



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Posgrado en Ciencias Biomédicas
Instituto de investigaciones Biomédicas
Departamento de Inmunología

Fusión monocito-linfocito inducida por el virus de
inmunodeficiencia humana tipo 1: características fenotípicas y
funcionales

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS

PRESENTA:
DAVID MARTÍNEZ MÉNDEZ

DIRECTORA DE TESIS:
Dra. Leonor Huerta Hernández
Instituto de Investigaciones Biomédicas

COMITÉ TUTOR
Dr. Héctor Enrique Espinosa Arciniega
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
Dr. Enrique Ortega Soto
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Ciudad Universitaria, Cd. Mx. Octubre 2018



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.

ÍNDICE

Resumen.	1
Introducción	
Fusión celular.	5
Estructura del VIH-1	7
Ciclo de replicativo.	8
Estructura del complejo Env.	10
Mecanismo de fusión de membranas	12
Células susceptibles a la infección por VIH.	14
Fusión célula-célula.....	15
Antecedentes del estudio de la fusión celular <i>in vitro</i> por citometría de flujo.	18
Formación de heterocariones por células monocíticas y linfocíticas.	20
Planteamiento del problema, pregunta y objetivos	24
Materiales y métodos	
Cultivo celular.....	25
Ensayo de fusión célula-célula.....	26
Inhibidor de fusión T-20, inmunofenotipificación y ensayo de fagocitosis.....	27
Microscopía de fluorescencia, Activación de PMA e Inhibición de señalización de TLR.....	29
Análisis estadístico.....	30
Resultados	
Análisis por citometría de flujo de la formación de heterocariones.....	31
Análisis de inmunofenotipificación.....	33
Actividad fagocítica.....	36
Análisis de la morfología de los heterocariones.....	38
Expresión de ICAM-1 en respuesta a la estimulación de PMA.....	41
Expresión de CD11b.....	44
Fusión entre células THP-1 y linfocitos T CD4 ⁺ primarios inducida por partículas virales.....	47
Discusión de resultados y conclusiones.....	50
Referencias.....	56
Artículos publicados.....	69

Agradecimientos

-Las células Jurkat HXBc2 (4) y 522F / Y (J. Sodroski) se obtuvieron a través del Programa de Reactivos de Referencia e Investigación del SIDA (AIDSRRRP), NIAD, NIH.

-David Martínez Méndez es candidato a doctorado del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y recibió la beca 364399 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT).

-Este trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (número de subvención CB2014 / 238931) y el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la Universidad Nacional Autónoma de México (proyecto número IN211716).

-Agradezco a la Dra. Claudia Garay Canales por sus útiles observaciones a los procedimientos experimentales.

-Agradezco a la Dra. Leonor Huerta Hernández por su excelente papel como tutora y a los miembros de mi comité tutorial, Dr. Héctor Enrique Espinosa Arciniega y al Dr. Enrique Ortega Soto por sus excelentes críticas al proyecto y sus recomendaciones.

-Agradezco al Comité Académico del Doctorado en Ciencias Biomédicas por el apoyo que nos brinda a los estudiantes del programa.

- Agradezco al Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo (LabNaCit) por el apoyo técnico en la adquisición de muestras por citometría de flujo.

- Este trabajo fue apoyado por el proyecto PAPIIT IN211716

Resumen

El virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) induce la fusión de células que expresan sobre su superficie la molécula CD4 y un correceptor de la familia de los receptores para quimiocinas. La fusión célula-célula tiene lugar cuando las proteínas de fusión del virus (complejo Env) se expresan en la membrana de células infectadas y entran en contacto con células blanco, o bien cuando partículas virales extracelulares entran en contacto y se fusionan simultáneamente con células adyacentes no infectadas. Los linfocitos T CD4⁺ y las células del linaje monocito-macrófago expresan los receptores para las proteínas del complejo Env, lo que les confiere la capacidad de interactuar con células Env⁺ o partículas virales libres, fusionarse con células adyacentes y generar células multinucleadas denominadas policariones.

La presencia de virus inductores de sincicios de linfocitos T en pacientes infectados ha sido correlacionada con progresión a SIDA. Por otra parte, se ha reportado la presencia de policariones con posible origen mielóide en el sistema nervioso central y en ganglios linfáticos de pacientes infectados por el VIH-1.

En este trabajo se reportan evidencias de la fusión célula-célula *in vitro*, entre linfocitos y monocitos inducida por las proteínas gp120 y gp41 virales expresadas en la membrana de células Jurkat así como por virus de la cepa IIIb del VIH-1. También se muestran algunas de las características fenotípicas y funcionales de los policariones.

A través de un método de tinción diferencial con colorantes lipofílicos fluorescentes y análisis por citometría de flujo, encontramos que la fusión entre células monocíticas THP-1 y linfocíticas Jurkat CD4⁺ lleva a la formación de heterocariones con un fenotipo estable predominantemente mielóide, actividad fagocítica y características similares a las de monocitos activados. La activación no se observó en cocultivos de células THP-1 y células Jurkat Env⁺ en presencia de un inhibidor específico de la fusión, mostrando que la activación no fue inducida por el mero contacto entre las células, sino que requirió la fusión entre ellas. Adicionalmente, la activación no se manifestó en presencia del

inhibidor TIRAP señuelo, específico de la señalización mediada por TLR4 y TLR2, por lo que se propone que es debida a la interacción de Env con receptores TLR4 ó TLR4 intracelulares.

La fusión en cocultivos de células THP-1 con linfocitos T CD4⁺ purificados de la sangre de donadores también se observó a 24 y 48 horas después de la adición de partículas infecciosas. Observamos evidencias de que la fusión inducida por el virus puede ocurrir de dos formas, conocidas como fusión “desde adentro” (inducida por la expresión de Env en las células infectadas) y “fusión desde afuera” (inducida por virus extracelular después del contacto con células adyacentes).

Nuestros resultados sugieren que la fusión entre monocitos y linfocitos podría ocurrir en pacientes infectados con el VIH-1, llevando a la formación de heterocariones con un fenotipo de monocito activado, los cuales podrían contribuir al ambiente inflamatorio crónico característico de la infección.

Abstract

The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) induces the fusion of cells expressing on its surface the CD4 molecule and a co-receptor of the family of chemokine receptors. Cell-cell fusion occurs when virus fusion proteins (Env complex) are expressed on the membrane of infected cells and come in contact with target cells, or when extracellular viral particles come into contact and fuse simultaneously with non -infected adjacent cells. CD4⁺ T lymphocytes and cells of the monocyte-macrophage lineage express the receptors for Env complex proteins, which gives them the ability to interact with Env⁺ cells or free viral particles, fuse with adjacent cells and generate multinucleated cells called polycarions.

The presence of T-lymphocyte-inducing viruses in infected patients has been correlated with progression to AIDS. On the other hand, the presence of polycarions with possible myeloid origin in the central nervous system and lymph nodes of patients infected with HIV-1 has been reported.

In this work, we report evidences of cell-cell fusion *in vitro*, between lymphocytes and monocytes induced by gp120 and viral gp41 proteins expressed in the membrane of Jurkat cells as well as by virus of the IIIb Strain of HIV- 1. This also shows some of the phenotypic and functional characteristics of polycarions.

Through a method of differential staining with fluorescent lipophilic dyes and analysis by flow cytometry, we found that the fusion between monocytic cells THP-1 and lymphocytes Jurkat CD4⁺ leads to the formation of heterokaryons with a stable predominantly myeloid phenotype, phagocytic activity and characteristics similar to those of activated monocytes. Activation was not observed in cocultures of THP-1 cells and Jurkat Env⁺ cells in the presence of a specific fusion inhibitor, showing that the activation was not induced by mere contact between the cells, but required fusion between them. Additionally, activation was not manifested in the presence of the TIRAP

decoy, a specific inhibitor of signaling mediated by TLR4 and TLR2, so it is proposed that it is due to the interaction of Env with intracellular TLR4 or TLR4 receptors.

Fusion was also observed in cocultures of THP-1 cells with purified CD4⁺ T lymphocytes from the blood of donors 24 and 48 after the addition of infectious particles. We observed evidence that fusion induced by the virus can occur in two ways, known as fusion "from within" (induced by the expression of Env in infected cells) and "fusion from outside" (induced by extracellular virus after contact with adjacent cells).

Our results suggest that the fusion between monocytes and lymphocytes could occur in patients infected with HIV-1, leading to the formation of heterokaryons with an activated monocyte phenotype, which could contribute to the chronic inflammatory environment characteristic of the infection.

Introducción

Fusión celular

La fusión célula-célula es una forma de organización celular que se produce en condiciones fisiológicas y patológicas, como la formación de músculo [1] y placenta, desarrollo en metazoos [2], reparación de órganos por células madre [3], [4], [5], [6], y la transformación maligna [7], [8]. La fusión de las células del sistema inmune se induce en varias infecciones diferentes y en reacciones no infecciosas a las lesiones tisulares [9], [10]. Esta asociación íntima entre células del mismo linaje o diferentes (formando sincicios o heterocariones, respectivamente) puede dar como resultado una sincronización altamente funcional y una eficiencia óptima para llevar a cabo tareas complejas, y puede implicar una reprogramación celular importante, lo que puede resultar en un fenotipo alterado [6], [11]–[13]. Por lo tanto, las propiedades de las células fusionadas generalmente difieren significativamente de las células parentales. Una excelente revisión por Ogle *et al* [14], describe las implicaciones biológicas generales de la fusión célula-célula.

Una variedad de virus con envoltura, incluido el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), presentan complejos compuestos por glicoproteínas que interactúan con los receptores en las células blanco, lo que induce la fusión del virus y la célula. Las células infectadas sintetizan y luego exponen las proteínas de fusión virales en sus membranas, lo que confiere a las células infectadas la capacidad de fusionarse con las células no infectadas. Entre los virus que inducen la fusión célula-célula están incluidos muchos virus asociados con enfermedades humanas, como Herpesviridae (virus del herpes, citomegalovirus, varicela zóster, virus de Epstein-Barr), Paramyxoviridae (sarampión, paperas, virus respiratorio sincicial), y familias Retroviridae (VIH, HTLV). La capacidad de los virus para inducir sincicios generalmente se supone que es indicativa de que los virus se transmiten a través de una vía de célula a célula, sin exposición al medio extracelular, lo que permite que el

virus se propague rápidamente y evite la respuesta inmune del hospedero [15]. Sin embargo, el alcance y las consecuencias de la formación de sincicios durante la infección por estos virus aún no se conocen bien. Dada la relación entre varios virus fusogénicos y cáncer, Duelli y Lazebnik han considerado la intrigante posibilidad de que la transformación celular surja de la combinación de la actividad del oncogén y la inestabilidad cromosómica inducida por la fusión célula-célula [4].

Estructura general del VIH-1.

El VIH-1 pertenece a la subfamilia *lentiviridae* de la familia *retroviridae*. Los lentivirus se caracterizan por presentar largos periodos de infección antes de inducir síntomas clínicos en los hospederos. Los individuos infectados con VIH-1 pueden tardar en promedio hasta 10 años en presentar síntomas clínicos de SIDA [16].

El genoma del VIH-1 presenta dos cadenas de RNA de cadena sencilla con polaridad positiva, organizado como un complejo de ribonucleoproteínas dentro de la cápside, asociado a las enzimas integrasa, proteasa y transcriptasa reversa.

La membrana viral expresa las proteínas de fusión viral gp120 y gp41 las cuales conforman el complejo Env. Estas proteínas se encuentran asociadas por enlaces no covalentes y organizadas en trímeros en la membrana viral. Las proteínas del complejo Env son esenciales para la interacción de las membranas viral y celular, y la entrada del virus a células blanco [17].

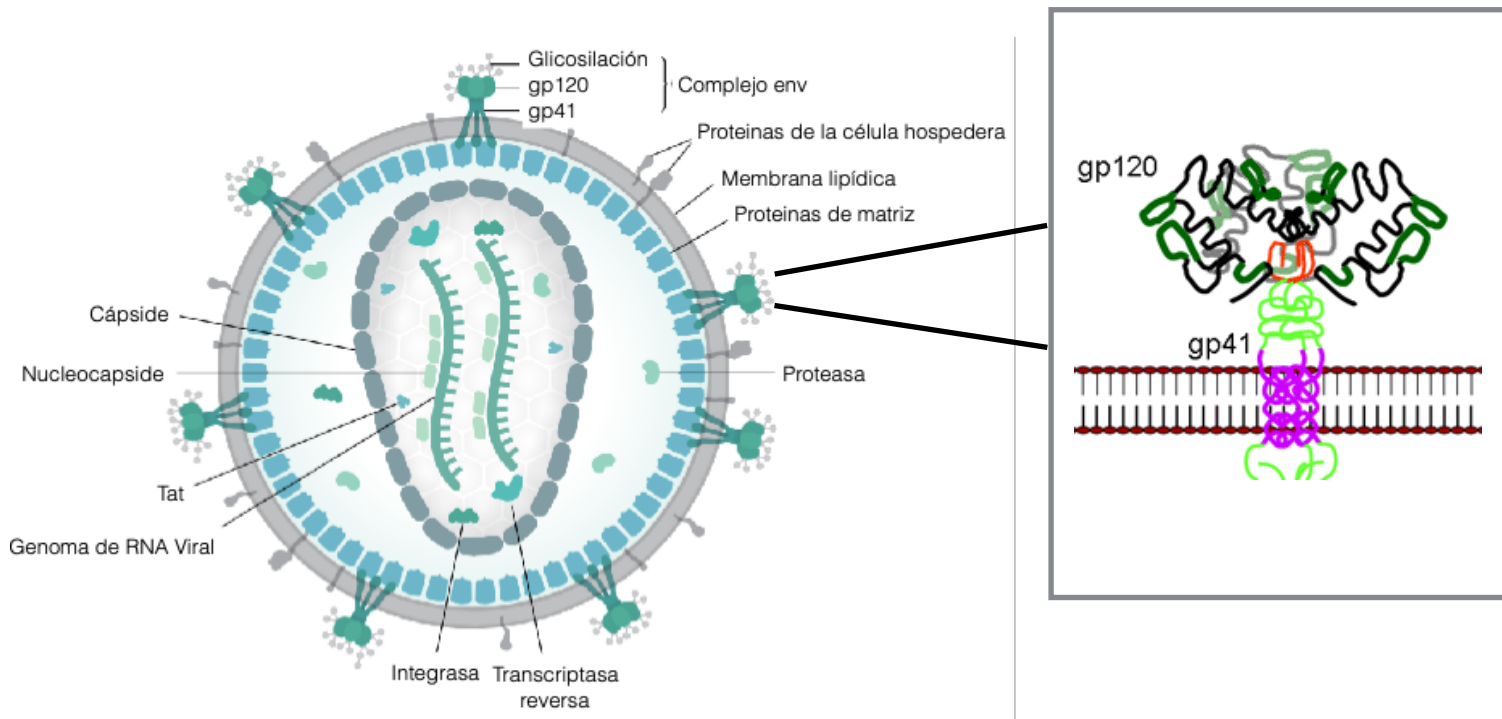


Figura 1. Esquema de la estructura general del VIH-1. Se muestran ancladas en la membrana viral, las proteínas gp120 y gp41 que conforman el complejo Env [18].

Ciclo replicativo del VIH-1

El ciclo replicativo del VIH-1 consiste en una serie de pasos regulados por la interacción entre las proteínas virales y celulares. En la fase de reconocimiento, las proteínas gp120 del complejo Env interactúan con el receptor CD4 expresado en la membrana de la célula blanco como se muestra en la figura 2. Esta interacción promueve cambios conformacionales en gp120 y gp41 promoviendo el acercamiento de las membranas celular y viral, lo que promueve a su vez la formación de un poro de fusión [19]. Cuando las membranas viral y celular se fusionan, se libera la cápside viral en el ambiente citoplásmico de la célula blanco, en donde se lleva a cabo el proceso de transcripción reversa. Durante este proceso la cápside es transportada a través de la red de microtúbulos de la célula hospedera hacia la periferia de la membrana nuclear en donde se promueve la disociación de las proteínas p24 que conforman la cápside liberando el

complejo de preintegración formado por el DNA viral, las proteínas p6, p17, Vpr y las enzimas integrasa, proteasa y transcriptasa reversa [20]. El complejo de preintegración es entonces transportado por la maquinaria celular hacia el interior del núcleo en donde interactúa con el DNA de la célula hospedera y promueve su integración predominantemente en regiones no codificantes de genes activos transcripcionalmente. Posteriormente los mRNA virales son traducidos a proteínas virales las cuales son procesadas en aparato de Golgi y ensambladas en regiones ricas en colesterol en la membrana plasmática. Posteriormente los virus ensamblados son liberados al espacio extra celular en donde finaliza el proceso de maduración de las proteínas gag, teniendo como resultado un virus maduro infeccioso [21]–[23].

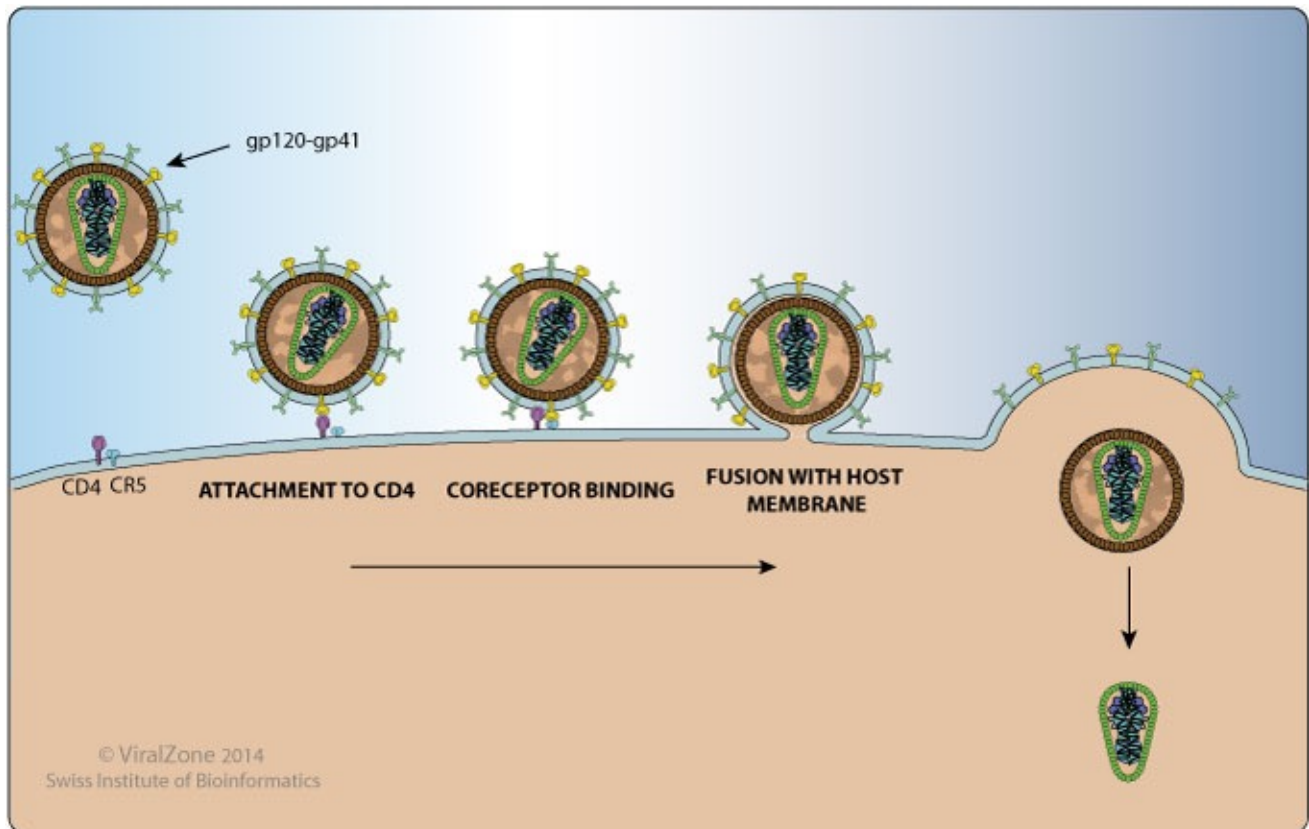


Figura 2. Mecanismo general de entrada del VIH-1 a la célula blanco. El VIH-1 interactúa con el receptor CD4 y un coreceptor para quimiocinas (CCR5). Esta interacción promueve la fusión de la membrana viral con la de la célula blanco y la entrada de la cápside viral al medio celular [24].

Estructura del complejo Env.

El complejo de envoltura viral (Env) está conformado por las proteínas gp120 y gp41. Estas proteínas son el resultado del procesamiento y corte de la proteína precursora gp160 la cual es codificada por el gen env y escindida por proteasas de la familia de las convertasas en el retículo endoplásmico de la célula infectada, donde el precursor es sujeto a N-glicosilación en los residuos de asparagina contenidos en los motivos Asn-X-Ser y Asn-X-Thr, adquiriendo una masa aparente de 160 kDa (gp160). Estudios bioquímicos han demostrado que, dentro del retículo endoplásmico, gp160 adquiere la conformación que la hace competente para interactuar con el receptor CD4 y más tarde se oligomeriza principalmente en trímeros. En su forma trimérica, la glicoproteína es transportada hacia el aparato de Golgi donde enzimas de la familia de las convertasas catalizan su escisión en las subunidades gp120 y gp41, que se mantienen asociadas por interacciones de tipo no covalentes [7], [8], [25].

Finalmente, el complejo es transportado hacia la membrana plasmática donde gp41 se encuentra como una proteína transmembranal, asociada con la subunidad de superficie gp120 [26].

Las proteínas gp120 y gp41 se encuentran asociadas por interacciones no covalentes y en trímeros asociados a la membrana viral en la porción transmembranal de gp41 [8], [26].

Los análisis estructurales de gp120 sugieren que esta proteína contiene 5 regiones altamente variables V1-V5 separadas por 5 regiones constantes C1-C5. Estudios han demostrado que los aminoácidos de la corona del bucle de la región V3 son importantes para la determinación del tropismo del virus [27], [28].

Por otro lado, la proteína gp41 cuenta con un ectodominio, una región transmembranal y un dominio citoplásmico. En el ectodominio se encuentra una región rica en

aminoácidos hidrofóbicos denominada péptido de fusión, seguido de dos dominios helicoidales [29].

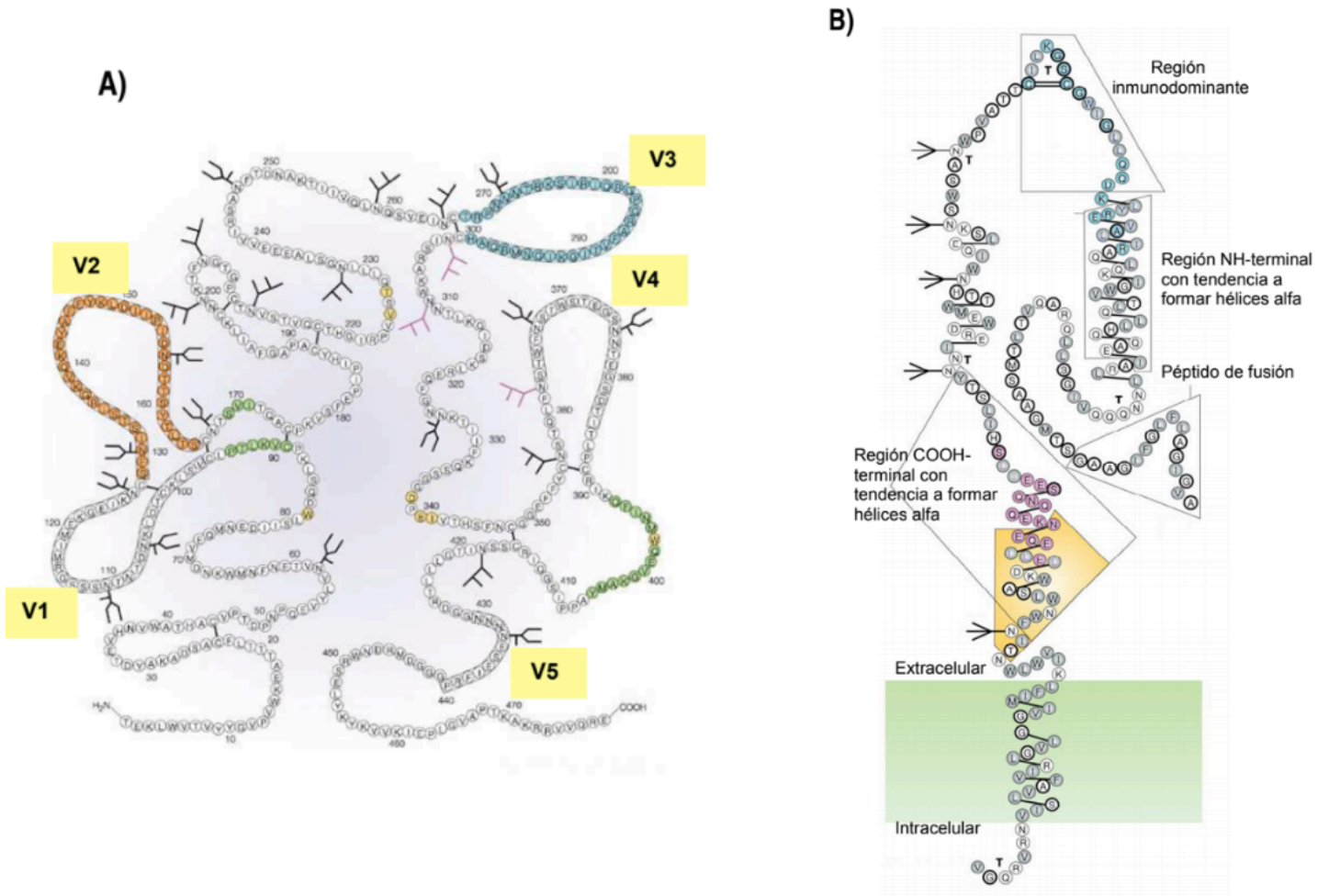


Figura 3. Estructura de las proteínas de la envoltura del VIH, A) gp120 y B) gp41. A) Se muestran las regiones de alta variabilidad de la gp120 y los sitios de unión a carbohidratos como la manosa (ramificaciones en negro). B) Se muestran las principales regiones de la estructura de la gp41 [30].

Mecanismo de fusión de membranas

El primer contacto entre el virus y la célula blanco ocurre cuando gp120 interactúa con el receptor celular CD4, esta interacción promueve cambios conformacionales en gp120. El uso de anticuerpos monoclonales ha permitido identificar el sitio de unión de

gp120 a su correceptor el cual se encuentra en la región v3, sitio que se expone después de la unión de gp120 con CD4 [31], [32].

La unión con el correceptor induce cambios conformacionales adicionales en gp41 la cual expone su péptido de fusión y por sus propiedades hidrofóbicas se inserta en la membrana de la célula blanco. El modelo mas aceptado (Chan et. al 1998), mostrado en la figura 4, sugiere que posteriormente gp41 forma una estructura de horquilla en el cual las 3 hélices C próximas a la membrana viral interactúan con las hélices N mas próximas a la membrana celular. Esto promueve el empaquetamiento de las seis hélices de gp41 y como consecuencia el acercamiento de las porciones membranales del virus y la célula. Posteriormente se forma un poro de fusión entre las membranas adyacentes y la fusión de estas [33], [34].

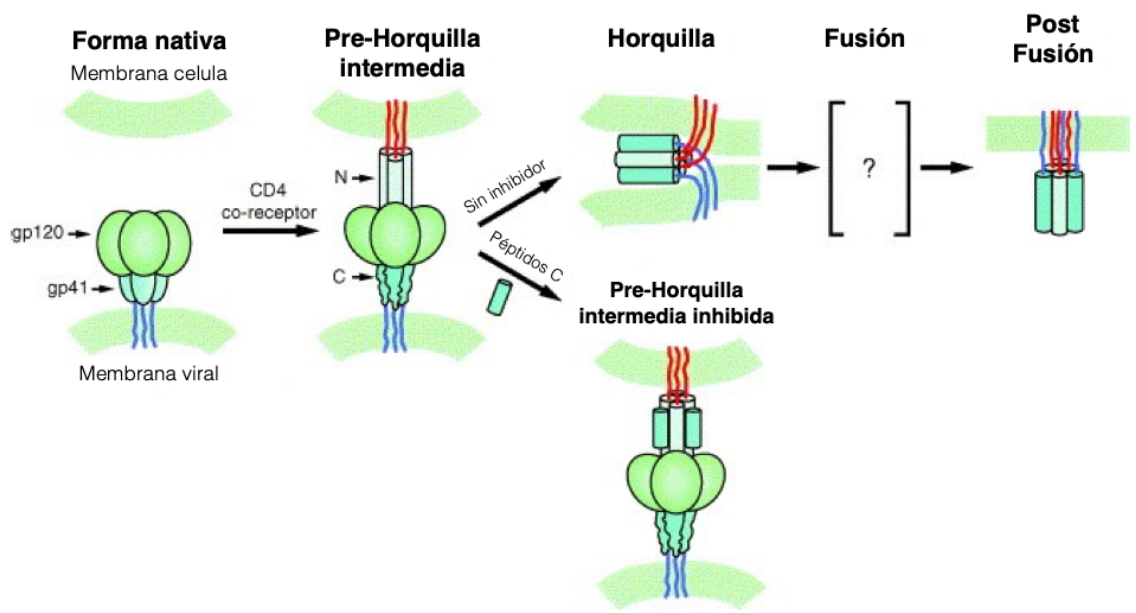


Figura 4. Mecanismo propuesto de fusión de las membranas viral y celular en la infección por VIH-1 de acuerdo con Chan y Kim (1998). Péptidos sintéticos análogos a las secuencias de las hélices alfa amino- y carboxilo-terminales (como el T-20), pueden unirse a estas regiones e inhibir la fusión [35].

