



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Instituto de Investigaciones Biomédicas

**Fusión celular en la infección por el VIH-1:
aportaciones a la comprensión de los
mecanismos patogénicos del SIDA**

Tesis

para optar al grado de

Doctora en Investigación Biomédica Básica

que presenta la

M. En C. Leonor Huerta Hernández

Director: Dr. Carlos Larralde

México, D. F., Abril 2004

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE:

Leonor Huerta Hernández

FECHA:

Abril 16, 2004

FIRMA:

Leonor Huerta Hernández

Fusión celular en la infección por el VIH-1: aportaciones a la comprensión de los mecanismos patogénicos del SIDA

Tesis que presenta la

M. en C. Leonor Huerta

para optar por el grado de

Doctora en Investigación Biomédica Básica

Director: Dr. Carlos Larralde

Este trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México, a través de los proyectos 34941-M y 40413-M.

Abril 2004

A mis padres, José y Catalina

A Carlos y a nuestros hijos, Diana y Alberto

Agradezco infinitamente a las siguientes personas:

Al Dr. Carlos Larralde, maestro sin par, por su apoyo, afecto y confianza.

Al Dr. Edmundo Lamoyi y a la Dra. Armida Báez, por su amistad y colaboración.

Al Dr. Luis Soto y a los miembros de su grupo (Mónica Viveros, Luis L. Fuentes y Roberto Rodríguez), que colaboraron en este trabajo.

A los Dres. Germinal Cocho y Carlos Villarreal, quienes contribuyeron de manera fundamental a mi formación académica.

A los miembros del jurado, Doctores Beatriz Gómez, Jaime Mas, Enrique Ortega, Jorge Alcocer, Luis Padilla, Carlos Larralde y José Moreno, por su revisión y comentarios a esta tesis.

ÍNDICE

Resumen	1
Introducción	2
1. Antecedentes.....	2
2. La fusión celular “in vitro”: formación de sincicios y efecto citopático.....	3
3. La fusión celular “in vivo”.....	5
4. Fusión de membranas en la transmisión del virus célula a célula.....	6
5. Fusión celular y SIDA.....	6
6. Las proteínas de fusión del VIH.....	9
7. Modelo general de la fusión de membranas mediada por Env.....	10
8. Otras moléculas involucradas en la fusión.....	14
9. Utilidad de los trazadores lipofílicos fluorescentes para la cuantificación de la fusión celular.....	16
Planteamiento del problema e hipótesis	18
Objetivos y diseño experimental	19
Materiales y Métodos	20
1. Anticuerpos monoclonales.....	20
2. Otros reactivos.....	20
3. Líneas celulares.....	20
4. Marcadores lipofílicos fluorescentes.....	21
5. Preparación de las soluciones de colorantes.....	22
6. Cultivo celular e inducción de la expresión de <i>env</i>	22
7. Tinción de las células con DiI y DiO.....	22
8. Ensayo de fusión.....	23
9. Análisis por citometría de flujo.....	23
10. Inmunofluorescencia directa para CD4 y CXCR4.....	23
11. Adsorción de los anticuerpos del suero con proteína G-Sefarosa.....	24
12. Análisis estadístico.....	25
13. Cálculo de la estequiometría de la fusión.....	25
Pacientes estudiados	27
Resultados	30
A) Cuantificación y caracterización de la fusión celular por citometría de flujo	

1. Modelo de fusión celular “in vitro”.....	30
2. Análisis por citometría de flujo.....	30
3. Transferencia de energía de la fluorescencia (TEF) en las células fusionadas.....	33
4. Relación entre el nivel de fusión y la expresión de las moléculas CD4 y CXCR4.....	35
5. Efecto de anticuerpos anti-gp120, anti-gp41, anti-CD4 y anti-CXCR4 sobre la fusión.....	37
B) Efecto del suero de pacientes infectados por el VIH-1 sobre la fusión celular	
1. Actividad del suero y su relación con los parámetros clínicos de la infección.....	39
2. Aglutinación celular por sueros promotores de la fusión.....	42
C) Dinámica de la estequiometría de la fusión.....	43
Discusión.....	47
1. Citometría de flujo aplicada al estudio de la fusión celular.....	47
2. Transferencia de energía de la fluorescencia en células fusionadas.....	47
3. Estequiometría de la fusión.....	48
4. Efecto del suero y anticuerpos monoclonales sobre la fusión celular.....	49
Inhibición.....	49
Promoción.....	51
5. Consideraciones finales: fusión celular y patogénesis.....	51
Conclusiones.....	54
Perspectivas.....	56
Apéndices.....	57
1. El virus de la inmunodeficiencia humana: estructura y función.....	57
2. Historia natural de la infección por el VIH-1.....	62
3. Clasificación CDC de los estados de la infección.....	64
Bibliografía.....	66
Anexos.....	76
1. Artículo publicado: Huerta L., Lamoyi E., Báez-Saldaña	

- A., Larralde C. HIV envelope-dependent cell-cell fusion: a quantitative fluorescence cytometric assay. *Cytometry* 47 (2): 100-106, 2002.....76
2. **Artículo enviado a publicación:** Huerta L., Gómez-Icazbalceta G., Soto L., Viveros M., Lamoyi E., León L., C. Larralde. HIV-1-envelope dependent cell-cell fusion regulation by HIV-positive sera is related to disease progression. (Marzo del 2004).84
3. **Artículo en preparación:** Huerta L., López B.N., Rivera T.G., Lamoyi E., C. Larralde. Stoichiometry of the HIV envelope mediated cell-cell fusion: Env-expressing CD4+ T cells are out numbered by CD4+ T cells in syncytia.....110

RESUMEN

La síntesis de proteínas virales por células infectadas por el virus de la inmunodeficiencia adquirida humana (VIH) conduce a la expresión de las proteínas de la envoltura viral (complejo gp120/gp41 o Env) en la membrana citoplasmática. Estas moléculas confieren a las células infectadas la capacidad para interactuar con receptores de linfocitos T no infectados circundantes, conduciendo a la fusión entre las membranas citoplásmicas de ambas células. En condiciones de alta densidad celular "in vitro", la fusión de membranas celulares se asocia a la transmisión del virus célula a célula y provoca efectos citopáticos en las células involucradas. "In vivo", se ha determinado una correlación importante entre el hallazgo de variantes de VIH con alta capacidad fusogénica (inductoras de sincicios) en la sangre de individuos infectados, y la disminución de la cuenta de linfocitos T CD4+ circulantes. Por lo tanto, los eventos asociados a la fusión celular constituyen mecanismos potencialmente importantes en la progresión de la infección hacia el síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

La presente tesis se divide en tres partes: 1) diseño y caracterización de un método para el estudio cuantitativo de la fusión celular por citometría de flujo, 2) estudio de la regulación de la fusión por factores del suero de pacientes VIH-positivos sobre la fusión y su relación con el estadio clínico de la infección y 3) estudio de la composición celular de los sincicios (estequiometría) y la dinámica de su formación.

Utilizando líneas celulares de linfocitos T CD4+ transfectadas con el gene *env* de una variante del VIH-1 altamente fusogénica (células Env+), diseñamos una metodología novedosa para el estudio cuantitativo de la fusión, basada en el uso de dos colorantes lipofílicos fluorescentes (DiO y DiI) para marcar las células participantes y citometría de flujo para la cuantificación automática de los productos fusionados. Un efecto de transferencia de energía de la fluorescencia (FRET) entre ambos colorantes, así como el perfil morfológico (tamaño y granularidad) de las células fusionadas, permitió distinguir entre células fusionadas y agregadas. El método se caracterizó ampliamente y mostró su utilidad para analizar la cinética de la fusión y la dependencia de la expresión de los receptores específicos (Env, CD4 y CXCR4). El efecto de anticuerpos monoclonales anti-gp120 y anti-gp41 sugiere que la sensibilidad de la fusión célula-célula a estos inhibidores es distinta a la de la fusión virus-célula. Mediante un tratamiento matemático de los datos de citometría de flujo, se demostró que la estequiometría de la fusión depende del tiempo, de la proporción inicial de las células en el cultivo e implica a varias células CD4+ por una célula Env+ en las fusiones, sugiriendo un mecanismo de amplificación de los efectos de la fusión a varias células no infectadas por cada célula infectada. El estudio del efecto del suero de pacientes seropositivos al VIH sobre la fusión, mostró una asociación significativa entre la capacidad del suero para inhibir la fusión y los principales indicadores de progresión de la enfermedad así como con el estado clínico de los pacientes.

Nuestros resultados indican que los eventos de fusión celular pueden tener un papel relevante en la patogénesis del SIDA y sientan las bases para el estudio de los factores fisiológicos que influyen en la misma.

INTRODUCCIÓN

1. Antecedentes

El entendimiento de los procesos biológicos que subyacen en la interacción virus-huésped en la infección por el virus de la inmunodeficiencia adquirida humana (VIH), causante del Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), constituye uno de los problemas más apremiantes de la investigación biomédica dada la magnitud de la epidemia mundial, así como la estimada para el corto y mediano plazos. Desde el comienzo de la pandemia, el VIH ha infectado a más de 60 millones de personas en todo el mundo y ha causado la muerte a 19 millones de ellas, según un informe reciente del Programa Conjunto contra el SIDA de la Organización de las Naciones Unidas y la Organización Mundial de la Salud (141). En México, la Secretaría de Salubridad y Asistencia reportó que en el país existen 40,000 enfermos de SIDA y aproximadamente 150,000 portadores del VIH (142). La amenaza del VIH no ha disminuido en ningún país. Si bien los medicamentos antivirales han aportado esperanza a muchos pacientes, el efecto de su uso prolongado y de su retiro, son desconocidos, y en la mayor parte del mundo no están disponibles (141).

La lucha contra el VIH se ha visto considerablemente complicada por la inesperada complejidad de la enfermedad. Las perspectivas planteadas a mediados de los años 80 sobre el desarrollo de vacunas en un lapso de 10 años, se han visto frenadas por la falta de claridad, y aún contradicción, de los resultados sobre el tipo de inmunidad implicada en la contención de la infección. Esto ha hecho evidente la necesidad de conocer a profundidad los mecanismos patogénicos de la enfermedad. Al nivel de la investigación en inmunología, la infección por el VIH plantea problemas únicos. Puesto que el virus se replica en células del sistema inmune, la activación inmunológica necesaria para el control del virus favorece al mismo tiempo la replicación de éste. Aún más, todavía no existe una explicación definitiva para la disminución de linfocitos T CD4+, a pesar de que existen varios mecanismos propuestos (129). Existe una creciente tendencia a otorgar una mayor importancia a la fusión celular inducida por el VIH (161) y a los fenómenos de activación inmunológica en la patogénesis del SIDA (127).

Las células infectadas por el VIH inician la síntesis de las proteínas virales, de las cuales las proteínas de la envoltura viral, gp120 y gp41, son transportadas a la membrana celular, confiriendo a las células infectadas la capacidad para interactuar específicamente con receptores sobre la membrana de linfocitos T no infectados y eventualmente, fusionarse con ellos. En condiciones de alta densidad celular, donde el contacto entre las células es estrecho, la fusión es un mecanismo muy eficiente de transmisión directa del virus de una célula a otra y de muerte celular. La fusión entre células infectadas y no infectadas es conspicua "in vitro" y sincicios multinucleados son frecuentemente encontrados "in vivo", localizados en los tejidos linfáticos de individuos infectados por el VIH. En conjunto, estas observaciones sugieren que la fusión de membranas celulares podría subyacer como uno de los

factores causantes de la gama de desarreglos inmunológicos asociados a la infección por el VIH, con impacto en el curso clínico de la enfermedad.

El mecanismo molecular de la fusión virus-célula y la estructura del complejo gp120/gp41 han sido objeto de investigación intensa, de la cual se ha derivado un modelo general de fusión, en el cual una estructura altamente organizada del complejo gp120/gp41 atraviesa por una secuencia de complejos cambios conformacionales, al tiempo que tolera una alta variabilidad en su secuencia de aminoácidos y presenta limitada sensibilidad a la neutralización por anticuerpos específicos. Se sabe que además de las proteínas virales, moléculas propias de la membrana celular participan de manera determinante en el proceso. Sin embargo, las causas de la formación y permanencia de grupos de células fusionadas (sincicios) en los tejidos linfáticos de pacientes VIH-positivos, las consecuencias fisiológicas de la presencia de estas formaciones y su incidencia en la progresión a SIDA, el papel de la respuesta inmune en la contención de la fusión celular, y de manera importante, la extensión real de la fusión celular "in vivo", han sido mucho menos atendidas.

En esta introducción se proporciona un panorama general del estado del conocimiento actual sobre los tópicos mencionados anteriormente, analizando la relación entre el conocimiento generado mediante estudios "in vitro", con datos obtenidos "in vivo" que apuntan hacia un papel de la fusión celular en la patogénesis del SIDA. Para una revisión de las características generales del VIH-1 y de la enfermedad que produce, ver los **Apéndices 1 a 3**.

2. La fusión celular "in vitro": formación de sincicios y efecto citopático.

Los virus obtenidos de la sangre de individuos infectados (aislados primarios) frecuentemente inducen la fusión célula-célula de linfocitos T CD4+ "in vitro", dando lugar a la formación de células gigantes multinucleadas cuya viabilidad se pierde en pocos días (**Figura 1**). Los sincicios son el resultado de la actividad de las proteínas de la envoltura viral (Env) en interacción con receptores específicos sobre la superficie de las células blanco (CD4 y un receptor de la familia de las quimiocinas, principalmente CCR5 o CXCR4) (1-6) (apartado 6 "Las proteínas de fusión del VIH" y **figuras 6 y 7**). Además de los receptores específicos, diversas moléculas de la membrana celular que propician los contactos estrechos entre las células, favorecen de manera importante la formación de sincicios (apartado 8 "Otras moléculas involucradas en la fusión").

Mediante la modificación genética dirigida de la capacidad fusogénica de membranas del complejo gp120/gp41, se ha mostrado que esta habilidad se relaciona directamente con las propiedades citopáticas de los virus en cultivo celular (11). Notablemente, la naturaleza del efecto citopático depende de la densidad celular en el cultivo. En condiciones de densidad celular baja, la mayoría de los linfocitos T CD4+ que expresan glicoproteínas del VIH altamente fusogénicas son lisados como células individuales debido a un proceso de necrosis, presumiblemente iniciado por la formación de complejos intracelulares entre las glicoproteínas virales y CD4 en vesículas de Golgi (11-12). La necrosis no ocurre en condiciones de alta densidad celular, en las cuales estas células se fusionan unas con otras formando sincicios multinucleados que finalmente sufren apoptosis (11).

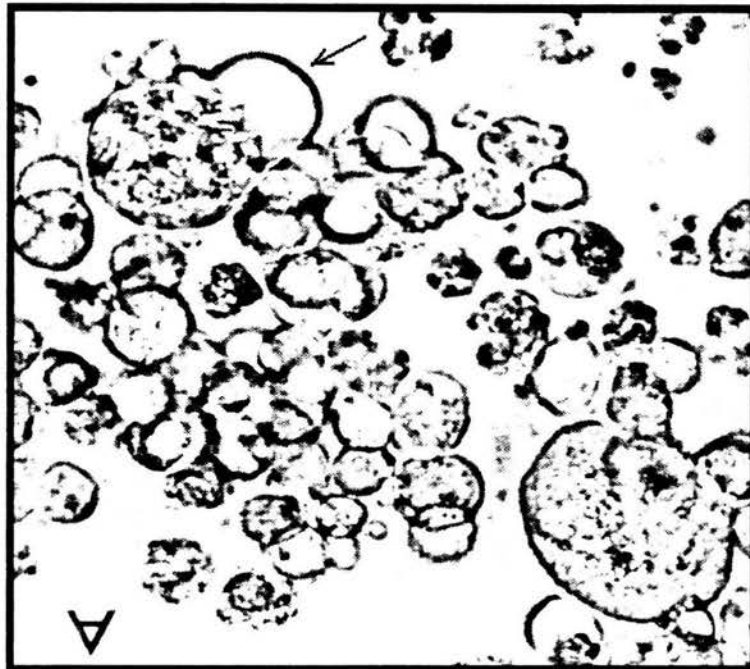


Figura 1. Citopatología característica inducida por el VIH "in vitro". Las membranas celulares se fusionan formando sincicios multinucleados y su permeabilidad se modifica produciendo hinchamiento celular (flecha) (8).

En las células fusionadas la apoptosis tiene lugar en un periodo de días (13, 14). Los eventos intracelulares involucrados han sido descritos por Castedo y cols (15) y Ferri y cols (16) quienes concluyeron que la apoptosis es el resultado de una iniciación fallida de la mitosis en las células fusionadas. Utilizando células HeLa transfectadas para la expresión de Env y células blanco CD4+, estos investigadores observaron un aumento transitorio de ciclina B después de la fusión de las membranas citoplásmicas, la cual es seguida de fusión del nucleoplasma (cariogamia), activación del blanco de rapamicina de mamíferos (mTOR) y fosforilación de p53. La estimulación de la expresión de Bax por p53 conduce a la permeabilización de las membranas mitocondriales y la liberación de proteínas apoptogénicas de este organelo .

La dinámica "in vitro" de la fusión celular ha sido estudiada por Soll y cols. en cultivos de líneas de células T infectadas por el VIH. Estos autores reportaron que los sincicios fusionan células mas rápidamente de lo que éstas se replican, son el mecanismo principal de muerte de células T en cultivos infectados por el VIH, que la muerte de un sincicio induce la formación local de nuevos sincicios y que los sincicios son la fuente principal de nuevo virus en los cultivos (17). Los autores atribuyen a estas células propiedades de motilidad

y de liberación de factores quimiotácticos, por lo que proponen que la fusión celular podría tener un papel muy importante en la muerte de linfocitos T y en el deterioro de los nódulos linfáticos que se observa en pacientes con progresión a SIDA (18-20).

La fusión celular inducida por el VIH se asocia comúnmente a hinchamiento celular ("balloning degeneration") (21) (**Figura 1**), causado por un aumento de la permeabilidad de la membrana a los iones Ca^{++} , Na^+ y K^+ . Cuando el volumen de las células aumenta más allá de los límites de la membrana plasmática, sobreviene la pérdida de la integridad de la membrana y la muerte de la célula. Aunque la proteína gp41 de la envoltura viral tiene propiedades de desestabilización de membranas (22), células transfectadas con el gene *env* no sufren hinchamiento, indicando que Env probablemente no causa las alteraciones de membrana que producen este efecto. En cambio, la entrada de iones podría ser causado por las proteínas virales Vpr y Vpu, proteínas integrales de membranas con conocida capacidad para formar canales iónicos en bicapas lipídicas (23-25).

3. La fusión celular "in vivo".

Durante el periodo asintomático de la infección por el VIH (ver Apéndice 2), la cantidad de virus libre y de células infectadas en la sangre es baja, lo cual inicialmente condujo a pensar en una relación directa entre el nivel de viremia y la condición clínica de los individuos infectados. Sin embargo, en la década de los 90 se descubrió que la replicación viral en las etapas tempranas de la enfermedad es más activa de lo que previamente se había considerado, y que esta actividad se localiza principalmente en los ganglios linfáticos y no en la sangre (26-27). La evolución de los tejidos linfoides infectados ha sido bien determinada, demostrándose una pérdida progresiva de la estructura ganglionar que culmina con su degeneración completa en los pacientes con SIDA (26). En este contexto, es interesante el hallazgo frecuente de sincicios multinucleados en biopsias de ganglios linfáticos de individuos infectados y en chimpancés infectados con el SIV (28-33). Previamente sincicios multinucleados infectados derivados de macrófagos habían sido detectados en el cerebro y la médula espinal de pacientes con infección por el VIH (34-37). En tejidos linfáticos, el tipo de células que componen estas formaciones se describe como macrófagos (38), células dendríticas (29) y linfocitos (38). En la mayoría de los casos los tejidos provinieron de pacientes asintomáticos y siempre presentaron replicación viral activa. Estas características han conducido a proponer que los sincicios podrían actuar como sitios de infección inicial y reservorios naturales de virus, los cuales se encontrarían inaccesibles a la acción del sistema inmune. Por otra parte, Amendola y cols mostraron que sincicios encontrados en biopsias de ganglio axilar de individuos VIH-positivos expresan transglutaminasa tisular, un marcador de apoptosis temprana (39). Por lo tanto, la fusión celular en los ganglios linfáticos es un mecanismo potencial de daño celular probablemente implicado en la degeneración tisular. En ninguno de los estudios mencionados se describe fusión heterotípica (fusión entre células de diferente tipo), aunque se reconoce que la fusión podría inducir cambios en los antígenos de la superficie celular, dificultado su identificación (29).

4. Fusión de membranas en la transmisión célula a célula.

Un fenómeno relacionado a la fusión de membranas mediado por las proteínas de la envoltura del VIH, es la capacidad de transmisión célula-célula de virus infeccioso sin fusión celular (**Figura 2**). Varios estudios han demostrado que la infección mediada por células es mucho más eficiente que la infección por virus libre (9, 40-42). Al igual que la formación de sincicios, este tipo de transmisión depende del complejo gp120/gp41, requiere el contacto estrecho entre las células, y la participación de moléculas de adhesión (9, 43-44). "In vitro", se ha demostrado transmisión eficiente de virus entre células dendríticas y linfocitos (45) entre linfocitos y epitelio cervical (46), de macrófago a linfocito (47) y de linfocito a linfocito (48). Se ha propuesto que la transmisión del VIH célula-célula puede ser más relevante que la infección por virus libres "in vivo", tanto en la transmisión entre individuos como en el mantenimiento de la infección crónica (42, 48-49). Notablemente, la transmisión célula-célula puede ocurrir aún en presencia de anticuerpos neutralizantes anti-VIH (43, 50-52) por lo que podría constituir un mecanismo de evasión inmunológica "in vivo".

5. Fusión celular y SIDA.

La velocidad de progresión a SIDA es variable entre los individuos infectados por el VIH-1 (**Apéndice 2**), siendo la cuenta de linfocitos T CD4+ y el estado clínico de los pacientes los parámetros principales para evaluar la progresión (**Apéndice 3**). El estudio simultáneo de los cambios en el número de linfocitos T CD4+, el estatus clínico, la carga viral y las propiedades biológicas de los virus aislados en momentos definidos en el transcurso de la infección, demuestra que la disminución de linfocitos se asocia con una carga viral aumentada y con la detección de variantes de VIH inductoras de sincicios en la sangre de los pacientes (53-56). El cambio en el fenotipo viral aparece típicamente de 4 a 5 años después de la infección en al menos 50% de los pacientes (7). Estas variantes citopáticas para líneas celulares poseen una alta cinética de replicación (53, 57) y utilizan como correceptor sólo a CXCR4, o bien a CXCR4 y CCR5 (58). En cambio, durante la infección temprana y el periodo asintomático, las variantes de virus aisladas son predominantemente trópicas para macrófagos y utilizan CCR5 como correceptor (53, 59) (**Figura 3**). En un estudio realizado en 1993 sobre una cohorte de 188 pacientes, se observó una asociación entre la presencia de virus inductores de sincicios al momento del inicio del estudio, y la frecuencia de progresión a SIDA en los 30 meses siguientes (**Figura 4**) (7).

Se ha demostrado que los virus que utilizan CCR5 se replican preferencialmente en células T activadas (de memoria/efectoras), mientras que los virus que interaccionan con CXCR4 son además capaces de infectar células T progenitoras intratímicas y linfocitos T no activados en el sistema linfoide periférico. Por lo tanto, se ha sugerido que la aparición de virus X4 afecta las reservas celulares del sistema inmune y favorece así al desarrollo de la inmunodeficiencia (57). Investigaciones conducidas en macacos sugieren que la formación de sincicios puede participar en pérdida de células T "in vivo". En un estudio por Sodroski y cols. se obtuvieron combinaciones genéticas simio-

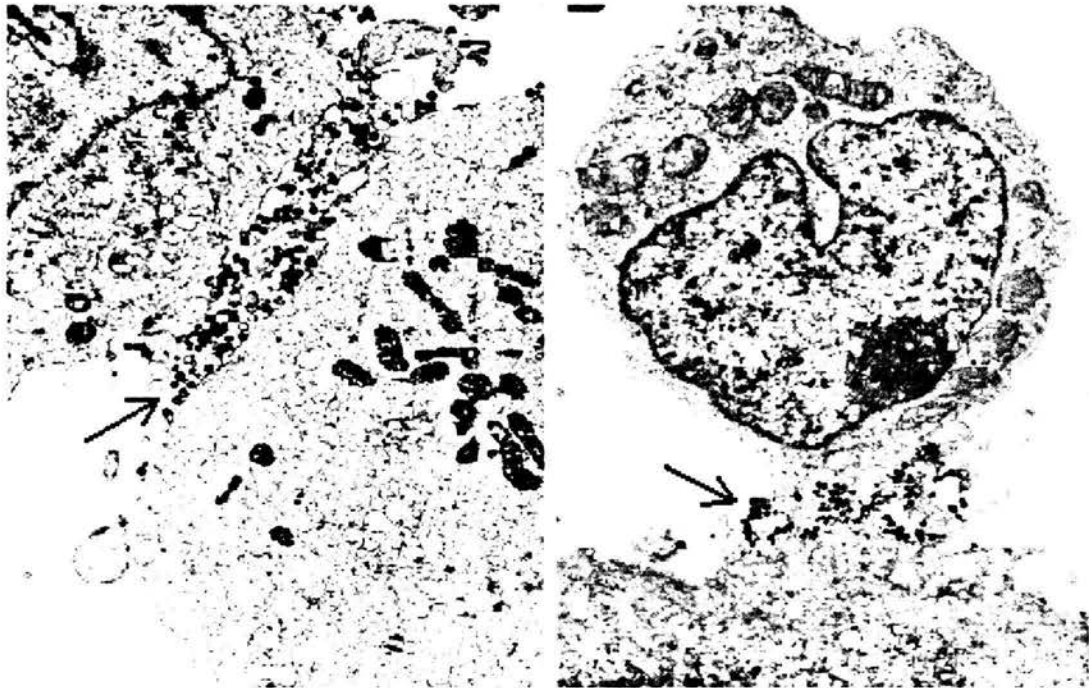
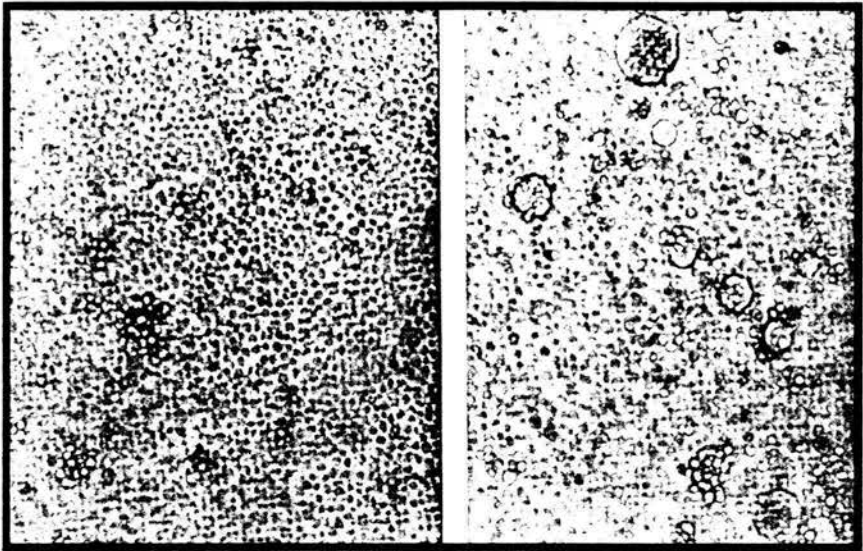


Fig. 2. Transmisión polarizada de partículas virales (flechas) en sitios de contacto célula-célula en cultivos de linfocitos T CD4+ (48).

humano de virus que contenían el gene *env* del VIH clonado en el provirus de simio, de modo que las quimeras obtenidas expresaban las glicoproteínas de la envoltura del VIH (quimeras SHIV). Después de varios pasajes *in vivo*, los virus quiméricos produjeron variantes patogénicas que causaron una profunda y rápida depleción de linfocitos T CD4+ en macacos (60). Los determinantes de esta actividad fueron localizados en los dominios exteriores de las glicoproteínas gp120 y gp41 y se mostró que especificaban incrementada actividad fusogénica y mayor afinidad en la unión a receptores de quimiocinas (56, 61). Por consiguiente, en este modelo la habilidad de las glicoproteínas de la envoltura del VIH para fusionar membranas determinó la eficiencia del virus para causar la disminución rápida de linfocitos T CD4+.

Por lo tanto, los mecanismos patogénicos responsables de la pérdida de células T CD4+ se relacionan no solo a cambios cuantitativos (incremento en la carga viral), sino también a cambios cualitativos del virus relacionados con su capacidad fusogénica en células T.



VIRUS TEMPRANO

VIRUS TARDÍO

Fig. 3. Aspecto de cultivos de líneas de células T infectadas por virus aislados de la sangre periférica de un paciente durante la etapa asintomática de la infección (virus temprano) y una vez que desarrolló SIDA (virus tardío) (7).

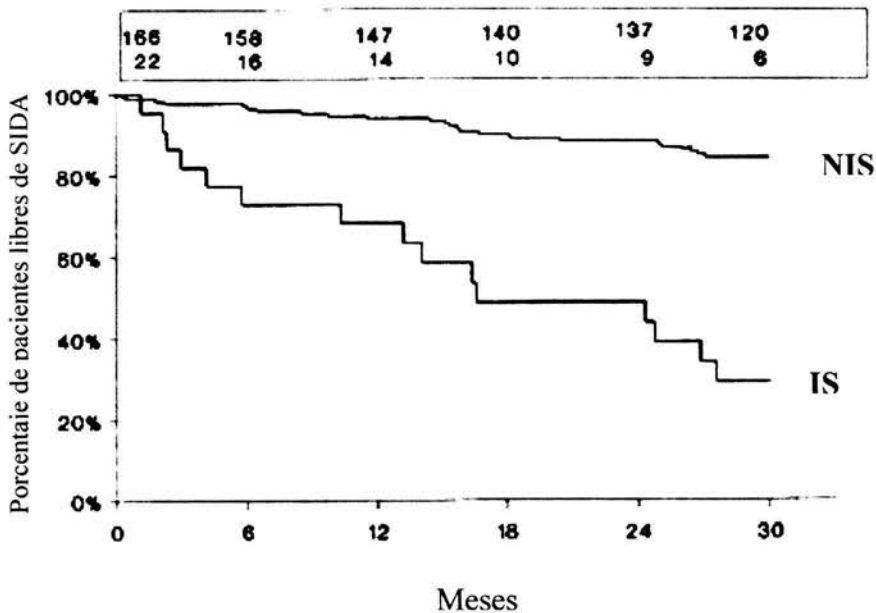


Figura 4. Gráfica de Kaplan-Meier de la frecuencia acumulada de progresión a SIDA DE 188 pacientes varones cuyo fenotipo viral se estableció al inicio del estudio. Se indica el numero de individuos en riesgo en cada punto de tiempo. **IS** = aislado viral inductor de sincicios; **NIS** = aislado viral no inductor de sincicios.

6. Las proteínas de fusión del VIH.

El proceso de fusión celular mejor estudiado es el que ocurre durante la infección de una célula hospedera por un virus con envoltura. Como consecuencia de su papel en la entrada del virus a la célula huésped, estas moléculas están implicadas también en importantes aspectos biológicos de la interacción virus-célula y virus-sistema inmune: tropismo, infectividad, actividad de anticuerpos neutralizantes y formación de sincicios.

El complejo de glicoproteínas de la envoltura del VIH (Env) consiste de dos subunidades asociadas no covalentemente, gp120 y gp41, que son sintetizadas inicialmente como un precursor único (gp160), el cual es procesado por una proteasa celular. La gp120 es la proteína más externa y contiene los sitios necesarios para la unión del virus a las células blanco específicas, es hipervariable y se encuentra expuesta en forma de espículas asociadas con residuos de azúcar. La gp41 es transmembranal y contiene las estructuras requeridas para la oligomerización del complejo, su fijación a la membrana viral y los dominios requeridos para la fusión de la membrana viral con la membrana celular (62) (**Figura 5**).

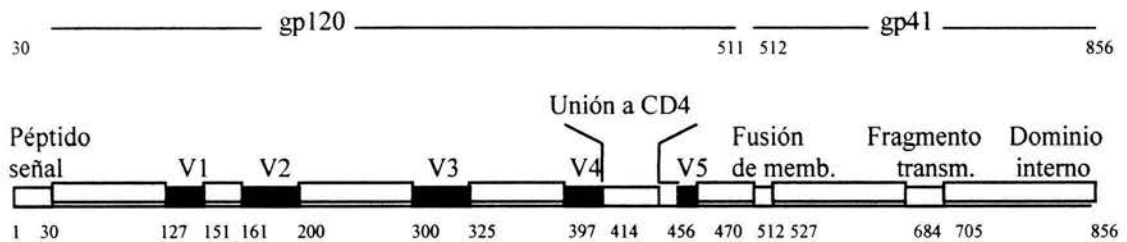


Figura 5. Diagrama lineal de la proteína precursora gp160 de la envoltura del VIH. Las regiones sombreadas son los dominios hipervariables, los bloques blancos representan las regiones relativamente conservadas (63).

Hasta la fecha se ha determinado la secuencia de nucleótidos de al menos 400 aislados virales independientes, las cuales están contenidas en la Base de Datos de Secuencias del VIH del Laboratorio de Los Álamos (64). La variabilidad reside sobre todo en las proteínas de la envoltura, donde puede alcanzar hasta 30% en la secuencia de aminoácidos (64).

Las **figuras 6 y 7** muestran modelos de las moléculas gp120 y gp41 del VIH, elaborados por Gallaher (65-66). Los modelos se basan en predicciones de algoritmos computacionales y en la comparación de la secuencia de gp120 y gp41 con la de otras proteínas de la superficie de la familia de los retrovirus, así como en consideraciones biológicas, inmunológicas o propiedades genéticas. Sin embargo, la organización espacial de estas proteínas ha sido parcialmente

dilucidada en los últimos años. La **figura 8** muestra la estructura cristalográfica de una molécula desglicosilada de gp120 a la cual se truncaron las 4 regiones variables, obtenida por los grupos de W. Hendrickson y J. Sodroski en 1998 (67). La molécula mostrada se obtuvo en complejo con CD4 y con la cadena ligera de un fragmento Fab del anticuerpo monoclonal 17b. Por lo tanto, la estructura obtenida corresponde a la conformación de gp120 después de la interacción con CD4. La cavidad central contiene el sitio de unión para CD4, mientras que la base forma el sitio de unión para el correceptor. Ambas regiones se encuentran rodeadas por las regiones hipervariables adyacentes, las cuales modulan la interacción con los receptores. Otras implicaciones de esta estructura se discuten en las refs. 68 y 69.

7. Modelo general de la fusión de membranas mediada por Env.

La fusión de membranas es un proceso cooperativo. Se estima que cuatro a cinco receptores CCR5, múltiples moléculas CD4, y tres a seis trímeros Env se necesitan para formar un poro de fusión (revisado en ref. 62). La secuencia de eventos moleculares que conducen a la fusión de membranas durante la formación de sincicios, es análoga al proceso de fusión virus-célula: a) el VIH se une a la superficie celular a través de la interacción gp120-CD4 (62) y moléculas de adhesión derivadas de la célula que contribuyen a la eficiencia de la unión (70-71) b) cambios conformacionales en gp120 que exponen sitios en esta proteína (y probablemente en gp41) que interactúan con el correceptor, c) extensión de un complejo de fusión trimérico helicoidal de gp41, d) exposición del péptido de fusión del extremo amino-terminal de gp41, el cual se inserta en la membrana de la célula blanco, e) la extensión del péptido de fusión es seguida por el empaquetamiento de las hélices amino-terminales y carboxilo-terminales de tres moléculas de gp41, formando un paquete de 6 hélices (revisado 62). Se ha determinado que el cambio en energía libre de la transición del oligómero de gp41 a su estado activado es suficiente para formar un poro de fusión (72) (**Figuras 9 y 10**).

