



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EL CICLO CELULAR DURANTE LA FUSIÓN DE
LINFOCITOS T CD4⁺ MEDIADA POR LAS PROTEÍNAS
DE ENVOLTURA DEL HIV-1.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

P R E S E N T A:

ISRAEL TORRES CASTRO



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. LEONOR HUERTA HERNÁNDEZ
2011**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del Alumno

Torres
Castro
Israel
0445545523375
Universidad Nacional Autónoma de
México
Facultad de Ciencias
Biología
40704393-4

2. Datos del tutor

Dra.
Leonor
Huerta
Hernández

3. Datos del sinodal 1

Dr.
Edmundo de Ibis
Lamoyi
Velázquez

4. Datos del sinodal 2

Dra.
Perla Mariana
Del Río
Estrada

5. Datos del sinodal 3

Dra.
María Luisa
Escobar
Sánchez

6. Datos del sinodal 4

Dra.
Rosa Elena
Sarmiento
Silva

7. Datos del trabajo escrito

El ciclo celular durante la fusión de
linfocitos T CD4+ mediada por las
proteínas de envoltura del HIV-1.
146
2011

*A ti **madre** con cariño dedico este poema que me recuerda siempre cada una de las palabras que me dijiste en esa última carta que recibí de tu parte.*

Enseñarás a volar

*Enseñarás a volar,
pero no volarán tu vuelo.
Enseñarás a soñar,
pero no soñarán tu sueño.
Enseñarás a vivir,
pero no vivirán tu vida.
Sin embargo...
en cada vuelo,
en cada vida,
en cada sueño,
perdurará siempre la huella
del camino enseñado.*

Madre Teresa de Calcuta.

Agradecimientos:

Quiero agradecer a tantísimos seres queridos, familia, amigos, maestros y compañeros que me han apoyado, inspirado y alentado.

A mis padres que me inculcaron el espíritu de la perseverancia y que me impulsaron a seguir siempre hacia adelante y que cada tropiezo no es más que una nueva oportunidad de aprender.

A mi hermana Mirna que de no ser por su apoyo a lo largo de estos años, no hubiese siquiera haber podido concluir mis estudios universitarios, te estaré eternamente agradecido ya que siempre estuviste ahí con un buen consejo, palabra de aliento y hasta reprimenda cuando por azares del destino tendía a desviarme del camino.

A mis tíos Bety y Toño y a mis primas Betina y Licha mil gracias por su apoyo y amistad los estimo muchísimo y no me canso de agradecer lo que han hecho por mí y mi hermana Mirna.

A mi amado Roberto Ruiz pues te debo que hayas llegado a mi vida para iluminarla con todo ese amor que jamás hubiese creído posible. Quiero que sepas que eres lo mejor que me ha pasado en la vida y que este año juntos ha sido el mejor de mi vida, te amo. También quiero agradecer a tu familia en especial a tu mamá por aceptarnos y hacerme sentir como de la familia.

A los maestros como el Dr. Alejandro Marche Cova que me inspiraron a ser siempre excelente en cualquier empresa que se decida tomar. A la Dra. Concepción Sánchez Gómez que me enseñó que el ser un reconocido investigador y docente no excluye la humildad y respeto hacia los demás. A la Dra. Carolina Gonzáles Torres que me mostró con su profesionalismo, dedicación, compromiso y conocimiento que la juventud no es excusa para permitirse ser incompetente.

Al Dr. Pedro García Barrera a quien estimo mucho por mostrarme que la docencia es una pasión que se lleva en el alma y a la Dra. Olga Margarita Echeverría Martínez de quien aprendí a exigirme a mí mismo más allá de mi máximo esfuerzo, porque siempre se puede ser mejor. Al Dr. José Sullivan López González el profesor que más admiro porque siempre me motivo en el ámbito académico a buscar retos cada vez más grandes.

A mis compañeros y amigos que estuvieron al lado a lo largo de mi camino por esta gran universidad, Biol. Ana Paola Galicia Gallardo, Biol. Cesar Noé Cortes Rubio, Biol. Leonardo Ramos y a los futuros biólogos Yaxem López Sevilla, Rosa, Dulce, Karla B. Zamora Cristóbal, Jazmín Terán Martínez, Luis Alday López García, Eunice Molina Garduño, Dafne E. Bonilla Cerquedo, Jose L. Ríos Perez, Minerva Ingrein Gonzales López y Omar Chávez.

A mis amigos como el Mat. Jesús Caballero Medrano o el futuro matemático Manuel Carrera y el futuro actuari Gabriel Pérez, aunque por cuestión de espacio no he podido mencionar a todos.

A la Dra. Leonor Huerta Hernández quien ha sido mi asesora y guía a lo largo de todo este trabajo y a quien tengo en gran estima, agradezco sus consejos y paciencia.

Al Dr. Carlos Larralde Rangel por aceptarme en su grupo de investigación y permitirme ser parte de este maravilloso proyecto que me ha permitido desarrollarme tanto académica como personalmente.

A mis Sinodales el Dr. Edmundo Lamoyi por sus siempre oportunas observaciones, a la Dra. Rosa Elena Sarmiento Silva por su interés y aportaciones, a la Dra. María Luisa Escobar Sánchez de quien tuve el gusto de ser alumno al igual que de la Dra. Perla Mariana del Río Estrada y que fueron de suma importancia durante mi formación académica.

Al financiamiento por medio del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (proyectos IN229307 Y IN209811) de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM.

A la Facultad de Ciencias y a la Universidad Nacional Autónoma de México mi alma máter a la que siempre llevare en el corazón con amor y orgullo, y a la cual dedicaré mi vida a engrandecer mediante mi labor profesional.

Contenido

1. Abreviaturas.....	7
2. Resumen.....	9
3. Abstract.....	11
4. Introducción	13
4.1 Estructura de la partícula viral del HIV-1.....	14
4.2 Ciclo replicativo.....	20
4.3 Formación de sincicios mediada por las proteínas de envoltura del HIV-1	23
4.4 El ciclo celular	30
4.5 Regulación del ciclo celular.....	32
4.6 Proteínas del HIV-1 que alteran el ciclo celular	38
4.7 Efecto de la fusión de células sobre el ciclo celular	40
5. Planteamiento del problema	42
6. Objetivo general.....	43
6.1 Objetivos particulares	43
7. Hipótesis.....	44
8. Materiales y Métodos.....	45
8.1 Líneas celulares.....	45
8.2 Condiciones del cultivo celular.....	47
8.3 Inducción de la expresión de proteínas Env	48
8.4 Colorantes de membrana	49
8.5 Marcaje de células con los colorantes de membrana.....	51
8.6 Cocultivos.....	52
8.7 Pulso de BrdU	54
8.8 Cosecha	54
8.9 Estudio de las dinámicas de proliferación de las poblaciones celulares Mediante conteo absoluto	56
8.10 Fusión celular y viabilidad	59

8.11 Análisis del ciclo celular.....	61
8.12 Análisis por citometría de flujo.....	67
9. Resultados.....	69
9.1 Formación de sincicios	69
9.2 Dinámica de las poblaciones en cocultivo.....	75
9.3 Porcentaje de fusión celular	80
9.4 Viabilidad de las células en cocultivo.....	81
9.5 Desarrollo de una técnica para el estudio del ciclo celular en experimentos de fusión de células linfocitarias mediante citometría de cuatro colores.....	89
9.6 Ciclo celular en monocultivos de células CD4 ⁺ y Env ⁺	93
9.7 Ciclo celular en cocultivos de células CD4 ⁺ y Env ⁺	97
10. Discusión.....	105
10.1 Características de los sincicios generados por fusión celular	105
10.2 Dinámicas de las poblaciones en cocultivo (aumento o disminución Del número absoluto de células)	106
10.3 Porcentaje de fusión y efecto del inhibidor T-20.....	108
10.4 Porcentajes de viabilidad de las células en cocultivo.....	108
10.5 Ciclo celular previa y posteriormente a la formación de sincicios	110
11. Conclusiones.....	113
12. Bibliografía.....	116
13. Apéndice A.....	137
13.1 Origen y epidemiología del VIH/SIDA.....	137
13.2 Manifestaciones clínicas tempranas y marcadores de progresión a SIDA	141
13.3 Organización genómica	142
13.4 Descubrimiento de los factores que regulan el ciclo celular.....	145

1. Abreviaturas

7-AAD: 7-amino-actinomicina D.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

APC: aloficocianina, fluorocromo.

ARN: ácido ribonucleico.

ARNm: ácido ribonucleico mensajero.

BrdU: bromodeoxiuridina, análogo de timina.

BSA: albumina sérica bovina por sus siglas en inglés.

CDC: siglas en inglés del Centro para el control y Prevención de enfermedades.

CDK: siglas en inglés de cinasa dependiente de ciclina.

CD4: designador de grupo 4 por sus siglas en inglés, glicoproteína que funciona como receptor en células T, células dendríticas, macrófagos y monocitos, y es empleado por el HIV-1.

DiI: perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3',3'-tetrametilindocarbocianina.

DiO: perclorato de 3,3'-dioctadeciloxocarbocianina.

DMSO: dimetil sulfóxido.

DPBS: solución amortiguadora salina de fosfatos de Dulbecco.

FRET: transferencia de energía de resonancia de Förster, se refiere a que la energía de excitación de un fluorocromo puede transferirse a otro cercano.

FSC: siglas en inglés de dispersión frontal (forward scatter), se detecta la dispersión del láser en un ángulo pequeño que es proporcional al tamaño de la partícula que interfiere entre el láser y el detector.

HIV-1: virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) por sus siglas en inglés.

IP: yoduro de propidio.

LTR: siglas en ingles de las secuencias genómicas del HIV-1 que conforman terminaciones largas repetitivas.

MPF: factor promotor de la mitosis por sus siglas en inglés

PBMC: siglas en ingles de las células mononucleares de sangre periférica.

PHA: fitohemaglutinina.

PMA: forbol 12-miristato 13-acetato.

PIC: siglas en ingles del complejo de preintegración.

RT: reversotranscriptasa o retrotranscriptasa.

SFBI: suero fetal bovino inactivado.

SIDA: síndrome de inmunodeficiencia adquirida.

SIV: siglas en ingles del virus de inmunodeficiencia de los simios.

SSC: siglas en ingles de dispersión lateral (side scatter), se detecta la dispersión del láser en un ángulo de 90 °C que es proporcional a la complejidad o granularidad celular.

2. Resumen

Las células infectadas por el HIV-1 sintetizan y expresan en su membrana las proteínas virales Gp120 y Gp41 (complejo Env). La interacción entre células Env⁺ y los receptores CD4 y CXCR4 de linfocitos no infectados produce la fusión de membranas, conduciendo a la formación de células multinucleadas o sincicios. La formación de células multinucleadas se observa frecuentemente en cultivos *ex vivo* de células infectadas por el HIV, así como en diversos tejidos de individuos portadores del virus. El origen y función de los sincicios en la infección por el VIH están poco estudiados. El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de la formación de sincicios sobre las dinámicas de proliferación, viabilidad y ciclo celular de las poblaciones celulares en cocultivo durante experimentos de fusión celular inducida por las proteínas Env del HIV-1 *in vitro*.

En éste trabajo, se utilizó un modelo experimental que consiste en la utilización de células Jurkat transfectadas con el gene que codifica para las proteínas de envoltura del VIH (células Env⁺), en cocultivo con células Jurkat CD4⁺CXCR4⁺. Las células se marcaron con colorantes fluorescentes de membrana (DiO para las células Env⁺ y DiI para las células CD4⁺), se cocultivaron para permitir la fusión y se analizaron por citometría de flujo. Las células fusionadas se detectaron como células con doble fluorescencia, mientras que las células que permanecieron sin fusionarse como células de un solo color. La cinética de las poblaciones fusionada y no fusionada se determinó mediante un ensayo de citometría de flujo de tres colores, que incluyó la adición de un número fijo de perlas fluorescentes de referencia para calcular el número absoluto de células en cada población. El estudio del ciclo celular durante la formación de sincicios se realizó mediante un ensayo de citometría de flujo de cuatro colores, determinando la incorporación del análogo de nucleótido

bromodeoxiuridina (BrdU) y el contenido relativo de ADN en células fusionadas y no fusionadas (células espectadoras).

Los resultados mostraron que el ciclo celular de las células CD4⁺ no fusionadas (células CD4⁺ espectadoras) en cocultivos es igual al de cultivos control (monocultivos de células CD4⁺), después de 6, 24 y 48 horas. En cambio, las células Env⁺ tienen nula capacidad replicativa tanto en monocultivos como en cocultivos con las células CD4⁺, debido a un detenimiento en la fase G₁. Las poblaciones de células espectadoras (tanto Env⁺ como CD4⁺) disminuyeron desde las primeras 8 horas de cocultivo, coincidiendo con la generación de sincicios (≈20% de las células en cocultivo). Después de 4 días en cocultivo, la población de células CD4⁺ espectadoras muestran un número 10 veces menor a la de células CD4⁺ en cultivos control (monocultivos). La disminución del número de células CD4⁺ no fusionadas en los cocultivos no se debió a una disminución de su capacidad replicativa, sino a su constante reclutamiento en los sincicios. El ciclo celular de los sincicios mostró que durante las primeras seis horas de cocultivo, entre el 60 y 70% presentan síntesis de ADN. Lo anterior, es debido probablemente a las células CD4⁺ en fase S que se incorporaron en los sincicios. Sin embargo, el porcentaje de sincicios que sintetizaron ADN se redujo aproximadamente a la mitad a las 24 horas. Aunque, una parte de los sincicios (≈23%) retienen la capacidad de sintetizar ADN, hasta por 48 horas, aun cuando se inhibió el reclutamiento de más células con la presencia de un inhibidor de la fusión.

3. Abstract

Cells infected by HIV-1 synthesize and express in their membrane the viral proteins Gp120 and Gp41 (Env complex). The interaction between Env⁺ cells and CD4 and CXCR4 receptors on uninfected lymphocytes leads to membrane fusion, resulting in the formation of multinucleated cells or syncytia. The formation of multinucleated cells is frequently observed in *ex vivo* cell cultures infected with HIV, as well as in several tissues of individuals carrying the virus. The origin and function of syncytia in HIV infection is poorly studied. The aim of this study was to determine the effect of the formation of syncytia on the dynamics of proliferation, viability and cell cycle of cell populations in coculture during cell fusion experiments induced by Env proteins of HIV-1 *in vitro*.

In this work, we used an experimental model consisting of Jurkat cells transfected with the gene encoding the HIV envelope protein (Env⁺ cells), in coculture with CD4⁺ CXCR4⁺ Jurkat cells. Cells were labeled with lipophilic fluorescent dyes membrane (DiO for Env⁺ cells and DiI for CD4⁺ cells), were cocultured to allow fusion and analyzed by flow cytometry. Fused cells were detected as double-fluorescent, whereas individual cells remained as single-colored. The kinetics of fused and unfused populations was determined by flow cytometry assay of three colors, which included the addition of a known number of fluorescent beads of reference to calculate the absolute number of cells in each population. The study of the cell cycle during syncytia formation was performed with a flow cytometry assay of four colors. In cells in coculture we determined the incorporation of the nucleotide analog bromodeoxyuridine (BrdU) and the relative content of DNA in fused and unfused cells (bystander cells).

Results showed that the cell cycle of CD4⁺ unfused cells (bystander cells) in cocultures was not modified respective to control cultures (monocultures of CD4⁺ cells), after 6, 24 and 48 hours. In contrast, Env⁺ cells had no replicative capacity both in monoculture and in coculture with CD4⁺ cells, due to an arrest in the G₁ phase. Bystander cells populations (both Env⁺ and CD4⁺) decreased from the first 8 hours of coculture, coinciding with the generation of syncytia (≈20% of the cells in coculture). After 4 days in coculture, CD4⁺ bystander cells populations are 10 times lower than the CD4⁺ cells in control cultures (monocultures). Thus, reducing the number of CD4⁺ cells in coculture was not due to a decrease in their replicative capacity, but its constant recruitment into syncytia. Results of cell cycle of syncytia showed that during the first six hours of coculture, between 60 and 70% have DNA synthesis. This is probably due to CD4⁺ cells in S phase are incorporated into syncytia. However, the percentage of syncytia that syntetized DNA were reduced by approximately half at 24 hours. Although some syncytia (≈23%) retained the ability to synthesize DNA, up to 48 hours, even when inhibited the recruitment of more cells with the presence of a fusion inhibitor.

4. Introducción

El virus de inmunodeficiencia humana adquirida (VIH o HIV por sus siglas en inglés) se descubrió en asociación con el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) (54, 100). La patología característica de dicho síndrome es la marcada reducción de células CD4⁺, lo cual causa inmunosupresión al individuo afectado volviéndolo susceptible a la infección de agentes patógenos oportunistas, además de ser asociado al riesgo de padecer cáncer (26, 27, 170). El HIV-1 es miembro del género *Lentivirus* en la familia *Retroviridae* con los cuales comparte la característica de que su material genético está basado en moléculas de ARN, que en el caso del HIV-1, está constituido por dos hebras de éste ácido nucleico (100).

Los lentivirus constituyen un grupo de diversos virus animales entre los cuales se pueden mencionar el virus de la anemia infecciosa equina, uno de los primeros virus identificados en la naturaleza en 1904 por Vallee y Carre (166). Dicho virus, infecta macrófagos principalmente derivando en problemas de anemia hemolítica autoinmune y encefalopatía (166). El virus de la artritis-encefalitis caprina, que infecta también macrófagos, produciendo inmunodeficiencia, artritis y encefalopatía. El virus de inmunodeficiencia felino (FIV por sus siglas en inglés) y el virus de inmunodeficiencia de simio (SIV por sus siglas en inglés), infectan felinos y primates respectivamente. En ambos casos, la célula blanco para la infección son los linfocitos T, estas infecciones originan inmunodeficiencia y encefalopatías en sus respectivos hospederos (30, 60, 99, 100).

