

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**ESTUDIO DE LA RESPUESTA CITOTÓXICA MEDIADA POR  
LINFOCITOS T CD8+ EN PRESENCIA DE LA PROTEÍNA NEF  
DEL VIH-1 EN FORMA SOLUBLE**

**T E S I S**

**Que para obtener el grado de  
Doctor en Ciencias Biomédicas**

**P R E S E N T A**

**Guillermo Gómez Icazbalceta**

**Tutor principal:**

**Dr. Carlos Larralde**

**Comité tutorial:**

**Dr. Luis Enrique Soto**

**Dr. Enrique Ortega**

**Mayo de 2010**



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.

La presente tesis doctoral se realizó en el Departamento de  
Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la  
U.N.A.M. bajo la dirección del Dr. Carlos Larralde.

# AGRADECIMIENTOS

**Quiero dar las gracias a:**

A mi jurado por su tiempo y dedicación para evaluar esta tesis:

Dr. Alejandro Mohar. IIB-INCAN

Dr. Carlos Larralde. IIB UNAM

Dr. Armando Isibasi. CMN SXXI IMSS

Dr. Ricardo Lascurain. FAC. MEDICINA UNAM

Dra. Kaethe Willms. FAC. MEDICINA UNAM

De la U.N.A.M.:

Al Dr. Carlos Larralde, mi tutor y guía durante siete años. A través de él, la UNAM me permitió hacer lo que me vino en gana, en el buen sentido por supuesto. Esta tesis doctoral confirma que pese a la dificultad del proyecto y pese a mi personalidad misma, no lo defraudé. ¡Muchas gracias por la confianza, gracias por obligarme a pensar de verdad y por enseñarme a valorar la importancia de los pequeños detalles en la ciencia y en la vida misma!

A la Dra. Leonor Huerta, mi asesora, por su infinita paciencia y ayuda incomparable para diseñar experimentos, por su apoyo total durante la fase más crítica del proyecto y por enseñarme a escribir un artículo científico de forma decente y por haber confiado en esta tesis. ¡Gracias!

Al Dr. Edmundo Lamoyi, por sus críticas, siempre severas pero siempre constructivas y valiosas.

A los miembros de mi comité tutorial: Dr. Enrique Ortega y Dr. Luis Enrique Soto, por sus valiosas observaciones, críticas y sugerencias.

Al Químico Carlos Castellanos, por su ayuda, siempre entusiasta, en el manejo de material radiactivo y del citómetro de flujo.

A la Dra. Guillermina Yankelevich, por enseñarme a hacer investigación estadística y por compartirme un poco de su fascinante historia de vida.

A Evelyn Rivera, por su ayuda siempre desinteresada y entusiasta durante algunas fases del proyecto, especialmente por ayudarme a capturar y analizar datos en el citómetro de flujo.

A Marcela Esquivel y Pedro Ostoia, por su amistad y apoyo para construir el nuevo proyecto que apenas ha empezado y también por los buenos ratos de ocio en el laboratorio.

A Silvana Bazua, de alguna forma la primera estudiante que tuve a mi cargo. Espero que durante el tiempo que estuvo bajo mi asesoría en el laboratorio le haya enseñado algo valioso y útil. Ella dice que sí. Gracias por su apoyo genial en el cultivo celular.

A Cristian Togno, por compartirme parte de su delirante genialidad y amistad.

A todos mis compañeros del laboratorio: Nayali, César, Israel T, Israel N y Juan Manuel. Y a José Antonio Vargas y a su esposa.

De otros lugares:

A los miembros del laboratorio de virología molecular del INCMNSZ: Mónica Viveros, Luis Fuentes, Roberto Rodríguez, Sayda, Gris, Karla Polanco, Elsa y Mario Hernández. Hace muchos años llegué a ese laboratorio para hacer una estancia con el objetivo de que me enseñaran a manipular de forma ordenada y segura material infeccioso-contagioso. Sin embargo, lo que me enseñaron fue el rostro más real del VIH y del SIDA, la piel de la pandemia y los ojos de la esperanza. Creo que la depresión me duró un par de meses. Entonces comprendí que tenía que tomar un poco más en serio mi doctorado. ¡Gracias de verdad!

A los miembros del Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS, por las donaciones de paquetes de sangre para realizar mi investigación.

A la Dra. Carmen Sánchez, del CINVESTAV del IPN; su asesoría en el manejo de monocitos y células dendríticas fue fundamental para mi tesis.

En el plano personal:

A mis padres, Guillermo y Guadalupe, por su apoyo infinito, por permitirme ser partícipe de esta aventura maravillosa. Siempre estuvieron junto a mí sin cuestionarme nada, sin hacerme dudar. Gracias por su confianza, por su amor y por haber estado ahí. ¡Los quiero mucho!

A mi hermana Diana, por su apoyo, discreto pero necesario y por hacerme sonreír en los momentos menos esperados. ¡Te quiero mucho!

A mis amigos (cualquier omisión será accidental): Benito, Mauricio, Francisco, Joel, Karina, Jorge, Cynthia, Mario, Arturo y Adriana, Adriana Santa Cruz, Cynthia Janet, Brissa, Carlos Alberto y muchos más que ahora no recuerdo.

A Yared Santa Ana, por volver a vernos, por ser mi amiga y por compartirme esa maravillosa visión del mundo que habita en su ser.

A Paola Piña, por hacerme creer que otro mundo es posible. Hoy todavía le creo pese a todo. Y por su amor a la Naturaleza (ya somos dos).

A Elly Natty Sánchez, porque al compartirme su historia vida, pude entonces comprender mejor la mía. Ella bien sabe a que me refiero. Gracias por las charlas interminables y por ser mi amiga.

A Cristina Aguilar, por muchas cosas, entre otras, por su amistad, la cocina, la música, el vino y por contagiarme de su entusiasmo por el teatro, el cine y la vida.

A Elizabeth Ibarra, por su valentía inexplicable para soportarme en la calma y en la tempestad y por compartir parte de su existencia conmigo, como una amistad que va de los libros al café y también hacia algo indefinible.

A Eric, de Papantla, por la música y la buena charla y por su amistad obviamente.

A Carlos Ramírez y Diana Rodríguez. Hago mía esta frase de Subiela que resume todo:

*Qué miedo me daría esta noche que se viene, si no los tuviera a ustedes.*

Sinceramente (Let it be).

A Diana Narváez, por *esos* años...

A Magui Ontiveros. Gracias sólo por el hecho de existir, pero también por llevarme a la Sierra Tarahumara, en dónde por cierto, recuperé mi alma.

Ciertamente hay otros seres, hoy en día en forma de ausencias y espíritus. Prefiero reservarme sus nombres. Gracias no obstante por todo su amor y gracias también por recordarme que nada ni nadie es para siempre. ¡Gracias!

A la Ciudad de México, a la que amo con la misma intensidad (mucho) con que la odio (mucho). Así sucede cuando, entre el pavimento, los barrios surrealistas, los sismos, los amores fugaces, la violencia de los automovilistas y la muerte repentina con olor a smog, es posible encontrar la paz como un café entre callejones del siglo XIX, museos, la euforia como una mañana nublada en Chapultepec; un cine, un teatro; la soledad como una puesta de sol color anaranjado y morado, la lluvia torrencial, la libertad como una ciclista y un espejo de agua que te mira y te dice que, pese a todo, eres feliz. *Las posibilidades emocionales de un objeto físicamente inabarcable* dijo Melannie Griffith

A la Ciudad Universitaria... la utopía es un lugar al sur del D.F.



Hay allá abajo una cavidad que se aleja tanto de Lucifer cuanta es la extensión de su tumba; cavidad que no puede reconocerse por la vista, sino por el rumor de un arroyuelo, que desciende por el cauce de un peñasco que ha perforado con su curso sinuoso y poco pendiente. Mi Guía y yo entramos en aquel camino oculto, para volver al mundo luminoso; y sin concedernos el menor descanso, subimos, él delante y yo detrás, hasta que pude ver por una abertura redonda las bellezas que contiene el Cielo, y por allí salimos para volver a ver las estrellas.

Pasaje final de El Infierno, en La Divina Comedia, de Dante Alighieri.

## Contenido

RESUMEN.....	3
ABSTRACT.....	4
ABREVIATURAS.....	5
AGRADECIMIENTOS: .....	6
I. INTRODUCCIÓN.....	14
I.1 El largo camino hacia Nef extracelular (exNef). .....	14
I.1.2 Descripción de Nef. ....	18
I.1.2.1 Estructura de Nef. ....	18
I.1.2.1 Nef en el ciclo replicativo del VIH-1.....	19
I.2 Papel de Nef in vivo como una toxina viral.....	21
I.3 Los linfocitos T CD8+ en la infección por el VIH-1. ....	22
I.4 Modelo de inducción de una respuesta inmune citotóxica mediada por los Linfocitos T CD8+.....	24
I.4.1 Inducción alterada de CTL.....	27
I.5 Nef extracelular y los linfocitos T CD8+.....	28
II. PREGUNTA.....	30
III. HIPÓTESIS.....	30
IV. OBJETIVOS .....	30
Objetivo general .....	30
Objetivos particulares.....	30
V. MATERIALES Y MÉTODOS .....	31
Diseño experimental.....	31
Medio de cultivo y reactivos.....	31
Separación de monocitos y diferenciación hacia células dendríticas maduras. ....	31
Separación de linfocitos T CD8+ e inducción de CTL. ....	32
Ensayo de proliferación de linfocitos T CD8+.....	32
Ensayo de citotoxicidad por liberación de <sup>51</sup> Cromo.....	33
Análisis estadístico.....	34
VI. RESULTADOS.....	35
VI.1 Asociación entre la actividad citotóxica basal y la proliferación de linfocitos T CD8+ mediante PHA. ....	35
VI.2 Efecto de exNef sobre la inducción de actividad citotóxica. ....	37
VI.3 Efecto de exNef sobre la proliferación inducida por la PHA.....	39

VII. DISCUSIÓN .....	40
VIII. CONCLUSIÓN .....	44
IX. APÉNDICES.....	45
IX.1 Implicaciones biomédicas de Nef en patología y terapia.....	45
IX.2 exNef y Cáncer. ....	47
IX.2.1 Efecto de exNef sobre el crecimiento de líneas de células tumorales humanas.....	47
IX.2.2 Efecto de exNef en la inducción de una respuesta inmune citotóxica mediada por PBMC contra líneas de células tumorales humanas.....	49
X. REFERENCIAS.....	52
ARTÍCULOS PUBLICADOS .....	61
ARTÍCULOS ORIGINALES .....	62
ARTÍCULOS DE REVISIÓN .....	63

## RESUMEN

Nef es una proteína accesoria del VIH-1 involucrada en la amplificación de la replicación viral, en la endocitosis de los receptores CD4 y CXCR4 en el linfocito T, en la prevención de la apoptosis y en la regulación de la respuesta inmune mediante la alteración en la secreción de citocinas con propiedades inmunológicas diversas. Así mismo, Nef es secretada al ambiente extracelular (exNef) y al torrente sanguíneo, sugiriendo que exNef podría afectar a diversas poblaciones celulares inmunológicas y no inmunológicas. En este sentido, se ha demostrado que exNef altera en diverso grado de intensidad y dirección la funcionalidad de los linfocitos B, linfocitos T CD4+, células dendríticas maduras e inmaduras y de forma interesante afecta también la expresión del receptor CD8 en los linfocitos T en respuesta a la estimulación por la PHA, por lo que decidimos evaluar el efecto de exNef en la inducción de actividad citotóxica y proliferación en los linfocitos T CD8+ humanos.

Encontramos que exNef a la concentración de 10 ng/ml amplificó la actividad citotóxica inducida de forma alogénica mediante mDC, mientras que a la concentración de 100 ng/ml no indujo efecto alguno sobre la actividad citotóxica. El índice de amplificación de la actividad citotóxica por exNef se relacionó inversamente con la actividad citotóxica basal, por lo que los linfocitos T CD8+ con menor actividad citotóxica basal desplegaron mayor actividad citotóxica en respuesta a exNef. En cambio, exNef a ambas concentraciones moduló diferencialmente la proliferación de los linfocitos T CD8+ inducida por la PHA, observándose tanto la ausencia de efecto, como amplificación y disminución de la proliferación en respuesta a exNef más PHA. La dirección del efecto dependió inversamente de la proliferación basal. exNef en ausencia de PHA no causó efecto alguno.

Estos hallazgos señalan que exNef tiene la capacidad *in vitro* de afectar de forma pronunciada dos funciones inmunológicas esenciales de los linfocitos T CD8+ humanos: la proliferación y la inducción de actividad citotóxica, en una forma que dependió inversamente de la reactividad basal de las células, sugiriendo así que exNef podría tener un efecto inmunomodulador relevante en la patogénesis del SIDA y que también podría ser empleada en inmunoterapia.

## ABSTRACT

Nef is an accessory protein of HIV-1 involved in the amplification of viral replication, in the endocytosis of CD4 and CXCR4 receptors in T lymphocytes, in the prevention of apoptosis and the regulation of the immune response by altering the secretion of cytokines with different immunological properties. Similarly, Nef is secreted into the extracellular environment (exNef) and the blood, suggesting that exNef could affect immunological and non-immunological cell populations. In this sense, it has been shown that exNef alters in several degrees of intensity and direction the functionality of B cells, CD4 + T cells, immature and mature dendritic cells and interestingly also affects the expression of receptor CD8 on T cells in response to stimulation by PHA. Thus, we decided to evaluate the effect of exNef in the induction of cytotoxic activity and proliferation in human CD8 + T lymphocytes.

We found that exNef at the concentration of 10 ng / ml amplified the cytotoxic activity induced by allogeneic mDC, while the concentration of 100 ng / ml did not induce any effect on the cytotoxic activity. The rate of cytotoxic activity amplification by exNef was inversely associated with basal cytotoxic activity, as CD8 + T cells with lower basal cytotoxic activity displayed higher cytotoxic activity in response to exNef. In contrast, both concentrations of exNef differentially modulated the proliferation of CD8 + T lymphocytes induced by PHA, showing both the absence of effect, as the amplification and decreased of proliferation in response to PHA plus exNef. The direction of the effect depended inversely on the basal proliferation. exNef in the absence of PHA did not cause any effect.

These findings indicate that exNef has the *in vitro* ability to profoundly affect two pivotal immune functions of the human CD8+ T lymphocytes: the proliferation and induction of cytotoxic activity in a manner that depends inversely on the basal reactivity of the cells, suggesting that exNef could have a significant immunomodulatory effect in the pathogenesis of AIDS and may also be used in immunotherapy.

## ABREVIATURAS

**exNef:** Nef extracelular.

**VIH-1:** virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1.

**SIDA:** síndrome de inmunodeficiencia adquirida.

**OMS:** Organización Mundial de la Salud.

**SIV:** virus de la inmunodeficiencia del simio.

**TAR:** elemento de respuesta a la trans-activación.

**MHC I:** complejo mayor de histocompatibilidad clase I.

**TCR:** receptor del linfocito T.

**CTL:** linfocitos T CD8+ citotóxicos.

**SHIV:** virus quimera constituido por genes del VIH-1 y del SIV.

**APC:** célula presentadora de antígeno profesional.

**mDC:** célula dendrítica madura.

**pMHC:** complejo péptido MHC I específico.

**PHA:** fitohemaglutinina.

**rIL-2:** interleucina 2 recombinante humana.

**rIL-4:** interleucina 4 recombinante humana.

**GM-CSF:** factor estimulante de colonias de monocitos y granulocitos.

**LPS:** lipopolisacárido bacteriano.

**PBMC:** células mononucleares de sangre periférica.

**SFB:** suero fetal bovino.

**cpm:** cuentas por minuto.

**ANOVA:** análisis de varianza.

## INTRODUCCIÓN.

### **I.1 El largo camino hacia Nef extracelular (exNef).**

La infección por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) y el conjunto de patologías asociadas a ésta, el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), representan uno de los principales problemas de salud pública mundial. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el mundo viven aproximadamente 33 millones de personas infectadas con el VIH-1, con un incremento anual de casi 3 millones de nuevos infectados (sitio OMS en internet). La investigación sobre la infección y la patogénesis del SIDA se ha convertido en una prioridad de salud a nivel mundial, debido al impacto que el VIH-1 tiene en la vida misma del paciente, en el estatus socioeconómico y en las relaciones interpersonales en general (Danzinger R 1994., Kleinman DV 1997., Gayle H 2000., Piot P et al. 2001). Además, la infección por el VIH-1 representa un reto ineludible de estudio por las ciencias biomédicas, dado que durante el curso de la infección es posible observar una serie considerable de patologías, como inflamación cerebral, pérdida de peso, autoinmunidad en presencia de inmunodeficiencia, desbalance hormonal, desgaste cardíaco, atrofia muscular y atrofia del tejido linfoide (Edelman AS et al., 1989, Levy JA et al., 2007). Muchas de esas alteraciones fisiológicas se corresponden con cambios en la viabilidad, distribución y diferenciación de varias poblaciones celulares inmunológicas.

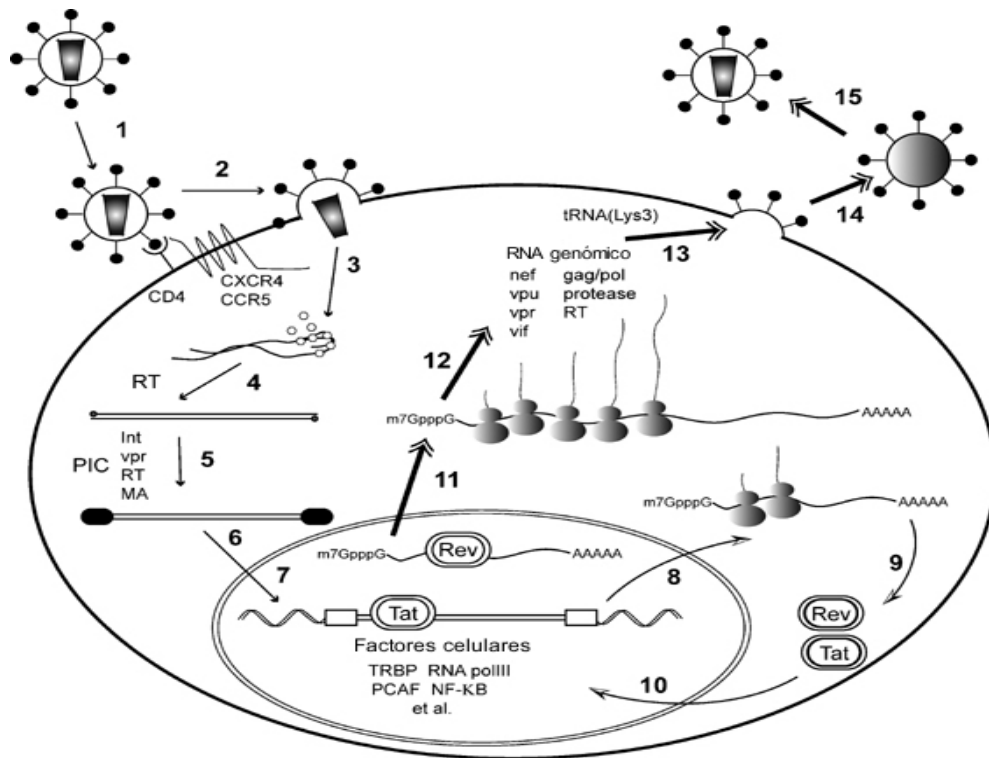
El entendimiento de la patogénesis del SIDA debida a la infección por el VIH-1 comenzó en 1984 cuando se postuló que la causa del SIDA podía residir de forma casi exclusiva en la depleción gradual pero irreversible de los linfocitos T CD4+ (Goedert JJ et al., 1985, McDougal JS et al., 1985), los cuales desempeñan un papel central en el desarrollo de la inmunidad protectora contra agentes infecciosos. Siguiendo este postulado, el ciclo de infección inicia con la entrada del virus al linfocito T CD4+ a través de la interacción del complejo de proteínas virales gp120/gp41 con el receptor celular de membrana CD4 y con alguno de los receptores para quimiocinas, principalmente CCR5 y CXCR4, induciendo la fusión de la envoltura viral con la membrana celular, la internalización del virus y su migración hacia el núcleo celular, donde ocurre la retro-transcripción, la integración del genoma viral en el genoma celular, la síntesis de nuevas partículas virales, el ensamblaje de los virus y su migración hacia nuevas células blanco a través de la gemación desde la membrana celular (Markham PD et al., 1985; revisado en Trkola A et al., 2004).

Poco después se estableció un esquema más amplio, con la identificación de todos los genes y proteínas virales, así como su participación en cada uno de los pasos del ciclo viral. El paso más significativo en esta clasificación fue la división del ciclo viral en dos etapas: etapa temprana, donde ocurre la integración del genoma viral en el genoma celular, la síntesis de las proteínas reguladoras y accesorias y, etapa tardía, donde ocurre la síntesis de las proteínas estructurales, el ensamblaje de los virus y la gemación. Estas etapas fueron sugeridas con base a las infecciones de otros retrovirus, como HTLV I, donde previamente se habían establecido (revisado en Cullen BR 1991 y Nisole S et al., 2004).

En el caso del VIH-1 (figura 1) (revisado en Freed EO et al., 2006), la etapa temprana empieza antes de la integración del genoma viral, con la síntesis de las proteínas virales reguladoras y accesorias. Las proteínas reguladoras son Tat y Rev, las cuales son completamente esenciales para la síntesis del ARN viral, mientras que las proteínas accesorias son Vpr, Vpu, Vif y Nef, las cuales ejercen múltiples funciones sobre la maquinaria celular, que en general convergen en el alargamiento de la vida de la célula infectada, en el escape a la vigilancia inmunológica, en el ensamblaje de los virus y en la síntesis elevada de las partículas virales. La etapa tardía empieza después de la integración del genoma viral, con la síntesis de las proteínas virales estructurales gag, pol y env, que son comunes a todos los retrovirus. Posteriormente, ocurre la gemación de las nuevas partículas virales, la cual puede causar apoptosis *in vitro* en los linfocitos T CD4+ (Leonard R et al., 1988). Esta caracterización permitió vincular a la replicación viral con la depleción de los linfocitos T CD4+ y la progresión al SIDA, aunque pronto se hizo énfasis en que no explicaba completamente cómo la depleción aparente de un solo tipo celular, esto es, de los linfocitos T CD4+, ocasionaba un complejo cuadro inmunopatológico (Edelman AS et al., 1989).

Figura 1.





**Figura 1. Ciclo de replicación del VIH-1.** Símbolos: las flechas rectas indican los pasos desde la entrada a la integración, la flechas curvadas indican la fase temprana del ciclo y las flechas de cabeza doble indican la fase tardía del ciclo. 1) Interacción entre el virus y los receptores celulares CD4 y CXCR4. 2) Fusión. 3) desnudamiento del genoma viral. 4) Transcripción reversa. 5) Formación del complejo de pre-integración. 6) Importación nuclear del complejo. 7) Integración del genoma viral en el genoma celular. 8) Transcripción de los RNAm tempranos. 9) Traducción de las proteínas regulatorias. 10) Importación nuclear de Tat y Rev. 11) Exportación mediada por Rev de los RNAm virales. 12) Traducción de las proteínas virales estructurales. 13) Ensamblaje del RNA viral en la membrana. 14) Gemación viral. 15) Maduración viral. Algunos factores celulares involucrados en la transcripción viral: RNA pol III y NF-κB. (modificado de Scherer L et al., 2007).

Un reporte fortaleció este esquema básico y al mismo tiempo estableció que sí bien Nef era completamente innecesaria para la replicación viral *in vitro* (Cullen BR 1994), era completamente esencial para mantener una replicación viral elevada y para desarrollar el SIDA en monos infectados con el virus de la inmunodeficiencia del simio (SIV) (Kestler H W 3rd et al., 1991). Por esas fechas se publicaron varios estudios que analizaron la relación entre la presencia de anticuerpos anti-Nef en el plasma de pacientes infectados por el VIH-1 y la progresión al SIDA, de los cuales 2 estudios mostraron datos contradictorios entre si y 3 de ellos no encontraron relación sólida entre la presencia de los anticuerpos y la progresión (Reiss P et al., 1989., Reiss P et al., 1990., Reiss P et al., 1991., Bahraoui E et al., 1990., Rezza G et al., 1992). Es necesario destacar que para ese momento el estudio del papel de Nef sobre la progresión al SIDA estaba enfocado casi exclusivamente en sus efectos sobre las células infectadas y la

replicación viral. Este enfoque cambió sutilmente en 1994, cuando el Dr. Jean Claude Chermman, quien fuera antiguo colaborador del Dr. Luc Montagnier, reportó que el VIH-1 causó apoptosis en cultivos de células de médula ósea (Calenda V et al., 1994). Ese efecto se reprodujo con la adición de mutantes virales impedidas para replicarse. Sin embargo, ese efecto no se observó cuando las células se infectaron con variantes virales competentes para replicarse que carecían del gen nef. De forma interesante, la sola adición de la proteína Nef en forma exógena si causó apoptosis. En este trabajo no se expuso la inferencia que llevó al grupo del Dr. Chermann a proponer que Nef podía ser el mediador de la apoptosis, pero es el primer reporte experimental que postuló de forma clara que la proteína Nef del VIH-1 era un mediador independiente de daño *in vitro* hacia tipos celulares diferentes a los linfocitos T CD4+ y que la replicación viral podía ser innecesaria. Recientemente, otros autores han corroborado *in vivo* este hallazgo (Prost S et al., 2008). Justo un año después se publicó la primera descripción detallada de una cohorte de pacientes australianos infectados a través de la sangre de un donador común, con una variante del VIH-1 que expresaba al gen nef de forma no funcional, teniendo como consecuencia el desarrollo de una infección con replicación viral baja, cuenta de linfocitos T CD4+ relativamente estable y nula o lenta progresión al SIDA (Deacon NJ et al., 1995). En 1997, Whitakker R (1997), se preguntó si la sola replicación viral podía explicar la miríada de desordenes inmunológicos observados durante la infección por el VIH-1, aunque aceptaba que el tratamiento antirretroviral tenía un efecto benéfico, previniendo o retrasando la expresión de esos desórdenes, por lo que sugirió, a la luz de evidencia experimental, la posibilidad de que componentes virales solubles pudieran mediar efectos adicionales en células no infectadas. Un año antes se había demostrado la presencia de la proteína exNef tanto en el sobrenadante de cultivos infectados con el VIH-1 como en el plasma de una elevada proporción de un grupo de pacientes infectados con el virus, en concentraciones que oscilaban entre 1 y 10 ng por mililitro (Fujii Y et al., 1996). Ensayos *in vitro* mostraron que a concentraciones de 0.1 µg/ml, exNef inhibió ampliamente la proliferación de linfocitos T CD4+, provenientes tanto de líneas celulares como de muestras de sangre periférica. Este trabajo disparó una serie de experimentos *in vitro* e *in vivo*. Se demostró que exNef causó apoptosis en los linfocitos T CD4+ (Fujii Y et al., 1996), inhibición en la secreción de anticuerpos en linfocitos B (Quaranta MG et al., 2000), proliferación de células mononucleares de sangre periférica no infectadas (Quaranta MG et al., 1999). exNef también alteró la leucotaxis *in vivo* (Koedel U et al., 1999). Otro estudio mostró

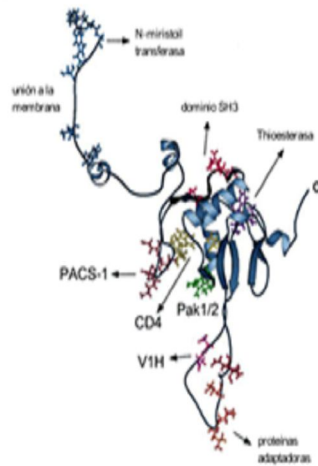
que exNef causó apoptosis en líneas celulares de neuronas humanas (Trillo-Pazos G et al., 2000). Estos hallazgos fortalecieron la hipótesis de que exNef podía ser un mediador independiente de daño sobre varios tipos celulares.

