



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

*IDENTIFICACIÓN DE ANTÍGENOS ASOCIADOS A LA PRODUCCIÓN DE
ANTICUERPOS INHIBIDORES DE LA FUSIÓN DE MEMBRANAS INDUCIDA POR EL
VIH-1*

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA
QFB. MIRNA BERENICE RUIZ RIVERA

TUTOR PRINCIPAL
DRA. LEONOR HUERTA HERNÁNDEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

COMITÉ TUTOR
DRA. ISABEL SADA OVALLE
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS
DR. LUIS LLORENTE PETERS
INSTITUTO DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICIÓN "SALVADOR ZUBIRÁN"

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., SEPTIEMBRE 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: DR. CARLOS ROSALES LEDEZMA

SECRETARIO: DRA. LEONOR HUERTA HERNÁNDEZ

VOCAL: DRA. YOLANDA LÓPEZ VIDAL

VOCAL: DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA

VOCAL: DRA. SANDRA PINTO CARDOSO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Leonor Huerta Hernández

SUSTENTANTE (S):

Mirna Berenice Ruiz Rivera

A mi familia:

Mis padres: por estar siempre a mi lado, por su apoyo incondicional, y por ser los pilares de mi vida.

Gisela, Estrella y Laura: porque siempre han estado conmigo y me han apoyado en todo momento.

Santiago: llegaste a mi vida en la recta final de este proyecto, pero eres la mayor motivación de mi vida. Te amo.

Jorge: con quien es un placer compartir mi vida. Y quien junto a Santiago hacen mi vida muy feliz.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Leonor Huerta por compartir su conocimiento y experiencia con nosotros y por sus enseñanzas en la elaboración de este trabajo.

A los miembros de mi comité tutor: Dra. Isabel Sada y Dr. Luis Llorente por su disposición y tiempo para discutir los resultados, así como por brindarme su asesoramiento.

Al Dr. Edmundo Lamoyi, por su apoyo y conocimiento durante la elaboración del proyecto, por su disposición para discutir los resultados, escuchar propuestas y brindarnos consejos.

Al Servicio de Medicina Transfusional del INCMNSZ coordinado por el Dr. Antonia Velazquez Gonzalez

A Dra. Monica Viveros, Dr. Luis Leon y Santiago Pérez Patrigeon por las asesorías en el manejo de pacientes con VIH, la disposición para discutir resultados y brindar consejos.

Al LABNALCIT por facilitarnos y asesorarnos en el uso de los equipos de citometría de flujo.

A los investigadores asignados como Jurado por el tiempo dedicado a la revisión de esta Tesis.

A la Dra. Nora Fierro por su apoyo y ánimo.

A mis compañeros de laboratorio por brindarme su ayuda incondicional, compañía y apoyo durante estos años.

A CONACyT por la beca de Doctorado y la beca en el proyecto de investigación CONACYT CIENCIA BÁSICA 2014/238931

A PAPIIT-DGAPA por el financiamiento al PROYECTO IN215820 y la beca de obtención de grado.

ÍNDICE

Abreviaturas	9
Resumen	11
Introducción	14
1.2 Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) y SIDA.....	15
1.3 Curso Natural de la Infección por el VIH-1	21
1.3.1 Fase Aguda	22
1.3.2 Periodo Asintomático	23
1.3.3 SIDA	24
1.4 Mecanismo de fusión mediado por las proteínas del VIH-1	26
1.4.1 Fusión Celular y su participación en la diseminación y patogénesis en la Infección por el VIH-1	32
1.5 Anticuerpos en la infección por el VIH-1	35
1.6 Autoanticuerpos en la infección por el VIH-1	37
1.6.1 Anticuerpos anti-linfocito (ALA).....	43
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	45
3. HIPOTESIS.....	46
4. OBJETIVOS	46
4.1 General:	46
4.2 Particulares:.....	47
5. JUSTIFICACIÓN.....	47
6. METODOLOGIA	48
6.1 Materiales	48
6.1.1 Pacientes e individuos control.....	48
6.1.2 Líneas celulares.....	49
6.1.3 Trazadores lipofílicos fluorescentes	50
6.2 Cultivo celular.....	50
6.3 Inducción de la expresión de proteínas de la envoltura viral en células Jurkat	51
6.4 Tinción con colorantes fluorescentes vitales lipofílicos	51
6.5 Ensayo de fusión celular por citometría de flujo.....	51
6.6 Fijación con paraformaldehído (PFA) al 2%.....	52
6.7 Preparación de las diluciones del suero de los pacientes	53

6.8	Inmunofluorescencia indirecta (Presencia de ALA en el suero).....	53
6.9	Adsorción de anticuerpos anti-linfocito con células Jurkat CD4-	54
6.10	Preparación de extractos de proteínas integrales de la membrana	56
6.11	Análisis electroforético y por Western Blot de las proteínas de membrana de las células Jurkat T CD4 negativas.....	56
6.12	Análisis de imágenes	59
6.13	Purificación de linfocitos CD4 de donadores sanos.....	60
6.14	Citometría de flujo.....	60
6.15	Pruebas estadísticas	61
7.	RESULTADOS.....	61
7.1	Caracterización y cuantificación de la fusión celular por citometría de flujo.....	61
7.2	Efecto del suero sobre la fusión celular.....	63
7.3.	Determinación de la unión de IgG del suero a células Jurkat CD4+	66
_Toc1025627187.4 Actividad del suero y su relación con los parámetros clínicos de la infección.		
72		
7.5	Efecto de la adsorción de IgG en células Jurkat CD4 negativas sobre la fusión de membranas mediada por la envoltura del VIH y linfocitos T CD4 primarios.....	76
7.6	Identificación de antígenos reconocidos por los Anticuerpos Anti-Linfocito.....	77
_Toc102562727_Toc1025627288. Discusión.....		86
9.	Conclusiones	93
10.	Limitaciones del estudio.....	94
11.	Ventajas del estudio	95
12.	Perspectivas	95
13.	Referencias.....	96
14.	APENDICE A.....	117
14.1	Determinación de proteínas por Bradford	117
14.2	Electroforesis 1D	118
14.3	Western Blot.....	121
14.4	Purificación de Anticuerpos, Kit Proteus MIDI (PUR0-12 de BIO RAD)	124
14.5	Separación de PBMCs por gradiente de Ficoll.....	127

Indice de Figuras

Figura 1. Virus de Inmunodeficiencia Humana. ENV: Envoltura	16
Figura 2. Organización del genoma de VIH-1.....	19
Figura 3. Esquema del ciclo replicativo del VIH-1 que inicia con la unión del virus a los receptores y correceptores celulares, y la fusión de la envoltura viral con la membrana de la célula blanco.	21
Figura 4. Esquema que representa el curso natural de la infección por el VIH.....	24
Figura 5. Esquema de la estructura secundaria de la glicoproteína 120 con las regiones variables (V1-V5).....	27
Figura 6. Esquema de la estructura secundaria de la proteína gp41.....	29
Figura 7. Esquemas de las estructuras en gp41.....	29
Figura 8. Interacción de Env con receptores y fusión de membranas.....	31
Figura 9. Gráficos de puntos de la fusión entre células Jurkat Env ⁺ expresando el complejo Env funcional y células Jurkat E6 no transfectadas.....	63
Figura 10. Análisis de la fusión entre células Jurkat CD4 ⁺ y Jurkat Env ⁺ por citometría de flujo..	64
Figura 11. Efecto del suero de 38 individuos VIH + y 30 donantes sanos (VIH -) sobre la fusión de células Env ⁺ con células Jurkat CD4 ⁺	65
Figura 12. Unión de ALA de tipo IgG e IgM antes y después de la adsorción de los sueros con células Jurkat E6 CD4 ⁺	68
Figura 13. Se muestra Unión de IgM (a) e IgG (b) en suero de individuos VIH + y donantes sanos a la superficie de las células T Jurkat CD4 ⁺ con graficas de dispersión.	69
Figura 14. Graficas de dispersión que muestran la unión de IgM.	70
Figura 15. Con graficas de dispersión se analizó la actividad de sueros no adsorbidos (NA) y adsorbidos (A) sobre la fusión de células Jurkat Env + con células Jurkat CD4 ⁺	71
Figura 16. Tendencia que asocia el nivel de ALA inhibidores de la fusión con la carga vira en la sangre de los pacientes VIH+.....	74
Figura 17. Graficos de línea se analizó el efecto del suero y de IgG purificada sobre la fusión entre células Env ⁺ y células Jurkat CD4 ⁺	77
Figura 18. Espectro de proteínas de membrana de las células Jurkat CD4 negativas en un gel de electroforesis.	78
Figura 19. Análisis de electroforesis bidimensional del extracto de proteínas de la membrana de células Jurkat CD4 negativas.	79
Figura 20. Membranas de Nitrocelulosa procesadas con la técnica de Western Blot.....	81

Figura 21. Western Blot de- electroforesis 2D de proteínas de membrana de células Jurkat CD4-.	84
Figura 22. Búsqueda de proteínas comunes entre los tres pools	86

Indice de Tablas

Tabla 1. Proteínas de la membrana de viriones que se derivan de la célula de origen.....	38
Tabla 2. Moléculas de la membrana celular implicadas en la transmisión de la fusión célula-célula o de la célula inducida por el virus VIH-1.	40
Tabla 3. Proteínas de la membrana de células T que son reconocidas por los anticuerpos del suero de pacientes con VIH-1.	45
Tabla 4. Comparación entre los sueros de pacientes VIH + que contienen ALA inhibidores de la fusión	74

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico de doble cadena
ALA	Anticuerpos anti-linfocito
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ssARN	Ácido ribonucleico monocatenario
CA	Cápside
DC	Células dendríticas
Dil	Perclorato de 1,1'-dioctadecil-3, 3,3',3'-tetrametilindocarbocianina
DiO	Perclorato de 3,3'-dioctadeciloxacarbocianina
DMSO	Dimetil sulfóxido
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
HR1	Secuencia hepta repetida 1
IMF	Intensidad media de fluorescencia
IN	Integrasa
LLP-1	Péptido lítico de lentovirus 1
LTR	Región repetida terminal larga
MA	Matriz
NC	Nucleocápside
Nef	Factor negativo
PBS	Amortiguador fosfato salino
PIC	Complejo de preintegración
PR	Proteasa
Rev	Proteína reguladora
RT	Transcriptasa Reversa
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
T20	Enfuvirtida
VIH-1	Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1
Env	Glicoproteína de envoltura del VIH
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
CD44	Receptor de superficie celular del hialuronato
CD55	El factor acelerador de la descomposición del complemento
CD59	Proteína inhibitoria del complejo de ataque a la membrana
HLA-I y HLA-II	Antígenos leucocitarios humanos
ICAM-1	Glucoproteína de la superficie celular
LFA-1	El antígeno 1 asociado a la función linfocitaria
CD3	Forma parte de un complejo más grande que incluye el receptor de linfocitos
CD25	Cadena alfa del receptor de interleucina-2
CD26	Ectoenzima de la dipeptidilpeptidasa IV
CD36	Glicoproteína plaquetaria 4

CD14	Es una glicoproteína de membrana superficial de cadena única ligada a glicosilfosfatidilinositol
CD86	Glicoproteína transmembrana de cadena única
CD80	Glucoproteínas de estructura francamente similar de la familia de las inmunoglobulinas
$\alpha 4\beta 7$	Integrina que se expresa en la mayoría de los leucocitos
CD4	Cúmulo de diferenciación 4, es una molécula que se expresa en la superficie de algunas células T y en las células dendríticas
CCR5	C-C quimiocina receptora de tipo 5
CXCR4	El receptor de quimiocinas C-X-C de tipo 4, también conocido como fusina
PSGL-1	El ligando de selectina P
IFITM	Proteína transmembrana 1 inducida por interferón
SERINC3	El incorporador de serina 3
CD95/CD95L	Fas o APO-1 es una glicoproteína transmembrana
CD43	Leucosialina también conocido como sialoforina o CD43 es una proteína transmembranal
CD11b	Integrin alpha M es una subunidad proteica que forma la molécula heterodimérica de integrina alfa-M beta-2, también conocida como antígeno de macrófago-1 o receptor del complemento
Tat	Transactivador de la transcripción genética
Vif	Factor de infectividad viral
Vpu	Proteína viral U
APOBEC3G (A3G)	Enzima editora de ARNm de apolipoproteína B, subunidad catalítica 3G
MHC-I	Complejo Mayor de Histocompatibilidad I
SFB	Suero Fetal Bovino
CO ₂	Dioxido de Carbono
MPER	Region externa proximal de la membrana
DTT	Ditiotreitol
ZAP70	Proteína Clnasa 70 zeta-asociada
DNM2	Dinamina 2
LES	Lupus Eritematoso Sistemico
SDS	Docecilsulfato sódico
BnAds	Anticuerpos neutralizantes de amplio espectro
%	Porcentaje
°C	Grados centígrados
rpm	Revoluciones por minuto
mL	Mililitro
mm ³	Milimetro cubico
nm	Nanometro
min	Minuto
μ L	Micro Litro
M	Molaridad
pH	Potencial Hidrógeno

RESUMEN

La proteína de la envoltura del VIH-1 (Env) media el proceso de fusión de la membrana viral y celular permitiendo la entrada del virus a las células diana. La eficiencia para inducir la fusión de la membrana es un determinante importante de la patogenicidad del VIH-1. Además de los receptores conocidos para la entrada del virus (CD4, CCR5, CXCR4), otros componentes de la membrana celular pueden favorecer la fusión (e.g. moléculas de adhesión o señalización). La participación de moléculas del hospedero en la fusión inducida por Env implica que anticuerpos anti-linfocito (ALA) presentes en el suero de pacientes con VIH en conjunto con anticuerpos anti-Env pueden contribuir a la inhibición de la fusión de membranas mediada por Env y la propagación del virus. En el presente trabajo se planteó investigar la frecuencia de la presencia de ALA capaces de influir en la fusión de membranas mediada por Env, en pacientes VIH-positivos (VIH+) que no han recibido tratamiento antirretroviral.

En esta tesis se estudió: 1) la frecuencia de ALA en el suero de una muestra de pacientes VIH+, 2) el efecto del suero de los pacientes sobre la fusión de células linfocitarias mediada por Env; 3) la participación de los ALA en el efecto inhibitorio del suero sobre la fusión celular inducida por Env, y 4) el reconocimiento de proteínas específicas de la membrana linfocitaria por los ALA presentes en el suero de pacientes VIH+.

Los sueros de 38 hombres VIH+ y 30 donantes sanos fueron analizados para detectar la presencia de IgG e IgM capaces de unirse a la membrana de la línea linfocitaria humana Jurkat T CD4+. Se detectaron ALA tipo IgG e IgM en el 74% y el 84% de los sueros VIH+, respectivamente.

Para el estudio del efecto del suero sobre la fusión, se utilizaron células Jurkat transfectadas establemente con el gene *env* de una variante de VIH-1 altamente fusogénica (células Env+) y células Jurkat T CD4+ (Jurkat CD4+) como diana. Las células se marcaron diferencialmente con colorantes lipofílicos (fluorescentes Dil (fluorescente en rojo) y DiO (fluorescente en verde)) y se cocultivaron por 5 horas. Las células fusionadas (con fluorescencia mixta) se cuantificaron por citometría de flujo. Para evaluar la

participación de los ALA en el efecto del suero sobre la fusión, éstos se removieron absorbiéndolos por incubación con células Jurkat a 4°C. La actividad de los sueros sobre la fusión de las células CD4+ con células Env+ fue determinada antes y después de la remoción de los ALA.

El 58% de las muestras de suero analizadas mostraron actividad inhibidora de la fusión relacionada a ALA, lo cual conduce a proponer que una fracción significativa de individuos VIH+ producen anticuerpos capaces de contribuir a la inhibición de la fusión inducida por Env. En este documento se denomina a estos anticuerpos “ALA inhibidores de la fusión”. La proporción en que los ALA contribuyeron a la actividad inhibidora de la fusión de sueros individuales fue muy variable, con un promedio del 33%.

De forma concordante, la IgG purificada de un grupo de sueros VIH+ inhibió la fusión de linfocitos T CD4 primarios con Jurkat Env+, y la adsorción de las IgG en células Jurkat disminuyó la actividad inhibidora de la fusión. Por tanto, la actividad inhibidora de los sueros se relacionó con ALA tipo IgG. Nuestras observaciones sugieren que los ALA inhibidores de la fusión pueden contribuir significativamente a la inhibición de la fusión célula-célula mediada por Env. ALA inhibidores de la fusión, pero no niveles de ALA totales, se asociaron con cargas virales plasmáticas bajas en el suero de los pacientes, lo que sugiere que ALA específicos podrían participar en la contención del virus inhibiendo la fusión virus-célula en una fracción significativa de pacientes infectados por el VIH.

Para el reconocimiento de los antígenos linfocitarios reconocidos por las IgG del suero, se obtuvo un extracto de proteínas de membrana de células Jurkat CD4-negativas. Realizamos un western blot para identificar las proteínas de membrana de células Jurkat CD4-negativas que reaccionan con el suero de pacientes VIH+ e individuos sanos. Con base en los resultados del efecto inhibitorio de suero después de la adsorción de los ALA se consideraron 3 grupos de estudio, el primero compuesto por los sueros de individuos sanos, el segundo por los sueros de pacientes VIH+ que tienen ALA relacionados con la inhibición de la fusión celular y el tercer grupo por los sueros de pacientes VIH+ que contienen ALA que no están relacionados con la inhibición de la fusión celular.

Se observaron diferencias entre el número de proteínas de membrana del extracto celular reconocidas por los ALA presentes en los sueros de individuos sanos y los sueros de pacientes VIH+. Los sueros de pacientes VIH+ contienen una variedad mayor de ALA capaces de reconocer proteínas del extracto de células Jurkat CD4-negativas que los sueros de individuos sanos. Por otra parte, se observaron diferentes patrones de reconocimiento de los ALA presentes en los diferentes grupos de sueros VIH+, siendo los sueros de pacientes VIH+ con ALA que inhiben la fusión celular el grupo que presenta un mayor número de spots y solo alguna de estas proteínas que son reconocidas por ALA del pool 3 no se encuentran en ninguno de los otros pools. Esto nos indica que los ALA que no inhiben la fusión celular tienen especificidad diferente a los ALA que sí inhiben la fusión celular. Estas observaciones indican que los ALA relacionados a la inhibición de la fusión celular reconocen antígenos particulares. Por lo tanto, es de relevancia la identificación de las proteínas reconocidas por los ALA que están relacionados con la inhibición de la fusión celular mediada por Env. Las observaciones reportadas aquí pueden contribuir a un mejor conocimiento de los mecanismos de contención de la infección por la respuesta inmune humoral durante la infección por el VIH-1, así como a la identificación de nuevos blancos terapéuticos.

1. INTRODUCCIÓN

Han pasado más de tres décadas desde el descubrimiento del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) en el año de 1984 ^{1,2,3}, como causa del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). A pesar de que existen tratamientos efectivos para suprimir la replicación del virus en las personas infectadas y prevenir la transmisión del virus, actualmente, la infección por VIH sigue siendo uno de los mayores problemas de salud pública a nivel mundial. Se estima que han muerto 32,7 millones [24,8 millones–42,2 millones] de personas a causa de enfermedades relacionadas con el SIDA al cierre del 2019 según las cifras de ONUSIDA. En el 2020 alrededor del mundo 38 millones de personas vivían con VIH. En México existen 312,954 personas diagnosticadas con VIH, de las cuales han fallecido 109,837 personas y cada año se siguen diagnosticando casos nuevos.

El virus de inmunodeficiencia humana (VIH) infecta a las células del sistema inmunitario, alterando su función. La infección produce un deterioro progresivo del sistema inmunitario por una progresiva pérdida y disfuncionalidad de linfocitos T CD4+.

El VIH pertenece a la familia de los *lentivirus* y se clasifica en dos tipos: VIH-1 y VIH-2 que tienen un 40-50% de homología genética y una organización genómica similar. El VIH-1 es el causante de la pandemia mundial de sida mientras que el VIH-2, aunque también puede producir sida, se considera menos patogénico y menos transmisible. El VIH-2 se encuentra confinado principalmente a zonas del África occidental, aunque se han detectado algunos casos en Europa y EE.UU. Tanto el VIH-1 como el VIH-2 provienen de diferentes saltos inter-especie de virus que infectan en la naturaleza a poblaciones de simios en África.

El VIH se encuentra libre en sangre o en células infectadas en mucosas de los pacientes infectados. El curso de la infección con el VIH en ausencia de un tratamiento antirretroviral se divide en tres etapas: infección primaria (o aguda), infección crónica (asintomática) y progresión a la enfermedad (SIDA). El SIDA es un término que se define por un conteo inferior a 200 células/ μ L en los estadios más avanzados de la infección por

VIH y se caracteriza por la presencia de alguna de las más de 20 infecciones oportunistas o de cánceres relacionados con el VIH.

A pesar de los importantes avances en la investigación biomédica, una cura o una vacuna confiable sigue siendo difícil de alcanzar. El desarrollo de una vacuna contra el VIH se ve obstaculizado por la diversidad genética del VIH y la capacidad del virus para evadir las respuestas inmunitarias. Si bien se han identificado anticuerpos de origen natural con una amplia y potente actividad de neutralización del VIH, estos solo aparecen en una minoría de pacientes, tardan años en desarrollarse y contienen un alto grado de mutaciones somáticas⁴. Por lo tanto, sigue siendo cuestionable si dichos anticuerpos se pueden provocar mediante estrategias de vacunación convencionales.

1.2 Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) y SIDA

1.2.1 Características y organización genómica del VIH-1

El VIH-1 pertenece a la familia *Retroviridae* y al género *Lentivirus*. Los retrovirus se caracterizan por tener un genoma de ARN de cadena sencilla que se transcribe a ADN complementario dentro de la célula a través de la enzima viral transcriptasa reversa. El ADN viral sintetizado es insertado posteriormente en el genoma de la célula hospedera⁵.

La partícula del VIH-1 mide entre 100 y 130 nm de diámetro, es de forma esférica y tiene una bicapa lipídica que toma de la célula huésped donde se insertan 72 complejos de proteínas glucosiladas de la envoltura Env necesarias para el reconocimiento y la entrada del virus a la célula. Por debajo de la envoltura, la proteína miristilada MA (p17) forma la matriz viral de estructura icosaédrica. En el centro, se encuentra la cápside que asemeja a un cono y está constituida por la proteína viral más abundante en la partícula, CA (p24)⁶. La cápside encierra el genoma viral, su genoma consta de 9.2 kilobases, integrado en dos copias de ácido ribonucleico de cadena sencilla, (ssARN) en forma lineal, de polaridad positiva, en el sentido 5' - 3' y flanqueado por dos marcos de repetición, junto con las enzimas: proteasa, transcriptasa e integrasa. Figura 1^{7,8}

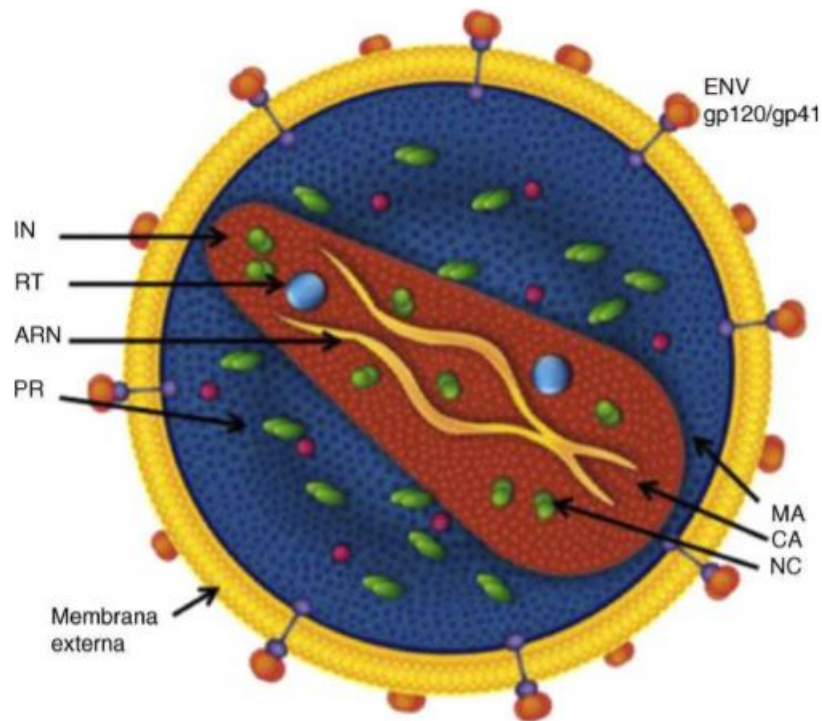


Figura 1. .Virus de Inmunodeficiencia Humana. ENV: Envoltura, MA: Matriz, CA: Cápside, NC: Nucleocápside, IN: Integrasa, RT: Retrotranscriptasa, PR, Proteasa, ARN: Genoma del virus. Ilustración tomada de R. Delgado / Enferm Infecc Microbiol Clin. 2011.

Sus genes se clasifican en estructurales, reguladores y accesorios. Los genes virales que codifican para las proteínas estructurales son *gag*, *pol* y *env*. El gen *gag* codifica para la proteína precursora p55, que se asocia a las dos copias del RNA viral durante la síntesis de las partículas virales. El gen *pol* codifica para tres enzimas: una transcriptasa reversa (RT), una integrasa (IN) y una proteasa (PR). La proteasa viral, denominada p10, corta al precursor mixto de Gag-Pol para generar monómeros de Gag y Pol. Una vez separados los monómeros p10 corta a la proteína p55 durante la maduración del virión, para dar lugar a cinco proteínas estructurales: p24, p17, p6, p7 y p9. La p24 forma la cápside viral (CA), p17 constituye la matriz (MA) situada bajo la envoltura y, las proteínas p6, p7 y p9 forman la nucleocápside (NC).

La transcriptasa inversa (RT) denominada p50, lleva a cabo la síntesis del ADN de doble cadena del virus a partir de la cadena simple del ARN viral. Una vez formada la primera cadena de ADN complementaria del ARN viral, el dominio de ribonucleasa de la

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

El gen *env* sintetiza a la proteína Env, que está formada por el precursor gp160, el cual es a su vez cortado por la proteasa p10, para dar lugar a las proteínas gp120 y gp41⁹. La gp41 se inserta en la bicapa lipídica de la envoltura viral mediante un dominio transmembranal, mientras que gp120 interacciona con gp41 mediante uniones no covalentes en la parte externa de la membrana^{9,10} gp120 y gp41 se asocian adicionalmente formando trímeros^{11,12}.

Además de las proteínas estructurales, el genoma del VIH-1 expresa proteínas reguladoras, que son proteínas que tienen función directa sobre la célula hospedera: la proteína Transactivadora (Tat) y la proteína Reguladora de la expresión de proteína viral (Rev). Tat es una proteína implicada en la regulación positiva de la replicación del VIH-1,¹³ mediante su unión a una región del ARN viral, para potenciar la transcripción, mientras que Rev se encarga de regular la expresión de las proteínas virales que son necesarias para la producción de nuevos viriones, al controlar el ritmo de exportación del ARNm viral al citoplasma^{14,15}.

El genoma viral también codifica para proteínas accesorias, las cuales no forman parte del virus maduro, pero desempeñan un papel importante en los acontecimientos tempranos de la infección por el VIH-1, ya que afectan eventos como el ensamblaje,^{16,17} ciclo celular, gemación e infectividad durante la producción de virus infecciosos^{13,18}.

Las proteínas accesorias son Vif, Vpu y Nef. La proteína Vif forma parte de la partícula viral, su función la realiza antes que el virus gema de la célula. La Vif previene que el virus acarree a la proteína celular APOBCEG (A3G), un factor de restricción antiviral que interfiere con la retrotranscripción. A3G es una citidina desaminasa celular que se une al ARN,^{13,19,20} al momento de la retrotranscripción causa la mutación de la dC por dU en la primera hebra de ADN retrotranscrita; posteriormente por cada dU se

adiciona dA a la segunda hebra de ADN (hebra positiva) generada. El gran número de mutaciones que introduce A3G genera un ADNc proviral abortivo ²¹. La proteína Vif induce la degradación de APOBEC3G vía proteosoma (26S) ²², específicamente Vif interactúa con la ubiquitin ligasa E ²³, para inducir la poliubiquitinación de A3G. La degradación de A3G evita que sea incorporada en los virus recién formados; lo que impide la retrotranscripción defectuosa antes mencionada.

La proteína Vpu tiene dominios que la unen con la membrana, ²⁴ principalmente del retículo endoplasmático rugoso y del aparato de Golgi. A su estructura y localización en la membrana se le asocian dos actividades importantes para la replicación viral. Promueve la liberación de partículas virales de la membrana celular; desestabiliza la membrana, agrupándose para formar un canal iónico.^{25,26} Por otra parte, Vpu regula negativamente la expresión de CD4. Esta regulación negativa evita que CD4 se una con el complejo Env dentro de la misma célula; lo que permite una concentración óptima de Env en la membrana celular, necesaria para la gemación viral ²⁷.

La proteína Nef (acrónimo de *negative* factor, por sus siglas en inglés) interactúa con proteínas celulares que inducen la regulación negativa de la expresión de CD4 y MHC-I, lo que conduce a la evasión del sistema inmune. Además, Nef reduce el umbral de activación del linfocito T CD4+, con lo que facilita la integración del genoma viral y la replicación del virus ^{28,29}.

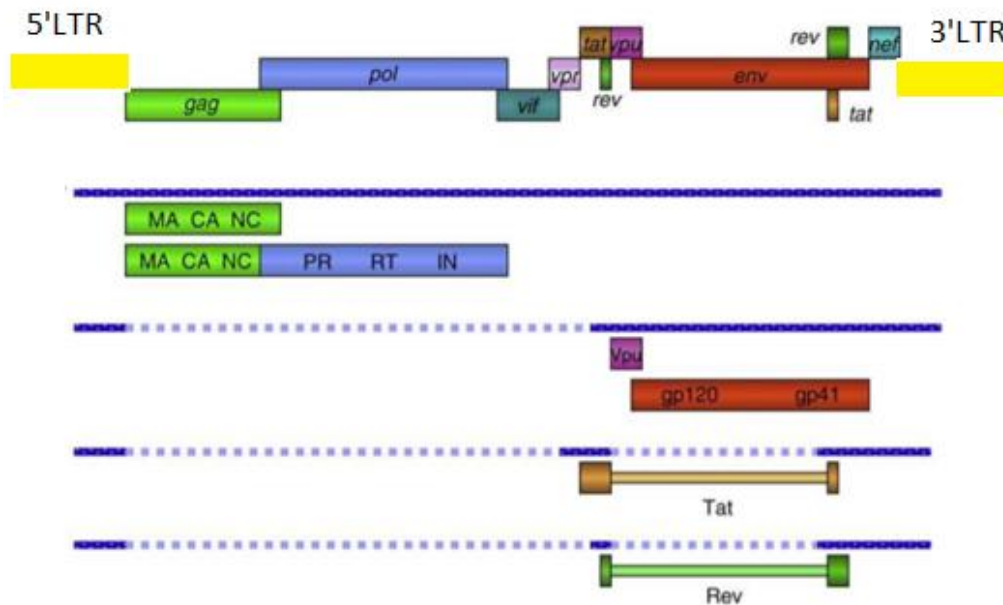


Figura 2. Organización del genoma de VIH-1. En la forma proviral el virus integrado esta flanqueado por las regiones terminales repetidas (LTR). El LTR 5' controla la expresión de los genes estructurales: gag, pol y env, y los accesorios: tat, rev, nef, vif, vpr y vpr. MA: Matriz, CA: Cápside, NC: Nucleocápside, IN: Integrasa, RT: Retrotranscriptasa, PR: Proteasa. Los 9 genes de VIH-1 se expresan por medio de diferentes mensajeros a partir del provirus (ADN) integrado. Los ARN más largos son exportados al citoplasma por un mecanismo Rev-dependiente y constituyen el genoma de nuevas partículas o son traducidos a las proteínas estructurales Gag, Pol y Env. Las proteínas reguladoras o accesorias son productos de extenso procesamiento (splicing) del ARN en el núcleo donde se producen hasta 7 versiones diferentes del ARN transcrito. Ilustración tomada y modificada de R. Delgado / Enferm Infecc Microbiol Clin. 2011.

1.2.2 Estructura de VIH-1 y replicación viral

Los virus envueltos deben fusionar su membrana viral con la membrana de la célula blanco para poder introducir su genoma en el citoplasma e iniciar su ciclo de replicación. Para que se lleve a cabo la infección por el VIH-1, las proteínas de la envoltura viral Env (gp120/gp41) se unen al CD4 y al correceptor (CCR5 o CXCR4) para catalizar la fusión con la membrana plasmática y liberar la cápside en el citoplasma (Figura 3). Posteriormente, el ARN viral se libera al remover el core (proteínas de la cápside) y se inicia la transcripción inversa. La ARN polimerasa lleva a cabo la transcripción inversa para eventualmente generar una copia del genoma viral, como de ADN de doble cadena (ADNc) ^{13,18}. La proteína p7 permite una transcripción inversa eficiente y también incrementa la proporción de transcritos largos de ADNc producidos

en la transcripción inversa ³⁰. El cADN resultante se incorpora al complejo de preintegración (PIC), el cual contiene a las proteínas virales MA, Vpr e integrasa ^{31,32}. El PIC es transportado al núcleo a través del complejo del poro nuclear. Una vez en el núcleo, el ADN viral linear se integra en el genoma celular por medio de un proceso que involucra a la integrasa y a diversos factores celulares ³³⁻³⁵. La integración del provirus ocurre en regiones transcripcionalmente activas en el genoma de la célula hospedera ^{36,37}. Tras la integración, las primeras especies de ARNm viral generadas por la célula infectada son transcritas con corte y empalme doble que codifican para las principales proteínas reguladoras como Tat, Rev y Nef ^{18,38}. La proteína Rev proporciona un balance entre la expresión de las proteínas reguladoras y las proteínas estructurales del VIH-1. Rev promueve el transporte hacia el citoplasma del ARNm que no ha sufrido corte y empalme, el cual es responsable de codificar para las proteínas estructurales y de las enzimas que se incorporaran a los virus infecciosos ^{14,39}. En el citoplasma, los ribosomas celulares catalizan la producción de proteínas virales. Las proteínas de la envoltura viral son insertadas en la membrana plasmática de la célula e interaccionan con las proteínas de la matriz para ensamblar una partícula viral, el ensamblaje viral se lleva a cabo en la membrana celular, donde el ARN viral se incorpora en cápsides que geman de la superficie celular. La incorporación de gp120 y gp41 en la envoltura del virión involucra la asociación del extremo citoplásmico del gp41 con la proteína Gag (Pr55) ^{40,41}. La gemación puede llevarse a cabo de dos formas ⁴². Uno involucra la traslocación del virus hacia las balsas lipídicas en zonas de la membrana plasmática ricas en esfingolípidos y colesterol, hacia donde se localizan Gag y Gag/Pol. El virus gema preferentemente de estas regiones. La unión del virión con las balsas lipídicas está influida por cantidades de colesterol, que es importante para el ensamblaje y la salida del virus. ⁴³ La otra forma propuesta, llamada la hipótesis del exosoma troyano, involucra el ensamblaje del VIH-1 en cuerpos vesiculares hacia donde gema el virus. Estos cuerpos se dirigen a la superficie celular y se fusionan con la membrana plasmática, liberando a los virus como un exosoma ⁴⁴. La maduración final de las proteínas del virión, mediada por la proteasa viral, ocurre dentro de la partícula en gemación. La proteína de la cápside p24, así como Vpu están involucradas en los pasos finales del ensamblaje de la partícula viral ^{45,46}.

La expresión del genoma viral (provirus) está influenciada por el estado de activación y tiempo de vida media de la célula hospedera. La replicación viral es más rápida y eficiente en linfocitos T CD4+ activados, sin embargo, también pueden integrarse en células que se encuentran en reposo y permanecer en estado latente ⁴⁷. Adicionalmente, se ha reportado que gp120 puede iniciar señalización celular que favorece un estado de activación que contribuye a la infección viral ⁴⁸.

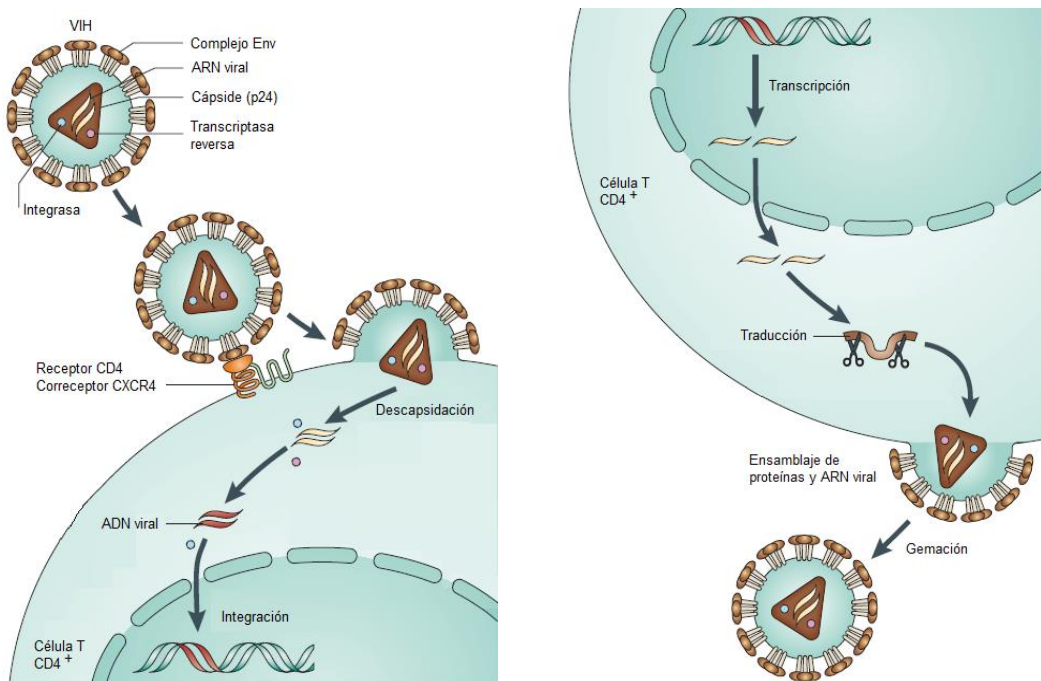


Figura 3. Esquema del ciclo replicativo del VIH-1 que inicia con la unión del virus a los receptores y correceptores celulares, y la fusión de la envoltura viral con la membrana de la célula blanco. El ARN es liberado desde la cápside y sirve de molde para la síntesis del ADN copia por acción de la transcriptasa reversa. Cuando la célula inicia un proceso de transcripción activa, también se expresa el genoma viral y se producen las proteínas que se ensamblan para producir nuevas partículas virales. Finalmente ocurre la salida por gemación. (Tomada y modificada de De Clercq, 2007. *Nature Reviews*).

1.3 Curso Natural de la Infección por el VIH-1

El VIH se encuentra como partículas libres o bien asociado a células en las mucosas y sangre de los individuos infectados, por lo cual su transmisión ocurre por

contacto sexual, por la vía intravenosa (por ejemplo, el uso compartido de jeringas) o por la ruta materno-fetal. La infección por el VIH se caracteriza principalmente por la reducción en el número y producción de linfocitos T CD4⁺ ⁴⁹. El VIH-1 infecta a las células T CD4⁺, macrófagos residentes, células dendríticas o células de la mucosa que recubren la cavidad rectal o cervicovaginal ^{50,51}. Una vez que el virus infecta a las células dendríticas, las células migran a los ganglios linfáticos, en donde transfieren el virus a las células T ⁵¹.

El curso de la infección por el VIH en ausencia de un tratamiento antirretroviral se puede dividir en tres etapas de acuerdo con el estadio clínico: infección aguda, periodo asintomático y SIDA (Figura 4). El curso de la infección varía enormemente entre los individuos infectados, mientras que algunos progresan a SIDA a partir de 6 meses de la infección aguda otros pueden mantenerse incluso sin tratamiento hasta por 25 años con una cuenta normal de células CD4⁺.

1.3.1 Fase Aguda

En el curso natural de la infección las personas infectadas por el VIH son diagnosticadas muchos años después de adquirida la infección, ya que el síndrome retroviral agudo (primera manifestación) presenta síntomas inespecíficos tales como: fiebre, faringitis, linfadenopatías, dolor de cabeza, náuseas, diarrea, entre otros, además de ser auto-limitado, lo que hace que pase inadvertido. Los síntomas aparecen repentinamente y duran de 3 a 21 días, aproximadamente. Sin embargo, la infección sigue su curso y se presenta la fase aguda (2-3 meses), en donde ocurre un rápido descenso de los linfocitos T CD4⁺ y replicación viral como consecuencia de la activación y proliferación inmunológica.

La fase aguda se caracteriza por una alta replicación viral y diseminación generalizada del VIH por el organismo con una importante caída en la cuenta de células T CD4⁺. La elevada replicación viral tiene lugar en un periodo de 5 a 7 días con hasta 5,000 partículas infecciosas (PI)/mL, o $>10^7$ moléculas de RNA viral/mL de plasma

detectadas⁵². En esta etapa se puede detectar al antígeno p24 del núcleo viral, a menudo concomitante con las manifestaciones clínicas y se da la seroconversión al detectar anticuerpos neutralizantes contra el VIH; esta seroconversión tiene lugar en un lapso de días a semanas después de la infección^{53,54}. En la infección aguda se eleva el número de células T CD8+ como respuesta inmune celular que también se ha observado en otras infecciones virales⁴⁹.

Durante los ciclos de replicación viral se producen procesos patogénicos importantes como el establecimiento de reservorios celulares (linfocitos T CD4+, monocitos, macrófagos, células dendríticas) y tisulares en el sistema nervioso central (SNC) y tracto genitourinario.

En esta etapa, el tejido linfoide asociado a mucosa en el intestino es una de las áreas más afectadas. En humanos se observó que el tejido linfoide asociado a mucosa en el intestino presenta la mayor pérdida de linfocitos CD4+ en todas las etapas de la infección. La población más vulnerable son los linfocitos T CD4+ CCR5+ ya que más de la mitad de estas células se pierden, lo que provoca que el paciente entre en la fase de infección crónica con un menor repertorio de células CD4+^{55,56}.

1.3.2 Periodo Asintomático

Esta etapa se caracteriza por una reducción notable en la replicación del virus, debido principalmente a la inducción de una activa respuesta inmune, durante la cual se estabiliza el número de células T CD4+, pero generalmente por debajo de los niveles normales. Se ha establecido que las células T CD4+ circulantes disminuyen con una tasa estimada de 25 a 60 células/ μ L por año⁵⁷.

Alrededor del 1% de los pacientes pueden presentar una progresión a SIDA muy rápida (1 a 2 años), lo cual es más frecuente con los virus inductores de sincicios (virus X4), mientras que otros pacientes pueden permanecer con niveles de células T CD4+ normales hasta por 10-25 años⁵⁸. Muchos pacientes pueden presentar fatiga,

linfadenopatía y eventos clínicos menores como infecciones orales por el virus de Epstein Bar, candidiasis oral y vaginal, herpes zoster y otras alteraciones dermatológicas.

A diferencia de la fase aguda, en la fase asintomática, el aislamiento del virus a partir de las células de la sangre periférica es considerablemente más difícil y el nivel de antígeno p24 en el plasma puede caer por debajo del nivel de detección. Esta supresión continúa de la replicación del VIH durante el periodo asintomático, es mediada principalmente por células antivirales T CD8+ citotóxicas ^{59,60}. Además, se pueden observar anomalías en las células B como la producción de autoanticuerpos y la falta de respuesta a antígenos independientes de células T ^{61,62} y quimiotaxis disminuida en macrófagos.

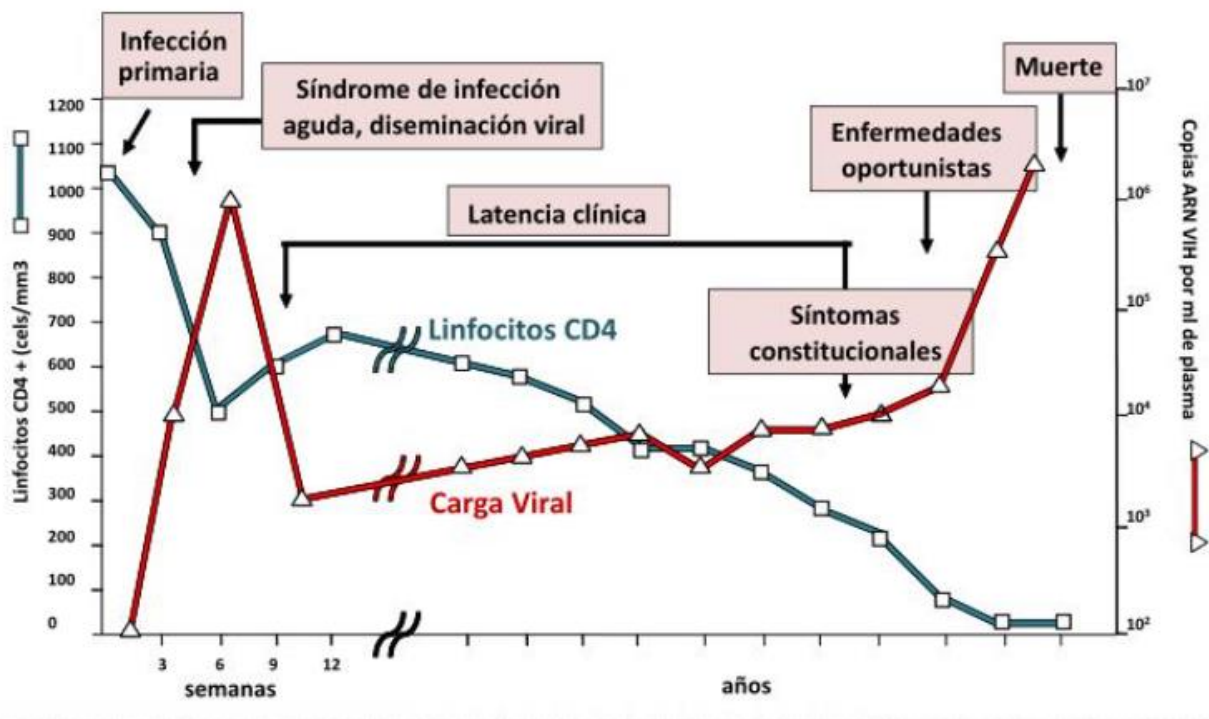


Figura 4. Esquema que representa el curso natural de la infección por el VIH. Se muestran los cambios en la cuenta de linfocitos T CD4+ y la carga viral a través del tiempo y los estadios de la infección del VIH. (Adaptado de Fauci et al., 1996).

1.3.3 SIDA

El SIDA es la fase terminal de la infección persistente por el VIH. Su característica más prominente es una inmunosupresión severa como resultado de un impedimento funcional inmunológico y de la caída drástica del número de células T CD4+. En esta etapa el número de linfocitos T CD4+ ha caído por debajo de 200 células/ μ L, mientras que la carga viral se incrementa considerablemente y se acompañan con la aparición de enfermedades oportunistas y malignas.⁶³⁻⁶⁵ En los ganglios linfáticos, la replicación del virus se incrementa simultáneamente con la destrucción del tejido linfoide de manera irreversible,⁶⁶ debido a una respuesta inmune celular hiperactivada^{6,35,59,60}.

El VIH también puede inducir daño a los neutrófilos a través de la unión de componentes de la envoltura viral a la membrana celular, lo que disminuye las respuestas quimiotácticas, la actividad fagocítica y la producción de superóxido⁶⁷; lo que conduce al desarrollo de infecciones bacterianas serias. Además, el paciente es atacado por infecciones de microorganismos que normalmente no son considerados patógenos.

Por lo tanto, conforme la infección progresa al SIDA, se observa una disminución irreversible en el número de células T CD4+, un aumento de la carga viral y pérdida de anticuerpos neutralizantes en contra del virus⁶⁸.

El surgimiento de cepas virales con mayor capacidad replicativa se ha asociado a mayor pérdida de linfocitos T CD4+ y más rápida progresión clínica al SIDA. Resulta notable que algunas de esas variantes virales tienen la capacidad de generar sincicios,⁶⁹ mientras que por parte del hospedero factores como su genética y su respuesta inmunológica particular influyen en el curso clínico de la infección por el VIH.

Se puede concluir que el desarrollo clínico de la infección se da por la interacción de factores virales y del hospedero. Una respuesta convencional del sistema inmune de los humanos y de otros animales, contra las infecciones virales es la producción de anticuerpos que se unen a los virus y los neutralizan. Esa respuesta es mediada principalmente por inmunoglobulinas del tipo IgG⁷⁰.

En el caso de la infección por el VIH, el blanco para estos anticuerpos neutralizantes pueden ser las proteínas de la envoltura gp120 y gp41^{71,72}; también se han identificado anticuerpos monoclonales ampliamente reactivos, dirigidos contra epítopos

del sitio de unión de gp120 a CD4 ⁷³. Varios estudios han indicado que la neutralización del VIH puede involucrar la unión del virus, fusión o un paso posterior a la fusión virus-célula⁷⁴. La unión del VIH al receptor CD4 también activa vías de señalización y la subsecuente expresión de citocinas y quimiocinas que influyen en la eficiencia de la infección por el VIH ²⁶.

1.4 Mecanismo de fusión mediado por las proteínas del VIH-1

Las proteínas de la envoltura del VIH-1 (Env) son sintetizadas a partir del precursor gp160, el cual es glicosilado y experimenta oligomerización en el retículo endoplasmático donde se asocia no covalentemente formando homotrímeros. Posteriormente, los homotrímeros son transportados al aparato de Golgi donde son proteolíticamente escindidos para generar el complejo glicoproteico maduro; un heterodímero formado por tres subunidades de superficie gp120 y tres subunidades transmembranales gp41 ^{75,76}.

La estructura de la proteína gp120 consiste de 5 regiones variables entre las distintas cepas del VIH-1 (V1 a V5) y 5 regiones constantes (C1 a C5), las cuales tienden a ser similares entre los diferentes aislamientos virales (Figura 5). Las regiones V1 y V2 se encuentran unidas por puentes de disulfuro y forman el dominio V1/V2; las otras tres regiones (V3, V4 y V5) forman asas independientes dentro de la gp120 ^{77,78}. La Gp120 es una proteína membranar profusamente glicosilada, que está anclada al virus vía interacciones no covalentes con la proteína transmembranar gp41 ⁷⁹.