Hacia el año de 1981 se describieron y publicaron los primeros casos de SIDA en jóvenes homosexuales en Nueva York y San Francisco (25, 26, 27). El cuadro clínico era caracterizado por el predominio de enfermedades oportunistas tales como: sarcoma de

Kaposi, neumonía por *Pneumocystis carinii* y una linfadenopatía persistente. En 1983 Barré-Sinoussi y sus colaboradores del Instituto Pasteur recuperaron un virus que poseía actividad de retrotranscripción, en tejido de nódulos linfáticos en hombres con linfadenopatía generalizada persistente (PGL por sus siglas en inglés) (10). Luc Montagnier, investigador del Instituto Pasteur fue quien identificó al VIH como agente causal de tal síndrome, para 1984, Robert C. Gallo publicó evidencia virológica y epidemiológica de que el nuevo virus (HIV-1) era el causante del SIDA.

4.1 Estructura de la partícula viral del HIV-1

Las partículas virales son de forma esférica con un diámetro de alrededor de 100-120 nm, poseen un cono oscuro a la vista del microscopio electrónico (cápside) de un largo aproximado de 100 nm y un ancho de 50 a 40 nm (100) (Fig. 1). La estructura más externa del virión es una bicapa lipídica que constituye la superficie. La bicapa lipídica proviene de la membrana plasmática de la célula hospedera de la que proviene cada virión. De ésta sobresalen proyecciones que son trímeros de estructuras formadas a partir de complejos de dos glicoproteínas llamadas Gp120 y Gp41 (trímeros de complejos Gp120/Gp41). La Gp41 es una glicoproteína que se encuentra anclada a la membrana de la superficie de la partícula, es decir, es transmembranal. Por su parte, la Gp120 se encuentra fuertemente unida a Gp41 a través de enlaces no covalentes en el dominio extracelular de ésta última. Tanto Gp41 como Gp120 derivan de un solo precursor llamado Gp160 el cual es cortado en dos fragmentos, éste precursor común, es codificado por el gene *env*, por lo cual también en su conjunto éstas proteínas son llamadas proteínas Env. La forma y la integridad del virión están dadas por la expresión de los genes de la región *gag*. La matriz se encuentra al

interior de la partícula viral por debajo de la superficie. La proteína Gag p17 constituye a la matriz y se encuentra adherida en la cara interna de la bicapa lipídica de la superficie. La cápside se localiza de manera más interna que la matriz. La proteína Gag p24 forma la estructura de la cápside y nucleocápside. El material genético del virus está asociado a ARNt capturado de la célula hospedera durante el ensamblaje de las partículas virales. Las proteínas producto de la expresión de los genes gag, son p6 y p9 las cuales se encuentran asociadas a las hebras de ARN que constituyen el genoma del virus y son llamadas proteínas de la nucleocápside. Además, la cápside contiene proteínas esenciales para en la capacidad infectiva del virus, éstas son la reversotranscriptasa, la integrasa, y la proteasa. En la Tabla 1, se resume los genes del genoma viral, así como las modificaciones postraduccionales que sufren los transcritos primarios, los productos de éstos y las funciones de los mismos.

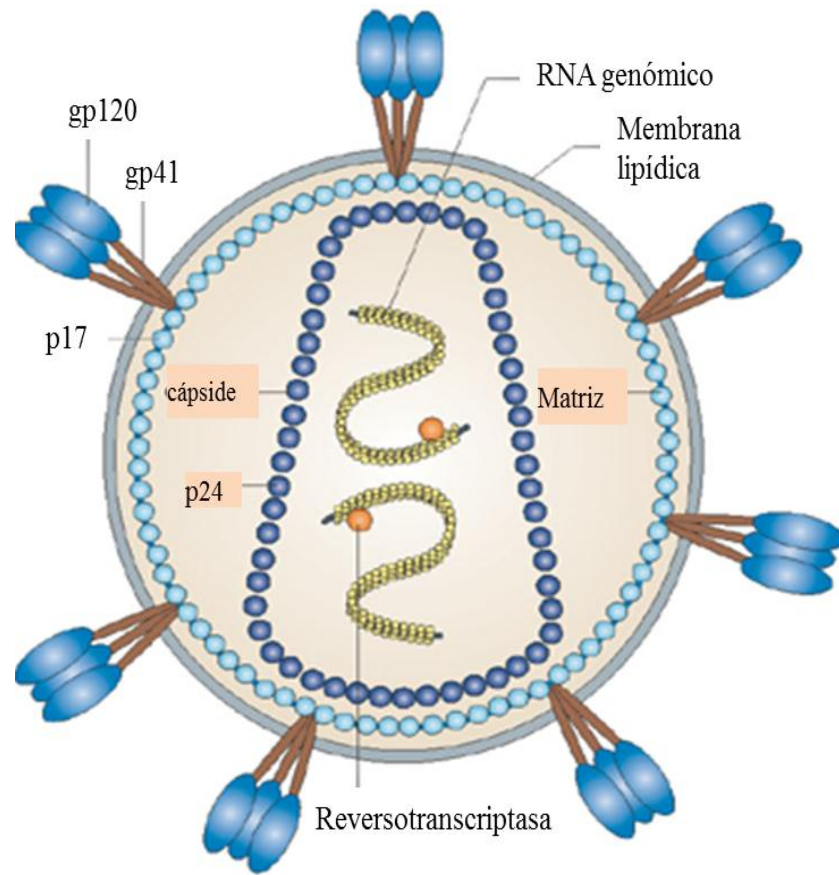


Figura 1. Estructura de la partícula viral del HIV-1. Imagen adaptada de Hedestam GBK *et al*, 2008.

Tabla 1. Clasificación y funciones de las proteínas del HIV-1

Gene	Modificaciones pos-traduccionales	Proteína	Función	Referencias
<i>gag</i>	La proteasa viral corta la poliproteína Gag (Pr55) durante la maduración vírica.	Matriz (MA; p17)	Importación nuclear del PIC (complejo de preintegración por sus siglas en ingles), exportación de los complejos de RNA de <i>gag</i> al citosol, unión a la membrana y formación del virión y PIC.	Gallay <i>et al.</i> , 1995 y 1996. Scarlati y Carter, 2003. Bukrinskaya, 2007. Ganser-Pornillos <i>et al.</i> , 2008.
		Cápside (CA; p24)	Unión a la membrana y formación de la cápside.	Scarlati y Carter, 2003. Bukrinskaya, 2007. Ganser-Pornillos <i>et al.</i> , 2008.
		Nucleocápside (NC; p24)	Unión a la membrana, formación del virión y el PIC, unión al RNA y cofactor de la RT, selección del RNA genómico, empaquetamiento y dimerización durante el ensamble vírico.	Scarlati y Carter, 2003. Bukrinskaya, 2007. Ganser-Pornillos <i>et al.</i> , 2008. Mougel <i>et al.</i> , 2009.
		SP1	Regulación de la tasa de clivaje, unión a la membrana y formación del virión.	Bukrinskaya, 2007. Ganser-Pornillos <i>et al.</i> , 2008.
		SP2	Regulación de la tasa de clivaje, unión a la membrana, gemación del virus y formación del virión.	Bukrinskaya, 2007. Ganser-Pornillos <i>et al.</i> , 2008.
		p6	Recluta a Vpr hacia el virión, el dominio PTAP involucrado en interacciones con proteínas del hospedero, unión a la membrana y formación del virión.	Paxton <i>et al.</i> , 1993. Scarlati y Carter, 2003. Bukrinskaya, 2007. Ganser-Pornillos <i>et al.</i> , 2008. Salgado <i>et al.</i> , 2009.

<i>gag-pol</i>	La poliproteína Gag/pol (Pr160) es cortada por medio de la proteasa durante la maduración del virus.	p6* (polipéptido trasframe; TF)	Estabilización de interacciones Gag-Gag/pol y activación de corte mediante proteasa (PR)	Chiu <i>et al.</i> , 2006.
		Reverso transcriptasa y RNasa H (RT: heterodímero p66/p51 y p15)	Síntesis de ADNc viral (actividad enzimática de reverso transcripción con actividad de ribonucleasa H localizada en la región C-terminal de la subunidad p66).	Basu <i>et al.</i> , 2008. Mougel <i>et al.</i> , 2009.
		Proteasa (PR; p11)	Corte de la poliproteína Gag y la poliproteína Gag/pol, maduración vírica.	Boden y Markowitz, 1998. Louis <i>et al.</i> , 2007.
		Integrasa (IN; p31)	Importación nuclear del PIC, integración del ADNc viral dentro del genoma del hospedero.	Gallay <i>et al.</i> , 1997. Poeschla, 2008. Woodward <i>et al.</i> , 2009.
<i>env</i>	La proteína Env (Gp160) es cortada por proteasas celulares.	Gp120 (SU)	Interacción con el receptor CD4 y correceptores de la célula hospedera.	Melikyan, 2008.
		Gp41 (TM)	Anclaje de los complejos Gp120/Gp41 en la membrana viral, fusión de membranas con la célula blanco.	Weissenhorn <i>et al.</i> , 2007. Melikyan, 2008.
<i>tat</i>		Transactivador (Tat; p16/p14)	Inicio de la transcripción a partir de los LTR virales, remodelación de la cromatina, regulación de la apoptosis, modulación de la respuesta inmune del hospedero.	Seelamgari <i>et al.</i> , 2004. Barboric y Peterlin, 2005. Bolinger y Boris-Lawrie, 2009.
<i>rev</i>		Regulador de la expresión de proteínas virales (Rev; p19)	Control de la integración del provirus, exportación nuclear del ARN viral sin corte y empalme, estimulación de la traducción del ARN viral.	Cullen, 2003. Seelamgari <i>et al.</i> , 2004. Groom <i>et al.</i> , 2009. Levin <i>et al.</i> , 2009. Suhasingi y Reddy, 2009.

<i>nef</i>	Factor negativo (Nef; p27)	Regulación negativa del receptor CD4, regulación negativa de MHC-I y MHC-II, interfiere señales de traducción, mejora la infectividad (rearregla la actina del citoesqueleto).	Stumpter-Cuvelette <i>et al.</i> , 2001. Seelamgari <i>et al.</i> , 2004. Anderson y Hope, 2004. Foster y Garcia, 2008.
<i>vif</i>	Factor de infectividad viral (Vif; p23)	Inactivación de la respuesta inmune del hospedero vía unión a la apolipoproteína B enzima de edición de ARNm (APOBEC3) y del factor regulador de interferón (IRF3).	Seelamgar <i>et al.</i> , 2004. Barraud <i>et al.</i> , 2008. Okumura <i>et al.</i> , 2008.
<i>vpr</i>	Proteína viral R (Vpr; p14)	Importación nuclear del PIC, control de la reversotranscripción, bloqueo del ciclo celular (en fase G ₂), inducción de apoptosis, transactivación de los LTR virales y genes de la célula hospedera, inhibición del corte y empalme de pre-ARNm.	Seelamgari <i>et al.</i> , 2004. Okumura <i>et al.</i> , 2008.
<i>vpu</i>	Proteína viral U (Vpu; p16)	Degradación del receptor CD4, liberación de partículas virales, regulación de la apoptosis.	Seelamgari <i>et al.</i> , 2004. Neil <i>et al.</i> , 2008. Nomaguchi <i>et al.</i> , 2008.

*Tabla adaptada de: Pluta y Kacprzak, 2009.

4.2 Ciclo replicativo

El ciclo de replicación del VIH depende de la infección de una célula humana que exprese el receptor y los correceptores adecuados (Fig. 2). El receptor CD4 de superficie en las células diana es reconocido por las proteínas de envoltura del VIH (trímeros de complejos Gp120/Gp41) (34, 94, 141). Los trímeros Env (en sus regiones V3 de la Gp120) reconocen y se unen de manera no covalente al dominio CDR2 de la molécula CD4. La unión entre Gp120 y los trímeros Env provoca cambios conformacionales que exponen sitios que interactúan con el correceptor, tanto en las Gp120 como probablemente las Gp41 (157) (Fig. 3). Los principales correceptores para la infección por VIH son el receptor para β -quimiocinas CCR5 en macrófagos y el receptor para α -quimiocinas CXCR4 en linfocitos T CD4⁺ (1, 42). La extensión del complejo de fusión trimérico helicoidal ocurre después de la unión al receptor y correceptor. El complejo de fusión está formado por las hélices de los dominios llamados péptidos de fusión de cada una de las Gp41 que integran al trímero. Las hélices amino terminales del complejo de fusión se insertan en la membrana de las células blanco. Los trímeros Env son objeto de un nuevo cambio conformacional que genera un paquete de seis hélices (82). La energía generada debido a esto, es suficiente para ocasionar la formación de un poro de fusión (109, 113, 114). La participación de moléculas de adhesión de la misma célula facilita el proceso de fusión, al interactuar con sus ligandos que se encuentran en la membrana del virión. Aún se desconoce el número de trímeros que participan en los procesos de fusión de membranas. Sin embargo, modelos matemáticos muy serios intentan dilucidar cuantos trímeros de Env requiere una partícula viral para poder infectar una célula. Algunos autores han sugerido que solo se requiere un trímero funcional (185), lo cual podría explicar el por qué aún a pesar de la alta tasa de errores en la

síntesis de las proteínas Env, la patogenicidad del VIH es tan elevada. No obstante, éstos resultados han sido controvertidos y cuestionados (108).

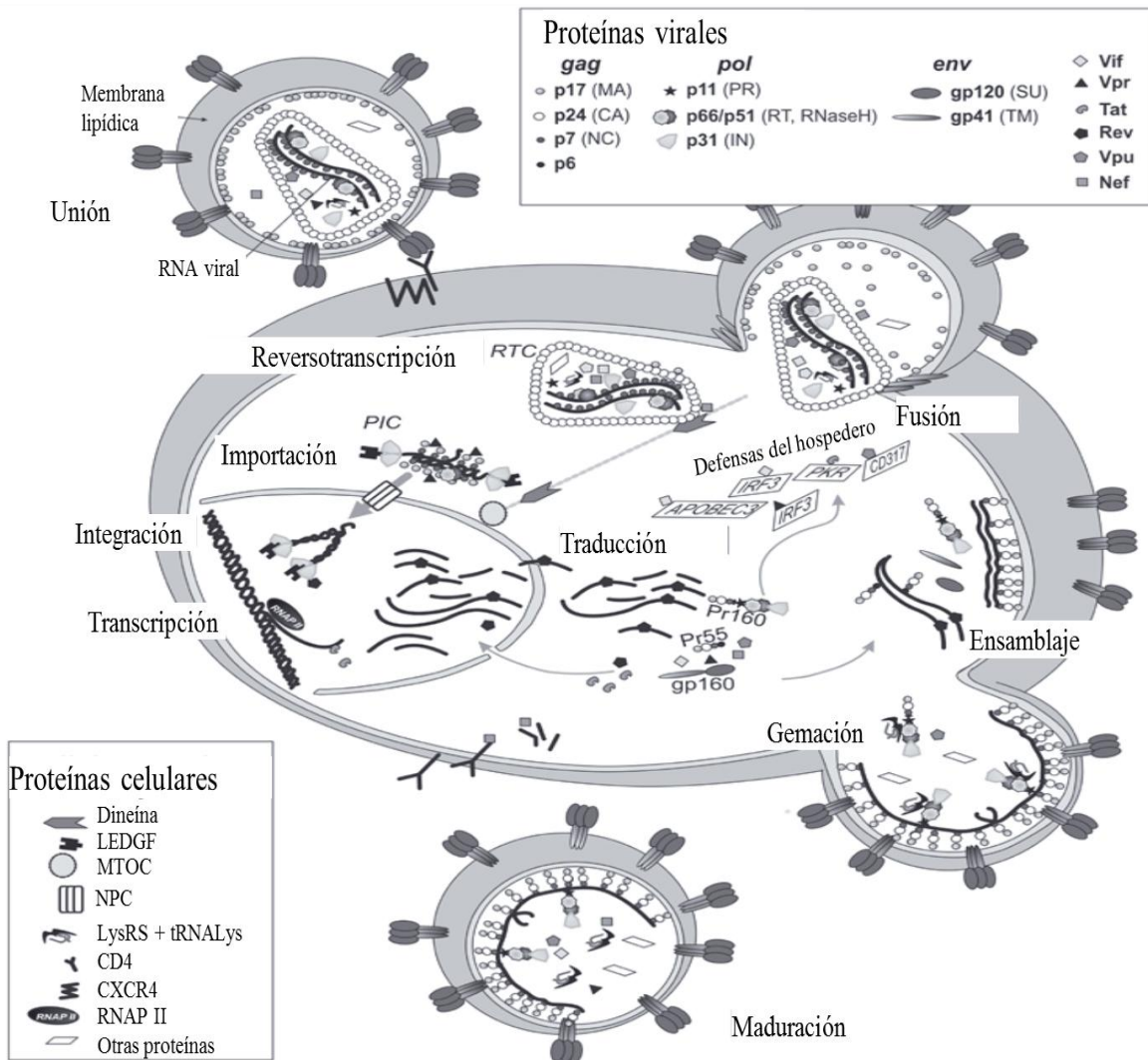


Figura 2. Ciclo replicativo del HIV-1. Imagen adaptada de Pluta y Kacprzak, 2009.

El tropismo es más marcado hacia la infección a macrófagos durante los estadios tempranos de la infección. Lo anterior ocurre porque las partículas virales son inicialmente tóxicas al correceptor CCR5. Un cambio de tropismo ocurre con el avance de la enfermedad, hacia el correceptor CXCR4 característico de linfocitos.