## **I.1.2 Descripción de Nef.**

### **I.1.2.1 Estructura de Nef.**

Nef es una proteína de 27kDa a 35 kDa que se ha dividido esquemáticamente en tres regiones: la región amino terminal, la región del cuerpo o *core* y la región carboxilo terminal (figura 2) (Geyer M et al., 2001). La región amino terminal, compuesta por los aminoácidos 1 al 70 aproximadamente, es una región genéticamente muy variable, que puede sufrir dos modificaciones post-traduccionales: fosforilación y miristilación. Mientras que la relevancia de la fosforilación es poco conocida, la relevancia de la miristilación es muy importante, dado que induce su traslocación a la membrana celular, la cual permite que Nef interactúe con los receptores de membrana asociados a la activación del linfocito T. La región del *core* es la menos variable de las tres regiones, está compuesta por los aminoácidos 70 al 180 aproximadamente y es la región de Nef que une a la mayoría de las moléculas de señalización, debido a que exhibe varias zonas ricas en prolina. En particular, destacan la zona P72xxP75, donde se une el grupo SH3 de las quinasas Src, las cuales juegan un papel central en la activación del linfocito T (Carl S et al., 2000). Resulta notable que el efecto observado debido a las interacciones de algunas de estas moléculas no se correlaciona siempre con la fuerza de la afinidad con la región SH3 de Nef. Por ejemplo, Nef une con afinidad muy alta a la quinasa Lyn, sin observar efecto alguno. En cambio, Nef también une con afinidad muy alta a Hck, resultando en la activación de la quinasa. Además de afectar diferencialmente a las vías de señalización, la región del *core* tiene la propiedad de mediar la oligomerización de Nef, tanto *in vivo* como *in vitro*, aunque se desconoce su relevancia funcional. La oligomerización de otras moléculas se ha asociado comúnmente con la amplificación de un efecto. Por lo tanto, se considera que la oligomerización de Nef a través del *core*

Figura 2.



**Figura 2. Estructura de Nef.** Esquema que muestra las principales regiones funcionales de la proteína Nef del VIH-1. Destaca la región de miristilación, que permite el anclaje de Nef a la membrana celular, la región de unión a Sh3, que permite la interacción entre Nef y varias moléculas de señalización, la región de unión a CD4, la región de unión a las proteínas celulares asociadas al transporte PACS1, la región de unión a proteínas del tipo ATPasas (modificado de Geyer M et al., 2001).

promueve un mayor efecto de Nef sobre la señalización celular y la subsecuente activación del linfocito T. Una porción de Nef localizada entre los aminoácidos 57 y 100, que corresponde a una zona intermedia entre la región amino terminal y la del *core*, participa en el anclaje de las moléculas PACS1 y  $\beta$ -COP, asociadas a la endocitosis del MHC I y del CD4. La región carboxilo terminal de Nef al parecer no desencadena un evento de trascendencia para la funcionalidad celular. Algunos estudios mostraron que esta región de Nef se expresa en la membrana celular, induciendo la formación de sincicios (Otake K et al., 1994), cuya detección se ha asociado a la aparición de cepas virales más agresivas y a más rápida progresión al SIDA. Está constituido por los últimos 40 aminoácidos de Nef.

### **I.1.2.1 Nef en el ciclo replicativo del VIH-1.**

El esquema original del ciclo replicativo del VIH-1 derivado de estudios iniciales del virus (Markham PD et al., 1985) postulaba que, posterior a la integración del genoma viral en el genoma celular, ocurre la expresión de la proteína viral Tat, que es el producto viral de expresión más temprana (revisado en Wu Y 2004), la cual se une a una región del ADN viral denominada elemento de respuesta a la trans-activación (TAR), teniendo como consecuencia la síntesis elevada de aproximadamente 30

diferentes transcritos virales, que se generan a partir de la edición alternativa de un transcrito común, para después dar origen a las diferentes proteínas regulatorias, accesorias y estructurales del virus. En 1990 se demostró que la integración *in vitro* no era necesaria para la generación de las proteínas del VIH-1 (Stevenson M et al., 1990) y estudios de la presente década demostraron que más del 99% del ADN viral no está integrado en el genoma celular durante la etapa asintomática de la infección (Wu Y et al., 2003a), fenómeno que también había sido reportado en la infección por el virus de la inmunodeficiencia felina (Mullins Hi et al., 1991), sugiriendo que se trata de una propiedad compartida entre los retrovirus.

Usando virus genéticamente impedidos para integrarse así como inhibidores químicos de la integrasa viral, se demostró que en linfocitos T CD4+ en reposo, posterior a la expresión de Tat, la proteína Nef era el segundo transcrito en expresarse, a los 3 días de infección, seguida de la proteína Rev y, con expresión positiva, aunque baja, de las demás proteínas virales (Wu Y et al., 2003b). La expresión temprana de Nef en ausencia de integración promueve la endocitosis del receptor CD4 (Gillim-Ross L et al., 2005). En relación a la replicación viral, la expresión temprana de Nef en ausencia de integración induce una mayor proliferación en respuesta a la activación celular por anti-CD3 y anti-CD28, que resulta en mayor síntesis de IL-2. Otros ensayos además mostraron que Nef promueve la integración del genoma viral en el genoma celular. (Tokunaga K et al., 1998). Por lo tanto, la expresión temprana de Nef reduce el umbral de activación del linfocito T CD4+ para promover la integración y la subsecuente replicación elevada del VIH-1.

En la infección por el VIH-1 en humanos se encontró una fuerte relación entre la patogenicidad del virus y la capacidad de Nef para desplegar cuatro funciones *in vitro*: la endocitosis del receptor CD4, la endocitosis del complejo mayor de histocompatibilidad tipo I (MHCI), la promoción de la replicación viral y la amplificación de la infectividad (Carl S et al., 2001). En general se admitió que la endocitosis del CD4 y del MHCI se ve favorecida en las etapas tempranas de la infección, alargando la vida media de la célula y facilitando el escape a la vigilancia inmunológica, respectivamente, en tanto que la promoción de mayor replicación viral e infectividad se ve favorecida en las etapas avanzadas de la infección, promoviendo la expansión del virus y mayor pérdida de linfocitos T CD4+ (Carl S et al., 2001., Crotti A et al., 2006). Si bien Nef es necesaria y suficiente para desplegar estas propiedades *in*

*vitro*, los hallazgos de que Nef tiene la capacidad de asociarse directamente con la región del *core* del virus y con una ribonucleoproteína viral, sugieren que otros componentes del VIH-1 podrían aumentar la patogenicidad intrínseca de Nef, como la amplificación de la infectividad y la promoción de la replicación viral.

## **I.2 Papel de Nef in vivo como una toxina viral.**

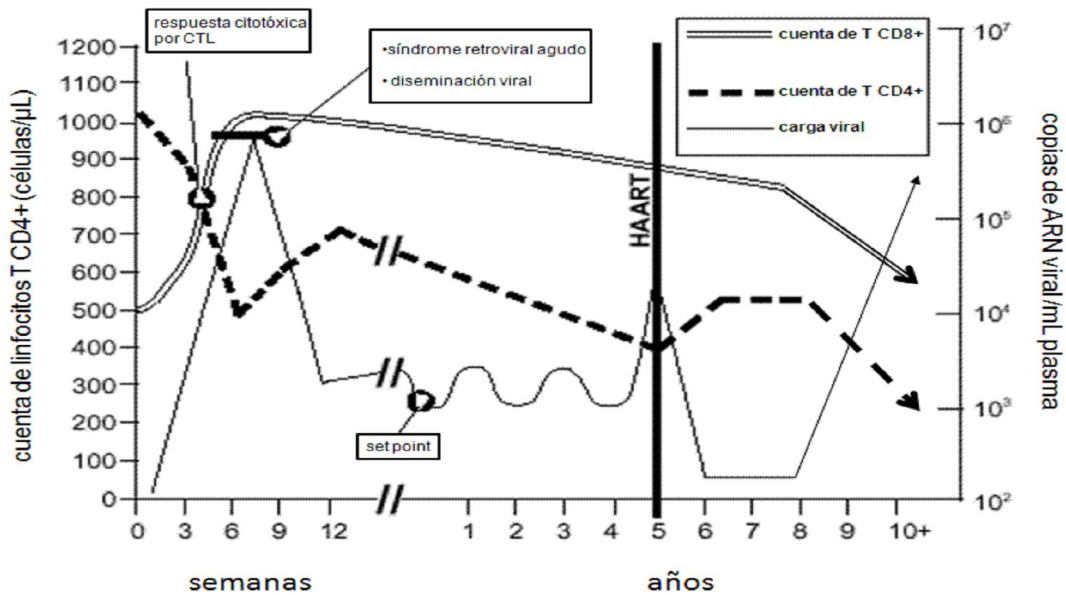
En 1998 se ensayó el efecto de la expresión del genoma del VIH-1 y del gen *nef* en ratones transgénicos. Se encontró que la expresión del genoma viral completo causó en los ratones un cuadro similar al SIDA mientras que la expresión de una variante del genoma viral que no expresaba al gen *nef* no causó patología. De forma notable, la sola expresión del gen *nef* causó un cuadro similar al SIDA de igual magnitud al causado en los ratones transfectados con el genoma viral completo (Hanna Z et al., 1998). Dos años después, este trabajo se analizó en un artículo de revisión que postuló directamente que Nef tiene un papel patogénico relevante en células y tejidos no infectados, independiente al de la replicación viral. (Azad AA 2000). Este postulado recibió importante apoyo experimental en el 2002 (Dehghani H et al., 2002), cuando se mostró que la inoculación en monos de una variante patogénica del SIV que normalmente inducía un cuadro clínico similar al SIDA después de varios meses de infección, inesperadamente indujo una enfermedad letal en solo quince días de infección en promedio, caracterizada por linfopenia severa, síndrome de desgaste, salpullido, elevada replicación viral, hiperactivación del sistema inmune concomitante con la secreción elevada de TNF alfa e IL-6 y severo daño tisular, en particular sobre el tejido linfoide asociado al intestino. El análisis molecular reveló que el virus había sufrido una mutación por sustitución de un solo aminoácido en la región ITAM de Nef, que es una región que tiene gran homología con las regiones ITAM del receptor de la célula T (TCR), las cuales permiten el anclaje y activación de moléculas que disparan la cascada de señalización que inducen la activación del linfocito T. Interesantemente, el incremento en la virulencia de la nueva variante viral no se asoció ni con cambios en la cinética de replicación viral, dado que las infecciones con ambos virus desplegaron cargas virales elevadas de similar magnitud, ni con cambios en el número de células infectadas. Más aún, la introducción de esa mutación en otras variantes del SIV poco agresivas fue suficiente para incrementar notoriamente su virulencia. Por lo tanto,

mutaciones en Nef pueden alterar la rapidez y magnitud de la enfermedad sin inducir cambios en la replicación viral.

### I.3 Los linfocitos T CD8+ en la infección por el VIH-1.

La infección primaria por el VIH-1 se caracteriza por elevada replicación viral, depleción de linfocitos T CD4+ y por algunas manifestaciones clínicas indicativas de inmunodeficiencia. La detección de linfocitos T CD8+ citotóxicos (CTL) circulantes específicos del virus coincide con la caída de la replicación viral y con la recuperación significativa del número de los linfocitos T CD4+, mientras que la progresión al SIDA se ha asociado al aumento continuo de la replicación viral y a la pérdida acelerada de los linfocitos T CD4+ (figura 3).

Figura 3.



**Figura 3. Curso temporal de la infección por el VIH-1 y la respuesta inmune citotóxica.** Durante la infección temprana por el VIH-1 se observa una potente repuesta inmune mediada por CTL asociada al control de la infección y a la recuperación en la cuenta de linfocitos T CD4+, mientras que en la progresión al SIDA, se observa una declinación en los CTL asociada al aumento de la replicación viral y a la caída drástica en la cuenta de linfocitos T CD4+. HAART: (de terapia antiretroviral altamente activa por sus siglas en inglés), señala el momento estimado en el cual se debe administrar al paciente terapia antiretroviral (modificado de thebody.com).

En 1999 se analizó nuevamente a la cohorte australiana descrita arriba, pero esta vez se tomó en cuenta la funcionalidad inmunológica. De todos los parámetros analizados, solamente se encontró una fuerte correlación, inversa, entre la respuesta

inmune citotóxica mediada por los CTL y la replicación viral (Dyer WB et al., 1999). Otros estudios de cohorte de pacientes infectados con variantes virales que si expresaban a Nef de forma funcional, mostraron la misma relación. Estas evidencias permitieron hipotetizar que, al igual que en otras infecciones virales, la respuesta inmune citotóxica mediada por los CTL era esencial, tanto para el control primario y subsecuente de la replicación del VIH-1, como para retrasar el desarrollo del SIDA.

La infección de monos Rhesus con virus quimeras constituidos por los genes estructurales gag, pol y env y por el gen nef del SIV y por los demás genes del VIH-1 (SHIV), despliega una cinética de replicación viral muy similar a la observada en la infección primaria en humanos, por lo que constituye un modelo experimental adecuado para estudiar la función de los CTL en el control de la replicación viral y el desarrollo del SIDA. La administración de un anticuerpo anti-CD8 en esos monos 3 días antes y 7 días después de la inoculación del SHIV ocasionó una depleción transitoria de los linfocitos T CD8+, junto con un incremento notable en la replicación viral y en la depleción de los linfocitos T CD4+ (Matano T et al. 1998). Tres semanas después de la administración del anti-CD8, se observó una marcada recuperación en el número de los linfocitos T CD8+ junto con una fuerte caída en la replicación viral y una recuperación, aunque menos pronunciada, en el número de los linfocitos T CD4+. Específicamente, la replicación viral en los monos tratados con el anticuerpo se estableció en un promedio de 13,800 copias de ADN viral por cada  $10^5$  linfocitos T CD4+ mientras que en los no tratados se estableció en 600 copias de ADN viral por cada  $10^5$  linfocitos T CD4+. Treinta semanas después del seguimiento de la infección, la carga viral promedio se mantuvo en 4,200 copias por cada  $10^5$  células para los tratados y en 190 copias por cada  $10^5$  células para los no tratados. De forma inesperada, se encontró que el anticuerpo anti-CD8 había depletado casi exclusivamente a los linfocitos T CD8+ del subtipo CD28-, los cuales corresponderían al fenotipo de células efectoras terminalmente diferenciadas o CTL, que se caracterizan por desplegar actividad citotóxica inmediata sin necesidad de estimulación.

Los CTL aislados de una elevada proporción de pacientes infectados por el VIH-1 a menudo exhiben alteraciones funcionales *ex vivo*, que consisten en defectos para secretar compuestos antivirales, en la disminución de su capacidad proliferativa y en el despliegue de actividad citotóxica deficiente o nula. Mediante el análisis por dilución limitante, se encontró una mayor frecuencia de CTL específicos del VIH-1 en la sangre



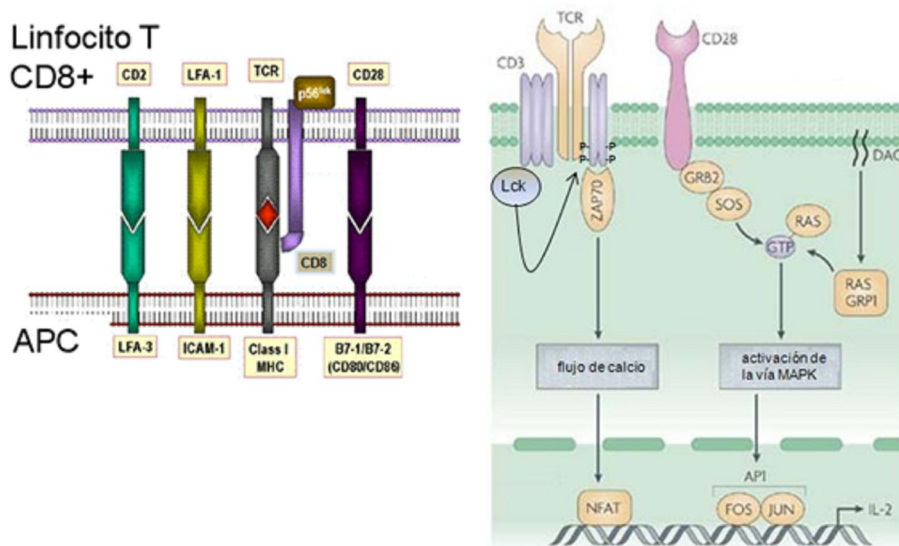
de pacientes asintomáticos que mantenían cargas virales bajas que en la sangre de los pacientes sintomáticos que mantenían cargas virales elevadas. Empleando la técnica de marcaje de CTL específicos del VIH-1 mediante complejos tetraméricos, otro estudio encontró que los cambios temporales en la detección de CTL específicos del virus se correspondieron con cambios en la replicación viral (Ogg GS et al., 1999). Estudios adicionales reforzaron estos hallazgos y además establecieron que la detección de CTL específicos del VIH-1 que tenían la capacidad para secretar compuestos antivirales, para desplegar actividad citotóxica (Betts MR et al., 2006) y que además desarrollaban una respuesta antiviral diversa frente a varios antígenos virales, era un indicador muy sólido de lenta progresión al SIDA asociada a un fuerte control de la replicación viral. Estos hallazgos fortalecieron la hipótesis de que la inducción de una adecuada respuesta inmune citotóxica mediada por los CTL podría ser determinante para el curso de la infección por el VIH-1 en humanos.

#### **I.4 Modelo de inducción de una respuesta inmune citotóxica mediada por los Linfocitos T CD8+.**

La concepción más aceptada (Janeway CA et al., 2005) postula que el evento inicial que conduce a la activación y diferenciación del linfocito T CD8+ virgen hacia CTL, es su migración hacia tejidos linfoides secundarios, debido a la expresión de los receptores de “homing” tisular CCR7 y CD62L, en donde se une con una célula presentadora de antígeno profesional (APC) infectada, como la célula dendrítica madura (mDC), inicialmente a través de la unión de las moléculas de adhesión LFA-1, ICAM-3 y CD2, expresadas en la membrana del linfocito T, con las moléculas de adhesión ICAM-1, ICAM-2, DC-SIGN y CD58, expresados en la membrana de la mDC (figura 4a). Esta unión, que es temporalmente breve, permite al linfocito T CD8+ rastrear la membrana celular de la mDC en busca de su complejo MHC I- péptido viral específico (pMHC). Cuando el linfocito T CD8+ une su TCR con el complejo pMHC, ocurre un cambio conformacional en LFA-1, que incrementa su afinidad por ICAM-1 y 2, estabilizando la unión entre la célula T y la mDC, induciendo un segundo proceso de interacción, esta vez entre el co-receptor CD8 y el mismo pMHC al que se unió el TCR, promoviendo una adhesión más estable y de mayor duración que tiene como consecuencia inmediata la activación por fosforilación de la quinasa p56/Lck, que unida a la porción intracitoplasmática de la cadena alfa del CD8, dispara la fosforilación de las

regiones ITAM del CD3 y del TCR, para permitir el anclaje de varias moléculas de señalización, especialmente ZAP-70, que conducen a la activación de factores de transcripción necesarios para activar al linfocito T (figura 4a).

Figura 4a y 4b.

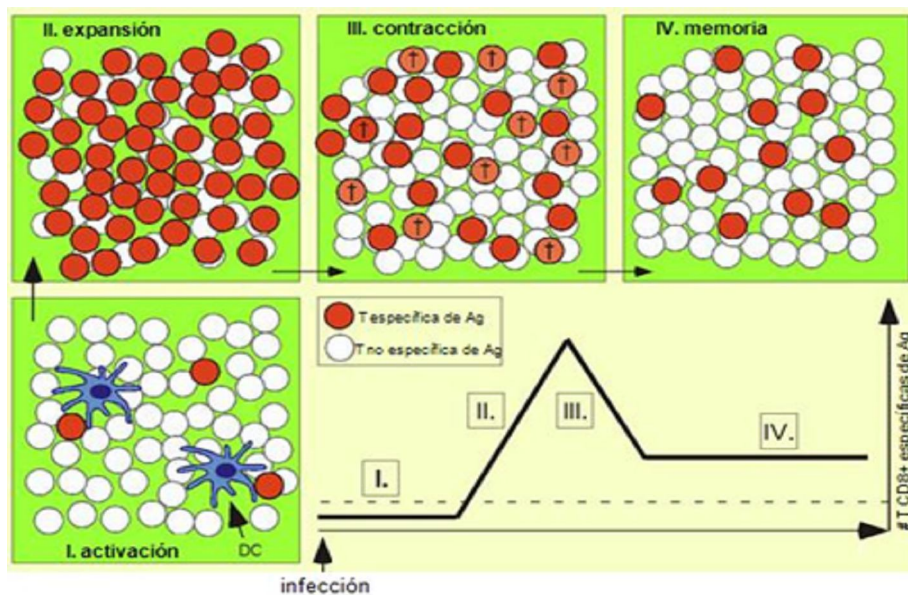


**Figura 4. Esquematación del proceso de activación del linfocito T CD8+ que conduce a su diferenciación hacia CTL. a)** Interacción entre el linfocito T CD8+ con la APC profesional a través de los receptores membranales de cada tipo celular (modificado de <http://pathmicro.med.sc.edu/bowers/mhc.htm>). **b)** A la interacción entre el TCR y el MHC ocurre la interacción entre el CD8 y el pMHC, la cual induce la activación de Lck para fosforilar y activar varias moléculas de señalización que conducen a la activación del factor de transcripción NFAT, mientras que la interacción de CD28 con sus ligandos induce la activación del factor de transcripción API1, los cuales promueven la síntesis de IL-2 (modificado de Fathman CG et al., 2007).

La segunda etapa de activación (figura 4b), la cual ocurre de forma casi concomitante a la interacción del TCR con el pMHC, mediante la interacción del receptor CD28 con sus ligandos expresados sobre la membrana de la mDC, B7.1 (CD80) y B7.2 (CD86), tiene dos efectos claramente definidos. El primero es proveer la segunda co-estimulación, la cual desencadena la activación de otra vía de señalización que induce la activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y AP-1, los cuales estimulan una elevada síntesis del ARNm de la IL-2 y de la cadena alfa del receptor para esta citocina, para generar un receptor para IL-2 de alta afinidad.

El segundo efecto, que converge con la estimulación provista por el TCR y por el co-receptor CD8, consiste en la activación del factor de transcripción NFAT, el cual induce la estabilización del ARNm de la IL-2 para permitir una elevada síntesis de IL-2. A la síntesis y secreción de IL-2 sigue una fase de intensa expansión clonal (figura 5), que ocasiona que el linfocito activado aumente su número en varios órdenes de magnitud y que comience su diferenciación, con la regulación negativa de la expresión de L-selectina y CCR7, para impedir que el linfocito activado recircule nuevamente por el ganglio linfático, concomitante con la expresión de la molécula VLA-4, que facilita la migración del linfocito T CD8+ hacia los sitios de infección e inflamación, en donde se expresa su ligando, VCAM-1.

Figura 5.



**Figura 5. Esquemización de la expansión de los linfocitos T CD8+ durante su diferenciación hacia CTL.** CTL que reconocen a su complejo pMHC viral específico (rojo) se activan (I) y despliegan una elevada proliferación clonal (II) para diferenciarse hacia CTL. Posteriormente sigue una fase de contracción (III), en la cual solo sobreviven aproximadamente el cinco por ciento de las células, las cuales prosiguen su diferenciación hacia células de memoria (IV). (Modificado de <http://www.medicine.uiowa.edu/pathology/site/faculty/badovinac/badovinac.html>).

Junto con la migración ocurre la adquisición del fenotipo efector, con la síntesis de citotoxinas, como perforina y granzima B, con la expresión del receptor FasL en la membrana celular y con la síntesis de citocinas, como interferón gamma, interferón beta

y TNF alfa. Las citotoxinas permiten al linfocito T CD8+ eliminar directamente a las células infectadas por apoptosis, en una forma específica del antígeno viral expresado en la superficie del MHC I, en tanto que FasL causa apoptosis al unirse a su ligando Fas expresado en células infectadas en una forma no específica del antígeno, mientras que las citocinas llevan a cabo diversos efectos, tanto locales como a distancia, destacando la inhibición de la replicación viral, la activación de macrófagos y la inhibición de la activación de los linfocitos B.

Posteriormente sigue una fase de contracción, en la cual se ha estimado que más del 90% los CTL que se generaron en la fase de inducción mueren por apoptosis (figura 6). Las células remanentes, las cuales aún expresan marcadores propios de célula efectora, llevan a cabo un proceso ulterior de diferenciación hacia células de memoria, mediante la reducción de la expresión de esos marcadores, en una forma que es independiente de la presencia del antígeno que las estimuló (figura 6). Los números de estas células de memoria se mantienen relativamente constantes después de esta etapa sin necesidad de estimulación antigénica, debido a un proceso de proliferación homeostática en respuesta a las IL-7 e IL-15, que se producen en la médula ósea de los huesos largos principalmente.

#### **I.4.1 Inducción alterada de CTL.**

Mediante el uso de anticuerpos monoclonales y de células modificadas genéticamente, se ha demostrado la importancia de la participación del TCR y de la co-estimulación provista por los co-receptores CD28 y CD8 en la inducción de una adecuada respuesta inmune citotóxica.

Los linfocitos T CD8+ estimulados únicamente con un anticuerpo anti-TCR proliferan ampliamente sin diferenciarse hacia CTL, pero después de varios ciclos de división celular, la mayoría de las células mueren por apoptosis, mientras que las células que sobreviven desarrollan anergia frente a la estimulación secundaria, en tanto que la estimulación simultánea del TCR y del co-receptor CD28 inducen una activación más completa, caracterizada por una mayor proliferación asociada a la secreción de IL-2 y a la síntesis de factores anti-apoptóticos, como Bcl-2. Otros estudios, por el contrario, han demostrado que los linfocitos T CD8+ se pueden diferenciar hacia CTL en ausencia

de co-estimulación mediada por CD28. Se ha señalado que la necesidad de co-estimulación parece depender de la fuerte afinidad del TCR por el complejo pMHC.

A diferencia de la participación del CD28 en la co-estimulación del linfocito T, se ha demostrado que la participación del co-receptor CD8 es determinante en la diferenciación de la célula virgen hacia CTL. La estimulación del TCR en presencia de un anticuerpo anti-CD8 inhibe la proliferación de los linfocitos T CD8+ vírgenes e impide su diferenciación hacia CTL. De forma similar, en experimentos *in vivo* usando linfocitos T mutantes que no expresan al co-receptor CD8, se demostró que los linfocitos no proliferan en condiciones de linfopenia ni desarrollan actividad citotóxica, debido a que el co-receptor CD8 estabiliza la afinidad del TCR por el pMHC. Por lo tanto, la expresión del receptor CD8 es esencial en la inducción de una respuesta inmune citotóxica, al participar en la proliferación y la diferenciación del linfocito T CD8+ hacia CTL.

### **I.5 Nef extracelular y los linfocitos T CD8+.**

Las alteraciones en la proliferación y la actividad citotóxica de los linfocitos T CD8+ durante la infección por el VIH-1 se han asociado a un defecto en el proceso de inducción. Debido a que estas células rara vez se infectan y sus números permanecen generalmente estables, se ha postulado que algunos factores inmunológicos como la anergia debida a la presentación alterada de antígenos virales, la secreción de citocinas supresoras como IL-10 y la estimulación excesiva de la célula, podrían desencadenar esas alteraciones funcionales. De igual forma, se ha sugerido que algunos factores virales solubles podrían mediar esas alteraciones, como las proteínas virales gp120, Tat y Nef, ya que son secretadas al ambiente extracelular y despliegan diversos efectos sobre células no infectadas. En particular destacamos a la proteína Nef, dada su vinculación necesaria con los determinantes del SIDA, tanto en modelos animales como en la infección en humanos y en los ensayos *in vitro*. Se ha demostrado que Nef en forma extracelular (*exNef*) se une a la membrana de los linfocitos T CD8+ activados con el mitógeno fitohemaglutinina (PHA). Además, en esas células *exNef* induce apoptosis en presencia de un anticuerpo anti-Nef. De forma interesante, un reporte demostró que la adición de *exNef* a un cultivo de PBMC indujo la reducción de la expresión del receptor CD8 en un 10% después de 32 horas de cultivo y este efecto se

exacerbó en presencia de la PHA, hasta reducir su expresión en un 69% después de 5 días de cultivo. Además, exNef redujo la expresión intracelular de ese receptor en un 20% a ese mismo tiempo (Jason J et al., 2001). Estos datos sugirieron que exNef podría afectar la inducción *in vitro* de la proliferación y la actividad citotóxica mediada por los CTL, así que decidimos analizar el papel de exNef en la funcionalidad *in vitro* de esas células, tomando en cuenta dos parámetros funcionales: proliferación y citotoxicidad, empleando para ello el ensayo estándar de proliferación y el ensayo alogénico de inducción de citotoxicidad.