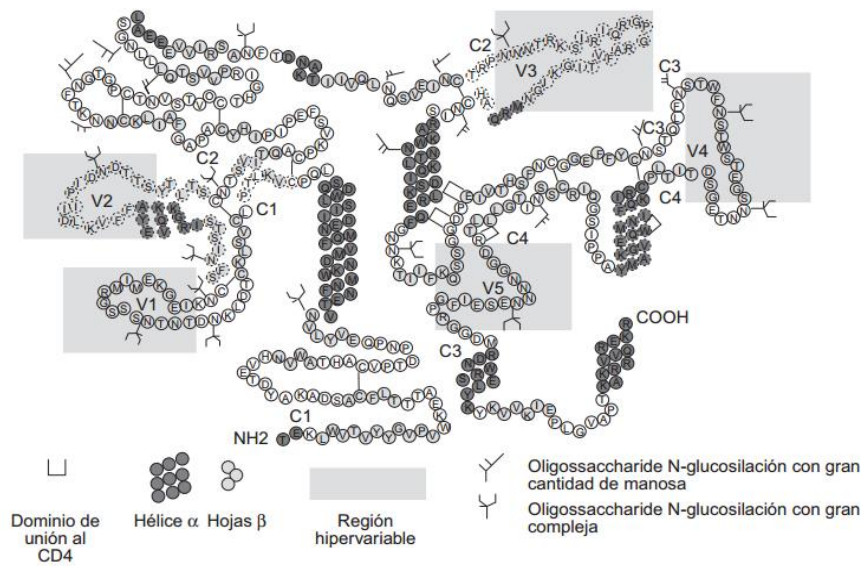


Figura 5. Esquema de la estructura secundaria de la glicoproteína 120 con las regiones variables (V1-V5), delimitadas por la sombra gris. También se indican las regiones constantes (C1-C5) y los sitios de glicosilación (Modificado de José Alcamí, 2004).

La glicoproteína gp41 se ha dividido en tres zonas (Figura 6): cola citoplasmática (contiene al extremo carboxilo), región transmembranal y ectodominio (o dominio extracelular, que contiene el extremo amino). La cola citoplasmática interactúa con las proteínas de matriz (MA)⁴⁰; además, tiene dos dominios que alteran la estabilidad o permeabilidad de la membrana, denominados péptidos líticos de lentivirus (LLP-1 y LLP-2) (Figura 6).

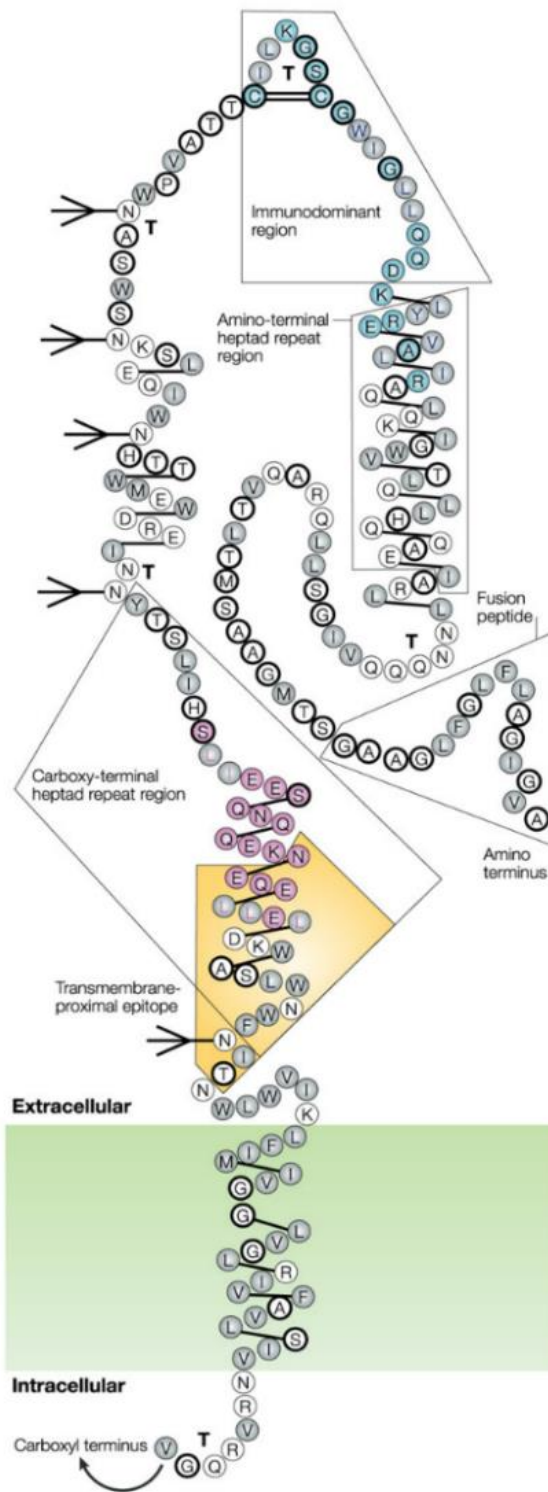


Figura 6. Esquema de la estructura secundaria de la proteína gp41. Las secuencias que están enmarcadas con líneas negras son hélices alfa. Los aminoácidos hidrofóbicos se muestran con círculos oscuros, los aminoácidos cargados se muestran con los círculos abiertos y los aminoácidos neutros se muestran con círculos parcialmente llenos. Los sitios de glicosilación se muestran con flechas. (Modificado de Zolla-Pazner, 2004).

El ectodominio está involucrado en el proceso de fusión de la envoltura viral con la membrana de la célula blanco. Tiene dos α -hélices con un patrón característico de 7 aminoácidos, llamadas secuencias hepta repetidas (HR), y en su parte distal (lado amino) se encuentra el péptido de fusión. El par de hélices están separadas por un asa que permite la interacción antiparalela. La α -hélice próxima a la membrana se llama CHR o HR2 y la más distal a la membrana es llamada NHR o HR1. La asociación entre los trímeros del complejo Env es mediada por la interacción entre las α -hélices de gp41 vecinas, que se ordenan con las HR1 al centro y las HR2 en la periferia⁸⁰ (Figura 7).

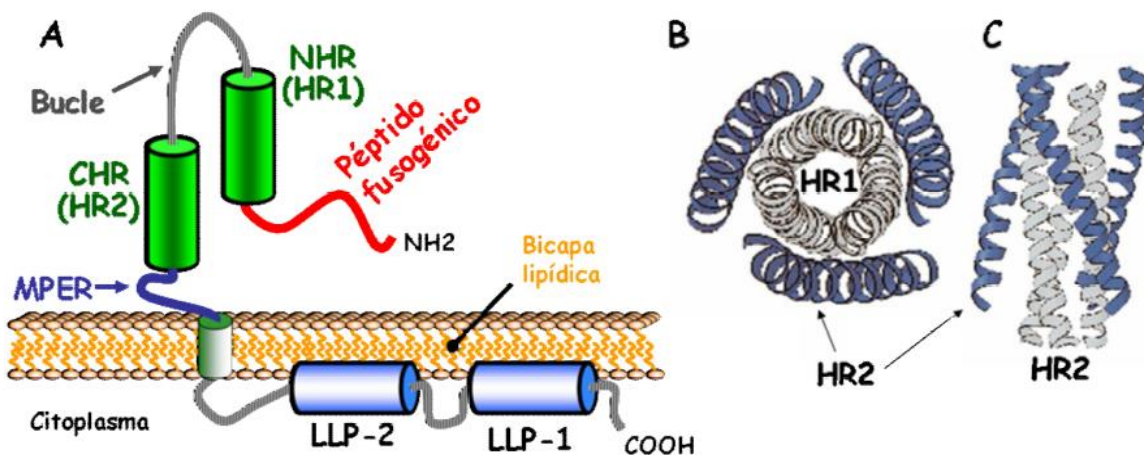


Figura 7. Esquemas de las estructuras en gp41. A) Se representan el péptido fusogénico, alfa hélices con heptarepetidos (HR), lado amino (NHR o HR1) y lado carboxilo (CHR o HR2), asa, región extracelular próxima a la membrana y los LLPs. B) y C) Asociación de los dominios HR cuando las gp41 interactúan formando trímeros. Modificado de Israel Hernández de Luna, 2011, Estado actual del conocimiento de los eventos intracelulares que controlan la replicación del VIH-1 en células del sistema inmune. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

La entrada del VIH-1 a las células del hospedero se da a través de la unión y fusión de la membrana celular con la envoltura del VIH-1 a través de tres procesos: unión, fusión y entrada. Para lograr la entrada eficiente del virus es necesaria la unión de gp120 viral con el receptor CD4, esta unión induce cambios conformacionales que le permite a gp120

interactuar con los correceptores, que son principalmente CCR5 y CXCR4, formando un complejo ternario (gp120-C4-correceptor). Este suceso induce un cambio conformacional en gp41, se despliegan los dominios HR1 y HR2 que permite la exposición del péptido de fusión que se inserta en la membrana de la célula blanco generando una estructura intermedia que atraviesa las dos membranas. Posteriormente, se disocia gp120 de gp41 y el intermediario puede formar un complejo de fusión trimérico helicoidal al colocar las regiones HR-2 en orientación antiparalela contra las regiones HR-1, generando un paquete de seis hélices. En la última se forma el complejo trimérico helicoidal (una estructura extremadamente estable), es lo que crea el poro de fusión, permitiendo que ocurra la fusión entre las dos membranas (Figura 8) ^{75,81-84}.

Los correceptores en la fusión virus célula es CCR5 para variantes virales trópicos de macrófagos y linfocitos T CD4+ de memoria ^{85,86} y CXCR4 es el correceptor para cepas con tropismo hacia células T CD4+ ⁸⁷. Aquellas variantes virales que emplean el correceptor CCR5 se conocen como virus R5, mientras que los virus que emplean el otro correceptor CXCR4 se conoce como virus X4^{88,89}. También existen variantes virales con tropismo dual (X4/R5) que puede usar cualquiera de los dos receptores ⁹⁰ dependiendo de su densidad relativa en la membrana de la célula ⁵². En tejidos linfoides los primeros tipos celulares de replicación viral son las células T CD4+, células dendríticas (DC) y los macrófagos diferenciados ⁹¹. Por lo tanto, el VIH-1 es un virus politrópico, esto es, que puede infectar diferentes tipos celulares, aunque los niveles más altos de replicación se producen en células T CD4+ ⁹².

La interacción entre CD4 y gp120 (Figura 8) es de tipo electrostático no covalente. El sitio de unión al receptor CD4 en gp120 tiene carga negativa y atrae la carga positiva del receptor. Además, se manifiestan fuerzas de Van der Waals y puentes de hidrógeno que ayudan a estabilizar la interacción CD4-gp120. Un aminoácido de fenilalanina, que está situado en la posición 43 de la molécula CD4, es el único residuo que se une a esta cavidad de gp120, formada por los dominios V1/V2. Como consecuencia de esta unión, el núcleo conservado de gp120 sufre cambios conformacionales que hacen que pase de un estado flexible a otro rígido, lo cual permite la interacción posterior con los receptores de quimiocinas ⁹³.

Los correceptores CXCR4 y CCR5 pertenecen a la familia de receptores con dominios transmembranales acoplados a la proteína G. Presentan una estructura α -hélice de 4 dominios transmembrana: 3 bucles extracelulares y un dominio N-terminal. La unión del complejo CD4-gp120 a los correceptores se produce a través de la región V3 de gp120, aunque hay otras regiones de ésta que también participan en esta interacción. En particular, el brazo de la región V3 de gp120, junto con residuos del dominio conservado C4, se encarga de la unión de gp120 al dominio N-terminal de CCR5, mientras que tanto la corona como el brazo de V3 participan en la unión de gp120 a la superficie de CCR5⁹⁴. En el caso de CXCR4, es la región V3 de gp120 la que interacciona directamente con CXCR4, con independencia de las regiones V1/V2 de gp120 (Figura 8)⁹⁵.

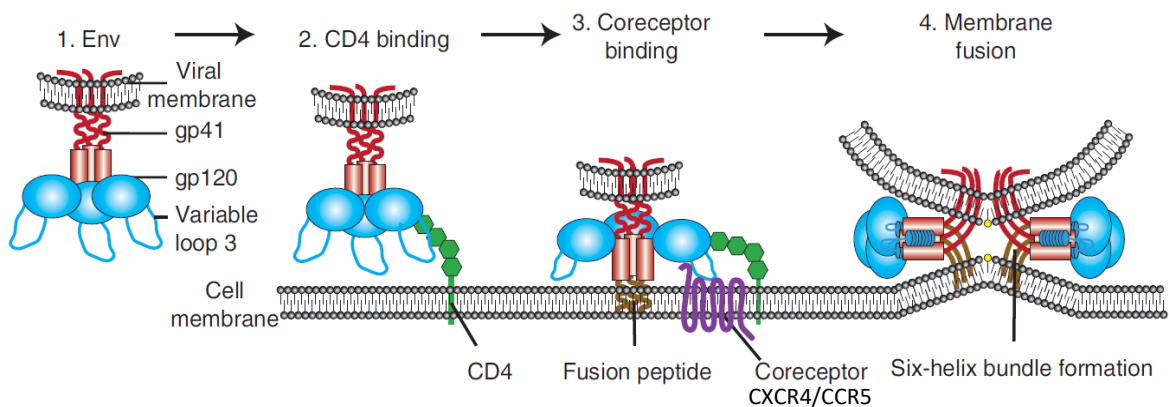


Figura 8. Interacción de Env con receptores y fusión de membranas. A) CD4 es el receptor que se reconoce primero por gp120. B) Tras la interacción, gp120 expone sitios de unión al coreceptor (presentes en V3, V1 Y V2); la flexibilidad en CD4 permite un mayor acercamiento de gp120 al coreceptor; C) al desplegarse gp41, el péptido fusogénico de gp41 puede insertarse en la membrana de la célula blanco, perturbando su estructura. D) La tendencia a restablecer la interacción entre las hélices de gp41 genera la estructura 6HB. E) Formación del poro de fusión, el cual se expande. (Modificado de Israel Hernández de Luna, 2011, Estado actual del conocimiento de los eventos intracelulares que controlan la replicación del VIH-1 en células del sistema inmune (Tomada y modificada de M. Pacera Virologie et al 2005, 9:457-72).

1.4.1 Fusión Celular y su participación en la diseminación y patogénesis en la Infección por el VIH-1

Este virus afecta diferentes células de la respuesta inmune, ya sea como consecuencia directa de la infección o, indirectamente, por múltiples mecanismos que incluyen, entre otros, la inducción de apoptosis mediada por varias proteínas virales solubles (Nef, Tat, Vpu, Vif), la muerte celular secundaria al estado de hiperactivación inmunológica inducido por esta infección, la formación de sincios y el daño progresivo de los órganos linfoides primarios y secundarios⁹⁶.

Las células infectadas por el VIH expresan las proteínas de la envoltura viral (gp120/gp41) en su membrana plasmática, las cuales le permiten interactuar y fusionarse con células CD4+ no infectadas ⁹⁷. La secuencia de eventos moleculares que conducen a la fusión de membranas celulares es análoga al proceso de fusión virus-célula.

La fusión de membranas está involucrada en la diseminación y patología del VIH de varias maneras durante la infección: i) entrada de partículas libres de células en las células, ii) transmisión directa de célula a célula de virus, iii) formación de células infectadas multinucleadas mediante fusión célula-célula, y iv) apoptosis de las células transeúntes ^{98,99}. Una mayor fusogenicidad de los virus del paciente está relacionada con la progresión de la enfermedad ^{100,101} quizás reflejando una mayor ocurrencia *in vivo* de estos eventos.

La transmisión de célula a célula (también denominada infección por virus asociado a células) es más relevante que la infección por partículas libres de células, ya que tiene las ventajas de implicar una difusión de corto alcance, una mayor concentración de virus, transferencia direccional de virus, y áreas más grandes de contactos estables de membrana ¹⁰². Los primeros trabajos demostraron que la participación del receptor por parte del complejo Env del VIH desencadena el rápido reclutamiento de los receptores del VIH y las moléculas de adhesión en la célula diana para conformar la sinapsis virológica. La infectividad de las células productoras de virus fue de ~10² a 10³ veces mayor que la infectividad de las partículas homólogas sin células ¹⁰³. La transmisión más

eficiente de virus asociado a células en comparación con el virus libre de células se ha observado en células linfoides primarias de amígdalas infectadas *in vitro* ¹⁰⁴.

Se ha observado la transmisión del VIH de célula a célula entre células T CD4, entre células T CD4 y macrófagos, y entre células mieloides ^{105,106}. Curiosamente, la transmisión de célula a célula del VIH-1 puede inducir una infección abortiva y la muerte piroptótica de las células T CD4 en reposo ¹⁰⁴, lo que constituye un mecanismo de depleción e inflamación de las células T CD4. Recientemente, Imle y cols. cuantificó la contribución de la transmisión sin células y asociada a células, en suspensión 2D frente a sistemas de cultivo de matriz 3D ¹⁰⁷. Las restricciones ambientales impuestas por la matriz de colágeno en el cultivo 3D limitaron la infección por viriones libres de células, pero promovieron la transmisión del VIH-1 asociada a células. Además, la transferencia de virus de célula a célula es resistente a los anticuerpos que pueden neutralizar virus homólogos libres de células. Así, la transferencia viral de célula a célula puede constituir un mecanismo relevante de evasión de la respuesta inmune humoral ^{107,108} siendo muy importante en tejidos con alta densidad celular.

Una característica importante de la infección por el VIH es la formación de células multinucleadas o sincicios, que se originan como resultado de la fusión de las células infectadas, que expresan en su membrana Env del virus y las células CD4+ no infectadas ^{39,109,110}. Algunas variantes R5 y X4 se distinguieron inicialmente por la inducción de sincicios en líneas de células T infectadas ¹¹¹. En estudios *in vitro* se ha observado que los sincicios son el principal mecanismo de muerte de células T CD4 en cultivos infectados por el VIH-1, debido a que los sincicios fusionan células más rápidamente de lo que estas se dividen. Una característica importante de estos sincicios es que una vez que se destruyen, inducen la formación local de nuevo sincicios, que son la fuente principal de nuevo virus en los cultivos ¹¹². Se ha postulado que el deterioro de los nódulos linfáticos que se observa en pacientes con progresión al SIDA, puede estar influida por la fusión celular ^{78,113}.

Las células multinucleadas (sincicios) se observan con frecuencia en cultivos de células infectadas por VIH-1 ^{110,114}, así como en tejido linfoide, médula espinal y cerebro

de pacientes infectados. La formación de sincicio está relacionada con el reclutamiento y muerte de células CD4+ no infectadas, por lo que se considera un efecto citopático indirecto que podría contribuir a la diseminación de las células T CD4 + ^{115,116}. El sincicio observado *in vivo* y en los cultivos de células infectadas expresan antígenos virales (proteína viral p24), por lo que se consideran sitios de replicación viral activa ¹¹⁷⁻¹¹⁹, incluso se ha considerado que los sincicios con la mayor fuente de replicación y liberación de virus en cultivos, ya que se observó que los sinciciosexpresan una mayor cantidad de proteína viral p24 y liberan una mayor cantidad de virus que las células individuales. ¹²⁰ Asimismo, inhibiendo la formación de sincicios en un cultivo infectado por medio del anticuerpo monoclonal anti-CD4, la cantidad de virus en el sobrenadante se redujo de tres a cinco veces ¹²¹. También se observó que los sincicios pueden albergar una mayor cantidad de provirus que las células individuales, lo que favorece la recombinación y genera diversidad viral ¹²².

La fusión célula-célula puede tener un papel patogénico importante *in vivo*, dado que se han encontrado células gigantes multinucleadas infectadas con VIH-1 en ganglios linfáticos de pacientes asintomáticos y pacientes con SIDA, los ganglios linfáticos han sido propuestos como reservorios virales. ^{114,123}. Además, la inducción viral de sincicios se relaciona con la depleción de células T CD4+ y la progresión al SIDA ^{124,125}. Aunque los anticuerpos neutralizantes pueden restringir las infecciones por partículas libres de virus, podrían ser menos eficaces en la contención de la propagación del virus de célula a célula y la muerte celular mediada por la extensa actividad de fusión. Se ha descrito la fusión celular mediada por Env a partir de una cepa prototipo VIH-1. Esa fusión se ha inhibido con el suero de pacientes VIH+. Esa inhibición se atribuye a los anticuerpos que se unen a epítopes virales conservados esenciales para el reconocimiento de CD4 y de correceptores que interaccionan con gp120, y con regiones asociadas a la activación de gp41¹²⁶. En este sentido, se ha determinado que esta inhibición de la fusión celular es dependiente del estado clínico del paciente, dado que los sueros de pacientes que son VIH+ y que tienen cuentas de linfocitos T CD4+ altas, logran inhibir la fusión celular significativamente más que los sueros de pacientes sintomáticos o con cuentas de CD4

definitorias de SIDA. Al respecto, algunos sueros de pacientes con estadio clínico de SIDA favorecen la fusión celular ¹²⁶.

Finalmente, la fusiogenicidad de Env es crítica para la apoptosis de células T CD4+ no infectadas (transeúntes). Mediante la clonación de Env de longitud completa del plasma de pacientes virémicos y la prueba de Env- que expresan células por su potencial inductor de apoptosis en PBMC normales, Joshi y cols. observó una pérdida selectiva de células T CD4+ ¹²⁷. El entrecruzamiento de CD4 a través de gp120 activa la vía CD95 / CD95L y la apoptosis parece ser inducida por gp41, lo que implica la etapa de fusión. El proceso dependía en gran medida de CCR5 y se sugiere que puede ser necesario un umbral diferente de nivel de CCR5 para la apoptosis de los espectadores en comparación con la replicación del virus.

Es importante conocer todas las proteínas que participan en el proceso de fusión celular para comprender el mecanismo completo y los posibles cambios o señales que se producen en la célula en este proceso lo que nos permitirá generar nuevas estrategias u objetivos de posibles tratamientos.

1.5 Anticuerpos en la infección por el VIH-1

La infección por el VIH-1 desencadena una activación del sistema inmune desproporcionadamente extensa e inespecífica. Sin embargo, esta activación de la respuesta inmune no logra desarrollar mecanismos totalmente efectivos para controlar completamente la infección en la mayoría de los individuos infectados. Se sabe que el VIH-1 tiene una capacidad inherente para generar mutaciones en las secuencias antigénicas reconocidas por el sistema inmune adaptativo, creando cepas de escape ¹²⁸. En consecuencia, a pesar de más de tres décadas de investigaciones dirigidas a inducir una respuesta inmune adaptativa contra el VIH-1, no se han implementado terapias inmunológicas o vacunas exitosas ¹²⁹.

Se ha demostrado que durante la evolución de la infección por el VIH-1 se induce la producción de anticuerpos neutralizantes, los cuales se unen a las proteínas virales

que interactúan con los receptores y correceptores, previniendo la entrada del VIH-1 a las células blanco ^{130,131}. En un individuo en particular, los anticuerpos neutralizantes más importantes son aquellos que neutralizan las cepas propias de VIH-1 (aislados autólogos); entre mayor sea el repertorio de anticuerpos neutralizantes, mejor es el pronóstico de la infección. Sin embargo, durante la replicación del VIH-1, y debido a la presión ejercida por los anticuerpos neutralizantes y a la gran capacidad de mutación que presenta este virus, empiezan a aparecer mutantes virales o cepas de escape que van siendo resistentes a la acción neutralizante de los anticuerpos ^{130,132}.

Un factor que impide el establecimiento de una respuesta humoral protectora universal contra el VIH-1 es la gran variabilidad de virus circulante en el mundo; dentro del grupo M del VIH-1, siendo el más frecuente, existen varios subtipos virales (denominados desde A hasta K), con muy poca reacción cruzada entre ellos ¹³³. Además, un individuo puede tener infecciones mixtas (por dos o más subtipos), con cepas que pueden intercambiar material genético para originar cepas recombinantes, cuya prevalencia ha ido en aumento ¹³³.

Los anticuerpos con amplia actividad neutralizante contra diferentes cepas del VIH-1 (bnAbs) ^{134,135} representan respuestas inmunes que, en principio, podrían reproducirse en individuos sanos para prevenir infecciones como la infección por el VIH-1. Sin embargo, los mecanismos necesarios para generar y mantener tales bnAbs parecen extremadamente complejas, y siguen siendo poco conocidos. Los bnAbs que emergen tienen altos niveles de mutaciones somáticas, lo que sugiere que las células B que producen bnAbs se desarrollan por rondas de mutación y selección de genes de anticuerpos en centros germinales ^{136,137}.

Los anticuerpos neutralizantes de amplio espectro (bnAbs) contra el VIH-1 son a menudo autorreactivos y se ha sugerido que la tolerancia inmunológica puede restringir una respuesta de anticuerpos neutralizantes. Esto puede explicarse porque Env está muy glicosilada y, nuevamente como consecuencia de su variabilidad genética, los sitios de glicosilación de gp120 varían con el tiempo ¹³⁸. Esto no sólo proporciona una barrera física dinámica para neutralizar los epítomos, sino que también cubre el VIH-1 con

glicanos ligados a N, que el sistema inmunológico no puede distinguir de los autocarbohidratos ¹³⁹. Una alta proporción de bnAbs del VIH-1 dirigidos contra los sitios de unión de CD4 (CD4bs) y la región externa proximal de la membrana (MPER) situada en los epítomos de gp41 también mostraron especificidad para sí mismos y, por lo tanto, son anticuerpos poli / autorreactivos ¹⁴⁰⁻¹⁴². Los autoantígenos reconocidos por estos bnAbs del VIH-1 incluyen las enzimas quinureninasa y ubiquitina ligasa F3A, factor de empalme SF3B3 ^{142,143} fosfolípidos (p. Ej., Cardiolipina) ¹⁴⁴, dsDNA ¹⁴⁰ y recientemente, histona H2A ¹⁴⁵. Además, también se ha demostrado que la poli / autorreactividad de bnAbs mejora la afinidad del anticuerpo por el VIH-1 a través de la heteroligación definida como el reconocimiento simultáneo de un pico de Env escasamente distribuido y un antígeno de membrana derivado del hospedador ^{146,147}.

Además, los anticuerpos anti-VIH-1 que no tienen capacidad neutralizante pueden llegar a potenciar la infección de células como los neutrófilos, monocitos, macrófagos, células dendríticas mieloides, células NK y linfocitos B que expresan receptores Fc, los cuales unen la fracción Fc de las inmunoglobulinas que se encuentran formando complejos inmunes con los virus ⁹⁶. Además, durante la infección por el VIH-1 se produce una hiperactivación policlonal de linfocitos B y se desencadenan respuestas inmunes contra proteínas propias del hospedero portadas por el virus en su envoltura (Tabla 1); este fenómeno se ha asociado con mayor frecuencia a procesos autoinmunes mediados por anticuerpos que se observan durante esta infección ⁹⁶.

1.6 Autoanticuerpos en la infección por el VIH-1

La infección por el VIH-1 está asociada con varios desordenes autoinmunes. La autoinmunidad puede ocurrir como resultado de la proliferación de células B, o mimetismo molecular ¹⁴⁸. Como parte de esa autoinmunidad, se pueden producir autoanticuerpos que se pueden unir a diversas proteínas celulares normales. Se ha observado que algunos de esos anticuerpos se unen a proteínas de la membrana de linfocitos T CD4+.

Autoanticuerpos específicos que reconocen las moléculas de superficie de la membrana de linfocitos T CD4+, como CCR5, CXCR4, CD3, CD43, están presentes en individuos VIH-1 positivos y sanos (Tabla 3) ^{149,150}. Estos pueden influir en la fusión celular.

Además de la interacción de Env con CD4 y receptores de quimiocinas, otros componentes de la superficie celular aumentan la eficacia de la fusión de la membrana inducida por el VIH-1. Una variedad de moléculas de adhesión y activación celular se incorporan a la membrana del virus durante el ensamblaje y los procesos de gemación de la célula infectada ^{151,152}. Asimismo, la interacción estrecha entre células infectadas y no infectadas durante la formación de sincicios y la transmisión de virus de célula a célula a través de sinapsis virológicas se ve favorecida por moléculas de adhesión asociadas a células (Tabla 2) ^{153,154}.

Tabla 1. Proteínas de la membrana de viriones que se derivan de la célula de origen

Proteína	Reference
HLA-I y HLA-II	Rossio et al. 1995; Esser et al. 2001; Cantin et al. 1997; Jocelyn Roy et al 2005
CD44	Orentas and Hildreth 1993
CD55 y CD59 complement control	Montefiori et al. 1994
ICAM-1	Guo and Hildreth 1995; Orentas and Hildreth 1993; Jonathan R. Grover et al. 2015; Pascal Jalaguier et al. 2015
LFA-1	Guo and Hildreth 1995; Orentas and Hildreth 1993
CD3	Lawn et al. 2000
CD25	Lawn et al. 2000
CD26	Lawn et al. 2000
CD36	Lawn et al. 2000
CD14	Lawn et al. 2000
CD86	Esser et al. 2001; Giguère et al. 2004; Jocelyn Roy et al. 2005
CD80	Giguère et al. 2004
α4β7	Christina Guzzo et al. 2017
Hasta 105 proteínas de membrana implicadas es estructura, adhesión, señalización y respuesta inmune	Chertova et al. 2006; Christina Guzzo et al. 2017

CD44:Receptor de superficie celular del hialuronato, CD55:El factor acelerador de la descomposición del complemento, CD59:Proteína inhibitoria del complejo de ataque a la membrana, HLA-I y HLA-II:Antígenos leucocitarios humanos, ICAM-1:Glicoproteína de la superficie celular, LFA-1: El antígeno 1 asociado a la función linfocitaria, CD3:Forma parte de un complejo más grande que incluye el receptor de linfocitos T, CD25:Cadena alfa del receptor de interleucina-2, CD26:Ectoenzima de la dipeptidilpeptidasa IV, CD36:Glicoproteína plaquetaria 4, CD14:Es una glicoproteína de membrana superficial de cadena única ligada

a glicosilfosfatidilinositol, CD86:Glicoproteína transmembrana de cadena única, CD80:Glucoproteínas de estructura francamente similar de la familia de las inmunoglobulinas que actúan como receptores presentes sobre la membrana de células presentadoras de antígeno, $\alpha 4\beta 7$:Integrina que se expresa en la mayoría de los leucocitos y es esencial para su migración a los tejidos linfoides asociados al intestino.

El papel de la adhesión LFA-1 (El antígeno 1 asociado a la función linfocitaria) e ICAM-1 (Glucoproteína de la superficie celular) en la formación de la sinapsis virológica para la transferencia viral eficiente. Jolly y col. mostró por primera vez que los anticuerpos contra LFA-1 e ICAM-1 podían bloquear parcialmente la transferencia viral a través de la sinapsis virológica ^{155,156}. A continuación, se confirmó el papel de las moléculas de adhesión para la formación de la sinapsis virológica y la transferencia de virus, mostrando una inhibición significativa en la transferencia de virus utilizando una línea de células Jurkat T que carece de la subunidad α de LFA-1 ¹⁵⁷. Algunas moléculas implicadas en la señalización de las células T también participan en la transmisión de célula a célula del VIH-1. En consecuencia, la polarización de las células puede estar mediada por la señalización de ICAM-1 / LFA-1, que además de su efecto en la estabilización de la formación de sinapsis virológicas, induce una vía de señalización dependiente de ZAP70 (proteína cinasa 70 zeta-asociada es una proteína que normalmente se expresa cerca de la membrana superficial de los linfocitos) para la remodelación del citoesqueleto, la polarización de las células T y la eficaz. transferencia de VIH-1 en la sinapsis virológica ^{158,159}. Para concluir, si bien el reclutamiento de moléculas de adhesión en la sinapsis virológica está bien establecido ^{155,158}, su función específica y los requisitos para la transmisión de célula a célula del VIH-1 aún no se han determinado.

Finalmente, se ha propuesto que la unión de gp120 a la molécula de integrina $\alpha 4\beta 7$ favorece el acceso del virus a CD4 en células de memoria T CD4 +, y este evento puede estar involucrado en gran medida en la infección productiva y la inflamación patológica en el tejido linfoide asociado al intestino ^{160,161}. Por lo tanto, además de los receptores de virus, la participación de otras moléculas de superficie en el proceso de fusión es sustancial, lo que implica que los anticuerpos que reconocen las moléculas de la membrana celular pueden participar en la modulación de la fusión de la membrana mediada por Env, uniéndose a la membrana celular.

Se desconoce si esos autoanticuerpos se generan debido a una respuesta inmune específica hacia los antígenos propios o simplemente son un reflejo de la hipergamaglobulinemia no específica producida por la activación policlonal de células B, la cual es una característica de la desregulación inmunológica causada en la infección por el VIH-1. En estudios en pacientes con SIDA, se han detectado anticuerpos frecuentemente asociados con desordenes clínicos contra plaquetas, células T y nervios periféricos ¹⁶².

En un artículo reciente, se ha demostrado que DNM2 (dinamina 2, está asociada con los microtúbulos. Se ha implicado en procesos celulares como la endocitosis y la motilidad celular, y en alteraciones de la membrana) es crucial para la fusión del VIH-1 en las células T CD4+ primarias ^{163,164}. Se mostró que el DNM2 desempeñaría un papel crucial durante la entrada del VIH-1 en las células TZM-bl y las células T CD4+ primarias, estableciendo hemifusión y, en una etapa posterior, estabilizando el poro de fusión, muy probablemente en la membrana plasmática ¹⁶⁴. En la transmisión de célula a célula, DNM2 también podría estar implicado en el proceso de fusión, como ha sido el caso de la entrada de un solo virus en las células T CD4+. Esto es importante porque el virus que sigue a la transmisión de célula a célula puede servir para evadir la neutralización mediante la circulación de anticuerpos específicos del VIH-1.

Tabla 2. Moléculas de la membrana celular implicadas en la transmisión de la fusión célula-célula o de la célula inducida por el virus VIH-1.

Role	Proteína	Reference
Promoción de la fusión	CD4	Sodroski et al. 1986
	CCR5	Pontow et al. 2004
	CXCR4	Pontoe et al. 2004
	ICAM-1	Hioe et al. 1998
	LFA-1	Hioe et al. 2011
	Dynamin-2	Miyauchi et al. 2009; Agganwal, A et al. 2017; Jones, D. M. et al. 2017
	Integrina $\alpha 4\beta 7$	Cicala, Arthos & Fauci, 2011
	Sincitina	Tang Y et al., 2020
Inhibición de la fusión	Tetraspanina CD9 y CD81	Weng et al. 2009; Gordon-Alonso et al. 2006
	EWI-2	Roy NH et al., 2014; Whitaker EE et al., 2019
	PSGL-1	Fu Y et al., 2020
	IFITM1, IFITM2	Li, K. et al. 2013; Yu. J.Y. et al. 2015
	SERINC3 SERINC5	Rosa A. et al. 2015; Usami Y et al. 2015
Apoptosis	CCR5	Garg and Joshi 2017

CD4: Cúmulo de diferenciación 4, es una molécula que se expresa en la superficie de algunas células T y en las células dendríticas, CCR5: C-C quimiocina receptora de tipo 5, CXCR4: El receptor de quimiocinas C-X-C de tipo 4, también conocido como fusina, PSGL-1: El ligando de selectina P, IFITM: Proteína transmembrana 1 inducida por interferón, SERINC3: El incorporador de serina 3, CD95/CD95L: Fas o APO-1 es una glicoproteína transmembrana.

Por otro lado, hay moléculas como las proteínas transmembrana inducida por interferón (IFITM) que son una familia recientemente descubierta de proteínas celulares antivirales que restringen la replicación de varios virus envueltos y no envueltos. Las proteínas IFITM se encuentran en la membrana plasmática y las membranas endosómicas, los principales portales de entrada de muchos virus. Los estudios bioquímicos y de fusión de membranas sugieren que las proteínas IFITM tienen la capacidad de inhibir la entrada viral y las fusiones de célula a célula en el paso de entrada antes de la formación de los poros de fusión, posiblemente al modular la fluidez de las membranas celulares ^{165,166}.

Asimismo, conocer las moléculas capaces de inhibir la formación de sincicioso la inhibición de los procesos en los que intervienen estas moléculas implicadas en la fusión de membranas es de importancia para contrarrestar la transmisión de partículas virales célula-célula que conduce a la diseminación viral. Existe un acuerdo general de que la potencia de los anticuerpos neutralizantes se reduce durante la transmisión de célula a célula en comparación con la infección libre de células y que solo un subconjunto de anticuerpos neutralizantes puede inhibir eficazmente la transmisión de célula a célula ¹⁶⁷⁻¹⁷¹. Por ejemplo, se informó que varios anticuerpos anti-gp120 específicos dirigidos al sitio de unión de CD4 perdieron una potencia considerable (disminución de 10 a 100) cuando el VIH-1 se transfirió por transmisión de célula a célula. El VRC01, que es uno de los anticuerpos más potentes para inhibir la infección libre de células, es particularmente ineficaz para bloquear la transferencia viral de célula a célula ¹⁶⁷. Globalmente, la eficacia de los anticuerpos neutralizantes para la neutralización de la transferencia viral mediada por la sinapsis virológica es variable y algunos epítomos de las glicoproteínas de la envoltura viral parecen más susceptibles que otros a la neutralización de la transferencia viral de célula a célula entre células T.

Se ha postulado que habría varias formas en que los anticuerpos podrían contribuir a la protección de la infección por el virus ¹⁷². Ciertos tipos de anticuerpos no neutralizantes podrían bloquear el movimiento de los viriones o de las células infectadas a través de barreras mucosales, y/o inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos ¹⁷³. Otros tipos de anticuerpos podrían bloquear la formación de contactos estrechos entre células durante la infección por virus libres y durante la transmisión célula a célula ¹⁷⁴.

La producción de anticuerpos hacia componentes celulares se ha asociado a defectos de las células B en individuos con VIH-1, principalmente en sujetos con alta carga viral, incluyendo activación policlonal, hipergamaglobulinemia, inducción de diferenciación terminal y niveles incrementados de autoanticuerpos ¹⁷⁵. Los mecanismos posibles de las manifestaciones autoinmunes incluyen: reactividad cruzada entre el virus y proteínas propias ¹⁴¹, activación inmunológica¹⁷⁵⁻¹⁷⁷, mimetismo molecular, efectos directos del VIH-1 sobre células endoteliales, sinoviales y células hematopoyéticas, destrucción de células CD4+ e incrementada actividad citotóxica junto con expresión aumentada de autoantígenos ^{148,178}. También se ha asociado la activación inmunológica con la producción de autoanticuerpos y con una frecuencia disminuida de células T reguladoras, en ausencia de signos de enfermedad autoinmune ^{179,180}.

Una explicación para la reducción en células CD4+ en la infección por el VIH-1 ha sido la inducción de anticuerpos anti células T o anticuerpos contra CD4 ¹⁸¹. Se han encontrado autoanticuerpos contra un gran número de proteínas celulares normales en individuos infectados por VIH-1 ^{181,182}. La infección por VIH-1 de las células T podría llevar a alteraciones en la proliferación de células B. De igual modo, la infección de macrófagos por el VIH-1 podría llevar a la producción aumentada de IL-6, con la proliferación resultante de células B. La proliferación de células B podría eventualmente llevar la producción de linfoma a través de cambios cromosómicos y el establecimiento de un estado de transformación. La presencia de antígenos celulares en la superficie de viriones del VIH-1 o expresados junto con antígenos virales en la superficie de las células podrían inducir respuestas inmunes contra antígenos celulares normales ¹⁸³, llevando a reacciones celulares autoinmunes ⁹⁵.

1.6.1 Anticuerpos anti-linfocito (ALA)

Los anticuerpos anti-linfocitos (ALA) son conspicuos en la sangre durante la infección por VIH. En particular, se han notificado con frecuencia anticuerpos anti-CD4, aunque no está claro si contribuyen de manera significativa a la inhibición de la entrada del virus durante la infección por VIH ¹⁸⁴. Los primeros informes mostraron que la presencia de anticuerpos anti-CD4 y anti-HLA de clase I circulantes se relacionaba con la resistencia a la infección en individuos seronegativos expuestos ^{86,185}. Por otro lado, recientemente se han encontrado niveles elevados de anticuerpos anti-CD4 en no respondedores inmunológicos VIH+ tratados con terapia antirretroviral, lo que sugiere un papel patológico de estas inmunoglobulinas ¹⁸⁶. Otros ALA detectados en suero de personas infectadas por el VIH incluyen anticuerpos contra CCR5 ^{187,188}, CXCR4, CD3 ¹⁸⁹, HLA clase II ¹⁹⁰, CD43 ^{191,192}, anti-CD95 (APO-1 / Fas) ¹⁹³ y TCR cadenas alfa / beta ¹⁹⁴. Evaluar el papel de ALA producido durante la infección por VIH en el proceso de fusión mediado por la envoltura del virus puede respaldar el conocimiento integral de la respuesta inmune humoral involucrada en la contención del virus.

Las proteínas celulares incorporadas en los viriones del VIH-1 y que pueden ser reconocidas por ALA incluyen moléculas HLA de clase I y clase II ^{151,195,196}, CD3, CD25, CD8, CD63, CD71, LFA-1, CD43¹⁹⁵, CD44 ^{195,197}, CD46, CD55, CD59 ¹⁹⁸, y CD86 ¹⁹⁹. Un análisis proteómico de partículas de virus detectó más de cien proteínas involucradas en la adhesión, señalización y respuesta inmune ¹⁰². La actividad de anticuerpos ampliamente neutralizantes de una mezcla de sueros humanos policlonales que contienen anticuerpos contra HLA clase I o clase II, gp120 del VIH y proteína de choque térmico de 70 kDa es un ejemplo de que los autoanticuerpos pueden potenciar la actividad antiviral de los anticuerpos específicos de Env ²⁰⁰. Asimismo, un anticuerpo contra ICAM-1 neutralizó completamente la infección por virus que contienen ICAM-1, reduciendo la eficacia de la entrada del virus en casi 100 veces ²⁰¹. Recientemente, se encontró que romper la tolerancia periférica en ratones promueve la producción de autoanticuerpos capaces de participar en la neutralización del VIH-1 ¹⁶⁴.

La inhibición de la fusión por ALA puede resultar de mecanismos como el bloqueo de la interacción de Env con moléculas co-receptoras por anticuerpos dirigidos a CXCR4, bloqueo del contacto cercano entre células por anticuerpos que reconocen moléculas de adhesión como LFA-1 e ICAM-1, o por unión a moléculas que facilitan la interacción Env-CD4, como la integrina $\alpha 4\beta 7$, que es expresada por las células Jurkat ^{202,203}. Del mismo modo, los ALA que inhibe la fusión puede incluir anticuerpos capaces de unirse a la proteína de la envoltura viral, ya que se han informado consistentemente reacciones cruzadas entre la Env neutralizante y los epítomos de linfocitos ^{194,204–206}. Por otro lado, la potenciación de la fusión puede estar mediada por ALA no inhibidor con la capacidad de impedir la unión de anticuerpos inhibidores de la fusión. Finalmente, no se puede descartar la posibilidad de inducción de procesos de señalización que inhiban o promuevan la permisividad de la membrana celular para la fusión por ALA. Un ejemplo de este mecanismo es la observación de que los anticuerpos reactivos al CCR5 en parejas seronegativas de individuos seropositivos al VIH modulan a la baja el CCR5 superficial *in vivo* y neutralizan la infectividad de las cepas R5 del VIH-1 *in vitro* ¹⁸⁸.

Una asociación entre la autoinmunidad y el VIH-1 se ha apreciado en la literatura durante décadas. Recientemente, se documentó una asociación entre la autoinmunidad y la inmunidad humoral protectora del VIH-1 en un individuo con LES (lupus eritematoso sistémico) cuyo plasma neutraliza una amplia gama de subtipos genéticos de VIH-1 y controla la infección en ausencia de terapia antirretroviral ¹⁴⁰.

Los individuos infectados por el VIH que albergan bnAbs del VIH-1 también muestran niveles significativamente más altos de autoanticuerpos en suero en comparación con los individuos infectados con una actividad neutralizante del VIH-1 limitada ²⁰⁷. Juntos, estos hallazgos sugieren que algunas especificidades de anticuerpos autorreactivos pueden reaccionar de forma cruzada con la Env del VIH-1 y respalda la idea de que la tolerancia inmune impide la producción de anticuerpos neutralizantes del VIH-1.

Peter I. Lobo y colaboradores en 2008 determinaron que los anticuerpos anti-linfocitos similares a IgM de pacientes con VIH, tanto *in vitro* como *in vivo*, inhiben la formación de

sincicios hasta en un 90% ²⁰⁸. Estos datos indican que un mecanismo inmune innato que está presente desde el nacimiento, es decir, IgM-ALA, tiene un papel en la inhibición de la entrada del virus del VIH-1 en las células.

Tabla 3. Proteínas de la membrana de células T que son reconocidas por los anticuerpos del suero de pacientes con VIH-1.

Proteína	Referencia
CD43	Giordanengo et al. 1995; Ardman et al. 1990
HLA-II	Golding et al. 1988
CD4	Kowalski et al. 1989; Sekigawa et al. 1991; Wilks et al. 1990; Lobo et al. 2008; Burastero et al. 2009
CD11b/CD18 (MAC-1)	Rubinstein et al. 1999
α/β TCR	Lake et al. 1994
CD95	²⁰⁹ Carter 2011
CCR5	Lobo et al. 2008; Lopalco 2010
CXCR4	Lobo et al. 2008
CD3	Lobo et al. 2008
Fas (CD95/Apo-I)	Stricker 1998

HLA-II: Antígenos leucocitarios humanos, ICAM-1: Glucoproteína de la superficie celular, CD3: Forma parte de un complejo más grande que incluye el receptor de linfocitos T, CD4: Cúmulo de diferenciación 4. Es una molécula que se expresa en la superficie de algunas células T y en las células dendríticas, CCR5: C-C quimiocina receptora de tipo 5, CXCR4: El receptor de quimiocinas C-X-C de tipo 4, también conocido como fusina, CD95/CD95L: Fas o APO-1 es una glicoproteína transmembrana, CD43: Leucosialina también conocido como sialoforina o CD43 es una proteína transmembranal de la superficie celular, CD11b: Integrin alpha M es una subunidad proteica que forma la molécula heterodimérica de integrina alfa-M beta-2, también conocida como antígeno de macrófago-1 o receptor del complemento 3.

Para concluir existen diferentes factores que pueden contribuir a la presencia de estos autoanticuerpos en el suero de pacientes VIH+, por lo que es importante conocer cuál es su papel en la etapa crónica de la infección y si este papel se puede aprovechar para generar nuevas estrategias de tratamiento o funcionar como biomarcadores de progresión de la enfermedad.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Nuestro grupo de trabajo previamente reportó un estudio en el que se observó un efecto inhibitorio del suero de pacientes VIH+ sobre la fusión entre células Jurkat CD4+ y Env+. Mediante la remoción de anticuerpos tipo IgG o IgM del suero, se demostró que la inhibición de la fusión fue debida a los anticuerpos de tipo IgG de los pacientes ¹²⁶. Es

plausible asumir que la inhibición de la fusión es debida a la actividad de los anticuerpos anti-Env. Sin embargo, se sabe que durante la infección por el VIH es frecuente la producción de anticuerpos capaces de reconocer moléculas propias de la membrana celular.

El presente trabajo se planteó con el fin de responder a tres preguntas: ¿existen anticuerpos anti-linfocito (ALA) implicados en el efecto del suero sobre la fusión entre células Env+ y células CD4+?, ¿cuál es su relevancia en términos de su frecuencia en una muestra de pacientes y cuál es el nivel de participación en la inhibición de la fusión?, y ¿cuáles son los antígenos celulares reconocidos por estos ALA?

La respuesta a estas preguntas es relevante para el conocimiento de la respuesta inmune humoral en la infección por el VIH-1.

3. HIPOTESIS

El suero de pacientes con infección por el VIH-1 contiene anticuerpos anti-linfocito (ALA) capaces de reconocer una variedad de proteínas de la membrana celular, sugiriendo que pueden participar en la inhibición de la fusión de membranas inducida por las proteínas de la envoltura del virus.

4. OBJETIVOS

4.1 General:

Determinar la presencia de ALA en el suero de una muestra de pacientes VIH+ y un grupo de donadores sanos. Cuantificar el efecto del suero sobre la fusión entre células Env+ y CD4+, antes y después de remover los ALA del suero mediante su adsorción sobre células Jurkat. Estimar el nivel de participación de ALA en el efecto del suero sobre la fusión.

4.2 Particulares:

- a) Crear un banco de muestras de suero de individuos con infección por el VIH-1 y de individuos seronegativos, confirmados por laboratorio, así como una base de datos con la información clínica de cada paciente (cuenta de CD4 y carga viral).
- b) Determinar la capacidad del suero para inhibir la fusión entre células Jurkat Env+ y células Jurkat CD4+, por citometría de flujo.
- c) Determinar el grado de unión de los anticuerpos del suero a componentes de la superficie de células Jurkat CD4+ y CD4⁻ por citometría de flujo.
- d) Evaluar la participación de los ALA en la capacidad del suero para inhibir la fusión entre células Jurkat Env+ y células Jurkat CD4+ por citometría de flujo, antes y después de remover los ALA por adsorción a células Jurkat.
- e) Analizar las moléculas que son reconocidas por los ALA en geles de poliacrilamida de dos dimensiones e identificar las proteínas que muestren una relación con el efecto del suero sobre la fusión celular.

5. JUSTIFICACIÓN

La infección por el VIH-1 se asocia con la producción de autoanticuerpos capaces de interactuar con moléculas de los linfocitos T. En conjunto con anticuerpos anti-Env, los autoanticuerpos dirigidos a moléculas de la superficie linfocitaria podrían contribuir al bloqueo de la fusión de membranas inducida por las proteínas de la envoltura viral. Los resultados de este estudio permitirán caracterizar la especificidad de los anticuerpos asociados al efecto sobre la fusión de membranas inducida por Env y al estado clínico de los pacientes, determinando si ciertas combinaciones de anticuerpos específicos para proteínas virales y celulares podrían asociarse a protección. Este conocimiento podría contribuir al diseño de pruebas que contribuyan al pronóstico clínico y a la evaluación del potencial de los autoanticuerpos producidos durante la infección para inhibir la fusión de membranas mediada por Env. El trabajo puede contribuir al conocimiento de la

participación de las proteínas celulares en la fusión de membranas y del potencial de autoanticuerpos para contender con el virus.

6. METODOLOGIA

6.1 Materiales

6.1.1 Pacientes e individuos control

Grupo A: 38 individuos seropositivos para VIH asintomáticos.