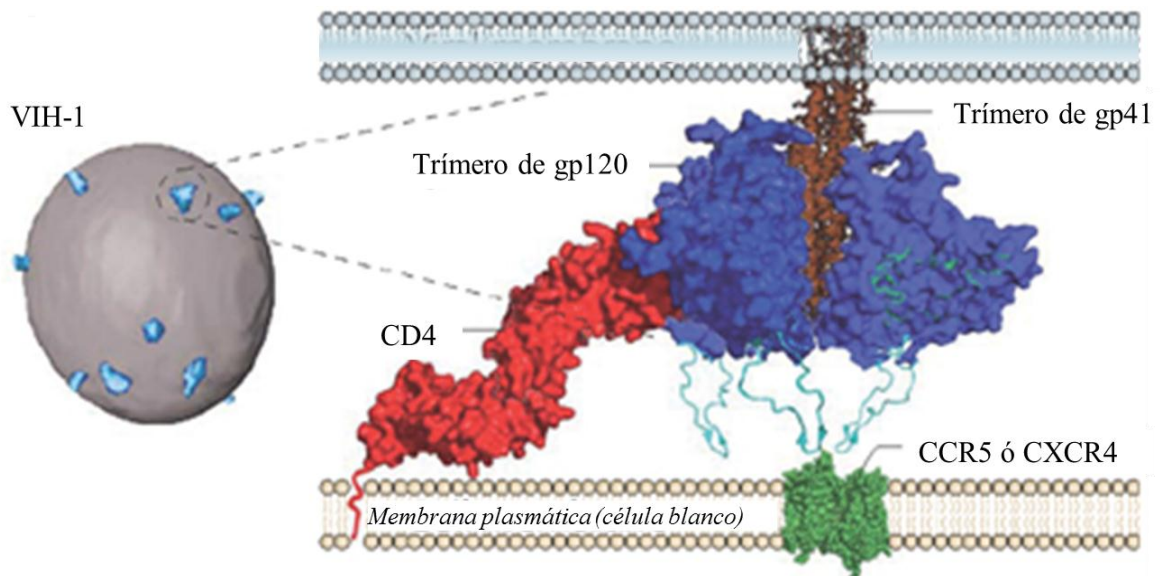


Figura 3. Interacción de las proteínas Env del HIV-1 con su receptor y correceptor en la célula blanco. Imagen adaptada de Karlsson Hedestam GB *et al.*, 2008.

La liberación de la cápside viral hacia el citoplasma ocurre después de la fusión de membranas entre la célula blanco y la partícula viral. La proteína Nef induce un rearrreglo de la actina favoreciendo el desplazamiento de la cápside a través de la barrera de actina cortical subyacente a la membrana plasmática (22). La actina facilita el movimiento de corto alcance de la cápside del virus a otra región del citoplasma periférico y posteriormente los une a los microtúbulos para el transporte eficiente hacia el núcleo celular (112). La cápside se ancla al poro nuclear y tras ocurrir la retrotranscripción ocurre la descapsidación para formar el complejo de preintegración (PIC). El PIC es transportado al interior del núcleo, donde el ADN viral puede integrarse al material genético del hospedero. La observación del tráfico de la cápside viral en células vivas marcando la tubulina con compuestos fluorescentes, permitió visualizar cómo ésta se desplaza a lo largo

de los microtúbulos hacia el núcleo celular (112). También, la integrasa se ha marcado con fluorescencia y se ha visto cómo atraviesa hacia el compartimiento nuclear mostrando una cinética característica de los microtúbulos y de la actina (7). Las proteínas estructurales del virus son capaces de autoensamblarse y son transportadas hacia la membrana plasmática de la célula. Sin embargo, la formación de partículas infecciosas de HIV-1 maduras depende de la separación de los componentes de Gag (Pr55) y Gag-pol (Pr160) por parte de la proteasa (107, 141).

4.3 Formación de sincicios mediada por las proteínas de envoltura del HIV-1

La formación de sincicios se asocia a la patogénesis de la enfermedad y es considerada con un posible mecanismo que contribuye a la depleción de células CD4⁺ (41, 186). Las células infectadas por el HIV-1 sintetizan las proteínas de las partículas virales y las propias. Las proteínas Env son de gran importancia ya que son transportadas a la membrana plasmática de la célula hospedera en forma regulada (115). La presentación de los trímeros Env en la superficie de la célula hospedera provoca la formación de uniones entre éstas células y una célula CD4⁺ y en presencia de linfocitos T CD4⁺. Las uniones ocurren por la interacción de las proteínas Env con el receptor CD4 y el correceptor de la célula blanco, con la participación de moléculas de adhesión. La energía para el acercamiento y la fusión de membranas está dada por el cambio conformacional en el dominio de Gp41 denominado como péptido de fusión (109, 113, 114).

La baja cantidad de virus libre y de células infectadas en la sangre durante la etapa asintomática de la infección, se tomó como base inicialmente para postular una relación directa entre el nivel de viremia y la condición clínica de los afectados. Posteriormente se

descubriría que la replicación viral en estadios tempranos es más activa de lo que se consideraba, ya que la actividad se focaliza en los ganglios linfáticos y no en la sangre (61, 137). La progresión de éste fenómeno lleva a la subsecuente pérdida progresiva de los tejidos linfoides hasta la degeneración completa de la estructura ganglionar en individuos con SIDA (137). Partiendo de éste punto, se puede considerar la importancia en la detección de sincicios multinucleados en biopsias de ganglios linfáticos de personas y chimpancés infectados con el HIV-1 y SIV respectivamente (20). Así como las implicaciones de sincicios multinucleados infectados, derivados de macrófagos detectados en el cerebro y medula espinal de pacientes con VIH (164).

La aparición de cepas HIV-1 inductoras de sincicios se ha asociado con fallas en la homeostasis celular (77), la acelerada disminución de linfocitos T CD4⁺ y progresión a SIDA (13, 140). La formación de sincicios quizás es importante en la depleción de CD4⁺ resultado de la lisis de células no fusionadas o su incorporación a los sincicios (21, 52, 65). La fusión celular en la infección por HIV-1 abre la posibilidad de que el virus se disemine más rápidamente, aun en presencia de anticuerpos dirigidos contra el mismo, escapando a la vigilancia inmunológica (186). El proceso de fusión de membranas celulares también se ha asociado a citopatogenicidad y muerte celular (21, 92, 103). En estudios *ex vivo* mediante biopsias de tejidos de individuos infectados con HIV-1, se ha detectado la presencia de sincicios en aproximadamente el 50% de las personas que progresan a SIDA. En dichos pacientes se asocia con encefalopatía aguda y demencia, ya que se encontró sincicios en el cerebro y nódulos linfático (46, 123, 136, 176). La presencia de sincicios se ha detectado además, en amígdalas (en células detriticas de la mucosa nasofaríngea),

adenoides, centros germinales y nódulos linfáticos periféricos y axiales en personass infectadas (45, 46, 136, 176).

Estudios *in vitro* demuestran que la formación de sincicios es un evento citopático que origina muerte celular y es dependiente del complejo proteico Gp120/Gp41 (21). Los sincicios presentan pobre viabilidad presentando apoptosis después de un periodo de días (93), muy probablemente debido a una iniciación fallida de la mitosis en las células fusionadas (24, 43). Sin embargo, en otros sistemas retrovirales los sincicios pueden permanecer viables por largos periodos de tiempo (98). Por otra parte, como se mencionó antes, es interesante el hallazgo frecuente de sincicios en diversos tejidos de individuos infectados por el VIH (18, 45, 136, 176). En ciertos casos los tejidos provinieron de personas asintomáticas y siempre presentaron replicación viral activa (87, 149). Éstas observaciones indican que las células fusionadas podrían generarse y mantenerse viables *in vivo*, actuando como reservorios naturales de virus, los cuales se encontrarían inaccesibles a la acción del sistema inmune. Debido a la heterogeneidad de los sincicios, es probable que no todos los resultados posibles de la fusión celular inducida por el VIH hayan sido investigados por los grupos que han abordado éste problema.

Proponemos que la fusión celular podría tener otras consecuencias posibles, antes de, o además de conducir a la muerte de las células fusionadas. Dada la heterogeneidad en la conformación de los sincicios, es probable que no todos los resultados posibles de la fusión celular inducida por el VIH hayan sido investigados por los grupos que han abordado éste problema. Las posibilidades incluyen el “rescate” de las células infectadas por la fusión con células sanas y la promoción o reducción de la replicación viral (dependiendo del estado de activación de las células fusionadas). Además, la reducción del

número de células en el microambiente, la modificación del fenotipo celular, la recombinación de virus de distintas cepas dentro de los sincicios y la producción de citocinas con efectos sobre tejidos circundantes (71).

En el Instituto de Investigaciones Biomédicas nuestro grupo ha diseñado una estrategia experimental para abordar el estudio de la fusión celular. Nuestro modelo se basa en el uso de líneas celulares linfocíticas humanas transfectadas con los genes *env* y *rev* de una variante altamente fusogénica del HIV-1 (denominadas como células Env⁺) (21). en cocultivo con células blanco portadoras del receptor CD4 y el correceptor CXCR4. La fusión celular se manifiesta en pocas horas con la formación de células gigantes multinucleadas (69, 70, 71, 106). El análisis cuantitativo de la fusión se efectúa mediante un método consistente en la tinción de las células antes de la fusión con colorantes lipofílicos fluorescentes (rojo para las células CD4⁺ y verde para las células Env⁺). Las células marcadas se cocultivan y una vez que la fusión ha tenido lugar, todas las células en el cocultivo son analizadas por citometría de flujo. Por lo tanto es posible cuantificar la proporción de células fusionadas (partículas con fluorescencia mixta), así como la proporción de las células no fusionadas de cada tipo (partículas de un solo color) en la población total (70) (Fig. 4). Herramientas metodológicas adicionales permiten comprobar la mezcla de los contenidos citoplasmáticos en las partículas con fluorescencia mixta, distinguir entre agregados celulares y sincicios (células fusionadas) (70). Así como estimar la proporción en que se reclutan las células CD4⁺ y las células Env⁺ en los sincicios (106). El análisis por citometría de flujo facilita asimismo el estudio de las características funcionales de las poblaciones celulares (fusionadas y no fusionadas) mediante el uso de colorantes fluorescentes adicionales (151). La fusión mediada por éste procedimiento es

sensible a anticuerpos monoclonales y policlonales anti-CD4, anti-Gp120 y a concentraciones nanomolares del péptido T-20, inhibidor de la infección por el HIV (68, 70)

Dado que la cuantificación de la fusión celular es objetiva y automática, éste sistema es útil para explorar y caracterizar rápidamente el efecto de múltiples compuestos con potencial para inhibir la fusión mediada por las proteínas de la envoltura viral. Utilizando ésta metodología hemos reportado que el efecto de los anticuerpos del suero de individuos seropositivos al HIV sobre la fusión celular se relaciona significativamente con los indicadores clínicos de la infección (cuenta de linfocitos T CD4⁺ en la sangre, carga viral y estadio clínico) (68).

El análisis por citometría de flujo presenta la ventaja de que permite el análisis simultáneo de las células fusionadas y de las células que permanecieron sin fusionarse (células espectadoras) en el mismo pozo de cultivo. De éste modo, es posible determinar las

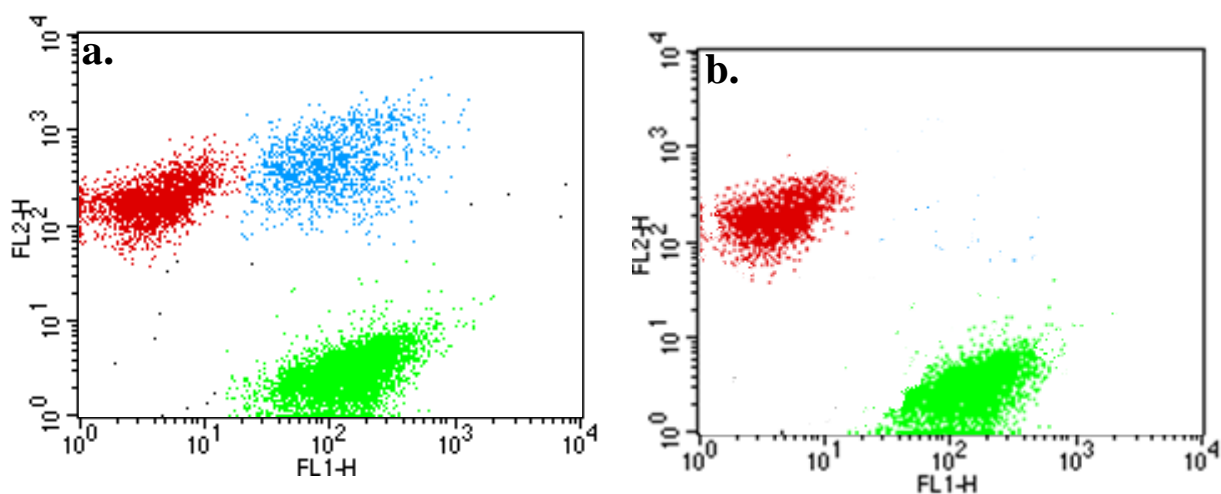


Figura 4. Análisis de la fusión celular entre linfocitos T por citometría de flujo. **a)** Formación de sincicios (*azul*) en cocultivos entre células CD4⁺ (*rojo*) y células Env⁺ fusogénicas (*verde*), **b)** control negativo de fusión en cocultivos entre células CD4⁺ (*rojo*) y células Env⁺ no fusogénicas (*verde*).

características de las células que no se reclutaron en los sincicios pero que permanecen en la vecindad de las células fusionadas, siendo blancos probables de factores solubles producidos por éstas.

Utilizando citometría de flujo, en el laboratorio se ha mostrado que la fusión celular inducida por las proteínas de fusión del VIH es un proceso altamente heterogéneo en el cual se generan sincicios y heterocariontes que difieren en tamaño, composición celular y viabilidad (70, 106, 150). Asimismo, la expresión de moléculas de superficie importantes para la función de los linfocitos T (CD28, ICAM-1, CXCR4 y CD3) se mantiene en más del 80% de los sincicios, con un nivel de expresión heterogéneo (Rivera-Toledo, 2010a). La expresión de CD4 tanto en las células Env⁺ como en los sincicios es prácticamente nula (151) (Tabla 2). Aunado a la expresión de receptores inmunes, los sincicios tienen la capacidad de producir interleucina-2 en respuesta a la estimulación con PMA e ionomicina, así como para expresar el receptor para ésta interleucina (CD25), ambos a niveles similares a los de las células individuales (151).

Tabla 2. Expresión de marcadores de células en cocultivo

Marcador	Células CD4 ⁺		Células Env ⁺		Sincicios* (%)
	Control (%)	Cocultivadas* (%)	Control (%)	Cocultivadas* (%)	
CD4	51.7 ± 11.4	23.2 ± 3.7	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
CD28	92.8 ± 3.0	94.5 ± 3.3	96.7 ± 2.4	96.2 ± 3.1	88.2 ± 9.7
ICAM-1	49.4 ± 7.8	52.4 ± 6.7	79.5 ± 4.2	79.0 ± 5.1	70.9 ± 4.6
CXCR4	82.7 ± 6.0	83.7 ± 5.1	69.8 ± 8.3	71.8 ± 8.7	83.9 ± 0.4
CD3	93.4 ± 1.6	92.7 ± 0.2	62.4 ± 3.8	66.9 ± 3.7	97.1 ± 2.3

* Células obtenidas de cocultivos de ocho horas.

Datos tomados de: Rivera-Toledo *et al*, 2010a

Cabe resaltar que nuestros estudios muestran que aproximadamente el 60% de las células fusionadas que se generan *in vitro* se componen de 2 a 4 células, mientras que menos del 20% corresponde a células gigantes (con 6 núcleos o más) (70, 106). Así, la presencia *in vivo* de sincicios formados por células T podría pasar desapercibida si son productos de fusión de pocas células, prácticamente indistinguibles de las células normales. La anterior posibilidad ha sido propuesta también por J. Sodroski y cols., a partir del estudio de variantes patogénicas de quimeras simio-humano de virus que causan inmunodeficiencia en macacos, en los cuales la capacidad fusogénica de la envoltura viral se asoció con la disminución de células CD4⁺ (41).

Una observación consistente durante las investigaciones desarrolladas en nuestro laboratorio, es la fuerte disminución de la expresión del receptor CD4 en la membrana citoplasmática tanto de los sincicios como de los heterocariontes (150, 151). Por lo tanto, existe la posibilidad de que muchos de los sincicios generados durante la infección *in vivo*, consistan de sincicios pequeños y prácticamente negativos para la expresión de CD4. Éstas características dificultarían la identificación de las células fusionadas generadas durante la infección humana. El conocimiento de las características de las células fusionadas *in vitro* promovería el diseño de estrategias para evaluar la extensión y el potencial patogénico de la fusión celular *in vivo*. En conjunto, nuestros estudios señalan que las células fusionadas constituyen una fuente de variabilidad funcional, cuyos efectos pueden incidir en la respuesta inmune y en la replicación viral.

4.4 El ciclo celular

El ciclo celular es un proceso altamente regulado y sumamente complejo (76), en las células eucariotas se divide en cuatro fases G_1 , S, G_2 y M (124, 130). Un ciclo replicativo consiste en la secuencia de eventos que ocurren después de la división celular de una célula en mitosis que originó dos células hijas, y que terminan en una subsiguiente división celular con la cual el ciclo vuelve a comenzar. Después de que la célula progenitora se ha dividido, las células hijas pueden permanecer en un estado de quiescencia que muchos autores denominan G_0 . Lo anterior ocurre principalmente en caso de tejidos diferenciados, la célula quiescente es inducida a reingresar al ciclo celular mediante estímulos mitogénicos (143).

La fase G_1 comprende el lapso entre una división mitótica y la síntesis de ADN para el proceso de replicación. Durante ésta fase la célula incrementa su metabolismo para la producción del material enzimático, la replicación de sus organelos, producción de los desoxiribonucleotidos y estructuras membranosas para la renovación de los componentes del retículo endoplasmático (76). Además de que otras moléculas y estructuras citoplasmáticas también aumentan en número, se sintetizan también microtúbulos, microfilamentos de actina y ribosomas, los cuales están compuestos por subunidades proteicas (13). Como resultado de todo lo anterior el tamaño de las células aumenta.

En la fase S del ciclo celular en la cual se lleva a cabo el proceso de replicación del material genético y que es caracterizado por la síntesis de hebras de ADN complementario a partir de las hebras molde que originalmente poseía la célula. Se generan así dos copias del material genético y se denomina a ésta condición como diploide. También durante la fase S se sintetizan las histonas H1, H2a, H2b, H3 y H4 necesarias para el

empaquetamiento de la cromatina en los núcleos de las futuras células hijas. Además de proteínas asociadas al ADN como las ADN polimerasas, ligasas, topoisomerasas entre otras (124).