## II. PREGUNTA

¿La reducción en la expresión del receptor CD8 por exNef afecta la inducción de una respuesta citotóxica mediada por los linfocitos T CD8+?

## III. HIPÓTESIS

exNef afecta la inducción de una respuesta citotóxica *in vitro* mediada por los linfocitos T CD8+.

## IV. OBJETIVOS

### *Objetivo general*

Determinar el efecto de la proteína Nef del VIH-1 en forma exógena sobre la inducción *in vitro* de una respuesta inmune citotóxica mediada por Linfocitos T CD8+.

### *Objetivos particulares*

Determinar si Nef exógena afecta

- Proliferación
- Actividad citotóxica

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### **Diseño experimental.**

Dieciocho donadores de linfocitos T CD8<sup>+</sup> y seis donadores de mDC se dividieron en 6 grupos experimentales, cada uno consistente de 3 donadores de linfocitos T CD8<sup>+</sup> y un donador mDC derivadas de monocitos de sangre periférica. Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de cada donador se separaron en dos partes. Una parte se empleó para la inducción de actividad citotóxica y la otra parte para el ensayo de proliferación.

### **Medio de cultivo y reactivos.**

Las interleucinas humanas recombinantes 2 (rIL-2) y 4 (rIL-4) y el factor estimulante de colonias de monocitos/granulocitos (GM-CSF) se adquirieron de Peprotech (Rocky Hill, NJ), el lipopolisacárido bacteriano LPS y la fitohemaglutinina PHA se adquirieron de Sigma (St Louis, MO) y la proteína Nef IIIB del VIH-1 en forma recombinante se adquirió de International Immuno-Diagnostics (Foster City, CA). El stock de Nef estaba libre de endotoxina de acuerdo al ensayo estándar de lisado de amebocitos (<0.01 endotoxina U/ml) (Cambrex Bioscience, Walkersvilles, MD).

### **Separación de monocitos y diferenciación hacia células dendríticas maduras.**

- Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aislaron de paquetes leucocitarios de donadores sanos del Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional Siglo XXI, en México, D.F., usando centrifugación por densidad en gradiente de Ficoll-Hypaque. (Cambrex Bioscience, Walkersvilles, MD).
- Las células CD14<sup>+</sup> se separaron mediante selección positiva usando separación celular magnética con un kit de aislamiento MACS (Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Alemania) (Sánchez-Torres et al., 2001) y se cultivaron en una proporción de 10<sup>6</sup> células/ml en placas de poliestireno de seis pozos (Costar Corp., Cambridge, MA) y se adicionó GM-CSF (1000 U/ml) e IL-4 (15 ng/ml) en medio RPMI-10 (medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado, 100 µg/ml de estreptomycin y 100 U/ml penicillina).



- La mitad del medio se removió y se renovó cada dos días con medio fresco que contenía IL-4 y GM-CSF. Al cuarto día de cultivo, la mitad de las células se congelaron a  $-70^{\circ}$  hasta su empleo posterior en el ensayo de citotoxicidad.
- Para generar mDC, las células remanentes se cosecharon al sexto día de cultivo y se replaqueron en una proporción de  $0.5 \times 10^6$  células/ml en medio RPMI-10 que contenía GM-CSF and IL-4 más LPS (200 ng/ml) durante 24 horas adicionales (Sánchez-Torres et al., 2001).

### **Separación de linfocitos T CD8+ e inducción de CTL.**

- Los linfocitos T CD8+ se separaron de las PBMC usando separación celular magnética con un kit de aislamiento MACS (Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Alemania) (Tenorio EP et al., 2005).
- La pureza de la suspensión de células T CD8+ fue superior al 98%, de acuerdo al análisis por citometría de flujo. Las células T CD8+ T se cocultivaron con mDC alogénicas en medio RPMI-10 en una proporción de cultivo de 10:1.
- *exNef* a una concentración de 10ng/ml o 100 ng/ml se adicionó al inicio del cocultivo. La rIL-2 (20 IU/ml) se adicionó al día 2.
- Los cocultivos se mantuvieron por 5 días a  $37^{\circ}\text{C}$  y 5%  $\text{CO}_2$  en una atmósfera humidificada.
- Los CTL se colectaron para usarlos en el ensayo de citotoxicidad.

### **Ensayo de proliferación de linfocitos T CD8+.**

El ensayo de proliferación se desarrolló según la referencia 15.

- Los linfocitos T CD8+ se ajustaron a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml en medio RPMI-10 y 100  $\mu\text{L}$ /pozo se transfirieron a placas de 96 pozos.
- Como células estimuladoras, se adicionaron a cada pozo 100  $\mu\text{L}$  de PBMC autólogas irradiadas (3000 rad) a la misma concentración.

- Las células se activaron usando 5 µg/ml de PHA-L o bien PHA-L más *exNef*.
- Después de 72 horas de cocultivo, se adicionó timidina marcada con tritio radiactivo (<sup>3</sup>H).
- Las células se cosecharon 18 horas después y la incorporación de timidina se determinó empleando un contador de centelleo líquido Betaplate (Wallac, Turku, Finlandia).
- El efecto de *exNef* se expresó como el índice de estimulación de *exNef*, de la siguiente forma: (*exNef* + PHA cpm) / PHA cpm.

### **Ensayo de citotoxicidad por liberación de <sup>51</sup>Cr.**

- Un día antes del ensayo de citotoxicidad, las mDC se incubaron toda la noche con cromato de sodio 51 estéril (<sup>51</sup>Cr) (Amersham) en medio RPMI 1640 suplementado con 100 µg/ml estreptomicina, 100 U/ml penicilina and 30% FBS inactivado por calor (Dra. Patrizia Comoli, comunicación personal).
- Las mDC se lavaron tres veces con medio RPMI-10 y se plaquearon en una proporción de 5 x 10<sup>3</sup> células/pozo en el mismo medio.
- Los CTL finalmente se adicionaron en una proporción *efector/target* de 40:1 en placas de fondo plano y se incubaron a 37° C and 5% CO<sub>2</sub> en atmósfera humidificada.
- Después de 5-6 h de cocultivo, la liberación de <sup>51</sup>Cr se determinó del sobrenadante usando el contador de centelleo líquido Betaplate. (Wallac, Turku, Finlandia).
- El porcentaje de actividad citotóxica se calculó como sigue: ((liberación experimental cpm – liberación espontánea cpm) / (liberación total cpm – liberación espontánea cpm)) x 100.
- Los cambios en los valores de actividad citotóxica relacionados a *exNef* 10 ng/ml se expresaron como índice de amplificación por *exNef*, como sigue: actividad citotóxica *exNef* 10 ng/ml / actividad citotóxica basal.

### **Análisis estadístico.**

El análisis estadístico se desarrolló empleando Graphpad Prism 3.03 (Graphpad Software, San Diego, California, USA).

- Se hizo análisis de varianza (ANOVA) para la comparación entre los grupos de la actividad citotóxica promedio. La prueba de Tukey se usó para comparar entre las medias individuales.
- El análisis de regresión no lineal se usó para examinar la asociación entre las cpm obtenidas de las células estimuladas con PHA y la actividad citotóxica basal y también para comparar entre la actividad citotóxica basal de los controles no tratados y el índice de amplificación por exNef de las células tratadas con exNef.
- Se realizó un análisis de *clusters en dos pasos* basado en el parámetro P, esto es, el producto de la actividad citotóxica basal y la proliferación de todos los donadores, usando el criterio de agrupamiento de Schwarz's Bayesian\* con el software SPSS. Se realizó la prueba de t a los dos grupos derivados de este análisis.

\* Método de análisis que consiste en la separación objetiva de dos ó más grupos de datos, basada en la obtención de la máxima probabilidad de que un grupo de datos pertenezca a dos ó más grupos diferentes.



## VI. RESULTADOS

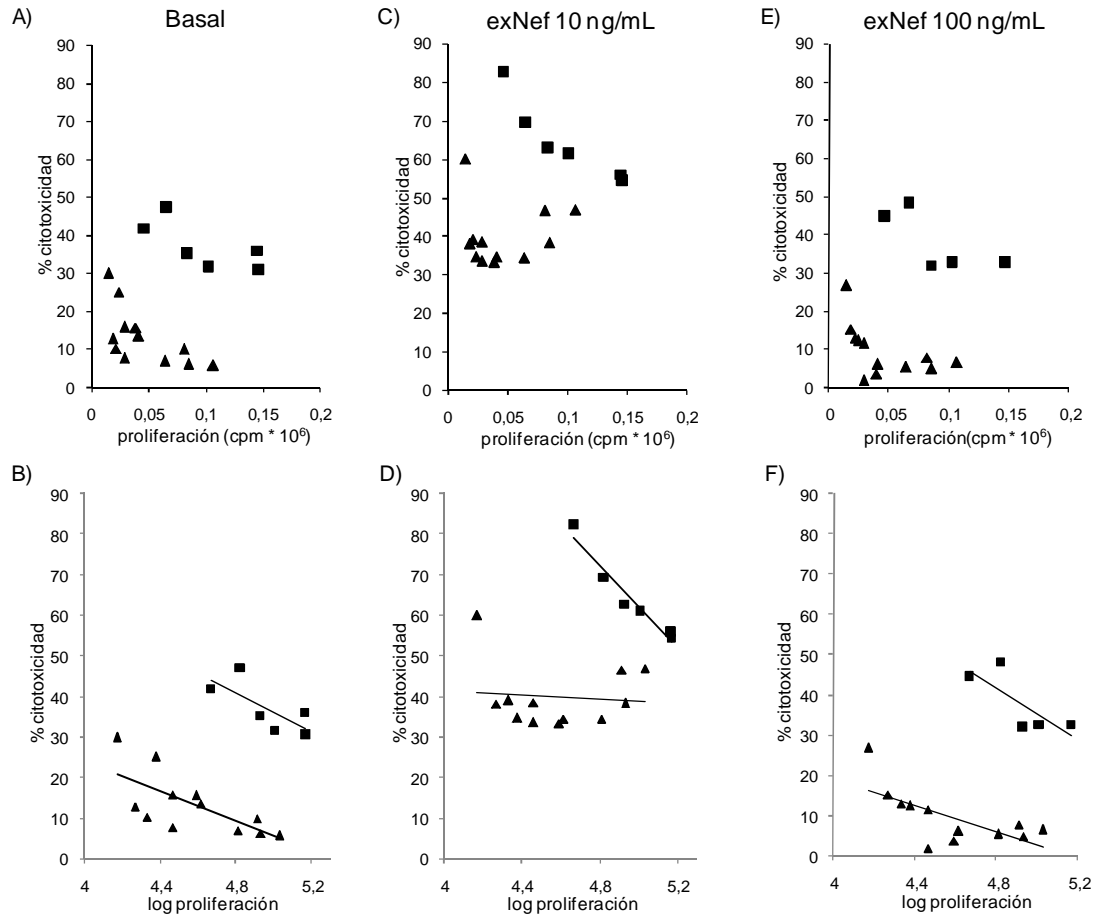
### **VI.1 Asociación entre la actividad citotóxica basal y la proliferación de linfocitos T CD8+ mediante PHA.**

La actividad citotóxica de los linfocitos T CD8+ de 18 donadores se midió después de su inducción alogénica, empleando mDC. Como puede verse en la Tabla 1, los niveles basales de actividad citotóxica en los cultivos control varió ampliamente entre los donadores, desde  $5.6\% \pm 10.6$  hasta  $46.97\% \pm 4.8$ , con una media global de  $21.11\% \pm 13.49$ . La proliferación de las células T CD8+ en respuesta a la PHA también fue muy variable entre los donadores, con un intervalo de 14,787 cpm hasta 147,091 cpm, todos los valores por encima de los valores de fondo de por al menos treinta veces. El hecho de que diferentes niveles de actividad citotóxica se obtuvieran entre y dentro de los experimentos indicó que tal variación era debida a las células de los diferentes donadores y no a las diferentes capacidades de las células estimulantes o a la manipulación técnica. Además, la gran variabilidad observada en el ensayo de proliferación estándar ilustró la heterogeneidad en la reactividad biológica de las células de los diferentes donadores. De esta forma, se asumió que los valores observados correspondían a la variabilidad natural de los linfocitos T CD8+ de cada donador. Mediante la graficación de los valores de la actividad citotóxica basal contra la proliferación estimulada por PHA, se encontraron dos grupos de respondedores. Cada uno mostró una relación inversa entre las dos variables (figura 6A y B): un grupo de “respondedores altos“, que consistía de 6 de los 18 donadores (33%), en el cual las células mostraron más altos niveles de actividad citotóxica y proliferación ( $36.98\% \pm 6.31$  y  $89280 \text{ cpm} \pm 17170$ , respectivamente). El otro grupo estaba conformado por “respondedores bajos“, en el cual se encontraron valores más bajos de ambas actividades ( $13.18\% \pm 7.57$  and  $43710 \text{ cpm} \pm 8466$ ). Las diferencias en la actividad citotóxica basal y en la proliferación por PHA entre estos dos grupos fueron muy significativas ( $p < 0.05$ ). El análisis realizado con el paquete estadístico confirmó el agrupamiento real de los datos en dos grupos significativamente diferentes ( $p < 0.0001$ ). Resultó notable que ambos grupos incluyeron datos de diferentes experimentos,



sugiriendo que el nivel de la respuesta no puede ser atribuido a las diferencias en la habilidad de inducción de las mDC usadas en los diferentes experimentos.

Figura 6.

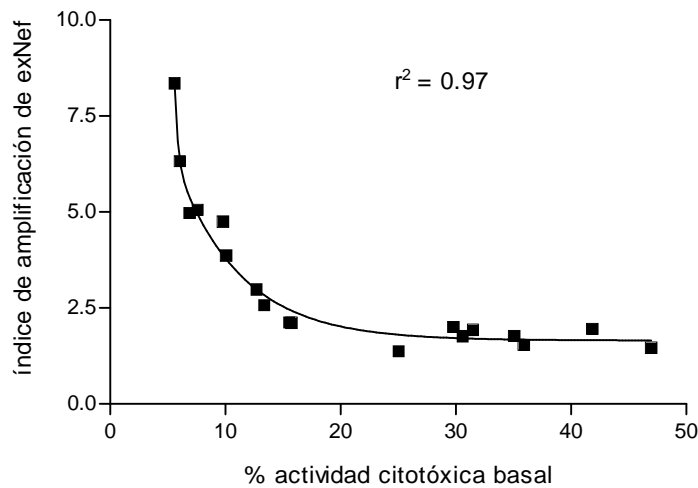


**Figura 6. Efecto de exNef sobre la inducción de actividad citotóxica de linfocitos T CD8+ humanos.** **A:** Relación entre la actividad citotóxica basal y la proliferación inducida por la PHA de linfocitos de 18 donadores. **B:** Grupos de respondedores "Altos" y "Bajos" (cuadrados y triángulos, respectivamente) se hicieron evidentes cuando el logaritmo de la proliferación se graficó. **C and D:** A 10 ng/ml, exNef amplificó la actividad citotóxica de las células de ambos grupos. **E and F:** exNef a 100 ng/ml no tuvo efecto.

## VI.2 Efecto de exNef sobre la inducción de actividad citotóxica.

Como se muestra en las figuras 6C y 6D, la inducción por mDC de la actividad citotóxica en los linfocitos T CD8+ de todos los individuos fue completamente amplificada en la presencia de 10 ng/ml of *exNef* ( $p < 0.05$ ), desde 2 hasta 9 veces más que los valores basales de actividad citotóxica. La relación entre la actividad citotóxica basal y la proliferación inducida por la PHA entre los grupos descritos anteriormente se

afectó diferencialmente por 10 ng/ml de *exNef*. Para los “respondedores altos“, la extensión de la amplificación era similar en todos los casos. (entre 1.5 a 2 veces de incremento) y no fue relacionada a la proliferación estimulada por PHA ( $p=0.62$ ). Para los “respondedores bajos“, la extensión de la amplificación por *exNef* fue más variable (desde 1.4 a 9 veces de incremento) y se correlacionó positivamente con la proliferación inducida por la PHA ( $p<0.001$ ). En la presencia de 10 ng/ml *exNef*, los niveles de actividad citotóxica entre los grupos respondedores de altos y bajos fue muy diferente ( $p<0.0001$ ). Por el contrario, no se observó efecto en la actividad citotóxica en presencia de 100 ng/ml de *exNef* ( $p>0.05$ ) (Fig. 6E y F).



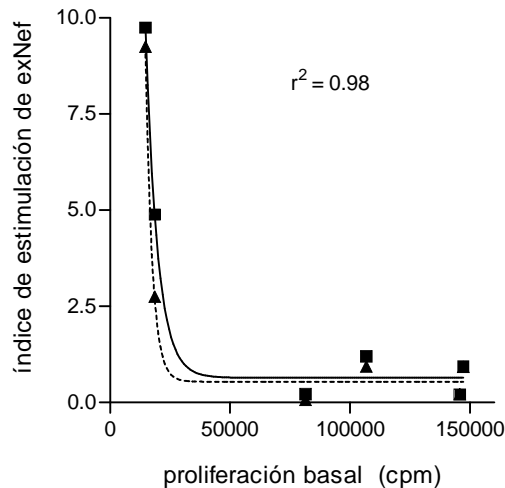
**Figura 7. Índice del efecto amplificador de *exNef* (10 ng/ml) sobre la actividad citotóxica se correlacionó inversamente con la actividad citotóxica basal.** Los valores representan el promedio de triplicados de 18 donadores.  $R^2$ , que indica bondad de ajuste, fue de 0.97.

En todos los donadores, la extensión de la amplificación citotóxica producida por 10 ng/ml de *exNef* se relacionó inversamente con los niveles basales de actividad citotóxica (Figura 7). Por lo tanto, las bajas actividades basales fueron las más amplificadas por *exNef*, mientras que las altas actividades basales fueron las menos afectadas.



### VI.3 Efecto de exNef sobre la proliferación inducida por la PHA.

En vista del marcado efecto de exNef sobre la inducción de actividad citotóxica, nos preguntamos si exNef podría afectar la proliferación de los linfocitos T CD8+. De esta forma, en los experimentos 5 y 6, el efecto de exNef se ensayó solo o en combinación con la PHA. Únicamente valores de fondo se detectaron en las células incubadas sólo con 10 ó 100 ng/ml de exNef (datos nos mostrados). Por el contrario, cuando exNef se adicionó junto con la PHA, exNef incrementó, redujo o no tuvo efecto, en una forma inversa al nivel de proliferación inducida solamente por la PHA (Tabla I, Figura 8). Tanto 10 como 100 ng/ml of exNef dieron resultados similares ( $p=0.01$  y  $p<0.05$ ) (Figura 8).



**Figura 8. Correlación inversa entre el índice de estimulación de exNef de la proliferación y la proliferación basal inducida por la PHA.** ExNef se adicionó a 10 ng/ml (cuadros, línea continua) ó 100 ng/ml (triángulos, línea punteada). Los puntos representan la proliferación promedio de triplicados de linfocitos de seis donadores. R<sup>2</sup>, que indica bondad de ajuste, fue de 0.98.

## VII. DISCUSIÓN

La infección primaria por el VIH-1 conduce a un desajuste temprano y permanente sobre la funcionalidad del sistema inmunológico, dado que después de la potente respuesta inmune antiviral inicial, se mantiene una replicación viral persistente y, aunque el número de los linfocitos T CD4+ periféricos se recupera, generalmente se estabiliza por debajo del intervalo normal (Figura 3). Conforme la enfermedad avanza, la replicación viral aumenta en asociación con la disminución de la cuenta de los linfocitos T CD4+. Este fenómeno puede invertirse mediante el tratamiento anti-retroviral específico, indicando que la muerte de los linfocitos T CD4+ y el avance de la enfermedad son consecuencias inevitables y directas de la replicación del VIH-1. Esta visión constituye el paradigma central. Estudios posteriores señalaron que la sola depleción de los linfocitos T CD4+ no podía explicar por completo la compleja red de alteraciones celulares y fisiológicas que emerge durante la infección por el VIH-1 (Edelman AS et al., 1989., Whitaker RE 1997). En particular se destacó el deterioro progresivo de poblaciones celulares y tejidos no infectados por el virus (Edelman AS 1989, Larralde C 1996) y que, además de la inmunodeficiencia asociada a la replicación viral, se manifestaban a menudo episodios de autoinmunidad muy reactiva (Calabrese LH 1988., Edelman AS et al., 1989., Talal N, 1992., Silvestris F et al., 1995., Onlamoon N 2005). Como probables factores adicionales causantes de patogenicidad se señalaron a las proteínas virales gp120, Tat y Nef, debido a que se secretan al ambiente extracelular y a que despliegan varios efectos *in vitro* e *in vivo* sobre las células no infectadas (Edelman AS et al., 1989). Además, gp120 y Nef se han detectado frecuentemente en el plasma de pacientes infectados con el VIH-1. Destacamos la importancia de exNef, dado que su expresión es determinante del SIDA (revisado en Gomez-Icazbalceta G et al., 2009) y a que en forma extracelular despliega varios efectos sobre diversas poblaciones inmunológicas y no inmunológicas.

La presente tesis constituye el estudio del efecto de exNef sobre la inducción de actividad citotóxica de linfocitos T CD8+, cuya detección coincide con la caída de la replicación viral y con la recuperación significativa del número de los linfocitos T CD4+. Para ello, empleamos la inducción de CTL por mDC alogénicas, que es un método muy eficiente y usado ampliamente para generar CTL *in vitro* humanos (Zarling AL et al., 1999., Nishioka Y et al., 2003). Encontramos que exNef a la concentración de

10 ng/ml amplificó la actividad citotóxica pero no a la concentración de 100 ng/ml. Además, exNef afectó diferencialmente la respuesta proliferativa de los linfocitos T CD8+ a la PHA. El efecto de exNef sobre la inducción de la actividad citotóxica y la proliferación fue muy dependiente de las diferentes reactividades basales entre las células de los donadores individuales. Mediante la graficación de la actividad citotóxica contra la proliferación, se obtuvo un claro arreglo de los datos individuales en dos grupos. Un grupo, que consiste de un tercio de los casos, mostró, en promedio, tres y dos veces más actividad citotóxica basal y más proliferación, respectivamente, que el otro grupo, constituido por los demás casos (figura 6A y B). Esa variabilidad no puede atribuirse a la edad o al género de los donadores, de acuerdo a la información provista por el Banco de Sangre del Centro Médico Nacional. Otros estudios han documentado la enorme variabilidad en la respuesta proliferativa a la PHA en linfocitos de individuos sanos (Murasko DM et al., 1987). Además, se ha mostrado que en respuesta a la PHA, los linfocitos tanto de donadores sanos no infectados con retrovirus como de pacientes asintomáticos que solo son portadores del HTLV-I, proliferan más que los linfocitos de pacientes infectados con el VIH-1 y que los linfocitos de pacientes co-infectados con ambos virus (Olah I et al., 2007). Así mismo, mediante análisis multivariado se encontró que los CTL de donadores sanos que contenían en su plasma anticuerpos anti-hepatitis B, CMV y EBV y elevados complejos antígeno-anticuerpo, desarrollaron mayor actividad citotóxica alogénica *in vitro* que los CTL de donadores sanos que no contenían esos anticuerpos (Tung KS et al., 1985). Por lo tanto, factores como el fondo genético y el historial inmunológico personal pueden determinar el nivel de respuesta de los linfocitos T CD8+ para un tiempo dado de medición. Tales diferencias intrínsecas podrían estar involucradas en la diversidad individual de cursos de progresión de la infección por el VIH-1 (Revisado en Hogan CM et al., 2001a y b).

El hallazgo de que la actividad citotóxica y la proliferación estuvieran inversamente relacionadas, sugiere que son dos propiedades mutuamente excluyentes o bien que dos tipos diferentes de linfocitos T CD8+ podrían estar involucrados, un tipo celular expresando actividad citotóxica y el otro tipo una respuesta proliferativa a la PHA. Estudios previos mostraron que los linfocitos expandidos *ex vivo* mediante el uso de la PHA tienen funcionalidad reducida *in vivo* en comparación con sus contrapartes no manipuladas (Bonini C et al., 1997, Duarte RF et al., 2002). En particular, Duarte et al. mostró que la expansión de los linfocitos T CD8+ mediante la PHA ocasiona que las

células muestren defectos para responder frente a la estimulación alogénica o viral. Este efecto fue asociado a la redistribución inducida por la PHA de los subpoblaciones de células T funcionales, promoviendo la desaparición casi total de células que despliegan el fenotipo citotóxico (Duarte RF et al., 2002). En este punto, una relación inversa entre la inducción de actividad citotóxica y la proliferación estimulada por PHA en linfocitos T CD8<sup>+</sup> circulantes no ha sido documentada y, por lo tanto, podría ser útil en estudios enfocados a modificar la funcionalidad *ex vivo* de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>.

El efecto bifásico de exNef sobre la amplificación de la actividad citotóxica a la baja concentración e inefectiva a la alta concentración, sugiere la participación de mecanismos muy complejos y probablemente antagónicos, entre los cuales podrían estar la interacción de diferentes receptores con distintas afinidades (Conolly RB et al, 2004), que se podrían localizar en las células T CD8<sup>+</sup>, en las mDC o en ambas. De hecho, se ha reportado que exNef afecta la funcionalidad del linfocito T CD4<sup>+</sup> a través del receptor CXCR4 (James CO et al., 2004), el cual es un importante receptor de quimiocinas que pertenece a la familia de receptores acoplados a proteínas G, con gran heterogeneidad estructural y funcional (Sloane AJ et al., 2005), que también se expresa en los linfocitos T CD8<sup>+</sup>.

Tanto 10 como 100 ng/ml de exNef afectaron de forma muy similar a la proliferación de células T CD8<sup>+</sup>. La extensión de ese efecto (el índice de estimulación de exNef) fue inversamente dependiente de la proliferación inducida por PHA, así que exNef potenció fuertemente la proliferación de las células pobremente reactivas, mientras una pequeña disminución o bien una inhibición muy notoria se produjo en células fuertemente reactivas a la PHA. Estas observaciones son congruentes con los hallazgos de que exNef se une a la superficie de células T CD8<sup>+</sup> estimuladas con PHA. La unión de exNef estimula vías de señalización intracelular causantes de apoptosis cuando se entrecruzó con un anticuerpo anti-Nef (Okada H et al., 1997). Otros reportes han mostrado que exNef indujo la proliferación de PBMC (Quaranta MG et al., 1999, Torres BA et al., 1996) e incrementó la capacidad de DC para estimular la proliferación de NK (Quaranta MG et al., 2007). Este efecto puede ser inducido mediante la estimulación con o citocinas producidas por APC o DC (Quaranta MG et al., 1999, Haraguchi S et al., 2001). exNef por si sola, a ambas concentraciones, no indujo proliferación, así que su efecto fue secundario a la activación por PHA y no debido a mitógenos contaminantes en las preparaciones de exNef usadas. Tanto los receptores participantes como los

mecanismos involucrados restan por determinarse, así como las consecuencias de estos hallazgos para la infección por el VIH-1.