Pacientes con número de registro del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), con diagnóstico confirmado para VIH, asintomáticos (sin infecciones oportunistas, enfermedad neoplásica o síndrome de desgaste) y que no han recibido tratamiento antirretroviral. Asimismo, que cuenten con un resultado de carga viral y linfocitos T CD4+ al momento del estudio y que acepten participar en el estudio y firmen el consentimiento informado. El protocolo de investigación clínica fue revisado y aprobado por el Comité de Ética en Investigación del INCMNSZ (PAG. 118)

Grupo B: Grupo control: 30 individuos seronegativos para VIH.

Individuos seronegativos procedentes del Servicio de Medicina Transfusional del INCMNSZ, con serología negativa para el VIH al momento del estudio. Que acepten participar en el estudio y firmen el consentimiento informado.

Para todos los grupos:

- Las muestras fueron colectadas de mayo 2014 hasta agosto de 2016
- Género: masculino.
- Mayores de 18 y menores de 60 años.
- Que no hayan recibido terapia antirretroviral.

Cantidad mínima de suero requerida por individuo: 5ml, proveniente de aproximadamente 12 ml de sangre venosa.

Se almacenarán en alícuotas de 200 µl a -70°C.

Cuadro 1 Características de los pacientes VIH+ y donadores sanos (VIH-)

VIH+, n=38		
<i>Edad</i>	35*	18-60**
<i>Sin tratamiento anti-retroviral</i>	100%	
<i>Carga viral (copias RNA/mL)</i>	272479	1,560-2,908,948**
<i>Cuenta de CD4+ (células/µL)</i>	562	12-829**
VIH-, n=30		
<i>Edad</i>	31.5*	18-45**

*Se muestra promedios y **el rango

6.1.2 Líneas celulares

Las células Env+ provienen de la transfección estable de células Jurkat E6-1 con dos plásmidos diferentes. El primero contiene los genes env y rev de la cepa HXBc2 del VIH-1 acoplados al operador de tetraciclina y a una secuencia de resistencia a higromicina. El segundo cuenta con el activador VP16 de citomegalovirus unido a un represor dependiente de tetraciclina y a una secuencia de resistencia a geneticina. De esta manera, en ausencia de tetraciclina se induce la expresión de Env (Cao et al.1996). Estas células son una donación del Dr. Joseph Sodroski (Harvard Medical School, Boston, Mass.), y se obtuvieron a través del AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH.

Las células CD4+ corresponden a la línea linfocítica Jurkat E6-1, y se obtuvieron a través del ATCC.

Las células Env+ y CD4+ se cultivan en suspensión en botellas T-75 (Corning) con medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (Gibco), penicilina 50 U/ml y estreptomycin 50 µg/ml (Gibco). Las células Env+ también son cultivadas en presencia de 1 µg/ml de tetraciclina, 200 µg/ml de higromicina (Invitrogen) y 200 µg/ml de geneticina (Gibco). Ambos cultivos se mantienen a 37°C con 5% de CO₂.

6.1.3 Trazadores lipofílicos fluorescentes

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

Las soluciones de estas carbocianinas se prepararon de acuerdo a las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones: se preparó una solución de cada colorante a una concentración de 3.5 mg/mL en DMSO y se sonicaron brevemente para optimizar su solubilización. Para poder ser empleados en el marcaje de células, se realizó una dilución 1:10 de cada colorante con DMSO y se almacenaron en obscuridad a temperatura ambiente.

6.2 Cultivo celular

Las células se cultivaron en Medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado al 10% con suero fetal bovino (SFB) (Gibco) inactivado durante 30 minutos a 56° C; al medio se le adicionó 100 U/mL de penicilina (Gibco) y 100 µg/mL de estreptomycin (Gibco). En el caso de las células HXBc2, se cultivaron en RPMI con 4µg/mL de higromicina y 4µg/mL de geneticina para mantener la presencia del plásmido y con 1µg/mL de tetraciclina, para

reprimir la expresión de las proteínas de Env. Los cultivos celulares se mantuvieron en una incubadora (Thermo Scientific®) a 37°C y 5% de CO₂.

6.3 Inducción de la expresión de proteínas de la envoltura viral en células Jurkat

La expresión de Env (gp120/gp41) se indujo retirando la tetraciclina del medio, para ello las células Env+ se lavan 2 veces con 30 ml de PBS estéril (Gibco) con la finalidad de retirar la tetraciclina (Cao et al. 1996) y se resuspenden en medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino y adicionando con 200 µg/ml de geneticina (Gibco) y 200 µg/ml de higromicina (Invitrogen). Se incuban a 37°C con 5% de CO₂ durante el tiempo necesario, como máximo 3 días para la expresión de las proteínas gp120/gp41 del VIH (Huerta et al. 2009).

6.4 Tinción con colorantes fluorescentes vitales lipofílicos

Las células se marcan con los colorantes lipofílicos fluorescentes DiO y Dil. Doce horas previas al ensayo de fusión las células Env+ inducidas para expresar las proteínas virales 48 horas antes y las células CD4+ se ajustan a una concentración de 5 a 15 X10⁶ células/ml de medio RPMI en un tubo de 15mL. A las células Env+ se les adiciona 15 µl/ml de DiO (verde) 1:10, se incubaron en agitación leve constante durante 15 minutos a temperatura ambiente y protegidas de la luz. Se lavan 2 veces con 10 volúmenes de medio RPMI y se mantienen en cultivo en el mismo medio adicionado de los antibióticos geneticina e higromicina en las concentraciones ya mencionadas. Las células CD4+ se marcan con el colorante Dil (rojo) 1:10 a una concentración de 8 µl/ml siguiendo el mismo procedimiento que para las anteriores (Huerta et al. 2002; Lopez-Balderas et al.2007). Se incuban toda la noche a 37°C con 5% de CO₂.

6.5 Ensayo de fusión celular por citometría de flujo

Las células Env+ y CD4+ previamente marcadas con los colorantes fluorescentes verde y rojo se centrifugaron 3 min a 1200 rpm y se resuspenden en medio de cultivo especial para linfocitos libre de suero (AIM-V, Gibco BRL), ajustándolas a una concentración de 0.2×10^6 células/0.1ml. Para inducir la formación de sincicios, en una placa de 96 pozos de fondo en "u" (Cornig) se colocaron en cocultivo 200,000 células de cada tipo celular en 100 μ l de medio AIM-V por pozo. El cocultivo se incubó durante 5 horas a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂. Para los ensayos donde se evaluó el efecto del suero en la fusión de membranas, primero se colocan en el pozo 200,000 células CD4+ en 90 μ l de medio AIM-V más 10 μ L del suero de la concentración correspondiente (1:10, 1:20 y 1:50) y se incuban por 40 minutos a 37°C con 5% de CO₂. Una vez transcurrido el tiempo de pre-incubación se colocaron las 200,000 células Env+ en 100 μ l de medio AIM-V en cada pozo. El cocultivo se incubó en las condiciones y tiempo mencionado anteriormente. Las células se transfirieron a tubos para citometría y se lavaron con 2 ml de PBS. Se fijaron con paraformaldehído al 2% durante 20 minutos. Finalmente, se resuspendieron en 300 μ l de amortiguador para citometría de flujo y se analizaron en un citómetro modelo Attune (Applied Biosystems/Lifetechnologies®) exitando a 488 nm. El análisis se realizó sobre 10,000 eventos adquiridos construyendo gráficas de puntos de granularidad contra tamaño o de fluorescencias. Con las gráficas de fluorescencia se detectaron tres poblaciones de células diferentes, rojas no fusionadas, las verdes no fusionadas y los sincicios como partículas de fluorescencia mixta.

6.6 Fijación con paraformaldehido (PFA) al 2%

Al finalizar la incubación, se cosecharon las células los cocultivos de cada pozo y se transfirieron cada uno a un tubo FACS (BD®) de 2 mL que contenía 1 mL de PBS pH 7.4 frío, se centrifugaron a 238 g/3min a 4°C, se decantó el sobrenadante y se resuspendieron las células con 500 μ L de PBS pH 7.4 frío y 500 μ L de PFA al 4%. Se incubaron por 20 minutos en baño de hielo y se resuspendieron las células cada 8 min. Después de la incubación de 20 minutos, las células se centrifugaron a 238 g/ 3 min a

4°C, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular con 1mL de PBS pH 7.4 frío. Se analizaron por citometría de flujo en el Citómetro Attune (Applied Biosystems/Lifetechnologies®).

6.7 Preparación de las diluciones del suero de los pacientes

Se realizaron dos diluciones previas del suero (1:2 y 1:5) esto con la finalidad de mantener un volumen fijo de suero que se colocó en cada pozo en todos los ensayos de fusión. Las diluciones finales del suero en la placa fueron 1:10, 1:20 y 1:50, las cuales fueron preparadas en microtubos esteriles.

Cuadro 2: Volúmenes requeridos de suero y medio AIM-V para preparar las diluciones requeridas para el ensayo de fusión.

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

6.8 Inmunofluorescencia indirecta (Presencia de ALA en el suero)

Se colocaron células Jurkat E6 CD4+ o CD4- en tubos de 15ml esteril, se centrifugaron 3 min a 250 g y se lavaron con 2ml de solución de lavado (PBS PH 7.4 + azida de sodio NaN₃ 0.1%). Se contaron y ajustaron a 500,000 células en 180µl de solución de marca (PBS + SFB 2% + azida de sodio NaN₃ 0.1%), se colocaron 180µl de la suspensión celular por pozo en una placa de 96 pozos fondo en “u” y se adicionaron 20µl del suero humano de la muestra (VIH+ o VIH-). Las células se incubaron 45 minutos a 4°C. Posteriormente se lavaron dos veces con 200µl de solución de lavado por pozo y se resuspendieron las células con 190 µl de solución de marca. Se agregaron 10µl del anticuerpo secundario de FITC-anti-IgG humana (Biolegend, California, EE UU.) o anticuerpo IgM anti-humana APC (Biolegend, California, EE. UU.), según sea el caso y se incubaron por 45 minutos a 4°C protegiéndose de la luz. Las células se lavaron tres veces con 200µl de solución de lavado y se resuspendieron en 200µl de PBS pH 7.4.

Finalmente se tomó el contenido de cada pozo y se colocó en tubos de FACS con 300µL de PBS PH 7.4 y se fijaron con paraformaldehído al 2% durante 20 minutos, se lavan dos veces con PBS PH 7.4 y se resuspenden en 1ml de PBS PH 7.4 y se analizaron en el citometro Attune (Applied Biosystems/Lifetechnologies®).

6.9 Adsorción de anticuerpos anti-linfocito con células Jurkat CD4-

Cada suero humano (VIH+ o VIH-) se adsorbió exhaustivamente con células CD4-negativas; 150µl de cada suero se incubó con $7,5 \times 10^6$ células CD4- en 600 µl de medio AIM-V en tubos de polipropileno de 1,5 ml estériles y se incubaron durante 40 minutos a 4°C en un mezclador rotatorio. Las células fueron sedimentadas por centrifugación (3min a 250 g) y se recuperó el suero adsorbido en microtubos de 1mL esteriles. Los sueros adsorbidos se usaron posteriormente para evaluar nuevamente su efecto sobre la fusión celular inducida por Env de VIH-1. Para el ensayo de fusión se colocaron 100,000 células Jurkat E6 CD4+ en 50µL de medio AIM-V más 50 µL del suero adsorbido por pozo. Se incubaron por 40 minutos a 37°C y 5% de CO₂, una vez transcurrida la incubación, se agregaron 100 µL con 100,000 células Env+, se incubaron 5 horas a 37°C y 5% CO₂. Paralelamente se corrió un ensayo de fusión de cada suero sin adsorber siguiendo el procedimiento del ensayo de fusión descrito en el apartado 6.5

Se realizó la determinación de la presencia de anticuerpos anti-linfocitos de tipo IgG e IgM del suero humano adsorbido y no adsorbido de VIH+ o VIH-. Para el caso del suero adsorbido en una placa de 96 pozos en forma de “u” se colocaron por pozo 500,000 células Jurkat E6 CD4- o CD4+ en 100 µL de solución de marcaje (PBS PH 7.4 + Azida (0.01%) + SFB (2%)) más 100µL de suero adsorbido, se incubaron por 45 minutos a 4°C protegidos de la luz. Se lavaron los pozos con 200 µL de solución de lavado (PBS PH 7.4 + Azida (0.01%)), se centrifugaron 3 min a 250 g. Se resuspendieron los pozos con 190 µL de solución de marcaje (PBS PH 7.4 + Azida (0.01%) + SFB (2%)) y se agregaron 10 µL de FITC-anti-IgG humana (Biolegend, California, EE UU.) o anticuerpo IgM anti-humana APC (Biolegend, California, EE. UU.), según sea el caso. Se incubaron las placas por 45 minutos a 4°C y protegidos de la luz. Posteriormente se eliminó el anticuerpo no

unido realizando dos lavados de 200 μ L de la solución de lavado (PBS PH 7.4 + Azida (0.01%)) con centrifugación por 3 min a 250 g. Se tomó el contenido de cada pozo y se colocó en un tubo de 1.5ml con 400 μ L de PFA al 2%, se incubaron por 20 minutos a 4°C. Posteriormente se realizaron 3 lavados con 500 μ L PBS PH 7.4 y se resuspendieron en 1mL de PBS PH 7.4 y fueron analizados en el citometro Attune.

Para el suero no adsorbido se determinó la presencia de anticuerpo anti-linfocito como se describe en el apartado 6.8.

El pool de sueros y la IgG purificada se adsorbieron en las mismas condiciones, mencionadas en el párrafo anterior. También se realizaron ensayos de fusión celular en las mismas condiciones mencionadas anteriormente.

Distribución de los sueros en las placas de 96 pozos, una para el suero completo (S) y otra para el suero adsorbido (SA) correspondiente a cada suero con sus respectivos controles positivos y negativos de fusión celular.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	S1		S5	S5			V	V			
B												
C	S2	S2		S6	S6			R	R			
D												
E	S3	S3		F	F	F		SM	SM			
F												
G	S4	S4		T20	T20	T20						
H												

*Suero sin adsorber (S) acompañado del número de suero, Fusión (F), Inhibición de la fusión (T20), Celulas teñidas con colorante verde (V) y colorante rojo (R), Células sin colorante (SM),

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	SA1	SA1		SA5	SA5			V	V			
B												
C	SA2	SA2		SA6	SA6			R	R			
D												

E	SA3	SA3		F	F	F		SM	SM			
F												
G	SA4	SA4		T20	T20	T20						
H												

*Suero adsorbido (SA) acompañado del número de suero, Fusión (F), Inhibición de la fusión (T20), Células teñidas con colorante verde (V) y colorante rojo (R), Células sin colorante (SM),

6.10 Preparación de extractos de proteínas integrales de la membrana

Se utilizó el método descrito por Weissman (Weissman 2003). Se cosecharon mil quinientos millones de células Jurkat E6 CD4-, se lavaron dos veces con PBS y se centrifugaron por 5 min a 500xg a 4 ° C. El pellet fue resuspendido con 3ml de amortiguador de Dounce frío con inhibidores de proteasas y Mg²⁺ 0.2mM, esta concentración de magnesio es necesaria para mantener la integridad de la membrana del núcleo en el proceso de lisis celular. Se incubó por 10 min en baño de hielo y después esta suspensión celular se colocó en el homogeneizador de vidrio de Dounce (PIREX) previamente colocado en un baño de hielo y se le aplicaron 45 golpes para realizar la lisis celular. El material insoluble fue centrifugado 15 minutos a 10,000 xg a 4 ° C, para separar los núcleos de las células del contenido del citoplasma y membranas celulares. El sobrenadante fue recuperado, alícuotado y congelado a -70°C. La cuantificación de proteína se determinó por colorimetría usando el método de Bradford (1976), a través de Kit de Bio-Rad. Se utilizó la Albúmina Sérica Bovina (BSA) como proteína de referencia, se describe a detalle en el apartado de Anexos.

6.11 Análisis electroforético y por Western Blot de las proteínas de membrana de las células Jurkat T CD4 negativas.

Amortiguador de corrida:

- CHAPS 20%
0.2g en 1mL de H₂O Mili-Q (almacenar a -20°C)
- DTT 0.1mg/mL

- 20mg en 200 μ L de H₂O Mili-Q (almacenar a -20°C)
- UREA 8M (60mg)

Amortiguador de Muestra

- UREA 8M
- Extracto proteico (100 μ g/15.6 μ L)
- CHAPS (2%/12.5 μ L)
- DTT 10 μ L
- Anfolinas 2 μ L
- Azul de Bromofenol 1 μ L

Amortiguador de Equilibrio:

- UREA 6M
- SDS 2%
- TRIS 0.355M pH 8.8
- Glicerol 20%

Una vez que se obtuvo el extracto de proteínas de la membrana de las células CD4 negativas y que se confirmó la presencia de proteínas de membrana en estado íntegro se realizó la separación de las proteínas por electroforesis bidimensional. En este proceso, las proteínas se separan inicialmente por su punto isoeléctrico y posteriormente en función de su peso molecular. Para la primera parte la muestra debe ser mezclada con agentes caotrópicos, surfactantes y reductores para desnaturalizar las proteínas por ruptura de puentes de disulfuro. Se realizo una exhaustiva búsqueda en publicaciones científicas acerca del análisis electroforético bidimensional de proteínas de membrana, dado que por sus características hidrofóbicas son más difíciles de solubilizar de manera eficiente. Una vez que se determino cual seria la programación más eficiente para el equipo de isoelectroenfoque se realizó la separación por punto isoeléctrico.

Se tomaron 100 μ g de proteína de membrana del extracto de células Jurkat E6 CD4- en amortiguador de hidratación (Urea (BIORAD) 7M, Tiourea (BIORAD) 2M, CHAPS 4%, DTT (BIORAD) 50mM, Anfolinas (BIORAD) 2 μ L, azul de bromofenol (SIGMA) y agua Mili-Q) completando un volumen final de muestra de 125 μ L en un tubo de 1.5mL. Una vez que todo está completamente disuelto, la muestra se colocó en un carril de la bandeja de hidratación (Read strip IPC Strip BioRad 163200 pH 3-10, 7cm),

evitando la generación de burbujas. Se retiró la capa protectora de la tira de gel y se colocó en el carril con la solución. Se mantiene a temperatura ambiente por 30 minutos para permitir que el gel absorba la muestra y posteriormente se le agregaron 900µL de aceite mineral, lentamente. Se cubrió la bandeja y se incubó toda la noche a temperatura ambiente.

La tira de gel se acomodó en la bandeja del equipo de isoelectroenfoque (PROTEAN® i12™ IEF System BioRad) y se programó con los siguientes parámetros:

Cuadro 3. Parametros establecidos para la separación de proteínas por punto isoelectrico

STEP	VOLTAGE	GRAD.	µAMP	VALUE	UNITS
1	50	Rapid	50	2:00	HH:MM
2	125	rapid	50	2:00	HH:MM
3	250	gradual	50	0:20	HH:MM
4	500	rapid	50	1:00	HH:MM
5	4000	rapid	50	2:00	HH:MM
6	4000	rapid	50	12000	Volt Hr

Una vez que el equipo terminó el programa, la tira de gel se retiró del equipo y se equilibró la tira.

. Para equilibrar la tira de gel se emplearon dos amortiguadores de equilibrio (Urea 6M, SDS 2%(BIORAD), Tris 0.375M pH 8.8 (SIGMA) y Glicerol 20% (BAKER)), uno con 20mg de DTT y el segundo con 50mg de iodoacetamina. Se incubaron durante 10 minutos con agitación constante primero con 2 ml de amortiguador que contiene DTT (Ditiotreititol) y después otros 10 minutos con 2ml de amortiguador de iodoacetamina.

Transcurrida la incubación, se preparó la cámara de electroforesis con los geles de acrilamida (BIORAD 4-20% de acrilamida), el amortiguador de transferencia y en el pozo del gel se colocaron 90µL de Amortiguador de carga (Glicerol, SDS, Azul de bromofenol). Se tomó la tira por ambos extremos con las pinzas para colocarla en el pozo y se introdujo al pozo del polo negativo y cuidadosamente se dejó caer sobre el pozo. Se depositaron 2.5µL del marcador de peso molecular y se corrió el gel a 100 Volts por 1.45 horas. Al transcurrir el tiempo programado, se retiró el gel de la cámara de electroforesis y se colocó en un recipiente limpio con amortiguador de transferencia por 10 minutos.

Se retiró el gel del amortiguador de transferencia y se colocó el gel, la membrana de nitrocelulosa y los aditamentos necesarios en una cámara de transferencia semi-húmeda. Se realizó la transferencia de proteínas del gel a la membrana de nitrocelulosa a 15Volts por 30 minutos. La membrana fue colocada en un recipiente limpio y seco donde se realizó la tinción de proteínas transferidas a la membrana con CPTS (SIGMA).

Posteriormente se bloqueó la membrana con Blotting 5% (BIORAD) en agitación constante a 4°C por 12 horas. Se realizaron 5 lavados con la solución de lavado (PBS + Tween 20 0.5% (BAKER)), se incubaron las membranas con los diferentes pools de sueros de pacientes VIH+ y una membrana con el pool de sueros de VIH-, dilución 1:100 (anticuerpo primario) a 4°C con agitación, toda la noche. Posteriormente se realizaron 5 lavados con la solución de lavado y se colocó el anticuerpo secundario anti-IgG (Goat anti-Human IgG Fc Cross-Adsorbed Secondary Antibody, HRP, Invitrogen) dilución 1:5000, se incubó 1 hora a temperatura ambiente, con agitación constante. Se realizaron nuevamente 5 lavados con la solución de lavado y finalmente para revelar la membrana se colocó la solución de revelado (Diaminobencidina (SIGMA) y H₂O₂, sustrato de la enzima peroxidasa (BAKER)) por 6 minutos a temperatura ambiente y con agitación. Se realizaron de 5 a 7 lavados con H₂O Milli-Q para retirar toda la solución de revelado y se dejó secar la membrana protegida de la luz. Una vez que la membrana se secó se digitalizó en un Scanner HP Scanjet G4050.

6.12 Análisis de imágenes

Para el análisis de los antígenos se escanearon las inmunotransferencias 2D. En ambos casos se utilizó un escáner HP Scanjet G4050 con un nivel de resolución de 300 dpi en formato TIF. Las imágenes digitalizadas se analizaron luego con el software PdQuest™ (Bio-Rad) para la detección de manchas. Todas las imágenes se estudiaron con los mismos ajustes de brillo, contraste y color para minimizar el sesgo.

6.13 Purificación de linfocitos CD4 de donadores sanos

Se empleó el Naive CD4+ T Cell Isolation Kit II human (130-094-131), para purificar linfocitos T CD4 de paquetes de sangre de donadores sanos obtenidos a través del banco de sangre del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”. Los linfocitos T CD4 primarios fueron teñidos y mantenidos en medio RPMI 1460 durante una noche y posteriormente empleados en el ensayo de fusión.

6.14 Citometría de flujo

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

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

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

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

Donde:

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

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

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

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

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

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

6.15 Pruebas estadísticas

Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante pruebas no aparejadas de U-Mann-Whitney y Kruskal-Wallis. Se utilizaron coeficientes de correlación clasificados de Sperman para determinar la correlación entre variables.

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software Statistica v. 7.

7. RESULTADOS

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

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

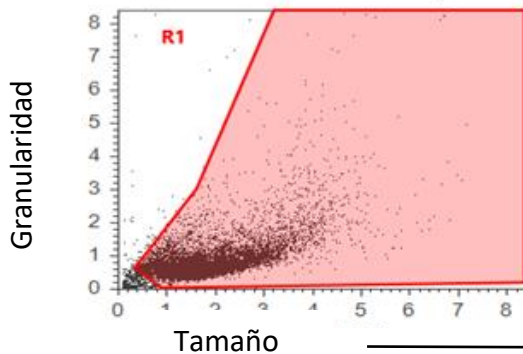
Las células marcadas (Env⁺ con DiO y E6 con Dil) se colocaron en cocultivo durante 5 horas para permitir la fusión. Para todos los experimentos de fusión, se colocaron las células Env⁺ (transfectadas), previamente inducidas por tres días para que expresaran Env, en cocultivo con las células E6 (no transfectadas),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

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

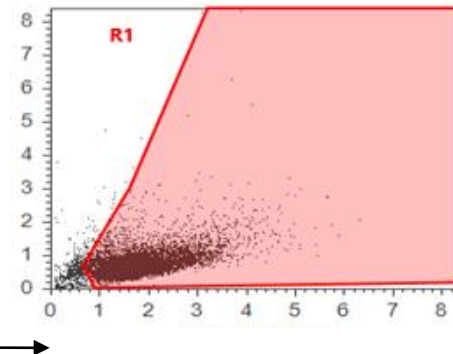
En el análisis por citometría de flujo, la fluorescencia verde (DiO) se leyó en el canal BL1, mientras la fluorescencia roja (DiI) se leyó en el canal BL2. La Figura 9 C) y D) muestra que los productos de fusión se detectaron como partículas con fluorescencia mixta. El porcentaje de fluorescencia mixta fue de 11 a 18 % aproximadamente, de la población total, después de 5 horas de cocultivo (C).

En cada placa se colocó un control positivo (Figura 9, C) y negativo (Figura 9, D). El control positivo consistía de un cocultivo de células E6 y Env⁺ por 5 horas. El control negativo consistía de células Env⁺ y E6 cocultivadas en presencia del inhibidor T20 el cual previamente al cocultivo se incubó por 15 minutos únicamente con las células Env⁺. Los resultados se analizaron en el Software de Attune versión 1.2.5. frase muy confusa

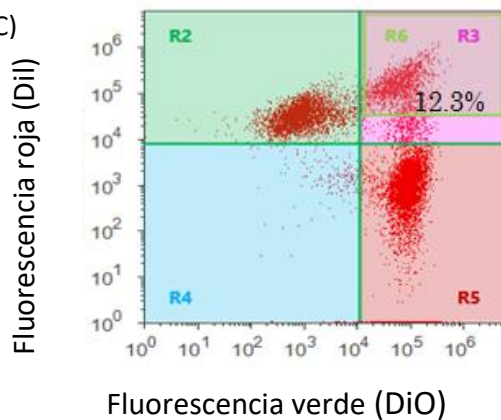
A) Cocultivo Env⁺ con E6



B) Cocultivo Env⁺ con E6 CD4⁺ y T20



C)



D)

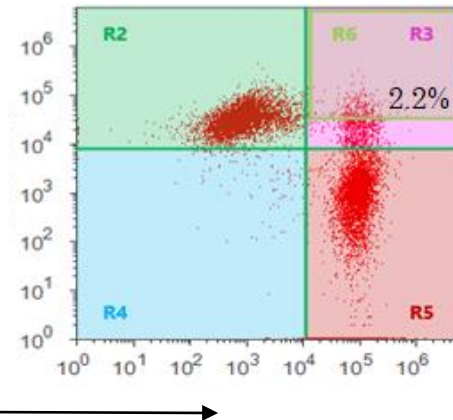


Figura 9. Gráficos de puntos de la fusión entre células Jurkat Env⁺ expresando el complejo Env funcional y células Jurkat E6 no transfectadas. A), B) se muestran los gráficos de tamaño contra granularidad y se ve claramente que el cocultivo donde ocurren las fusiones muestra mayor tamaño y granularidad que el cocultivo donde se está inhibiendo la fusión celular. C) y D) gráficas de fluorescencia donde se indica el porcentaje de células con fluorescencia mixta.

En los pozos donde se agregó T20 (Figura 9, D), se observó entre el 1 y 3% de células doblemente positivas para la fluorescencia verde y la fluorescencia roja; estas células doblemente fluorescentes no correspondían a células fusionadas, sino a agregados celulares, ya que no presentaron la transferencia de energía (FRET) que ocurre del colorante lipofílico Dil al colorante lipofílico DiO²¹⁰.

7.2 Efecto del suero sobre la fusión celular.

Las células E6 se preincubaron 40 minutos a 37°C y 5% de CO₂ con el suero de los pacientes VIH+ o de donadores sanos, a las diluciones 1:50, 1:20 y 1:10 en una placa de 96 pozos. Posteriormente, se le agregaron las células Env⁺ y se cocultivaron por 5 horas. Se incluyeron controles de fusión en ausencia de suero y de inhibición de la fusión celular con anticuerpos anti-CD4 y el péptido inhibidor de la fusión T20. En la Figura 10 se muestran gráficas representativas del análisis del efecto del suero sobre la fusión celular.

Efecto del suero en la fusión celular

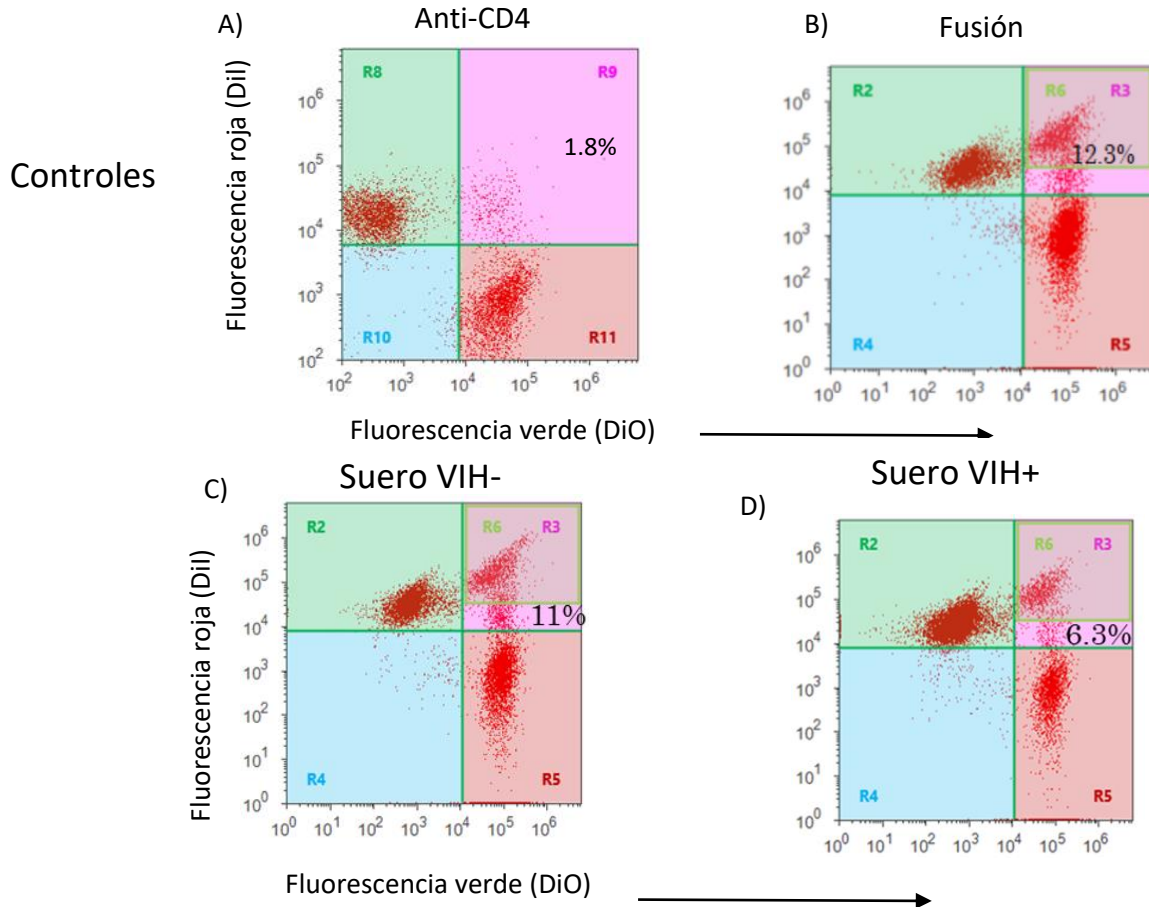


Figura 10. Análisis de la fusión entre células Jurkat CD4⁺ y Jurkat Env⁺ por citometría de flujo. A) Control negativo: cocultivo de células E6 y Env⁺ en presencia de un anticuerpo monoclonal anti-CD4, B) Control positivo de fusión en ausencia de inhibidores, C) y D) efecto de un suero VIH- que no presentó ningún efecto sobre la fusión celular, E) y F) efecto de un suero VIH+ que produjo un efecto inhibitorio de la fusión. La región R3 de cada gráfica representa el porcentaje de células fusionadas como partículas con fluorescencia mixta y que tienen una intensidad de fluorescencia roja mayor a la población roja no fusionada (región R2), debido a FRET. Se muestra el efecto de diluciones 1:10 del suero.

Se analizó el efecto del suero de 38 sueros pacientes VIH+ que no habían recibido tratamiento anti-retroviral y de 30 sueros de donadores sanos para determinar su efecto sobre la fusión de células Jurkat CD4⁺ y células Jurkat Env⁺. Los resultados mostraron que los sueros de pacientes VIH+ inhibieron la fusión en grados variables y la inhibición dependió de la dilución, con una actividad media de inhibición de la fusión de 32.3% ±

2.8, $23.3\% \pm 2.9$ y $14.9\% \pm 3.2$ para las diluciones 1:10, 1:20 y 1: 50, respectivamente (Figura 11). Los sueros VIH- causaron pequeños niveles de inhibición o bien promovieron la fusión ligeramente, aunque su efecto no dependió de la dilución (Figura 11). La actividad inhibidora de la fusión de los sueros VIH+ no se asoció con la carga viral del paciente ni con el recuento de células T CD4+ ($p = 0,3$).

En conjunto, la actividad los dos grupos de sueros (VIH+ y VIH-) fue significativamente diferente (prueba de Mann Whitney, $p < 0,001$). Por otra parte, la actividad de los sueros sobre la fusión no se asoció con la carga viral ni con el recuento de células T CD4+ de los pacientes (Spearman $p = 0,3$, para ambos casos).

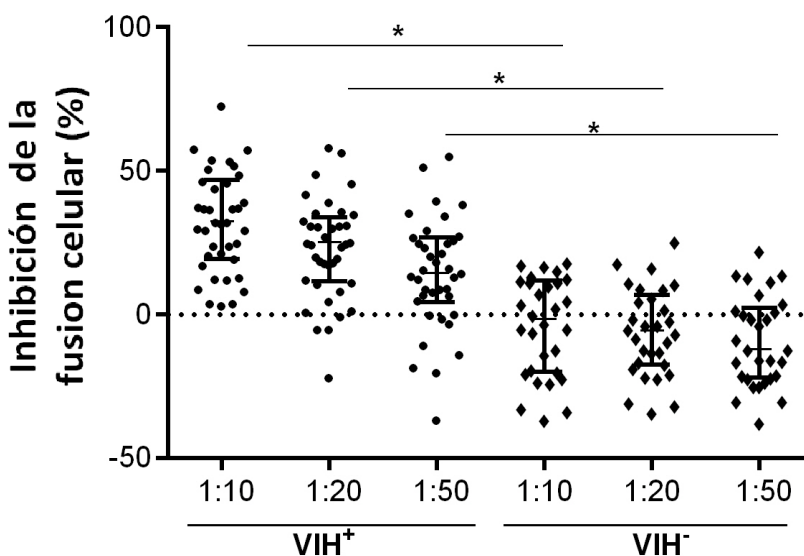


Figura 11. Efecto del suero de 38 individuos VIH + y 30 donantes sanos (VIH -) sobre la fusión de células Env+ con células Jurkat CD4+. Las células Jurkat CD4+ se incubaron previamente con las diluciones indicadas de los sueros antes de la adición de células Jurkat Env+. El porcentaje de inhibición de la fusión se calculó con respecto a la fusión obtenida en ausencia de suero (línea punteada). En la gráfica, los valores positivos indican inhibición de la fusión y los valores negativos indican promoción de la misma. Se observa que los sueros VIH+ inhibieron la fusión celular de forma significativa en comparación con los sueros VIH- a la dilución correspondiente. *U-Mann Whitney $p < 0.05$.

Dado que las células contienen la proteína Env y el receptor CD4, la inhibición de la fusión por el suero podría deberse a anticuerpos anti-Env, partículas de virus, complejos inmunes virus-anticuerpo, o ALA. Por lo tanto, para evaluar el papel de los ALA

decidimos: 1) determinar la unión de anticuerpos IgG e IgM del suero a células Jurkat CD4⁺ y células Jurkat CD4⁻, y 2) remover los ALA del suero y probar nuevamente su efecto sobre la fusión celular. Para remover los ALA, estos se adsorbieron incubando el suero con células Jurkat a 4°C, y se determinó nuevamente su efecto sobre la fusión. La remoción de los ALA se certificó determinando su unión a las células antes y después de la adsorción por inmunofluorescencia indirecta.

7.3. Determinación de la unión de IgG del suero a células Jurkat CD4⁺

Se realizaron ensayos de inmunofluorescencia indirecta para saber si los sueros de los individuos VIH⁺ contenían anticuerpos capaces de unirse a componentes de la membrana de los linfocitos T CD4⁺, y determinar si la presencia de estos anticuerpos tenía relación con el efecto del suero sobre la fusión celular y con el estadio clínico de los pacientes.

Se realizaron inmunofluorescencias indirectas, bajo la premisa de que el anticuerpo primario (anticuerpos anti-linfocito) se encontraba presente en el suero de los pacientes o donadores sanos. Como anticuerpo secundario se emplearon dos anticuerpos conjugados: un anticuerpo anti-IgG humana acoplado a Isotiocianato de fluoresceína (FITC) (BD®) (fluorescencia verde), y un anticuerpo anti-IgM humana acoplado a alofococianina (APC) (BD®) (fluorescencia roja).

Las células E6 CD4⁺ se incubaron por 40 minutos con el suero de los individuos a una dilución 1:10 a 4°C, posteriormente se les agregó el anticuerpo secundario, el cual se incubó por otros 45 minutos. Se realizaron lavados y las células se fijaron con PFA al 2% como se describe en Material y Métodos. La unión de los anticuerpos IgG e IgM se determinó por citometría de flujo; cada suero se probó por duplicado seleccionando el porcentaje de células positivas para FITC o APC, respectivamente (Figura 12, D y E).

Células Jurkat E6

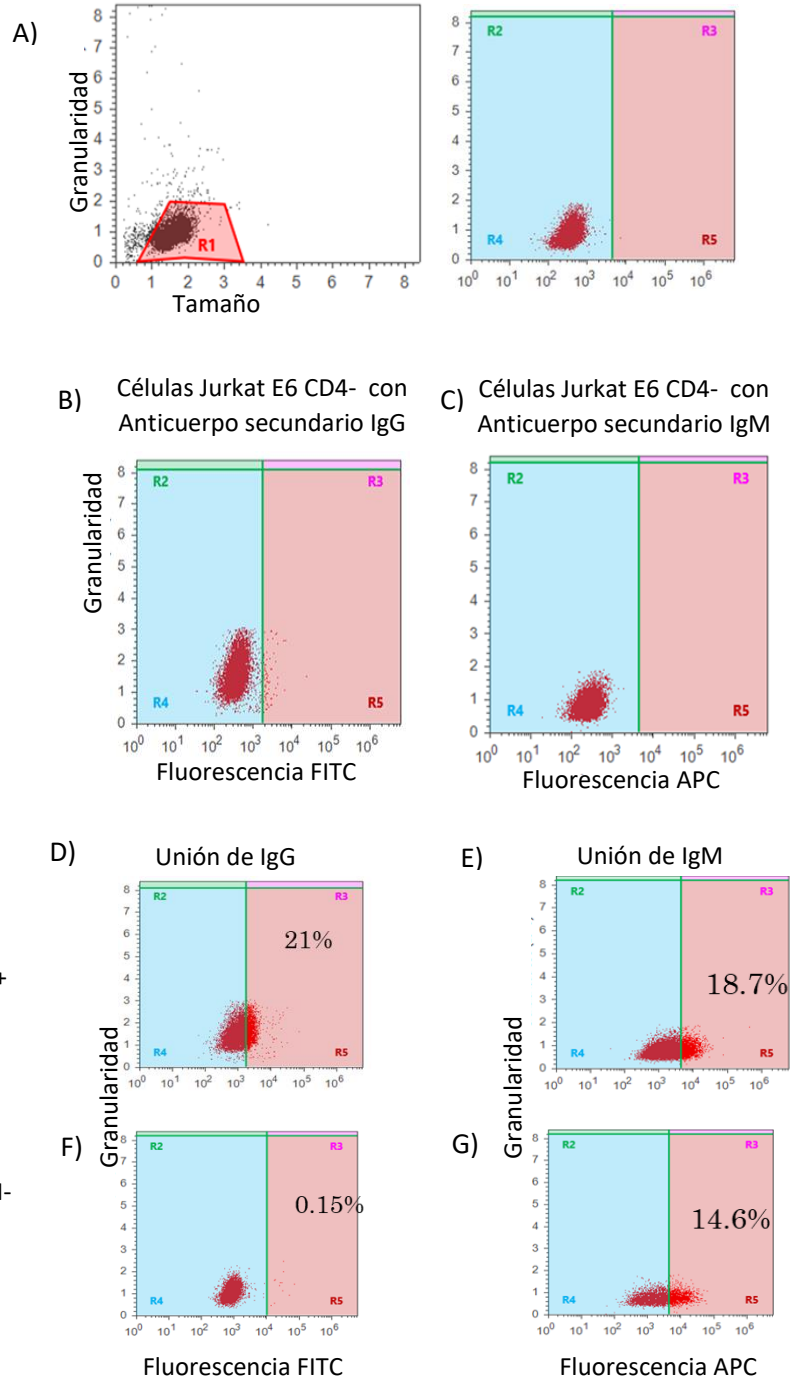


Figura 12. Unión de ALA de tipo IgG e IgM antes y después de la adsorción de los sueros con células Jurkat E6 CD4+. Gráfica representativa del ensayo de inmunofluorescencia. A) células sin marcar, B) control negativo (células E6 (CD4+) + Ac secundario para IgG; C) Ac secundario para IgM, D) un suero de un paciente VIH+ con 42.6% de células positivas para FITC; E) un 18.7% de células positivas para APC; F) suero de un donador sano que presentó en la región R2, (positiva para FITC), un 0.15% de células positivas, mientras que en G) se muestra ese mismo suero que presentó un 14.6% de células positivas para la APC

Los resultados mostraron que los sueros de los pacientes con infección por el VIH-1 contienen IgG e IgM que se unen a componentes de la membrana celular. Dieciocho de los 19 (94%) y 32/38 (84%) de los sueros de pacientes VIH+ fueron positivos para la unión de IgM e IgG a células Jurkat, respectivamente. La Figura 13 muestra los porcentajes de células Jurkat positivas a la unión de IgM e IgG de sueros individuales de pacientes VIH + y controles VIH-. Curiosamente, la unión de IgG de pacientes VIH + a células Jurkat CD4 + reveló dos grupos principales de sueros que mostraron una unión alta y unión baja de IgG. Sin embargo, no hubo correlación entre el nivel de unión de IgG a células Jurkat CD4+ y la actividad inhibidora de fusión de los sueros (Spearman $r=0.0135$, $p=0.9360$), la carga viral (Spearman $r=0.0855$, $p=0.6149$) o el recuento de células T CD4 (Spearman $r=0.0968$, $p=0.5686$). Debe notarse que los anticuerpos secundarios también podrían haber detectado complejos inmunes virus-anticuerpo unidos a CD4²¹¹²¹² además de los ALA, y por lo tanto la evaluación de ALA pudo haberse sobreestimado.

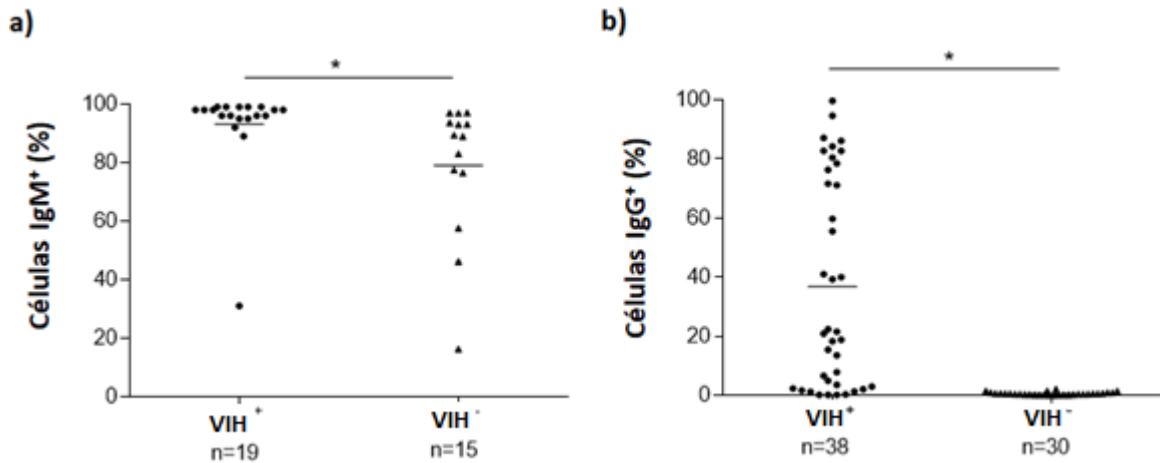


Figura 13. Se muestra Unión de IgM (a) e IgG (b) en suero de individuos VIH + y donantes sanos a la superficie de las células T Jurkat CD4+ con graficas de dispersión. Las células se incubaron con sueros y luego se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado con fluorocromos anti-IgG o anti-IgM, y se analizaron por citometría de flujo como se describe en Material y Métodos. Se encontró una diferencia significativa entre en grupo VIH+ y VIH- tanto para IgG como para IgM con el siguiente método y valor de p: U de Mann-Whitney $p=0.05$.

Para evaluar la contribución de los ALA a la inhibición de la fusión célula-célula dependiente de Env, los sueros se adsorbieron en células Jurkat CD4 negativas y su efecto sobre la fusión se comparó con su actividad antes de la adsorción, la cual se probó en paralelo. La adsorción en células CD4 negativas remueve ALA del suero, pero no partículas de virus bloqueadores de CD4 o complejos inmunes de virus-anticuerpos. Cabe hacer notar que la ausencia de CD4 en las células no permite remover anticuerpos anti-CD4 del suero, como se ejemplifica en el cuadro 2. Por lo tanto, cualquier cambio en la actividad de los sueros adsorbidos sobre la fusión celular debería atribuirse a la eliminación de los ALA (excepto anticuerpos anti-CD4, que permanecerían en el suero después de la adsorción).

Cuadro 4. Adsorción del suero con Linfocitos T CD4 negativas

Suero Completo	Suero adsorbido con CD4-	
Contiene	Elementos retirados	Permanece

Anticuerpos anti-virus	Anticuerpos anti-linfocito	Anticuerpos anti-virus
Anticuerpos anti-linfocito		Anticuerpos anti-CD4
Complejos inmunes		Complejos Inmunes
Partículas virales		Partículas virales

La unión de IgG e IgM a las células Jurkat CD4 negativas se detectó en 28/38 (74%) y 32/38 (84%) de sueros VIH+, respectivamente, y la adsorción eliminó significativamente esta actividad (Figura 14). Los niveles de unión de Ig a las células CD4- negativas fueron más bajos que en las células CD4+, lo que probablemente refleja la detección de anticuerpos anti-CD4 y complejos inmunes virus-anticuerpo en esta última. En cuanto a las células Jurkat CD4+, no observamos una correlación entre el nivel de unión de IgG a células Jurkat CD4 negativas y la actividad inhibidora de la fusión de los sueros (Spearman $r=0.0056$, $p=0.9733$), la carga viral (Spearman $r=0.1699$, $p=0.3147$) o el recuento de células T CD4 (Spearman $r=0.0925$, $p=0.5860$).

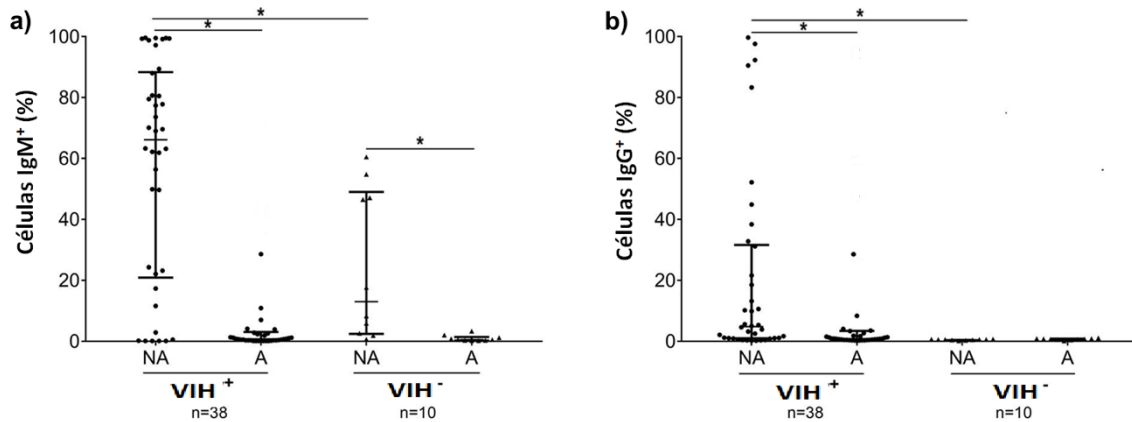


Figura 14. Graficas de dispersión que muestran la unión de IgM (a) e IgG (b) de sueros VIH + y VIH - no adsorbidos (NA) y adsorbidos (A) en células Jurkat CD4 negativas. Se realizó la prueba U de Mann-Whitney $p=0.05$ y se determino que existe diferencia significativa entre los grupos VIH+ y VIH-, además de la diferencia significativa entre el suero adsorbido y en suero no adsorbido.

La adsorción disminuyó la actividad de inhibición de la fusión de los sueros VIH +, mientras que tuvo un efecto insignificante sobre la actividad de los sueros VIH negativos (Figura 15a). La Figura 15B muestra el efecto de la adsorción de sueros VIH+ agrupados según su consecuencia para la inhibición de la fusión. Doce sueros VIH + (31,6%) mostraron una mayor capacidad de inhibición de la fusión después de la adsorción, con una diferencia media del 31% respecto de la muestra no adsorbida (Figura 15c). Se observó el efecto opuesto para 22 sueros (58%) que mostraron una capacidad de inhibición de fusión disminuida con respecto a la muestra no adsorbida (Figura 15b). La media de la disminución de la actividad de inhibición de la fusión por adsorción fue del 33% (Figura 15c).