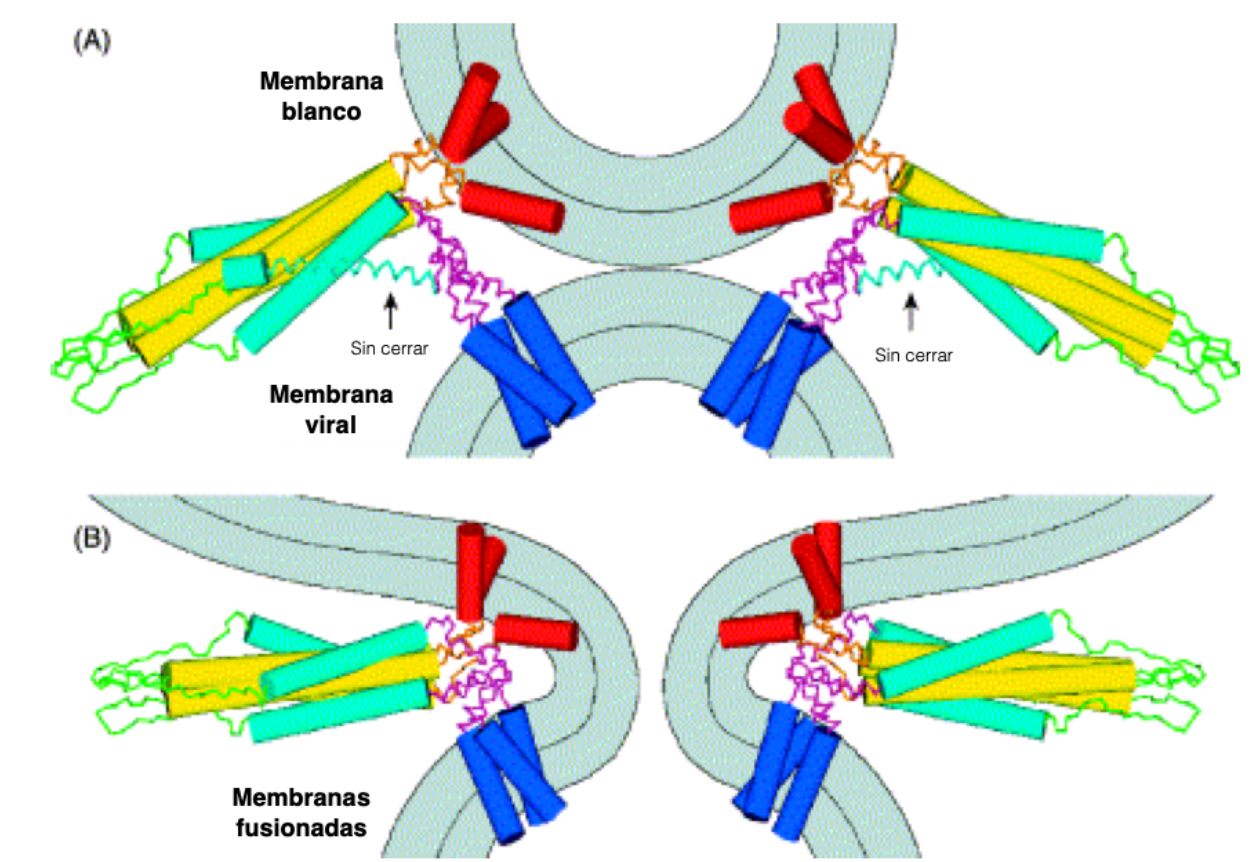


Figura 5. Estado intermedio durante el proceso de fusión de membranas (hemifusión) en el que únicamente interaccionan las membranas externas de las bicapas lipídicas [35].

Las moléculas de adhesión celular como ICAM-1 y las proteínas de fusión son utilizadas por los virus para superar la barrera electrostática formada por la superficie cargada negativamente de las membranas celulares. La fusión celular requiere la aposición cercana de las membranas superficiales de las células, la inducción de perturbaciones lipídicas y la formación de poros de fusión que eventualmente se expanden y conducen a la fusión completa célula-célula [36], [37]. Durante la infección por VIH, la fusión virus-membrana se logra mediante el complejo macromolecular de envoltura de VIH (Env), compuesto por heterotrímeros de las glicoproteínas gp120 y gp41. La fusión requiere una secuencia de cambios conformacionales complejos que involucran la interacción específica de Env con la molécula CD4 y un correceptor de la familia de receptores de

quimiocinas [12], [38], [39]. La fusión célula-célula mediada por Env-VIH se induce por un mecanismo análogo al del proceso de fusión virus-célula [40]–[42].

Células susceptibles a la infección por VIH

La permisividad de las células del sistema inmune a la infección por VIH-1 está correlacionada con la expresión de los receptores CD4 y de los receptores para quimiocinas CXCR4 y CCR5 que funcionan como correceptores para el virus [43]–[45].

Los aislados de VIH-1 han sido clasificados según su uso de correceptor. Se denomina X4 a los que son dependientes de CXCR4 y R5 a los que usan CCR5 principalmente. Algunas cepas virales presentan tropismo dual, por lo cual se les denomina X4/R5 [46].

Diversos estudios han identificado otros receptores que son utilizados por el VIH-1 para su entrada a la célula blanco, como receptores de manosa, sulfato de heparán, receptores de ácido siálico, CCR3 y CCR2 [43], [47].

Inicialmente se consideraba que los linfocitos T CD4⁺ eran el principal blanco del virus, sin embargo, posteriormente se observó que el VIH-1 era capaz de infectar células del linaje mielóide *in vitro*, como son monocitos, macrófagos y células dendríticas. También se observó que estas células no llevan a cabo una infección productiva, posiblemente por la forma de entrada del virus y a la expresión de moléculas tipo lectina que capturan las partículas virales en vesículas y degradan al virus de forma intracelular. Adicionalmente los monocitos y macrófagos pueden expresar al receptor CD4 hasta 6 veces menos en comparación a las células linfoides [48], [49].

Por otra parte, se ha observado que los virus de pacientes en etapas avanzadas de la enfermedad, pueden infectar células con una baja o nula expresión de CD4, como células B, microglia, células epiteliales entre otras [50]–[52].

Fusión célula-célula

La fusión celular es un proceso muy común y de suma importancia en procesos biológicos, como son la fecundación, la formación de la placenta, el desarrollo del músculo esquelético y respuestas inmunes crónicas [14].

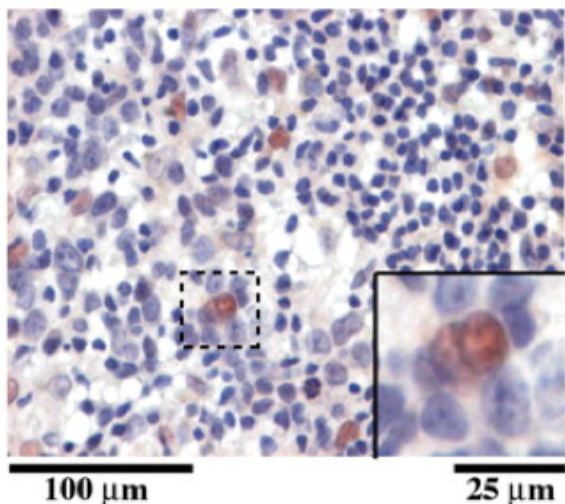
En la infección por VIH-1 se considera a la fusión célula-célula como un proceso patogénico. Estudios han sugerido que la formación de policariones en la infección por VIH-1 podría tener consecuencias perjudiciales para los pacientes (tabla 1). Los policariones podrían fungir como reservorios virales, contribuir al agotamiento de células del sistema inmune, servir como sitios de recombinación y promover daño a tejidos. En la tabla 1 se muestra el número de referencias de artículos científicos en los que se proponen diversos posibles efectos de la fusión celular inducida por el VIH-1.

Estudios han determinado que la presencia de virus inductores de sincicios *in vitro* en pacientes presentan una correlación con avance a etapas de SIDA [53].

Así mismo se ha observado la presencia de células multinucleadas en biopsias de sistema nervioso central de personas que murieron de SIDA (figura 6). Se propuso que estas células tenían un posible origen mieloide. La presencia de policariones en pacientes ha sido relacionada con complicaciones asociadas a daño neuronal, como demencia asociada a SIDA. También existen evidencias de que el virus tiene la capacidad de invadir el SNC desde etapas tempranas de la infección y puede causar síntomas como meningitis, así como la detección de partículas virales en el líquido cerebroespinal de los pacientes [54]–[56].

También se han observado policariones en biopsias de amígdalas y adenoides de pacientes (figura 6). La tinción de estos policariones con anticuerpo anti-p24 y la detección de ácidos nucleicos por hibridación *in situ*, han demostrado que los policariones encontrados se encuentran infectados persistentemente [36].

Infectado con VIH-1



Infectado con VIH-1 y con demencia

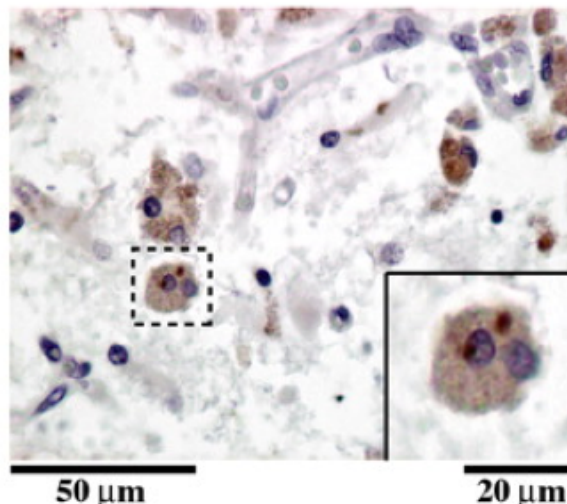


Figura 6. Biopsias de ganglio linfático (izquierda), y SNC (derecha), de pacientes infectados con VIH-1. Se muestra la presencia de policariones con núcleos teñidos [36], [54].

Posibles consecuencias de la formación de sincicios inducidos por el VIH-1

Consecuencia	Ref.
Muerte celular <i>in vitro</i>	[50,57,65,66]
Agotamiento de células T en sangre	[44,67,68]
Diseminación de virus por contacto célula - célula	[61,63,69,70,71,72,73,74]
Reservorios de virus replicantes	[52,55,56,75,76,77]
Sitios de recombinación de diferentes cepas	[64]
Mejoramiento de la replicación viral	[52,78]
Modificación del fenotipo celular	N.f.
Supervivencia de las células infectadas por fusión con células sanas	N.f.
Reducción del número de células en el microambiente	N.f.
Reducción de replicación viral	N.f.
Daño a tejidos por producción de citocinas	N.f.

Nota: N.f., no encontrado

Tabla 1. Posibles consecuencias de la formación de sincicios inducida por el VIH-1 [57].

Se han propuesto 2 mecanismos principales por los cuales el VIH-1 puede inducir la fusión de células adyacentes. A estos procesos se les ha denominado “fusión desde adentro” (FFWI) y “fusión desde afuera” (FFWO).

La fusión desde adentro (FFWI) consiste en la expresión de las proteínas gp120 y gp41 en la membrana de células infectadas. Cuando estas interactúan con células CD4⁺ sanas pueden inducir la fusión de sus membranas, formando policariones [32], [33], [58].

Por otro lado Clavel *et al.* han propuesto a través de estudios con partículas libres de VIH-1, que estas pueden tener la capacidad de mediar la fusión entre células adyacentes no infectadas (FFWO) [59].

En contraste con la FFWI, la FFWO presenta requerimientos adicionales. En estudios realizados se propone que este tipo de fusión podría ocurrir con menos frecuencia ya que requiere el contacto de la partícula viral con los receptores CD4 de 2 células adyacentes. Adicionalmente se requeriría la formación de 2 poros de fusión con células distintas para completar este proceso. Se propone también que la FFWO podría requerir altas concentraciones tanto de partículas virales libres como de células que expresen el receptor CD4, lo cual favorecería la formación de contactos entre las células y el virus. Estas condiciones que podrían cumplirse *in vivo* en sitios como los ganglios linfáticos [59], [60].

Adicionalmente, las partículas de VIH-1 transmitidas a través de las sinapsis virológicas podrían servir como puente para FFWO en el reducido espacio sináptico [37].

Experimentalmente se ha observado que la FFWO es sensible a los inhibidores de la polimerización de actina LatA, CytD y Jasp, mientras que la entrada de partículas virales en células blanco y la FFWI no se ven afectadas. Se propone que la actina podría estar implicada en la polarización de moléculas de superficie necesarias para llevar a cabo este proceso. Además la actina podría tener un papel importante en el ensanchamiento

de los poros de fusión inducidos en FFWO [61], [62]. También se observó que la eliminación de la cola citoplásmica de gp41 incrementa considerablemente la FFWO, mientras que no tiene efecto sobre FFWI [37].

Estudio de la fusión celular *in vitro* por citometría de flujo

En nuestro laboratorio el fenómeno de fusión célula-célula inducida por Env mediante citometría de flujo se ha estudiado utilizando células Jurkat CD4⁺E6 y Jurkat Env⁺HXBc2 las cuales pueden expresar de manera inducible las proteínas del complejo Env en su membrana (ver materiales y métodos). En cocultivo, las células Jurkat CD4⁺ y Env⁺ se fusionan generando sincicios de diferentes tamaños y composición nuclear (Figura 7). Para cuantificar la fusión las células se tiñen previamente con los colorantes lipofílicos fluorescentes DiO (Perclorato de 3,3 –dioctadecil-oxacarbocianina) y Dil (Perclorato de 1,1-dioctadecil-3,3,3 tetrametil-indocarbocianina), que son colorantes lipofílicos que consisten en una región polar y 2 cadenas hidrofóbicas, las cuales se intercalan en la membrana celular y fluorescen en verde y rojo, respectivamente.

Posteriormente las fusiones son detectadas por citometría de flujo como partículas con fluorescencia mixta, mientras que las no fusionadas permanecen como eventos de una sola fluorescencia [63].

Utilizando un modelo de tinción diferencial podemos analizar las células con fluorescencia mixta, correspondientes a fusiones inducidas por Env y evaluar diferentes características, como tamaño, complejidad, expresión de receptores intra y extra celulares. Adicionalmente las células fusionadas pueden distinguirse de las no fusionadas mediante el fenómeno de transferencia de energía por resonancia de la fluorescencia (FRET) fenómeno en el que el espectro de emisión del colorante DiO (verde) se traslapa con el de absorción del colorante Dil (rojo) aumentando la energía de éste y su fluorescencia, lo cual sólo ocurre a distancias muy reducidas (en el orden de ángstroms) y como consecuencia, la fluorescencia de Dil se observa incrementada en las células fusionadas con respecto a las no fusionadas [64].

Resultados obtenidos demuestran que la fusión entre células E6 CD4⁺ y Hx Env⁺ genera sincicios con heterogeneidad en su composición nuclear (figura 7).

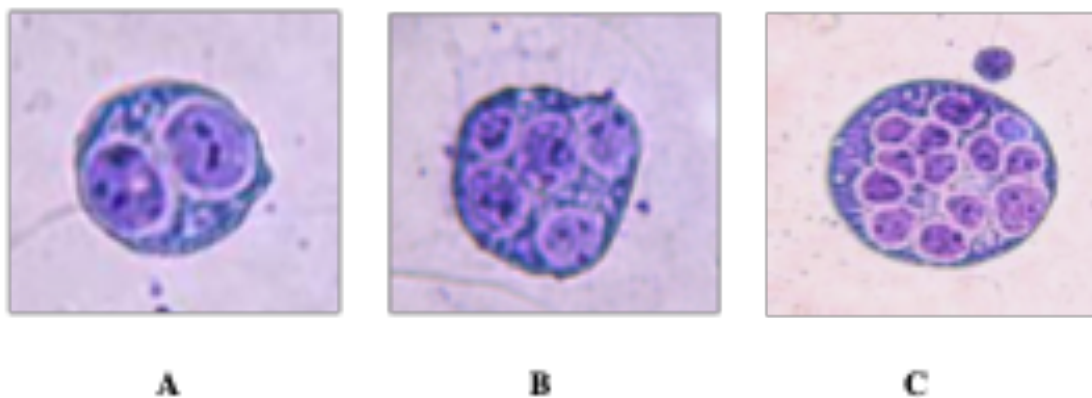


Figura 7. Heterogeneidad de los sincicios *in vitro* por la fusión de células Env y CD4. (A) Célula binucleada; (B) célula con 5 núcleos; (C) Célula multinucleada. Las células fueron teñidas con Giemsa [57].

Se reportó también que en nuestro modelo de fusión homotípica (linfocito-linfocito), la proporción inicial de células en el cocultivo, afecta el porcentaje, tamaño y composición celular de los sincicios, siendo la proporción 1:1 la más eficiente en cuanto a generación de células con fluorescencia mixta (70). Cabe mencionar que en este ensayo de fusión, las células Env⁺ no se fusionan entre sí ya que no expresan CD4 (64), de modo que la fusión solo puede producirse con las células CD4⁺ que no expresan Env⁺.

Se observó también que la fusión puede ser inhibida por concentraciones nanomolares de inhibidores clásicos como el péptido sintético T-20 o anticuerpos anti-CD4 en una manera dosis dependiente. También se observó que utilizando las células Jurkat 522 F/Y que presentan una sustitución F / Y en la posición 522 en gp41 (64, 65), no se generaban sincicios ni eventos con mayor complejidad después de los tiempos de cocultivo [65].

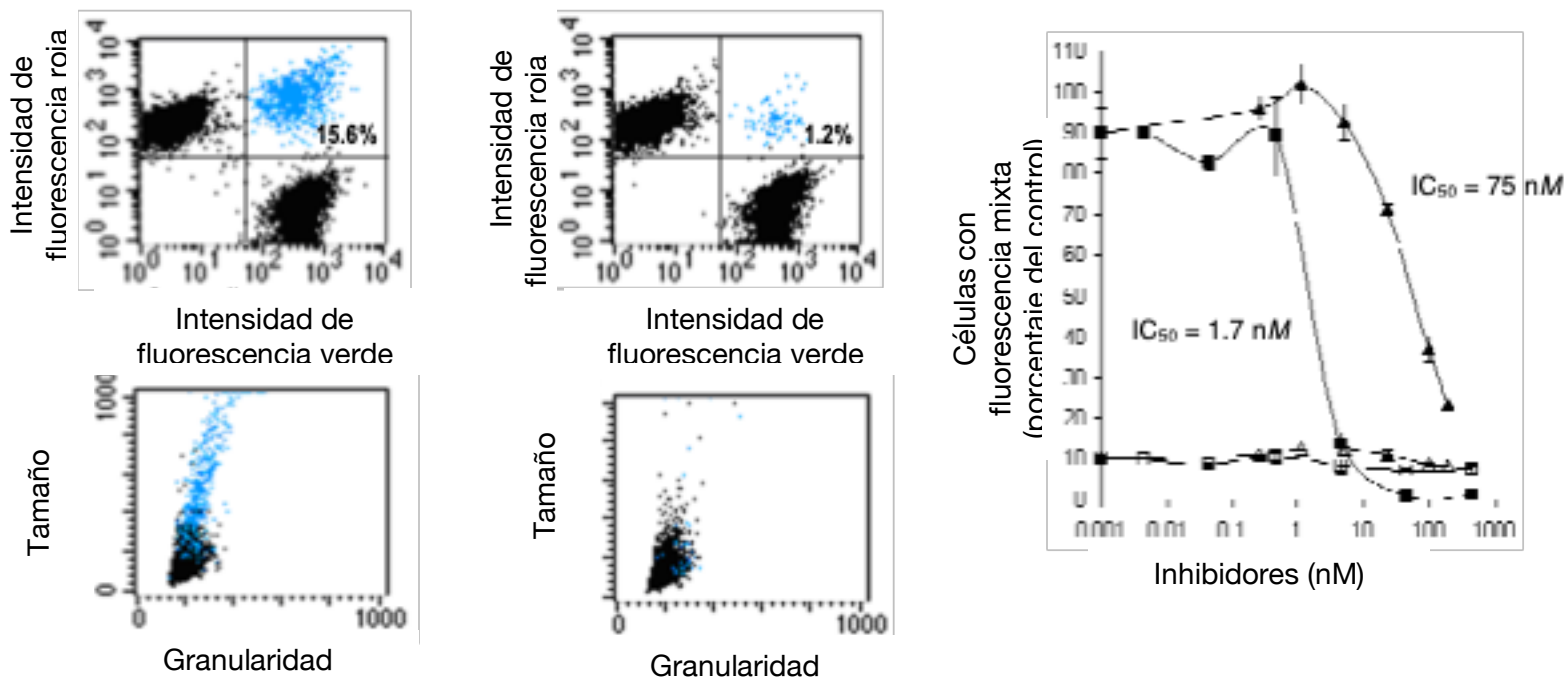


Figura 8. Análisis de citometría de fluorescencia de la formación de sincicios y la inhibición de la fusión utilizando el anticuerpo anti-CD4 (triángulos) y el péptido inhibidor T-20 (cuadros) [66].

Formación de heterocariones por células monocíticas y linfocíticas

Los monocitos humanos expresan CD4 y por lo tanto son blancos de la infección por el VIH-1. En nuestro laboratorio se describió por primera vez que células que expresan las proteínas de la envoltura viral son capaces de fusionarse con monocitos de la línea celular THP-1. Este tipo de fusión se denomina fusión heterotípica por involucrar dos células que provienen de linajes diferentes.

Las células THP-1 y Jurkat Env⁺ se fusionan generando heterocariones que son detectables desde las 5 horas, aumentando su número hasta las 24 horas. No se formaron heterocariones en el cocultivo con células 522 F/Y no fusogénicas (figura 9). También se observó que los heterocariones presentaron una disminución de la expresión de los marcadores linfoides CD3 y CD28 mientras que mantuvieron la expresión de los marcadores mieloides CD32 y CD68 (figura 10).

Los heterocarios formados presentaban una morfología en placa similar a la de monocitos activados (figura 11), [67].

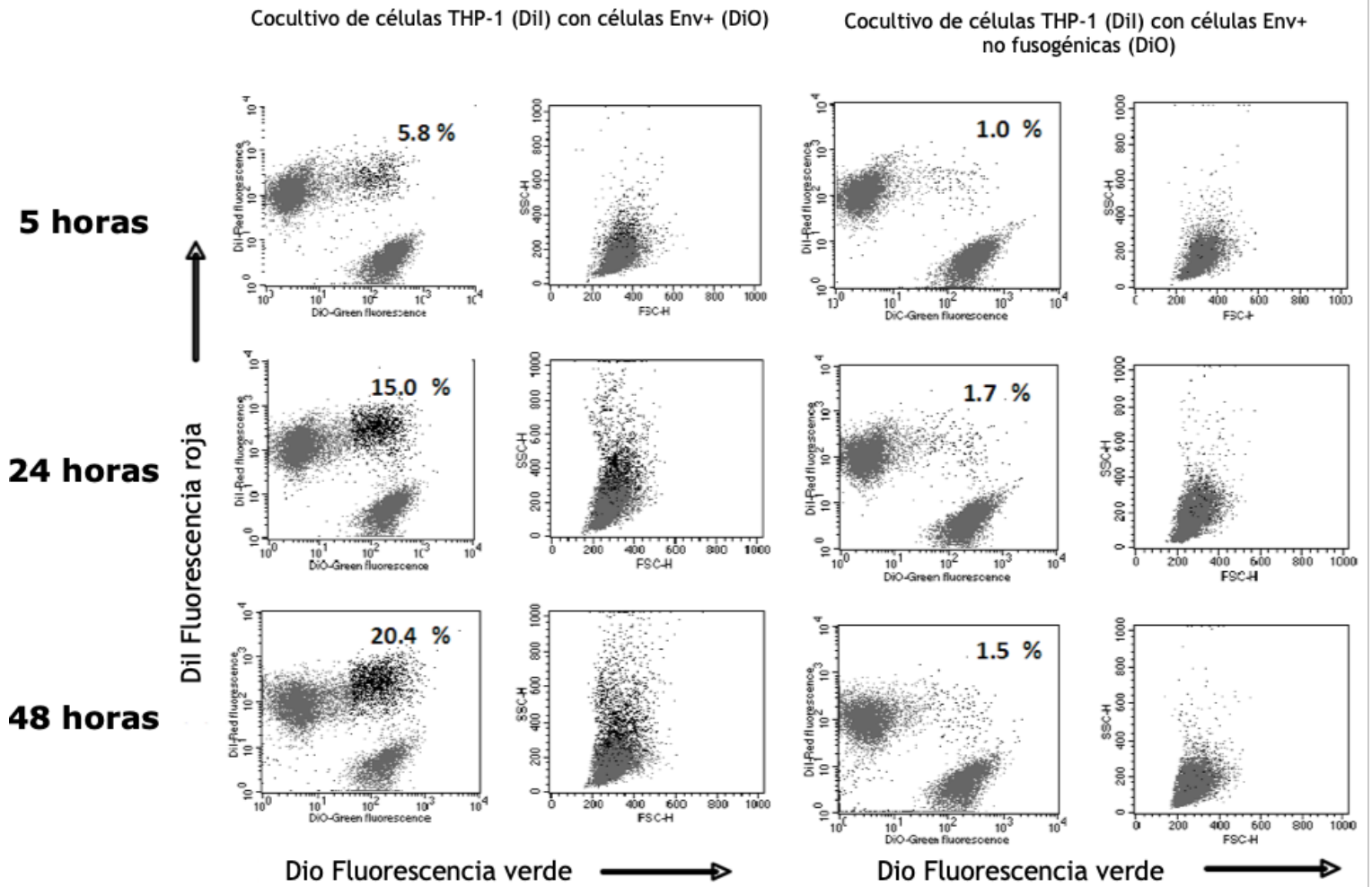


Figura 9. Formación de células con fluorescencia mixta en cocultivos entre monocitos CD4⁺ marcados con un colorante fluorescentes en rojo y a) células T Env⁺ fusogénicas o b) células T Env⁺ no-fusogénicas, marcadas con un colorante fluorescentes en verde. Los cocultivos se incubaron durante 5, 24 y 48 horas y posteriormente se evaluaron mediante citometría de flujo. Se muestran las gráficas respectivas de granularidad (SSC-H) contra tamaño (FSC-H), en donde se resalta con puntos negros la distribución de las células con fluorescencia mixta [67].

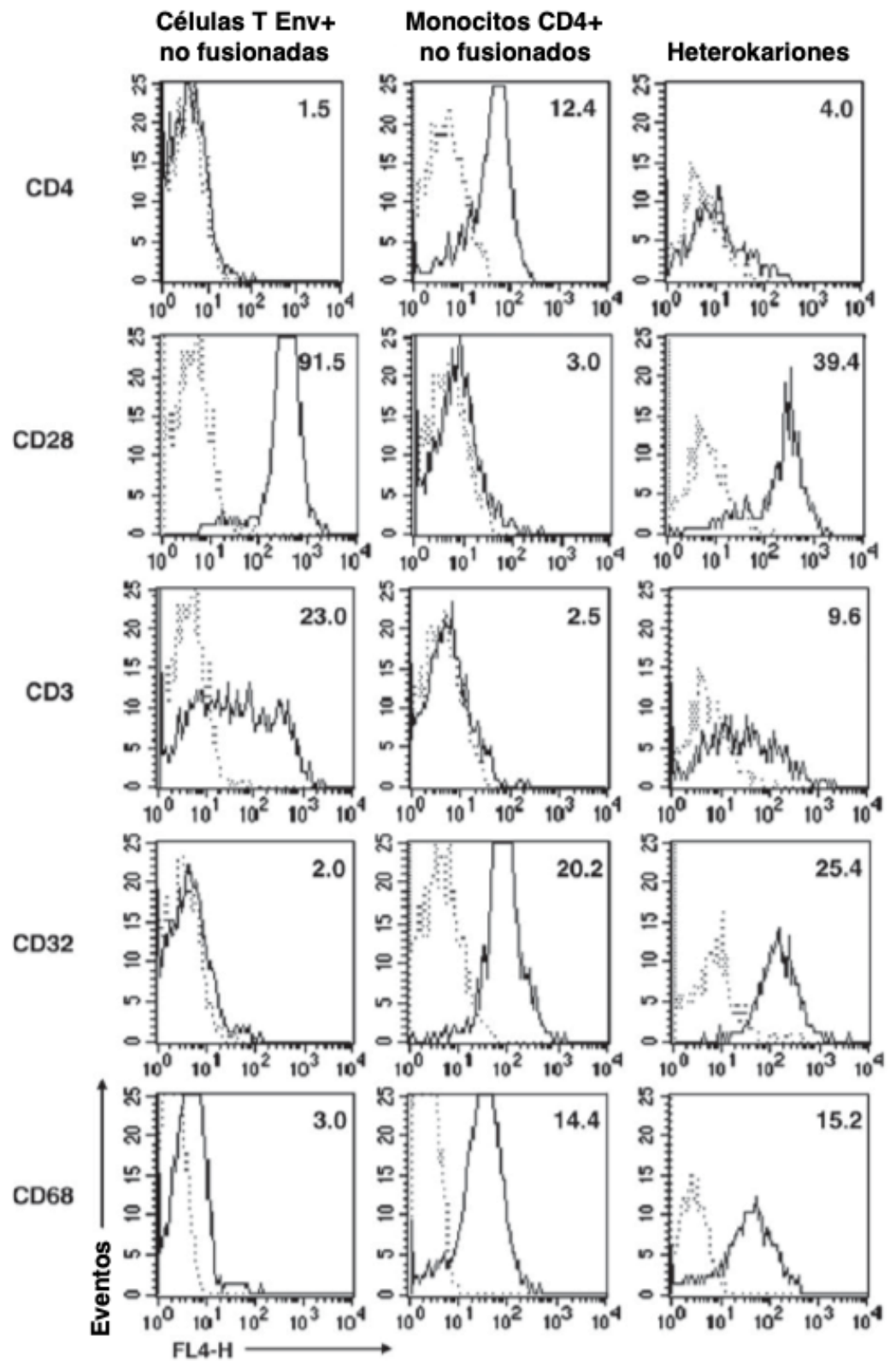


Figura 10. Expresión de marcadores linfoides y mieloides en cada una de las tres poblaciones celulares presentes en cocultivos incubados durante 24 horas. Se reporta la intensidad de fluorescencia media (IFM). La línea punteada corresponde al control de isotipo [67].