CD4 (**Figura 11**) está altamente expresado sobre células T y en menor medida sobre macrófagos, células dendríticas y microglía, todas las cuales unen al VIH. La interacción entre CD4 y gp120 monomérica es de alta afinidad (1 a 10 nM), aunque la unión de CD4 con gp120 asociada a la membrana viral o a células transfectadas con el gene *env*, a menudo es débil. La oligomerización de gp160 en trímeros de heterodímeros de gp120/gp41, al parecer tiene un efecto dramático sobre la accesibilidad del sitio de unión a CD4, reduciendo la afinidad por CD4 soluble en aproximadamente tres órdenes de magnitud (revisado en ref. 73). En contraste con la complejidad del sitio receptor de gp120, el reconocimiento por parte de la molécula CD4 está determinado por el residuo 43 (fenilalanina) localizado en el dominio CDR2 de esta proteína (74).

Las proteínas de la envoltura viral inducen la fusión de membranas mediante la interacción con la molécula CD4 y con un correceptor apropiado. En 1996 varios grupos reportaron que dos receptores para moléculas quimiotácticas para monocitos y linfocitos (CCR5 y CXCR4) funcionan como segundos receptores para el VIH (75-77) (**Fig. 9**). Estas moléculas están

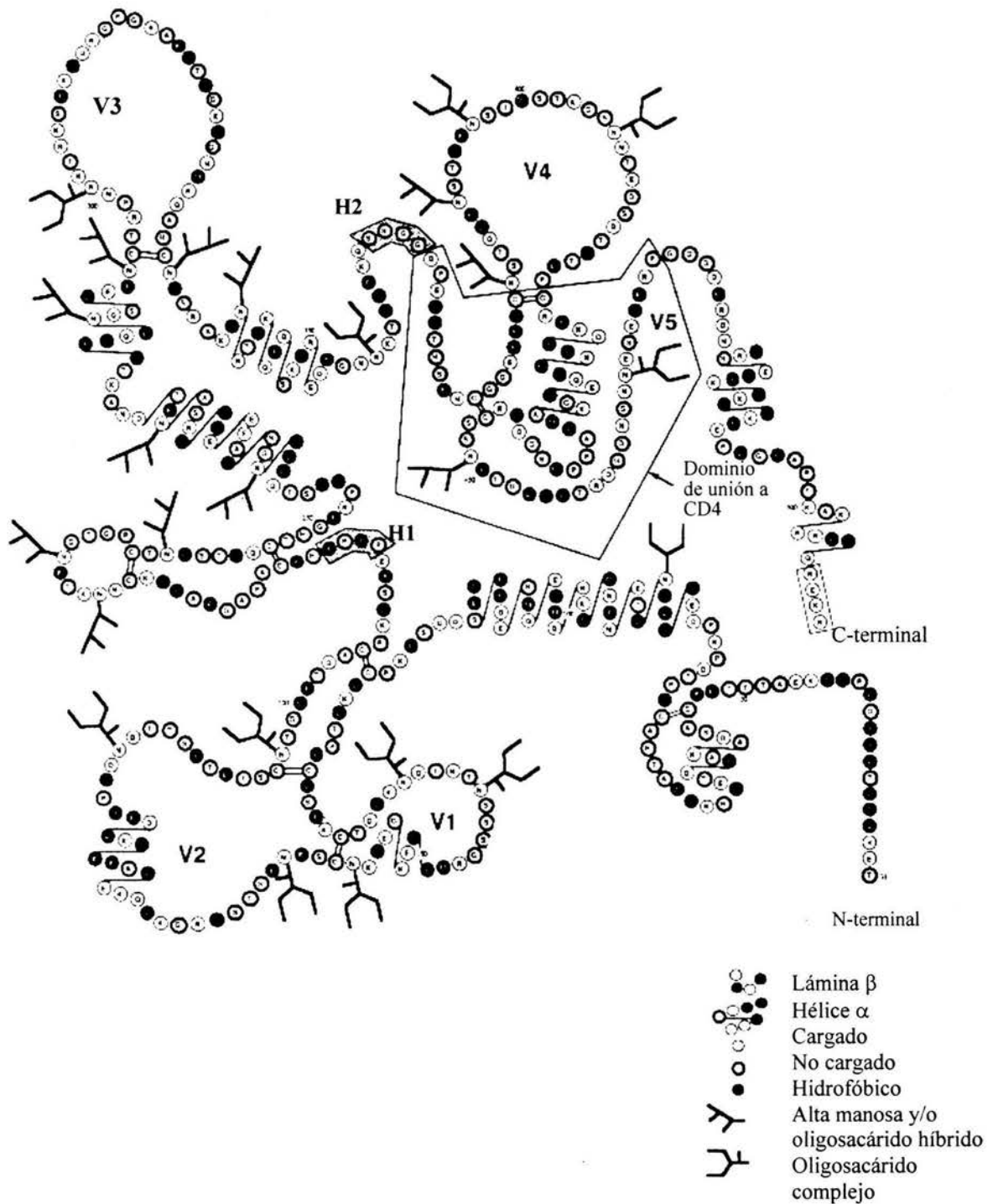


Figura 6. Modelo de gp120. La glicoproteína aparece como una estructura subdividida en tres dominios (carboxilo-terminal, central y amino-terminal), separados por dos regiones de "bisagra" altamente conservadas (H1 y H2). Las 5 regiones hipervariables (V1-V5) están organizadas como horquillas y las 5 regiones relativamente conservadas (C1-C5) como láminas beta y hélices. Los oligosacáridos comprenden aproximadamente la mitad del peso molecular total y se distribuyen más densamente hacia el centro de la secuencia (65).

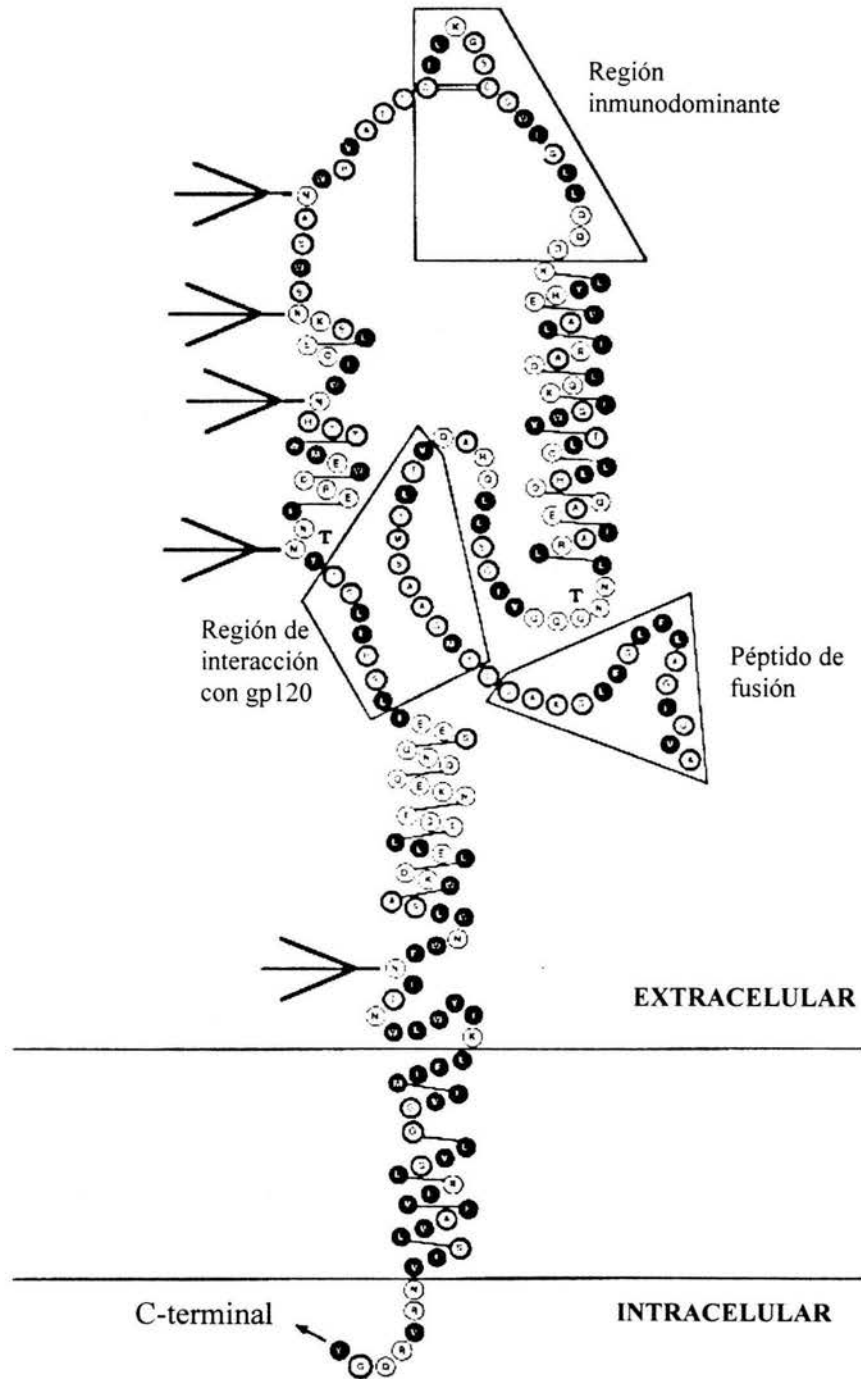


Figura 7. Modelo de gp41 del VIH-1. Las secuencias que incluyen líneas son hélices alfa. Los aminoácidos hidrofóbicos se muestran con círculos oscuros, los aminoácidos cargados con los círculos abiertos y los aminoácidos neutros con círculos parcialmente llenos. T = doblamiento. Los sitios de glicosilación se muestran con flechas (66).

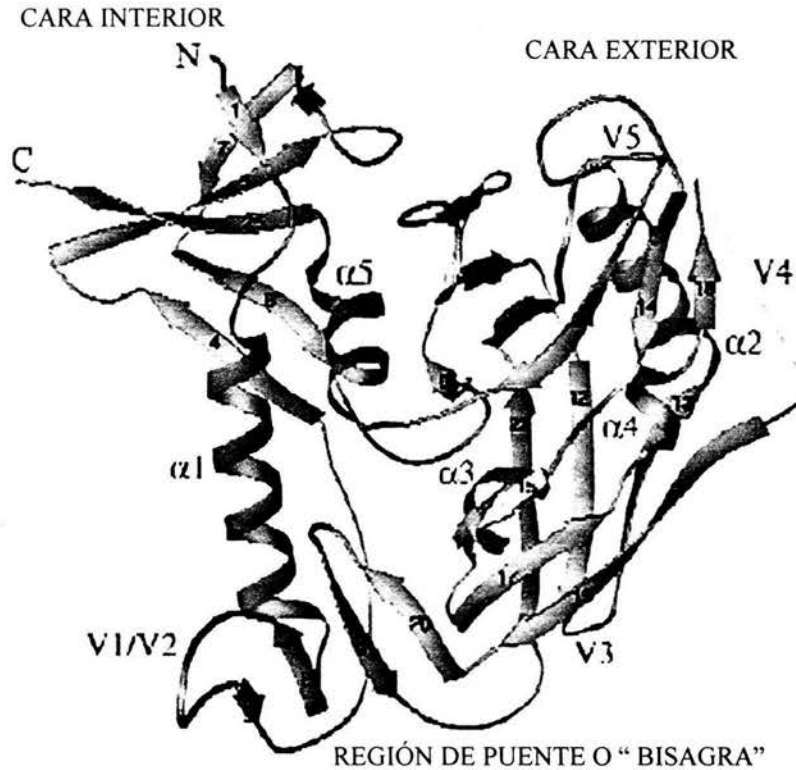


Figura 8. Estructura obtenida por cristalografía de rayos X del monómero de gp120 de la cepa HXBc2 del VIH, en su conformación de unión con CD4 (la molécula CD4 se ha removido de la estructura para permitir la visualización de gp120). Las regiones variables (cuya posición se señala en la figura) y grupos glicosídicos fueron truncados para facilitar la cristalización. La estructura muestra un dominio interno relativamente conservado que interacciona con gp41, un dominio externo más variable el cual se expone sobre la superficie de la molécula, y una región de puente conservada que constituye el sitio de unión del correceptor. La cavidad central se encuentra formada por las cadenas laterales de los aminoácidos que conforman el sitio de unión para CD4 (68).

implicadas en el paso de fusión y requieren cooperación con el receptor CD4 para permitir la entrada del virus a las células. Los ligandos naturales de éstos receptores (RANTES, MIP-1 α y MIP-1 β) actúan como agentes antivirales, de modo que una sobreproducción de estas moléculas correlaciona con resistencia a la infección presumiblemente debido a mecanismos de competencia por la unión a los receptores CCR5 y CXCR4 (78-79).

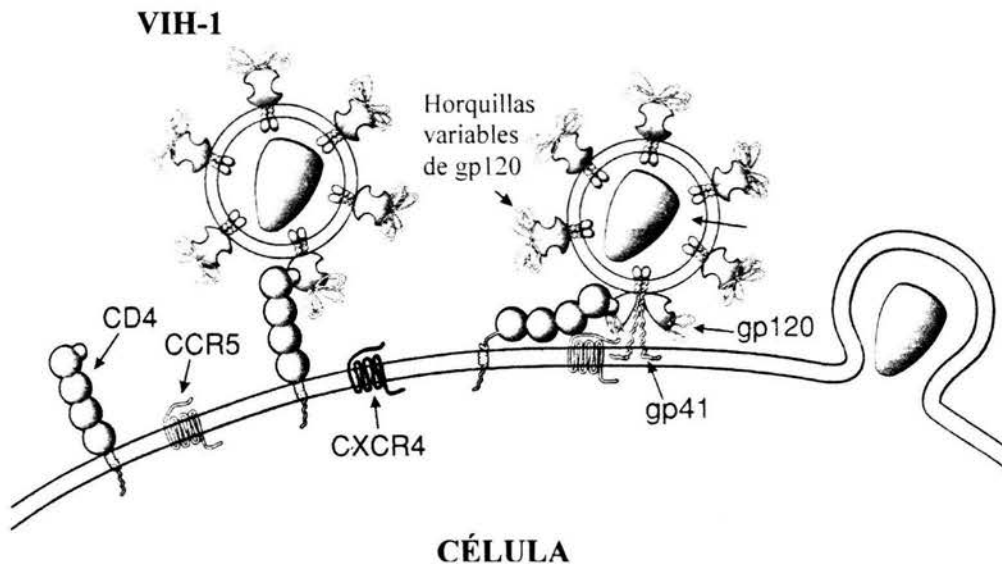


Figura 9. Esquema de la interacción del VIH con los receptores de la membrana celular. La interacción de gp120 con CD4 induce cambios conformacionales en gp120 que favorecen la unión de gp120 con el correceptor, lo cual induce a su vez la conformación activa de gp41 que produce la fusión de membranas.

8. Otras moléculas involucradas en la fusión.

Las evidencias señalan que el resultado de la interacción entre las proteínas virales y los receptores específicos sobre las células blanco depende tanto de factores virales (principalmente de la secuencia de aminoácidos de Env), como de factores de la membrana de la célula huésped. Por ejemplo, el tratamiento de líneas de células T con heparinasas produce una pérdida de la capacidad de unir virus X4 o R5X4 (revisado en la ref. 80). Se ha planteado la posibilidad de que la interacción específica del dominio de fusión de gp41 con el sulfato de heparán de la membrana de linfocitos T, potencie significativamente la fusión de membranas (82). En contraste, la interacción de virus R5 con CCR5 no depende del contenido de sulfato de heparán sobre las células blanco. Por lo tanto, el uso de distintos correceptores parece implicar interacciones moleculares altamente dependientes de la célula blanco.

El estado de activación celular también influye en la capacidad fusogénica de las células a través de la estimulación de la expresión de moléculas de adhesión. Normalmente, dicha estimulación conduce a la polarización celular con reclutamiento de ICAM-1 y -3 sobre el sitio de adherencia, promoviendo la activación y migración transendotelial. En el caso

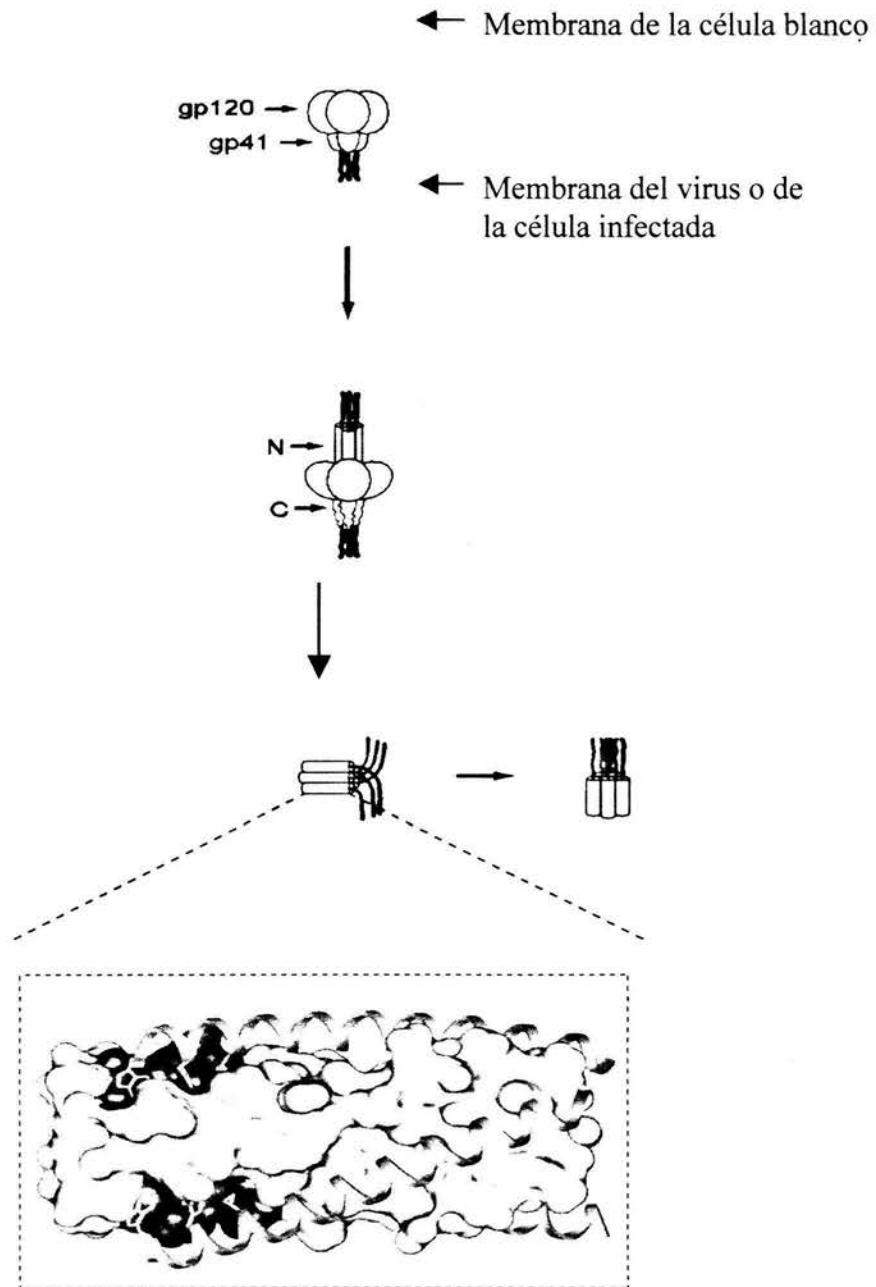


Figura 10. Modelo de los cambios conformacionales de gp41 durante la fusión de membranas. La interacción de gp120 con CD4 y el correceptor, induce una conformación extendida del trímero de gp41, la cual es transitoria y propicia la inserción del extremo amino terminal de esta molécula en la membrana de la célula blanco. Un doblamiento posterior del trímero produce una estructura compuesta de 6 hélices empaquetadas que induce la fusión de membranas (62). N=hélices del extremo amino terminal; C=hélices del lado carboxilo terminal.

de células infectadas, la transmisión del VIH depende mucho del contacto célula-célula a través de LFA-1 y sus ligandos. Anticuerpos dirigidos a ICAM-1, ICAM-2, o ICAM-3, (los tres ligandos conocidos de LFA-1), pueden bloquear la formación de sincicios y la transmisión del virus célula-célula (70-71, 80-81). Por lo tanto, la estimulación de los linfocitos por citocinas puede favorecer la fusión celular directamente mediante la estimulación del contacto estrecho entre las células a través de moléculas de adhesión.

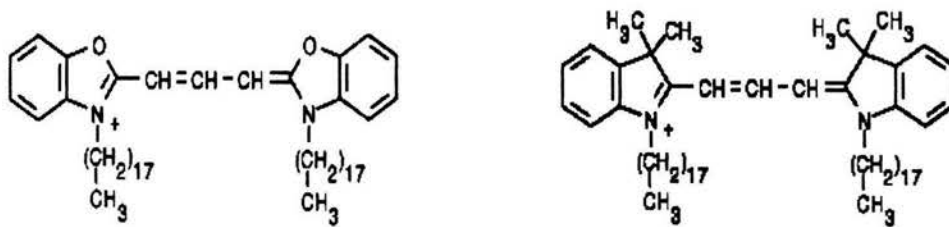
En el caso de la fusión célula-célula, la unión de las membranas que precede a la fusión y las distintas moléculas celulares implicadas en este proceso, modulan la fusión y por lo tanto juegan un papel importante en la determinación del tipo de células participantes y en la extensión de la misma.

9. Utilidad de los trazadores lipofílicos fluorescentes para la cuantificación de la fusión celular.

La fusión virus-célula y célula-célula mediada por proteínas de la envoltura de virus se ha estudiado por métodos diversos que incluyen: cuenta directa del número de células gigantes multinucleadas, redistribución de trazadores fluorescentes combinada con microscopía de fluorescencia, recobramiento de fluorescencia, transferencia de energía por resonancia, fotosensibilización y genes reporteros. Algunos de estos métodos proveen una estimación sensible aunque global de la fusión, mientras que otros se han usado para el seguimiento detallado de la cinética de los cambios en los compartimentos lipídico y citosólico por microscopía de fluorescencia, permitiendo el estudio de los mecanismos de fusión (revisado en ref. 83).

Las carbocianinas lipofílicas DiI (DiIC₁₈(3)) y DiO (DiOC₁₈(3)) utilizadas en este trabajo se han usado ampliamente para marcar células, organelos, liposomas, virus y lipoproteínas para aplicaciones que incluyen estudios de trasplante celular, migración, adhesión, y trazamiento axonal (revisado en ref. 84). Su estructura química consiste de un grupo polar tipo indocarbocianina y dos cadenas alquil hidrofóbicas de 18 carbonos.

DiI y DiO exhiben fluorescencia roja y verde, la cual es detectable con filtros ópticos estándar para rodamina y fluoresceína. Son débilmente fluorescentes en agua pero altamente fluorescentes y fotoestables cuando se incorporan en membranas. Sus coeficientes de extinción son extremadamente altos ($\epsilon > 125,000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ a la longitud de onda de absorción máxima). Una vez aplicados a las células, los colorantes difunden lateralmente dentro de la membrana plasmática, tiñendo la célula completa. Usualmente, la transferencia de estos trazadores entre membranas intactas es despreciable debido a que su cadena de 18 carbonos permite un anclaje estable en las membranas (**Figura 11**). Las soluciones concentradas de estos trazadores deben prepararse en alcohol o dimetilsulfóxido (DMSO) y adicionarse directamente a las suspensiones celulares. La presencia de DiI y DiO en la membrana celular no afecta apreciablemente la viabilidad celular, el desarrollo, u otras propiedades fisiológicas básicas (revisado en la ref. 85).



DiO

DiI

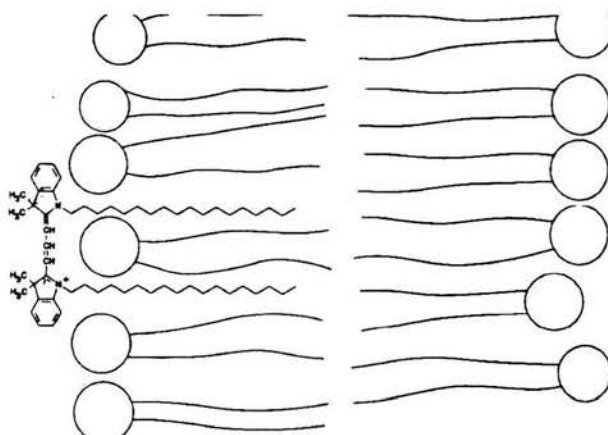


Fig. 11. Estructura química de los trazadores lipofílicos utilizados y su inserción en la membrana celular (85).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1. Eventos de fusión entre células infectadas y células no infectadas constituyen una forma de diseminación del VIH-1 a través de la transmisión célula a célula, así como un mecanismo de daño para las células fusionadas y probablemente para células circundantes no infectadas.
2. La detección de variantes virales que inducen fusión celular en cultivos de líneas de células T se asocia a un aumento de la velocidad de disminución de linfocitos T CD4+ en la sangre y con la progresión a SIDA.
3. La fusión célula-célula es conspicua "in vitro" y es frecuentemente encontrada "in vivo". Sin embargo, su papel como mecanismo patogénico está poco estudiado.

HIPÓTESIS

La fusión de membranas celulares es un evento de importancia significativa en la patogénesis del SIDA.

OBJETIVO

Evaluar la importancia de la fusión de linfocitos CD4+ como probable mecanismo patogénico en el SIDA.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.** Diseñar y caracterizar un método cuantitativo para medir la fusión célula-célula dependiente de las proteínas de la envoltura del VIH por citometría de flujo.
- 2.** Determinar la relación entre el efecto de anticuerpos del suero de individuos VIH-positivos sobre la fusión y su relación con el estado clínico de los pacientes, así como con indicadores de progresión a SIDA.
- 3.** Estudiar los factores que determinan la capacidad fusogénica de las células que expresan gp120/gp41.

DISEÑO EXPERIMENTAL

- 1.** Adaptación de un modelo de fusión celular "in vitro" dependiente de las proteínas de fusión del VIH-1. El modelo consiste de una línea celular linfocitaria (Jurkat) establemente transfectada para la expresión de las proteínas gp120/gp41 de una cepa viral altamente fusogénica (células HXBc2), en cocultivo con células Jurkat no transfectadas (células E6), las cuales son naturalmente CD4⁺CXCR4⁺. Este ensayo permite el estudio de la función de las proteínas de la envoltura viral en el contexto de la membrana celular.
- 2.** Diseño y caracterización de un método de citometría de flujo para la cuantificación directa y objetiva de los productos de la fusión.
- 3.** Estudio transversal del efecto de los anticuerpos del suero de individuos infectados por el VIH-1 sobre la fusión y su relación con los parámetros clínicos de la infección (nivel de linfocitos T CD4⁺, carga viral y estadio clínico).
- 4.** Determinación de la dinámica del reclutamiento celular en los sincicios y la estequiometría de los mismos.

MATERIALES Y METODOS

1. Anticuerpos monoclonales

	Num. cat. AIDSRRRP	Num. cat. BD Pharmingen	Num. cat. Otros
• No conjugados			
Anti-HIV gp120 V3 (IIIB-V3-21):	1725		
Anti-HIV gp120 (F105):	857		
Anti-HIV gp120 (902):	522		
Anti-HIV gp120 (2G12):	1476		
Anti-CD4:		555343	
Anti-CXCR4 (12G5):	3439	555971	
Anti-CXCR4 (A-145): (MBL)			A123-3
Anti-CCR5 (2D7)	3933	555990	
• Conjugados			
Anti-CD4-Fluoresceína		555346	
Anti-CXCR4(12G5)-ficoeritrina		557145	
Anti-CXCR4 (12G5)-ficoeritrina		36195X	
Anti IgG humana-fluoresceína (Zymed) Anti-IgG humana-ficoeritrina		555787	62-7111
Anti-IgG1 de ratón-fluoresceína		553443	
Anti-IgG3 de ratón fluoresceína		553403	
• Controles de isotipo			
IgG ₁ k-Fluoresceína		555748	
IgG _{2a} -Ficoeritrina		555574	

2. Otros reactivos

CD4 soluble: AIDSRRRP num. cat. 1813.
SDF-1 α : BD Pharmingen, num. cat. 555105.

3. Líneas celulares

• Jurkat HXBc2(4) (denominada en lo subsiguiente HXBc2): células establemente transfectadas para la expresión inducible del complejo gp120/gp41 del VIH-1. Estas células fueron transfectadas inicialmente con un plásmido (regulador) que codifica para el activador VP16 de citomegalovirus

fusionado con un represor dependiente de tetraciclina (secuencia tTA), acoplado con una secuencia de resistencia a neomicina. Una segunda transfección introdujo un plásmido (respondedor) con los genes *env* y *rev* de la cepa HXBc2 del VIH-1 acoplados a secuencias operadoras de tetraciclina y a un promotor mínimo de citomegalovirus, al cual le fué insertado un gene de resistencia a higromicina (12) (**Figura 12**).

- Jurkat 522F/Y (denominadas en lo subsiguiente 522): transfectadas para la expresión inducible de gp120/gp41. Obtenidas como HXBc2 pero con una sustitución F/Y en la posición 522 del precursor gp160, localizada en el extremo amino terminal de gp41 (12).
- Jurkat clona E6-1 (denominada en lo subsiguiente E6): no transfectada.

HXBc2 y 522 se obtuvieron por donación del Dr. Joseph Sodroski (Harvard Medical School, Boston, Mass.) y E6 del Dr. Robin Weiss, a través del Programa de Reactivos de Referencia e Investigación en SIDA, (AIDS RRRP), Institutos Nacionales de Salud, Estados Unidos.

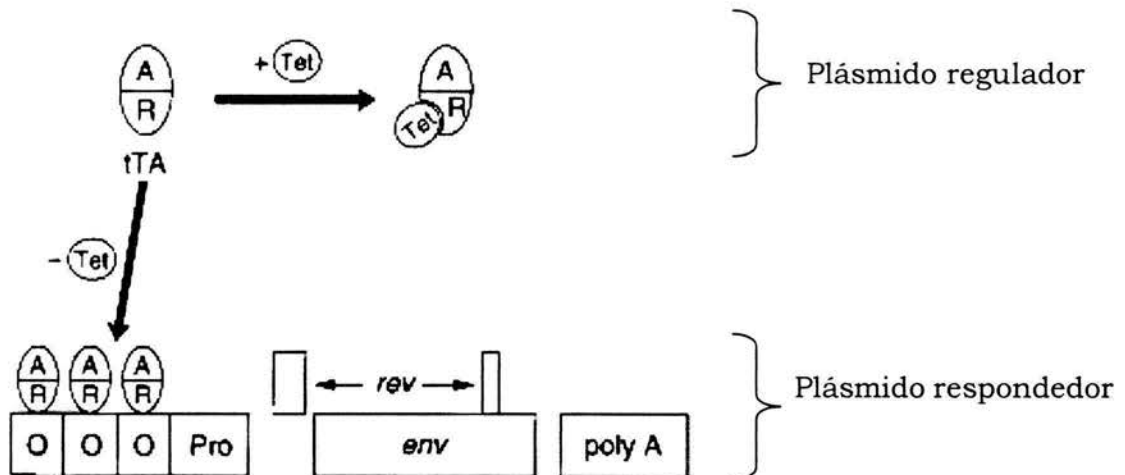


Figura 12. Sistema para la expresión inducible de las glicoproteínas de la envoltura del VIH-1. La unión de la proteína tTA, (la cual contiene el activador A fusionado al represor tet R), al operador es inhibida por tetraciclina (Tet) (12).

4. Marcadores lipofílicos fluorescentes

- DiI (perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina): energías de excitación y emisión 549 y 565 nm (rojo) respectivamente.
- DiO (perclorato de 3,3'-dioctadeciloxacarbocianina): energías de excitación y emisión 484 y 501 nm (verde) respectivamente.

Las estructuras y propiedades de estos colorantes se describen en la "Introducción" y en la **figura 11**. Ambos colorantes se obtuvieron de Molecular Probes (Eugene, OR).

5. Preparación de las soluciones de colorantes

Se prepararon soluciones de DiO y DiI a 3.5 mg/ml in DMSO estéril. El DiO requirió sonicación breve para su solubilización completa. Para marcar las células se prepararon diluciones 1:10 de DiI y 1:30 de DiO en el mismo solvente. Las soluciones se almacenaron protegidas de la luz a temperatura ambiente. En estas condiciones la fluorescencia del DiI es estable durante aproximadamente 1 año. En cambio, la fluorescencia del DiO decae aproximadamente 50% cada mes, por lo que es necesario incrementar con frecuencia la cantidad de solución adicionada a las células a fin de obtener un nivel de fluorescencia constante, cuidando de no sobrepasar una concentración final de DMSO del 10%. En este caso, se preparó una nueva dilución de DiO.

6. Cultivo celular e inducción de la expresión de *env*

Las células E6 se mantuvieron constantemente en medio RPMI (Gibco BRL, Rockville, MD) con 10% de suero fetal bovino (Gibco BRL) y 50 U/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomycin (RPMI-10). Las células HXBc2 y 522 se crecieron en RPMI-10 con 200 µg/ml de geneticina, 200 µg/ml de higromicina, y 1µg/ml de tetraciclina (12).

Para inducir la expresión de *env*, las células HXBc2 y 522 se lavaron 2 veces con 40 ml PBS y se cultivaron por 3 días en medio RPMI-10 sin tetraciclina antes de los experimentos de fusión, manteniendo las concentraciones de geneticina e higromicina a las concentraciones indicadas antes. Las células inducidas y las células E6 se marcaron con los colorantes fluorescentes un día antes del ensayo de fusión.

7. Tinción de las células con DiI y DiO

- Las células se ajustaron a una concentración de 5 - 15x10⁶ células/ml in RPMI-10 en tubos de 15 ml y se agregaron aproximadamente 11 µl de DiI o 20 µl de DiO de las diluciones indicadas antes. (Puesto que la fluorescencia decae con el tiempo, frecuentemente se hicieron pruebas previas de marcaje con 2 o 3 concentraciones de los colorantes, en el rango de 5 a 30 µl/ml de células, para conseguir entre 10² y 10³ unidades de intensidad de fluorescencia).
- Después de adicionar los colorantes, las células se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente, protegidas de la luz, con agitación suave.
- Después de centrifugar y descartar el sobrenadante para remover el exceso de colorante, las células se lavaron 2 veces con 10 volúmenes de medio RPMI-10.
- Las células marcadas se resuspendieron en RPMI-10 y se dejaron en el incubador a 37°C con 5% de CO₂.

8. Ensayo de fusión

- Las células marcadas se centrifugaron a 1100 rpm, 3 minutos y se resuspendieron en un medio libre de suero (AIM-V, Gibco BRL), ajustando a 2.2×10^6 células/ml.
- Las células HXBc2 se repartieron en una placa de 96 pozos, colocando 90 μ l de células (0.2×10^6) en cada pozo.
- Se añadieron cantidades adecuadas de suero o de anticuerpos monoclonales anti-gp120 o anti-gp41 a cada pozo para conseguir las concentraciones finales indicadas, por duplicado, incluyendo 2 pozos con células sin suero o anticuerpo monoclonal y 2 pozos con células 522 (no fusogénicas).
- A un volumen igual (90 μ l) de células E6 se agregaron las diluciones señaladas del anticuerpo monoclonal anti-CD4.
- Las células se preincubaron con el suero o anticuerpos monoclonales durante 40 minutos a 37°C y 5% de CO₂.
- Se añadieron 90 μ l (0.2×10^6 células) de E6 o HXBc2 a los pozos correspondientes y el cocultivo se preincubó 5 horas (a menos que se indique otro periodo) a 37°C y 5% de CO₂ para permitir la fusión.
- Para el análisis por citometría de flujo, las células se colectaron de cada pozo con una micropipeta y se colocaron en tubos de FACS con 3 ml de buffer de fosfatos 10 mM con 126 mM de NaCl, pH 7.4. Se lavaron por centrifugación a 1100 rpm 3 minutos, y se resuspendieron en 300 μ l de buffer de FACS (Becton Dickinson) o bien en 300 μ l de paraformaldehído al 2% en PBS.