La fase G₂ comprende la etapa después de la replicación del ADN y hasta antes del inicio de la mitosis. Durante éste tiempo, las células se preparan para la división mitótica sintetizando enzimas necesarias para la etapa de mitosis y ocurre un importante punto de revisión donde el material genético es censado a fin de detectar daños al ADN que pudieran haber ocurrido durante la replicación (76).

La división mitótica de las células ocurre durante la fase M, que se encuentra subdividida en profase, metafase, anafase, telofase y citocinesis. Al inicio de la profase ocurre la condensación de la cromatina que origina los cromosomas visibles mediante el microscopio óptico. Además ocurre la polarización a ambos lados del núcleo, de los centrosomas y se comienza el ensamblaje del huso cromático. Por último se desensambla la envoltura nuclear (126). En la metafase los microtúbulos que constituyen al huso cromático reconocen la región del cinetocoro de cada cromosoma y los alinean en el plano ecuatorial, constituyendo así la placa ecuatorial (4). Es en la anafase cuando ocurre la segregación de las cromátides hermanas en cada cromosoma hacia cada uno de los extremos del huso cromático separando cada juego de copias del material genético en dos agrupaciones distintas de cromosomas. Durante la telofase se originan dos envolturas nucleares cada una de las cuales rodea un juego de copias del material genético (126). Por último ocurre la citocinesis que es la separación del citoplasma hacia dos células hijas de manera aproximadamente equitativa. Lo anterior inicia con la formación de un anillo contráctil (constituido por filamentos de actina) en el ecuador de la célula progenitora que constriñen

el citoplasma a tal punto que se da la completa separación de los citoplasmas y membranas plasmáticas. Una vez concluida la división mitótica el ciclo vuelve a su punto de partida.

4.5 Regulación del ciclo celular

Las concentraciones de distintas ciclinas y cinasas dependientes de ciclinas (CDK por sus siglas en inglés) varían con una regularidad periódica a lo largo del ciclo celular (76). Cada complejo ciclina/CDK es característico de cada fase y regula distintas cascadas de señalización que derivan en actividades específicas realizadas durante las mismas. En mamíferos se han identificado hasta nueve cinasas dependientes de ciclinas distintas que son enumeradas como CDK1 al CDK9. Además, se han logrado identificar dieciséis ciclinas distintas las cuales son; A, B1, B2, C, D1, D2, D3, E, F, G1, G2, H, I, K, T1 Y T2 (76). Todas las ciclinas poseen una región homóloga fuertemente conservada llamada “cyclin box” que es un dominio que se une y activa a su respectiva CDK. No todas las ciclinas ni todas las CDK participan en la regulación del ciclo celular, algunas se han visto involucradas en mecanismos de reparación del ADN, diferenciación, apoptosis y regulación de la transcripción (76).

La participación de las ciclinas de tipo D (D1 y D2) al inicio del ciclo celular es necesaria para inducir la entrada a la fase G_1 de células quiescentes (165). Las ciclinas tipo D se asocian a CDK4 en etapas tempranas de la fase G_1 , y en estadios más tardíos de ésta fase tienden a asociarse a CDK6. Los complejos de ciclinas de tipo D con CDK4 o CDK6 tienen la capacidad de fosforilar la proteína Rb que se encuentra formando un complejo con las proteínas E2F y DP. La proteína Rb fosforilada se disocia de éste complejo (Rb/E2F/DP) represor de la transición de fase G_1 a fase S (159). E2F y DP continúan

formando un complejo que actúa ahora como un activador de señales que conducen a la síntesis de ADN y a la codificación de proteínas que regulan la progresión del ciclo celular (ciclina E, ciclina A y CDK1) (76, 159).

La formación del complejo ciclina E/CDK2 es necesaria para llevar a cabo la transición de la fase G₁ a fase S (132). Al entrar en la fase S las concentraciones de ciclina E y CDK2 son muy elevadas y el complejo que conforman mantiene hiperfosforilada la proteína Rb y por ello la disocia del complejo E2F/DP (66). La concentración del complejo ciclina E/CDK2 disminuye dramáticamente conforme avanza la fase S, hasta prácticamente desaparecer (159). La concentración de ciclina A aumenta y compite con la ciclina E por la unión a CDK2, por lo que aumenta la concentración del complejo ciclina A/CDK2. El complejo ciclina A/CDK2 fosforila al complejo E2F/DP en la proteína DP y provoca de ésta manera su inactivación (66).

La ciclina A asociada a CDK2 es necesaria para la entrada en fase S y para completar dicha fase. La entrada en fase M requiere del complejo ciclina A/CDK1 (53, 96, 179). La ciclina A después de asociarse a CDK2, procede posteriormente a asociarse a CDK1 en etapas tardías de la fase S. Las concentraciones de dicho complejo permanecen más o menos constantes a lo largo de la fase G₂ y hasta el comienzo de la fase M cuando empiezan a decrecer. En contraste, las concentraciones del complejo ciclina B1-B2/CDK1 aumentan, ya que éste complejo se requiere para la salida de la fase G₂ (76).

La acción sinérgica de los complejos de ciclina A/CDK1 y ciclina B1-B2/CDK1 regula la entrada en mitosis (6, 86). La activación del complejo ciclina B/cdk1 produce cambios característicos de la fase M como resultado de la fosforilación de sustratos de dicho complejo. La ruptura de la membrana nuclear durante la mitosis se produce por la

fosforilación las laminas A, B y C de la membrana nuclear y a la vimentina, por parte del complejo ciclina B/CDK1 (128). Otro sustrato susceptible de fosforilación por dicho complejo es la histona H1, cuyo estado fosforilado permite una adecuada condensación de los cromosomas durante la profase (129). El complejo ciclina B/CDK1 (llamado en ocasiones factor promotor de la mitosis ó MPF por sus siglas en inglés) fosforila también a la p60^{SrC}, la nucleolína, el antígeno SV40, la ARN polimerasa II y el factor de elongación Ef-1 γ . Generando respectivamente la reorganización del citoesqueleto, la reorganización del nucléolo, la replicación del ADN y la inhibición de la transcripción, procesos que ocurren al inicio de la fase M (117, 128). La salida de la fase M requiere de la degradación de las ciclinas A y B, evidencia sugiere que ésta es regulada por el complejo ciclina B/CDK1 (8). En la anafase, los complejos ciclina A o B/CDK1 se inactivan mediante la degradación de las ciclinas vía proteosoma y la inactivación de la CDK1, los sustratos de éste complejo tienden a desfosforilarse y esto representa el fin de la mitosis (36, 122).

Los inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (CKI por sus siglas en inglés) son proteínas que promueven la detención del ciclo celular en respuesta a diversas señales intrínsecas y/o extrínsecas. Éstas señales pueden ser: procesos de senescencia, inhibición por contacto, activación de un punto de revisión (control de comprobación del ciclo celular) y señales antiproliferativas (73).

En mamíferos se han logrado identificar dos familias de CKI (73, 184). Las proteínas de la familia CIP/KIP (del inglés kinase inhibitor protein) son p21^{Cip1}, p27^{Kip1} y p57^{Kip2}. Los inhibidores bloquean la actividad de la cinasa al unirse a los complejos ciclina/CDK y reconocen los complejos ciclina E/CDK2, ciclina A/CDK2, ciclina A/CDK1, ciclina B/CDK1 y posiblemente ciclina D/CDK4 y ciclina D/CDK6. Mientras

que en la familia INK4 (del inglés inhibidor of CDK4) se encuentran las proteínas p15^{INK 4b}, p16^{INK 4a}, p18^{INK 4c} y p19^{INK 4d}. Los miembros de la familia INK4 inhiben específicamente a CDK4 y CDK6 cuando se encuentran en forma de monómeros (73, 76, 184).

Adicionalmente existen muchos más genes involucrados en la regulación del ciclo celular, entre los cuales se encuentra el protooncogen *c-myc* que tiene la capacidad de inhibir o activar la proliferación celular. El gene *c-myc* influye en la formación y actividad de complejos de ciclina/CDK. El gene *c-myc* además codifica para un factor de transcripción (proteína c-Myc) dependiente de la asociación con el factor Max para su activación, dicho complejo es necesario para que ocurra la mitogénesis (2, 3). Los factores de crecimiento favorecen la expresión de *c-myc*, lo que induce la entrada al ciclo celular de células en fase G₀ (40). La proteína c-Myc activa la transcripción de CDC25A, una fosfatasa con capacidad de activar a CDK. La expresión de CDC25 es necesaria para la activación del ciclo celular inducida por *c-myc* (48).

La transición de la fase G₁ a fase S también requiere de la proteína c-Myc, y su inhibición origina un bloqueo de la proliferación (64). La proteína c-Myc participa en la inducción de genes que codifican para CDK4, ciclina A, ciclina D1, ciclina D2, ciclina E y E2F. Además, regula negativamente al inhibidor p27^{kip1} y a otros genes que detienen el ciclo celular como GADD45, p15^{INK 4b}, y p21^{Cip1}. Sin embargo, altos niveles de expresión de *c-myc* inducen la actividad de p19^{INK 4d}, que secuestra a la proteína mdm-2 conduciendo a un bloqueo del ciclo celular o a apoptosis mediante la actividad de p53 (3).

Existen tres isómeros de la fosfatasa CDC25, éstos son CDC25A, CDC25B y CDC25C. Durante la transición de la fase G₁ a S participa CDC25A que al fosforilarse se activa actuando a nivel del complejo ciclina E/CDK2, fosforilando a CDK2 y promoviendo

su actividad de cinasa. Las fosfatasas CDC25B y CDC25C participan en la transición de la fase G₂ a M que al fosforilarse son activadas y desfosforilan a CDK1 activando su función de cinasa, promoviendo la entrada en la fase M (88, 91, 116, 121). La concentración de ésta fosfatasa se va acumulando a lo largo del ciclo celular y el sobrepasar un nivel umbral de concentración es la señal de inicio de la fase M independientemente de las condiciones externas. Ésto tiene efecto sobre el complejo ciclina A o B/CDK1, e indica que la duplicación del ADN ha terminado (90). Los productos de los genes *weel* y *mikl* inhiben la entrada en mitosis de la célula al impedir la desfosforilación de la CDK1, la proteína Weel es una proteína cinasa que hiperfosforila a la CDK1 y por ésta vía la inactiva (187).

Los puntos de revisión son etapas específicas del ciclo celular donde la progresión y estado de la célula es de cierta manera censado a fin de minimizar el riesgo de alteraciones de diversa índole. Los dos principales puntos de revisión del ciclo celular la transición G₁/S y la transición G₂/M.

El punto de revisión G₁/S controla la transición de la fase G₁ a fase S y los principales involucrados en éste proceso son la ciclina D, ciclina E, CDK2, CDK4, CDK6, CDC25A, E2F, Rb, p21^{Cip1} y p27^{kip1} (143). Una de las vías principales por las cuales se puede inducir un bloqueo del ciclo celular es mediante la vía de daño al ADN en la cual ATR/ATM inducen la actividad de p53, chk1 y chk2. La proteína p53 activa al inhibidor p21^{Cip1}, el cual regula negativamente a CDK2 (73, 184). Por otro lado, chk1 y chk2 inhiben la actividad de la fosfatasa CDC25A. La activación de p21^{Cip1} y la inhibición de CDC25 A conducen a un detenimiento en fase G₁ (76, 143).

Los factores de crecimiento son reconocidos por sus receptores respectivos y activan a la proteína Akt, la cual reprime la vía de Fox0. La proteína Fox0 que tiene la

capacidad de activar a los inhibidores p15^{INK 4b}, p21^{Cip1} y p27^{Kip1} (83). La acción de ciertas hormonas puede activar a p19^{INK 4d}, señales de diferenciación pueden activar a p18^{INK 4c}, señales de senescencia replicativa y de respuesta al estrés inducido por luz ultravioleta activan a p16^{INK 4a}. Todas las vías anteriores inhiben la actividad de las cinasas CDK4 y CDK6 (184).

El punto de revisión G₂/M ocurre una vez que el ADN se ha duplicado y se da una revisión de la integridad del material genético. En caso de haber daño al ADN, la vía de señalización que se activa es mediante ATM/ATR. Dicha vía incrementa las concentraciones de p53 y se activa su función. La función de p53 es inducir la actividad de inhibidores de CDK1 (p21^{Cip1}, GADD45, reprimó y 14-3-3, éste último secuestra a CDK1 y produce su exclusión del núcleo celular) (187). La vía de ATM/ATR como ya se ha mencionado activa a chk1 y chk2 que inhiben a CDC25. La ausencia de desfosforilación en CDK1 por CDC25 y la hiperfosforilación de CDK1 ocasionada por la proteína Wee1, producen el detenimiento del ciclo celular por inhibición de la formación del complejo ciclina B/CDK1 (187).

En ambos puntos de revisión se puede ver involucrada la vía de daño al ADN donde la activación de p53 puede inducir el paro del ciclo celular (y mecanismos de reparación del material genético activados por ATM/ATR) o el fenómeno de apoptosis, los mecanismos por los cuales se decide entre una u otra opción siguen sin ser esclarecidos en su totalidad.

4.6 Proteínas del HIV-1 que alteran el ciclo celular

Las alteraciones al ciclo celular en células infectadas por virus son relativamente comunes, tales son los casos de los virus que inducen tumores debido a las células infectadas en constante progresión a través del ciclo celular (HTVL-1, poliomavirus, adenovirus y papilomavirus) (188). El virus Herpes simplex tipo 1 (HSV-1) bloquea la transición de la fase G₁ a fase S y evita la fosforilación de la proteína Rb, lo que estabiliza el complejo Rb/E2F manteniendo inactiva a E2F (39, 168). El citomegalovirus humano lleva a cabo un bloqueo similar mediante la proteína UL69 (63). La proteína NS1 de parvovirus en ratones induce un paro del ciclo celular en fase G₂ (135). Otros virus que alteran el ciclo celular son el del sarampión y el virus de simio 5 (SV5, que arresta a la célula infectada en fase G₂) (104). Entre muchas de las implicaciones citopáticas que conlleva la infección por HIV-1 se encuentran las alteraciones al ciclo celular de las células blanco, las cuales consisten básicamente en el paro del ciclo en fase G₂. Las proteínas virales que se ha reportado tienen efecto sobre el ciclo celular son Gp120, Vpr, Vif y Tat (29, 35, 38, 67, 79, 133, 152, 153, 154, 187).

La Gp120 produce el detenimiento del ciclo celular en células linfocíticas dependientes de IL-2, en células CD8⁺ obtenidas de PBMC activadas con PHA (153, 154) y en células progenitoras neuronales (133). La unión de Gp120 soluble con receptores de quimiocinas (CXCR4 y CCR5) de células progenitoras neuronales desencadena una cascada de señalización. Dicha cascada termina con la fosforilación y activación de p38MAPK, que fosforila y activa a MAPK2. La proteína cinasa MAPK2 fosforila a la fosfatasa CDC25 e inhibe su actividad, bloqueando la transición a fase S (133). Éste mismo mecanismo podría posiblemente presentarse en linfocitos T y monocitos. En células

linfocitarias, el detenimiento en fase G_1 se debe a la disminución de la expresión de ciclina E (153, 154).

La proteína Vpr produce el detenimiento del ciclo celular en fase G_2 , ya que induce la actividad de la proteína Wee1 (67, 79, 152). La proteína Vpr inhibe la actividad de la fosfatasa CDC25, impidiendo la formación del complejo ciclina B/CDK1. Además, el estado fosforilado de CDK1 es susceptible de secuestro en el citoplasma debido a la acción de la proteína 14-3-3 (67, 187).

La expresión del gen Vif induce el paro en fase G_2 de células infectadas de manera independiente de Vpr (152). La proteína Vif interactúa con la ligasa Cullin 5-ElonginB/CE3 (APOBEC3) para unirse a la citidina desaminasa (lo que posee actividad antiviral). La interacción entre Vif y APOBEC3 provoca la poliubiquitinación y degradación de APOBEC3, vía proteosoma (35, 180). La actividad de Vif y Vpr es sinérgica produciendo un mayor porcentaje de células detenidas en fase G_2 . Sin embargo, algunos autores postulan que Vif prolonga la duración de la fase G_2 , más que un detenimiento (35).

La proteína Tat tiene la capacidad de disminuir las concentraciones de la proteína p53, lo cual ha sido asociado a la posible formación de neoplasias, e inhibe específicamente la actividad de p21^{Cip1} produciendo la pérdida del punto de revisión G_1/S (29). En la Tabla 3 se resumen los efectos de las proteínas virales sobre el ciclo celular de las células blanco.

Tabla 3. Proteínas del HIV-1 que alteran el ciclo celular

Proteína	Efecto sobre el ciclo celular	Referencias
Gp120	Detiene el ciclo celular en fase G ₁ , mediante la unión a receptores de citocinas de células blanco, de manera independiente de CD4. Desencadena una vía de señalización que bloquea la transición G ₁ /S por la disminución de ciclina E e inhibición de la fosfatasa CDC25.	Sakaida <i>et al.</i> , 1997 y 1998. Donnellan <i>et al.</i> , 1999. Okamoto <i>et al.</i> , 2007.
Vpr	Detiene el ciclo celular en fase G ₂ , mediante la activación de la proteína Wee1, la inhibición de la fosfatasa CDC25 y la hiperfosforilación de CDK1.	Jowett <i>et al.</i> , 1995 Sakai <i>et al.</i> , 2006
Vif	Detiene el ciclo celular en fase G ₂ de manera independiente de Vpr.	Sakai <i>et al.</i> , 2006. Wang <i>et al.</i> , 2007. DeHart <i>et al.</i> , 2008.
Tat	Acelera la transición G ₁ /S, disminuyendo la concentración de p53, inhibe la acción de p21 ^{Cip1} .	Clark <i>et al.</i> , 2000.

4.7 Efecto de la fusión de células sobre el ciclo celular

Un evento de fusión celular desencadena una serie de cambios en la arquitectura y función celular. Durante la formación de sincicios heterofásicos (fusión de células en distintas fases del ciclo celular) puede ocurrir una sincronización del ciclo celular en fase S o al inicio de la mitosis (56, 75, 145, 146).

La fusión entre una célula en fase G₁ y otra en fase S, induce rápidamente la síntesis de ADN en el núcleo la primera célula. Lo anterior, reduce el tiempo de duración de la fase G₁ y prolonga la duración de la fase S. En dichos casos se observa la progresión del ciclo celular de éstos sincicios por más de una ronda proliferativa (181).