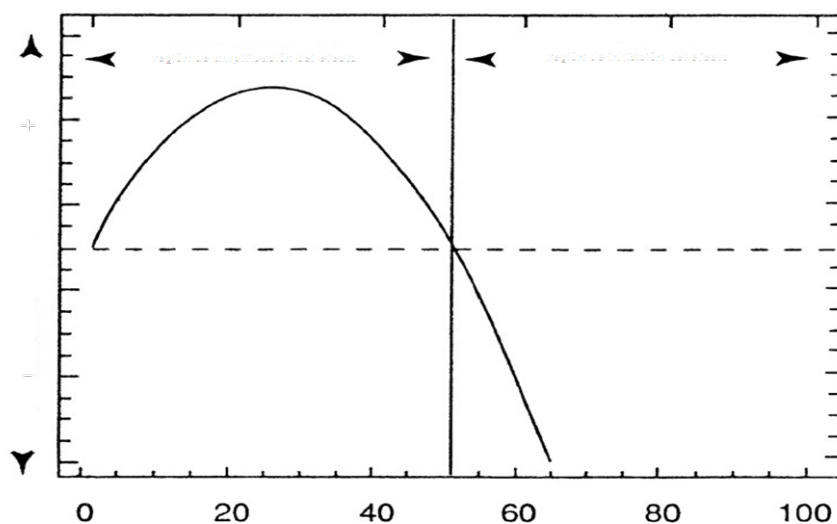
## VIII. CONCLUSIÓN

El reporte de Jason et al (2001) de que exNef reduce la expresión del receptor CD8 en los linfocitos activados con la PHA fue nuestro punto de referencia para postular que exNef puede afectar la inducción de una respuesta citotóxica, dado el papel central del receptor CD8 en la inducción de CTL. Esta hipótesis señala, tácitamente, dos consecuencias opuestas: que la reducción en la expresión del receptor CD8 puede disminuir la inducción de la respuesta por los CTL, o bien, que exNef puede exacerbar la inducción de la respuesta por los CTL, dado que la reducción en la expresión de ese receptor es necesaria para promover la activación y diferenciación del linfocito T CD8+ hacia CTL. La investigación reportada en esta tesis se acerca más, en general, a la segunda consecuencia, porque exNef a la concentración de 10 ng/ml tiene un efecto promotor de la actividad citotóxica y un efecto variable sobre la proliferación inducida por la PHA. Estos hallazgos, dado que tienen como sitio de vinculación a la activación inicial del linfocito T CD8+, enfatizan que la proteína Nef del VIH-1 en forma extracelular altera la reactividad inicial *in vitro* de un tipo celular inmunológico que normalmente no se infecta con el VIH-1, sin restricción aparente por la especificidad del antígeno, abriendo la posibilidad para considerar a exNef como participante en la citotoxicidad exacerbada mediada por los CTL, la cual ha sido postulada reiteradamente como uno de los eventos inmunopatológicos desencadenantes del SIDA (Malatzky-Goshen E et al., 1989, Zinkernagel RM et al., 1994).

## IX. APÉNDICES

### IX.1 Implicaciones biomédicas de Nef en patología y terapia.

El efecto bifásico de diferentes compuestos sobre los linfocitos T de ratón y sobre algunas líneas celulares humanas ha sido revisado ampliamente en un trabajo (Calabrese EJ 2005), en el cual se citan 75 compuestos endógenos, 133 compuestos exógenos (fármacos) y 48 compuestos tóxicos, todos los cuales despliegan efectos bifásicos, esto es, frente a concentraciones seriales crecientes de un compuesto, se observa promoción de un efecto inmunológico a las dosis más bajas e inhibición del mismo efecto a las dosis más altas o viceversa (figura 9).



**Figura 9.** Representación general de la curva de dosis-respuesta en forma de U invertida, asociada a un efecto bifásico dependiente de la concentración. (modificada de Calabrese EJ et al ., 2003).

Se asume que efectos similares tendrían lugar en los linfocitos humanos. Varios efectos bifásicos asociados a la respuesta inmune han sido plenamente confirmados, destacando dentro de ellos la proliferación inducida por la PHA, la actividad citotóxica mediada por los CTL y la inducción de actividad citotóxica por el método de reacción cruzada de linfocitos (mixed leukocyte reaction), siendo éste último método el predecesor del actual ensayo de inducción alogénica de CTL empleado aquí. Aunque en

nuestro trabajo solo usamos dos concentraciones de exNef, los resultados permiten sugerir un efecto bifásico dependiente de la concentración sobre la actividad citotóxica y la proliferación. Permiten apuntalar esta hipótesis los hallazgos de que Nef, intracelular o extracelular, tiene las propiedades de ejercer un efecto selectivo y variable sobre una subpoblación de linfocitos en particular (Otake K et al., 2000) y que tal efecto, para el caso de los linfocitos T CD4+ y T CD8+, depende de su activación previa, como en el caso de la proliferación inducida por la PHA reportado en esta tesis (Gómez-Icazbalceta et al., 2007). Además, Nef despliega diversos efectos, a menudo opuestos, sobre una misma célula blanco, en función de su concentración intracelular (Baur AS et al., 1994) y, se ha sugerido la posibilidad de que varios receptores participen de esos efectos (Gómez-Icazbalceta G et al., 2007). Estas propiedades de Nef son comunes entre las moléculas que exhiben efectos bifásicos, así que abren el escenario para considerar las posibles implicaciones biomédicas de Nef, tanto en patología como en terapia. exNef a concentraciones similares a las empleadas por nosotros inhibe la secreción *in vitro* de anticuerpos por células B (Giordani L et al., 2000), sugiriendo su utilidad para modificar la autoreactividad de esas células. Además, induce la expresión de citocinas pro-inflamatorias (Haraguchi S et al., 2001) y afecta los canales de potasio de líneas neuronales de una forma similar al veneno del alacrán (Kort JJ et al., 1998, Werner T et al., 1991). Experimentos *in vivo* han mostrado que la infección de macacos con una variante del SIV que tiene mutaciones en el gen nef induce protección contra la re-infección por el SIV de tipo patogénico. Esa protección es mediada por los CTL (Schmitz JE et al., 2005). Estos hallazgos sugieren que la atenuación de la virulencia del VIH-1 por la delección del gen nef no solo resulta en cargas virales bajas, sino que también afecta la capacidad del sistema inmunológico para generar una respuesta secundaria protectora mediada por los CTL contra la infección posterior con el SIV de tipo patogénico.



## **IX.2 exNef y Cáncer.**

### **IX.2.1 Efecto de exNef sobre el crecimiento de líneas de células tumorales humanas.**

En líneas de células tumorales humanas, exNef causa apoptosis, despertando el interés de emplear a exNef con fines terapéuticos. Se ha reportado que elevadas dosis de Nef inhiben el crecimiento tumoral *in vivo* (Bumpers HL et al., 2001).

Como extensión al proyecto original de doctorado, estudiamos el efecto de exNef en el crecimiento *in vitro* de seis líneas tumorales humanas (Figura 10). Encontramos que exNef tuvo un efecto variable sobre el crecimiento de todas las líneas de células tumorales, el cual no fue dependiente ni de la concentración de exNef ni del tiempo de cultivo. En general, exNef tuvo un efecto negativo sobre el crecimiento de las células tumorales de origen intestinal, un efecto nulo sobre las de origen cervical y efectos variables sobre las de origen cerebral.

Figura 10.

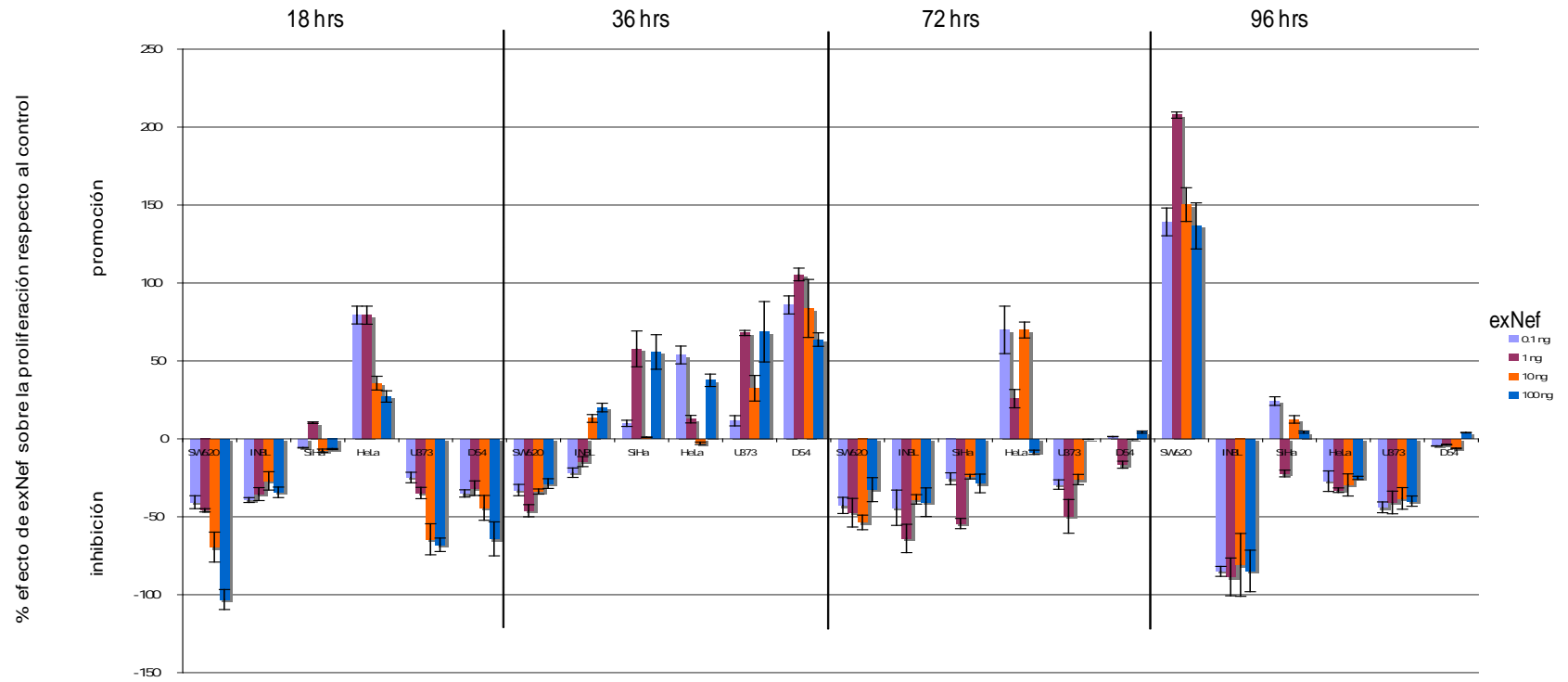


Figura 10. Efecto variable de exNef sobre la proliferación de líneas de células tumorales humanas expresado como porcentaje respecto al control (cero exNef). Cada columna representa el porcentaje promedio de tres réplicas más una desviación estándar.

### **IX.2.2 Efecto de exNef en la inducción de una respuesta inmune citotóxica mediada por PBMC contra líneas de células tumorales humanas.**

Dado que exNef afecta tanto a la inducción alogénica de actividad citotóxica mediada por CTL, como a la proliferación de células tumorales, decidimos estudiar el efecto de exNef en la inducción de una respuesta inmune alogénica antitumoral mediada por las PBMC (Figura 11). Se desarrolló un sistema de inducción alogénica de actividad citotóxica antitumoral, como se ha reportado (Bain C et al., 1996), con algunas modificaciones: no se transfectaron las células tumorales con moléculas co-estimuladoras para mejorar la inducción de actividad citotóxica ni se adicionó mitomicina C para frenar la división celular. Para evitar la saturación del pozo debido al crecimiento celular excesivo, previamente se tituló la cantidad de células tumorales necesarias para mantener el cocultivo durante 96 horas y se encontró que partiendo de  $5 \times 10^5$  células, al final de 96 horas se había alcanzado una confluencia aproximada del 80% sin desprendimiento de las células. Cada experimento consistió en el cocultivo de PBMC de tres donadores con el cocultivo de tres líneas tumorales: HeLa, que proviene de adenocarcinoma epitelial de cérvix; SW480 y SW620 que provienen de adenocarcinoma de colon primario y metastásico, respectivamente, del mismo paciente. Las PBMC se adicionaron a una proporción de 10:1. Se ensayaron tres tiempos de cocultivo de inducción, al final de los cuales se realizó el ensayo estándar de citotoxicidad. En los experimentos 1 y 2 encontramos que a 24 hrs y 48 hrs de cocultivo se indujo actividad citotóxica, aunque no en todos los pozos y en algunos casos solo se ensayó una réplica debido al bajo número de células efectoras recuperadas. El experimento 3 consistió en un cocultivo de 96 horas, dividido en dos fases: una fase de reconocimiento inicial, de 18 horas, con el objetivo de permitir la interacción entre las PBMC y las células tumorales y, una fase de estimulación de la inducción, de 78 hrs, al inicio de la cual se adicionaron LPS, que es una molécula capaz de estimular una mayor diferenciación de los CTL, exNef a 10 ng/mL y la combinación de LPS más Nef. Se obtuvo una gran variabilidad en el número de las células efectoras recuperadas al final del cocultivo de inducción, la cual no pudo atribuirse a alguno de los tratamientos. Debido a esa variabilidad y a que el elevado número de pozos impedían elegir un número de efectoras fijo para cocultivarse con las células tumorales durante el ensayo de citotoxicidad, decidimos emplear todas las células efectoras recuperadas de cada

pozo, por lo que se ensayaron varias proporciones de *effector/target* en dos tiempos: 6 horas y 12 horas. A las 12 horas no se observó algún beneficio en la actividad citotóxica, por lo que no se comentará más. Encontramos que a las 6 horas se indujo actividad citotóxica en todos los pozos, con un intervalo de 0.23% a 9.22 % (figura 11a). No se encontró una relación aparente entre la proporción *effector/target* y el porcentaje de actividad citotóxica. Se observó una tendencia positiva en las PBMC de los donadores 7 y 9 en respuesta a los tratamientos individuales con LPS y Nef para lisar al tipo celular SW480 y, en las PBMC de donador 9 en respuesta los mismos tratamientos para lisar a los tipos celulares Hela y SW620. La lisis de las células SW480 por las PBMC fue significativamente mayor que la lisis de los otros tipos celulares, la cual fue muy similar ( $p < 0.001$ ) (figura 11b).

Figura 11a.

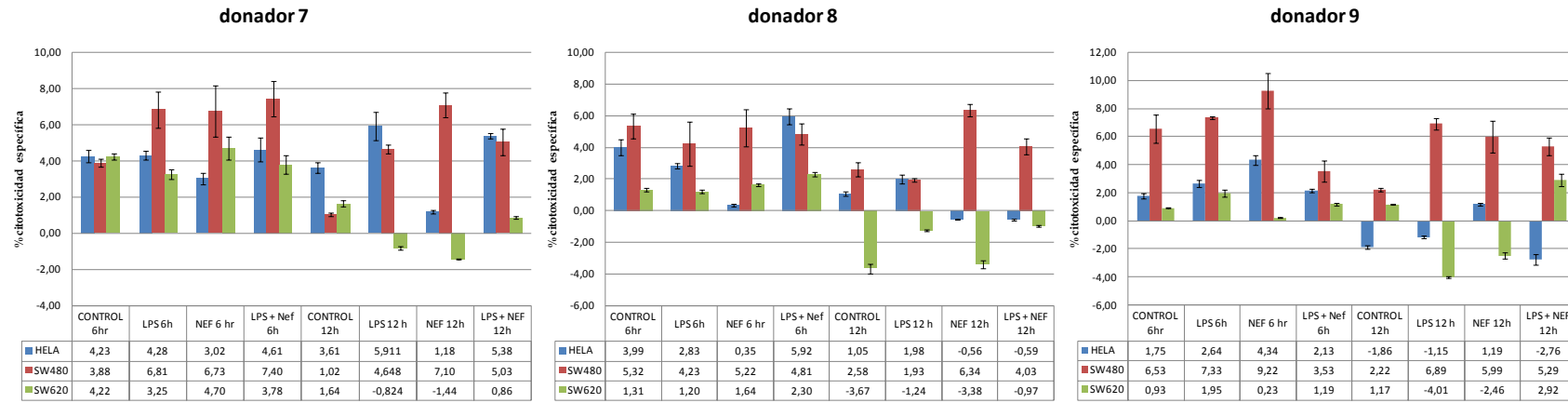
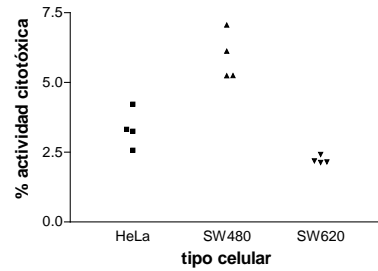


Figura 11b.



**Figura 11. a)** Efecto de los tratamientos sobre la inducción de actividad citotóxica mediada por PBMC de los donadores 7 a 9. PBMC se cocultivaron con líneas tumorales durante 18 horas, posteriormente LPS, exNef o LPS más Néf se adicionaron al cocultivo para un tiempo total de 96 horas. Cada barra representa el promedio de tres réplicas más una desviación estándar. **b)** Graficación de todos los tratamientos agrupados por líneas celulares. La actividad citotóxica contra las células SW480 fue significativamente mayor ( $p < 0.001$ )



## X. REFERENCIAS.

Azad AA. Could Nef and Vpr proteins contribute to disease progression by promoting depletion of bystander cells and prolonged survival of HIV-infected cells? *Biochem Biophys Res Commun.* 2000, 267: 677-685.

Bahraoui E, Benjouad A, Sabatier JM, Allain JP, Laurian Y, Montagnier L, Gluckman JC. Relevance of anti-nef antibody detection as an early serologic marker of human immunodeficiency virus infection. *Blood* 1990, 76: 257-264.

Bain C, Merrouche Y, Puisieux I, Duc A, Colombo MP, Favrot M. B7.1 gene transduction of human renal-cell-carcinoma cell lines restores the proliferative response and cytotoxic function of allogeneic T cells. *Int J Cancer* 1996, 67: 769-776.

Baur AS, Sawai ET, Dazin P, Fantl WJ, Cheng-Mayer C, Peterlin BM. HIV-1 Nef leads to inhibition or activation of T cells depending on its intracellular localization. *Immunity* 1994, 5: 373-384.

Betts MR, Nason MC, West SM, De Rosa SC, Migueles SA, Abraham J, Lederman MM, Benito JM, Goepfert PA, Connors M, Roederer M, Koup RA. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. *Blood* 2006, 107: 4781-4789.

Bonini C, Bordignon C. Potential and limitations of HSV-TK-transduced donor peripheral blood lymphocytes after allo-BMT. *Hematol Cell Ther.* 1997, 39: 273-274.

Bumpers HL, Huang MB, Powell M, Grizzle WE, Lillard JW Jr, Okoli J, Bond VC. Effects of HIV-1 Nef, a cytotoxic viral protein, on the growth of primary colorectal cancer. *Cancer Biol Ther.* 2005, 4:65-69.

Calabrese EJ, Baldwin LA. Hormesis: the dose-response revolution. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2003, 43: 175-197.

Calabrese EJ. Hormetic dose-response relationships in immunology: occurrence, quantitative features of the dose response, mechanistic foundations, and clinical implications. *Crit. Rev. Toxicol.* 2005, 35:89-295.

- Calabrese LH. Autoimmune manifestations of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Clin Lab Med.* 1988, 8: 269-279.
- Calenda V, Graber P, Delamarter JF, Chermann JC. Involvement of HIV nef protein in abnormal hematopoiesis in AIDS: in vitro study on bone marrow progenitor cells. *Eur J Haematol.* 1994, 52: 103-107.
- Carl S, Iafrate AJ, Lang SM, Stolte N, Stahl-Hennig C, Mätz-Rensing K, Fuchs D, Skowronski J, Kirchhoff F. Simian immunodeficiency virus containing mutations in N-terminal tyrosine residues and in the PxxP motif in Nef replicates efficiently in rhesus macaques. *J Virol.* 2000, 74: 4155-4164.
- Carl S, Greenough TC, Krumbiegel M, Greenberg M, Skowronski J, Sullivan JL, Kirchhoff F. Modulation of different human immunodeficiency virus type 1 Nef functions during progression to AIDS. *J Virol* 2001, 75: 3657-3665.
- Conolly RB, Lutz WK. Nonmonotonic dose-response relationships: mechanistic basis, kinetic modeling, and implications for risk assessment. *Toxicol Sci.* 2004, 77: 151-157.
- Crotti A, Neri F, Corti D, Ghezzi S, Heltai S, Baur A, Poli G, Santagostino E, Vicenzi E. J. Nef alleles from human immunodeficiency virus type 1-infected long-term-nonprogressor hemophiliacs with or without late disease progression are defective in enhancing virus replication and CD4 down-regulation. *Virology.* 2006, 80: 10663-10074.
- Cullen BR. Human immunodeficiency virus as a prototypic complex retrovirus. *J Virol.* 1991, 65: 1053-1056.
- Cullen BR. The role of Nef in the replication cycle of the human and simian immunodeficiency viruses. *Virology.* 1994, 205: 1-6.
- Danziger R. The social impact of HIV/AIDS in developing countries. *Soc Sci Med.* 1994, 39: 905-917.
- Deacon NJ, Tsykin A, Solomon A, Smith K, Ludford-Menting M, Hooker DJ, McPhee DA, Greenway AL, Ellett A, Chatfield C, Lawson VA, Crowe S, Maerz A, Sonza S, Learmont J, Sullivan JS, Cunningham A, Dwyer D, Dowton D, Mills J. Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients. *Science* 1995, 270: 988-991.



Dehghani H, Brown CR, Plishka R, Buckler-White A, Hirsch VM. The ITAM in Nef influences acute pathogenesis of AIDS-inducing simian immunodeficiency viruses SIVsm and SIVagm without altering kinetics or extent of viremia. *J Virol.* 2002, 76: 4379-4389.

Duarte RF, Chen FE, Lowdell MW, Potter MN, Lamana ML, Prentice HG, Madrigal JA. Functional impairment of human T-lymphocytes following PHA-induced expansion and retroviral transduction: implications for gene therapy. *Gene Ther.* 2002, 9: 1359-1368.

Dyer WB, Ogg GS, Demoitie MA, Jin X, Geczy AF, Rowland-Jones SL, McMichael AJ, Nixon DF, Sullivan JS. Strong human immunodeficiency virus (HIV)-specific cytotoxic T-lymphocyte activity in Sydney Blood Bank Cohort patients infected with nef-defective HIV type 1. *J Virol.* 1999, 73: 436-443.

Edelman AS, Zolla-Pazner S. AIDS: a syndrome of immune dysregulation, dysfunction, and deficiency. *FASEB J.* 1989, 3: 22-30.

Fathman CG, Lineberry NB. Molecular mechanisms of CD4+ T-cell anergy. *Nat Rev Immunol.* 2007, 7: 599-609.

Forshey BM, Aiken C. Disassembly of human immunodeficiency virus type 1 cores in vitro reveals association of Nef with the subviral ribonucleoprotein complex. *J Virol.* 2003, 77: 4409-4414.

Freed EO, Mouland AJ. The cell biology of HIV-1 and other retroviruses. *Retrovirology* 2006, 3: 77.

Fujii Y, Otake K, Tashiro M, Adachi A. Soluble Nef antigen of HIV-1 is cytotoxic for human CD4+ T cells. *FEBS Lett* 1996, 393: 93-96.

Gayle H. An overview of the global HIV/AIDS epidemic, with a focus on the United States. *AIDS.* 2000, 14, Suppl 2: S8-17.

Geyer M, Fackler OT, Peterlin BM. Structure--function relationships in HIV-1 Nef. *EMBO Rep.* 2001, 2: 580-585.

Gillim-Ross L, Cara A, Klotman ME. Nef expressed from human immunodeficiency virus type 1 extrachromosomal DNA downregulates CD4 on primary CD4+ T lymphocytes: implications for integrase inhibitors. *J Gen Virol*. 2005, 86: 765-771.

Giordani L, Giacomini E, Quaranta MG, Viora M. HIV-1 Nef protein inhibits the in vitro induction of a specific antibody response to *Candida albicans* by an early up-regulation of IL-15 production. *Clin Exp Immunol*. 2000, 122: 358-363.

Goedert JJ, Gallo RC. Epidemiological evidence that HTLV-III is the AIDS agent. *Eur J Epidemiol* 1985, 1: 155-159.

Gómez-Icazbalceta G, Huerta L, Soto-Ramirez LE, Larralde C. Extracellular HIV-1 Nef protein modulates lytic activity and proliferation of human CD8+ T lymphocytes. *Cell Immunol*. 2007, 250: 85-90.

Gómez-Icazbalceta G, Larralde C. Linking Nef with the immunological and virological determinants of AIDS. *Rev. Invest. Clin*. 2009, 61: 243-251.

Hanna Z, Kay DG, Rebai N, Guimond A, Jothy S, Jolicoeur P. Nef harbors a major determinant of pathogenicity for an AIDS-like disease induced by HIV-1 in transgenic mice. *Cell*. 1998, 95: 163-175.

Haraguchi S, Brigino-Buenaventura EN, Hitchcock R, James-Yarish M, Good RA, Day NK. Involvement of a herbimycin A-sensitive protein tyrosine kinase in extracellular action of HIV-1 Nef. *Immunol Lett*. 2001, 75: 97-101.

Hogan CM, Hammer SM. Host determinants in HIV infection and disease. Part 1: cellular and humoral immune responses. *Ann. Intern. Med*. 2001a, 134: 761-776.

Hogan CM, Hammer SM. Host determinants in HIV infection and disease. Part 2: genetic factors and implications for antiretroviral therapeutics. *Ann. Intern. Med*. 2001b, 134: 978-996.

James CO, Huang MB, Khan M, Garcia-Barrio M, Powell MD, Bond VC. Extracellular Nef protein targets CD4+ T cells for apoptosis by interacting with CXCR4 surface receptors. *J Virol*. 2004, 78: 3099-3109.

Janeway CA, Travers P., Walpot M., Shlomchik MJ. *Immunobiology. The immune system in health and disease*. Garland Science 2005. 6<sup>th</sup> edition. USA.

Jason J, Inge KL. Modulation of CD8 and CD3 by HIV or HIV antigens. *Scand J Immunol.* 2001, 53: 259-267.

Jay A. Levy. *El VIH y la patogénesis del SIDA.* FCE. México. 2007.

Kestler HW 3rd, Ringler DJ, Mori K, Panicali DL, Sehgal PK, Daniel MD, Desrosiers RC. Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell* 1991, 65: 651-662.

Kleinman DV. The social, economic and political impact of the global HIV/AIDS epidemic. *Oral Dis.* 1997, 3 Suppl 1: S7-12.

Kort JJ, Jalonen TO. The nef protein of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) inhibits a large-conductance potassium channel in human glial cells. *Neurosci Lett.* 1998, 251: 1-4.

Kotov A, Zhou J, Flicker P, Aiken C. Association of Nef with the human immunodeficiency virus type 1 core. *J Virol.* 1999, 73: 8824-8830.

Larralde C, Huerta L. Network between main protagonists and events leading to AIDS. *Arch Med Res.* 1996, 27: 107-113.

Leonard R, Zagury D, Desportes I, Bernard J, Zagury JF, Gallo RC. Cytopathic effect of human immunodeficiency virus in T4 cells is linked to the last stage of virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988, 85: 3570-3574.

Malatzky-Goshen E, Shoenfeld Y. AIDS and autoimmunity. *Autoimmunity* 1989, 3: 201-212.

Markham PD, Shaw GM, Salahuddin SZ, Hahn B, Sarngadharan MG, Gallo RC. Etiology of AIDS: biological and biochemical characteristics of HTLV-III. *Adv Exp Med Biol.* 1985, 187: 13-34.

Matano T, Shibata R, Siemon C, Connors M, Lane HC, Martin MA. Administration of an anti-CD8 monoclonal antibody interferes with the clearance of chimeric simian/human immunodeficiency virus during primary infections of rhesus macaques. *J Virol.* 1998, 72: 164-169.

McDougal JS, Mawle A, Cort SP, Nicholson JK, Cross GD, Scheppeler-Campbell JA, Hicks D, Sligh J. Cellular tropism of the human retrovirus HTLV-III/LAV. I. Role of T cell activation and expression of the T4 antigen. *J Immunol.* 1985, 135: 3151-3162.

Mullins JI, Hoover EA, Quackenbush SL, Donahue PR. Disease progression and viral genome variants in experimental feline leukemia virus-induced immunodeficiency syndrome. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1991, 4: 547-557.

Murasko DM, Weiner P, Kaye D. Decline in mitogen induced proliferation of lymphocytes with increasing age. *Clin Exp Immunol.* 1987, 70: 440-448.

Nishioka Y, Wen H, Mitani K, Robbins PD, Lotze MT, Sone S, Tahara H. Differential effects of IL-12 on the generation of alloreactive CTL mediated by murine and human dendritic cells: a critical role for nitric oxide. *J Leukoc Biol.* 2003, 73: 621-629.

Nisole S, Saïb A. Early steps of retrovirus replicative cycle. *Retrovirology.* 2004,1: 9.