9. Análisis por citometría de flujo

Las células se analizaron en un citómetro de flujo modelo FACScan (Becton Dickinson) y el programa Cell Quest (Becton Dickinson), ajustando la compensación utilizando células marcadas no cocultivadas. Se capturaron 10,000 eventos de cada tubo, con registro de tamaño (FSC-H), granularidad (SSC-H), fluorescencia verde (FL1-H) y fluorescencia roja (FL2-H). Para disminuir la cantidad de agregados celulares, las células se disociaron utilizando una pipeta automática justo antes de su captura. El porcentaje de inhibición se calculó con respecto a la fusión obtenida en cocultivo HXBc2-E6 en ausencia de inhibidor.

10. Inmunofluorescencia directa para CD4 y CXCR4

- Todo el procedimiento se realizó en hielo y las soluciones se filtraron usando membranas de nitrocelulosa con poro de 0.22 μ m.
- Las células se colocaron en tubos de 15 ml y se centrifugaron a 1110 rpm, 3 min. para eliminar el medio de cultivo.
- Se lavaron una vez con amortiguador de lavado (PBS con 0.1% de azida de sodio).
- Se resuspendieron en buffer de tinción (PBS con 0.1% de azida de sodio y 2% de suero fetal bovino, ajustando a 2×10^7 células/ml).

- Se distribuyeron en tubos de 5 ml, colocando 50 μ l de células (1×10^6) en cada tubo.
- Se agregaron 5 o 10 μ l del anticuerpo fluorescente correspondiente y se incubó por 40 minutos.
- Se agregaron 2 ml de amortiguador de lavado frío, se centrifugó y descartó el sobrenadante.
- Las células se resuspendieron en 200 μ l de paraformaldehído al 1% en PBS y se almacenaron en la oscuridad a 4°C protegidas de la luz.
- Para capturarlas en el citómetro de flujo, se agregaron 500 μ l de PBS a cada tubo.

11. Adsorción de los anticuerpos del suero con Proteína G-Sefarosa

- La Proteína G-Sefarosa (Sigma, num.cat P-4691) se lavó 3 veces con 50 ml de agua MQ estéril en un embudo Buchner.
- Se pasó a una columna de plástico de 10 ml y se estabilizó con 60 ml de amortiguador de fosfato de sodio 20 mM, pH 7.2. Se agregó amortiguador hasta aproximadamente 0.5 cm por arriba de la suspensión.
- Para distribuir en los tubos, se agitó con una punta de 1 ml y se colocaron 50 μ l de sefarosa en tubos de plástico de 1.5 ml.
- Se agregaron a cada tubo 140 μ l de medio AIM-V.
- Se centrifugó el suero a 12,000 rpm, 5 min en frío y se separaron los lípidos.
- Se colocaron 60 μ l de suero a cada tubo.
- La mezcla se incubó a 24°C con agitación rotatoria, 40 min (Adsorción 1).
- Se centrifugó con un pulso de 10 segs en la microcentrífuga. Se separó el sobrenadante y se continuó como se indica en el esquema siguiente hasta completar 3 adsorciones.

Adsorción 1:

50 μ l sefarosa
 140 μ l AIM-V
 60 μ l suero
 Total: 250 μ l
 (Dilución del suero 1:4.17)

Adsorción 2:

50 μ l sefarosa
 40 μ l AIM-V
 190 μ l sobrenadante de la adsorción 1
 Total: 280 μ l
 (Dilución del suero 1:1.47)

Adsorción 3:

50 μ l sefarosa
 40 μ l AIM-V
 220 μ l sobrenadante de la adsorción 2
 Total: 310 μ l
 (Dilución del suero 1:1.41)

- Dilución del suero adsorbido: 1:8.6.
- Se tomaron 200 µl del sobrenadante final y se diluyó con 150 µl de medio AIM-V (dilución 1:1.75). Volumen total: 350 µl.
- Se usaron 100 µl/pozo para experimento de fusión, ajustando las células a $0.2 \times 10^6/50 \mu\text{l}$, de modo que el volumen total en el pozo fue de 200 µl. Así, la dilución final del suero fue de 1:30.1.

12. Análisis estadístico

Los resultados de la fusión se presentan como el promedio de los duplicados \pm la desviación del promedio. Las correlaciones entre variables se determinaron mediante un coeficiente de correlación de Pearson. Las comparaciones entre grupos se llevaron a cabo usando la prueba *t* de Student para grupos no emparejados.

13. Cálculo de la estequiometría promedio de la fusión

Los porcentajes de células fusionadas y no fusionadas en después de cierto periodo de incubación de los cocultivos se pueden expresar como sigue:

$$\frac{X_o - rF}{T} + \frac{Y_o - mF}{T} + \frac{F}{T} = 1 \quad (1)$$

donde

X_o = número inicial de células E6 (o células blanco), y

Y_o = número inicial de células HXBc2 cells (Env+),

r = número promedio de células E6 que se incorporan en los sincicios por cada célula HXBc2,

m = número promedio de células HXBc2 que se incorporan en los sincicios,

F = número de sincicios

T = número total de células.

Así el primero y segundo términos de la ecuación 1 corresponden a la proporción de células E6 y HXBc2 que permanecen no fusionadas, respectivamente, mientras que el último término corresponde a la proporción de fusiones.

Cuando el cocultivo se inicia con una relación 1:1 ($X_o = Y_o$), y las fusiones incorporan al menos una célula HXBc2 cells ($m = 1$), se puede demostrar que

$$r = \frac{1 - 2\left(\frac{X_o - rF}{T}\right)}{\frac{F}{T}} \quad \text{o} \quad r = \frac{1 - 2(\%E6/100)}{(\%fusions/100)} \quad (2)$$

Con proporciones iniciales diferentes de cada tipo celular, se puede considerar que $Y_0 = cX_0$ (Y_0 es c veces X_0) and para $m = 1$, la ecuación 1 se vuelve

$$r = \frac{1 - (1+c) \left(\frac{X_0 - rF}{T} \right)}{c \left(\frac{F}{T} \right)} \quad . \text{ o } \quad r = \frac{1 - (1+c)(\% E6 / 100)}{c(\% fusions / 100)} \quad (3)$$

En esta expresión, c puede ser un número entero o fraccionario.

PACIENTES ESTUDIADOS

La **Tabla 1** describe las características de 39 pacientes seropositivos al VIH-1 que acudieron al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zurbirán” (INCMNSZ) entre los meses de marzo y octubre del año 2002. Todos los pacientes fueron adultos que no habían recibido tratamiento antirretroviral al momento de la toma del suero.

Se muestran los datos de linfocitos T CD4+/ml de sangre (cuenta de linfocitos CD4+), copias de RNA viral/ml de plasma (carga viral), sintomatología, fecha de diagnóstico, fecha de toma de las muestras, edad y factor de riesgo. Todos los datos se obtuvieron al momento de toma de las muestras de suero y plasma. El estadio clínico se determinó de acuerdo con la clasificación 1993 del Centro de Control de Enfermedades de los Institutos Nacionales de Salud, Estados Unidos (**Apéndice 3**). La donación de las muestras para fines de investigación se hizo bajo el consentimiento de los pacientes. La **Tabla 1** incluye a 10 pacientes positivos al VIH-1 cuyo suero fue proporcionado por el Instituto Nacional de Salud Pública y para los cuales sólo se tuvo acceso a la cuenta de linfocitos CD4+.

En la mayoría de los pacientes la determinación de la cuenta de linfocitos CD4+ se realizó en laboratorios particulares diversos ajenos a las instituciones mencionadas. La carga viral se determinó en el INCMNSZ mediante el ensayo comercial de transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) Cobas Amplicor HIV-1 Monitor Assay (Roche Diagnostic Systems, Mannheim, Alemania).

Tabla 1. Pacientes estudiados

No.	Pacient e	Toma de mues.	Edad	Fecha DX	CD4 céls./ ml	Carga viral copias/ ml	Clasif CDC	Fac Ries	Sintomatología
1	S12006				49	n.d.	C		n.d.
2	S21136				49	n.d.	C		n.d.
3	S16085				49	n.d.	C		n.d.
4	S20973				134	n.d.	C		n.d.
5	S70338				145	n.d.	C		n.d.
6	S21129				172	n.d.	C		n.d.
7	S15760				173	n.d.	C		n.d.
8	S21040				303	n.d.			n.d.
9	S20595				321	n.d.			n.d.
10	S21022				479	n.d.			n.d.
11	CV1962	Jul 10-02	30	1999	8	>75000	C3	HSX	Tifoidea, sarampión, pérdida de peso (> de 7 kg/2 meses), herpes genital, condiloma, fatiga
12	CV1947	Jul 16-02	34	Nov-01	9	>75000	C3	BSX	Pérdida de peso 6Kg/7 meses, leucoplagia, candidiasis, dermatitis atópica
13	CV1917	Jun 3-02	24	1996	12	>75000	C3	HSX	Pérdida de peso, diarrea, gastritis, úlcera, trastornos neurológicos, criptococosis
14	CV2069	Oct 2-02		Ago 2002	30	>75000	C3		Tuberculosis pulmonar, pérdida de peso
15	CV2058	Sep 23-02		Ago 2002	32	>75000	B3		Diarrea, pancreatitis
16	CV 1965	Jul 11-02	23	May 2002	36	>75000	C3	HSX	Candida, resfriado, neumonía, pérdida de peso (40kg 1.5 años)
17	CV1750	Abr 26-02	27	2001	150	8880	B3	HSX	Candida bucal
18	MCA	May14-02		1995	200	37500	B2		Infección estomacal
19	CV1968	Jul 12-02	32	Abr 2002	201	>75000	C2	HSX	Herpes zoster, ulceraciones en boca, orquitis
20	CV2023	Ago 26-02		Jul 2001	300	75000	B2		Pérdida de peso, sudoración nocturna, diarrea, inflamación de ganglios
21	JSanta na	Jun 5-02	12	1990	324	33600	A2	PN	Asintomático
22	NPSCO	Oct 1-02		1992	330	64600	A2		Asintomático
23	NPLCA	Oct 7-02		1994	339	34900	A2		Asintomático, con linfocitos CD4+ a la baja
24	CV2076	Oct 9-02		2002	367	18300	C2		Diarrea, vómito, salmonelosis
25	NP LCA	Abril 8-02		1995	396	9600	A2		Asintomático
26	NP31	Jul 23-02			400	57000	A2		Asintomático
27	NP36	Jul 26-02	37	Mar 1996	403	66400	A2	HSX	Asintomático
28	NPCMB M	Jun 14-02		1992	410	11800	A2		Asintomático (condilomas)
29	CV1758	May 14-02		Feb 2002	459	>75000			n.d.
30	NP7	Jul 26-02	42	1985	500	55500	A1		Asintomático

Continúa...

31	CV1916	Jun 3-02		Ago 2000	517	22800	A1		Asintomático
32	NP89	Sep 9-02		1997	538	20	A1		Asintomático
33	CV1960	Jul 08-02	31	Jun-02	618	13800	A1	HSX	Asintomático
34	CV 1593	Mar 25-02		2001	619	7410	A1		Asintomático
35	CV1550 b	Sep 20-02		Ago 2001	833	2180	A1		Asintomático
36	CV1843	Abr 2-02	20	2001	n.d.	7990	C	HSX	Candida esofágica, dolor de cabeza, sudoraciones nocturnas
37	CV 1870	Abr 1602	42	Abr 2002	n.d.	10400	C		Fiebre pérdida de peso, tos, herpes bucal
38	CV1627 a	Abr 10-02		Feb 2001	n.d.	18300	C	HTX	Herpes genital sudoración nocturnas
39	CV1873	Abr 18-02	30	Abr 2002	n.d.	20200	B	HTX	Ganglios linfáticos inflamados herpes bucal
40	CV1817	Mar 14-02	32	Ene 2002	n.d.	31000	B	HTX	Pérdida de peso, diarrea
41	CV2026	Ago 27-02	24	Ene 2002	n.d.	40800	A	HSX	Asintomático
42	CV 1821	Mar 18-02	35	1996	n.d.	>75000	A		Fiebre fatiga pérdida de peso(6kg) neuropatía
43	CV1902	May 15-02	16	Ene 2002	n.d.	>75000	C3	HSX	Candidiasis fiebre tos
44	CV1820	Mar 18-02	43	Sep 2001	n.d.	>75000	C	HSX	Pérdida de peso(+ de 20 kilos) gastritis diabetes insulino dep
45	CV1816	Mar 14-02	42	Mar 2002	n.d.	>75000	n.d.		Neuropatía periférica
46	CV1994	Ago 5-02		Jul 2002	n.d.	>75000	B		Sudoraciones nocturnas
47	CV1978	Jul 22-02		Jul 2002	n.d.	>75000	C		Candida, herpes, diarrea, papiloma anal, pérdida de peso(12kg/2 meses)
48	NPJQS	Oct 4-02		1994	n.d.	>75000	B		Papilomavirus
49	CV2060	Sep 23-02		Jun 2000	n.d.	>75000	A		Asintomático

BSX, bisexual; HSX, homosexual; HTX, heterosexual; PN, perinatal; n.d., no determinado.

RESULTADOS

A) Cuantificación y caracterización de la fusión celular por citometría de flujo.

1. Modelo de fusión celular “in vitro”.

Para acceder al estudio del papel de la fusión celular en la patogénesis de la infección por el VIH, se utilizaron células Jurkat transfectadas establemente con el gene *env* de la variante viral altamente fusogénica HXBc2. Esta variante pertenece al subgrupo B, el cual es predominante en los países occidentales y en México (144-145). En estas células, el gene *env* se encuentra en un plásmido bajo el control de un operador dependiente de tetraciclina (ver **Figura 12** en “Material y Métodos”), de modo que las células son crecidas en presencia de tetraciclina y la síntesis de las proteínas gp120/gp41 (Env) se consigue lavando las células y cultivándolas en ausencia de este antibiótico. Esta línea se denominará en lo sucesivo HXBc2.

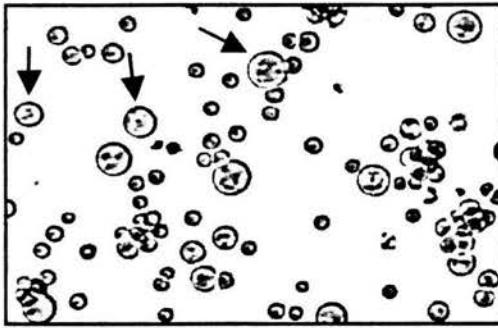
Otra línea celular Jurkat transfectada contiene un plásmido con un gene *env* portador de una sustitución F/Y en el aminoácido 522, ubicado en el dominio conocido como péptido de fusión de la proteína gp41 (**Fig. 7** en la Introducción). Esta sustitución inhabilita a las células (las cuales se denominarán 522) para mediar fusión con las células blanco.

El examen microscópico de los cultivos permitió apreciar la aparición de células gigantes multinucleadas de diversos tamaños desde las primeras horas de cocultivo, incrementando su tamaño hasta incluir mas de 10 núcleos en su interior (**Figura 13**). Estos productos de fusión grandes pueden cuantificarse fácilmente por conteo directo, método que ha sido usado por muchos grupos de investigación para evaluar el efecto de diversas variables sobre la fusión. Sin embargo, el método visual presentó varios inconvenientes: aunque los sincicios grandes pueden ser fácilmente reconocidos, no es posible identificar productos de fusión compuestos por pocas células, haciendo subjetivo este método de cuantificación; la cuenta visual se restringe al campo de observación y por lo tanto sólo es posible registrar una pequeña fracción de las células en el cultivo. Asimismo, el conteo visual resulta lento y laborioso, lo cual dificulta su aplicación para el análisis del efecto de un gran número de muestras (por ejemplo, sueros humanos) sobre la fusión.

2. Análisis por citometría de flujo.

Con el propósito de diseñar un método que permitiera cuantificar la proporción de células fusionadas directamente mediante citometría de flujo (FACS), se utilizó un par de trazadores vitales lipofílicos fluorescentes tipo carbocianina (denominadas DiI y DiO, las cuales emiten fluorescencia roja y verde, respectivamente) para marcar diferencialmente a las células participantes (ver Material y Métodos). Las características de estos colorantes y su forma de inserción en la membrana celular se describieron en la

Cocultivo: HXBc2 - E6



522 - E6

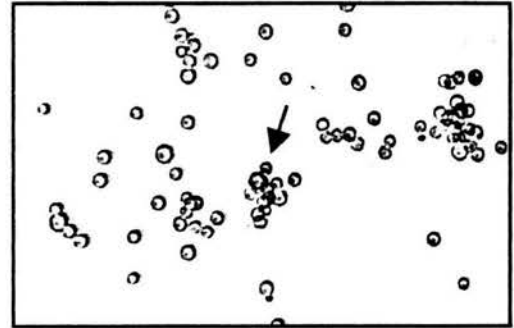
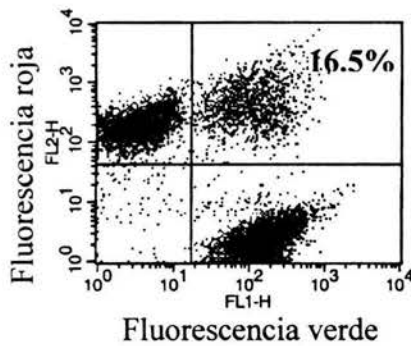


Figura 13. Izquierda: aspecto microscópico de los cocultivos de células Jurkat expresando el complejo Env funcional (HXBc2) y mutante (522) con células Jurkat no transfectadas (E6). Se aprecia la formación de productos de fusión de tamaño variable (flechas). Derecha: asociación, sin fusión, de células en los cocultivos de 522 y E6. Amplificación: 20X.

Cocultivo: HXBc2-E6



522 - E6

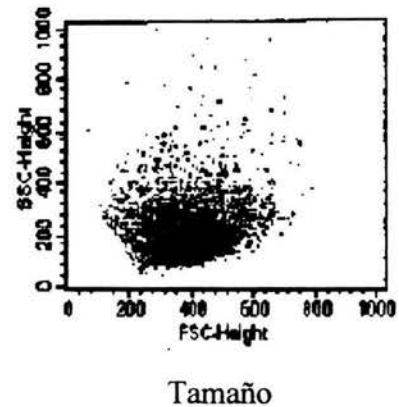
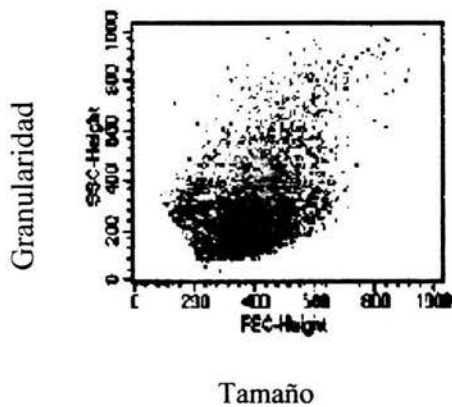
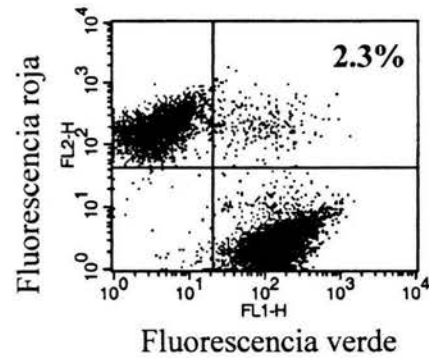


Figura 14. Análisis por citometría de flujo de la fusión entre células Jurkat expresando el complejo Env funcional (HXBc2) y células Jurkat no transfectadas (E6). Arriba: gráficas de fluorescencia. Se indica el porcentaje de células con fluorescencia mixta. Abajo: Las células con fluorescencia mixta presentan tamaño y granularidad mayores que las células no fusionadas.

Introducción. Las células marcadas (HXBc2 y 522 con DiO y E6 con DiI) se colocan en cocultivo para permitir la fusión. Para los experimentos de fusión, las células transfectadas inducidas para la expresión de Env se colocaron en cocultivo con células Jurkat no transfectadas (células E6), las cuales expresan los receptores CD4+ y CXCR4+. Todos los experimentos de fusión se efectuaron en un medio especial libre de suero (AIM-V).

El análisis por citometría de flujo de los cocultivos HXBc2-E6 y 522-E6 (proporción 1:1) se efectuó utilizando condiciones estándar para fluoresceína y rodamina. La **figura 14** muestra que los productos de fusión son fácilmente detectados como partículas con fluorescencia mixta, conformando usualmente entre el 15 y el 20 % de la población total después de 5 horas de cocultivo. El uso de células 522 en lugar de HXBc2 produjo habitualmente entre 0.5 y 2.3% de células doblemente fluorescentes, las cuales corresponden a agregados celulares (ver Sección 3 "Transferencia de energía entre los colorantes"). El examen de los cultivos por microscopía de fluorescencia permitió distinguir células individuales (presentando un sólo tipo de fluorescencia) y células fusionadas (grandes y con fluorescencia verde y roja) (**Fig 15**).

El porcentaje de fusión obtenido después de 5 horas de cocultivo se modificó dependiendo del tiempo de cultivo de las células transfectadas en ausencia de tetraciclina (tiempo de inducción), aumentando de 6% para células inducidas durante 24 horas, a 18.5 para la inducción durante 72 horas, indicando un incremento del nivel de expresión del complejo gp120/gp41 con tiempos de inducción mayores. En células inducidas durante 3 días la fusión tiene lugar rápidamente, alcanzando el 50% de la fusión máxima en aproximadamente 1 hora y la fusión máxima en 2 horas (**Fig.16**).

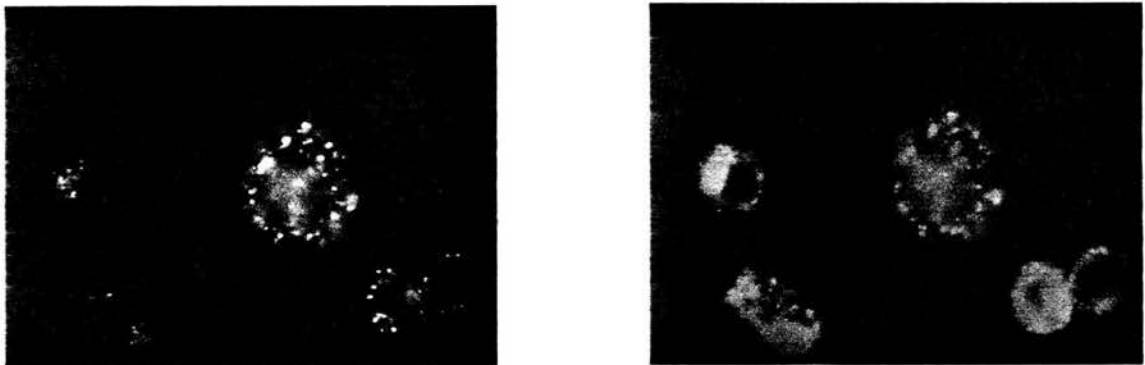


Figura 15. Microscopía de fluorescencia de un producto de fusión mostrando fluorescencia roja y verde (flechas). Las células circundantes, no fusionadas, son más pequeñas y muestran un sólo color. Amplificación: 600X.

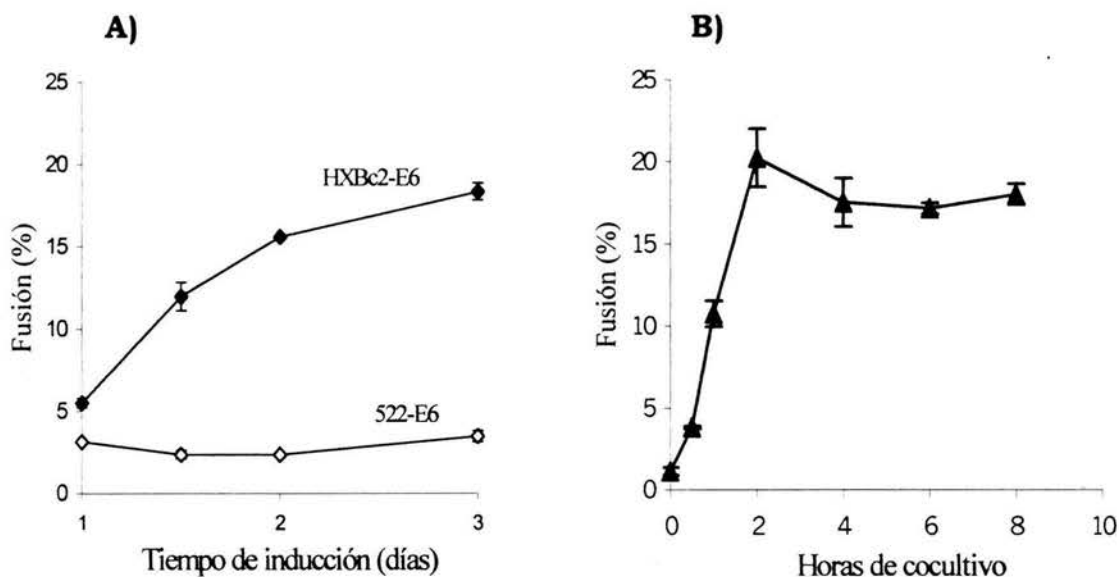


Figura 16. El porcentaje de células fusionadas aumenta con el tiempo de inducción de la síntesis de las proteínas gp120/gp41 (A) y del tiempo de cocultivo (B).

3. Transferencia de energía de la fluorescencia (TEF) en las células fusionadas.

Durante el análisis de la fusión celular por citometría de flujo, se observó repetidamente que las células fusionadas mostraban una intensidad de fluorescencia roja mayor que las células no fusionadas (**Figura 13**). Esta observación es compatible con la incorporación de un número mayor de células rojas (E6) que verdes (HXBc2) en las fusiones, o bien con un proceso de transferencia de energía (TEF) entre los colorantes debido al extenso solapamiento de las energías de emisión y absorción de los mismos (**Figura 17**). Este proceso sería debido a una estrecha cercanía física (1 a 10 nanómetros) (83) entre las moléculas de los colorantes en las estructuras membranales de las células fusionadas. En este caso, el solo marcaje simultáneo de células con ambos colorantes produciría TEF, lo cual ocurre efectivamente, como se muestra en la **figura 18**. El incremento en la fluorescencia roja fue proporcional a la concentración de DiO empleada para marcar las células, indicando TEF entre los colorantes.

Como se muestra en la **figura 19**, la TEF se observó también en células fusionadas como función de la concentración de DiO incorporado en las células. Las partículas doblemente fluorescentes residuales después de la inhibición de la fusión por un anticuerpo anti-CD4, mostraron un escaso nivel

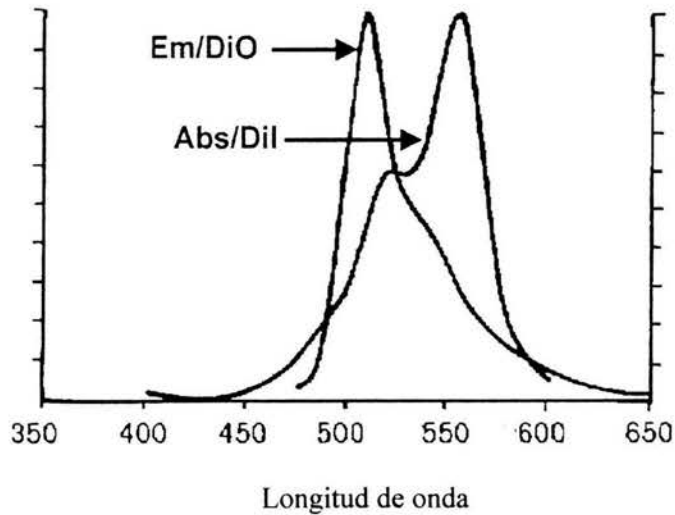


Figura 17. Sobrelapamiento entre los espectros de emisión del DiO y de absorción del DiI.

de TEF, consecuente con una mínima mezcla de lípidos en estas células. Las partículas con fluorescencia mixta producidas por agregación celular en el cocultivo 522 - E6 no mostraron TEF.

Por lo tanto, la TEF se manifiesta en células fusionadas y no en células agregadas, permitiendo la distinción entre ambos procesos en los experimentos de fusión.

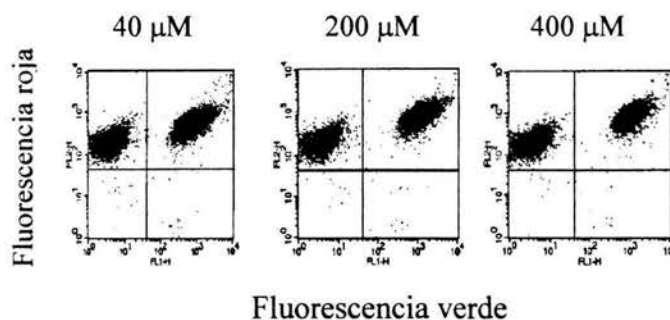


Figura 18. A) Transferencia de energía de la fluorescencia en células E6 marcadas simultáneamente con DiO y DiI. Las células se marcaron con una concentración fija de DiI ($4 \mu\text{M}$) y posteriormente con concentraciones crecientes de DiO, como se indica. Para el análisis por FACS, las células doblemente fluorescentes se mezclaron con células marcadas sólo con DiI.

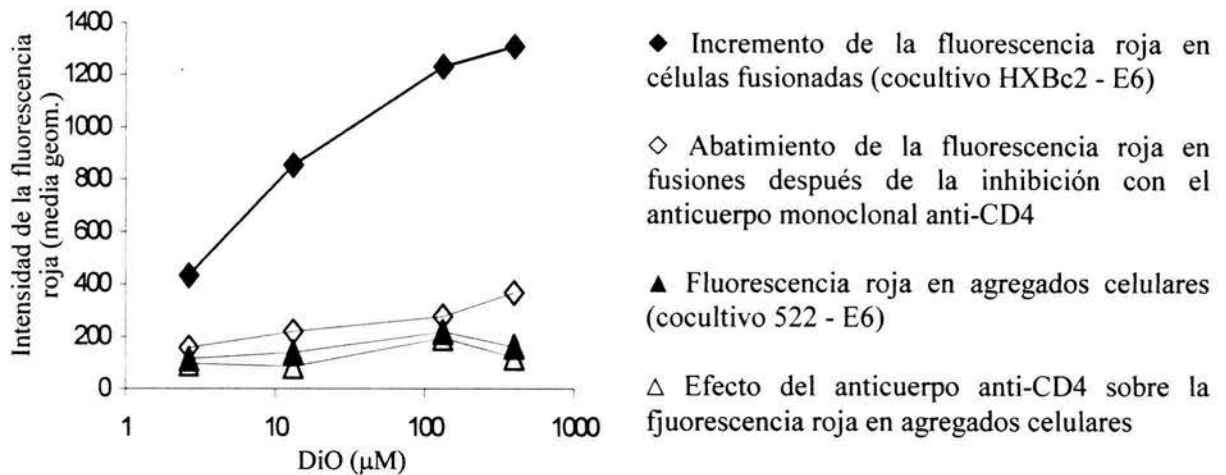


Figura 19. Transferencia de energía de la fluorescencia en células fusionadas. las células E6 se marcaron con una concentración fija de DiI (4 µM) y se cocultivaron con células HXBc2 o 522 marcadas con concentraciones crecientes de DiO, como se indica. El análisis por FACS se efectuó después de 5 horas de cocultivo. El anticuerpo anti-CD4 se preincubó con las células E6 antes de la fusión a una concentración de 33 µg/ml.

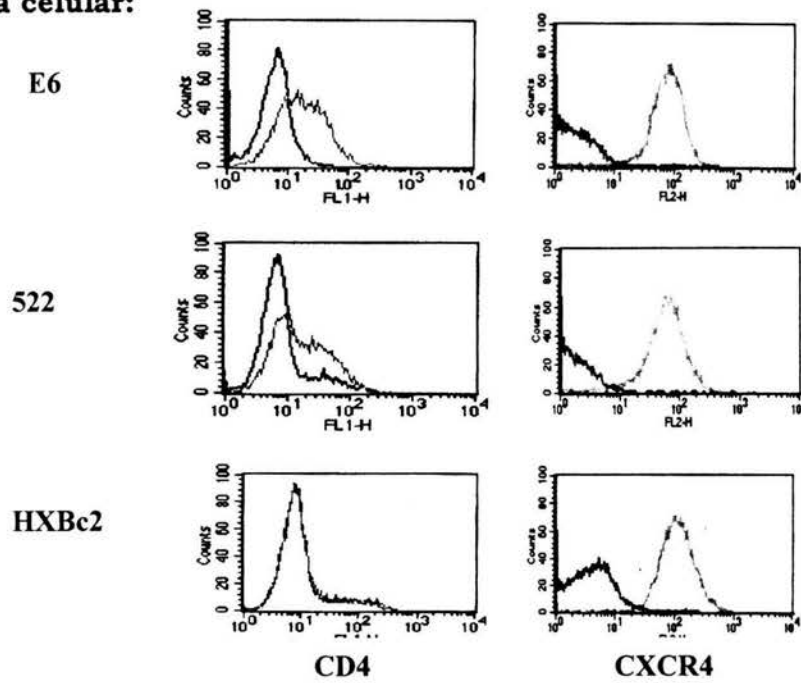
4. Relación entre el nivel de fusión y la expresión de las moléculas CD4 y CXCR4.

El VIH y las células infectadas por el mismo utilizan como receptores a las moléculas CD4 y CXCR4 de la membrana de los linfocitos T (ref.) Para determinar la dependencia de la expresión de estas moléculas en el sistema de fusión Jurkat-Jurkat por el método de citometría de flujo, inicialmente se determinó el nivel de expresión de CD4 y CXCR4 por inmunofluorescencia en las células HXBc2, 522 y E6. La **Fig. 20A** muestra que la expresión de la molécula CD4 en la superficie de las células E6 es mayor que en las células 522, mientras que es indetectable en las células HXBc2. Por otra parte, la expresión de CXCR4 es muy similar en las tres líneas celulares.

La fusión producida por combinaciones de estas células se muestra en la **figura 20B**. Los resultados muestran que la fusión es altamente dependiente de la expresión de CD4, de modo que la combinación HXBc2-E6 produce el mayor porcentaje de fusión (15.7%), seguida por la combinación HXBc2-522 (7%). Las combinaciones restantes (HXBc2-HXBc2, 522-522 y 522-E6) producen únicamente niveles menores de partículas con fluorescencia mixta que corresponden a agregados celulares. Por lo tanto, con niveles de expresión similar de CXCR4, la capacidad fusogénica de las células blanco correlaciona estrechamente con el nivel de expresión de CD4. Asimismo, puesto que las células HXBc2 no se fusionan entre sí debido a su escasa expresión de CD4, el porcentaje de fusión obtenido en el cocultivo HXBc2-E6 es representativa del total de los eventos de fusión en el mismo.

A)

Línea celular:



B)

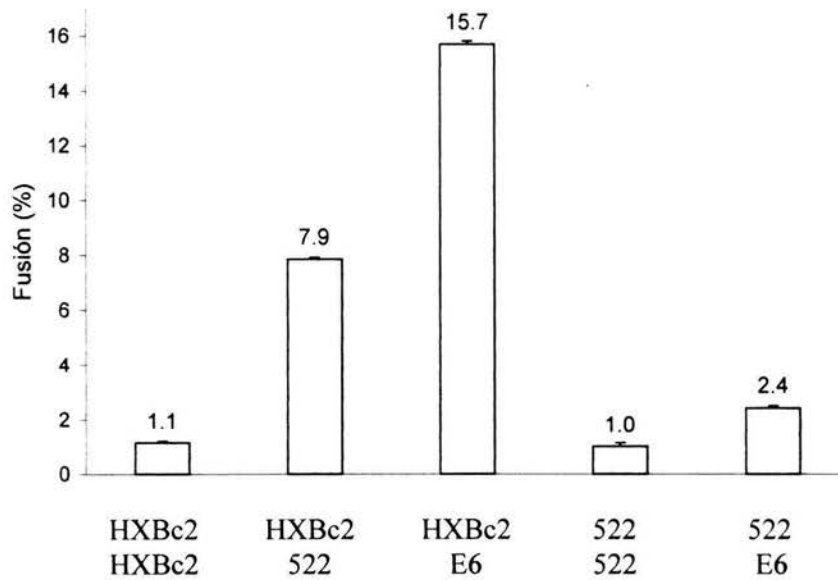


Fig. 20. El porcentaje de fusión depende del nivel de expresión de CD4. A) Expresión de CD4 y CXCR4 por las células HXBc2, 522 y E6. B) Porcentaje de fusión obtenido con diferentes combinaciones de las tres líneas celulares, como se indica en el eje horizontal.