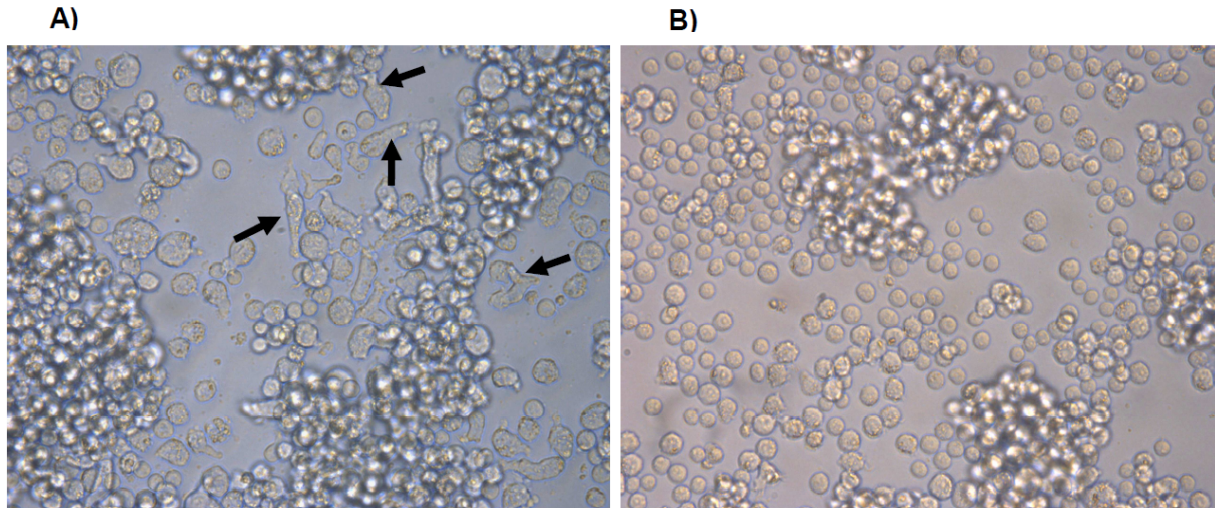


Figura. 11. Cambios morfológicos en los cocultivos donde ocurre la fusión heterotípica. Cocultivos entre monocitos $CD4^+$ y A) células T Env^+ fusogénicas o B) células Env^+ no fusogénicas. Se resaltan con flechas algunas de las células con morfología extendida [67].

Planteamiento del problema.

Durante la infección por el VIH, se ha encontrado que existe una correlación importante entre la detección en sangre periférica de variantes virales con alta capacidad para fusionar células *in vitro* y la pérdida acelerada de células T $CD4^+$ que conlleva a SIDA.

Se ha observado la presencia de policariones en pacientes infectados con VIH-1 en ganglio linfático y sistema nervioso central. Algunos trabajos orientados hacia el estudio del fenotipo de las células multinucleadas que se originan *in vivo*, han reportado que presentan marcadores de monocitos/macrófagos o bien, de células dendríticas.

La presencia de policariones en sistema nervioso central se ha asociado con demencia asociada a SIDA.

Se ha demostrado que las proteínas de fusión viral Env son capaces de inducir la fusión célula-célula, formando policariones *in vitro*.

Se ha demostrado también que esta fusión puede ocurrir entre células monocíticas y linfocíticas generando heterocariones.

Hasta ahora, existe poca información acerca de las consecuencias de la formación de heterocariones y su posible papel en la patogénesis del SIDA.

Hipótesis

La fusión entre monocitos y linfocitos promovida por el VIH-1, genera heterocariones con fenotipo predominantemente mielóide e inmunológicamente funcionales.

Objetivo

Analizar las características fenotípicas y funcionales de los heterocariones formados por la fusión entre linfocitos y monocitos inducidos por el VIH-1.

Objetivos específicos

- Analizar la expresión de marcadores de superficie linfoides y mieloides en los heterocariones formados, haciendo un seguimiento hasta 3 días de cocultivo.
- Analizar la capacidad fagocítica de los heterocariones formados a las 24 horas de cocultivo, comparando con el nivel de actividad de los monocitos precursores.
- Explorar las causas del fenotipo de monocito activado presentado por los heterocariones formados.
- Analizar el efecto de la activación por PMA en los heterocariones formados.
- Analizar el efecto del péptido señuelo de TIRAP en la expresión de CD11b en los heterocariones formados.
- Analizar la capacidad de la cepa viral 3b del VIH-1 para inducir la fusión de las células THP-1 con linfocitos purificados de donadores sanos.

Materiales y métodos

Anticuerpos utilizados (marca “BD Pharmingen™”):

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

-APC goat anti-mouse Ig (Cat. 550826 BD). Anti-CD32-APC (Cat. 559769 BD).

-APC mouse IgG2bk Isotype control (Cat. 555745 BD). Anti- CD3-APC (Cat. 340440).

-Anti- CD28-APC (Cat. 559770).

-APC mouse IgG1 Isotype control (Cat. 555751).

-APC Mouse Anti-Human CD11b (Cat. 340937)

Cultivo de células

Las células Jurkat Env + HXBc2 y 522F / Y se obtuvieron del AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAD, NIH. Estas líneas celulares contienen un transactivador dependiente de tetraciclina inducible y se encuentran transfectadas con los genes env y rev de la cepa HIV-1 HXBc2 acoplada a un promotor de citomegalovirus y a las secuencias del operador de tetraciclina [64]. Esta construcción permite la expresión de Env (gp120 / gp41) después de la eliminación de la tetraciclina del medio de cultivo. Las células HXBc2 (4) expresan una proteína Env fusogénica, mientras que la línea celular 522F / Y no se fusiona con las células blanco debido a una sustitución F / Y en la posición 522 en gp41[63], [66]. La línea celular THP-1 se adquirió de ATCC (ATCC TIB-202).

Se cultivaron las células HXBc2 y 522F / Y en RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY) suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado (Gibco) (RPMI-10), 200 µg / ml de geneticina e higromicina, y 1 µg / ml de tetraciclina. Los cultivos celulares se mantuvieron a 37 °C y 5% de CO₂. Para inducir la expresión de Env, las células se lavaron con PBS y se cultivaron en medio sin tetraciclina. Después de 24 h, las células

se marcaron con DiO, y las células teñidas se mantuvieron en una incubadora durante la noche antes de los experimentos de fusión. Por lo tanto, los experimentos de fusión se realizaron 48 h después de la inducción de la expresión de Env.

Las células THP-1 se cultivaron en RPMI 1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado (Gibco) con 600 µg/ml de penicilina, 600 µg/ml de estreptomycin, 2 mM de L-glutamina, 100 µM de aminoácidos no esenciales y 1 mM de piruvato de sodio. Las células se mantuvieron a una densidad de 0.5×10^6 células/ml.

Ensayo de fusión célula-célula

Las células a fusionar se tiñeron con los colorantes fluorescentes DiO rojo y verde DiO, obtenidos de Molecular Probes (Eugene, OR). Las soluciones stock de Dil y DiO se prepararon disolviendo 3 mg/ml de colorante en DMSO, y las soluciones de trabajo se prepararon diluyendo las diluciones 1:10 en el mismo disolvente.

Un día antes de los experimentos de fusión, las células se ajustaron a $5-15 \times 10^6$ células/ml en RPMI-10 y se añadieron 10 µl de solución de trabajo DiO a Env⁺ HXBc2 o 522 células F/Y (después de 24 h de privación de tetraciclina), y 15 µl de Dil solución de trabajo se añadieron a las células THP-1. Las suspensiones celulares se cubrieron de la luz y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos con agitación suave. Las células se lavaron dos veces con 10 ml de RPMI-10 y se resuspendieron en el mismo medio. Los cultivos de células marcadas se incubaron durante la noche a 37 ° C y 5% de CO₂.

Las células Env⁺ Jurkat marcadas con DiO y las células THP-1 marcadas con Dil (que se denominarán células DIO-Env⁺ Jurkat y Dil-THP-1, respectivamente) se cocultivaron en una relación 1:1 (4×10^5 células de cada tipo) en una placa de cultivo de fondo plano de 48 pozos en un volumen total de 800 µl. Para los ensayos de inhibición de la fusión, las células Env⁺ Jurkat marcadas con DiO se preincubaron durante 30 minutos con 60 nM del péptido inhibidor de la fusión T-20 antes de la adición de las células THP-1. Las células etiquetadas, así como las células marcadas con DiO y Dil solo se colocaron en

pozos separados para usarlos como controles para ajustar las configuraciones de FACS. Cada condición fue probada por duplicado.

Después de los tiempos indicados, las células se recogieron de los pozos, se centrifugaron para eliminar el medio de cultivo y se resuspendieron en 0,4 ml de buffer de FACS. Las células se analizaron mediante citometría de flujo usando células marcadas y no marcadas para el ajuste inicial. Se seleccionó una región de células viables y se analizaron en gráficos de puntos FL-1 frente a FL-2, donde el porcentaje de células individuales verdes, rojas simples y con fluorescencia mixta (células Env⁺ Jurkat no fusionadas, células THP-1 no fusionadas y heterocariones, respectivamente) se determinó en 10,000 eventos en un citómetro Attune (BD) equipado con láser rojo y azul.

Inhibidor de fusión T-20

T-20 es un péptido sintético de 36 residuos de aminoácidos que comprende la región repetida heptad 2 (HR2) de gp41, y es complementario a gp41 HR1. Interfiere específicamente con el proceso de fusión impidiendo el ensamblaje de la conformación fusogénica gp41 [25]. Fuzeon, el derivado N-acetilado de T-20 se obtuvo de Trimeris / Roche (Lexington, MA / Basilea, Suiza) y se disolvió en PBS a 98 µg/ml.

Inmunofenotipificación

Las células se recogieron de placas después de los tiempos indicados en cocultivo, se lavaron con 1 ml de PBS, se re suspendieron en buffer de unión y se incubaron con anticuerpos monoclonales conjugados con APC contra los receptores CD3, CD28, CD32 o CD68 (BD Pharmingen, San José, CA) y fueron analizados por citometría de flujo como se describió anteriormente. Los anticuerpos monoclonales conjugados con APC contra ICAM-1 y CD11b se adquirieron en eBioscience (San Diego, CA). El índice de intensidad de fluorescencia media (MFI, por siglas en inglés) se calculó como la relación de la

intensidad de fluorescencia media geométrica del anticuerpo monoclonal específico y la intensidad de fluorescencia media geométrica del anticuerpo de control de isotipo.

Ensayo de fagocitosis

Los eritrocitos se opsonizaron con anti-SRBC IgG (IgG-SRBC) para la medición de la fagocitosis mediada por FcγR. Se recubrieron SRBC (1.2×10^9 en PBS) con 250 μg/ml de sulfo-NHS-biotina (Pierce, Rockford, IL) durante 20 minutos a 4° C. A continuación, se lavaron e incubaron con una dilución subhemaglutinante de IgG de conejo anti-SRBC durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las IgG-SRBC recubiertas con biotina se incubaron con Streptavidin-APC (Molecular Probes) diluido 1:700, durante 20 min a 4° C (IgG-SRBC-APC).

Para el ensayo de fagocitosis, se añadió el péptido inhibidor de fusión T-20 a cocultivos de 24 horas de células DIO-Env⁺ Jurkat y Dil-THP-1 para detener la incorporación de células adicionales en heterocariones. Veinticuatro horas después, las células en cocultivos se mezclaron con los eritrocitos opsonizados (IgG-SRBC-APC) en una relación de células cocultivadas totales a eritrocitos de 1:20 a 37° C durante 1 h. Las muestras sin mezclar se incubaron a 4°C como controles. Los eritrocitos no internalizados se lisaron por shock hipotónico, suspendiendo las células en 900 μl de agua doble desionizada y adicionando después de 1 minuto 100 μl de PBS 10x. La fagocitosis se cuantificó mediante citometría de flujo. Los datos se expresan como porcentaje de células positivas para APC (células que han ingerido al menos un eritrocito) como se informó (31).

Para los ensayos de fagocitosis en presencia de citocalasina D, las células Dil-THP-1, las células DiO-Env⁺ Jurkat o las células cocultivadas se incubaron con citocalasina D 200 nM (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) o DMSO como control del vehículo, para 2 horas a 37° C antes del ensayo de fagocitosis. Cada condición fue probada por duplicado.

Microscopía de fluorescencia

Los cambios morfológicos de las células con fluorescencia mixta y la fagocitosis se analizaron con un microscopio confocal Carl Zeiss (Jena, Alemania). Las células no fijadas se colocaron en una placa con cámara para el análisis de microscopía. Sesenta fotos fueron tomadas de diferentes campos. Las imágenes se procesaron utilizando el software Image J (NIH).

Activación con PMA

Las células DIO-Env⁺ Jurkat y Dil-THP-1 se cocultivaron en una relación 1:1 (4×10^5 células de cada tipo) en una placa de pozos de fondo plano de 48 pozos en un volumen total de 800 μ l. Se dejó que la fusión continuara durante 24 h, después de lo cual se añadió PMA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) a una concentración final de 15 nM. Después de 24 h de incubación con PMA, las células se recogieron de las placas, se lavaron con PBS y se analizaron inmediatamente mediante citometría de flujo para la expresión de ICAM-1 y de CD11b usando anticuerpos monoclonales conjugados específicos de APC, como se describió anteriormente (63). Las regiones correspondientes a células con fluorescencia mixta y rojas simples (monocitos y heterocariones no fusionados, respectivamente) se delimitaron en gráficos de puntos FL-1 frente a FL-2 y se determinó el porcentaje de células positivas para APC en el canal FL-3. Cada condición fue probada por duplicado. Los cocultivos no activados se establecieron y analizaron en paralelo.

Inhibición de señalización de TLR

Se prepararon soluciones madre del inhibidor TIRAP TLR2 y TLR4 NBP2- 26245 y el péptido control antennapedia (Novus Biologicals, Littleton, CO) como se describe por el fabricante. Las células DIO-Env⁺ Jurkat y Dil-THP-1 (4×10^5 cada una) se preincubaron por separado con 5, y 15 μ M de NBP2-26245, o con el péptido de control antennapedia (20 μ M) en 0,4 ml de medio de cultivo durante 1 h. a 37°C con 5% de CO₂. Las células se cocultivaron a continuación en un volumen total de 0,8 ml de medio de cultivo en presencia de péptidos. Se incluyeron pozos que contenían cocultivos de control sin

ningún péptido. Después de 24 h, la mitad del medio se reemplazó por medio nuevo que contenía las concentraciones correspondientes de péptido. El porcentaje de fusión y expresión de CD11b se determinó después de 24 h adicionales de cocultivo.

Análisis estadístico

Las diferencias entre los grupos se analizaron por ANOVA para la significancia ($P < 0.05$), usando GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc).

Resultados

Análisis por citometría de flujo de la formación de heterocariones

La fusión de células monocíticas THP-1 con células Env⁺ Jurkat (linfoides) se midió por medio por la detección de los heterocariones (células con fluorescencia mixta) mediante citometría de flujo. La fiabilidad del ensayo de citometría de flujo se confirmó en un estudio previo mediante la observación de que el número de células con fluorescencia mixta detectadas por citometría de flujo coincidía con el obtenido mediante el recuento por microscopía de fluorescencia. Asimismo, el ensayo de citometría de flujo se utilizó para cuantificar la inhibición de la fusión por concentraciones nanomolares de un anticuerpo monoclonal anti-CD4 y el péptido T-20, un inhibidor de la entrada del VIH que permite la interacción inicial de gp120 con CD4 y el correceptor, pero que previene los cambios conformacionales de gp41 requeridos para la fusión de la membrana. En estos estudios previos, el 50% de la fusión fue inhibida por concentraciones de anticuerpo anti-CD4 y péptido T-20, respectivamente [62], [64], [67].

La fagocitosis de las células Env⁺ T por las células THP-1 como fuente de agregados se descartó ya que estas no se produjeron células con fluorescencia mixta cuando las células Jurkat que expresan una proteína Env mutante no fusogénica (células 522F/Y) se cocultivaron con células THP-1 [67]. La Fig. 12A ilustra el análisis de citometría de flujo de fusión entre células THP-1 y Env⁺ Jurkat, así como el efecto del péptido inhibidor de la fusión T-20. El curso de tiempo típico de fusión en cocultivos de 3 días se muestra

en la figura 12B. La mayor parte de la fusión tiene lugar después de 24 h de cocultivo, alcanzando un máximo a las 48 h. El péptido T-20 abrogó completamente la generación de células con fluorescencia mixta.

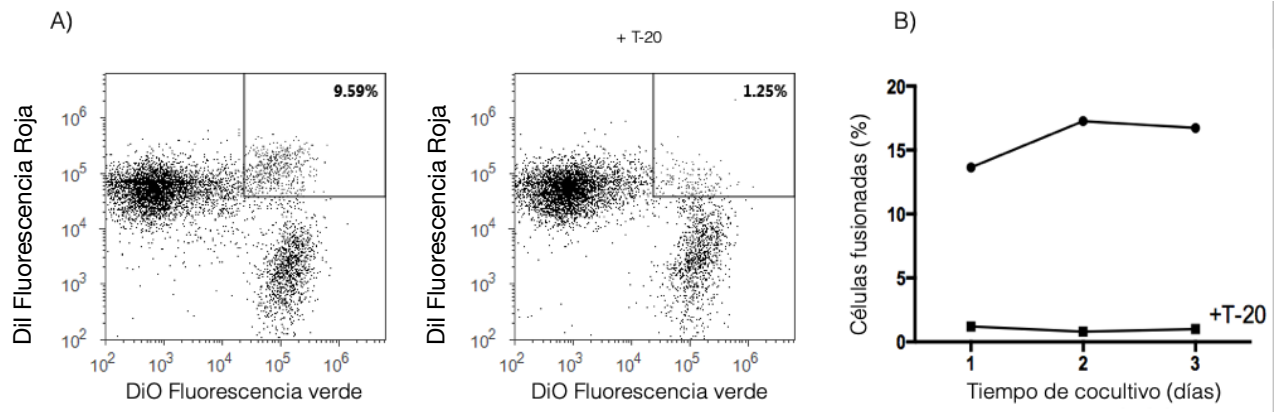


Figura 12. Análisis FACS de la fusión entre células THP-1 y Env⁺ Jurkat. A) Diagramas de puntos representativos de un cocultivo de 24 h de células THP-1 marcadas con Dil (rojo) con células Env⁺ Jurkat marcadas con DiO (verde). Está indicado el porcentaje de células con fluorescencia mixta, así como el efecto del inhibidor de la fusión del VIH-1 T-20 (derecha). B) Curso típico de tiempo de fusión entre células Dil-THP-1 y células Jurkat DiO-Env⁺ en ausencia (●) y presencia (■) de T-20.

Análisis de inmunofenotipificación

La expresión de marcadores de superficie linfoides y mieloides expresados por los heterocariones se determinó en diferentes puntos temporales en cocultivos de células Jurkat Env⁺ marcadas con DiO (DIO-Env) y con células THP-1 marcadas con Dil (Dil-THP-1), usando anticuerpos monoclonales conjugados con APC y dirigidos a los marcadores linfoides CD3 y CD28 y a los marcadores mieloides CD32 y CD68. La expresión de estos receptores en los heterocariones se comparó con su expresión en células que permanecieron sin fusionar en los mismos cocultivos. Además, dado que la incorporación continua de nuevas células (monocíticas o linfocíticas) en heterocariones ya formados podía evitar la estabilización del fenotipo, se añadió una concentración completamente inhibidora de T-20 a un grupo separado de pozos después de 24 h de cocultivo, y el fenotipo fue analizado en tiempos posteriores.

Los marcadores mieloides CD68 y CD32 se expresaron a niveles similares en heterocariones y en monocitos que permanecieron sin fusionar, tanto con respecto al

porcentaje de células positivas (un promedio de 82.8% y 84.5% de células CD32⁺, y 88.3% y 89% de células CD68⁺, de monocitos y heterocariones no fusionados en cocultivos de 48 h, respectivamente), como a su el nivel de expresión, determinado como el índice de fluorescencia media (MFI) (figura 13). Se observó una disminución en la expresión del receptor scavenger CD68 con el tiempo en heterocariones y en la población de células THP-1 no fusionadas, y por lo tanto esta disminución no se asoció con la fusión, sino al cocultivo con células Jurkat Env⁺. No tenemos una explicación para esta reducción, aunque los factores solubles producidos por las células Jurkat podrían afectar la supervivencia y la función de los monocitos [68]. En nuestro sistema, la disminución de CD68 no estaba relacionada con activación celular, ya que la población células de THP-1 no fusionadas no mostró cambios morfológicos ni expresión de CD11b.

Como se esperaba, los marcadores linfoides CD3 y CD28 presentaron una alta expresión en las células Env⁺ Jurkat no fusionadas, mientras que su expresión disminuyó claramente en los heterocariones, manteniéndose baja durante todo el tiempo de cocultivo (Fig. 13). La adición de T-20 a los cocultivos no modificó significativamente el patrón de expresión de los marcadores de superficie de los heterocariones, aunque produjo un nivel ligeramente más bajo de expresión de CD3 y CD28, tal vez debido al bloqueo de la incorporación de células Env⁺ adicionales en los heterocariones ya formados.

Por lo tanto, la expresión de marcadores mieloides y la disminución en la expresión de marcadores linfoides es una característica de los heterocariones linfocito-monocito.

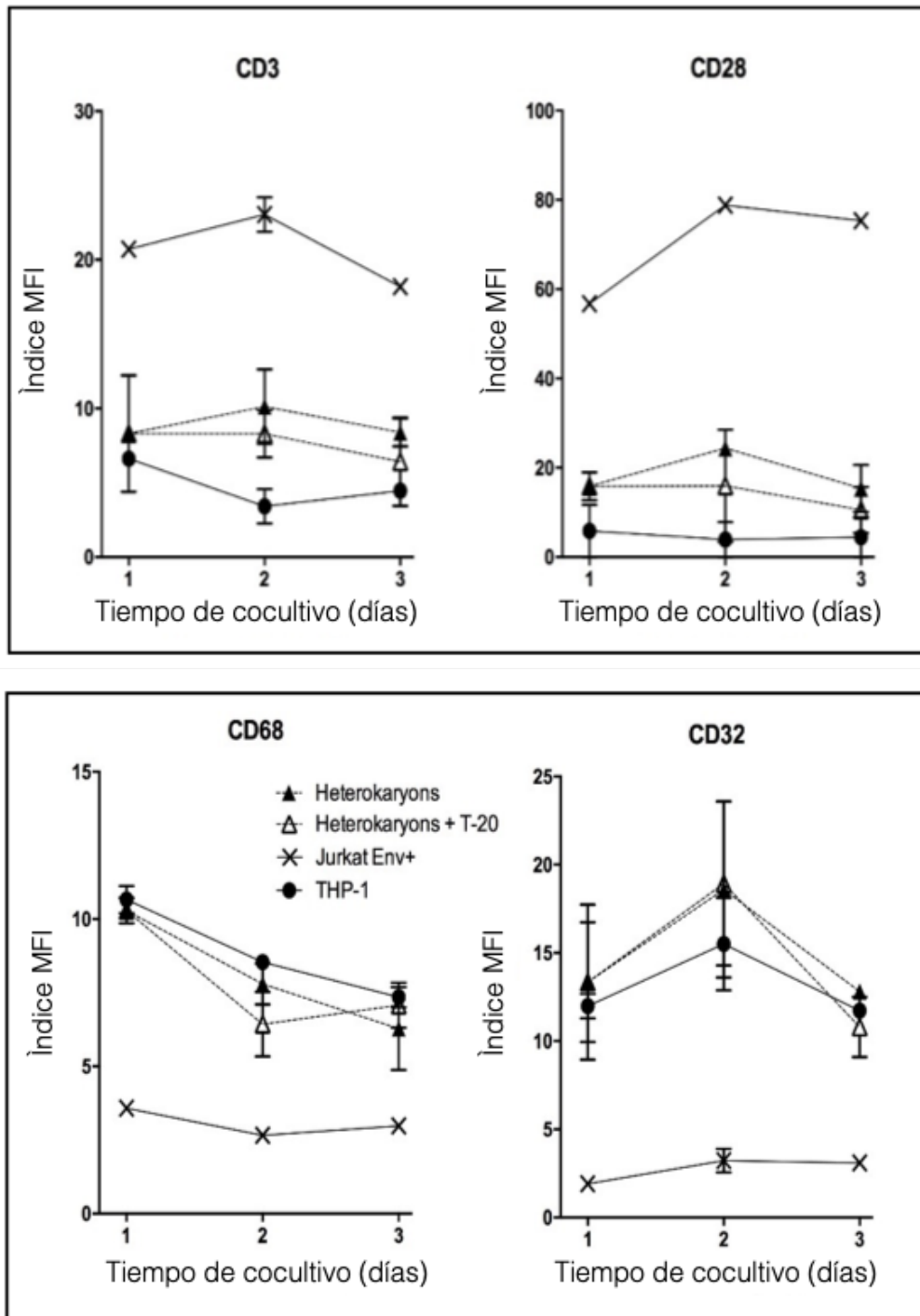


Fig. 13. Expresión de marcadores mieloides (A) y linfoides (B) en heterocariones y células no fusionadas en cocultivos de células DiI-THP-1 y DiO-Env + Jurkat. La expresión de los antígenos indicados se determinó en células con fluorescencia mixta (heterocariones) y en células fluorescentes verdes rojas únicas y únicas (células THP-1 y Env + Jurkat que permanecieron sin fusionar, respectivamente), usando anticuerpos monoclonales conjugados con APC y citometría de flujo. El índice de MFI está indicado.

Actividad fagocítica

Dada la conservación de los marcadores mieloides en los heterocariones, fue de interés determinar si estos conservaban las propiedades funcionales de las células THP-1 precursoras, particularmente fagocitosis mediada por los receptores Fc γ [69]. Esta función se examinó usando un ensayo de fagocitosis dependiente de Fc γ R por citometría de flujo de tres colores. Glóbulos rojos de carnero (SRBC) se biotinilaron y opsonizaron con IgG policlonal anti-SRBC, y posteriormente se marcaron con estreptavidina-APC. Los SRBC opsonizados y marcados con APC se añadieron a cocultivos de 48 horas de células Dil-THP-1 y DiO-Env⁺ Jurkat. Después de la incubación, los SRBC no internalizados se lisaron mediante choque hipotónico. El porcentaje de células con SRBC internalizados (células positivas para APC) se determinó mediante citometría de flujo en heterocariones, en células Dil-THP-1 que permanecen sin fusionar y en células Dil-THP-1 de control (monocultivo). Se encontró que aproximadamente el 50% de los heterocariones eran capaces de internalizar SRBC recubiertos con IgG (figura 14A), un porcentaje similar al de las células de control THP-1 control no cocultivadas (figura 14B). Los SRBC no opsonizados no fueron internalizados por heterocariones ni por células THP-1 no fusionadas, lo que confirma que la internalización estaba mediada por Fc γ R. La internalización de los eritrocitos opsonizados fue inhibida por la incubación previa de las células con citocalasina D, un potente inhibidor de la polimerización de actina. Además, se descartó la adhesión de SRBC a la membrana celular a través de Fc \ gamma R ya que no se observó fluorescencia de APC asociada con las células tras la incubación de células con eritrocitos opsonizados a 4°C. La fagocitosis de SRBC opsonizados también se observó mediante microscopía de fluorescencia (Fig. 15). Por lo tanto, además de la expresión estable de marcadores mieloides, la capacidad de los heterocariones para realizar la fagocitosis mediada por Fc γ R a niveles similares a los de las células monocíticas demuestra que mantienen un fenotipo monocítico.

