



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

PARTICIPACIÓN DE AUTOANTICUERPOS EN LA INHIBICIÓN DE LA
FUSIÓN CELULAR MEDIADA POR LAS PROTEÍNAS DE LA
ENVOLTURA DEL VIH-1

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGA

PRESENTA

MIRNA BERENICE RUIZ RIVERA



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: ENRIQUE ORTEGA SOTO

VOCAL: Profesor: JULIO CÉSAR MARTÍNEZ ÁLVAREZ

SECRETARIO: Profesor: GUILLERMO GÓMEZ ICAZBALCETA

1ER. SUPLENTE: Profesor: GIBRAN PÉREZ MONTESINOS

2° SUPLENTE: Profesor: GUSTAVO OLVERA GARCÍA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Guillermo Gómez Icazbalceta

SUSTENTANTE (S):

Mirna Berenice Ruiz Rivera

ÍNDICE

RESUMEN	6
1. INTRODUCCIÓN.....	8
1.1 Clasificación y organización genómica del VIH-1	8
1.2 Estructura del VIH-1	11
1.3 Replicación viral	13
1.4 Características de la infección por el VIH-1.....	15
1.4.1 Fase Aguda	16
1.4.2 Periodo Asintomático.....	16
1.4.3 SIDA.....	17
1.5 Fusión del VIH-1 con una célula blanco	18
1.6 Receptores y mecanismos moleculares implicados en la fusión de membranas mediada por el complejo gp120/gp41	22
1.7 Formación de sincicios y efecto citopático	25
1.8 Autoanticuerpos en la infección por VIH-1	26
2. Pregunta.....	29
3. Hipótesis.....	29
4. Objetivos	29
4.1 Objetivo general	29
4.2 Objetivos particulares:	30
5. Metodología.....	30
5.1 Materiales.....	30
5.1.1 Líneas celulares	30
5.1.2 Trazadores lipofílicos fluorescentes	31
5.2 Cultivo celular.....	32
5.3 Inducción de la expresión de la proteína Env.....	32
5.4 Marcaje de las células con los trazadores lipofílicos	32
5.5 Ensayo de fusión celular	33
5.6 Proceso de fijación con paraformaldehído (PFA) al 2%	34
5.7 Muestra de suero de sangre periférica de donadores sanos y pacientes VIH+	35

5.8 Preparación de las diluciones del suero de los pacientes	35
5.9 Efecto de los sueros de pacientes VIH+ y donadores sanos en la fusión celular	36
5.10 Inmunofluorescencia indirecta	38
5.11 Citometría de flujo	39
5.12 Pruebas estadísticas	40
6. Resultados	40
6.1 Caracterización y cuantificación de la fusión celular por citometría de flujo.	40
6.2 Efecto del suero sobre la fusión celular.....	43
6.3 Inmunofluorescencia indirecta de los sueros de los pacientes y de los donadores sanos.....	46
6.4 Actividad del suero y su relación con los parámetros clínicos de la infección.	57
6.4.1 Relación entre la unión de anticuerpos del suero a antígenos de la membrana celular y la carga viral.....	57
6.4.2 Relación entre el efecto de inhibición de la fusión celular y la carga viral.	59
6.4.3 Relación entre la unión de anticuerpos a antígenos de la membrana celular y la cuenta de CD4+.	59
6.4.4 Relación entre el efecto de inhibición de la fusión celular y la cuenta de CD4+	61
7. Discusión.....	61
8. Conclusiones.....	66
9. Bibliografía	67
APÉNDICE A.....	80
10.1 Extracción de proteínas de membrana de la línea celular.....	80
10.2 Determinación de proteínas por Bradford.....	81
10.3 Adsorción de Anticuerpos del suero por medio de Proteína G	83
10.4 Electroforesis 1D	85
10.5 Western Blot.....	88
Apéndice B.....	91
Publicaciones	91

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico de doble cadena
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
CA	Cápside
DC	Células dendríticas
Dil	Perclorato de 1,1'-dioctadecil-3, 3,3',3'-tetrametilindocarbocianina
DiO	Perclorato de 3,3'-dioctadeciloxacarbocianina
DMSO	Dimetil sulfóxido
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
HR1	Secuencia hepta repetida 1
IMF	Intensidad media de fluorescencia
IN	Integrasa
LLP-1	Péptido lítico de lentovirus 1
LTR	Región repetida terminal larga
MA	Matriz
NC	Nucleocápside
Nef	Factor negativo
PBS	Buffer fosfato salino
PIC	Complejo de preintegración
PR	Proteasa
Rev	Proteína reguladora
RT	Transcriptasa inversa
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
T20	Enfuvirtida
VIH-1	Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

RESUMEN

Durante la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), se observa una disminución progresiva en la cuenta de los linfocitos T CD4+ asociada a la replicación continua del virus. El aumento en la declinación de los linfocitos T y la más rápida progresión de la infección hacia el estado de inmunodeficiencia coincide con la detección en la sangre y tejido de los pacientes, de variantes virales inductoras de sincicios. En los sitios de contacto célula-célula, la interacción entre el complejo de proteínas virales de la envoltura Env, (gp120-gp41) y los receptores celulares de membrana, principalmente CD4, promueven la creación de poros de fusión entre las dos membranas plasmáticas, para culminar con la producción de sincicios. Un evento relacionado a la formación de sincicios es la transmisión directa del virus de una célula a otra. Además, la transmisión célula-célula es un medio más potente y eficiente en la propagación del virus en poblaciones celulares que la infección por partículas virales libres. Actualmente se conoce que estos eventos pueden ser potenciados o modulados por moléculas propias de la membrana celular.

Resulta notable que durante la infección por el VIH-1 se producen autoanticuerpos que pueden reconocer moléculas de la superficie de los linfocitos T. En conjunto con anticuerpos anti-Env, los autoanticuerpos dirigidos a moléculas de la superficie linfocitaria podrían contribuir al bloqueo de la fusión de membranas durante la formación de sincicios y la propagación del virus de célula a célula. Por lo tanto, en esta tesis nos preguntamos si el suero de los pacientes VIH positivos inhibe la formación de sincicios y, si este efecto tiene relación con la presencia de anticuerpos en el suero dirigidos a moléculas presentes en la membrana de los linfocitos T CD4+.

En esta tesis se estudió: 1) el efecto del suero de pacientes VIH+ y sanos sobre la fusión celular y su relación con el estadio clínico de la infección, mediante citometría

de flujo, 2) la relación de un efecto de inhibición en la fusión celular por el suero con la presencia de autoanticuerpos en los sueros de los pacientes VIH-positivos.

Se utilizaron líneas celulares de linfocitos Jurkat T CD4+ transfectadas con el gene *env* de una variante del VIH-1 altamente fusogénica (células Env+), se realizó una metodología basada en el uso de dos colorantes lipofílicos fluorescentes (Dil y DiO) para marcar las células participantes y citometría de flujo para la cuantificación de los productos de fusión. Se distinguieron células fusionadas y agregadas mediante la identificación del efecto de transferencia de energía de la fluorescencia (FRET) entre ambos colorantes, así como el perfil morfológico (tamaño y granularidad) de las células fusionadas.

Para la determinación de la presencia de autoanticuerpos en los sueros de los pacientes, se empleó el método de inmunofluorescencia indirecta y citometría de flujo.

Se observó que algunos sueros inhibieron la fusión celular. Esa inhibición se asoció con la unión de anticuerpos presentes en el suero a las proteínas de superficie de la línea celular de linfocitos Jurkat T CD4+.

La actividad del suero se relacionó con la unión de autoanticuerpos a las células blanco, que se generan como una respuesta inmune contra la infección del VIH-1 pero sin causar manifestaciones clínicas de autoinmunidad.

1. INTRODUCCIÓN

El virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) se identificó como el agente causal del Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) en 1984.^{146, 134} En el 2013 se estimó que 35.3 millones de personas en el mundo vivían con el VIH-1. Para mediados de 2014, la infección por el VIH-1 había causado la muerte de 30 millones de personas y se calcula que cada año mueren 1.8 millones.¹²⁶

La infección por el VIH-1 se caracteriza principalmente por la disminución en la cuenta de linfocitos T CD4⁺ y la diseminación del virus hacia ganglios linfáticos,^{28, 63} lo que conduce eventualmente al deterioro progresivo del sistema inmunológico del paciente, para finalmente progresar hacia el síndrome de inmunodeficiencia adquirida SIDA, con lo cual el paciente queda ampliamente susceptible a infecciones oportunistas y neoplasias.

Aunque se ha logrado reducir la infección por el VIH-1 como una de las principales causas de muerte en adultos jóvenes,¹²⁶ quedan por definir varios de los mecanismos por los cuales el VIH-1 desencadena la inmunodeficiencia, para así generar terapias novedosas y mejorar las ya existentes, con el objetivo de aumentar la esperanza y calidad de vida de los pacientes.

1.1 Clasificación y organización genómica del VIH-1

El VIH-1 pertenece al género de los Lentivirus y a la familia de los Retrovirus. Los Lentivirus se distinguen por tener un periodo de incubación asintomático largo, además de que poseen la capacidad de infectar células mediante la formación de sincicios entre la célula infectada y una célula sana. Los retrovirus se caracterizan por tener un genoma de ARN de cadena sencilla que se transcribe a ADN de cadena doble dentro de la célula a través de la enzima viral transcriptasa reversa (RT). El ADN viral sintetizado es insertado posteriormente en el genoma de la célula hospedera.²⁸ El

ADN complementaria del ARN viral, el dominio de ribonucleasa de la RT, denominada p15, separa al ARN de la nascente cadena de ADN, lo que permite a la RT sintetizar la segunda cadena de ADN, tomando como molde la primera que se formó. Finalmente, la integrasa viral, denominada p31, realiza la inserción del ADN viral en el genoma de la célula hospedera.

El gen *env* sintetiza a la proteína Env, que está formada por el precursor gp160, el cual es a su vez cortado por la proteasa p10, para dar lugar a las proteínas gp120 y gp41⁵⁵. gp41 se inserta en la bicapa lipídica de la envoltura viral mediante un dominio transmembranal, mientras que gp120 interacciona con gp41 mediante uniones no covalentes en la parte externa de la membrana.^{55,114} gp120 y gp41 se asocian adicionalmente formando trímeros.^{20, 104}

Además de las proteínas estructurales, el genoma del VIH-1 expresa proteínas reguladoras, que son proteínas que tienen función directa sobre la célula hospedera: la proteína Transactivadora (Tat) y la proteína Reguladora de la expresión de proteína viral (Rev). Tat es una proteína implicada en la regulación positiva de la replicación del VIH-1,¹³¹ mediante su unión a una región del ARN viral, para potenciar la transcripción, mientras que Rev se encarga de regular la expresión de las proteínas virales que son necesarias para la producción de nuevos viriones, al controlar el ritmo de exportación del ARNm viral al citoplasma.^{45, 150}

El genoma viral también codifica para proteínas accesorias, las cuales no forman parte del virus maduro, pero desempeñan un papel importante en los acontecimientos tempranos de la infección por el VIH-1, ya que afectan eventos como el ensamblaje,^{18, 103} ciclo celular, gemación e infectividad durante la producción de virus infecciosos.^{127, 131} Las proteínas accesorias son Vif, Vpu y Nef.

La proteína Vif realiza su función antes que el virus gema de la célula. Vif previene que el virus acarree a la proteína celular APOBCEG (A3G), un factor de restricción antiviral que interfiere con la retrotranscripción. A3G es una citidina desaminasa celular que se une al ARN,^{83, 164} al momento de la retrotranscripción causa

la mutación de la dC por dU en la primera hebra de ADN retrotranscrita; posteriormente por cada dU se adiciona dA a la segunda hebra de ADN (hebra positiva) generada. El gran número de mutaciones que introduce A3G genera un ADNc proviral abortivo.⁹² Vif induce la degradación de APOBEC3G vía el proteosoma (26S),¹¹⁶ específicamente Vif interactúa con la ubiquitin ligasa E,¹⁶³ para inducir la poliubiquitinación de A3G. La degradación de A3G evita que sea incorporada en los virus recién formados, lo que impide la retrotranscripción defectuosa antes mencionada.

La proteína Vpu tiene dominios que la unen con la membrana,¹⁰⁹ principalmente del retículo endoplasmico rugoso y del aparato de Golgi. A su estructura y localización en la membrana se le asocian dos actividades importantes para la replicación viral: Promueve la liberación de partículas virales de la membrana celular y desestabiliza la membrana, agrupandose para formar un canal ionico.^{128, 133}

Por otra parte, Vpu regula negativamente la expresión de CD4. Esta regulación negativa evita que CD4 se una con el complejo Env dentro de la misma célula; lo que permite una concentración óptima de Env en la membrana celular, necesaria para la gemación viral.⁸⁷

La proteína Nef (acrónimo de *negative factor*, por sus siglas en inglés) interactúa con proteínas celulares que inducen la regulación negativa de la expresión de CD4 y MHC-I, lo que conduce a la evasión del sistema inmune. Además, Nef reduce el umbral de activación del linfocito T CD4+, con lo que facilita la integración del genoma viral y la replicación del virus.¹⁴¹

1.2 Estructura del VIH-1

Un virión maduro del VIH-1 mide aproximadamente 120 nm de diámetro.⁸⁶ El VIH-1 está conformado en el exterior por una envoltura esférica, compuesta por una bicapa lipídica derivada de la célula hospedera, en la cual se encuentra insertado el complejo de glicoproteínas virales gp120/gp41.

En la figura 2 se ilustra un esquema de la estructura de un virión del VIH-1. Se pueden observar la matriz (MA, p17), que forma la capa interna debajo de la envoltura viral, la cápside (CA, p24), que forma el centro cónico que incluye dos copias del genoma viral, compuesto por dos cadenas de ARN. La nucleocápside (NC, p7) interacciona con el ARN dentro de la cápside en forma de complejos de ribonucleoproteína con la proteína p7.

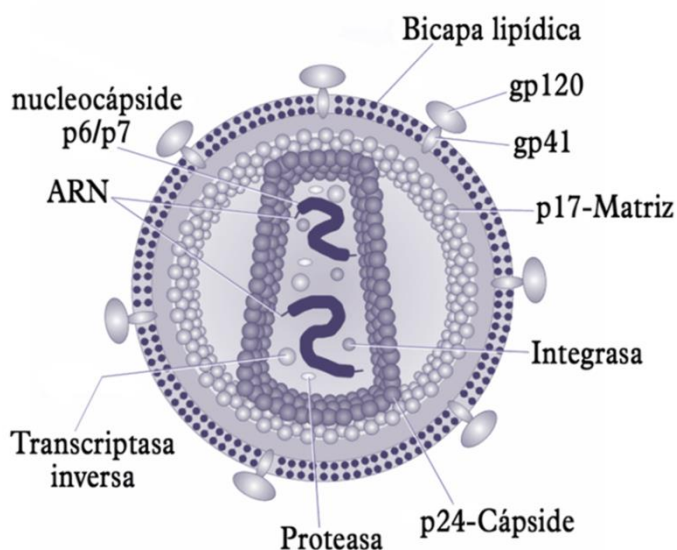


Figura 2. Esquema de la estructura del virión del VIH-1. En la parte externa del virión se encuentra la envoltura de la bicapa lipídica, la cual expone las espículas compuestas por gp120/gp41. Por debajo de estas proteínas se encuentra la matriz. Debajo de la matriz se representa la nucleocápside con sus diversos elementos; la forma de cono truncado se debe a las proteínas de la cápside después de que han polimerizado; dentro de la cápside se encuentran dos copias del ARN genómico viral, la retrotranscriptasa reversa, la integrasa y la proteasa. (Modificado de Israel Hernández de Luna, 2011, Estado actual del conocimiento de los eventos intracelulares que controlan la replicación del VIH-1 en células del sistema inmune. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán).

El ADN de doble cadena sintetizado a partir del ARN de cadena simple del virus, es eventualmente integrado en el genoma celular para dar lugar al provirus. El provirus está delimitado en ambos extremos por unas secuencias de nucleótidos denominadas

regiones repetidas largas terminales (LTR, por sus siglas en ingles), que poseen señales para la iniciación y la terminación de la transcripción.¹¹⁹

1.3 Replicación viral

Una vez que el virus entra a la célula, el ARN del VIH-1 sale de la cápside viral con la ayuda de la proteína p24, en asociación con ciclofilinas (p.e. ciclofilina A (Cyp A) uniéndose a la proteína de la cápside.³² La participación de Cyp A depende de su abundancia en células blanco .⁶⁹ Una vez asociado el ARN viral a las proteínas de la cápside y p17 principalmente, la ARN polimerasa lleva a cabo la transcripción reversa para eventualmente generar una copia del genoma viral, de ADN de doble cadena (cADN).^{127,131} La proteína p7 permite una transcripción inversa eficiente y también incrementa la proporción de transcritos largos de cADN producidos en la transcripción inversa.⁴⁶ El cADN resultante se incorpora al complejo de preintegración (PIC), el cual contiene a las proteínas virales MA, Vpr e Integrasa.^{16, 71} El PIC es transportado al núcleo a través del complejo del poro nuclear. Una vez en el núcleo, el ADN viral linear se integra en el genoma celular por medio de un proceso que involucra a la integrasa y a diversos factores celulares.^{32, 94} La integración del provirus ocurre en regiones transcripcionalmente activas en el genoma de la célula hospedera.^{12, 145} Tras la integración, las primeras especies de ARNm viral generadas por la célula infectada son transcritas con corte y empalme doble que codifican para las principales proteínas reguladoras como Tat, Rev y Nef ^{60, 127} (figura 3). La proteína Rev proporciona un balance entre la expresión de las proteínas reguladoras y las proteínas estructurales del VIH-1. Rev promueve el transporte hacia el citoplasma del ARNm que no ha sufrido corte y empalme, el cual es responsable de codificar para las proteínas estructurales y de las enzimas que se incorporaran a los virus infecciosos.^{45, 150} El ensamblaje viral se lleva a cabo en la membrana celular, donde el ARN viral se incorpora en cápsides que geman de la superficie celular. La incorporación de gp120 y gp41 en la envoltura del virión involucra la asociación del extremo citoplásmico del gp41 con la proteína Gag

(Pr55).^{122, 162} La gemación puede llevarse a cabo de dos formas.⁵⁸ Una involucra la traslocación del virus hacia las balsas lipídicas en zonas de la membrana plasmática ricas en esfingolípidos y colesterol, hacia donde se localizan Gag y Gag/Pol. El virus gema preferentemente de estas regiones. La unión del virión con las balsas lipídicas está influida por cantidades de colesterol, que es importante para el ensamblaje y la salida del virus.¹²⁴ La otra forma propuesta, llamada la hipótesis del exosoma troyano, involucra el ensamblaje del VIH-1 en cuerpos vesiculares hacia donde gema el virus. Estos cuerpos se dirigen a la superficie celular y se fusionan con la membrana plasmática, liberando a los virus como un exosoma.⁵⁹ La maduración final de las proteínas del virión, mediada por la proteasa viral, ocurre dentro de la partícula en gemación. La proteína de la cápside p24, así como Vpu están involucradas en los pasos finales del ensamblaje de la partícula viral.^{53, 158}

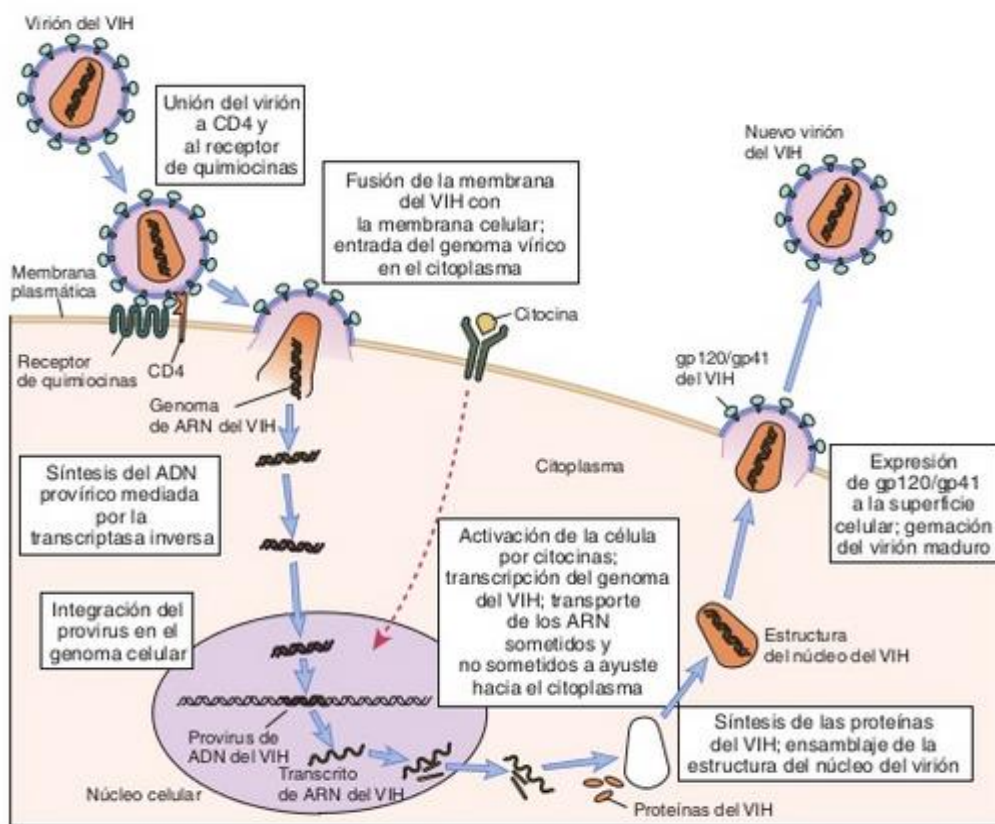


Figura 3. Esquema del ciclo replicativo del VIH-1 se inicia con la unión del virus a los receptores y correceptores celulares y la fusión de la envoltura viral con la membrana de la célula blanco. El ARN es

liberado desde la cápside y sirve de molde para la síntesis del ADN copia por acción de la transcriptasa reversa. Cuando la célula inicia un proceso de transcripción activa, también se expresa el genoma viral y se producen las proteínas que se ensamblan para producir nuevas partículas virales. Finalmente ocurre la salida por gemación. (Modificado de Abbas, Cellular and Molecular Immunology 7ª ed 2011).

1.4 Características de la infección por el VIH-1

La infección por el VIH-1 se caracteriza principalmente por la reducción en el número y producción de linfocitos T CD4⁺.⁵⁶ El VIH-1 infecta a las células T CD4+, macrófagos residentes, células dendríticas o células de la mucosa que recubren la cavidad rectal o cervicovaginal.^{65, 166} Una vez que el virus infecta a las células dendríticas, las células migran a los ganglios linfáticos, en donde transfieren el virus a las células T.¹⁶⁶

El curso de la infección del VIH-1 se puede dividir en tres etapas de acuerdo con el estadio clínico: infección aguda, periodo asintomático y SIDA (figura 4).

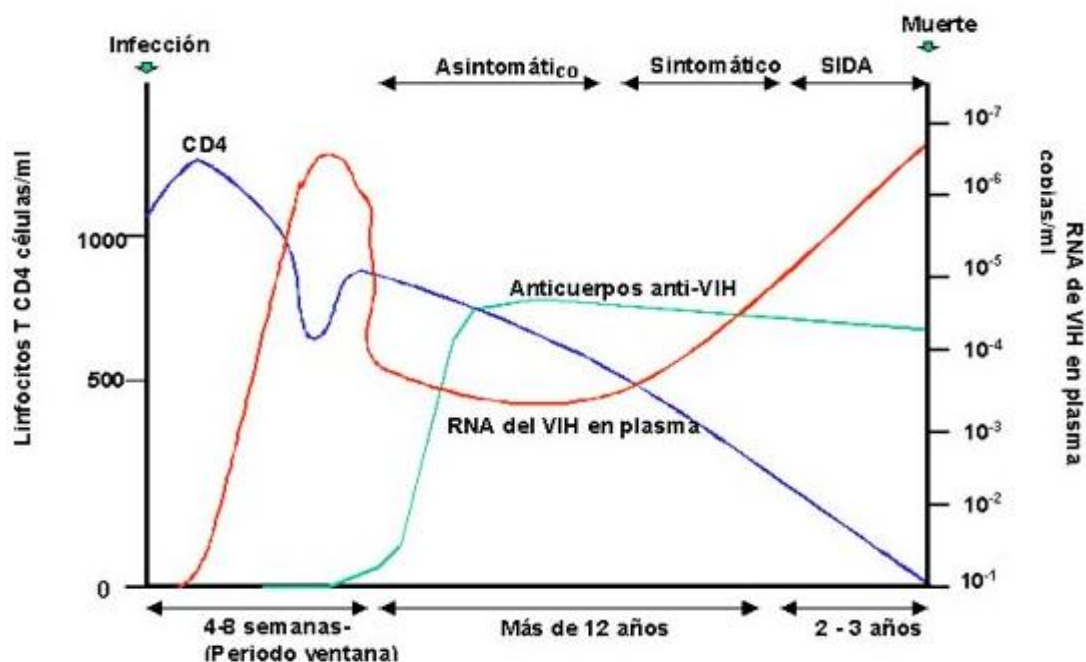


Figura 4. Esquema que representa el curso de la infección del VIH-1. Se muestran los cambios en la cuenta de linfocitos T CD4⁺ y la carga viral a través del tiempo y los estadios de la infección del VIH-1. (Adaptado de www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/virologia/sida-vih.html).

1.4.1 Fase Aguda

La fase aguda se caracteriza por una alta replicación viral y diseminación generalizada del VIH-1 por el organismo con una importante caída en la cuenta de células T CD4+. Esta fase aguda puede ser asintomática o asociada con un síndrome semejante a la infección por influenza A y B. Los síntomas aparecen repentinamente y duran de 3 a 21 días, aproximadamente. La elevada replicación viral tiene lugar en un periodo de 5 a 7 días con hasta 5,000 partículas infecciosas (PI)/mL, o $>10^7$ moléculas de RNA viral/mL de plasma detectadas.⁴³ En esta etapa se puede detectar al antígeno p24 de la cápside viral, a menudo concomitante con las manifestaciones clínicas y se da la seroconversión al detectar anticuerpos neutralizantes contra el VIH-1; esta seroconversión tiene lugar en un lapso de días a semanas después de la infección.^{36, 82} En la infección aguda se eleva el número de células T CD8+ como respuesta inmune celular que se ha observado en otras infecciones virales.⁵⁶

1.4.2 Periodo Asintomático

Esta etapa se caracteriza por una reducción notable en la replicación del virus, debido principalmente a la inducción de una activa respuesta inmune, durante la cual se estabiliza el número de células T CD4+, pero generalmente por debajo de los niveles normales. Se ha establecido que los T CD4+ circulantes disminuyen con una tasa estimada de 25 a 60 células/ μ L por año.⁹⁰

A diferencia de la fase aguda, en la fase asintomática, el aislamiento del virus a partir de las células de la sangre periférica es considerablemente más difícil y el nivel de antígeno p24 en el plasma puede caer por debajo del nivel de detección. Esta supresión continúa de la replicación del VIH-1 durante el periodo asintomático, es mediada principalmente por células antivirales T CD8+ citotóxicas.^{98, 138}

Además, se pueden observar anomalías en las células B como la producción de autoanticuerpos y la falta de respuesta a antígenos independientes de células T ¹³⁷, ¹⁴⁷ y quimiotaxis disminuida en macrófagos.

1.4.3 SIDA

El SIDA es el estado terminal de la infección persistente por el VIH-1. Su característica más prominente es una inmunosupresión severa como resultado de la caída drástica del número de células T CD4+. En esta etapa el número de linfocitos T CD4+ ha caído por debajo de 200 células/ μ L, mientras que la carga viral se incrementa considerablemente.^{88, 108, 125} En los ganglios linfáticos, la replicación del virus se incrementa simultáneamente con la destrucción del tejido linfoide de manera irreversible,⁴⁷ debido a una respuesta inmune celular hiperactivada.^{13, 97, 98, 138}

El VIH-1 también puede inducir daño a los neutrófilos a través de la unión de componentes de la envoltura viral a la membrana celular, lo que disminuye las respuestas quimiotácticas, la actividad fagocítica y la producción de superóxido,¹²¹ lo que conduce al desarrollo de infecciones bacterianas serias. Además, el paciente es atacado por infecciones por microorganismos que normalmente no son considerados patógenos.

Por lo tanto, conforme la infección progresa al SIDA, se observa una disminución irreversible en el número de células T CD4+, un aumento de la carga viral y pérdida de anticuerpos neutralizantes en contra del virus.⁴⁴

El surgimiento de cepas virales con mayor capacidad replicativa se ha asociado a mayor pérdida de linfocitos T CD4+ y más rápida progresión clínica al SIDA. Resulta notable que algunas de esas variantes virales tienen la capacidad de generar sincicios,²⁴ mientras que por parte del hospedero factores como composición genética y su respuesta inmunológica particular influyen en el curso clínico de la infección por el VIH-1.