5. Efecto de anticuerpos anti-gp120, anti-gp41, anti-CD4 y anti-CXCR4 sobre la fusión.

La fusión de membranas mediada de las proteínas de fusión del VIH depende de la interacción de gp120 con el receptor CD4 y con un correceptor de la familia de receptores para las quimiocinas, principalmente CXCR4 y CCR5. El receptor CXCR4 o fusina, funciona como correceptor para virus inductores de sincicios en cultivo celular (ver "Introducción"). Para validar el ensayo de fusión "in vitro", se probó el efecto de anticuerpos dirigidos a estas moléculas, comparando las concentraciones inhibitorias medias (IC_{50}) obtenidas, con las reportadas por otros grupos de investigación.

La **figura 20** muestra el efecto sobre la fusión por dos anticuerpos monoclonales con actividad neutralizante potente sobre partículas virales (2G12 y F105) y un anticuerpo no neutralizante (III-V3-21), así como de un anticuerpo anti-CD4 y 2 anticuerpos anti-CXCR4. La especificidad y otras características de estos anticuerpos se resumen a continuación:

a) **F105**: humano. Reconoce un epítipo conformacional cercano al sitio de interacción de gp120 con CD4. Inhibe la unión de virus libre infecciosos a células CD4+. Neutraliza eficientemente a los virus adaptados al crecimiento en líneas celulares, incluyendo HXBc2 y MN, a concentraciones que van de 140 ng/ml a 10 μ g/ml. No neutraliza aislados primarios. (86, 87).

b) **2G12**: humano. El anticuerpo se une con alta afinidad a un epítipo conformacional formado por carbohidratos en el dominio externo de gp120. Es uno de los escasos anticuerpos monoclonales para los cuales se ha reportado actividad neutralizante potente contra una amplia variedad de cepas virales, incluyendo tanto a virus adaptados a cultivo celular, como a aislados primarios (90, 91).

c) **III-V3-21**: murino. Se une a una región conservada ubicada en la base de la tercera horquilla hipervariable (V3) de gp120. No neutralizante (89).

d) **Anti-CD4**: murino (clona RPA-T4). Se une al dominio D1 (epítopes CDR1 y CDR3) de CD4. Es capaz de bloquear la infección de células por el VIH-1 y se une a gp120 soluble. Inhibe la formación de sincicios (92).

e) **Anti-CXCR4 (12G5)**: murino. Se une al segundo loop extracelular (12G5) de CXCR4. La utilización de este receptor en la infección por el VIH se demostró en 1996 mediante el uso de este anticuerpo, el cual inhibe la infección por partículas virales (96).

f) **Anti-CXCR4 (A-145)**: murino. Se une al extremo amino terminal de CXCR4. Neutralizante de virus T-trópicos (97).

La fusión fue inhibida 50% por 4 μ g/ml y 52 μ g/ml del anticuerpo anti-CD4 y 2G12, respectivamente. Se obtuvo menos del 50% de inhibición con la concentración máxima utilizada del anticuerpo F105 (50 μ g/ml). Estas concentraciones son mas altas (4 a 100 veces) a las reportadas para inhibir la infección de líneas de células T y de células

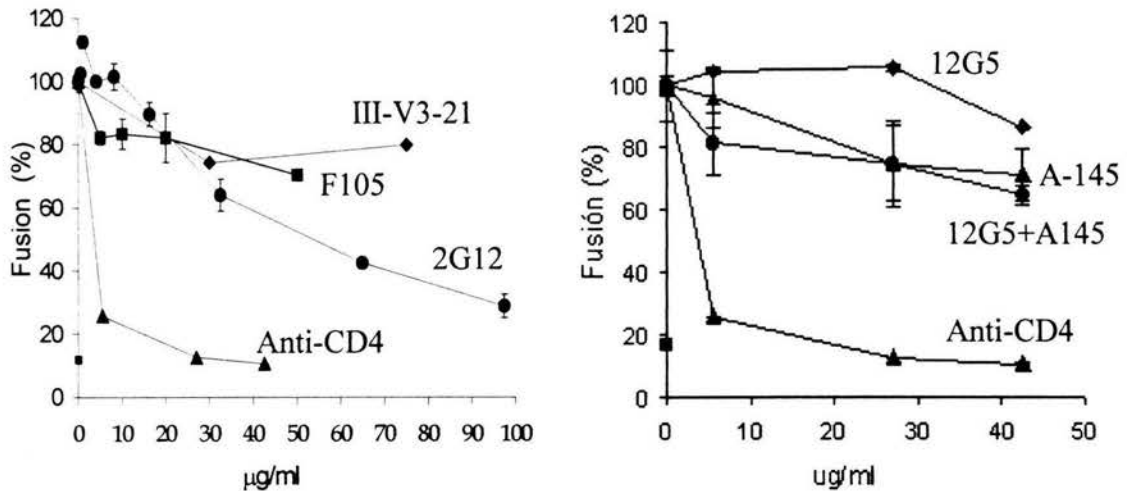


Figura. 20. Efecto de anticuerpos monoclonales anti-gp120, anti-CD4 y anti-CXCR4 sobre la fusión.

mononucleares de sangre periférica por la variante HXBc2 del VIH y otras cepas relacionadas (25-30), aunque similares a las concentraciones reportadas por Barna y Berger en un sistema de fusión celular dependiente de las proteínas de la envoltura del VIH (140).

Los anticuerpos anti-CXCR4 tuvieron un efecto menor sobre la fusión. A la concentración más alta (43 µg/ml) 12G5 y A-123 inhibieron la fusión en un 15% y 30%, respectivamente. La combinación de ambos anticuerpos produce un efecto igual al del anticuerpo A-123. Estos resultados contrastan con reportes que muestran una alta dependencia de la infección viral y de la fusión célula-célula, de la interacción de gp120 con CXCR4 (96). Sin embargo, concuerdan con estudios de Barinbaud (143), quienes proponen diferentes estados conformacionales del receptor, y de Siciliano y cols. (101), quienes han sugerido que la utilización del correceptor depende de la densidad de moléculas gp120/gp41 disponibles para la fusión en la membrana celular. Así, en el caso de la fusión Jurkat-Jurkat, la expresión abundante de las proteínas virales minimizaría la necesidad del uso de CXCR4.

Por lo tanto, la fusión HXBc2-E6 mostró ser altamente sensible a anticuerpos dirigidos al sitio de interacción de CD4 con gp120. La fusión fue poco sensible a un anticuerpo anti-gp120 que inhibe la interacción de esta molécula con CD4 y relativamente sensible al anticuerpo 2G12, uno de los anticuerpos anti-VIH más potentes conocidos en la actualidad. Finalmente, la fusión fue solo marginalmente inhibida por anticuerpos anti-CXCR4.

En resumen, los resultados indican que la fusión celular tiene requerimientos de inhibición cuantitativamente diferentes a la fusión virus-célula.

B. Efecto del suero de pacientes infectados por el VIH-1 sobre la fusión celular.

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

La inhibición de procesos patogénicos de fusión celular por la respuesta inmune del huésped podría retardar la progresión a SIDA en individuos infectados por el VIH-1. Se realizó un estudio transversal sobre 49 pacientes adultos, que aún no habían recibido tratamiento, para determinar la relación entre el efecto del suero sobre la fusión y los principales indicadores de progresión a SIDA (cuenta de linfocitos T CD4+ y carga viral), así como con el estadio clínico. Las células HXBc2 se preincubaron con el suero de los pacientes a diluciones 1:50, 1:20 y 1:10, antes de agregar las células E6 para iniciar la fusión. Se obtuvo una alta correlación entre los resultados obtenidos con las tres diluciones ($R = 0.9692$, $p < 0.00001$), por lo que se muestran sólo los resultados para la dilución 1:50.

El efecto del suero fue de tres tipos: inhibición (64%), promoción (6.1%) y ninguno (24.5%). La **figura 21** resume la relación entre el efecto del suero de individuos VIH-positivos sobre la fusión y los parámetros antes mencionados, mostrando una correlación directa con la cuenta de linfocitos T CD4+ e inversa con la carga viral de los pacientes.

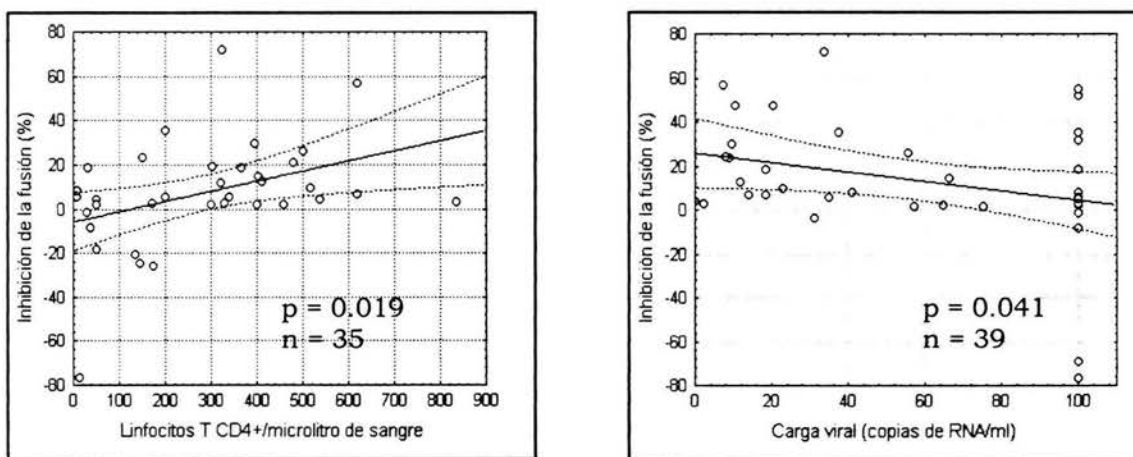


Figura 21. Relación del efecto del suero de individuos seropositivos al VIH sobre la fusión con la carga viral y la cuenta de linfocitos T CD4+. El porcentaje de inhibición se calculó con respecto a la fusión obtenida en el cocultivo HXBc2-E6 en ausencia de suero (ver Material y Métodos). Cada punto representa el promedio de los duplicados obtenido para la dilución 1:50 de suero. Valores positivos indican inhibición y negativos aumento de la fusión. Se indica la probabilidad asociada a la correlación de Pearson y el intervalo de confianza correspondiente (95%).

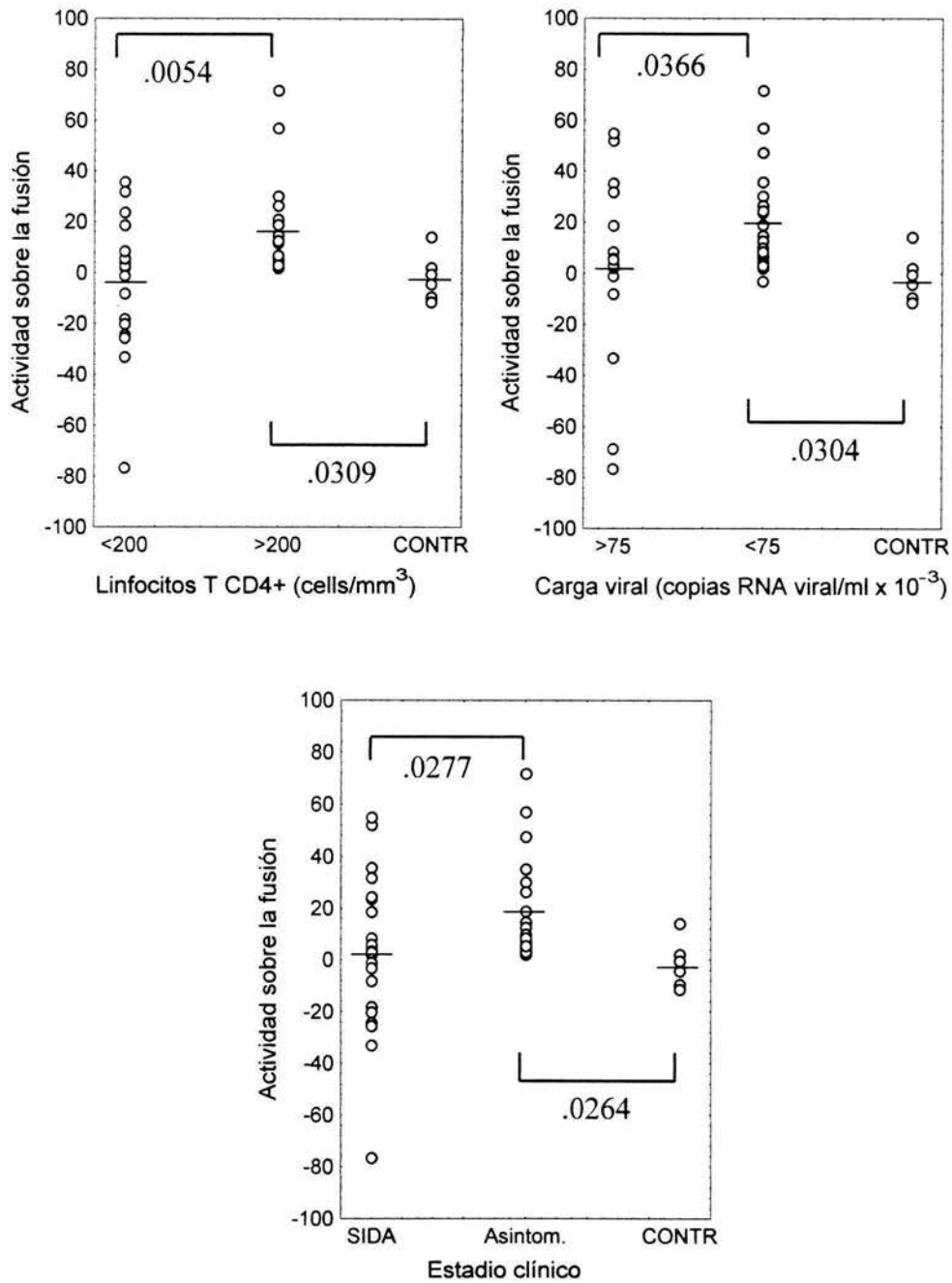


Figura 22. Efecto del suero sobre la fusión en grupos clínicamente relevantes. El porcentaje de inhibición se calculó como se indicó para la figura anterior. Cada punto representa el promedio de los duplicados obtenido para la dilución 1:50 de suero. Sólo se muestran las diferencias significativas. El grupo control consistió de 8 sueros de individuos seronegativos al VIH.

El efecto del suero sobre la fusión se examinó en distintos grupos clínicos según los criterios aceptados actualmente para la clasificación de los casos de infección por el VIH (**Apéndice 3**). Los pacientes en estado intermedio de la enfermedad (grupos centrales en las gráficas) significativamente inhiben la fusión, mientras que una disminución en la actividad inhibidora o estimulación de la fusión, se asociaron significativamente a bajos niveles de linfocitos T CD4+ circulantes, carga viral elevada y progresión a SIDA (**Figura 22**). La absorción de las inmunoglobulinas de una muestra de 14 sueros por adsorción sobre Sefarosa acoplada a proteína G, removió la actividad de 7 de 8 sueros inhibitorios. Notablemente, la adsorción incrementó la actividad promotora de 6 sueros que ya favorecían la fusión antes de la remoción de los anticuerpos, reflejando quizás la eliminación de bajos niveles de anticuerpos inhibidores. En 10 de 14 sueros (71.4%) se observó un efecto promotor residual similar al mostrado por los sueros control (**Figura 23**).

Estos resultados indican que los anticuerpos inhibidores de la fusión se desarrollan en etapas tempranas de la infección. La pérdida de la capacidad inhibidora o dominancia de anticuerpos promotores se correlaciona con progresión a SIDA. La actividad de anticuerpos inhibidores de la fusión de linfocitos T podrían influir de manera importante en el curso de la infección.

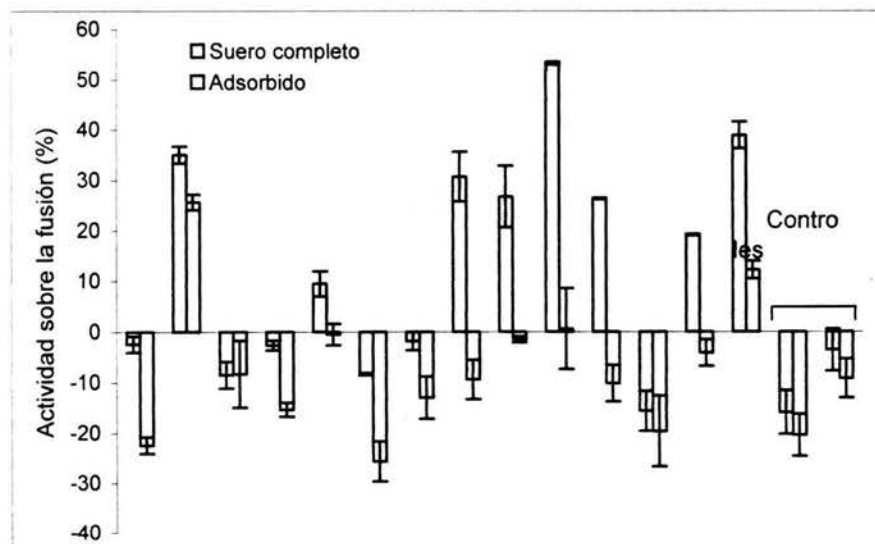


Figura 23. La adsorción de los anticuerpos con Sefarosa-Proteína G elimina significativamente el efecto inhibitorio del suero sobre la fusión.

2. Aglutinación celular por sueros promotores de la fusión

La investigación de la actividad del suero sobre la fusión incluyó la determinación del efecto del mismo sobre células no fusogénicas, con el propósito de descartar la generación de células con fluorescencia mixta no debidas a fusión. Con este propósito se utilizó una línea celular transfectada con un gene *env* portador de una mutación en el extremo amino-terminal de la proteína gp41. Debido a esta mutación las células (llamadas 522F/Y) son incapaces de mediar fusión, aunque esta mutación no impide la síntesis del complejo gp120/gp41, como tampoco su procesamiento y expresión en la membrana celular.

El suero de tres pacientes con enfermedad avanzada produjo un importante incremento de la fusión entre las células HXBc2 y E6. A diferencia del resto de los sueros probados, dos de estos sueros generaron un alto porcentaje de agregados con fluorescencia mixta en cocultivos de células 522 con E6 CD4+ (**Figura 24**). Por su patrón de tamaño y granularidad los agregados fueron fácilmente distinguibles de las células fusionadas (**Figura 25**). Por lo tanto, la capacidad del suero para inducir muy eficientemente aglutinación celular se relacionó con su actividad promotora de la fusión.

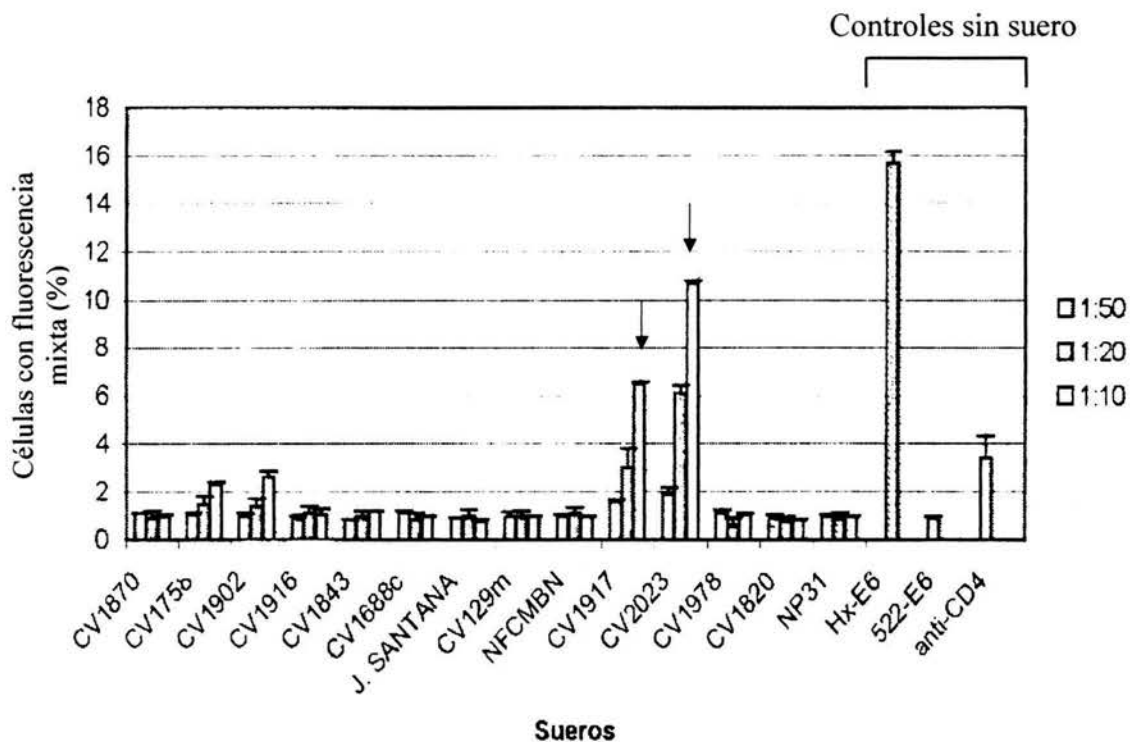


Figura.24. Efecto del suero de pacientes sobre la formación de agregados en cocultivos de células Jurkat Env+ no fusogénicas (522F/Y) y células E6 CD4+. Cada suero se probó a las 3 diluciones indicadas. Las flechas muestran los dos sueros con actividad aglutinante.

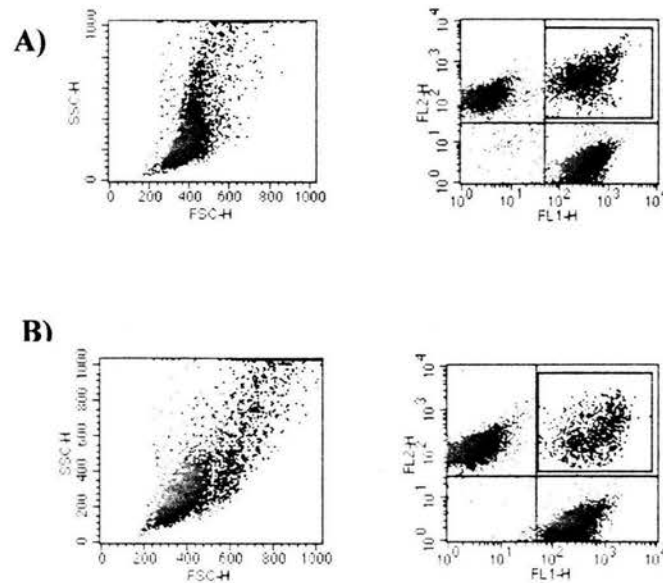


Figura 25. Diferencia entre los patrones de tamaño y granularidad de las células fusionadas y de los agregados celulares generados por el suero CV2023. Ambos son similares en fluorescencia (gráficas de la derecha), pero distintos en morfología (gráficas de la izquierda). A) Fusión en cultivos de células HXBc2 y E6. B) agregación en cultivos de células 522-E6.

C. Dinámica de la estequiometría de la fusión

El conocimiento de la composición celular de los sincicios (estequiometría) es un aspecto fundamental para el estudio de los factores que regulan la fusión celular y de sus consecuencias biológicas. Asimismo, la determinación de la estequiometría constituye un indicador de la capacidad fusogénica de las células infectadas por el VIH.

Durante el desarrollo de experimentos de cinética de la fusión, fue evidente que era posible cuantificar el número de células de cada tipo incorporadas en las fusiones mediante los cambios en la proporción de células no fusionadas. Estos cambios reflejan la velocidad de reclutamiento de células de cada población en las fusiones. En experimentos de cinética se observó reiteradamente que la proporción de células E6 disminuye rápidamente mientras que la de células HXBc2 apenas se modifica (**Figura 26**). Este patrón se conservó al invertir el protocolo de marcaje, indicando que el tipo de

colorante no influyó en el mayor reclutamiento de células E6 en las fusiones. Se

determinó, por lo tanto, que la relación E6/HXBc2 en las fusiones (la cual se denominará en adelante r) es mayor a 1.

Para calcular r en cada punto de tiempo, se desarrolló una expresión matemática para la relación entre las proporciones de células fusionadas y no fusionadas. Las ecuaciones 2 y 3 (ver apartado 13 en “Materiales y Métodos”) permiten determinar directamente el número de células E6 incorporadas en las fusiones por cada célula HXBc2, para los casos en que la proporción inicial HXBc2/E6 (c) es igual o diferente de 1. Las ecuaciones se validaron usando una simulación empírica de la fusión, en la cual r se definió previamente.

Las gráficas de la **figura 27** muestran los cambios en la proporción de las tres poblaciones (HXBc2, E6 y fusiones) en función del tiempo y la dinámica de la estequiometría correspondiente.

La fusión se desarrolla rápidamente, aproximándose a su máximo en 2 horas. Durante la primera media hora $r = 5$, es decir, incorporan a 5 células E6 por cada HXBc2 en las fusiones cuando la proporción inicial de las células fue igual ($c = 1.08$). En cambio, más células E6 se incorporaron durante la primera media hora en las fusiones ($r = 8$) cuando las células E6 se colocaron en exceso con respecto a HXBc2 ($c = 0.56$), y fue mínima ($r = 1$) cuando las células HXBc2 estuvieron en exceso ($c = 1.37$). Después de esta primera etapa, la estequiometría de la fusión disminuye para $c = 1.0$ y $c = 0.56$, reflejando la incorporación de más células HXBc2 en las fusiones, probablemente atraídas por el contenido creciente de CD4 en estas. La excepción a esta tendencia la constituyó el caso de $c = 1.37$, en donde r pasa de un valor menor (1), a uno mayor (4). Dado que en este caso cabría esperar un número alto de fusiones con bajos valores de r (muchas y pequeñas fusiones), este resultado podría reflejar una ventaja en el reclutamiento de células E6 por las fusiones formadas inicialmente, sobre las células HXBc2 que no han iniciado la fusión. Esta interpretación es compatible con el hecho de que, en este caso, se obtuvo el menor porcentaje de fusión máxima (11%).

Por lo tanto, la relación E6/HXBc2 en los sincicios fue mayor de 1 en todos los casos, variando con el tiempo de incubación del cocultivo y con la proporción inicial de las células en el mismo. El reclutamiento de varias células E6 por cada célula HXBc2 indica que una célula infectada es capaz de extender los efectos de la fusión a varias células no infectadas circundantes.

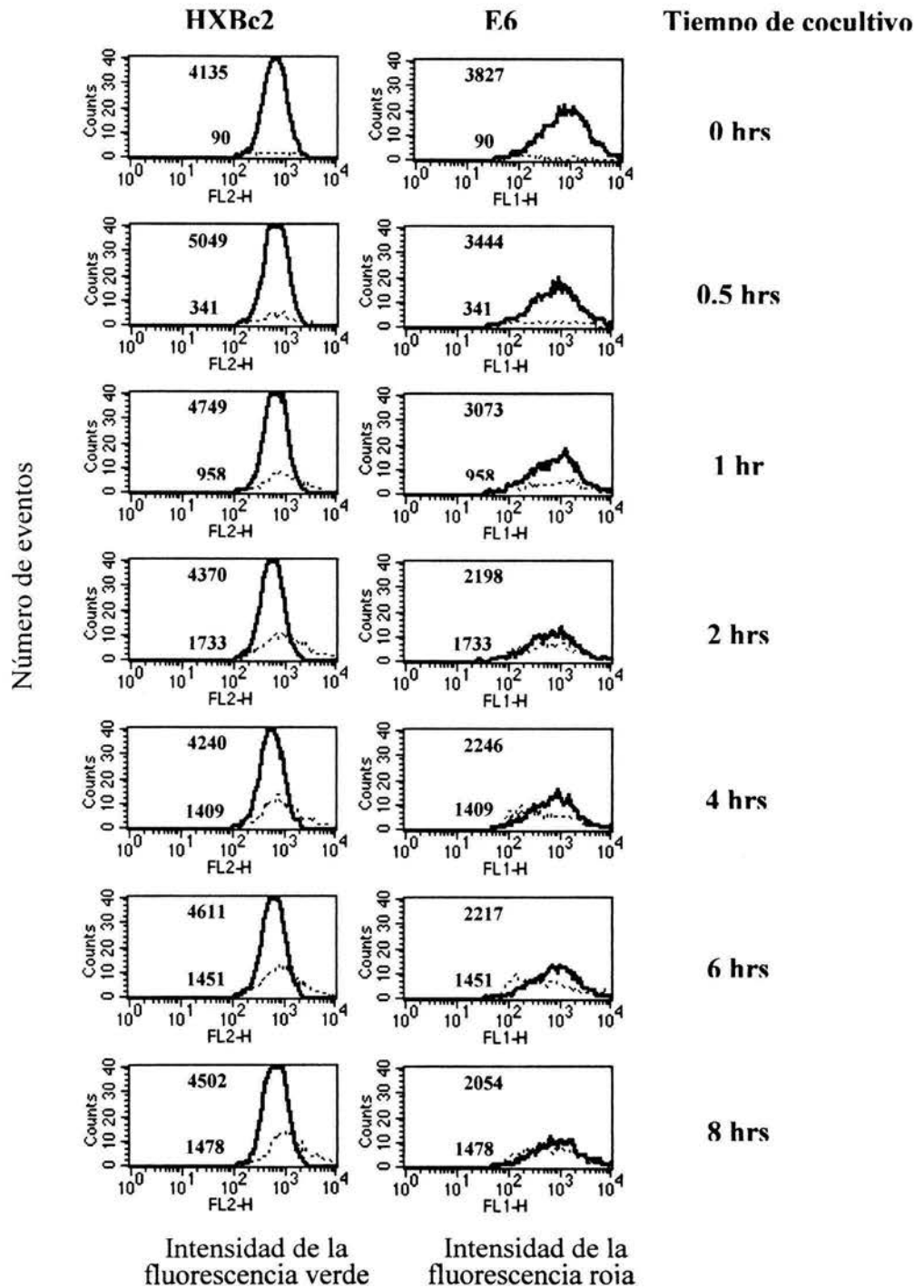


Figura 26. Cinética de los cambios en el número de células fusionadas y no fusionadas en el cocultivo HXBc2-E6. Las líneas continuas representan a las células no fusionadas indicadas arriba, (HXBc2 con fluorescencia verde, E6 con fluorescencia roja). Las líneas punteadas corresponden a las fusiones, las cuales aparecen en ambas columnas ya que poseen ambos tipos de fluorescencia. La cantidad de células E6 disminuye rápidamente conforme avanza la fusión, reflejando una mayor incorporación de éstas en las fusiones.

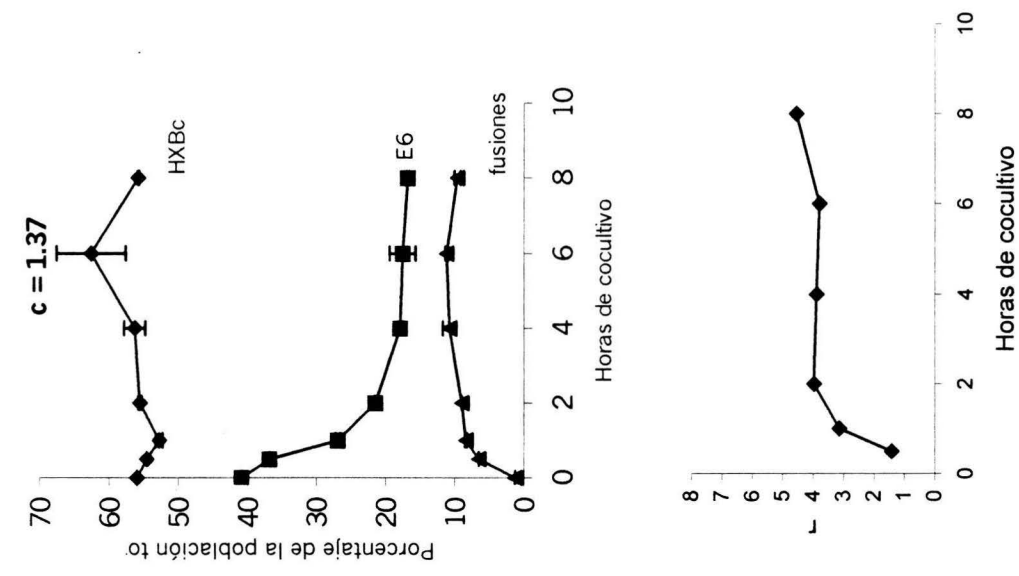
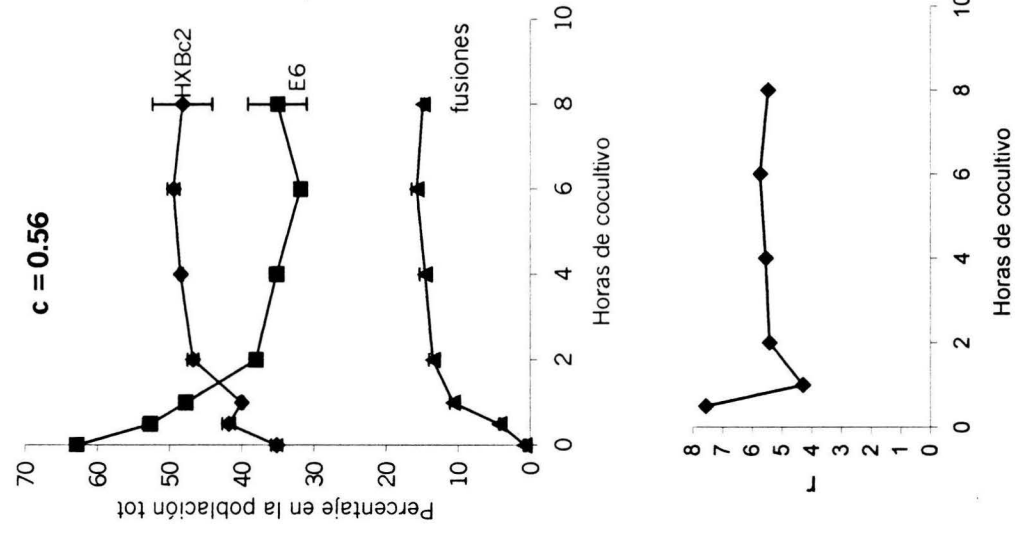
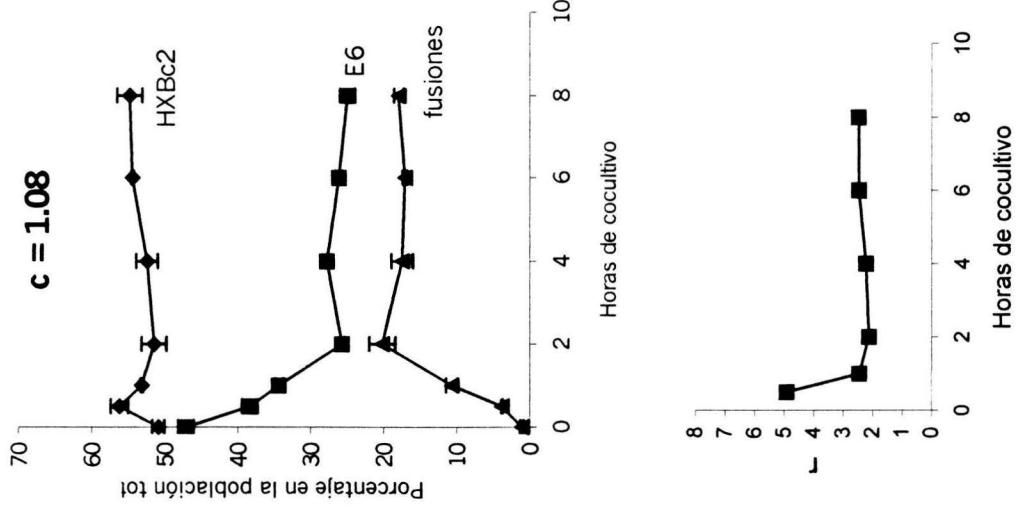


Figura 27. Arriba: cinética de los cambios en la proporción de las células fusionadas y no fusionadas en cocultivos con distintas proporciones iniciales de células HXBc2 y E6. Abajo: Dinámica de la estequiometría de las fusiones en los mismos cultivos. c = relación HXBc2:E6 inicial. r = relación F6/HXBc2 en las fusiones

DISCUSIÓN

1. Citometría de flujo aplicada al estudio de la fusión celular

La importancia de la fusión de membranas inducida por las proteínas de la envoltura del VIH (Env), radica no sólo en que constituye la fase inicial de la infección de células por virus, sino porque variantes del VIH-1 con una elevada capacidad para inducir fusión entre células infectadas y no infectadas (típicamente virus X4), se generan en las etapas tardías de la enfermedad. El estudio de los factores que modulan la fusión de membranas puede proporcionar indicios para el diseño de terapias potenciales.