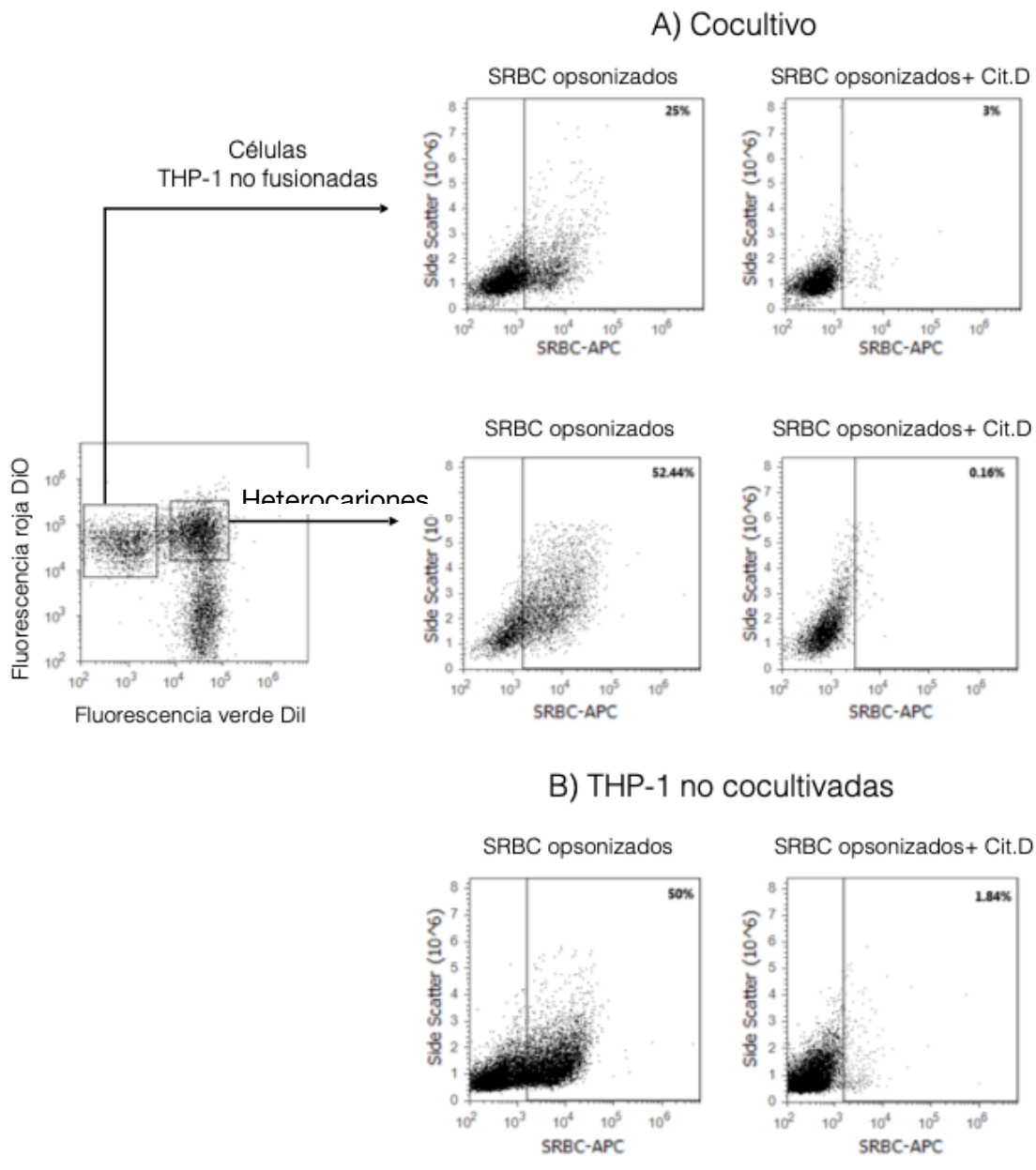


Fig. 14. Actividad fagocítica dependiente de FcγR de células THP-1 y heterocariones. Los glóbulos rojos de oveja (SRBC) que han sido biotinilados, opsonizados con IgG policlonal anti-eritrocito y marcados con estreptavidina-APC, se agregaron a cocultivos de células Dil-THP-1 y células DiO-Env + Jurkat o a Dil no cocultivado -THP-1 células. Después de la incubación, no se lisaron eritrocitos internalizados con un tampón hipotónico. La fluorescencia de APC se analizó mediante citometría de flujo en las poblaciones de células con fluorescencia mixta y rojas simples, para células THP-1 que permanecieron sin fusionar y heterocariones, respectivamente (A), y en células THP-1 no cocultivadas (B). Se muestra el porcentaje de células con eritrocitos internalizados en ausencia o presencia de citocalasina D.

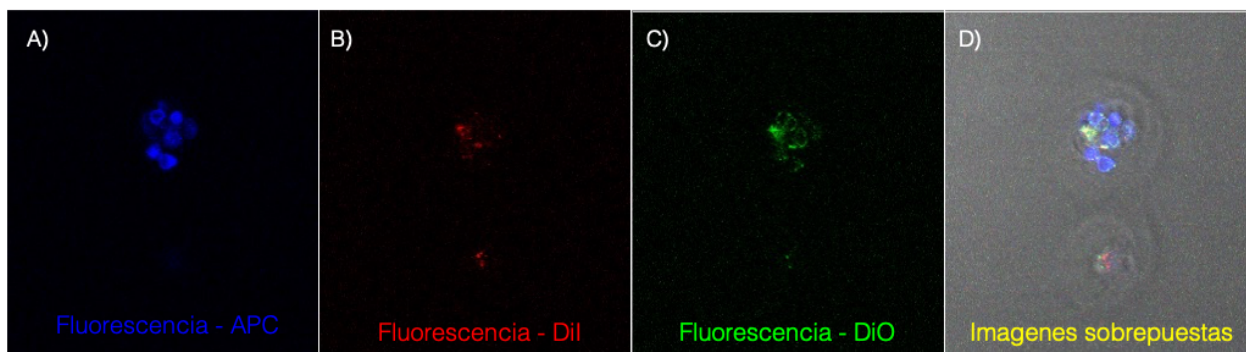


Fig. 15. Ejemplo del aspecto microscópico de la fagocitosis de glóbulos rojos ovinos opsonizados y fagocitados por un heterocarion. El ensayo de fagocitosis se realizó en células cocultivadas DiI-THP-1 y DiO Jurkat Env⁺ como se describe en la leyenda de la figura 3. Las imágenes microscópicas del mismo campo muestran la fluorescencia roja del DiI (A) y la fluorescencia verde del DiO (B) en dos heterocariones proximales. Solo la célula de la parte superior ha engullido eritrocitos marcados con APC, que se muestra en azul (C). (D) Combinación en el campo claro. Ampliación, x1000.

Análisis de la morfología de los heterocariones

La inducción de la diferenciación de células THP-1 a macrófagos utilizando agentes tales como PMA o vitamina D3 produce cambios en la morfología y la adherencia de las células al fondo de los pozos de cultivo [70]. En el curso de experimentos de fusión entre células THP-1 y Jurkat Env⁺ observamos de forma consistente la presencia de células alargadas en el fondo de los pozos de la placa de cultivo en ausencia de un estímulo de activación. Tal cambio en la morfología celular no se observó en cocultivos de THP-1 con células no fusogénicas Env⁺ Jurkat (células 522 F / Y) (Fig. 16), por lo que supusimos que el cambio morfológico de las células se realiza solo cuando hay fusión y no solo cuando las células THP-1 se cocultivan con las células Jurkat Env⁺.

Para determinar el efecto de la fusión en la morfología celular, se contó mediante microscopía de fluorescencia el número de heterocariones (células con fluorescencia mixta) con morfología alterada. Los heterocariones mostraron tamaño y morfología heterogéneos, algunos siendo pequeños y redondos o agrandados y redondos, y otros alargados y con proyecciones. Aproximadamente la mitad de las células con

fluorescencia mixta (54,3%) mostraron cambios morfológicos con muchas similitudes a macrófagos. Las células con morfología alterada no se observaron en presencia del inhibidor de fusión T-20 (Fig. 17).

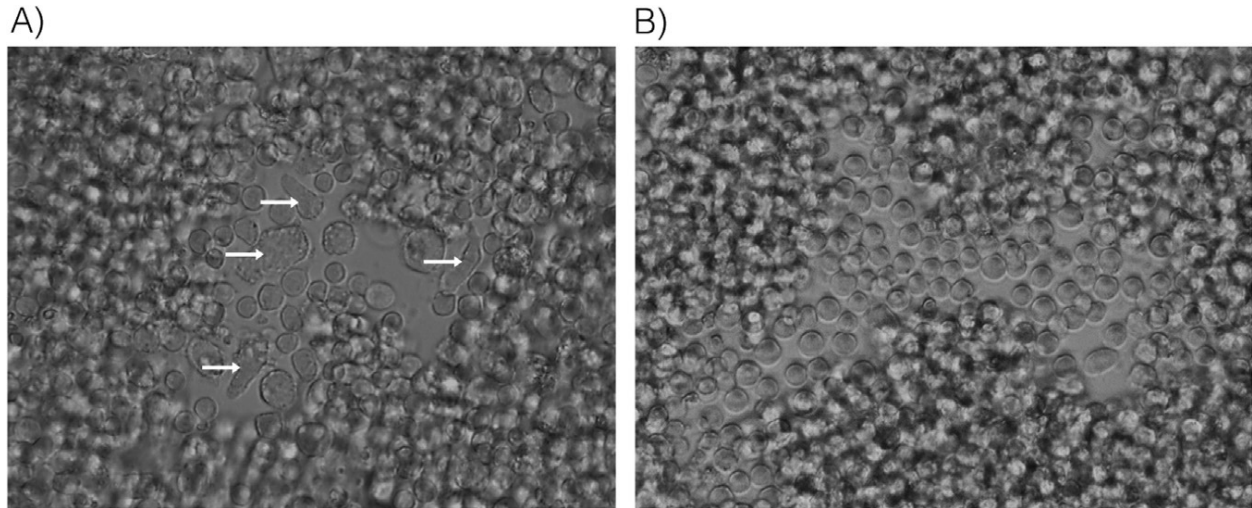
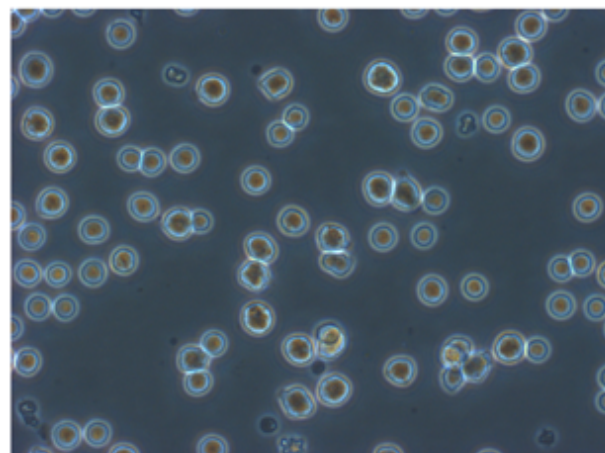
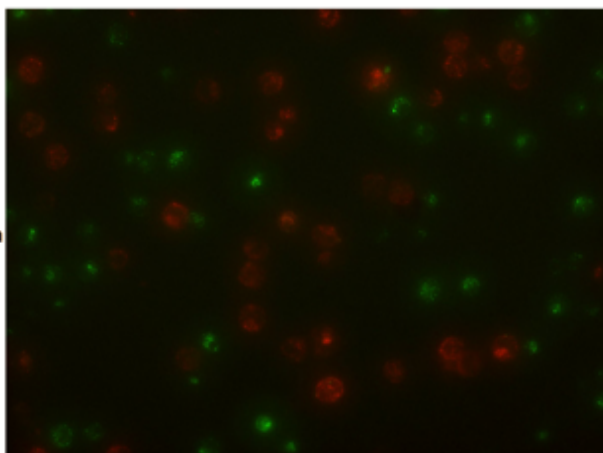


Fig. 16. Efecto del cocultivo de las células THP-1 y Env⁺ Jurkat sobre la morfología celular. Las células THP-1 se cocultivaron con A) células Env⁺ Jurkat o B) células Jurkat no fusogénicas 522 F / Y Env⁺ durante 24 h. Las flechas indican celdas con morfología alterada. Ampliación, x200.

Fluorescencias verde y roja

Campo claro

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



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

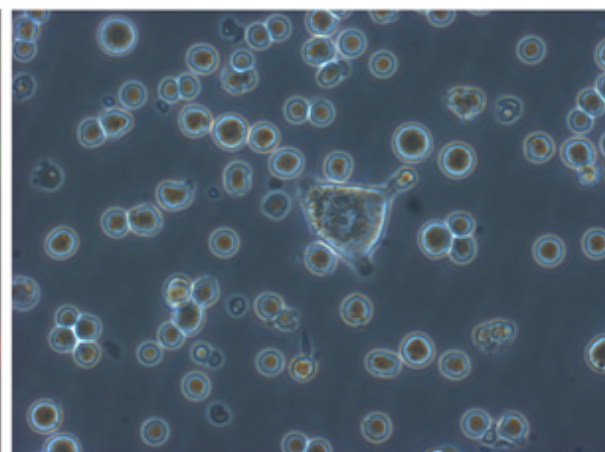
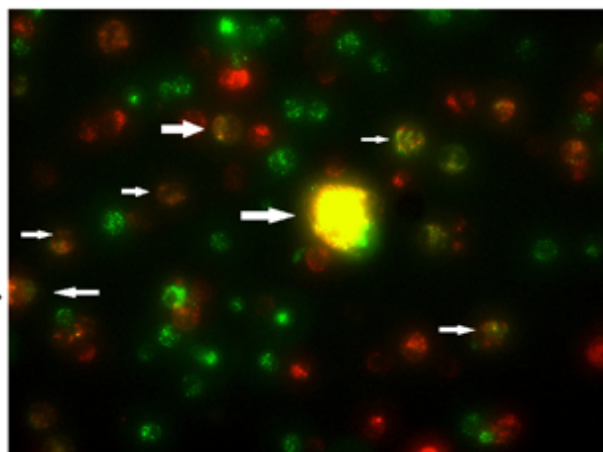
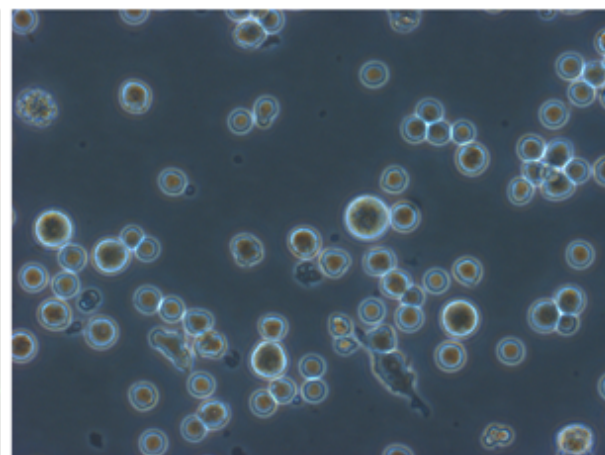
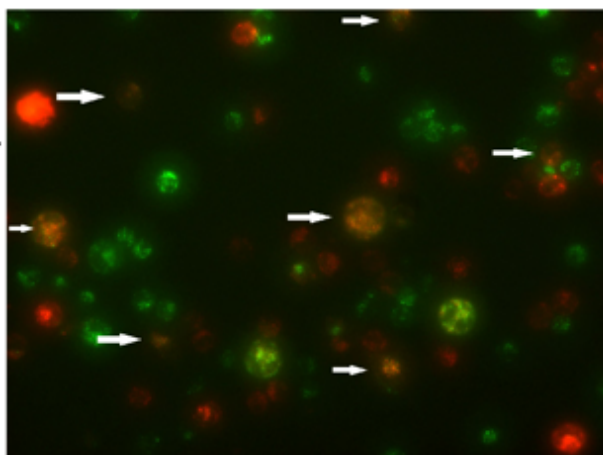


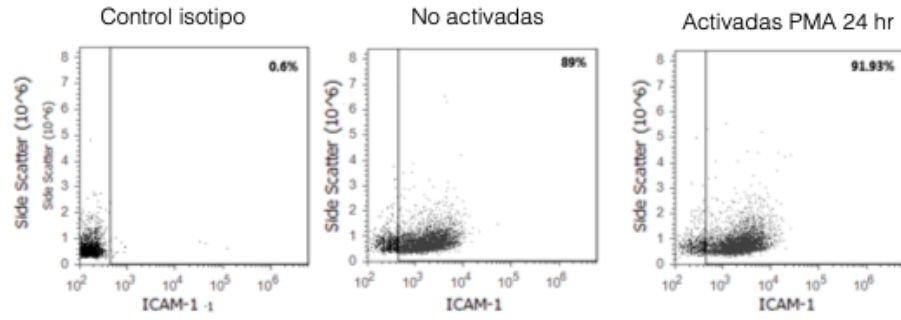
Fig. 17. Análisis por microscopía de fluorescencia del cambio morfológico de los heterocariones. Las flechas señalan los heterocariones con cambios visibles.

Expresión de ICAM-1 en respuesta a la estimulación de PMA

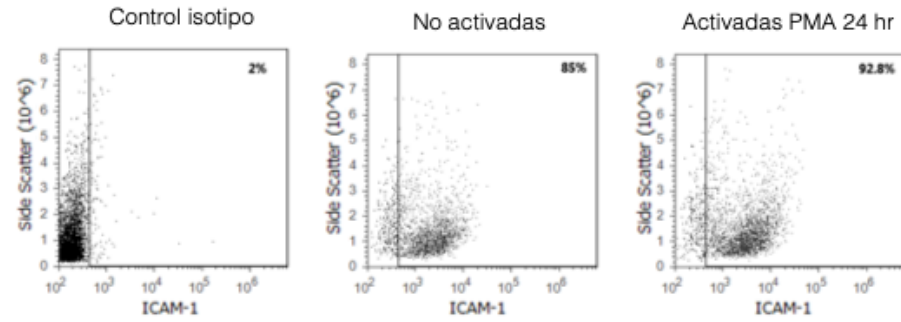
El aumento de la expresión de ICAM-1 constituye una característica general del proceso de activación de monocitos. La capacidad de los heterocariones para responder a la activación se probó usando la estimulación con forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), un potente inductor de la activación de monocitos. Entre otros eventos, PMA promueve la expresión mejorada de ICAM-1 en células THP-1 [60]. Se añadió PMA a cocultivos de 24 h y se determinó la expresión de ICAM-1 en monocitos y heterocariones no fusionados 24 h después. ICAM-1 se expresó en ambas células THP-1 que permanecieron sin fusionar y en heterocariones en ausencia de activación; tras la activación con PMA, el porcentaje de células que expresan ICAM-1 aumentó en ambos tipos de células (Fig. 18A), así como en células THP-1 no cocultivadas (Fig. 18B). La intensidad media de fluorescencia, que es una medida relativa de la densidad de las moléculas en la superficie celular, también aumentó a niveles similares en THP-1 y heterocariones, lo que demuestra que los heterocariones conservan la capacidad de expresar niveles óptimos de ICAM-1 tras la activación.

A) Cocultivo

Células THP-1 no fusionadas



Heterokariones



B) Células THP-1 (no cocultivadas)

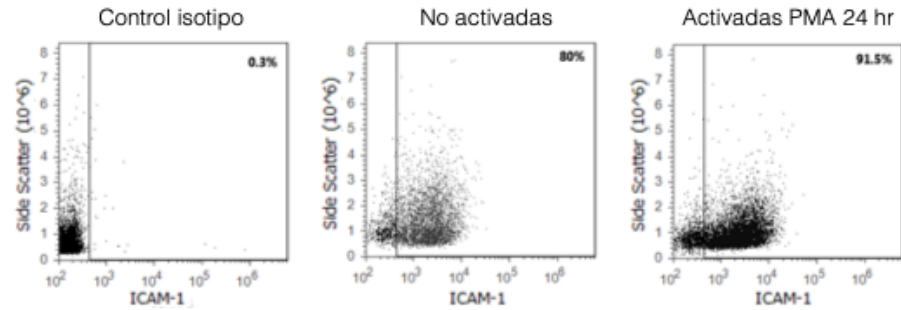


Fig. 18. (A) Expresión de ICAM-1 en células de cocultivos de células DiI-THP-1 y DiO-Env + Jurkat, con o sin estimulación de 24 h con PMA (15 nM). La expresión de ICAM-1 en células THP-1 que permanecieron sin fusionar y heterokariones se determinó en las poblaciones de células rojas y con fluorescencia mixta, respectivamente usando un anticuerpo monoclonal anti-ICAM-1 APC-conjugado .

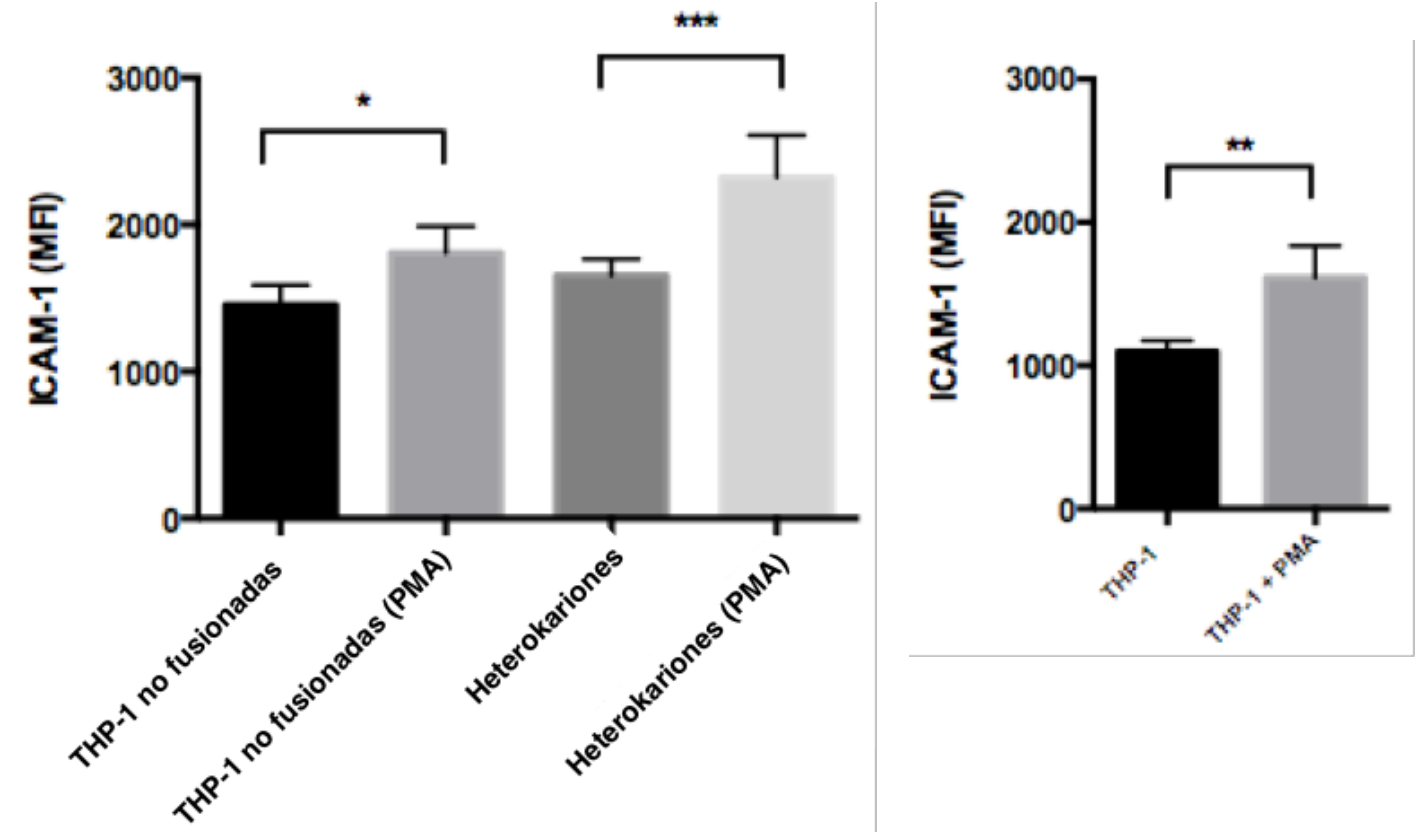


Fig. 19. (B) Expresión de ICAM-1 en células DiI-THP-1 no cocultivadas. Los histogramas muestran el índice de intensidad de fluorescencia media (MFI) de las células ICAM-1⁺ de tres experimentos.

Expresión de CD11b

Dado que la morfología de los heterocariones nos sugirió posibles eventos de activación, examinamos la expresión del antígeno CD11b, un marcador de activación/diferenciación de monocitos, en los heterocariones y en células THP-1 que permanecieron sin fusionar, usando un anticuerpo monoclonal anti-CD11b conjugado con APC. La Fig. 20A muestra que la expresión de CD11b fue consistentemente detectada en un promedio de 41% de heterocariones en ausencia de agentes de activación. Notablemente, CD11b no se expresó por monocitos que quedaban sin fusionar en los mismos cocultivos (Fig. 20A, gráfica del medio superior), lo que indica que la expresión de CD11b se indujo por la fusión y no por la presencia de las células Jurkat Env⁺. El tratamiento con PMA aumentó aún más la expresión de CD11b en los heterocariones (Fig. 20A). El nivel de expresión de CD11b en heterocariones en ausencia de PMA fue similar al de las células THP-1 tratadas con PMA no co-cultivadas (figura 20B). La Fig. 20 también muestra que los heterocariones que expresan CD11b tienen una complejidad celular incrementada (evaluada por el parámetro SSC), consistente con un fenotipo activado. La expresión de CD11b y el aumento de la complejidad celular en heterocariones en ausencia de agentes de activación externos sugieren que la fusión por si sola es un estímulo para la activación de heterocariones.

Env actúa como un patrón molecular asociado a patógenos virales (PAMP) para TLR2 y TLR4, y se ha reportado que los monocitos humanos y las células dendríticas derivadas de monocitos (MDC) contienen TLR2 y TLR4 intracelulares y funcionales [71], [72]. Por lo tanto, probamos el efecto de la inhibición de la señalización intracelular inducida por estos receptores sobre la expresión de CD11b en heterocariones. Utilizamos un péptido que contiene una secuencia de bloqueo de la molécula adaptadora asociada a TLR TIRAP, TLR2 y TLR4. El péptido contiene una secuencia antenapedia que permite que la molécula completa penetre en las células [73], por lo cual se utilizó también un péptido que contenía solamente la secuencia antenapedia como control negativo. Tanto el péptido inhibidor de TIRAP como el péptido control se añadieron separadamente a células THP-1 una hora antes de la adición de las células Env⁺ y se mantuvieron durante el cocultivo.. El péptido inhibidor TIRAP redujo en gran medida la expresión de CD11b

en heterocariones (figura 9). El péptido control tuvo un efecto mínimo en la expresión de CD11b, lo que indica que la interacción intracelular de Env con TLR2 / TLR4 participa en el fenotipo de diferenciación de heterocariones.

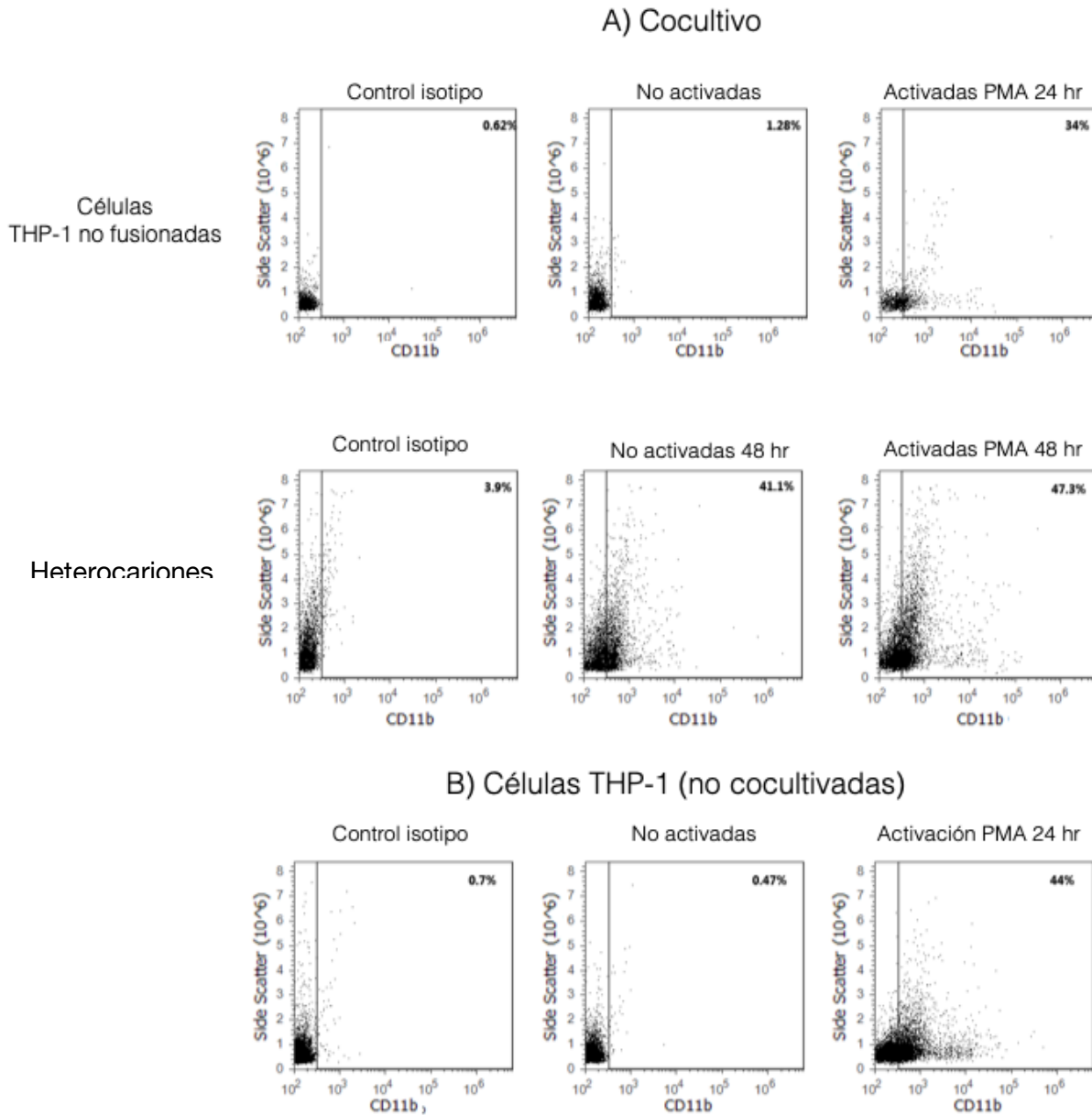


Fig. 20. Expresión de CD11b en cocultivos de células, durante 24 h o 48h de estimulación del cocultivo con o sin PMA (15 nM). A) La expresión de CD11b en células THP-1 que permanecieron sin fusionar y heterocariones se determinó en las poblaciones de células rojas y con fluorescencia mixta, respectivamente (como se muestra en la Fig. 3) usando un anticuerpo monoclonal anti-CD11b conjugado a APC. B) Expresión de CD11b en células THP-1 en monocultivo.