Una respuesta del sistema inmune de los humanos y de otros animales, contra las infecciones virales es la producción de anticuerpos que se unen a los virus y los neutralizan. Esa respuesta es mediada principalmente por inmunoglobulinas del tipo IgG.⁸⁵ En el caso de la infección por el VIH-1, el blanco para estos anticuerpos neutralizantes pueden ser las proteínas de la envoltura gp120 y gp41; ^{14, 23} también se han identificado anticuerpos monoclonales ampliamente reactivos, dirigidos contra epítopos del sitio de unión de gp120 a CD4.⁹ Varios estudios han indicado que la neutralización del VIH-1 puede involucrar el bloqueo de la unión del virus, fusión o un paso posterior a la fusión virus-célula.¹¹³ La unión del VIH-1 al receptor CD4 también activa vías de señalización y la subsecuente expresión de citocinas y quimiocinas que influyen en la eficiencia de la infección por el VIH-1.¹³³

1.5 Fusión del VIH-1 con una célula blanco

La entrada del VIH-1 a las células del hospedero se da a través de la unión y fusión de la membrana celular con la envoltura del VIH-1 a través de tres procesos: unión, fusión y entrada. Para lograr la entrada eficiente del virus es necesaria la unión de gp120 viral con el receptor CD4 y los correceptores, que son principalmente CCR5 y CXCR4, lo cual induce un cambio conformacional en gp120 que permite la exposición de una región de gp41 y luego la fusión a través de gp41 con otra molécula de la superficie celular^{73, 135} (figura 5).

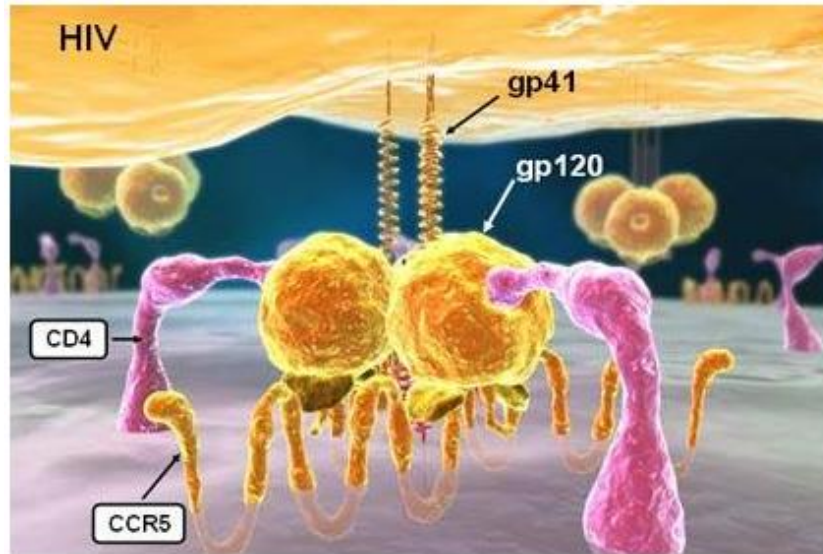


Figura 5. Esquema que representa interacción de las glicoproteínas de la envoltura del VIH-1 (gp120 y gp41) y una célula blanco. (Modificado de <http://epidemiologiamolecular.com/entrada-vih-celula-farmacos-inhibidores/>).

El complejo de glicoproteínas de la envoltura del VIH-1 consiste de dos subunidades asociadas no covalentemente, gp120 y gp41. La gp120 es la proteína más externa y contiene dos sitios de unión que el VIH-1 requiere para la unión a las células blanco, se encuentra expuesta en forma de espículas asociadas con residuos de azúcar. La gp41 es una proteína transmembranal que contiene las estructuras necesarias para la oligomerización del complejo, su fijación a la membrana viral y los dominios requeridos para la fusión de la membrana viral con la membrana celular.⁴²

La estructura de la proteína gp120 consiste de 5 regiones variables entre las distintas cepas del VIH-1 (V1 a V5) y 5 regiones constantes (C1 a C5), las cuales tienden a ser similares entre los diferentes aislamientos virales (figura 6). Las regiones V1 y V2 se encuentran unidas por puentes de disulfuro y forman el dominio V1/V2; las otras tres regiones (V3, V4 y V5) forman asas independientes dentro de la gp120.^{86, 152} Gp120 es una proteína membranal profusamente glicosilada, que está anclada al virus vía interacciones no covalentes con la proteína transmembranal gp41.⁷²

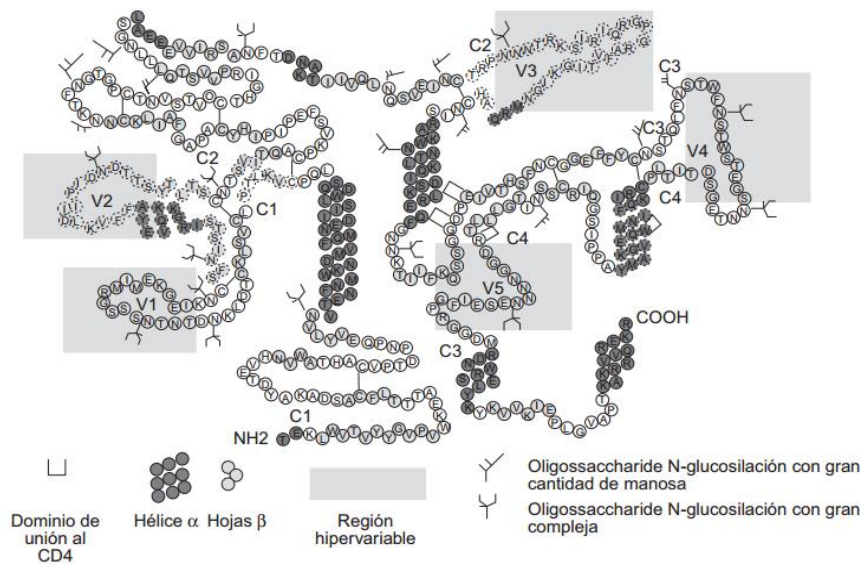


Figura 6. Esquema de la estructura secundaria de la glicoproteína 120 con las regiones variables (V1-V5), delimitadas por la sombra gris. También se indican las regiones constantes (C1-C5) y los sitios de glicosilación (Modificado de José Alcamí, 2004).

La glicoproteína gp41 se ha dividido en tres zonas (figura 7): cola citoplasmática (contiene al extremo carboxilo), región transmembranal y ectodominio (o dominio extracelular, que contiene el extremo amino). La cola citoplasmática interactúa con las proteínas de matriz (MA); ¹²² además tiene dos dominios que alteran la estabilidad o permeabilidad de la membrana, denominados péptidos líticos de lentivirus (LLP-1 y LLP-2) (figura 8).

El ectodominio está involucrado en el proceso de fusión de la envoltura viral con la membrana de la célula blanco. Tiene dos α -hélices con un patrón característico de 7 aminoácidos, llamadas secuencias hepta repetidas (HR), y en su parte distal (lado amino) se encuentra el péptido de fusión. El par de hélices están separadas por un asa que permite la interacción antiparalela. La α -hélice próxima a la membrana se llama CHR o HR2 y la más distal a la membrana es llamada NHR o HR1. La asociación entre los trímeros del complejo Env es mediada por la interacción entre las α -hélices de gp41 vecinas, que se ordenan con las HR1 al centro y las HR2 en la periferia.²² (figura 8).

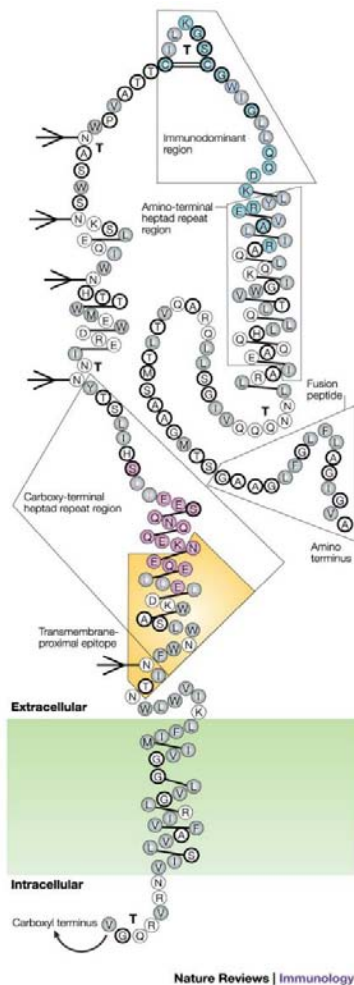


Figura 7. Esquema de la estructura secundaria de la proteína gp41. Las secuencias que están enmarcadas con líneas negras son hélices alfa. Los aminoácidos hidrofóbicos se muestran con círculos oscuros, los aminoácidos cargados se muestran con los círculos abiertos y los aminoácidos neutros se muestran con círculos parcialmente llenos. Los sitios de glicosilación se muestran con flechas. (Modificado de Zolla-Pazner, 2004).

Además del receptor CD4, el virus requiere de correceptores para entrar a la célula. Los correceptores en la fusión virus célula es CCR5 para variantes virales trópicos de macrófagos y linfocitos T CD4+ de, memoria ^{25, 107} y CXCR4 es el correceptor para cepas con tropismo hacia células T CD4+.⁸ Aquellas variantes virales que emplean el correceptor CCR5 se conocen como virus R5, mientras que los virus que emplean el otro correceptor CXCR4 se conoce como virus X4.^{27, 37} También existen variantes virales con tropismo dual (X4/R5) que puede usar cualquiera de los dos

receptores ³⁹ dependiendo de su densidad relativa en la membrana de la célula.⁴³ En tejidos linfoides los primeros tipos celulares de replicación viral son las células T CD4+, células dendríticas (DC) y los macrófagos diferenciados.¹⁴³ Por lo tanto, el VIH-1 es un virus politrópico, esto es, que puede infectar diferentes tipos celulares, aunque los niveles más altos de replicación se producen en células T CD4+.⁶⁰

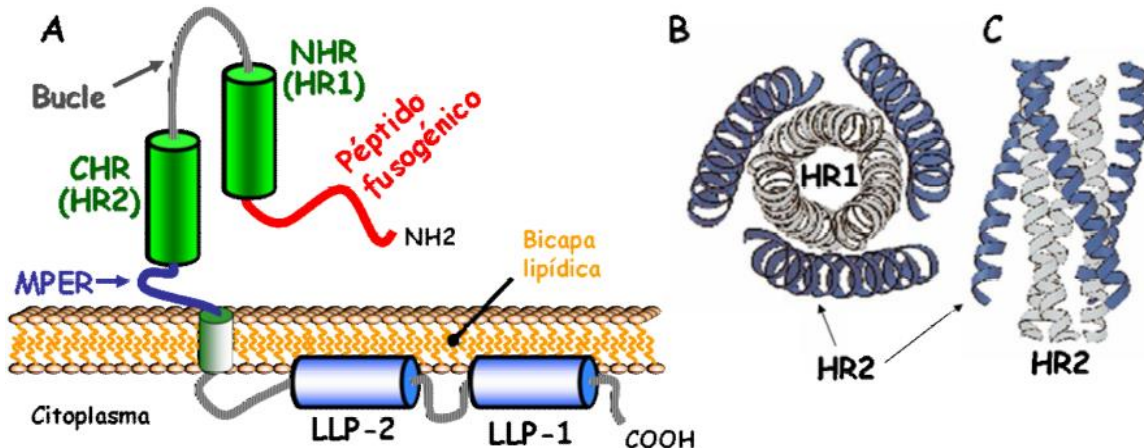


Figura 8. Esquemas de la estructuras en gp41. A) Se representan el péptido fusogénico, alfa hélices con heptarepetidos (HR), lado amino (NHR o HR1) y lado carboxilo (CHR o HR2), asa, región extracelular próxima a la membrana y los LLPs. B) y C) Asociación de los dominio HR cuando las gp41 interactúan formando trímeros. Modificado de Israel Hernández de Luna, 2011, Estado actual del conocimiento de los eventos intracelulares que controlan la replicación del VIH-1 en células del sistema inmune. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

1.6 Receptores y mecanismos moleculares implicados en la fusión de membranas mediada por el complejo gp120/gp41

Las proteínas de la envoltura viral inducen la fusión de membranas mediante la interacción con la molécula CD4+ y con un correceptor apropiado. La secuencia de eventos moleculares que conducen a la fusión de membranas es análoga al proceso de fusión virus-célula.

Las regiones V1/V2, V3 y C4 son las más importantes en la entrada viral.^{77, 95} Los puentes disulfuro formados entre ambos dominios darán lugar a la cavidad que va a interactuar con CD4+; esta cavidad se construye por elementos derivados de las

regiones C3 y C4. El sitio de interacción de CD4 y gp120 está resguardado, protegido y bien conservado estructuralmente.^{84, 91}

La interacción entre CD4 y gp120 (figura 9) es de tipo electrostático no covalente. El sitio de unión al receptor CD4 en gp120 tiene carga negativa y atrae la carga positiva del receptor. Además, se manifiestan fuerzas de Van der Waals y puentes de hidrógeno que ayudan a estabilizar la interacción CD4-gp120. Un aminoácido de fenilalanina, que está situado en la posición 43 de la molécula CD4, es el único residuo que se une a esta cavidad de gp120, formada por los dominios V1/V2. Como consecuencia de esta unión, el núcleo conservado de gp120 sufre cambios conformacionales que hacen que pase de un estado flexible a otro rígido, lo cual permite la interacción posterior con los receptores de quimiocinas.¹²³

Los correceptores CXCR4 y CCR5 pertenecen a la familia de receptores con dominios transmembranales acoplados a la proteína G. Presentan una estructura α -hélice de 4 dominios transmembrana: 3 bucles extracelulares y un dominio N-terminal. La unión del complejo CD4-gp120 a los correceptores se produce a través de la región V3 de gp120, aunque hay otras regiones de ésta que también participan en esta interacción. En particular, el brazo de la región V3 de gp120, junto con residuos del dominio conservado C4, se encarga de la unión de gp120 al dominio N-terminal de CCR5, mientras que tanto la corona como el brazo de V3 participan en la unión de gp120 a la superficie de CCR5.³⁰ En el caso de CXCR4, es la región V3 de gp120 la que interacciona directamente con CXCR4, con independencia de las regiones V1/V2 de gp120.¹³⁹

El mapeo de la región de unión de gp120 al receptor de quimiocinas indica que, para el virus R5, el dominio N-terminal y el segundo bucle extracelular de CCR5 son esenciales para el reconocimiento y la actividad como correceptor, mientras que para las cepas X4 el lugar crítico es el segundo bucle extracelular (ECL2).¹⁶¹

La gp41 es el principal mediador viral del proceso de fusión del VIH-1 a las células diana. Si se analiza de forma lineal su estructura, en el extremo N-terminal se encuentra

el dominio correspondiente al péptido de fusión. Su carácter hidrofóbico de gp41 es lo que permite su inserción en la membrana celular. A continuación se encuentran las regiones repetidas heptad-repeat 1 (HR1) y heptad-repeat 2 (HR2), que presentan aminoácidos con un patrón de repetición característico de 7 residuos, de los cuales los correspondientes a la primera y cuarta posición son aminoácidos hidrofóbicos. Estos aminoácidos median la unión de los monómeros de gp41 en la forma trimérica de la envoltura viral.

Durante el proceso de fusión se produce una reorganización estructural de gp41 que provoca la interacción entre las regiones HR1 y HR2 y lleva a la formación de una estructura termoestable de 6 hélices, que es fundamental para que se produzca la fusión entre las membranas del VIH-1 y la célula diana.¹⁰⁶ La estructura de 6 hélices está compuesta por un trímero interno, formado por las estructuras en espiral enrolladas de HR1 y otro trímero externo formado por las regiones HR2. Las regiones HR2 se unen de forma antiparalela a las estructuras en espiral enrollada de HR1 a través de cavidades hidrofóbicas.¹⁹ Las interacciones hidrofóbicas entre las regiones HR1 y HR2 confieren a la estructura de 6 hélices una gran estabilidad. El cambio en energía libre asociado a la formación de la estructura de 6 hélices es lo que suministra la fuerza necesaria para producir la formación de un poro de fusión.¹¹⁷ (figura 9).

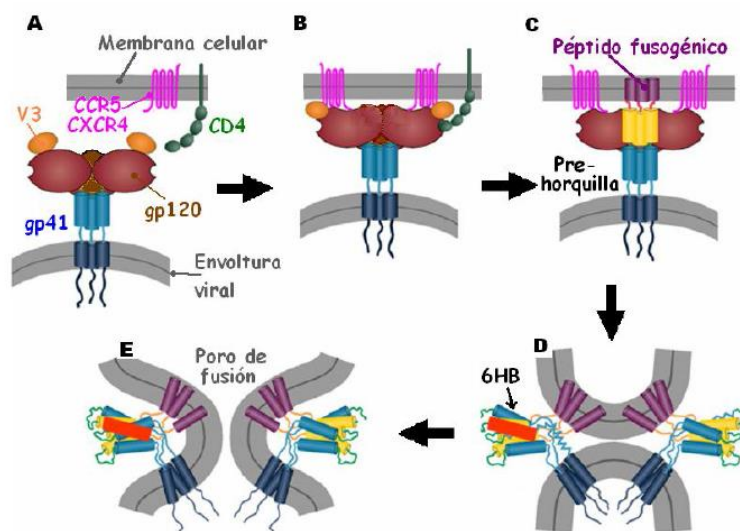


Figura 9. Interacción de Env con receptores y fusión de membranas. A) CD4 es el receptor que se reconoce primero por gp120. B) Tras la interacción, gp120 expone sitios de unión al correceptor (presentes en V3, V1 Y V2); la flexibilidad en CD4 permite un mayor acercamiento de gp120 al correceptor; C) al desplegarse gp41, el péptido fusogénico de gp41 puede insertarse en la membrana de la célula blanco, perturbando su estructura. D) La tendencia a restablecer la interacción entre las hélices de gp41 genera la estructura 6HB. E) Formación del poro de fusión, el cual se expande. (Modificado de Israel Hernández de Luna, 2011, Estado actual del conocimiento de los eventos intracelulares que controlan la replicación del VIH-1 en células del sistema inmune. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán).

1.7 Formación de sincicios y efecto citopático

La característica más prominente de la infección por el VIH-1 es la reducción en el número de linfocitos T CD4+. Se han proporcionado evidencias de que la apoptosis o los procesos relacionados con la muerte celular pueden ser los principales mecanismos de muerte de las células CD4+ y otras células, en personas infectadas con VIH-1.^{75, 99}

Sin embargo, una característica importante de la infección por el VIH es la formación de células multinucleadas o sincicios, que se originan como resultado de la fusión de las células infectadas con las células CD4+ no infectadas.^{100, 101} Algunas variantes R5 y X4 se distinguieron inicialmente por la inducción de sincicios en líneas de células T infectadas.^{155, 156} La fusión célula-célula en cultivo puede observarse dentro de las primeras dos horas¹⁵⁴ depende de la temperatura,⁵⁴ no requiere de la síntesis de ADN, ARN o proteínas celulares, e involucra a proteínas y glicolípidos de la superficie celular.^{66, 112, 154} Se ha reportado que gp41 contiene el péptido de fusión, determinante de la fusión celular.^{51, 52} Los sincicios son el resultado de la actividad de Env en interacción con receptores específicos sobre la superficie de las células blanco.^{67, 151} En estudios *in vitro* se ha observado que los sincicios son el principal mecanismo de muerte de células T en cultivos infectados por el VIH-1, debido a que los sincicios fusionan células más rápidamente de lo que estas se dividen. Una característica importante de estos sincicios es que una vez que se destruyen, inducen la formación local de nuevo sincicios, que son la fuente principal de nuevo virus en los cultivos.¹⁵⁴ Se ha postulado que el deterioro de los nódulos linfáticos que se observa en pacientes con progresión al SIDA, puede estar influida por la fusión celular.^{148, 152} Un fenómeno

relacionado a la fusión de membranas mediado por las proteínas de la envoltura del VIH-1, es la capacidad de transmisión célula-célula de virus infeccioso. Cabe destacar que se ha demostrado que la infección mediada por células es más eficiente que la infección por virus libre.^{140, 38, 64}

Por lo tanto, la formación de sincicios es resultado de la interacción entre células infectadas, que expresan en su membrana Env del virus y las células blanco no infectadas CD4+. ^{101, 150} La fusión célula-célula puede tener un papel patogénico importante *in vivo*, dado que se han encontrado células gigantes multinucleadas infectadas con VIH-1 en ganglios linfáticos de pacientes asintomáticos y pacientes con SIDA, los ganglios linfáticos han sido propuestos como reservorios virales. ^{15, 49} Además, la inducción viral de sincicios se relaciona con la depleción de células T CD4+ en pacientes y la progresión al SIDA.^{10, 31} Aunque los anticuerpos neutralizantes pueden restringir las infecciones por partículas libres de virus, podrían ser menos eficaces en la contención de la propagación del virus de célula a célula y la muerte celular mediada por la extensa actividad de fusión. Se ha descrito la fusión celular mediada por Env a partir de una cepa prototipo VIH-1. Esa fusión se ha inhibido con el suero de pacientes VIH positivos. Esa inhibición se atribuye a los anticuerpos que se unen a epítopes virales conservados esenciales para el reconocimiento de CD4 y de correceptores que interaccionan con gp120, y con regiones asociadas a la activación de gp41. ⁷⁸

En este sentido, se ha determinado que esta inhibición de la fusión celular es dependiente del estado clínico del paciente, dado que los sueros de pacientes que son VIH positivos y que tienen cuentas de linfocitos T CD4+ altas, logran inhibir la fusión celular significativamente más que los sueros de pacientes sintomáticos o con cuentas de CD4 definitorias de SIDA. Al respecto, algunos sueros de pacientes con estadio clínico de SIDA favorecen la fusión celular. ⁷⁸

1.8 Autoanticuerpos en la infección por VIH-1

La infección por el VIH-1 está asociada con varios desordenes autoinmunes. La autoinmunidad puede ocurrir como resultado de la proliferación de células B, o mimetismo molecular.¹⁷⁰ Como parte de esa autoinmunidad, se pueden producir autoanticuerpos que se pueden unir a diversas proteínas celulares normales. Se ha observado que algunos de esos anticuerpos se unen a proteínas de la membrana de linfocitos T CD4+.

Se plantea aquí que autoanticuerpos específicos para las moléculas de superficie de la membrana de linfocitos T CD4+, como CCR5, CXCR4, CD3, CD43, están presentes en individuos VIH-1 positivos y sanos ^{7, 120} y que esos autoanticuerpos pueden afectar la fusión celular. Se han descrito autoanticuerpos dirigidos a epítomos de la membrana de linfocitos T.

Tabla 1. Proteínas reconocidas por anticuerpos dirigidos hacia moléculas de la membrana de linfocitos T en suero de pacientes con infección por el VIH-1.

Proteína	Referencia
CD43	(Giordanengo et al. 1995; Ardman et al. 1990)
HLA clase II	(Ameglio et al. 1987; Golding et al. 1988)
CD4	(Kowalski et al. 1989; Sekigawa et al. 1991; Wilks et al. 1990; Lobo et al. 2008)
CD11b/CD18 (MAC-1)	(Rubinstein et al. 1999)
Alfa/beta TCR	(Lake et al. 1994)
CD95	(Carter 2011)
CCR5	(Lobo et al. 2008)
CXCR4	(Lobo et al. 2008)
CD3	(Lobo et al. 2008)
Fas (CD95/Apo-I)	(Silvestris et al. 2001)

Tabla 1. Tomada de Huerta et al., 2005

Se desconoce si esos autoanticuerpos se generan debido a una respuesta inmune específica hacia los antígenos propios o simplemente son un reflejo de la

hipergamaglobulinemia no específica producida por la activación policlonal de células B, la cual es una característica de la desregulación inmunológica causada en la infección por el VIH-1. En estudios en pacientes con SIDA, se han detectado anticuerpos frecuentemente asociados con desordenes clínicos contra plaquetas, células T y nervios periféricos.¹²²

Se ha postulado que habría varias formas en que los autoanticuerpos podrían contribuir a la protección de la infección por el virus.¹⁴⁰ Ciertos tipos de anticuerpos no neutralizantes podrían bloquear el movimiento de los viriones o de las células infectadas a través de barreras mucosales, y/o inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (Letvin 2009). Otros tipos de anticuerpos podrían bloquear la formación de contactos estrechos entre las células, disminuyendo la eficiencia de la interacción de Env con los receptores celulares durante la infección por virus libres y durante la transmisión célula a célula.⁴⁸

La producción de anticuerpos hacia componentes celulares se ha asociado a defectos de las células B en individuos con VIH-1, principalmente en sujetos con alta carga viral, incluyendo activación policlonal, hipergamaglobulinemia, inducción de diferenciación terminal y niveles incrementados de autoanticuerpos.¹¹⁸ Los mecanismos posibles de las manifestaciones autoinmunes incluyen: reactividad cruzada entre el virus y proteínas propias,⁷⁰ activación inmunológica,³⁴ mimetismo molecular,^{35, 149} efectos directos del VIH-1 sobre células endoteliales, sinoviales y células hematopoyéticas, destrucción de células CD4+ e incrementada actividad citotóxica junto con expresión aumentada de autoantígenos.^{3, 170} También se ha asociado la activación inmunológica con la producción de autoanticuerpos y con una frecuencia disminuida de células T reguladoras, en ausencia de signos de enfermedad autoinmune.^{5, 93}

Una explicación para la reducción en células CD4+ en la infección por el VIH-1 ha sido la inducción de anticuerpos anti células T o anticuerpos contra CD4.²¹ Se han encontrado autoanticuerpos contra un gran número de proteínas celulares normales en individuos infectados por VIH-1.^{21, 84} La infección por VIH-1 de las células T podría llevar a alteraciones en la proliferación de células B. De igual modo, la infección de

macrófagos por el VIH-1 podría llevar a la producción aumentada de IL-6, con la proliferación resultante de células B. La proliferación de células B podría eventualmente llevar la producción de linfoma a través de cambios cromosómicos y el establecimiento de un estado de transformación. La presencia de antígenos celulares en la superficie de viriones del VIH-1 o expresados junto con antígenos virales en la superficie de las células podrían inducir respuestas inmunes contra antígenos celulares normales,¹⁰⁴ llevando a reacciones celulares autoinmunes.¹³⁹

2. Pregunta

¿Los autoanticuerpos presentes en el suero de pacientes VIH+ afectan la fusión celular mediada por Env debido a su unión a antígenos presentes en la membrana celular de los linfocitos T CD4+?

3. Hipótesis

El efecto del suero en la fusión celular se debe a la presencia de anticuerpos que reconocen proteínas de la membrana celular.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

- Determinar si existe relación entre el efecto de inhibición del suero en la fusión celular con la presencia de autoanticuerpos.

4.2 Objetivos particulares:

- Identificar sueros de pacientes VIH+ que afecten la fusión celular.
- Determinar si los anticuerpos del suero de pacientes VIH+ se unen a los antígenos de membrana de las células T CD4+.
- Determinar si hay relación entre el estadio clínico del paciente con la presencia de antígenos de membrana de las células T CD4+ y el efecto del suero sobre la fusión celular de pacientes VIH+

5. Metodología

5.1 Materiales

5.1.1 Líneas celulares

Se emplearon las células Jurkat HxBc2, las cuales son una línea celular humana de Linfocitos T CD4+, que están transfectadas establemente para la expresión inducible del complejo de proteínas gp120/gp41 del VIH-1. Estas células contienen un plásmido que codifica para el activador VP16 del citomegalovirus, fusionado con un represor dependiente de la tetraciclina, acoplado a una secuencia de resistencia a neomicina. Contienen una segunda transfección, que consiste en un plásmido que expresa a los genes *env* y *rev* de la cepa HxBc2 del VIH-1, acoplados a secuencias operadoras de la tetraciclina (Cao J. 1996).