En el presente trabajo se reporta el diseño de un método de cuantificación de la fusión entre linfocitos T que expresan las proteínas de la envoltura del VIH y linfocitos T CD4+, utilizando para ello los marcadores lipofílicos fluorescentes DiI y DiO en combinación con citometría de flujo. Las propiedades de estos colorantes que los hacen adecuados para su aplicación al estudio de la fusión celular se describieron antes (ver "Introducción").

Un aspecto básico de la medición de la fusión celular por citometría de flujo es la necesidad de distinguir las células fusionadas de los agregados celulares cuando ambas presentan fluorescencia mixta. La disponibilidad de una línea celular con la capacidad de expresar las proteínas virales pero inhabilitada para producir fusión celular (células 522F/Y), fue importante para resolver esta materia. La formación de agregados formados por estas y las células CD4+ (E6), permitió determinar su perfil morfológico de tamaño y granularidad, el cual difirió claramente del de las células fusionadas.

Aunque la fusión celular puede medirse por otras técnicas (ver "Introducción"), el uso de la citometría de flujo para el estudio de la fusión tiene propiedades evidentes: determinación directa del número de células fusionadas y no fusionadas de cada tipo, accesibilidad a la estequiometría global de la fusión; rapidez y objetividad en el análisis, proporcionando capacidad técnica para el examen del efecto de múltiples agentes y accesibilidad a la determinación de la expresión de antígenos de superficie de las células fusionadas y no fusionadas.

El método fue ampliamente caracterizado, por lo que provee una herramienta para el estudio de los factores asociados con la inhibición y/o la promoción de un fenómeno de importancia potencial en la patogénesis del SIDA.

2. Transferencia de energía de la fluorescencia en células fusionadas

La fusión entre células marcadas con el colorante rojo (DiI) y células marcadas con el colorante verde (DiO) produce una población de células fusionadas fluorescentes en ambos colores. Sin embargo, la fluorescencia roja de las células fusionadas mostró reiteradamente un incremento de intensidad de al menos 4 veces en relación con la fluorescencia roja de las células no fusionadas marcadas con DiI. Se examinó la posibilidad de que este efecto fuera causado por una incorporación mayor de células "rojas" vs. células

“verdes” en los sincicios, o bien por una interacción entre los colorantes debida a transferencia de energía (FRET), dado que los espectros de emisión del DiO y de absorción del DiI están ampliamente superpuestos.

Mediante experimentos de marcaje simultáneo de un sólo tipo celular con ambos colorantes se comprobó que el incremento de la fluorescencia roja se debe efectivamente a FRET, ya que las células marcadas con ambos colorantes mostraron el mismo incremento de la fluorescencia roja que las células fusionadas. El aumento en la concentración de DiO utilizada para marcar las células produjo incrementos proporcionales en la fluorescencia roja.

En el FRET una molécula excitada dona energía a una molécula aceptora si la distancia entre ellas es de 1 a 10 nm. Por lo tanto, se requiere una estricta cercanía física entre los colorantes. Esta propiedad explica que el transferencia de energía no se observe en mezclas de células marcadas en ausencia de fusión, ni tampoco en los escasos agregados celulares que son detectados como partículas doblemente fluorescentes. Un nivel de FRET similar al detectado en las fusiones se observa en el caso del efecto de ciertos sueros de pacientes seropositivos al VIH que promueven un porcentaje elevado de agregación celular. Tales agregados, sin embargo, pueden distinguirse de las fusiones por sus características de tamaño y granularidad.

De estas observaciones se deriva la posibilidad de detectar valores variables de FRET relacionados con distintos grados de mezcla de las bicapas lipídicas, es decir, con la formación de estados intermedios de la fusión y el efecto de anticuerpos y otros inhibidores sobre los mismos.

3. Estequiometría de la fusión

Conforme avanza la fusión, la disminución en el número de células Env⁺ es mucho menor que la disminución en el número de células CD4⁺, implicando que la relación Env⁺/CD4⁺ (r) en los sincicios es mayor que 1. Puesto que las células se cultivaron en una relación 1:1, este efecto no se debió a una mayor abundancia relativa de células E6. De hecho, r fué mayor de 1 aún en presencia de un exceso de células Env⁺. Por lo tanto, las células Env⁺ mostraron una capacidad intrínseca para fusionarse con varias células E6. El estudio de las causas del reclutamiento de múltiples células CD4⁺ por células Env⁺ en las fusiones, debe involucrar inicialmente dos hipótesis:

a) La probabilidad de que ocurra la estequiometría observada aumenta considerablemente debido a niveles bajos de expresión de expresión de CD4⁺ por las células E6 y expresión abundante de gp120/gp41 por las células Env⁺. Esta hipótesis puede ser confirmada mediante estudios de fusión entre células en las cuales se ha modificado el nivel de expresión de estos receptores.

b) La estequiometría depende de la facilitación de la fusión por la desestabilización transitoria de la membrana citoplasmática de la célula Env⁺. Esta desestabilización, la cual precede a la fusión celular ha sido estudiado por Dimitrov y cols. (102). Esta posibilidad podría examinarse mediante estudios por citometría de flujo de la liberación de un marcador fluorescente hidrofílico por las células HXBc2, si el porcentaje de células que se permeabiliza es igual al porcentaje de células que se fusionan.

Este hallazgo conduce a postular un posible mecanismo de amplificación del daño debido a la fusión (o la transmisión del virus célula-célula) por células

infectadas. Por otra parte, r podría constituir un indicador de referencia de la fusogenicidad de células que expresan las proteínas virales.

4. Efecto del suero y anticuerpos monoclonales sobre la fusión celular

La aplicación de este método al análisis del efecto del suero de los pacientes seropositivos al VIH, mostró que factores de este, principalmente anticuerpos, ejercen un efecto sobre la fusión que se relaciona con la etapa clínica de la infección. La inhibición de la fusión fue más frecuente en los pacientes sin SIDA (contar menores de -6-19.87), mientras que la falta de efecto o la promoción de la fusión se encontraron asociadas a SIDA (idem). La determinación del efecto del suero sobre la fusión es potencialmente útil en el pronóstico del curso de la infección, apoyando el manejo clínico de los pacientes y en la optimización de la aplicación de terapias antivirales.

Puesto que los resultados anteriores se obtuvieron utilizando el suero completo a diluciones iguales, su efecto probablemente refleja la suma de factores cualitativos (especificidad de los anticuerpos y su capacidad inhibidora o promotora de la fusión) y cuantitativos (concentración de los mismos, tomando en cuenta la proporción que puede encontrarse ocupada por partículas virales en complejos inmunes). A continuación se discuten separadamente los modos probables en que tendría lugar la inhibición y la promoción de la fusión.

Inhibición

La capacidad neutralizante del VIH por anticuerpos producidos durante la infección está ampliamente documentada, aunque su papel en el control de la infección ha sido debatida durante largo tiempo. Sin embargo, se han acumulado evidencias de que su participación en la contención de la infección puede ser importante. Anticuerpos neutralizantes para variantes de virus adaptadas al crecimiento en líneas celulares y para aislados primarios, se detectan en los individuos infectados y se ha mostrado que son más frecuentes en sujetos asintomáticos y en pacientes no progresores que en pacientes con SIDA (109-113). Asimismo, anticuerpos neutralizantes en contra de aislados primarios autólogos se desarrollan semanas después de la infección primaria (114-117), mientras que anticuerpos que reaccionan con virus adaptados al cultivo en líneas celulares, usualmente virus X4 altamente fusogénicos, se detectan con mayor frecuencia algunos meses después de la infección primaria (116). Por lo tanto, anticuerpos con capacidad neutralizante son producidos en los pacientes y tienden a estar presentes en asociación con una mejor condición inmunológica de éstos.

No obstante, la progresión de la enfermedad tiene lugar aún en presencia de esta respuesta inmune. Las explicaciones probables incluyen la rápida generación de mutantes de virus que escapan a la neutralización (115-118), inaccesibilidad de los epítopes conservados importantes en la estructura cuaternaria de Env, especialmente en aislados primarios (revisado en ref. 119), y generación de anticuerpos hacia fragmentos irrelevantes de los antígenos virales ("viral debris") (119). Otra posibilidad es que, en etapas tardías de la infección, la magnitud de la transmisión célula a célula sea mucho más importante que en las etapas previas. Los anticuerpos detectados por los

ensayos de neutralización podrían afectar la fusión célula-célula de manera distinta a la fusión virus-célula. El examen del efecto de los anticuerpos monoclonales mostrado en el presente trabajo es consistente también con esta proposición. De los tres anticuerpos neutralizantes del VIH-1 probados en este trabajo, dos (F105 y 902) mostraron solo una escasa actividad inhibitoria (30%) aún a concentraciones considerablemente superiores a las reportadas para la neutralización de partículas virales (86, 88, 120). Estas observaciones concuerdan con un reporte en donde la infectividad de virus libres se inhibió por un anticuerpo monoclonal anti-V3, mientras que el mismo anticuerpo no tuvo efecto sobre la transmisión virus-célula (52). El tercer anticuerpo (2G12), es uno de los pocos monoclonales con alta eficiencia de neutralización de una amplia variedad de cepas virales y con actividad potente contra aislados primarios. En este trabajo se demuestra que este anticuerpo sí inhibe la fusión célula-célula dependiente de la envoltura viral, aunque a concentraciones al menos 8 veces mayores de las reportadas para la inhibición virus célula (91). Finalmente, la fusión fue solo marginalmente inhibida por anticuerpos anti-CXCR4. Estas observaciones indican menor sensibilidad de la fusión célula-célula a la actividad de inhibidores de clásicos de la fusión virus-célula.

Las observaciones descritas resaltan que la actividad de los anticuerpos del suero sobre la fusión celular no coincide necesariamente con su capacidad neutralizante de partículas infecciosas. Aunque ambos procesos (fusión célula-célula y fusión virus-célula) comparten el mecanismo básico, el contacto estrecho entre membranas citoplásmicas de células infectadas provee un área extensa para el establecimiento de numerosas interacciones efectivas entre los receptores involucrados. Adicionalmente, moléculas propias de la membrana celular pueden favorecer la adhesión intercelular (CD4, moléculas de adhesión, moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad), y potenciar la avidéz de las interacciones específicas. Se ha demostrado que anticuerpos dirigidos a ellas pueden inhibir la transmisión del virus célula a célula (ver "Introducción"). Estos autoanticuerpos podrían inhibir significativamente la fusión por sí mismos o en conjunto con anticuerpos anti-Env. La presencia de tales anticuerpos ha sido demostrada en una importante proporción de individuos infectados, debida principalmente a hiperactividad de los linfocitos B (81).

Nuestras observaciones de que la actividad inhibitoria de la fusión del suero se relaciona con el estadio clínico de los pacientes introduce la posibilidad de que cierto tipo de anticuerpos inducidos por las proteínas virales o combinaciones particulares de ellos (quizás en conjunto con autoanticuerpos) juegen un papel importante en la inhibición de eventos de fusión celular asociados a la patogénesis del SIDA. Puesto que las células transfectadas expresan las proteínas de fusión de un virus prototipo altamente fusogénico, el efecto de los anticuerpos del suero se debe probablemente al reconocimiento de epítopes conservados esenciales para interacción de gp120 con CD4 y CXCR4, y para la activación de gp41. La identificación de los epítopes involucrados puede incidir en el diseño de terapias inmunológicas dirigidas hacia la inhibición de la fusión mediada por Env.

Promoción

El importante incremento de la fusión producida por algunos sueros podría explicarse principalmente por tres mecanismos:

a) Inducción de cambios conformacionales en gp120 que activan la maquinaria de fusión, de manera similar al incremento de la fusión por concentraciones bajas de CD4 soluble. Esta molécula se ha considerado tanto un activador como un inhibidor de la reacción de fusión: un activador porque induce los cambios conformacionales que preceden a la fusión, y un inhibidor dado que bloquea competitivamente la interacción de gp120 con el CD4 celular y/o induce liberación de gp120, (122). El incremento de la fusión mediado por CD4 es altamente variable, dependiendo del tipo celular. Es notable que, para algunos aislados de HIV-2, CD4 soluble favorece la infección de células CD4-negativas (123), indicando que la unión de CD4 soluble podría inducir la exposición de sitios crípticos en gp120 o gp41 para el correceptor. En este modelo, CD4 soluble sustituye el lugar del CD4 de superficie muy eficientemente, activando la maquinaria de fusión (123). Se han descrito anticuerpos monoclonales anti-gp120 que favorecen la infectividad del virus por un mecanismo similar (124). Los epítopes de gp120 reconocidos por estos anticuerpos incluyen el sitio de unión a CD4, la tercera región hipervariable (V3) y epítopes expuestos después de la interacción de gp120 con CD4.

b) Aglutinación de los linfocitos, incrementando la fuerza de los contactos intercelulares y, en consecuencia, la fusión (incremento de la avidéz de las interacciones específicas). Este efecto, el cual podría ser mediado por redes virus- anticuerpos-células o, como lo ha descrito Subbramanian y cols. (125), a receptores de complemento unidos a complejos complemento-anticuerpos-célula. Asimismo, debe considerarse la posible participación de anticuerpos polivalentes (IgM, IgA). Nuestras observaciones de que los dos sueros que incrementaron la fusión en más del 50% también mostraron capacidad para aglutinar células no fusogénicas (522 y E6), (ver "Resultados Adicionales") muestra que esta puede ser una forma muy eficiente de promoción de la fusión.

c) Activación de la expresión de moléculas de adhesión por anticuerpos o por otras moléculas solubles, de manera similar a la estimulación por IFN-gama de la fusión de macrófagos con la generación de células gigantes multinucleadas (126), o la aglutinación e incremento de la actividad fusogénica inducida por un anticuerpo anti-CXCR4 en una línea de linfoblastos humanos infectados con el VIH-1 (97).

Notablemente, dos de los tres sueros que mostraron importante actividad aglutinante/fusogénica provinieron de pacientes con SIDA y carga viral elevada. Esta observación indica que la presencia en el suero de factores aglutinantes de linfocitos T se asocia a un mal pronóstico clínico de la infección.

5. Consideraciones finales: fusión celular y patogénesis.

Las causas de la disminución progresiva de células T CD4+ en los pacientes infectados por el virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) y el

tipo de inmunidad implicada en la contención de la infección, son dos aspectos fundamentales en la investigación del SIDA para los cuales no existe aún una explicación satisfactoria (127). La formación de sincicios a través de la fusión celular inducida por el VIH (1, 18, 56, 62, 128), así como la transmisión del virus célula-célula (48) y los fenómenos de activación inmunológica (127) se han sugerido como eventos subyacentes que pueden ser significativos en la patogénesis.

Aunque no hay dudas de que el VIH-1 puede destruir células T CD4+ directamente tanto "in vitro" como "in vivo", esta no es la única explicación para la progresión de la enfermedad (129). Estudios "in vivo" de la dinámica viral y celular muestran que la desaparición progresiva de células CD4+ en la circulación no puede explicarse por su eliminación directa por el virus, como tampoco por la falla del sistema inmune para reemplazar estas células a la velocidad requerida. En cambio, las evidencias actuales sugieren que la activación inmune inducida por la infección guía tanto la replicación viral como la disminución de las células CD4+ (127, 130). Aunque los sincicios formados por células T no se observan comúnmente en los tejidos de individuos infectados, su presencia *in vivo* podría estar enmascarada por productos de fusión pequeños prácticamente indistinguibles de las células normales. Esta posibilidad ha sido propuesta también por Sodroski y cols. (14), a partir del estudio de variantes patogénicas de virus quiméricos simio-humano que causan inmunodeficiencia en macacos, en los cuales la capacidad fusogénica de la envoltura viral se asoció con la disminución de células T CD4+.

Los virus X4 aparecen en las etapas avanzadas de la infección. Es factible que la activación inmunológica sostenida durante varios años favorezca adicionalmente la generación de virus altamente fusogénicos de células T mediante dos mecanismos combinados:

- 1) La selección por el sistema inmune mediante la eliminación progresiva de virus circulantes (por anticuerpos neutralizantes) y de células infectadas que sostienen eficientemente la producción y liberación de partículas virales (por células citotóxicas). Ambas actividades, anticuerpos neutralizantes y células citotóxicas específicas para los antígenos del VIH-1, son detectables fácilmente durante la infección, mientras el sistema inmune aún está intacto (131). En particular, la neutralización por anticuerpos, el cual constituye el principal mecanismo de eliminación de partículas virales libres, puede sin embargo no ser igualmente efectivo en la inhibición de eventos de fusión celular mediados por células infectadas (52 y "Resultados Adicionales").

- 2) La activación inmunológica crónica con producción de linfocinas activadoras de linfocitos T. Estos mediadores favorecen la expresión de moléculas de adhesión sobre la superficie de los linfocitos T, favoreciendo la transmisión del virus célula-célula. El efecto de interleucinas mediadoras de la inflamación sobre la fusión celular puede ser particularmente significativo en los tejidos linfoides, donde el virus establece un estado de activación crónica que conduce a la degeneración progresiva de la estructura ganglionar característica del SIDA (132). En estos sitios, el virus induce el incremento de la expresión de importantes linfocinas inflamatorias como IFN-gama y TNF-alfa, promoviendo extravasación y secuestro de linfocitos mediante la activación de la expresión y secreción de quimiocinas, selectinas, integrinas y otras moléculas de adhesión sobre linfocitos y endotelio vascular (revisado en ref. 132). El efecto de estos mediadores, en combinación con la presencia de células

infectadas, podría favorecer la fusión celular a través del aumento de la expresión de moléculas de adhesión.

En condiciones de alta densidad celular, este proceso de activación-mutación-selección favorecería la generación de virus que se transmiten célula-célula de manera muy eficiente y que pueden promover la fusión celular. Las observaciones reportadas en esta tesis sientan las bases para el estudio las propiedades biológicas de las células fusionadas, así como de los factores que influyen en la fusión de membranas dependiente de las proteínas de la envoltura del VIH.

CONCLUSIONES

1. La fusión celular puede cuantificarse en forma automática, objetiva y directa por citometría de flujo, mediante la tinción de las células con los colorantes lipofílicos fluorescentes DiI y DiO. El procedimiento es sencillo y mínimamente invasivo.
2. El método diseñado permite distinguir claramente entre fusión y agregación celular mediante la comparación del perfil de tamaño y granularidad de estas poblaciones, así como por el incremento de la intensidad de la fluorescencia roja del DiI en las células fusionadas debido a un proceso de transferencia de energía de la fluorescencia del DiO al DiI.
3. La fusión entre las células HXBc2 y E6 teñidas con DiO y DiI produce entre 14 a 18% de productos de fusión.
4. La especificidad de la fusión no es afectada por el procedimiento de tinción: depende del nivel de expresión de CD4 y de gp120/gp41, es altamente sensible a anticuerpos anti-CD4, medianamente sensible a anticuerpos anti-gp120 y marginalmente sensible a anticuerpos anti-CXCR4.
5. Las concentraciones de anticuerpos monoclonales anti-gp120 que inhibieron la fusión células-célula fueron al menos 8 veces mayores a las concentraciones reportadas como necesarias para inhibir la fusión virus-células. Estas observaciones indican que la fusión célula-célula es menos sensible a la actividad de inhibidores clásicos de la fusión virus-célula.
6. El tratamiento matemático de los datos de citometría de flujo permite estimar la composición celular de los sincicios o estequiometría de la fusión. Se demostró que esta se modifica con el tiempo de incubación y con la proporción inicial de cada tipo celular en el cocultivo.
7. La estequiometría de los sincicios (relación E6/HXBc2 en las fusiones) es >1 , de modo que una sola célula Env+ es capaz de fusionarse con varias células CD4+. Esto sugiere un mecanismo de amplificación de los efectos de la fusión, involucrando a varias células circundantes no infectadas por cada célula infectada.
8. El método permite el análisis rápido y preciso del efecto sobre la fusión de grupos numerosos de sueros. Los sueros tanto de los controles como de los infectados inhiben o promueven la fusión. Existe una amplia variación en la actividad del suero sobre la fusión entre individuos infectados; este efecto aumenta conforme avanza la enfermedad.
9. La actividad del suero se relaciona directamente con la cuenta de linfocitos T CD4+ e inversamente con la carga viral. Existe una diferencia

significativa entre el efecto de sueros de pacientes con SIDA y con infección asintomática.

- 10.** Los resultados indican que anticuerpos inhibidores de la fusión se producen en estadios asintomáticos de la infección y decaen cuando los individuos presentan SIDA. Esta observación es consistente con la hipótesis de un papel protector de los anticuerpos inhibidores de la fusión celular.
- 11.** La determinación del efecto del suero sobre la fusión celular podría utilizarse como un indicador diagnóstico y pronóstico en el manejo clínico de los individuos con infección por el VIH-1.
- 12.** En esta tesis se ha enfatizado la importancia de la fusión celular como mecanismo patogénico del SIDA y se han sentado las bases para una exploración metódica de los factores que la afectan y de sus consecuencias biológicas.

PERSPECTIVAS

Las perspectivas planteadas a continuación contemplan la aplicación de las técnicas descritas en la práctica clínica y la profundización en la investigación de la fusión celular como causa subyacente en la patogénesis del SIDA:

- Determinación del valor diagnóstico y pronóstico del efecto del suero fusión celular, idealmente en un estudio longitudinal sobre una muestra numerosa de individuos infectados por el VIH-1. Los resultados contribuirían a apoyar el manejo clínico de los pacientes y la optimización del uso de terapias antirretrovirales.
- Investigación de la especificidad y concentración relativa de los anticuerpos del suero que inhiben y favorecen la fusión, así como de la probable participación de autoanticuerpos. Estos estudios conducirán a proponer nuevos enfoques experimentales para el diseño de vacunas.
- Determinación del fenotipo de los sincicios en relación con su composición celular (estequiometría), con el fin de desarrollar la capacidad de identificarlos en células sanguíneas y tejidos de individuos infectados.
- Investigación de las consecuencias patológicas de la formación de sincicios en función de su estequiometría, tanto para las células fusionadas como para las células circundantes.
- Investigación del papel de la activación inmunológica, en particular el efecto de linfocinas y quimiocinas, que se observa durante la infección por el VIH-1 (127) en la estimulación de eventos de fusión celular y su relación con la progresión a SIDA. Estos estudios se extenderán a la fusión inducida por células que expresen proteínas de fusión de distintas variantes del VIH-1 y a células infectadas por virus prototipo. Los resultados incidirán en la proposición de nuevos enfoques terapéuticos que prolonguen el periodo asintomático de la enfermedad.

APÉNDICE 1

El virus de la inmunodeficiencia humana: estructura y función

En la figura 1 se presenta un esquema de la estructura viral mostrando la ubicación de los componentes del núcleo, la cápside, la matriz y la envoltura del virión. Las partículas maduras extracelulares miden 90-130 nm de diámetro y tienen una doble membrana (envoltura) que rodea un núcleo cilíndrico electrodenso. La envoltura del virus está formada por una membrana lipídica derivada de la célula huésped. Dos proteínas virales, la glicoproteína de la superficie externa, gp120, y la glicoproteína de la transmembrana, gp41, cubren la membrana viral. Adicionalmente, la envoltura contiene proteínas derivadas de la célula huésped como β 2-microglobulina, antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad Clase I y Clase II, y moléculas de adhesión (70, 71).

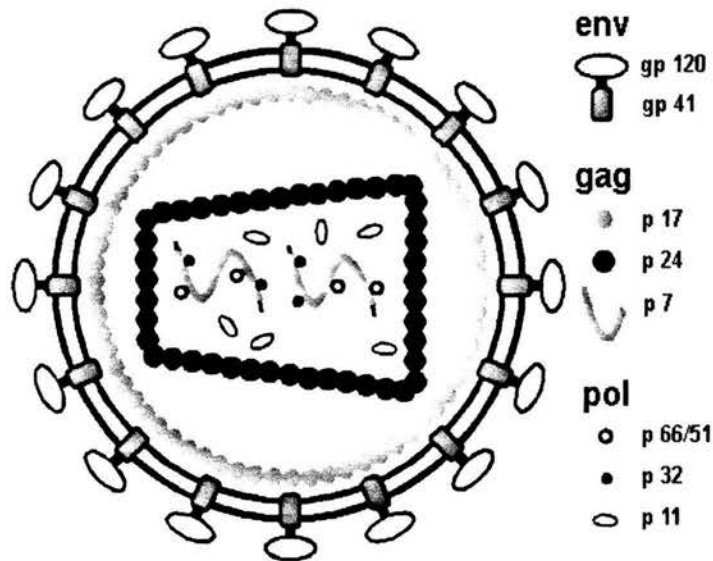


Fig 23. Estructura del VIH-1. SU, unidad de superficie; TM, proteína transmembranal; MA, proteína de la matriz; CA proteína de la cápside; NC, proteína de la nucleocápside; Pr, proteasa; RT, transcriptasa reversa; In, integrasa; $tRNA^{lys}$, iniciador usado para la transcripción reversa. La localización exacta de otras proteínas virales tales como Vpr y p6 no se ha determinado. Fig 1. Estructura del VIH-1. SU, unidad de superficie; TM, proteína transmembranal; MA, proteína de la matriz; CA proteína de la cápside; NC, proteína de la nucleocápside; Pr, proteasa; RT, transcriptasa reversa; In, integrasa; $tRNA^{lys}$, iniciador usado para la transcripción reversa.

Se han identificado dos subtipos del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), como los agentes etiológicos del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida humana (SIDA): el VIH tipo 1 (VIH-1), encontrado principalmente en África Central, Europa y América, y el VIH tipo 2 (VIH-2), el cual infecta individuos de África Occidental. Ambos pertenecen al grupo de los retrovirus, los cuales tienen como característica la capacidad de convertir su material genético compuesto de ARN en ADN, y pertenecen a la familia de los lentivirus.

Organización genómica, expresión y función de las proteínas virales.

El genoma está compuesto de dos cadenas de RNA de una sola hebra con aproximadamente 9200 nucleótidos. Como otros retrovirus, el genoma contiene secuencias terminales repetidas (LTR's) que poseen señales para la iniciación y la terminación de la transcripción, así como los genes *gag* (antígenos específicos del grupo, proteínas que forman la matriz y la cápside), *pol* (proteasa, encargada del procesamiento de los productos *gag* y *pol*, transcriptasa reversa e integrasa) y *env* (envoltura, codifica para las glicoproteínas gp120, la cual se une al receptor CD4 y gp41, promueve la fusión con la célula blanco). El VIH también posee tres genes implicados en la regulación del crecimiento viral, *rev* (proteína reguladora del virión), *tat* (transactivador de la transcripción) y *nef* (factor regulador negativo, función actualmente en duda). El genoma contiene también otros tres genes pequeños: *vpu* (proteína viral U, requerida para el ensamble eficiente del virus), *vpr* (proteína viral R, activa débilmente la transcripción) y *vif* (factor de infectividad del virión). La organización genómica del HIV-1 y las proteínas expresadas se muestran en la fig. 2 (133).

Ciclo de vida

La replicación del genoma viral se divide en dos fases: temprana y tardía. La fase temprana consiste en la interacción del virus con el receptor de superficie (la molécula CD4 en la mayor parte de los casos), la liberación del ARN de la nucleocápside, la conversión del ARN viral en la forma de ADN y la integración en el cromosoma de la célula huésped. La fase tardía consiste en la expresión de las proteínas virales a partir del genoma viral integrado, la traducción de las proteínas virales y el ensamble y liberación del virus (133). El virus es capaz de infectar una variedad de células, afectando principalmente células sanguíneas (linfocitos, macrófagos, megacariocitos y células dendríticas) y células del cerebro (macrófagos, oligodendrocitos, astrocitos y células endoteliales) (8).

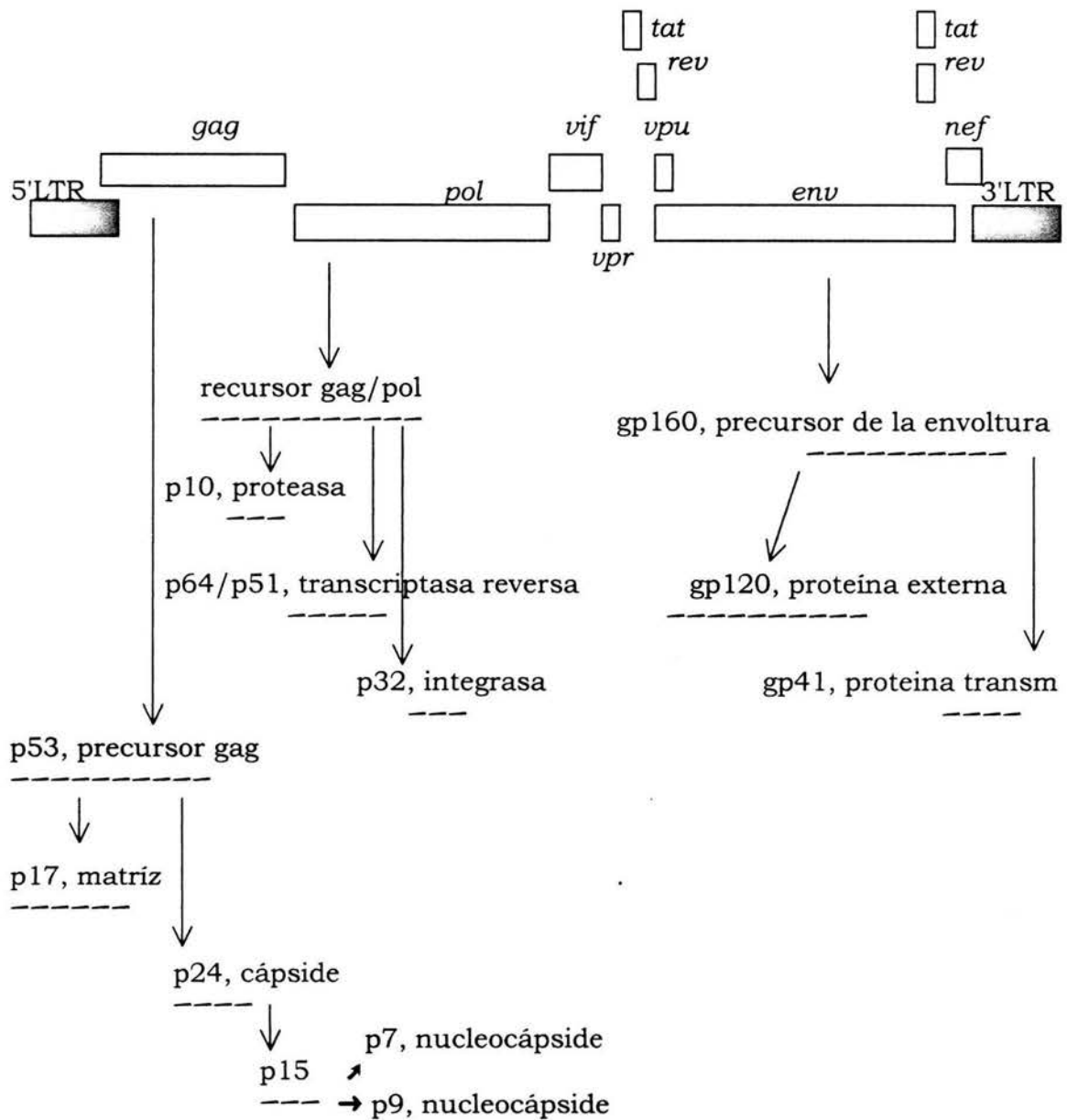


Fig 24. Organización genética del VIH-1 y expresión y procesamiento de los productos de los genes gag, pol y env. Como se indica, las secuencias que codifican algunos genes se sobrelapan. El procesamiento diferencial de un ARN original y su traducción en diferentes marcos de lectura produce los diversos productos génicos (133).

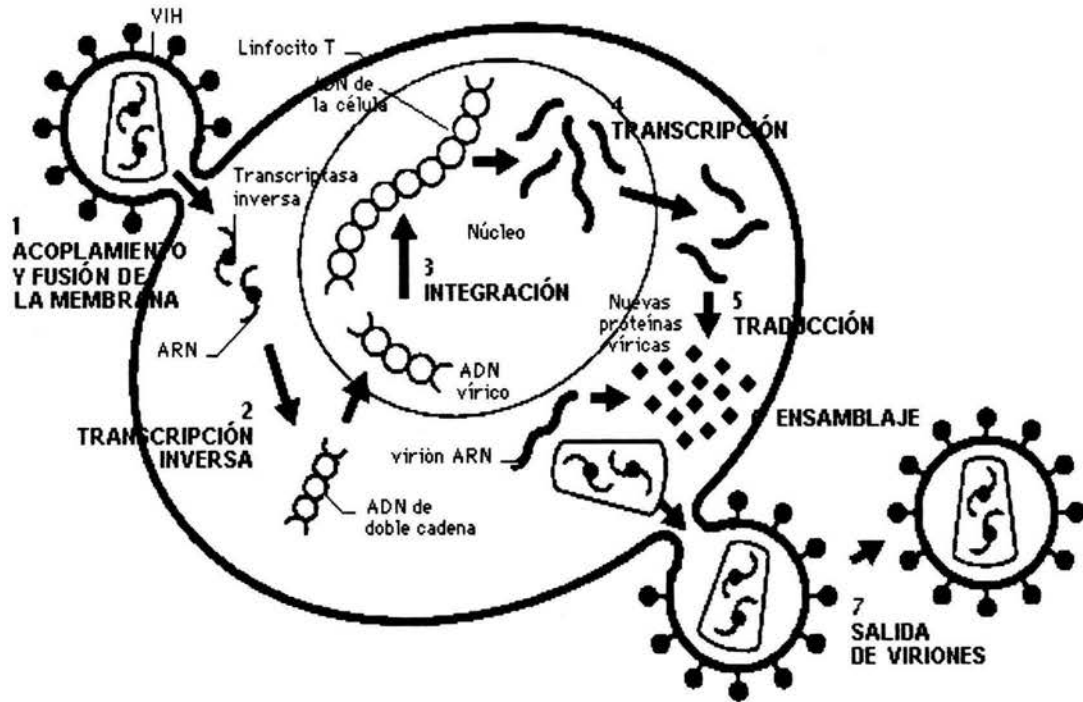


Fig. 25. Ciclo de vida del VIH.

Una vez que el ARN ha sido introducido en una célula blanco y liberado de la cápside, es transcrito en ADN por la enzima transcriptasa reversa. El ADN viral es integrado en el genoma de la célula huésped, formando un provirus, el cual puede permanecer en un estado latente y ser transmitido a las células hijas. La activación del provirus inicia la transcripción de los genes estructurales en ARN mensajero, el cual es traducido en proteínas virales. La membrana plasmática es modificada por inserción de gp41 y gp120; el ARN viral y las proteínas de la cápside se ensamblan debajo de ésta, adquiriendo la membrana modificada de la célula huésped como su envoltura en un proceso denominado gemación. Una vez dentro de la célula huésped la replicación del virus es modulada tanto por factores celulares como virales, dando como resultado ya sea la permanencia del provirus integrado en el DNA celular (latencia), la replicación controlada con producción moderada de virus sin muerte de la célula, o la producción masiva de virus acompañada de lisis celular. (134) (Figura 4).