La sincronización del ciclo celular no ocurre al fusionar células en fase G₂ con células en fase S, aunque tampoco la síntesis de ADN en el núcleo de la segunda célula es inhibida (56, 146). En el ejemplo anterior, la duración de la fase S no es afectada por los elementos citoplasmáticos inductores de la síntesis de ADN (56, 57). La fusión de células

en fase G₂ con células en fase G₁ o S, ocasiona que el núcleo de la célula en fase G₂ no pueda entrar en mitosis (56, 146).

Cuando se fusiona una célula en fase M con alguna célula en interfase (fase G₁, S o G₂), el núcleo en interfase puede perder su envoltura nuclear, su nucléolo y ocurre un proceso de condensación cromosómica prematura (PCC por sus siglas en inglés) (56, 74, 111, 144, 145). Los cromosomas prematuramente condensados provenientes de núcleos en fase G₁ solo poseerán una cromátide, mientras que los cromosomas provenientes de núcleos en fase G₂ tendrán dos cromátides hermanas. El PCC ocasiona inestabilidad cromosomal (172).

La fusión celular generada por el cocultivo de células HeLa que expresan CD4 con células HeLa que expresan Env, condujo a los sincicios a una catástrofe mitótica (muerte celular durante la metafase) por la inhibición de chk2 (23). La catástrofe mitótica provoca la liberación de citocromo c de la mitocondria, mediante la activación de la caspasa 2 (23, 43).

La formación de sincicios por la fusión de células linfocitarias CD4⁺ con células linfocitarias Env⁺ tiene muchas interrogantes sin respuesta. Tales interrogantes son: ¿todos los sincicios mueren a causa de las alteraciones debidas a la fusión celular? ¿ocurre la sincronización del ciclo celular de los núcleos, al fusionar células CD4⁺ en fase S con células Env⁺ detenidas en fase G₁? ¿pueden los sincicios continuar a través del ciclo celular?

5. Planteamiento del problema

En la infección por HIV-1, las células infectadas pueden expresar las proteínas de la envoltura del virus en su membrana plasmática. Lo anterior hace posible su interacción y fusión con células CD4⁺ circundantes, formando células multinucleadas (sincicios). Dicho fenómeno es factible de ocurrir tanto *in vitro* como *in vivo*.

Las implicaciones funcionales de la formación de sincicios pudieran ser muy diversas. Dichas implicaciones incluyen la reducción del número de células CD4⁺ en el microambiente, la modificación del fenotipo celular y la producción de citocinas con efectos sobre células circundantes. Además de que pudieran constituir un reservorio viral que presente replicación viral activa. Por otra parte, es posible que no todos los sincicios mueran a causa de las alteraciones debidas a la fusión celular es probable. Adicionalmente, existe la posibilidad de que los sincicios tengan la capacidad de continuar el ciclo celular y replicarse. Lo anterior, podría relacionarse con el estado del ciclo celular en que se encuentran las células al momento de fusionarse.

6. Objetivo general

Determinar el efecto de la formación de sincicios sobre las dinámicas de proliferación, viabilidad y ciclo celular de las poblaciones celulares en cocultivos entre células CD4⁺ y células Env⁺ fusogénicas durante experimentos de fusión de celular inducida por las proteínas Env del HIV-1.

6.1 Objetivos particulares

- Determinar el efecto de la formación de sincicios sobre la dinámica de la proliferación celular en cocultivos de células CD4⁺ con células Env⁺.
- Determinar el efecto del péptido inhibidor de la fusión T-20 sobre la proliferación subsecuente de las células CD4⁺, en cocultivos donde ya se ha permitido la formación de sincicios.
- Determinar la viabilidad de las poblaciones celulares durante la generación de sincicios.
- Determinar el perfil del ciclo celular de células Jurkat CD4⁺ y Env⁺ controles (no cocultivadas).
- Caracterizar la evolución del ciclo celular en la población de sincicios y en las células no fusionadas en los cocultivos hasta por cuarenta y ocho horas.
- Identificar el efecto de la formación de los sincicios sobre la proliferación de células CD4⁺ que no se fusionan (espectadoras).

7. Hipótesis

Los sincicios generados por la fusión de células linfocitarias $CD4^+$ con células linfocitarias Env^+ , podrían tener efectos sobre las células no fusionadas circundantes (espectadoras). Dichos efectos se reflejarían en la capacidad proliferativa de éstas células espectadoras.

La formación de sincicios podría causar una disminución del número de linfocitos $CD4^+$ no fusionados circundantes. La disminución de células $CD4^+$ pudiera ser causada por su reclutamiento continuo en sincicios, a la inducción de muerte celular, o bien su disminución de capacidad replicativa.

8. Materiales y Métodos

8.1 Líneas celulares

Se utilizaron tres líneas celulares de origen linfocítico, las Jurkat E6-1 que expresan constitutivamente CD4 y el receptor de citocinas CXCR4, derivadas de una línea celular de leucemia linfoblástica aguda. Las células Jurkat E6-1 (células CD4⁺) presentan mutado el gen *p53* por lo cual se encuentran en continua proliferación.

Las Jurkat HXBc2 son células provenientes de una línea de linfocitos CD4⁺ doblemente transfectadas. Dichas células poseen un plásmido regulador derivado del plásmido pHUD15-1. Dicho plásmido codifica para la proteína tTA (transactivador controlado por tetraciclina). La proteína tTA posee un dominio de represión dependiente de tetraciclina (TetR) y la región C-terminal de la proteína VP16 del virus herpes simplex. El plásmido regulador contiene además la secuencia promotora de citomegalovirus humano, una secuencia señal de poliadenilación SV40 (Virus de simios 40 por sus silgas en inglés) y un gen de resistencia a geneticina (21). Las células Jurkat HXBc2 poseen un segundo plásmido (pUHD10-3hygENV), el cual posee un sitio promotor dependiente de la proteína tTA debido a que tiene secuencias operador de tetraciclina (TetO). El plásmido pUHD10-3hygENV posee además un promotor de citomegalovirus humano, una resistencia a higromicina y los genes *rev* y *env* del HIV-1. El gene *env* proviene de la cepa viral HXBc2 con tropismo a linfocitos y altamente fusogénica (21).

Las Jurkat 522 F/Y son células con un fondo genético idéntico a las Jurkat HXBc2, y también son doblemente transfectadas con un plásmido regulador idéntico y un plásmido de respuesta cuya única diferencia radica en que el gene *env* proviene de una cepa HXBc2

mutada (21). Ésto se traduce en una sustitución en aminoácidos de fenilalanina por tirosina en posición 522 de la glicoproteína Gp41, en la región denominada péptido de fusión. La tirosina evita la inserción del péptido de fusión en la membrana plasmática de la célula blanco, lo que impide la formación del poro de fusión y la fusión de membranas. Las células Jurkat 522 F/Y pueden expresar los trímeros del complejo Gp120/Gp41, ya que la mutación no afecta la síntesis, el procesamiento del precursor, la asociación de las subunidades, el transporte a la superficie celular ni la unión a CD4. Dichas células solo pierden su capacidad fusogénica.

Las células HXBc2 (Env^+ fusogénicas) y las células 522 F/Y (Env^+ no fusogénicas) representan sistemas de expresión inducible por tetraciclina para la expresión de las proteínas de envoltura codificadas por el gene *env* de HIV-1. Dicha expresión inducible se presenta cuando se retira la tetraciclina del medio, de modo que ésta ya no se una a la región tetR de la proteína tTA (de expresión constitutiva dada por el plásmido regulador). El dominio tetR se une a las secuencias operador (tetO) del plásmido de respuesta al no haber impedimento estérico. Posteriormente, la región C-terminal de la proteína VP16 actúa como activador y promueve la expresión de los genes *env* y *rev* (Fig. 5). El gene *rev* es necesario para el adecuado corte del precursor Gp160, el ensamblaje de los complejos Gp120/Gp41, así como su transporte y presentación en la membrana plasmática (21).

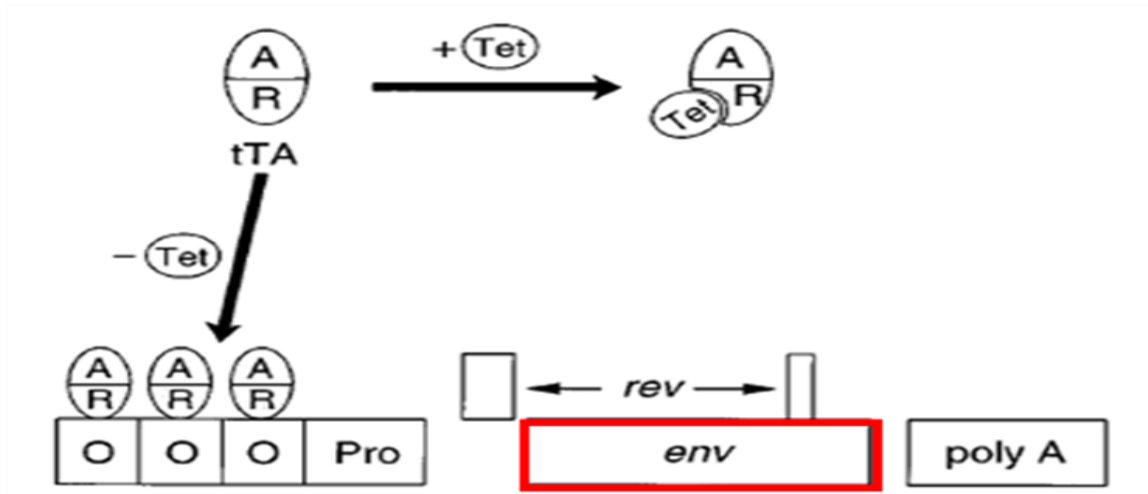


Figura 5. Modelo del sistema para la expresión inducible de las proteínas Gp120/Gp41 del HIV-1. Cao, *et al*, 1996.

Tanto las células Jurkat HXBc2 como las Jurkat 522 F/Y fueron donadas por el Dr. Joseph Sodroski (Harvard medical school, Boston, Mass). Las células Jurkat E6-1 fueron donadas por el Dr. Robin Wess. Las donaciones se realizaron a través del Programa de Reactivos de Referencia e Investigación en SIDA (AIDS RRRP por sus siglas en inglés).

8.2 Condiciones del cultivo celular

El cultivo de las líneas celulares Jurkat se llevó a cabo en medio RPMI 1640 con 2 gr/L de bicarbonato de sodio y suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (SFBi). Se adicionó 50 U/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomicina. La densidad celular se mantuvo superior a 2×10^6 células/ml, ya que el cultivo de células Jurkat en altas densidades actúa probablemente como un factor ambiental benéfico para su crecimiento, viabilidad y expresión de CD4.

Las células HXBc2 y 522 F/Y requirieron para su cultivo (además de las condiciones antes descritas) la adición de 1 µg/ml de tetraciclina para inhibir la expresión de proteínas virales. Además de geneticina (G418) a 200 µg/ml e higromicina a 200 µg/ml, para mantener la selección de las células transfectadas.

Los cultivos se mantuvieron en una incubadora a 37°C en una atmósfera controlada con 5% de CO₂. Se realizaron cambios totales de medio cada tres días debido a que la tetraciclina adicionada al medio de las líneas celulares HXBc2 y 522 F/Y se descompone a 37°C.

8.3 Inducción de la expresión de proteínas Env

Las líneas celulares HXBc2 y 522 F/Y se indujeron para la expresión de las proteínas Env (Gp120/Gp41) en la membrana plasmática. La inducción se realizó al retirar el medio con tetraciclina. Para esto, la suspensión celular se centrifugó a 1150 rpm por 3 min en tubos de 50 ml y se descartó el sobrenadante. Posteriormente, el paquete celular se resuspendió en 30 ml de buffer fosfato salino de Dulbecco (DPBS) y se lavó centrifugando y descartando el sobrenadante, éste último paso se repitió en dos ocasiones más. El DPBS utilizado es una solución salina que contiene 200 mg/L de cloruro de potasio (KCl), 200 mg/L de fosfato monopotásico (KH₂PO₄), 8 gr/L de cloruro de sodio (NaCl) y 2.16 gr/L de fosfato disódico heptahidratado (Na₂HPO₄*7H₂O) que posee un pH de 6.7 a 7.4.

El paquete celular se resuspendió en medio RPMI suplementado y adicionado con geneticina e higromicina (200 µg/ml de ambos antibióticos). La suspensión celular se llevó a una nueva botella de cultivo, las células se guardaron nuevamente en la incubadora a 37°C en una atmósfera controlada con 5% de CO₂ por tres días más. Las células que a

partir de ese momento presentan las proteínas de envoltura del HIV-1 en su membrana plasmática son llamadas células Env^+ fusogénicas en el caso de las HXBc2 y células Env^+ no fusogénicas en el caso de las 522 F/Y.

8.4 Colorantes de membrana

Las células CD4^+ (Jurkat E6-1) se marcaron con el colorante de membrana DiI (1,1'-Dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametil-Indocarbocianina). El DiI tiene un espectro de absorción en longitudes de onda (λ) entre los 450 y 575 nm con máximo de absorción a una λ de 551 nm, y un espectro de emisión en λ entre los 550 y 650 nm con un máximo de emisión en una λ de 569 nm.

Las células Env^+ (Jurkat HXBc2 y Jurkat 522 F/Y) se marcaron con el colorante de membrana DiO (nombre abreviado del perclorato de 3,3'-Dioctadeciloxacarbocianina). El DiO tiene un espectro de absorción en λ entre los 405 y 520 nm con un máximo de absorción a una λ de 489 nm, y un espectro de emisión en λ entre los 475 y 550 nm con un máximo de emisión a una λ de 506 nm (Fig. 6).

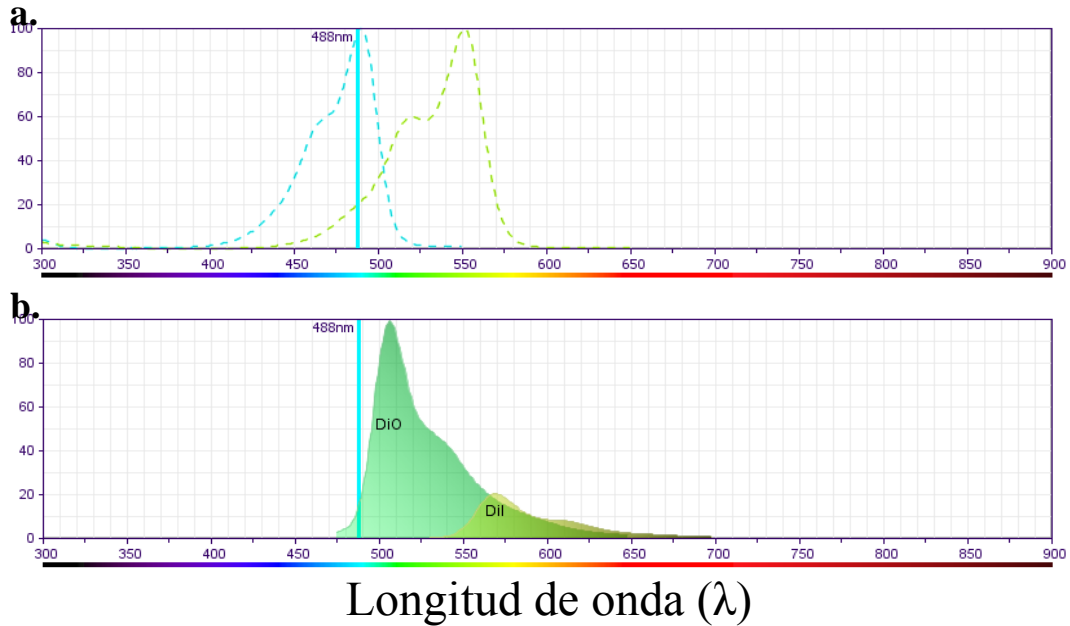


Figura 6. Espectros de absorción y emisión de los colorantes DiO y DiI. **a)** espectro de absorción del DiO (*azul*) y del DiI (*verde olivo*), **b)** espectro de absorción del DiO (*verde claro*) y del DiI (*verde olivo*). El láser utilizado para excitar a ambos colorantes tiene una longitud de onda de 488 nm, logra un 99.2% de excitación del DiO y un 20.5% de excitación del DiI. Información de www.bdbiosciences.com (Fluorescence Spectrum Viewer).

Ambos colorantes tienen un grupo carbocianina que posee dos colas constituidas por una cadena hidrocarbonada de 18 carbonos (Fig. 7). Las colas hidrocarbonadas se intercalan entre los fosfolípidos de la membrana plasmática y los colorantes se quedan fijados a las células.

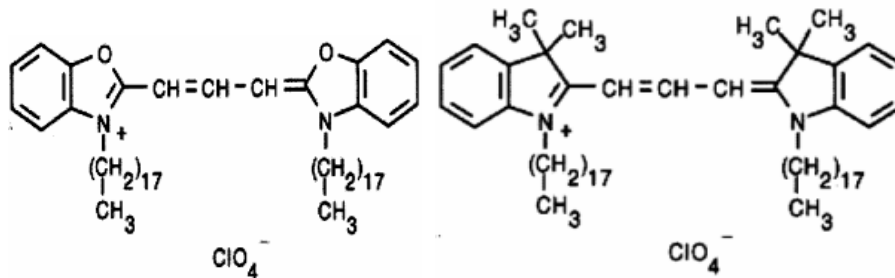


Figura 7. Estructura química de los colorantes lipofílicos de membrana DiO (*izq*) y DiI (*der*). Ambos presentan dos colas de 18 carbonos que se inserta en la capa externa de la membrana plasmática.

Los colorantes DiI y DiO en polvo se disolvieron en dimetil sulfóxido (DMSO). Las soluciones de trabajo de dichos colorantes tienen una concentración de 350 µg/ml, y se mantuvieron protegidas de la luz y a temperatura ambiente.