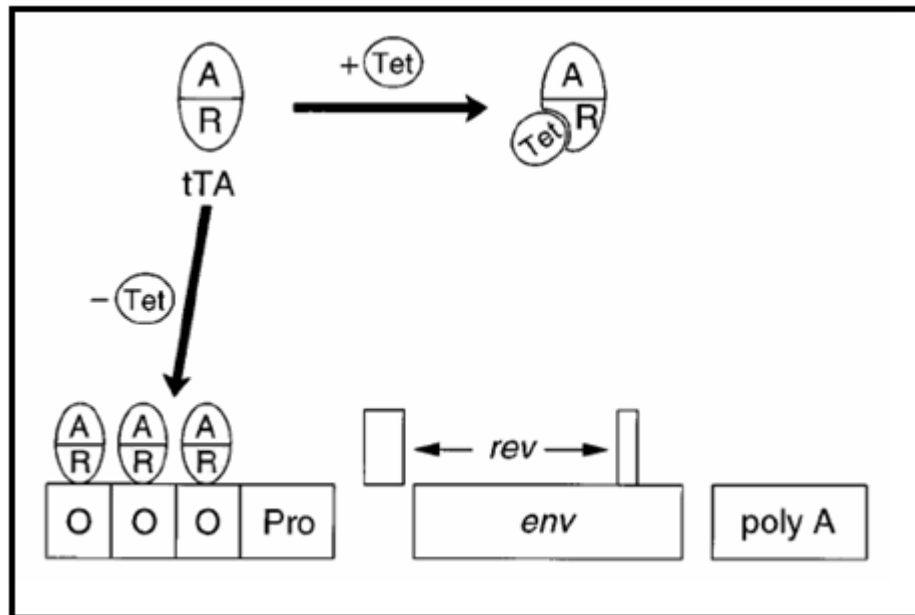


Figura 10. Sistema de la expresión inducible de las glicoproteínas gp120/gp41 de la envoltura del VIH-1. Esta expresión es inhibida por tetraciclina. Modificado de Cao J. 1996.

5.1. 2 Trazadores lipofílicos fluorescentes

Se emplearon dos carbocianinas lipofílicas: el perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3',3'-tetrametilindocarbocianina (Dil) y el perclorato de 3,3'-dioctadeciloxacarbocianina (DiO) (Molecular Probes). Estas carbocianinas son altamente fluorescentes y foto estables cuando se incorporan a la membrana celular. Se difunden lateralmente por la membrana plasmática, tiñendo a la célula completa. Dil tiene una fluorescencia roja con energías de activación y emisión 549 y 565 nm, respectivamente y DiO una fluorescencia verde con energías de activación y emisión de 484 y 501 nm, respectivamente.

Las soluciones de estas carbocianinas se prepararon de acuerdo a las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones: se preparó una solución de cada colorante a una concentración de 3.5 mg/mL en DMSO y se sonicaron brevemente para optimizar su solubilización. Para poder ser empleados en el marcaje de células, se realizó una

dilución 1:10 de cada colorante con DMSO y se almacenaron en oscuridad a temperatura ambiente.

5.2 Cultivo celular

Las células se cultivaron en Medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado al 10% con suero fetal bovino (SFB) (Gibco) inactivado durante 30 minutos a 56° C; al medio se le adicionó 100 U/mL de penicilina (Gibco) y 100 µg/mL de estreptomycin (Gibco). En el caso de las células HxBc2, se cultivaron en RPMI con 4µg/mL de higromicina y 4µg/mL de geneticina para mantener la presencia del plásmido y con 1µg/mL de tetraciclina, para reprimir la expresión de las proteínas de Env. Los cultivos celulares se mantuvieron en una incubadora (Thermo Scientific®) a 37°C y 5% de CO₂.

5.3 Inducción de la expresión de la proteína Env

Las células HxBc2 se colocaron en un tubo de 50 mL, se centrifugaron a 238 g/3min, se decantó el medio y se realizaron dos lavados con 40 mL de PBS 1x se centrifugaron a 238 g rpm/3 min para eliminar la tetraciclina e inducir la expresión del complejo Env. Después de los lavados, las células se colocaron en una botella para cultivo celular con capacidad de 75 cm² con filtro (Cell Star de Greiner bio-one®) con medio RPMI más los antibióticos geneticina e higromicina a las concentraciones descritas. El cultivo se mantuvo en una incubadora por 3 días a 37°C y 5% de CO₂.

5.4 Marcaje de las células con los trazadores lipofílicos

Tanto las células HxBc2 previamente inducidas como las células E6 se ajustaron a una concentración de $5-15 \times 10^6$ células/mL en RPMI en tubos de 15 mL. Para ajustar las células se realizó un conteo de la siguiente forma:

Las células se centrifugaron a 238 g/3min, se decanta el sobrenadante y se resuspendieron en 1 mL del cual se tomaron 5 μ L de la suspensión celular y se colocaron en un microtubo de 200 μ L que contenía 95 μ L de azul de tripano. Se colocaron 10 μ L de esta dilución 1:20 en un hematocitómetro, en el cual se contaron 4 campos y se calculó un promedio para obtener el número de células/mL.

A las células E6 se les agregaron 9 μ L de Dil de la dilución 1:10, mientras que a las células HxBc2 se le agregaron 15 μ L de DiO de la dilución 1:10. Después se resuspendieron las células, cuidadosamente, y se mantuvieron en incubación por 15 minutos a temperatura ambiente con agitación moderada y protegidas de la luz. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las células se centrifugaron 238 g/3min y se decantó el sobrenadante para eliminar el exceso de colorante que no haya sido incorporado a las células. Se realizó un lavado con 8 mL de medio RPMI. Se centrifugaron nuevamente a 238 g/3min y se desechó el sobrenadante. Finalmente, las células marcadas se resuspendieron en 1 mL de RPMI y se colocaron en una botella nueva para cultivo celular con aproximadamente 11 mL de RPMI y se dejaron en incubación a 37°C con 5% de CO₂. La tinción de las células se realizó un día antes del ensayo de fusión.

5.5 Ensayo de fusión celular

Las células marcadas el día anterior se centrifugaron 238 g/3min y se ajustaron las HxBc2 a una concentración de 2×10^6 células/mL y las E6 en 2.2×10^6 células/mL en medio libre de suero AIM-V (Gibco®).

Las células se repartieron en 6 pozos en una placa de 96 pozos. Se colocaron en cada pozo 100µL de células a una concentración final de 0.2×10^6 / pozo. En tres de estos pozos se realizó una pre-incubación con Enfuvirtida® (también conocido como T-20), es un péptido inhibidor de la fusión y la infección del VIH-1; está conformado de 36 aminoácidos que se une a una región de la glicoproteína gp41 de la envoltura de VIH-1 que está involucrada en la fusión del virus con la membrana de la célula

CD4+. Se colocaron en estos tres pozos 10µL de una dilución 1:100 de T20 en medio AIM-V, el cual tiene un efecto de inhibición en la fusión celular dependiente de Env, y se incubó la placa por 15 minutos a 37°C y 5% de CO₂. Posterior a la incubación se agregaron en los 6 pozos 90 µL de células E6 (0.2×10^6 células). En la placa también se colocaron 200 µL de células HxBc2 para ser el control de la fluorescencia del colorante DiO (verde) y en otro pozo 200 µL de células E6 para control de la fluorescencia de Dil (roja) así como también se colocó un pozo con 200µL de células E6 sin marca, es decir, libres de colorantes. La placa se incubó por 5 hrs a 37°C y 5% de CO₂ para permitir la fusión.

5.6 Proceso de fijación con paraformaldehido (PFA) al 2%

Al finalizar la incubación, se cosechó el cocultivo de cada pozo y se transfirió a un tubo FACS (BD®) de 2 mL que contenía 1 mL de PBS 1X frío, se centrifugaron a 238 g/3min a 4°C, se decantó el sobrenadante y se resuspendieron las células con 500 µL de PBS 1X frío y 500 µL de PFA al 4%. Se incubaron por 20 minutos en baño de hielo y se resuspendieron las células cada 8 min. Después de la incubación de 20 minutos, las células se centrifugaron a 238 g/ 3 min a 4°C, se decantó el sobrenadante

y se resuspendió el botón celular con 1mL de PBS 1X frío. Se analizaron por citometría de flujo en el Citómetro Attune (byLifetechnologies®).

Placa:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	F1	F2	F3		T20	T20	T20					
B												
C	R	R		V	V		Sm	Sm				
D												
E												
F												
G												
H												

Sm, células sin marca. F, control positivo de fusión. T20, control negativo de fusión. V, células Hx. R, células E6.

5.7 Muestra de suero de sangre periférica de donadores sanos y pacientes VIH+

Se realizó un estudio transversal con 20 pacientes VIH+ y 20 donadores sanos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zurbiran”. Las muestras de los pacientes se recolectaron desde marzo 2014 a diciembre del 2014. Todos los sueros recolectados provenían de hombres adultos y sin tratamiento anti-retroviral hasta antes de la toma de muestra, en el caso de pacientes VIH+.

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición. El consentimiento informado se obtuvo de todos los pacientes y donadores sanos.

5.8 Preparación de las diluciones del suero de los pacientes

Se realizaron las diluciones 1:2 y 1:5 del suero debido a que se quiso mantener un volumen fijo para todos los ensayos de fusión y al igual que un volumen de suero fijo, con la finalidad de igualar las condiciones del ensayo, debido a esto y al considerar los volúmenes finales fue necesario realizar las siguientes diluciones del suero para obtener al final las concentraciones deseadas (1:10, 1:20 y 1:50).

Dilución	Suero (µL)	Medio AIM-V (µL)
1:10	10	-----
1:2	8	8
1:5	3	12

5.9 Efecto de los sueros de pacientes VIH+ y donadores sanos en la fusión celular

Para determinar el efecto de los sueros de pacientes VIH positivos y suero de donadores sanos, se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

1. Se realizó la inducción de 10×10^6 células HxBc2 por 3 días.
2. Las células Hx se marcaron con DiO 1:10 con $15 \mu\text{L}/\text{mL}$.
Las células E6 se marcaron con Dil 1:10 con $8 \mu\text{L}/\text{mL}$.

Ensayo de fusión

3. Se realizó el conteo de células E6 y se ajustaron a 2.2×10^6 en 1 mL de medio AIM-V.
4. Se realizó el conteo de células Hx y se ajustaron a 2×10^6 en 1 mL de medio AIM-V.
5. Se tomaron $90 \mu\text{L}$ de células E6 y se transfirieron a un pozo de una placa de 96 pozos y se agregó $10 \mu\text{L}$ de suero de los pacientes o donadores sanos. La

dilución final del suero de pacientes o donadores sanos en el pozo es de 1:10. Se realizaron dos replicas por cada dilución de suero.

6. Se colocaron 90µL de células E6 en otro pozo de la misma placa más 10µL de suero con dilución 1:2. La dilución final del suero de pacientes o donadores sanos en el pozo es de 1:20.
7. Se colocaron 90µL de células E6 en otro pozo más 10µL de suero dilución 1:5. La dilución final del suero de pacientes o donadores sanos en el pozo es de 1:50.
8. Se colocaron 90µL de células E6 en otro pozo más 10µL del anticuerpo anti-CD4 dilución 1:2.
9. La placa se incubó durante 40 min 37°C y 5% CO₂.
10. Se colocaron 100µL de células Hx en un pozo más 10 µL de T20 dilución 1:100.
11. Se Incubaron por 15 min 37°C y 5% CO₂.
12. Una vez transcurrido el tiempo de incubación de las células E6 con los sueros, se les agregaron 100µL de las Hx a cada pozo.
13. Una vez transcurrido el tiempo de incubación de las células Hx con T20, se agregaron 90µL de E6 en el pozo.
14. Se colocó en un pozo 90µL de Hx más 10µL de Medio AIM-V más 100µL de E6.
15. La placa completa se incubó por 5hr a 37°C y 5% CO₂.
16. Se tomó en contenido de cada pozo y se colocó en un tubo independiente cada uno y se fijaron las células con PFA 2%.
17. Se analizaron los tubos por Citometría de Flujo.

Placa:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1:10	S1:10	S1:10		T20	T20	T20					
B	S1:20	S1:20	S1:20		F	F	F					
C	S1:50	S1:50	S1:50		Ac	Ac	Ac					
D	R	R			V	V			Sm	Sm		

5.10 Inmunofluorescencia indirecta

- Se tomaron las células E6 en un tubo de 15mL, se centrifugaron a 238 g/ 3 min.
- Se realizaron dos lavados con PBS 0.1% azida frio.
- Se contaron las células y se ajustaron a 500,000 en 200µL.
- Por cada suero de donador o paciente VIH+ se colocaron en una placa de 96 pozos:
 - En 2 pozos se colocaron 180µL de células E6 más 20µL de la dilución del suero 1:10.
 - En 2 pozos se colocaron 180µL de células E6.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	S1	S5	S5	S9	S9			D2	D2	D6	D6
B							Sm	Sm				
C	S2	S2	S6	S6	F	F			D3	D3	D7	D7
D												
E	S3	S3	S7	S7	T20	T20			D4	D4	D8	D8
F												
G	S4	S4	S8	S8	R	V	D1	D1	D5	D5	D9	D9
H												

S, suero de paciente VIH+. D, suero de donador sano. F, control positivo de Fusión. T20, control negativo de fusión. R, control de DiO-células E6, V, control de Dil-células Hx, Sm, Células sin marca.

- Se Incubaron por 40 minutos a 4°C.
- Se realizaron dos lavados con PBS 1x 0.1% azida, mediante centrifugación a 238 g/3min.
- Se resuspendieron las células en 190µL de PBS 1X + Azida más 2%FBS.
- Se agregaron 10 µL de Ac anti-human IgG Fc en cada pozo.
- Se Incubaron por segunda vez a 4°C y oscuridad durante 45 minutos.
- Se colocó el contenido de cada pozo en tubos Facs etiquetados previamente.
- Para eliminar el anticuerpo no unido, se realizaron dos lavados de 500µL de PBS 1x más 0.1% azida.
- Se resuspendieron en 500µL de PBS 1X más 500µL de PFA 4%.
- Se incubaron por 20 minutos y se realizó un último lavado después del periodo de incubación, se centrifugaron a 238 g/3 min.

-Finalmente el pellet celular se resuspendió en 1mL de PBS 1x para su posterior análisis por citometría de flujo.

5.11 Citometría de flujo

Los cocultivos se analizaron en un citómetro de flujo modelo Attune y con el programa AttuneCytometricSoftware versión 4.2.5 (Lifetechnologies). Para ajustar la compensación, se emplearon células marcadas no cocultivadas. Se capturaron 10,000 eventos de cada tubo, con registro de gráfico de puntos de tamaño (FSC-H) contra granularidad (SSC-H) y fluorescencia verde (DiO, FL1-H) contra fluorescencia roja (DiI, FL2-H). El porcentaje de inhibición se calculó con respecto a la fusión obtenida en cocultivo de las células HxBc2-E6 en ausencia de inhibidor o suero.

Para cuantificar el efecto de los sueros de los donadores sanos y pacientes VIH+ en la fusión celular en forma de porcentaje se empleó la siguiente formula:

El porcentaje del efecto de los sueros en la fusión celular respecto al control positivo (cocultivo sin suero), se calculó con la siguiente formula:

$$\text{Efecto} = 100 - \left(\frac{\text{promedio fusión muestra} \times 100}{\text{promedio fusión del control positivo}} \right)$$

Donde:

-promedio fusión muestra: es el promedio del porcentaje de células fusionadas en los duplicados de cada suero.

-promedio fusión del control positivo: es el promedio del porcentaje de células fusionadas en los duplicados del control positivo.

El índice de células positivas se calculó de la siguiente manera: se realizaron duplicados para cada suero, se obtuvo el promedio de estos duplicados y el promedio de los duplicados para el control negativo y se aplicó la siguiente formula.

$$\text{Índice de partículas} = \frac{\text{prom.dup} - \text{control neg}}{\text{control neg}}$$

-prom. dup: promedio del porcentaje de células positivas de los sueros de donadores y pacientes VIH+

-control neg: promedio del porcentaje de células positivas del control negativo.

5.12 Pruebas estadísticas

Se realizó la prueba t-Student para saber si existía diferencia significativa entre las medias del efecto de inhibición de la fusión celular o el índice de unión a partículas de pacientes VIH+ y donadores sanos.

También se empleó el análisis de correlación lineal para saber si el efecto de inhibición en la fusión celular o el índice de partículas positivas se asociaban con la cuenta de linfocitos T CD4+ o la carga viral de los pacientes VIH+.

6. Resultados

6.1 Caracterización y cuantificación de la fusión celular por citometría de flujo.

Con el propósito de cuantificar la proporción de células fusionadas directamente por citometría de flujo, se emplearon dos colorantes lipofílicos fluorescentes denominados Dil y DiO de fluorescencia roja y verde, respectivamente.

Las células marcadas (Hx con DiO y E6 con Dil) se colocaron en cocultivo durante 5 horas para permitir la fusión. Para todos los experimentos de fusión, se colocaron las células Hx transfectadas inducidas por tres días para que expresaran Env en cocultivo con las células E6 (no transfectadas), que expresan los receptores CD4+ y CXCR4+. Los cocultivos Hx-E6 se realizaron en una proporción 1:1 en el número de

células. Estos experimentos se efectuaron con un medio especial libre de suero fetal bovino AIM-V (Gibco).

En el análisis por citometría de flujo, la fluorescencia verde (DiO) se leyó en el canal BL1, mientras la fluorescencia roja (Dil) se leyó en el canal BL2. La figura 11 C) y D) muestra que los productos de fusión se detectaron como partículas con fluorescencia mixta. El porcentaje de fluorescencia mixta fue de 12 a 18 % aproximadamente, de la población total, después de 5 horas de cocultivo (C).

En cada placa se colocó un control positivo (figura 11, C) y negativo (figura 11 D). El control positivo consistía de un cocultivo de células E6 y Hx por 5 horas. El control negativo consistía de células Hx y E6 a cocultivar en presencia del inhibidor T20, el cual previamente se incubó por 15 minutos únicamente con las células Hx y después se agregaron las células E6 para el cocultivo de 5 horas; todo esto para observar un efecto de inhibición en la fusión celular.

Los resultados se analizaron en el Software de Attune versión 1.2.5.

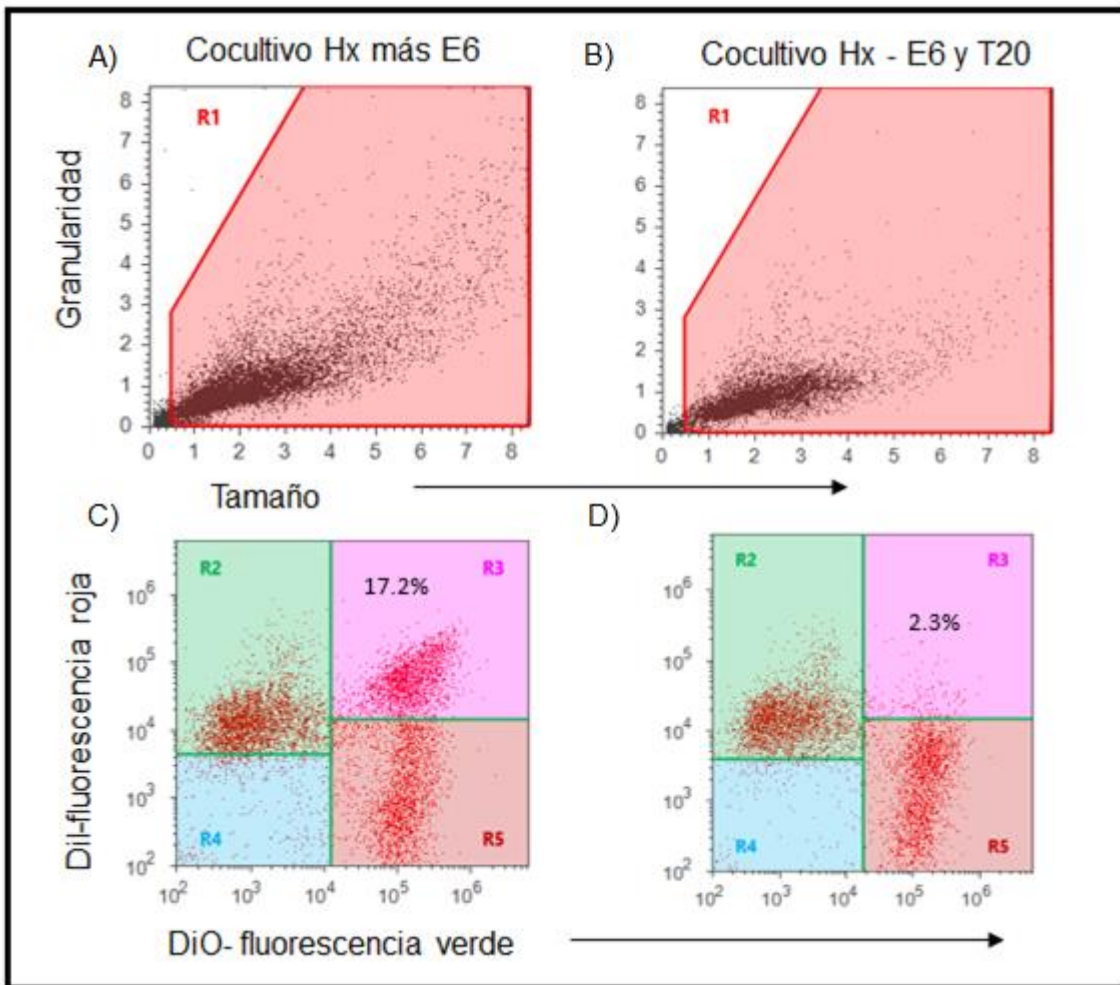


Figura 11. Gráficos de puntos de la fusión entre células Jurkat HXBc2 expresando el complejo Env funcional y células Jurkat E6 no transfectadas. A), B) se muestran los gráficos de tamaño contra granularidad y se ve claramente que el cocultivo donde ocurren las fusiones muestra mayor tamaño y granularidad que el cocultivo donde se está inhibiendo la fusión celular. C) y D) gráficas de fluorescencia y se indica el porcentaje de célula con fluorescencia mixta.

En los pozos donde se agregó T20 (figura 11, D), se produjo entre el 1 y 3% de células doblemente positivas para la fluorescencia verde y la fluorescencia roja; estas células doblemente fluorescentes no correspondían a células fusionadas, sino a agregados celulares, ya que no presentaron la transferencia de energía (FRET) que ocurre del colorante lipofílico DiI al colorante lipofílico DiO.¹¹

6.2 Efecto del suero sobre la fusión celular.

Las células E6 se preincubaron 40 minutos a 37° y 5% CO₂ con el suero de los pacientes VIH+ o de donadores sanos, a las diluciones 1:50, 1:20 y 1:10 en una placa de 96 pozos. Posteriormente, se le agregaron las células HxBc2 y se cocultivaron por 5 horas. Se incluyeron controles de fusión sin suero y de inhibición de la fusión celular con anticuerpo anti-CD4 y T20. En la figura 12 se ilustran la dilución 1:10, que fue la concentración donde se observó con mayor facilidad el efecto de los sueros sobre la formación de los sincicios.

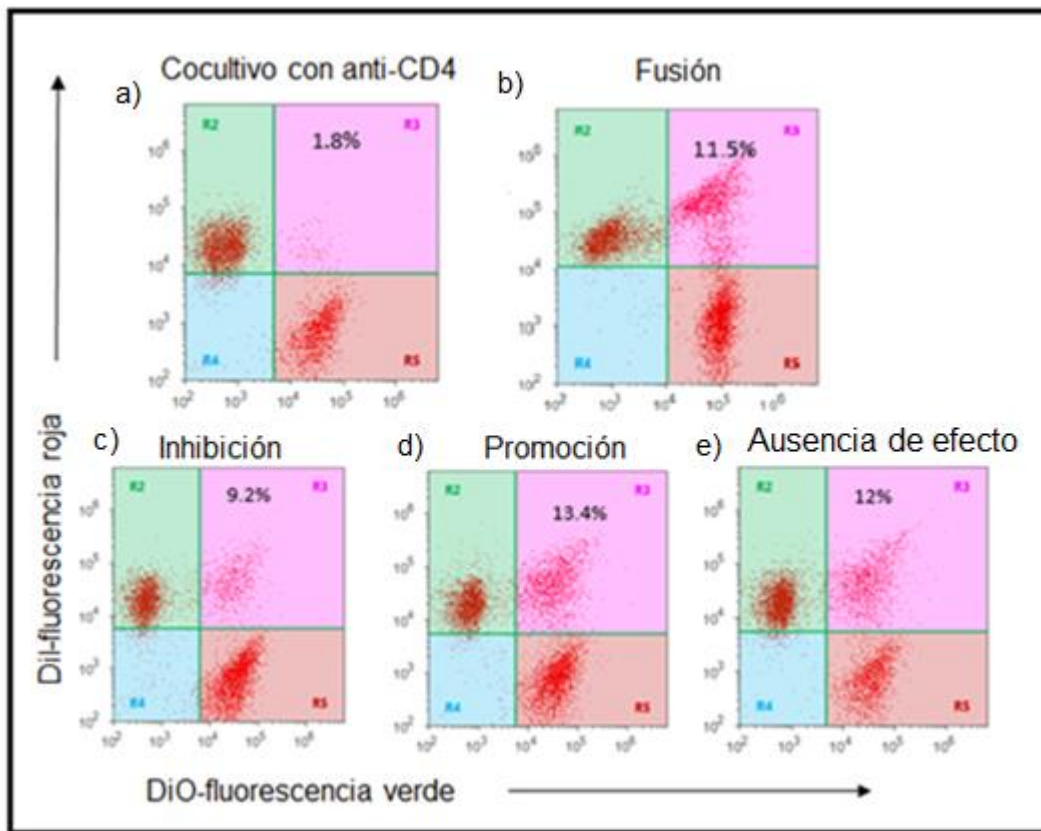


Figura 12. Graficas que representan la fluorescencia verde vs fluorescencia roja las imágenes a) cocultivo de células E6 y Hx con anti-CD4 como control negativo. b) muestra el control positivo de fusión: cocultivo de E6 y Hx. c), d) y e) muestran el tipo de efecto que presentaron los sueros c) VIH 7, presentó un efecto inhibitorio en fusión celular), d) VIH 4, promovió la fusión celular y e) VIH 1, que no presentó ningún efecto sobre la fusión celular. Todos estos efectos se seleccionaron de acuerdo con el porcentaje de

partículas con fluorescencia mixta presentes en la región R3 de cada gráfica. La parte superior presento B) control positivo (fusión) y A) control negativo (anti-CD4).

Se ensayaron los sueros a tres diluciones. Los sueros tuvieron dos efectos sobre la fusión celular (figura 12): inhibición (figura 12, c) o promoción (figura 12, d), y también ausencia de efecto (figura 12, e). Se observó que la dilución 1:10 de todos los sueros de pacientes y donadores sanos fue la que más contribuyó con algún efecto sobre la fusión celular.

Para comparar el efecto de los sueros sobre la fusión celular, se empleó la dilución 1:10 de cada suero (figura 13). En el caso de los sueros de los pacientes VIH+, se observó que todos los sueros inhibieron la fusión celular. 18 de 20 sueros inhibieron la fusión celular en un porcentaje mayor al 10%. La máxima inhibición se observó con el suero identificado con el número 19, con un efecto de inhibición de 47.1% respecto al control positivo, mientras que únicamente los sueros 11 y 12 presentaron un porcentaje de inhibición menor al 5%.

Para los sueros de los donadores sanos, encontramos que 9 de 20 sueros (45%) presentaron un efecto de promoción sobre la fusión celular. El efecto de inhibición se presentó en 11 de 20 sueros (55%) de los sueros, dentro de los cuales 3 sueros (15%) presentó un porcentaje de inhibición menor al 10%, mientras que 8 sueros (40%) presentó un porcentaje de inhibición mayor al 10%. La máxima inhibición se observó con el suero del donador sano identificado con el número 8, con un efecto de inhibición de 19.3%.

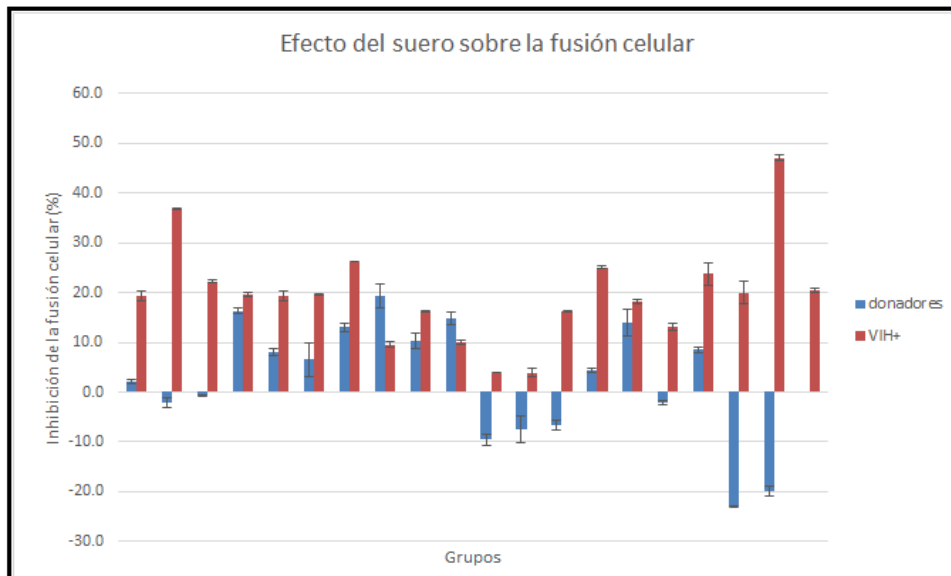


Figura 13. Efecto del suero de donadores y pacientes VIH positivos (dilución 1:10) sobre la fusión celular.