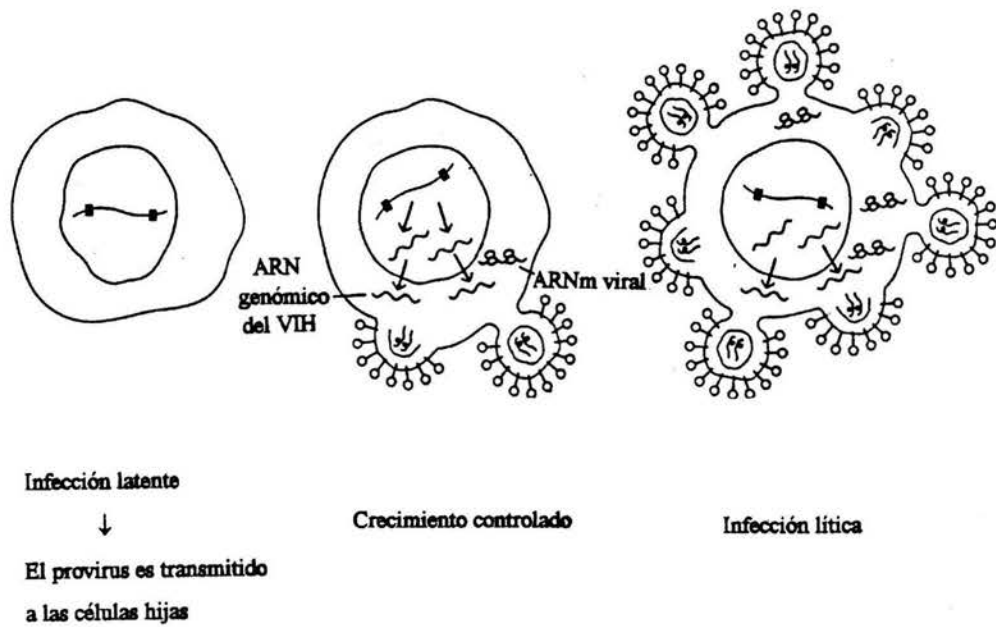


Figura 26. Formas del ciclo replicativo del HIV.

APÉNDICE 2

Historia natural de la infección por el virus de la inmunodeficiencia adquirida humana

La figura 1 ilustra el curso de la infección por el VIH (ver Apéndice 1). En ella se describe la cantidad de virus detectado en la sangre periférica de los individuos infectados así como el cambio en el número total de los linfocitos T CD4+ en la sangre periférica, el indicador principal del transcurso de la infección. Esta puede dividirse en tres etapas: infección aguda, periodo asintomático y SIDA.

Infección aguda.

En la figura 2a se muestran en forma esquemática las principales características de este periodo. La infección primaria por el VIH, puede ser asintomática o asociada con un síndrome semejante a influenza A y B o semejante a mononucleosis (Apéndice 2). La enfermedad aparece repentinamente y dura de 3 a 21 días. El primer marcador serológico detectado es el antígeno p24 del núcleo viral (ver Apéndice 1), el cual aparece al mismo tiempo o antes de las manifestaciones clínicas y de la aparición de anticuerpos (seroconversión). Una segunda característica de la seroconversión es una disminución transitoria en el número de células CD4+ (Figura 5) (135). En los últimos años, la transmisión de la infección puede ser detectada mediante una prueba consistente en la amplificación del genoma viral por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Por este medio es posible detectar la infección aún antes de la aparición de los marcadores serológicos (Hewlett). Desafortunadamente, el PCR aún no es una técnica de aplicación masiva, siendo la detección del antígeno p24 y la cantidad de células CD4+ los indicadores de uso común. Los virus que pueden ser aislados inmediatamente después de este periodo tienen una alta capacidad replicativa y de formación de sincisios (136).

Periodo asintomático.

La figura 2b muestra las características generales del curso de la infección durante un periodo de varios años. Después de la seroconversión, el aislamiento del virus a partir de células de la sangre periférica es considerablemente más difícil y el nivel de antígeno p24 en el plasma generalmente cae por debajo del nivel de detección. El antígeno será detectable nuevamente meses o años más tarde como un marcador pronóstico de enfermedad inminente, o como asociado con enfermedad clínica (136). Sin embargo, ya desde el periodo asintomático el virus infecta extensamente la zona de los centros germinales en los ganglios linfáticos (Apéndice 3). Por lo tanto, durante este periodo la replicación del virus se lleva a cabo activamente aún en ausencia de síntomas (26, 137).

SIDA

Una característica de la progresión a la enfermedad es la disminución en el número de células CD4+. El tiempo requerido para aislar el virus a partir de

la sangre periférica de un paciente es más corto y la producción de virus obtenida es más alta. Por lo tanto, en esta etapa el virus ya no se encuentra limitado a los nódulos linfáticos, encontrándose ahora diseminado en la sangre.

El SIDA es el estado 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 del número de células T ayudadoras que portan el receptor membranal CD4. Junto con síntomas como desgaste (pérdida de peso) y demencia, el paciente inmunodeficiente es atacado por infecciones por microorganismos que normalmente no son considerados patogénicos y por neoplasmas poco comunes. La descripción detallada de los signos clínicos de las diferentes etapas de la enfermedad está contenida en la clasificación de los Centros para el Control de Enfermedades de Atlanta, Georgia (clasificación CDC, Apéndice 3). Al momento en que la infección progresa a SIDA o se presentan los síntomas iniciales (Complejo Relacionado al SIDA, CRS), se observa una disminución aguda en el número de células CD4+, un aumento del nivel de antígeno plasmático y pérdida de anticuerpos neutralizantes en contra del virus .

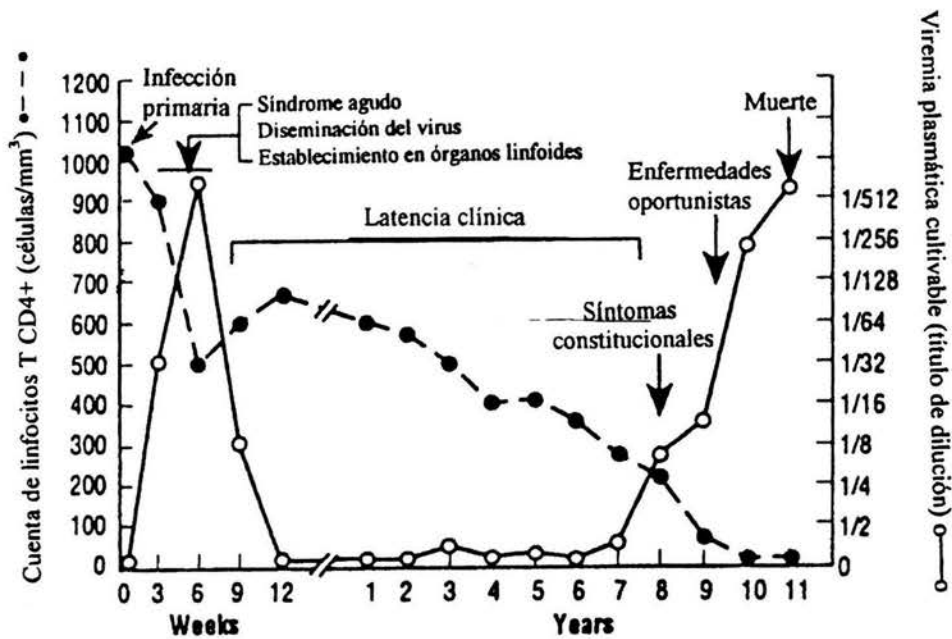


Fig.27. Parámetros clínicos y cambios en la cuenta de linfocitos T CD4+ en la infección por el VIH (138).

APÉNDICE 3

Clasificación CDC (1993) de los estados de la infección por el VIH.

	Categorías clínicas		
	(A)	(B)	(C)
Cuenta de células T CD4+	Asintomático, infección aguda o LGP *	Sintomático, (no en condiciones A o C)	Condiciones indicadoras de SIDA
(1) > 500 μ L	A1	B1	C1
(2) 200-499 μ L	A2	B2	C2
(3) < 200 μ L	A3	B3	C3

Condiciones indicadoras de SIDA:

Enfermedad constitucional, incluyendo uno o más de los síntomas siguientes:

- (i) Fiebre persistente por más de 14 días sin otra infección
- (ii) Pérdida de peso
- (iii) Diarrea persistente por más de 30 días sin causa definida

Enfermedad neurológica, incluyendo uno más de los síntomas siguientes:

- (i) demencia
- (ii) mielopatía
- (iii) neuropatía periférica

Infecciones oportunistas, incluyendo una o más de las siguientes:

- Neumonía por *Pneumocystis carinii*
- Enfermedad micobacteriana diseminada atípica
- Toxoplasmosis cerebral
- Candidiasis esofageal
- Criptosporidiosis
- Criptococosis extrapulmonar
- Retinitis por citomegalovirus
- Coccidioidomicosis diseminada
- Histoplasmosis diseminada
- Tuberculosis involucrando al menos un sitio extrapulmonar
- Septicemia recurrente no-tifoide
- Strongiloidosis extraintestinal
- Leucoencefalopatía multifocal progresiva

Neoplasmas

- Sarcoma de Kaposi

Linfoma primario cerebral
Linfoma no-Hodgkins
Otros: observaciones clínicas o enfermedades no clasificadas arriba
pero atribuidas a infección por el VIH.

*: Linfadenopatía generalizada persistente.

Adaptado de la ref. 139.

Faltan páginas

N° 66-75

ANEXOS

1. ARTÍCULO PUBLICADO

Faltan páginas

N° 77-83

2. ARTÍCULO ENVIADO A PUBLICACIÓN

HIV-1-envelope dependent cell-cell fusion regulation by HIV-positive sera is related to disease progression.

Huerta L.¹, Gómez-Icazbalceta G.¹, Soto L.², Viveros M.², Rodríguez R.², Fuentes L.², Lamoyi E.¹, and C. Larralde^{1*}.

¹*Department of Immunology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal, México, and* ²*Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Secretaría de Salud, Distrito Federal, México.*

Running title: Serum effect on cell-cell fusion in HIV-1 infection

*Corresponding author:

Carlos Larralde
Departamento de Inmunología
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México
Apartado Postal 70228
Distrito Federal, C.P. 04510
México

Telephone: (5255) 5622-38-54
Fax: (5255) 56-22-33-69
E-mail: larralde@servidor.unam.mx

Total words in
Main text: 3,582
Summary: 244
Figures and Tables: 6

SUMMARY

Fusion of CD4⁺ T cells by HIV-1 envelope proteins is a mechanism of virus spread and cell damage. Production of specific antibodies with the ability to influence cell-cell fusion “in vivo” may affect the course of the infection. We tested the ability of sera from 49 HIV-1-positive patients to affect “in vitro” the fusion between Env-expressing Jurkat T cells and untransfected Jurkat target cells. Quantification of cell-cell fusion was performed by flow cytometry of cells previously labeled with the lipophilic dyes DiI and DiO. Sera from HIV-infected subjects varied in their activity on fusion: 69.4% inhibited, 24.5% had no effect, and 6.1% enhanced cell fusion. Fusion activity correlated positively with the CD4⁺ T cell count and inversely with the viral load. Thus, sera from patients with a CD4⁺ T cell count >200 cells/mm³, viral loads <75,000 HIV RNA copies/ml and with non-AIDS clinical conditions inhibited fusion significantly better than those from patients with less than 200 cells/mm³ ($p = .0054$) viral loads >75,000 RNA copies/ml ($p = .0366$) and with AIDS ($p = .0277$). Adsorption of immunoglobulins from inhibitory sera with Protein G-agarose significantly eliminated fusion inhibition but favored the enhancing effect. Our data indicate that antibodies modulate cell-cell fusion in HIV infection: inhibitory activity predominates in early and intermediate stages of infection, whereas loss of inhibition or enhancement of fusion correlates with progression to AIDS. Identification of the antigens inducing the production of fusion inhibitory antibodies could be of therapeutic and preventive value. Elucidation of the factors enhancing fusion may provide new insights in the pathogenesis of HIV infection.

INTRODUCTION

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) obtained from the blood of patients frequently induces cell-cell fusion with syncytia formation in cultures of CD4⁺ T cells. Syncytia formation is a consequence of the interaction between infected cells expressing the virus envelope glycoprotein (Env) on their cytoplasmic membranes, and neighbour uninfected CD4⁺ target cells (Lifson et al., 1986; Sodroski et al., 1986).

Several findings indicate that cell-cell fusion may have an important pathogenic role “in vivo”. HIV-infected giant multinucleated cells are frequently detected in the lymph nodes of asymptomatic and AIDS patients, and have been proposed as virus reservoirs (Amendola et al., 1996; Budka 1986; Frenkel et al., 1996; Koenig et al., 1986; Orenstein 2000). Detection of circulating syncytium-inducing viruses (usually requiring CXCR4 as coreceptor) is associated with an increased rate of T CD4⁺ lymphocyte depletion and progression to AIDS (Blaak et al., 2000; Connor et al., 1993; Miedema et al., 1994). Peptides that interfere with the virus-cell fusion step decrease viral loads in infected humans (Kilby et al., 1998; Lazzarin et al., 2003). Furthermore, the membrane fusing ability of the envelope glycoprotein of a simian-human immunodeficiency virus chimera (SHIV), was determinant for CD4⁺ T-cell depletion in infected macaques (Etemad-Moghadam et al., 2001). In conditions of high cell density, cell fusion is a significant cause of cell death “in vitro”, mainly by apoptosis triggered by aberrant initiation of mitosis (Laurent-Crawford et al., 1991; LaBonte et al., 2000; Castedo et al., 2002; Ferri et al., 2000). The magnitude of CD4⁺ cell-cell fusion events can be significant in lymphoid tissues, where close contact between cells is propitiated because of high cellular density (Amendola et al., 1996). On the other hand, cell-to-cell HIV transmission without formation of syncytia, likely involving localized fusion events at cell contact points, was early proposed as the mechanism of transmission between individuals and an important route of viral spread “in vivo” (Gupta et al., 1989; Sato et al., 1992; Phillips 1994). More recently, it has been shown that virus strains highly efficient in cell-to-cell transmission are selected in an “in vitro” model of the rapid T-cell turnover known to occur during the HIV-1 infection. Cell-to-cell transmission was concomitant with the acquisition of a syncytium-inducing phenotype by such viral variants (Gummurulu et al., 2000). Both cell-cell fusion and cell-to-cell virus transmission without complete fusion, require close contact between cells and the function of the HIV-envelope glycoprotein (Sato et al., 1992; Phillips 1994; Gummurulu et al., 2000).

Inhibition of pathogenic cell-cell fusion process by the host immune response could play a significant role in retarding disease progression. In principle, such inhibition would be attainable by HIV-specific neutralizing antibodies. However, antibodies

detected by neutralization assays of cell-free virus are not necessarily effective in inhibiting cell-cell fusion. Early studies demonstrated that infection by cell-associated virus is more efficient than infection by free viral particles (Gupta et al., 1989; Sato et al., 1992; Dimitrov et al., 1993). According to this, it is frequently found that blocking of HIV-1 Env-dependent cell-cell fusion requires higher concentration of specific antibodies (Allaway et al., 1993; Barna et al., 2003) than is necessary to inhibit virus-cell fusion (Zwick et al., 2001; Sullivan et al., 1995; McKeating et al., 1996; Li et al., 1998; Trkola et al., 1998; Posner et al., 1991). In some cases, Env-specific antibodies that effectively inhibited virus infection, did not have effect on envelope-mediated cell-cell fusion (Gupta et al., 1989; Pantaleo et al., 1995). Thus, although neutralizing antibodies of free virus particles can restrict new infections, they could be less effective in the containment of cell-to-cell virus spread and cell death mediated by extensive cell fusion activity in the established infection.

Evaluation of the potential of serum antibodies to influence cell fusion is facilitated by the availability of cell lines transfected with the *env* gene from syncytia-forming HIV-1 strains. Here, we evaluated the activity of sera from HIV-1-infected subjects on Env-mediated cell-cell fusion using Jurkat T cells stably transfected for the expression of the envelope from the HXBc2 HIV-1 strain (Cao et al., 1996), a prototype of syncytium inducing virus. Use of primary isolates, while more specific for each patient, would not allow a fair comparison between individuals affected by different virus variants. It was preferable to use transfected cells expressing well known proteins from a reference strain of HIV-1 clade B, that affects most infected people in Mexico and in the Western world (WHO report 2001; Gudiño & Soler, 2000). This approach also allows the study of cell fusion independently of virus replication. Although several cell lines have been generated which express the HIV-1 *env* gene (Allaway et al., 1993; Litwin et al., 1996), the lymphocytic character of Jurkat cells make them a more suitable model for the study of the HIV-1 envelope mediated cell-cell fusion. An objective quantitation of fusion events was attained by a recently designed flow cytometry assay (Huerta et al., 2002), which, in combination with the stable expression of Env glycoprotein in the transfected cells, provided a reproducible and rigorously quantitative fusion assay to study the effect of a number of patient serum samples. Activity of sera on

fusion was related to the patient's clinical status, viral load and CD4^T lymphocyte count at the time of serum collection.

MATERIAL AND METHODS

Patients. Serum and plasma samples from 49 HIV-1 infected humans (Table 1) were obtained from the Infectology Department at the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán in Mexico City, from March to October of 2002. Except one case (perinatal transmission in a 12 years old), all were adults infected by sexual transmission. Only subjects not having received treatment were included in the study after written informed consent. CD4⁺ cell count of HIV-positive subjects was determined by standard procedures. Clinical status was defined according to the 1993 CDC Classification System for HIV Infection (Castro et al., 1993). Serum from 8 healthy HIV-negative individuals were included as controls.

Plasma HIV-1 RNA quantification. Viral load was determined by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), the Cobas Amplicor HIV-1 Monitor assay (Roche Diagnostic Systems, Mannheim, Germany), as specified by the manufacturer.

Antibodies. Anti-CD4 mAb (RPA-T4 clone) was purchased from BD Pharmingen (San Diego, CA). Anti-gp120 mAbs F105 and 2G12, and the anti-gp41 mAb 2F5 were obtained through the AIDS Research and Reference Reagent Program (AIDSRRRP), NIAD, NIH.

Cells. Jurkat cell lines HXBc2(4) and 522F/Y containing an inducible tetracycline-dependent transactivator and transfected with the *env* and *rev* genes from the HIV-1 HXBc2 strain coupled to a cytomegalovirus promoter and to a tetracycline operator sequences, were obtained from Dr. Joseph Sodroski (Cao et al., 1996). HXBc2(4) cell line expresses a functional gp120/gp41 glycoprotein, while 522F/Y cell line contains a

F/Y substitution at position 522 in gp41 that prevents fusion. Both transfected cell lines and Jurkat clone E6-1 (E6 cells) were obtained through the AIDSRRRP.

Cell culture. Transfected cells were grown in RPMI medium (Gibco BRL, Rockville, MD) containing 10% fetal bovine serum (Gibco BRL) (RPMI-10), 200 µg/ml of G418, 200 µg/ml of hygromycin, and 1 µg/ml of tetracycline. To induce *env* expression, cells were washed with PBS and cultured for 3 days in medium without tetracycline before fusion experiments (Cao et al., 1996). Jurkat E6-1 cells were maintained in RPMI-10.

Fluorescent dyes. Red fluorescent DiI (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate) and green fluorescent DiO (3,3'-dioctadecyloxycarbocyanine perchlorate) were obtained from Molecular Probes (Eugene, OR). Excitation and emission energies are 549/565 and 484/501, respectively. Stock solutions of dyes (3.5 mg/ml) were prepared in dimethylsulfoxide (DMSO) as described (Huerta et al., 2002).

Cell labeling and fusion assay. To label cells, stocks were diluted in DMSO to get a final concentration of 5 µM of DiI and 25 µM of DiO. Preliminary labeling tests were performed to determine the amount of DiO solution needed to obtain fluorescence intensities of 10^2 to 10^3 in flow cytometry. Cell labeling was performed on the day before fusion experiment as follows: appropriate amounts of DiO (usually from 14 to 50 µl) or DiI (8 µl) working solutions were added to $5\text{-}15 \times 10^6$ cells suspended in 1 ml of RPMI-10. After incubation for 15 min at room temperature in the dark, cells were washed twice with 10 volumes of RPMI-10, resuspended in the same medium (adding hygromycin and G418 to transfected lines) and cultured overnight at 37°C, with 5% CO₂. To test the effects of sera on cell fusion, DiO-labeled HXBc2 cells (DiO-HXBc2) were adjusted to 2.2×10^6 cells/ml in a serum-free medium (AIM-V medium, Gibco BRL) and 2×10^5 cells in 90 µl were preincubated either with patient or control sera or medium alone for 40 min at 37°C, with 5% CO₂ in 96-well plates at the final dilution indicated. Then, 2×10^5 DiI-labeled E6 cells (DiI-E6) were added to wells and gently stirred. Cocultures were incubated for 5 hours at 37°C, in 5% CO₂. Three dilutions of each patient or control

serum (1/50, 1/20, and 1/10) were assayed in duplicate. Wells containing 33 $\mu\text{g/ml}$ of anti-CD4 mAb (Pharmingen) and a coculture of labeled non-fusogenic DiO-522F/Y with DiI-E6 were always included in each plate as controls for fusion inhibition and cellular aggregation, respectively. Anti-CD4 mAb was added to DiI-E6 cells before addition of DiO-HXBc2 cells. After coculture, cells were collected from plates, washed one time with 2 ml of PBS, and resuspended in 300 μl of 2% paraformaldehyde in PBS. Flow cytometry analysis was performed on 10,000 events captured in a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA) using the CellQuest software (Becton Dickinson). Loosely aggregated cells were dissociated by gently pipetting immediately before analysis. With this procedure, the amount of double-colored aggregates was nearly constant at 2%. Non-cocultured single-labeled cells were used for compensation in order to separate red and green fluorescent populations. Results are shown as averages of duplicates. Serum activity upon cell fusion was calculated with respect to the cell fusion obtained in the absence of serum. Thus, fusion activity (FA) is defined as $1 - (F_i/F_o) \times 100$, where F_o and F_i are the fusion values obtained in the absence and presence of serum, respectively.

Adsorption of serum immunoglobulins on protein G agarose. Patient and control sera were exhaustively adsorbed with protein G coupled to agarose beads. The degree of immunoglobulin adsorption was assessed by Western blotting with anti-Ig antibody coupled to alkaline phosphatase (Sigma). One hundred μl of adsorbed sera were preincubated with 2×10^5 HXBc2 cells before the addition of the same number of E6 cells to give final volume of 200 μl and 1:30 serum dilution.

Statistical analysis. Fusion results are presented as the arithmetic mean of duplicate estimates in each serum at each dilution. Pearson's correlation coefficients were used to determine the correlation of serum activity on fusion with the CD4^+ T cell count and the viral load. Comparisons of sera effects on fusion between patient groups were compared using an unpaired Student's *t* test, and the difference between means were considered significant at the 95% level of confidence.

RESULTS

Activity of monoclonal antibodies on Env-mediated cell-cell fusion. The cell-cell fusion assay makes use of Jurkat cells transfected with a plasmid bearing the env gene from the HXBc2 HIV-1 strain (named here as HXBc2 cells), under the control of a tetracycline-dependent operator (Cao et al., 1996). Longer culture times in the absence of tetracycline produces an increase in the number of HXBc2 cells that fuse with Jurkat untransfected cells (data not shown), indicating that more cells synthesize the amount of Env necessary to fuse with target cells. Fusion assays presented here were performed using HXBc2 cells induced during 3 days for the expression of Env. At this time, a 14 to 18% of fused particles was consistently obtained. The flow cytometry assay used to study Env-mediated cell-cell fusion involved the labelling of fusion partner cells with the fluorescent carbocyanines DiI and DiO, was described before (Huerta et al., 2002). Figure 1A shows typical fluorescence dot plots of fusion between labelled DiO-HXBc2 and DiI-E6 Jurkat cells after 5 hr of coculture. The susceptibility of Env-dependent cell-cell fusion to inhibition by three potent HIV neutralizing antibodies and by an anti-CD4 Mab is shown in Fig 1B. Fifty percent of fusion inhibition was obtained with 52 µg/ml and 64 µg/ml of the 2G12 anti-gp20 and 2F5 anti-gp41 Mabs, respectively. Fusion was potently inhibited by the anti-CD4 mAb (IC_{50%} 4 µg/ml). Less than 50% of fusion inhibition was obtained with 50 µg/ml of the F105 Mab. These concentrations are several to hundred fold higher than those reported to inhibit the infection of T cell lines and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) by HXBc2 and other related strains (Zwick et al., 2001; Sullivan et al., 1995; McKeating et al., 1996; Li et al., 1998; Trkola et al., 1998; Posner et al., 1991), but similar to those used by others to inhibit HIV-dependent cell-cell fusion (Barna & Berger, 2003).

Serum activity on cell-cell fusion. A cross sectional study of the effect of serum from 49 HIV-1 infected subjects on the Jurkat Env-mediated fusion was subsequently performed using the flow cytometry assay. Sera from healthy HIV-negative individuals generally caused a slight enhancement of fusion (6% mean increase) when compared with fusion controls without serum. Therefore, activity of sera from HIV-infected

patients on cell fusion was defined as enhancing, inhibiting or nully effective with respect to the average of fusion obtained with all dilutions of HIV-negative sera ± 2 standard deviations (-6.167 ± 19.87). On this basis, 34 of the 49 HIV-positive sera (69.4%) were inhibitors, 12 (24.5%) were nully effective and 3 (6.1%) were enhancers of fusion (Figure 2). A high correlation between results from the three dilutions tested was found ($R = 0.9692$, $p < 0.00001$).

Association between the serum fusion activity and CD4⁺ T cell count, viral load and clinical status.

The relationship between the fusion activity of sera and disease indicators in clinically relevant groups is shown in Fig. 3. Sera from patients with more than 200 CD4⁺ cells/mm³ inhibited fusion significantly above the sera from HIV-positive patients with the lower numbers of CD4⁺ lymphocytes ($p = 0.0054$, respectively) (Fig 3A). Likewise, the inhibitory activity of serum is significantly higher for patients with viral loads $< 75,000$ HIV RNA copies/ml. Inhibitory activity significantly decreases when plasma viral load exceeded of 75,000 RNA copies/ml ($p = 0.0366$). (Fig. 3B). Fusion activity (FA) of sera showed significant differences between groups in distinct clinical status (Fig. 3C). FA of sera from patients with AIDS was significantly lower than those with non-AIDS conditions ($p = 0.0277$). Although the FA of HIV-negative sera did not differ in average from that of sera from patients with advanced disease, the sera from patients with more advanced infection produced the widest range of FA values. Consistent with these data, a positive correlation between fusion activity and the CD4⁺ cell count, and an inverse correlation between FA and viral load were found significant (Fig. 4). The three parameters considered (CD4⁺ T cell count, viral load, and clinical status) were available for 25 of the 49 patients studied. For these patients, FA of sera was significantly inhibitory for patients with no disease progression (viral loads $< 75,000$ RNA copies/ml, CD4 T+ cell count > 200 cells/mm³ and asymptomatic or with non-AIDS related conditions) compared to that of patients with advanced disease (viral loads $> 75,000$ RNA copies/ml, CD4 T+ cell count < 200 cells/mm³ and AIDS condition ($p = 0.0494$)).

To evaluate the participation of antibody molecules in the FA of sera, we removed serum immunoglobulins by adsorption on protein G and the FA's were estimated before and after adsorption. As shown in Fig.5, adsorption of immunoglobulins completely removed the inhibitory activity of 7 of 8 sera (87.5%). In contrast, a residual enhancing effect, similar to that of HIV-negative sera, remained after immunoglobulin adsorption in 5 of these 8 sera. Additionally, in six HIV-positive sera that had shown to enhance fusion to different extents, adsorption of immunoglobulin increased the enhancement.

Overall, these data indicate that fusion inhibition antibodies develop early and reach a maximum at intermediate stages of disease. Loss of fusion inhibition or dominance of enhancing activities positively correlates with progression to AIDS.

DISCUSSION

Syncytium formation and cell-to-cell transmission of virus are related processes that underlie AIDS pathogenesis by inducing cell damage, by favoring virus spread and persistence and by offering escape from neutralizing antibodies. Although virus-cell and cell-cell fusion share basic fusion machinery, differences between both phenomena should be emphasized. The amount of gp120/gp41 molecules on the cytoplasmic membrane of infected cells with a high level of viral protein synthesis (Connor & Ho., 1994) and *env*-transfected cells, are higher than in virus membrane. Also, close contact of the cytoplasmic membranes of infected cells provides a more extensive area for the establishment of a higher number of effective Env-receptors interactions. In addition, cell membrane-associated molecules potentiate specific cell-membrane interactions (Hioe et al., 1998). As a result, cell-cell fusion may differ in quantitative and qualitative requirements from virus-cell fusion. Our results and those of others with HIV-1 specific monoclonal antibodies (Gupta et al., 1989; Pantaleo et al., 1995) strengthen this notion.

Here, by means of a quantitative FACS cell fusion assay, we have shown that serum antibodies from HIV-infected individuals affect the extent of HIV *env*-dependent cell-cell fusion of human CD4⁺ T cell lines. The effects of sera associate with the number

of CD4⁺ cells and viral load in circulation of HIV-infected individuals and with clinical progression of the disease. Fusion activity in all sera from HIV infected individuals correlated positively with the number of circulating CD4⁺ cells and negatively with the number of viral particles in the circulation. Fusion activity of sera is related to serum antibodies since adsorption of the immunoglobulin by protein G-agarose reduced fusion activity when inhibitory and increased it when enhancing (Figure 5). As a first approximation to explain these results, the inhibitory activity of the HIV⁺ sera may reflect the temporal changes in the infected persons serum levels of specific antibodies against the HIV envelope proteins, that usually increase early in infection and decay at later times, when CD4⁺ T cells also decrease and viral load increases (Rober-Guroff et al., 1988; Pilgrim et al., 1997; Montefiori et al., 1996; Cecilia et al., 1999; Ngo-Giang et al., 2001). In the initial phases of infection the excess of circulating anti-Env antibodies would probably suffice to block most viral proteins located in the membrane of the transfected Env-expressing T cell (HXBc2, putatively the infected cell) from reacting with the CD4 molecules of the non-infected cell (E6). In later stages of infection, when serum levels of effective anti-Env antibodies have been reduced and/or the viral particles are in excess with respect to antibodies, there would be no inhibition of the fusion between infected and not-infected CD4⁺ T cells. Should this binding reaction equilibria (Celis & Larralde, 1978) between CD4, Env and their specific antibodies be occurring in a similar manner in vivo, a high level of cell-fusion inhibitory activity in the sera of an HIV infected individual could be interpreted as a sign of effective immune containment of disease progression, whereas a decreased level of cell fusion inhibition would indicate to a weakened immune status of the patient.

But the proposed equilibria between antibodies, receptors and Env in viral particles could be more complicated than described above. Notwithstanding the statistical significance of the correlations between degrees of cell-fusion and markers of disease progression, there is a large fraction of the results' variance that is left unexplained by the linear correlation hypotheses of fusion activity with CD4⁺ T cell count and viral load, a suggestion of the involvement of additional factors. The comparison between clinical groups with respect to their cell-fusion properties (Figure 3C) provided with an interesting and unsuspected finding that may explain a significant fraction of the residual

variance. The sera of non-AIDS, HIV-positive patients are significantly more inhibitory (mean = 19.07, SD = 20.49) than the sera of healthy persons (mean=-3.65, SD=8.69) and none of them was enhancing. In AIDS cases the mean of fusion values falls back to control levels (2.65) and 30% of the sera enhance fusion, one of them well beyond the level of sera from healthy people, resulting in a wide distribution of fusion activities (SD = 28.38). Enhancing was also more frequent in the higher (5 of 17, 29.4%) than in the lower viral load group (1 of 23, 4.4%). Adsorption of serum immunoglobulins significantly reduced their capacity to inhibit cell fusion but increased their capacity to enhance cell-fusion. The simplest explanation of the enhancing effects of Ig depletion would be that in the absence of anti-Env antibodies and other immunoglobulins the cell fusion reaction is greatly favored (as is suggested by adsorption of immunoglobulin increasing the enhancing activity of control HIV-negative sera). Nonetheless, there is a considerable fraction of HIV-positive sera that enhances cell-fusion even if not pre-absorbed. Thus, it is hypothesized that there are two functional kinds of anti-Env antibodies, one that inhibits cell-fusion and the other that enhances it, in a manner similar to that described previously (Subbramanian et al., 2002). But there is also the active participation of other of the serum components vigorously controlling cell fusion. The relative effectiveness and concentrations of all participants would determine the net degree of cell-fusion along the course of the infection.

Since the study presented here was conducted using the env-gene from one highly fusogenic prototype HIV-1 strain, the effect of patient's serum antibodies is likely due to conserved epitopes essential for CD4 and correceptor-gp120 interactions, and in domains participating in gp41 activation. On the other hand, the participation of auto-antibodies specific for cellular molecules can not be discarded. It is known that a variety of autoantibodies are present in a great proportion of HIV-1 infected persons, including antibodies directed to CD4, molecules of the major histocompatibility complex, and phospholipids (Sekigawa et al., 1991; Muller et al., 1994; Asherson & Shoenfeld, 2003). In particular, antibodies specific for CD4, which have been found in neutralizing sera from HIV-seronegative exposed individuals (Lopalco et al., 1999; Lopalco et al., 2000) could greatly affect cell fusion since it is strongly dependent on this molecule (Burkly et al., 1995).

A third party of participant(s) is however plausible, if as yet there are fewer clues as to their identity. Its presence is perceived in the fact that sera of healthy persons without appreciable specific anti-Env antibodies may also enhance or inhibit cell-fusion to some extent, and the adsorption of Igs from the enhancing normal sera also makes them more enhancing (Fig. 5). Perhaps adhesins, complement molecules and low affinity antibody activity or autoanti-CD4 antibodies may cooperate with the other more specific and avid molecules involved in cell fusion.

Besides the prognostic value of the quantitative cell-fusion activity in the sera of HIV infected persons, the identification of the viral or cell epitopes involved in the inhibition and enhancement of cell-fusion may lead to protective immune interventions in preventing or controlling the progression of HIV disease by way of interfering with cell Env-mediated cell fusion. Availability of reference envelope-transfected lymphocytic cell lines and a sensitive flow cytometry assay, may facilitate the regular exploration of the potential of HIV-infected patient's immune response to confront HIV-envelope mediated cell fusion.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Yadira Palacios for technical assistance. The following reagents were obtained through the AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH: Jurkat-HXBc2(4) and Jurkat-522F/Y cells from Dr. Joseph Sodroski, and Jurkat Clone E6-1 cells from ATCC (Dr. Arthur Weiss). This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología of México, grants 34941-M and 40413-M.