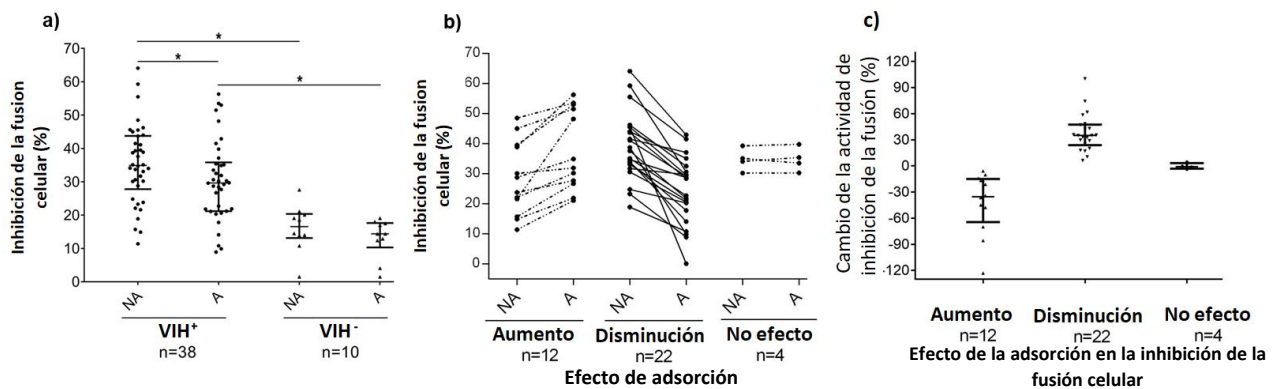


Figura 15. Con graficas de dispersión se analizó la actividad de sueros no adsorbidos (NA) y adsorbidos (A) sobre la fusión de células Jurkat Env + con células Jurkat CD4+. La adsorción se realizó en células Jurkat CD4 negativas. La actividad del suero en la fusión se ensayó como se describe en la Figura 1, usando una dilución 1:10 del suero. El porcentaje de inhibición de la fusión se calculó con respecto a la fusión obtenida en ausencia de suero. a) Efecto de la remoción de ALA del suero de 38 individuos VIH + y 10 individuos VIH negativos. Mediana \pm 25-75 percentil de inhibición de fusión se muestra la actividad inhibitoria de fusión. b) Solo los sueros VIH + fueron agrupados según el efecto de la adsorción sobre la inhibición de la fusión: aumento, disminución y sin efecto, debido a que los sueros VIH (-) no presetaron cambios en la inhibición de la fusión después de la adsorción. c) Actividad de inhibición de la fusión de ALA (porcentaje de cambio de la actividad de inhibición de la fusión después de la adsorción) para los grupos que se muestran en B. Se muestran el rango de percentil \pm 25-75 mediano de la actividad de inhibición de la fusión. Los datos fueron analizados utilizando la prueba de Kruskal-Wallis. ($p < 0.05$).

Finalmente, la adsorción no modificó el efecto de los sueros en el 10.5% de los casos (Figura 15b). Estas observaciones indican que ALA séricos contribuyeron significativamente a la inhibición de la fusión de la membrana mediada por la proteína Env del VIH-1.

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

Los sueros de pacientes con VIH inhibieron la fusión célula-célula mediada por Env con eficiencias variables, y parte de este efecto puede haber ocurrido a través de la participación de ALA (que no son anticuerpos anti-CD4). Como se mostró en la sección anterior, el suero de una fracción significativa de pacientes VIH + (alrededor del 58%) tuvo una actividad inhibidora de la fusión, una parte de la cual se eliminó mediante la adsorción de los sueros en células Jurkat CD4 negativas. La menor inhibición de la fusión después de la adsorción es compatible con la presencia de ALA capaces de reconocer moléculas de superficie de linfocitos. En un informe anterior, se mostró que la inhibición de la fusión por los sueros de una cohorte diferente de pacientes VIH+ se reduce o se elimina al retirar la IgG total mediante el uso de proteína G (Huerta et al., 2005). Por lo tanto, aunque la adsorción de sueros en células Jurkat no proporciona una evidencia directa de que la IgG sea la única responsable del cambio en la inhibición de la fusión, el trabajo previo indica que puede considerarse un actor importante en este efecto. En este trabajo, estimamos que la contribución de anticuerpos del suero a la inhibición de la fusión puede ser altamente variable, con un promedio del 33%. Estos resultados muestran que que en el suero de la mayoría de los pacientes (58%) existen ALA que pueden contribuir a la inhibición de la fusión celular mediada por Env, mientras que en el resto de los pacientes (42%) los ALA podrían promover la fusión, o no afectarla.

Para examinar la posibilidad de que estos anticuerpos tengan un papel en el control de la infección *in vivo*, comparamos ambos grupos con la carga viral y la cuenta de células T CD4 de los pacientes, junto con los datos de unión de anticuerpos de tipo IgG e IgM a la membrana de las células Jurkat E6, y el efecto del suero no adsorbido (Tabla 4).

En la tabla 4 se resumen los resultados anteriores, mostrando el valor promedio de distintas variables de los sueros y de los pacientes con respecto a la presencia o no de ALA inhibidores de la fusión, como son la actividad inhibidora de la fusión del suero, la unión de IgG e IgM a las células Jurkat (tanto el porcentaje de células positivas como

la intensidad media de la fluorescencia), así como la carga viral y la cuenta de linfocitos T CD4 de los pacientes. Se observa que los sueros que contenían ALA que inhiben la fusión (detectados en los experimentos de adsorción) ejercen una inhibición mayor de la fusión que el grupo de sueros que contienen ALA que promueven la fusión o no tienen efecto sobre ella ($p = 0.028$). Por otra parte, no se observaron diferencias significativas en los niveles de unión de anticuerpos a las células Jurkat entre los sueros que contenían ALA que inhibieron y los que no inhibieron la fusión. Esta observación señala que la detección de anticuerpos anti-linfocito es una característica de la infección, pero ésta no es indicativa de la capacidad de estos anticuerpos para contribuir a la inhibición la fusión. Por lo tanto, es posible que la inhibición de la fusión se asocie con la actividad de ALA con especificidades de antígenos particulares, mas que a su nivel absoluto.

De forma importante, la tabla 4 muestra que la carga viral en la sangre de los pacientes fue significativamente menor para el grupo que contenían ALA inhibidores de la fusión, en comparación con el grupo de pacientes en quienes no se detectaron estos anticuerpos ($p = 0.042$). Asimismo, observamos una tendencia de asociación entre la carga viral en plasma y el nivel de ALA inhibidores de la fusión, para todos los pacientes (Figura 16). Estas observaciones sugieren que los ALA capaces de inhibir la fusión podrían contribuir a la contención del virus *in vivo*. Este efecto podría producirse mediante el bloqueo de la formación de sincicios, la transmisión de virus de célula a célula, o la neutralización de partículas libres, las cuales contienen en su membrana proteínas celulares, como se describió en la Introducción (sección 1.6). La identificación de los antígenos de la membrana celular que son reconocidos por estos anticuerpos es un paso necesario para la caracterización de esta actividad.

Tabla 4. Comparación entre los sueros de pacientes VIH + que contienen ALA inhibidores de la fusión*.

Fusion inhibitory ALA	Fusion inhibition by unabsorbed serum (%)	IgG ⁺ cells (%)	IgG ⁺ cells (MFI)	IgM ⁺ cells (%)	IgM ⁺ cells (MFI)	Viral load (RNA copies/mL)	Viral load range (RNA copies/mL)	CD4 ⁺ cells (cells/ μ L)	CD4 ⁺ cells range (cells/ μ L)
Yes (n=23)	39.2 \pm 2.3	20.9 \pm 8.0	10,258 \pm 1789	53.9 \pm 7.3	10,378 \pm 2723	174,183 \pm 93,093	1,560 – 201,2391	344 \pm 57	28-684
No (n= 15)	29.9 \pm 2.8	20.7 \pm 6.7	11,447 \pm 2167	60.7 \pm 9.9	32,396 \pm 10874	416,647 \pm 19,5571	28,201 – 2,908,948	420 \pm 51	10-829
<i>P</i>	0.028	0.77	0.94	0.62	0.60	0.042		0.39	

* Se muestra la media \pm desviación estándar, MFI: intensidad media de fluorescencia. Los valores de p significativos se muestran en negrita.

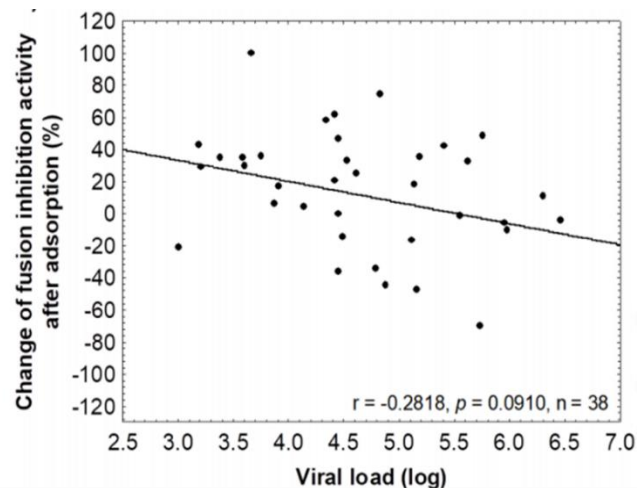


Figura 16. Tendencia que asocia el nivel de ALA inhibidores de la fusión con la carga vira en la sangre de los pacientes VIH+.

7.5 Efecto de la adsorción de IgG en células Jurkat CD4 negativas sobre la fusión de membranas mediada por la envoltura del VIH y linfocitos T CD4 primarios.

Para determinar si los anticuerpos tipo IgG son los principales responsables de la inhibición de la fusión, la IgG se purificó a partir de un pool de 23 sueros VIH+ con alta actividad de fusión inhibitoria y de un conjunto de 10 sueros de donantes sanos. El efecto del pool de sueros de IgG purificada en la fusión celular fue probado antes y después de su adsorción en células Jurkat CD4 negativas. Además, el efecto del pool de sueros y de IgG sobre la fusión celular también se determinó para la fusión entre linfocitos T CD4 primarios y células Jurkat Env+. La Figura 17 muestra que tanto los sueros como la IgG purificada de individuos VIH+ inhibe la fusión de Jurkat Env+ con Jurkat CD4+ o con linfocitos T CD4 primarios. La adsorción de sueros o IgG en células Jurkat CD4 negativas disminuye la actividad inhibitoria de fusión correspondiente. La adsorción de los sueros o IgG de donantes sanos no tuvieron ningún efecto. De este modo, confirmamos que la actividad inhibitoria del suero se relacionó con ALA tipo IgG y que estos anticuerpos pueden inhibir la fusión de linfocitos primarios.

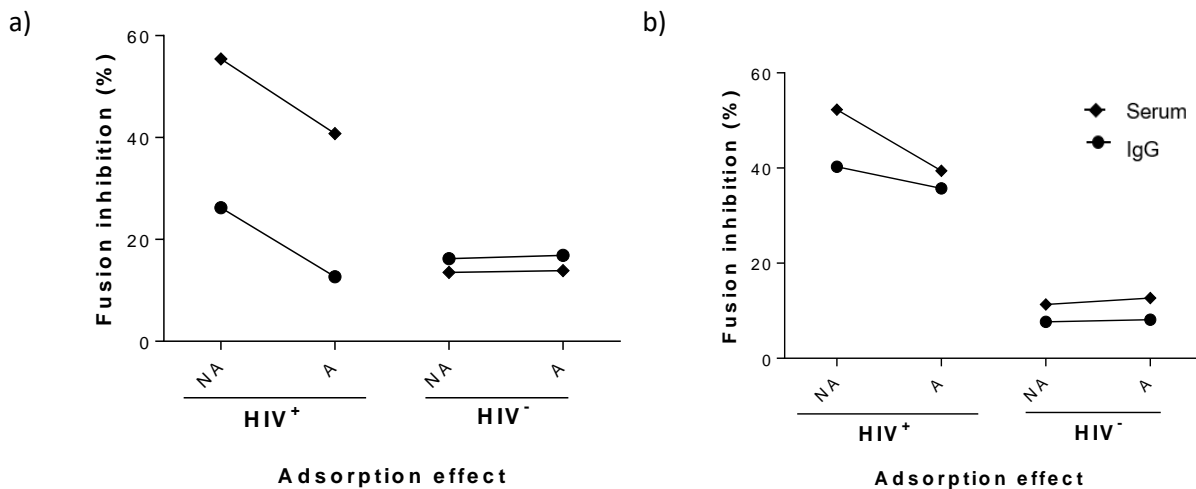


Figura 17. Comparación del efecto del suero y de IgG purificada sobre la fusión entre células Env+ y células Jurkat CD4+ (a) y sobre la fusión de células Env+ y linfocitos T CD4 primarios purificados de la sangre de donadores sanos (b). Se muestra el efecto del suero y de la IgG sobre la fusión antes y después de la adsorción de ALA en células CD4 negativas.

Las observaciones anteriores enfatizan la posible relevancia de los ALA en la inhibición de la fusión inducida por Env durante la infección por el VIH-1. La identificación de los antígenos de la membrana celular reconocidos por los ALA que participan en la inhibición de la fusión es necesaria para la caracterización de esta actividad.

7.6 Identificación de antígenos reconocidos por los Anticuerpos Anti-Linfocito

Para identificar los antígenos reconocidos por los ALA de los individuos VIH+, realizamos una extracción de proteínas de membrana de las células Jurkat CD4 negativas, solubilizándolas con un detergente no iónico, como se describió en la sección de metodología. Durante la extracción se eliminaron los núcleos celulares. Empleamos el método de Bradford para cuantificar el extracto celular, la cual fue de 31.8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ a partir de 1.5×10^7 millones de células. El extracto obtenido se analizó por electroforesis para comprobar la integridad de las proteínas de membrana en el extracto. En la Figura 18a se observan bandas bien definidas de diferentes pesos moleculares, debido a la gran variedad de proteínas en el extracto. Para determinar que el extracto efectivamente contenía proteínas de la membrana celular, se efectuó la detección de dos proteínas transmembranales, una que contiene un dominio transmembranal (ICAM1), y una que contiene siete (CXCR4). La presencia de CXCR4 e ICAM-1 se determinó por Western Blot utilizando anticuerpos monoclonales anti-humano y un anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a peroxidasa. Ambas proteínas estuvieron presentes en el extracto, confirmando que la extracción fue eficiente (Figura 18a y 18b).

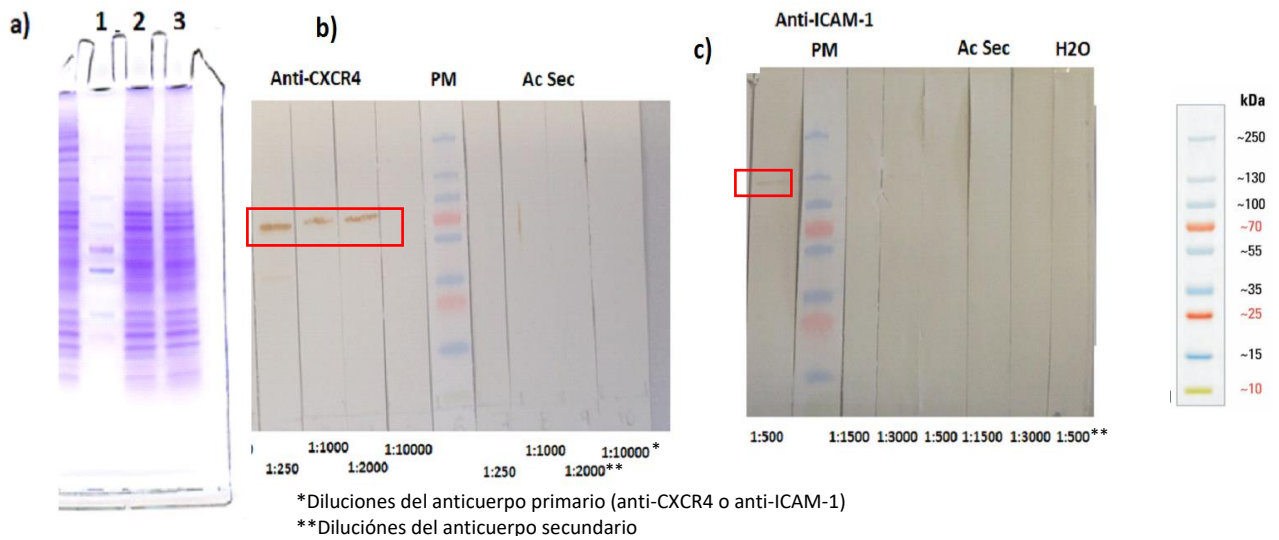


Figura 18. a) Análisis de las proteínas de membrana de las células Jurkat en un gel de electroforesis. Carril 2, marcadores de peso molecular. Carriles 0, 2 y 3, extracto celular. B) Detección de CXCR4 por Western Blot. C) Detección de ICAM-1.

Una vez que se obtuvo el extracto de proteínas de la membrana de las células Jurkat CD4-negativas y que se confirmó la presencia de proteínas de membrana en estado íntegro, se realizó la separación de las proteínas por electroforesis bidimensional. Los gels obtenidos después de la electroforesis bidimensional se tiñeron con azul de Commasie para comprobar que la separación de proteínas del extracto fuera adecuada antes de realizar el western blot. (Figura 19).

Con la tinción de los gels (Figura 19) también nos aseguramos que el extracto estuviera libre de lípidos y contaminación de sales que podrían interferir en una adecuada separación. Las proteínas fueron enfocadas adecuadamente, y se observaron una gran variedad de proteínas (spots) en diferentes pesos y punto isoeléctricos. La gran mayoría de las proteínas del extracto se ubicaron en un rango de pH de 4-8 y un peso molecular de 150 a 25 KDa.

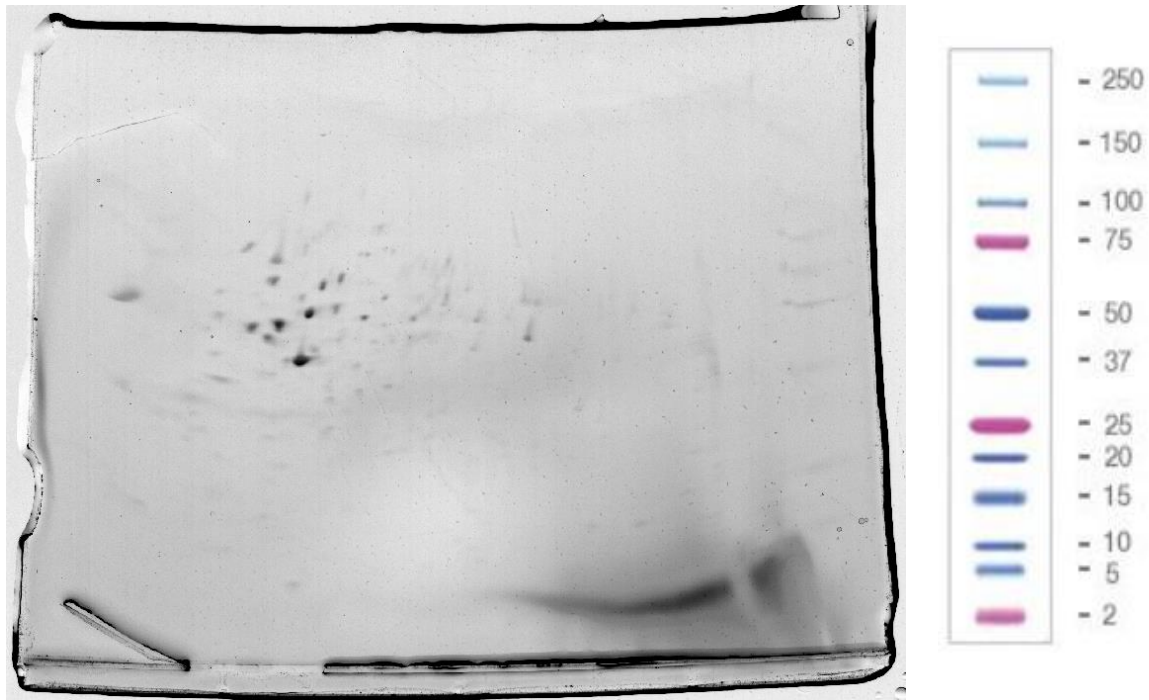


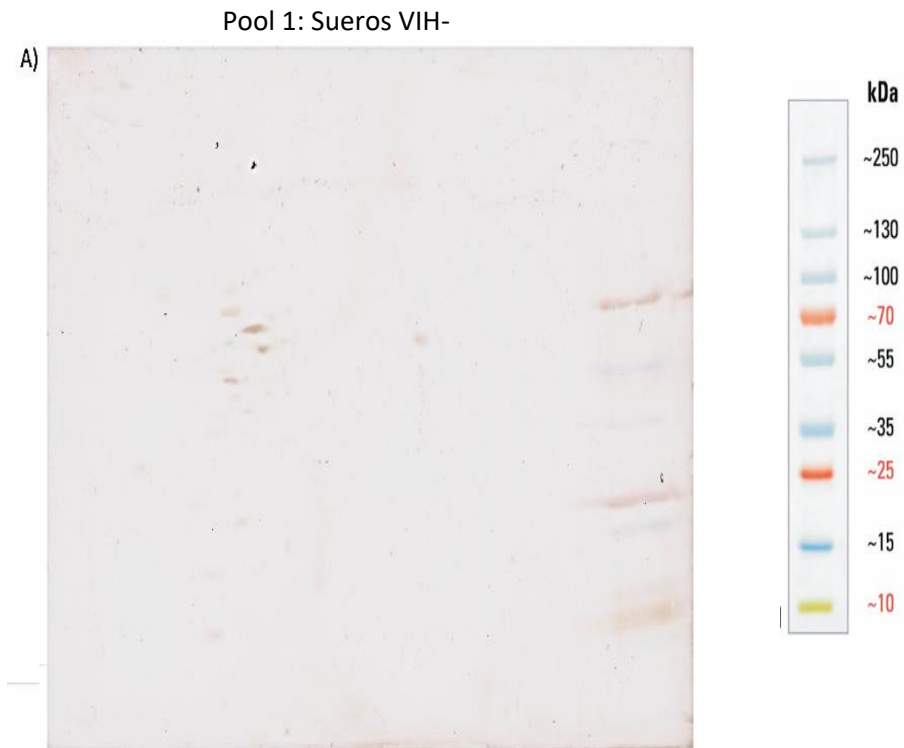
Figura 19. Análisis de electroforesis bidimensional del extracto de proteínas de la membrana de células Jurkat CD4-negativas. El gel fue teñido con azul de Commassie y digitalizado en un densitómetro GS-900 Calibrated Densitometer BioRad. Se visualizaron alrededor de 35 proteínas (spots), definidas, separadas y con diferentes intensidades.

Después de la transferencia de las proteínas separadas en los geles bidimensionales a membranas de nitrocelulosa, éstas fueron incubadas con el suero de los pacientes. Según los resultados obtenidos en los ensayos del efecto sobre la fusión de la adsorción de ALA sobre células Jurkat, se conformaron 3 grupos de sueros que fueron combinados en pools:

- 1) Pool de 30 sueros de individuos VIH negativos.
- 2) Pool de 15 sueros de pacientes VIH+ que tenían ALA que no inhibieron la fusión celular.
- 3) Pool de 23 sueros de pacientes VIH+ que tenían ALA que inhiben la fusión celular.

Se utilizaron 3 membranas de nitrocelulosa por pool. Como lo muestra la Figura 19, el revelado mostró diferencias en el patrón de proteínas reconocidas por los anticuerpos de los sueros de VIH- y los VIH+.

En un examen visual es aparente que los sueros de pacientes VIH+ (Pool 2 y 3) contienen una variedad mayor de anticuerpos capaces de reconocer proteínas del extracto de proteínas de la membrana, con respecto a los sueros VIH- (Pool 1). Asimismo, se pueden observar diferencias entre los patrones de reconocimiento de los ALA de los dos grupos de sueros VIH+: los sueros que contuvieron ALA que inhiben la fusión celular produjeron (Pool 3) y los sueros que contuvieron ALA que no inhibieron la fusión celular (Pool 2).



Pool 2

Pool 3

Sueros VIH+ NO relacionados con la inhibición de la fusión

Sueros VIH+ SI Relacionados con la inhibición de la fusión

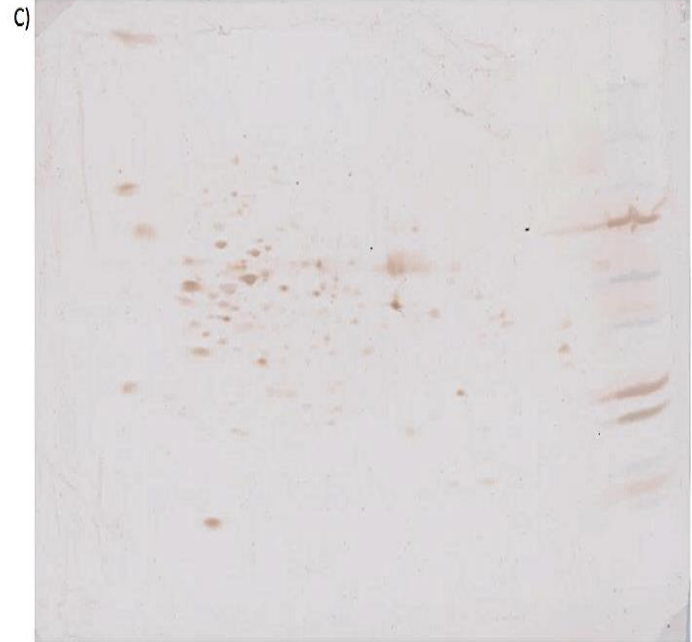


Figura 20. . Membranas de Nitrocelulosa procesadas con la técnica de Western Blot. Las membranas se incubaron con: (A) Pool 1, VIH negativos; (B) Pool 2, VIH+ ALA que no tienen relación con la inhibición de la fusión celular; (C) Pool 3, VIH+ con ALA que si tiene relación con la inhibición de la fusión celular. Se empleó un anticuerpo secundario anti-Fc de IgG humana acoplado a peroxidasa de rábano.

El Pool 2 que contenía ALA no relacionados con la inhibición de la fusión mostró un patrón de reconocimiento de antígenos que se distribuyeron por toda la membrana, mostrando un rango amplio tanto de peso molecular, que va desde los 10 hasta los 130 kDa, como de punto isoeléctrico, que va desde 3 a 10. En cambio, el Pool 3 que contiene ALA que si están relacionados con la inhibición de la fusión celular contiene spots concentrados en la parte central de izquierda de la membrana, indicando que esas proteínas tienen un peso molecular entre 25 y 130 kDa y un pH de 5 a 8.

Mediante el análisis de las membranas con el Software PDQuest se determino que el Pool 2 de sueros VIH+ tiene mayor numero de spots en comparación con el Pool 3 VIH+ y el Pool 1 VIH-, como se muestra en el cuadro 4. Se realizaron 3 replicas por cada pool, y se identificaron en promedio 15 proteínas en el pool 1, 119 proteínas en el pool 2 y 73 proteínas en el pool 3.

Cuadro 4. Numero de spots por membrana obtenidos por el programa PDQuest y el numero de spots que tiene cada membrana y el numero de spot en común entre las diferentes membranas

Membrana	Réplicas del Grupo	Numero de proteínas (spots)	Numero de proteínas en común con la membrana de Referencia	Porcentaje de proteínas en común (%)
Pool 1 M1	Pool 1	16	0	0
Pool 1 M2		10	0	0
Pool 1 M5		20	0	0
Pool 2 M4	Pool 2	124	0	0
Pool 2 M7		110	0	0
Pool 2 M9		123	0	0
Pool 3 M3*	Pool 3	59	57	96
Pool 3 M6		91	22	36
Pool 3 M8		69	34	56

*Membrana que se uso como referencia para a búsqueda de proteínas en común entre las diferentes membranas
M: membrana.

MatchSet information		Replicate group and classes information			
Spots matched to every member:	0 +0	Replicate Group/Classes	Member	Matched to all	Mean CV
Overall mean coefficient of variation:	N/A	pool 1 M	3	0 +0	N/A
		pool 2 M	3	0 +0	N/A
		pool 3 M	3	13 +1	96.39 -1.12

Ademas el programa determino que 13 proteínas se encuentran en las tres réplicas del pool 3 y que no hay ninguna proteína común entre las réplicas del pool 1, pool 2 y pool 3 (Figura 21).

El programa cuenta con otra herramienta que nos permite saber si entre las diferentes membranas hay proteínas en común y lo hace a través de una cuadrícula sobre la membrana de referencia. Cuando se encuentran proteínas comunes entre las mebranas esa cuadrícula aparece solamente en el conjunto de membranas que tengan proteínas en común. Con este análisis se confirmó que no hay proteínas comunes entre el Pool 1 y Pool 3, ni entre el Pool 2 y el Pool 3. Sin embargo, si hay proteínas comunes entre las replicas de cada Pool (Figura 22),

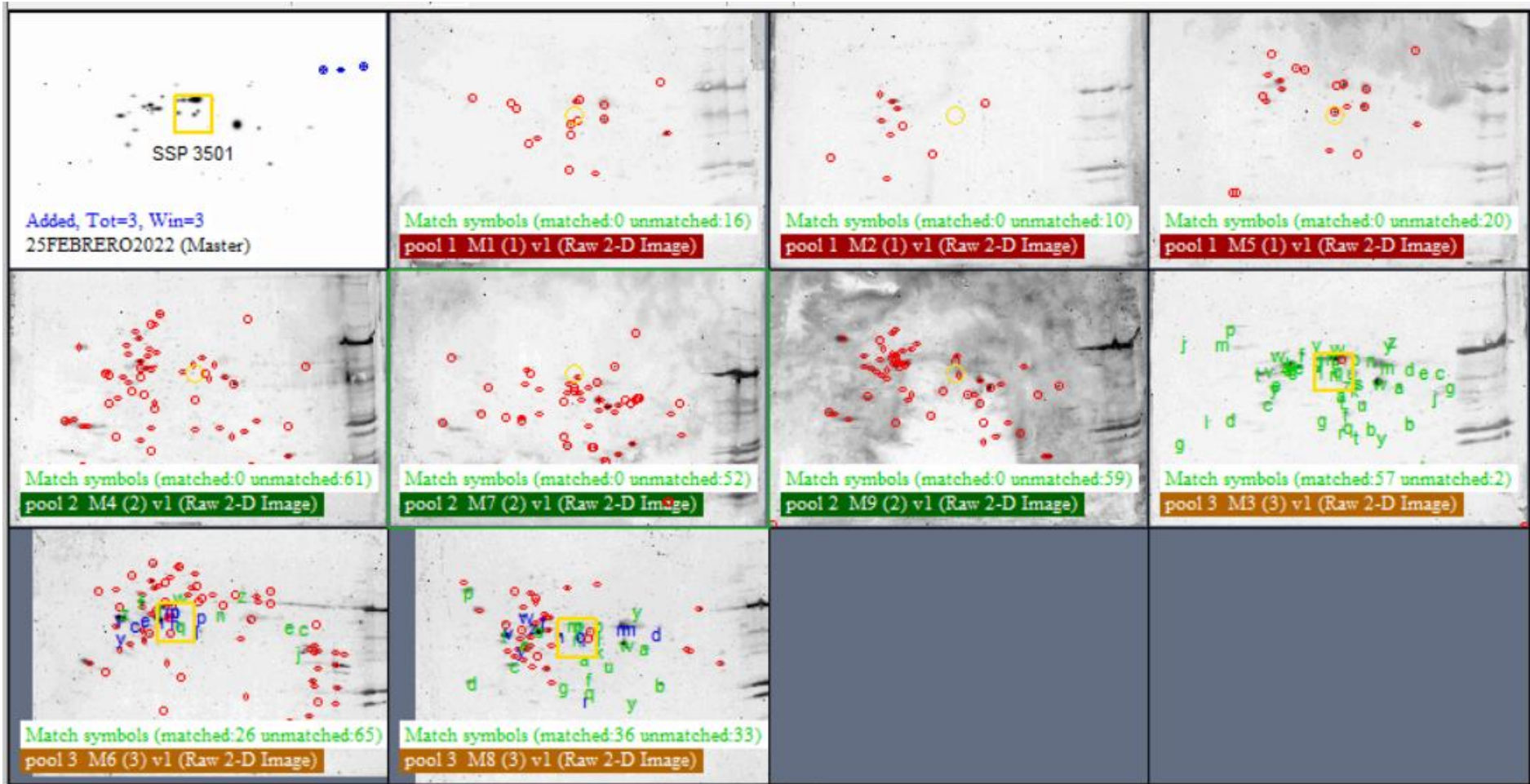
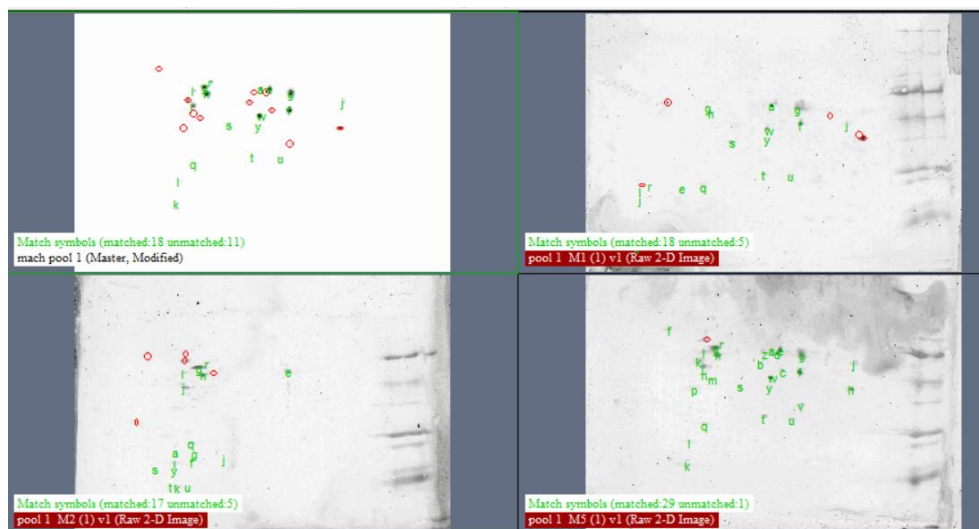
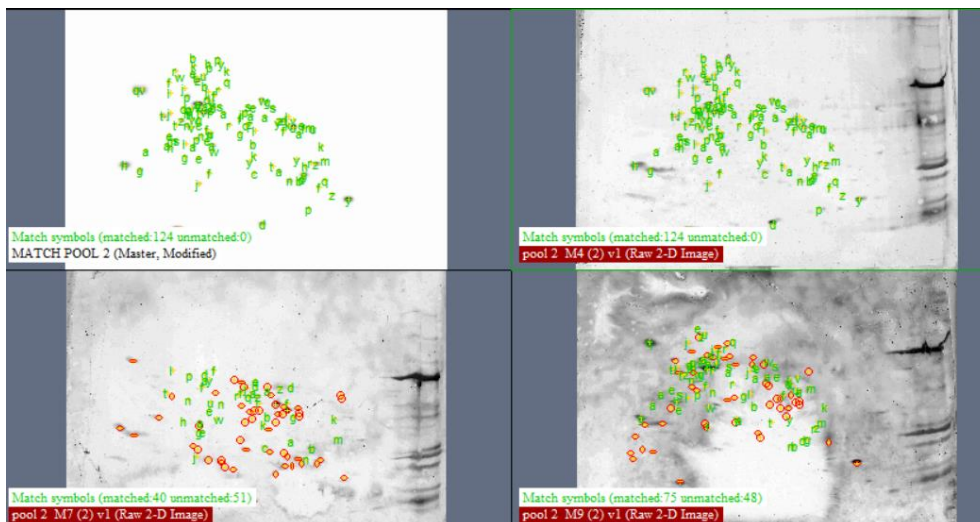


Figura 21. Western Blot de- electroforesis 2D de proteínas de membrana de células Jurkat CD4-. Se ejemplifica la presencia de una proteína nombrada por el programa como SSP 3501 y que esta presente en las replicas del pool 3, pero no en los otros dos pools. La primera membrana es la de referencia para la búsqueda de proteínas en común, que para este set de membranas es una membrana que pertenece al pool 3, nuestro grupo de interés. El recuadro amarillo muestra la selección de proteínas que se están presentes en las directas membranas. Los círculos en rojo indican las proteínas que no son comunes entre los geles y las letras en color verde son las proteínas que si son comunes entre las membranas.

a)



b)



c)

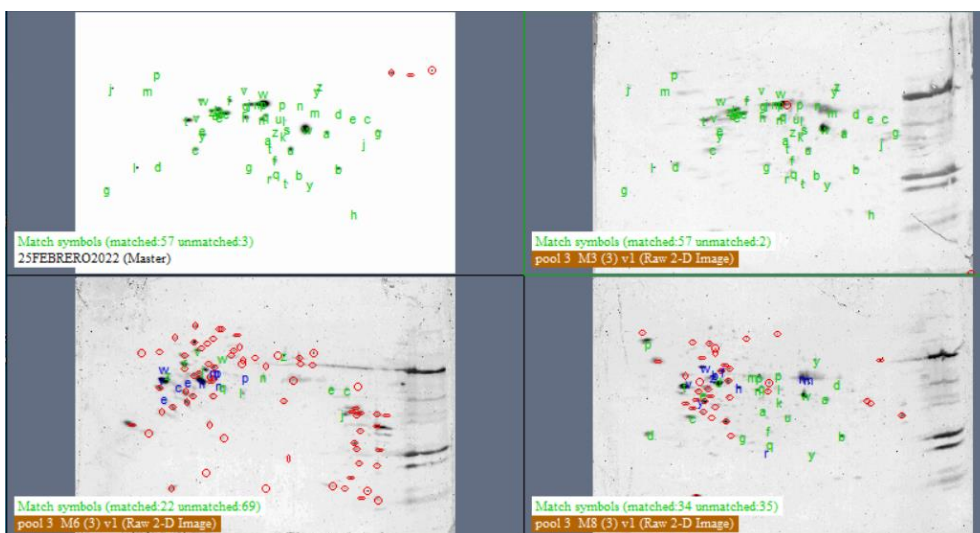


Figura 22. Proteínas en común dentro de las replicas de cada grupo, a) replicas de membranas del Pool 1. b) replicas de membranas del Pool 2. c) replicas de membranas del Pool 3.

Las observaciones anteriores indican que los ALA que participan en la inhibición de la fusión celular reconocen antígenos particulares. Una vez determinados, las proteínas correspondientes serán extraídas de los geles de poliacrilamida y analizadas por espectrometría de masas para determinar su identidad.

8. Discusión

Numerosas referencias en la literatura han reportado la participación de autoanticuerpos en la fusión de membranas inducida por las proteínas del VIH-1. En este trabajo se analizó la respuesta por anticuerpos dirigida a proteínas de la membrana de células linfocitarias T, para determinar la frecuencia de su participación en la fusión de membranas en un grupo de 38 pacientes con infección no tratada. El efecto del suero se determinó utilizando un ensayo entre células Jurkat transfectadas establemente con el gen env de la variante viral HXBc2, y células de la misma línea que no expresan env. La variante es predominante en los países occidentales y en México ^{213,214}.

En el presente trabajo se muestra que el suero de una porción relevante de pacientes con infección por el VIH puede contener anticuerpos anti-linfocito que pueden unirse a proteínas de la superficie de la membrana de células linfocitarias y que tienen la capacidad de afectar la fusión celular mediada por Env. En algunos sueros, se observó una relación entre la capacidad para alterar la fusión celular y la unión a las proteínas de membrana. De acuerdo con observaciones previas sobre una cohorte diferente de pacientes con VIH ²¹⁵, la mayoría de los sueros inhibieron la fusión célula-célula mediada por Env con una eficacia variable (Figura 11). Aquí mostramos que parte de este efecto

puede ocurrir a través de la participación de ALA (distintos a anticuerpos anti-CD4) (Figura 15).

En el presente trabajo, observamos que el suero de una fracción sustancial de pacientes con VIH (aproximadamente el 60%) mostró actividad inhibitoria de la fusión que pudo eliminarse por adsorción de los sueros en células Jurkat CD4 negativas (Figura 15b). El cambio en la inhibición de la fusión después de la adsorción de los sueros es compatible con la presencia de ALA capaces de reconocer moléculas específicas de superficie de linfocitos que modulan la fusión. El grado de contribución de los componentes del suero al efecto sobre la fusión fue muy variable, con un promedio del 33% (Figura 15c). La variabilidad puede ser generada por la heterogeneidad propia de la infección por el VIH-1 asociada con factores como el tiempo de evolución de la infección, la cepa viral y la intensidad de la respuesta inmune, las cuales a su vez pueden ser influenciadas por variables ambientales y genéticas.

La infección por el VIH-1 se ha asociado con la producción de autoanticuerpos contra una amplia variedad de autoantígenos, incluyendo a proteínas de membrana de linfocitos T. Se desconoce si estos autoanticuerpos se generan debido a una respuesta inmune específica hacia los antígenos propios, o simplemente son un reflejo de la hipergamaglobulinemia no específica producida por la activación policlonal de células B, la cual es característica de la desregulación inmunológica causada por la infección^{216,217}. Con esto en mente es importante mencionar que a la corte de los pacientes usados en este trabajo se les realizó una prueba de anticuerpos antinucleares (ANA), esto con la intención de determinar si existía la posibilidad de que alguno de los pacientes VIH+ con los que se trabajó en este proyecto tuviera alguna manifestación de enfermedad autoinmune. Solo el 52% de los pacientes VIH+ presentaron positividad para alguno de los diferentes anticuerpos que se determinan en esta prueba, los resultados obtenidos de manera individual se muestran en el Apéndice C. Pero ninguno de estos pacientes tiene manifestaciones de alguna enfermedad autoinmune. Con lo cual podemos concluir que la presencia de los ALA que participan en el efecto inhibitorio del suero de pacientes VIH+ no están relacionados con ningún signo o sintomatología de enfermedades autoinmunes.

Durante la infección por el VIH-1 se inducen múltiples tipos de anticuerpos en contra de las proteínas de gp120 y gp41, incluyendo anticuerpos dirigidos a las regiones variables de la envoltura, al sitio de unión de CD4, y a los sitios de unión a receptores de quimiocinas ²¹⁸. Sin embargo, estos anticuerpos no controlan al virus y son fácilmente evadidos por el mismo en el transcurso de la infección ²¹⁸. En la etapa temprana de la infección por el VIH-1, la producción de anticuerpos neutralizantes toma un tiempo relativamente largo (3-6 meses) ¹⁷⁶, y cuando se producen, son altamente específicos para el virus transmitido ¹²⁰. No obstante, la progresión de la enfermedad tiene lugar aún en la presencia de esta respuesta inmune humoral, debido a la rápida generación de mutantes del virus que escapan a la neutralización ²¹⁹, inaccesibilidad de los epítopes conservados importantes en la estructura terciaria de Env y generación de anticuerpos hacia fragmentos irrelevantes de los antígenos virales ²²⁰. En etapas tardías de la infección, la magnitud de la transmisión del virus de célula a célula es mucho más importante. Cabe destacar que los anticuerpos neutralizantes de partículas virales libres no son necesariamente inhibidores de la fusión celular⁴.

La relevancia de los anticuerpos dirigidos contra antígenos propios se ha demostrado en estudios con individuos que habían sido expuestos al virus debido a su convivencia por un largo tiempo con una pareja infectada, pero que habían permanecido seronegativos. El análisis del suero de dichos individuos mostró que éste contenía anticuerpos anti-HLA y anti-CD4 ²²¹. De manera notable, esos anticuerpos tenían la capacidad de neutralizar al virus derivado de la pareja seropositiva, así como una actividad neutralizante hacia otras cepas virales ²²¹.

Algunos tipos de anticuerpos no neutralizantes podrían bloquear el movimiento de los viriones de las células infectadas a través de barreras mucosas, y/o inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos ²²². Otros tipos de anticuerpos podrían bloquear la formación de contactos estrechos entre las células, disminuyendo la eficacia de la interacción de Env con los receptores celulares durante la infección por el virus libre y durante la transmisión célula a célula ¹⁷⁴.

La generación de autoanticuerpos podría deberse a varios mecanismos: reactividad cruzada de los anticuerpos hacia el virus y proteínas propias ¹⁴¹, activación inmunológica ¹⁷⁵, no se encuentra en referencias mimetismo molecular ^{177,223}, efectos directos del VIH-1 sobre las células endoteliales, destrucción de linfocitos T CD4+ y actividad citotóxica exacerbada con incremento en la producción de autoanticuerpos ¹⁷⁸. La activación inmunológica junto con la producción de autoanticuerpos se ha asociado frecuentemente con disminución de células T reguladoras, en ausencia de enfermedad autoinmune ^{26,179}.

En un informe anterior, mostramos que la inhibición de la fusión por sueros de pacientes con VIH se redujo o se eliminó mediante la eliminación de IgG total utilizando perlas de proteína G ¹²⁶. Aquí mostramos que la IgG purificada a partir de sueros inhibidores de la fusión también inhibió la fusión, y que la eliminación de IgG de los ALA disminuyó este efecto (Fig. 17). Por tanto, la actividad inhibidora de los ALA séricos estaban relacionada con anticuerpos de tipo IgG. Si bien la adsorción de sueros en células Jurkat no proporciona evidencia directa de que los ALA de tipo IgG sean los únicos responsables del cambio en la inhibición de la fusión, el trabajo anterior y la evidencia actual indican que juega un papel importante en la inhibición de la fusión.

La carga viral fue significativamente menor en los sueros que contuvieron ALA relacionados con la inhibición de la fusión que fueron removidos mediante la adsorción en células Jurkat (CD4 negativas) (Tabla 4). Asimismo, se observó una tendencia entre el nivel de ALA inhibidores de la fusión y la carga viral plasmática (Figura 16). Estas observaciones sugieren que los ALA (distintos de los anticuerpos anti-CD4) son capaces de inhibir la fusión y pueden contribuir a la contención del virus *in vivo*, posiblemente bloqueando procesos de fusión de membranas durante la formación de sincicios o la transmisión del virus de célula a célula, además de la neutralización de partículas virales libres (las cuales contienen proteínas de la membrana celular en su propia membrana).

Los niveles totales de ALA tipo IgG o IgM no se relacionaron con la capacidad de los sueros de inhibir la fusión o se asociaron con la carga viral, lo cual sugiere que la inhibición de la fusión implica la actividad de los ALA con especificidades particulares. Es

posible que la abundancia relativa de los ALA inhibidores de la fusión específicos sea variable entre pacientes y que no necesariamente guarden una correlación con el nivel de los ALA totales producidos. En cambio, el nivel de cambio en la actividad inhibidora de la fusión después de la adsorción, presumiblemente reflejando los niveles de los ALA que inhiben eficazmente la fusión, se correlacionó con la actividad inhibidora de la fusión de los sueros completos y con la carga viral. Proponemos que el ensayo de adsorción permite la detección general de los ALA inhibidores de la fusión, cuya abundancia relativa no se relaciona con el contenido total de los ALA en el suero. La participación de los ALA en la inhibición de la fusión célula-célula inducida por Env *in vitro* puede representar una consideración relevante en la evaluación de la respuesta inmune humoral antiviral durante la infección por VIH-1.

Diversos antígenos celulares pueden constituir el blanco de los ALA que inhiben la fusión. Entre ellos se encuentran los correceptores del VIH-1 CXCR4 y CCR5²⁰⁸. Como nuestro ensayo involucra el correceptor CXCR4, los anticuerpos contra esta molécula pueden contribuir a la inhibición de la formación de sincicios. Esto de acuerdo con los resultados anteriores que indican altos niveles de anticuerpos anti-CXCR4 en el suero de pacientes con VIH²⁰⁸. Asimismo, el bloqueo de moléculas de adhesión celular²²⁴⁻²²⁶, o de componentes que facilitan la interacción Env-CD4, como la integrina $\alpha 4\beta 7$, que es expresada por las células Jurkat^{227,228}, también pueden participar en la inhibición de la fusión. Los ALA inhibidores de la fusión también pueden incluir anticuerpos capaces de unirse a la proteína de la envoltura viral, ya que se han informado consistentemente reacciones cruzadas entre la Env neutralizante y epítomos propios^{112,190,229-231}. Por último, no se pueden excluir antígenos inductores de rutas de señalización que modifican la permisividad de la membrana celular para la fusión, como se ha mostrado para anticuerpos anti-CCR5²³².

El aumento de la actividad inhibidora en el 31,6% de los sueros después de la adsorción sugiere la eliminación de los ALA con la capacidad de prevenir la unión de componentes séricos inhibidores de la fusión, como anticuerpos anti-Env, partículas de virus, complejos inmunes virus-anticuerpo o anticuerpos anti-CD4²³³. En la sección 1.6 y la tabla 2 (Introducción) se citan reportes recientes sobre proteínas de la membrana

celular que pueden limitar la fusión celular, así como sus posibles mecanismos de acción. Existe la posibilidad de que la unión de anticuerpos a estas moléculas prevenga su acción inhibidora de la fusión, favoreciéndola así.

Otros componentes del suero pueden participar en el efecto de los sueros sobre la fusión y la incubación a 37°C en presencia de sueros pueden permitir reacciones citotóxicas debidas al complemento sérico o a las hormonas. Sin embargo, los linfocitos T CD4+ y las células Jurkat no se lisan por el complemento debido a la presencia de proteínas de control del complemento en su membrana celular ²³⁴⁻²³⁶. Por otra parte, durante nuestros experimentos no se manifestó muerte celular después del período de incubación, la cual se observa en gráficas de tamaño contra granularidad (SSC-H frente a FSC-H) durante el análisis por citometría de flujo. Otro factor que puede afectar la viabilidad celular es la hormona cortisol, que puede alcanzar una concentración del doble de la concentración fisiológica en el suero de los pacientes con VIH en comparación con los individuos sanos, y estas concentraciones pueden inducir la apoptosis de los linfocitos ²³⁷. Sin embargo, se observó inhibición de la fusión utilizando suero diluido al menos 1:10 y, por tanto, la concentración de cortisol en nuestros ensayos podría ser considerablemente menor. Asimismo, la concentración de otras hormonas que pueden influir en la expresión de los correceptores del VIH-1 *in vitro* ²³⁸ es considerablemente mayor que la presente en sangre ²³⁹. Hasta donde sabemos, este es el primer estudio que muestra una asociación de niveles de ALA inhibidores de la fusión con cargas virales plasmáticas bajas.