Mediante la prueba de t-Student se encontró una diferencia significativa entre las medias del efecto de los sueros de donadores sanos respecto a los pacientes VIH+ (figura 14). Se encontró que existe una diferencia significativa entre la media del efecto de inhibición de la fusión celular en los sueros de donadores sanos y la media de los sueros de pacientes VIH+.

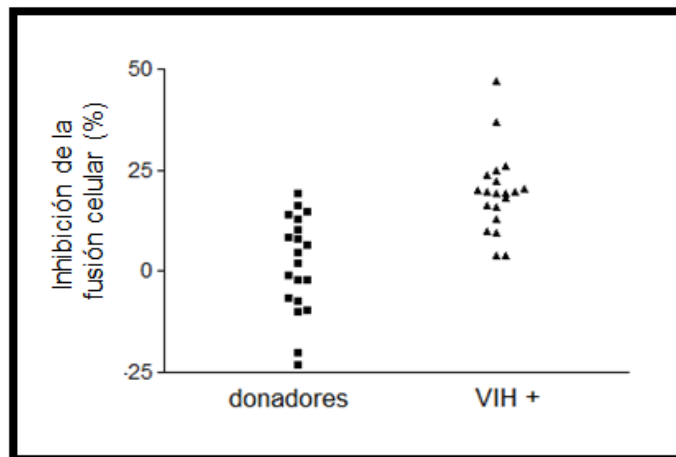


Figura 14. Se representa el porcentaje de inhibición que obtuvo cada suero con la dilución 1:10 de ambos grupos. Cada grupo contiene 20 sueros. El promedio del porcentaje de inhibición de la fusión celular para el grupo de los sueros de los donadores sanos fue de 1.795 ± 2.659 error estándar de la media (EEM), mientras que para el grupo de los pacientes VIH+ fue de $19.51 \pm \text{EEM}$ ($p < 0.0001$).

6.3 Inmunofluorescencia indirecta de los sueros de los pacientes y de los donadores sanos

Se realizaron Inmunofluorescencias indirectas, para las cuales se hizo la suposición de que el anticuerpo primario se encontraba presente en el suero de los donadores sanos o pacientes y como anticuerpo secundario se empleó un anticuerpo Anti-IgG humana acoplado a Isotiocianato de fluoresceína (FITC) (BD®), el cual es un fluorocromo que emite una fluorescencia verde.

Las células E6 se incubaron por 40 minutos con el suero de los individuos a una concentración 1:10 a 4°C, posteriormente se les agregó el anticuerpo secundario, el cual se incubo por otros 45 minutos. Se realizaron lavados y las células se fijaron con PFA al 2% concentración final.

Se realizó inmunofluorescencia indirecta para saber si los sueros de los individuos VIH+ contenían anticuerpos que se unen a antígenos propios expresados en la membrana de los linfocitos T CD4+ y relacionar la posible existencia de estos anticuerpos con el efecto sobre la fusión celular y con el estadio clínico.

El análisis de la inmunofluorescencia se realizó por citometría de flujo; cada suero se probó por duplicado. El análisis de estos resultados consistió en seleccionar el porcentaje de células positivas para FITC (figura 15, c y d), dado que la célula que presentara una fluorescencia positiva para FITC nos indicó que a estas células se unió un anticuerpo, en este caso una inmunoglobulina IgG, presente en el suero del paciente o donador sano. Además del porcentaje de células positivas para FITC, se tomó en cuenta la Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) que se genera partir de la región seleccionada como positiva para FITC de cada suero de paciente o donador sano.

Posteriormente, se obtuvo un índice del número de veces que aumentó el porcentaje de células positivas para FITC y un índice del número de veces que aumentó la IMF con respecto al control negativo, el cual contenía únicamente células E6 más el anticuerpo secundario (anti-IgG humana).

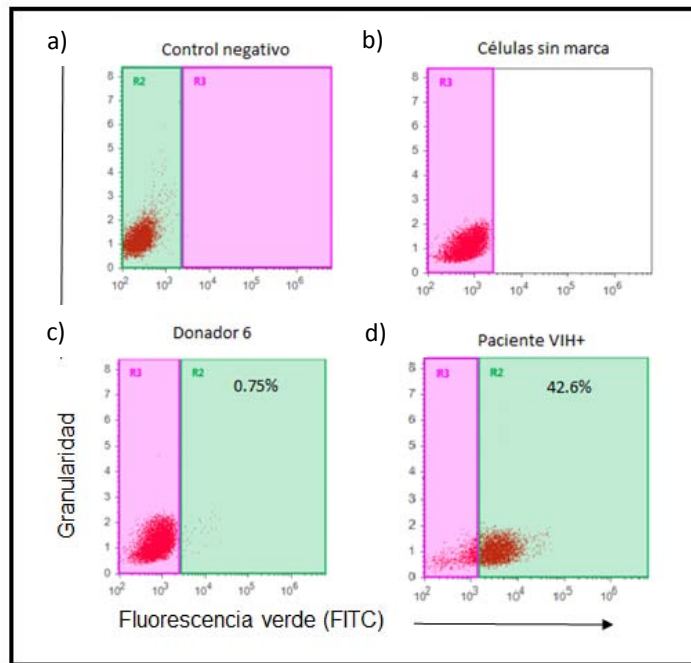


Figura 15. Grafica representativa del ensayo de inmunofluorescencia. a) control negativo (células E6 + Ac secundario), b) células sin marca c) suero de un donador sano que presentó en la región R2, (positiva para FITC), un 0.75% de células positivas, mientras que en d) se muestra el suero de un paciente VIH+ con 42.6% de células positivas para FITC.

Se realizó la prueba t-Student para observar si existía alguna diferencia significativa entre la media de las partículas positivas de los sueros de donadores sanos y de los pacientes VIH+ (figura 16). Se encontró que existe diferencia significativa entre la media del índice del porcentaje de partículas positivas del suero de donadores sanos y la media de los sueros de pacientes VIH+.

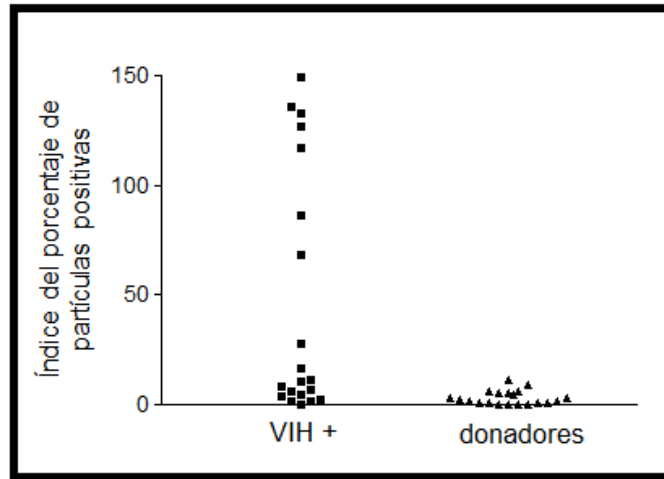


Figura 16. Grafica que el índice del porcentaje de partículas positivas, el cual representa la unión de anticuerpos presentes en los sueros a moléculas de la membrana de las células E6. La media del índice de partículas positivas para el grupo de donadores sanos fue de 3.207 ± 0.7087 EEM, mientras que la media de los pacientes VIH+ fue de 45.96 ± 12.53 EEM ($p=0.0016$). Se concluyó que si existe diferencia significativa.

El efecto de los sueros en la fusión celular, el porcentaje de partículas positivas, cuenta de CD4+ y carga viral se muestran en las tablas 1 y 2.

Tabla1. Recopilación de los datos obtenidos en los ensayos de fusión celular, inmunofluorescencia indirecta de los pacientes VIH+ y datos clínicos de conteo de CD4 y carga viral.

ID	Promedio del % Inhibición fusión celular	Promedio del % células positivas	Índice del promedio del % de partículas positivas	CD4 (cel/ μ L)	Carga Viral (copias/mL)
VIH 1	19.3 ± 1.1	20.91 ± 2.7	133.04	469	67,700
VIH 2	36.8 ± 0.2	1.77 ± 0.51	10.35	653	575,164
VIH 3	22.2 ± 0.3	13.65 ± 0.21	86.50	60	417,000
VIH 4	19.6 ± 0.3	1.34 ± 0.09	68.23	679	14,600
VIH 5	19.3 ± 1.1	0.56 ± 0.03	0.17	826	3,870
VIH 6	19.6 ± 0.2	55.96 ± 0.56	116.80	619	5,600
VIH 7	26.2 ± 0.1	4.45 ± 0.49	135.92	479	2,337

VIH 8	9.5 ± 0.6	71.58 ± 0.22	149.68	604	4,599
VIH 9	16.1 ± 0.1	1.44 ± 0.15	8.20	557	6,529
VH 10	10.1 ± 0.4	1.26 ± 0.27	7.08	188	33,584
VIH 11	3.9 ± 0.1	3.37 ± 0.7	4.96	344	89,608
VIH 12	3.9 ± 0.8	1.28 ± 0.46	1.70	379	161,852
VIH 13	16.2 ± 0.3	2.80 ± 0.91	3.95	454	67,179
VIH 14	25.1 ± 0.3	4.01 ± 2.73	6.10	527	144,041
VIH 15	18.1 ± 0.4	72.06 ± 12.38	126.54	478	3,985
VIH 16	13.0 ± 0.7	1.46 ± 0.51	2.07	503	28,201
VIH 17	23.7 ± 0.3	13.79 ± 2.15	28.03	690	19,694
VIH18	20.0 ± 0.9	1.42 ± 0.15	1.98	436	615,383
VIH 19	47.1 ± 1.0	8.27 ± 1.69	16.40	509	19,453
VIH 20	20.4 ± 0.4	7.08 ± 0.62	11.54	324	61,987

Tabla 2. Recopilación de los datos obtenidos en los ensayos de fusión celular e inmunofluorescencia indirecta en los sueros de los donadores sanos.

ID	Promedio del % inhibición fusión celular	Promedio del %células positivas	Índice del promedio del %partículas positivas
DON 1	2.1 ± 0.6	0.86 ± 0.04	0.87
DON 2	-2.1 ± 1.0	1.47 ± 0.5	9.45
DON 3	-0.9 ± 0.1	0.17 ± 0.2	0.17
DON 4	16.3 ± 1.0	0.37 ± 0.2	2.30
DON 5	7.9 ± 0.1	0.90 ± 0.7	5.78
DON 6	6.5 ± 0.3	0.78 ± 0.7	5.01
DON 7	13 ± 0.4	0.93 ± 0.5	5.97
DON 8	19.3 ± 0.6	0.69 ± 0.07	4.43
DON 9	10.2 ± 0.8	0.85 ± 0.6	5.45
DON 10	14.9 ± 0.3	0.54 ± 0.07	3.44
DON 11	-9.5 ± 1.1	1.76 ± 0.2	11.28
DON 12	-7.4 ± 2.6	0.58 ± 0.2	1.03

DON 13	-6.5 ± 1.0	0.80 ± 0.006	1.42
DON 14	-10.1 ± 0.4	2.37 ± 0.08	-0.02
DON 15	4.5 ± 2.6	1.79 ± 0.8	3.17
DON 16	14 ± 0.5	0.54 ± 0.14	0.95
DON 17	-2.20 ±	1.08 ± 0.45	1.91
DON 18	8.6 ± 0.2	0.22 ± 0.12	0.39
DON 19	-22.90 ± 0.9	0.35 ± 0.10	0.20
DON 20	-19.90 ±	0.5 ± 0.29	0.89

Para determinar si la unión a los anticuerpos presentes en los sueros de los pacientes y donadores sanos estaba asociado a algún proceso autoinmune de relevancia clínica, a 20 sueros de VIH+ y a 15 de 20 sueros de donadores sanos se les realizó un perfil autoinmune clínico que consistía en identificar tres patrones de autoinmunidad; nuclear, citoplásmico y filamentos intermedios.

El perfil se realizó en el laboratorio del Dr. Luis Guillermo Llorente Peters, Investigador en Ciencias Médicas del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Recibimos resultados de tres patrones, que se muestran en la tabla 3. Se consideraron los valores de referencia de la tabla 3 para designar si el donador o paciente presentaba un perfil de autoinmunidad positivo o negativo en cada patrón estudiado. Los resultados del estudio se muestran en la tabla 4.

Tabla 3. Valores de Referencia del título de anticuerpos presentes en el suero dirigidos a los patrones estudiados en el perfil autoinmune en la población mexicana, tomada de los reportes del laboratorio del Dr. Llorente del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Valores de referencia (Población Mexicana)	
MF ó MG	<1:160
Nuc	<1:40
Cit	<1:80
FI	<1:160
Mit	<1:160
Gol	<1:80

Tabla 4. Resultados del perfil autoinmune de los donadores sanos y pacientes VIH+.

ID	Patrón nuclear	pos/neg	Patrón citoplásmico	pos/neg
Control 1	MF 1:80	neg	-	neg
Control 2	MG 1:160	neg	Cit 1:80	neg
Control 3	MG 1:80	neg	Cit 1:40	neg
Control 4	MF 1:160	neg	Cit 1:40	neg
Control 5	MF 1:160	neg	-	neg
Control 6	MF 1:160	neg	Cit 1:40	neg
Control 7	MF 1:80	neg	-	neg
Control 8	MF 1:80	neg	Mit 1:40	neg
Control 9	MF 1:80	neg	Cit 1:40	neg
Control 10	MF 1:160	neg	Cit 1:80	neg
Control 11	MF 1:160	neg	Cit 1:40	neg
Control 12	MG 1:160	neg	Cit 1:40	neg
Control 13	MG 1:160	neg	Cit 1:80, Mit 1:80	neg
Control 14	MG 1:320	pos	Cit 1:40	neg
Control 15	MG 1:80	neg	-	neg
VIH 1	MG 1:160	neg	Cit 1:80	neg
VIH 2	MF 1:320	pos	Cit 1:320, FI 1:160	pos/neg
VIH 3	MF 1:640	pos	Cit 1:320, FI 1:320	pos/pos
VIH 4	MF 1:320	pos	Cit 1:160, FI 1:320	neg/pos
VIH 5	MG 1:80	neg	Cit 1:40	neg
VIH 6	MF 1:320	pos	Cit 1:160	pos
VIH 7	MF 1:80	neg	Cit 1:40	neg
VIH 8	MF 1:160	neg	Cit 1:40	neg
VIH 9	MF 1:320	pos	Cit 1:160, FI 1:80	pos/neg
VIH 10	MF 1:160	neg	Cit 1:80	neg
VIH 11	MG 1:80	neg	Cit 1:80, Gol 1:80	neg/neg
VIH 12	MG 1:160	neg	Cit 1:80	neg
VIH 13	MF 1:320	pos	Cit 1:160, FI 1:160	neg/neg
VIH 14	MF 1:160	neg	Cit 1:80, FI 1:80	neg/neg
VIH 15	MF 1:320	pos	Cit 1:160, FI 1:80	neg/neg
VIH 16	MF 1:80	neg	-	neg
VIH 17	MF 1:80	neg	-	neg
VIH 18	Nuc 1:80	pos	Cit 1:40	neg
VIH 19	MF 1:80	neg	Cit 1:40	neg
VIH 20	MF 1:320	pos	Cit 1:80	neg

Tabla 5. Patrones del perfil autoinmune obtenido de los sueros de los donadores sanos y los pacientes VIH+.

Tipo de suero	Patrón nuclear (+)	Patrón citoplásmico(+)	Filamentos intermedios
Donador	1/15	0/15	n.t.
VIH+	9/20	4/20	2/20

Resumen de los resultados del perfil autoinmune de acuerdo a los patrones determinados y la relación positivo/negativo de cada grupo.

Los resultados se ordenaron bajo un código numérico, donde cero fue negativo para todos los patrones del perfil autoinmune y uno fue positivo para al menos un patrón del perfil autoinmune. Posteriormente, se realizó una sumatoria para agrupar aquellos que presentaban por lo menos un valor en los diferentes patrones del perfil en adelante contra aquellos que no lo presentaban. Finalmente, los resultados del perfil se ordenaron de menor a mayor, es decir, aquellos que no presentan ningún valor (cero) en ningún patrón del perfil y por lo tanto no presentaron autoinmunidad a los que presentan un valor (≥ 1) en uno o más patrones del perfil autoinmune, por lo tanto presentaron un perfil de autoinmunidad positivo.

Tabla 6. Pacientes VIH+ y donadores sanos ordenados de acuerdo a los valores que presentan en cada patrón del perfil autoinmune.

Grupo	Promedio del % inhibición fusión celular	Índice del promedio del % de partículas positivas	Índice del promedio de la mediana de IMF mediana	Nuc	Cit	FI	Mit	Gol	Suma
VIH 1	19.3 ±1.1	133.04	3.79	0	0	0	0	0	0
VIH 5	19.3 ± 1.1	5.28	5.16	0	0	0	0	0	0
VIH 7	26.2 ± 0.1	135.92	14.06	0	0	0	0	0	0
VIH 8	9.5 ± 0.6	34.38	4.57	0	0	0	0	0	0
VIH 10	10.1 ± 0.4	7.08	15.48	0	0	0	0	0	0

VIH 11	3.9 ± 0.1	4.96	10.64	0	0	0	0	0	0
VIH 13	16.2 ± 0.3	3.95	31.27	0	0	0	0	0	0
VIH 15	18.1 ± 0.4	126.54	7.27	0	0	0	0	0	0
VIH 16	13.0 ± 0.7	21.46	8.82	0	0	0	0	0	0
VIH18	20.0 ± 2.2	0.96	15.93	0	0	0	0	0	0
VIH 20	20.4 ± 0.4	11.53	4.78	0	0	0	0	0	0
DON 1	-2.1 ± 0.5	26.38	0.34	0	0	0	0	0	0
DON 2	-2.1 ± 1.0	9.45	12.76	0	0	0	0	0	0
DON 3	-0.8 ± 0.1	5.15	0.19	0	0	0	0	0	0
DON 4	16.3 ± 0.5	2.36	0.05	0	0	0	0	0	0
DON 5	7.9 ± 0.7	5.78	0.12	0	0	0	0	0	0
DON 6	6.5 ± 3.5	5.01	0.14	0	0	0	0	0	0
DON 7	13.0 ± 0.8	5.97	-0.02	0	0	0	0	0	0
DON 8	19.3 ± 2.3	4.43	17.21	0	0	0	0	0	0
DON 9	10.2 ± 1.6	5.45	0.29	0	0	0	0	0	0
DON 10	14.9 ± 1.3	3.44	0.17	0	0	0	0	0	0
DON 11	-9.5 ± 1.1	11.28	4.90	0	0	0	0	0	0
DON 12	-7.4 ± 2.6	1.03	11.28	0	0	0	0	0	0
DON 13	-6.5 ± 1.0	1.42	7.77	0	0	0	0	0	0
DON 15	4.5 ± 2.6	3.17	6.27	0	0	0	0	0	0
VIH 12	3.9 ± 0.8	1.70	3.76	1	0	0	0	0	1
VIH 14	25.1 ± 0.3	6.10	13.54	1	0	0	0	0	1
VIH 17	23.7 ± 2.2	1.09	21.47	1	0	0	0	0	1
VIH 19	47.1 ± 0.6	75.41	4.64	1	0	0	0	0	1
DON 14	-10.1 ± 0.4	4.19	6.73	1	0	0	0	0	1
VIH 2	36.8 ± 0.23	10.35	4.02	1	1	0	0	0	2
VIH 4	19.6 ± 0.3	68.23	24.92	1	0	1	0	0	2
VIH 6	19.6 ± 0.2	51.44	5.43	1	1	0	0	0	2
VIH 9	16.1 ± 0.2	8.20	5.07	1	1	0	0	0	2
VIH 3	22.2 ± 0.3	86.47	3.91	1	1	1	0	0	3

Perfil autoinmune: Nuclear (Nc), citoplásmico (Cit), filamentos intermedios (FI), mitocondrial (Mit) y golgi (Gol).

Al relacionar el perfil autoinmune de cada paciente con el porcentaje de inhibición de la fusión y el índice del porcentaje de partículas positivas, se observaron agrupaciones distintivas, esto es, un grupo conformado por donadores y pacientes VIH+ que presentaron al menos un patrón positivo en el perfil autoinmune. También se observaron otros donadores sanos que no presentaron perfil de autoinmunidad, aunque sí presentaron un porcentaje de inhibición de la fusión celular alto. Por lo tanto, los autoanticuerpos presentes en el suero de estos pacientes no se relacionaron con algún perfil autoinmune.

Posteriormente se analizó la relación entre la presencia de un perfil de autoinmunidad y el efecto de inhibición de la fusión celular en los sueros de donadores sanos y pacientes VIH+ (figura 17). Se observó que 18 de 20 sueros (90%) presentaron un porcentaje de inhibición mayor al 10%, mientras que en los sueros de los donadores sanos 3 de 15 sueros (33%) presentaron un porcentaje de inhibición mayor al 10%. 6 de 15 sueros (40%) de los sueros de los donadores sanos, promovieron la fusión celular.

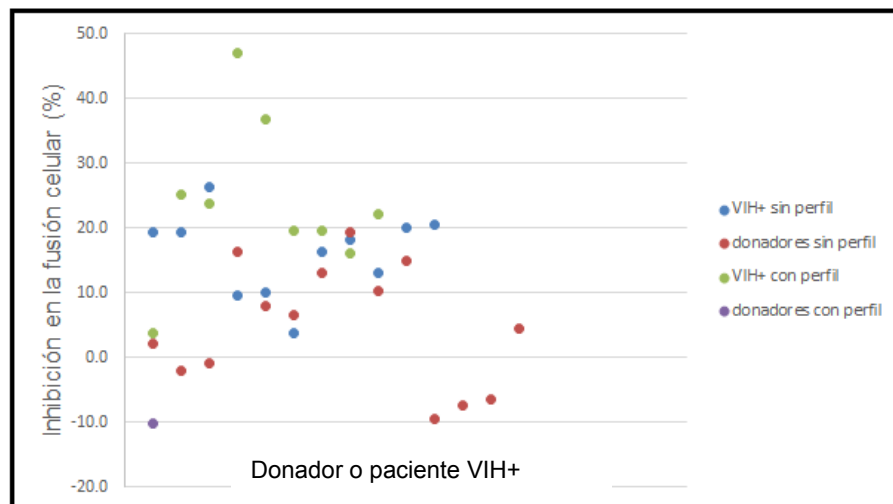


Figura 17. Porcentaje de inhibición de la fusión celular en los sueros de donadores sanos y VIH+. Cada punto representa un donador o un paciente VIH+. Sanos que no presentaron perfil autoinmune (rojo), donadores sanos con perfil autoinmune (violeta), pacientes VIH+ que presentaron un perfil autoinmune (verde) y pacientes VIH+ sin ningún perfil autoinmune (azul).

Al graficar el índice del porcentaje de unión a partículas positivas (figura 18), se observó que 7 de 20 sueros de los pacientes VIH+ (35%), presentaron un índice del porcentaje de partículas positivas mayor a 60. Un suero de 20 (5%) presentó un índice mayor a 20 veces en el aumento del porcentaje de células positivas con respecto al control, mientras que 19 de 20 sueros (95%) obtuvieron un índice menor a 10 veces. En el caso de los individuos VIH+, se observaron 11 de 20 sueros (58%) que presentaron un índice menor a 20 veces y , 8 de 20 sueros (42%), tuvieron un índice de aumento mayor a 20 veces en el porcentaje de células positivas con respecto al control (figura 18).

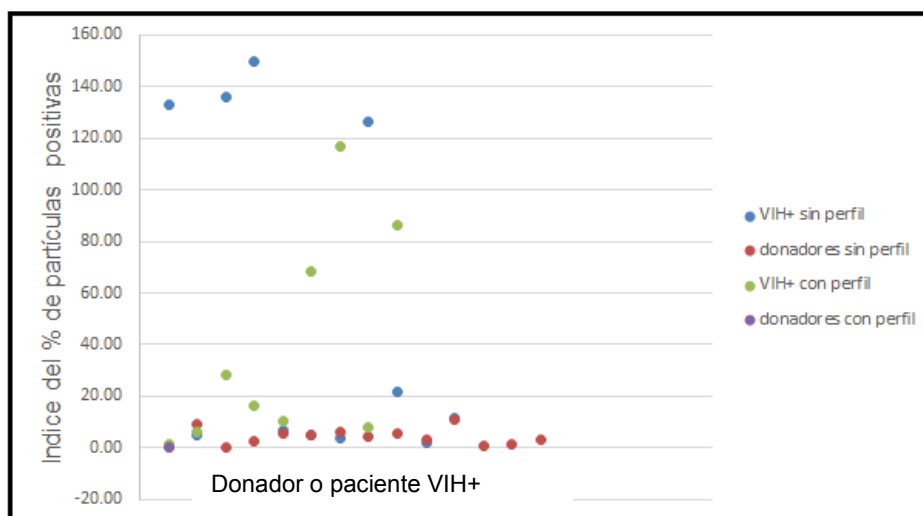


Figura 18. Índice del porcentaje de células positivas en sueros VIH+ y donadores sanos, respecto al control. Donadores sanos sin perfil autoinmune positivo (rojo), donadores sanos que presentaron por lo menos un perfil positivo de autoinmunidad (violeta) y en el caso de pacientes VIH+, azules para aquellos que no presentaron autoinmunidad y verdes para los que sí la presentaron. Se observó que los donadores sanos solo tuvieron un aumento máximo de 40 veces con respecto al porcentaje de células positivas, mientras que los VIH+ tuvieron un aumento mayor a 150 veces.

Se analizó la relación entre la unión de los autoanticuerpos y su efecto en la fusión celular. Se distinguió cada paciente según su perfil autoinmune. 8 de 20 sueros VIH+ (42%) presentaron una relación entre el porcentaje de inhibición de la fusión celular y el aumento en el índice de partículas positivas, es decir, a mayor porcentaje de

inhibición, mayor el número de veces que aumentó el porcentaje de partículas positivas (figura 19, son los 6 puntos del lado derecho de la figura). El perfil autoinmune no se asoció con el porcentaje de inhibición de la fusión celular. Por otra parte, los sueros de los donadores sanos no presentaron relación alguna entre el porcentaje de inhibición de la fusión celular y el índice de partículas positivas.

Por parte de los sueros de los donadores sanos, se observaron dos grupos: uno en el cual 15 de los sueros inhibieron la fusión celular y otro en el que 5 sueros promovieron la fusión celular (figura 19). Solo el donador sano identificado con el número 14 presento un perfil autoinmune y promovió la fusión celular en un 10% (morado). Como ya se dijo antes, el perfil autoinmune no presentó asociación ni con el efecto de los sueros sobre la fusión celular, ni con el índice de unión a partículas positivas.