REFERENCES

- Allaway, G. P., Ryder, A. M., Beaudry, G. A. & Maddon, P. J. (1993).** Synergistic inhibition of HIV-1 envelope-mediated cell fusion by CD4-based molecules in combination with antibodies to gp120 or gp41. *AIDS Res Hum Retroviruses* **9**, 581-587.
- Amendola, A., Gougeon, M. L., Poccia, F., Bonduarnd, A., Fesus, L. & Placentini, M. (1996).** Induction of "tissue" transglutaminase in HIV patogenesis: evidence for high rate apoptosis of CD4+ T lymphocytes and accessory cells in lymphoid tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 11057-11062.
- Asherson, R. & Shoenfeld, V. (2003).** Human immunodeficiency virus infection, antiphospholipid antibodies, and the antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol* **30**, 214-219
- Barna, D. & Berger, E. A. (2003).** Vaccinia-based reporter gene cell-fusion assays to quantitate functional interactions of HIV envelope glycoprotein with receptor. *In Current Protocols in Immunology, Supp.* 54, pp 12-10-1-12.10.20. John Wiley and Sons Inc.
- Berkowitz, R. D., Alexander, S., Bare, C. V & 8 other authors. (1998).** CCR5-and CXCR4-utilizing strains of human immunodeficiency virus type 1 exhibit differential tropism and pathogenesis in vivo. *J Virol* **72**, 10108-10117.
- Blaak, H., Van't Wout, A. B., Brouwer, M., Hooibrink, B., Hovenkamp, E. & Schuitemaker, H. (2000).** In vivo HIV-1 infection of CD45RA+CD4+ T cells is established primarily by syncytium-inducing variants and correlates with the rate of CD4+ T cell decline. *Proc Natl Acad Sci* **97**, 1269-1274.
- Budka, H. (1986).** Multinucleated giant cells in brain: a hallmark of the acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Acta Neuropathol (Berl.)*; **69**, 253-258.
- Burkly, L., Mulrey, N., Blumenthal, R. & Dimitrov, D. S. (1995).** Synergistic inhibition of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein-mediated cell fusion and infection by an antibody to CD4 domain 2 in combination with anti-gp120 antibodies. *J Virol* **69**, 4267-4273.
- Cao, J., Park, I. W., Cooper, A. & Sodroski, J. (1996).** Molecular determinants of acute single-cell lysis by human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **70**, 1340-1354.
- Castedo, M., Roumier, T., Blanco, J. & 18 others autors. (2002).** Sequential involvement of Cdk1, mTOR and p53 in apoptosis induced by the HIV-1 envelope. *EMBO Journal* **21**, 4070-4080.

- Castro, K. G., Ward, J.W., Slutsker, L., Buehler, J. W., Jaffe, H. W., & Berkelman, R. L. (1993).** Revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *Morbidity and Mortality Weekly Report, Centers for Disease Control and Prevention, U.S. Department of Health and Human Services*, **41(RR17)**, 1-19.
- Cecilia, D., Kleeberger, C., Muñoz, A., Giorgi, J. V. & Zolla-Pazner, S. (1999).** A longitudinal study of neutralizing antibodies and disease progression in HIV-1-infected subjects. *J Infect Dis* **179**, 1365-1374.
- Celis, E. & Larralde, C. (1978).** Regulation of the binding of antigen to receptors by soluble antibodies: in-vitro competition and synergism for dinitrophenylated human serum albumin and epsilon-DNP-lysine. *Immunochemistry* **15**, 595-601.
- Connor, R. I. & Ho, D. D. (1994).** Human immunodeficiency virus type 1 variants with increased replicative capacity develop during the asymptomatic stage before disease progression. *J Virol* **68**, 4400-4408.
- Connor, R. I., Mohri, H. Cao, Y. & Ho, D. D. (1993).** Increased viral burden and cytopathicity correlate temporally with CD4+ T-lymphocyte decline and clinical progression in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *J Virol* **67**, 1772-1777.
- Deschambeault, J., Lalonde, J. P., Cervantes-Acosta G., Lodge, R., Cohen, E. A. & Lemay, G. (1999).** Polarized human immunodeficiency virus budding in lymphocytes involves a tyrosine-based signal and favors cell-to-cell viral transmission. *J Virol* **73**, 5010-5017.
- Dimitrov, D. S., Willey, R. L., Sato, H., Chang, L. J., Blumenthal, R. & Martin, M. A. (1993).** Quantitation of human immunodeficiency virus type 1 infection kinetics. *J Virol* **67**, 2182-2190.
- Etemad-Moghadam, B., Rhone, D., Steenbeke, T. & 9 others autors. (2001).** Membrane-fusing capacity of the human immunodeficiency virus envelope proteins determines the efficiency of CD4+ T-cell depletion in macaques infected by a simian-human immunodeficiency virus. *J Virol* **75**, 5646-5655.

- Ferri, K. F., Jacotot, E., Blanco, J. & 8 other authors. (2000).** Apoptosis control in syncytia induced by the HIV type 1-envelope glycoprotein complex: role of mitochondria and caspases. *J Exp Med* **192**, 1081-1092.
- Frenkel, S. S., Wenig, B. M., Burke, A. P., Manan, P., Thompson, L. D., Abbondazo, S. L., Nelson, A. M., Pope, M. & Steinman, R. M. (1996).** Replication of HIV-1 in dendritic cell-derived syncytia at the mucosal surface of the adenoid. *Science* **272**, 115-117.
- Gummurulu, S., Kinsey, M. C. & Emerman, M. (2000).** An in vitro rapid-turnover assay for human immunodeficiency virus type 1 replication selects for cell-to-cell spread of virus. *J Virol* **74**, 10882-10891.
- Gupta, P., Balachandran, R., Ho, M., Enrico, A. & Rinaldo, C. (1989).** Cell-to-cell transmission of human immunodeficiency virus type 1 in the presence of azidothymidine and neutralizing antibody. *J Virol* **63**, 2361-2365.
- Hioe, C. E., Bastiani, L., Hildreth, J. E. & Zolla-Pazner, S. (1998).** Role of cellular adhesion molecules in HIV type 1 infection and their impact on virus neutralization. *AIDS Res Hum Retroviruses* **14**, S247-S254.
- Huerta, L., Lamoyi, E., Báez-Saldaña, A. & Larralde C. (2002).** HIV envelope-dependent cell-cell fusion: a quantitative fluorescence cytometric assay. *Cytometry* **47**, 100-106.
- Kalia, V., Sarkar, S., Gupta, P. & Montelaro, R. (2003).** Rational site-directed mutations of the LLP-1 and LLP-2 lentivirus lytic peptide domains in the intracytoplasmic tail of human immunodeficiency virus type 1 gp41 indicate common functions in cell-cell fusion but distinct roles in virion envelope incorporation. *J Virol* **77**, 3634-3646.
- Kilby, J. M., Hopkins, S., Venetta, T. M. & 12 other authors. (1998).** Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nat Med* **4**, 1302-1307.
- Koenig, S., Gendelman, H. E., Orenstein, J. M. & 7 others authors. (1986).** Detection of AIDS virus in macrophages in brain tissue from AIDS patients with encephalopathy. *Science* **233**, 1089-1093.

- LaBonte, J. A., Patel, T., Hofmann, W. & Sodroski, J. (2000).** Importance of membrane fusion mediated by human immunodeficiency virus envelope glycoproteins for lysis of primary CD4-positive T cells. *J Virol* **74**, 10690-10698.
- Laurent-Crawford, A. G., Krust, B., Muller, S., Riviere, Y., Rey-Cuille, M. A., Bechet, J. M., Montagnier, L. & Hovanessian, A. G. (1991).** The cytopathic effect of HIV is associated with apoptosis. *Virology* **185**, 829-839.
- Lazzarin, A., Clotet, B., Cooper, D. & 14 other authors. (2003).** Efficacy of enfuvirtide in patients infected with drug-resistant HIV-1 in Europe and Australia. *N Engl J Med* **348**, 2186-219.
- Li, A., Katinger, H., Posner, M. R. & 7 other authors. (1998).** Synergistic neutralization of simian-human immunodeficiency virus SHIV-vpu⁺ by triple and quadruple combinations of human monoclonal antibodies and high-titer anti-human immunodeficiency virus type 1 immunoglobulins. *J Virol* **72**, 3235-3240.
- Lifson, J. D., Feinberg, M. B., Reyes, G. R. & 7 other authors. (1986).** Induction of CD4-dependent cell fusion by the HTLV-III/LAV envelope glycoprotein. *Nature* **323**, 725-728.
- Litwin, V., Nagashima, K. A., Ryder, A. M. & 7 others authors. (1996).** Human immunodeficiency virus type 1 membrane fusion mediated by a laboratory-adapted strain and a primary isolate analyzed by resonance energy transfer. *J Virol* **70**, 6437-6441.
- Lopalco, L., Magnani, Z., Confeti, C. & 8 other authors. (1999).** Anti-CD4 antibodies in exposed seronegative adults and in newborns of HIV type 1-seropositive mothers: a follow-up study. *AIDS Res Hum Retroviruses* **15**, 1079-1085.
- Lopalco, L., Pastori, C., Cosma, A., Burastero, S. E., Capiluppi, B., Boeri, E., Beretta, A., Lazzarin, A. & Siccardi, A. G. (2000).** Anti-cell antibodies in exposed seronegative individuals with HIV type 1-neutralizing activity. *AIDS Res Hum Retroviruses* **16**, 109-115.
- McKeating, J. A., Zhang, Y-J., Arnold, C., Frederiksson, R., Fenyó, E-M. & Balfes, P. (1996).** Chimeric viruses expressing primary envelope glycoproteins of human immunodeficiency virus type 1 show increased sensitivity to neutralization by human sera. *Virology* **220**, 450-460.

- Miedema, F., Meyaard, L., Koot, M. & 8 others autors. (1994).** Changing virus-host interactions in the course of HIV-1 infection. *Immunol Rev* **140**:35-72.
- Montefiori, D. C., Pantaleo, G., Fink, L. M., Zhou, T., Zhou, J. Y., Bilska, M., Miralles, G. D. & Fauci, A. S. (1996).** Neutralizing and infection-enhancing antibody responses to human immunodeficiency virus type 1 in long term nonprogressors. *J Infect Dis* **173**, 60-67.
- Muller, C., Kukel, S., Schneweis, K. E. & Bauer, R. (1994).** Anti-lymphocyte antibodies in plasma of HIV-1-infected patients preferentially react with MHC class II-negative T cells and are linked to antibodies against gp41. *Clin Exp Immunol* **97**, 367-372.
- Ngo-Giang-Huong, N., Candotti, D., Goubar, A. & 8 other authors. (2001).** HIV type 1-specific IgG2 antibodies: markers of helper T cell type response and prognostic marker of long-term nonprogression. *AIDS Res Hum Retroviruses* **17**, 1435-1446.
- Orenstein, J. J. (2000).** In vivo cytolysis and fusion of human immunodeficiency virus type 1-infected lymphocytes in lymphoid tissue. *J Infect Dis* **182**, 338-342.
- Pantaleo, G., Demarest, J. F., Vaccareza, M. Graziosi, C., Bansal, G. P., Koenig, S. & Fauci, A. S. (1995).** Effect of anti-V3 antibodies on cell-free and cell-to-cell human immunodeficiency virus transmission. *Eur J Immunol* **25**, 226-231.
- Phillips D. M. (1994).** The role of cell-to-cell transmission in HIV infection. *AIDS* **8**, 719-731.
- Pilgrim, A. K., Pantaleo, G., Cohen, O. J., Fink, L. M., Zhou, J. Y., Bolognesi, D. P., Fauci, A. S. & Montefiori, D. C. (1997).** Neutralizing antibody responses to human immunodeficiency virus type 1 in primary infection and long-term-nonprogressive infection. *J Infect Dis* **176**, 924-932.
- Posner, M. R., Hideshima, T., Cannon, T. Mukherjee, M., Mayer, K. H. & Byrn, R. A. (1991).** An IgG human monoclonal antibody that reacts with HIV-1/gp120, inhibits virus binding to cells, and neutralizes infection. *J Immunology* **146**, 4325-4332.
- Rober-Guroff, M., Goedert, J. J., Naugle, C. J., Jennings, A. M., Blattner, W. A. & Gallo, R.C. (1988).** Spectrum of HIV-1 neutralizing antibodies in a cohort of homosexual men: results of a 6 year prospective study. *AIDS Res Hum Retroviruses*. **4**, 343-350.

Sato, H., Orenstein, J., Dimitrov, D. & Martin, D. (1992). Cell-to-cell spread of HIV-1 occurs within minutes and may not involve the participation of virus particles. *Virology* **186**, 712–724.

Sekigawa, I., Groopmen, J. E., Allan, J. D., Ikeuchi, K., Biberfeld, G., Takatsuki, K. & Byrn, R. A. (1991). Characterization of autoantibodies to the CD4 molecule in human immunodeficiency virus infection. *Clin Immunol Immunopathol* **58**:145-153.

Sodroski, J., Goh, W. C, Rosen, C., Cambell, K. & Haseltine, W. A. (1986). Role of the HTLV-III/LAV envelope in syncytium formation and cytophaticity. *Nature* **322**, 470-474.

Spies, C. P., Ritter Jr, G. D., Mulligan, M. J. & Compans, R. W. (1994). Truncation of the cytoplasmic domain of the simian immunodeficiency virus envelope glycoprotein alters the conformation of the external domain. *J Virol* **68**, 585-591.

Subbramanian, R. A., Xu, J., Toma, E. Morisset, R., Cohen, E. A., Menezes, J. & Ahmad, A. (2002). Comparison of human immunodeficiency virus (HIV)-specific infection-enhancing and –inhibiting antibodies in AIDS patients. *J Clin Microbiol* **40**, 2141-46.

Subbramanian, R. A., Xu, J., Toma, E., Morisset, R., Cohen, E. A., Menezes, J. & Ahmad, A. (2002). Comparison of human immunodeficiency virus (HIV)-specific infection-enhancing and –inhibiting antibodies in AIDS patients. *J Clin Microbiol* **40**, 2141-2146.

Sullivan, N., Sun, Y., Li, J. Hofman, W. & Sodroski, J. (1995). Replicative function and neutralization sensitivity of envelope glycoproteins from primary and T-cell line-passaged human immunodeficiency virus type 1 isolates. *J Virol* **69**, 4413-4422.

Trkola, A., Ketas, T., Kewalramani, V. N., Endorf, F., Binley, J. M., Katinger, H., Robinson, J., Littman, D. R. & Moore, J. P. (1998). Neutralization sensitivity of human immunodeficiency virus type 1 primary isolates to antibodies and CD4-based reagents is independent of coreceptor usage. *J Virol* **72**, 1876-1885.

Zingler, K. & Littman, D. R. (1993). Truncations of the cytoplasmic domain of the simian immunodeficiency virus envelope glycoprotein increases env incorporation into particles and fusogenicity and infectivity. *J Virol* **67**, 2824-2831.

Zwick, M. B., Wang, M., Poignard, P., Stiegler, G., Katinger, H., Burton, D. R. & WHI (2001). Neutralization synergy of human immunodeficiency virus type 1 primary isolates by cocktails of broadly neutralizing antibodies. *J Virol* **75**, 12198-12208.

World Health Organization. (2001). Monitoring the emergence of antiretroviral resistance. Report of a WHO consultation in collaboration with Instituto di Sanità and the International AIDS Society. WHO/CDS/CSR/DRS/2001.11.

Gudiño JC & Soler C. (2000). Detección de virus subtipo B del HIV-1 mediante el análisis de restricción de amplicones de gag con la enzima Bst Xi (REA-PCR). Abstracts from the I Congreso Nacional de la Rama de Bioquímica y Biología Molecular de Virus de la Sociedad Mexicana de Bioquímica. *Rev Biomed* 11:135-154.

Table 1. CD4⁺ cell count, viral load and clinical status of patients examined in this study.

<i>Num.</i>	<i>Sex</i>	<i>Age</i>	<i>CD4⁺ T (cells/μl)</i>	<i>Viral load (RNA copies/ml)</i>	<i>Clinical status</i>
1			49	n.d.	n.d.
2			49	n.d.	n.d.
3			49	n.d.	n.d.
4			134	n.d.	n.d.
5			145	n.d.	n.d.
6			172	n.d.	n.d.
7			173	n.d.	n.d.
8			303	n.d.	n.d.
9			321	n.d.	n.d.
10			479	n.d.	n.d.
11	M	30	8	>75,000	C3
12	M	34	9	>75,000	C3
13	M	24	12	>75,000	C3
14	M	32	30	>75,000	C3
15	M	34	32	>75,000	B3
16	M	36	36	>75,000	C3
17	M	27	150	8880	B3
18	M	38	200	37500	B2
19	M	32	201	>75,000	C2
20	M	30	300	75000	B2
21	F	12	324	33600	A2
22	M	37	330	64600	A2
23	F	38	339	34900	A2
24	M	21	367	18300	C2
25	F	38	396	9600	A2
26	M	35	400	57000	A1
27	M	37	403	66400	B2
28	M	30	239	11800	A2
29	M	23	459	>75,000	n.d.
30	M	42	500	55500	A2

31	M	24	517	22800	A
32	F	43	538	<50	A1
33	M	31	618	13800	A1
34	M	52	619	7410	A1
35	M	25	833	2180	A1
36	M	20	n.d.	7990	C3
37	M	42	n.d.	10400	C
38	M	21	n.d.	18300	C
39	M	30	n.d.	20200	B1
40	F	32	n.d.	31000	C
41	M	24	n.d.	40800	A
42			n.d.	>75,000	A
43			n.d.	>75,000	C3
44			n.d.	>75,000	C
45			n.d.	>75,000	B
46			n.d.	>75,000	B
47			n.d.	>75,000	C
48			n.d.	>75,000	B
49			n.d.	>75,000	A

M, male; F, female; n.d., not determined.

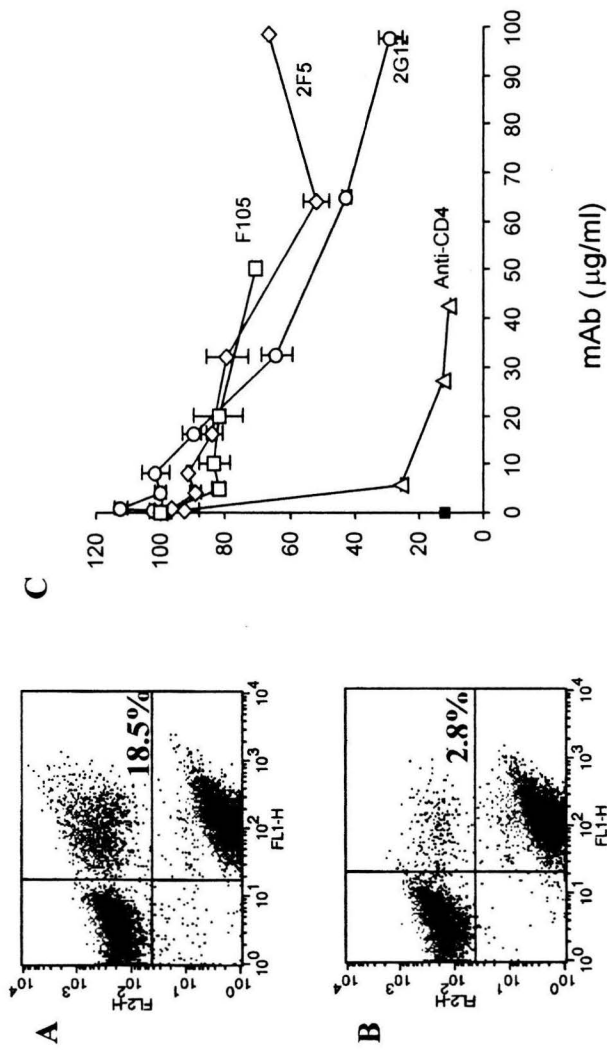


Fig. 1. A) Quantitation of Jurkat HIV-1 envelope dependent cell-cell fusion by flow cytometry. DiO-HXBc2 cells were incubated with Dil-E6 cells by 5 hours in the absence and presence of an anti-CD4 monoclonal antibody. Percentage of dual-fluorescent cells is indicated in the upper right quadrant. B) Fusion inhibition obtained with anti-CD4, anti-g41 (2F5) and two anti-gp120 (F105 and 2G12) monoclonal antibodies. Black square indicates the percent of double fluorescent particles obtained in the control 522-E6 coculture. Data are expressed as percent of fusion obtained in the absence of antibodies.

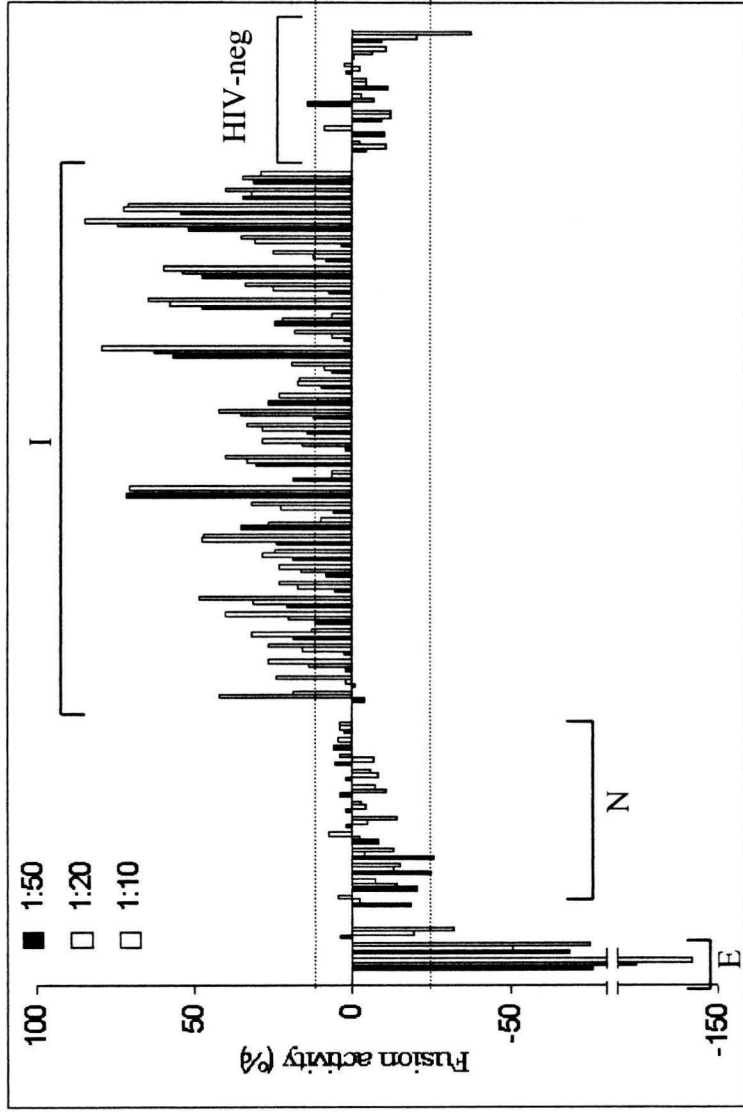


Fig. 2. Serum activity upon cell-cell fusion. Three dilutions of each serum were tested as indicated. Fusion activity of each serum was calculated with respect to the fusion obtained in the absence of serum. Fusion activity (FA) is $(1 - Fi/Fo) \times 100$, where Fo and Fi are the percent of fusion obtained in the absence and presence of serum, respectively. Patient sera were classified by comparison with HIV-negative sera as indicated in the text: I, inhibitors; E, enhancers; N, non effective. Shaded area represents the mean FA of 8 non infected individuals ± 2 standard deviations.

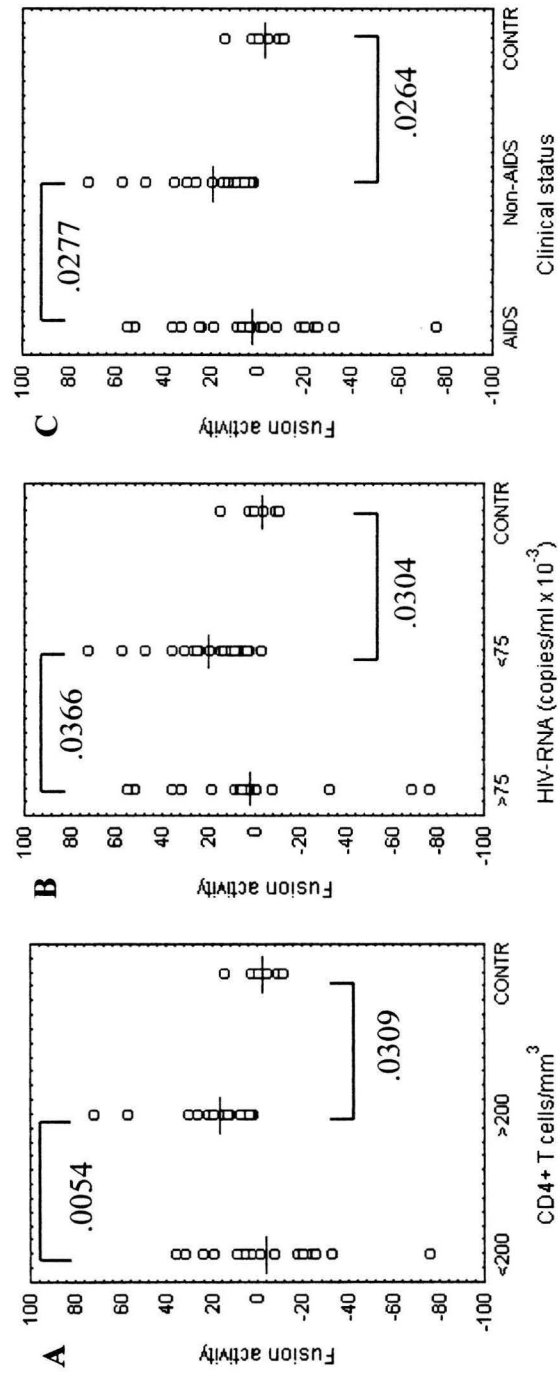


Fig. 3. Relationship of sera effect on fusion with CD4+ lymphocyte count (A), viral load (B) and clinical status (C). P values for significant differences are shown.

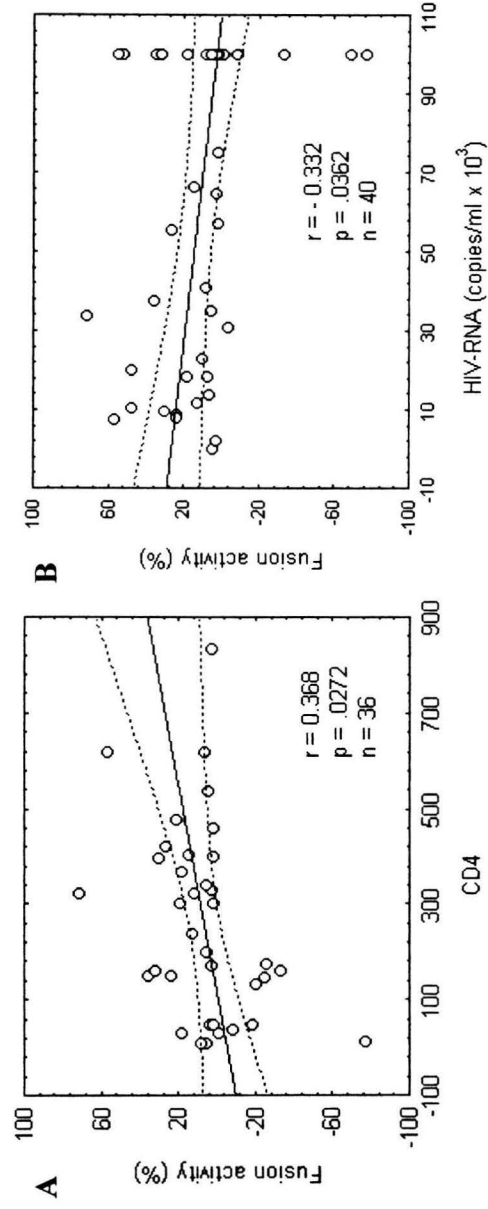


Fig. 4. Pearson's correlation between percent of fusion and the CD4 cell count (A) and viral load (B). Virus loads >75,000 copies/ml are plotted as 100,000 copies/ml.

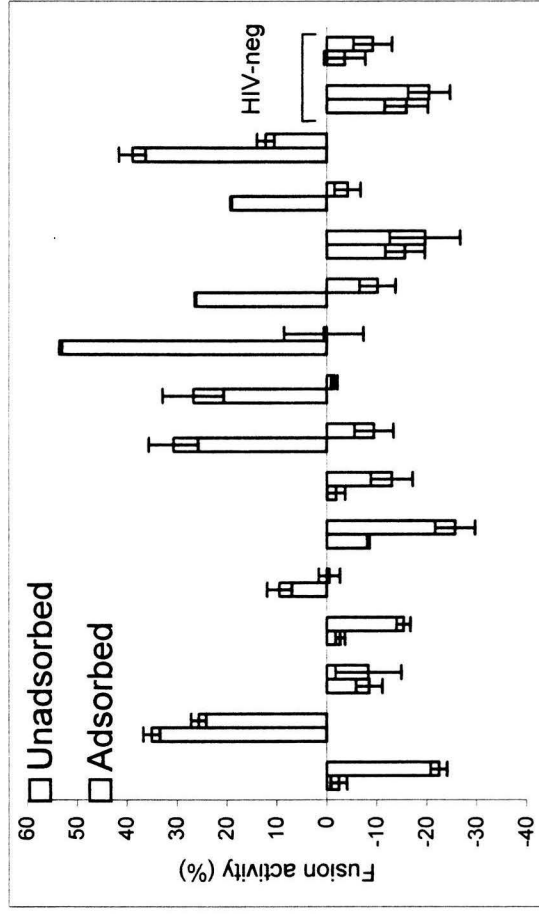


Fig. 5. Elimination of serum immunoglobulins by adsorption with protein G-agarose abrogates fusion inhibitory activity and promotes enhancing.

3. ARTICULO EN PREPARACIÓN

Stoichiometry of the HIV envelope mediated cell-cell fusion: Env-expressing CD4⁺ T cells are out numbered by CD4⁺ T cells in syncytia

Huerta L., López B.N., Villarreal C., Rivera T.G., Lamoyi E. and C. Larralde

Instituto de Investigaciones Biomédicas and Instituto de Física, Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal, México

Running title: Stoichiometry of HIV-envelope dependent cell-cell fusion.

ABSTRACT

Cell-cell fusion leading to syncytia formation involves the interaction of the viral gp120/gp41 envelope glycoprotein expressed on infected cells, with the CD4 receptor and correceptor proteins on target cells. The relative incorporation of infected and non-infected cells into syncytia (fusion stoichiometry) can be an indicator of Env-expressing cells fusogenicity and could help to elucidate the mechanism and biological consequences of fusion. In order to determine fusion stoichiometry, a recently developed flow cytometry assay based on the labeling of fusion partners with the lipophilic probes DiO and DiI (Huerta et al. 2002) was used. An enhancement of the DiI-red fluorescence was consistently observed in fusion products, compatible with fluorescence resonance energy transfer (FRET) between the two dyes and with different ratios (r) of cells incorporated in the syncytia. FRET occurs when the two dyes are located in the same membrane, thus allowing to distinguish fused from aggregated cells in fusion experiments. Since r could not be evaluated by relative fluorescence intensities in fused particles due to FRET, we developed a simple mathematical approach based on the change of the proportions of unfused cells and fused particles after syncytia formation, that reflect the number of each of the cells incorporated into fused particles. Results indicate that r of CD4+/Env+ cells is a function of time and of the initial proportion of each cell in the coculture. r was >1 in all circumstances, according with the interpretation of syncytia formation as a form of amplifying fusion effects to innocent bystanding uninfected cells when recruited into a syncytium. This methodology allows to analyse fusion dynamics and to manipulate initial coculture conditions in order to obtain a specific E6/HXBc2 ratio in fusions for functional studies.

INTRODUCTION

Cells infected with the human immunodeficiency virus (HIV) express the viral fusion protein (Env) on their cytoplasmic membrane, and can fuse with CD4 and correceptor-expressing cells in the vicinity, leading to syncytium formation (1, 2). Env consists of a molecular complex composed of transmembrane (gp41) and surface (gp120) subunits, arranged as trimers of heterodimers in the virus and infected cell membranes. The molecular mechanism of fusion between infected and normal cells is proposed to be analogous to the virus-cell fusion process. It involves the initial apposition of cell membranes and the interaction of gp120 with the CD4 and correceptor molecules (3, 4). Conformational changes in gp120 induce a fusion-active conformation of gp41, which initiates the formation of a fusion pore (5). Fused lymphocytes are short lived, dying by swelling (cytopathic effect) or apoptosis after several days in vitro (6-8). Fused cells are conspicuous in cultures of HIV-infected T cells and frequently found in lymphoid tissues from HIV-1 infected individuals (9-14). Detection of syncytium inducing virus in the circulation of HIV-infected patients is associated with an increased rate of CD4+ lymphocyte depletion and progression to AIDS (15-17). The fusogenic activity of a HIV/SIV chimeric virus correlated with the rate of CD4+ cell depletion in infected macaques (18). Thus, events associated with Env-dependent membrane fusion can be significant for AIDS pathogenesis.

The ability of HIV-1 to cause cell fusion depends on virus and host cell factors. Mutations in the *env* gene that change the virus-correceptor specificity can determine a syncytium inducing phenotype in some viral strains (19). Also, the intracytoplasmic tail of gp41 controls cell-cell fusion properties of Env by modulating the conformation and levels of the cell surface Env ectodomain (20-22). Besides specific mechanisms, cellular proteins that can modulate the extent of fusion have been described. Expression of adhesion molecules on the cell membrane, which depends on the cell activation stage, can determine the HIV-infection efficiency (23-24). In addition, local lipids surrounding the Env complex can influence the extent of cell-cell fusion (26).

Determination of the relative number of cells incorporated in HIV-induced syncytia can give clues about cellular mechanisms of fusion regulation and of mechanisms of pathological damage. We have recently developed a reliable FACS-based method to study the fusion of Env⁺ with CD4⁺ Jurkat cells (28). The assay involves the single labeling of fusion partners with carbocyanine fluorescent lipophilic tracers DiO and DiI (19, 28); fused cells are detected as double-fluorescent particles. The assay allows the direct and quantitative detection of both fused and non-fused cells. In previous experiments we noticed that fused, double-fluorescent cells consistently exhibit an increased DiI fluorescence intensity relative to their non-fused counterparts. Such enhancing could reflect a preferential incorporation of red-stained cells into syncytia or it could be due to an interaction between dyes resulting in fluorescence resonance energy transfer (FRET). In this paper we analysed these two possibilities and show a new approach to the determination of fusion stoichiometry.

MATERIAL AND METHODS

Cells: Jurkat E6-1 and transfected cell lines HXBc2(4) (HXBc2 cells) and 522F/Y containing an inducible tetracycline-dependent transactivator and the *env* gene from the HIV-1 HXBc2 strain coupled to a cytomegalovirus promoter and to tetracycline operator sequences (29), were obtained through the AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAD, NIH. HXBc2(4) cell line express a functional gp120/gp41 glycoprotein, while 522F/Y cell line contains a mutant gene with a F/Y substitution at position 522 in gp41.

Fluorescent dyes: Red fluorescent DiI (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate) and green fluorescent DiO (3,3'-dioctadecyloxycarbocyanine perchlorate) were obtained from Molecular Probes

(Eugene, OR). Excitation and emission energies are 549/565 and 484/501, respectively.

Cell culture: Env expressing Jurkat cell lines were grown in RPMI medium (Gibco BRL, Rockville, MD) containing 10% fetal bovine serum (Gibco BRL) (RPMI-10), 200 µg/ml of G418, 200 µg/ml of hygromycin, and 1µg/ml of tetracycline (29). To induce *env* expression, cells were washed with PBS and cultured for 3 days in medium without tetracycline before fusion experiments (29). E6-1 cells were maintained in the same medium without the mentioned antibiotics.

Cell labeling and fusion assay: Labelling of cells with DiI and DiO was performed as described before (28). Briefly, 11 µl of DiI or 20 µl of DiO working solutions were added to 1 ml of cells adjusted to 5-15x10⁶ cells/ml in RPMI-10, and incubated 15 min at room temperature protected from light. After washing 2 times with 10 volumes of RPMI-10, cells were resuspended in the same medium (adding hygromycin and G418 to transfected lines) and maintained overnight. For fusion experiments, 0.2 x 10⁶ labeled of each cell type were cocultured in a serum-free medium (AIM-V medium, Gibco BRL) and incubated at 37°C, with 5% CO₂ during 5 hours. For kinetics experiments, the proportion of fusion partners and incubation times were as indicated. Finally, cells were collected from wells, washed with 3 ml of PBS, resuspended in 300 ml of FACSS buffer (Becton Dickinson) and analyzed immediately.

Facs analysis: Flow cytometry analysis was performed in a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA) using the CellQuest software (Becton Dickinson) as described before (28). Results are shown as averages of duplicate samples.

