, H. y Kräusslich, H.G. 1998. Sequential Steps in Human Immunodeficiency Virus Particle Maturation Revealed by Alterations of Individual Gag Polyprotein Cleavage Sites. *Journal of Virology* **72** (4): 2846–2854.
81. Wilen, C.B.; Tilton, J.C. y Doms, R.W. 2012. HIV: Cell Binding and Entry. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**:a006866: 1-13.
82. Wu, Y.; Beddall, M. y Marsh, J. 2007. Rev-Dependent Indicator T Cell Line. *Curr HIV Res.* **5** (4): 394-402.
83. Wyma, D.J.; Kotov, A. y Aiken, C. 2000. Evidence for a Stable Interaction of gp41 with Pr55Gag in Immature Human Immunodeficiency Virus Type 1 Particles. *Journal of Virology* **74** (20): 9381–9387.
84. Zhang, Z.-Q.; Schuler, T.; Zupancic, M.; Wietgreffe, S.; Staskus, K.A.; Reimann, K.A.; Reinhart, T.A.; Rogan, M.; Cavert, W.; Miller, C.J.; Veazey, R.S.; Notermans, D.; Little, S.; Danner, S.A.; Richman, D.D.; Havlir, D.; Wong, J.; Jordan, H.L.; Schacker, T.W.; Racz, P.; Tenner-Racz, K.; Letvin, N.L.; Wolinsky, S. y Hasse, A.T. 1999. Sexual Transmission and Propagation of SIV and HIV in Resting and Activated CD4<sup>+</sup> T Cells. *Science* **286**: 1353-1357.