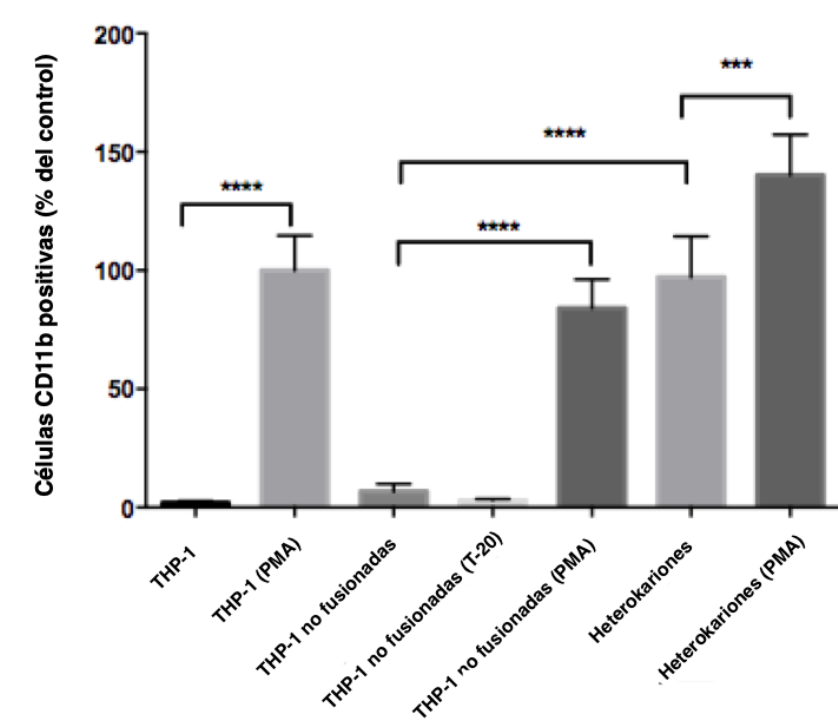


Fig. 21. Expresión de CD11b en células DiI-THP-1 no cocultivadas. Resumen de resultados de tres experimentos. Los datos se presentan como el porcentaje medio \pm SE. relativo a las células CD11b⁺ THP-1 estimuladas con PMA.

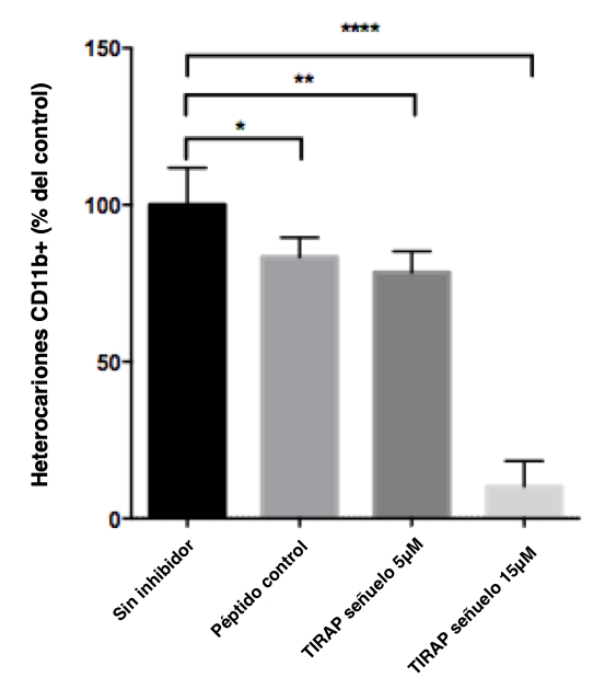


Fig. 22. Efecto del inhibidor de TIRAP NBP2-26245 sobre la expresión de CD11b por heterocariones. La expresión de CD11b se determinó en la población de células con fluorescencia mixta, como se muestra en la Fig. 3. Los datos se presentan como el porcentaje medio \pm es.e. con respecto a heterocariones CD11b⁺ en ausencia de inhibidor.

Fusión entre células THP-1 y linfocitos T CD4⁺ primarios inducida por partículas virales.

En los experimentos previos se utilizó un modelo de células Jurkat transfectadas con el gene env, lo cual les permite expresar las proteínas de fusión del VIH en su membrana y fusionarse con células monocíticas THP-1. En esta sección se describe que partículas infecciosas del VIH-1 pueden inducir la fusión entre las células THP-1 y linfocitos T CD4⁺ purificados de la sangre de donadores sanos.

Se ha reportado que las partículas libres de VIH-1 tienen la capacidad de mediar fusión de células adyacentes no infectadas *in vitro* (63) mediante el mecanismo de fusión “desde afuera” (o FFWO, por “fusión from without”), el cual implica la fusión simultánea del virus con células CD4⁺ adyacentes. Para analizar si las partículas de VIH-1 pueden inducir la formación de heterocariones, utilizamos 5 millones de partículas de la cepa viral IIIB en cocultivos con un número total de 1 millón de células, la mitad siendo linfocitos marcados con DiO, y la mitad células THP-1 marcadas con Dil.

A las 24 horas de cocultivo observamos la presencia de células con fluorescencia mixta por citometría de flujo. Una concentración alta de citocalacina-D, un inhibidor de la polimerización de actina, inhibió en 50% la formación de estas células. Esto nos sugiere que la mitad de las fusiones obtenidas a las 24 horas podrían formarse por FFWO, mientras que las fusiones que no son sensibles a Cit-D podrían formarse por FFWI. Además, la fusión fue inhibida totalmente con el inhibidor T-20, mostrando que las partículas con fluorescencia mixta efectivamente se formaron por la actividad de Env (figura 23).

Los cocultivos fueron observados por microscopía de fluorescencia para confirmar la fusión de manera visual. Además de observar la fluorescencia verde y roja aportada por las células parentales, la tinción de los núcleos con HOECHST mostró que las células con fluorescencia mixta contuvieron varios núcleos, confirmando la formación de heterocariones. Estas observaciones fueron concordantes con los resultados obtenidos por citometría de flujo.

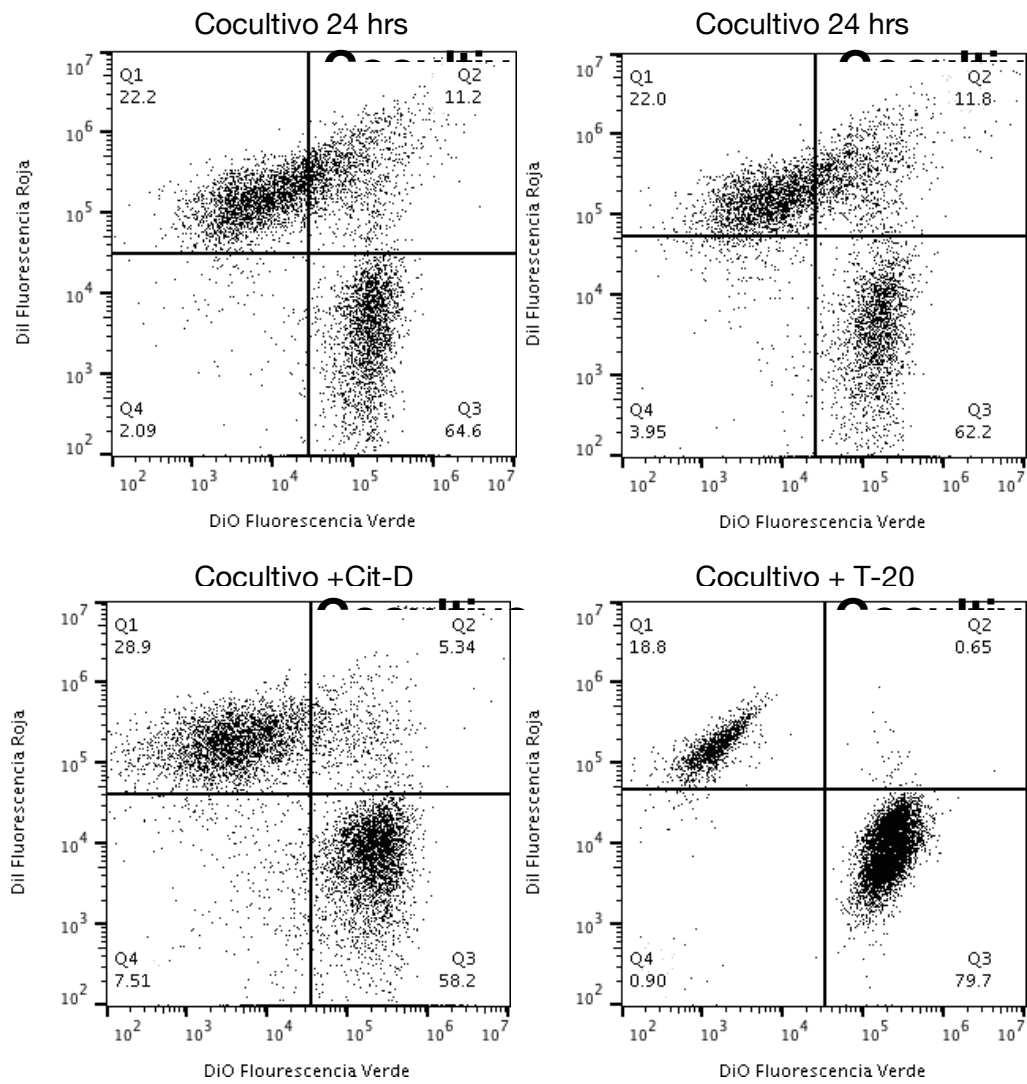


Fig. 23. Análisis por citometría de flujo de la formación de heterocariotes inducida por partículas libres de VIH-1 (superior derecha y superior izquierda). Inhibición de la fusión por Cit-D (inferior izquierda) y por T-20 (inferior derecha).

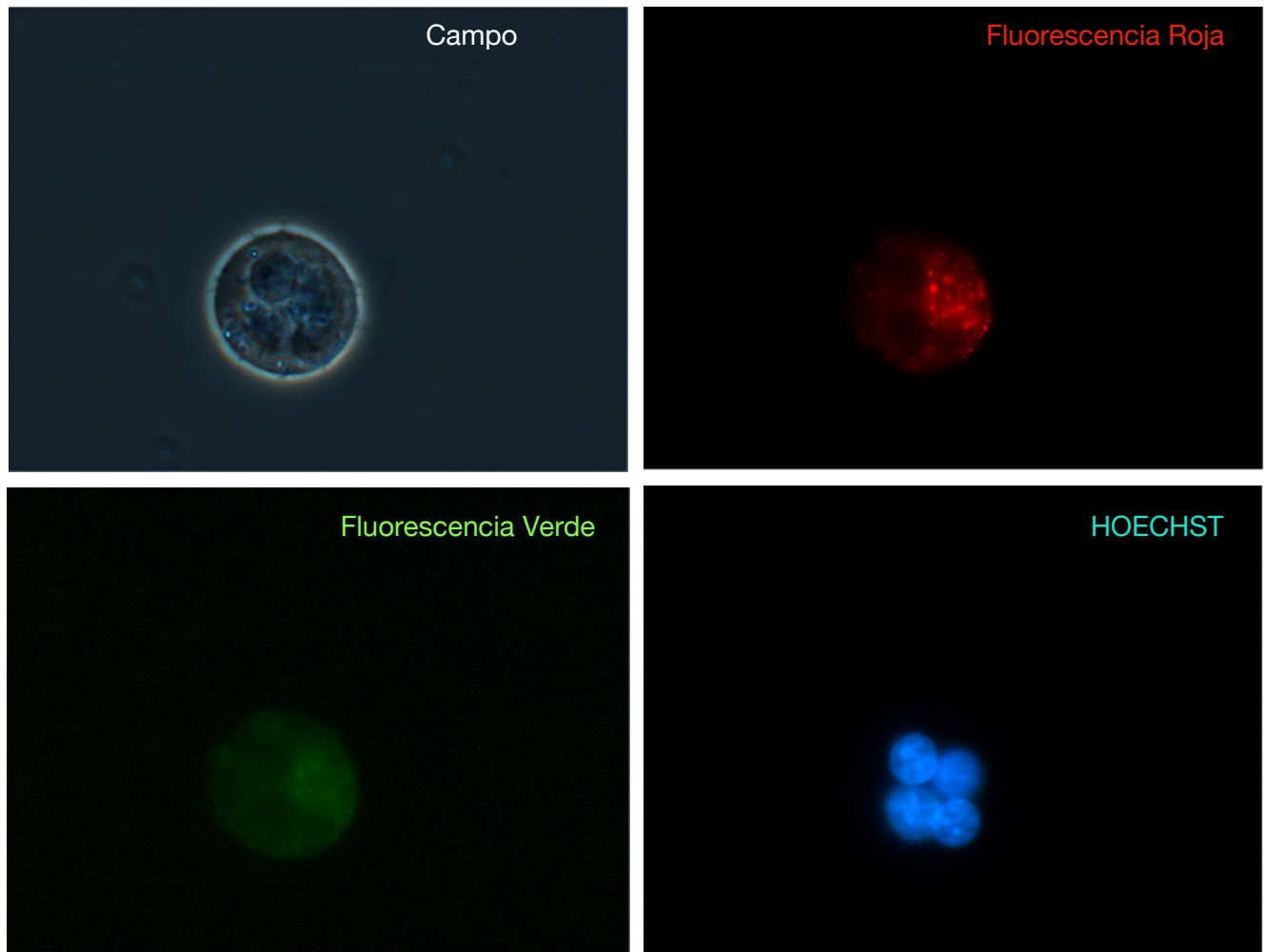


Fig. 24. Fotografías de microscopía de fluorescencia de un heterocarión inducido por partículas de VIH-1.

Los resultados anteriores nos demuestran que las partículas virales libres pueden inducir fusión de linfocitos purificados de donadores sanos y células monocíticas THP-1 desde tiempos cortos (24 horas) y nos sugieren que la fusión de estas células podría ocurrir por FFWI y FFWO.

Discusión de resultados y conclusiones

La fusión celular inducida por el VIH-1 es un fenómeno que ha sido ampliamente observado en cultivos *in vitro* y en tejidos de pacientes afectados por el virus. Existen pocos estudios sobre el papel funcional de estas células y aún se desconoce el origen y la función de las células mieloides multinucleadas en la infección por VIH-1.

Las entidades multinucleadas tales como los sincicios y heterocariones inducidos por el VIH-1, han sido considerados como subproductos de la replicación del virus *in vitro*, o bien como eventos ocasionales en tejidos de individuos infectados. Sin embargo, estudios cuantitativos de la fusión celular por citometría de flujo efectuados previamente en nuestro laboratorio, mostraron que la fusión célula-célula genera productos heterogéneos en cuanto a su composición celular [66]. Es factible entonces que la heterogeneidad estructural sea una fuente de heterogeneidad funcional entre los productos de la fusión. Así, las células fusionadas podrían manifestar funciones distintas a las de las células de origen individuales, y/o además servir como sitios de replicación del virus.

La relevancia de la formación de policariones durante la infección por el VIH-1 se reveló en estudios tempranos que mostraron la asociación entre la presencia de células multinucleadas infectadas y una alta replicación viral en el cerebro y ganglios linfáticos [8], [26]–[28]. Recientemente, utilizando la tinción intravital de los ganglios linfáticos de ratones humanizados infectados con el VIH-1 [31], mostraron que una fracción significativa de células infectadas estaba compuesta por sincicios pequeños de células T que además eran altamente móviles, sugiriendo que estas formaciones contribuyen a la diseminación del virus. Posteriormente, los mismos autores mostraron que los sincicios migratorios pueden generarse *in vitro* en matrices de hidrogel, en donde pueden interactuar transitoriamente con células no infectadas a las cuales pueden transferir el virus rápidamente [32]. Estos estudios han vuelto a poner en relieve un posible papel significativo de las células fusionadas en la replicación y diseminación viral. Aún quedan por investigar aspectos cruciales de la biología de estas células, como lo son las distintas

formas y funciones que pueden adoptar y su sensibilidad a las drogas antivirales actuales.

En nuestro laboratorio se demostró que las proteínas de fusión del VIH-1 expresadas por células Jurkat podían mediar la fusión de éstas con células monocíticas de la línea THP-1. Los heterocariones formados por las células THP-1 y Env⁺ perdían propiedades funcionales de los linfocitos, es decir, la capacidad de expresar la cadena IL2R-alfa (CD25) y la IL-2 intracelular con estimulación por PMA [49]. El presente trabajo de investigación reporta evidencia de la expresión estable de los marcadores mieloides aportados por los monocitos precursores y de funciones de monocito, como la actividad fagocítica dependiente de FcγR y el aumento de la expresión de ICAM-1 tras la estimulación con PMA. Estas observaciones confirman que el fenotipo de monocito es predominante en los heterocariones formados por los linajes mieloides y linfoides.

También observamos que los heterocariones presentaban un fenotipo similar al de monocitos activados, el cual se manifestó como cambios morfológicos, aumento de la complejidad celular y expresión del marcador de activación CD11b en ausencia de estimulación, lo cual indica que la fusión por sí sola funge como un estímulo para la activación de los heterocariones.

CD11b es la subunidad α de CR3 (integrina αM-β2, Mac-1, receptor de complemento 3), y se expresa en los monocitos humanos activados y células dendríticas en sangre (78). CD11b es expresado por células THP-1 tras la estimulación con PMA, 1,25-dihidroxi-vitamina D3 (VD3), o con lipoproteína de baja densidad oxidada [74]–[76] y es importante para la adhesión de células THP-1 a endotelio [77]. Observamos que los heterocariones mantuvieron la expresión de los marcadores mieloides CD32 y CD68, mientras que aproximadamente la mitad de ellos mantuvieron su actividad fagocítica, presentaron cambios morfológicos y expresaron CD11b sin estimulación externa. La expresión de marcadores mieloides, la capacidad fagocítica y la expresión de ICAM-1 por los heterocariones fueron similares a las de las células de THP-1 no cocultivadas, lo que indica que el fenotipo mieloides se conservó establemente después de la fusión. Del

mismo modo, la expresión de CD11b en los heterocariones no estimulados fue similar a la expresión de CD11b en células THP-1 estimuladas con PMA.

Se ha reportado que la interacción de gp120 soluble con receptores de quimiocinas induce eventos de señalización en monocitos, macrófagos derivados de monocitos y células dendríticas inmaduras derivadas de monocitos [78]. gp120 también estimula la producción de IL-10 y una reducción de la síntesis de IL-12 por parte de la población de monocitos en PBMC [79], [80]. En vista de estos hallazgos, se esperaría que las células THP-1 experimentaran activación en respuesta al contacto con Env expresado por células Jurkat en ausencia de fusión. Sin embargo, en nuestro estudio, no observamos cambios morfológicos, aumento de la complejidad celular o expresión de CD11b cuando las células THP-1 se cocultivaron con células Jurkat que expresan la subunidad gp120 junto con una proteína no fusogénica gp41-mutante, ni cuando el inhibidor de fusión T-20 estaba presente en cocultivos (T-20 se une a gp41 y por lo tanto no bloquea gp120). Estas observaciones indican que la activación de los heterocariones no fue inducida por la interacción con la proteína Env HIV-1 en células Jurkat, ni por factores solubles liberados en el medio. En cambio, el fenotipo monocito diferenciado de heterocariones fue compatible con interacciones moleculares a nivel intracelular después de la fusión.

Estudios han demostrado que los monocitos humanos y las células dendríticas derivadas de monocitos (MDC) contienen TLR2 y TLR4 intracelulares asociados con el aparato de Golgi y los microtúbulos [51], [70], [81]–[88], [71]–[76], [79], [80]. Estos receptores intracelulares mostraron ser funcionales, ya que la alteración de su expresión en MDC inhibió la producción de IL-12 después de la fagocitosis de la bacteria *N. meningitidis* [71]. La funcionalidad de TLR4 intracelular en respuesta a LPS también se ha descrito en células endoteliales humanas [72] y en células epiteliales intestinales murinas [80]. En el último caso, se encontró TLR4 a altas concentraciones en el aparato de Golgi.

El complejo Env actúa como un patrón molecular asociado a patógenos virales (PAMP) para TLR2 y TLR4 [80], [89]–[91]. Notablemente, la señalización a través de la interacción Env-TLR en la superficie celular requiere la presencia de sulfatos de heparan (HS) en el epitelio genital [37]. En nuestro estudio, el requisito de HS puede explicar la

falta de activación de las células THP-1 solo por contacto con Env expresado en células Jurkat, ya que, a diferencia de los macrófagos diferenciados, las células THP-1 y los monocitos circulantes contienen niveles muy bajos de HS en su superficie [92]. Sin embargo, el precursor de Env glicosilado (gp160) transita en la red trans-Golgi, donde los oligosacáridos adquieren modificaciones complejas antes de que gp160 sea procesado por proteasas y transportado a la membrana plasmática [93].

Por lo tanto, los contactos intracelulares entre el precursor Env y TLR2 y/o TLR4 en los compartimentos de Golgi pueden inducir señales que inducen eventos de activación en los heterocariones. Nuestras observaciones muestran que la inhibición específica de la señalización de TLR 2/4 a través del bloqueo de la proteína adaptadora TIR (TIRAP) inhibió la expresión del marcador de activación CD11b por heterocariones. Puede proponerse que la fusión conduciría eventualmente a la detección de Env por TLR2 / 4 en los compartimentos de Golgi. Entonces, el dominio TIR citosólico de TLR2 / 4 podría reclutar proteínas que contienen el dominio TIR citoplásmico, tales como MyD88, TIRAP, TRIF y TRAM. Junto con las ligasas E3 de la familia TRAF, estos adaptadores inducen la cascada de señalización que conduce a la expresión de genes implicados en la activación de monocitos [94]. Aunque las vías particulares implicadas en la activación de los heterocariones necesitan analizarse más a fondo, se sabe que la expresión de CD11b es dependiente de PI3K en células THP-1 [40], y que la activación de TLR4 y TLR2 puede inducir la fosforilación de PI3K y Akt. a través de MyD88 [3], [95]. Las redes intracelulares de las rutas PI3K/AKT y MAPK también regulan la producción de citocinas proinflamatorias como IL-23 e IL-12 [96]. Varios informes han documentado una marcada disminución en la producción de IL-12 por monocitos, macrófagos y células dendríticas de pacientes infectados por VIH después de la estimulación con una variedad de agentes [97]. Por otro lado, IL-23 es esencial para el control de patógenos durante la infección por VIH, mientras que también puede estar involucrado en la inmunopatogenia del SIDA [98].

Estos hallazgos destacan la necesidad de un trabajo adicional orientado al análisis del resultado de la activación de monocitos por fusión con linfocitos T a través de la proteína de la envoltura del VIH.

Nuestras observaciones implican que la fusión de monocitos con células T a través del complejo Env puede llevar a la formación de células multinucleadas en la infección por VIH-1. El predominio del fenotipo mieloide podría ser un obstáculo en la identificación de eventos de fusión por marcadores de superficie en biopsias de pacientes infectados.

Cuando analizamos la formación de heterocariones por partículas virales libres, observamos que se formaron heterocariones a las 24 horas. En nuestra experiencia con ensayos de infección, 24 horas es considerado un tiempo corto en el cual hay poco nivel de infección cuando utilizamos células linfocíticas blanco. Al utilizar el inhibidor de polimerización de actina Cit-D observamos que el nivel de fusión fue inhibido al 50%. Esto nos sugiere que al menos la mitad de las fusiones inducidas por el VIH-1 a las 24 horas podrían ser fusiones formadas por FFWO. Para corroborar esta posibilidad es necesario realizar estudios posteriores con Inhibidores de la replicación viral como transcriptasa reversa e integrasa virales. De esta manera podríamos confirmar que los heterocariones formados se deben exclusivamente a la actividad de partículas virales libres y no de proteínas Env expresadas en células infectadas.

En resumen, las proteínas Env del VIH-1 median en la fusión de células linfoides y monocíticas, formando heterocariones con un fenotipo predominantemente mieloide, como lo indica la expresión de marcadores de superficie y pruebas funcionales. La fusión induce eventos de diferenciación de monocitos que están mediados por la interacción de Env con TLR4 y / o TLR2 intracelular, proporcionando un mecanismo de activación de monocitos que no podría ser inducido por interacciones a nivel superficial.

En conclusión, los resultados reportados en esta tesis nos sugieren que el VIH-1 es capaz de inducir fusión entre linfocitos y monocitos, y que el fenotipo de los heterocariones resultantes es fundamentalmente mieloide. De forma importante, la fusión en sí induce diferenciación en los heterocariones en ausencia de estímulos de activación. Los heterocariones con un fenotipo de monocito activado, podrían formarse *in vivo* y tener consecuencias funcionales en la patogénesis del VIH-1, contribuyendo al ambiente crónicamente activado de los pacientes infectados con el virus.

Bibliografía

- [1] V. Horsley, K. M. Jansen, S. T. Mills, and G. K. Pavlath, "IL-4 acts as a myoblast recruitment factor during mammalian muscle growth.," *Cell*, vol. 113, no. 4, pp. 483–494, May 2003.
- [2] B. Huppertz, C. Bartz, and M. Kokozidou, "Trophoblast fusion: fusogenic proteins, syncytins and ADAMs, and other prerequisites for syncytial fusion.," *Micron*, vol. 37, no. 6, pp. 509–517, 2006.
- [3] M. Alvarez-Dolado, R. Pardal, J. M. Garcia-Verdugo, J. R. Fike, H. O. Lee, K. Pfeffer, C. Lois, S. J. Morrison, and A. Alvarez-Buylla, "Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes.," *Nature*, vol. 425, no. 6961, pp. 968–973, Oct. 2003.
- [4] K. Matsuura, H. Wada, T. Nagai, Y. Iijima, T. Minamino, M. Sano, H. Akazawa, J. D. Molkentin, H. Kusanuki, and I. Komuro, "Cardiomyocytes fuse with surrounding noncardiomyocytes and reenter the cell cycle.," *J. Cell Biol.*, vol. 167, no. 2, pp. 351–363, Oct. 2004.
- [5] F. D. Camargo, R. Green, Y. Capetanaki, K. A. Jackson, and M. A. Goodell, "Single hematopoietic stem cells generate skeletal muscle through myeloid intermediates.," *Nat. Med.*, vol. 9, no. 12, pp. 1520–1527, Dec. 2003.
- [6] N. Rodic, M. S. Rutenberg, and N. Terada, "Cell fusion and reprogramming: resolving our transdifferences.," *Trends Mol. Med.*, vol. 10, no. 3, pp. 93–96, Mar. 2004.
- [7] C. N. Scanlan, J. Offer, N. Zitzmann, and R. A. Dwek, "Exploiting the defensive sugars of HIV-1 for drug and vaccine design.," *Nature*, vol. 446, no. 7139, pp. 1038–1045, Apr. 2007.
- [8] H. Kido, K. Kamoshita, A. Fukutomi, and N. Katunuma, "Processing protease for gp160 human immunodeficiency virus type I envelope glycoprotein precursor in human T4+ lymphocytes. Purification and characterization.," *J. Biol. Chem.*, vol. 268, no. 18, pp. 13406–13413, Jun. 1993.
- [9] D. Duelli and Y. Lazebnik, "Cell fusion: a hidden enemy?," *Cancer cell*, vol. 3, no. 5. United States, pp. 445–448, May-2003.
- [10] D. Duelli and Y. Lazebnik, "Cell-to-cell fusion as a link between viruses and

- cancer.," *Nature reviews. Cancer*, vol. 7, no. 12. England, pp. 968–976, Dec-2007.
- [11] A. Vignery, "Macrophage fusion: the making of osteoclasts and giant cells.," *J. Exp. Med.*, vol. 202, no. 3, pp. 337–340, Aug. 2005.
- [12] J. T. Kimata, L. Kuller, D. B. Anderson, P. Dailey, and J. Overbaugh, "Emerging cytopathic and antigenic simian immunodeficiency virus variants influence AIDS progression.," *Nat. Med.*, vol. 5, no. 5, pp. 535–541, May 1999.
- [13] H. M. Blau and B. T. Blakely, "Plasticity of cell fate: insights from heterokaryons.," *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 10, no. 3, pp. 267–272, Jun. 1999.
- [14] B. M. Ogle, M. Cascalho, and J. L. Platt, "Biological implications of cell fusion.," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 6, no. 7, pp. 567–575, Jul. 2005.
- [15] N. Terada, T. Hamazaki, M. Oka, M. Hoki, D. M. Mastalerz, Y. Nakano, E. M. Meyer, L. Morel, B. E. Petersen, and E. W. Scott, "Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion.," *Nature*, vol. 416, no. 6880, pp. 542–545, Apr. 2002.
- [16] A. T. Haase, "Pathogenesis of lentivirus infections.," *Nature*, vol. 322, no. 6075, pp. 130–136, Jul. 1986.
- [17] J. Sodroski, W. C. Goh, C. Rosen, K. Campbell, and W. A. Haseltine, "Role of the HTLV-III/LAV envelope in syncytium formation and cytopathicity.," *Nature*, vol. 322, no. 6078, pp. 470–474, Jul. 1986.
- [18] Splettstoesser, "No Title," 2004. .
- [19] N. J. Arhel, S. Souquere-Besse, S. Munier, P. Souque, S. Guadagnini, S. Rutherford, M.-C. Prevost, T. D. Allen, and P. Charneau, "HIV-1 DNA Flap formation promotes uncoating of the pre-integration complex at the nuclear pore.," *EMBO J.*, vol. 26, no. 12, pp. 3025–3037, Jun. 2007.
- [20] Y. Suzuki and R. Craigie, "The road to chromatin - nuclear entry of retroviruses.," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 5, no. 3, pp. 187–196, Mar. 2007.
- [21] A. Bukrinskaya, "HIV-1 matrix protein: a mysterious regulator of the viral life cycle.," *Virus Res.*, vol. 124, no. 1–2, pp. 1–11, Mar. 2007.
- [22] A. R. W. Schroder, P. Shinn, H. Chen, C. Berry, J. R. Ecker, and F. Bushman, "HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots.,"

- Cell*, vol. 110, no. 4, pp. 521–529, Aug. 2002.
- [23] D. H. Nguyen and J. E. Hildreth, “Evidence for budding of human immunodeficiency virus type 1 selectively from glycolipid-enriched membrane lipid rafts.,” *J. Virol.*, vol. 74, no. 7, pp. 3264–3272, Apr. 2000.
- [24] “HIV-1 entry.” [Online]. Available: <https://viralzone.expasy.org/5057>.
- [25] L. Bhoopat, T. S. Rithaporn, S. Khunamornpong, T. Bhoopat, C. R. Taylor, and P. S. Thorner, “Cell reservoirs in lymph nodes infected with HIV-1 subtype E differ from subtype B: identification by combined in situ polymerase chain reaction and immunohistochemistry.,” *Mod. Pathol. an Off. J. United States Can. Acad. Pathol. Inc.*, vol. 19, no. 2, pp. 255–263, Feb. 2006.
- [26] M. Moulard and E. Decroly, “Maturation of HIV envelope glycoprotein precursors by cellular endoproteases.,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1469, no. 3, pp. 121–132, Nov. 2000.
- [27] C. K. Leonard, M. W. Spellman, L. Riddle, R. J. Harris, J. N. Thomas, and T. J. Gregory, “Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 265, no. 18, pp. 10373–10382, Jun. 1990.
- [28] C. D. Rizzuto, R. Wyatt, N. Hernandez-Ramos, Y. Sun, P. D. Kwong, W. A. Hendrickson, and J. Sodroski, “A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding.,” *Science*, vol. 280, no. 5371, pp. 1949–1953, Jun. 1998.
- [29] D. M. Eckert and P. S. Kim, “Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition.,” *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 70, pp. 777–810, 2001.
- [30] L. Bastiani Lалlos, D. Cecilia, E. M. Fenyo, S. Laal, and S. Zolla-Pazner, “HIV phenotype correlates with the relative amounts of lymphocyte function-related molecule 1 (LFA-1) and major histocompatibility complex (MHC) class II in the virion envelope.,” *AIDS*, vol. 14, no. 11, pp. 1523–1531, Jul. 2000.
- [31] P. D. Kwong, R. Wyatt, J. Robinson, R. W. Sweet, J. Sodroski, and W. A. Hendrickson, “Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody.,” *Nature*, vol. 393, no.