8.5 Marcaje de células con los colorantes de membrana

Las células se marcaron un día antes del ensayo de fusión, es decir dos días después de la inducción. Las células se transfirieron a tubos de 15 ml y se centrifugaron a 1150 rpm durante 3 min y se descartó el sobrenadante (para eliminar el medio de cultivo). La concentración celular se ajustó a 5×10^6 células/ml de medio RPMI suplementado con 10% de SFBi.

En los experimentos de conteo absoluto, las células Env⁺ se marcaron con 5 µl de la solución de trabajo del colorante DiO, por cada mililitro de suspensión celular; mientras que las CD4⁺ se marcaron con 5 µl de la solución de trabajo del colorante DiI, por cada mililitro de suspensión celular. Sin embargo, en los experimentos de ciclo celular y viabilidad, las células Env⁺ se marcaron con 6 µl de la solución de trabajo del colorante DiI, por cada mililitro de suspensión celular; mientras que las células CD4⁺ se marcaron con 4 µl de la solución de trabajo, por cada mililitro de suspensión celular. La cantidad de DiO se aumentó para potenciar el efecto de FRET y reconocer mejor la población doble fluorescente. En contraste, la cantidad de DiI se redujo para no interferir con la señal de fluorescencia de la 7-Amino-actinomicina D (7-AAD). La incubación de las células con los colorantes fue por 15 min en la oscuridad y agitación constante.

El exceso de colorante (disuelto en el medio RPMI suplementado) se retiró al centrifugar las células a 1150 rpm durante 3 minutos y descartar el sobrenadante. Las células se lavaron dos veces con 10 ml de medio RPMI suplementado. Por último, las células se resuspendieron en medio RPMI suplementado y se mantuvieron a una concentración entre 2×10^6 y 2.5×10^6 células por mililitro. A las células Env⁺ se adicionó nuevamente las concentraciones antes descritas de higromicina y geneticina (se mantuvieron las condiciones de inducción sin tetraciclina). Finalmente, las células se guardaron en la incubadora a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂.

8.6 Cocultivos

Las células se transfirieron a tubos de 15 ml, se centrifugaron a 1150 rpm durante 3 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron en 1 ml de medio libre de suero AIM-V. Las células viables se contaron con el hemocitómetro y se ajustó la concentración de la suspensión celular a 2×10^6 células/ml de medio. Se emplearon placas de cultivo con 48 pozos. A cada pozo de cocultivo se añadió 500,000 células CD4⁺ (250 µl de suspensión celular) y 500,000 células Env⁺ (250 µl de suspensión celular). En los pozos de monocultivo se depositaron 500,000 células (250 µl de suspensión celular) de una sola línea celular (CD4⁺, Env⁺ fusogénica o Env⁺ no fusogénica). La placa de cultivo se incubó a 37°C en una atmosfera de 5% de CO₂, antes de colectarse para su adquisición en el citómetro de flujo.

Se llevaron a cabo cocultivos de células $CD4^+$ marcadas con DiI y células Env^+ fusogénicas marcadas con DiO, la fusión de células se puede apreciar a partir de dos horas de cocultivo (Fig. 8). El control negativo para la fusión celular consistió de cocultivos entre células Env^+ no fusogénicas marcadas y células $CD4^+$ marcadas, los dos tipos de cocultivos se realizaron en paralelo.

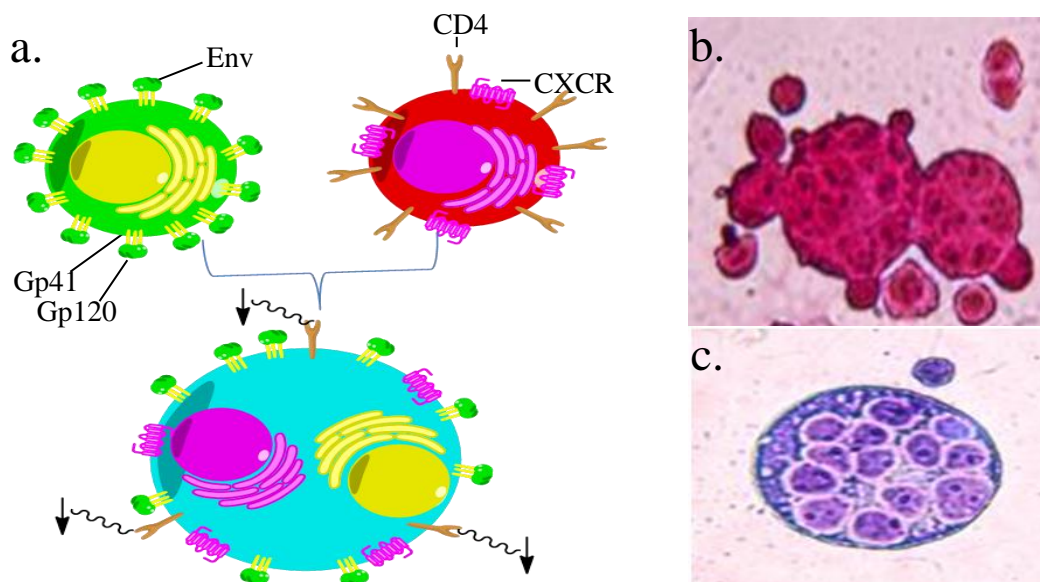


Figura 8. Formación de sincicios. a) Representación esquemática de cocultivos entre células $CD4^+$ (rojo) y células Env^+ fusogénicas (verde), con la subsecuente formación de sincicios (azul). Las flechas en negro señalan la regulación negativa de CD4 Imagen de autoría propia realizada mediante el software ChemBio Draw; b) Fusión de sincicios y células individuales, tinción con Fucsina 40X; c) Sincicio con 13 núcleos y una célula individual circundante, tinción con Giemsa 40X.

El efecto del inhibidor de fusión T-20 (que se une a una estructura intermedia de la Gp41 y evita el cambio conformacional, necesario para la fusión de membranas) se probó en cocultivos de células $CD4^+$ con Env^+ fusogénicas. La adición del T-20 se llevó a cabo a partir de las 6 u 8 horas de cocultivo (posterior a la formación de sincicios), evitando la formación de nuevos sincicios después de éste tiempo. El T-20 se adicionó a partir de las

6 horas de cocultivo en experimentos de fusión, viabilidad o ciclo celular y a partir de las 8 horas de cocultivo en experimentos de conteo absoluto.

El T-20 se disolvió en DPBS, estableciendo la concentración de T-20 de dicha solución en 9800 µg/ml. A los pozos de cocultivo se agregó 1 µl de dicha solución por cada 100 µl de suspensión celular. La concentración de T-20 en cada pozo fue de 98 µg/ml de suspensión celular.

8.7 Pulso de BrdU

La 5-bromo-2-deoxyuridina (BrdU) es un análogo de la timina que se incorpora al ADN durante la fase S del ciclo celular. La BrdU se adicionó a los pozos con células en experimentos de ciclo celular. Se preparó una solución 0.65 mM de BrdU en buffer Perm/Wash 1X. El pulso de BrdU se dió al añadir 20 µL de dicha solución a cada pozo de cultivo durante los últimos 45 minutos de incubación, antes de cosechar las células. La incubación con la BrdU fue a 37 °C en una atmosfera con 5% de CO₂.

8.8 Cosecha

La colecta o cosecha de las células en cocultivo, así como de sus controles en monocultivo se llevó a cabo a las 6, 24, 48 y 72 horas después de colocar la placa de cultivo, para el caso de los experimentos de fusión y viabilidad. Para experimentos de ciclo celular, las células se incubaron en cocultivo y monocultivo por 6, 24 y 48 horas. Para los experimentos de conteo absoluto se prefirió colectar a las 0, 8, 24, 48, 72 y 96 horas, para

ampliar la ventana de tiempo y correlacionar los números de las distintas poblaciones celulares con respecto a un tiempo cero.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación correspondiente, el contenido de cada pozo se transfirió a un tubo de citometría distinto. Las células en cada tubo se lavaron con 1 ml de buffer y se centrifugaron a 1150 rpm durante 3 minutos (para experimentos de fusión, viabilidad y conteo absoluto) o 5 minutos (en experimentos de ciclo celular). El sobrenadante se descartó y el exceso de buffer de lavado se retiró absorbiendo con una gasa estéril por decantación.

El buffer de lavado empleado en la cosecha varió según el tipo de experimento que se realizó. Cuando solo se analizó la fusión y viabilidad en muestras sin fijar, el buffer consistió en DPBS. En cambio, en los experimentos de ciclo celular se utilizó un buffer de lavado a base de DPBS + 3% de SFBI + 0.1% de azida de sodio. El buffer de lavado en los experimentos de conteo absoluto, consistió en DPBS + 0.5% de albumina sérica bovina (BSA) + 0.1% de azida de sodio.

8.9 Estudio de las dinámicas de proliferación de las poblaciones celulares mediante conteo absoluto

El uso de perlas fluorescentes es usual para determinar el número absoluto de células en muestras como es el caso de conteo de células CD4⁺ y CD8⁺ en muestras de personas infectadas con HIV-1 o bien para el conteo de células CD34⁺ en muestras de leucoféresis (17, 160). El conteo absoluto de las células en cada pozo se realizó con la ayuda de perlas TruCOUNT. Las células y las perlas fluorescentes se analizaron inmersas en un buffer DPBS + 0.5% BSA + 0.1% azida de sodio (la presencia de proteínas minimizó la variación en el conteo absoluto con perlas fluorescentes) (17).

Las células después de cosechadas se resuspendieron en 300 µL de buffer de lavado (DPBS + 0.5% BSA + 0.1% de azida de sodio). Por otra parte, el paquete 50,000 perlas TruCOUNT se resuspendió en 1 ml de buffer de lavado. La suspensión de 1 ml de buffer de lavado con 50,000 perlas se utilizó para tomar cuatro alícuotas de 200 µL (con 10,000 perlas). Cada alícuota se llevó a un tubo de citometría distinto que contenía a las células de cada pozo en 300 µL de buffer de lavado. El contenido final de cada tubo de citometría consistió de las células de cada pozo en 500 µL de buffer de lavado y diez mil perlas TruCOUNT.

Las suspensiones celulares con perlas fluorescentes se analizaron en un citómetro de flujo FACSCalibur. La fluorescencia de las perlas TruCOUNT se puede detectar por medio de cualquiera de los cuatro detectores de dicho equipo. La fluorescencia de las perlas se registró por medio de los detectores FL-4 y FL-3 (Fig. 9). Las muestras se analizaron en el citómetro de flujo hasta que se registraron 500 perlas fluorescentes.

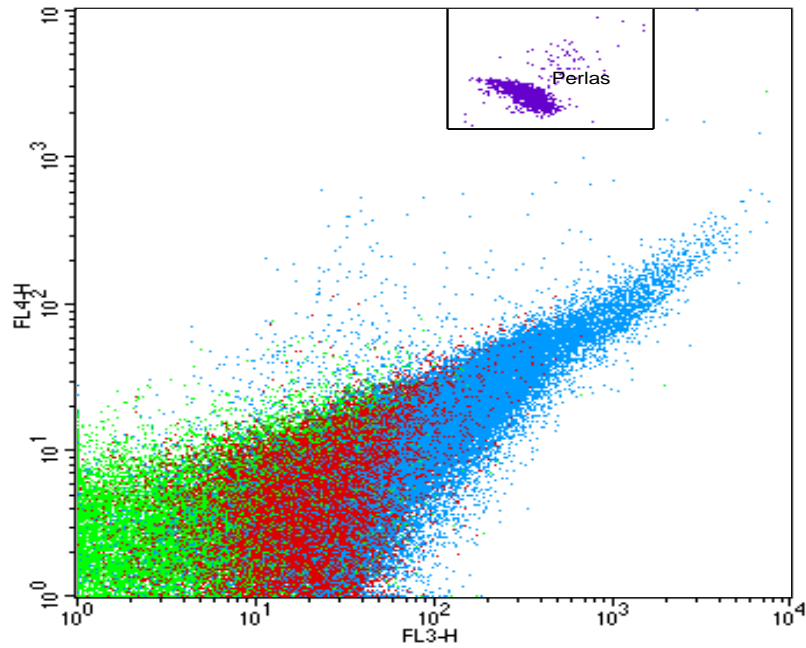


Figura 9. Ejemplo de la manera en que se identificaron y se seleccionaron las perlas TruCOUNT (*morado*), lo que sirve para contabilizar un número fijo de perlas. Se pueden distinguir por su distinto patrón de fluorescencia de células Env⁺ fusogénicas (*verde*), células CD4⁺ (*rojo*) y sincicios (*azul*).

A partir de los parámetros de tamaño contra granularidad se delimitó la población principal (R1) ya que ésta corresponde a la población de células viables (Fig. 10). Se determinó el número absoluto de células en cada muestra con base en la siguiente fórmula:

$$\text{Número absoluto de células} = (C_1) \frac{P_1}{P_2}$$

Dónde:

P₁ = número de perlas totales en el tubo.

P₂ = número de perlas adquiridas por el citómetro.

C₁ = número de células adquiridas por el citómetro.

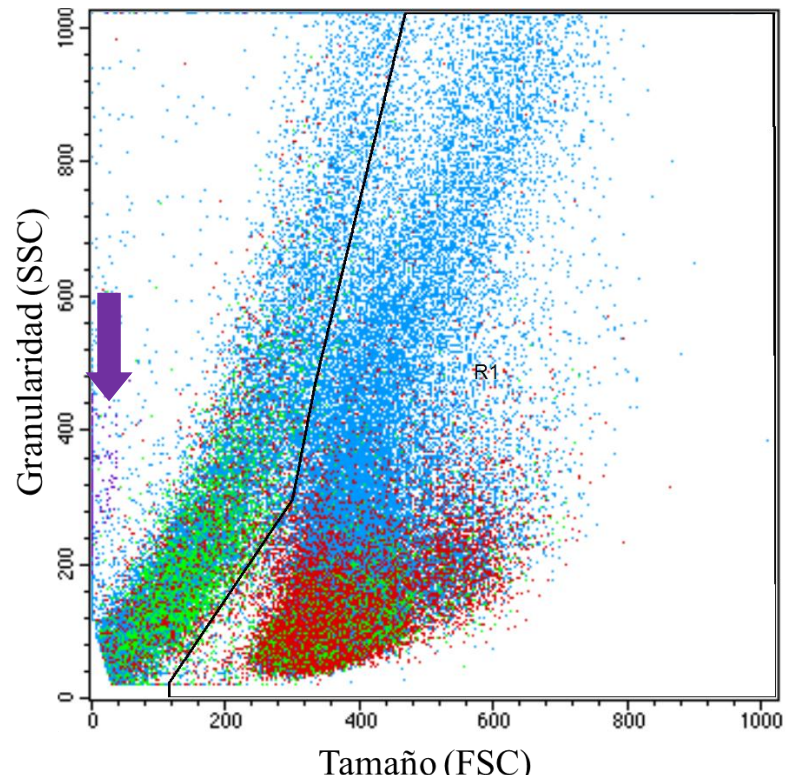


Figura 10. Ejemplo de la manera en que se delimitó la población principal (R1). El tamaño de las perlas fluorescentes (*morado*), es más pequeño que el de las células y restos celulares, y se observan muy cerca del origen (*flecha morada*). Las perlas son excluidas al delimitar la R1 (*células viables*), al igual que los restos celulares.

Se realizó conteo absoluto para cocultivos y sus controles en monocultivo a las 0, 8, 24, 48, 72 y 96 horas, se consideró únicamente las células de la población principal o R1 (células viables).

8.10 Fusión celular y viabilidad

Las células en cocultivo y monocultivo después de haber sido cosechadas se resuspendieron en 300 μL de DPBS. A las células en suspensión se les adicionaron 3 μL de 7-AAD y se incubaron por 15 min con hielo y en la oscuridad. Las células se analizaron en el citómetro de flujo FACSCalibur y la incorporación de 7-AAD por parte de las células no viables se registró en el detector FL-3. Las células procesadas bajo éste procedimiento, sirvieron para determinar tanto porcentaje de fusión en muestras no fijadas como la viabilidad de las mismas (Fig. 11).

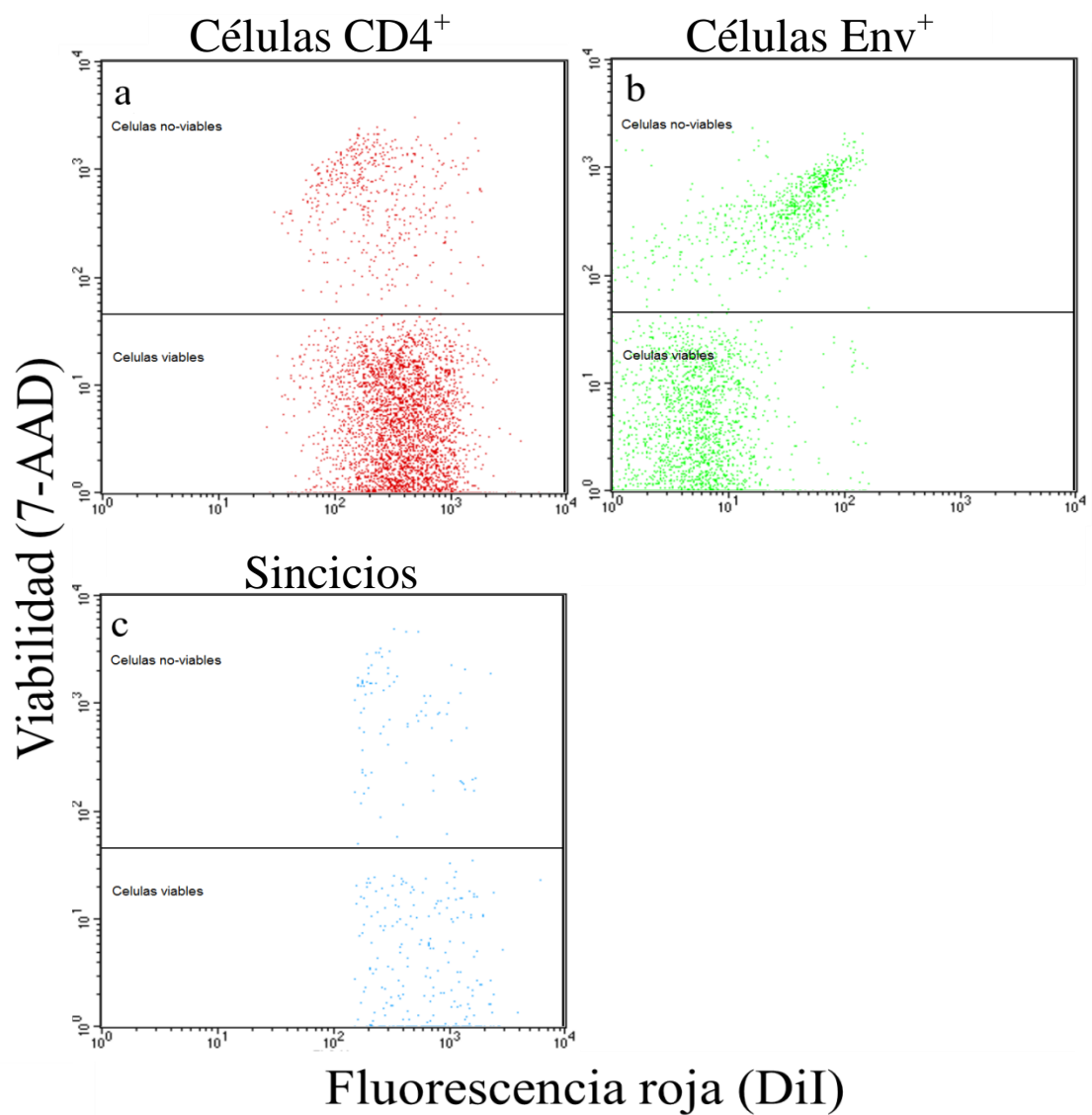


Figura 11. Ejemplo de la manera en que se delimitó a las células viables de las no viables. **a)** Células CD4⁺ espectadoras en cocultivo con Env⁺ fusogénicas por 6 horas, **b)** células Env⁺ fusogénicas espectadoras en cocultivo con células CD4⁺ y **c)** sincicios de cocultivos entre células CD4⁺ y Env⁺ espectadoras. Las poblaciones roja, verde y azul corresponden a las que se muestran en la figura 4.