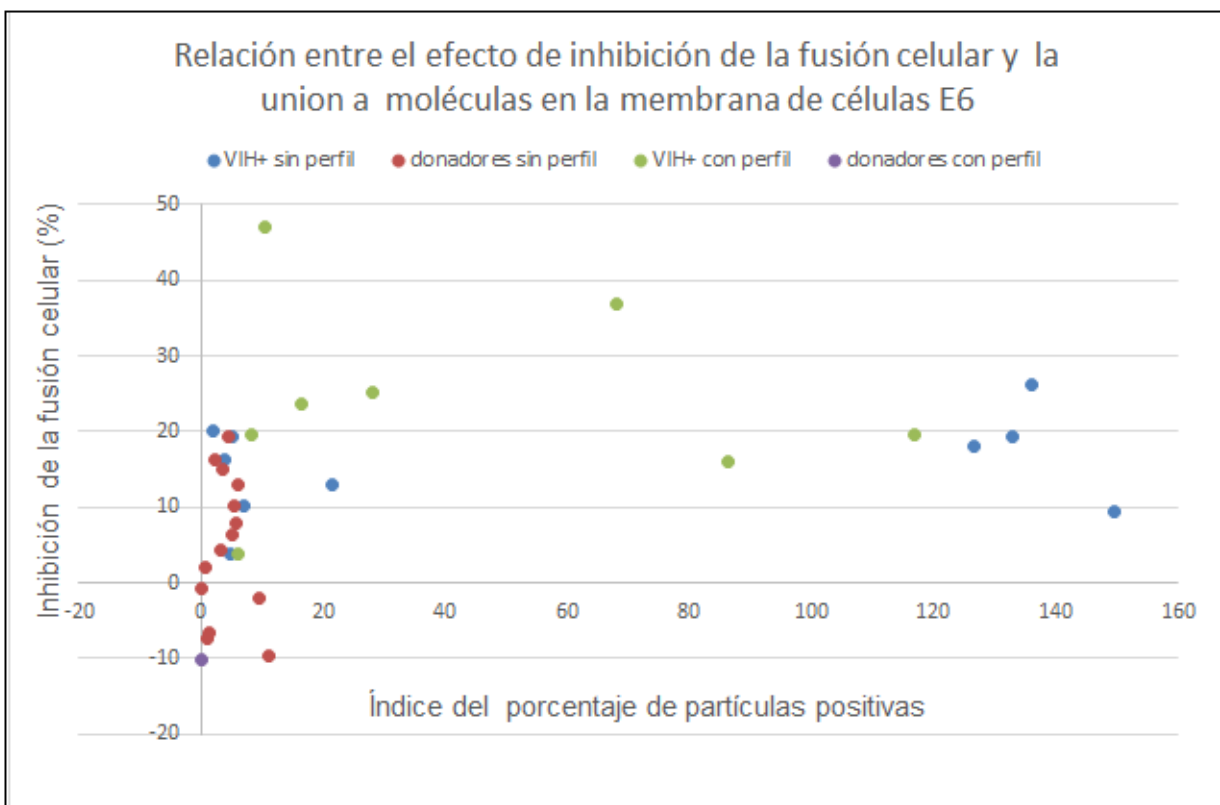


Figura 19. Relación entre la fusión celular y el índice del porcentaje de partículas positivas.

6.4 Actividad del suero y su relación con los parámetros clínicos de la infección.

Con los datos que se proporcionaron en la tabla 1, se determinó la relación entre el efecto del suero sobre la fusión celular y los principales indicadores de progresión a SIDA: cuenta de linfocitos T CD4+ y carga viral. Con el objetivo de saber si los pacientes VIH+ presentaron una relación inversa entre la carga viral y cuenta de células CD4+ que suele ser una relación indicativa para estado clínico del paciente. En la figura 20 se muestra la relación entre la cuenta de CD4+ y la carga viral de los pacientes VIH+,

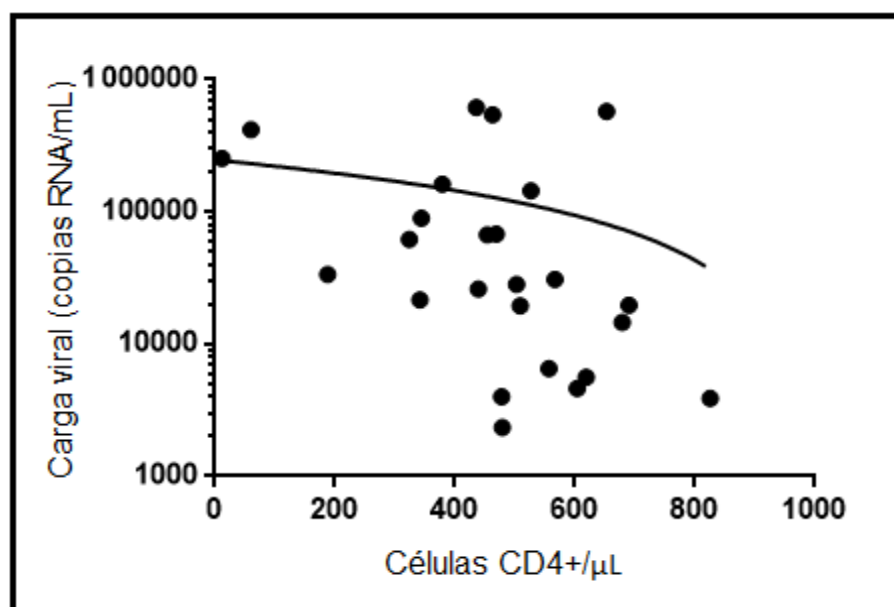


Figura 20. Relación entre la carga viral y la cuenta de Linfocitos T CD4+ de pacientes VIH. Se observó una tendencia inversa entre el número de células CD4+ y la carga viral, pero sin relación significativa ($p=0.297$, $r=0.06$).

6.4.1 Relación entre la unión de anticuerpos del suero a antígenos de la membrana celular y la carga viral.

Se expresó la unión de anticuerpos del suero a antígenos de la membrana celular, como un índice del porcentaje de células positivas (figura 21). 7 de los 20

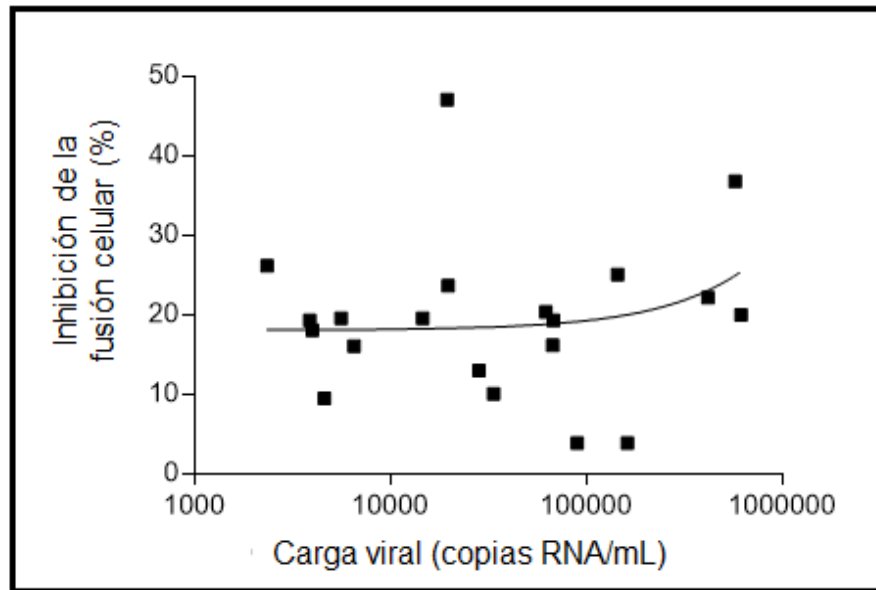


Figura 22. Relación entre el efecto de inhibición de los sueros VIH+ con la carga viral. La correlación lineal no fue significativa ($p=0.337$, $r=0.051$).

6.4.2 Relación entre el efecto de inhibición de la fusión celular y la carga viral.

Se observó que el nivel de la carga viral era variable entre los diferentes sueros de los pacientes VIH+ (figura 22). El intervalo del efecto de inhibición de la fusión celular para todos los sueros fue del 10 al 30%, sin relación con la carga viral. Los sueros de los pacientes 11 y 12 presentaron una inhibición de la fusión menor al 10%, el suero 19 presentó el efecto de inhibición más alto, mientras que el suero 2 presentó un porcentaje de inhibición de la fusión celular mayor al 30%.

6.4.3 Relación entre la unión de anticuerpos a antígenos de la membrana celular y la cuenta de CD4+.

El índice del porcentaje de partículas positivas relacionado con la cuenta de linfocitos T CD4+ mostró que 6 de 20 de los sueros (30%) que unieron un alto número de partículas, tenían un elevado número de linfocitos T CD4+, mientras que 8 sueros

(60%) no presentaron unión a partículas, pero la cuenta de CD4+ también era elevada. 6 de 20 sueros (30%) presentaron bajos niveles en la cuenta de CD4+ y baja unión a partículas. Sólo el suero del paciente identificado con el número 3 en fase de SIDA presentó un elevado índice del porcentaje de partículas positivas (figura 23).

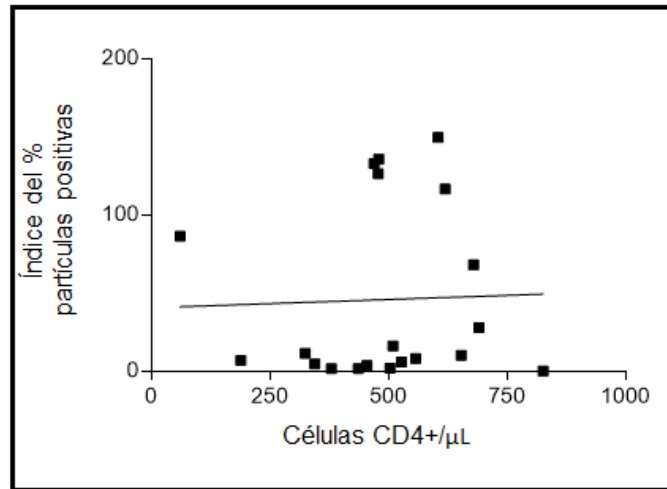


Figura 23. Relación entre el índice del porcentaje de partículas positivas con respecto al control y el número de linfocitos T CD4+ de los pacientes VIH+ no presentó una correlación lineal significativa ($p=0.888$, $r=0.01$)

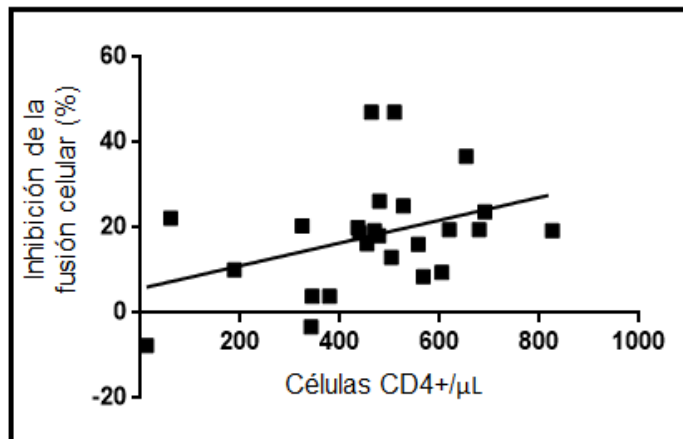


Figura 24. Relación entre el efecto de inhibición de la fusión celular y la cuenta de linfocitos T CD4+ de cada uno de los sueros de pacientes VIH+. No se encontró correlación lineal significativa ($p=0.5060$, $r=0.1498$).

6.4.4 Relación entre el efecto de inhibición de la fusión celular y la cuenta de CD4+

Se observó una tendencia positiva entre el efecto de inhibición de la fusión celular y el número de Linfocitos T CD4+ (figura 24). Se encontró de manera general que los sueros de pacientes VIH+ que tenían cuenta de linfocitos CD4+ elevadas, tenían mayores porcentajes de inhibición (10 al 35%). El suero 19 presentó el más alto porcentaje de inhibición (47%). Sólo los sueros 3 y 10 presentaron una inhibición de la fusión celular menor al 10% y tenían una cuenta de CD4+ menor a 400 células/ μ L.

7. Discusión

Para observar el papel de los autoanticuerpos en la inhibición de la fusión celular en la infección por el VIH-1, se utilizaron células Jurkat transfectadas establemente con el gen *env* de la variante viral HXBc2. Esta variante es predominante en los países occidentales y en México.^{41, 63} En estas células el gen *env* se encuentra en un plásmido acoplado a un operador dependiente de tetraciclina, de modo que las células son cultivadas en presencia de tetraciclina. Para la síntesis de las proteínas gp120/gp41 (Env), las células se lavan para remover la tetraciclina y se re-cultivan en ausencia de ésta.

Durante la infección por el VIH-1 se inducen múltiples tipos de anticuerpos en contra de las proteínas de gp120 y gp41, incluyendo anticuerpos dirigidos a las regiones variables de la envoltura, al sitio de unión de CD4, y a los sitios de unión a receptores de quimiocinas.¹⁷ Sin embargo, estos anticuerpos no controlan al virus y son fácilmente evadidos por el mismo en el transcurso de la infección.¹⁷ En la etapa temprana de la infección por el VIH-1, la producción de anticuerpos neutralizantes toma un tiempo relativamente largo (3-6 meses),¹³⁶ y cuando se producen, son altamente específicos para el virus transmitido.¹⁵⁹ No obstante, la progresión de la enfermedad tiene lugar aun en la presencia de esta respuesta inmune, debido a la rápida

generación de mutantes de virus que escapan a la neutralización,^{2, 142} inaccesibilidad de los epítopes conservados importantes en la estructura terciaria de Env y generación de anticuerpos hacia fragmentos irrelevantes de los antígenos virales.⁴⁰ Otra posibilidad es que, en etapas tardías de la infección, la magnitud de la transmisión del virus de célula a célula sea mucho más importante. Cabe destacar que los anticuerpos neutralizantes del VIH-1 no necesariamente son inhibidores de la fusión celular.

En el presente trabajo se muestra que el suero de los pacientes VIH+ y de los donadores sanos contienen anticuerpos que afectan la fusión celular mediada por Env y que también pueden unirse a proteínas de superficie de la membrana celular de los linfocitos Jurkat T CD4+. En algunos sueros, se observó una relación entre la capacidad de alterar la fusión celular y la unión a las proteínas de membrana. Sin embargo, en algunos sueros no se encontró relación. Es posible que esas diferencias se deban a la interacción entre la presencia de anticuerpos dirigidos tanto a proteínas celulares como a antígenos virales. Así mismo, pueden presentarse variaciones en las concentraciones plasmáticas de anticuerpos presentes en el suero, en la formación de complejos inmunes y la composición genética del individuo. Se demostró que algunos de los sueros de los pacientes infectados con perfil negativo para autoinmunidad, contienen anticuerpos dirigidos a antígenos presentes en las células blanco. La infección por el VIH-1 se ha asociado con la producción de autoanticuerpos contra una amplia variedad de autoantígenos, incluyendo a proteínas de membrana de linfocitos T. Se desconoce si estos autoanticuerpos se generan debido a una respuesta inmune específica hacia los antígenos propios, o simplemente son un reflejo de la hipergamaglobulinemia no específica producida por la activación policlonal de células B, la cual es característica de la desregulación inmunológica causada por la infección por el VIH-1.^{26, 89} En este estudio se observó la presencia de autoanticuerpos dirigidos a las proteínas de membrana de linfocitos T CD4+ y su relación con el efecto de inhibición de la fusión celular. En este estudio la presencia de autoanticuerpos no dependió de un perfil autoinmune. Cabe destacar que el perfil de autoinmunidad realizado no determinó la presencia de posible autoanticuerpos dirigidos a proteínas de membrana.

La relevancia de los anticuerpos dirigidos contra antígenos propios se ha demostrado en estudios de individuos que habían sido expuestos al virus debido a su convivencia por un largo tiempo con una pareja infectada, pero que habían permanecido seronegativos. El análisis del suero mostró que éste contenía anticuerpos anti-HLA y anti-CD4.¹⁰⁵ De manera notable, esos anticuerpos tenían la capacidad de neutralizar al virus derivado de la pareja seropositiva, así como una actividad neutralizante hacia otras cepas virales.¹⁰⁵

Algunos tipos de anticuerpos no neutralizantes podrían bloquear el movimiento de los viriones de las células infectadas a través de barreras mucosas, y/o inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.⁹⁶ Otros tipos de anticuerpos podrían bloquear la formación de contactos estrechos entre las células, disminuyendo la eficacia de la interacción de Env con los receptores celulares durante la infección por el virus libre y durante la transmisión célula a célula.⁴⁸

La mayoría de los sueros de pacientes VIH+ analizados en este trabajo, presentaron un efecto de inhibición de la fusión celular, que se asoció solo en 5 casos a la presencia de autoanticuerpos, mientras que otros sueros no contenían autoanticuerpos pero sí inhibían eficientemente la fusión celular, lo que sugiere que posiblemente contuvieran anticuerpos dirigidos contra gp120 y gp41 para evitar la fusión celular.

La producción de anticuerpos hacia componentes celulares se ha asociado a defectos de las células B en individuos con VIH-1, principalmente en sujetos con carga viral elevada, que pueden incluir activación policlonal, hipergamaglobulinemia y niveles incrementados de autoanticuerpos.^{44, 118} La generación de autoanticuerpos podría deberse a varios mecanismos: reactividad cruzada de los anticuerpos hacia el virus y proteínas propias,⁷⁰ activación inmunológica,³⁴ mimetismo molecular,^{35, 149} efectos directos del VIH-1 sobre las células endoteliales, destrucción de linfocitos T CD4+ y actividad citotóxica exacerbada con incremento en la producción de autoanticuerpos.³

La activación inmunológica junto con la producción de autoanticuerpos se ha asociado frecuentemente con disminución de células T reguladoras, en ausencia de enfermedad autoinmune.^{5, 93} Esta asociación podría explicar el hecho de que algunos sueros tuvieran algún perfil positivo de autoinmunidad y que los sueros negativos para esos perfiles tuvieran anticuerpos dirigidos a las moléculas de la membrana de los linfocitos T CD4+. También podría explicar que algunos sueros que inhibieron la fusión celular y al mismo tiempo presentaron autoanticuerpos, son negativos para algún perfil de autoinmunidad.

De los 20 sueros VIH+ que se estudiaron, solo los sueros 3 y 10 provienen de pacientes con definición clínica de SIDA (brazo 1, cuenta de CD4 de $50 < 250$ células/ μ L), mientras que los otros 18 sueros provienen de pacientes en la fase asintomática (brazo 2, cuenta de CD4 > 400 células/ μ L). No se observó una correlación entre el efecto de los sueros en la inhibición de fusión celular o en el índice de unión a partículas positivas con los datos clínicos (cuenta de CD4+ y carga viral), lo cual podría deberse a la falta de muestras que pertenezcan al grupo del brazo 1.

Los sueros de pacientes que se encuentran en la fase asintomática, presentaron un efecto de inhibición de la fusión celular mayor que los sueros de los pacientes en fase de SIDA. Esto puede deberse a que en la fase asintomática se produce mayor abundancia de anticuerpos neutralizantes y a que no se han generado mutantes del virus que escapan a la neutralización por anticuerpos. Otra posibilidad es que conforme progresa la infección ocurre una destrucción gradual de la capacidad inmunológica.

Las diferencias genéticas entre los pacientes son una variable importante, que influye en la respuesta inmune contra la progresión de la enfermedad.²⁹ La formación de sincicios a través de la fusión celular inducida por el VIH-1,^{150, 151} así como la transmisión celular del virus célula-célula⁸⁰ y los fenómenos de activación inmunológica⁶² se han sugerido como eventos subyacentes que pueden ser significativos en la patogénesis.

Con este estudio se identificaron 5 sueros de pacientes VIH+ en fase asintomática que manifiestan una relación inversa entre la cuenta de CD4 y la carga viral, es decir, a mayor número de CD4 menor es la carga viral. Además presentaron un elevado porcentaje de inhibición de la fusión y que se encuentran uniéndose con un alto índice a moléculas de membrana de los linfocitos T. Estos sueros a pesar de solo corresponder al 33% de los sueros estudiados podrían ser indicativos de la relación de la existencia de autoanticuerpos presentes en los pacientes que contribuyen a la inhibición de formación de sincicios y la identificación de autoanticuerpos en un paciente puede ser de utilidad para el seguimiento de progreso de la infección. Otros estudios han asociado significativamente la presencia de autoanticuerpos con la depleción de CD4+, por lo tanto son de importancia en el pronóstico de la infección por VIH-1.¹¹¹

El suero número 3 proviene de un paciente con definición clínica de SIDA, pero presenta el mayor índice de unión a partículas positivas a pesar de tener una elevada carga viral y una cuenta de CD4 menor a 60 células/ μ L. Una explicación a este efecto puede deberse a la presencia de anticuerpos, tanto contra linfocitos T cooperadores como contra T supresores, como se ha descrito en otros estudios.^{4, 40, 160} Los anticuerpos anti-CD4 se detectan primero, pero los autoanticuerpos contra ambas subpoblaciones linfocitarias, CD4+ y CD8+, pueden detectarse al aparecer los síntomas de la enfermedad.^{146, 21, 158} Se han detectado autoanticuerpos contra la proteína CD4 (si bien no contra el sitio de unión al VIH-1) en individuos infectados por el VIH-1; estos anticuerpos podrían ser responsables de la muerte de algunos linfocitos T CD4. Al ocurrir la muerte de linfocitos CD4 la cuenta se mantiene baja, se desarrolla la fase de SIDA, pero a su vez la presencia de estos autoanticuerpos que pueden estar dirigidos a CD4 u otras moléculas de superficie de los linfocitos contribuyen a la inhibición de la fusión celular.

8. Conclusiones

-El método de citometría de flujo permite el análisis rápido y preciso del efecto sobre la fusión de grupos numerosos de sueros. Los sueros tanto de los controles como de los infectados inhiben o promueven la fusión celular. Existe una amplia variación en la actividad del suero sobre la fusión entre individuos infectados.

-El efecto de inhibición del suero de los pacientes VIH+ en la fusión celular se relaciona con la unión de autoanticuerpos a las células blanco, que se generan como una respuesta inmune contra la infección del VIH-1.

9. Bibliografía

1. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman y Shiv Pillai. 2011. *Inmunología celular y molecular*. 6ta. Edición, Editorial El sevier saunders. 469-474.
2. Albert J, Abrahamsson B, Nagy K, Aurelius E, Gaines H, Nystrom G, Fenyo EM. 1990. Rapid development of isolate-specific neutralizing antibodies after primary HIV-1 infection and consequent emergence of virus variants which resist neutralization by autologous sera. *AIDS* 4:107-12.
3. Ansari AA (2004) Autoimmunity, anergy, lentiviral immunity and disease. *Autoimmun Rev* 3:530-540. doi:10.1016/j.autrev.2004.07.009
4. Ardman B., M. A. Sikorski, M. Settles, y D. E. Stauntion. 1990. Human immunodeficiency virus type 1-infected individuals make autoantibodies that bind to CD43 on normal thymic lymphocytes. *J. Exp. Med.* 172:1151-1158.
5. Arguello RJ, Balbaryski J, Barboni G, Candi M, Gaddi E, Laucella S (2012) Altered frequency and phenotype of CD4+ forkhead box protein 3+ T cells and its association with autoantibody production in human immunodeficiency virus-infected paediatric patients. *Clin Exp Immunol* 168:224-233. doi:10.1111/j.1365-2249.2012.04569.x
6. Arthur L. O., J. W. Bess Jr., R. C. Sowder II, R. E. Benveniste, D. L. Mann, J. C. Chermann, y L. E. Henderson. 1992. Cellular proteins bound to immunodeficiency viruses: implications for pathogenesis and vaccines. *Science* 258:1935-1938.
7. Asherson A. R., E. Wypkema, S. Singh, y S. Loizou. 2003. Anticardiolipin, anti-b2glycoprotein I and antiprothrombin antibodies in black South African patients with infectious disease. *Ann. Rheum. Dis.* 62:1106-1111.
8. Berger, J. E. A., P. M. Murphy, y J. M. Farber. 1999. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu. Rev. Immunol.* 17:657-700.
9. Binley, J. M., T. Wrin, B. Korber, M. Zwick, M. Wang, C. Chappey, G. Stiegler, R. Kunert, S. Zolla-Pazner, H. Katinger, C. J. Petropoulos, y D. R. Burton. 2004. Comprehensive cross-clade neutralization analysis of a panel of anti-human immunodeficiency virus type 1 monoclonal antibodies. *J. Virol.* 78:13232-13252.
10. Blaak H, van't Wout AB, Brouwer M, Hooibrink B, Hovenkamp E, Schuitemaker H (2000) In vivo HIV-1 infection of CD45RA(+)CD4(+) T cells is established primarily by syncytium-inducing variants and correlates with the rate of CD4(+) T cell decline. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:1269-1274
11. Blumenthal R, Gallo SA, Viard M, Raviv Y, and Puri A. 2002. Fluorescent lipid probes in the study of viral membrane fusion. *Chemistry and Physics of Lipids* 116:39-55
12. Bor, Y. C., M. D. Miller, F. D. Bushman, y L. E. Orgel 1996. Target-sequence preferences of HIV-1 integration complexes in vitro. *Virology* 222:283-288.
13. Brander, C. y Y. Riviere. 2002 Early and late cytotoxic T lymphocyte responses in HIV infection. *AIDS* 16 (Suppl. 4):S97-S103
14. Broliden, P.-A., A. von Gegerfelt, P. Clapham, J. Rosen, E.-M. Fenyo, B. Wahren, y K. Broliden. 1992. Identification of human neutralization-inducing regions of the

- human immunodeficiency virus type 1-envelope glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:461-465.
15. Budka H (1986) Multinucleated giant cells in brain: a hallmark of the acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Acta Neuropathol* 69:253-258
 16. Bukrinsky M. I., S. Haggerty, M. P. Dempsey, N. Sharova, A. Adzhubel, L. Spitz, P. Lewis, D. Goldfarb, M. Emerman, y M. Stevenson. 1993. A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. *Nature* 365:666-669.
 17. Burton DR, Desrosiers RC, Doms RW, Koff WC, Kwong PD, Moore JP, Nabel GJ, Sodroski J, Wilson IA, Wyatt RT (2004) HIV vaccine design and the neutralizing antibody problem. *Nat Immunol* 5:233-236. doi:10.1038/ni0304-233
 18. Camaur, D., B. D. Jamieson, J. A. Zack, y I. S. Y. Chen. 1994. Pathogenesis of syncytium-inducing and non-syncytium inducing HIV-1
 19. Cammack N. The potencial for HIV fusion inhibition. *Curr Opin Infect Dis.* 2001; 14:13-6
 20. Center, R. J., R. D. Leapman, J. Lebowitz, L. O. Arthur, P. L. Earl, B. Moss. (2002) Oligomeric structure of the huma immunodeficiency virus type 1 envelope protein on the virion Surface. *J. virol* 76: 7863-7.
 21. Chams V., T. Jouault, E. Fenouillet, J. C. Gluckman, y D. Klatzmann. 1988. Dtection of anti-CD4 autoantibodies in the sera of HIV-infected patients using recombinant soluble CD4 molecules. *AIDS* 2:353-361.
 22. Chan, D. C., D. Fass. J M. Berger, P. S. Kim (1997) Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell.* 89:263-73.
 23. Chanh, T. C., G. R. Dreesman, P. Kanda, G. P. Linette, J. T. Sparrow, D. D. Ho, y R. C. Kennedy. 1986. Induction of anti-HIV neutralizing antibodies by synthetic peptides. *EMBO J.* 5:3065-3071.
 24. Cheng-Mayer, C. D. Seto, M. Tateno, y J. A. Levy. 1998. Biologic features of HIV that correlate with virulence in the host. *Science* 240:80-82.
 25. Cheng-Mayer, C., R. Liu, N. R. Landau, y L. Stamatatos. 1997. Macrophage tropism of human immunodeficiency virus type 1 and utilization of the CC-CCR5 coreceptor. *J. Virol.* 71:1657-1661.
 26. Chirmule N, V S Kalyanaraman, C. Saxinger, F. Wong-Staal, J. Ghayeb, y S Pahwa. 1990. Localization of B- cell stimulatory activity of HIV-1 to the carboxyl terminus of gp41. *AIDS. Res. Hum. Retrovir.* 6:299-305.
 27. Choe H, Farzan M. Sun Y. Sullivan N. Rollins B, Ponath PD, et al. The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* 1996 85(7): 1135-48
 28. Coffin, J. M. 1992. Structure and classification of retroviruses, p. 19-50. In I A. Levy (ed), *The Retroviridae*, vol. 1. Plenum Press, New York, N. Y.
 29. Collaborative-Groupon AIDS Incubation and HIV Survival including the CASCADE EU Concerted Action. 2000. Time from HIV-1 seroconversion to AIDS and death before widespread use og highly-active antiretroviral therapy: a collaborative re-analysis. *Lancet* 355:1131-1137.