- 6686, pp. 648–659, Jun. 1998.
- [32] S. A. Gallo, C. M. Finnegan, M. Viard, Y. Raviv, A. Dimitrov, S. S. Rawat, A. Puri, S. Durell, and R. Blumenthal, “The HIV Env-mediated fusion reaction.,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1614, no. 1, pp. 36–50, Jul. 2003.
- [33] L. V Chernomordik and M. M. Kozlov, “Mechanics of membrane fusion.,” *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 15, no. 7, pp. 675–683, Jul. 2008.
- [34] G. B. Melikyan, R. J. O. Barnard, L. G. Abrahamyan, W. Mothes, and J. A. T. Young, “Imaging individual retroviral fusion events: from hemifusion to pore formation and growth.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 24, pp. 8728–8733, Jun. 2005.
- [35] D. C. Chan, D. Fass, J. M. Berger, and P. S. Kim, “Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein.,” *Cell*, vol. 89, no. 2, pp. 263–273, Apr. 1997.
- [36] V. Soontornniyomkij, G. Wang, S. B. Kapadia, C. L. Achim, and C. A. Wiley, “Confocal microscopy assessment of lymphoid tissues with follicular hyperplasia from patients infected with human immunodeficiency virus type 1.,” *Arch. Pathol. Lab. Med.*, vol. 122, no. 6, pp. 534–538, Jun. 1998.
- [37] N. Kondo, M. Marin, J. H. Kim, T. M. Desai, and G. B. Melikyan, “Distinct requirements for HIV-cell fusion and HIV-mediated cell-cell fusion.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 290, no. 10, pp. 6558–6573, Mar. 2015.
- [38] J. D. Lifson, M. B. Feinberg, G. R. Reyes, L. Rabin, B. Banapour, S. Chakrabarti, B. Moss, F. Wong-Staal, K. S. Steimer, and E. G. Engleman, “Induction of CD4-dependent cell fusion by the HTLV-III/LAV envelope glycoprotein.,” *Nature*, vol. 323, no. 6090, pp. 725–728, Oct. 1986.
- [39] D. J. Eilbott, N. Peress, H. Burger, D. LaNeve, J. Orenstein, H. E. Gendelman, R. Seidman, and B. Weiser, “Human immunodeficiency virus type 1 in spinal cords of acquired immunodeficiency syndrome patients with myelopathy: expression and replication in macrophages.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 86, no. 9, pp. 3337–3341, May 1989.
- [40] R. Nardacci, A. Antinori, L. M. Larocca, V. Arena, A. Amendola, J.-L. Perfettini, G. Kroemer, and M. Piacentini, “Characterization of cell death pathways in human immunodeficiency virus-associated encephalitis.,” *Am. J. Pathol.*, vol. 167, no. 3,

pp. 695–704, Sep. 2005.

- [41] H. Budka, “Multinucleated giant cells in brain: a hallmark of the acquired immune deficiency syndrome (AIDS).,” *Acta Neuropathol.*, vol. 69, no. 3–4, pp. 253–258, 1986.
- [42] C. Harbison, K. Zhuang, A. Gettie, J. Blanchard, H. Knight, P. Didier, C. Cheng-Mayer, and S. Westmoreland, “Giant cell encephalitis and microglial infection with mucosally transmitted simian-human immunodeficiency virus SHIVSF162P3N in rhesus macaques.,” *J. Neurovirol.*, vol. 20, no. 1, pp. 62–72, Feb. 2014.
- [43] C. C. Broder and R. G. Collman, “Chemokine receptors and HIV.,” *J. Leukoc. Biol.*, vol. 62, no. 1, pp. 20–29, Jul. 1997.
- [44] G. Alkhatib, C. Combadiere, C. C. Broder, Y. Feng, P. E. Kennedy, P. M. Murphy, and E. A. Berger, “CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1.,” *Science*, vol. 272, no. 5270, pp. 1955–1958, Jun. 1996.
- [45] Y. Feng, C. C. Broder, P. E. Kennedy, and E. A. Berger, “HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor.,” *Science*, vol. 272, no. 5263, pp. 872–877, May 1996.
- [46] B. J. Doranz, J. Rucker, Y. Yi, R. J. Smyth, M. Samson, S. C. Peiper, M. Parmentier, R. G. Collman, and R. W. Doms, “A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors.,” *Cell*, vol. 85, no. 7, pp. 1149–1158, Jun. 1996.
- [47] L. de Witte, A. Nabatov, M. Pion, D. Fluitsma, M. A. W. P. de Jong, T. de Gruijl, V. Piguet, Y. van Kooyk, and T. B. H. Geijtenbeek, “Langerin is a natural barrier to HIV-1 transmission by Langerhans cells.,” *Nat. Med.*, vol. 13, no. 3, pp. 367–371, Mar. 2007.
- [48] B. Lee, M. Sharron, L. J. Montaner, D. Weissman, and R. W. Doms, “Quantification of CD4, CCR5, and CXCR4 levels on lymphocyte subsets, dendritic cells, and differentially conditioned monocyte-derived macrophages.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 96, no. 9, pp. 5215–5220, Apr. 1999.
- [49] S. Roy and M. A. Wainberg, “Role of the mononuclear phagocyte system in the development of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS).,” *J. Leukoc. Biol.*,

- vol. 43, no. 1, pp. 91–97, Jan. 1988.
- [50] A. Antinori, M. L. Giancola, L. Alba, F. Soldani, and S. Grisetti, “Cardiomyopathy and encephalopathy in AIDS.,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 946, pp. 121–129, Nov. 2001.
- [51] J. Chehimi, S. Bandyopadhyay, K. Prakash, B. Perussia, N. F. Hassan, H. Kawashima, D. Campbell, J. Kornbluth, and S. E. Starr, “In vitro infection of natural killer cells with different human immunodeficiency virus type 1 isolates.,” *J. Virol.*, vol. 65, no. 4, pp. 1812–1822, Apr. 1991.
- [52] A. L. Howell, R. D. Edkins, S. E. Rier, G. R. Yeaman, J. E. Stern, M. W. Fanger, and C. R. Wira, “Human immunodeficiency virus type 1 infection of cells and tissues from the upper and lower human female reproductive tract.,” *J. Virol.*, vol. 71, no. 5, pp. 3498–3506, May 1997.
- [53] M. Tersmette, R. E. de Goede, B. J. Al, I. N. Winkel, R. A. Gruters, H. T. Cuypers, H. G. Huisman, and F. Miedema, “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.*, vol. 62, no. 6, pp. 2026–2032, Jun. 1988.
- [54] S. Kramer-Hammerle, I. Rothenaigner, H. Wolff, J. E. Bell, and R. Brack-Werner, “Cells of the central nervous system as targets and reservoirs of the human immunodeficiency virus.,” *Virus Res.*, vol. 111, no. 2, pp. 194–213, Aug. 2005.
- [55] E. A. Berger, P. M. Murphy, and J. M. Farber, “Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease.,” *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 17, pp. 657–700, 1999.
- [56] B. Etemad-Moghadam, D. Rhone, T. Steenbeke, Y. Sun, J. Manola, R. Gelman, J. W. Fanton, P. Racz, K. Tenner-Racz, M. K. Axthelm, N. L. Letvin, and J. Sodroski, “Membrane-fusing capacity of the human immunodeficiency virus envelope proteins determines the efficiency of CD⁺ T-cell depletion in macaques infected by a simian-human immunodeficiency virus.,” *J. Virol.*, vol. 75, no. 12, pp. 5646–5655, Jun. 2001.
- [57] N. Lopez-Balderas, L. Huerta, C. Villarreal, E. Rivera-Toledo, G. Sandoval, C. Larralde, and E. Lamoyi, “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.*, vol. 123, no. 2, pp. 138–146, Feb. 2007.
- [58] F. S. Cohen and G. B. Melikyan, "The energetics of membrane fusion from binding, through hemifusion, pore formation, and pore enlargement.," *J. Membr. Biol.*, vol. 199, no. 1, pp. 1–14, May 2004.
- [59] F. Clavel and P. Charneau, "Fusion from without directed by human immunodeficiency virus particles.," *J. Virol.*, vol. 68, no. 2, pp. 1179–1185, Feb. 1994.
- [60] T. T. Murooka, M. Deruaz, F. Marangoni, V. D. Vrbanac, E. Seung, U. H. von Andrian, A. M. Tager, A. D. Luster, and T. R. Mempel, "HIV-infected T cells are migratory vehicles for viral dissemination.," *Nature*, vol. 490, no. 7419, pp. 283–287, Oct. 2012.
- [61] K. Konopka, E. Pretzer, B. Plowman, and N. Duzgunes, "Long-term noncytopathic productive infection of the human monocytic leukemia cell line THP-1 by human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1III_B).," *Virology*, vol. 193, no. 2, pp. 877–887, Apr. 1993.
- [62] J. M. Kilby, S. Hopkins, T. M. Venetta, B. DiMassimo, G. A. Cloud, J. Y. Lee, L. Alldredge, E. Hunter, D. Lambert, D. Bolognesi, T. Matthews, M. R. Johnson, M. A. Nowak, G. M. Shaw, and M. S. Saag, "Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry.," *Nat. Med.*, vol. 4, no. 11, pp. 1302–1307, Nov. 1998.
- [63] J. Cao, I. W. Park, A. Cooper, and J. Sodroski, "Molecular determinants of acute single-cell lysis by human immunodeficiency virus type 1.," *J. Virol.*, vol. 70, no. 3, pp. 1340–1354, Mar. 1996.
- [64] G. Gomez-Icazbalceta, M. B. Ruiz-Rivera, E. Lamoyi, and L. Huerta, "FRET in the Analysis of In Vitro Cell-Cell Fusion by Flow Cytometry.," *Methods Mol. Biol.*, vol. 1313, pp. 217–227, 2015.
- [65] L. Huerta, E. Lamoyi, A. Baez-Saldana, and C. Larralde, "Human immunodeficiency virus envelope-dependent cell-cell fusion: a quantitative fluorescence cytometric assay.," *Cytometry*, vol. 47, no. 2, pp. 100–106, Feb. 2002.

- [66] L. Huerta, N. Lopez-Balderas, C. Larralde, and E. Lamoyi, "Discriminating in vitro cell fusion from cell aggregation by flow cytometry combined with fluorescence resonance energy transfer.," *J. Virol. Methods*, vol. 138, no. 1–2, pp. 17–23, Dec. 2006.
- [67] E. Rivera-Toledo, L. Huerta, C. Larralde, and E. Lamoyi, "Quantitative and phenotypic analyses of lymphocyte-monocyte heterokaryons induced by the HIV envelope proteins: Significant loss of lymphoid markers.," *Exp. Mol. Pathol.*, vol. 90, no. 2, pp. 157–166, Apr. 2011.
- [68] S. W. Krause, M. Zaiss, M. Kreutz, and R. Andreesen, "Activation of lymphocytes inhibits human monocyte to macrophage differentiation.," *Immunobiology*, vol. 203, no. 5, pp. 709–724, Aug. 2001.
- [69] S. Tsuchiya, M. Yamabe, Y. Yamaguchi, Y. Kobayashi, T. Konno, and K. Tada, "Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1).," *Int. J. cancer*, vol. 26, no. 2, pp. 171–176, Aug. 1980.
- [70] J. Agramonte-Hevia, C. Hallal, C. Garay-Canales, C. Guerra-Araiza, I. Camacho-Arroyo, and E. Ortega Soto, "1alpha, 25-dihydroxy-vitamin D3 alters Syk activation through FcgammaRII in monocytic THP-1 cells.," *J. Cell. Biochem.*, vol. 89, no. 5, pp. 1056–1076, Aug. 2003.
- [71] H. Uronen-Hansson, J. Allen, M. Osman, G. Squires, N. Klein, and R. E. Callard, "Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 are present inside human dendritic cells, associated with microtubules and the Golgi apparatus but are not detectable on the cell surface: integrity of microtubules is required for interleukin-12 production in response to internalized bacteria.," *Immunology*, vol. 111, no. 2, pp. 173–178, Feb. 2004.
- [72] S. Dunzendorfer, H.-K. Lee, K. Soldau, and P. S. Tobias, "Toll-like receptor 4 functions intracellularly in human coronary artery endothelial cells: roles of LBP and sCD14 in mediating LPS responses.," *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, vol. 18, no. 10, pp. 1117–1119, Jul. 2004.
- [73] L. A. Couture, W. Piao, L. W. Ru, S. N. Vogel, and V. Y. Toshchakov, "Targeting Toll-like receptor (TLR) signaling by Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain-containing adapter protein/MyD88 adapter-like (TIRAP/Mal)-derived decoy

- peptides.," *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 29, pp. 24641–24648, Jul. 2012.
- [74] V. Le Douce, G. Herbein, O. Rohr, and C. Schwartz, "Molecular mechanisms of HIV-1 persistence in the monocyte-macrophage lineage.," *Retrovirology*, vol. 7, p. 32, Apr. 2010.
- [75] A. Moeenrezakhanlou, L. Shephard, L. Lam, and N. E. Reiner, "Myeloid cell differentiation in response to calcitriol for expression CD11b and CD14 is regulated by myeloid zinc finger-1 protein downstream of phosphatidylinositol 3-kinase.," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 84, no. 2, pp. 519–528, Aug. 2008.
- [76] J. M. Hayden, L. Brachova, K. Higgins, L. Obermiller, A. Sevanian, S. Khandrika, and P. D. Reaven, "Induction of monocyte differentiation and foam cell formation in vitro by 7-ketocholesterol.," *J. Lipid Res.*, vol. 43, no. 1, pp. 26–35, Jan. 2002.
- [77] E. A. Starikova, D. I. Sokolov, A. A. Chernova, and I. S. Freidlin, "Changes in phenotype of monocyte-like THP-1 cells associated with transendothelial migration.," *Bull. Exp. Biol. Med.*, vol. 146, no. 5, pp. 596–598, Nov. 2008.
- [78] B. Kwon, M. Lee, A. J. Waring, and M. Hong, "Oligomeric Structure and Three-Dimensional Fold of the HIV gp41 Membrane-Proximal External Region and Transmembrane Domain in Phospholipid Bilayers.," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 140, no. 26, pp. 8246–8259, Jul. 2018.
- [79] D. Schols and E. De Clercq, "Human immunodeficiency virus type 1 gp120 induces anergy in human peripheral blood lymphocytes by inducing interleukin-10 production.," *J. Virol.*, vol. 70, no. 8, pp. 4953–4960, Aug. 1996.
- [80] Y. Taoufik, O. Lantz, C. Wallon, A. Charles, E. Dussaix, and J. F. Delfraissy, "Human immunodeficiency virus gp120 inhibits interleukin-12 secretion by human monocytes: an indirect interleukin-10-mediated effect.," *Blood*, vol. 89, no. 8, pp. 2842–2848, Apr. 1997.
- [81] D. Mittag, A. I. Proietto, T. Loudovaris, S. I. Mannering, D. Vremec, K. Shortman, L. Wu, and L. C. Harrison, "Human dendritic cell subsets from spleen and blood are similar in phenotype and function but modified by donor health status.," *J. Immunol.*, vol. 186, no. 11, pp. 6207–6217, Jun. 2011.
- [82] I.-T. Lee, C.-C. Lin, C.-K. Hsu, M.-Y. Wu, R.-L. Cho, and C.-M. Yang, "Resveratrol inhibits *Staphylococcus aureus*-induced TLR2/MyD88/NF-kappaB-dependent

- VCAM-1 expression in human lung epithelial cells.," *Clin. Sci. (Lond)*., vol. 127, no. 6, pp. 375–390, Sep. 2014.
- [83] M. Del Corno, G. Donninelli, B. Varano, L. Da Sacco, A. Masotti, and S. Gessani, "HIV-1 gp120 activates the STAT3/interleukin-6 axis in primary human monocyte-derived dendritic cells.," *J. Virol.*, vol. 88, no. 19, pp. 11045–11055, Oct. 2014.
- [84] M. Lewin-Smith, S. M. Wahl, and J. M. Orenstein, "Human immunodeficiency virus-rich multinucleated giant cells in the colon: a case report with transmission electron microscopy, immunohistochemistry, and in situ hybridization.," *Mod. Pathol. an Off. J. United States Can. Acad. Pathol. Inc*, vol. 12, no. 1, pp. 75–81, Jan. 1999.
- [85] L. Fantuzzi, I. Canini, F. Belardelli, and S. Gessani, "HIV-1 gp120 stimulates the production of beta-chemokines in human peripheral blood monocytes through a CD4-independent mechanism.," *J. Immunol.*, vol. 166, no. 9, pp. 5381–5387, May 2001.
- [86] M. Zembala, S. Bach, A. Szczepanek, G. Mancino, and V. Colizzi, "Phenotypic changes of monocytes induced by HIV-1 gp120 molecule and its fragments.," *Immunobiology*, vol. 197, no. 1, pp. 110–121, Jun. 1997.
- [87] D. Giulian, E. Wendt, K. Vaca, and C. A. Noonan, "The envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 stimulates release of neurotoxins from monocytes.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 90, no. 7, pp. 2769–2773, Apr. 1993.
- [88] K. E. Medders, N. E. Sejbuk, R. Maung, M. K. Desai, and M. Kaul, "Activation of p38 MAPK is required in monocytic and neuronal cells for HIV glycoprotein 120-induced neurotoxicity.," *J. Immunol.*, vol. 185, no. 8, pp. 4883–4895, Oct. 2010.
- [89] E. Latz, A. Visintin, E. Lien, K. A. Fitzgerald, B. G. Monks, E. A. Kurt-Jones, D. T. Golenbock, and T. Espevik, "Lipopolysaccharide rapidly traffics to and from the Golgi apparatus with the toll-like receptor 4-MD-2-CD14 complex in a process that is distinct from the initiation of signal transduction.," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 49, pp. 47834–47843, Dec. 2002.
- [90] M. W. Hornef, T. Frisan, A. Vandewalle, S. Normark, and A. Richter-Dahlfors, "Toll-like receptor 4 resides in the Golgi apparatus and colocalizes with

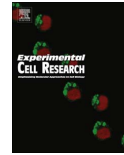
- internalized lipopolysaccharide in intestinal epithelial cells.," *J. Exp. Med.*, vol. 195, no. 5, pp. 559–570, Mar. 2002.
- [91] B. M. Henrick, X.-D. Yao, and K. L. Rosenthal, "HIV-1 Structural Proteins Serve as PAMPs for TLR2 Heterodimers Significantly Increasing Infection and Innate Immune Activation.," *Front. Immunol.*, vol. 6, p. 426, 2015.
- [92] I. J. Edwards, H. Xu, J. C. Obunike, I. J. Goldberg, and W. D. Wagner, "Differentiated macrophages synthesize a heparan sulfate proteoglycan and an oversulfated chondroitin sulfate proteoglycan that bind lipoprotein lipase.," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 15, no. 3, pp. 400–409, Mar. 1995.
- [93] K. Miyauchi, A. R. Curran, Y. Long, N. Kondo, A. Iwamoto, D. M. Engelman, and Z. Matsuda, "The membrane-spanning domain of gp41 plays a critical role in intracellular trafficking of the HIV envelope protein.," *Retrovirology*, vol. 7, p. 95, Nov. 2010.
- [94] T. Kawasaki and T. Kawai, "Toll-like receptor signaling pathways.," *Front. Immunol.*, vol. 5, p. 461, 2014.
- [95] B. A. 3rd Watts, T. George, and D. W. Good, "Lumen LPS inhibits HCO₃⁻ absorption in the medullary thick ascending limb through TLR4-PI3K-Akt-mTOR-dependent inhibition of basolateral Na⁺/H⁺ exchange.," *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, vol. 305, no. 4, pp. F451-62, Aug. 2013.
- [96] J.-H. Quan, J.-Q. Chu, J. Kwon, I.-W. Choi, H. A. H. A. Ismail, W. Zhou, G.-H. Cha, Y. Zhou, J.-M. Yuk, E.-K. Jo, and Y.-H. Lee, "Intracellular Networks of the PI3K/AKT and MAPK Pathways for Regulating Toxoplasma gondii-Induced IL-23 and IL-12 Production in Human THP-1 Cells.," *PLoS One*, vol. 10, no. 11, p. e0141550, 2015.
- [97] F. Villinger and A. A. Ansari, "Role of IL-12 in HIV infection and vaccine.," *Eur. Cytokine Netw.*, vol. 21, no. 3, pp. 215–218, Sep. 2010.
- [98] G. R. Yannam, T. Gutti, and L. Y. Poluektova, "IL-23 in infections, inflammation, autoimmunity and cancer: possible role in HIV-1 and AIDS.," *J. Neuroimmune Pharmacol.*, vol. 7, no. 1, pp. 95–112, Mar. 2012.

Artículos publicados



Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Cell Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yexcr

Monocyte-lymphocyte fusion induced by the HIV-1 envelope generates functional heterokaryons with an activated monocyte-like phenotype



David Martínez-Méndez, Evelyn Rivera-Toledo, Enrique Ortega, Ileana Licona-Limón, Leonor Huerta*

Department of Immunology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:
Cell-cell fusion
HIV envelope protein
Monocyte differentiation
Multinucleated cells
TLR
Heterokaryons

ABSTRACT

Enveloped viruses induce cell-cell fusion when infected cells expressing viral envelope proteins interact with target cells, or through the contact of cell-free viral particles with adjoining target cells. CD4⁺ T lymphocytes and cells from the monocyte-macrophage lineage express receptors for HIV envelope protein. We have previously reported that lymphoid Jurkat T cells expressing the HIV-1 envelope protein (Env) can fuse with THP-1 monocytic cells, forming heterokaryons with a predominantly myeloid phenotype. This study shows that the expression of monocytic markers in heterokaryons is stable, whereas the expression of lymphoid markers is mostly lost. Like THP-1 cells, heterokaryons exhibited FcγR-dependent phagocytic activity and showed an enhanced expression of the activation marker ICAM-1 upon stimulation with PMA. In addition, heterokaryons showed morphological changes compatible with maturation, and high expression of the differentiation marker CD11b in the absence of differentiation-inducing agents. No morphological change nor increase in CD11b expression were observed when an HIV-fusion inhibitor blocked fusion, or when THP-1 cells were cocultured with Jurkat cells expressing a non-fusogenic Env protein, showing that differentiation was not induced merely by cell-cell interaction but required cell-cell fusion. Inhibition of TLR2/TLR4 signaling by a TIRAP inhibitor greatly reduced the expression of CD11b in heterokaryons. Thus, lymphocyte-monocyte heterokaryons induced by HIV-1 Env are stable and functional, and fusion prompts a phenotype characteristic of activated monocytes via intracellular TLR2/TLR4 signaling.

1. Introduction

Cell-cell fusion is conspicuous in physiological and pathological situations, such as development of metazoans, placentation, organ repair by stem cells, malignant transformation, viral infections, and reactions to tissue injury. Products of fusion between cells from different types are called heterokaryons, in opposition to syncytia, which originate from fusion of homologous cells. Major biological implications of cell-cell fusion are functional synchronization and cellular reprogramming [1]. Enveloped viruses can induce cell-cell fusion when infected cells expressing viral envelope proteins interact with target cells, or through the contact of cell-free viral particles with adjoining target cells [2,3].

Fused cells are frequently observed in cultures of human leukocytes infected with HIV-1 isolates from patients with HIV-1 infection [4]. In vivo, multinucleated cells expressing viral antigens are a hallmark of

HIV-1 and SIV infections in the nervous system, and the presence of these cells is associated with severe neuropathology [5–9]. Infected multinucleated cells have been also observed in lymph nodes of asymptomatic HIV-1 infected individuals [10–17]. Expression of myeloid markers indicates that multinucleated cells may originate from dendritic cells [11,13,16] or macrophages [5,10,12,14,15,17,18]. Cell-cell fusion can be induced by interaction of membrane-bound HIV-1 envelope protein (Env) with the CD4 molecule and a coreceptor on a target cell. The interaction of the gp120 Env subunit with CD4 and with a molecule belonging to the family of chemokine receptors, induce conformational changes in the gp41 Env subunit, which then induce fusion of the cell membranes [2,3]. The origin and role of multinucleated cells in HIV-1 pathogenesis are not clear.

Human monocytes express CD4 and chemokine receptors [19], and are precursors of macrophages and dendritic cells. Monocytes are susceptible to infection by HIV-1 both in vitro [19] and in vivo [20],

Abbreviations: HIV-1, human immunodeficiency virus type 1; MFI, mean fluorescence intensity; FcγR, receptor for the Fc portion of IgG; Env, HIV-1 envelope protein; SIV, simian immunodeficiency virus; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; DiI, 1,1'-dioctadecyl-3, 3,3', 3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate; DiO, 3,3'-dioctadecyloxacarbocyanine perchlorate; SRBC, Sheep red blood cells

* Corresponding author.

E-mail address: leonorhh@biomedicas.unam.mx (L. Huerta).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.01.014>

Received 9 November 2016; Received in revised form 23 January 2017; Accepted 25 January 2017

Available online 27 January 2017

0014-4827/© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

and they may contribute to viral dissemination and generation of virus reservoirs after differentiation [21,22]. On the other hand, CD4⁺ T lymphocytes are the main targets of HIV-1, and their depletion in blood is related to AIDS. Given that CD4⁺ monocytes and T lymphocytes can come in close proximity at sites of inflammation, it is possible that HIV Env expressed by infected cells, or virus particles, promote fusion between these cells.

THP-1 is a human monocytic CD4⁺ cell line that can be induced to differentiate into a macrophage-like phenotype by PMA, and is widely used as a model of the monocyte/macrophage transition. THP-1 cells are susceptible to infection by HIV-1, even without activation by PMA [23,24]. We showed before that non-differentiated THP-1 cells are able to fuse with a HIV-1 Env-expressing lymphoid T cell line (Env⁺ Jurkat cells), forming multinucleated heterokaryons. Heterokaryons did not arise when THP-1 cells were cocultured with Env⁺ Jurkat cells expressing a mutant non-fusogenic gp41 protein, showing that a functional Env protein was necessary for the formation of heterokaryons. Participation of CD4 and Env in cell-cell fusion was further demonstrated by the inhibition of fusion by nanomolar concentrations of an anti-CD4 monoclonal antibody, or by the HIV-1 fusion inhibitor T-20, which specifically targets the fusogenic conformation of gp41 [25]. Some hours after formation, heterokaryons showed a decreased expression of lymphoid markers while preserving the expression of myeloid markers. The myeloid phenotype was predominant even when heterokaryons incorporated several lymphoid cells per each monocyte [26].

This study examined the stability of the lymphocyte-monocyte heterokaryon phenotype as well as some of its functional features. Thus, the expression of lymphocytic (CD3 and CD28) and myeloid (CD32 and CD68) markers in heterokaryons was analyzed during 3 days in cocultures of THP-1 and Env⁺ Jurkat cells, and their phagocytic capacity and response to activation with PMA was determined. Since heterokaryons showed morphological changes compatible with differentiation in the absence of activating agents, we also evaluated the expression of the monocyte differentiation marker CD11b by the heterokaryons, as well as the effect of blocking of TLR4 and TLR2 signaling.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture

Env⁺ HXBc2(4) and 522F/Y Jurkat cells were obtained from the AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAD, NIH. These cell lines contain an inducible tetracycline-dependent transactivator and are transfected with the *env* and *rev* genes from the HIV-1 HXBc2 strain coupled to a cytomegalovirus promoter and to tetracycline operator sequences [27]. This construction allows the expression of Env (gp120/gp41) after tetracycline removal from the culture medium. HXBc2(4) cells express a fusion competent Env protein, whereas the 522F/Y cell line do not fuse with target cells due to an F/Y substitution at position 522 in gp41 [27,28]. The THP-1 cell line was purchased from ATCC (ATCC TIB-202).

HXBc2 and 522F/Y cells were grown in RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY) supplemented with 10% of inactivated fetal bovine serum (Gibco) (RPMI-10), 200 µg/ml of geneticin and hygromycin, and 1 µg/ml of tetracycline. Cell cultures were maintained at 37 °C and 5% of CO₂. To induce Env expression, cells were washed with PBS and cultured in medium without tetracycline. After 24 h, cells were labeled with DiO as indicated below, and stained cells were kept in an incubator overnight before fusion experiments. Thus, fusion experiments were performed 48 h after induction of Env expression.