Todas las imágenes fueron escaneadas con la misma resolución, tamaño y formato, y se estudiaron con los mismos ajustes de brillo, contraste y color para minimizar cualquier sesgo. El examen visual de las membranas muestra patrones de reconocimiento de antígenos asociados a los ALA de pacientes VIH+ que participan en el efecto inhibitorio del suero en el ensayo de fusión celular diferentes a los ALA que no participan en el efecto inhibitorio del suero y este examen visual fue corroborado por el análisis de las membranas en el Software del programa PDQuest donde se determino que las proteínas marcadas en las membranas que presentaron reactividad con el Pool 3 son diferentes a las proteínas que se marcan en las membranas del Pool 1 y 2.

Es importante destacar que los 2 pools de pacientes VIH+ y el pool de VIH- presentaron reactividad contra proteínas de membrana de células Jurkat CD4- (Figura 20), y que las proteínas que están reconociendo los ALA capaces de inhibir la fusión celular son diferentes a los ALA que no inhiben la fusión celular, lo cual indica que estos ALA son específicos e por este motivo no tiene relación directa el número de ALA totales con el efecto inhibitorio del suero.

De acuerdo con el análisis del western blot solo 13 proteínas (Cuadro 4) coinciden en la posición en las membranas de las 3 replicas del pool 3 y no coinciden con ninguna membrana ni del pool 1, ni del pool 2. Estas 13 proteínas están potencialmente implicadas en el proceso de fusión celular y todas ellas son diferentes a CD4. La inducción de anticuerpos capaces de unirse a las moléculas de la superficie de los leucocitos durante la enfermedad del VIH se conoce desde hace mucho tiempo, incluidos los anticuerpos que reconocen CD4, CCR5, CXCR4, HLA-II, CD11b/CD18 (MAC-1), α/β TCR, CD95, CD3 y CD95 (Apo-1/Fas)²⁴⁰ y pueden modular eventos de fusión. Es relevante identificar las proteínas de la membrana de linfocitos reconocidas por los ALA capaces de inhibir de la fusión celular para corroborar la participación de estas proteínas ejemplificadas anteriormente, como blancos para inhibir el proceso de fusión celular por medio de anticuerpos o bien conocer nuevas proteínas implicadas en el proceso de fusión y nuevos blancos para la inhibición de dicho proceso.

El suero de pacientes VIH contiene otros anticuerpos además de los ALA y estos anticuerpos pueden estar reconociendo proteínas de la membrana de células Jurkat por reacción cruzada o mimetismo molecular debido a que, durante el ensamblaje y la gemación, los virus incorporan proteínas derivadas de la membrana celular. Históricamente, se ha detectado una gran cantidad de proteínas en partículas de VIH mediante microscopía de fluorescencia, Western, espectrometría de masas, utilizando perlas magnéticas y, recientemente, virometría de flujo ^{241,103} y esto permite exponer antígenos propios al sistema inmune transportados en la partícula viral.

Con lo anterior en mente es importante mencionar que los westerns blot del Pool 1, 2 y 3 se realizaron con el suero completo de pacientes VIH- y VIH+, respectivamente.

Así que una parte de las proteínas que fueron marcadas en el pool 2 y pool 3 por el programa podrían ser spots que representan la reactividad de anticuerpos que están reconociendo proteínas de la membrana de células Jurkat por reacción cruzada o mimetismo molecular. Hay reporte de anticuerpos terapéuticos que reconocen antígenos propios. El dominio extracelular 2 (Ibalizumab) fue aprobado por la FDA para el tratamiento de la infección por VIH resistente a múltiples fármacos en 2018. El anticuerpo no bloquea la unión de gp120 a CD4, pero previene los cambios conformacionales en el complejo CD4-gp120 que conducen a la fusión. Como IgG4, evita la lisis mediada por Fc de las células portadoras de CD4 y no parece interferir con la inmunidad dependiente de CD4, ya que se une a CD4 en un lugar diferente al de las moléculas MHC. El anticuerpo ha mostrado una potente actividad contra el VIH-1 genéticamente diverso, aunque se ha detectado alguna reducción en la susceptibilidad por mutación. En un estudio de fase 3 de 25 semanas, una infusión venosa cada dos semanas de Ibalizumab tuvo una actividad antiviral significativa.²⁴² Este tipo de anticuerpo es un ejemplo de la importancia que tiene identificar a los antígenos que son reconocidos por los ALA que están relacionados con la inhibición de la fusión.

Las observaciones apuntan a la participación de los anticuerpos anti-linfocito como un elemento importante de la respuesta inmune humoral al VIH durante la infección natural. s anticuerpos anti-Env y como una oportunidad a la búsqueda de nuevo blancos terapéutico.

9. Conclusiones

Todos los sueros de los pacientes VIH+ analizados tuvieron actividad inhibitoria de la fusión celular, de los cuales un 74% presentó anticuerpos anti-linfocito (ALA) de tipo IgG y un 84% tipo IgM.

Se detectaron anticuerpos anti-linfocito capaces de inhibir la fusión celular en una proporción importante de los individuos (58%). Por otra parte, 31.6% de los pacientes presentaron anticuerpos anti-linfocito capaces de promover la fusión. Finalmente, no se detectaron anticuerpos anti-linfocito con efecto sobre la fusión celular en un 10% de los pacientes.

Los pacientes VIH+ con anticuerpos anti-linfocito que tienen actividad en la modulación de la fusión celular tienen una menor carga viral.

El suero de los pacientes con anticuerpos anti-linfocito reconocen proteínas de membrana de las células Jurkat CD4-negativas. El patrón de reconocimiento de proteínas de membrana de células Jurkat CD4-negativas es diferente entre los grupos de pacientes que mostraron anticuerpos anti-linfocito que inhiben y que no inhiben la fusión celular.

Se identificaron 13 proteínas exclusivas del Pool 3 que corresponde a suero de pacientes VIH+ con ALA que inhiben la fusión celular.

Nuestro estudio muestra que los anticuerpos anti-linfocito son frecuentes en la población infectada, y sugiere que estos anticuerpos pueden influir de manera importante en las determinaciones experimentales de la capacidad de los anticuerpos para bloquear procesos de fusión de membranas inducidos por el virus, como son la fusión entre células infectadas y no infectadas, la transmisión del virus célula-célula y la neutralización del virus

10. Limitaciones del estudio

Una posible limitación del estudio es que la mayoría de los experimentos se realizó con el suero completo de pacientes VIH+ y no con anticuerpos purificados del suero. Sin embargo, se demostró que las IgG purificadas del suero de los pacientes tuvieron actividad inhibitoria de la fusión celular, y que para ambos tipos de muestra la intensidad de la inhibición se redujo cuando los anticuerpos anti-linfocito del suero fueron adsorbidos. Estas observaciones se reprodujeron cuando se utilizó un ensayo de fusión

entre células Jurkat Env+ y linfocitos T CD4 de la sangre (Figura 17). De este modo, confirmamos que la actividad inhibitoria del suero se relacionó con ALA tipo IgG y que estos anticuerpos pueden inhibir la fusión de linfocitos primarios.

El análisis del efecto de anticuerpos anti-linfocito se efectuó utilizando todos los anticuerpos de este tipo presentes en el suero, por lo que los resultados reflejan con alta probabilidad el efecto combinado de anticuerpos con distintas especificidades y afinidades. Sin embargo, por su propia naturaleza, los resultados del estudio se aplican a la infección natural.

Este estudio es de naturaleza transversal. No se realizó un seguimiento a los pacientes para determinar si se producen variaciones de los niveles de anticuerpos anti-linfocito en el tiempo, y si estas variaciones influyen en la progresión de la enfermedad.

11. Ventajas del estudio

A diferencia de otros estudios que han determinado el efecto de anticuerpos anti-linfocito sobre la actividad fusogénica de Env, en los cuales se prueban anticuerpos monoclonales, este estudio se realizó sobre anticuerpos que se encuentran en el suero de pacientes VIH+. Este enfoque enfatiza la potencial importancia antiviral de anticuerpos anti-linfocito producidos durante la infección natural.

12. Perspectivas

A partir de los estudios y discusión presentados en esta tesis, las perspectivas de trabajos futuros se orientan en dos direcciones.

Después del estudio de 38 pacientes VIH+ observamos que los anticuerpos anti-linfocito pueden ser de gran relevancia para la respuesta inmune humoral al VIH. Los resultados nos permiten plantear que es necesario realizar estudios sobre un mayor número de pacientes, con el fin de confirmar nuestras observaciones y establecer que los anticuerpos anti-linfocito son relevantes para la inhibición de la fusión de membranas inducida por Env durante la infección natural. Nuestros resultados sugieren que este tipo de anticuerpos son frecuentes en la población infectada y que podrían influir de manera importante en determinaciones de la capacidad de los anticuerpos para bloquear procesos de fusión de membranas inducidos por el virus, como son la fusión entre células infectadas y no infectadas, la transmisión del virus célula-célula y la neutralización del virus.

Es relevante la identificación de los autoantígenos que son reconocidos por los anticuerpos anti-linfocito. Este estudio permitiría establecer cuales son los antígenos reconocidos con mayor frecuencia por los anticuerpos de los pacientes y determinar mecanismos subyacentes de su producción in vivo. La opción mas pausable es el análisis por espectrometría de masas de las manchas reconocidas por WB.

Una vez identificados los autoantígenos, se podrían realizar estudios de validación con anticuerpos monoclonales dirigidos a éstos, para ser probados de manera individual y combinada en el ensayo de fusión. Este tipo de estudio podría dar pie a una propuesta de uso de anticuerpos anti-linfocito como agentes terapéuticos contra la infección por el VIH. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que los resultados de nuestro estudio reflejan muy probablemente el efecto de una mezcla compleja de anticuerpos con distintas especificidades y afinidades, como lo sugiere el patrón de antígenos que muestran los experimentos de Western Blot.

13. Referencias

1. Barre-Sinoussi F, Chermann J, Rey F, et al. Isolation of a T-lymphotropic

- retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* (80-). 1983;220(4599):868–871. doi:10.1126/SCIENCE.6189183
2. Sawai ET, Baur A, Struble H, Peterlin BM, Levy JA, Cheng-Mayer C. Human immunodeficiency virus type 1 Nef associates with a cellular serine kinase in T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(4):1539. doi:10.1073/PNAS.91.4.1539
 3. RC G, SZ S, M P, et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science*. 1984;224(4648):500–503. doi:10.1126/SCIENCE.6200936
 4. Burton DR, Mascola JR. Antibody responses to envelope glycoproteins in HIV-1 infection. *Nat Immunol*. 2015;16(6):571. doi:10.1038/NI.3158
 5. JM C. Structure, replication, and recombination of retrovirus genomes: some unifying hypotheses. *J Gen Virol*. 1979;42(1):1–26. doi:10.1099/0022-1317-42-1-1
 6. C B, Y R. Early and late cytotoxic T lymphocyte responses in HIV infection. *AIDS*. 2002;16 Suppl 4(SUPPL. 4). doi:10.1097/00002030-200216004-00014
 7. Delgado R. Características virológicas del VIH. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29(1):58–65. doi:10.1016/J.EIMC.2010.10.001
 8. Fields B. *Retroviridae: The Retroviruses and Their Replication*. 5th ed. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
 9. Gelderblom H, Reupke H, Pauli G. LOSS OF ENVELOPE ANTIGENS OF HTLV-III/LAV, A FACTOR IN AIDS PATHOGENESIS? *Lancet*. 1985;326(8462):1016–1017. doi:10.1016/S0140-6736(85)90570-7
 10. Matthews TJ, Weinhold KJ, Lyerly HK, Langlois AJ, Wigzell H, Bolognesi DP. Interaction between the human T-cell lymphotropic virus type IIIB envelope glycoprotein gp120 and the surface antigen CD4: role of carbohydrate in binding and cell fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(15):5424. doi:10.1073/PNAS.84.15.5424
 11. Center RJ, Leapman RD, Lebowitz J, Arthur LO, Earl PL, Moss B. Oligomeric Structure of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Protein on the Virion Surface. *J Virol*. 2002;76(15):7863–7867. doi:10.1128/JVI.76.15.7863-7867.2002
 12. J L. Viruses as immunological adjuvants in cancer. *Biochim Biophys Acta*. 1974;355(1):49–75. doi:10.1016/0304-419X(74)90007-9
 13. SH P, AA M, AA N, et al. Three-dimensional structure of the channel-forming trans-membrane domain of virus protein “u” (Vpu) from HIV-1. *J Mol Biol*. 2003;333(2):409–424. doi:10.1016/J.JMB.2003.08.048
 14. MB F, RF J, A A, RC G, F W-S. HTLV-III expression and production involve complex regulation at the levels of splicing and translation of viral RNA. *Cell*.

- 1986;46(6):807–817. doi:10.1016/0092-8674(86)90062-0
15. AR S, P S, H C, C B, JR E, F B. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell*. 2002;110(4):521–529. doi:10.1016/S0092-8674(02)00864-4
 16. JD L, GR R, MS M, BS S, EG E. AIDS retrovirus induced cytopathology: giant cell formation and involvement of CD4 antigen. *Science*. 1986;232(4754):1123–1127. doi:10.1126/SCIENCE.3010463
 17. Camaur, D., B. D. Jamieson, J. A. Zack y ISYC. Pathogenesis of syncytium-inducing and non-syncytium inducing HIV-1. Published online 1994.
 18. DH N, JE H. Evidence for budding of human immunodeficiency virus type 1 selectively from glycolipid-enriched membrane lipid rafts. *J Virol*. 2000;74(7):3264–3272. doi:10.1128/JVI.74.7.3264-3272.2000
 19. MA K, S K, E M, et al. Viral RNA is required for the association of APOBEC3G with human immunodeficiency virus type 1 nucleoprotein complexes. *J Virol*. 2005;79(9):5870–5874. doi:10.1128/JVI.79.9.5870-5874.2005
 20. UK von S, M S, B M, et al. The protein network of HIV budding. *Cell*. 2003;114(6):701–713. doi:10.1016/S0092-8674(03)00714-1
 21. LA L, G N, DH S, et al. Delineation of a region of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 glycoprotein critical for interaction with the CD4 receptor. *Cell*. 1987;50(6):975–985. doi:10.1016/0092-8674(87)90524-1
 22. JA M, A M, JP M. Differential loss of envelope glycoprotein gp120 from virions of human immunodeficiency virus type 1 isolates: effects on infectivity and neutralization. *J Virol*. 1991;65(2):852–860. doi:10.1128/JVI.65.2.852-860.1991
 23. C T, J G, P S, et al. Antibodies to soluble CD4 in HIV-1-infected individuals. *AIDS*. 1988;2(5):345–351. doi:10.1097/00002030-198810000-00003
 24. Mackewicz CE, Barker E, Greco G, Reyes-Teran G, Levy JA. Do beta-chemokines have clinical relevance in HIV infection? *J Clin Invest*. 1997;100(4):921. doi:10.1172/JCI119608
 25. GS O, X J, S B, et al. Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA. *Science*. 1998;279(5359):2103–2106. doi:10.1126/SCIENCE.279.5359.2103
 26. X L, D I, S K, et al. Transcriptional profiles of latent human immunodeficiency virus in infected individuals: effects of Tat on the host and reservoir. *J Virol*. 2003;77(15):8227–8236. doi:10.1128/JVI.77.15.8227-8236.2003
 27. Kuznetsov YG, Victoria JG, Robinson WE, Jr., McPherson A. Atomic Force Microscopy Investigation of Human Immunodeficiency Virus (HIV) and HIV-Infected Lymphocytes. *J Virol*. 2003;77(22):11896. doi:10.1128/JVI.77.22.11896-11909.2003

28. Richman DD, Wrinn T, Little SJ, Petropoulos CJ. Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(7):4144. doi:10.1073/PNAS.0630530100
29. BR C. Human immunodeficiency virus as a prototypic complex retrovirus. *J Virol*. 1991;65(3):1053–1056. doi:10.1128/JVI.65.3.1053-1056.1991
30. Feng YX, Copeland TD, Henderson LE, et al. HIV-1 nucleocapsid protein induces “maturation” of dimeric retroviral RNA in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(15):7577. doi:10.1073/PNAS.93.15.7577
31. MI B, S H, MP D, et al. A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. *Nature*. 1993;365(6447):666–669. doi:10.1038/365666A0
32. Heinzinger NK, Bukinsky MI, Haggerty SA, et al. The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(15):7311. doi:10.1073/PNAS.91.15.7311
33. BR C. Journey to the center of the cell. *Cell*. 2001;105(6):697–700. doi:10.1016/S0092-8674(01)00392-0
34. Legrand FA, Nixon DF, Loo CP, et al. Strong HIV-1-Specific T Cell Responses in HIV-1-Exposed Uninfected Infants and Neonates Revealed after Regulatory T Cell Removal. *PLoS One*. 2006;1(1):e102. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0000102
35. Letvin NL. Moving Forward in HIV Vaccine Development. *Science (80-)*. 2009;326(5957).
36. YC B, MD M, FD B, LE O. Target-sequence preferences of HIV-1 integration complexes in vitro. *Virology*. 1996;222(1):283–288. doi:10.1006/VIRO.1996.0422
37. Sato AI, Balamuth FB, Ugen KE, Williams W V, Weiner DB. Identification of CD7 glycoprotein as an accessory molecule in HIV-1-mediated syncytium formation and cellfree infection. *J Immunol*. 1994;152(10).
38. WC G, BM P. Charting HIV’s remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. *Nat Med*. 2002;8(7):673–680. doi:10.1038/NM0702-673
39. AR S, P S, H C, C B, JR E, F B. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell*. 2002;110(4):521–529. doi:10.1016/S0092-8674(02)00864-4
40. WJ M, DA I, RE S, RB S, T K-E. AIDS virus infection and autoimmunity: a perspective of the clinical, immunological, and molecular origins of the autoallergic pathologies associated with HIV disease. *Clin Immunol Immunopathol*. 1991;58(2):163–180. doi:10.1016/0090-1229(91)90134-V
41. M T, RE de G, BJ A, et al. 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.* 1988;62(6):2026–2032. doi:10.1128/JVI.62.6.2026-2032.1988
42. C G, TJ H. The ins and outs of HIV replication. *Cell Microbiol.* 2005;7(5):621–626. doi:10.1111/J.1462-5822.2005.00516.X
 43. JF M, S S, LR B, et al. Effect of human immunodeficiency virus type 1 on intracellular activation and superoxide production by neutrophils. *J Infect Dis.* 1999;180(1):206–210. doi:10.1086/314821
 44. Gould SJ, Booth AM, Hildreth JEK. The Trojan exosome hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(19):10592–10597. doi:10.1073/PNAS.1831413100
 45. Freed EO. Viral Late Domains. *J Virol.* 2002;76(10):4679. doi:10.1128/JVI.76.10.4679-4687.2002
 46. BR S, BH H, GM S, et al. Identification and characterization of conserved and variable regions in the envelope gene of HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS. *Cell.* 1986;45(5):637–648. doi:10.1016/0092-8674(86)90778-6
 47. Sodroski J, Goh WC, Rosen C, Campbell K, Haseltine WA. Role of the HTLV-III/LAV envelope in syncytium formation and cytopathicity. *Nature.* 1986;322(6078):470–474. doi:10.1038/322470a0
 48. SIRIOS M, ROBITAILLE L, SASIK R, ESTAQUIER J, FORTIN J CJ. R5 and X4 HIV viruses differentially modulate host gene expression in resting CD4+T cells. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2008;24:485–493.
 49. Gelen JLMC GJ. Virus-host interactions in human immunodeficiency virus infection. *Prog Med Virol.* 1991;vol 38:27–41.
 50. AT H. Perils at mucosal front lines for HIV and SIV and their hosts. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(10):783–792. doi:10.1038/NRI1706
 51. Weimer R, Daniel V, Zimmermann R, Schimpf K, Opelz G. Autoantibodies against CD4 cells are associated with CD4 helper defects in human immunodeficiency virus-infected patients. *Blood.* 1991;77(1):133–140. doi:10.1182/BLOOD.V77.1.133.BLOODJOURNAL771133
 52. J E, M Z, JL R, et al. Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS. *Nature.* 1993;362(6418):359–362. doi:10.1038/362359A0
 53. Zhuang J, Jetzt AE, Sun G, et al. Human immunodeficiency virus type 1 recombination: rate, fidelity, and putative hot spots. *J Virol.* 2002;76(22):11273–11282. doi:10.1128/jvi.76.22.11273-11282.2002
 54. AC K, S L, H G, A S. Characterization of the viral population during primary HIV-1 infection. *AIDS.* 1998;12(8):839–847. doi:10.1097/00002030-199808000-00005

55. JM B, DA P, DC D. HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe? *Nat Immunol.* 2006;7(3):235–239. doi:10.1038/NI1316
56. Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, et al. CD4+ T Cell Depletion during all Stages of HIV Disease Occurs Predominantly in the Gastrointestinal Tract. *J Exp Med.* 2004;200(6):749. doi:10.1084/JEM.20040874
57. HC L, H M, LC E, G W, AH R, AS F. Abnormalities of B-cell activation and immunoregulation in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med.* 1983;309(8):453–458. doi:10.1056/NEJM198308253090803
58. JW M, A M, JV G, et al. Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection. *Ann Intern Med.* 1997;126(12):946–954. doi:10.7326/0003-4819-126-12-199706150-00003
59. JA L. HIV pathogenesis and long-term survival. *AIDS.* 1993;7(11):1401–1410. doi:10.1097/00002030-199311000-00001
60. NM Q, DH C, RF G, LA H. Characterization of a putative cellular receptor for HIV-1 transmembrane glycoprotein using synthetic peptides. *AIDS.* 1990;4(6):553–558. doi:10.1097/00002030-199006000-00009
61. M P, MG S, E R, RC G. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science.* 1984;224(4648):497–500. doi:10.1126/SCIENCE.6200935
62. G S, T L, V H, et al. Interplay of HIV-1 phenotype and neutralizing antibody response in pathogenesis of AIDS. *Immunol Lett.* 1996;51(1–2):23–28. doi:10.1016/0165-2478(96)02550-3
63. J L, A M, D T. Cell-surface expression of CD4 reduces HIV-1 infectivity by blocking Env incorporation in a Nef- and Vpu-inhibitable manner. *Curr Biol.* 1999;9(12):622–631. doi:10.1016/S0960-9822(99)80284-X
64. Lu M, Blacklow SC, Kim PS. A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein. *Nat Struct Biol* 1995 2 12. 1995;2(12):1075–1082. doi:10.1038/nsb1295-1075
65. T M, EO F. The long cytoplasmic tail of gp41 is required in a cell type-dependent manner for HIV-1 envelope glycoprotein incorporation into virions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(1):343–348. doi:10.1073/PNAS.97.1.343
66. JM F, C A, E C. Lymphoid follicles are sites of heightened human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication and reduced antiretroviral effector mechanisms. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2005;21(5):363–370. doi:10.1089/AID.2005.21.363
67. CD M, J P, JK W. Viral gene products and replication of the human immunodeficiency type 1 virus. *Am J Physiol.* 1994;266(5 Pt 1). doi:10.1152/AJPCCELL.1994.266.5.C1135

68. AS F. The human immunodeficiency virus: infectivity and mechanisms of pathogenesis. *Science*. 1988;239(4840):617–622. doi:10.1126/SCIENCE.3277274
69. C C-M, D S, M T, JA L. Biologic features of HIV-1 that correlate with virulence in the host. *Science*. 1988;240(4848):80–82. doi:10.1126/SCIENCE.2832945
70. M K, J P, L B, et al. Functional regions of the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *Science*. 1987;237(4820):1351–1355. doi:10.1126/SCIENCE.3629244
71. Broliden PA, Gegerfelt A von, Clapham P, et al. Identification of human neutralization-inducing regions of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(2):461. doi:10.1073/PNAS.89.2.461
72. Chanh TC, Dreesman GR, Kanda P, et al. Induction of anti-HIV neutralizing antibodies by synthetic peptides. *EMBO J*. 1986;5(11):3065. Consultado agosto 5, 2021. /pmc/articles/PMC1167262/?report=abstract
73. JM B, T W, B K, et al. Comprehensive cross-clade neutralization analysis of a panel of anti-human immunodeficiency virus type 1 monoclonal antibodies. *J Virol*. 2004;78(23):13232–13252. doi:10.1128/JVI.78.23.13232-13252.2004
74. PS M, C A, IA N, NP da S, EI S, LE A. Clinical implications of autoantibodies in HIV infection. *AIDS*. 1997;11(15):1845–1850. doi:10.1097/00002030-199715000-00009
75. Garg H, Blumenthal R. Role of HIV Gp41 mediated fusion/hemifusion in bystander apoptosis. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(20):3134–3144. doi:10.1007/s00018-008-8147-6
76. KH R, KA T. AIDS virus envelope spike structure. *Curr Opin Struct Biol*. 2007;17(2):244–252. doi:10.1016/J.SBI.2007.03.008
77. PA K, D C, JH E, S J. Contrasting IgA and IgG neutralization capacities and responses to HIV type 1 gp120 V3 loop in HIV-infected individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1994;10(7):813–822. doi:10.1089/AID.1994.10.813
78. GM S, M C. Early T-helper cell defects in HIV infection. *AIDS*. 1991;5(3):245–253. doi:10.1097/00002030-199103000-00001
79. E H, U O, C F, J S. Human immunodeficiency virus type 1 gp120 envelope glycoprotein regions important for association with the gp41 transmembrane glycoprotein. *J Virol*. 1991;65(4):2119–2123. doi:10.1128/JVI.65.4.2119-2123.1991
80. DC C, D F, JM B, PS K. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell*. 1997;89(2):263–273. doi:10.1016/S0092-8674(00)80205-6
81. SA G, CM F, M V, et al. The HIV Env-mediated fusion reaction. *Biochim Biophys*

- Acta*. 2003;1614(1):36–50. doi:10.1016/S0005-2736(03)00161-5
82. GB M. Common principles and intermediates of viral protein-mediated fusion: the HIV-1 paradigm. *Retrovirology*. 2008;5. doi:10.1186/1742-4690-5-111
 83. E R, A Z, JP W, F LN, C B. The molecular players of sperm-egg fusion in mammals. *Semin Cell Dev Biol*. 2006;17(2):254–263. doi:10.1016/J.SEMCDB.2006.02.012
 84. I S, CH U, JV G. Sensitive method for measuring apoptosis and cell surface phenotype in human thymocytes by flow cytometry. *Cytometry*. 1994;15(1):12–20. doi:10.1002/CYTO.990150104
 85. C C-M, R L, NR L, L S. Macrophage tropism of human immunodeficiency virus type 1 and utilization of the CC-CKR5 coreceptor. *J Virol*. 1997;71(2):1657–1661. doi:10.1128/JVI.71.2.1657-1661.1997
 86. L L, C P, A C, et al. Anti-cell antibodies in exposed seronegative individuals with HIV type 1-neutralizing activity. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2000;16(2):109–115. doi:10.1089/088922200309458
 87. EA B, PM M, JM F. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol*. 1999;17:657–700. doi:10.1146/ANNUREV.IMMUNOL.17.1.657
 88. H C, M F, Y S, et al. The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell*. 1996;85(7):1135–1148. doi:10.1016/S0092-8674(00)81313-6
 89. H D, R L, W E, et al. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature*. 1996;381(6584):661–666. doi:10.1038/381661A0
 90. BJ D, J R, Y Y, et al. 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*. 1996;85(7):1149–1158. doi:10.1016/S0092-8674(00)81314-8
 91. Rowland-Jones, S. R. Tan y AM. Role of cellular immunity in protection against HIV infection. . *Adv Immunol*. 1997;65:277.
 92. WC G, BM P. Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. *Nat Med*. 2002;8(7):673–680. doi:10.1038/NM0702-673
 93. SN E, D S, SS S, IK C, DS P, MT M. Association between the p170 form of human topoisomerase II and progeny viral DNA in cells infected with herpes simplex virus type 1. *J Virol*. 1994;68(2):1010–1020. doi:10.1128/JVI.68.2.1010-1020.1994
 94. Cormier EG, Dragic T. The Crown and Stem of the V3 Loop Play Distinct Roles in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Glycoprotein Interactions with the CCR5 Coreceptor. *J Virol*. 2002;76(17):8953. doi:10.1128/JVI.76.17.8953-8957.2002

95. J R, N R, NL M, DW W. HIV type 1 Tat protein induces immunoglobulin and interleukin 6 synthesis by uninfected peripheral blood mononuclear cells. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1994;10(7):781–785. doi:10.1089/AID.1994.10.781
96. Cohen O, Weissman D FA. The immunopathogenesis of HIV infection. En: WE P, ed. *Fundamental Immunology*. 4th ed. LIPPINCOTT RAVEN; 1999:1455–1498.
97. Lifson JD, Feinberg MB, Reyes GR, et al. Induction of CD4-dependent cell fusion by the HTLV-III/LAV envelope glycoprotein. *Nat* 1986 3236090. 1986;323(6090):725–728. doi:10.1038/323725a0
98. Li H, Zony C, Chen P, Chen BK. Reduced Potency and Incomplete Neutralization of Broadly Neutralizing Antibodies against Cell-to-Cell Transmission of HIV-1 with Transmitted Founder Envs. *J Virol*. 2017;91(9). doi:10.1128/jvi.02425-16
99. YC C, C S, M M, et al. Super-Resolution Fluorescence Imaging Reveals That Serine Incorporator Protein 5 Inhibits Human Immunodeficiency Virus Fusion by Disrupting Envelope Glycoprotein Clusters. *ACS Nano*. 2020;14(9):10929–10943. doi:10.1021/ACSNANO.0C02699
100. Len ACL, Starling S, Shivkumar M, Jolly C. HIV-1 Activates T Cell Signaling Independently of Antigen to Drive Viral Spread. *Cell Rep*. 2017;18(4):1062. doi:10.1016/J.CELREP.2016.12.057
101. Burnie J, Guzzo C. The Incorporation of Host Proteins into the External HIV-1 Envelope. *Viruses*. 2019;11(1). doi:10.3390/V11010085
102. Chertova E, Chertov O, Coren L V, et al. Proteomic and biochemical analysis of purified human immunodeficiency virus type 1 produced from infected monocyte-derived macrophages. *J Virol*. 2006;80(18):9039–9052. doi:10.1128/JVI.01013-06
103. Jalaguier P, Cantin R, Maaroufi H, Tremblay MJ. Selective Acquisition of Host-Derived ICAM-1 by HIV-1 Is a Matrix-Dependent Process. *J Virol*. 2015;89(1):323. doi:10.1128/JVI.02701-14
104. Gombos RB, Kolodkin-Gal D, Eslamizar L, et al. Inhibitory Effect of Individual or Combinations of Broadly Neutralizing Antibodies and Antiviral Reagents against Cell-Free and Cell-to-Cell HIV-1 Transmission. *J Virol*. 2015;89(15):7813. doi:10.1128/JVI.00783-15
105. C C, S M-H, D M-A, et al. Viral Characteristics Associated with the Clinical Nonprogressor Phenotype Are Inherited by Viruses from a Cluster of HIV-1 Elite Controllers. *MBio*. 2018;9(2). doi:10.1128/MBIO.02338-17
106. BJ C, LE H, AMJ W, et al. Immune activation correlates with and predicts CXCR4 co-receptor tropism switch in HIV-1 infection. *Sci Rep*. 2020;10(1):15866–15866. doi:10.1038/S41598-020-71699-Z
107. Imle A, Kumberger P, Schnellbacher ND, et al. Experimental and computational analyses reveal that environmental restrictions shape HIV-1 spread in 3D cultures. *Nat Commun* 2019 101. 2019;10(1):1–18. doi:10.1038/s41467-019-09879-3

108. Meng B, Ip NCY, Abbink TEM, Kenyon JC, Lever AML. ESCRT-II functions by linking to ESCRT-I in human immunodeficiency virus-1 budding. *Cell Microbiol.* 2020;22(5). doi:10.1111/CMI.13161
109. W L, D G, MP M, A N. Molecular and cellular mechanisms of neuronal cell death in HIV dementia. *Neurotox Res.* 2005;8(1–2):119–134. doi:10.1007/BF03033824
110. JD L, GR R, MS M, BS S, EG E. AIDS retrovirus induced cytopathology: giant cell formation and involvement of CD4 antigen. *Science.* 1986;232(4754):1123–1127. doi:10.1126/SCIENCE.3010463
111. Sodroski J, Goh WC, Rosen C, Dayton A, Terwilliger E, Haseltine W. A second post-transcriptional trans-activator gene required for HTLV-III replication. *Nat* 1986 3216068. 1986;321(6068):412–417. doi:10.1038/321412a0
112. F S, RC W, F D. Autoreactivity in HIV-1 infection: the role of molecular mimicry. *Clin Immunol Immunopathol.* 1995;75(3):197–205. doi:10.1006/CLIN.1995.1072
113. T S, S L, E C, et al. Productive infection of T cells in lymphoid tissues during primary and early human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis.* 2001;183(4):555–562. doi:10.1086/318524
114. J S, WC G, C R, K C, WA H. Role of the HTLV-III/LAV envelope in syncytium formation and cytopathicity. *Nature.* 1986;322(6078):470–474. doi:10.1038/322470A0
115. McCune JM. The dynamics of CD4+ T-cell depletion in HIV disease. *Nature.* 2001;410(6831):974–979. doi:10.1038/35073648
116. Stevenson M. HIV-1 pathogenesis. *Nat Med.* 2003;9(7):853–860. doi:10.1038/nm0703-853
117. Frankel SS, Tenner-Racz K, Racz P, et al. Active replication of HIV-1 at the lymphoepithelial surface of the tonsil. *Am J Pathol.* 1997;151(1):89–96. Consultado noviembre 26, 2019. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9212735>
118. Orenstein JM, Wahl SM. The Macrophage Origin of the HIV-Expressing Multinucleated Giant Cells in Hyperplastic Tonsils and Adenoids. *Ultrastruct Pathol.* 1999;23(2):79–91. doi:10.1080/019131299281734
119. Rinfret A, Latendresse H, Lefebvre R, St-Louis G, Jolicoeur P, Lamarre L. Human immunodeficiency virus-infected multinucleated histiocytes in oropharyngeal lymphoid tissues from two asymptomatic patients. *Am J Pathol.* 1991;138(2):421–426. Consultado noviembre 26, 2019. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1992767>
120. Sylwester A, Murphy S, Shutt D, Soll DR. HIV-induced T cell syncytia are self-perpetuating and the primary cause of T cell death in culture. *J Immunol.* 1997;158(8):3996–4007. Consultado noviembre 26, 2019. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9103471>

121. Chowdhury MI, Koyanagi Y, Suzuki M, Kobayashi S, Yamaguchi K, Yamamoto N. Increased production of human immunodeficiency virus (HIV) in HIV-induced syncytia formation: an efficient infection process. *Virus Genes*. 1992;6(1):63–78. doi:10.1007/bf01703758
122. Steain MC, Wang B, Saksena NK. The possible contribution of HIV-1-induced syncytia to the generation of intersubtype recombinants in vitro. *AIDS*. 2008;22(9):1009–1017. doi:10.1097/QAD.0b013e3282f82b6c
123. Frankel SS, Wenig BM, Burke AP, et al. Replication of HIV-1 in dendritic cell-derived syncytia at the mucosal surface of the adenoid. *Science*. 1996;272(5258):115–117. doi:10.1126/SCIENCE.272.5258.115
124. H B, AB van't W, M B, B H, E H, H S. In vivo HIV-1 infection of CD45RA(+)CD4(+) T cells is established primarily by syncytium-inducing variants and correlates with the rate of CD4(+) T cell decline. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(3):1269–1274. doi:10.1073/PNAS.97.3.1269
125. RI C, H M, Y C, DD H. Increased viral burden and cytopathicity correlate temporally with CD4+ T-lymphocyte decline and clinical progression in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *J Virol*. 1993;67(4):1772–1777. doi:10.1128/JVI.67.4.1772-1777.1993
126. L H, G G-I, L S-R, et al. Human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) envelope-dependent cell-cell fusion modulation by HIV-positive sera is related to disease progression. *J Gen Virol*. 2005;86(Pt 7):1961–1966. doi:10.1099/VIR.0.80635-0
127. Joshi A, Nyakeriga AM, Ravi R, Garg H. HIV ENV glycoprotein-mediated bystander apoptosis depends on expression of the CCR5 co-receptor at the cell surface and ENV fusogenic activity. *J Biol Chem*. 2011;286(42):36404–36413. doi:10.1074/jbc.M111.281659
128. PC T, JW B, AA H, AL L, HA K, DR K. Genotypic analysis of HIV-1 isolates to identify antiretroviral resistance mutations from source patients involved in health care worker occupational exposures. *JAMA*. 1999;281(12):1085–1086. doi:10.1001/JAMA.281.12.1085
129. Valdez H, Al-Harhi L, Landay A, Lederman MM. Rationale for immune-based therapies for HIV-1 infection. *J Lab Clin Med*. 1998;131(3):197–206. doi:10.1016/S0022-2143(98)90090-7
130. F F, RM R. Neutralizing antibodies against HIV -- back in the major leagues? *Curr Opin Immunol*. 2002;14(4):495–502. doi:10.1016/S0952-7915(02)00362-X
131. JR M, MG L, G S, et al. Protection of Macaques against pathogenic simian/human immunodeficiency virus 89.6PD by passive transfer of neutralizing antibodies. *J Virol*. 1999;73(5):4009–4018. doi:10.1128/JVI.73.5.4009-4018.1999
132. Parren, P. W., Moore, J. P., Burton, D. R., & Sattentau QJ. The neutralizing antibody response to HIV-1: viral evasion and escape from humoral immunity.

AIDS. 1999;13 Suppl A:137–162.

133. JP M, PW P, DR B. Genetic subtypes, humoral immunity, and human immunodeficiency virus type 1 vaccine development. *J Virol*. 2001;75(13):5721–5729. doi:10.1128/JVI.75.13.5721-5729.2001
134. Balazs AB, Chen J, Hong CM, Rao DS, Yang L, Baltimore D. Antibody-based protection against HIV infection by vectored immunoprophylaxis. *Nature*. 2012;481(7379):81–86. doi:10.1038/nature10660
135. Gautam R, Nishimura Y, Pegu A, et al. A single injection of anti-HIV-1 antibodies protects against repeated SHIV challenges. *Nature*. 2016;533(7601):105–109. doi:10.1038/nature17677
136. Shingai M, Donau OK, Plishka RJ, et al. Passive transfer of modest titers of potent and broadly neutralizing anti-HIV monoclonal antibodies block SHIV infection in macaques. *J Exp Med*. 2014;211(10):2061–2074. doi:10.1084/jem.20132494
137. Ledgerwood JE, Coates EE, Yamshchikov G, et al. Safety, pharmacokinetics and neutralization of the broadly neutralizing HIV-1 human monoclonal antibody VRC01 in healthy adults. *Clin Exp Immunol*. 2015;182(3):289–301. doi:10.1111/cei.12692
138. Overbaugh J, Morris L. The Antibody Response against HIV-1. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(1):a007039. doi:10.1101/cshperspect.a007039
139. Barre-Sinoussi F, Chermann J, Rey F, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science (80-)*. 1983;220(4599):868–871. doi:10.1126/science.6189183
140. Bonsignori M, Wiehe K, Grimm SK, et al. An autoreactive antibody from an SLE / HIV-1 individual broadly neutralizes HIV-1. 2014;124(4):1835–1843. doi:10.1172/JCI73441DS1
141. BF H, J F, EW SC, et al. Cardiolipin polyspecific autoreactivity in two broadly neutralizing HIV-1 antibodies. *Science*. 2005;308(5730):1906–1908. doi:10.1126/SCIENCE.1111781
142. Liu M, Yang G, Wiehe K, et al. Polyreactivity and Autoreactivity among HIV-1 Antibodies. 2015;89(1):784–798. doi:10.1128/JVI.02378-14
143. Yang G, Holl TM, Liu Y, et al. Identification of autoantigens recognized by the 2F5 and 4E10 broadly neutralizing HIV-1 antibodies. *J Exp Med*. 2013;210(2):241–256. doi:10.1084/jem.20121977
144. Alam SM, McAdams M, Boren D, et al. The role of antibody polyspecificity and lipid reactivity in binding of broadly neutralizing anti-HIV-1 envelope human monoclonal antibodies 2F5 and 4E10 to glycoprotein 41 membrane proximal envelope epitopes. *J Immunol*. 2007;178(7):4424–4435. doi:10.4049/jimmunol.178.7.4424

145. Schroeder KMS, Agazio A, Strauch PJ, et al. Breaching peripheral tolerance promotes the production of HIV-1-neutralizing antibodies. *J Exp Med*. 2017;214(8):2283–2302. doi:10.1084/jem.20161190
146. Mouquet H, Nussenzweig MC. Polyreactive antibodies in adaptive immune responses to viruses. *Cell Mol Life Sci*. 2012;69(9):1435–1445. doi:10.1007/s00018-011-0872-6
147. Mouquet H, Scheid JF, Zoller MJ, et al. Polyreactivity increases the apparent affinity of anti-HIV antibodies by heterologation. *Nature*. 2010;467(7315):591–595. doi:10.1038/nature09385
148. G Z-G, Y S. HIV and autoimmunity. *Autoimmun Rev*. 2002;1(6):329–337. doi:10.1016/S1568-9972(02)00086-1
149. Berger EA, Doms RW, Fenyö E-M, et al. A new classification for HIV-1. *Nat* 1998 3916664. 1998;391(6664):240–240. doi:10.1038/34571
150. Phogat S, Wyatt RT, Hedestam GBK. Inhibition of HIV-1 entry by antibodies: potential viral and cellular targets. *J Intern Med*. 2007;262(1):26. doi:10.1111/J.1365-2796.2007.01820.X
151. Cantin R, Fortin JF, Lamontagne G, Tremblay M. The presence of host-derived HLA-DR1 on human immunodeficiency virus type 1 increases viral infectivity. *J Virol*. 1997;71(3):1922–1930. doi:10.1128/JVI.71.3.1922-1930.1997
152. Hioe CE, Bastiani L, Hildreth JE, Zolla-Pazner S. Role of cellular adhesion molecules in HIV type 1 infection and their impact on virus neutralization. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1998;14 Suppl 3:S247-54. Consultado junio 5, 2018. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9814951>
153. Jolly C, Mitar I, Sattentau QJ. Adhesion molecule interactions facilitate human immunodeficiency virus type 1-induced virological synapse formation between T cells. *J Virol*. 2007;81(24):13916–13921. doi:10.1128/JVI.01585-07
154. Starling S, Jolly C. *LFA-1 Engagement Triggers T Cell Polarization at the HIV-1 Virological Synapse*. Vol 90.; 2016. doi:10.1128/JVI.01152-16
155. Bosch B, Grigorov B, Senserrich J, et al. A clathrin–dynamin-dependent endocytic pathway for the uptake of HIV-1 by direct T cell–T cell transmission. *Antiviral Res*. 2008;80(2):185–193. doi:10.1016/J.ANTIVIRAL.2008.06.004
156. Kuhl BD, Sloan RD, Donahue DA, Bar-Magen T, Liang C, Wainberg MA. Tetherin restricts direct cell-to-cell infection of HIV-1. *Retrovirology*. 2010;7(1):115. doi:10.1186/1742-4690-7-115
157. Sewald X, Gonzalez DG, Haberman AM, Mothes W. In vivo imaging of virological synapses. *Nat Commun*. 2012;3(1):1320. doi:10.1038/ncomms2338
158. Sloan RD, Kuhl BD, Mesplède T, Münch J, Donahue DA, Wainberg MA. Productive entry of HIV-1 during cell-to-cell transmission via dynamin-dependent

- endocytosis. *J Virol.* 2013;87(14):8110–8123. doi:10.1128/JVI.00815-13
159. Ladinsky MS, Kieffer C, Olson G, et al. Electron Tomography of HIV-1 Infection in Gut-Associated Lymphoid Tissue. Rey FA, ed. *PLoS Pathog.* 2014;10(1):e1003899. doi:10.1371/journal.ppat.1003899
 160. Cicala C, Martinelli E, McNally JP, et al. The integrin alpha4beta7 forms a complex with cell-surface CD4 and defines a T-cell subset that is highly susceptible to infection by HIV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(49):20877–20882. doi:10.1073/pnas.0911796106
 161. Guzzo C, Ichikawa D, Park C, et al. Virion incorporation of integrin $\alpha 4\beta 7$ facilitates HIV-1 infection and intestinal homing. *Sci Immunol.* 2017;2(11). doi:10.1126/sciimmunol.aam7341
 162. WJ M, DA I, RE S, RB S, T K-E. AIDS virus infection and autoimmunity: a perspective of the clinical, immunological, and molecular origins of the autoallergic pathologies associated with HIV disease. *Clin Immunol Immunopathol.* 1991;58(2):163–180. doi:10.1016/0090-1229(91)90134-V
 163. Aggarwal A, Hitchen TL, Ootes L, et al. HIV infection is influenced by dynamin at 3 independent points in the viral life cycle. *Traffic.* 2017;18(6):392–410. doi:10.1111/tra.12481
 164. Schroeder KMS, Agazio A, Strauch PJ, et al. Breaching peripheral tolerance promotes the production of HIV-1-neutralizing antibodies. *J Exp Med.* 2017;214(8):2283–2302. doi:10.1084/jem.20161190
 165. Amini-Bavil-Olyaei S, Choi YJ, Lee JH, et al. The antiviral effector IFITM3 disrupts intracellular cholesterol homeostasis to block viral entry. *Cell Host Microbe.* 2013;13(4):452–464. doi:10.1016/j.chom.2013.03.006
 166. Desai TM, Marin M, Chin CR, Savidis G, Brass AL, Melikyan GB. IFITM3 restricts influenza A virus entry by blocking the formation of fusion pores following virus-endosome hemifusion. *PLoS Pathog.* 2014;10(4):e1004048. doi:10.1371/journal.ppat.1004048
 167. Ayinde D, Bruel T, Cardinaud S, et al. SAMHD1 Limits HIV-1 Antigen Presentation by Monocyte-Derived Dendritic Cells. *J Virol.* 2015;89(14):6994–7006. doi:10.1128/JVI.00069-15
 168. Casartelli N, Sourisseau M, Feldmann J, et al. Tetherin Restricts Productive HIV-1 Cell-to-Cell Transmission. Luban J, ed. *PLoS Pathog.* 2010;6(6):e1000955. doi:10.1371/journal.ppat.1000955
 169. Chauveau L, Donahue DA, Monel B, et al. HIV Fusion in Dendritic Cells Occurs Mainly at the Surface and Is Limited by Low CD4 Levels. *J Virol.* 2017;91(21). doi:10.1128/JVI.01248-17
 170. Lee B, Sharron M, Montaner LJ, Weissman D, Doms RW. 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*. 1999;96(9):5215–5220. doi:10.1073/pnas.96.9.5215
171. Sourisseau M, Sol-Foulon N, Porrot F, Blanchet F, Schwartz O. Inefficient human immunodeficiency virus replication in mobile lymphocytes. *J Virol*. 2007;81(2):1000–1012. doi:10.1128/JVI.01629-06
 172. S R-N, P P, S N, et al. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *N Engl J Med*. 2009;361(23):2209–2220. doi:10.1056/NEJMOA0908492
 173. NL L. Virology. Moving forward in HIV vaccine development. *Science*. 2009;326(5957):1196–1198. doi:10.1126/SCIENCE.1183278
 174. JF F, R C, MG B, MJ T. Interaction between virion-bound host intercellular adhesion molecule-1 and the high-affinity state of lymphocyte function-associated antigen-1 on target cells renders R5 and X4 isolates of human immunodeficiency virus type 1 more refractory to neutralization. *Virology*. 2000;268(2):493–503. doi:10.1006/VIRO.2000.0190
 175. A M, B S, P A, C Z, M M, D G. Vif overcomes the innate antiviral activity of APOBEC3G by promoting its degradation in the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem*. 2004;279(9):7792–7798. doi:10.1074/JBC.M313093200
 176. W P, JE H, PM P. Binding of human immunodeficiency virus type 1 to CD4 and CXCR4 receptors differentially regulates expression of inflammatory genes and activates the MEK/ERK signaling pathway. *J Virol*. 1998;72(8):6406–6413. doi:10.1128/JVI.72.8.6406-6413.1998
 177. D S, R P, J D, E DC. Presence of class II histocompatibility DR proteins on the envelope of human immunodeficiency virus demonstrated by FACS analysis. *Virology*. 1992;189(1):374–376. doi:10.1016/0042-6822(92)90719-6
 178. AA A. Autoimmunity, anergy, lentiviral immunity and disease. *Autoimmun Rev*. 2004;3(7–8):530–540. doi:10.1016/J.AUTREV.2004.07.009
 179. RJ A, J B, G B, M C, E G, S L. Altered frequency and phenotype of CD4+ forkhead box protein 3+ T cells and its association with autoantibody production in human immunodeficiency virus-infected paediatric patients. *Clin Exp Immunol*. 2012;168(2):224–233. doi:10.1111/J.1365-2249.2012.04569.X
 180. D L, F B, F C, AJ H. Hypermutation of HIV-1 DNA in the absence of the Vif protein. *Science*. 2003;300(5622):1112. doi:10.1126/SCIENCE.1083338
 181. V C, T J, E F, JC G, D K. Detection of anti-CD4 autoantibodies in the sera of HIV-infected patients using recombinant soluble CD4 molecules. *AIDS*. 1988;2(5):353–361. doi:10.1097/00002030-198810000-00004
 182. RJ K, R G, KM D, et al. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies in patients with symptomatic HIV infection. *Clin Exp Immunol*. 1992;87(1):24–30. doi:10.1111/J.1365-2249.1992.TB06408.X