Stoichiometry calculation: The percentages of fused and non-fused cells at any time can be expressed as follows:

$$\frac{X_o - rF}{T} + \frac{Y_o - mF}{T} + \frac{F}{T} = 1 \quad (1)$$

where X_o and Y_o represent the initial number of E6 cells (target cells) and HXBc2 cells (Env+), respectively; r and m correspond to the average number of the same cells that are incorporated in a syncytia, F represents the number of syncytia and T the particle total number. Thus, the first and second terms correspond to the proportion of E6 and HXBc2 cells remaining non-fused, respectively, whereas the last term corresponds to the proportion of fusions. When cells have been cocultured in a 1:1 ratio ($X_o = Y_o$), and fusions incorporate one HXBc2 cells ($m = 1$), it can be demonstrated that

$$r = \frac{1 - 2\left(\frac{X_o - rF}{T}\right)}{\frac{F}{T}}, \text{ or } r = \frac{1 - 2(\%E6/100)}{(\%fusions/100)} \quad (2)$$

With different initial proportion of cells, it can be considered that $Y_o = cX_o$ (Y_o is c times X_o), and $m = 1$, equation 1 becomes

$$r = \frac{1 - (1+c)\left(\frac{X_o - rF}{T}\right)}{c\left(\frac{F}{T}\right)}, \text{ or } r = \frac{1 - (1+c)(\%E6/100)}{c(\%fusions/100)} \quad (3)$$

In this expression, c can be entire or fraction number.

RESULTS

FRET in the analysis of cell-cell fusion by flow cytometry.

Fusion between DiO-labeled Env-expressing (HXBc2) and DiI-labeled CD4+ (E6) cells consistently produced double fluorescent fused cells which exhibited an increased red DiI fluorescence intensity relative to that of their non fused counterparts (**Figure 1a**). This effect is not due to a particular dye-

cell combination. As shown in **Figure 1b**, when the labeling protocol was reversed, the percentage of double fluorescent cells was similar in both DiI-E6/DiO-HXBc2 and DiI-HXBc2/DiO-E6 cocultures (19.7 and 18.7%, respectively). Monoclonal antibody against CD4 diminished fusion to 3.6% in both cases (**Figure 1, c and d**). This implies that the kind of probe used to label cells does not influence either the extent of fusion nor its CD4-dependence. In both cases, double fluorescent cells show an approximately 3-fold increase of the average red fluorescence intensity over their red-only counterparts.

Because the emission spectrum of DiO and the absorption spectrum of DiI are extensively overlapped (30), fluorescence resonance energy transfer (FRET) could take place when dyes are located in the same membrane compartment, causing the enhancing of the red fluorescence. To test this, we double-labeled E6 cells; first with a DiI (4 μ M), divided in several batches and subsequently stained with increasing concentrations of DiO. Their relative red DiI fluorescence intensities were compared to that of DiI-E6 red-only cells. Intensity of the DiI red fluorescence in the double-labeled cells increased along with the amount of DiO incorporated, indicating FRET from DiO to DiI (**Figure 2**).

A similar result was obtained in cell-cell fusion experiments. DiI labeled E6 cells were cocultured with HXBc2 cells that had been labeled with increasing concentrations of DiO. **Figure 3a** shows the DiI-red fluorescence intensity in fused cells as a function of the DiO concentration used to label HXBc2 cells. Fusion products show an enhancement of their red fluorescence intensity proportional to the amount of DiO added to HXBc2 cells.. After inhibition with the anti-CD4 mAb, the remaining fused cells show a very low level of FRET, possibly due to a low level of lipid mixing in these products. No FRET was detected in the scarce percentage (1.5%) of double fluorescent particles generated with cells unable to fuse, namely DiI-E6/DiO-522 cocultures, even when high concentrations of DiO were used, an indication that this subset of double-fluorescent cells are just cellular aggregates. The extent of fusion was not affected when low or moderate amounts of DiO were used to label HXBc2 cells (**Figure 3b**). Preincubation of DiI-E6 cells with an anti-CD4 mAb consistently reduced fusion to 3.5%, even with the higher DiO

concentration, indicating that fusion specificity was maintained in all conditions. Labeling with the higher concentration of DiO induced 20% more fusion than with the lower concentrations, although it was still efficiently inhibited by the anti-CD4 mAb. (**Figure 3b**).

That FRET manifests when cells are fused but not when they are aggregated was additionally tested by cocultivation of DiI-E6 and DiO-HXBc2 cells for 2 hours at 4°C to inhibit fusion. Only a background level of 1% of aggregated cells was detected with no manifestation of FRET (data not shown).

Stoichiometry of syncytium formation.

Since r could not be evaluated by relative fluorescence intensities in fused particles due to FRET, we developed a mathematical approach in order to calculate an r average value. Cells from the DiI and DiO single-labeled populations are recruited during syncytia formation, and thus, recruitment can be estimated by the time variations in the proportion of single-coloured cells with respect to their initial values. We studied these changes in order to estimate the amount of cells participating in fusion at different time points. Panels A to C in **Figure 4** show the changes in the proportions of fused particles and unfused cells throughout 8 hours-coculture. Fusion approximates to maximum in 2 hours, with the proportion of unfused E6 cells decreasing quickly during this time. Instead, the proportion of HXBc2 cells showed a tendency to increase as fusion progressed. This pattern was observed regardless the initial proportion of each cell type, indicating that more E6 than HXBc2 cells were incorporated into fused particles. To assess any direct effect of dyes on the fusion stoichiometry, the reaction kinetics was studied labeling each cell fusion partner alternatively with DiI or DiO. The same pattern of incorporation of each cell type was observed, regardless of the cell-dye combination (data not shown).

To determine r at each time point, a mathematical expression for the relationship between proportions of fused and non-fused cells was developed, defining the parameter r as the E6/HXBc2 ratio in fused particles (see Materials and Methods). Thus, equations 2 and 3 allowed to directly determine the incorporation of E6 cells per each HXBc2 cell when the initial HXBc2/E6

ratio (c) in the coculture is 1, or different of 1 ($c <$ or >1), respectively. Thus, in both equations, r is calculated using the proportion of fused particles and unfused E6 cells obtained by FACS analysis. Equations were validated using an empirical simulation of fusion, in which r was previously defined (data not shown).

Panels D to F in **figure 4** show that r depended both on time and the initial proportion of fusion partners. After the first half hour, a high r value (nearly 8) was obtained when E6 cells were in excess (Fig.6 B and E), reflecting a more rapid incorporation of E6 than HXBc2 cells at this time. A lower r value (5) was obtained at this time when the initial proportion of fusion partners was the same (Fig. 6 A and D), and finally, initial r was minimal when HXBc2 cells were in excess (Fig 6 C and F). r decreased as fusion progressed when fusion partners were equally present or E6 was in excess (**Figure 4 D and E**), reflecting a progressive incorporation of HXBc2 along with the continuous recruitment of E6 cells. Notably, r progress from low to higher values (1.4 to 4) when the HXBc2 cells were in excess (**Figure 4F**). Since a high number of fusions with low r values would be expected in this condition, this result could reflect an advantageous recruitment of E6 cells by recently formed fusions over single HXBc2 cells. Compatible with this interpretation is the observation that the percent of fused particles in this case was the lower obtained (11%).

Thus, the ratio E6/HXBc2 (r) in syncytia was > 1 in all cases. The initial proportion of each cell type in the coculture was limiting of the final percentage of fusion and r , which was between 2 to 5 E6 cells per each HXBc2 cell. However, fusions with higher or lower r values were observed at culture times less than 2 hours. Thus, manipulation of culture conditions can render fused cells with particular r 's for functional studies.

DISCUSSION

The outcome of fusion between HIV-infected and not-infected cells must depend on viral and cellular factors. Of the last ones, the kind of the fusing cells, their physiological stage, and the relative incorporation of each cell type into syncytia (fusion stoichiometry) should be taken into account in order to determine the biological significance of cell-cell fusion in HIV-infection.

In this paper we shown that fusion stoichiometry can be assessed by flow cytometry techniques using two lipophilic probes (DiI and DiO) to label fusion partners. To this purpose, we examined two possible explanations of the red fluorescence enhancement in fused cells observed in flow cytometry studies of cell-cell fusion: FRET between dyes or incorporation of more red than green cells into syncytia.

In FRET, the excited state energy from a donor is transferred to an acceptor fluorochrome. The rate of energy transfer depends upon the extent of overlap of their respective emission and absorption spectrum, the relative orientation of the donor and acceptor transition dipoles, and the distance between these molecules (27).

Overlapping of the DiO-emission green and the DiI-excitation red spectra, and the enhancing of the red fluorescence independently of the cell-dye combination, indicated that FRET occurs in fused cells. Increasing amounts of DiO incorporated into the cell membrane produced a proportional enhancement of the DiI fluorescence in both double-labeled single and fused cells, consistent with an increased excitation of the DiI molecule. A very low but still detectable level of FRET was observed in double fluorescent cells that remained after inhibition of fusion with an anti-CD4 antibody (Fig. 3A), indicating that a low level of lipid mixing can be still present in these products. A minimal if any FRET was observed in cell aggregates in cocultures of labeled non-fusogenic cells (522-E6 cocultures), a fact which confers the method with the technical advantage of distinguishing between fused and aggregated cells. Absence of FRET in this condition also indicated to minimal non-specific dye transfer between cells in the experimental conditions. Stability of the dyes in

the membrane and the short time of coculture possibly limit the dye exchange between cells.

The cell labeling procedure does not interfere with fusion specificity, as indicated by the fact that neither total fusion nor sensitivity to inhibition by the anti-CD4 mAb were altered by the labeling of cells with several fold increments of dyes (with the exception of the higher concentration of DiO, which corresponds to a nearly 300-fold excess of DiO). Likewise, percentage of fusion between the different cell lines agreed with their relative content of CD4 and with the level of expression of the viral glycoprotein.

FRET has been applied in cellular biology to study nonrandom codistribution of membrane proteins, with detection by flow cytometry in some cases (31-32). An advantage of FRET based cytometry over other methods using a combination of fluorescent probes (reviewed in 28) and reporter gene-based methods (33), is that flow cytometry allows a discerning direct quantification of fusion events generated in a cell population. An important technical consequence of FRET is that partial lipid mixing, or formation of fusion intermediates, could be studied with flow cytometry by detection of variable levels of FRET (or spectral shifts).

However, FRET between the dyes used to label cell partners interferes in non-ambiguous estimation of the numbers of cells of each cell type that are incorporated into each syncytium by comparing the emission of each color from fusion products with that of unfused cells (34). Instead, stoichiometry of fusion was evaluated mathematically by assuming that the proportion of the unfused cells after syncytia formation reflects the number of them that have been incorporated into fusions. On this base, the average fusion stoichiometry can be calculated using the data provided by FACS analysis and monitored in kinetics experiment. Our results indicate that changes in fusion stoichiometry can be explained by changes in the expression of specific receptors in the fused particles as fusion evolves: several E6 cells are recruited initially by a cell with a high level of Env expression. The magnitude of this initial recruitment depends of the relative abundance of E6 cells in the well. Then, stoichiometry drops reflecting the incorporation of HXBc2 cells attracted by the increased expression of CD4 molecules in syncytia. Interestingly, when HXBc2 where

placed in excess over E6 cells, the initial stoichiometry is 1, indicating that E6 cells can fuse with only one HXBc2 cell. As CD4 expression would be low in these fusions, incorporation of more HXBc2 cells do not take place; instead, E6 recruitment continues, raising stoichiometry to 6 after 2 hours. If this observation reflects a preferential recruitment of E6 cells by syncytia over still non-fused HXBc2 cells deserves additional study.

Therefore, HIV-1 envelope expression can confer a “promiscuous” fusogenic activity to infected cells. Since transfected cells used in this study express high levels of Env (29), the multiple recruitment of CD4⁺ cells by Env⁺ cells could result from low levels of CD4 expression in E6 cells combined with a profuse expression of Env on the HXBc2 membrane. Studies of stoichiometry changes associated to different levels of receptor expression would clear this point.

Cellular promiscuity could amplify the cytopathic events associated to cell fusion between HIV-1 infected and non-infected CD4⁺ cells and/or could contribute a favourable environment for HIV-replication in a protected niche . Alternatively, syncytia could represent a form of normal lymphocytes advantageously confronting the infected cells and of isolating the rest of the organism from the potentially pathogenic products of the confrontation. From the equilibrium of these events a net pathogenic course of the infection ensues.

Thus, the distribution of the fusion products in the fluorescence dot plot is a result of the combined effect of FRET from DiO to DiI, and the heterogeneous incorporation of each fusion partner into fusions, which can be assessed from the changes in the proportion of unfused cells of each cell type as fusion progress. The stoichiometry of fusion can be considered as an indicator of Env fusogenicity.

REFERENCES

1. Lifson JD, Feinberg MB, Reyes GR, et al. Induction of CD4-dependent cell fusion by the HTLV-III/LAV envelope glycoprotein. *Nature* 1986;323:725-728.
2. Sodroski J, WC Goh, Rosen C, Campbell K y Haseltine WA. 1986. Role of the HTLV-III/LAV envelope in syncytium formation and cytophaticity. *Nature* 322:470-474.
3. McDougal JS, Kennedy MS, Slich JM, ET AL. 1986. Binding of HTLV-III/LAV to T4+ T cells by a complex of the 110 K viral protein and the T4 molecule. *Science* 231:382-385.
4. Maddon PJ, Dalgheish AG, McDougal JS, ET AL. 1986. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* 47:333-348.
5. Lu M, Blacklow SC, Kim PS. 1995. A trimeric structural domain in of the HIV-1 transmembrane glycoprotein. *Nat Struct Biol* 2:1075-1082.
6. Laurent-Crawford, AG, et al. 1991. The cytophatic effect of HIV is associated with apoptosis. *Virology* 185:829-839.
7. Castedo M, Roumier T, Blanco J, Ferri KF, Barretina J, Tintignac LA., et al. 2002. Sequential involvement of Cdk1, mTOR and p53 in apoptosis induced by the HIV-1 envelope. *The EMBO Journal* 21:4070-4080.
8. Ferri KF, Jacotot E, Blanco J, Esté JA, et al. 2000. Apoptosis control in syncytia induced by the HIV type 1-envelope glycoprotein complex: role of mitochondria and caspasas. *J Exp Med* 192:1081-1092.
9. Amendola A, Gougeon M-L, Poccia F, Bondurand A, Fesus L, Placentini M. 1996. Induction of "tissue" transglutaminase in HIV patogénesis: Evidence for high rate apoptosis of CD4+ T lymphocytes and accessory cells in lymphoid tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:11057-11062.
10. Koenig S. Gendelman HE, Orenstein JM, Dal Canto MC, Pezeshkpour GH, Yungbluth M, Janotta F, Aksamit A, Martin MA, Fauci AS. Detection of AIDS virus in macrophages in brain tissue from AIDS patients with encephalopathy. *Science* 1986;233:1089-1093.

11. Budka H. Multinucleated giant cells in brain: a hallmark of the acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Acta Neuropathol. (Berl.)* 1986;69:253-258.9.
12. 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;138:421-426.
13. Frenkel SS, Wenig BM, Burke AP, Manan P, Thompson LDR, Abbondanzo SL, Nelson AM, Pope M, Steinman RM. Replication of HIV-1 in dendritic cell-derived syncytia at the mucosal surface of the adenoid. *Science* 1996;272:115-117.
14. Orenstein JM. 2000. In vivo cytolysis and fusion of human immunodeficiency virus type 1-infected lymphocytes in lymphoid tissue. *J Infect Dis* 182(1):338-342.
15. Connor RI, Mohri H, Cao Y, Ho DD. 1993. Increased viral burden and cytopathicity correlate temporally with CD4+ T-lymphocyte decline and clinical progression in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *J Virol* 67:1772-1777.
16. Miedema F, Meyaard L, Koot M, Klein MR, Roos MTL, Groenink M, Fouchier RAM, Van't Wout AB, Tersmette M, Schellekens PTA, et al. 1994. Changing virus-host interactions in the course of HIV-1 infection. *Immunol Rev* 140:35-72.
17. Blaak H, Van't Wout AB, Brouwer, M, Hooibrink B, Hovenkamp E, Schuitemaker H. 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.* 2000;97:1269-1274.
18. Etemad-Moghadam B, Rhone D, Steenbeke T, Sun Y, Manola J, Gelman R, Fanton JW, Racz P, Tenner-Racz K, Axthelm MK, Letvin NL, Sodroski J. Membrane-fusing capacity of the human immunodeficiency virus envelope proteins determines the efficiency of CD4+ T-cell depletion in macaques infected by a simian-human immunodeficiency virus. *J. Virol.* 2001;75:5646-5655.

19. Huerta L., Gómez-Icazbalceta G, Soto L., Viveros M., León L., Rodríguez R., Lamoyi E., and C. Larralde. 2003. Effect of sera from HIV-1 infected individuals on HIV-1-envelope dependent cell-cell fusion is related to the CD4+ T cell count, viral load, and clinical status. (Submitted).
20. Donaldson Y.K., Bell, J.E. , Holmes E.C., Hughes, E.S., Brown H.K. y Simmonds P. 1994. In vivo distribution and cytopathology of variants of human immunodeficiency virus type 1 showing restricted sequence variability in the V3 loop. *J. Virol.*68:5991-6005.
21. Kalia V, Sarkar S, Gupta P, Montelaro R. 2003. Rational site-directed mutations of the LLP-1 and LLP-2 lentivirus lytic peptide domains in the intracytoplasmic tail of human immunodeficiency virus type 1 gp41 indicate common functions in cell-cell fusion but distinct roles in virion envelope incorporation. *J Virol* 77 (6):3634-3646.
22. Deschambeault J, Lalonde JP, Cervantes-Acosta G, Lodge R, Cohen EA, Lemay G. 1999. Polarized human immunodeficiency virus budding in lymphocytes involves a tyrosine-based signal and favors cell-to-cell viral transmission. *J Virol* 73(6):5010-5017.
23. Zingler K, Littman DR. 1993. Truncations of the cytoplasmic domain of the simian envelope glycoprotein increases env incorporation into particles and fusogenicity and infectivity. *J Virol.* 67:2824-2831.
24. Ugolini S, Mondor I y Sattentau QJ. 1999. HIV-1 attachment: another look. *Trends Microbiol* 7(4):144-149.
25. Hioe CE, Bastiani L, Hildreth JEK, 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(S3):S247-S254.
26. Hug P, Lin H-M J, Korte T, Xiao X, Dimitrov DS, Wang JM, Puri A y Blumenthal R. 2000. Glycosphingolipids promote entry of a broad range of human immunodeficiency virus type 1 isolates into cell lines expressing CD4, CXCR4, and/or CCR5. *J Virol* 74:6377-6385.
27. Blumenthal R, Gallo SA, Viard M, Raviv Y, and Puri A. 2002. Fluorescent lipid probes in the study of viral membrane fusion. *Chemistry and Physics of Lipids* 116:39-55.

28. Huerta L., Lamoyi E., Báez-Saldaña A. y Larralde C. 2002. HIV envelope-dependent cell-cell fusion: a quantitative fluorescence cytometric assay. *Cytometry* 47 (2): 100-106.
29. Cao J, Park I-W, Cooper A y Sodroski J. 1996. Molecular determinants of acute single-cell lysis by human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 70:1340-1354.
30. Molecular Probes web sites:
www.probes.com/servlets/spectra?fileid=282 lip and
www.probes.com/servlets/spectra?fileid=275lip.
31. Szöllösi J y S Damjanovich. 1994. In *Mobility and Proximity in Biological Membranes*, eds. Damjanovich, S. and Edidin, M. (CRC, Boca Ranton, FL), pp.49-108.
32. Szöllösi J, S Damjanovich, Mulhern SA y Tron L. 1987. *Prog Biophys Mol Biol* 49:65-87. Flow cytometric measurements of fluorescence energy transfer using single laser excitation. *Cytometry*. 1987 Mar;8(2):120-8.
33. Rucker J, Doranz BJ, Edinger AL, Long D, Berson JF and Doms RW. 1997. Cell-cell fusion assay to study role of chemokine receptors in human immunodeficiency virus type 1 entry. *Methods in Enzymology*, vol. 288. pp.118-133.
34. Segal DM. 1996. Measurement of intercellular conjugates by flow cytometry. In *Current Protocols in Immunology*, Coligan JE, Kruisbeek AD, Margulies DH, Shevach EM and Strober W. Eds. John Wiley and Sons, Suppl. 14 pp. 5.6.1-5.6.8.

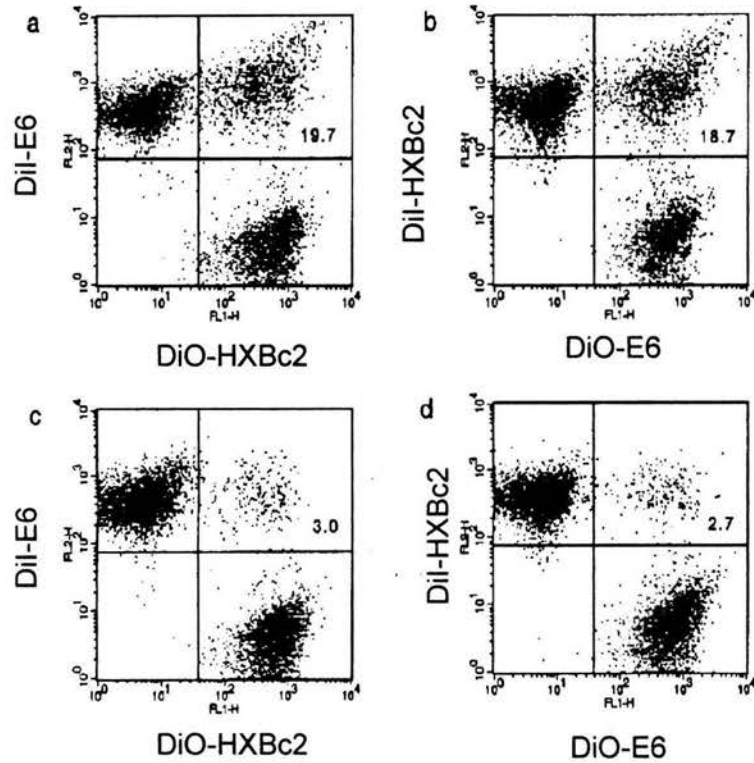


Fig. 1. FACS analysis of fusion between Env-expressing Jurkat cells and E6 Jurkat cells labeled alternatively with DiI and DiO (a and b). DiI-red fluorescence in fused cells is enhanced with respect to non-fused DiI-labeled cells. The percentage of fused cells and the effect of 33 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of anti-CD4 mAb is shown in each case (c and d).

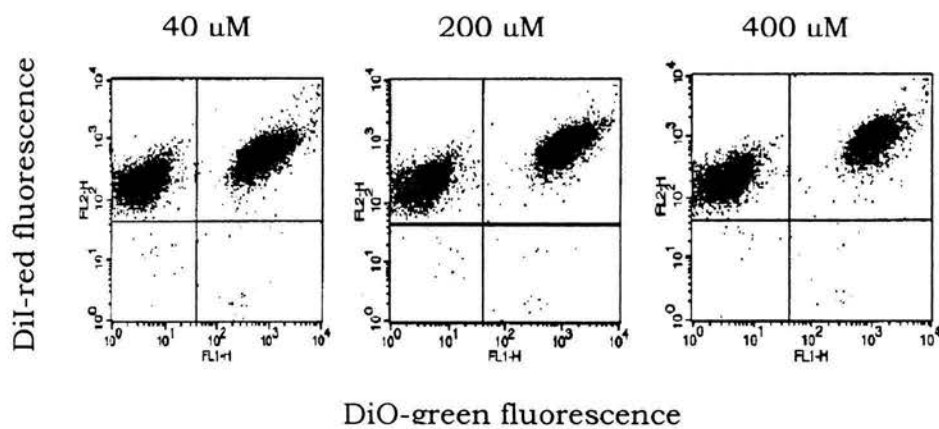


Fig. 2. FRET from DiO to DiI in E6 cells labeled with a fixed concentration of DiI (4 μ M) and then with increasing concentrations of DiO, as indicated. For FACS analysis, double labeled cells were mixed with red-only cells labeled with 4 μ M of DiI.

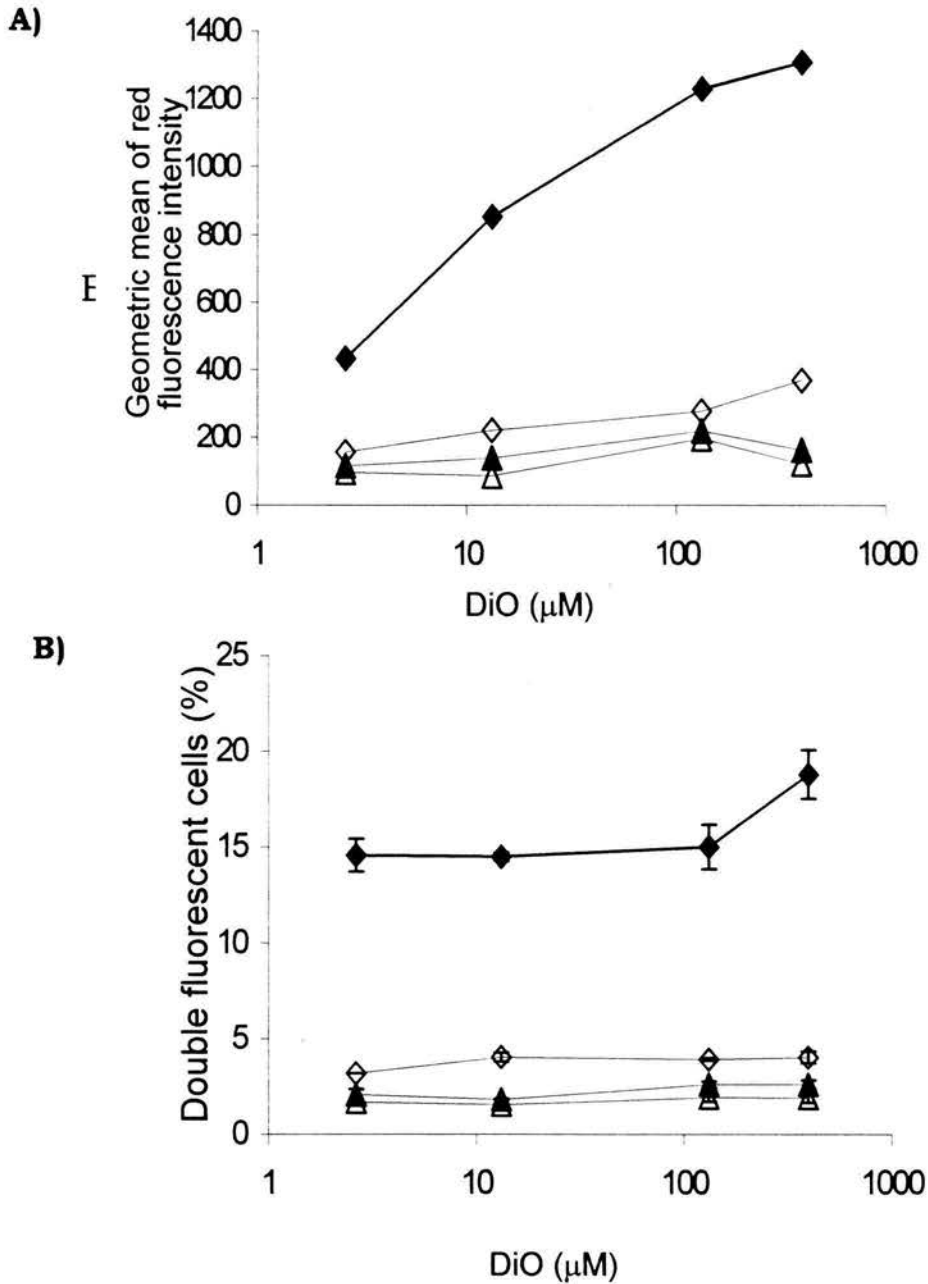


Fig. 3. FRET from DiO to DiI in fused cells. E6 cells labeled with 4 μM of DiI and HXBc2 cells labeled with increasing concentrations of DiO, were cocultured by 5 hours. A) Red fluorescence intensity of double fluorescent cells. Arrow indicates the fluorescence intensity of non-cocultured DiI-labeled E6 cells. Non-fusing cells (DiO-522/DiI-E6 coculture) do not exhibit FRET. B) Percentage of double fluorescent cells obtained in A. ◆, HXBc2-E6; ◇, HXBc2-E6 + anti-CD4; ▲, 522-E6; △, 522-E6 + anti-CD4.

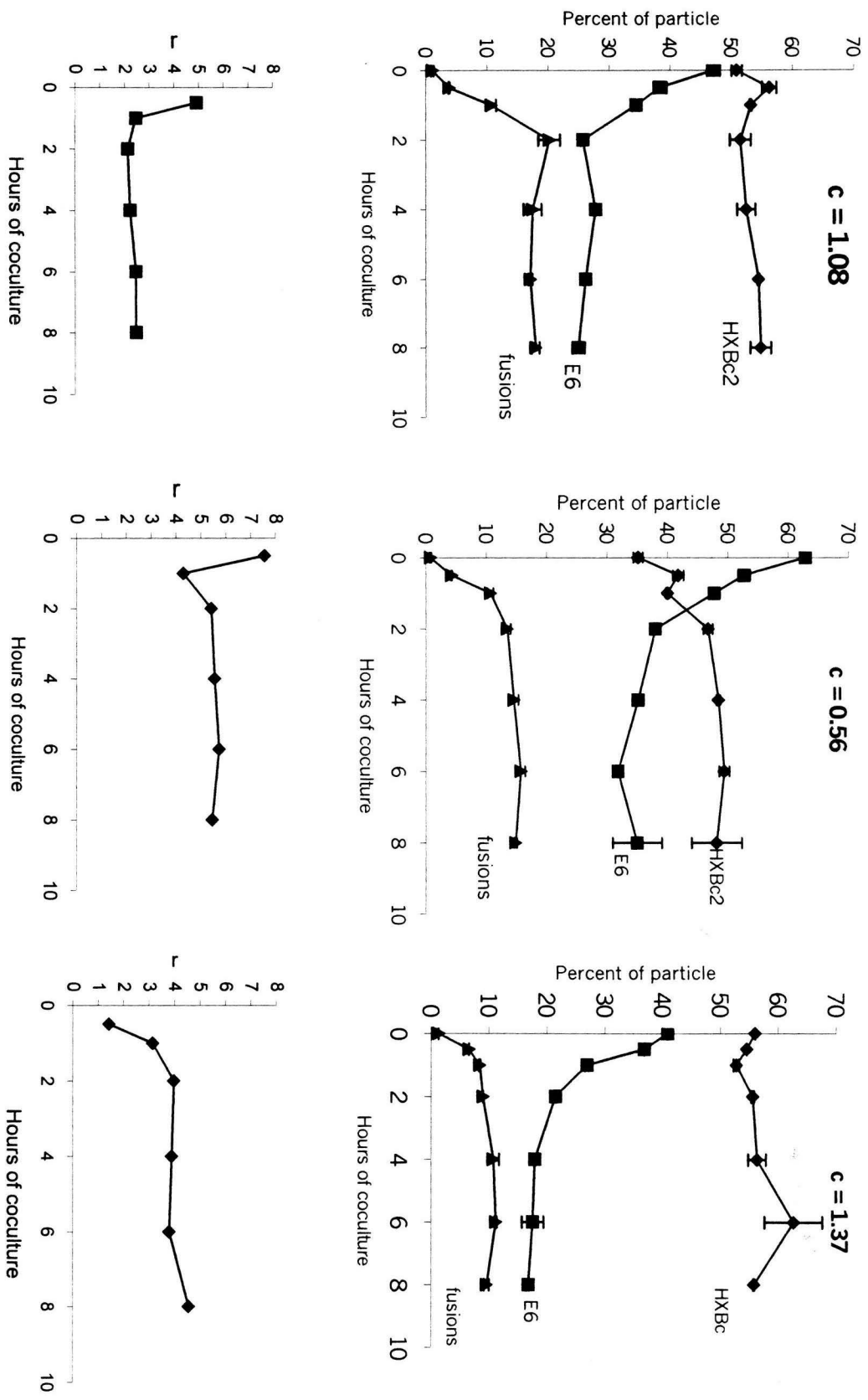


Fig. 6. Upper panels: Kinetics of the proportion of fused and non-fused cells in cocultures differing in the initial proportions of fusion partners (c). Lower panels: Dynamics of the E6/HXBC2 ratio in fused particles.

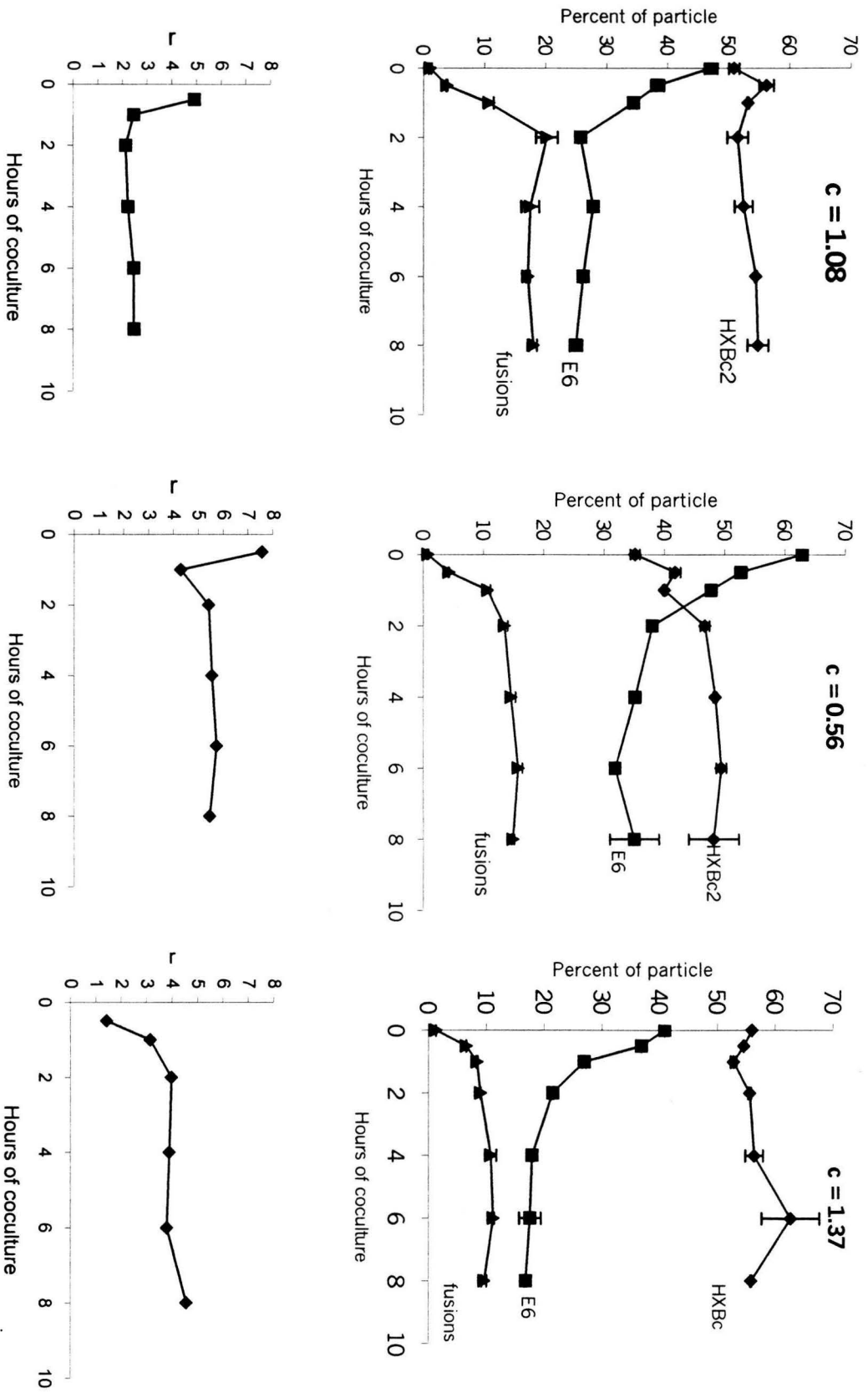


Fig. 4. Upper panels: Kinetics of the proportion of fused and non-fused cells in cocultures differing in the initial proportions of fusion partners (c). Lower panels: Dynamics of the E6/HXBC2 ratio in fused particles.