THP-1 cells were grown in RPMI 1640 supplemented with 10% of inactivated fetal bovine serum (Gibco) with 600 µg/ml of penicillin, 600 µg/ml of streptomycin, 2 mM l-glutamine, 100 µM non-essential amino acids and 1 mM of sodium pyruvate. Cells were maintained at a density of 0.5×10⁶ cells/ml.

2.2. Cell-cell fusion assay

Fusion partners were stained with the red fluorescent DiI and green fluorescent DiO lipophilic dyes, obtained from Molecular Probes (Eugene, OR). DiI and DiO stock solutions were made by dissolving 3 mg/ml of dye in DMSO, and working solutions were prepared by diluting stocks 1:10 in the same solvent. Labeling of cells with DiI and DiO was performed as described before [29]. Cells were labeled the day before fusion experiments. Briefly, cells were adjusted to 5–15×10⁶ cells/ml in RPMI-10 and 10 µl of DiO working solution were added to Env⁺ HXBc2 or 522 F/Y cells (after 24 h of tetracycline deprivation), and 15 µl of DiI working solution were added to THP-1 cells. Cells suspensions were covered from light and incubated at room temperature for 10 min with gently shaking. Cells were then washed twice with 10 ml of RPMI-10 and resuspended in the same medium. Labeled cell cultures were incubated overnight at 37 °C and 5% of CO₂.

DiO-labeled Env⁺ Jurkat and DiI-labeled THP-1 cells (which will be hereinafter called DIO-Env⁺ Jurkat and DiI-THP-1 cells, respectively) were cocultured at a 1:1 ratio (4×10⁵ cells of each type) in a 48-flat bottom well plate in a total volume of 800 µl. For the fusion inhibition assays, DiO-labeled Env⁺ Jurkat cells were pre incubated for 30 min with 60 nM of the HIV fusion inhibitor peptide T-20 before addition of THP-1 cells. Unlabeled, as well as single DiO- and DiI-labeled cells were placed in separated wells to use them as controls for adjusting FACS settings. Each condition was tested in duplicate.

After the indicated times, cells were collected from wells, centrifuged to remove the culture medium and resuspended in 0.4 ml of FACS flow buffer. Cells were analyzed by flow cytometry using unlabeled and single labeled cells for setting's adjustment. A region of viable cells was selected and analyzed in FL-1 vs. FL-2 dot plots, where the percentage of single green-, single red-, and double fluorescent cells (unfused Env⁺ Jurkat cells, unfused THP-1 cells, and heterokaryons, respectively) was determined on 10,000 events in an Attune cytometer (BD) equipped with red and blue lasers.

2.3. T-20 fusion inhibitor

T-20 is a synthetic 36 amino acid peptide comprising the heptad repeat region 2 (HR2) of gp41, and is complementary to gp41 HR1. It interferes specifically with the fusion process by impeding the assembly of the gp41 fusogenic conformation [25]. Fuzeon, the N-acetylated derivative of T-20 was obtained from Trimeris/Roche (Lexington, MA/Basel, Switzerland) and dissolved in PBS at 98 µg/ml.

2.4. Immunophenotyping

Cells were collected from plates after the indicated times in coculture, washed with 1 ml of PBS, resuspended in binding buffer and incubated with APC conjugated monoclonal antibodies against the CD3, CD28, CD32, or CD68 receptors (BD Pharmingen, San José, CA), and analyzed by flow cytometry as described before [26]. APC conjugated monoclonal antibodies against ICAM-1 and CD11b were purchased from eBioscience (San Diego, CA). The mean fluorescence intensity (MFI) index was calculated as the ratio of the geometric mean fluorescence intensity of the specific monoclonal antibody and the geometric mean fluorescence intensity of the isotype-matched control antibody.

2.5. Phagocytosis assay

SRBC were opsonized with anti-SRBC IgG (IgG-SRBC) for the measurement of FcγR-mediated phagocytosis as previously described [30] with some modifications. Briefly, SRBC (1.2×10⁹ in PBS) were coated with 250 µg/ml of sulfo-NHS-biotin (Pierce, Rockford, IL) for 20 min at 4 °C. Next, they were washed and incubated with a sub-hemagglutinating dilution of rabbit anti-SBRC IgG for 30 min at room

temperature. Biotin coated IgG-SRBC were then incubated with Streptavidin-APC (Molecular Probes) diluted 1:700, for 20 min at 4 °C (IgG-SRBC-APC).

For the phagocytosis assay, the fusion inhibitor peptide T-20 was added to 24-h cocultures of DIO-Env⁺ Jurkat and DiI-THP-1 cells to stop the incorporation of additional cells into heterokaryons. Twenty-four hours later, cells in cocultures were mixed with the opsonized erythrocytes (IgG-SRBC-APC) at a ratio of total cocultured cells to erythrocytes of 1:20 at 37 °C for 1 h. Identical samples were incubated at 4 °C as controls. Non-internalized erythrocytes were lysed by hypotonic shock. Phagocytosis was quantified by flow cytometry. Data are expressed as percentage of APC-positive cells (cells that have ingested at least one erythrocyte) as previously reported [31].

For the phagocytosis assays in the presence of Cytochalasin D, DiI-THP-1 cells, DiO-Env⁺ Jurkat cells or cocultured cells were incubated with 200 nM Cytochalasin D (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) or DMSO as vehicle control, for 2 h at 37 °C before the phagocytosis assay. Each condition was tested in duplicate.

2.6. Fluorescence microscopy

Morphological changes of double fluorescent cells and phagocytosis were analyzed with a Carl Zeiss (Jena, Germany) confocal microscope. The unfixed cells were put in a chambered plate for microscopy analysis. Sixty pictures were taken from different fields. Images were processed using Image J software (NIH).

2.7. PMA activation

DIO-Env⁺ Jurkat and DiI-THP-1 cells were cocultured at a 1:1 ratio (4×10^5 cells of each type) in a 48- flat bottom well plate in a total volume of 800 μ l. Fusion was allowed to proceed for 24 h, after which PMA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) was added to a final concentration of 15 nM. After 24 h of incubation with PMA, cells were collected from plates, washed with PBS, and analyzed immediately by flow cytometry for the expression of ICAM-1 and of CD11b using specific APC-conjugated monoclonal antibodies, as described before [26]. Gates corresponding to single red- and double-fluorescent cells (unfused monocytes and heterokaryons, respectively) were delimited in FL-1 vs. FL-2 dot plots and the percentage of APC-positive cells was determined in the FL-3 channel. Each condition was tested in duplicate. Non-activated cocultures were set up and analyzed in parallel.

2.8. TLR signaling inhibition

Stock solutions of the TLR2 and TLR4 TIRAP inhibitor NBP2-26245 and the antennapedia control peptide (Novus Biologicals, Littleton, CO) were prepared as described by the manufacturer. DIO-

Env⁺ Jurkat and DiI-THP-1 cells (4×10^5 each) were pre-incubated separately with 5, and 15 μ M of NBP2-26245, or with the antennapedia control peptide (20 μ M) in 0.4 ml of culture medium for 1 h. at 37°C with 5% CO₂. Cells were then cocultured in a total volume of 0.8 ml of culture medium in the presence of peptides. Wells containing control cocultures without any peptide were included. After 24 h, half of medium was replaced with fresh medium containing the corresponding concentrations of peptide. Percentage of fusion and expression of CD11b was determined after additional 24 h of coculture.

2.9. Statistical analyses

Differences between groups were analyzed for significance by ANOVA ($P < 0.05$), using GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc).

3. Results

3.1. Flow cytometry analysis of heterokaryon formation

Fusion of monocytic THP-1 with lymphoid Env⁺ Jurkat cells was measured by means of the differential labeling with the red DiI and green DiO lipophilic probes, followed by detection of the heterokaryons (double-labeled cells) by flow cytometry. Reliability of the flow cytometry assay was previously confirmed by the observation that the number of double fluorescent cells detected by flow cytometry agreed with that obtained by fluorescence microscopy counting. Likewise, the flow cytometry assay was useful to quantify the inhibition of fusion by nanomolar concentrations of an anti-CD4 monoclonal antibody and the T-20 peptide, an HIV entry inhibitor that allows the initial interaction of gp120 with CD4 and the coreceptor, but prevents the conformational changes of gp41 required for membrane fusion [25,26,32]. Phagocytosis of Env⁺ T cells by the THP-1 cells as the source of double fluorescent particles was ruled out since double fluorescent cells did not arise when Jurkat cells expressing a mutant non-fusogenic Env protein were cocultured with THP-1 cells [26]. Fig. 1A illustrate the flow cytometry analysis of fusion between THP-1 and Env⁺ Jurkat cells, as well as the effect of the T-20 peptide. The typical time course of fusion in 3-day cocultures is shown in Fig. 1B. Most of fusion takes place after 24 h of coculture, reaching a maximum at 48 h. The HIV-1 fusion inhibitor T-20 completely abrogated the generation of double fluorescent cells.

3.2. Immunophenotypic analysis

The expression of lymphoid and myeloid surface markers by heterokaryons was determined at different time points in cocultures of DIO-Env⁺ Jurkat and DiI-THP-1 cells, using APC-conjugated monoclonal antibodies directed to CD3, CD28, CD32 and CD68. For comparison, the expression of these antigens was also determined on

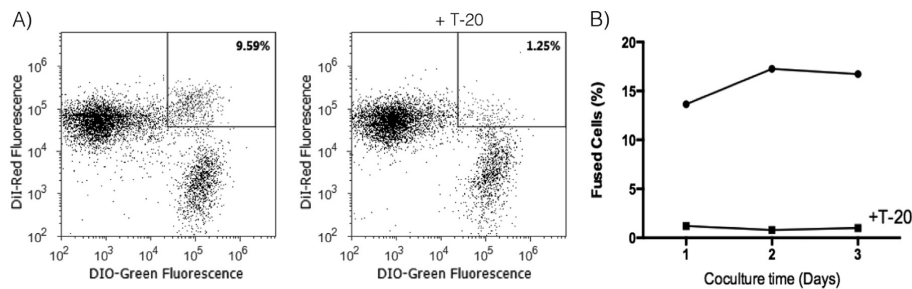


Fig. 1. FACS analysis of fusion between THP-1 and Env⁺ Jurkat cells. A) Representative dot plots from a 24-h coculture of DiI-labeled THP-1 cells (red) with DiO-labeled Env⁺ Jurkat cells (green). Percent of double fluorescent cells is indicated, as well as the effect of the HIV-1 fusion inhibitor T-20 (right). B) Typical time course of fusion between DiI-THP-1 cells and DiO-Env⁺ Jurkat cells in the absence (●) and presence (■) of T-20.

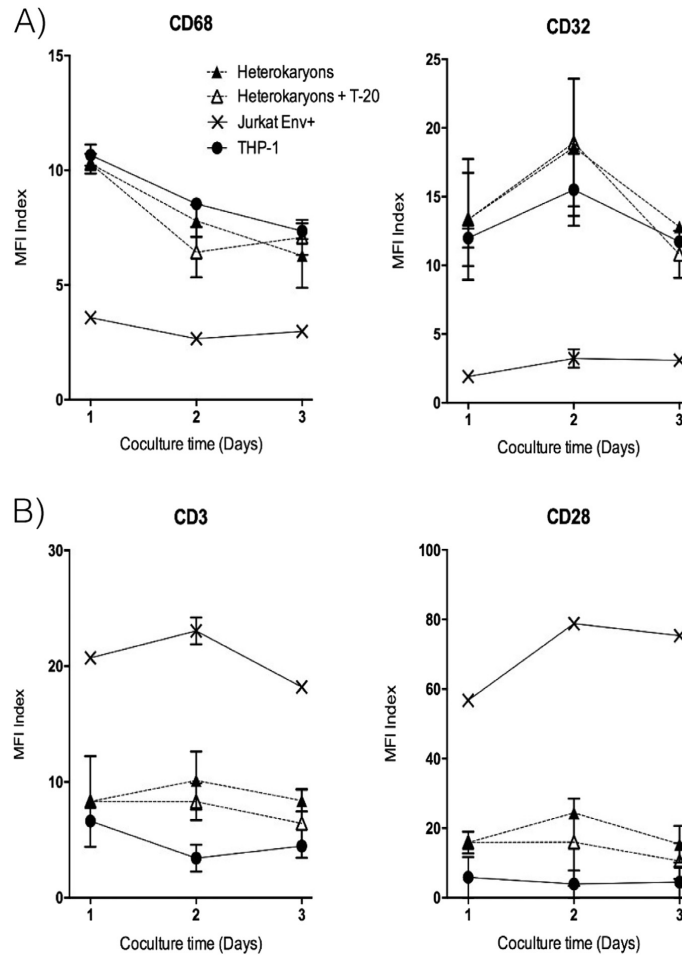


Fig. 2. Expression of myeloid (A) and lymphoid (B) markers in heterokaryons and unfused cells in cocultures of DiI-THP-1 and DiO- Env⁺ Jurkat cells. Expression of the indicated antigens was determined in double fluorescent cells (heterokaryons) and in the single red and single green fluorescent cells (THP-1 and Env⁺ Jurkat cells that remained unfused, respectively), using APC-conjugated monoclonal antibodies and flow cytometry. MFI index is indicated.

cells that remained unfused in the same cocultures. In addition, since the continuous incorporation of new cells (monocytic or lymphocytic) into already formed heterokaryons may avoid stabilization of phenotype, a completely inhibitory concentration of T-20 was added to a separate set of wells after 24 h of coculture, and phenotype was analyzed at later times.

The myeloid markers CD68 and CD32 were expressed at similar levels in heterokaryons and in monocytes that remained unfused, both regarding the percentage of positive cells (an average of 82.8% and 84.5% of CD32⁺ cells, and 88.3% and 89% of CD68⁺ cells, of unfused monocytes and heterokaryons in 48-h cocultures, respectively), and the level of expression, determined as the MFI index (Fig. 2A). A decrease in the expression of the scavenger receptor CD68 with time was observed in heterokaryons and the unfused THP-1 cell population, and thus it was not associated with fusion but to coculture with Env⁺ Jurkat cells. We have not an explanation for this reduction, although soluble factors produced by Jurkat cells may affect monocyte survival and function [33]. In our system, the decrease of CD68 was not related

with activation, since the unfused THP-1 population did not show morphological changes nor expression of CD11b (see below).

As expected, the lymphoid markers CD3 and CD28 were highly expressed by unfused Env⁺ Jurkat cells, whereas they were clearly diminished in heterokaryons during the whole time of coculture (Fig. 2B). Addition of T-20 to cocultures did not modify significantly the pattern of expression of markers in heterokaryons, although it produced a slightly lower level of expression of CD3 and CD28, maybe because of blocking of fusion of additional Env⁺ cells.

Thus, the expression of myeloid markers and the loss of lymphoid markers is a feature of lymphocyte-monocyte heterokaryons.

3.3. Phagocytic activity

Given the conservation of myeloid markers in heterokaryons, we were interested in determining if they conserved functional properties of monocytes. THP-1 cells have intrinsic phagocytic activity mediated by Fcγ receptors [34]. This function was examined using a three-color

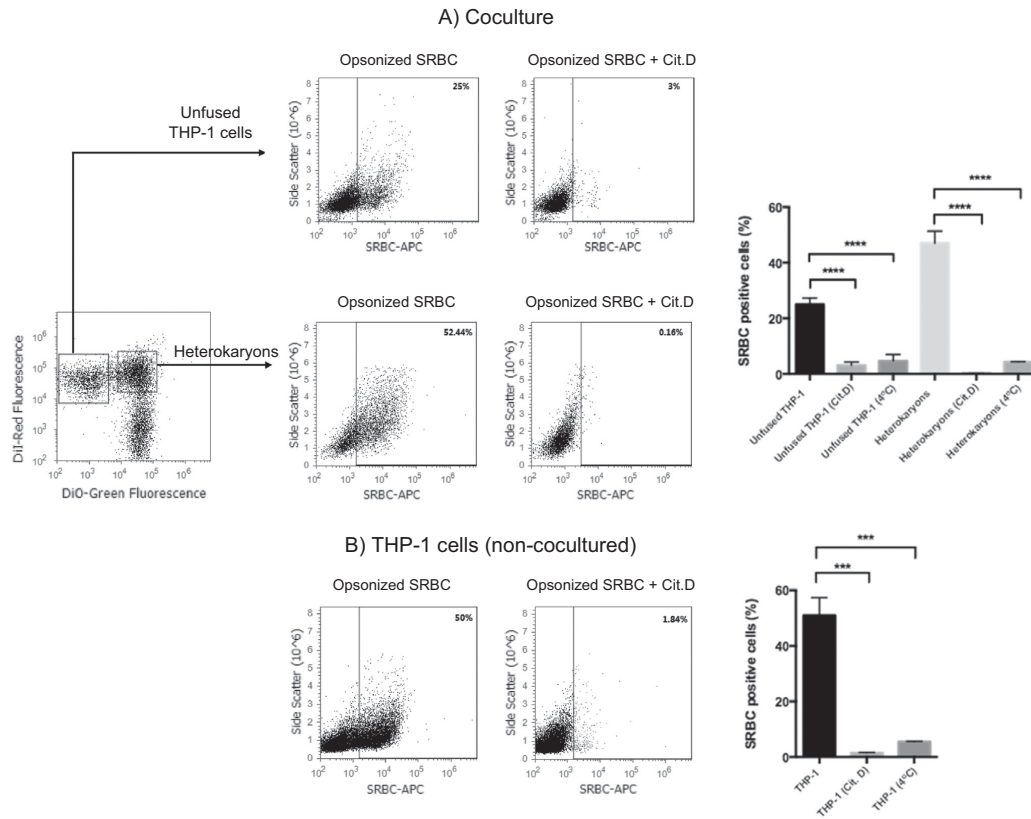


Fig. 3. Fc γ R-dependent phagocytic activity of THP-1 cells and heterokaryons. Sheep red blood cells (SRBC) that have been biotinylated, opsonized with anti-erythrocyte polyclonal IgG, and labeled with streptavidin-APC, were added to cocultures of DiI-THP-1 cells and DiO-Env⁺ Jurkat cells or to non-cocultured DiI-THP-1 cells. After incubation, no internalized erythrocytes were lysed with a hypotonic buffer. The APC fluorescence was analyzed by flow cytometry in the single red and the double fluorescent cell populations, for THP-1 cells that remained unfused and heterokaryons, respectively (A), and in non-cocultured THP-1 cells (B). The percentage of cells with internalized erythrocytes in the absence or presence of Cytochalasin D is shown, as well as the effect of incubation at 4°C. Bar graphs show the percentage of phagocytic cells from three independent experiments.

flow cytometry Fc γ R-dependent phagocytosis assay. Sheep red blood cells (SRBC) were biotinylated and opsonized with anti-SRBC polyclonal IgG, and then labeled with streptavidin-APC. The opsonized and APC-labeled SRBC were added to 48-h cocultures of DiI-THP-1 and DiO-Env⁺ Jurkat cells. After incubation, non-internalized SRBC were lysed by hypotonic shock. The percentage of cells with internalized SRBC (APC-positive cells) was determined by flow cytometry in heterokaryons, in DiI-THP-1 cells remaining unfused and in control (monocultured) DiI-THP-1 cells. We found that about 50% of heterokaryons were able to internalize IgG-coated SRBC (Fig. 3A), a percentage similar to that of control, non-cocultured THP-1 cells (Fig. 3B). Non-opsonized SRBC were not internalized by heterokaryons nor by unfused THP-1 cells, confirming that internalization was mediated by Fc γ R's (data not shown). According with the actin dependence of phagocytosis, internalization of opsonized erythrocytes was inhibited by the previous incubation of cells with Cytochalasin D, a potent inhibitor of actin polymerization. In addition, adhesion of SRBC to cell membrane through Fc γ R's without phagocytosis was discarded since no APC fluorescence associated with the cells was observed upon incubation of cells with opsonized erythrocytes at 4°C (Fig. 3). Phagocytosis of opsonized SRBC was also observed by fluorescence microscopy (Fig. 4). Thus, besides stable expression of myeloid

markers, the ability of heterokaryons to perform Fc γ R-mediated phagocytosis at levels similar to those of monocytic cells demonstrates that they maintain a monocytic phenotype.

3.4. Expression of ICAM-1 in response to PMA stimulation

Increased expression of ICAM-1 constitutes a general feature of the process of monocyte activation. The ability of heterokaryons to respond to activation was tested using stimulation with phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA), a potent inducer of monocyte activation. Among other events, PMA promotes enhanced expression of ICAM-1 in THP-1 cells [35]. PMA was added to 24 h-cocultures and the expression of ICAM-1 in unfused monocytes and heterokaryons was determined 24 h later. ICAM-1 was expressed in both THP-1 cells that remained unfused and in heterokaryons in the absence of activation; upon activation with PMA the percentage of cells expressing ICAM-1 increased in both cell types (Fig. 5A), as well in non-cocultured THP-1 cells (Fig. 5B). The mean fluorescence intensity, which is a relative measure of the density of molecules on the cell surface, also increased at similar levels in THP-1 and heterokaryons, showing that heterokaryons retained the ability to express optimal levels of ICAM-1 upon activation.

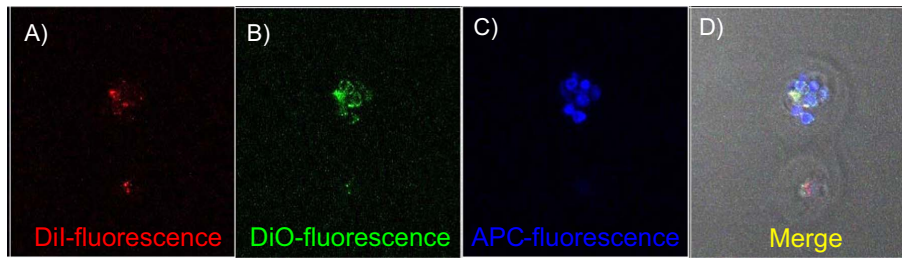


Fig. 4. Microscopic view of phagocytosis of opsonized sheep red blood cells by heterokaryons. The phagocytosis assay was performed on cocultured DiI-THP-1 and DiO Jurkat Env⁺ cells as described in legend to Fig. 3. Microscope images of the same field show the DiI red fluorescence (A) and the DiO green fluorescence (B) in two proximal heterokaryons. Only the cell on the upper side has engulfed APC-labeled SRBC, shown in blue (C). (D) Merge on bright field. Magnification, x1000.

3.5. Heterokaryons' morphology

Induction of differentiation of THP-1 cells to macrophages using agents such as PMA or vitamin D3 produces changes in morphology and adherence of the cells to the culture flasks [36]. In the course of fusion experiments between THP-1 and Env⁺ Jurkat cells, we consistently observed the presence of elongated cells in the bottom of the plastic wells in the absence of activation stimulus. Such a change in cell morphology was not observed in cocultures of THP-1 with nonfuso-

genic Env⁺ Jurkat cells (522 F/Y cells) (Fig. 6), so it required fusion and not only the exposure of Env on the surface of Jurkat cells. To determine the effect of fusion on cell morphology, the number of heterokaryons (double fluorescent cells) with altered morphology was counted by fluorescence microscopy. Heterokaryons showed heterogeneous size and morphology, with some being small and round or enlarged and round, and others elongated and with projections. About half of double fluorescent cells (54.3%) exhibited morphological changes (i.e., not round) with many resembling differentiation into

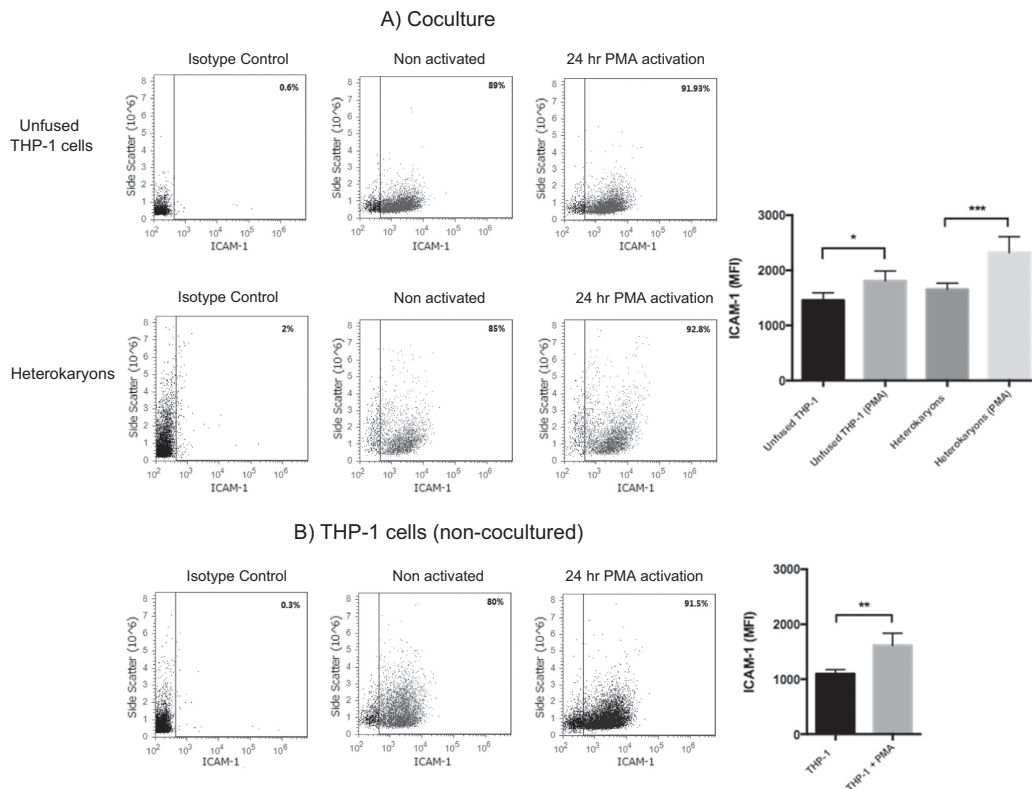


Fig. 5. (A) Expression of ICAM-1 in cells from cocultures of DiI-THP-1 and DiO- Env⁺ Jurkat cells, with or without 24 h stimulation with PMA (15 nM). The expression of ICAM-1 in THP-1 cells that remained unfused and heterokaryons was determined in the single red and the double fluorescent cell populations, respectively (as shown in Fig. 3) using an anti-ICAM-1 APC-conjugated monoclonal antibody. (B) Expression of ICAM-1 in non-cocultured DiI-THP-1 cells. Histograms show the mean fluorescence intensity (MFI) index of ICAM-1⁺ cells from three experiments.

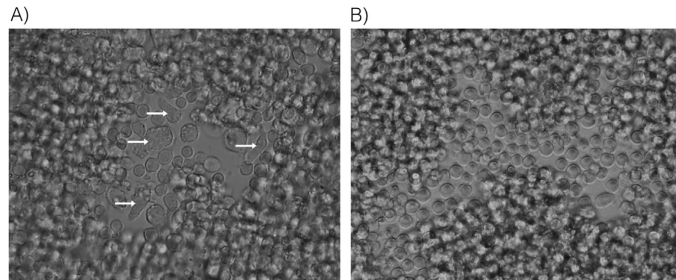


Fig. 6. Effect of coculture of THP-1 and Env⁺ Jurkat cells on cell morphology. THP-1 cells were cocultured with A) Env⁺ Jurkat cells or B) Jurkat non-fusogenic 522 F/Y Env⁺ cells for 24 h. Arrows indicate cells with altered morphology. Magnification, x200.

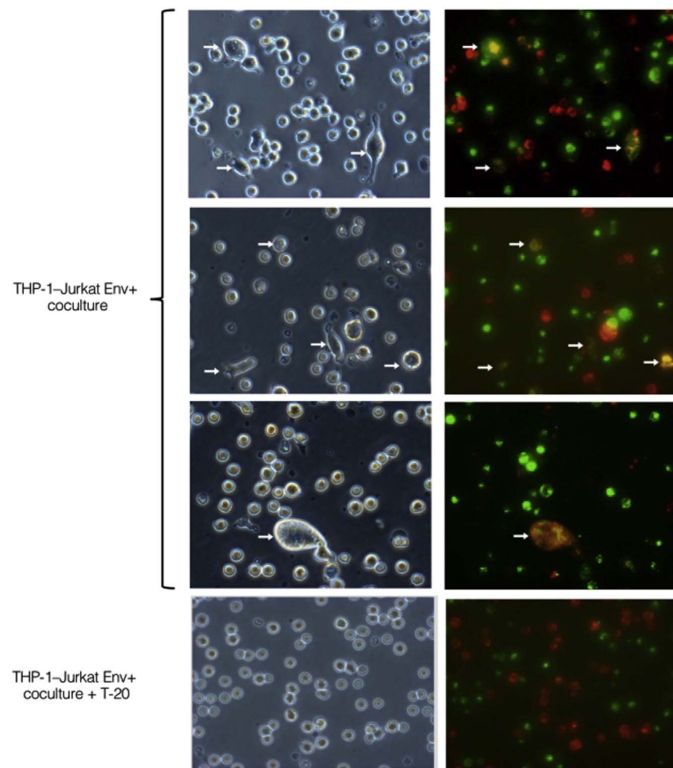


Fig. 7. Morphology of monocyte-lymphocyte heterokaryons. Light microscopy and merged fluorescence images of different fields of cocultures of DiI-THP-1 (red) and DiO-Env⁺ Jurkat (green) cells. Double fluorescent heterokaryons (yellow-orange) are indicated by arrows. The lower pictures show the appearance of cocultures in the presence of T-20. Magnification, x200.

macrophages. Cells with altered morphology were not observed in the presence of the T-20 fusion inhibitor (Fig. 7).