Otake K, Fujii Y, Nakaya T, Nishino Y, Zhong Q, Fujinaga K, Kameoka M, Ohki K, Ikuta K. The carboxyl-terminal region of HIV-1 Nef protein is a cell surface domain that can interact with CD4+ T cells. *J Immunol.* 1994, 153: 5826-5837.

Ogg GS, Kostense S, Klein MR, Jurriaans S, Hamann D, McMichael AJ, Miedema F. Longitudinal phenotypic analysis of human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T lymphocytes: correlation with disease progression. *J Virol.* 1999, 73: 9153-9160.

Okada H, Takei R, Tashiro M. HIV-1Nef protein-induced apoptotic cytolysis of a broad spectrum of uninfected human blood células independently of CD95 (Fas). *FEBS Letters* 1997, 414: 603-606.

Olah I, Fukumori LM, Montanheiro P, Vergara MP, Smid J, Duarte AJ, Penalva de Oliveira AC, Csseb J. Patterns of in vitro lymphoproliferative responses among HTLV-1-infected subjects: upregulation by HTLV-1 during HIV-1 co-infection. *Scand J Immunol.* 2007, 65: 577-580.

Onlamoon N, Pattanapanyasat K, Ansari AA. Human and nonhuman primate lentiviral infection and autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci.* 2005, 1050 :397-3409.

Organización Mundial de la Salud en <http://www.who.int/hiv/en/>

Otake K, Ohta M, Minowada J, Hatama S, Takahashi E, Ikemoto A, Okuyama H, Fujii Y. Extracellular Nef of HIV-1 can target CD4 memory T population. *AIDS* 2000, 14: 1662-1664.

Piot P, Bartos M, Ghys PD, Walker N, Schwartländer B. The global impact of HIV/AIDS. *Nature* 2001, 410: 968-973.

Prost S, Le Dantec M, Augé S, Le Grand R, Derdouch S, Auregan G, Déglon N, Relouzat F, Aubertin AM, Maillere B, Dusanter-Fourt I, Kirszenbaum M. Human and simian immunodeficiency viruses deregulate early hematopoiesis through a Nef/PPARgamma/STAT5 signaling pathway in macaques. *J Clin Invest.* 2008, 118: 1765-1775.

Quaranta MG, Camponeschi B, Straface E, Malorni W, Viora M. Induction of interleukin-15 production by HIV-1 nef protein: a role in the proliferation of uninfected cells. *Exp Cell Res.* 1999, 250: 112-121.

Quaranta MG, Napolitano A, Sanchez M, Giordani L, Mattioli B, Viora M. HIV-1 Nef impairs the dynamic of DC/NK crosstalk: different outcome of CD56(dim) and CD56(bright) NK cell subsets. *FASEB J.* 2007, 10: 2323-2334.

Reiss P, de Ronde A, Lange JM, de Wolf F, Dekker J, Debouck C, Goudsmit J. Antibody response to the viral negative factor (nef) in HIV-1 infection: a correlate of levels of HIV-1 expression. *AIDS* 1989, 3: 227-333.

Reiss P, Lange JM, de Ronde A, de Wolf F, Dekker J, Debouck C, Goudsmit J. Speed of progression to AIDS and degree of antibody response to accessory gene products of HIV-1. *J Med Virol.* 1990, 30: 163-168.

Reiss P, de Wolf F, Kuiken CL, de Ronde A, Dekker J, Boucher CA, Debouck C, Lange JM, Goudsmit J. Contribution of antibody response to recombinant HIV-1 gene-encoded products nef, rev, tat, and protease in predicting development of AIDS in HIV-1-infected individuals. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 1991, 4: 165-172.

Rezza G, Titti F, Pezzotti P, Sernicola L, Lo Caputo S, Angarano G, Lazzarin A, Sinicco A, Rossi GB, Verani P. Anti-nef antibodies and other predictors of disease progression in HIV-1 seropositive injecting drug users. *J Biol Regul Homeost Agents.* 1992, 6: 15-20.

Sánchez-Torres C, García-Romo GS, Cornejo-Cortés MA, Rivas-Carvalho A, Sánchez-Schmitz G. CD16<sup>+</sup> and CD16<sup>-</sup> human blood monocyte subsets differentiate in vitro to dendritic cells with different abilities to stimulate CD4<sup>+</sup> T cells. *Int Immunol*. 2001, 12: 1571-1581.

Scherer L, Rossi JJ, Weinberg MS. Progress and prospects: RNA-based therapies for treatment of HIV infection. *Gene Ther*. 2007, 14: 1057-1064.

Schmitz JE, Johnson RP, McClure HM, Manson KH, Wyand MS, Kuroda MJ, Lifton MA, Khunkhun RS, McEvers KJ, Gillis J, Piatak M, Lifson JD, Grosschupff G, Racz P, Tenner-Racz K, Rieber EP, Kuus-Reichel K, Gelman RS, Letvin NL, Montefiori DC, Ruprecht RM, Desrosiers RC, Reimann KA. Effect of CD8<sup>+</sup> lymphocyte depletion on virus containment after simian immunodeficiency virus SIVmac251 challenge of live attenuated SIVmac239delta3-vaccinated rhesus macaques. *J Virol* 2005, 79: 8131-8141.

Silvestris F, Williams RC Jr, Dammacco F. Autoreactivity in HIV-1 infection: the role of molecular mimicry. *Clin Immunol Immunopathol*. 1995, 75: 197-205.

Sloane AJ, Raso V, Dimitrov DS, Xiao X, Deo S, Muljadi N, Restuccia D, Stevenson M, Haggerty S, Lamonica CA, Meier CM, Welch SK, Wasiak AJ: Integration is not necessary for expression of human immunodeficiency virus type 1 protein products. *J Virol* 1990, 64:2421-2425.

Talal N, Flescher E, Dang H. Are endogenous retroviruses involved in human autoimmune disease? *J Autoimmun*. 1992, 5 Suppl A: 61-66.

Tenorio EP, Saavedra R. Differential effect of sodium arsenite during the activation of human CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. *Int Immunopharmacol*. 2005, 5: 1853-1869.

Tokunaga K, Kojima A, Kurata T, Ikuta K, Akari H, Koyama AH, Kawamura M, Inubushi R, Shimano R, Adachi A. Enhancement of human immunodeficiency virus type 1 infectivity by Nef is producer cell-dependent. *J Gen Virol*. 1998, 79: 2447-2453.

Torres BA, Tanabe T, Johnson HM. Characterization of Nef-induced CD4 T cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996, 225: 54-61.

- Trillo-Pazos G, McFarlane-Abdulla E, Campbell IC, Pilkington GJ, Everall IP. Recombinant nef HIV-III<sub>B</sub> protein is toxic to human neurons in culture. Brain Res. 2000, 864: 315-326.
- Trkola A. HIV-host interactions: vital to the virus and key to its inhibition. *Curr Opin Microbiol* 2004, 7: 555-559.
- Tung KS, Koster F, Bernstein DC, Kriebel PW, Payne SM, Shearer GM. Elevated allogeneic cytotoxic T lymphocyte activity in peripheral blood leukocytes of homosexual men. *J Immunol.* 1985, 135: 3163-3171.
- Turville S, Kearney C, Broder CC, Zoellner H, Cunningham AL, Bendall L, Lynch GW. Marked structural and functional heterogeneity in CXCR4: separation of HIV-1 and SDF-1alpha responses. *Immunol Cell Biol.* 2005, 83: 129-143.
- Werner T, Ferroni S, Saermark T, Brack-Werner R, Banati RB, Mager R, Steinaa L, Kreutzberg GW, Erfle V. HIV-1 Nef protein exhibits structural and functional similarity to scorpion peptides interacting with K<sup>+</sup> channels. *AIDS* 1991, 5: 1301-1308.
- Whitaker RE. Re-assessing the virological approach to HIV pathogenesis: can it explain AIDS as an immunological disease? *J Theor Biol.* 1997, 187: 45-56.
- Wu Y. HIV-1 gene expression: lessons from provirus and non-integrated DNA. *Retrovirology* 2004, 1: 13.
- Wu Y, Marsh JW. Early transcription from nonintegrated DNA in human immunodeficiency virus infection. *J Virol* 2003, 77: 10376-10382.
- Wu Y, Marsh JW. Gene transcription in HIV infection. *Microbes Infect* 2003, 5: 1023-1027.
- Zarling AL, Johnson JG, Hoffman RW, Lee DR. Induction of primary human CD8<sup>+</sup> T lymphocyte responses in vitro using dendritic cells. *J Immunol.* 1999, 162: 5197-204.
- Zinkernagel RM, Hengartner H. *Immunol Today.* T-cell-mediated immunopathology versus direct cytolysis by virus: implications for HIV and AIDS 1994, 15: 262-268.

## Short Communication

# Human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) envelope-dependent cell–cell fusion modulation by HIV-positive sera is related to disease progression

L. Huerta,<sup>1</sup> G. Gómez-Icazbalceta,<sup>1</sup> L. Soto-Ramírez,<sup>2</sup> M. Viveros-Rogel,<sup>2</sup> R. Rodríguez,<sup>2</sup> L. Fuentes,<sup>2</sup> E. Lamoyi<sup>1</sup> and C. Larralde<sup>1</sup>

### Correspondence

C. Larralde

larralde@servidor.unam.mx

<sup>1</sup>Department of Immunology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70228, Distrito Federal, CP 04510, México

<sup>2</sup>Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Secretaría de Salud, Distrito Federal, México

Fusion of CD4<sup>+</sup> cells by HIV-1 envelope proteins (Env) is a mechanism of virus spread and cell damage. Production of antibodies able to influence cell–cell fusion *in vivo* may affect the course of the infection. The effect of sera from 49 HIV-1-positive patients was tested on an *in vitro* fusion assay using Env-expressing and normal Jurkat T cells labelled with Dil and DiO dyes, and flow cytometry for quantification of cell–cell fusion. Sera 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<sup>+</sup> T-cell count and inversely with the viral load. Removal of IgG or IgM from sera reduced or eliminated inhibition and enhancing activities, respectively. Antibodies with inhibitory activity predominate in early and intermediate stages of infection, whereas loss of inhibition or enhancement of fusion correlates with progression to AIDS.

Received 24 September 2004

Accepted 4 April 2005

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) frequently induces cell–cell fusion with syncytia formation in cultures of CD4<sup>+</sup> T cells. Syncytia formation result from the interaction between infected cells expressing the virus envelope glycoprotein (Env) on their surface and neighbouring uninfected CD4<sup>+</sup> cells (Lifson *et al.*, 1986; Sodroski *et al.*, 1986). Cell–cell fusion may have an important pathogenic role *in vivo*. HIV-1-infected giant multinucleated cells are frequently detected in the lymph nodes of asymptomatic and AIDS patients, and have been proposed as virus reservoirs (Budka 1986; Frankel *et al.*, 1996; Koenig *et al.*, 1986). Syncytium-inducing viruses (usually requiring CXCR4 as a co-receptor) associate with an increased rate of CD4<sup>+</sup> T-lymphocyte depletion in patients and progression to AIDS (Blaak *et al.*, 2000; Connor *et al.*, 1993; Miedema *et al.*, 1994). Peptides that interfere with virus–cell fusion decrease viral loads in humans (Kilby *et al.*, 1998; Lazzarin *et al.*, 2003). Furthermore, the membrane fusing ability of Env from a simian–human immunodeficiency virus chimera was determinant for CD4<sup>+</sup> T-cell depletion in macaques (Etemad-Moghadam *et al.*, 2001). Cell fusion is a significant cause of cell death *in vitro*, mainly by apoptosis triggered by aberrant initiation of mitosis (Castedo *et al.*, 2002; Ferri *et al.*, 2000; Laurent-Crawford *et al.*, 1991). The magnitude of CD4<sup>+</sup> cell–cell fusion events can be significant in lymphoid tissues, where there is close contact between cells (Amendola *et al.*, 1996). On the other hand, cell-to-cell HIV-1 transmission without formation of syncytia, likely

involving localized fusion events at cell contact points was proposed as a mechanism of transmission between individuals, and an important route of viral spread (Gupta *et al.*, 1989; Phillips, 1994; Sato *et al.*, 1992). Recently, it was shown that virus strains highly efficient in cell-to-cell transmission and with a syncytium-inducing phenotype are selected in an *in vitro* model of the rapid T-cell turnover known to occur during HIV-1 infection (Gummurulu *et al.*, 2000).

Inhibition of pathogenic cell–cell fusion processes by the host immune response could play a significant role in retarding disease progression. In principle, such inhibition would be attainable by HIV-1-specific neutralizing antibodies. However, antibodies detected by cell-free virus neutralization assays are not necessarily effective in inhibiting cell–cell fusion. Blocking HIV-1 Env-dependent cell–cell fusion often requires higher concentration of antibodies or soluble CD4 than is necessary for virus neutralization (Allaway *et al.*, 1993; McKeating *et al.*, 1996; Posner *et al.*, 1991; Trkola *et al.*, 1998; Zwick *et al.*, 2001). Furthermore, some Env-specific antibodies that effectively inhibited infection by cell-free virus did not have an effect on cell-to-cell virus transmission (Gupta *et al.*, 1989; Pantaleo *et al.*, 1995). The amount of gp120/gp41 on the cytoplasmic membrane of infected cells (Connor & Ho, 1994) and *env*-transfected cells is higher than in viral membrane. Also, close contact of the cytoplasmic membranes of cells provides a more extensive area for the establishment of a higher



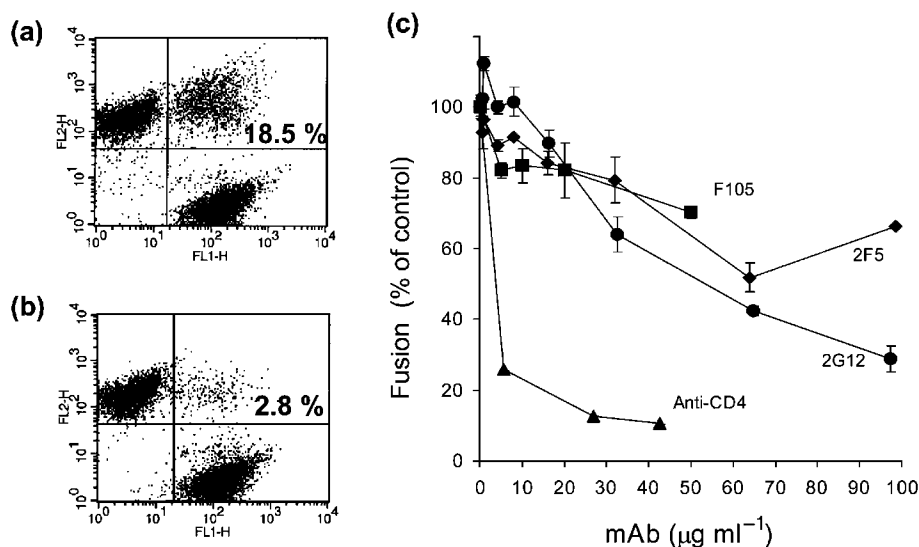
number of effective Env-receptor interactions potentiated by other membrane-associated molecules (Hioe *et al.*, 1998). As a result, cell-cell fusion may differ in quantitative and qualitative requirements from virus-cell fusion. Thus, although neutralizing antibodies can restrict infections by free virus particles, they could be less effective in the containment of cell-to-cell virus spread and cell death mediated by extensive fusion activity.

To our knowledge, the effect of sera from HIV-1-infected individuals on cell-cell fusion and its relation to disease markers has not been explored. This is necessary to get a comprehensive understanding of the potential of the humoral immune response to influence the various ways of HIV-1 spreading and cell damage. Therefore, we determined the activity of sera from HIV-1-infected subjects on Env-mediated cell-cell fusion using Jurkat cells stably transfected with a plasmid bearing the *env* gene from the HIV-1 syncytium-inducing virus HXBc2 (HXBc2 cells) and untransfected Jurkat cells as the CD4<sup>+</sup> fusion partner (Cao *et al.*, 1996). The use of cells expressing Env from a highly fusogenic prototypic clade B virus, the most prevalent clade in México and the Western world (Gudiño & Soler, 2000; WHO, 2001) allows a fair comparison between individuals affected by different virus variants.

An accurate quantification of fusion events was attained by a recently designed flow cytometry assay (Huerta *et al.*, 2002), involving the labelling of fusion partner cells with the fluorescent carbocyanines DiI and DiO (Molecular Probes). Fig. 1(a) and (b) show typical fluorescence dot plots of fusion between DiO-HXBc2 and DiI-E6 labelled Jurkat cells

after 5 h of co-culture; a 14–18% of fused double fluorescent particles was consistently obtained. Dependence of the cell-cell fusion on Env and CD4 is shown by the inhibition caused by an anti-CD4 mAb (clone RPA-T4; BD Pharmingen) and by three HIV-1 neutralizing mAbs (Fig. 1c). Fusion was potently inhibited by the anti-CD4 mAb ( $IC_{50} = 4 \mu\text{g ml}^{-1}$ ). Approximately 50% inhibition was obtained with 52 and 64  $\mu\text{g ml}^{-1}$  of 2G12 anti-gp20 and 2F5 anti-gp41 mAbs, respectively. Less than 50% inhibition was obtained with 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  of the F105 mAb. These anti-Env mAb concentrations are several to 100-fold higher than those reported to inhibit the infection of cells by HXBc2 and related strains (Posner *et al.*, 1991; McKeating *et al.*, 1996; Trkola *et al.*, 1998; Zwick *et al.*, 2001) but similar to those used by others to inhibit Env-dependent cell-cell fusion (Allaway *et al.*, 1993).

A cross-sectional study of the effect of serum from 49 HIV-1-infected subjects on the Jurkat Env-mediated fusion was subsequently performed. Sera were obtained from patients attending 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 year old), all were adults infected by sexual transmission. Only subjects not having received treatment were included in the study after written informed consent. Sera from eight healthy HIV-1-negative individuals used as controls generally caused a slight enhancement of fusion (6% mean increase) when compared with fusion assays without serum. Therefore, activity of sera from HIV-1-infected patients on cell fusion (fusion activity, FA) was defined as enhancing,

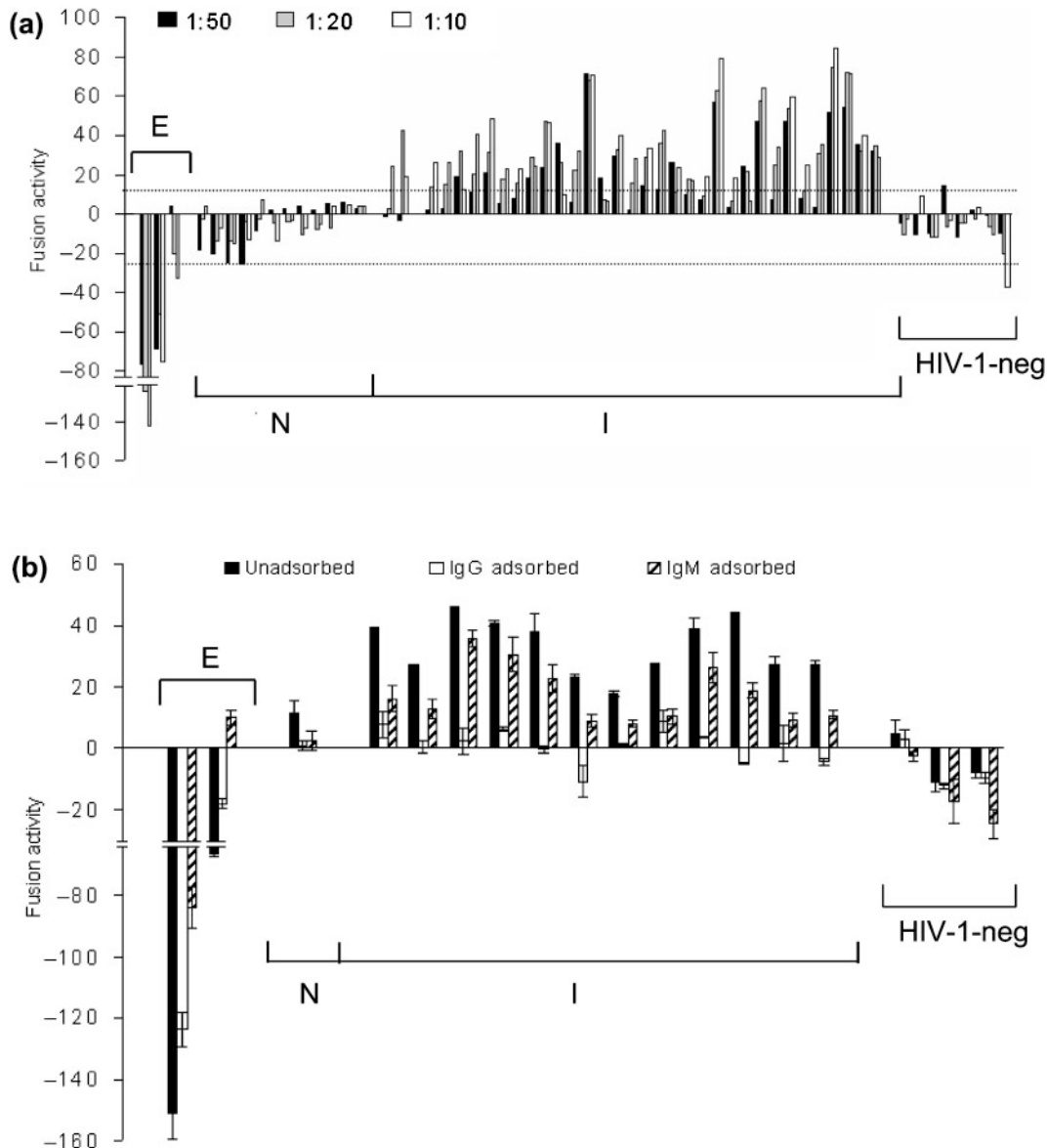


**Fig. 1.** Quantification of HIV-1-envelope dependent cell-cell fusion by flow cytometry. DiO-HXBc2 Jurkat cells were incubated with DiI-E6 Jurkat cells for 5 h in serum-free AIM-V medium (Invitrogen) in the absence (a) or presence (b) of 33  $\mu\text{g ml}^{-1}$  anti-CD4 mAb. Percentage of dual-fluorescent cells is indicated in the upper right quadrant. (c) Fusion inhibition obtained with anti-CD4, anti-gp41 (2F5) and two anti-gp120 (F105 and 2G12) mAbs. Data are expressed as percentage of fusion obtained in the absence of antibodies.

inhibiting or not effective with respect to the mean of fusion obtained with three dilutions of HIV-1-negative sera  $\pm 2$  standard deviations (SD) ( $-6.167 \pm 19.87$ ). On this basis, 34 of 49 HIV-1-positive sera (69.4%) were inhibitors, 12 (24.5%) were not effective and 3 (6.1%) were enhancers of fusion (Fig. 2a). A high correlation between results from the three dilutions tested was found ( $r^2 = 0.9394$ ,  $P < 0.00001$ ).

To evaluate the participation of IgG and IgM in the

inhibitory and enhancing FAs of the sera, immunoglobulins were removed by adsorption with protein G or anti-human IgM coupled to agarose beads (Sigma) and the FA values were estimated before and after adsorption. As shown in Fig. 2(b), adsorption of IgG completely eliminated the FA of all of 12 inhibitory sera, whereas removal of IgM reduced it partially to about 47.7%, on average. Both IgG and IgM seem to participate in the enhancing effect, since removal of each isotype reduced the activity of the two enhancing sera



**Fig. 2.** (a) Serum activity upon cell-cell fusion. Three dilutions of each serum were preincubated with DiO-HXBc2 cells for 40 min at 37 °C before the addition of Dil-E6 cells. After 5 h co-culture, cells were washed, fixed and analysed by flow cytometry. FA of each serum was calculated with respect to the fusion obtained in the absence of serum. FA is  $(1 - F_i / F_o) \times 100$ , where  $F_i$  and  $F_o$  are the percentages of fusion obtained in the presence and absence of serum, respectively. Patient sera were classified by comparison with HIV-1-negative sera as: I, inhibitors; E, enhancers; N, non-effective. Area between dotted lines represents the mean FA of eight non-infected individuals  $\pm 2$ SD. Positive values indicate inhibition of fusion, whereas negative values indicate enhancement. (b) Effect of the removal of IgG and IgM from sera.

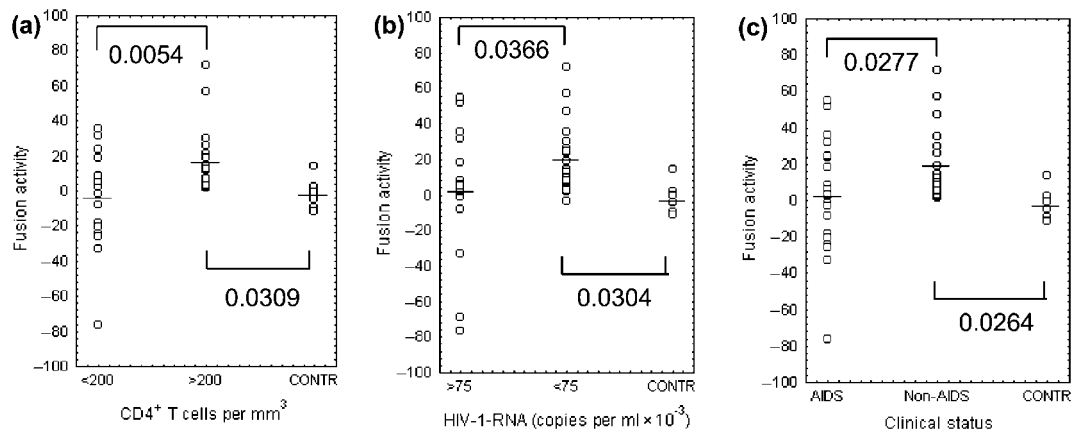
tested, although adsorption of IgM produced a greater reduction than adsorption of IgG (44 and 100%, and 19 and 73%, respectively). Thus, the FA of inhibiting sera was due mainly to IgG whereas enhancing was related to IgM. Reduction of the inhibitory effect after adsorbing IgM could result from the removal of inhibitory IgG in the form of immune complexes comprising viral particles and both HIV-1-specific IgG and IgM. Possible explanations for the differential activities of IgG and IgM would be: (i) different avidity due to antibody valence; and (ii) different target epitopes on Env protein, among others.

The effect of sera on Env-dependent cell-cell fusion is in significant correlation with the number of CD4<sup>+</sup> cells and viral load in circulation of HIV-1-infected individuals as well as with clinical progression of the disease (Fig. 3). Sera from patients with more than 200 CD4<sup>+</sup> cells per mm<sup>3</sup> inhibited fusion significantly above the sera from patients with the lower numbers of CD4<sup>+</sup> lymphocytes ( $P=0.0054$ ) (Fig. 3a). Likewise, the inhibitory activity of serum is significantly higher for patients with viral loads <75 000 HIV-1 RNA copies ml<sup>-1</sup>. Inhibitory activity significantly decreases when plasma viral load exceeded that of 75 000 RNA copies ml<sup>-1</sup> ( $P=0.0366$ ). (Fig. 3b). 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 mean FA of HIV-1-negative sera did not differ 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 FA and the CD4<sup>+</sup> cell count ( $P=0.0272$ ), and a negative correlation between FA and viral load ( $P=0.0362$ ) were found significant. The three parameters considered (CD4<sup>+</sup> T-cell count, viral load and clinical status) were available for 25 of 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<sup>-1</sup>, CD4<sup>+</sup> T-cell count >200 cells per mm<sup>3</sup> and asymptomatic or with non-AIDS related conditions) compared with that of patients with advanced disease [viral loads >75 000 RNA copies ml<sup>-1</sup>, CD4<sup>+</sup> T-cell count <200 cells per mm<sup>3</sup> and AIDS condition ( $P=0.0494$ )].