Se determinó el porcentaje de fusión y viabilidad de las células en cocultivo y sus controles en monocultivo, a las 6, 24, 48 y 72 horas de incubación.

8.11 Análisis del ciclo celular

El estado del ciclo celular de las poblaciones celulares se determinó en cocultivos de células CD4⁺ con Env⁺ fusogénicas, en cocultivos de células CD4⁺ con Env⁺ no fusogénicas y en sus respectivos controles en monocultivo. Lo anterior se realizó después de 6, 24 y 48 horas de cocultivo, mediante la detección de incorporación de BrdU al material genético de las células en fase S y del contenido total de ADN.

Las células después de que se cosecharon, se resuspendieron en 100 µl de buffer BD Cytotfix/Cytoperm (contiene PFA al 4%) y se incubaron por 15 minutos en hielo. Posteriormente, se les realizó un lavado con 1 ml de buffer BD Perm/Wash 1X (contiene saponina), se centrifugaron a 1150 rpm por 5 min y a 4°C, y se descartó el sobrenadante.

Las células se resuspendieron en 100 µl de buffer BD Cytoperm Plus (contiene DMSO al 10%) y se incubaron por 10 minutos a 4°C o en hielo. Por último, las células se lavaron con 1 ml de buffer BD Perm/Wash 1X centrifugando a 1150 rpm por 5 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante.

Las células se resuspendieron en 100 µl de buffer BD Cytotfix/Cytoperm (contiene PFA al 4%) y se incubaron por 5 minutos en hielo. Posteriormente, se les realizó un lavado con 1 ml de buffer BD Perm/Wash 1X (contiene saponina), se centrifugaron a 1150 rpm por 5 min y a 4°C, y se descartó el sobrenadante.

El paquete celular se resuspendió en 50 µl DNAsa diluida (300 µg/ml) en DPBS y se incubó a 37 °C por una hora a baño maría. Las células se lavaron con 1 ml de buffer Perm/Wash 1X a 1150 rpm por 5 minutos a 4°C, y se desechó el sobrenadante. Posteriormente, el paquete celular se resuspendió con 50 µl de una solución 1:50 de anti-BrdU acoplado a APC en buffer Perm/Wash 1X, y se incubó por 20 minutos a temperatura

ambiente en la oscuridad. Se lavaron las células con 1 ml de buffer Perm/Wash 1X a 1150 rpm durante 5 minutos a 20 °C y se descartó el sobrenadante.

La cuantificación relativa del contenido total de ADN presente en las células, se llevó a cabo con la adición de 10 μ l 7-AAD, en el cual se resuspendió el paquete celular de cada tubo con muestra y se incubó por 15 minutos a 4 °C en oscuridad. Finalmente, se añadió a cada muestra 350 μ l de buffer del buffer de lavado a base de DPBS + 3% de SFBi + 0.1% de azida de sodio y las células se analizaron en el citómetro de flujo.

El ciclo celular se determinó en las células en cocultivo y sus controles en monocultivo, a las 6, 24 y 48 horas, considerando solo las células viables (tomando como base solo la población principal o R1). En células individuales, el ciclo celular puede determinarse mediante la determinación de síntesis de ADN evidenciada por la incorporación de BrdU y por el contenido de ADN (la ploidía no se modifica) (Fig. 12). Sin embargo, en los sincicios la ploidía se modifica. El problema se vuelve aún más complicado de dilucidar si tenemos en cuenta que las células que se fusionan no siempre se encuentran en el mismo estadio del ciclo celular.

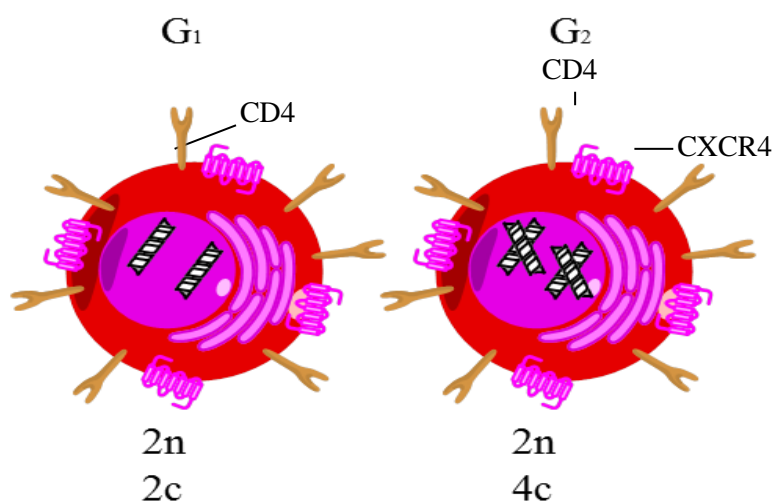


Figura 12. Representación esquemática de la relación entre la ploidía y en contenido de ADN en células en fase G₁ y en fase G₂. Imagen de autoría propia realizada mediante el software ChemBio Draw.

La posibilidad de que se formen sincicios con la misma ploidía pero diferente contenido de ADN o bien con el mismo contenido de ADN pero diferente ploidía (Fig. 13 y 14). Al detectar el contenido de ADN por citometría de flujo mediante el uso de 7-AAD, no se puede tener certeza de la ploidía de los sincicios obtenidos salvo en un caso particular. Dicho caso son los sincicios binucleados en los cuales una célula Env^+ en fase G_1 se fusiona con una célula $CD4^+$ en fase G_1 , que origina sincicios con una ploidía $4n$ y un contenido de ADN $4c$ (Fig. 13a). Ésto recuerda al contenido de ADN de una célula en fase G_2 pero tiene una ploidía diferente. El resultado de la fusión de células $CD4^+$ en distintas fases del ciclo celular con células Env^+ resulta en una gran diversidad de ploidías y contenidos de ADN en los sincicios debido a dos principales razones, el número de células fusionadas y al contenido de ADN de cada una de las células que se fusionan (Fig. 14).

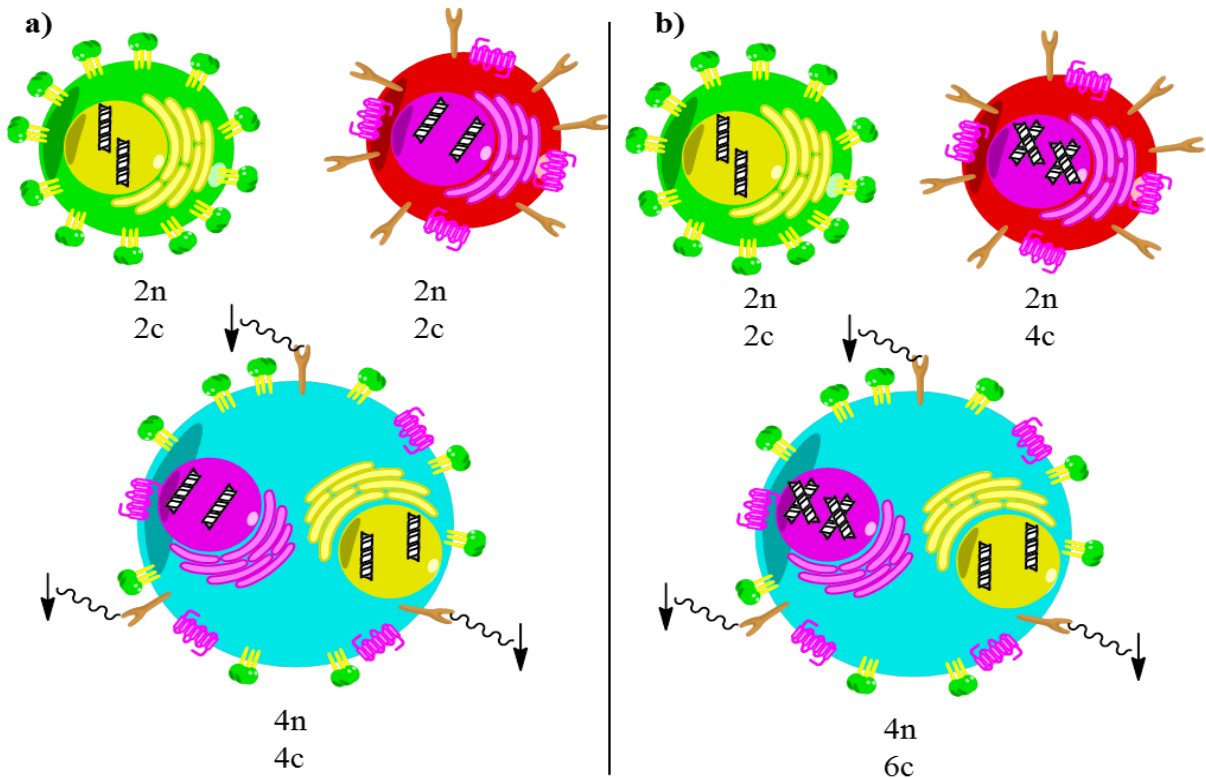


Figura 13. Discrepancia entre la ploidía y el contenido de ADN en sincicios generados por fusión celular en cocultivos de células $CD4^+$ con células Env^+ fusogénicas. La flecha negra indica la desaparición de CD4 de la membrana plasmática al formarse los sincicios. Imagen de autoría propia realizada mediante el software ChemBio Draw.

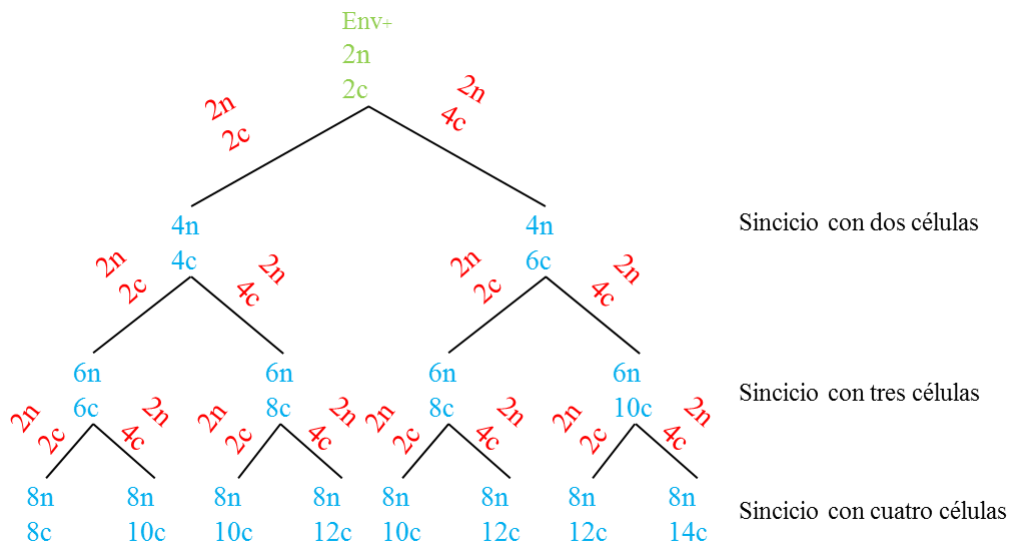


Figura 14. Probables combinaciones de ploidía y contenido de ADN en sincicios (azul) de hasta cuatro células considerando la incorporación de una sola célula Env^+ fusogénica (verde) y de células $CD4^+$ únicamente en fase G_1 o G_2 (rojo), pues las células en fase S representan el rango intermedio en contenido de ADN.

Las células en monocultivo y las células espectadoras se clasificaron por su contenido de ADN e incorporación de BrdU, como células en fase G_1 , S o G_2 (Fig. 15). Los sincicios se clasificaron como positivos o negativos para la incorporación de BrdU, y mediante el parámetro de contenido de ADN proveídos por las células individuales, como pequeños o grandes. Los llamados sincicios pequeños son aquellos con un contenido de ADN menor o igual a $4c$, que es la cantidad que posee una célula en fase G_2 una vez que ha duplicado su material genético. Los sincicios pequeños son los que tienen un contenido de ADN mayor a $4c$ (Fig. 15E).

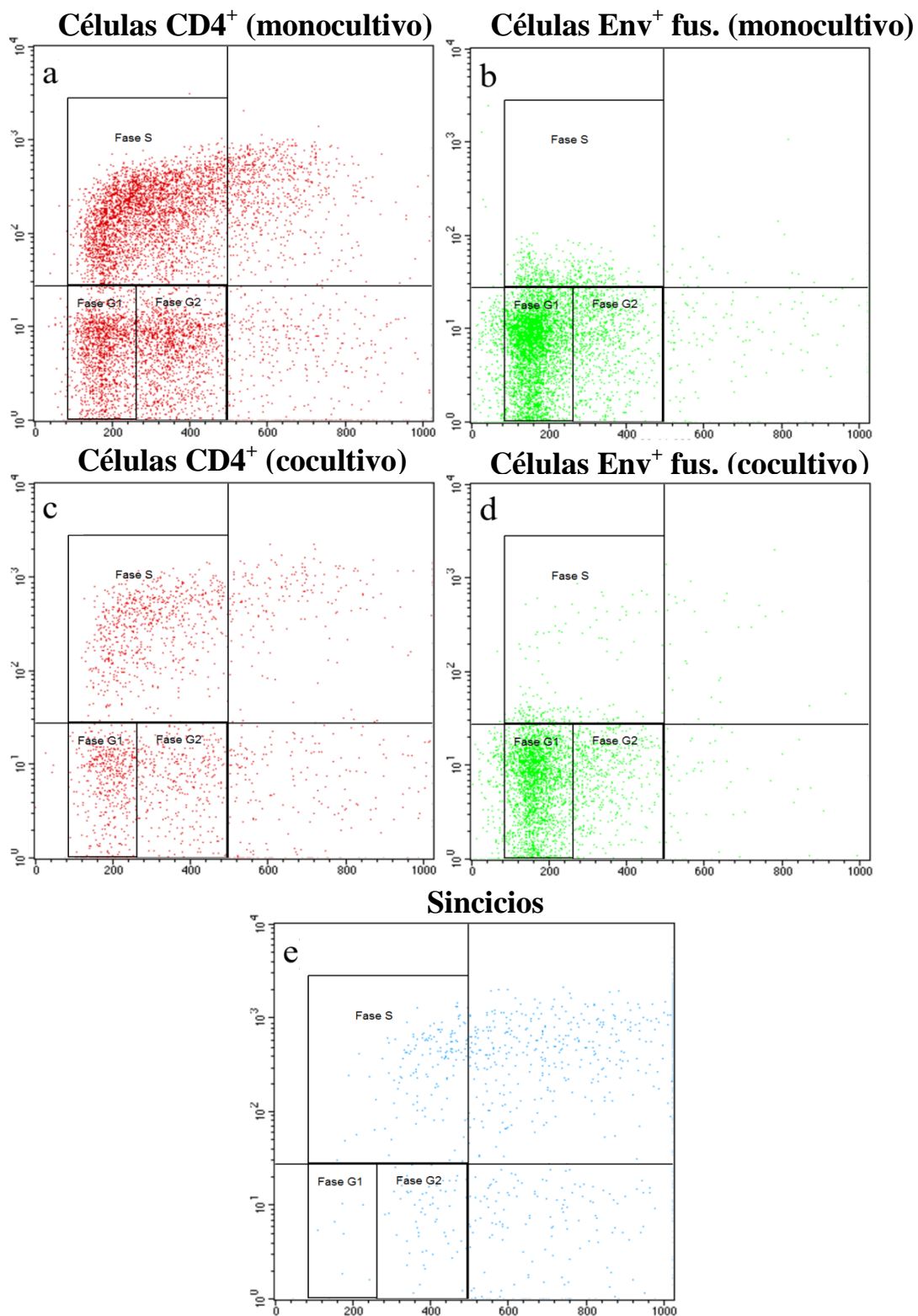


Figura 15. Ejemplo de la manera en que se determinó el ciclo celular. **a)** Células CD4⁺ en monocultivo, **b)** células Env⁺ fusogénicas en monocultivo, **c)** células CD4⁺ espectadoras en cocultivo con células Env⁺ fusogénicas, **d)** células Env⁺ fusogénicas espectadoras en cocultivo con células CD4⁺ y **e)** sincicios (positivos y negativos a la incorporación de BrdU, cuadrantes superiores e inferiores respectivamente; pequeños y grandes por su contenido de ADN, cuadrantes izquierdos y derechos respectivamente).