3.6. Expression of CD11b

Given that heterokaryons morphology was suggestive of differentiation, we examined the expression of the monocyte differentiation antigen CD11b in heterokaryons and in THP-1 cells that remained unfused in cocultures, using an APC-conjugated anti-CD11b monoclonal antibody. Fig. 8A shows that the expression of CD11b was

consistently detected in an average of 41% of heterokaryons in the absence of differentiation agents. Notably, CD11b was not expressed by monocytes remaining unfused in the same cocultures (Fig. 8A, upper middle plot), indicating that expression of CD11b was determined by fusion and not by the presence of the Env⁺ Jurkat cells. PMA treatment further increased the expression of CD11b in heterokaryons (Fig. 8A). The level of CD11b expression in heterokaryons in the absence of PMA was similar to that of non-cocultured PMA-treated THP-1 cells (Fig. 8B). Fig. 8 also shows that CD11b-expressing heterokaryons had increased cellular complexity (assessed by the SSC parameter),

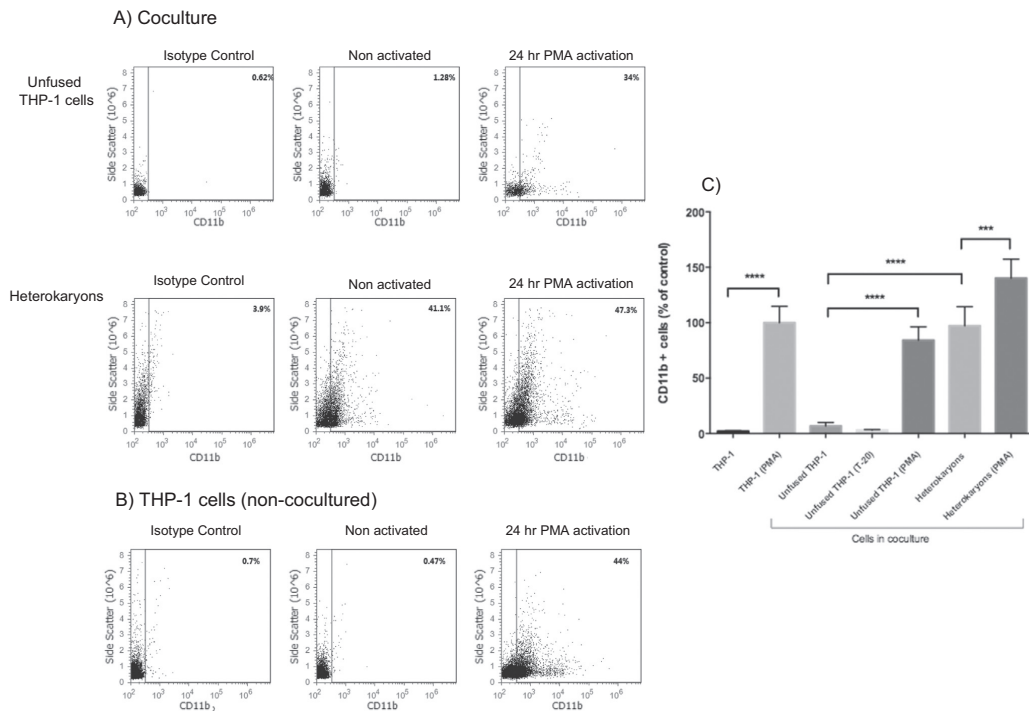


Fig. 8. (A) Expression of CD11b in cocultures of cells, with or without 24 h stimulation of the coculture with PMA (15 nM). The expression of CD11b in THP-1 cells that remained unfused and heterokaryons was determined in the single red and the double fluorescent cell populations, respectively (as shown in Fig. 3) using an anti-CD11b APC-conjugated monoclonal antibody. (B) Expression of CD11b in non-cocultured DiI-THP-1 cells. (C) Summary of results from three experiments. Data are presented as the mean percentage \pm s.e.m relative to CD11b⁺ THP-1 cells stimulated with PMA.

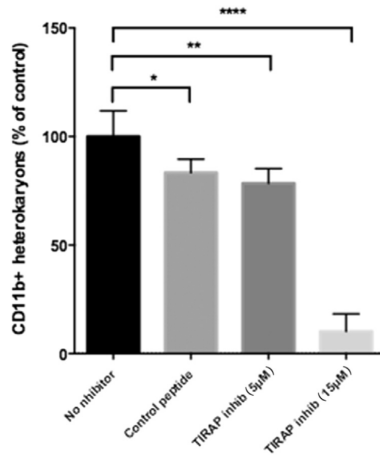


Fig. 9. Effect of TIRAP inhibitor NBP2-26245 on the expression of CD11b by heterokaryons. The expression of CD11b was determined in the double fluorescent cell population, as shown in Fig. 3. Data are presented as the mean percentage \pm s.e.m relative to CD11b⁺ heterokaryons in the absence of inhibitor.

consistent with a more differentiated phenotype. Expression of CD11b and increase in cellular complexity in heterokaryons in the absence of external activation agents suggests that fusion alone is a stimulus for monocyte differentiation.

Env acts as a viral pathogen-associated molecular pattern (PAMP) for TLR2 and TLR4 [37,57], and it has been reported that human monocytes and monocyte-derived dendritic cells (MDC) contain functional intracellular TLR2 and TLR4 [38,39]. Thus, we tested the effect of inhibition of the intracellular signaling induced by these receptors on the expression of CD11b in heterokaryons. A peptide containing a TLR2 and TLR4 TIRAP blocking sequence along with an antennapedia sequence (that enable the whole molecule to enter cells) [40] was added to THP-1 cells one hour before addition of Env⁺ cells and maintained throughout the coculture. A control peptide containing only the antennapedia sequence was tested in parallel. The TIRAP inhibitor peptide greatly reduced the expression of CD11b in heterokaryons (Fig. 9). The control peptide had a minimal effect, indicating that intracellular interaction of Env with TLR2/TLR4 participate in the differentiation phenotype of heterokaryons.

4. Discussion

The origin and function of myeloid multinucleated cells in HIV-1 infection is still uncertain. Previously, we have shown that THP-1-Env⁺ Jurkat heterokaryons loss functional properties of lymphocytes, i.e.,

the ability to express the IL2R- α chain (CD25) and intracellular IL-2 upon stimulation with PMA [26]. Here we report that heterokaryons produced by the fusion of THP-1 with HIV-1 Env⁺ Jurkat cells stably express monocyte markers and perform monocyte functions, such as Fc γ R-dependent phagocytosis activity and increased expression of ICAM-1 upon stimulation with PMA. These observations confirm that the monocyte phenotype was dominant in the fusion of cells from the myeloid and lymphoid lineages induced by HIV-1 Env.

An unexpected finding was the observation of a monocyte differentiated phenotype in heterokaryons, which was manifested as morphological changes, increased cellular complexity, and expression of the activation marker CD11b in the absence of stimulation, indicating that fusion alone operated as a stimulus for monocyte differentiation.

CD11b is the α subunit of CR3 (α M- β 2 integrin, Mac-1, complement receptor 3), and is expressed by activated human monocytes and dendritic cells in blood and spleen [41]. CD11b is expressed by THP-1 cells upon stimulation with PMA, 1,25-dihydroxy-vitamin D3 (VD3), or with oxidized low density lipoprotein [42–44] and it is important for the adherence of THP-1 cells to stimulated endothelium [45]. At least 80% of heterokaryons retained the expression of the CD32 and CD68 myeloid markers, whereas approximately half of them showed phagocytic activity, morphological change and expression of CD11b without stimulation. Expression of myeloid markers, phagocytosis ability and ICAM-1 expression by heterokaryons were similar to that of control, non-cocultured THP-1 cells, indicating that the myeloid phenotype was well preserved after fusion. Likewise, CD11b expression by non-stimulated heterokaryons was similar to the CD11b expression in PMA-activated THP-1 cells.

It is known that the interaction of soluble gp120 with chemokine receptors induce signaling events in monocytes, monocyte-derived macrophages and immature monocyte-derived dendritic cells [46–52]. gp120 also stimulates the production of IL-10 and a reduction of the synthesis of IL-12 by the monocyte population in PBMC [53,54]. In view of these findings, THP-1 cells would be expected to undergo activation in response to contact with Env expressed by Jurkat cells in the absence of fusion. In our study, however, we did not observe morphological change, increased cellular complexity, or expression of CD11b when THP-1 cells were cocultured with Jurkat cells expressing the gp120 subunit along with a gp41-mutant non-fusogenic protein, nor when the HIV-1 fusion inhibitor T-20 was present in cocultures (T-20 binds gp41 and thus it does not block gp120). These observations indicate that differentiation of THP-1 cells was not induced by interaction with the HIV-1 Env protein on Jurkat cells, nor by soluble factors released into the medium. Instead, the differentiated-monocyte phenotype of heterokaryons was compatible with molecular interactions at the intracellular level after fusion.

Human monocytes and monocyte-derived dendritic cells (MDC) contain intracellular TLR2 and TLR4 associated with the Golgi complex and microtubules [38–55]. Intracellular TLR2/4 can be functional, as disruption of their expression in MDC inhibited IL-12 production after phagocytosis of the bacteria *N. meningitidis* [38]. Functionality of intracellular TLR4 in response to LPS has also been described in human endothelial cells [39] and in murine intestinal epithelial cells [56]. In the later case, TLR4 was found at high concentration in the Golgi apparatus.

HIV Env acts as a viral pathogen-associated molecular pattern (PAMP) for TLR2 and TLR4 [37,57]. Notably, signaling through the Env-TLR interaction at the cellular surface required the presence of heparan sulfates (HS) in genital epithelium [37]. In our study, the requirement of HS may account for the lack of activation of THP-1 cells only by contact with Env expressed on Jurkat cells, since, in contrast to differentiated macrophages, THP-1 cells and circulating monocytes contain very low levels of HS on their surface [58]. However, the glycosylated Env precursor (gp160) transits in the trans-Golgi network, where oligosaccharides acquire complex modifications before gp160 is processed by proteases and transported to the plasma membrane [59].

Thus, intracellular contacts between the Env precursor and TLR2 and/or TLR4 in Golgi compartments may induce signals that induce differentiation events in heterokaryons. Our observations show that specific inhibition of TLR 2/4 signaling through blocking of the TIR adaptor protein (TIRAP) inhibited the expression of the activation marker CD11b by heterokaryons. It can be proposed that, upon fusion, mixing of intracellular membranes would eventually lead to detection of Env by TLR2/4 in Golgi compartments. Then, the cytosolic TIR domain of TLR2/4 would recruit cytoplasmic TIR domain-containing proteins, such as MyD88, TIRAP, TRIF and TRAM. Together with TRAF family E3 ligases, these adaptors would induce the signaling cascade leading to the expression of genes involved in monocyte activation [60]. Although the particular pathways involved in the heterokaryon activation need to be further analyzed, it is known that the expression of CD11b is PI3K dependent in THP-1 cells [43], and that activation of TLR4 and TLR2 can induce PI3K and Akt phosphorylation via MyD88 [61,62]. Intracellular networks of the PI3K/AKT and MAPK pathways also regulate the production of pro-inflammatory cytokines like IL-23 and IL-12 [63]. Several reports have documented a marked decrease in IL-12 production by monocytes, macrophages and dendritic cells from HIV-infected patients upon stimulation with a variety of agents [64]. On the other hand, IL-23 is essential for the control of pathogens during HIV infection, whereas it can be also involved in AIDS immunopathogenesis [65]. These findings highlight the necessity of further work oriented to the analysis of the outcome of activation of monocytes by fusion with T lymphocytes through the HIV envelope protein.

Our observations implicate that fusion of monocytes with T cells through HIV Env may lie beneath the formation of multinucleated cells in HIV-1 infection. The predominance of the myeloid phenotype would preclude the identification of fusion events.

In summary, HIV-1 Env protein mediate the fusion of lymphoid and monocytic cells, forming heterokaryons with a predominantly myeloid phenotype, as indicated by the expression of surface markers and functional tests. Fusion induces monocyte differentiation events that may be mediated by interaction of the HIV-1 Env precursor with intracellular TLR4 and/or TLR2, providing a mechanism of monocyte activation that could not be induced by interactions at the surface level.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

Jurkat HXBc2(4) and 522F/Y cells (J. Sodroski) were obtained through the AIDS Research and Reference Reagent Program (AIDSRRRP), NIAD, NIH. David Martínez Méndez is a PhD candidate from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowship 364399 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT). This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (grant number CB2014/238931) and Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica of the Universidad Nacional Autónoma de México (grant number IN211716). We thank Dr. Claudia Garay Canales for useful observations to experimental procedures.

References

- [1] B.M. Ogle, M. Cascalho, J.L. Platt, Biological implications of cell fusion, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6 (2005) 567–575.
- [2] F. Clavel, P. Charneau, Fusion from without directed by human immunodeficiency virus particles, *J. Virol.* 68 (1994) 1179–1185.
- [3] J.D. Lifson, M.B. Feinberg, G.R. Reyes, L. Rabin, B. Banapur, S. Chakrabarti, B. Moss, F. Wong-Staal, K.S. Steimer, E.G. Engleman, Induction of CD4-dependent cell fusion by the HTLV-III/LAV envelope glycoprotein, *Nature* 323 (1986)

- 725–728.
- [4] J.T. Kimata, L. Kuller, D.B. Anderson, P. Dailey, J. Overbaugh, Emerging cytopathic and antigenic simian immunodeficiency virus variants influence AIDS progression, *Nat. Med.* 5 (1999) 535–541.
 - [5] D.J. Eilbott, N. Peress, H. Burger, D. LaNeve, J. Orenstein, H.E. Gendelman, R. Seidman, B. Weiser, Human immunodeficiency virus type 1 in spinal cords of acquired immunodeficiency syndrome patients with myelopathy: expression and replication in macrophages, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 3337–3341.
 - [6] R. Nardacci, A. Antinori, L.M. Larocca, V. Arena, A. Amendola, J.L. Perfettini, G. Kroemer, M. Piacentini, Characterization of cell death pathways in human immunodeficiency virus-associated encephalitis, *Am. J. Pathol.* 167 (2005) 695–704.
 - [7] H. Budka, Neuropathology of human immunodeficiency virus infection, *Brain Pathol.* 1 (1991) 163–175.
 - [8] C. Harbison, K. Zhuang, A. Gettie, J. Blanchard, H. Knight, P. Didier, C. Cheng-Mayer, S. Westmoreland, Giant cell encephalitis and microglial infection with mucosally transmitted simian-human immunodeficiency virus SHIVSF162P3N in rhesus macaques, *J. Neurovirol.* 20 (2014) 62–72.
 - [9] J.E. Bell, The neuropathology of adult HIV infection, *Rev. Neurol.* 154 (1998) 816–829.
 - [10] A. Rinfret, H. Latendresse, R. Lefebvre, G. St-Louis, P. Jolicoeur, L. Lamerre, Human immunodeficiency virus-infected multinucleated histiocytes in oropharyngeal lymphoid tissues from two asymptomatic patients, *Am. J. Pathol.* 138 (1991) 421–426.
 - [11] S.S. Frankel, B.M. Wenig, A.P. Burke, P. Mannan, L.D. Thompson, S.L. Abbondanzo, A.M. Nelson, M. Pope, R.M. Steinman, Replication of HIV-1 in dendritic cell-derived syncytia at the mucosal surface of the adenoid, *Science* 272 (1996) 115–117.
 - [12] J.L. Dargent, L. Lespagnard, A. Kornreich, P. Hermans, N. Clumeck, A. Verhest, HIV-associated multinucleated giant cells in lymphoid tissue of the Waldeyer's ring: a detailed study, *Mod. Pathol.* 13 (2000) 1293–1299.
 - [13] S.S. Frankel, K. Tenner-Racz, P. Racz, B.M. Wenig, C.H. Hansen, D. Heffner, A.M. Nelson, M. Pope, R.M. Steinman, Active replication of HIV-1 at the lymphoepithelial surface of the tonsil, *Am. J. Pathol.* 151 (1997) 89–96.
 - [14] S.B. Kapadia, C.A. Wiley, V. Soontornniyomkij, G. Wang, S.H. Swerdlow, HIV-associated Waldeyer's ring lymphoid hyperplasia: characterization of multinucleated giant cells and the role of Epstein-Barr virus, *Hum. Pathol.* 30 (1999) 1383–1388.
 - [15] J.M. Orenstein, S.M. Wahl, The macrophage origin of the HIV-expressing multinucleated giant cells in hyperplastic tonsils and adenoids, *Ultra. Pathol.* 23 (1999) 79–91.
 - [16] L. Bhoopar, T.S. Rithaporn, S. Khunamornpong, T. Bhoopar, C.R. Taylor, P.S. Thoner, Cell reservoirs in lymph nodes infected with HIV-1 subtype E differ from subtype B: identification by combined in situ polymerase chain reaction and immunohistochemistry, *Mod. Pathol.* 19 (2006) 255–263.
 - [17] M. Lewin-Smith, S.M. Wahl, J.M. Orenstein, Human immunodeficiency virus-rich multinucleated giant cells in the colon: a case report with transmission electron microscopy, immunohistochemistry, and in situ hybridization, *Mod. Pathol.* 12 (1999) 75–81.
 - [18] V. Soontornniyomkij, G. Wang, S.B. Kapadia, C.L. Achim, C.A. Wiley, Confocal microscopy assessment of lymphoid tissues with follicular hyperplasia from patients infected with human immunodeficiency virus type 1, *Arch. Pathol. Lab. Med.* 122 (1998) 534–538.
 - [19] F. Kazazi, J.M. Mathijs, P. Foley, A.L. Cunningham, Variations in CD4 expression by human monocytes and macrophages and their relationships to infection with the human immunodeficiency virus, *J. Gen. Virol.* 70 (Pt 10) (1989) 2661–2672.
 - [20] A.M. Spivak, M. Salgado, S.A. Rabi, K.A. O'Connell, J.N. Blankson, Circulating monocytes are not a major reservoir of HIV-1 in elite suppressors, *J. Virol.* 85 (2011) 10399–10403.
 - [21] S. Crowe, T. Zhu, W.A. Muller, The contribution of monocyte infection and trafficking to viral persistence, and maintenance of the viral reservoir in HIV infection, *J. Leukoc. Biol.* 74 (2003) 635–641.
 - [22] V. Le Douce, G. Herbein, O. Rohr, C. Schwartz, Molecular mechanisms of HIV-1 persistence in the monocyte-macrophage lineage, *Retrovirology* 7 (2010) 32.
 - [23] K. Konopka, N. Duzgunes, Expression of CD4 controls the susceptibility of THP-1 cells to infection by R5 and X4 HIV type 1 isolates, *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 18 (2002) 123–131.
 - [24] K. Konopka, E. Pretzer, B. Plowman, N. Duzgunes, Long-term noncytopathic productive infection of the human monocytic leukemia cell line THP-1 by human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1HIB), *Virology* 193 (1993) 877–887.
 - [25] J.M. Kilby, S. Hopkins, T.M. Venetta, B. DiMassimo, G.A. Cloud, J.Y. Lee, L. Allredge, E. Hunter, D. Lambert, D. Bolognesi, T. Matthews, M.R. Johnson, M.A. Nowak, G.M. Shaw, M.S. Saag, Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry, *Nat. Med.* 4 (1998) 1302–1307.
 - [26] E. Rivera-Toledo, L. Huerta, C. Larralde, E. Lamoyi, Quantitative and phenotypic analyses of lymphocyte-macrophage heterokaryons induced by the HIV envelope proteins: significant loss of lymphoid markers, *Exp. Mol. Pathol.* 90 (2011) 157–166.
 - [27] J. Cao, L.W. Park, A. Cooper, J. Sodroski, Molecular determinants of acute single-cell lysis by human immunodeficiency virus type 1, *J. Virol.* 70 (1996) 1340–1354.
 - [28] L. Huerta, N. Lopez-Balderas, E. Rivera-Toledo, G. Sandoval, G. Gomez-Icazbalceta, C. Villarreal, E. Lamoyi, C. Larralde, HIV-envelope-dependent cell-cell fusion: quantitative studies, *ScientificWorldJournal* 9 (2009) 746–763.
 - [29] G. Gomez-Icazbalceta, M.B. Ruiz-Rivera, E. Lamoyi, L. Huerta, FRET in the analysis of in vitro cell-cell fusion by flow cytometry, *Methods Mol. Biol.* 1313 (2015) 217–227.
 - [30] P. Mina-Osorio, E. Ortega, Aminopeptidase N (CD13) functionally interacts with Fcγ receptors in human monocytes, *J. Leukoc. Biol.* 77 (2005) 1008–1017.
 - [31] I. Licona-Limon, C.A. Garay-Canales, O. Munoz-Paletta, E. Ortega, CD13 mediates phagocytosis in human monocytic cells, *J. Leukoc. Biol.* 98 (2015) 85–98.
 - [32] E. Rivera-Toledo, N. Lopez-Balderas, L. Huerta, E. Lamoyi, C. Larralde, Decreased CD4 and wide-ranging expression of other immune receptors after HIV-envelope-mediated formation of syncytia in vitro, *Arch. Virol.* 155 (2010) 1205–1216.
 - [33] S.W. Krause, M. Zais, M. Kreutz, R. Andreesen, Activation of lymphocytes inhibits human monocyte to macrophage differentiation, *Immunobiology* 203 (2001) 709–724.
 - [34] S. Tsuchiya, M. Yamabe, Y. Yamaguchi, Y. Kobayashi, T. Konno, K. Tada, Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1), *Int. J. Cancer* 26 (1980) 171–176.
 - [35] Y. Kurihara, M. Furue, Interferon-gamma enhances phorbol myristate acetate-induced cell attachment and tumor necrosis factor production via the NF-κB pathway in THP-1 human monocytic cells, *Mol. Med. Rep.* 7 (2013) 1739–1744.
 - [36] J. Agramonte-Hevia, C. Hallal, C. Garay-Canales, C. Guerra-Araiza, I. Camacho-Arroyo, E. Ortega Soto, 1α,25-dihydroxy-vitamin D3 alters Syk activation through FcγRIII in monocytic THP-1 cells, *J. Cell Biochem.* 89 (2003) 1056–1076.
 - [37] A. Nazli, J.K. Kafka, V.H. Ferreira, V. Anipindi, K. Mueller, B.J. Osborne, S. Dizzell, S. Chauvin, M.F. Mian, M. Ouellet, M.J. Tremblay, K.L. Mossman, A.A. Ashkar, C. Kovacs, D.M. Bowdish, D.P. Snider, R. Kaul, C. Kaushic, HIV-1 gp120 induces TLR2- and TLR4-mediated innate immune activation in human female genital epithelium, *J. Immunol.* 191 (2013) 4246–4258.
 - [38] H. Uronen-Hansson, J. Allen, M. Osman, G. Squires, N. Klein, R.E. Callard, Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 are present inside human dendritic cells, associated with microtubules and the Golgi apparatus but are not detectable on the cell surface: integrity of microtubules is required for interleukin-12 production in response to internalized bacteria, *Immunology* 111 (2004) 173–178.
 - [39] S. Duzendörfer, H.K. Lee, K. Soldau, P.S. Tobias, Toll-like receptor 4 functions intracellularly in human coronary artery endothelial cells: roles of LBP and sCD14 in mediating LPS responses, *FASEB J.* 18 (2004) 1117–1119.
 - [40] L.A. Couture, W. Piao, L.W. Ru, S.N. Vogel, V.Y. Toshchakov, Targeting Toll-like receptor (TLR) signaling by Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain-containing adapter protein/MyD88 adapter-like (TIRAP/Mal)-derived decoy peptides, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 24641–24648.
 - [41] D. Mittag, A.I. Proietto, T. Loudovaris, S.I. Mannering, D. Vremec, K. Shortman, L. Wu, L.C. Harrison, Human dendritic cell subsets from spleen and blood are similar in phenotype and function but modified by donor health status, *J. Immunol.* 186 (2011) 6207–6217.
 - [42] H. Schwende, E. Fitzke, P. Ambs, P. Dieter, Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D3, *J. Leukoc. Biol.* 59 (1996) 555–561.
 - [43] A. Moenrezakhanlou, L. Shephard, L. Lam, N.E. Reiner, Myeloid cell differentiation in response to calcitriol for expression CD11b and CD14 is regulated by myeloid zinc finger-1 protein downstream of phosphatidylinositol 3-kinase, *J. Leukoc. Biol.* 84 (2008) 519–528.
 - [44] J.M. Hayden, L. Brachova, K. Higgins, L. Obermiller, A. Sevanian, S. Khandrika, P.D. Reaven, Induction of monocyte differentiation and foam cell formation in vitro by 7-ketocholesterol, *J. Lipid Res.* 43 (2002) 26–35.
 - [45] E.A. Starikova, D.I. Sokolov, A.A. Chernova, I.S. Freidlin, Changes in phenotype of monocyte-like THP-1 cells associated with transendothelial migration, *Bull. Exp. Biol. Med.* 146 (2008) 596–598.
 - [46] C. Lee, Q.H. Liu, B. Tomkowicz, Y. Yi, B.D. Freedman, R.G. Collman, Macrophage activation through CCR5- and CXCR4-mediated gp120-elicited signaling pathways, *J. Leukoc. Biol.* 74 (2003) 676–682.
 - [47] M. Del Corno, G. Donnielli, B. Varano, L. Da Sacco, A. Masotti, S. Gessani, HIV-1 gp120 activates the STAT3/interleukin-6 axis in primary human monocyte-derived dendritic cells, *J. Virol.* 88 (2014) 11045–11055.
 - [48] L.M. Wahl, M.L. Corcoran, S.W. Pyle, L.O. Arthur, A. Harel-Bellan, W.L. Farrar, Human immunodeficiency virus glycoprotein (gp120) induction of monocyte arachidonic acid metabolites and interleukin 1, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 621–625.
 - [49] L. Fantuzzi, I. Canini, F. Belardelli, S. Gessani, HIV-1 gp120 stimulates the production of beta-chemokines in human peripheral blood monocytes through a CD4-independent mechanism, *J. Immunol.* 166 (2001) 5381–5387.
 - [50] M. Zembala, S. Bach, A. Szczepanek, G. Mancino, V. Colizzi, Phenotypic changes of monocytes induced by HIV-1 GP120 molecule and its fragments, *Immunobiology* 197 (1997) 110–121.
 - [51] D. Giulian, E. Wendt, K. Vaca, C.A. Noonan, The envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 stimulates release of neurotoxins from monocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 2769–2773.
 - [52] K.E. Medders, N.E. Sejbuk, R. Maung, M.K. Desai, M. Kaul, Activation of p38 MAPK is required in monocytic and neuronal cells for HIV glycoprotein 120-induced neurotoxicity, *J. Immunol.* 185 (2010) 4883–4895.
 - [53] D. Schols, E. De Clercq, Human immunodeficiency virus type 1 gp120 induces anergy in human peripheral blood lymphocytes by inducing interleukin-10 production, *J. Virol.* 70 (1996) 4953–4960.
 - [54] Y. Taoufik, O. Lantz, C. Wallon, A. Charles, E. Dussaux, J.F. Delfraissy, Human immunodeficiency virus gp120 inhibits interleukin-12 secretion by human monocytes: an indirect interleukin-10-mediated effect, *Blood* 89 (1997) 2842–2848.
 - [55] E. Latz, A. Visintin, E. Lien, K.A. Fitzgerald, B.G. Monks, E.A. Kurt-Jones, D.T. Golenbock, T. Espevik, Lipopolysaccharide rapidly traffics to and from the Golgi apparatus with the toll-like receptor 4-MD-2-CD14 complex in a process that

- is distinct from the initiation of signal transduction, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 47834–47843.
- [56] M.W. Hornef, T. Frisan, A. Vandewalle, S. Normark, A. Richter-Dahlfors, Toll-like receptor 4 resides in the Golgi apparatus and colocalizes with internalized lipopolysaccharide in intestinal epithelial cells, *J. Exp. Med.* 195 (2002) 559–570.
- [57] B.M. Henrick, X.D. Yao, K.L. Rosenthal, I.s. team, HIV-1 structural proteins serve as PAMPs for TLR2 heterodimers significantly increasing infection and innate immune activation, *Front Immunol.* 6 (2015) 426.
- [58] I.J. Edwards, H. Xu, J.C. Obunike, I.J. Goldberg, W.D. Wagner, Differentiated macrophages synthesize a heparan sulfate proteoglycan and an oversulfated chondroitin sulfate proteoglycan that bind lipoprotein lipase, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15 (1995) 400–409.
- [59] K. Miyauchi, A.R. Curran, Y. Long, N. Kondo, A. Iwamoto, D.M. Engelman, Z. Matsuda, The membrane-spanning domain of gp41 plays a critical role in intracellular trafficking of the HIV envelope protein, *Retrovirology* 7 (2010) 95.
- [60] T. Kawasaki, T. Kawai, Toll-like receptor signaling pathways, *Front. Immunol.* 5 (2014) 461.
- [61] B.A. Watts 3rd, T. George, D.W. Good, Lumen LPS inhibits HCO₃⁻ absorption in the medullary thick ascending limb through TLR4-PI3K-Akt-mTOR-dependent inhibition of basolateral Na⁺/H⁺ exchange, *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* 305 (2013) F451–F462.
- [62] I.T. Lee, C.C. Lin, C.K. Hsu, M.Y. Wu, R.L. Cho, C.M. Yang, Resveratrol inhibits *Staphylococcus aureus*-induced TLR2/MyD88/NF- κ B-dependent VCAM-1 expression in human lung epithelial cells, *Clin. Sci.* 127 (2014) 375–390.
- [63] J.H. Quan, J.Q. Chu, J. Kwon, I.W. Choi, H.A. Ismail, W. Zhou, G.H. Cha, Y. Zhou, J.M. Yuk, E.K. Jo, Y.H. Lee, Intracellular networks of the PI3K/AKT and MAPK pathways for regulating *Toxoplasma gondii*-induced IL-23 and IL-12 production in human THP-1 cells, *PLoS One* 10 (2015) e0141550.
- [64] F. Villinger, A.A. Ansari, Role of IL-12 in HIV infection and vaccine, *Eur. Cytokine Netw.* 21 (2010) 215–218.
- [65] G.R. Yannam, T. Gutti, L.Y. Poluektova, IL-23 in infections, inflammation, autoimmunity and cancer: possible role in HIV-1 and AIDS, *J. Neuroimmune Pharm.* 7 (2012) 95–112.