Different levels of inhibitory activity of the HIV-1-positive sera on fusion may reflect the temporal changes in the infected person's serum levels of antibodies against Env proteins, the bulk of which usually increases early in infection and decays at later times, when CD4<sup>+</sup> T cells also decrease and viral load increases (Cecilia *et al.*, 1999; Montefiori *et al.*, 1996; Ngo-Giang-Huong *et al.*, 2001; Pilgrim *et al.*, 1997; Robert-Guroff *et al.*, 1988). In the initial phases of infection, a high level of cell-fusion inhibitory activity in the sera of an HIV-1-infected individual could be interpreted as a sign of effective immune containment of disease progression. In later stages of infection, when serum levels of effective anti-Env antibodies have declined and/or the viral particles are in excess with respect to antibodies, they are sequestered by the virus and there would be no inhibition of fusion. Since this study was performed using the Env protein from a prototype HIV-1 strain, the effect of patient's serum on fusion is likely due to antibodies reacting with conserved epitopes essential for CD4 and co-receptor-gp120 interactions, and those participating in gp41 activation. However, the participation of autoantibodies specific for cellular molecules in the effect of patient's sera cannot be ruled out since a variety of autoantibodies including some directed to CD4, lymphocyte molecules and phospholipids are present in a great proportion of HIV-1-positive individuals (Asherson & Shoefeld, 2003; Muller *et al.*, 1994; Sekigawa *et al.*, 1991).

The comparison between clinical groups with respect to their sera activities on cell-fusion (Fig. 3c) provided an explanation for the results large variance (Fig. 3). The sera of



**Fig. 3.** Relationship of sera activity on fusion with CD4<sup>+</sup> lymphocyte count (a), viral load (b) and clinical status (c).  $P$  values for significant differences are shown. Clinical status was defined according to the 1993 CDC Classification System for HIV-1 infection (Castro *et al.*, 1993). Dilution of sera was 1:50.

HIV-1-positive non-AIDS 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 FAs (SD = 28.38). Enhancement of fusion was also more frequent in the higher (5 of 17, 29.4 %) than in the lower viral load group (1 of 23, 4.4 %). Thus, if there are two functional kinds of fusion-active immunoglobulins in the serum, one that inhibits cell fusion (mainly IgG) and another that enhances it (IgM), then their relative effectiveness and concentrations would determine the net degree of cell fusion along the course of the infection.

Besides the prognostic value of the quantitative cell-FA in the sera of HIV-1-infected persons, the identification of the viral or cell epitopes involved in the inhibition and enhancement of cell-cell fusion may lead to immune interventions for preventing or controlling the progression of HIV-1 disease by way of interfering with Env-mediated cell-cell fusion. The sensitive flow cytometry assay we have developed, may facilitate the regular exploration of the potential of HIV-1-infected patient's immune response to confront HIV-1 Env-mediated cell fusion.

Given the failure of neutralizing antibodies to control the established infection (Poignard *et al.*, 1999) this work emphasizes that, besides neutralizing antibodies, the effect of sera on syncytium formation should be considered for a comprehensive understanding of the role of immune factors in HIV-1 spreading and cell damage. Identification of the epitopes 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-1 infection.

## Acknowledgements

Jurkat HXBc2(4) cells (J. Sodroski), Jurkat clone E6-1 (A. Weiss), as well as mAbs F105 (M. Posner and L. Cavacini), 2G12 and 2F5 (H. Katinger) were obtained through the AIDS Research and Reference Reagent Program (AIDSRRRP), NIAD, NIH. We thank Nayali A. Balderas, Evelyn Rivera, Guadalupe Sandoval and Yadira Palacios for assistance in experiments with mAbs. G.G.-I. was recipient of a fellowship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México. This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México, grant 40413-M and by Universidad Nacional Autónoma de México, PAPIIT grant IN231303-3.

## 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., Bondurand, A., Fesus, L. & Piacentini, M. (1996). Induction of "tissue" transglutaminase in HIV pathogenesis: evidence for high rate apoptosis of CD4<sup>+</sup> T

lymphocytes and accessory cells in lymphoid tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 11057–11062.

Asherson, R. A. & Shoenfeld, V. (2003). Human immunodeficiency virus infection, antiphospholipid antibodies, and the antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol* **30**, 214–219.

Blaak, H., van't Wout, A. B., Brouwer, M., Hooibrink, B., Hovenkamp, E. & Schuitemaker, H. (2000). In vivo HIV-1 infection of CD45RA<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells is established primarily by syncytium-inducing variants and correlates with the rate of CD4<sup>+</sup> T cell decline. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 1269–1274.

Budka, H. (1986). Multinucleated giant cells in brain: a hallmark of the acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Acta Neuropathol* **69**, 253–258.

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 other authors (2002). Sequential involvement of Cdk1, mTOR and p53 in apoptosis induced by the HIV-1 envelope. *EMBO J* **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 Mortality Wkly Rep* **41**, 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.

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<sup>+</sup> T-lymphocyte decline and clinical progression in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *J Virol* **67**, 1772–1777.

Etemad-Moghadam, B., Rhone, D., Steenbeke, T. & 9 other authors (2001). Membrane-fusing capacity of the human immunodeficiency virus envelope proteins determines the efficiency of CD4<sup>+</sup> 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.

Frankel, 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.

Gudiño, J. C. & 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.

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).** Human immunodeficiency virus envelope-dependent cell-cell fusion: a quantitative fluorescence cytometric assay. *Cytometry* **47**, 100–106.
- 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 other authors (1986).** Detection of AIDS virus in macrophages in brain tissue from AIDS patients with encephalopathy. *Science* **233**, 1089–1093.
- 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**, 2186–2219.
- 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.
- McKeating, J. A., Zhang, Y. J., Arnold, C., Frederiksson, R., Fenyo, E.-M. & Balfe, 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. & 11 other authors (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, J. T., Zhou, J. Y., Biliska, 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., Schneeweis, 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 1 response and prognostic marker of long-term nonprogression. *AIDS Res Hum Retroviruses* **17**, 1435–1446.
- 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., Zhou, J. T., 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.
- Poignard, P., Sabbe, R., Picchio, G. R., Wang, M., Gulizia, R. J., Katinger, H., Parren, P. W. H. I., Mosier, D. E. & Burton, D. R. (1999).** Neutralizing antibodies have limited effects on the control of established HIV-1 infection in vivo. *Immunity* **10**, 431–438.
- 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 Immunol* **146**, 4325–4332.
- Robert-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, M. (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., Campbell, K. & Haseltine, W. A. (1986).** Role of the HTLV-III/LAV envelope in syncytium formation and cytopathicity. *Nature* **322**, 470–474.
- Trkola, A., Ketas, T., Kewalramani, V. N., Endorf, F., Binley, J. M. & Katinger, H. (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.
- WHO (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. World Health Organization.
- Zwick, M. B., Wang, M., Poignard, P., Stiegler, G., Katinger, H., Burton, D. R. & Parren, P. W. (2001).** Neutralization synergy of human immunodeficiency virus type 1 primary isolates by cocktails of broadly neutralizing antibodies. *J Virol* **75**, 12198–12208.

# HIV-Envelope–Dependent Cell-Cell Fusion: Quantitative Studies

Leonor Huerta<sup>1,\*</sup>, Nayali López-Balderas<sup>1</sup>, Evelyn Rivera-Toledo<sup>1</sup>,  
Guadalupe Sandoval<sup>1</sup>, Guillermo Gómez-Icazbalceta<sup>1</sup>, Carlos Villarreal<sup>2</sup>,  
Edmundo Lamoyi<sup>1</sup>, and Carlos Larralde<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Distrito Federal, CP 04510, México;*

<sup>2</sup>*Departamento de Física Teórica, Instituto de Física, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Distrito Federal, CP 04510, México*

**E-mail:** [leonorhh@biomedicas.unam.mx](mailto:leonorhh@biomedicas.unam.mx), [nayalialb@yahoo.com.mx](mailto:nayalialb@yahoo.com.mx); [evelyn\\_rt@yahoo.com.mx](mailto:evelyn_rt@yahoo.com.mx); [yaxha00@yahoo.es](mailto:yaxha00@yahoo.es); [gqiczbalceta@gmail.com](mailto:gqiczbalceta@gmail.com); [carlos@fisica.unam.mx](mailto:carlos@fisica.unam.mx); [lamoyi@biomedicas.unam.mx](mailto:lamoyi@biomedicas.unam.mx); [clarralde@prodigy.net.mx](mailto:clarralde@prodigy.net.mx)

Received April 27, 2009; Accepted July 12, 2009; Published August 11, 2009

**Interaction *in vitro* between cells infected with human immunodeficiency virus (HIV) and surrounding, uninfected, target cells often leads to cell fusion and the formation of multinucleated cells, called syncytia. The presence in HIV-infected individuals of virus strains able to induce syncytia in cultures of T cells is associated with disease progression and AIDS. Even in the asymptomatic stage of infection, multinucleated cells have been observed in different organs, indicating that fused cells may be generated and remain viable in the tissues of patients. We used lymphocytic cells transfected for the expression of the HIV-envelope (Env) glycoproteins to develop a method for the direct quantification of fusion events by flow cytometry (Huerta et al., 2006, *J. Virol. Methods* 138, 17–23; López-Balderas et al., 2007, *Virus Res.* 123, 138–146). The method involves the staining of fusion partners with lipophilic probes and the use of fluorescence resonance energy transfer (FRET) to distinguish between fused and aggregated cells. We have shown that such a flow-cytometry assay is appropriate for the screening of compounds that have the potential to modulate HIV-Env–mediated cell fusion. Even those syncytia that are small or few in numbers can be detected. Quantitative analysis of the fusion products was performed with this technique; the results indicated that the time of reaction and initial proportion of fusion partners determine the number, relative size, and average cellular composition of syncytia. Heterogeneity of syncytia generated by HIV-Env–mediated cell-cell fusion may result in a variety of possible outcomes that, in turn, may influence the biological properties of the syncytia and surrounding cells, as well as replication of virus. Given the myriad immune abnormalities leading to AIDS, the full understanding of the extent, diverse composition, and role of fused cells in the pathogenesis of, and immune response to, HIV infection is an important, pending issue.**

**KEYWORDS:** cell-cell fusion, HIV, syncytia, syncytium-inducing virus, flow cytometry, Env, cell aggregation, FRET

## CELL-CELL FUSION IN HIV INFECTION

Cell-cell fusion is a form of cell organization that occurs in physiological and pathological conditions, such as the formation of muscle[1] and placenta[2], development in metazoa[3], organ repair by stem cells[4,5,6,7], and malignant transformation[8,9,10]. Fusion of cells of the immune system is induced in several different infections and in noninfectious reactions to tissue injury[11,12]. This intimate association between cells from the same, or different, lineages (forming syncytia or heterokaryons, respectively) may result in a highly functional synchronization and an optimal efficiency in order to accomplish complex tasks, and may involve a major cellular reprogramming, resulting in an altered phenotype[8,13,14,15]. Thus, the properties of fused cells usually differ significantly from those of parental cells. An excellent review by Ogle et al.[10] describes the general biological implications of cell-cell fusion.

A variety of enveloped viruses, including the human immunodeficiency virus (HIV), harbor “spikes” composed of glycoproteins that interact with receptors on target cells, thus inducing virus-cell fusion. Infected cells synthesize and then expose the viral fusion proteins on their membranes, thereby conferring the infected cells with the ability to fuse with uninfected cells. Included among the viruses that induce cell-cell fusion are many viruses that are associated with human diseases, such as the Herpesviridae (herpes viruses, cytomegalovirus, varicella zoster, Epstein-Barr virus), Paramyxoviridae (measles, mumps, syncytial respiratory virus), and Retroviridae (VIH, HTLV) families. The ability of viruses to induce syncytia is generally assumed to be indicative of the viruses being transmitted through a cell-to-cell pathway, without exposure to the extracellular milieu, thus allowing virus to spread rapidly and to evade the immune response of the host[16]. However, the extent and consequences of syncytia formation during infection by these viruses are still poorly understood. Table 1 shows examples of specific pathogenic processes in viral infections with which syncytia formation has been associated. Given the relationship between several fusogenic viruses and cancer, Duelli and Lazebnik have considered the intriguing possibility that cell transformation arises from the combination of oncogene activity and chromosomal instability induced by cell-cell fusion[9].

Cell adhesion molecules[33,34,35,36] and fusion proteins[37,38] are used by viruses to overcome the electrostatic barrier formed by the negatively charged surface of cell membranes. Cell fusion requires the close apposition of the surface membranes of cells, the induction of lipid perturbations, and the formation of fusion pores that eventually expand and lead to complete cell-cell fusion[39]. During HIV infection, virus-membrane fusion is accomplished by the HIV-envelope (Env) macromolecular complex, composed of heterotrimers of the gp120 and gp41 glycoproteins. Fusion requires a sequence of complex conformational changes that involve the specific interaction of Env with the CD4 molecule and a coreceptor of the chemokine receptor family[40,41,42]. HIV-Env-mediated cell-cell fusion is induced by a mechanism analogous to that of the virus-cell fusion process[43,44,45].

In contrast to the advances in the understanding of the molecular processes of HIV-induced membrane fusion, the factors involved in the cell-cell fusion and the biological role of fused cells in HIV infection has not been well studied. In early investigations, syncytia formation was described as a form of cytopathic effect occurring when mononuclear cells from HIV-infected individuals were cocultured with uninfected T CD4<sup>+</sup> cells[43,44,45]. Later reports consistently showed that detection of virus with the ability to induce syncytia in cultures of T lymphocytes correlates with an increased rate of depletion of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes and with progression to AIDS[46,47,48,49]. Multinucleated cells supporting virus replication were detected in different tissues, such as brain and lymphoid organs, of HIV-infected individuals, even when these patients were in the asymptomatic stage of the disease[50,51,52,53,54,55]. That syncytia may originate from the fusion of monocytes, lymphocytes, and/or dendritic cells has been evidenced by both the anatomical location and the phenotypic markers of the multinucleated cells[52,54,56]. Because death of syncytia by apoptosis is commonly observed in cocultures of infected and uninfected cells[57,58,59], cell-cell fusion is mainly considered to be a potential mechanism underlying CD4<sup>+</sup> T-cell depletion. Other reports argue that syncytia may function as viral reservoirs. Env-dependent cell fusion also has been implicated in the transfer of virus from infected cells to target cells through intercellular contacts, a form of infection that can be more efficient than infection by cell-free virus

**TABLE 1**  
**Some Events Associated with Syncytia Formation in Pathogenic Viral Infections**

Virus	Cell/Tissue	Observations	Ref.
Human herpes virus 6	Hepatocytes	Infection induces giant cells that express viral antigens and induce the so-called syncytial giant-cell hepatitis.	[17]
Cytomegalovirus	Many tissues	Cell-cell fusion is a key mediator of viral spread. <sup>a</sup>	[18]
Respiratory syncytial virus (RSV)	Respiratory tract	Cell-cell fusion favors virus spread	[19]
	Epithelial cells	Low fusogenicity associates with persistence of RSV <i>in vitro</i> .	[20]
Measles virus (MV)	Epithelial cells of the respiratory tract	Virus spread from epithelial cells to underlying tissues occurs through cell fusion. <sup>b</sup>	[21]
	Epithelial and dendritic cells (DC)	Beta interferon (IFN- $\beta$ ) production is amplified <i>in vitro</i> by virus-induced multinucleated giant cells derived from human epithelial cells or mature dendritic cells.	[22]
	DC and T lymphocytes	The interaction of MV-infected DC with T cells induces polykaryon formation and MV massive replication.	[23]
	Tracheobronchial lymph nodes and thymus	Live attenuated Edmonston strain induces large syncytia showing macrophage and DC surface markers in mice defective for the alpha/beta interferon receptor and expressing human CD46. <sup>c</sup>	[24]
Parainfluenza	Respiratory mucosal epithelial cells and diverse organs	Severe lung injury associated to highly reactive bronchial epithelial tissue containing multinucleated giant cells in patients with severe combined immunodeficiency (SCID). <sup>d</sup>	[25]
	Blood vessels	Antibodies directed against type 1 virus were shown in 40% of the cases vs. 20% of controls in giant-cell arteritis and polymyalgia rheumatica patients.	[26,27]
Murine leukemia virus (TR1.3 strain)	Endothelial capillary brain cells (ECBC)	Hemorrhagic disease with major brain damage associated to virus-induced syncytia. <sup>e</sup>	[28]
Epstein-Barr virus (EBV)	Lymphoid tissue DC	A clinicopathological study of 16 aggressive tumors containing EBV-positive Hodgkin and Reed-Sternberg-like giant cells.	[29]
Human papilloma virus 16	Cervical epithelial cells	E5 viral protein induces binucleated cells by cell-cell fusion <i>in vitro</i> . Coexpression of E5 with E6/E7 viral oncogenes enhances proliferation of fused cells. <sup>f</sup>	[30]
Varicella zoster virus	Epidermis	Induction of cytopathic effect through syncytia induced by cell-cell fusion.	[31]
	Human dorsal root ganglion	Virus-induced cell-cell fusion and polykaryon formation between neurons and infected satellite cells during virus replication <i>in vivo</i> . Virus entry into neuronal cell bodies is necessary for its transfer to skin during herpes zoster.	[32]

<sup>a</sup> This hypothesis is supported by the finding that, in spite of intense viral replication, free virus is rarely found in blood.

<sup>b</sup> Preventing virus-induced cell fusion abrogated the subepithelial spread of the virus *in vivo*.

<sup>c</sup> It is suggested that dissemination of MV in the initial stages of infection may occur by fusion of MV-infected monocytic cells with other cells.

<sup>d</sup> Syncytia were also detected in spleen, thymus, adrenal medulla, and urinary tract, among others tissues.

<sup>e</sup> Brain damage was associated exclusively with syncytia formation by ECBC cells.

<sup>f</sup> An interplay between E5, E6, and E7 proteins for the induction of carcinogenesis is suggested.



particles[60,61,62,63]. Other effects of syncytia formation, such as reduction in the rate of virus replication or promotion of recombination between virus strains, are also possible[64]. Table 2 contains a list of possible consequences of HIV-Env-dependent cell-cell fusion.

**TABLE 2**  
**Possible Consequences of HIV-Induced Syncytia Formation**

Consequence	Ref.
Cell death <i>in vitro</i>	[50,57,65,66]
T-cell depletion in blood	[44,67,68]
Spread by cell-to-cell transfer of virus at local fusion points	[61,63,69,70,71,72,73,74]
Reservoirs of replicating virus	[52,55,56,75,76,77]
Recombination of viruses from different strains	[64]
Enhancement of virus replication	[52,78]
Cell phenotype modification	N.f.
Survival of infected cells by fusion with healthy cells	N.f.
Reduction of number of cells in the microenvironment	N.f.
Reduction of virus replication	N.f.
Tissue injury by production of cytokines	N.f.

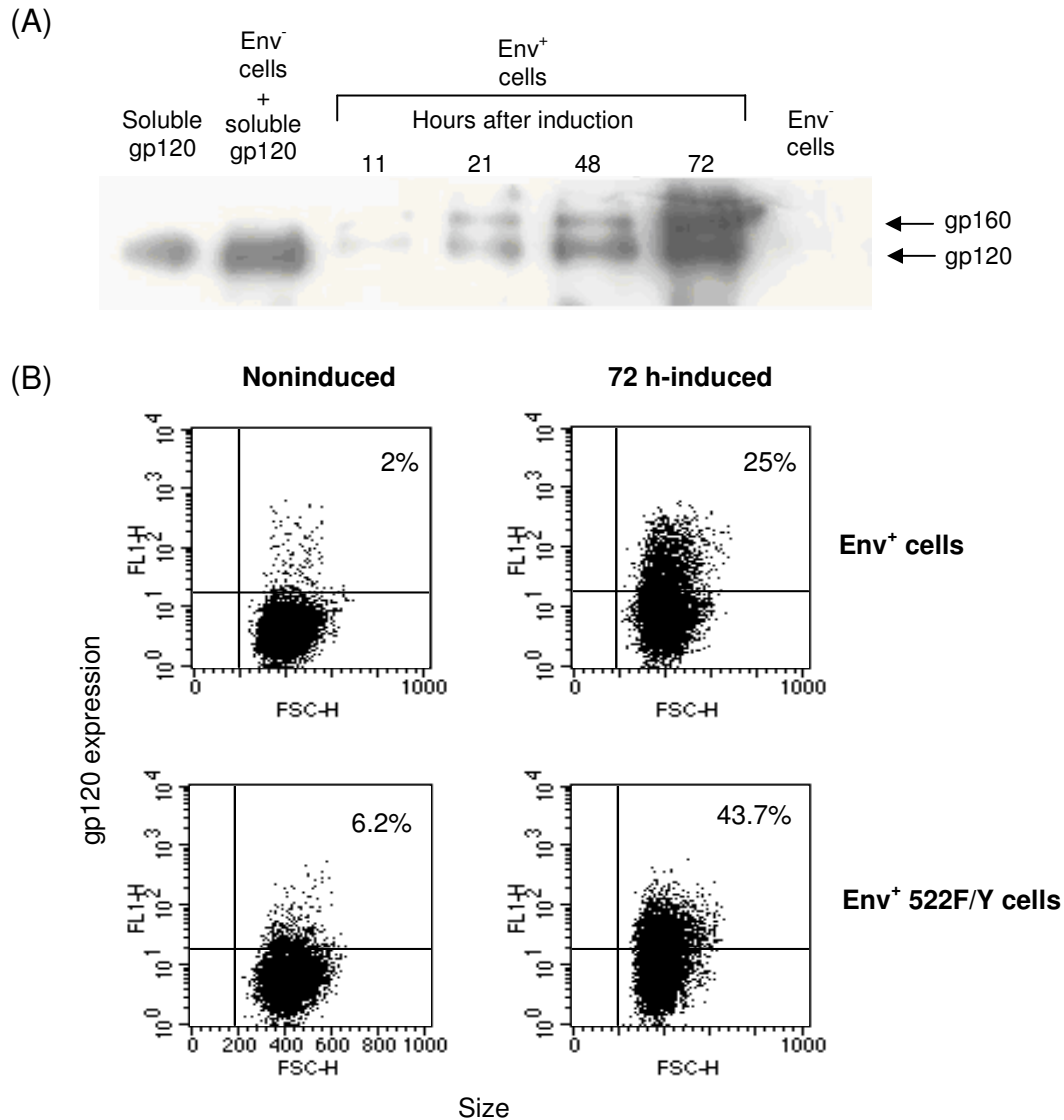
Note: N.f., not found.

The extent of Env-mediated cell-cell fusion may be important in lymphoid organs, where the high cellular density favors close contact between cells. That infected cells may constitute a major source of infectious particles in HIV infection[23] emphasizes the necessity of a fuller understanding of the consequences of cell-cell fusion in the immune system. Such understanding would aid in approaches to the challenge of inhibiting the different forms of viral spreading and virus-induced cell damage.

## A METHOD FOR THE STUDY OF CELL-CELL FUSION BASED ON FLOW CYTOMETRY AND FLUORESCENCE RESONANCE ENERGY TRANSFER (FRET)

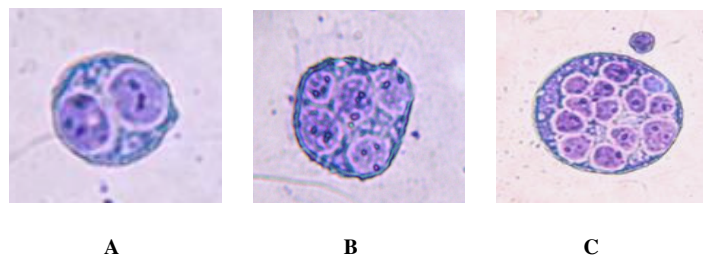
Cells transfected with the HIV *env* gene are a convenient system for the study of the mechanisms of HIV-induced membrane fusion and syncytia formation. In such cells, the gp160 precursor protein is synthesized, processed, and glycosylated, thus producing the mature gp120 and gp41 molecules that are then transported to the cell membrane and exposed to the extracellular milieu[79]. Stably transfected lymphocyte cell lines generated by Cao et al.[80] contain the *env* gene under the control of a tetracycline-inducible expression system, so that the synthesis of Env is repressed in the presence of tetracycline and is induced by the removal of the antibiotic from the medium (Env<sup>+</sup> cells). A second cell line (522F/Y cells) expresses a mutant, nonfusogenic Env protein[80] (Fig. 1). A few hours after Env<sup>+</sup> cells fused *in vitro* with target cells expressing the CD4 molecule and the proper coreceptor, a variety of fusion products can be detected (Fig. 2). Thus, because these cells provided an appropriate system for the study of HIV-Env syncytia formation, they were used in the experiments described in this article.

Usually, syncytia are counted by microscopy techniques or by the expression of reporter genes in the entire cell population[81,82,83]. We devised an approach for the quantitative study of HIV-Env-mediated cell-cell fusion, the aim of which was to integrate the study of the quantitative parameters (number and diversity of syncytia) of fusion with functional considerations and with cell-population dynamics during fusion[84,84a]. Our experimental approach was based on the staining of each of the fusion partners with one

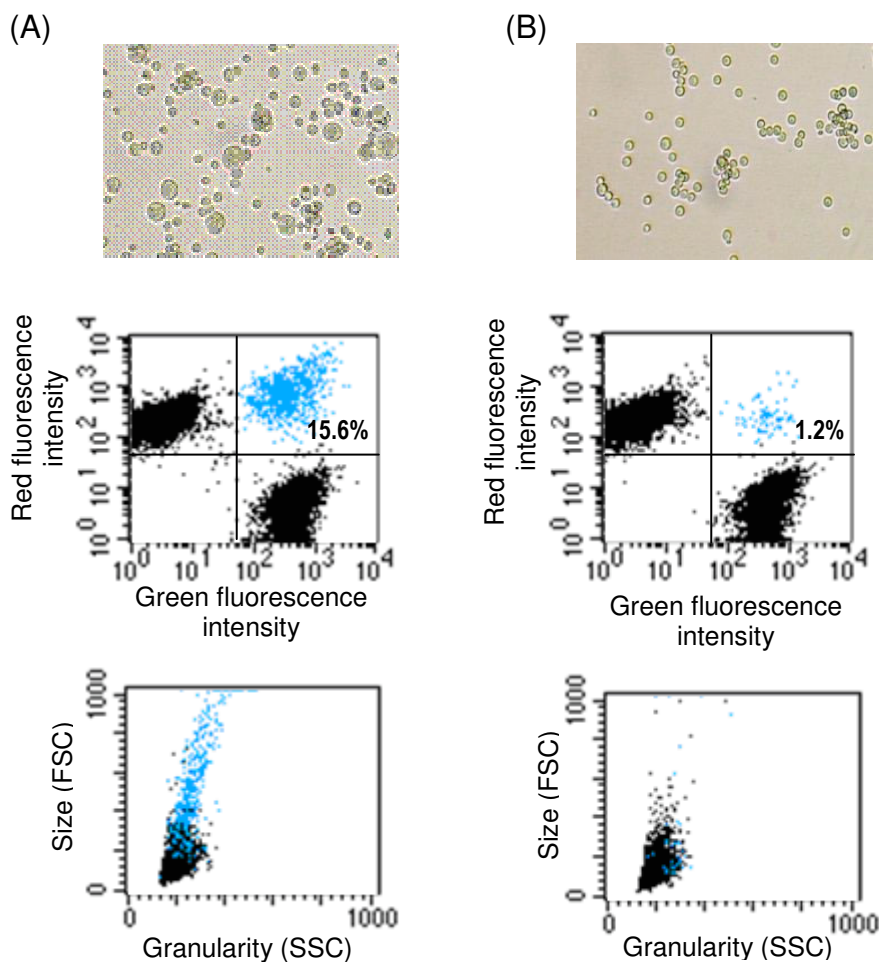


**FIGURE 1.** Tetracycline-inducible expression of HIV-Env proteins in Jurkat cells. Expression of the HIV-Env protein in transfected Jurkat cells was repressed when tetracycline was present in the culture medium (noninduced cells) and induced after its removal (induced cells). A time-dependent accumulation of envelope proteins in the induced cells was detected (A) by Western blot analysis of the immunoprecipitation products of cell extracts and (B) by flow cytometry on whole cells, using a rabbit anti-gp120 polyclonal antibody. In the Western blot, immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE (7% gel) and transferred to a nitrocellulose membrane. After incubation with the anti-gp120 antibody and a second antibody coupled to horseradish peroxidase, the blot was then treated with a chemiluminescent peroxidase substrate. For the flow cytometry, a second antibody coupled to fluorescein isothiocyanate was used.

of the lipophilic fluorescent dyes, DiI (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate) and DiO (3,3'-dioctadecyloxycarbocyanine perchlorate), which produce red and green fluorescence when excited by a 488 laser beam, respectively[83]. CD4<sup>+</sup> cells were stained with DiI and Env<sup>+</sup> cells were stained with DiO. After coculture, the syncytia and those cells that did not fuse were quantified by flow cytometry as double- and single-colored particles, respectively. The relative morphological pattern of double- and single-fluorescent populations can be visualized in dot plots of the forward scatter signal (FSC-H) vs. the side scatter signal (SSC-H). These signals are a measure of the relative size and granularity of the cell populations, respectively. These plots evidenced the high heterogeneity of the fusion products (Fig. 3).