30. Comier E, Dragic T. The crown and stem of the V3 loop play distinct roles in HIV type 1 envelope glycoprotein interactions with the CCR5 coreceptor. *J Virol.* 2002; 76:8953-7
31. Connor RI, Mohri H, Cao Y, Ho DD (1993) Increased viral burden and cytopathicity correlate temporally with CD4+ T-lymphocyte decline and clinical progression in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *J Virol* 67:1772-1777
32. Cullen, B. R. 2001. Journey to the center of the cell. *Cell* 105:697-700.
33. De acuerdo al National Center for Bionotechnology Information (NCBI), GenBank: NC_001802.1 y NC_001722.1, respectivamente para VIH-1 y VIH-2.
34. De Milito A (2004) B lymphocyte dysfunctions in HIV infection. *Curr HIV Res* 2:11-21
35. Deas JE, Liu LG, Thompson JJ, Sander DM, Soble SS, Garry RF, Gallaher WR (1998) Reactivity of sera from systemic lupus erythematosus and Sjogren's syndrome patients with peptides derived from human immunodeficiency virus p24 capsid antigen. *Clin Diagn Lab Immunol* 5:181-185
36. Delwart, E., M. Magierowska, M. Royz, B. Foley, L. Peddada, R. Smith, C. Heldebrant, A. Conrad, y M. Busch 2002. Homogeneous quasispecies in 16 out of 17 individuals during very early HIV-1 primary infection. *AIDS* 16:189-95.
37. Deng H, Liu R, Ellmeler W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, et al. Identification of major co-receptor for primary isolates of hiv-1, *Nature*, 1996: 381(6584
38. Dimitrov DS, Willey RL, Sato H, Chang LJ, Blumenthal R, Martin MA. 1993. Quantitation of human immunodeficiency virus infection from monocyte-derived macrophages to peripheral blood lymphocytes. *Virology* 265:319-329.
39. Doranz, B. J., J. Rucker, Y. Yi, R J, Smyth, M. Samsom, S. C. Peiper, M. Parmentier, R. G. Collman, y R. W. Doms. 1996. A dual tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the b-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusión cofactors. *Cell* 85:1149-1158.
40. Dorsett B. H., W. Cronin, y H. L. Ioachim. 1990. Presence and prognostic significance of antilymphocyte antibodies in symptomatic and asymptomatic human immunodeficiency virus infection. *Arch. Intern. Med.* 150:1025-1028.
41. Duh-E. J., W. J. Maury, T. M. Folks, A. S. Fauci, y A. B. Rabson. 1989. Tumor necrosis factor alpha activates human immunodeficiency virus type 1 through induction of nuclear factor binding to the NF-kappa B sites in the long terminal repeat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5794-5978.
42. Eckert D y Kim PS. 2001. Mechanism of viral membrane fusión and its inhibition. *Ann Rev Biochem* 70:777-810
43. Embretson, J., M. Zupancic, J. L. Ribas, A. Burke, P. Racz, K. Tenner-Racz, y A. T. Haase. 1993. Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS. *Nature* 362:359-362.
44. Fauci AS. 1988. The human immunodeficiency and mechanisms of pathogenesis. *Science*, 239:617-622
45. Feinberg, M. B., R. F. Jarrett, A. Aldovini, R. C. Gallo, y F. Wong-Staal. 1986 HTLV-III expression and production involve complex regulation at the levels of splicing and translation of viral RNA. *Cell* 46:807-817.

46. Feng, Y. X., T. D. Copeland, L. E. Henderson, R.J. Gorelick, W. J. Bosche, J. G. Levin, y A. Rein. 1997. HIV-1 nucleocapsidprotein induces "maturation" of dimeric retroviral RNA in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:7577-7581.
47. Folkvord, J. M., C. Armon, y E. Connick. 2005. Lymphoid follicles are sites of heightened human immunodeficiency virus type 1 replication and reduced antiretroviral effector mechanism. *AIDS Res.Hum. Retrovir* 21:363-370.
48. Fortin JF, Cantin R, Bergeron MG, Tremblay MJ (2000) Interaction between virion-bound host intercellular adhesion molecule-1 and the high-affinity state of lymphocyte function-associated antigen-1 on target cells renders R5 and X4 isolates of human immunodeficiency virus type 1 more refractory to neutralization. *Virology* 268:493-503. doi:10.1006/viro.2000.0190
49. Frankel SS, Wenig BM, Burke AP, Mannan P, Thompson, Abbondanzo SL, Nelson AM, Pope M y Steinman RP. 1996. Replication of HIV-1 in dendritic cell-derived syncytia at the mucosal surface of the adenoid. *Science* 272:115-117.
50. Freed E O, Martin M A. 1996 Domains of the human immunodeficiency virus type 1 matrix and gp41 cytoplasmic tail required for envelope incorporation into virions. *J Virol*; 70:341-51.
51. Freed E. O., E. L. Delwart, G. L. Buchschacher Jr., y A. T. Panganiban. 1992. A mutation in the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein gp41 dominantly interferes with fusion and infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:70-74.
52. Freed E. O., y D. J. Myers. 1992. Identification and characterization of fusion and processing domains of the human immunodeficiency virus type 2-envelope glycoprotein. *J. Virol.* 66:5472-5478.
53. Freed E., O.2002. Viral late domains. *J. Virol.* 76:4679-4687.
54. Frey S., M. Marsh, S. Gunther, A. Pelchen-Matthews, P. Stephens, S. Ortlepp, y T. Stegman. 1995. Temperature dependence of cell-cell fusion induced by the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 69:1462-1472.
55. Gelderblom HR, Reupke H, Pauli G (1985) Loss of envelope antigens of HTLV-III/LAV, a factor in AIDS pathogenesis?; 2:1016-7
56. Gelen JLMC, Goudsmit J. Virus-host interactions in human immunodeficiency virus infection. *Progress in Medical Virology*, vol 38, ed. Melnick JL, Basel, Karger, 1991:27-41
57. Gigliotti, F. 2005. *Pneumocystis carinii*: has the name really been changed *Clin. Infect. Dis.* 41:1752-1755.
58. Gómez C., y T. J. Hope. 2005. The ins and outs of HIV replication. *Cell. Microbiol.* 7:621-626.
59. Gould S., J. A. M. Booth, y J. E.K. Hildreth.2003. The Trojan exosome hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:10592-10597.
60. Greene W C, y B M Peterlin. 2002. Charting HIV's remarkable voyage through the cell: basic science as a passport to future therapy. *Nat. Med.* 8:673-680.
61. Greene W. C., 2004. The brightening future of HIV therapeutics. *Nat. Immunol.* 5:867-871.

62. Grossman Z, Meier-Schellersheim M, Sousa A, Victorino RMMM y Paul W. 2002. CD4+ T-cell depletion in HIV infection: are we closer to understanding the cause? *Nature Medicine*
63. Gudino C y Soler. 2000. Detección de virus subtipo B del HIV-1 mediante el análisis de restricción de amplicones de gag con la enzima Bst Xi (REA-PCR). Resumen del 1er. Congreso de la Rama de Bioquímica y Biología Molecular de Virus de la Sociedad Mexicana de Bioquímica. *Rev. Biomed* 11:135-154.
64. Gummuluru S, KewalRamani VN, and M Emerman. 2002. Dendritic cell-mediated viral transfer to T cells is required for human immunodeficiency virus type 1 persistence in the face of rapid cell turnover. *J. Virol* 76(21):10692-10701.
65. Haase A. T. 2005. Perils at mucosal front lines for HIV and SIV and their hosts. *Nat. Rev. Immunol.* 5: 783-792.
66. Hansen J. E. S., C. , M. Nielsen, C. Nielsen, P. Heegard, L. R. Mathiesen, y J. O. Nielsen. 1989. Correlation between carbohydrate structures on the envelope glycoprotein gp120 of HIV-1 and HIV-2 and syncytium inhibition with lectins. *AIDS* 3:635-641.
67. Hart TK, Truneh A, Bugelski PJ. 1996. Characterization of CD4-gp120 activation intermediates during human immunodeficiency virus type 1 syncytium formation. *AIDS Res Hum Retrovir* 12:1305-1313.
68. Hartley C. A., M. J. Gilbert, L. Brigido, T. Elbeik, J. A. Levy, S. M. Crowe, y J. Millis. 1996. Human immunodeficiency virus grown in CD4-expressing cells is associated with CD4. *J. Gen. Virol.* 77:2015-2023.
69. Hatzioannou T., D. Pérez-Caballero, S. Cowan, y P.D. Bieniasz. 2005. Cyclophilin interactions with incoming human immunodeficiency virus type 1 capsids with opposing effects on infectivity in human cells. *J. Virol.* 79:176-183.
70. Haynes BF, Fleming J, St. Clair EW, Katinger H, Stiegler G, Kunert R, Robinson J, Scearce RM, Plonk K, Staats HF, Ortel TL, Liao H-X, Alam SM (2005) Cardiophilin Polyspecific Autoreactivity in Two Broadly Neutralizing HIV-1 Antibodies. *Science* 308:1906-1908. doi:10.1126/science.1111781
71. Heinzinger N. K., M I Bukinsky, S. A. Haggerty, A M Ragland, V Kewalramani, M A Lee, H E. Gendelman, L. Ratner, M S tevenson, y M. Emerman. 1994. The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:7311-7315.
72. Helseth, E., U. Olshevsky, C. Furman, y J. Sodroski. 1991. Human immunodeficiency virus type 1 gp120 envelope glycoprotein regions important for association with the gp41 transmembrane glycoprotein. *J. Virol.* 65:2119-2123.
73. Henderson, L. A., y M. N. Qureshi. 1993. A peptide inhibitor of human immunodeficiency virus infection binds to novel human cell surface polypeptides. *J. Biol. Chem.* 268:15291-15297.
74. Hioe CE, Hildreth JE, Zolla-Pazner S (1999) Enhanced HIV type 1 neutralization by human anti-glycoprotein 120 monoclonal antibodies in the presence of monoclonal antibodies to lymphocyte function-associated molecule 1. *AIDS Res Hum Retroviruses* 15:523-531. doi:10.1089/088922299311042

75. Holm G H., y D. Gabuzda. 2005. Distinct mechanisms of CD4+ and CD8+ T cell activation and bystander apoptosis induced by human immunodeficiency virus type 1 virions. *J. Virol.* 79:6299-6311.
76. Hoxie J. A., T P. Fitzharris, P. R. Youngbar, D. M. Matthews, J. L. Rackowski, y S. F. Radka. 1987. Nonrandom association of cellular antigens with HTLV-III virions. *Hum. Immunol.* 18:39-52.
77. Hoxie J. Hypothetical assignment of intrachain disulfide bonds for HIV-2 and SIV envelope glycoproteins. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1991;7: 495-9.
78. Huerta L, Gomez-Icazbalceta G, Soto-Ramirez L, Viveros-Rogel M, Rodriguez R, Fuentes L, Lamoyi E, Larralde C (2005) Human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) envelope-dependent cell-cell fusion modulation by HIV-positive sera is related to disease progression. *J Gen Virol* 86:1961-1966. doi:10.1099/vir.0.80635-0
79. Israel Hernández de Luna, 2011, Estado actual del conocimiento de los eventos intracelulares que controlan la replicación del VIH-1 en células del sistema inmune. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán
80. Johnson DC y Huber MT.2002. Direct egress of animal viruses promotes cell-to-cell spread. *J Virol* 76: 1-8.
81. José Alcamí, Mario Esteban, Jesus Gil, Maria Angel García, Paulino Gomez Puertas, Susana Guerra, Joaquín Rullas, y Hiroyasu Nakano.2004. TRAF Family proteins link PKR with NF-B activation. *Molecular and Cellular Biology.* 24:4502-4512,
82. Karlsson, A. C., S. Lindback, H. Gaines, B. Hahn, y J. Sodroski. 1996. Characterization of the viral population during primary HIV-1 infection. *AIDS* 12:839-847.
83. Khan MA, Kao S, Miyagi E, Takeuchi H, Goila-Gaur R, Opi S, Gipson CL, Parslow TG, Ly H, Strebel K.(2005) Viral RNA is required for the association of APOBEC3G with human immunodeficiency virus type 1 nucleoprotein complexes. *J Virol;* 79:5870-4
84. Klaassen R. J. L., R Goldschmeding, K M Dolman, A.B.J. Vlekke, H. M. Weigel, J. K. M. Eefitink Schattenkerk, J. W. Mulder, M L. Westedt, y A. E. G. K. von dem Borne. 1992. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies in patients with symptomatic HIV infection. *Clin. Exp. Immunol.* 87:24-30.
85. Kowalski M, Potz J, Basiripour L, Dorfman T, Goh W, Terwilliger E, et al. Functional regions of the envelope glycoprotein of HIV type 1. *Science.* 1987; 237:1351-5.,
86. Kozlowski, P. A., D. Chen, J. H. Eldridge, y S. Jackson. 1994. Contrasting IgA and IgG neutralization capacities and responses to HIV TYPE 1 gp120 V3 loop in HIV-infected individuals. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 10:813-822.
87. Kuznetsov Y. G., J. G. Victoria, W. E. Robinson Jr y A. McPherson. 2003. Atomic force microscopy investigation of human immunodeficiency virus (HIV) and HIV-infected lymphocytes. *J. Virol.* 77:11896-11909.
88. Lama J, Mamgasarian A, Trono D. (1999) Cell-surface expression of CD4 reduces HIV-1 infectivity by blocking Env incorporation in a Nef and Vpu inhibitable manner *Curr. Biol.;* 9:622-31.

89. Landay, A. L. C. Mackewicz y J. A. Levy 1993 Anactivated CD8+ T cell phenotype correlates with HIV activity and asymptomatic clinical status. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 69:106-116.
90. Lane H C, H Masur, L C Edgar, G Whalen, A H ROOK, y A S Fauci. 1983. Abnormalities of B-cell activation and immunoregulation in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *N. Engl. J. Med.* 309:453-458.
91. Lang, W., H. Perkins, R. E. Anderson , R. Royce, N. Jewell, y W. Winkelstein, Jr. 1989. Patterns of T lymphocyte changes with human immunodeficiency virus infection: from seroconversion to the development of AIDS. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2:63-69.
92. Lasky L, Nakamura G, Smith D, Fennie C, Shimasaki C, Patzer E, et al. Delineation of a region of the HIV type 1 gp120 glycoprotein critical for interaction with the CD4 receptor. *Cell.* 1987; 50:975-85
93. Lecossier D, Bouchonnet F, Clavel F, Hance AJ (2003) Hypermutation of HIV-1 DNA in the absence of the Vif protein. *Science*; 300:112.
94. Legrand FA, Nixon DF, Loo CP, Ono E, Chapman JM, Miyamoto M, Diaz RS, Santos AM, Succi RC, Abadi J, Rosenberg MG, de Moraes-Pinto MI, Kallas EG (2006) Strong HIV-1-specific T cell responses in HIV-1-exposed uninfected infants and neonates revealed after regulatory T cell removal. *PLoS One* 1:e102. doi:10.1371/journal.pone.0000102 Letvin NL (2009) Moving Forward in HIV Vaccine Development. *Science* 326:1196-1198. doi:10.1126/science.1183278
95. Lehmann-Che J, y A. Saib. 2004. Early stages of HIV replication: how to hijack cellular functions for a successful infection. *AIDS Rev*; 6:199-207.
96. Leonard C, Spellman M, Riddle L, Harris R, Thomas J, Gregory T. Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant HIV envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.* 1990; 265:10373-82
97. Letvin NL (2009) Moving Forward in HIV Vaccine Development. *Science* 326:1196-1198. doi:10.1126/science.1183278
98. Levy, J. A. 1993. HIV pathogenesis and long-term survival. *AIDS* 7:1401-1410.
99. Levy, J. A., C. E. Mackewicz, y E. Barker. 1996 Detection of HIV in pathogenesis: the role of noncytotoxic anti-HIV activity of CD8+ cells. *Immunol. Today* 17:217-224.
100. Li W.,D. Galey, M. P. Mattson y A. Nath. 2005. Molecular and cellular mechanisms of neuronal cell death in HIV dementia. *Neurotox. Res.* 8:119-134.
101. Lifson J. D., G. R. Reyes, M.S. Mc Grath, B. S. Stein, y E. G. Engleman. 1986. AIDS retrovirus induced cytopathology: giant cell formation and involvement of CD4 antigen. *Science* 232:1123-1127.
102. Lifson J., S. Coutre, E. Huang, y E. Engleman. 1986. Role of envelope glycoprotein carbohydrate in human immunodeficiency virus (HIV) infectivity and virus-induced cell fusion. *J. Exp. Med.* 164:2101-2106.
103. Lifson JD, Reyes GR, McGrath MS, Stein BS, Engleman EG. 1986. AIDS retrovirus induced cytopathology: giant cell formation and involvement of CD4 antigen. *Science* 232:1123-1127.

104. Lindenmann J. 1974. Viruses as immunological adjuvants in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 355:49-75
105. Liu, H., X. Wu, M. Newman, G. M. Shaw, B. H. Hahn, y J. C. Kappes 1995 The Vif protein of human and simian immunodeficiency viruses is packaged into virions and associates with viral core structures. *J. Virol.* 69:7630-7638.
106. Liu, J, Bartesaghi A, Borgnia MJ, Sapiro G, Subramaniam S. (2008) Molecular architecture of native HIV-1 gp120 trimers. *Nature*; 455:109-13.
107. Lopalco L, Pastori C, Cosma A, Burastero SE, Capiluppi B, Boeri E, Beretta A, Lazzarin A, Siccardi AG (2000) Anti-cell antibodies in exposed seronegative individuals with HIV type 1-neutralizing activity. *AIDS Res Hum Retroviruses* 16:109-115. doi:10.1089/088922200309458
108. Lu M, Blacklow S, Kim P. A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein. *Nature Struct Biol.* 1995; 2:1075-82.
109. Mackewicz, C. E., E. Barker, G. Greco, G. Reyes-Teran, y J. A. Levy 1997. Do chemokines have clinical relevance in HIV infection? *J. Clin. Investig.* 100:921-930.
110. Mackewicz, C. E., H. W. Ortega, y J. A. Levy 1991. CD8+ cell anti-HIV activity correlates with the clinical state of the infected individual. *J. Clin. Investig.* 87:1462-1466.
111. Maldarelli F, Chen MY, Willey RL, Strebel K. (1993) Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein is an oligomeric type I integral membrane protein. *J Virol*; 67:5056-61.
112. Marriott, D. J. E. y M. McMurchie 1996. Managing HIV. Part 2. Phases of disease. 2.4 HIV and advanced immune deficiency. *Med. J. Aust.* 164:111-112.
113. Massabki S. Paulo, Conceicao Accetturi, Iracema A. Nishie, Neusa P. da Silva, Emilia I. Sato and Luis E.C. Amdrade. (1997) Clinical implications of autoantibodies in HIV infection. *AIDS* 11:1845-1850.
114. Matthews T. J., K. J. Weinhold, H. K. Lyerly, A. J. Langlois, H. Wigzell y D. P. Bolognesi. 1987. Interaction between the human T cell lymphotropic virus type IIb envelope glycoprotein gp120 and the surface antigen CD4: role of carbohydrate in binding and cell fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:5424-5428.
115. McInerney, T. L., L. McLain, S. J. Armstrong, y N. J. Dimmock. 1997. A human IgG1 (b12) specific for the CD4 binding site of HIV-1 neutralizes by inhibiting the virus fusion entry process, but b12 Fab neutralizes by inhibiting a postfusion event. *Virology* 233: 313-326.
116. McKeating JA, McKnight A, Moore JP. (1991) Differential loss of envelope glycoprotein gp120 from virions of human immunodeficiency virus type 1 isolates: effects on infectivity and neutralization *J Virol* ;65:852-60
117. Meerloo T., M. A. Sheik, A. C. Bloem, A. de Ronde, M. Schutten, C. A. C. van Els, P. J. M. Rohol, P. Joling, J. Goudsmit, y H.J. Schuurman. 1993. Host cell membrane proteins on human immunodeficiency virus type 1 after in vitro infection of H9 cells and blood mononuclear cells. An immune-electron microscopic study. *J. Gen. Virol.* 74:129-135.

118. Mehle A, Strack B, Ancuta P, Zhang C, McPike M, Gabuzda D. (2004) Vif overcomes the innate antiviral activity of APOBEC3G by promoting its degradation in the ubiquitin-proteasome pathway. *J. Biol Chem*; 279:7792-8.
119. Mellikan G, Markosyan R, Hemmati H, Delmedico M, Lambert D, Cohen F. Evidence that the transition of HIV-1 gp41 into a six-helix bundle, not the bundle configuration, induces membrane fusion. *J Cell Biol*. 2000; 151:413-23
120. Moir S, Fauci AS (2008) Pathogenic mechanisms of B-lymphocyte dysfunction in HIV disease. *J Allergy Clin Immunol* 122:12-19; quiz 20-11. doi:10.1016/j.jaci.2008.04.034
121. Morrow CD, Park J, Wakefield JK. 1994. Viral gene products and replication of the human immunodeficiency type 1 virus. *Am J Physiol*: C1135-C1156
122. Morrow W. J. W., D. A. Isenberg, R. E. Sobol, R. B. Stricker y T. Kieber-Emmons. 1991. AIDS virus infection and autoimmunity: a perspective of the clinical, immunological, and molecular origins of the autoallergic pathologies associated with HIV disease. *Clin. Immunol. Immunopathol*. 58:163-180.
123. Muller T, S. N. Ebert, D. Subramanian, S. S. Shtrom, I. K. Chung, y D. S. Parris. 1994. Association between the p170 from of human Topoisomerase II and progeny viral DNA in cells infected with herpes simplex Virus type 1. *J. Virol*.68:1010-1020.
124. Muñoz, J. F., S. Salmen, L. R., Berueta, M. P. Carlos, J. A. Cova, J. H. Donis, M. R. Hernández, y J. V. Torres. 1999. Effect of human immunodeficiency virus type 1 on intracellular activation and superoxide production by neutrophils *J. Infect. Dis*. 180:206-210.
125. Murakami T., y E. O. Freed.2000.The long cytoplasmatic tail of gp41 is required in a cell type-dependent manner for HIV-1 envelope glycoprotein incorporation into virions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:343-348.
126. Myszka D, Sweet R, Hensley P, Brigham-Burke M, Kwong P, Hendrickson W, et al. Energetics of the HIV gp120-CD4 binding reaction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:9026-31
127. Nguyen D. G., y J. E. Hildreth. 2000. Evidence for budding of human immunodeficiency virus type 1 selectively from glycolipid-enriched membrane lipid rafts. *J. Virol*. 74:3264-3272.
128. Ogg, G. S., X. Jin, S. Bonhoefer, P. R. Dunbar, M. A. Nowak, S. Monard, J. P. Segal, Y. Cao, S. L. Rowland-Jones, V. Cerundolo, A. Hurley, M. Markowitz, D.D. Ho, D. F. Nixon, y A. J. McMichael. 1998. Quantitation of HIV-1 specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA. *Science* 279:2103-2106.
129. ONUSIDA, Informe de ONUSIDA, 14/07/2014, recuperado el día 10 de noviembre de 2014 de <http://www.unaids.org>.
130. Ou, S. H. I., y R. B. Gaynor 1995 Intracellular factors involved in gene expression of human retroviruses, p. 97-187. En J. A. Levy (ed), *The Retroviridae*, vol. 4. Plenum Press, Nueva York, N. Y.
131. Park SH, Mrse AA, Nevzorov AA, Mesleh MF, Oblatt-Montal M, Montal M, Opella SJ. (2003) Three-dimensional structure of the channel-forming trans-membrane domain of virus protein "u" (Vpu) from HIV-1. *J Mol. Biol*; 333:409-24.

132. Parren PW, Moore JP, Burton DR, Sattentau QJ. 1999. The neutralizing antibody response to HIV-1: viral evasion and escape from humoral immunity. *AIDS* 13 Suppl A:S137-62.
133. Peterlin Matija B., Xin Lin, Dan Irwin, Satoshi Kanazawa, Laurence Huang, Joseph Romeo y T. S. Benedict Yen. Transcriptional profiles of latent human immunodeficiency virus in infected individuals effects of Tat on the host and reservoir. *J. Virol.* 77:8227-8236.
134. Peterlin, B. M. 1995. Molecular biology of HIV, p. 185-238. In J. A. Levy (ed), *The Retroviridae*, vol. 4. Plenum Press, Nueva York, N.Y.
135. Piller SC, Ewart GD, Premkumar A, Cox GB, Gape PW. (1996) Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 forms cation-selective channels in planar lipid bilayers. *Proc Natl Acad Sci USA*; 93:111-5.
136. Popik, W., J. E. Hesselgesser, y P. M. Pitha. 1998. Binding of human immunodeficiency virus type 1 to CD4 and CXCR4 receptors differentially regulates expression of inflammatory genes and activates the MEK/ERK signaling pathway. *J. Virol.* 72:6406-6413.
137. Popovic, M.M. G. Sarngadharan, E. Read y R. C G allo 1984 Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* 224:497-500.
138. Qureshi, N. M., D. H. Coy, R. F. Garry, y L. A. Henderson. 1990. Characterization of a putative cellular receptor for HIV-1 transmembrane glycoprotein using synthetic peptides. *AIDS.* 4:553-558.
139. Rautonen J., N. Rautonen, N. L. Martin y D. W. Wara. 1994. HIV type 1 tat protein induces immunoglobulin and interleukin 6 synthesis by uninfected peripheral blood mononuclear cells. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 10:781-785.
140. Rerks-Ngarm S, Pitisuttithum P, Nitayaphan S, Kaewkungwal J, Chiu J, Paris R, Prensri N, Namwat C, de Souza M, Adams E, Benenson M, Gurunathan S, Tartaglia J, McNeil JG, Francis DP, Stablein D, Birx DL, Chunsuttiwat S, Khamboonruang C, Thongcharoen P, Robb ML, Michael NL, Kunasol P, Kim JH (2009) Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to Prevent HIV-1 Infection in Thailand. *New England Journal of Medicine* 361:2209-2220. doi:doi:10.1056/NEJMoa0908492
141. Richman DD, Wrin T, Little SJ, Petropoulos CJ. (2003) Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:4144-4149
142. Roos, M. T. L, J. M. A. Langer, R. E. Y. de Goede, R. A. Coutinho, P. T. A. Schellenkens, F. Miedema, y M. Termsette. 1992. Viral phenotype and immune response in primary human immunodeficiency virus type 1 infection *J. Infect. Dis.* 165:427-432
143. Rowland-Jones, S. R. Tan, y A. McMichael. 1997. Role of cellular immunity in protection against HIV infection. *Adv. Immunol.* 65:277.
144. Sakaida H, Hori T, Yonezawa A, Sato A, Isaka Y, Yoshie O, et al. T-tropic HIV-1-derived V3 loop peptides directly bind to CXCR4 and inhibit T-tropic HIV-1 infection. *J Virol.* 1998; 72:9763-70.

145. Sato AI, Balamuth FB, Ugen KE, Williams WV, Weiner DB. 1994. Identification of CD7 glycoprotein as an accessory molecule in HIV-1-mediated syncytium formation and cell-free infection. *J. Immunol* 152:5142-5152.
146. Sawai E. T., A. Baur H, Struble B. M., Peterlin J. A., Levy y C. Cheng-Mayer. 1994. Human immunodeficiency virus type 1 Nef associates with a cellular serine kinase in T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. SCI. Usa* 91:1539-1543.
147. Scarlatti G, Leitner T, Hodara V, Jansson M, Karlsson A, Wahlberg J, Rossi P, Uhlen M, Fenyo EM, Albert J, 1996. Interplay of HIV-1 phenotype and neutralizing antibody response in pathogenesis of AIDS. *Immunol Lett* 51:23-8
148. Schacker, T., S. Little, E. Connick, K. Gebhard, Z.-Q. Zhang, J. Krieger, J.Pryor, D. Havlir , J. K. Wong, R. T. Schooley, D. Richman, L. Corey, y A. T. Haase. 2001. Productive infection of T cells in lymphoid tissues during primary and early human immunodeficiency virus infection. *J. Infect. Dis.* 183:555-562.
149. Schols D., R. Pauwels, J. Desmyter, y E. De Clercq. 1992. Presence of class II histocompatibility DR proteins on the envelope of human immunodeficiency virus demonstrated by FACS analysis. *Virology* 189:374-376.
150. Schroder A. R. W., P. Shinn, H. Chen, C. Berry, J. R. Ecker y F. Buschman. 2002. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* 110:521-529.
151. Schupbach, J., M. Popovic, R. V. Gilden, M. A. Gonda, M. G. Sangadharan, y R.C. Gallo 1984 Serological analysis of a subgroup of human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) associated with AIDS. *Science* 224:503-505.
152. Shearer, G. M. y M. Clerici 1991. Early T-helper cell defects in HIV infection. *AIDS* 5:245-253.
153. Shutt DC, Jenkins LM, Carolan EJ, Stapleton J, Daniels KJ, Kennedy RC y Soll DR.1998.T cell syncytia induced by HIV release T cell chemoattractants: demonstration with a newly developed single cell chemotaxis chamber. *J Cell Sci.* 111 (Pt 1):99-109.
154. Silvestris F, Williams RC, Jr., Dammacco F (1995) Autoreactivity in HIV-1 infection: the role of molecular mimicry. *Clin Immunol Immunopathol* 75:197-205
155. Sodroski, J. G., W. C.,Goh, C. Rosen, A. Dayton, E. Terwilliger, y W. A. Hanseltine 1986 A second posttranscriptional transactivator gene required for HTLV-III replication. *Nature* 321:412-417.
156. Sodroski J, WC Goh, Rosen C, Campbell K y Haseltine wa. 1986. Role of the HTLV-III/LAV envelope in syncytium formation and cytophaticity. *Nature* 322:470-474.
157. Soll DR and Kennedy RC 1994. The role of T cell motility and cytoskeletal reorganization in HIV-induced syncytium formation. *AIDS Res Hum Retroviruses* 10: 325.
158. Starcich BR, Hahn BH, Shaw GM, McNeely PD, Modrow S, Waf H, et al. Identification and characterization of conserved and variable regions in the envelope gene of HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS. *Cell* 1986; 45(5):637-48
159. Sylwester A, Murphy S, Shutt D y Soll DR. 1997.HIV-induced T cell syncytia are self-perpetuating and the primary cause of T cell death in culture. *J Immunol* 158:3996-4007.