183. J L. Viruses as immunological adjuvants in cancer. *Biochim Biophys Acta*. 1974;355(1):49–75. doi:10.1016/0304-419X(74)90007-9
184. Burastero SE, Figini M, Frigerio B, Lusso P, Mollica L, Lopalco L. Protective versus pathogenic anti-CD4 immunity: insights from the study of natural resistance to HIV infection. *J Transl Med*. 2009;7(1):101. doi:10.1186/1479-5876-7-101
185. BURASTERO SE, GAFFI D, LOPALCO L, et al. Autoantibodies to CD4 in HIV Type 1-Exposed Seronegative Individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1996;12(4):273–280. doi:10.1089/aid.1996.12.273
186. Luo Z, Li Z, Martin L, et al. Pathological Role of Anti-CD4 Antibodies in HIV-Infected Immunologic Nonresponders Receiving Virus-Suppressive Antiretroviral Therapy. *J Infect Dis*. 2017;216(1):82–91. doi:10.1093/infdis/jix223
187. Lopalco L. CCR5: From Natural Resistance to a New Anti-HIV Strategy. *Viruses*. 2010;2(2):574–600. doi:10.3390/v2020574
188. Venuti A, Pastori C, Lopalco L. The Role of Natural Antibodies to CC Chemokine Receptor 5 in HIV Infection. *Front Immunol*. 2017;8. doi:10.3389/fimmu.2017.01358
189. Lobo PI, Schlegel KH, Yuan W, Townsend GC, White JA. Inhibition of HIV-1 Infectivity through an Innate Mechanism Involving Naturally Occurring IgM Anti-Leukocyte Autoantibodies. *J Immunol*. 2008;180(3):1769–1779. doi:10.4049/JIMMUNOL.180.3.1769
190. Golding H, Robey FA, Gates FT, et al. Identification of homologous regions in human immunodeficiency virus I gp41 and human MHC class II beta 1 domain. I. Monoclonal antibodies against the gp41-derived peptide and patients' sera react with native HLA class II antigens, suggesting a role for autoimmunity in the pathogenesis of acquired immune deficiency syndrome. *J Exp Med*. 1988;167(3):914–923. Consultado junio 5, 2018. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3127528>
191. Ardman B, Sikorski MA, Settles M, Staunton DE. Human immunodeficiency virus type 1-infected individuals make autoantibodies that bind to CD43 on normal thymic lymphocytes. *J Exp Med*. 1990;172(4):1151–1158. doi:10.1084/jem.172.4.1151
192. Giordanengo V, Limouse M, Desroys du Roure L, et al. Autoantibodies directed against CD43 molecules with an altered glycosylation status on human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected CEM cells are found in all HIV-1+ individuals. *Blood*. 1995;86(6).
193. Stricker K, Knipping E, Böhler T, Benner A, Krammer PH, Debatin K-M. Anti-CD95 (APO-1/Fas) autoantibodies and T cell depletion in human immunodeficiency virus Type 1 (HIV-1)-infected children. *Cell Death Differ*. 1998;5(3):222–230. doi:10.1038/sj.cdd.4400332

194. Lake DF, Schluter SF, Wang E, Bernstein RM, Edmundson AB, Marchalonis JJ. Autoantibodies to the alpha/beta T-cell receptors in human immunodeficiency virus infection: dysregulation and mimicry. *Proc Natl Acad Sci.* 1994;91(23):10849–10853. doi:10.1073/pnas.91.23.10849
195. ORENTAS RJ, HILDRETH JEK. Association of Host Cell Surface Adhesion Receptors and Other Membrane Proteins with HIV and SIV. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1993;9(11):1157–1165. doi:10.1089/aid.1993.9.1157
196. ROSSIO JL, BESS J, HENDERSON LE, CRESSWELL P, ARTHUR LO. HLA Class II on HIV Particles Is Functional in Superantigen Presentation to Human T Cells: Implications for HIV Pathogenesis. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1995;11(12):1433–1439. doi:10.1089/aid.1995.11.1433
197. GUO MML, HILDRETH JEK. HIV Acquires Functional Adhesion Receptors from Host Cells. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1995;11(9):1007–1013. doi:10.1089/aid.1995.11.1007
198. Montefiori DC, Cornell RJ, Zhou JY, Zhou JT, Hirsch VM, Johnson PR. Complement Control Proteins, CD46, CD55, and CD59, as Common Surface Constituents of Human and Simian Immunodeficiency Viruses and Possible Targets for Vaccine Protection. *Virology.* 1994;205(1):82–92. doi:10.1006/VIRO.1994.1622
199. Esser MT, Graham DR, Coren L V, et al. Differential incorporation of CD45, CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), and major histocompatibility complex class I and II molecules into human immunodeficiency virus type 1 virions and microvesicles: implications for viral pathogenesis and immune regulation. *J Virol.* 2001;75(13):6173–6182. doi:10.1128/JVI.75.13.6173-6182.2001
200. Babaahmady K, Bergmeier LA, Lehner T. Combining human antisera to human leukocyte antigens, HIVgp120 and 70 kDa heat shock protein results in broadly neutralizing activity to HIV-1. *AIDS.* 2008;22(11):1267–1276. doi:10.1097/QAD.0b013e328304b3a6
201. Rizzuto CD, Sodroski JG. *Contribution of virion ICAM-1 to human immunodeficiency virus infectivity and sensitivity to neutralization.* Vol 71.; 1997. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=191712&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
202. Hyduk SJ, Cybulsky MI. Alpha 4 integrin signaling activates phosphatidylinositol 3-kinase and stimulates T cell adhesion to intercellular adhesion molecule-1 to a similar extent as CD3, but induces a distinct rearrangement of the actin cytoskeleton. *J Immunol.* 2002;168(2):696–704. doi:10.4049/JIMMUNOL.168.2.696
203. Liu C-C, Leclair P, Yap SQ, Lim CJ. The Membrane-Proximal KXGFFKR Motif of α -Integrin Mediates Chemoresistance. *Mol Cell Biol.* 2013;33(21):4334. doi:10.1128/MCB.00580-13

204. Golding H, Robey FA, Gates FT, et al. Identification of homologous regions in human immunodeficiency virus I gp41 and human MHC class II beta 1 domain. I. Monoclonal antibodies against the gp41-derived peptide and patients' sera react with native HLA class II antigens, suggesting a role for autoimmunity in the pathogenesis of acquired immune deficiency syndrome. *J Exp Med*. 1988;167(3):914–923. doi:10.1084/jem.167.3.914
205. F S, RC W, F D. Autoreactivity in HIV-1 infection: the role of molecular mimicry. *Clin Immunol Immunopathol*. 1995;75(3):197–205. doi:10.1006/CLIN.1995.1072
206. Zhu Z, Qin HR, Chen W, et al. Cross-Reactive HIV-1-Neutralizing Human Monoclonal Antibodies Identified from a Patient with 2F5-Like Antibodies. *J Virol*. 2011;85(21):11401. doi:10.1128/JVI.05312-11
207. Moody MA, Pedroza-Pacheco I, Vandergrift NA, et al. Immune perturbations in HIV-1–infected individuals who make broadly neutralizing antibodies. *Sci Immunol*. 2016;1(1):aag0851–aag0851. doi:10.1126/sciimmunol.aag0851
208. Lobo PI, Schlegel KH, Yuan W, Townsend GC, White JA. Inhibition of HIV-1 Infectivity through an Innate Mechanism Involving Naturally Occurring IgM Anti-Leukocyte Autoantibodies. *J Immunol*. 2008;180(3):1769–1779. doi:10.4049/JIMMUNOL.180.3.1769
209. Carter CJ. Extensive viral mimicry of 22 AIDS-related autoantigens by HIV-1 proteins and pathway analysis of 561 viral/human homologues suggest an initial treatable autoimmune component of AIDS. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2011;63(2):254–268. doi:10.1111/J.1574-695X.2011.00848.X
210. Blumenthal R, Gallo SA, Viard M, Raviv Y, Puri A. Fluorescent lipid probes in the study of viral membrane fusion. *Chem Phys Lipids*. 2002;116(1–2):39–55. doi:10.1016/S0009-3084(02)00019-1
211. Jakubik JJ, Saifuddin M, Takefman DM, Spear GT. Immune Complexes Containing Human Immunodeficiency Virus Type 1 Primary Isolates Bind to Lymphoid Tissue B Lymphocytes and Are Infectious for T Lymphocytes. *J Virol*. 2000;74(1):552. doi:10.1128/JVI.74.1.552-555.2000
212. Lobo PI, Schlegel KH, Vengal J, Okusa MD, Pei H. Naturally occurring IgM anti-leukocyte autoantibodies inhibit T-cell activation and chemotaxis. *J Clin Immunol*. 2010;30(SUPPL. 1). doi:10.1007/s10875-010-9412-7
213. Duht EJ, Mauryt WJ, Folks TM, Faucit AS, Rabsont AB. *Tumor necrosis factor a activates human immunodeficiency virus type 1 through induction of nuclear factor binding to the NF-cB sites in the long terminal repeat (ACH2 T-celi line/provirus/retroviral transcription)*. Vol 86.; 1989. <https://www.pnas.org>
214. Soler GC and. Detección de virus subtipo B del HIV-1 mediante el analisis de restricción de amplicones de gag con la enzima Bst Xi (REA-PCR). En: *1er. Congreso de la Rama de Bioquímica y Biología Molecular de Virus de la Sociedad Mexicana de Bioquímica*. ; 2000:135–154.

215. Huerta L, Gómez-Icazbalceta G, Soto-Ramírez L, et al. Human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) envelope-dependent cell–cell fusion modulation by HIV-positive sera is related to disease progression. *J Gen Virol*. 2005;86(7):1961–1966. doi:10.1099/VIR.0.80635-0
216. N C, VS K, C S, F W-S, J G, S P. Localization of B-cell stimulatory activity of HIV-1 to the carboxyl terminus of gp41. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1990;6(3):299–305. doi:10.1089/AID.1990.6.299
217. AL L, CE M, JA L. An activated CD8+ T cell phenotype correlates with anti-HIV activity and asymptomatic clinical status. *Clin Immunol Immunopathol*. 1993;69(1):106–116. doi:10.1006/CLIN.1993.1157
218. DR B, RC D, RW D, et al. HIV vaccine design and the neutralizing antibody problem. *Nat Immunol*. 2004;5(3):233–236. doi:10.1038/NI0304-233
219. MT R, JM L, RE de G, et al. Viral phenotype and immune response in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis*. 1992;165(3):427–432. doi:10.1093/INFDIS/165.3.427
220. Dorsett BH, Cronin W, Ioachim HL. Presence and Prognostic Significance of Antilymphocyte Antibodies in Symptomatic and Asymptomatic Human Immunodeficiency Virus Infection. *Arch Intern Med*. 1990;150(5):1025–1028. doi:10.1001/ARCHINTE.1990.00390170071016
221. Liu H, Wu X, Newman M, Shaw GM, Hahn BH, Kappes JC. The Vif protein of human and simian immunodeficiency viruses is packaged into virions and associates with viral core structures. *J Virol*. 1995;69(12):7630. Consultado agosto 8, 2021. /pmc/articles/PMC189703/?report=abstract
222. Leonard CK, Spellman MW, Riddle L, Harris RJ, Thomas JN, Gregory TJ. 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 BPOCICAL Chem*. 1990;265(18):10373–10382. doi:10.1016/S0021-9258(18)86956-3
223. JE D, LG L, JJ T, et al. Reactivity of sera from systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome patients with peptides derived from human immunodeficiency virus p24 capsid antigen. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1998;5(2):181–185. doi:10.1128/CDLI.5.2.181-185.1998
224. Cantin R, Fortin JF, Lamontagne G, Tremblay M. The presence of host-derived HLA-DR1 on human immunodeficiency virus type 1 increases viral infectivity. *J Virol*. 1997;71(3):1922–1930. Consultado junio 5, 2018. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9032323>
225. Rizzuto CD, Sodroski JG. Contribution of virion ICAM-1 to human immunodeficiency virus infectivity and sensitivity to neutralization. *J Virol*. 1997;71(6):4847–4851. Consultado junio 5, 2018.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9151884>

226. Babaahmady K, Bergmeier LA, Lehner T. Combining human antisera to human leukocyte antigens, HIVgp120 and 70 kDa heat shock protein results in broadly neutralizing activity to HIV-1. *AIDS*. 2008;22(11):1267–1276. doi:10.1097/QAD.0B013E328304B3A6
227. SJ H, MI C. Alpha 4 integrin signaling activates phosphatidylinositol 3-kinase and stimulates T cell adhesion to intercellular adhesion molecule-1 to a similar extent as CD3, but induces a distinct rearrangement of the actin cytoskeleton. *J Immunol*. 2002;168(2):696–704. doi:10.4049/JIMMUNOL.168.2.696
228. Liu C-C, Leclair P, Yap SQ, Lim CJ. The membrane-proximal KXGFFKR motif of α -integrin mediates chemoresistance. *Mol Cell Biol*. 2013;33(21):4334–4345. doi:10.1128/MCB.00580-13
229. Lake DF, Schluter SF, Wang E, Bernstein RM, Edmundson AB, Marchalonis JJ. Autoantibodies to the alpha/beta T-cell receptors in human immunodeficiency virus infection: dysregulation and mimicry. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(23):10849–10853. Consultado junio 5, 2018. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7971973>
230. Zhu Z, Qin HR, Chen W, et al. Cross-reactive HIV-1-neutralizing human monoclonal antibodies identified from a patient with 2F5-like antibodies. *J Virol*. 2011;85(21):11401–11408. doi:10.1128/JVI.05312-11
231. Root-Bernstein R. Human Immunodeficiency Virus Proteins Mimic Human T Cell Receptors Inducing Cross-Reactive Antibodies. *Int J Mol Sci*. 2017;18(10):2091. doi:10.3390/ijms18102091
232. Venuti A, Pastori C, Lopalco L. The Role of Natural Antibodies to CC Chemokine Receptor 5 in HIV Infection. *Front Immunol*. 2017;8:1358. doi:10.3389/fimmu.2017.01358
233. Lobo PI, Schlegel KH, Yuan W, Townsend GC, White JA. Inhibition of HIV-1 infectivity through an innate mechanism involving naturally occurring IgM anti-leukocyte autoantibodies. *J Immunol*. 2008;180(3):1769–1779. doi:10.4049/JIMMUNOL.180.3.1769
234. LW T, M N, HM L, ME M. Expression of the DAF (CD55) and CD59 antigens during normal hematopoietic cell differentiation. *J Leukoc Biol*. 1992;52(6):652–660. doi:10.1002/JLB.52.6.652
235. AM L, K J, C P, et al. Lck mediates signal transmission from CD59 to the TCR/CD3 pathway in Jurkat T cells. *PLoS One*. 2014;9(1). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0085934
236. Christmas SE, Espinosa CT de la M, Halliday D, Buxton CA, Cummerson JA, Johnson PM. Levels of expression of complement regulatory proteins CD46, CD55 and CD59 on resting and activated human peripheral blood leucocytes.

Immunology. 2006;119(4):522. doi:10.1111/J.1365-2567.2006.02467.X

237. LK S, JA C. Glucocorticoid-induced apoptosis of healthy and malignant lymphocytes. *Prog Brain Res*. 2010;182:1–30. doi:10.1016/S0079-6123(10)82001-1
238. SW C, BD N, ME K, MP G, JL F, JA Z. Impaired response to HAART in HIV-infected individuals with high autonomic nervous system activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(22):12695–12700. doi:10.1073/PNAS.221134198
239. C D, U B, I D, HL F, J B. Plasma epinephrine and norepinephrine concentrations of healthy humans associated with nighttime sleep and morning arousal. *Hypertens (Dallas, Tex 1979)*. 1997;30(1 Pt 1):71–76. doi:10.1161/01.HYP.30.1.71
240. R R-B. Human Immunodeficiency Virus Proteins Mimic Human T Cell Receptors Inducing Cross-Reactive Antibodies. *Int J Mol Sci*. 2017;18(10). doi:10.3390/IJMS18102091
241. Burnie J, Guzzo C. The Incorporation of Host Proteins into the External HIV-1 Envelope. *Viruses*. 2019;11(1). doi:10.3390/v11010085
242. Emu B, Fessel J, Schrader S, et al. Phase 3 Study of Ibalizumab for Multidrug-Resistant HIV-1. *N Engl J Med*. 2018;379(7):645–654. doi:10.1056/NEJMOA1711460

14. APENDICE A

Este apéndice contiene metodologías complementarias que se realizaron para cumplir con los objetivos establecidos en el proyecto.

14.1 Determinación de proteínas por Bradford

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

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

Concentración de proteína ($\mu\text{g/mL}$)	Albumina 1.38 [mg/mL]	H ₂ O (mL)
80	173 μL	2.827
	Albumina 80 $\mu\text{g/mL}$	
64	800 μL	0.200
32	400 μL	0.600
16	200 μL	0.800
8	100 μL	0.900
5	62 μL	0.938
1	12 μL	0.988
0.5	6 μL	0.994
0	-----	1

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

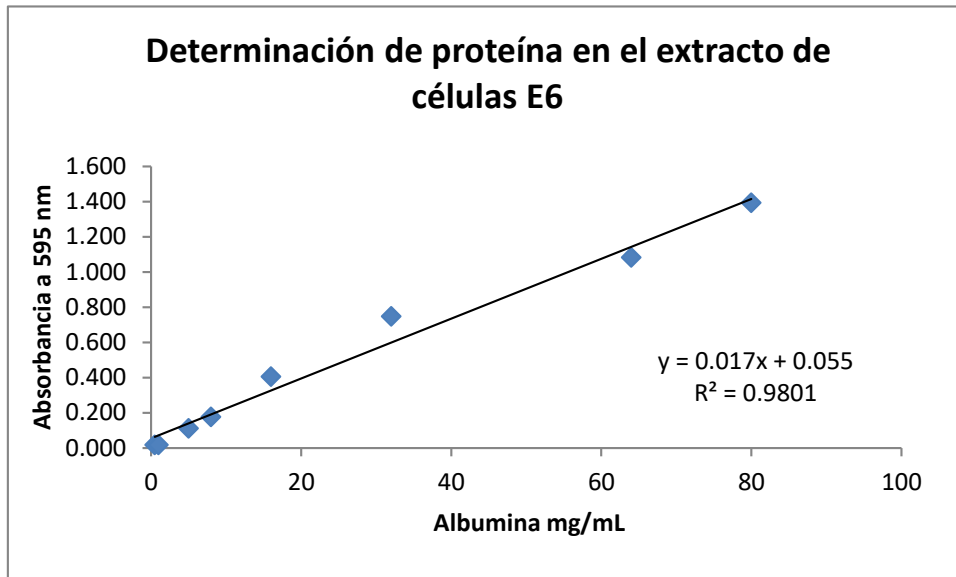


Figura 1. Gráfica que se obtuvo por medio de la curva patrón de Albumina en la determinación de proteínas por Bradford. Con esta gráfica se obtuvo la cantidad de proteína en el extracto.

14.2 Electroforesis 1D

Amortiguador de Electroforesis 1x

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

Amortiguador de carga 2x

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

1. Tratamiento de las muestras para electroforesis

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

2. Cargar las muestras en el gel

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

3. Corrida del gel

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

4. Tinciones de gel empleadas

Azul de Comassie y Comassie G

Una vez que la corrida termino se saca el gel de la cámara y se coloca en una charola con azul de Comassie para teñir las proteínas obtenidas mediante la separación por peso molecular, se dejó incubar toda la noche a temperatura ambiente y con agitación constante. Posterior a la incubación se retiró el azul Comassie de la charola y se agregó la solución para desteñir el gel, esta solución consiste de metanol al 40% y Ácido acético al 10%, se incubo por 3 horas a temperatura ambiente con agitación constante. La solución para desteñir fue retirada y se realizaron dos lavados con agua destilada y finalmente el gel fue escaneado.

Sulfato de zinc-imidazol

Reactivos

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

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

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

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

-Se escaneo el gel contra un fondo oscuro.

Nitrato de plata

Soluciones:

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

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

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

-Se realizaron 3 lavados de 5 minutos con agua desionizada

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

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

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

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

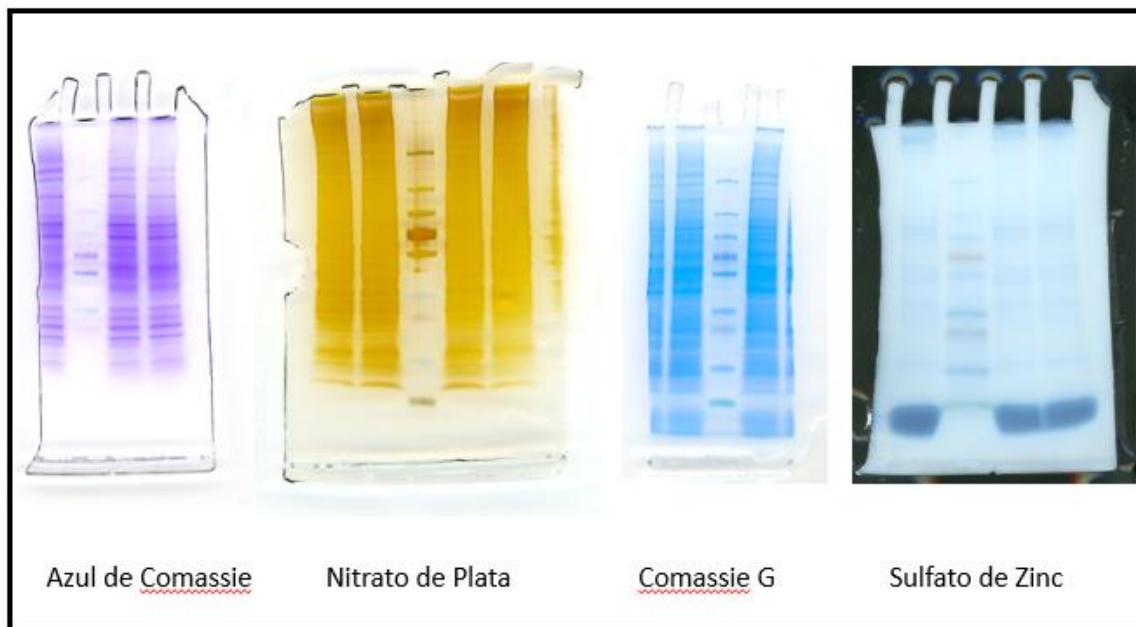


Figura 2. Gel que muestra el perfil de proteínas dentro del extracto obtenido de la purificación de proteínas de membrana con las diferentes tinciones empleadas para optar por aquella con mayor sensibilidad.

14.3 Western Blot

Soluciones:

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

1. Electroforesis

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

2. Transferencia

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

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

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

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

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

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

3. Incubación

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

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

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

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

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

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

4. Revelado

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

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

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

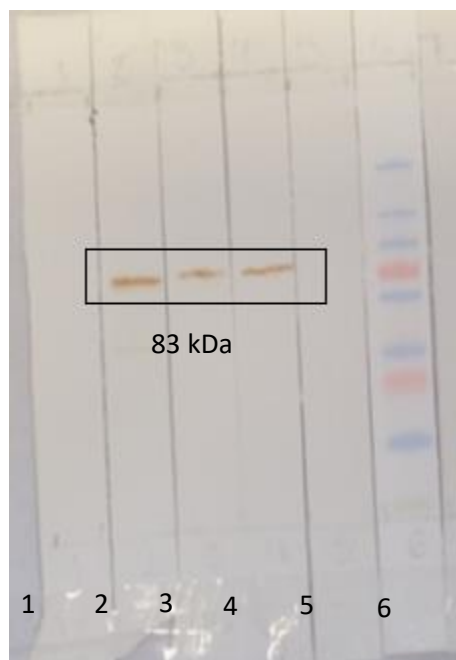


Figura 3. Imagen de la membrana de nitrocelulosa, donde se observa el resultado obtenido para el WB del anticuerpo anti-CXCR4. 1) control negativo solo tenía H₂O, 2) dilución de anti-CXCR4 1:250, 3) dilución de anti-CXCR4 1:1000, 4) dilución de anti-CXCR4 1:2000, 5) control del anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa para descartar un falso positivo y 6) marcador de peso molecular.

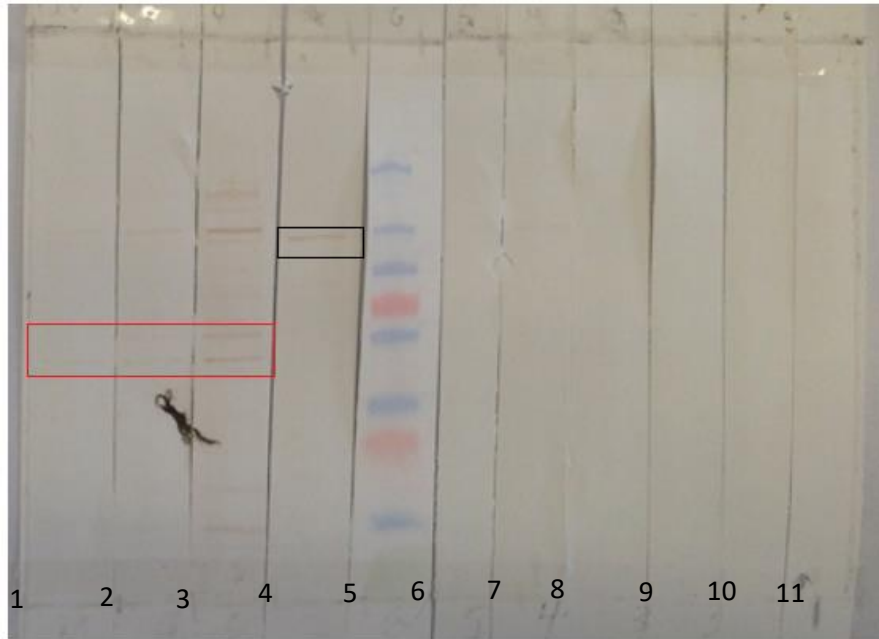


Figura 4. Imagen de la membrana de nitrocelulosa, donde se observa el resultado obtenido para el WB del anticuerpo anti-CD4 y anti-ICAM-1. 1) Dilución de anti-CD4 1:1000, 2) dilución de anti-CD4 1:500, 3) dilución de anti-CD4 1:170. Por parte del anticuerpo anti-ICAM-1, se muestran 4) dilución de anti-ICAM-1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

14.4 Purificación de Anticuerpos, Kit Proteus MIDI (PUR0-12 de BIO RAD)

Preparación de pools:

Pool 1. VIH-: 30 sueros, volumen final de 2 mL (125 μ L por suero)

Pool 2. VIH+ ALAr-IF (-): 16 sueros (11, 13, 15, 19, 21, 23, 24, 25, 27, 29, 30, 37, 41, 45, 48, 49), volumen final de 2 mL (125 μ L por suero).

Pool 3. VIH+ ALAr-IF (+): 13 sueros (1, 2, 3, 5, 6, 10, 14, 20, 22, 26, 31, 33, 39), bajo pegado de IgG (0.2-3.2%) y 9 sueros (8, 28, 32, 34, 38, 40, 46, 47, 50), alto pegado de IgG (5.0-99.7%)

volumen final de 2.750 mL (125 μ L por suero), para la columna con sefarosa solo se emplearon 2mL.

-Filtrar cada pool usando filtros de 0.2 μm para remoción de partículas que puedan obstaculizar el flujo por la columna.

1. Deslipidización de las muestras

-Se agregó a cada muestra 40 μL de dextran sulfato (10%) y 1 mL de CaCl_2 (1M). Fueron mezclados por 15 min.

-Se centrifugaron a 10,000 g/10 min, descartar el precipitado. El sobrenadante fue almacenado y se intercambió la muestra en TBS usando ultrafiltración (40 min 4000g).

2. Colocación del inserto de resina

-Se colocó el inserto de resina pre-empaquetada con Proteína-G recombinante inmovilizada en la columna de centrifugación con la ayuda de la herramienta de inserción.

-Se pre-equilibraron las columnas con 10 mL de amortiguador de unión G (pH 7.4), centrifugar a 500 g/3 min.

3. Clarificación de las muestras

-Cada muestra fue filtrada usando filtros de 0.2 μm inmediatamente antes de cargar las muestras en las columnas.

4. Cargar la muestra

-Se Diluye la muestra previamente filtrada relación 1:1 (v/v) con amortiguador de unión G (pH 7.4), mezclando invirtiendo el tubo tapado 3-4 veces

-Se transfirió la muestra a la columna y se centrifugó (150 g/30 min).

*Si queda algún residuo de muestra por encima del inserto, aumentar el tiempo o velocidad de centrifugación.

5. Lavado

-Realizar lavados a la columna de centrifugación 2 veces con 10mL de amortiguador de unión G (pH 7.4) para remover “contaminantes” no unidos por centrifugación (500 g/3 min). El lavado contenía componentes diferentes a las inmunoglobulinas.

6. Elución de Anticuerpos

-Se separó la IgG unida a la columna con 10 mL de amortiguador de elución B2 (pH 2.5) directamente en un nuevo tubo que contenga 1.3 mL de amortiguador de neutralización C (pH 9.0) para llevar el pH de la muestra a aproximadamente 7.5, centrifugar la columna a 500 g/3 min.

*Se giró el tubo para asegurar la mezcla completa del eluido final con el amortiguador de neutralización.

*Se repitió el paso de elución dos veces. NO JUNTAR LAS DOS FRACCIONES ELUIDAS SI SE QUIERE RECUPERAR EL ANTICUERPO PURIFICADO CONCENTRADO

7. Desalación y Concentración del Anticuerpo (AC)

-Se eliminó la sal y se concentró el AC utilizando tubos de ultrafiltración Ultra MWCO 30 kDa.

-Se agregó 0.05-0.2% (p/v) de azida de sodio para almacenar los anticuerpos a 2-8°C.

*Si los AC se deben almacenar por tiempo prolongado almacenar con glicerol (10-50%) a -20°C en alícuotas pequeñas.

Amortiguadores y soluciones requeridas para los protocolos

Protocolo para purificación de Anticuerpos, Kit Proteus MIDI

-Dextran sulfato (10%)

-CaCl₂ (1M)

-TBS

-Amortiguador de unión G (Fosfato de sodio 0.1 M, NaCl 0.15 M, pH 7.4)

-Amortiguador de elución B2 (Amortiguador de glicina/HCl 0.2 M, pH 2.5)

En el kit de purificación de IgG

-Amortiguador de neutralización C (Tris/HCl 1M, pH 9.0).

-0.05-0.2% (p/v) de azida de sodio

-Azida de sodio (0.1%)

14.5 Separación de PBMCs por gradiente de Ficoll

1. Se colocaron 10 ml de Ficoll-Paque Plus en dos tubos BD Falcon de 50 ml.
 2. En otros dos tubos de 50 ml se colocaron 20 ml de PBS PH 7.4 estéril.
 3. Se mantuvo el buffy coat en un vaso precipitados durante todo el procedimiento para mayor seguridad. Se realizó la limpieza del buffy coat, antes de abrirlo. Una vez abierto se resuspendió la sangre (15 veces) con una pipeta de 25ml.
 4. Se tomaron 10 ml de sangre y se colocaron en el tubo de 50 ml con PBS PH 7.4 (dilución 2:1) y se resuspendió la solución (15 veces).
 5. Se tomaron 30 ml de mezcla (sangre más PBS PH 7.4) y se colocaron en el tubo con Ficoll, se agregó muy lentamente, acomodando el tubo en posición casi horizontal y la punta de la pipeta pegada a la pared del tubo, de manera que quedaron 2 fases. El tubo se fue verticalizando conforme se llenaba. Realizó por duplicado a partir del paso 4 al 5 por duplicado.
 6. Se centrifugaron los tubos con Ficoll a 400xg por 30 min a 20°C, sin freno ni aceleración (0).
 7. Mientras se estaban centrifugando, se prepararon 2 tubos de 50 ml con 20 ml de PBS PH 7.4.
 8. Se extrajeron los tubos de la centrifuga con cuidado y se revisó el anillo, para corroborar que se formó adecuadamente y proseguir.
 9. Se retiró el plasma con una pipeta de 5 ml y fue desechado. Se recuperó el anillo de PBMC con micropipeta de 1 ml y se colocó en el tubo de 50 ml con 20 ml de PBS PH 7.4 y se completó el volumen a 45 ml con PBS PH 7.4.
 10. Se resuspendió (10 veces) y se centrifugó a 100 xg por 10 min. Con freno y aceleración normal (9).
 11. Se decantó el sobrenadante y se agregaron 45 ml de PBS PH 7.4, se resuspendió adecuadamente y se centrifugó a 100 xg por 10 min (segundo lavado).
- Nota:** bajarle la temperatura a la centrífuga a 4°C.
12. Se agregaron a cada tubo 10 ml de PBS PH 7.4 y se resuspendieron.

PBMCs totales:

Nota: se necesitan como mínimo un total de 120×10^6 para proseguir a la purificación de células CD4+.

13. Se juntaron las suspensiones celulares y se centrifugaron a 300 xg por 10 min. a 4°C. Se decantó el sobrenadante.
14. Mientras se estaban centrifugando, se metió una columna LS al congelador y se preparó el amortiguador MACS.

PURIFICACIÓN DE LINFOCITOS T CD4+ POR COLUMNA MAGNÉTICA

1. Se programó la centrifuga para mantenerla a 4°C.
2. Se preparó el amortiguador MACS con AutoMACS Rinsing Solution y BSA en una dilución 1:20 y mantuvo a 2-8°C:

Se preparó 35 ml en un tubo de 50 ml:

AutoMACS: 33.25 ml

BSA: 1.75 ml

3. Se resuspendió el pellet en 40 ul de Amortiguador MACS por cada 10^7 células
4. Adicionar 10 ul de Naive CD4+ T Cell Biotin-Antibody Cocktail II, human por cada 10^7 células, Se mezcló bien e incubó 10 min en el refrigerador (4°C).
5. Adicionar 30 ul de Amortiguador MACS por cada 10^7 células
6. Adicionar 20 ul de Naive CD4+ T Cell MicroBead Cocktail II, human: *Anti-Biotin Microbead* por cada 10^7 células.
7. Se incubaron 15 min en el refrigerador (4°C).
8. Se agregó 1 ml del Amortiguador MACS por 10^7 y centrifugar a 300 xg por 10 min a 4°C.
9. Se montó la columna magnética y se preparó una gradilla con un tubo de 15 ml para desechos del lavado de la columna.

10. Se humedeció la columna con 3 ml de Amortiguador MACS. Se esperó a que se filtrara por completo. Se colocó un nuevo tubo de 15 ml para recuperar las células CD4+.

Nota: al finalizar la centrifugación subió la temperatura de la centrífuga a 20°C.

11. Se decantó y aspiró completamente el sobrenadante. Se resuspendió el pellet en 500 ul por cada 10^8 células y se pasó la suspensión celular por la columna.

12. Se agregaron 3 ml de Amortiguador MACS a la columna para enjuagar. Se repitió un total de 3 veces.

13. Se centrifugó el tubo a 300 xg por 5 min a 20°C y se desechó el sobrenadante. Se resuspendió el pellet en 1 ml de medio RPMI.



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

MÉXICO, D.F., A 22 DE ABRIL DE 2014.

DRA. MÓNICA VIVEROS ROGEL
INVESTIGADORA PRINCIPAL
DEPTO. DE INFECTOLOGÍA
PRESENTE

Por este medio, nos permitimos informarle que el Comité de Investigación, así como el Comité de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, ha revisado y aprobado el Protocolo de Investigación Clínica, titulado:

"Identificación de antígenos asociados con la producción de anticuerpos inhibidores de la fusión de membranas inducida por el VIH-I"
Versión 11 abril, 2014.

REF. 1192

Así mismo se revisó y aprobó la siguiente documentación:

Carta de consentimiento informado versión 1.2 de fecha 11 abril, 2014.

La vigencia de la aprobación termina el día 22 de abril de 2015. Si la duración del estudio es mayor tendrá que solicitar la re-aprobación anual del mismo, informando sobre los avances y resultados parciales de su investigación e incluyendo todos los datos sobresalientes y conclusiones.

Sin más por el momento quedamos de usted.


DR. CARLOS A. AGUILAR SALINAS
PRESIDENTE
COMITÉ DE INVESTIGACIÓN

ATENCIÓN,

INCMNSZ
22 ABR 2014
COMISIÓN DE ÉTICA
EN INVESTIGACIÓN


DR. ARTURO GALINDO
PRESIDENTE
COMITÉ DE ÉTICA EN I

c-cp. Dr. Rubén Lisker V. Director de Investigación.

1 000

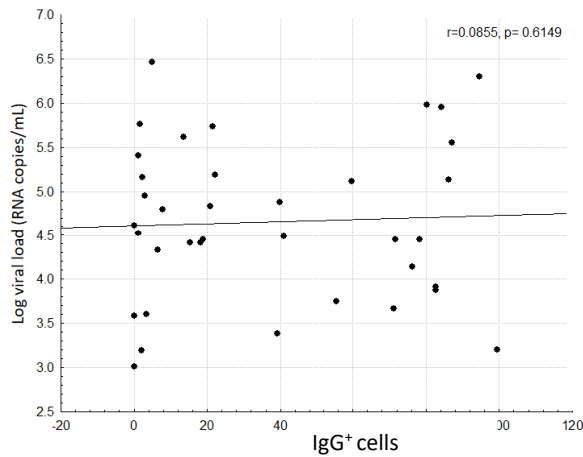
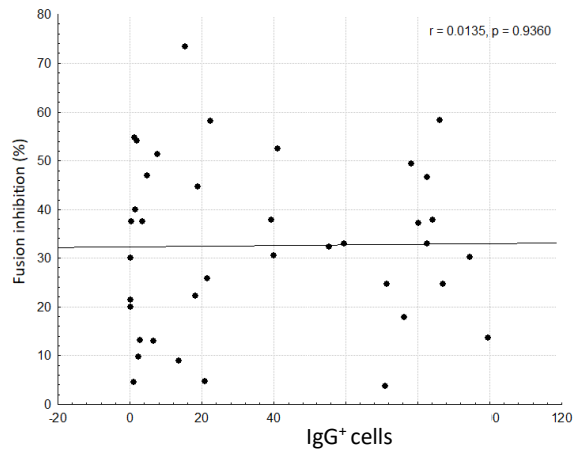
el.

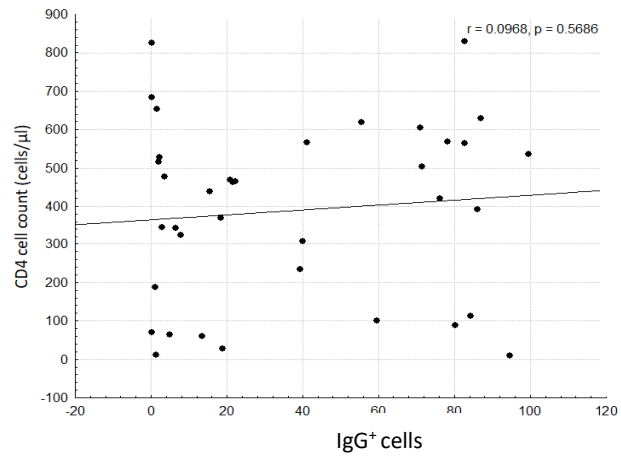
130

APENDICE B

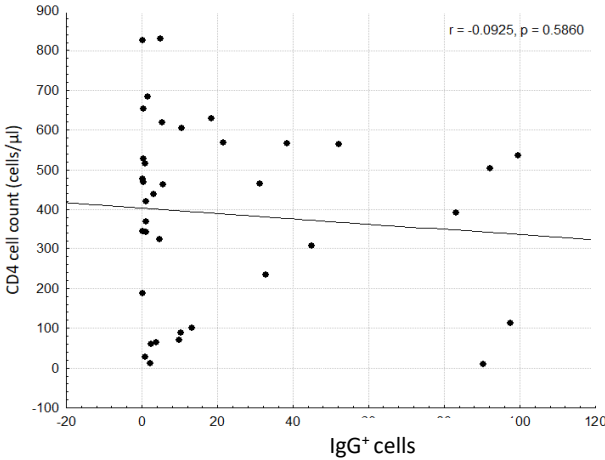
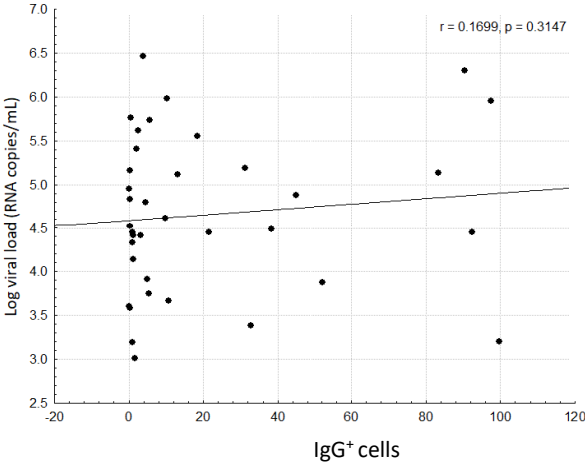
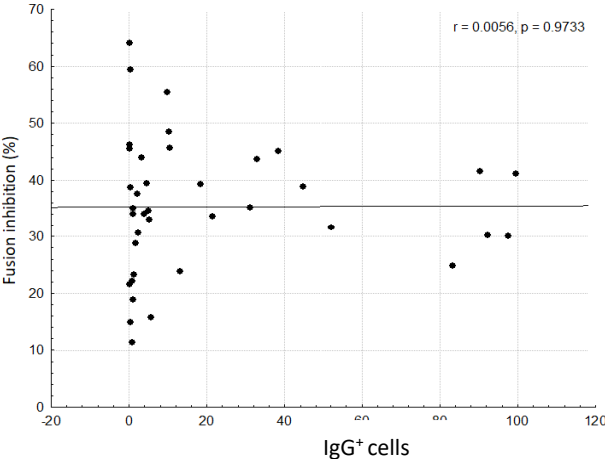
Supplementary data 1. Lack of relationship of total ALA levels, as measured on Jurkat CD4+ (A) or CD4-negative cells (B), with fusion inhibition, viral load or CD4 cell count.

A. Relationship between the percentage of **CD4+ Jurkat cells** that bound IgG and the fusion inhibition activity of the complete serum, the patient's viral load in plasma, and the CD4+ T cell count.





B. Relationship between the percentage of Jurkat CD4-negative cells that bound IgG with the fusion inhibition activity of the complete serum, the patient's viral load in plasma and the CD4⁺ T cell count.



Suppl. Mat. 2. ANA-staining patterns for sera from 30 healthy control individuals and 38 HIV+ patients.

Abbreviations:

NFS: nuclear fine speckled (AC-4); NCS: nuclear coarse speckled (AC-5); Cit: cytoplasmic (AC-19); Mit: mitochondrial (AMA; AC-21); FL: fibrillar (AC-16); Gol: Golgi-like (AC-22); Centri: centriolar (AC-24).

AC: anti-cell, according to the international consensus on ANA patterns [1].

Reference values (Mexican population) [2]	
NFS or NCS	<1:160
Nuc	<1:40
Cit	<1:80
FI	<1:160
Mit (AMA)	<1:160
Gol	<1:80

¹ Report of the first international consensus on standardized nomenclature of antinuclear antibody HEp-2 cell patterns 2014–2015. Chan EKL, et al. *Front. Immunol.* 2015; 6: 412.

² Antinuclear Antibodies: A marker associated with steroid dependence in patients with ulcerative colitis. Barahona-Garrido J, et al. *Inflamm Bowel Dis.* 2009; 15: 1039-43.

Summary

Pattern	Healthy donors		HIV+ patients	
Nuclear	2/30	6.6%	17/38	44.7%
Cytoplasmic	2/30	6.6%	9/38	23.7%
Fibrillar	0	0	7/38	18.4%
Centriol.	1/30	3.3%	0	0
Total	3/30	10%	20/38	52%

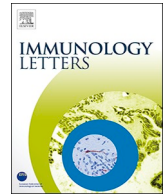
Results

Healthy	Nuclear staining	dicotomic result	Cytoplasmic staining	dicotomic result
Control 1	NFS 1:80	neg	-	neg
Control 2	NCS 1:160	neg	Cit 1:80	neg
Control 3	NCS 1:80	neg	Cit 1:40	neg
Control 4	NFS 1:160	neg	Cit 1:40	neg
Control 5	NFS 1:160	neg	-	neg
Control 6	NFS 1:160	neg	Cit 1:40	neg

Control 7	NFS 1:80	neg	-	neg
Control 8	NFS 1:80	neg	Mit 1:40	neg
Control 9	NFS 1:80	neg	Cit 1:40	neg
Control 10	NFS 1:160	neg	Cit 1:80	neg
Control 11	NFS 1:160	neg	Cit 1:40	neg
Control 12	NCS 1:160	neg	Cit 1:40	neg
Control 13	NCS 1:160	neg	Cit 1:80, Mit 1:80	neg
Control 14	NCS 1:320	pos	Cit 1:40	neg
Control 15	NCS 1:80	neg	-	neg
Control 16	NCS 1:40	neg	-	neg
Control 17	NCS 1:40	neg	-	neg
Control 18	Nuc 1:160	pos	Cit 1:320	pos
Control 19	NCS 1:80	neg	-	neg
Control 20	NCS 1:80	neg	-	neg
Control 21	NFS 1:80	neg	-	neg
Control 25	NFS 1:160	neg	Cit 1:80	neg
Control 26	NFS 1:160	neg	-	neg
Control 27	NCS 1:160	neg	-	neg
Control 28	NFS 1:160; Centri 1:80	neg	-	neg
Control 29	NFS 1:160	neg	FI 1:80	neg
Control 30	NFS 1:160	neg	Cit 1:80	neg
Control 31	NFS 1:160	neg	-	neg
Control 32	NFS 1:160	neg	Cit 1:40	neg
Control 33	NCS 1:80	neg	Mit 1:40	neg
Patients			-	neg
VIH 1	NCS 1:160	neg	Cit 1:80	neg
VIH 2	NFS 1:320	pos	Cit 1:320, FI 1:160	pos/neg
VIH 3	NFS 1:640	pos	Cit 1:320, FI 1:320	pos/pos
VIH 5	NCS 1:80	neg	Cit 1:40	neg
VIH 6	NFS 1:320	pos	Cit 1:160	pos
VIH 8	NFS 1:160	neg	Cit 1:40	neg
VIH 10	NFS 1:160	neg	Cit 1:80	neg
VIH 11	NCS 1:80	neg	Cit 1:80, Gol 1:80	neg/neg
VIH 13	NFS 1:320	pos	Cit 1:160, FI 1:160	neg/neg
VIH 14	NFS 1:160	neg	Cit 1:80, FI 1:80	neg/neg
VIH 15	NFS 1:320	pos	Cit 1:160, FI 1:80	neg/neg
VIH 19	NFS 1:80	neg	Cit 1:40	neg
VIH 20	NFS 1:320	pos	Cit 1:80	neg
VIH 21	NFS 1:640	pos	Cit 1:640	pos
VIH 22	NFS 1:160	neg	Cit 1:40	neg

VIH 23	NFS 1:160	neg	Cit 1:80	neg
VIH 24	Hom 1:160	pos	Cit 1:40	neg
VIH 25	NFS 1:160	neg	Cit 1:40	neg
VIH 26	NFS 1:160	neg	FI 1:320	pos
VIH 27	NFS 1:320	pos	Cit 1:160	neg
VIH 28	NFS 1:320	pos	-	neg
VIH 29	NCS 1:80	neg	Cit 1:40	neg
VIH 30	NCS 1:160	neg	Cit 1:80, FI 1:80	neg/neg
VIH 31	NFS 1:160	neg	-	neg
VIH 32	NFS 1:80	neg	-	neg
VIH 33	NFS 1:160	neg	Cit 1:40	neg
VIH 34	NFS 1:320	pos	FI 1:160	neg
VIH 37	NCS 1:160	neg	Cit 1:80, FI 1:320	neg/pos
VIH 38	NFS 1:160	neg	-	neg
VIH 39	NCS 1:80	neg	FI 1:320	pos
VIH 40	NFS 1:160	neg	Cit 1:80, FI 1:160	neg/neg
VIH 41	NFS 1:320	pos	Cit 1:160	neg
VIH 45	NCS 1:640	pos	Cit 1:320, FI 1:160	pos/neg
VIH 46	NFS 1:320	pos	-	neg
VIH 47	NFS 1:160	neg	Cit 1:80	neg
VIH 48	NCS 1:640	pos	Cit 1:160, FI 1:320	neg/pos
VIH 49	NFS 1:640	pos	Cit 1:320, FI 1:160	pos/neg
VIH 50	NFS 1:320	pos	Cit 1:160	neg

APENDICE C
PUBLICACIONES



Inhibition of HIV-1 envelope-dependent membrane fusion by serum antilymphocyte autoantibodies is associated with low plasma viral load

Mirna B. Ruiz-Rivera^{a,1}, Guillermo Gómez-Icazbalceta^{a,1}, Marcela Vélez-Alavez^a,
Mónica Viveros-Rogel^b, Santiago Pérez-Patrigéon^b, Edmundo Lamoyi^a, Luis Llorente^c,
Carlos A. Núñez-Álvarez^c, Leonor Huerta^{a,*}

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

^b Department of Infectious Diseases, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Ciudad de México, Mexico

^c Department of Immunology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Ciudad de México, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Antilymphocyte antibodies
Autoantibodies
HIV
Viral load
IgG
Cell-cell fusion
HIV-infected patients

ABSTRACT

The HIV-1 envelope protein (Env) mediates the membrane fusion process allowing virus entry to target cells and the efficiency to induce membrane fusion is an important determinant of HIV-1 pathogenicity. In addition to virus receptors, other adhesion/signaling molecules on infected and target cells and virus particles can enhance fusion. The presence of antilymphocyte autoantibodies (ALA) in HIV patients' serum suggests that they may contribute to the inhibition of Env-mediated membrane fusion. Here, sera from 38 HIV-1 infected treatment-naïve men and 30 healthy donors were analyzed for the presence of IgG and IgM able to bind to CD4-negative Jurkat cells. The use of CD4-negative cells precluded the binding of virus-antibody immune complexes, and allowed detection of ALA different from anti-CD4 antibodies. IgG and IgM antibodies binding to Jurkat CD4-negative cells was detected in 74% and 84% of HIV-positive sera, respectively. Then, the activity of sera on fusion of CD4⁺ with HIV Env⁺ Jurkat cells was determined before and after their adsorption on CD4-negative Jurkat cells to remove ALA. Sera inhibited fusion at variable extents, and inhibitory activity decreased in 58% of serum samples after adsorption, indicating that ALA contributed to fusion inhibition in these sera (herein called fusion inhibitory ALA). The contribution of ALA to fusion inhibition in individual sera was highly variable, with an average of 33%. IgG purified from a pool of HIV⁺ sera inhibited fusion of primary CD4 T lymphocytes with Jurkat Env⁺, and adsorption of IgG on CD4-negative Jurkat cells diminished the fusion inhibitory activity. Thus, the inhibitory activity of sera was related to IgG ALA. Our observations suggest that fusion inhibitory ALA other than anti-CD4 antibodies may contribute significantly to the inhibition of Env-mediated cell-cell fusion. Fusion inhibitory ALA, but not total ALA levels, associated with low plasma viral loads, suggesting that specific ALA may participate in virus containment by inhibiting virus-cell fusion in a significant fraction of HIV-infected patients.