**FIGURE 2.** Heterogeneity of syncytia generated *in vitro* by the fusion of Env<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> Jurkat cells in 5-h cocultures. (A) Binucleated cell; (B) five-nuclei cell; (C) multinucleated cell. Cells were stained with Giemsa.

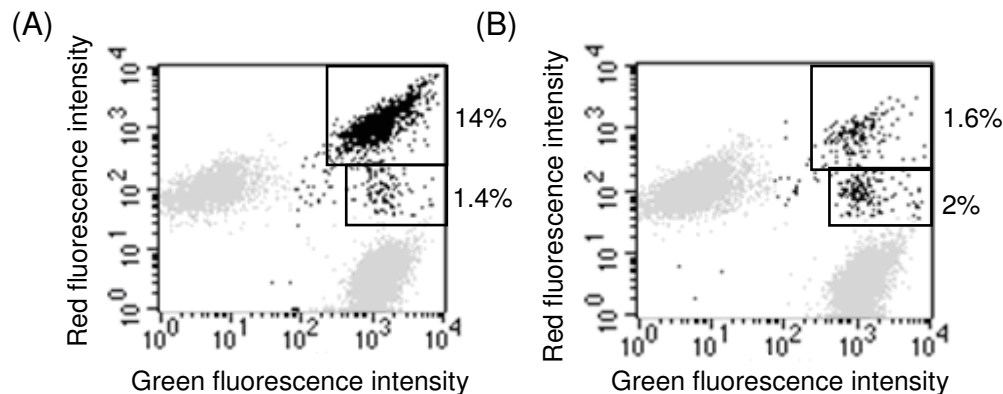


**FIGURE 3.** Microscopy view and flow cytometry analysis of syncytia formation in cocultures. Before coculture, Env<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> cells were labeled with DiO and DiI, respectively. The cocultures of CD4<sup>+</sup> Jurkat cells either (A) with Env<sup>+</sup> fusogenic cells or (B) with Env<sup>+</sup> nonfusogenic cells (522F/Y) were viewed by light microscopy (10×) and analyzed by flow cytometry. The fluorescence and morphological patterns of cells after syncytia formation is shown in dot plots (FL1-H vs. FL2-H and FSC-H vs. SSC-H, respectively). Double-fluorescent particles are shown in blue and their percentage in the coculture is indicated.

Interaction between the two lipophilic dyes causes the DiI-red fluorescence to be enhanced due to FRET from DiO to DiI. This interaction is favored by the close proximity of the dyes in the fused cell membranes[85] and by the extensive overlap of the DiO-emission and DiI-absorption spectra (<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/brands/Molecular-Probes.html>). Here, double-fluorescent particles exhibited an enhancement of the DiI-red fluorescence, relative to that of nonfused DiI-stained CD4<sup>+</sup> cells (Fig. 3). Labeling of one of the fusion partners with increasing concentrations of DiO induced a proportional increase in the red fluorescence of the double-fluorescent population, indicating an additional excitation of the DiI molecule by DiO[87].

We also used cytoplasmic dyes 5-chloromethylfluorescein diacetate (CMFDA) and 5-(and-6)-(((4-chloromethyl)benzoyl)amino) tetramethylrhodamine (CMTMR) to label the fusion partners. However, because they did not show FRET, aggregated cells could not be distinguished from true fusions.

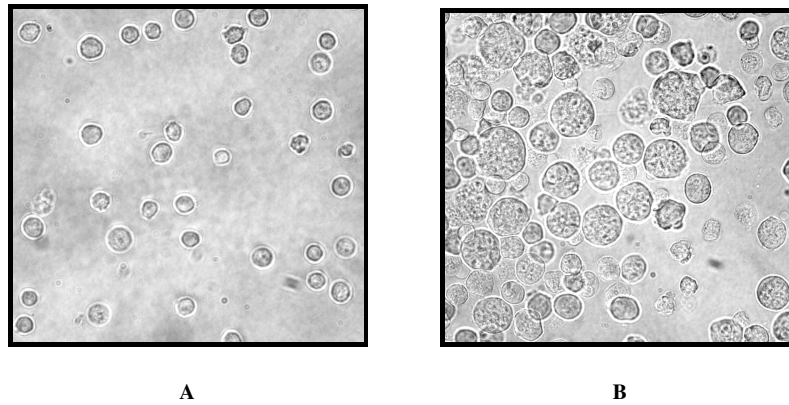
Enhancement of the red fluorescence in the double-fluorescent population was most easily observed when low concentrations of DiI and relatively high concentrations of DiO were used to label the cells. Two populations of double-fluorescent cells could be observed under these conditions: one was FRET-positive, showing approximately tenfold enhancement of the red fluorescence; the other, FRET-negative. An anti-CD4 monoclonal antibody, known to block CD4-gp120 interaction[86], inhibited the FRET-positive, but not the FRET-negative, cell population (Fig. 4A,B). Sorting and microscopic examination of these two populations showed the FRET-positive cells to be multinucleated, whereas the FRET-negative population was composed of single cells, indicating that they were cellular aggregates (Fig. 5)[87]. Thus, FRET between DiO and DiI allows the distinction and quantification of fused and aggregated cells, as determined by flow cytometry. FRET permits the detection of even small numbers of fused cells.



**FIGURE 4.** Fluorescence profiles of FRET-positive (fused cells, upper region) and FRET-negative (cellular aggregates, lower region) particles in cocultures of DiI-CD4<sup>+</sup> cells with (A) DiO-Env<sup>+</sup> cells and (B) DiO-Env<sup>+</sup> cells plus 30 µg/ml anti-CD4 monoclonal antibody. (Adapted from Huerta et al.[87]. Copyright 2006, with permission from Elsevier.)

Comparison of the number of syncytia counted by fluorescence microscopy and flow cytometry showed an excellent agreement between the two techniques, as shown in Table 3.

By using the FRET-based assay, a dose-dependent inhibition of fusion was obtained with monoclonal anti-CD4 and synthetic peptide T-20, which interferes with the membrane fusion step during virus entry[88]. The resulting values for the inhibition concentration (IC<sub>50</sub>) agree with that obtained by other methods[89,90,91,92] (Fig. 6). All experiments described in this article were conducted in serum-free medium containing human albumin (AIM-V medium, Gibco) in order to avoid any interaction between, or combined effect of, components in fetal serum and the inhibitors tested.



**FIGURE 5.** Appearance of double-fluorescent cells after sorting of (A) FRET-negative and (B) FRET-positive particles. Magnification 400 $\times$ . (Reprinted from Huerta et al.[87]. Copyright 2006, with permission from Elsevier.)

**TABLE 3**  
**Percentage of Syncytia and Single Cells Obtained by Visual Counting and Flow Cytometry**

	Microscopy Counting <sup>a</sup>	Flow Cytometry <sup>b</sup>
Single red (CD4+)	45.1	41.3
Single green (Env+)	34	36.4
Syncytia	21	20.8

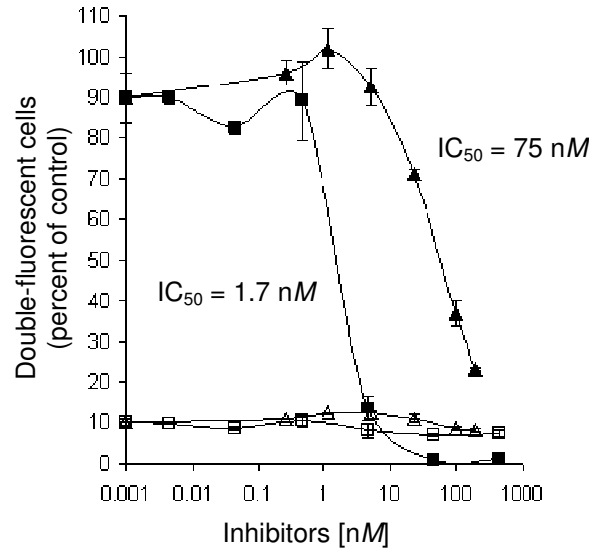
<sup>a</sup> Syncytia and single cells were identified as double- and single-fluorescent cells, respectively, in cocultures of Dil-CD4<sup>+</sup> and DiO-Env<sup>+</sup> cells. A total of 863 cells were analyzed in 58 microscope fields.

<sup>b</sup> FACS quantitation was carried out on 10,000 events.

Reprinted from Huerta et al.[87]. Copyright 2006, with permission from Elsevier.

## A QUANTITATIVE APPROACH TO THE STUDY OF SYNCYTIA DIVERSITY

Given the requirements for close contact and specific binding between cells, cell-cell fusion may roughly follow the principles of mass action. If so, the number of fusion reactions and the cellular composition of syncytia would depend on the duration of reaction, on the relative abundance of cell-fusion partners, and on the number of membrane receptors[93]. In turn, the extent of fusion (abundance of fused cells in a given compartment or microenvironment) and the cell composition of the syncytia (number and cell types incorporated into syncytia), in addition to the nature and intensity of stimuli from the microenvironment, must eventually determine the fate and biological significance of the syncytia. The study of cell-cell fusion by the flow cytometry method described in the previous section allows the quantitative analysis of several parameters of the cell-cell fusion reaction for a given experiment, i.e., the number of syncytia, average cell composition, and size distribution.



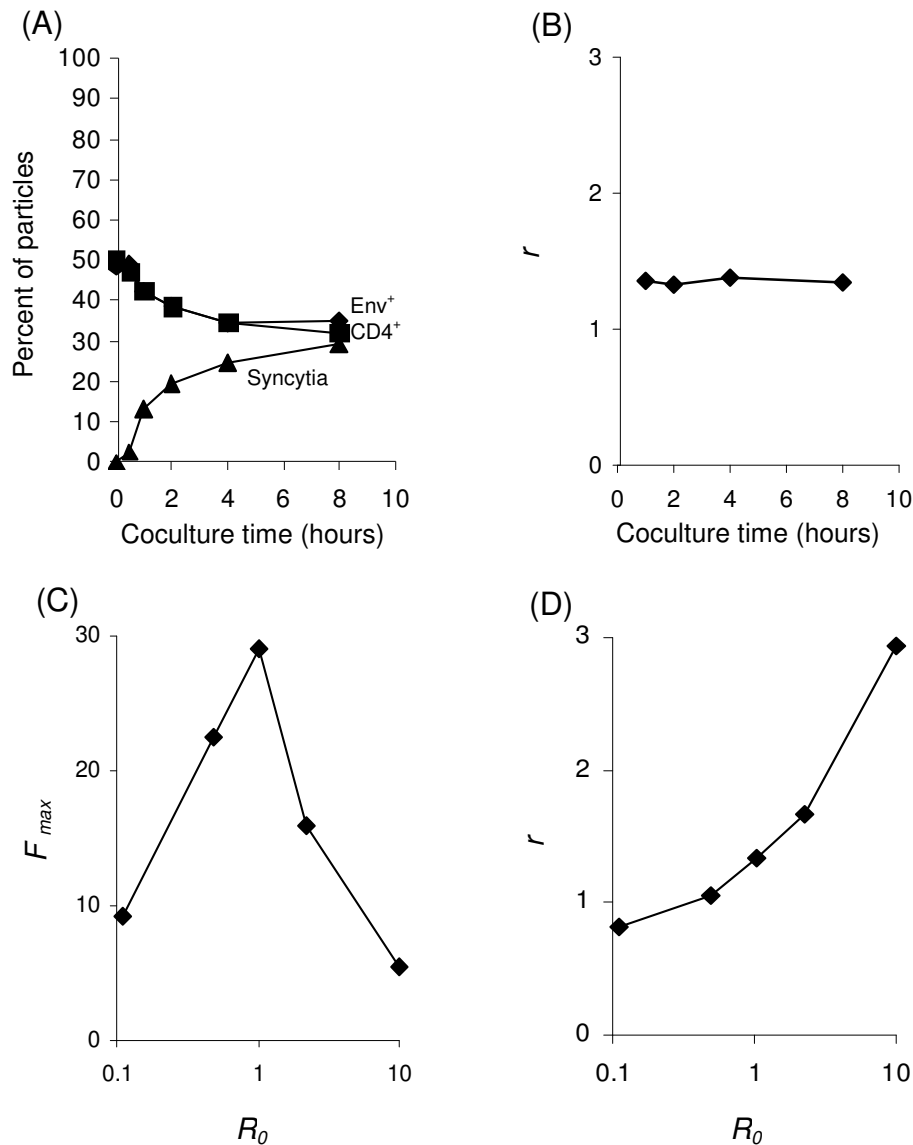
**FIGURE 6.** Effect of the fusion inhibitor peptide T-20 (squares) and anti-CD4 monoclonal antibody (triangles) on cell fusion (black symbols) and cellular aggregation (white symbols), as analyzed by the FRET-based flow cytometry method. Fused cells are sensitive to both inhibitors to different extents, while aggregated cells are not appreciably affected. (Reprinted from Huerta et al.[87]. Copyright 2006, with permission from Elsevier.)

The cellular composition of syncytia, i.e., the number of cells from each fusion partner that become fused, may prove to be an important biological parameter. For example, the ratio of healthy cells to virus-infected cells in a given syncytium may determine whether that syncytium will survive or die. In the FACS analysis shown above, it was possible both to identify and to count not only the syncytia, but also the cells that did not fuse (i.e., cells having only a single-colored fluorescence). Therefore, compared to the respective initial amounts of the fusion partners, changes in the number of nonfused cells could be used to calculate the number of cells incorporated into syncytia in short-term experiments, where cell proliferation or death are not significant. However, typical fluorometric analysis renders the proportion, but not the absolute number, of each cell type in the whole population. Given that changes in the proportion of cells remaining nonfused do not directly reflect the actual numbers of cells forming syncytia[84], the following simple expression was derived in order to calculate the  $CD4^+/Env^+$  ratio of cells incorporated into syncytia, or fusion stoichiometry coefficient (here designated as  $r$ )[84], using the percentage data provided by most of FACS equipment available:

$$r_i = \frac{R_0 - (1 + R_0)\{cd4\}_i}{f_i}$$

In this expression,  $R_0$ ,  $\{cd4\}_i$ , and  $f_i$  correspond to the initial  $CD4^+/Env^+$  ratio in the coculture, the percentage of nonfused  $CD4^+$  cells, and the percentage of syncytia at time  $i$ , respectively. The fusion stoichiometry coefficient,  $r$ , has a value of 1 when the two fusion partners are equally incorporated into syncytia[84].

Fusion kinetics and the stoichiometry coefficient,  $r$ , can be calculated by determining the proportion of fused and nonfused cells in different culture wells as fusion develops, as shown for an 8-h coculture of Jurkat cells seeded at  $R_0 = 1$  (Fig. 7A). In that study, maximal fusion ( $F_{max}$ ) was reached in 4 h. The percent of nonfused cells diminished at similar rates, indicating that equivalent numbers of  $CD4^+$  and

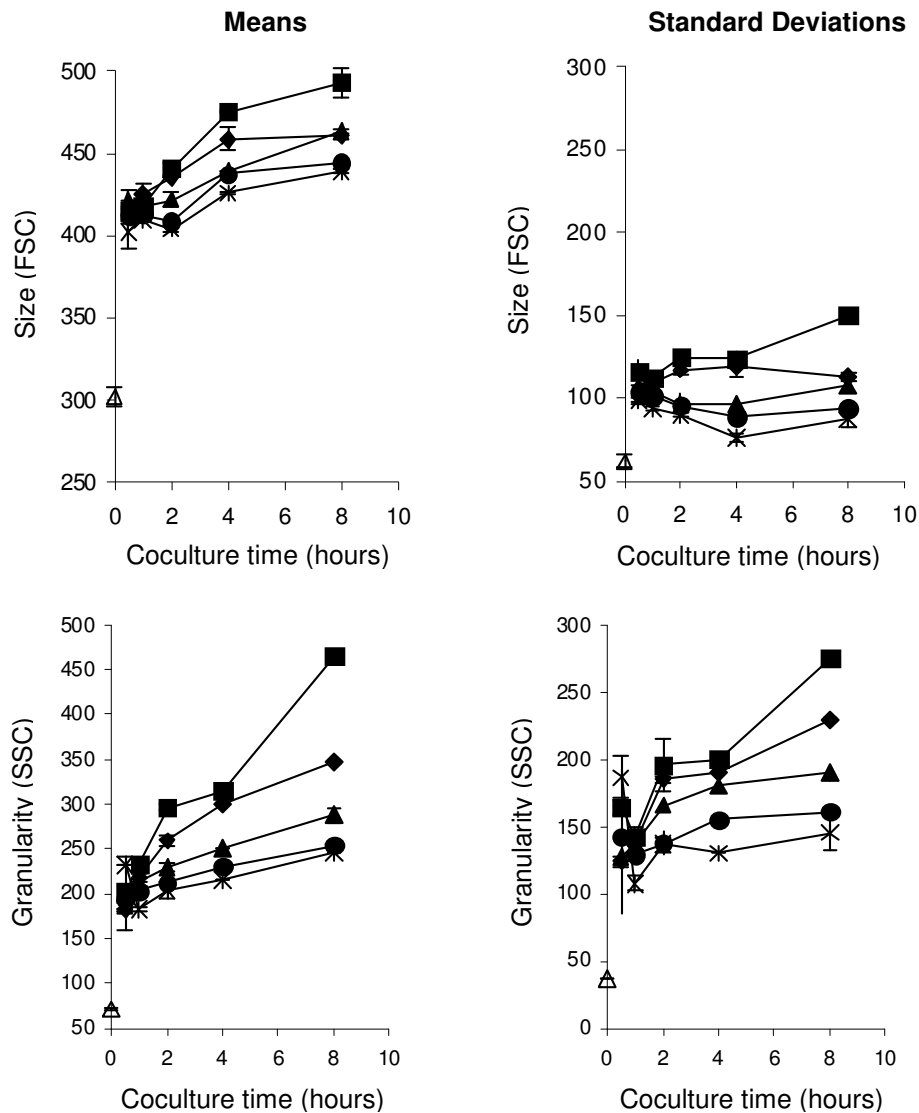


**FIGURE 7.** Changes in the percentages of syncytia and unfused cells (A) and in the ratio  $r$  ( $CD4^+/Env^+$ ) of incorporation of fusion partners into syncytia (B), at equal initial proportions of  $CD4^+$  and  $Env^+$  fusion partners ( $R_0 = 1$ ). (C) Relationship of  $F_{max}$  with  $R_0$  and (D) relationship of  $r$  with  $R_0$ . (Reprinted from Lopez-Balderas et al.[84]. Copyright 2007, with permission from Elsevier.)

$Env^+$  cells were incorporated into syncytia. In this example,  $r$  showed a constant value of 1.4 throughout the duration of the culture (Fig. 7B).

At coculture ratios distinct from 1,  $F_{max}$  decreased, probably due to the establishment of fewer effective contacts when one of the two fusion partners is in excess (Fig. 7C), while  $r$  stabilized at different values, with a maximum of 3 at  $R_0 = 10$  (Fig. 7D). Thus, the  $CD4^+/Env^+$  ratio of cells incorporated into syncytia was 3:1 when  $CD4^+$  cells were in tenfold excess, whereas this ratio was 0.7 (or 2:3  $CD4^+$  to  $Env^+$  cells) when  $Env^+$  were in tenfold excess. Thus, culture conditions can determine the generation of syncytia that differ in the abundance of one or the other cell type in their composition.

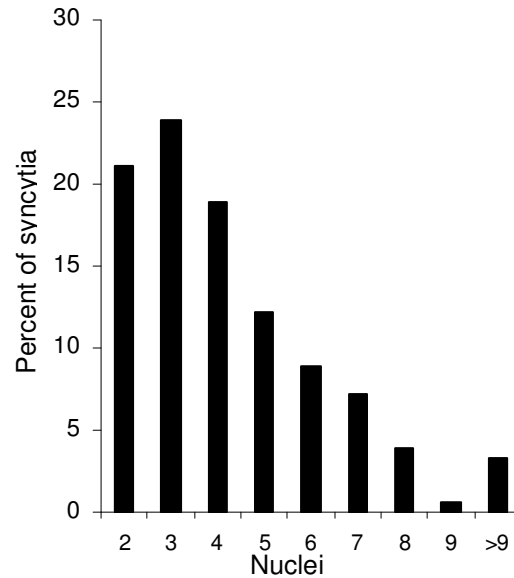
Distinct coculture conditions also generate different distributions of size and granularity of syncytia. Mean and standard deviations of the FSC-H and SSC-H parameters increase with coculture time and with  $R_0$ , so the largest syncytia were obtained with  $R_0 = 10$ , and the smallest with  $R_0 = 0.1$  (Fig. 8). Overall, fused



**FIGURE 8.** Changes in syncytia size (FSC) and granularity (SSC) with  $R_0$  and time of coculture. ■,  $R_0 = 10$ ; ◆,  $R_0 = 2.4$ ; ▲,  $R_0 = 1$ ; ●,  $R_0 = 0.5$ ; \*,  $R_0 = 0.1$ ; △, unfused CD4<sup>+</sup> cells. (Reprinted from Lopez-Balderas et al.[84]. Copyright 2007, with permission from Elsevier.)

cells show a major increase in granularity and a moderate increase in size, compared to nonfused cells. The modest increase in the intensity of the FSC-H signal of fused cells is related both to the observation that most of these cells were composed of two or three nuclei, as determined by microscopic counting (Fig. 9) and to the nonmonotonic nature of forward-scatter detector response. In contrast, the marked increase in the SSC-H signal is related to its high sensitivity to variations in the refractive index[94]. The finding that, under all the conditions tested, small syncytia comprised the greatest proportion ( $\approx 50\%$ ) points to the possibility that syncytia formed by only a few cells could be numerous during HIV infection and may go undetected in analysis by microscopy.





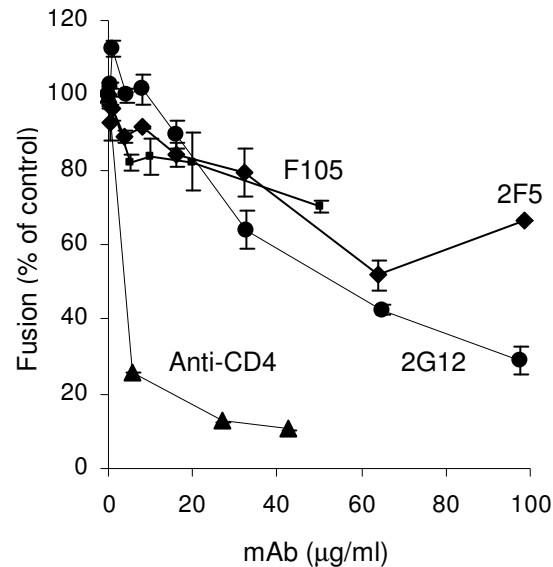
**FIGURE 9.** (A) Number of nuclei in syncytia formed in cocultures of DiI-CD4<sup>+</sup> and DiO-Env<sup>+</sup> cells. Nuclei were stained with the Hoechst 33342 dye and counted in 180 triple-fluorescent cells. (Reprinted from Huerta et al.[87]. Copyright 2006, with permission from Elsevier.)

Thus, as shown by the experimental results described above, the extent of fusion, the stoichiometry coefficient, and size of syncytia vary with time of reaction and initial proportion of fusion partners. The extent of fusion and diversity of syncytia under different experimental conditions may reflect heterogeneous features of the fusion-partner cell populations, such as different levels of expression of fusion-active proteins, or asynchronous cell cycles among the cell-line members. On the other hand, the increase in syncytia size without a similar increase of the proportion of fused cells suggests the occurrence of new fusion events that do not increase the number of double-fluorescent particles, such as the fusion of cells into already formed syncytia or fusion among syncytia.

## ASSOCIATION OF EFFECT OF SERA ON FUSION WITH MARKERS OF HIV DISEASE

Cell-cell fusion and cell-to-cell spreading of HIV may be affected by antibodies produced by HIV-infected patients. Although those antibodies that neutralize the cell-free virus would also block the Env-dependent cell-cell fusion, several findings indicate that virus-cell and cell-cell fusion may have different requirements[69,95]. Contact between extensive areas of the membranes of cells would involve interactions among large numbers of receptors and adhesion molecules[96]. Thus, blocking of Env-dependent cell-cell fusion may require higher concentrations of antibodies than those necessary to neutralize virus particles[97,98,99,100,101,102]. This idea is based on the finding that, in experiments using monoclonal antibodies against epitopes on the proteins gp120 and gp41, the concentration of monoclonal antibodies needed to inhibit fusion between Env<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> Jurkat cells (Fig. 10) was considerably higher than those reported for neutralization of cell-free virus[98,99,100,101].

We explored the effect of sera from HIV-infected individuals on the fusion of Env<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> Jurkat cells[103]. Most (69%) of the sera from a sampling of 49 HIV-positive individuals inhibited fusion to some extent; 24.5% had no effect and 6.1% enhanced fusion. Inhibition of fusion correlated with the asymptomatic stage of human HIV infection, whereas sera that had no effect or enhanced fusion were



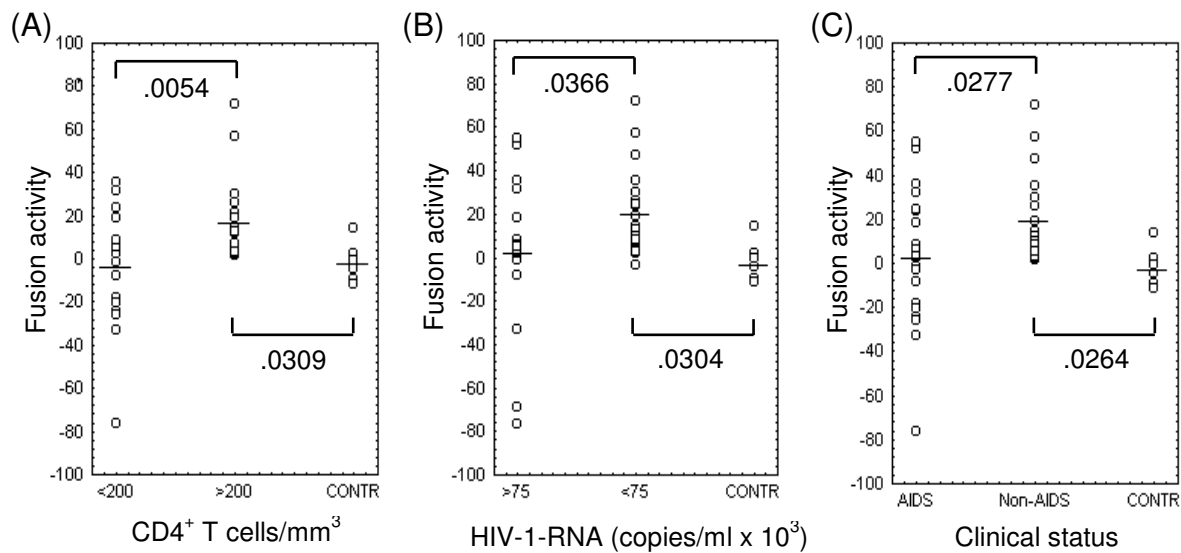
**FIGURE 10.** Fusion inhibition obtained with anti-CD4, anti-gp41 (2F5), and two anti-gp120 (F105 and 2G12) monoclonal antibodies. Data are expressed as percent of fusion obtained in the absence of antibodies. (Reprinted from Huerta et al.[103]. Copyright 2005, with permission from the Society for General Microbiology.)

associated with AIDS (Fig. 11). Coculture of labeled cells was performed in the absence of fetal bovine sera in order to avoid the influence of stimulating factors in the fetal serum on the patient's sera effect on fusion. The inhibition and enhancement of fusion by the patients' sera were shown to be related to IgG and IgM antibodies, respectively[103]. This study indicates that fusion-inhibiting antibodies predominate in the early stages of the disease, while loss of inhibition and the presence of fusion-enhancing antibodies appear during the late stages. This underscores the point that the effect of antibodies on syncytia formation should be considered in order to understand fully the role of the immune response in the control of the different forms of viral spreading and cell damage.