160. Tang Y. W., J. A. Levy. 1990. Parameters involved in the cell fusion induced by HIV. *AIDS* 4:409-414.
161. Tateno M., y A. Levy. 1988. MT-4 plaque formation can distinguish cytopathic subtypes of the human immunodeficiency virus (HIV). *Virology* 167:299-301.
162. Tersmette M., R. E. Y. de Goede, J. M. Bert, I. N. Al, R. A. Winkel, H. T. C. Gruters, H. G. Huisman, y F. Miedema. 1988. Differential syncytium-inducing capacity of human immunodeficiency virus isolates: frequent detection of syncytium-inducing isolates in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. *J. Virol.* 62:2026-2032.
163. Thiriart C., J. Goudsmit, P. Schellekens, F. Barin, D. Zagury, M. De Wilde, y C. Bruck. 1988. Antibodies to soluble CD4 in HIV-1 infected individuals. *AIDS* 2:345-351.
164. vonSchwedler U. K., M. Stuchell, B. Muller, D. M. Ward, H. Y. Chung, E. Morita, H.E. Wang, T. Davis, G. P. He, D. M. Cimborra, A. Scott, H.G.Krausslich, J. Kaplan, S. G. Morham, y W. I. Sundquist. 2003. The protein network of HIV budding. *Cell.* 114:701-713.
165. Wei X, Decker JM, Wang S, Hui H, Kappes JC, Wu X, Salazar-Gonzalez JF, Salazar MG, Kilby JM, Saag MS, Komarova NL, Nowak MA, Hahn BH, Kwong PD, Shaw GM.(2003).Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* 422:307-312
166. Weimer R., V. Daniel, R. Zimmermann, K. Schimpf, y G.Opelz. 1991. Autoantibodies against CD4 cells are associated with CD4 helper defects in human immunodeficiency virus-infected patients. *Blood* 77:133-140.
167. Wu L, LaRosa G, Kassam N, Gordon C, Heath H, Ruffing N, et al. Interaction of chemokine receptor CCR5 with its ligands: multiple domains for HIV-1 gp120 binding and a single domain for chemokine binding. *J Exp Med.* 1997; 186:1373-81.
168. Wyma D., J. A. Kotov, y C. Aiken. 2000. Evidence for a stable interaction of gp41 with Pr55(Gag) in immature human immunodeficiency virus type 1 particles. *J. Virol.* 74:9381-9387.
169. Yu X, Yu Y, Liu B, Luo K, Kong W, Mao P, Yu XF. (2003) Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex. *Science*; 302: 1056-60.
170. Zandman-Goddard G, Shoenfeld Y (2002) HIV and autoimmunity. *Autoimmun Rev* 1:329-337.
171. Zhang H, Yang B, Pomerants RJ, Zhang C, Arunachalam SC, Gao L.(2003) The cytidine deaminase CEM15 induces hypoermutation in newly synthesized VIV-1 DNA. *Nature*; 424: 94-8.
172. Zhang Z., T. Schuler M., Zupancic S., Wietgreffe K. A. Staskus, K. A. Reiman, T. A. Reinhart, M. Rogan, W. Cavert, C. J. Miller, R. S. Veazey, D. Notermans, S. Little, S. A. Danner, D. D. Richman, D. Havlir, J. Wong, H. L. Jordan, T. W. Schacker, P. Racz, K. Tenner-Racz, N. L. Letvin, S. Wolinsky, y A. T. Haase. 1999 Sexual transmission and propagation of SIV and HIV in resting and activated CD4(+) T cells. *Science* 286: 1353-1357.

173. Zolla-Pazner S., Mirosław K. Gorny, Kathy Revesz, Constance Williams, Barbara Volsky, Mark K. Louder, Christopher A. Anyangwe, Chavdar Krachmarov, Samuel C. Kayman, Abraham Pinter, Arthur Nadas, Phillippe N. Nyambi, y John R. Mascola. 2004. The V3 loop is accessible on the surface of most human immunodeficiency virus type 1 primary isolates and serves as a neutralization epitope. *J. Virol.* 78:2394-2404.

APÉNDICE A

Este apéndice contiene avances parciales adicionales al cuerpo principal de esta tesis, con base en los objetivos establecidos en el proyecto original, que tiene por nombre: “Identificación de antígenos asociados a la producción de anticuerpos inhibidores de la fusión de membranas inducida por el VIH-1” que se desarrolla en colaboración con el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”.

Una vez que se ha demostrado que el suero de los pacientes VIH+ tienen anticuerpos dirigidos a proteínas de membrana de linfocitos T CD4+, se van a identificar las proteínas a las que se unen, mediante la extracción de proteínas de membrana de la línea celular Jurkat E6 CD4+, con las cuales se realizaron de manera preliminar algunos W.B, como una herramienta para corroborar que las proteínas del extracto pertenecían a proteínas de membrana y que la extracción se realizó adecuadamente.

10.1 Extracción de proteínas de membrana de la línea celular

1. Se tomaron las células cultivadas (500×10^6 células) en un tubo de 50 mL y fueron lavadas con PBS a 4°C 238 g/3min, (todo el procedimiento se realizó en baño de hielo).
2. Se resuspendió el pellet en 2.5 mL de Buffer de Dounce con inhibidor de proteasas y se deja incubar por 10 minutos a 4°C .
3. Se tomó la suspensión de células y se colocaron en el homogenizador de Dounce, previamente incubado en hielo para mantenerlo en 4°C , se le dieron 50 golpes a la suspensión de células.
4. Se restauró la tonicidad con el buffer de tonicidad (0.6M NaCl) más inhibidores de proteasas, se agregaron $0.625\mu\text{L}$ de buffer de tonicidad para obtener una concentración final de 0.15M NaCl.

5. Se transfirió la suspensión a un tubo nuevo de 15mL, se centrifugo a 720g/5min a 4°C y se tomó el sobrenadante y se colocó en un tubo nuevo, descartando el pellet.
6. Se agregó 32µL de EDTA 0.5M, pH 7.6, quedando al final a una concentración de 5mM de EDTA. Todo el contenido del tubo se transfirió a tubos de 10 mL para ultracentrifugación, se centrifugaron 45 min en la ultracentrífuga Beckman rotor T-70 a 10000g/4°C.
7. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en el buffer de lisis (NaCl y Tris-Cl más inhibidor de proteasas) y se agregaron 125 µL de Buffer de Triton X-100 al 5% con inhibidor de proteasas para obtener una concentración final de 0.5% de Triton X-100, se dispersó el material contenido en el tubo.
8. Se incubo a 4°C por 45 min con agitación frecuente para solubilizar las proteínas de membrana.
9. Se centrifugo el tubo por 15 min a 5700g/4°C y se obtuvo el sobrenadante.
10. Se realizaron alícuotas del sobrenadante con un volumen de 200 y 100 µL. Se almacenaron a -70 ° C (revco).

10.2 Determinación de proteínas por Bradford

Para determinar la cantidad de proteína que se obtuvo en cada extracción se realizó la determinación de Bradford a través de un microensayo en microplaca.

1. Se prepararon 8 diluciones del estándar de Albumina con 1.38 mg/mL para la curva patrón.

Concentración de proteína (µg/mL)	Albumina 1.38 [mg/mL]	H ₂ O (mL)
80	173 µL	2.827
	Albumina 80 µg/mL	
64	800 µL	0.200
32	400 µL	0.600
16	200 µL	0.800
8	100 µL	0.900

5	62 µL	0.938
1	12 µL	0.988
0.5	6 µL	0.994
0	-----	1

2. En una placa de 96 pozos se colocaron 200 µL de cada dilución + 48 µL del reactivo de Bradford y cada punto dentro de la curva se realizó por triplicado.
3. Se realizaron dos diluciones de la muestra problema (Alícuotas del Extracto), 1:10 y 1:100.
4. Se determinó la cantidad de proteína en un lector de placas a un absorbancia de 595 nm

Tabla 1. Resultados que muestra la cantidad de proteína que se tiene en el extracto después de la purificación de proteínas de membrana.

Extracto				Promedio	DE	%CV	EEM	Valor de X	FD	Proteína mg/mL
Dilución 1:100	1.12	1.07	1.10	1.099	0.023	2.1	0.013	42.8823529	4288.23529	4.3
Dilución 1:10	1.41	1.51	1.49	1.474	0.053	3.6	0.031	64.9411765	649.411765	0.65

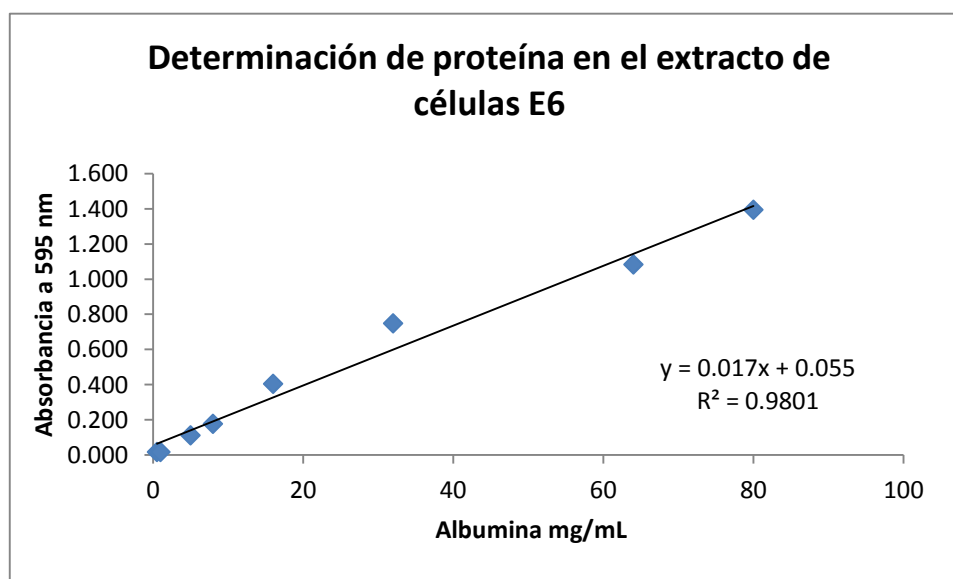


Figura 1. Grafica que se obtuvo por medio de la curva patrón de Albumina en la determinación de proteínas por Bradford. Con esta grafica se obtuvo la cantidad de proteína en el extracto.

10.3 Adsorción de Anticuerpos del suero por medio de Proteína G

Para este procedimiento se empleó un kit de Immunoprecipitation Protocol Using Dynabeads® Protein G (Novex by Life Technologies), por medio de las Dynabeads se adsorbieron los anticuerpos por medio de la interacción de la región Fc con la proteína G que se encuentra acoplada a un magneto (Dynabeads).

1. Se resuspendieron completamente las Dynabeads por pipeteo y posteriormente se transfirieron 50µL de las Dynabeads a un microtubo de 1.5 mL.
 2. Se colocó el tubo en el magneto hasta que la solución quedo completamente transparente, se eliminó el sobrenadante y se retiró el tubo del magneto.
 3. Se realizó una dilución del suero:
- 9 Se tomaron 0.8µL del suero y se colocaron en un tubo con el volumen necesario del Buffer Binding and Washing buffer para obtener un volumen final del 200µL. Esta mezcla se transfirió al tubo que contenía las Dynabeads.
4. Se incubaron con rotación por 10 minutos a temperatura ambiente.
 5. Se colocó el tubo en el magneto, se removió el sobrenadante y se guardó en un tubo como la fracción libre de anticuerpos (FL).
 6. Se removió el tubo del magneto y se resuspendió con 200µL de Wash binding buffer.
 7. Inmunoprecipitación:
- 10 Se colocó nuevamente el tubo en el magneto y se removió el sobrenadante.
- 11 Se agregaron 500µL del extracto de proteínas de membrana y se mezcló por pipeteo.
- 12 Se incubó el tubo por 20 minutos con rotación a temperatura ambiente.
- 13 Se colocó el tubo en el magneto y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo para ser almacenado como la fracción no adsorbida. (FNAd).

- 14 Se lavaron las Dynabeads tres veces con 200µL de Washing buffer, se separó el tubo de magneto entre cada lavado y se removió el sobrenadante.
- 15 Se resuspendieron las Dynabeads en 100µL de washing buffer.
8. Elución de la proteína
- 16 Se eliminó el sobrenadante colocando el tubo en el magneto
- 17 Se agregaron 20 µL de buffer de elución y se incubo con rotación por 2 minutos a temperatura ambiente.
- 18 Se colocó el tubo en el magneto y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo marcado como la Fracción con la interacción de Antígeno-Anticuerpo (FAc-Ag)
- 19 .Se corrieron todas las fracciones obtenidas en este proceso por electroforesis.

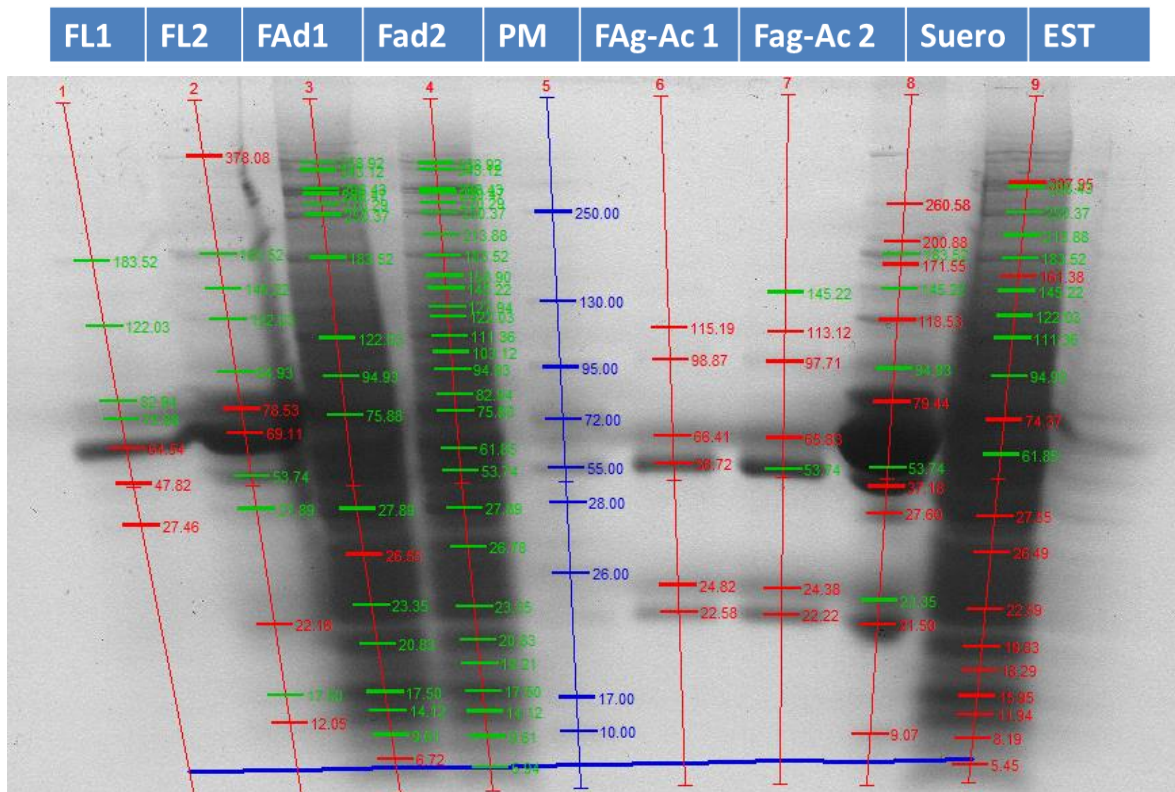


Figura 2. Se corrieron en un gel de electroforesis todas las fracciones obtenidas durante la adsorción de anticuerpos del suero del donador, junto con las fracciones se corrió un marcador de peso molecular (MPM), el suero completo y el extracto. La línea azul corresponde al MPM, las líneas verdes corresponden a las proteínas que se encuentran en todos los extractos, mientras que las líneas rojas hacen referencia a las proteínas que no se encuentran en otras fracciones.

10.4 Electroforesis 1D

Buffer de Electroforesis 1x

- 30.3g Tris-base
- 144g Glicina
- 10g de SDS
- Aforar a 1L con H₂O desionizada
- Almacenado a 4°C

Buffer de carga 2x

- H₂O
- 4% SDS
- 20% Glicerol
- 120mM de Tris-Cl (pH 6.8)
- 0.02% Azul de bromofenol

1. Tratamiento de las muestras para electroforesis

Para asegurar la desnaturalización de las proteínas, para todas las muestras se llevó a cabo un tratamiento previo, el cual consistió en agregar al buffer de carga beta-mercaptoetanol al 5% posteriormente se transfirió el contenido de la muestra a este buffer de carga y se pusieron a hervir por 3 minutos.

2. Cargar las muestras en el gel

Se colocaron 15µL de cada muestra por pozo en el gel, el cual previamente se hidrato en la cámara de electroforesis (Bio-Rad) con el Buffer de electroforesis frio.

3. Corrida del gel

El gel se corrió a 70 volts por 2.5 horas aproximadamente.

4. Tinciones de gel empleadas

Azul de Comassie y Comassie G

Una vez que la corrida termino se saca el gel de la cámara y se coloca en una charola con azul de Comassie para teñir las proteínas obtenidas mediante la separación por peso molecular, se dejó incubar toda la noche a temperatura ambiente y con agitación constante. Posterior a la incubación se retiró el azul Comassie de la charola y se agregó la solución para desteñir el gel, esta solución

consiste de metanol al 40% y Ácido acético al 10%, se incubo por 3 horas a temperatura ambiente con agitación constante. La solución para desteñir fue retirada y se realizaron dos lavados con agua destilada y finalmente el gel fue escaneado.

Sulfato de zinc-imidazol

Reactivos

- Sulfato de zinc 0.2 M
- Imidazol 0.2 M
- Glicina 0.1 M

-Se colocó el gel en un recipiente de plástico, se agregaron 25 mL de imidazol 0.2 M y se incubo por 10 min en agitación a temperatura ambiente.

-Se desechó la solución de imidazol y se colocaron 25 mL de sulfato de zinc 0.2 M, se agitó inmediatamente después hasta que se revelaron todas las proteínas.

-Se desechó la solución de imidazol y se realizaron 3 lavados con agua desionizada para detener el revelado.

-Se escaneo el gel contra un fondo oscuro.

Nitrato de plata

Soluciones:

- -Fijadora 1. Metanol 50%, ácido acético 10%
- -Fijadora 2. Metanol 5%, ácido acético al 1%
- Tiosulfato de sodio. Pesar 0.1g y disolver en 500mL de agua
- Nitrato de Plata: Pesar 0.5g y disolver en 250 mL de agua
- Reveladora. Pesar 12g de carbonato de sodio y disolver en 100 mL de agua, agregar 100 μ L de formaldehido al 37% y 4 mL de la solución de tiosulfato de sodio, una vez disuelto se aforo a 200 mL.

Se colocó el gel en un recipiente de plástico y se incubó toda la noche con la solución fijadora 1, en agitación lenta y temperatura ambiente.

-Se retiró la solución fijadora 1 y se incubó el gel con 50 mL de la solución fijadora 2 por 1 hora a temperatura ambiente.

-Se realizaron 3 lavados de 5 minutos con agua desionizada

-Se incubó con tiosulfato de sodio al 0.02% por 90 segundos, posteriormente se realizaron 3 lavados por 60 segundos con agua.

-Se incubó por 40 minutos en oscuridad en 25 mL de nitrato de plata al 0.2%, después se realizaron 3 lavados de 1 minuto.

-Se reveló el gel con la solución reveladora por 10 minutos, se detuvo la reacción al añadir ácido acético al 10%

-Se realizaron 2 lavados con agua desionizada y se escanó el gel.

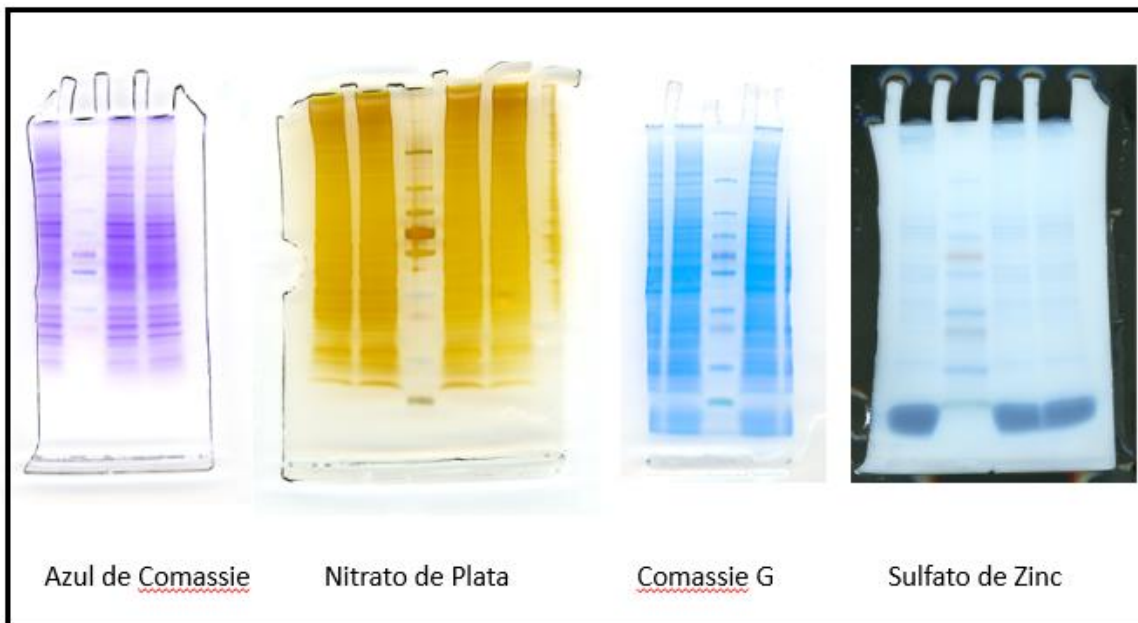


Figura 3. Gel que muestra el perfil de proteínas dentro del extracto obtenido de la purificación de proteínas de membrana con las diferentes tinciones empleadas para optar por aquella con mayor sensibilidad.

10.5 Western Blot

Soluciones:

- Buffer de electroforesis
- Buffer de transferencia con Metanol
- Buffer de bloqueo
- Buffer de bloqueo con blotton
- CPTS
- Solución KCl/NaOH
- Diaminobencidina

1. Electroforesis

Se realizó la electroforesis como se indica anteriormente para el extracto de proteínas de membrana pero en esta ocasión en este caso no se realizó ninguna tinción puesto que el gel obtenido se empleara en la cámara de transferencia.

2. Transferencia

Se incubaron por 10 minutos el gel obtenido de la electroforesis, la membrana de nitrocelulosa, en el buffer de transferencia.

Se realizó el sándwich para la transferencia en el siguiente orden:

Se colocó en la cámara de transferencia y se corrió por 1:15 hr a 100 vlts, con agitación constante a 4°C.

Se retiró la membrana de la cámara y se realizó una tinción con CPTS:

-Sensibilizar la membrana con la solución KCl/NaOH, retirar la solución y agregar el CPTS por unos segundos, retirarlo y enjuagar con agua desionizada.

-Verificar que la transferencia se realizara correctamente y desteñir la membrana con la solución KCl/NaOH.

3. Incubación

-Se cortó la membrana en 6 tiras de acuerdo a cada pozo, las cuales se incubaron toda la noche con Buffer de bloqueo a 4°C, con agitación constante en oscuridad.

-Se probaron 3 diluciones con el anticuerpo anti-ICAM-1 (Thermo®), tres diluciones con anticuerpo anti-CD4 (Thermo®) y 3 diluciones anti-CXCR4 (abcam®) con el buffer de bloqueo con blotton

-Se retiró el buffer de bloqueo con blotton y se colocaron las diferentes diluciones de los anticuerpos y se dejaron incubar por 5 hrs a temperatura ambiente y agitación constante en oscuridad.

-Se realizaron 5 lavados de 10 minutos en agitación constante con buffer de bloqueo.

-Se realizó una dilución 1:10000 del anticuerpo secundario acoplado a la enzima peroxidasa y se colocaron 2mL de esta dilución en cada una de las tiras. Las tiras se incubaron por una hora con en oscuridad y agitación constante.

-Se retiró el anticuerpo secundario y se realizaron 5 lavados con agua desionizada.

4. Revelado

-Se toman 19.990 mL de diaminobencidina y se agregan 10µL del H₂O₂.

-Se colocaron 2mL de esta solución en cada una de las tiras, se incubaron 10 minutos en la oscuridad en agitación constante.

-Se realizan 3 lavados con agua desionizada. Se secaron toda la noche en oscuridad.

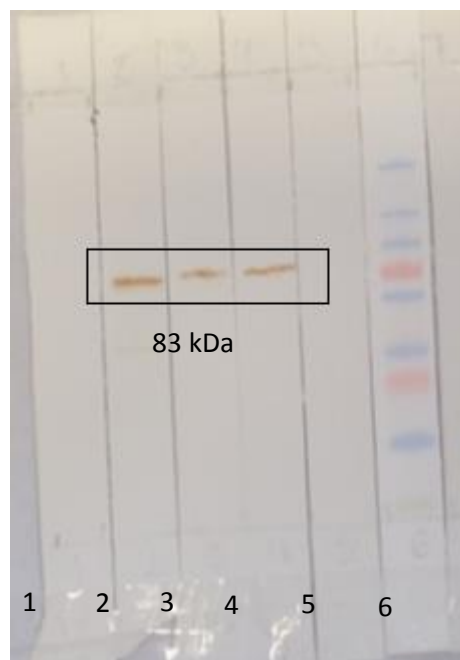


Figura 4. Imagen de la membrana de nitrocelulosa, donde se observa el resultado obtenido para el WB del anticuerpo anti-CXCR4. 1) control negativo solo tenía H₂O, 2) dilución de anti-CXCR4 1:250,

3) dilución de anti-CXCR4 1:1000, 4) dilución de anti-CXCR4 1:2000, 5) control del anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa para descartar un falso positivo y 6) marcador de peso molecular.

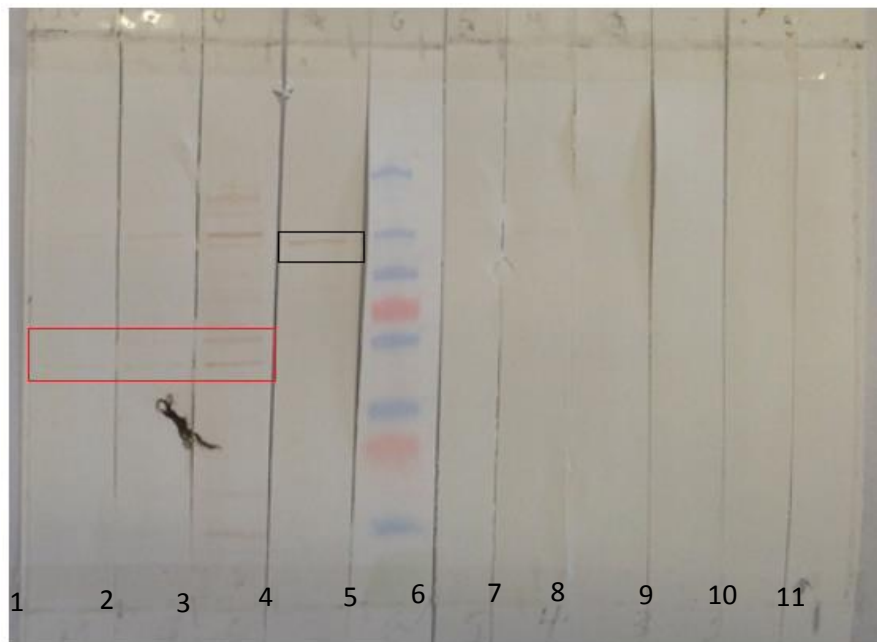


Figura 4. Imagen de la membrana de nitrocelulosa, donde se observa el resultado obtenido para el WB del anticuerpo anti-CD4 y anti-ICAM-1. 1) Dilución de anti-CD4 1:1000, 2) dilución de anti-CD4 1:500, 3) dilución de anti-CD4 1:170. Por parte del anticuerpo anti-ICAM-1, se muestran 4) dilución de anti-ICAM-1 1:500, 5) marcador de peso molecular 6) dilución anti-ICAM-1 1:3000, 7) dilución anti-ICAM-1 1:1500, 8) y 9) dilución del anticuerpo secundario 1:10000, 10) y 11) controles negativos solo tenían agua.