1. Introduction

An increased ability to induce membrane fusion during the entry of HIV-1 into target cells is a feature of highly pathogenic virus strains. The interaction of HIV-1 Env with the CD4 receptor and a co-receptor molecule induces the activation of the gp41 Env subunit, which directs the membrane fusion process [1]. Virus-cell fusion is involved in infection of target cells by cell-free viral particles and in virus cell-to-cell transmission, a highly efficient route of virus spread between cells that

is considered an important mode of dissemination [2–6]. In addition, Env fusion capability relates to the induction of multinucleated cells through cell-cell fusion. Multinucleated cells have the potential to express anomalous activation [7], to transfer virus to surrounding cells [8] and to induce lymph node and brain pathologies [9–13]. Finally, fusogenicity is critical for the gp41-mediated apoptosis of bystander cells [14–17]. An increased ability of patient's viruses to induce cell-cell fusion *in vitro* is related to disease progression [16,18–20], perhaps reflecting a higher *in vivo* occurrence of the events described before.

* Corresponding author at: Department of Immunology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, CP 04510, CDMX, Mexico.

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

¹ These authors contributed equally to this work and are both considered as first authors.

<https://doi.org/10.1016/j.imllet.2019.05.002>

Received 17 December 2018; Received in revised form 12 April 2019; Accepted 2 May 2019

Available online 04 May 2019

0165-2478/ © 2019 Published by Elsevier B.V. on behalf of European Federation of Immunological Societies.

In addition to CD4 and coreceptors (mainly CCR5 and CXCR4), other cellular surface molecules increase the efficiency of HIV-1-induced membrane fusion. A variety of adhesion and activation molecules are incorporated into the virus membrane during the assembly and budding of virions and have been implicated in the entry process [21–24]. Adhesion molecules favor the close interaction between infected and uninfected cells during the formation of syncytia and during the cell-to-cell transmission of virus [2,25,26]. Other molecules, such as $\alpha 4\beta 7$ integrin, support the access of the virus to CD4 on T memory cells during infection of the gut-associated lymphoid tissue [27,28]. Thus, the involvement of a variety of cell surface molecules in the fusion process implies that in addition to anti-Env antibodies, antilymphocyte autoantibodies (ALA) may participate in the modulation of fusion.

Although the presence of ALA during HIV infection has been described for a long time [29,30], their effect on Env-dependent membrane fusion is scarcely considered in the analysis of the humoral immune response during HIV-1 infection. The effect of ALA on Env-dependent membrane fusion is worth investigating since autoimmune events are related with the induction of antibodies able to neutralize a variety of HIV strains in humans [31,32] and breaking peripheral tolerance promotes the production of HIV-1-neutralizing autoantibodies in mice [33]. Anti-CD4 antibodies have been frequently reported in HIV-1-infected individuals, although it is not clear if they contribute significantly to virus containment [34], and a pathological role for these antibodies has been suggested [35]. However, antibodies against a variety of other lymphocyte surface molecules have been detected in HIV-infected individuals [36–42]. Moreover, it has been reported that healthy and HIV-1 infected individuals contain IgM ALA able to bind CD4, CXCR4 and CCR5, and inhibit HIV infectivity as well as syncytia formation [43]. Thus, evaluation of the effect of ALA on the virus envelope-mediated fusion process may contribute to the understanding of the role of the humoral immune response in virus control.

Here, we aimed to assess the contribution of ALA to the inhibition of HIV-1 Env-mediated lymphocyte membrane fusion by testing the effect of sera from ART-naïve HIV-1 infected men on a flow cytometry HIV-1-envelope-dependent Jurkat cell-cell fusion assay [44,45]. Jurkat cells are a well-characterized model that has been widely used for T cell signaling and HIV infection studies [46]. Previously, the effect of sera from a different cohort of 49 HIV patients was tested on this assay [47], showing that sera inhibited fusion at variable extents. Inhibition of fusion correlated with the asymptomatic stage of human HIV infection, whereas sera that had no effect or enhanced fusion were associated with AIDS. Removal of IgG or IgM from sera reduced or eliminated inhibition and enhancing activities, respectively. The inhibitory effect of IgG on fusion could be achieved by antibodies against the HIV envelope proteins and/or against lymphocyte antigens. In this work, we determined the effect of sera on fusion before and after the adsorption on CD4-negative Jurkat cells to remove ALA. Adsorption on CD4-negative cells prevented the elimination of other serum components that may interfere with fusion, such as CD4-binding virus particles and virus-IgG immune complexes. This procedure does not remove anti-CD4 antibodies. Thus, any change in the activity of the adsorbed sera on fusion should reflect the removal of ALA (except anti-CD4 antibodies). We determined if the presence of fusion inhibitory ALA (detected as a diminished fusion inhibition activity of sera after adsorption on Jurkat CD4-negative cells) correlated with total serum IgG and IgM ALA levels, as well as with the patient's viral load and CD4 cell count.

2. Methods

2.1. Study subjects

Patients analyzed attended the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán in Mexico City from May 2014 to August 2016 (Table 1). Antiretroviral treatment-naïve subjects without opportunistic infections, neoplastic illness or wasting syndrome were

Table 1
HIV-1 patients and healthy controls characteristics.

HIV patients	n = 38	range
Age (years)	35 ^a	18–60
Male	100%	
ART naïve	100%	
Viral load (copies/ml)	272,479	1,560–2,908,948
CD4 ⁺ T-cell count (cells/ μ l)	562	12–829
Healthy donors	n = 30	
Age	31.5	18–45
Male	100%	

^a Averages or percentage values are shown.

included after having signed an informed consent form. Healthy donors were negative for HBV, HCV, VDRL, HIV-1 and HIV-2. The study was approved by the Research Ethics Committee of Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

2.2. Cells

The Jurkat cell line HXBc2(4) transfected with the *env* and *rev* genes from the HIV-1 HXBc2 strain [48] and the non-transfected Jurkat T CD4⁺ cell line (E6-1) were obtained through the AIDS Research and Reference Reagent Program (AIDSRRRP). Jurkat clone D1.1, lacking CD4 expression (CD4-negative cells), was obtained from ATCC. HXBc2(4) cells were grown in RPMI medium (Gibco BRL, MD) containing 10% FBS (RPMI-10), 200 μ g/ml of G418, 200 μ g/ml of hygromycin, and 1 μ g/ml of tetracycline. CD4⁺ and CD4-negative Jurkat cells were grown in L-glutamine-rich RPMI-10 containing penicillin/streptomycin. Primary CD4 T lymphocytes were purified by negative selection using antibodies coupled to magnetic beads (CD4⁺ T cells Isolation Kit human, Miltenyi Biotec, Auburn, CA), as indicated by the manufacturer. Cells were maintained in RPMI medium containing 10% FBS and used for fusion experiments the next day.

2.3. Binding of IgG and IgM from HIV-positive patients to Jurkat cells

Jurkat cells (5×10^5) were incubated with HIV⁺ or control serum at a final dilution of 1/10 in PBS containing 0.1% azide and 2% FBS for 40 min at 4 °C. After washing twice with PBS-azide, FITC-anti-human IgG or APC-anti-human IgM antibodies (HP6017 and MHM-88 clones, respectively, Biolegend, CA) were added and incubated for 45 min on ice. After washing, the cells were fixed with 4% PFA in PBS for 20 min, washed and resuspended in 1 mL of PBS before FACS analyses using an Attune Cytometer System (Applied Biosystems, CA). A serum sample was considered positive for IgG or IgM binding to Jurkat cells when the percentage of stained cells was above the mean plus two standard deviations of the figures obtained for sera from healthy controls.

2.4. Adsorption of serum on CD4-negative T cells

One hundred and fifty microliters of each serum were incubated with 7.5×10^6 CD4⁻ Jurkat cells in 600 μ l of serum-free AIM-V media and mixed for 40 min at 4 °C using a rotating mixer. The cells were pelleted by centrifugation, and the adsorbed sera were recovered. Pooled sera and purified IgG were adsorbed in the same conditions.

2.5. Effect of sera on fusion assay

Labeling of cells and cytofluorometric fusion assay were performed as previously described [44,45]. Jurkat CD4⁺ or primary CD4 T cells were stained with the lipophilic red fluorescent DiI dye (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate), and Env⁺ Jurkat cells with the green fluorescent DiO dye (3,3'-dioctadecyloxycarbocyanine perchlorate) (Molecular Probes, Eugene, OR). Labeled

cells were cocultured for 5 h, at 37 °C with 5% CO₂ in 96-well plates. Double fluorescent cells were quantified in 10,000 events with an Attune Cytometer System (Applied Biosystems, California) and Attune Cytometry software version 1.2.5 (Applied Biosystems). Loosely aggregated cells were dissociated by gently pipetting immediately before analysis. To test the effect of sera on fusion, DiI-labeled CD4⁺ cells were preincubated with either adsorbed or non-adsorbed sera or IgG from patients or healthy donors control sera at the final dilution indicated in 100 µl of serum-free medium (AIM-V medium, Gibco BRL) for 40 min at 37 °C with 5% CO₂ in 96-well plates. Then, 2 × 10⁵ DiO-labeled Env⁺ cells were added to the wells and gently mixed in a total volume of 200 µl. Co-cultures were incubated for 5 h at 37 °C in 5% CO₂. The assays were performed in duplicate. The cells were collected from the plates, washed with 2 ml of PBS and resuspended in 300 µl of 2% paraformaldehyde in PBS. We performed flow cytometry immediately after fixation. Fusion activity (FA) was defined as 1-(F_i/F₀) × 100, where F₀ and F_i are the fusion values obtained in the absence and presence of serum, respectively.

2.6. Purification of IgG from HIV⁺ sera

IgG was purified from HIV⁺ and healthy serum pools by G protein affinity chromatography on protein G-Sepharose (Proteus Protein G Midi spin column Kit, BioRad, Kidlington, UK), as indicated by the manufacturer.

2.7. Antinuclear antibody (ANA) determination

Antinuclear antibodies (ANA-IgG) were detected in serum samples by indirect immunofluorescence using the HEP-2 cell line as indicated (INOVA Diagnostics, CA) and AutoCyte Image Titer software (Tripath Imaging Inc, NC). The results were positive if any pattern was above the values obtained for healthy Mexican individuals, according to the international consensus on ANA patterns (ICAP) [49].

2.8. Statistical analysis

Comparisons between groups were performed by unpaired U-Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests. Spearman's ranked correlation coefficients were used to determine the correlation between variables. Statistical analyses were performed using Statistica v.7 software.

3. Results

3.1. Inhibition of HIV envelope-dependent cell fusion by sera from HIV-positive individuals

Sera from 38 HIV-positive treatment-naïve and 30 healthy men were tested for activity in an HIV-1-envelope dependent cell-cell fusion assay between CD4⁺ and Env⁺ Jurkat cells. The accurate quantification of fusion events by the flow cytometry assay was previously established [44,50].

Jurkat CD4⁺ cells were pre-incubated with sera for 40 min at 37 °C before coculture with Jurkat Env⁺ cells, and fusion was analyzed after 5 h. HIV-positive sera inhibited fusion to variable extents, and inhibition was dilution-dependent, with mean fusion-inhibiting activities of 32.3% ± 2.8, 23.3% ± 2.9, and 14.9% ± 3.2 for the 1:10, 1:20 and 1:50 dilutions, respectively (Fig. 1a). A high correlation between the inhibition values obtained with the three dilutions of sera was observed (Fig. 1b) HIV-negative sera caused small levels of inhibition or enhanced fusion (Fig. 1a). The fusion-inhibiting activity of HIV-positive sera did not associate with either patient viral load or CD4⁺ T cell count (*p* = 0.3). Interference with fusion could be due to anti-Env antibodies, ALA, virus particles or virus-antibody immune complexes.

3.2. Binding of serum antibodies to Jurkat CD4⁺ cells

Inhibition of the Env-mediated fusion of Jurkat cells by HIV-positive sera may be partially due to the binding of antilymphocyte antibodies (ALA) to the cell membrane. Fig. 2 shows the percentages of stained Jurkat cells by IgM and IgG from individual sera of HIV patients and HIV-negative controls. Eighteen out of 19 (94%) and 32/38 (84%) of HIV⁺ patient sera were positive for IgM and IgG antibodies binding to Jurkat cells, respectively. Intriguingly, the binding of IgG from HIV patients to CD4⁺ Jurkat cells revealed two main groups of sera that showed high and low binding (Fig. 2b). However, there was no correlation between the level of IgG binding to CD4⁺ Jurkat cells and the fusion-inhibiting activity of the sera, the viral load or the CD4 T cell count (Supplementary Data 1A in Research Data section). It should be noted that the secondary anti-human Fc antibodies used for detection might have also bound virus-antibody immune complexes bound to CD4 [51,52] in addition to bona fide ALA, and thus the assessment of ALA may be overestimated. We also observed IgM able to bind Jurkat cells in sera from many HIV-negative individuals, while this is not the case for IgG. This is in agreement with previous observations of a high frequency of natural IgM-ALA in healthy donors and proposed an anti-inflammatory and anti-HIV role for this immunoglobulins [43,53].

3.3. Effect of serum adsorption on CD4-negative Jurkat cells on HIV envelope-mediated cell fusion

To assess the contribution of HIV patient serum ALA to the inhibition of Env-dependent cell-cell fusion, sera were adsorbed on CD4-negative Jurkat cells and their effect on fusion was compared with their activity before adsorption, tested in parallel. Adsorption on CD4-negative cells avoided the removal of CD4-binding virus particles, virus-antibody immune complexes [51,52] and anti-CD4 antibodies from the sera. Thus, any change in the activity of adsorbed sera on fusion should reflect the removal of ALA other than anti-CD4 antibodies.

IgG and IgM binding to Jurkat CD4-negative cells was detected in 28/38 (74%) and 32/38 (84%) of HIV-positive sera, respectively, and adsorption significantly removed this activity (Fig. 3). Levels of Ig binding to CD4-negative cells were lower than to CD4⁺ cells, likely reflecting the detection of anti-CD4 antibodies and virus-antibody immune complexes in the latter. We did not observe a correlation between the level of IgG binding to CD4-negative Jurkat cells and the fusion-inhibiting activity of sera, the viral load or the CD4 T cell count (Supplementary Data 1B in Research Data section). The change of fusion inhibitory activity after adsorption is quite clear for most sera even though ALA are still detected in some samples after their thorough adsorption with CD4-negative cells. This remaining antibodies may be a reflection of a very variable concentration of ALA in sera from HIV patients.

Adsorption decreased the fusion inhibition activity of HIV⁺ sera, whereas it had a negligible effect on the activity of HIV-negative sera (Fig. 4a). Fig. 4b shows the effect of adsorption of HIV⁺ sera grouped according to their activity on fusion inhibition. Twelve HIV⁺ sera (31.6%) had increased fusion inhibition capacity after adsorption, with a mean 31% difference respective to the non-adsorbed sample (Fig. 4c). The opposite effect was observed for 22 sera (58%), which had decreased fusion inhibition capacity respective to the non-adsorbed sample (Fig. 4b). A mean decrease of 33% of the fusion inhibition activity was removed by adsorption (Fig. 4c). Thereafter, the term "fusion inhibitory ALA" will be used when a decrease of the fusion inhibitory capacity of sera was observed after having adsorbed the serum on Jurkat CD4-negative cells. Finally, adsorption did not modify the effect of the sera in 10.5% of cases (Fig. 4b). These observations indicate that serum ALA other than anti-CD4 antibodies contribute significantly to inhibition of HIV Env-mediated membrane fusion.

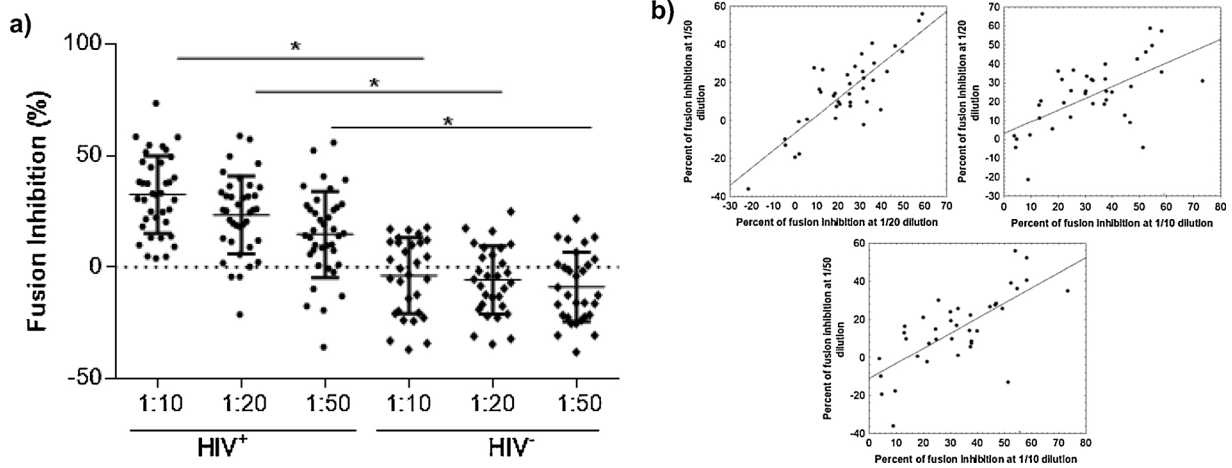


Fig. 1. (a) Activity of sera from 38 HIV + individuals and 30 healthy donors on the fusion of Env + with CD4+ Jurkat cells. CD4+ Jurkat cells were pre-incubated with the indicated dilutions of sera before the addition of Jurkat Env + cells. Coculture and flow cytometric analyses of fusion were performed as described in the Materials and Methods section. The percentage of fusion inhibition was calculated respective to the fusion obtained in the absence of serum. Positive and negative values indicate fusion inhibition and enhancement, respectively. Means are indicated. *p < 0.05. (b) Correlation between the effect of different dilutions of HIV-positive sera on Env-mediated cell-cell fusion. p < .005 for each plot.

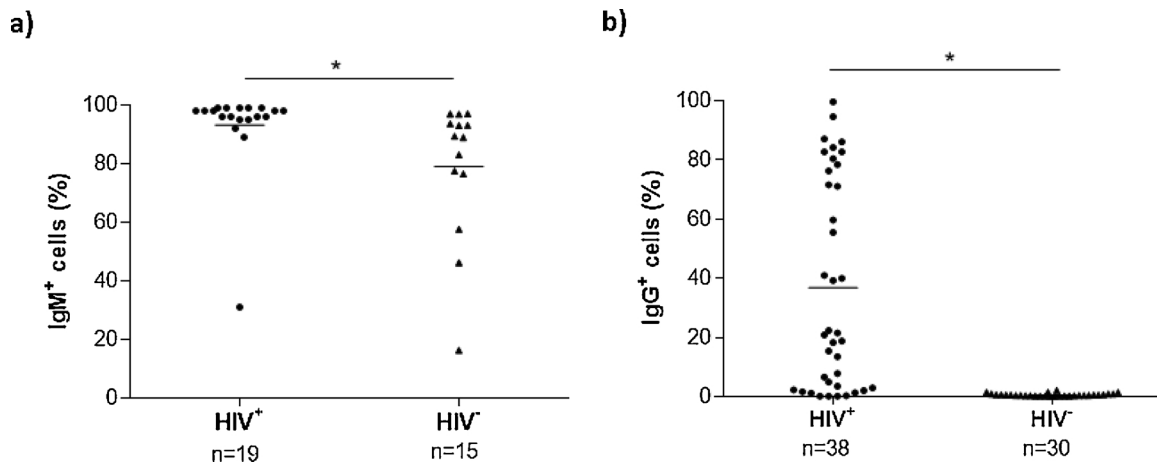


Fig. 2. Binding of serum IgM (a) and IgG (b) from HIV + individuals and HIV - healthy donors to the surface of Jurkat CD4 + T cells. Cells were incubated with sera and then with an anti-IgG or an anti-IgM fluorochrome-conjugated secondary antibody. The cells were analyzed by flow cytometry as described in the Materials and Methods section. Means are indicated. *p < 0.05.

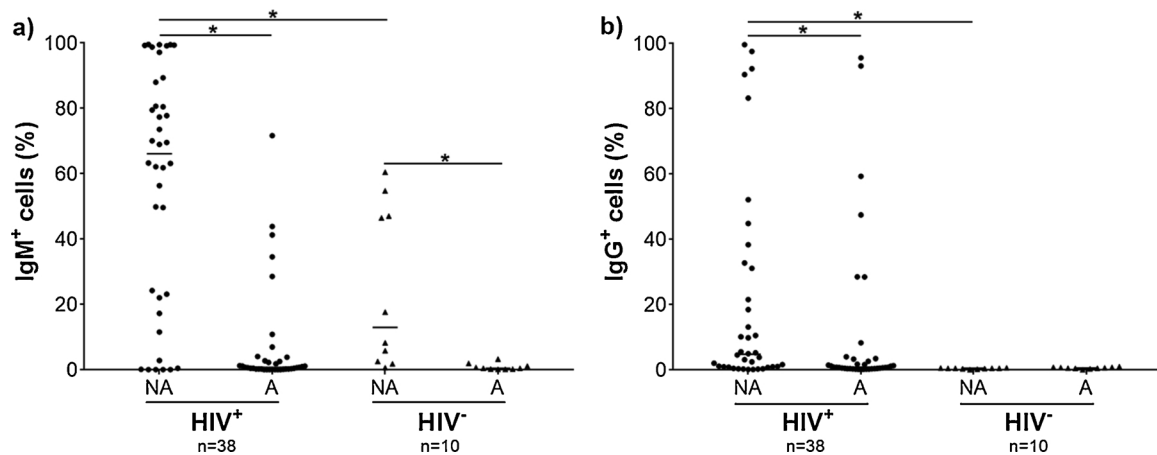


Fig. 3. Binding of IgM (a) and IgG (b) from HIV + and HIV - non-adsorbed (NA) and adsorbed (A) sera on CD4-negative Jurkat cells. Binding was determined as described in Fig. 2. Medians are indicated. *P < 0.05.

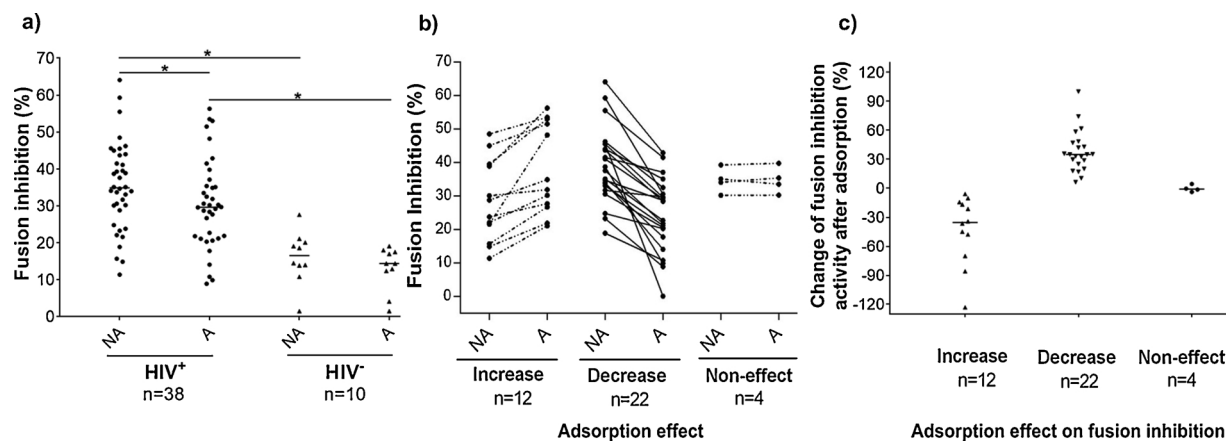


Fig. 4. Activity of non-adsorbed (NA) and adsorbed (A) sera on the fusion of Env⁺ with CD4⁺ Jurkat cells. Adsorption was performed on CD4-negative Jurkat cells. Sera activity on fusion was assayed as described in Fig. 1, using a 1:10 serum dilution. The percentage of fusion inhibition was calculated relative to the fusion obtained in the absence of serum. **a)** The effect of adsorption of sera from 38 HIV⁺ and 10 HIV⁻ individuals on fusion inhibition. **b)** HIV⁺ sera are grouped according with the effect of adsorption on fusion inhibition: increase, decrease, and non-effect. **c)** ALA fusion-inhibiting activity (as measured as the percent of change of fusion inhibition after adsorption) for the groups shown in b. Medians are indicated. *p < 0.05.

3.4. Relationship between levels of cell fusion inhibitory ALA and viral load

Table 2 shows that sera containing fusion inhibitory ALA resulted in greater inhibition of fusion by the complete (non-adsorbed) sera than those that did not contain this activity. Accordingly, a significant correlation between the effect of ALA on fusion and that of the complete (non-adsorbed) sera was obtained (Fig. 5a). Table 2 also shows that levels of binding of IgG and IgM to Jurkat CD4-negative cells were not different between sera containing and not containing fusion inhibitory ALA, so that the total levels of ALA measured by binding to cells were not indicative of their ability to inhibit fusion. Importantly, viral load was significantly lower in sera containing fusion inhibitory ALA (Table 2). Accordingly, we observed a weak trend associating the level of fusion inhibitory ALA, as measured by the change in fusion inhibition after adsorption, and the plasma viral load (p = 0.091) the (Fig. 5b).

There is an association between immune dysfunction in patients with HIV and AIDS and the development of autoimmune events [54]. Early reports indicated the detection of antinuclear antibodies (ANAs) in 0–23% [55,56] or more [57] of HIV-infected individuals, and they were not always associated with clinical autoimmune disease [56]. We detected ANAs in 52% of HIV⁺ patients and 10% of healthy individuals (Supplementary Data 2 in Research Data section). ANAs were detected in 50% of sera containing fusion inhibitory ALA, suggesting that ANAs does not correlate with fusion inhibition.

3.5. Effect of IgG adsorption on CD4-negative Jurkat cells on the HIV envelope-mediated fusion of primary CD4 T lymphocytes

In order to be sure that IgG participates in inhibition of fusion, IgG was purified from a pool of 9 HIV⁺ samples showing both a high inhibitory fusion activity and IgG binding to Jurkat CD4-negative cells. IgG was also purified from a pool of 10 sera from healthy donors as control. The effect of pooled sera and purified IgG on cell fusion was tested before and after their adsorption on Jurkat CD4-negative cells. In addition, the effect of the pooled sera of IgG on the fusion of primary CD4 T lymphocytes with Jurkat Env⁺ cells was also determined.

Fig. 6 shows that both sera and IgG purified from HIV⁺ individuals inhibited fusion of Jurkat Env⁺ with Jurkat CD4⁺ or with primary CD4 T lymphocytes. Adsorption of sera or IgG on CD4-negative Jurkat cells diminished the corresponding fusion inhibitory activity. Adsorption of sera or IgG from healthy donors had no effect. Thus, the inhibitory activity of serum was related to IgG ALA.

4. Discussion

In agreement with previous observations on a different cohort of HIV patients [47] most of HIV⁺ sera inhibited the Env-mediated cell-cell fusion with variable efficiency (Fig. 1a). Herein we show that part of this effect may have occurred through the participation of ALA other than anti-CD4 antibodies (Fig. 4). Serum from a substantial fraction of HIV patients (approximately 60%) contained fusion-inhibiting activity that could be removed by adsorption of the sera on CD4-negative Jurkat cells (Fig. 4b). The change in fusion inhibition after the adsorption of sera on CD4-negative Jurkat cells is compatible with the presence of ALA able to recognize specific lymphocyte surface molecules modulating fusion. The extent of contribution of CD4-negative Jurkat-binding serum components to the effect of sera on fusion was highly variable, with an average of 33% (Fig. 4c). In a previous report we showed that fusion inhibition by sera from HIV patients was reduced or eliminated by removal of total IgG using protein G beads [47]. Here we showed that IgG purified from fusion inhibitory sera also inhibited fusion, and that removal of ALA from IgG diminished this effect (Fig. 6). Thus, the inhibitory activity of serum ALA was related to IgG. While adsorption of sera on Jurkat cells does not provide direct evidence that IgG ALA are the only responsible for the change in fusion inhibition, the previous work and present evidence indicates that it plays a major role in fusion inhibition.

Viral load was significantly lower in sera containing than in sera not containing CD4-negative Jurkat-binding serum components (Table 2) and, accordingly, a trend associating the level of fusion inhibitory ALA and the plasma viral load was observed (Fig. 5b). This observations suggest that ALA other than anti-CD4 antibodies are capable of inhibiting fusion and may contribute to virus containment *in vivo*, perhaps by blocking the formation of syncytia and the cell-to-cell transmission of virus, in addition to the neutralization of cell-free particles. Identification of cognate cell membrane antigens with the ability to modulate these processes are necessary steps for the full characterization of this activity.

Total IgG or IgM ALA levels did not relate to the ability of sera to inhibit fusion or to viral load, suggesting that fusion inhibition involves the activity of ALA with particular specificities. It is possible that the relative abundance of specific fusion-inhibiting ALA is variable between patients and does not necessary correlate with the level of total ALA produced. Instead, the level of change in fusion inhibitory activity after adsorption, presumably reflecting levels of those ALA that effectively inhibit fusion, correlated with the fusion inhibitory activity of the complete sera and with viral load. We propose that the adsorption assay

Table 2
Comparison between sera from HIV⁺ patients containing and non-containing fusion inhibitory ALA^a.

Fusion inhibitory ALA	Fusion inhibition by unadsorbed serum (%)	IgG ⁺ cells (%)	IgG ⁺ cells (MFI)	IgM ⁺ cells (%)	IgM ⁺ cells (MFI)	Viral load (RNA copies/mL)	Viral load range (RNA copies/mL)	CD4 ⁺ cells (cells/ μ L)	CD4 ⁺ cells range (cells/ μ L)
Yes (n = 22)	39.2 \pm 2.3	20.9 \pm 8.0	10,258 \pm 1,789	53.9 \pm 7.3	10,378 \pm 2,723	174,183 \pm 93,093	1,560 – 201,2391	344 \pm 57	28–684
No (n = 16)	29.9 \pm 2.8	20.7 \pm 6.7	11,447 \pm 2,167	60.7 \pm 9.9	32,396 \pm 10,874	416,647 \pm 19,5571	28,201 – 2,908,948	420 \pm 51	10–829
<i>P</i>	0.028	0.77	0.94	0.62	0.60	0.042		0.39	

MFI: mean fluorescence intensity.
Significant *p* values are shown in bold characters.
^a Average \pm SE is shown.

allows the overall detection of fusion inhibitory ALA, which relative abundance may not be related to the total content of ALA in the serum.

The participation of ALA in the inhibition of Env-induced cell-cell fusion may represent a relevant consideration in the assessment of the antiviral humoral immune response during HIV-1 infection. Inhibition of fusion by ALA may be produced by blocking of CXCR4 and CCR5 co-receptors [43]. As our assay involves the CXCR4 coreceptor, antibodies against this molecule may contribute to the inhibition of syncytia formation. This would agree with previous results indicating high levels of anti-CXCR4 antibodies in sera of HIV patients [43]. Likewise, blocking of cellular adhesion molecules [21,22,58], or of components that facilitate the Env-CD4 interaction, such as α 4 β 7 integrin, which is expressed by Jurkat cells [59,60] may also participate in fusion inhibition. Fusion inhibitory ALA may also include antibodies able to bind the viral envelope protein, since cross-reactions between neutralizing Env and self epitopes have been consistently reported [40,41,61–63]. Finally, induction of signaling processes that modify the permissiveness of the cell membrane for fusion by ALA, as shown for anti-CCR5 auto-antibodies [37], cannot be excluded. On the other hand, enhancing of the inhibitory activity in 31.6% of sera after adsorption suggests the removal of ALA with the ability to prevent the binding of fusion inhibitory serum components, such as anti-Env antibodies, virus particles, virus-antibody immune complexes, or anti-CD4 antibodies [43].

Other serum components might participate in the effect of sera on fusion, and incubation at 37 °C in the presence of sera may allow cytotoxic reactions due to serum complement or hormones. However, CD4⁺ T lymphocytes and Jurkat cells are not lysed by complement due to the presence of complement control proteins on their cell membrane [64–66]. Cell death after the incubation period, which can be observed in flow cytometry SSC-H vs. FSC-H dot plots, was not observed during our analyses (data not shown). The cortisol hormone can reach a double-fold concentration in the serum of HIV patients compared with healthy individuals [67], and these concentrations are able to induce lymphocyte apoptosis [68]. However, fusion inhibition was observed using diluted serum, and thus the concentration of cortisol was considerably reduced. Likewise, the concentration of other hormones that can influence the expression of HIV-1 co-receptors *in vitro* [69] is considerably greater than that present in blood [70].

To our knowledge, this is the first study showing an association of IgG fusion inhibitory ALA with low plasma viral loads. Identification of the cell membrane antigens involved by proteomic methods and their mechanism of action deserves further study.

Competing interests

None declared.

Ethical approval

Research Ethics Committee of Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México. REF. 1192.

Acknowledgements

Jurkat HXBc2(4) cells (J. Sodroski) were obtained through the AIDS Research and Reference Reagent Program, NIH. Mirna Berenice Ruiz-Rivera is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México 595771. Sera from healthy individuals was obtained through the Servicio de Medicina Transfusional from Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. We thank the LabNaCit-UNAM (CONACYT) for technical support in the acquisition of flow cytometry samples. This work was supported by CONACYT (grant CB2014/238931 to LH) and Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, Dirección General de Asuntos

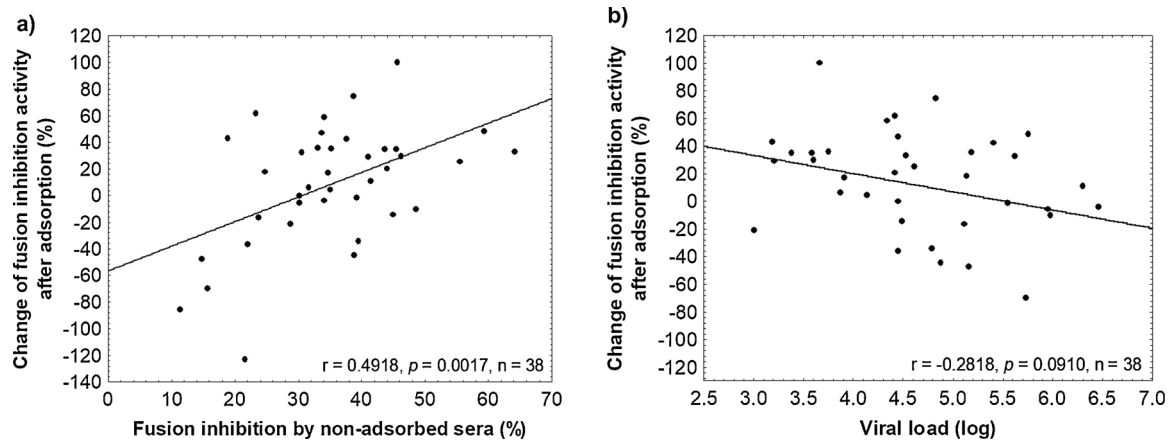


Fig. 5. a) Correlation between sera ALA fusion-inhibiting activity (measured as the percentage of change of fusion inhibition activity after adsorption) and fusion inhibition by non-adsorbed sera. b) Correlation between serum ALA fusion-inhibiting activity and viral load.

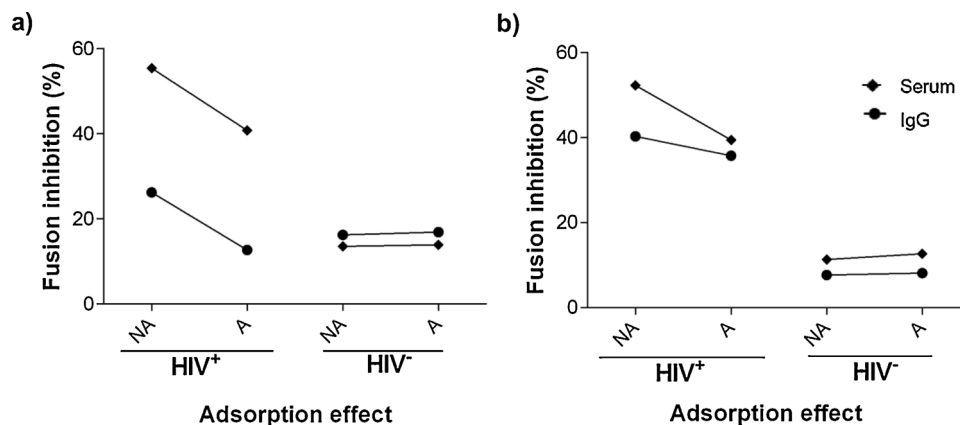


Fig. 6. Effect of sera and purified IgG on fusion of Jurkat Env⁺ cells with a) Jurkat CD4⁺ cells (E6-1 cells) and b) primary CD4 T lymphocytes. clear A diminished inhibition of fusion by sera or IgG after adsorption on Jurkat CD4-negative cells is shown. (NA) non-adsorbed, (A) adsorbed sample.

del Personal Académico, UNAM (grant UNAM-PAPIIT IN211716 to LH). We thank M.Sc. Luis León Fuentes for assistance in collection of blood from HIV patients.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <https://doi.org/10.1016/j.iml.2019.05.002>.

References

- Blumenthal, S. Durell, M. Viard, HIV entry and envelope glycoprotein-mediated fusion, *J. Biol. Chem.* 287 (49) (2012) 40841–40849.
- C. Jolly, I. Mitar, Q.J. Sattentau, Adhesion molecule interactions facilitate human immunodeficiency virus type 1-induced virological synapse formation between T cells, *J. Virol.* 81 (24) (2007) 13916–13921.
- D.M. Phillips, The role of cell-to-cell transmission in HIV infection, *AIDS* 8 (6) (1994) 719–731.
- P. Chen, W. Hubner, M.A. Spinelli, B.K. Chen, Predominant mode of human immunodeficiency virus transfer between T cells is mediated by sustained Env-dependent neutralization-resistant virological synapses, *J. Virol.* 81 (22) (2007) 12582–12595.
- H. Li, C. Zony, P. Chen, B.K. Chen, Reduced potency and incomplete neutralization of broadly neutralizing antibodies against cell-to-cell transmission of HIV-1 with transmitted founder envs, *J. Virol.* 91 (9) (2017).
- J.H. Wang, C. Kwas, L. Wu, Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), but not ICAM-2 and -3, is important for dendritic cell-mediated human immunodeficiency virus type 1 transmission, *J. Virol.* 83 (9) (2009) 4195–4204.
- D. Martínez-Mendez, E. Rivera-Toledo, E. Ortega, I. Licona-Limon, L. Huerta, Monocyte-lymphocyte fusion induced by the HIV-1 envelope generates functional heterokaryons with an activated monocyte-like phenotype, *Exp. Cell Res.* 352 (1) (2017) 9–19.
- M. Symeonides, T.T. Murooka, L.N. Bellify, N.H. Roy, T.R. Mempel, M. Thali, HIV-1 induced small T cell syncytia can transfer virus particles to target cells through transient contacts, *Viruses* 7 (12) (2015) 6590–6603.
- R. Nardacci, A. Antinori, G. Kroemer, M. Piacentini, Cell death mechanisms in HIV-associated dementia: the involvement of syncytia, *Cell Death Differ.* 12 (Suppl. 1) (2005) 855–858.
- I. Teo, C. Veryard, H. Barnes, S.F. An, M. Jones, P.L. Lantos, P. Luthert, S. Shaunak, Circular forms of unintegrated human immunodeficiency virus type 1 DNA and high levels of viral protein expression: association with dementia and multinucleated giant cells in the brains of patients with AIDS, *J. Virol.* 71 (4) (1997) 2928–2933.
- 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 (1) (1997) 89–96.
- J.M. Orenstein, S.M. Wahl, The macrophage origin of the HIV-expressing multinucleated giant cells in hyperplastic tonsils and adenoids, *Ultrastruct. Pathol.* 23 (2) (1999) 79–91.
- 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 (5258) (1996) 115–117.
- G.H. Holm, C. Zhang, P.R. Gorry, K. Peden, D. Schols, E. De Clercq, D. Gabuzda, Apoptosis of bystander T cells induced by human immunodeficiency virus type 1 with increased envelope/receptor affinity and coreceptor binding site exposure, *J. Virol.* 78 (9) (2004) 4541–4551.
- A. Joshi, A.M. Nyakeriga, R. Ravi, H. Garg, HIV ENV glycoprotein-mediated bystander apoptosis depends on expression of the CCR5 co-receptor at the cell surface and ENV fusogenic activity, *J. Biol. Chem.* 286 (42) (2011) 36404–36413.
- J. Wade, J. Sterjovski, L. Gray, M. Roche, L. Chiavaroli, A. Ellett, M.R. Jakobsen, D. Cowley, F. Pereira Cda, N. Saksena, B. Wang, D.F. Purcell, I. Karlsson, E.M. Fenyo, M. Churchill, P.R. Gorry, Enhanced CD4⁺ cellular apoptosis by CCR5-restricted HIV-1 envelope glycoprotein variants from patients with progressive HIV-1 infection, *Virology* 396 (2) (2010) 246–255.
- H. Garg, A. Joshi, C. Ye, P. Shankar, N. Manjunath, Single amino acid change in gp41 region of HIV-1 alters bystander apoptosis and CD4 decline in humanized mice, *Virol. J.* 8 (2011) 34.
- H. Blaak, A.B. van't Wout, M. Brouwer, B. Hooibrink, E. Hovenkamp, H. Schuitemaker, In vivo HIV-1 infection of CD45RA(+)CD4(+) T cells is established primarily by syncytium-inducing variants and correlates with the rate of CD4(+) T cell decline, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (3) (2000) 1269–1274.
- J. Sterjovski, M.J. Churchill, A. Ellett, L.R. Gray, M.J. Roche, R.L. Dunfee,

- D.F. Purcell, N. Saksena, B. Wang, S. Sonza, S.L. Wesselingh, I. Karlsson, E.M. Fenyo, D. Gabuzda, A.L. Cunningham, P.R. Gorry, *Asn* 362 in gp120 contributes to enhanced fusogenicity by CCR5-restricted HIV-1 envelope glycoprotein variants from patients with AIDS, *Retrovirology* 4 (2007) 89.
- [20] R.M. Scoggins, J.R. Taylor Jr, J. Patrie, A.B. van't Wout, H. Schuitemaker, D. Camerini, Pathogenesis of primary R5 human immunodeficiency virus type 1 clones in SCID-hu mice, *J. Virol.* 74 (7) (2000) 3205–3216.
- [21] R. Cantin, J.F. Fortin, G. Lamontagne, M. Tremblay, The presence of host-derived HLA-DR1 on human immunodeficiency virus type 1 increases viral infectivity, *J. Virol.* 71 (3) (1997) 1922–1930.
- [22] C.D. Rizzuto, J.G. Sodroski, Contribution of virion ICAM-1 to human immunodeficiency virus infectivity and sensitivity to neutralization, *J. Virol.* 71 (6) (1997) 4847–4851.
- [23] E. Chertova, O. Chertov, L.V. Coren, J.D. Roser, C.M. Trubey, J.W. Bess Jr, R.C. Sowder 2nd, E. Barsov, B.L. Hood, R.J. Fisher, K. Nagashima, T.P. Conrads, T.D. Veenstra, J.D. Lifson, D.E. Ott, Proteomic and biochemical analysis of purified human immunodeficiency virus type 1 produced from infected monocyte-derived macrophages, *J. Virol.* 80 (18) (2006) 9039–9052.
- [24] C.E. Hioe, L. Bastiani, J.E. Hildreth, S. Zolla-Pazner, Role of cellular adhesion molecules in HIV type 1 infection and their impact on virus neutralization, *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 14 (Suppl. 3) (1998) S247–54.
- [25] S. Starling, C. Jolly, LFA-1 engagement triggers T cell polarization at the HIV-1 virological synapse, *J. Virol.* 90 (21) (2016) 9841–9854.
- [26] J.E. Hildreth, R.J. Orentas, Involvement of a leukocyte adhesion receptor (LFA-1) in HIV-induced syncytium formation, *Science* 244 (4908) (1989) 1075–1078.
- [27] C. Cicala, E. Martinelli, J.P. McNally, D.J. Goode, R. Gopaul, J. Hiatt, K. Jelacic, S. Kottitil, K. Macleod, A. O'Shea, N. Patel, D. Van Ryk, D. Wei, M. Pascuccio, L. Yi, L. McKinnon, P. Izulla, J. Kimani, R. Kaul, A.S. Fauci, J. Arthos, The integrin $\alpha 4\beta 7$ forms a complex with cell-surface CD4 and defines a T-cell subset that is highly susceptible to infection by HIV-1, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106 (49) (2009) 20877–20882.
- [28] C. Guzzo, D. Ichikawa, C. Park, D. Phillips, Q. Liu, P. Zhang, A. Kwon, H. Miao, J. Lu, C. Rehm, J. Arthos, C. Cicala, M.S. Cohen, A.S. Fauci, J.H. Kehrl, P. Lusso, Virion incorporation of integrin $\alpha 4\beta 7$ facilitates HIV-1 infection and intestinal homing, *Sci. Immunol.* 2 (11) (2017).
- [29] B.H. Dorsett, W. Cronin, H.L. Joachim, Presence and prognostic significance of antilymphocyte antibodies in symptomatic and asymptomatic human immunodeficiency virus infection, *Arch. Intern. Med.* 150 (5) (1990) 1025–1028.
- [30] B.C. Bonner, T.A. Poulton, Cytofluorometric analysis of anti-lymphocyte antibodies in AIDS, *FEMS Microbiol. Immunol.* 4 (1) (1991) 33–40.
- [31] M.A. Moody, I. Pedroza-Pacheco, N.A. Vandergrift, C. Chui, K.E. Lloyd, R. Parks, K.A. Soderberg, A.T. Ogbe, M.S. Cohen, H.-X. Liao, F. Gao, A.J. McMichael, D.C. Montefiori, L. Verkoczy, G. Kelsey, J. Huang, P.R. Shea, M. Connors, P. Borrow, B.F. Haynes, Immune perturbations in HIV-1-infected individuals who make broadly neutralizing antibodies, *Sci. Immunol.* 1 (1) (2016) aag0851–aag0851.
- [32] J.J. Kobie, D.C. Alcena, B. Zheng, P. Bryk, J.L. Mattiacci, M. Brewer, C. Labranche, F.M. Young, S. Dewhurst, D.C. Montefiori, A.F. Rosenberg, C. Feng, X. Jin, M.C. Keefer, I. Sanz, 9G4 autoreactivity is increased in HIV-infected patients and correlates with HIV broadly neutralizing serum activity, *PLoS One* 7 (4) (2012) e35356.
- [33] K.M.S. Schroeder, A. Agazio, P.J. Strauch, S.T. Jones, S.B. Thompson, M.S. Harper, R. Pelanda, M.L. Santiago, R.M. Torres, Breaching peripheral tolerance promotes the production of HIV-1-neutralizing antibodies, *J. Exp. Med.* 214 (8) (2017) 2283–2302.
- [34] S.E. Burastero, M. Figini, B. Frigerio, P. Lusso, L. Mollica, L. Lopalco, Protective versus pathogenic anti-CD4 immunity: insights from the study of natural resistance to HIV infection, *J. Transl. Med.* 7 (2009) 101.
- [35] Z. Luo, Z. Li, L. Martin, Z. Wan, E.G. Meissner, E. Espinosa, H. Wu, X. Yu, P. Fu, M.A.J. Westerink, J.M. Kilby, J. Wu, L. Huang, S.L. Heath, Z. Li, W. Jiang, Pathological role of anti-CD4 antibodies in HIV-infected immunologic non-responders under viral suppressive antiretroviral therapy, *J. Infect. Dis.* 216 (1) (2017) 82–91.
- [36] L. Lopalco, CCR5: from natural resistance to a new anti-HIV strategy, *Viruses* 2 (2) (2010) 574–600.
- [37] A. Venuti, C. Pastori, L. Lopalco, The role of natural antibodies to CC chemokine receptor 5 in HIV infection, *Front. Immunol.* 8 (2017) 1358.
- [38] B. Ardman, M.A. Sikorski, M. Settles, D.E. Staunton, Human immunodeficiency virus type 1-infected individuals make autoantibodies that bind to CD43 on normal thymic lymphocytes, *J. Exp. Med.* 172 (4) (1990) 1151–1158.
- [39] V. Giordanengo, M. Limouse, L. Desroys du Roure, J. Cottalorda, A. Doglio, A. Passeron, J.G. Fuzibet, J.C. Lefebvre, Autoantibodies directed against CD43 molecules with an altered glycosylation status on human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected CEM cells are found in all HIV-1+ individuals, *Blood* 86 (6) (1995) 2302–2311.
- [40] H. Golding, F.A. Robey, F.T. Gates 3rd, W. Linder, P.R. Beining, T. Hoffman, B. Golding, Identification of homologous regions in human immunodeficiency virus 1 gp41 and human MHC class II beta 1 domain. I. Monoclonal antibodies against the gp41-derived peptide and patients' sera react with native HLA class II antigens, suggesting a role for autoimmunity in the pathogenesis of acquired immune deficiency syndrome, *J. Exp. Med.* 167 (3) (1988) 914–923.
- [41] D.F. Lake, S.F. Schluter, E. Wang, R.M. Bernstein, A.B. Edmundson, J.J. Marchalonis, Autoantibodies to the alpha/beta T-cell receptors in human immunodeficiency virus infection: dysregulation and mimicry, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91 (23) (1994) 10849–10853.
- [42] K. Stricker, E. Knipping, T. Bohler, A. Benner, P.H. Kramer, K.M. Debatin, Anti-CD95 (APO-1/Fas) autoantibodies and T cell depletion in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected children, *Cell Death Differ.* 5 (3) (1998) 222–230.
- [43] P.I. Lobo, K.H. Schlegel, W. Yuan, G.C. Townsend, J.A. White, Inhibition of HIV-1 infectivity through an innate mechanism involving naturally occurring IgM anti-leukocyte autoantibodies, *J. Immunol.* 180 (3) (2008) 1769–1779.
- [44] 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.
- [45] L. Huerta, N. Lopez-Balderas, C. Larralde, E. Lamoyi, Discriminating in vitro cell fusion from cell aggregation by flow cytometry combined with fluorescence resonance energy transfer, *J. Virol. Methods* 138 (1–2) (2006) 17–23.
- [46] R.T. Abraham, A. Weiss, Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm, *Nat. Rev. Immunol.* 4 (4) (2004) 301–308.
- [47] L. Huerta, G. Gomez-Icazbalceta, L. Soto-Ramirez, M. Viveros-Rogel, R. Rodriguez, L. Fuentes, E. Lamoyi, C. Larralde, Human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) envelope-dependent cell-cell fusion modulation by HIV-positive sera is related to disease progression, *J. Gen. Virol.* 86 (Pt 7) (2005) 1961–1966.
- [48] J. Cao, I.W. Park, A. Cooper, J. Sodroski, Molecular determinants of acute single-cell lysis by human immunodeficiency virus type 1, *J. Virol.* 70 (3) (1996) 1340–1354.
- [49] J. Barahona-Garrido, J. Camacho-Escobedo, C.I. Garcia-Martinez, H. Tocay, J. Cabiedes, J.K. Yamamoto-Furusho, Antinuclear antibodies: a marker associated with steroid dependence in patients with ulcerative colitis, *Inflamm. Bowel Dis.* 15 (7) (2009) 1039–1043.
- [50] L. Huerta, E. Lamoyi, A. Baez-Saldana, C. Larralde, Human immunodeficiency virus envelope-dependent cell-cell fusion: a quantitative fluorescence cytometric assay, *Cytometry* 47 (2) (2002) 100–106.
- [51] P. Liu, R.G. Overman, N.L. Yates, S.M. Alam, N. Vandergrift, Y. Chen, F. Graw, S.A. Free, J.C. Kappes, C. Ochsenbauer, D.C. Montefiori, F. Gao, A.S. Perelson, M.S. Cohen, B.F. Haynes, G.D. Tomaras, Dynamic antibody specificities and virion concentrations in circulating immune complexes in acute to chronic HIV-1 infection, *J. Virol.* 85 (21) (2011) 11196–11207.
- [52] J.J. Jakubik, M. Saifuddin, D.M. Takefman, G.T. Spear, Immune complexes containing human immunodeficiency virus type 1 primary isolates bind to lymphoid tissue B lymphocytes and are infectious for T lymphocytes, *J. Virol.* 74 (1) (2000) 552–555.
- [53] P.I. Lobo, K.H. Schlegel, C.E. Spencer, M.D. Okusa, C. Chisholm, N. McHedlishvili, A. Park, C. Christ, C. Burtner, Naturally occurring IgM anti-leukocyte autoantibodies (IgM-ALA) inhibit T cell activation and chemotaxis, *J. Immunol.* 180 (3) (2008) 1780–1791.
- [54] G. Zandman-Goddard, Y. Shoenfeld, HIV and autoimmunity, *Autoimmun. Rev.* 1 (6) (2002) 329–337.
- [55] V.L. Ng, B-lymphocytes and autoantibody profiles in HIV disease, *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 14 (4) (1996) 367–384.
- [56] J.A. Savage, L. Chang, S. Horn, S.M. Crowe, Anti-nuclear, anti-neutrophil cytoplasmic and anti-glomerular basement membrane antibodies in HIV-infected individuals, *Autoimmunity* 18 (3) (1994) 205–211.
- [57] G.E. Ozturk, P.F. Kohler, C.R. Horsburgh Jr, C.H. Kirkpatrick, The significance of antilymphocyte antibodies in patients with acquired immune deficiency syndrome (AIDS) and their sexual partners, *J. Clin. Immunol.* 7 (2) (1987) 130–139.
- [58] K. Babaahmady, L.A. Bergmeier, T. Lehner, Combining human antisera to human leukocyte antigens, HIVgp120 and 70 kDa heat shock protein results in broadly neutralizing activity to HIV-1, *AIDS* 22 (11) (2008) 1267–1276.
- [59] S.J. Hyduk, M.I. Cybulsky, Alpha 4 integrin signaling activates phosphatidylinositol 3-kinase and stimulates T cell adhesion to intercellular adhesion molecule-1 to a similar extent as CD3, but induces a distinct rearrangement of the actin cytoskeleton, *J. Immunol.* 168 (2) (2002) 696–704.
- [60] C.C. Liu, P. Leclair, S.Q. Yap, C.J. Lim, The membrane-proximal KXGFFKR motif of alpha-integrin mediates chemoresistance, *Mol. Cell. Biol.* 33 (21) (2013) 4334–4345.
- [61] Z. Zhu, H.R. Qin, W. Chen, Q. Zhao, X. Shen, R. Schutte, Y. Wang, G. Ofek, E. Streaker, P. Prabakaran, G.G. Fouda, H.X. Liao, J. Owens, M. Louder, Y. Yang, K.A. Klaric, M.A. Moody, J.R. Mascola, J.K. Scott, P.D. Kwong, D. Montefiori, B.F. Haynes, G.D. Tomaras, D.S. Dimitrov, Cross-reactive HIV-1-neutralizing human monoclonal antibodies identified from a patient with 2F5-like antibodies, *J. Virol.* 85 (21) (2011) 11401–11408.
- [62] F. Silvestris, R.C. Williams Jr, F. Dammacco, Autoreactivity in HIV-1 infection: the role of molecular mimicry, *Clin. Immunol. Immunopathol.* 75 (3) (1995) 197–205.
- [63] R. Root-Bernstein, Human immunodeficiency virus proteins mimic human T cell receptors inducing cross-reactive antibodies, *Int. J. Mol. Sci.* 18 (10) (2017).
- [64] L.W. Terstappen, M. Nguyen, H.M. Lazarus, M.E. Medof, Expression of the DAF (CD55) and CD59 antigens during normal hematopoietic cell differentiation, *J. Leukoc. Biol.* 52 (6) (1992) 652–660.
- [65] A.M. Lipp, K. Juhasz, C. Paar, C. Ogris, P. Eckerstorfer, R. Thuenauer, J. Hesse, B. Nimmervoll, H. Stockinger, G.J. Schutz, U. Bodenhofer, Z. Balogi, A. Sonnleitner, Lck mediates signal transmission from CD59 to the TCR/CD3 pathway in Jurkat T cells, *PLoS One* 9 (1) (2014) e85934.
- [66] S.E. Christmas, C.T. de la Mata Espinosa, D. Halliday, C.A. Buxton, J.A. Cummerson, P.M. Johnson, Levels of expression of complement regulatory proteins CD46, CD55 and CD59 on resting and activated human peripheral blood leucocytes, *Immunology* 119 (4) (2006) 522–528.
- [67] G. Norbiato, M. Bevilacqua, T. Vago, Glucocorticoids and the immune system in AIDS, *Psychoneuroendocrinology* 22 (Suppl. 1) (1997) S19–25.
- [68] L.K. Smith, J.A. Cidlowski, Glucocorticoid-induced apoptosis of healthy and malignant lymphocytes, *Prog. Brain Res.* 182 (2010) 1–30.
- [69] S.W. Cole, B.D. Naliboff, M.E. Kemeny, M.P. Griswold, J.L. Fahey, J.A. Zack, Impaired response to HAART in HIV-infected individuals with high autonomic nervous system activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (22) (2001) 12695–12700.
- [70] C. Dодt, U. Breckling, I. Derad, H.L. Fehm, J. Born, Plasma epinephrine and nor-epinephrine concentrations of healthy humans associated with nighttime sleep and morning arousal, *Hypertension* 30 (1 Pt 1) (1997) 71–76.