## CONCLUDING REMARKS

Cell-cell fusion is a highly heterogeneous process; it results in diverse outcomes having potentially significant consequences for the success or failure of the HIV infection. Studies of the biological features of syncytia must deal with such diversity in order to form an objective picture of their biological significance *in vivo*. Given the heterogeneity of fusion products, it is probable that not all the possible outcomes of cell-cell fusion induced by HIV infection have been investigated. A possibility to be considered is that, although multiple cell-cell fusion events lead to formation of multinucleated giant cells, there may be many fused cells *in vivo* too small to be easily detected by current methods.

Flow cytometry provides a convenient tool for the quantitative study of cell-cell fusion. The use of fluorescent dyes and of flow cytometry allows the high-speed analysis of the number, size, and average cellular composition of syncytia. This technique can be used not only to distinguish between aggregated and *bona fide* fused cells, but also to test for potential inhibitors to HIV entry. DiI and DiO can be combined with third-party fluorescent dyes coupled to antibodies for the determination of phenotypic markers of syncytia and other biological features (i.e., mechanism of death, cell cycle, cytokine production, virus production capability). The same features also can be determined in the surrounding cells that do not fuse.



**FIGURE 11.** Relationship of sera activity on fusion with CD4<sup>+</sup> lymphocyte count (A), viral load (B), and clinical status (C). Values of fusion activity greater and lower than zero indicate inhibition or enhancement of fusion, respectively. Probability values (*p*) for significant differences are shown. Dilution of sera was 1:50. CONTR: HIV-negative controls. (Reprinted from Huerta et al.[103]. Copyright 2005, with permission from the Society for General Microbiology.)

The combination of flow cytometry and FRET provides a method with sensitivity similar in degree to that of other current methodologies. It also has the advantages of technical simplicity, minimal cell-invasive procedures, and the possibility of using additional, distinct fluorochromes to explore simultaneously other biological markers of the cells involved in fusion.

## ACKNOWLEDGMENTS

Env<sup>+</sup> cells (HXBc2 and 522F/Y Jurkat cells) were obtained from Dr. Joseph Sodroski, and CD4<sup>+</sup> cells (Jurkat Clone E6-1) from ATCC (Dr. Arthur Weiss), through the AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH. This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología of México (CONACYT; Grant 61425) and by the Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México (PAPIIT; Grant IN229307). We thank Elsevier and the Society for General Microbiology for allowing us to reproduce previously published figures. The authors thank Veronica Yakoleff for editing, and Dr. Nuno C. Santos, editor of this issue of *TheScientificWorldJOURNAL*, for handling the manuscript.

## REFERENCES

1. Horsley, V., Jansen, K.M., Mills, S.T., and Pavlath, G.K. (2003) IL-4 acts as a myoblast recruitment factor during mammalian muscle growth. *Cell* **113**, 483–494.
2. Huppertz, B., Bartz, C., and Kokozidou, M. (2006) Trophoblast fusion: fusogenic proteins, syncytins and ADAMs, and other prerequisites for syncytial fusion. *Micron* **37**, 509–517.
3. Shemer, G. and Podbilewicz, B. (2003) The story of cell fusion: big lessons from little worms. *Bioessays* **25**, 672–682.
4. Alvarez-Dolado, M., Pardal, R., Garcia-Verdugo, J.M., Fike, J.R., Lee, H.O., Pfeffer, K., Lois, C., Morrison, S.J., and Alvarez-Buylla, A. (2003) Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* **425**, 968–973.

5. Camargo, F.D., Green, R., Capetanaki, Y., Jackson, K.A., and Goodell, M.A. (2003) Single hematopoietic stem cells generate skeletal muscle through myeloid intermediates. *Nat. Med.* **9**, 1520–1527.
6. Rodic, N., Rutenberg, M.S., and Terada, N. (2004) Cell fusion and reprogramming: resolving our transdifferences. *Trends Mol. Med.* **10**, 93–96.
7. Matsuura, K., Wada, H., Nagai, T., Iijima, Y., Minamino, T., Sano, M., Akazawa, H., Molkentin, J.D., Kasanuki, H., and Komuro, I. (2004) Cardiomyocytes fuse with surrounding noncardiomyocytes and reenter the cell cycle. *J. Cell Biol.* **167**, 351–363.
8. Duelli, D. and Lazebnik, Y. (2003) Cell fusion: a hidden enemy? *Cancer Cell* **3**, 445–448.
9. Duelli, D. and Lazebnik, Y. (2007) Cell-to-cell fusion as a link between viruses and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 968–976.
10. Ogle, B.M., Cascalho, M., and Platt, J.L. (2005) Biological implications of cell fusion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 567–575.
11. Vignery, A. (2005) Macrophage fusion: the making of osteoclasts and giant cells. *J. Exp. Med.* **202**, 337–340.
12. Anderson, J.M., Rodriguez, A., and Chang, D.T. (2008) Foreign body reaction to biomaterials. *Semin. Immunol.* **20**, 86–100.
13. Blau, H.M. and Blakely, B.T. (1999) Plasticity of cell fate: insights from heterokaryons. *Semin. Cell Dev. Biol.* **10**, 267–272.
14. Terada, N., Hamazaki, T., Oka, M., Hoki, M., Mastalerz, D.M., Nakano, Y., Meyer, E.M., Morel, L., Petersen, B.E., and Scott, E.W. (2002) Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* **416**, 542–545.
15. Ying, Q.L., Nichols, J., Evans, E.P., and Smith, A.G. (2002) Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* **416**, 545–548.
16. Sattentau, Q. (2008) Avoiding the void: cell-to-cell spread of human viruses. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 815–826.
17. Potenza, L., Luppi, M., Barozzi, P., Rossi, G., Cocchi, S., Codeluppi, M., Pecorari, M., Masetti, M., Di Benedetto, F., Gennari, W., Portolani, M., Gerunda, G.E., Lazzarotto, T., Landini, M.P., Schulz, T.F., Torelli, G., and Guaraldi, G. (2008) HHV-6A in syncytial giant-cell hepatitis. *N. Engl. J. Med.* **359**, 593–602.
18. Sweet, C. (1999) The pathogenicity of cytomegalovirus. *FEMS Microbiol. Rev.* **23**, 457–482.
19. Collins, P.L. and Crowe, J.E. (2007) Respiratory syncytial virus and metaneumovirus. In *Field's Virology*. 5<sup>th</sup> ed. Knipe, D.M. and Howley, P.M., Eds. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. pp. 1601–1646.
20. Sarmiento, R.E., Arias, C.F., Mendez, E., and Gomez, B. (2009) Characterization of a persistent respiratory syncytial virus showing a low-fusogenic activity associated to an impaired F protein. *Virus Res.* **139**, 39–47.
21. Moll, M., Pfeuffer, J., Klenk, H.D., Niewiesk, S., and Maisner, A. (2004) Polarized glycoprotein targeting affects the spread of measles virus in vitro and in vivo. *J. Gen. Virol.* **85**, 1019–1027.
22. Herschke, F., Plumet, S., Duhon, T., Azocar, O., Druelle, J., Laine, D., Wild, T.F., Rabourdin-Combe, C., Gerlier, D., and Valentin, H. (2007) Cell-cell fusion induced by measles virus amplifies the type I interferon response. *J. Virol.* **81**, 12859–12871.
23. Fugier-Vivier, I., Servet-Delprat, C., Rivallier, P., Rissoan, M.C., Liu, Y.J., and Rabourdin-Combe, C. (1997) Measles virus suppresses cell-mediated immunity by interfering with the survival and functions of dendritic and T cells. *J. Exp. Med.* **186**, 813–823.
24. Mrkic, B., Odermatt, B., Klein, M.A., Billeter, M.A., Pavlovic, J., and Cattaneo, R. (2000) Lymphatic dissemination and comparative pathology of recombinant measles viruses in genetically modified mice. *J. Virol.* **74**, 1364–1372.
25. Madden, J.F., Burchette, J.L., Jr., and Hale, L.P. (2004) Pathology of parainfluenza virus infection in patients with congenital immunodeficiency syndromes. *Hum. Pathol.* **35**, 594–603.
26. Duhaut, P., Bosshard, S., and Dumontet, C. (2000) Giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica: role of viral infections. *Clin. Exp. Rheumatol.* **18**, S22–23.
27. Duhaut, P., Bosshard, S., and Ducroix, J.P. (2004) Is giant cell arteritis an infectious disease? Biological and epidemiological evidence. *Presse Med.* **33**, 1403–1408.
28. Landers, M.C., Dugger, N., Quadros, M., Hoffman, P.M., and Gaulton, G.N. (2004) Neuropathogenic murine leukemia virus TR1.3 induces selective syncytia formation of brain capillary endothelium. *Virology* **321**, 57–64.
29. Shimazaki, K., Ohshima, K., Haraoka, S., Suzumiya, J., Nakamura, N., and Kikuchi, M. (2002) Accessory cell tumour: a clinicopathological study of 16 aggressive tumours containing EBV-positive Hodgkin and Reed-Sternberg-like giant cells. *Histopathology* **40**, 12–21.
30. Hu, L., Plafker, K., Vorozhko, V., Zuna, R.E., Hanigan, M.H., Gorbsky, G.J., Plafker, S.M., Angeletti, P.C., and Ceresa, B.P. (2009) Human papillomavirus 16 E5 induces bi-nucleated cell formation by cell-cell fusion. *Virology* **384**, 125–134.
31. Cole, N.L. and Grose, C. (2003) Membrane fusion mediated by herpesvirus glycoproteins: the paradigm of varicella-zoster virus. *Rev. Med. Virol.* **13**, 207–222.
32. Reichelt, M., Zerboni, L., and Arvin, A.M. (2008) Mechanisms of varicella-zoster virus neuropathogenesis in human dorsal root ganglia. *J. Virol.* **82**, 3971–3983.
33. Cantin, R., Methot, S., and Tremblay, M.J. (2005) Plunder and stowaways: incorporation of cellular proteins by enveloped viruses. *J. Virol.* **79**, 6577–6587.
34. Pantaleo, G., Butini, L., Graziosi, C., Poli, G., Schnittman, S.M., Greenhouse, J.J., Gallin, J.I., and Fauci, A.S. (1991)

- Human immunodeficiency virus (HIV) infection in CD4+ T lymphocytes genetically deficient in LFA-1: LFA-1 is required for HIV-mediated cell fusion but not for viral transmission. *J. Exp. Med.* **173**, 511–514.
35. Bastiani Lалlos, L., Cecilia, D., Fenyо, E.M., Laal, S., and Zolla-Pazner, S. (2000) HIV phenotype correlates with the relative amounts of lymphocyte function-related molecule 1 (LFA-1) and major histocompatibility complex (MHC) class II in the virion envelope. *AIDS* **14**, 1523–1531.
  36. Fortin, J.F., Cantin, R., Bergeron, M.G., and Tremblay, M.J. (2000) Interaction between virion-bound host intercellular adhesion molecule-1 and the high-affinity state of lymphocyte function-associated antigen-1 on target cells renders R5 and X4 isolates of human immunodeficiency virus type 1 more refractory to neutralization. *Virology* **268**, 493–503.
  37. Hernandez, L.D., Hoffman, L.R., Wolfsberg, T.G., and White, J.M. (1996) Virus-cell and cell-cell fusion. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **12**, 627–661.
  38. Lentz, B.R., Malinin, V., Haque, M.E., and Evans, K. (2000) Protein machines and lipid assemblies: current views of cell membrane fusion. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**, 607–615.
  39. Chernomordik, L.V. and Kozlov, M.M. (2008) Mechanics of membrane fusion. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 675–683.
  40. Melikyan, G.B. (2008) Common principles and intermediates of viral protein-mediated fusion: the HIV-1 paradigm. *Retrovirology* **5**, 111.
  41. Chen, E.H. and Olson, E.N. (2005) Unveiling the mechanisms of cell-cell fusion. *Science* **308**, 369–373.
  42. Gallo, S.A., Finnegan, C.M., Viard, M., Raviv, Y., Dimitrov, A., Rawat, S.S., Puri, A., Durell, S., and Blumenthal, R. (2003) The HIV Env-mediated fusion reaction. *Biochim. Biophys. Acta* **1614**, 36–50.
  43. Lifson, J.D., Feinberg, M.B., Reyes, G.R., Rabin, L., Banapour, B., Chakrabarti, S., Moss, B., Wong-Staal, F., Steimer, K.S., and Engleman, E.G. (1986) Induction of CD4-dependent cell fusion by the HTLV-III/LAV envelope glycoprotein. *Nature* **323**, 725–728.
  44. Lifson, J.D., Reyes, G.R., McGrath, M.S., Stein, B.S., and Engleman, E.G. (1986) AIDS retrovirus induced cytopathology: giant cell formation and involvement of CD4 antigen. *Science* **232**, 1123–1127.
  45. Sodroski, J., Goh, W.C., Rosen, C., Campbell, K., and Haseltine, W.A. (1986) Role of the HTLV-III/LAV envelope in syncytium formation and cytopathicity. *Nature* **322**, 470–474.
  46. Connor, R.I., Mohri, H., Cao, Y., and 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.
  47. Blaak, H., van't Wout, A.B., Brouwer, M., Hooibrink, B., Hovenkamp, E., and Schuitemaker, H. (2000) In vivo HIV-1 infection of CD45RA(+)/CD4(+) T cells is established primarily by syncytium-inducing variants and correlates with the rate of CD4(+) T cell decline. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 1269–1274.
  48. Miedema, F., Meyaard, L., Koot, M., Klein, M.R., Roos, M.T., Groenink, M., Fouchier, R.A., Van't Wout, A.B., Tersmette, M., Schellekens, P.T., and Schuitemaker, H. (1994) Changing virus-host interactions in the course of HIV-1 infection. *Immunol. Rev.* **140**, 35–72.
  49. Furrer, H., Wendland, T., Minder, C., Christen, A., von Overbeck, J., Grunow, R., Pichler, W., and Malinverni, R.P. (1998) Association of syncytium-inducing phenotype of HIV-1 with CD4 cell count, viral load and sociodemographic characteristics. *AIDS* **12**, 1341–1346.
  50. Amendola, A., Gougeon, M.L., Poccia, F., Bondurand, A., Fesus, L., and Piacentini, M. (1996) Induction of "tissue" transglutaminase in HIV pathogenesis: evidence for high rate of apoptosis of CD4+ T lymphocytes and accessory cells in lymphoid tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 11057–11062.
  51. Budka, H. (1986) Multinucleated giant cells in brain: a hallmark of the acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Acta Neuropathol.* **69**, 253–258.
  52. Frankel, S.S., Wenig, B.M., Burke, A.P., Mannan, P., Thompson, L.D., Abbondanzo, S.L., Nelson, A.M., Pope, M., and Steinman, R.M. (1996) Replication of HIV-1 in dendritic cell-derived syncytia at the mucosal surface of the adenoid. *Science* **272**, 115–117.
  53. Koenig, S., Gendelman, H.E., Orenstein, J.M., Dal Canto, M.C., Pezeshkpour, G.H., Yungbluth, M., Janotta, F., Aksamit, A., Martin, M.A., and Fauci, A.S. (1986) Detection of AIDS virus in macrophages in brain tissue from AIDS patients with encephalopathy. *Science* **233**, 1089–1093.
  54. Orenstein, J.M. (2000) In vivo cytolysis and fusion of human immunodeficiency virus type 1-infected lymphocytes in lymphoid tissue. *J. Infect. Dis.* **182**, 338–342.
  55. Rinfret, A., Latendresse, H., Lefebvre, R., St-Louis, G., Jolicoeur, P., and Lamarre, L. (1991) Human immunodeficiency virus-infected multinucleated histiocytes in oropharyngeal lymphoid tissues from two asymptomatic patients. *Am. J. Pathol.* **138**, 421–426.
  56. Bhoopat, L., Rithaporn, T.S., Khunamornpong, S., Bhoopat, T., Taylor, C.R., and Thorner, P.S. (2006) Cell reservoirs in lymph nodes infected with HIV-1 subtype E differ from subtype B: identification by combined in situ polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *Mod. Pathol.* **19**, 255–263.
  57. Castedo, M., Perfettini, J.L., Andreau, K., Roumier, T., Piacentini, M., and Kroemer, G. (2003) Mitochondrial apoptosis induced by the HIV-1 envelope. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1010**, 19–28.
  58. Ferri, K.F., Jacotot, E., Blanco, J., Este, J.A., Zamzami, N., Susin, S.A., Xie, Z., Brothers, G., Reed, J.C., Penninger, J.M., and Kroemer, G. (2000) Apoptosis control in syncytia induced by the HIV type 1-envelope glycoprotein complex: role of mitochondria and caspases. *J. Exp. Med.* **192**, 1081–1092.

59. Perfettini, J.L., Castedo, M., Roumier, T., Andreau, K., Nardacci, R., Piacentini, M., and Kroemer, G. (2005) Mechanisms of apoptosis induction by the HIV-1 envelope. *Cell Death Differ.* **12(Suppl 1)**, 916–923.
60. Chen, P., Hubner, W., Spinelli, M.A., and Chen, B.K. (2007) Predominant mode of human immunodeficiency virus transfer between T cells is mediated by sustained Env-dependent neutralization-resistant virological synapses. *J. Virol.* **81**, 12582–12595.
61. Dimitrov, D.S., Willey, R.L., Sato, H., Chang, L.J., Blumenthal, R., and Martin, M.A. (1993) Quantitation of human immunodeficiency virus type 1 infection kinetics. *J. Virol.* **67**, 2182–2190.
62. Lagaye, S., Derrien, M., Menu, E., Coito, C., Tresoldi, E., Mauclore, P., Scarlatti, G., Chauat, G., Barre-Sinoussi, F., and Bomsel, M. (2001) Cell-to-cell contact results in a selective translocation of maternal human immunodeficiency virus type 1 quasispecies across a trophoblastic barrier by both transcytosis and infection. *J. Virol.* **75**, 4780–4791.
63. Sato, H., Orenstein, J., Dimitrov, D., and Martin, M. (1992) Cell-to-cell spread of HIV-1 occurs within minutes and may not involve the participation of virus particles. *Virology* **186**, 712–724.
64. Steain, M.C., Wang, B., and Saksena, N.K. (2008) The possible contribution of HIV-1-induced syncytia to the generation of intersubtype recombinants in vitro. *AIDS* **22**, 1009–1017.
65. Ferri, K.F., Jacotot, E., Geuskens, M., and Kroemer, G. (2000) Apoptosis and karyogamy in syncytia induced by the HIV-1-envelope glycoprotein complex. *Cell Death Differ.* **7**, 1137–1139.
66. Nardacci, R., Antinori, A., Larocca, L.M., Arena, V., Amendola, A., Perfettini, J.L., Kroemer, G., and Piacentini, M. (2005) Characterization of cell death pathways in human immunodeficiency virus-associated encephalitis. *Am. J. Pathol.* **167**, 695–704.
67. Karlsson, G.B., Halloran, M., Li, J., Park, I.W., Gomila, R., Reimann, K.A., Axthelm, M.K., Iloff, S.A., Letvin, N.L., and Sodroski, J. (1997) Characterization of molecularly cloned simian-human immunodeficiency viruses causing rapid CD4+ lymphocyte depletion in rhesus monkeys. *J. Virol.* **71**, 4218–4225.
68. LaBonte, J.A., Patel, T., Hofmann, W., and 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.
69. Gupta, P., Balachandran, R., Ho, M., Enrico, A., and 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.
70. Phillips, D.M. and Bourinbaiar, A.S. (1992) Mechanism of HIV spread from lymphocytes to epithelia. *Virology* **186**, 261–273.
71. Sun, J., Barbeau, B., and Tremblay, M.J. (2006) HIV-1-mediated syncytium formation promotes cell-to-cell transfer of Tax protein and HTLV-I gene expression. *Virus Res.* **118**, 120–129.
72. Carr, J.M., Hocking, H., Li, P., and Burrell, C.J. (1999) Rapid and efficient cell-to-cell transmission of human immunodeficiency virus infection from monocyte-derived macrophages to peripheral blood lymphocytes. *Virology* **265**, 319–329.
73. Sherer, N.M., Lehmann, M.J., Jimenez-Soto, L.F., Horensavitz, C., Pypaert, M., and Mothes, W. (2007) Retroviruses can establish filopodial bridges for efficient cell-to-cell transmission. *Nat. Cell Biol.* **9**, 310–315.
74. Ruggiero, E., Bona, R., Muratori, C., and Federico, M. (2008) Virological consequences of early events following cell-cell contact between human immunodeficiency virus type 1-infected and uninfected CD4+ cells. *J. Virol.* **82**, 7773–7789.
75. Ioannidis, J.P., Reichlin, S., and Skolnik, P.R. (1995) Long-term productive human immunodeficiency virus-1 infection in human infant microglia. *Am. J. Pathol.* **147**, 1200–1206.
76. Fais, S., Borghi, P., Gherardi, G., Logozzi, M., Belardelli, F., and Gessani, S. (1996) Human immunodeficiency virus type 1 induces cellular polarization, intercellular adhesion molecule-1 redistribution, and multinucleated giant cell generation in human primary monocytes but not in monocyte-derived macrophages. *Lab. Invest.* **75**, 783–790.
77. Jimenez, J.L., Sanchez-Ramon, S., Palomino, S.S., Alcami, J., and Munoz-Fernandez, H.A. (2001) Where does free infective HIV-1 rebound come from? *AIDS* **15**, 657.
78. Li, H., Haviv, Y.S., Derdeyn, C.A., Lam, J., Coolidge, C., Hunter, E., Curiel, D.T., and Blackwell, J.L. (2001) Human immunodeficiency virus type 1-mediated syncytium formation is compatible with adenovirus replication and facilitates efficient dispersion of viral gene products and de novo-synthesized virus particles. *Hum. Gene Ther.* **12**, 2155–2165.
79. Kozarsky, K., Penman, M., Basiripour, L., Haseltine, W., Sodroski, J., and Krieger, M. (1989) Glycosylation and processing of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **2**, 163–169.
80. Cao, J., Park, I.W., Cooper, A., and Sodroski, J. (1996) Molecular determinants of acute single-cell lysis by human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **70**, 1340–1354.
81. Dimitrov, D.S., Broder, C.C., Berger, E.A., and Blumenthal, R. (1993) Calcium ions are required for cell fusion mediated by the CD4-human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein interaction. *J. Virol.* **67**, 1647–1652.
82. Rucker, J., Doranz, B.J., Edinger, A.L., Long, D., Berson, J.F., and Doms, R.W. (1997) Cell-cell fusion assay to study role of chemokine receptors in human immunodeficiency virus type 1 entry. *Methods Enzymol.* **288**, 118–133.
83. Shinn-Thomas, J.H., Scranton, V.L., and Mohler, W.A. (2008) Quantitative assays for cell fusion. *Methods Mol. Biol.* **475**, 347–361.
84. Lopez-Balderas, N., Huerta, L., Villarreal, C., Rivera-Toledo, E., Sandoval, G., Larralde, C., and Lamoyi, E. (2007) In vitro cell fusion between CD4(+) and HIV-1 Env(+) T cells generates a diversity of syncytia varying in total number, size and cellular content. *Virus Res.* **123**, 138–146; 84a. Huerta, L., Lamoyi, E., Báez-Saldaña, A., and

- Larralde, C. (2002) Human immunodeficiency virus envelope-dependent cell-cell fusion: a quantitative fluorescence cytometric assay. *Cytometry* **47**, 100–106.
85. Wu, P. and Brand, L. (1994) Resonance energy transfer: methods and applications. *Anal. Biochem.* **218**, 1–13.
86. Esser, U., Speck, R.F., Deen, K.C., Atchison, R.E., Sweet, R., and Goldsmith, M.A. (2000) Molecular function of the CD4 D1 domain in coreceptor-mediated entry by HIV type 1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **16**, 1845–1854.
87. Huerta, L., Lopez-Balderas, N., Larralde, C., and Lamoyi, E. (2006) Discriminating in vitro cell fusion from cell aggregation by flow cytometry combined with fluorescence resonance energy transfer. *J. Virol. Methods* **138**, 17–23.
88. Furuta, R.A., Wild, C.T., Weng, Y., and Weiss, C.D. (1998) Capture of an early fusion-active conformation of HIV-1 gp41. *Nat. Struct. Biol.* **5**, 276–279.
89. Hong, Y.L., Wu, L.H., Cui, M., McMaster, G., Hunt, S.W., 3rd, and Chung, F.Z. (1999) New reporter cell lines to study macrophage-tropic HIV envelope protein-mediated cell-cell fusion. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **15**, 1667–1672.
90. Sakamoto, T., Ushijima, H., Okitsu, S., Suzuki, E., Sakai, K., Morikawa, S., and Muller, W.E. (2003) Establishment of an HIV cell-cell fusion assay by using two genetically modified HeLa cell lines and reporter gene. *J. Virol. Methods* **114**, 159–166.
91. Wild, C.T., Shugars, D.C., Greenwell, T.K., McDanal, C.B., and Matthews, T.J. (1994) Peptides corresponding to a predictive alpha-helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 9770–9774.
92. Liu, S., Lu, H., Niu, J., Xu, Y., Wu, S., and Jiang, S. (2005) Different from the HIV fusion inhibitor C34, the anti-HIV drug Fuzeon (T-20) inhibits HIV-1 entry by targeting multiple sites in gp41 and gp120. *J. Biol. Chem.* **280**, 11259–11273.
93. Pauling, L., Campbell, D.H., and Pressman, D. (1943) The nature of forces between antigen and antibody and of the precipitation reaction. *Physiol. Rev.* **23**, 203–219.
94. Salzman, G.C. (2007) Light scatter: detection and usage. In *Current Protocols in Cytometry*. Robinson, J.P., Darzynkiewicz, Z., Hoffman, R., Nolan, J.P., Orfao, A., Rabinovitch, P.S., and Watkins, S., Eds. John Wiley & Sons, New York. Suppl. 9. pp. 1.13.1–1.13.8.
95. Pleskoff, O., Seman, M., and Alizon, M. (1995) Amphotericin B derivative blocks human immunodeficiency virus type 1 entry after CD4 binding: effect on virus-cell fusion but not on cell-cell fusion. *J. Virol.* **69**, 570–574.
96. Hioe, C.E., Bastiani, L., Hildreth, J.E., and 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**(Suppl 3), S247–254.
97. Allaway, G.P., Ryder, A.M., Beaudry, G.A., and 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.
98. McKeating, J.A., Zhang, Y.J., Arnold, C., Frederiksson, R., Fenyo, E.M., and Balfe, P. (1996) Chimeric viruses expressing primary envelope glycoproteins of human immunodeficiency virus type I show increased sensitivity to neutralization by human sera. *Virology* **220**, 450–460.
99. Posner, M.R., Hideshima, T., Cannon, T., Mukherjee, M., Mayer, K.H., and Byrn, R.A. (1991) An IgG human monoclonal antibody that reacts with HIV-1/GP120, inhibits virus binding to cells, and neutralizes infection. *J. Immunol.* **146**, 4325–4332.
100. Trkola, A., Ketas, T., Kewalramani, V.N., Endorf, F., Binley, J.M., Katinger, H., Robinson, J., Littman, D.R., and 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.
101. Zwick, M.B., Wang, M., Pognard, P., Stiegler, G., Katinger, H., Burton, D.R., and Parren, P.W. (2001) Neutralization synergy of human immunodeficiency virus type 1 primary isolates by cocktails of broadly neutralizing antibodies. *J. Virol.* **75**, 12198–12208.
102. Pantaleo, G., Demarest, J.F., Vaccarezza, M., Graziosi, C., Bansal, G.P., Koenig, S., and 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.
103. Huerta, L., Gomez-Icazbalceta, G., Soto-Ramirez, L., Viveros-Rogel, M., Rodriguez, R., Fuentes, L., Lamoyi, E., and Larralde, C. (2005) Human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) envelope-dependent cell-cell fusion modulation by HIV-positive sera is related to disease progression. *J. Gen. Virol.* **86**, 1961–1966.

---

**This article should be cited as follows:**

Huerta, L., López-Balderas, N., Rivera-Toledo, E., Sandoval, G., Gómez-Icazbalceta, G., Villarreal, C., Lamoyi, E., and Larralde, C. (2009) HIV-envelope-dependent cell-cell fusion: quantitative studies. *TheScientificWorldJOURNAL* **9**, 746–763. DOI 10.1100/tsw.2009.90.

---