Apéndice B
Publicaciones

FRET in the Analysis of In Vitro Cell–Cell Fusion by Flow Cytometry

Guillermo Gómez-Icazbalceta, Mirna Berenice Ruiz-Rivera, Edmundo Lamoyi, and Leonor Huerta

Abstract

Cell–cell fusion is a frequent event in nature leading to modification of cell fate. In this chapter, we describe a flow cytometric procedure for the quantitative assessment of in vitro cell–cell fusion events that allows the discrimination of fused from aggregated cells. The assay is based on the differential labeling of fusion partners with lipophilic fluorescent probes DiI (red) and DiO (green). Double fluorescent fused cells can be detected after coculturing by means of a flow cytometer equipped with a 488 nm laser. Fusion events can be distinguished from cell aggregates by the enhancement of the DiI red fluorescence intensity due to resonance energy transfer between the two probes occurring in the fused but not in the aggregated cell population.

Key words Cell–cell fusion, Cell aggregates, FRET, Flow cytometry, HIV, Syncytia, DiI, DiO, Multinucleated cells, gp120, gp41

1 Introduction

Cell–cell fusion is mediated by specialized proteins that are able to overcome the electrostatic repulsion between cell membranes and induce local membrane disturbances, leading to the formation and expansion of fusion pores [1]. In addition to fusion proteins, cell–cell fusion can be induced by polyethylene glycol [2] or electric pulses [3]. Close contact between cell membranes is a prerequisite for cell–cell fusion, with adhesion molecules playing a role to enhance fusion. The quantitation and characterization of individual fusion events in cocultures of cells expressing the appropriate fusion molecules and receptors is important for the analysis of the biochemical and microenvironmental factors influencing fusion.

This chapter provides a detailed description of a procedure for the analysis of cell–cell fusion events in cocultures of cells expressing fusion-inducing molecules (effector) with cells bearing the appropriate receptors (target). For the assay, fusion partners are

single-labeled with the DiI and DiO lipophilic fluorescent probes. DiI and DiO are carbocyanines containing fully saturated C_{18} tails and a fluorescent polar head and, therefore, they stably insert in cellular membranes.

Several features of these dyes make them suitable for the quantitation of cell fusion by flow cytometry. DiI and DiO show red and green emissions respectively, when excited with a standard flow cytometry 488 nm laser. The emission wavelengths of DiI and DiO are optimally detected by the same photomultipliers that are used for the FITC and PE fluorochromes and thus, fused cells appear as double fluorescent particles. *Bona fide* fused cells can be differentiated from cell aggregates by the fluorescence resonance energy transfer (FRET) from DiO to DiI; fused cells but not cell aggregates, show an enhanced DiI red fluorescence intensity in comparison with single-colored red cells [4]. In addition, the labeling procedure of lymphoid cells with DiI and DiO is fast and easy to perform.

FRET between the DiI and DiO lipid probes has been demonstrated at the biophysical level in artificial [5] and cellular membranes [6]. FRET between the two dyes in fused cells can be detected by flow cytometry because: (a) the emission spectrum of DiO (energy donor) substantially overlaps the excitation spectrum of DiI (energy acceptor) (Fig. 1), (b) the carbon tails of both dyes are identical, so they can colocalize in the same membrane microdomains after membrane fusion [6], favoring close proximity of

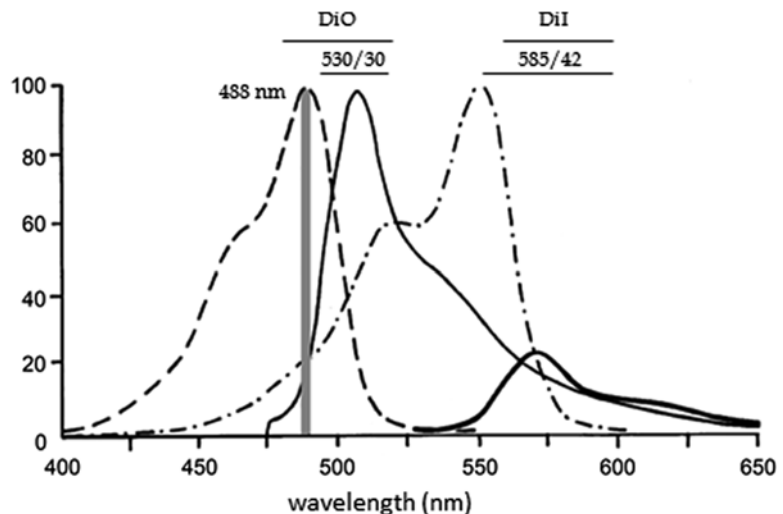


Fig. 1 DiO and DiI excitation (*dotted lines*) and emission (*continuous lines*) spectra. DiO is optimally excited with the 488 nm laser, whereas DiI is excited at low level. The emission of DiO extensively overlaps the excitation spectrum of DiI allowing FRET. Emission of both fluorochromes can be detected using the 530 and 574 nm filters (Modified from Becton Dickinson Biosciences website: <http://www.bd.com>)

their polar heads and the appropriate dipole alignment, two conditions that are necessary for FRET, and (c) the 488 nm laser optimally excites DiO (98 %), whereas it excites DiI at a low level (20 %) (Fig. 1), so allowing detection of the enhancement of the DiI red fluorescence in fused cells resulting from FRET.

This chapter describes details of the application of the FRET-flow cytometry assay for detection and quantification of fusion between Jurkat lymphoid cells stably transfected with a plasmid bearing the *env* gene from a fusogenic strain of the HIV-1 virus (Jurkat Env⁺), with untransfected CD4⁺ Jurkat cells. The assay has been also used for the analysis of the fusion between Jurkat Env⁺ cells with THP-1 monocytic cells [7], and HeLa CD4⁺ with CHO Env⁺ cells [8].

2 Materials

2.1 Cell Culture Reagents and Equipment

1. Sterile-filtered dimethylsulfoxide.
2. RPMI-10: RPMI culture medium supplemented with 10 % fetal bovine serum, 50 µg/mL penicillin, and 50 µg/mL streptomycin.
3. Sterile 1.5 mL Eppendorf tubes.
4. Sterile 15 mL conical centrifuge tubes.
5. 96- or 48-well culture plates.
6. Neubauer chamber.
7. Ultrasonic bath.
8. Refrigerated centrifuge Eppendorf 5804R or equivalent with a swinging bucket rotor and adapters for 15 mL conical and FACS tubes.
9. Inverted microscope.

2.2 Cell Lines

1. Target cells: Jurkat E6 cells, a human CD4⁺ cell line (ATCC TIB-152).
2. Effector cells: Jurkat HXBc2(4), a subclone derived from E6 cells expressing the HIV-1-envelope (Env⁺ cells) [9].

2.3 Lipophilic Dyes and Solutions

Store dyes at room temperature and protected from light. Carry out the preparation of stock and working dyes solutions under sterile conditions.

1. DiI dye (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate, Molecular Probes, Eugene, OR) Ex/Em: 549/565.
2. DiO (3,3'-dioctadecyloxycarbocyanine perchlorate, Molecular Probes, Eugene, OR). Ex/Em: 484/501.

3. Prepare stock solutions by dissolving 3.5 mg of DiI or DiO in 1 mL of DMSO in an Eppendorf tube. Sonicate briefly until solutions are transparent. The DiI solution should be intensely red whereas DiO solution should be yellow. Stocks are stored at room temperature, protected from light. The DiI stock can last up to 6 months. DiO is less stable and stock solution should be prepared every 1–2 months.
4. Working solutions are prepared by diluting DiI and DiO stocks 1:10 in DMSO. Five hundred microliters of working solutions are enough for many experiments. Keep them at room temperature protected from light.

2.4 FACS Analysis

1. Phosphate buffered saline solution pH 7.6 (PBS).
2. FACS flow buffer.
3. Round bottom or other appropriate FACS tubes.
4. Flow Cytometer equipped with an Argon 488 nm laser and 530/30 and 574/26 emission photomultipliers (this configuration is standard in most equipments).
5. Flow cytometry analysis software (e.g., CellQuest).

2.5 Fixative

1. 4 % paraformaldehyde stock solution in PBS.

3 Methods

Perform cell labeling and coculturing under sterile conditions.

3.1 Cell Labeling

1. Label cells the day before fusion experiments (*see* **Notes 1** and **2**). Reserve a culture of unlabeled cells as they will serve as a reference for determination of the fluorescence intensity of labeled cells.
2. Place $5\text{--}15 \times 10^6$ target or effector cells in 1 mL of complete medium (RPMI-10) in a 15 mL centrifuge tube.
3. Label cells by adding an appropriate amount of DiO or DiI working solutions and immediately shake the tubes slightly by hand to mix the dye in the cell suspension. Usually, 4–8 μL of DiI and 8–15 μL of DiO are enough for cell labeling. It should be noted that other cells types might require different amount of dyes in order to be properly labeled. So, before performing fusion experiments, it is necessary to determine the optimal amount of dye for labeling cells in order to obtain an adequate level of fluorescence for fusion experiments (*see* **Note 3**).
4. Protect cells from light and incubate at room temperature for 15 min with gently shaking. To obtain uniform labeling, cells should be kept always in suspension.

5. Immediately after the previous step, add 10 mL of room temperature RPMI-10 to the tubes in order to dilute the dye and centrifuge at $238 \times g$ for 3 min. Discard the supernatant.
6. Wash again with 10 mL of RPMI-10, resuspending the cells with a 10 mL pipette. Centrifuge at $238 \times g$ for 3 min and discard the supernatant.
7. Resuspend the cells in the same medium and transfer them to culture T-25 or T-75 flasks (depending of the number of cells labeled) at a density of 7×10^5 cells/mL. Incubate overnight at 37°C , with 5 % CO_2 .

3.2 Coculture

1. Coculture the DiI- and DiO-labeled cells at 1:1 ratio in 96- or 48-multiwell plates at high cell density to promote fusion. For fusion of Env^+ cells and CD4^+ Jurkat cells, 2×10^5 cells of each type in a final volume of 200 μL in 96-multiwell plates allow sufficient contacts to yield about 8 % of fused cells after 8 h of coculture. Other cell lines may require longer incubation times or higher cell densities in order to obtain fusion (*see Note 4*).
2. If available, add a proper concentration of a specific fusion inhibitor to a set of wells. Add the fusion inhibitor to the wells containing the cells expected to bind it and then add the fusion partner (*see Note 5*).
3. Reserve unlabeled, and single DiO- and DiI-labeled cells in separated wells to use them as controls for adjusting FACS settings (*see Note 6*).
4. Set the plate in the CO_2 incubator for the necessary time to obtain fusion. Observe the formation of syncytia using an inverted microscope.

3.3 Preparation of Cells for FACS Analysis

1. Fresh cells can be analyzed immediately after fusion. If necessary (e.g., biohazardous samples) cells can be fixed in 2 % paraformaldehyde-PBS solution and analyzed within 4–6 h (*see Subheading 3.4 and Note 7*).
2. For analysis of fresh cells prepare a FACS tube containing 1 mL of PBS per well in the plate. Include one tube for unlabeled cells and one for each of single DiI- and DiO-labeled cells that were not cocultured.
3. Gently resuspend cells in wells and transfer them to the corresponding tube using a 200 μL or 1 mL pipet tip.
4. Centrifuge the tubes at $238 \times g$ for 3 min and discard supernatant.
5. Resuspend the cells in 0.4 mL of FACS flow buffer.
6. Place tubes on ice and analyze by flow cytometry immediately (*see Note 8*).

3.4 PFA Fixation (Optional)

1. Collect and wash cells as described above (Subheading 3.3, steps 2–4).
2. Resuspend them in 200 μ L of PBS and add an equal volume of 4 % PFA, to achieve a final PFA concentration of 2 %.
3. Incubate 15 min on ice. Gently, resuspend cells with a 200 μ L pipet tip at 5 min intervals to minimize cell aggregation.
4. Centrifuge tubes and discard supernatant.
5. Resuspend the pellet in 0.4 mL FACS flow buffer and keep on ice.
6. Analyze by flow cytometry within 4–6 h.

3.5 FACS Analysis

1. Use the non-labeled cell suspension as a reference to adjust cytometer settings. Gently resuspend the cells with a 200 μ L pipet tip to dissociate cellular aggregates just before placing each FACS tube in the sample injection port (SIP). Install the sample tube in the SIP and construct forward scatter (FSC) vs. side scatter (SSC), and green fluorescence intensity (FL1) vs. red fluorescence intensity (FL2) dot plots.
2. Run and adjust voltage and gain of the photomultipliers (PMT) of the FSC and SSC detectors to visualize cells in the lower left corner of the plot. Run cells at ≤ 100 events/s. Stop the run and define a region one (R1) to delimitate the main cell population, excluding cell debris and dead cells (Fig. 2a). Positioning of the cell population in the lower left corner will leave enough area in the plot for the visualization of syncytia, which are expected to have greater granularity (SSC) and size (FSC) than non-fused cells.
3. Construct a FL1 vs. FL2 dot plot and plot cells in the R1 region only. Run and adjust the voltage and gain of the FL1 and FL2 PMT to visualize cells at the lower left corner (Fig. 2b).
4. Run the green-only cells and adjust the voltage to set them in the lower right quadrant (Fig. 2c). Next, set up the red-only cells and compensate to set them in the upper left quadrant (Fig. 2d).
5. Analyze the cocultured cells (Fig. 3). Single and double fluorescent cells populations should be clearly distinguished. Draw quadrants to show that the fluorescence of the red and green populations have been properly separated. Draw squares to delimitate the double fluorescent cell populations as shown in Fig. 3. Fused cells (R2) show an enhanced red fluorescence relative to that of the single-red fluorescent cells (Fig. 3a, upper right quadrant). Aggregated cells (R3) must show approximately the same mean red fluorescence intensity than the single-red fluorescent cells. If a fusion inhibitor has been included, only the percentage of FRET-positive cells will be reduced as

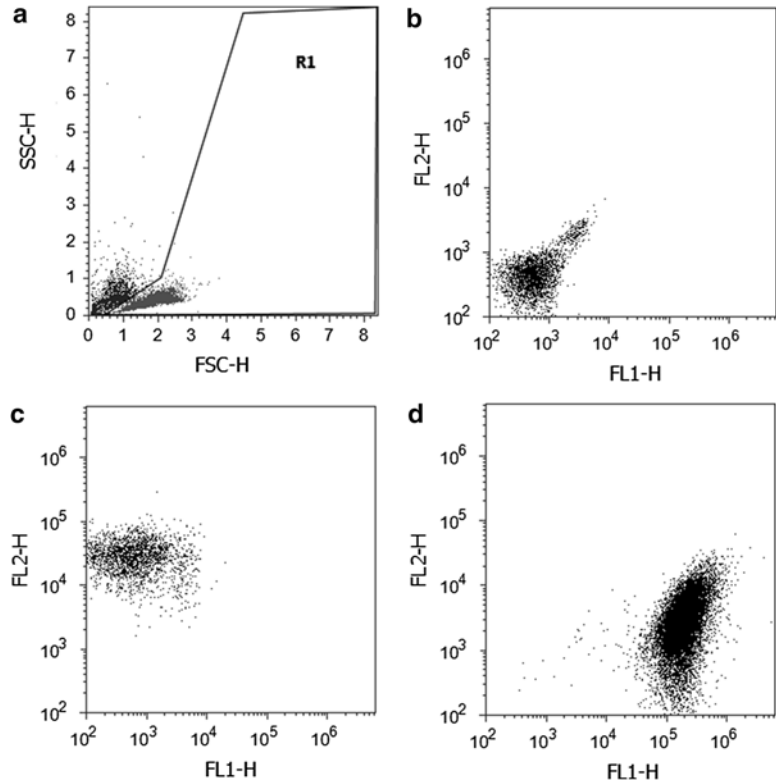


Fig. 2 Dot plots of control non-labeled and single-labeled CD4⁺ and Env⁺ Jurkat cells used for adjustment of instrument settings. **(a)** FSC-H vs. SSC-H dot plot showing a gate excluding cell debris (R1). **(b–d)** FL-1 (green fluorescence) vs. FL-2 (red fluorescence) dot plots of non-labeled cells, single-red CD4⁺ and single-green Env⁺ cells. Cells were analyzed on the Attune acoustic focusing cytometer using the Attune Cytometric Software (PC) (Applied Biosystems, Life Technologies)

shown in Fig. 3b, where cells have been cocultured in the presence of the T-20 peptide, a molecule that specifically inhibits the HIV-envelope mediated-membrane fusion [4, 10]. The same pattern can be observed in PFA-fixed cells (Fig. 3c, d) (*see Note 9*).

6. Quantitate the percentage and the mean fluorescence intensity of cells in the R2 and R3 regions. Compare the red fluorescence intensity of the double fluorescent populations with that of the single-red fluorescent cells. Approximately a 1-log difference should be observed between the fused cell population and that of single red-fluorescent cells, and between fused and aggregated cells (Fig. 3a, c) (*see Note 10*).
7. An example of the instrument settings used for analysis of fresh Jurkat cells cocultures is shown in Table 1.

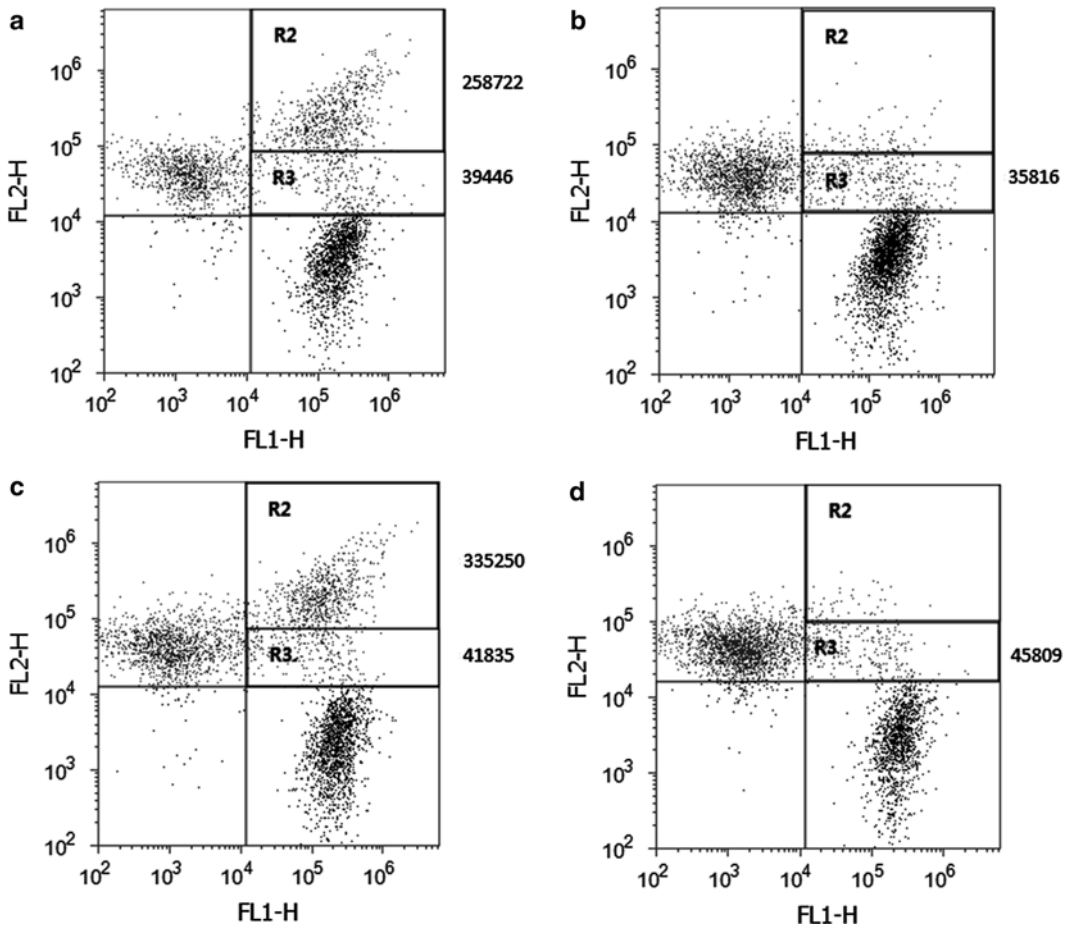


Fig. 3 Analysis of cell–cell fusion in 8-h cocultures of CD4⁺ and Env⁺ Jurkat cells. **(a)** Double-fluorescent fused and aggregated cells are located in the R2 and R3 regions, respectively. Note the enhancement of the Dil-red fluorescence in the fused population relative to that of non-fused red cells. **(b)** Inhibition of the fused cell population, but not of aggregated cells by the fusion inhibitor T-20. **(c-** and **d)** Comparable levels of fused and aggregated cells are observed after fixation with 2 % PFA. Numbers correspond to the mean fluorescence intensity of R2 and R3 regions

Table 1
Instrument settings used for the analysis of a representative experiment of cell–cell fusion (Attune system)

Parameter	Voltage (mV)
FSC	1,600
SSC	2,100
FL1	1,900
FL2	1,850
	Compensation
FL1-FL2	-6.00
FL2-FL1	-20.57

4 Notes

1. In our experience, Jurkat, THP-1, HeLa, and CHO cells are optimally labeled the day before fusion experiments [4, 7, 8]. Next day, dyes can be visualized in intracellular vesicles [11]. Internalization helps to prevent nonspecific transfer of dyes between cells [12]. For other cell types, the length of time between labeling and fusion must be empirically determined.
2. Cell labeling is stable enough to allow the analysis of cell–cell fusion several days after labeling (usually 2–3 days) even in proliferating cells [13].
3. Different cell types may require distinct concentrations of the lipophilic dyes in order to be properly labeled for flow cytometry analysis. Before performing fusion experiments, determine the labeling conditions to obtain an optimal separation between the fluorescence of the fusion partners, and the levels of FRET that allow the distinction of fused cells and aggregates. To obtain an optimal separation between fused and aggregated cells, the DiO fluorescence intensity should be greater than that of DiI, as shown in Fig. 2, where DiI-cells and DiO-cells show 2-log and 3-log higher fluorescence intensity, respectively, than unlabeled cells. The intensity of cellular fluorescence can be adjusted by increasing or decreasing the amount of the dye's working solutions used for labeling.
4. For cell lines requiring longer incubation times or higher cell densities to obtain fusion, multi-well plates with greater capacity should be used to avoid medium consumption. For overnight incubation, 0.4×10^6 cells of each cell type in a final volume of 800 μL can be used in 48-well plates. Fresh medium can be added to the wells as required. Spent medium can be replaced by carefully removing a half of volume from wells and adding fresh medium.
5. Nonspecific transfer of membrane lipids between cultured cells has been determined by the use of lipophilic dyes [10]. Thus, it is important to include a specific fusion inhibitor as an internal control in each fusion experiment. Alternatively, other appropriate controls such as coculture of target cells with cells lacking the fusion molecules or harboring fusion defective molecules can also be used.
6. To standardize instrument settings and for delineating regions corresponding to fused and unfused cell populations, unlabeled and single-labeled cells should be used as controls for each fusion experiment and for each day in a given experiment. These control non-cocultured cells should be maintained in parallel wells. In 2- or 3-day fusion experiments, minor adjustments of settings with respect to those of the first day may be

needed for the analysis, because of a slight but detectable loss of fluorescence intensity.

7. Fixation may be necessary for the analysis of biohazardous samples (e.g., cells infected with virus). The DiI and DiO fluorescence intensity and FRET in fused cells are preserved after treatment with 2 % paraformaldehyde, allowing the analysis of fusion experiments several hours after collecting cells from wells. However, the fluorescence of the DiI and DiO fluorochromes is greatly diminished after overnight storage (4 °C) of fixed cells, so it is necessary to analyze fusion experiments in the same day. It is important to subject the control cells (non-labeled and single-labeled red and green cells) to the same fixation procedure, and use them to establish the flow cytometer settings. We have noticed that fixation decreases the number of fused cells detected and increases the percentage of aggregated cells (Table 2). However, the difference between the percentage of fusion obtained with fresh and fixed cells is consistent and not greater than 10 % (Table 2).
8. Analysis of the cell fusion by flow cytometry implies that the cells must be subjected to centrifugation to remove the culture medium and then to a flow of liquid during analysis, so large syncytia may be damaged. In our experience, fused cells up to 30 μm can be analyzed properly. In a system in which the fusion is very efficient, one alternative is to reduce the time of coculture to limit the size of syncytia.
9. For successful detection and quantitation of fusion, cell aggregation should be minimized. This is achieved by gently pipetting the cells suspensions just before FACS analysis and by keeping a low cell density (up to 1×10^6 cells/mL).
10. Additional characterization of the fused cells (e.g., expression of surface molecules) can be achieved by the use of antibodies and other reagents labeled with third party fluorochromes [13, 14].

Table 2
Percentages of fusion obtained in parallel-run fresh and PFA-fixed cocultures

Fresh				PFA-fixed		
Replicates	Fused	+T20	Aggregates	Fused	+T20	Aggregates
1	7.4	0.8	2.5	7.1	1.28	3.6
2	7.2	0.78	2.7	6.9	0.95	3.05
3	8.2	0.45	2.21	6.8	0.76	2.87
Mean \pm SEM	7.6 \pm 0.4	0.68 \pm 0.15	2.47 \pm 0.17	6.9 \pm 0.11	0.99 \pm 0.19	3.17 \pm 0.28

Data from triplicates, means and standard error of the mean are shown

Acknowledgements

Jurkat-HXBc2(4) cells were obtained from Dr. Joseph Sodroski through the AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH. This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) of Mexico, (grant CB-2010/152946) and Universidad Nacional Autónoma de México, Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, Dirección General de Asuntos del Personal Académico (grant IA200414). G.G.I. is supported by a postdoctoral fellowship from CONACYT.

References

1. Richard JP, Leikina E, Langen R et al (2011) Intracellular curvature-generating proteins in cell-to-cell fusion. *Biochem J* 440:185–193
2. Pontecorvo G (1975) Production of mammalian somatic cell hybrids by means of polyethylene glycol treatment. *Somatic Cell Genet* 1:397–400
3. Blangero C, Teissie J (1985) Ionic modulation of electrically induced fusion of mammalian cells. *J Membr Biol* 86:247–253
4. Huerta L, Lopez-Balderas N, Larralde C et al (2006) Discriminating in vitro cell fusion from cell aggregation by flow cytometry combined with fluorescence resonance energy transfer. *J Virol Methods* 138:17–23
5. Buboltz JT (2007) Steady-state probe-partitioning fluorescence resonance energy transfer: a simple and robust tool for the study of membrane phase behavior. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 76:021903
6. Sengupta P, Holowka D, Baird B (2007) Fluorescence resonance energy transfer between lipid probes detects nanoscopic heterogeneity in the plasma membrane of live cells. *Biophys J* 92:3564–3574
7. Rivera-Toledo E, Huerta L, Lamoyi E et al (2011) Quantitative and phenotypic analyses of lymphocyte-monocyte heterokaryons induced by the HIV envelope proteins: significant loss of lymphoid markers. *Exp Mol Pathol* 90:157–166
8. Huerta L, Lamoyi E, Báez A et al (2002) Human immunodeficiency virus envelope-dependent cell-cell fusion: a quantitative fluorescence cytometric assay. *Cytometry* 47:100–106
9. Cao J, Park IW, Cooper A et al (1996) Molecular determinants of acute single-cell lysis by human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 70:1340–1354
10. Kilby JM, Hopkins S, Venetta TM et al (1998) Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nat Med* 4:1302–1307
11. Lopez-Balderas N, Huerta L, Villarreal C et al (2007) In vitro cell fusion between CD4(+) and HIV-1 Env(+) T cells generates a diversity of syncytia varying in total number, size and cellular content. *Virus Res* 123:138–146
12. Niu X, Gupta K, Yang JT et al (2009) Physical transfer of membrane and cytoplasmic components as a general mechanism of cell-cell communication. *J Cell Sci* 122:600–610
13. Torres-Castro I, Cortes-Rubio CN, Sandoval G et al (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 Anim* 50:453–463
14. Rivera-Toledo E, López-Balderas N, Huerta L et al (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