Host membrane proteins in the HIV-induced membrane fusion: Role in pathogenesis and therapeutic potential of autoantibodies

Mirna B. Ruiz-Rivera¹, Guillermo Gómez-Icazbalceta²,
Edmundo Lamoyi¹ and Leonor Huerta¹

Abstract

Host proteins such as receptors, adhesion and signaling molecules, promote virus–cell fusion, virus cell–cell transmission, and formation of multinucleated cells with outstanding properties. These events are implicated in virus dissemination and the induction of pathological effects such as the infection of the gut-associated lymphoid tissue, placenta infection, and neurological complications. Antibodies directed to the host membrane proteins are produced during the natural HIV infection and may contribute significantly to virus inhibition. Antibodies against the HIV receptor have been approved for therapy and others targeting additional host membrane proteins are currently under evaluation. This review emphasizes the relevance of the different pathways of HIV spreading between cells and of antibodies directed to host membrane components in the development of broad-range therapeutics against HIV.

Addresses

¹ Department of Immunology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico
² Xanthu Center for Technological Innovation, Medellín, Colombia

Corresponding author: Huerta, Leonor, (leonorhh@biomedicas.unam.mx)

Current Opinion in Pharmacology 2021, 60:241–248

This review comes from a themed issue on **Anti-Infectives (2021)**

Edited by **Elijah Ohimain** and **Chiranjib Chakraborty**

For complete overview about the section, refer [Anti-Infectives \(2021\)](#)

Available online 1 September 2021

<https://doi.org/10.1016/j.coph.2021.07.005>

1471-4892/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

The HIV envelope protein (Env) consists of the gp120 and gp41 subunits and it is exposed at the surface of viral particles and infected cells. Env binds CD4 and a coreceptor molecule (mainly CCR5 and CXCR4), promoting the rearrangement of the gp41 subunit into its active conformation, which induces virus membrane fusion with target cells (reviewed in Ref. [1]). Clustering of several Env complexes at membranes seems

essential for fusion/infection [2]. Intriguingly, TCR-related canonical but antigen-independent pathways of signaling are involved in viral spread although the determinants of contact-induced antigen-independent T cell signaling remained unclear [3]. In addition to Env, a large number of host transmembrane proteins have been detected in HIV particles [4–6].

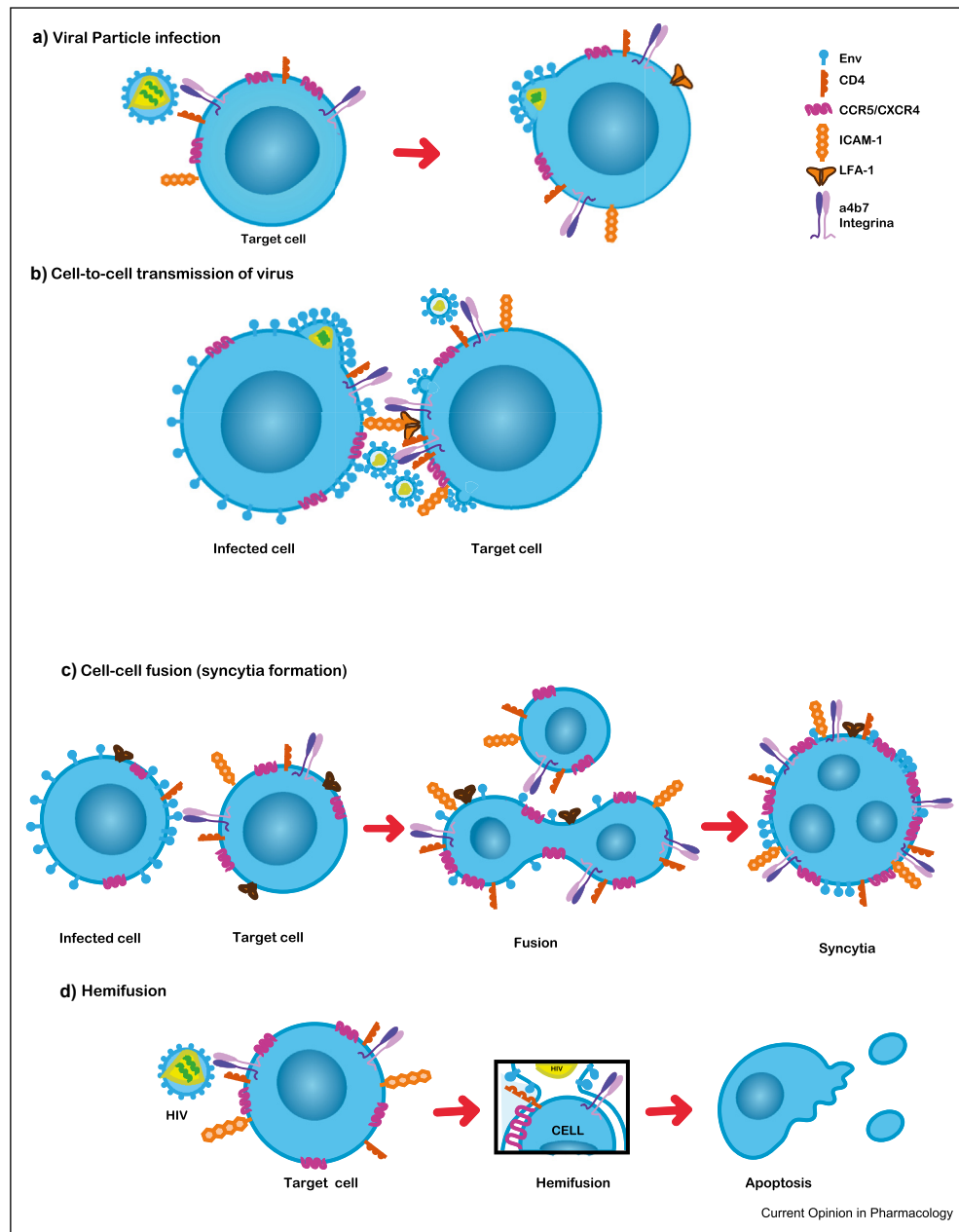
It has been reported that Env-mediated membrane fusion is involved in HIV dissemination and pathology in several ways: (a) entry of single, cell-free particles, into cells (virus–cell fusion), (b) direct transmission of virus from already infected cells to other target cells at sites of close contact (cell–cell transmission), (c) fusion between infected cells with target cells (cell–cell fusion), leading to the formation of multinucleated cells, or syncytia, and, (d) apoptosis of uninfected cells induced by partial fusion of virus and cell membranes (hemifusion) (Figure 1). Different fusion events have different sensitivities to inhibitory molecules [1,7]. An increased fusogenicity of patient's viruses is related to disease progression [8,9**] perhaps reflecting a higher *in vivo* occurrence of these events.

It can be considered that the extent of HIV induced fusogenic events reflects both the intrinsic Env molecule fusogenicity and the cell membrane permissiveness (e.g. adhesion, activation, and increasing of membrane fluidity). In this review, we discuss early and new discoveries regarding the several pathways in which membrane fusion participates in HIV dissemination and pathology, as well as the self-membrane components that promote or inhibit membrane fusion. In this regard, the state of therapeutic approaches using antibodies recognizing host membrane proteins is discussed. Membrane fission events that facilitate HIV-1 budding and release from infected cells are not included in this review and they can be appraised elsewhere in the recent literature [10].

Membrane fusion in virus dissemination and pathology: More than free viral particles Cell–cell transmission efficiency

It is proposed that cell–cell transmission (also referred to as infection by cell-associated virus) is more relevant than the infection by cell-free particles, as it has the

Figure 1



Forms in which HIV Env-induced membrane fusion is involved in viral spread and pathogenesis. a) entry of virus cell-free particles into cells, b) direct cell-to-cell virus transmission, c) fusion of infected with non-infected cells with formation of multinucleated cells (cell–cell fusion), and d) apoptosis of bystander cells.

advantages of involving short-range diffusion, higher virus concentration, directional transfer of virus, and larger areas of stable membrane contacts [11*].

Early work showed that receptor engagement by HIV Env triggers the rapid recruitment of HIV receptors and adhesion molecules in the target cell to assemble the virological synapse. The infectivity of virus-producing

cells was $\sim 10^2$ to 10^3 times higher than the infectivity of homologous cell-free particles [12]. The higher efficient transmission of cell-associated virus compared to that by cell-free virus has been observed in primary tonsil lymphoid cells infected *in vitro* [13].

HIV cell–cell transmission has been observed among CD4 T cells, between CD4 T cells and macrophages,

and among myeloid cells [14,15]. The mechanisms and implications of cell–cell transmission were discussed extensively in a recent review [16]. Interestingly, cell–cell transmission of HIV-1 may induce abortive infection and pyroptotic death of resting CD4 T cells [13], constituting a mechanism of CD4 T cell depletion and inflammation. Recently, Imle *et al.* quantified the contribution of cell-free and cell-associated transmission, in 2D suspension versus 3D matrix culture systems. Environmental restrictions posed by the collagen matrix in the 3D culture limited the infection by cell-free virions but promoted cell-associated HIV-1 transmission [11]. Furthermore, cell–cell viral transfer is resistant to antibodies that are able to neutralize homologous cell-free virus. Thus, cell–cell viral transfer can constitute a relevant mechanism of evasion from the humoral immune response [16,17] being greatly significant in tissues with high cell density.

Cell–cell fusion, outstanding properties of multinucleated cells

Early quantitative studies of syncytia formation induced by HIV Env showed great morphological heterogeneity potential of these cell constructs, implying functional heterogeneity [18]. Accordingly, various studies have shown several outstanding biological properties of these entities. Mobile and small HIV-1-induced T cell syncytia can transfer virus particles to target cells through transient contacts [19]. T cell–monocyte fusion induced by the expression of Env by the lymphoid partner can lead to formation of multinucleated giant cells with a myeloid phenotype, including phagocytic activity and activation features mediated by TLR2/4 [20,21]. T cell–macrophage fusion also leads to the formation of long-lived virus-producing giant cells that are able to transfer virus to surrounding macrophages [22]. Notably, brain pathologies associate with the presence of multinucleated infected cells. Recently, it was observed that human microglial cells, the brain and spinal cord resident macrophages, exhibit strong multinucleation and resistance to apoptosis when infected *in vitro* by HIV [23]. Several groups have proposed that the capacity for tissue infiltration, and extended survival of macrophages are central in the generation, stability, dissemination, and reactivation of HIV reservoirs (reviewed in Ref. [23]). In agreement with their potential role in brain pathology, it has been observed that HIV-infected microglia multinucleated cells can produce high levels of proinflammatory cytokines [24].

An intriguing recent report involves the endogenous retroviral protein syncytin in the transmission of HIV-1 to the placenta by cell–cell transmission and fusion. It was observed that HIV-1 infected lymphoid Jurkat as well as primary T cells can transfer virus to trophoblast cells in a manner dependent on syncytin. Interestingly, syncytin endogenously expressed on trophoblastic cells

can pseudotype HIV and enable the virus to directly infect normally HIV-nonpermissive cell types, thereby establishing HIV reservoirs in placenta [25**].

Apoptosis of bystander cells

Finally, Env fusogenicity is critical for apoptosis of uninfected (bystander) CD4+ T cells. By cloning full-length Env from plasma of viremic patients and testing Env-expressing cells for their apoptosis-inducing potential on normal peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), Joshi *et al.* observed a selective loss of CD4 T cells. Crosslinking of CD4 via gp120 activates the CD95/CD95L pathway and apoptosis seems to be induced by gp41, thus involving the fusion step. The process was greatly dependent on CCR5 and it is suggested that different threshold of CCR5 level may be required for bystander apoptosis compared to virus replication [26].

Autoantibodies in fusion inhibition

Historically, a large number of host proteins have been detected in HIV particles by fluorescence microscopy, western blot, mass spectrometry capture using monoclonal antibodies (Mabs) bound to plates of magnetic beads, and recently, flow virometry [4,6]. Up to 105 proteins such as receptors, adhesion and signaling molecules have been found in viral particles [5]. An excellent recent review summarizes studies showing the critical role of basic motifs of the viral Gag matrix domain (MA) in the recruitment of viral proteins and ARN at the plasma membrane, particularly in lipid raft microdomains (reviewed in Ref. [27]). Cell membrane molecules involved in HIV Env-dependent membrane fusion and apoptosis related to fusion processes are shown in Table 1. Participation of proteins involved in

Table 1

Cell membrane molecules involved in HIV Env-dependent membrane fusion and fusion-related apoptosis.

Role	Protein	Reference
Fusion promotion	CD4	[56]
	CCR5	[57]
	CXCR4	[57]
	ICAM-1	[35,58]
	LFA-1	[58]
	Dynamin-2	[59]
	Integrin $\alpha 4\beta 7$	[38]
	Syncytin	[25]
Fusion inhibition	Tetraspanin CD9, CD81	[44,60,61]
	EWI-2	[43,60]
	PSGL-1	[47]
	CD137 (BST-2/tetherin)	[55]
	IFITM1, IFITM3	[51,52]
	SERINC3, SERINC5	[2,53]
	MARCH8	[54]
Fusion-related apoptosis	CCR5	[26]
	CD95/CD95L	[26]

intracellular fusion events, such as endosomal trafficking/maturation, has been recently suggested in Env-mediated fusion of virus particles with endosomal membranes. This mechanism seems to be related to productive infection after virus endocytosis although mechanistic insights are still lacking [28].

The induction of antibodies able to bind leucocyte surface molecules during HIV disease has been known for a long time, including antibodies recognizing CD4, CCR5, CXCR4, HLA-II, CD11b/CD18 (MAC-1), α/β TCR, CD3, and CD95 (Apo-1/Fas) (reviewed in Refs. [29,30]), and they may modulate fusion events. A recent study associated lower plasma viral loads to the presence of serum anti-lymphocyte antibodies able to inhibit the Env-dependent cell fusion in a sample of HIV patients, suggesting that autoantibodies produced during the infection may contribute significantly to virus containment. The average contribution of these antibodies to the overall serum's fusion inhibitory activity was significant (33%). The study showed that the converse phenomenon is also possible, since removal of anti-lymphocyte antibodies from sera of a fraction of HIV positive individual enhanced Env-dependent fusion between Jurkat cells [30]. Several proteins that are able to inhibit fusion have been described (see last section). Hence, it can be thought that binding of antibodies to them may reduce constraints for fusion.

Whereas the fusion inhibitory, fusion enhancing or cytotoxic role of anti-lymphocyte antibodies deserve further evaluation in a larger number of patients, these observations point to the participation of anti-lymphocyte antibodies as an important consideration in the study of the humoral immune response to HIV, in addition to anti-Env antibodies (Figure 2).

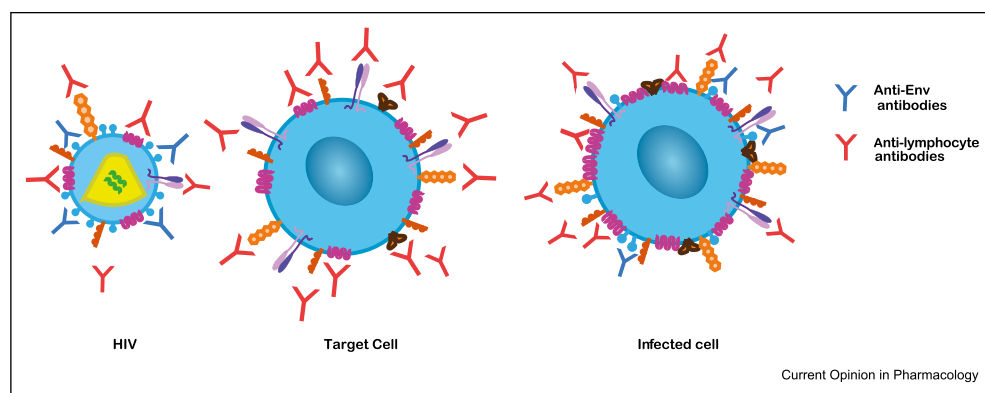
Anti-CD4 antibodies

Anti-CD4 antibodies have been frequently reported in HIV-1-infected individuals although it is not clear if they contribute significantly to virus containment [31] and a pathological role for these antibodies has been suggested [32]. However, a humanized IgG4 monoclonal antibody derived from a mouse monoclonal antibody that binds CD4 extracellular domain 2 (ibalizumab-uiyk), was approved by FDA for treatment of multidrug resistant HIV infection in 2018. The antibody does not block the binding of gp120 to CD4 but prevents the conformational changes in the CD4–gp120 complex leading to fusion. As an IgG4, it avoids the Fc-mediated lysis of CD4-bearing cells and does not appear to interfere with CD4-dependent immunity as it binds CD4 at a different place than MHC molecules. The antibody has shown potent activity against genetically diverse HIV-1 isolates although some reduction in susceptibility by mutation has been detected. In a 25-week phase 3 study, a venous infusion every two weeks of ibalizumab-uiyk had significant antiviral activity [33].

Anti-CCR5 antibodies

CCR5-tropic viruses are transmitted between individuals and predominate during the chronic disease. The humanized anti-CCR5 mAb named PRO 140 (Ierondimab) is a mAb that targets a conformational epitope between the N-terminus and the extracellular loop 2 of CCR5, and it deeply blocks viral entry. Anti-CCR5 natural Abs with the ability to block HIV and to induce long-lasting internalization of CCR5 have been long described in HIV patients. The effect of antibodies directed to these molecules associates with the targeted epitope. The extracellular 2 domain (ECL2) of CCR5 represents the binding site for both HIV and chemokines. The N-terminus is specific for viral binding only.

Figure 2



Antibodies directed to host membrane proteins can bind cell-free viral particles (left), non-infected target cells (center) and Env-expressing infected cells (right). In combination with anti-Env antibodies, autoantibodies favoring or constraining Env-mediated fusion can significantly modulate virus spread and fusion-related pathogenesis.

Instead, anti-CCR5 Abs directed to ECL1 elicit a long-lasting internalization of CCR5 but do not interfere with HIV binding directly (reviewed in Ref. [34]). In 2020, leronlimab was proposed to FDA to be introduced for the treatment of CCR5-tropic HIV-1 infection (<https://www.globenewswire.com/news-release/2020/06/08/2044758/0/en/CytoDyn-Receives-BLA-Acknowledgment-Letter-From-the-FDA.html>).

Anti-ICAM-1 antibodies

The interaction between virus-associated ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) and cell surface LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen 1) allows such virions to attach more firmly and fuse more rapidly with target cells than isogenic viruses lacking the adhesion molecule [35]. The higher permissiveness of both memory and activated CD4 T cells to productive infection with ICAM-1-bearing virions is attributable mostly to surface expression of an activated form of LFA-1 [36]. In addition to its effect on stabilizing virological synapse formation, ICAM-1/LFA-1 signaling induces a ZAP70-dependent signaling pathway for cytoskeleton remodeling and T cell polarization, promoting the efficient HIV-1 transfer at the virological synapse [3].

Specific inhibitors of leukocyte adhesion and traffic molecules are currently in evaluation for the treatment of intestinal inflammatory diseases, which pathogenic mechanisms are similar to those of HIV infection regarding microbial dysbiosis and antigen translocation, and thus they may constitute potential inhibitors of intestinal mucosal damage also in HIV infection. To date, antagonist peptides, small molecules, and antibodies targeting diverse integrins, as well as an anti-sense oligonucleotide able to down-regulate ICAM-1 mRNA, have shown promising results [37].

Anti- $\alpha 4\beta 7$ integrin antibodies

The gut mucosal tissue is seriously damaged early in the infection by HIV, causing the loss of the gut barrier integrity and permeability to microbial products. The circulation of translocated bacterial molecules in blood is closely linked to the systemic chronic immune activation driving disease pathogenesis. A number of reports have shown that binding of the gp120 envelope HIV protein to the gut homing $\alpha 4\beta 7$ integrin expressed on T CD4+ memory cells favors the access of virus to the CD4 cells. These events may be involved in productive infection and pathological inflammation in the gut-associated lymphoid tissue [reviewed in Ref. [38].

An open-label phase 1 clinical trial determined the effect of intravenous infusions of anti- $\alpha 4\beta 7$ antibodies (vedolizumab) after interruption of antiretroviral therapy (ART) on the viral load of HIV-infected individuals. The sole targeting of the $\alpha 4\beta 7$ integrin was well

tolerated although it did not lead to sustained suppression plasma viremia in the absence of ART [39*]. Surprisingly, vedolizumab administration in acute SIV infection resulted in higher viremia and more rapid disease progression. These findings suggest that integrin blockade alone fails to effectively control viral replication, dissemination, and reservoir establishment in HIV-1/SIV infection [40].

A recent study performed a detailed analysis of biopsies from the gastrointestinal tissue of individuals with both HIV-1 infection and inflammatory bowel disease (moderate). It was founded that anti- $\alpha 4\beta 7$ therapy led to a significant reduction of B cell aggregates and a decrease of activated CD4 T cells in immune inducer sites rather than affecting the memory component in effector sites, defining a new mechanism of action of anti- $\alpha 4\beta 7$ antibodies in HIV-1 infection [41*].

Host membrane proteins also constraint HIV-induced membrane fusion

Specific self-membrane proteins can also regulate HIV-envelope mediated fusion. Tetraspanins are proteins forming multimers that associate with other cellular proteins to form the so-called tetraspanin-enriched microdomains (TEMs). The presence of the tetraspanins CD9 and CD81 (which are considered the best markers of exosomes to date) in viral particles, has contributed to the proposal that HIV is released from infected cells as exosome particles, and thus it can be internalized by many cells though Env-independent mechanism. However, currently there is a little evidence supporting this process (reviewed in Ref. [42]). Conversely, it has been shown that tetraspanins regulate Env-driven fusion and syncytium formation (reviewed in Ref. [43]). EWI-2, a protein that associate with the tetraspanins CD9 and CD81 and with ezrin, a F-actin binding proteins that act as linkers between membrane proteins and the cytoskeleton, importantly contributes to the inhibition of Env-mediated cell-cell fusion [43]. It has been proposed that EWI-2 sequesters the tetraspanin proteins CD9 and CD81, hampering critical support for cell signaling [44]. On the other hand, HIV products such as Nef, Tat, the Tat responsive element (TAR), and viral RNA can be packaged into exosomes. Exosomes may diffuse between cells and cargo can influence HIV replication, T cell activation, and pathogenic processes [45,46].

PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1, or CD162) and CD43 are surface glycoproteins with a role in T cell tethering, rolling, and migration into inflamed tissues. PSGL-1 disrupts the ability of newly generated viruses to attach to target cells, and the relatively rigid and elongated extracellular domain was required for this activity, so it was proposed that this molecule sterically hinder the virus access to surface molecules [47].

The interferon-induced transmembrane proteins IFITM1 and IFITM3 inhibit or promote the entry of HIV and coronaviruses, most likely by modulation of the fusion of viral envelope with cellular membranes [48]. It is thought that IFITM proteins alter either the membrane curvature or fluidity of endocytic membranes to make them rigid and less able to fuse with viral envelopes [49,50]. The exact mechanism of the negative effect remains to be elucidated [51] and inhibition of HIV protein synthesis has also been reported [52].

The serine incorporator protein 5 (SERINC5) is another host transmembrane protein that incorporates into virions and reduces their infectivity by altering Env structure although it might be counteracted by the viral Nef protein. Importantly, SERINC5 incorporation sensitizes the virus to broadly neutralizing antibodies targeting cryptic Env epitopes. It is thought that SERINC5 restricts HIV-1, in part, by dispersing the Env clusters on the virus membrane [2]. The resistance developed by HIV Env to IFITM's and SERINC5 is differential over the course of HIV-1 infection [53].

The E3 ubiquitin ligase membrane-associated RING-CH (MARCH8) is another transmembrane protein that promotes antiviral activity by reducing incorporation of envelope glycoproteins from the cell surface into virions [54]. Finally, BST-2/tetherin is a transmembrane protein able to hold formed viruses to the cell surface, preventing their release and spread [55].

Conclusions

Membrane components that favor close contact between cells (e.g. adhesion) and membrane permissiveness (e.g. activation or membrane fluidity) can support the fusion process. On the other hand, membrane proteins that prevent the proper interaction of Env with its receptors can inhibit fusion. It is widely accepted that, in addition to virus receptors, the participation of surface molecules in the fusion process is substantial, so that antibodies recognizing cell membrane molecules may participate significantly in modulation of the Env-mediated membrane fusion. So far, only an anti-CD4 antibody has been approved for treatment of the HIV infection although several therapeutic approaches based on antibodies recognizing host membrane proteins are currently under investigation. On the other hand, evaluation of the participation of autoantibodies produced during the natural infection is desirable during the systematic analysis of the humoral response against HIV, as the combined recognition of a number of host membrane components may contribute significantly to virus inhibition. Identification of membrane molecules involved in induction of antibodies able to modulate membrane fusion should be continued and the molecular mechanisms characterized. Useful therapeutic approaches may include the combination of antibodies directed to several host membrane components.

Conflict of interest statement

Nothing declared.

Acknowledgements

Mirna Berenice Ruiz-Rivera is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and recipient of fellowship 595771 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México. This work was supported by Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, UNAM (grant IN215820 to LH).

References

Papers of particular interest, published within the period of review, have been highlighted as:

- * of special interest
 - ** of outstanding interest
1. Li H, Zony C, Chen P, Chen BK: **Reduced potency and incomplete neutralization of broadly neutralizing antibodies against cell-to-cell transmission of HIV-1 with transmitted founder Envs.** *J Virol* 2017, **91**.
 2. Chen YC, Sood C, Marin M, Aaron J, Gratton E, Salaita K, Melikyan GB: **Super-resolution fluorescence imaging reveals that serine incorporator protein 5 inhibits human immunodeficiency virus fusion by disrupting envelope glycoprotein clusters.** *ACS Nano* 2020, **14**:10929–10943.
 3. Len ACL, Starling S, Shivkumar M, Jolly C: **HIV-1 activates T cell signaling independently of antigen to drive viral spread.** *Cell Rep* 2017, **18**:1062–1074.
 4. Burnie J, Guzzo C: **The incorporation of host proteins into the external HIV-1 envelope.** *Viruses* 2019, **11**:85.
 5. Chertova E, Chertov O, Coren LV, Roser JD, Trubey CM, Bess Jr JW, Sowder 2nd RC, Barsov E, Hood BL, Fisher RJ, Nagashima K, et al.: **Proteomic and biochemical analysis of purified human immunodeficiency virus type 1 produced from infected monocyte-derived macrophages.** *J Virol* 2006, **80**:9039–9052.
 6. Jalaguier P, Cantin R, Maaroufi H, Tremblay MJ: **Selective acquisition of host-derived ICAM-1 by HIV-1 is a matrix-dependent process.** *J Virol* 2015, **89**:323–336.
 7. Gombos RB, Kolodkin-Gal D, Eslamizar L, Owuor JO, Mazzola E, Gonzalez AM, Koriath-Schmitz B, Gelman RS, Montefiori DC, Haynes BF, Schmitz JE: **Inhibitory effect of individual or combinations of broadly neutralizing antibodies and antiviral reagents against cell-free and cell-to-cell HIV-1 transmission.** *J Virol* 2015, **89**:7813–7828.
 8. Casado C, Marrero-Hernandez S, Marquez-Arce D, Pernas M, Marfil S, Borrás-Granana F, Olivares I, Cabrera-Rodríguez R, Valera MS, de Armas-Rillo L, Lemey P, et al.: **Viral characteristics associated with the clinical nonprogressor phenotype are inherited by viruses from a cluster of HIV-1 elite controllers.** *mBio* 2018, **9**, e02338-17.
 9. Connell BJ, Hermans LE, Wensing AMJ, Schellens I, Schipper PJ, van Ham PM, de Jong D, Otto S, Mathe T, Moraba R, Borghans JAM, et al.: **Immune activation correlates with and predicts CXCR4 co-receptor tropism switch in HIV-1 infection.** *Sci Rep* 2020, **10**:15866.
 - ** A 5 years follow-up of a HIV-1B seroconverter cohort showed that higher levels of CD4+T-cell activation markers in early infection preceded and independently predicted subsequent emergence of X4-tropic viral strains. This is the first report that clearly suggests that X4-tropic viral strains can emerge as the dominant viral population X4-tropic viruses as a consequence of ongoing immune activation. Thus, only viral genetic changes are not sufficient for tropism switching but host (immunological) factors are required.
 10. Meng B, Ip NCY, Abbink TEM, Kenyon JC, Lever AML: **ESCRT-II functions by linking to ESCRT-I in human immunodeficiency virus-1 budding.** *Cell Microbiol* 2020, **22**, e13161.
 11. Imle A, Kumberger P, Schnellbacher ND, Fehr J, Carrillo-Bustamante P, Ales J, Schmidt P, Ritter C, Godinez WJ, Muller B, Rohr K, et al.: **Experimental and computational analyses**

- reveal that environmental restrictions shape HIV-1 spread in 3D cultures.** *Nat Commun* 2019, **10**:2144.
- This study reveals that environmental restrictions given by a collagen matrix, limit infection by cell-free virions but promote cell-associated HIV-1 transmission. The study was performed using primary human CD4 T lymphocytes and infectious virus, combining quantification of pathogen replication with imaging for analyzing single-cell and cell population dynamics.
12. Starling S, Jolly C: **LFA-1 engagement triggers T cell polarization at the HIV-1 virological synapse.** *J Virol* 2016, **90**: 9841–9854.
 13. Galloway NL, Doitsh G, Monroe KM, Yang Z, Munoz-Arias I, Levy DN, Greene WC: **Cell-to-cell transmission of HIV-1 is required to trigger pyroptotic death of lymphoid-tissue-derived CD4 T cells.** *Cell Rep* 2015, **12**:1555–1563.
 14. Perot BP, Garcia-Paredes V, Luka M, Menager MM: **Dendritic cell maturation regulates TSPAN7 function in HIV-1 transfer to CD4(+) T lymphocytes.** *Front Cell Infect Microbiol* 2020, **10**: 70.
 15. Xie M, Leroy H, Mascarau R, Woottum M, Dupont M, Ciccone C, Schmitt A, Raynaud-Messina B, Verollet C, Bouchet J, Bracq L, *et al.*: **Cell-to-cell spreading of HIV-1 in myeloid target cells escapes SAMHD1 restriction.** *mBio* 2019, **10**.
 16. Smith SA, Derdeyn CA: **New connections: cell-to-cell HIV-1 transmission, resistance to broadly neutralizing antibodies, and an envelope sorting motif.** *J Virol* 2017, **91**.
 17. Parsons MS, Lloyd SB, Lee WS, Kristensen AB, Amarasena T, Center RJ, Keele BF, Lifson JD, LaBranche CC, Montefiori D, Wines BD, *et al.*: **Partial efficacy of a broadly neutralizing antibody against cell-associated SHIV infection.** *Sci Transl Med* 2017, **9**:eaaf1483.
 18. Huerta L, Lopez-Balderas N, Rivera-Toledo E, Sandoval G, Gomez-Icazbalceta G, Villarreal C, Lamoyi E, Larralde C: **HIV-envelope-dependent cell-cell fusion: quantitative studies.** *ScientificWorldJournal* 2009, **9**:746–763.
 19. Symeonides M, Murooka TT, Bellfy LN, Roy NH, Mempel TR, Thali M: **HIV-1-induced small T cell syncytia can transfer virus particles to target cells through transient contacts.** *Viruses* 2015, **7**:6590–6603.
 20. Martinez-Mendez D, Rivera-Toledo E, Ortega E, Licona-Limon I, Huerta L: **Monocyte-lymphocyte fusion induced by the HIV-1 envelope generates functional heterokaryons with an activated monocyte-like phenotype.** *Exp Cell Res* 2017, **352**:9–19.
 21. Rivera-Toledo E, Huerta L, Larralde C, Lamoyi E: **Quantitative and phenotypic analyses of lymphocyte-monocyte heterokaryons induced by the HIV envelope proteins: significant loss of lymphoid markers.** *Exp Mol Pathol* 2011, **90**:157–166.
 22. Bracq L, Xie M, Lambele M, Vu LT, Matz J, Schmitt A, Delon J, Zhou P, Randriamampita C, Bouchet J, Benichou S: **T cell-macrophage fusion triggers multinucleated giant cell formation for HIV-1 spreading.** *J Virol* 2017, **91**.
 23. Castellano P, Prevedel L, Eugenin EA: **HIV-infected macrophages and microglia that survive acute infection become viral reservoirs by a mechanism involving Bim.** *Sci Rep* 2017, **7**:12866.
 24. Ryan SK, Gonzalez MV, Garifallou JP, Bennett FC, Williams KS, Sotuyo NP, Mironets E, Cook K, Hakonarson H, Anderson SA, Jordan-Sciutto KL: **Neuroinflammation and EIF2 signaling persist despite antiretroviral treatment in an hiPSC tri-culture model of HIV infection.** *Stem Cell Reports* 2020, **14**:991.
 25. Tang Y, Woodward BO, Pastor L, George AM, Petrechko O, Nouvet FJ, Haas DW, Jiang G, Hildreth JEK: **Endogenous retroviral envelope syncytin induces HIV-1 spreading and establishes HIV reservoirs in placenta.** *Cell Rep* 2020, **30**: 4528–4539. e4.
- Syncytin, the Env protein of the human endogenous retroviral family W1 (HERV-W1) induced fusion of HIV-infected T cells with placental trophoblasts of a woman under suppressive ART. HIV reservoirs were observed in the placenta of the woman. The process was independent of both HIV Env and CD4 receptor. This article shows a novel mechanism of expansion of cell-to-cell spread of HIV to non-CD4-expressing cells in deep tissues.
26. Garg H, Joshi A: **Host and viral factors in HIV-mediated bystander apoptosis.** *Viruses* 2017, **9**:237.
 27. Thornhill D, Murakami T, Ono A: **Rendezvous at plasma membrane: cellular lipids and tRNA set up sites of HIV-1 particle assembly and incorporation of host transmembrane proteins.** *Viruses* 2020, **12**:842.
 28. Marin M, Kushnareva Y, Mason CS, Chanda SK, Melikyan GB: **HIV-1 fusion with CD4+ T cells is promoted by proteins involved in endocytosis and intracellular membrane trafficking.** *Viruses* 2019, **11**:100.
 29. Root-Bernstein R: **Human immunodeficiency virus proteins mimic human T cell receptors inducing cross-reactive antibodies.** *Int J Mol Sci* 2017, **18**:2091.
 30. Ruiz-Rivera MB, Gomez-Icazbalceta G, Velez-Alavez M, Viveros-Rogel M, Perez-Patrigeon S, Lamoyi E, Llorente L, Nunez-Alvarez CA, Huerta L: **Inhibition of HIV-1 envelope-dependent membrane fusion by serum antilymphocyte autoantibodies is associated with low plasma viral load.** *Immunol Lett* 2019, **211**: 33–40.
 31. Burastero SE, Gaffi D, Lopalco L, Tambussi G, Borgonovo B, De Santis C, Abecasis C, Robbioni P, Gasparri A, Lazzarin A, Celada F, *et al.*: **Autoantibodies to CD4 in HIV type 1-exposed seronegative individuals.** *AIDS Res Hum Retrovir* 1996, **12**: 273–280.
 32. Luo Z, Li Z, Martin L, Wan Z, Meissner EG, Espinosa E, Wu H, Yu X, Fu P, Julia Westerink MA, Kilby JM, *et al.*: **Pathological role of anti-CD4 antibodies in HIV-infected immunologic nonresponders receiving virus-suppressive antiretroviral therapy.** *J Infect Dis* 2017, **216**:82–91.
 33. Emu B, Fessel J, Schrader S, Kumar P, Richmond G, Win S, Weinheimer S, Marsolais C, Lewis S: **Phase 3 study of ibalizumab for multidrug-resistant HIV-1.** *N Engl J Med* 2018, **379**: 645–654.
 34. Venuti A, Pastori C, Lopalco L: **The role of natural antibodies to CC chemokine receptor 5 in HIV infection.** *Front Immunol* 2017, **8**:1358.
 35. Tardif MR, Tremblay MJ: **LFA-1 is a key determinant for preferential infection of memory CD4+ T cells by human immunodeficiency virus type 1.** *J Virol* 2005, **79**:13714–13724.
 36. Yu X, Shang H, Jiang Y: **ICAM-1 in HIV infection and underlying mechanisms.** *Cytokine* 2020, **125**:154830.
 37. Perez-Jeldres T, Tyler CJ, Boyer JD, Karuppachamy T, Bamias G, Dulai PS, Boland BS, Sandborn WJ, Patel DR, Rivera-Nieves J: **Cell trafficking interference in inflammatory bowel disease: therapeutic interventions based on basic pathogenesis concepts.** *Inflamm Bowel Dis* 2019, **25**:270–282.
 38. Goes LR, Sajani A, Sivo A, Olowojesiku R, Ray JC, Perrone I, Yolitz J, Girard A, Leyre L, Wibmer CK, Morris L, *et al.*: **The V2 loop of HIV gp120 delivers costimulatory signals to CD4(+) T cells through Integrin alpha4beta7 and promotes cellular activation and infection.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2020, **117**: 32566–32573.
 39. Sneller MC, Clarridge KE, Seamon C, Shi V, Zorawski MD, Justement JS, Blazkova J, Huiting ED, Proschan MA, Mora JR, Shetzline M, *et al.*: **An open-label phase 1 clinical trial of the anti-alpha4beta7 monoclonal antibody vedolizumab in HIV-infected individuals.** *Sci Transl Med* 2019, **11**, eaax3447.
- Twenty HIV-infected individuals received vedolizumab infusions every 2–4 weeks. ART was then discontinued at week 22. Vedolizumab was well tolerated. However, the antibody did not lead to sustained suppression of plasma viremia. This human clinical trial did not reproduce the vedolizumab positive effects that were reported in previous studies performed in non-human primate models infected with simian immunodeficiency virus (SIV).
40. Ziani W, Shao J, Fang A, Connolly PJ, Wang X, Veazey RS, Xu H: **Mucosal integrin alpha4beta7 blockade fails to reduce the seeding and size of viral reservoirs in SIV-infected rhesus macaques.** *Faseb J* 2021, **35**, e21282.

41. Uzzan M, Tokuyama M, Rosenstein AK, Tomescu C, SahBandar IN, Ko HM, Leyre L, Chokola A, Kaplan-Lewis E, Rodriguez G, Seki A, *et al.*: **Anti-alpha4beta7 therapy targets lymphoid aggregates in the gastrointestinal tract of HIV-1-infected individuals.** *Sci Transl Med* 2018, **10**:461. eaa4711.
- A detailed analysis of colonoscopies from the gastrointestinal tissue of HIV infected patients before and several months after anti- $\alpha 4\beta 7$ treatment is reported. The study shows that anti-alpha4beta7 therapy caused a greater effect on the homing of naïve T and B cells to inductive sites (terminal ileum) rather than to effector sites (colonic lamina propria), with a significant attenuation of lymphoid aggregates in the former. This article is important as it presents a previously unreported mechanism of action of anti- $\alpha 4\beta 7$ therapy.
42. Ellwanger JH, Veit TD, Chies JAB: **Exosomes in HIV infection: a review and critical look.** *Infect Genet Evol* 2017, **53**:146–154.
43. Roy NH, Lambale M, Chan J, Symeonides M, Thali M: **Ezrin is a component of the HIV-1 virological presynapse and contributes to the inhibition of cell-cell fusion.** *J Virol* 2014, **88**: 7645–7658.
44. Wang HX, Sharma C, Knoblich K, Granter SR, Hemler ME: **EWI-2 negatively regulates TGF- β signaling leading to altered melanoma growth and metastasis.** *Cell Res* 2015, **25**:370–385.
45. Patters BJ, Kumar S: **The role of exosomal transport of viral agents in persistent HIV pathogenesis.** *Retrovirology* 2018, **15**: 79.
46. Chen L, Feng Z, Yuan G, Emerson CC, Stewart PL, Ye F, Jin G: **Human immunodeficiency virus-associated exosomes promote Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection via the epidermal growth factor receptor.** *J Virol* 2020, **94**, e01782-19.
47. Fu Y, He S, Waheed AA, Dabbagh D, Zhou Z, Trinite B, Wang Z, Yu J, Wang D, Li F, Levy DN, *et al.*: **PSGL-1 restricts HIV-1 infectivity by blocking virus particle attachment to target cells.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2020, **117**:9537–9545.
48. Zhao X, Sehgal M, Hou Z, Cheng J, Shu S, Wu S, Guo F, Le Marchand SJ, Lin H, Chang J, Guo JT: **Identification of residues controlling restriction versus enhancing activities of IFITM proteins on entry of human coronaviruses.** *J Virol* 2018, **92**, e01535-17.
49. Amini-Bavil-Olyae S, Choi YJ, Lee JH, Shi M, Huang IC, Farzan M, Jung JU: **The antiviral effector IFITM3 disrupts intracellular cholesterol homeostasis to block viral entry.** *Cell Host Microbe* 2013, **13**:452–464.
50. Li K, Markosyan RM, Zheng YM, Golfetto O, Bungart B, Li M, Ding S, He Y, Liang C, Lee JC, Gratton E, *et al.*: **IFITM proteins restrict viral membrane hemifusion.** *PLoS Pathog* 2013, **9**, e1003124.
51. Appourchaux R, Delpeuch M, Zhong L, Burlaud-Gaillard J, Tartour K, Savidis G, Brass A, Etienne L, Roingear P, Cimarelli A: **Functional mapping of regions involved in the negative imprinting of virion particle infectivity and in target cell protection by interferon-induced transmembrane protein 3 against HIV-1.** *J Virol* 2019, **93**, e01716-18.
52. Lee WJ, Fu RM, Liang C, Sloan RD: **IFITM proteins inhibit HIV-1 protein synthesis.** *Sci Rep* 2018, **8**:14551.
53. Beitari S, Pan Q, Finzi A, Liang C: **Differential pressures of SERINC5 and IFITM3 on HIV-1 envelope glycoprotein over the course of HIV-1 infection.** *J Virol* 2020, **94**, e00514-20.
54. Zhang Y, Tada T, Ozono S, Kishigami S, Fujita H, Tokunaga K: **MARCH8 inhibits viral infection by two different mechanisms.** *Elife* 2020, **9**:e57763.
55. Zhang Y, Ozono S, Yao W, Tobiume M, Yamaoka S, Kishigami S, Fujita H, Tokunaga K: **CRISPR-mediated activation of endogenous BST-2/tetherin expression inhibits wild-type HIV-1 production.** *Sci Rep* 2019, **9**:3134.
56. Rizzuto CD, Wyatt R, Hernandez-Ramos N, Sun Y, Kwong PD, Hendrickson WA, Sodroski J: **A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding.** *Science* 1998, **280**:1949–1953.
57. Arif MS, Hunter J, Leda AR, Zukurov JPL, Samer S, Camargo M, Galinskas J, Kallas EG, Komninakis SV, Janini LM, Sucupira MC, *et al.*: **Pace of coreceptor tropism switch in HIV-1-infected individuals after recent infection.** *J Virol* 2017, **91**, e00793-17.
58. Jolly C, Mitar I, Sattentau QJ: **Adhesion molecule interactions facilitate human immunodeficiency virus type 1-induced virological synapse formation between T cells.** *J Virol* 2007, **81**:13916–13921.
59. Jones DM, Alvarez LA, Nolan R, Ferriz M, Sainz Urruela R, Massana-Munoz X, Novak-Kotzer H, Dustin ML, Padilla-Parra S: **Dynamin-2 stabilizes the HIV-1 fusion pore with a low oligomeric state.** *Cell Rep* 2017, **18**:443–453.
60. Whitaker EE, Matheson NJ, Perlee S, Munson PB, Symeonides M, Thali M: **EWI-2 inhibits cell–cell fusion at the HIV-1 virological presynapse.** *Viruses* 2019, **11**:1082.
61. Gordon-Alonso M, Yanez-Mo M, Barreiro O, Alvarez S, Munoz-Fernandez MA, Valenzuela-Fernandez A, Sanchez-Madrid F: **Tetraspanins CD9 and CD81 modulate HIV-1-induced membrane fusion.** *J Immunol* 2006, **177**:5129–5137.