8.12 Análisis por citometría de flujo

La lectura de las muestras se llevó a cabo mediante un citómetro de flujo FACSCalibur con capacidad para detectar cuatro canales de fluorescencia y con la capacidad de excitar a los colorantes fluorescentes con dos láseres. El láser de 488 nm se utiliza cuando se requiere el uso de los detectores FL-1, FL-2 y FL-3 y el láser de 633 nm se requiere cuando se utiliza el detector FL-4.

El detector FL-1 registra fluorescencias con longitudes de onda (λ) de entre 515 y 545 nm y se empleó para detectar al colorante DiO (fluoresce con λ entre 475-550nm). El detector FL-2 registra fluorescencias con λ entre 556 y 606 nm y sirvió para detectar al colorante DiI (fluoresce con λ entre 550-650nm). El detector FL-3 registra fluorescencias con λ mayores a 670 nm y en él se detectó la fluorescencia de la 7-AAD que se une a ADN en las células fijadas o en células no viables de muestras no fijadas. El detector FL-4 detecta fluorescencias con λ entre 635 y 667 nm, y en él se detectó la señal del fluorocromo APC el cual se encuentra unido al anticuerpo anti-BrdU y también se utilizó para detectar las perlas TruCOUNT. El registro del tamaño se llevó a cabo mediante el detector FSC (Forward Scatter) y la complejidad intracelular o granularidad mediante el detector SSC (Side Scatter). Los detectores FSC y SSC registran λ de 488 nm, ya que son para detectar la dispersión frontal y lateral respectivamente, del láser de 488 nm. La escala de tamaño (FSC) y granularidad (SSC) se realizó en escala lineal. El detector FL-3 solo en el caso de experimentos de ciclo celular, se registró la fluorescencia en escala lineal. Lo anterior se realizó con la finalidad de tener una medida relativa del contenido de ADN en las células analizadas (datos semicuantitativos). En los detectores FL-1, FL-2, FL-4 y FL-3 cuando se analiza la viabilidad, la detección de la fluorescencia se realizó en escala logarítmica.

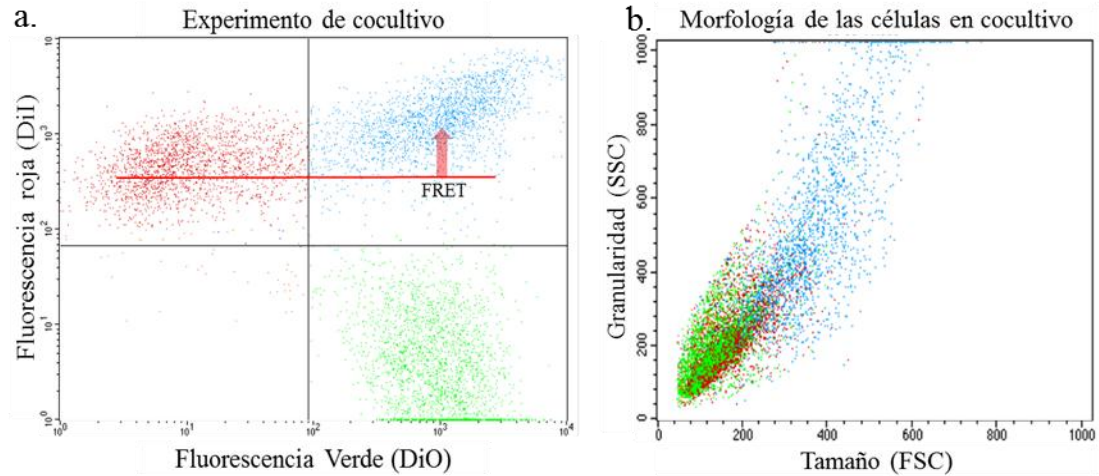
Para los experimentos de cocultivos se marcaron a las células Env⁺ con DiO volviéndolas positivas para la detección de fluorescencia en el detector FL-1. A su vez, ocurre lo mismo con las células CD4⁺ cuyas membranas plasmáticas se marcaron con DiI lo que las volvió positivas al registro de fluorescencia para el detector FL-2. Al ocurrir la fusión celular entre las células CD4⁺ y las Env⁺ fusogénicas, los sincicios se encontraron con doble fluorescencia, y fueron registrados por los detectores FL-1 y FL-2.

Los sincicios registraron en el detector FL-1, una intensidad de fluorescencia mayor que las células CD4⁺ no fusionadas (espectadoras). Lo anterior ocurrió por la Transferencia de Energía por Resonancia de Förster (FRET por sus siglas en inglés). El FRET se presentó en el caso de las células fusionadas debido a la tan estrecha proximidad entre las moléculas de ambos tipos de colorantes resultado de la fusión de membranas. Cuando la distancia entre los colorantes fue menor a 10 nm parte de la emisión de fluorescencia del colorante fluorescente DiO (verde) fue absorbida por el colorante DiI (rojo) y aumentó la intensidad de fluorescencia que éste emitía (el DiI fue excitado por el láser de 488 nm y por parte de la emisión de fluorescencia del DiO). El FRET no ocurrió en agregados de células CD4⁺ teñidas y células Env⁺ teñidas (partículas doble fluorescentes no debidas a fusión celular), ya que la distancia entre ambos colorantes fue mayor a 10 nm (69, 70, 71, 106, 151).

9. Resultados

9.1 Formación de sincicios

El análisis por citometría de flujo de los cocultivos de células Jurkat CD4⁺ teñidas con DiI y células Jurkat Env⁺ fusogénicas teñidas con DiO, muestran una tercera población compuesta por células con doble fluorescencia debido a la fusión mediada por las proteínas de envoltura del HIV-1 (Fig. 16). Las células doble fluorescentes corresponden a los sincicios (69, 70, 71, 106, 151). Las células CD4⁺ que no se fusionaron (espectadoras) presentan fluorescencia roja (emitida por el DiI). Las células Env⁺ que no se fusionaron (espectadoras) presentan fluorescencia verde (emitida por el DiO). En éste tipo de análisis, los sincicios presentan una fluorescencia roja más intensa que la de las células CD4⁺ no fusionadas (espectadoras), debido al fenómeno conocido como FRET (antes descrito para nuestro modelo) (Fig. 12A). La manifestación de FRET en las células con doble fluorescencia indica que éstas corresponden a células fusionadas (69, 70, 71, 106, 151). En presencia de compuestos que bloquean a los receptores Gp120/Gp41 y CD4, no se detectan células fusionadas si no solo agregados celulares, los cuales no presentan (70, 71, 106, 151). Los sincicios presentan un mayor tamaño y granularidad con respecto a las células espectadoras de ambos tipos, las que morfológicamente son similares entre ellas (Fig. 12B-C).



Morfología de las células en cocultivo

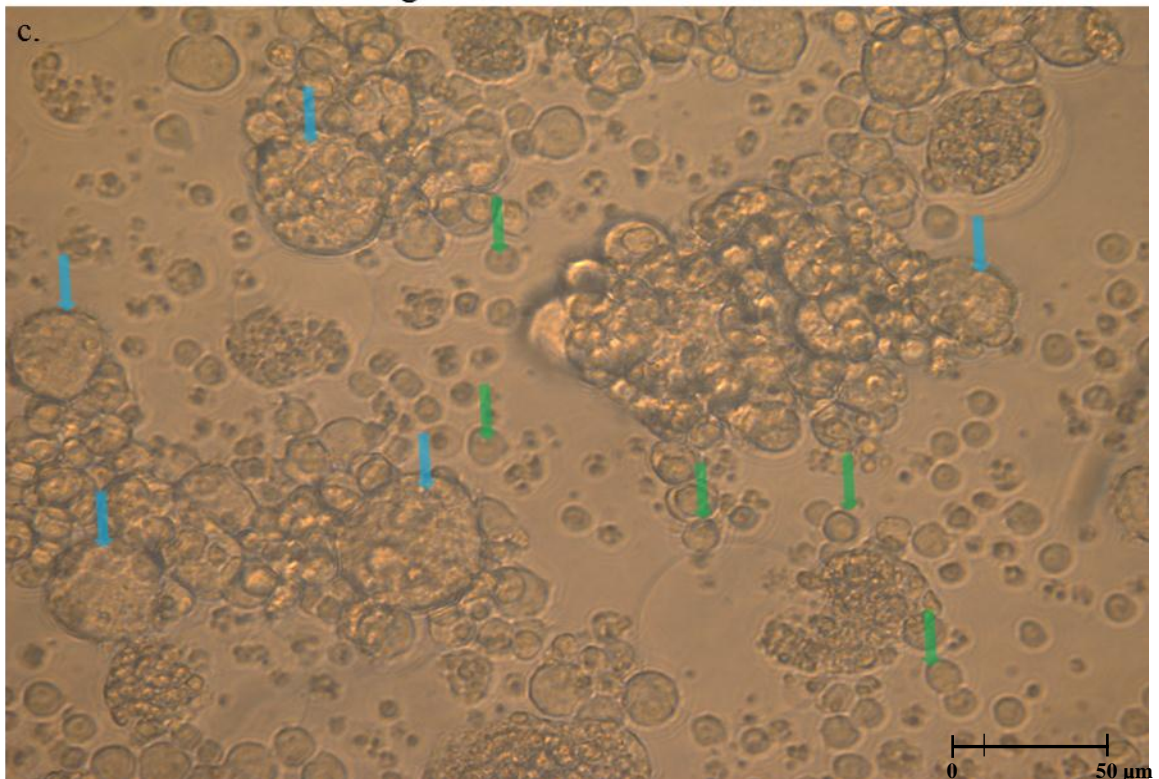


Figura 16. Fenómeno de fusión celular en cocultivos de células CD4^+ con Env^+ fusogénicas: **a)** Gráfica de puntos de un cocultivo de células CD4^+ (rojo) con células Env^+ fusogénicas (verde), donde aparece una tercera población celular doble fluorescente y con FRET sobre la fluorescencia roja, que representa los sincicios (azul). **b)** Gráfica de puntos donde se observa el tamaño y granularidad de las células en cocultivo y se aprecia que los sincicios (azul) poseen un mayor tamaño y granularidad o complejidad celular que las células CD4^+ espectadoras (rojo) y Env^+ espectadoras (verde). **c)** Microfotografía a un aumento de 40X de un pozo de cocultivo donde se señalan células espectadoras (flechas verdes) y sincicios (flechas azules).

Los porcentajes obtenidos de sincicios varían dependiendo del estado general de las células en cocultivo, de los niveles de expresión de CD4 por parte de las células blanco y del tiempo que dure el cocultivo. La expresión de la molécula CD4, la viabilidad y la proliferación celular mejoró cuando el cultivo se mantuvo a densidades de aproximadamente 2 ó 2.5×10^6 células/ml. Bajo condiciones de alta densidad celular, El porcentaje de células $CD4^+$ que expresaron niveles detectables de CD4 fue de entre 65 y 70% (Fig. 17). Lo anterior se menciona ya que usualmente se obtenían porcentajes de expresión de CD4 de entre 51-52% (151).

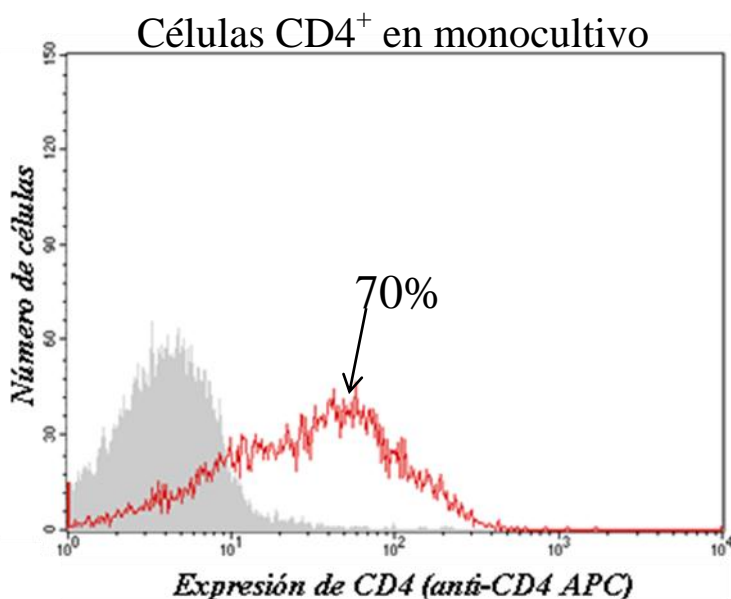


Figura 17. Nivel de expresión de CD4 por parte de las células $CD4^+$ en condiciones de alta densidad celular (*rojo*), con respecto a células no marcadas por un anticuerpo control de isotipo (*gris*).

La densidad celular en los cocultivos también es otro parámetro que afecta los índices de fusión ya que a mayor densidad se favorecen más el contacto entre células $CD4^+$ y Env^+ fusogénicas. Los experimentos se realizaron con una densidad celular de 2×10^6 cel/ml.

La morfología de las células en cocultivo se observó al microscopio óptico durante tres días y se tomaron fotografías a los pozos con cocultivo (Fig. 18) y sus controles en monocultivo (Fig. 19) justo antes de cosechar las células. En los cocultivos de células CD4⁺ y células Env⁺ fusogénicas, se observaron sincicios desde las primeras seis horas de cocultivo. Además, en cocultivos de células CD4⁺ y células Env⁺ no fusogénicas no se observaron sincicios generados por fusión celular, simplemente se encontraron células individuales en grandes agregados. Los controles en monocultivos nos muestran que existen grandes agregados en el caso de las células CD4⁺ debidos posiblemente a una muy alta expresión de moléculas de adhesión, sin embargo los monocultivos de células Env⁺ tanto fusogénicas como no fusogénicas no presentan ésta característica.

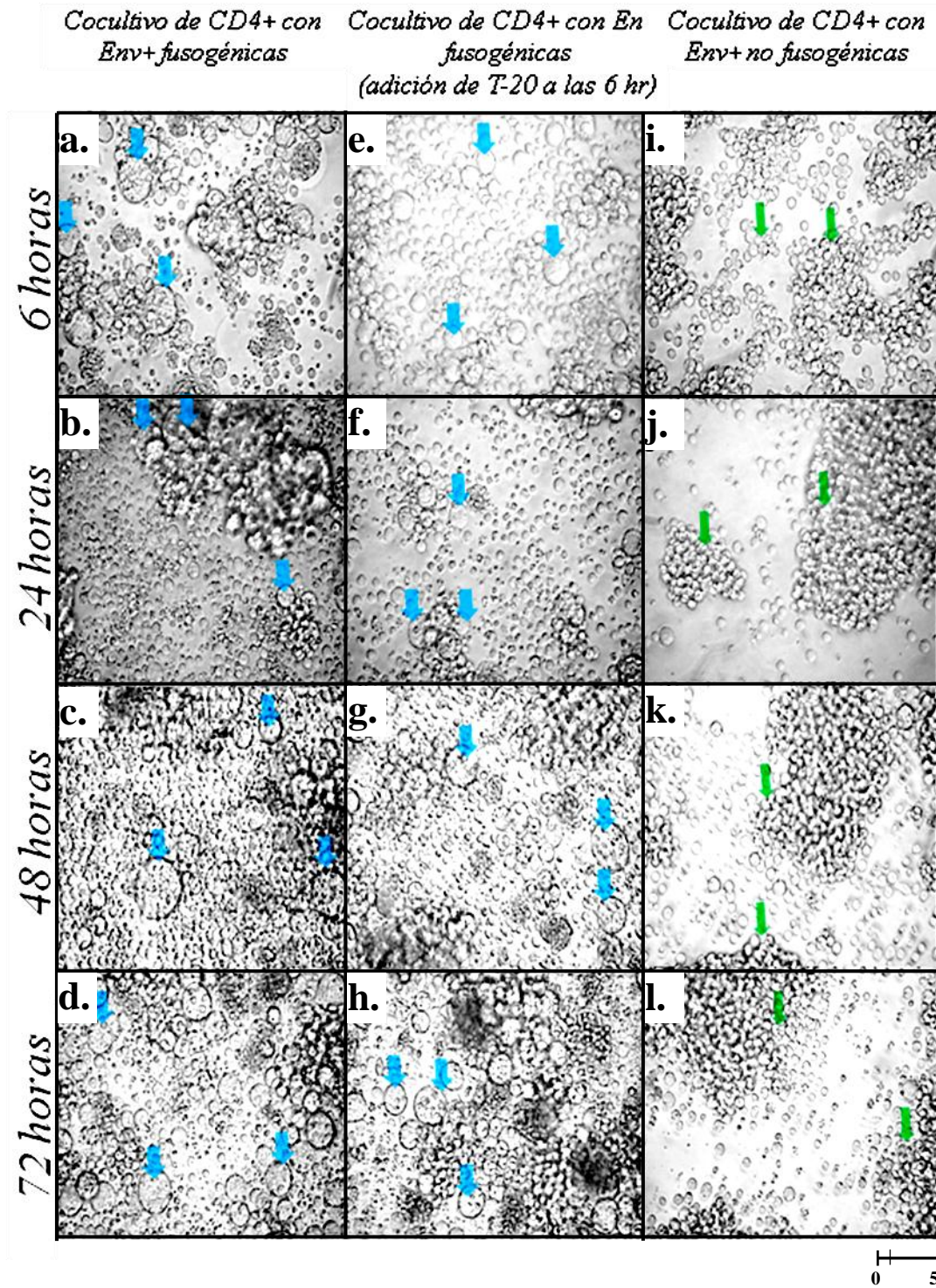


Figura 18. Microfotografías vistas a 40X de cocultivos en experimentos de 72 horas. **a-d)** Cocultivo de células CD4⁺ con Env⁺ fusogénicas, **e-h)** cocultivos de células CD4⁺ con Env⁺ fusogénicas añadiendo T-20 a partir de las 6 horas. **i-l)** cocultivo de células CD4⁺ con Env⁺ no fusogénicas (no se observaron sincicios). Las flechas azules señalan los sincicios, y las flechas verdes indican células individuales agregadas.

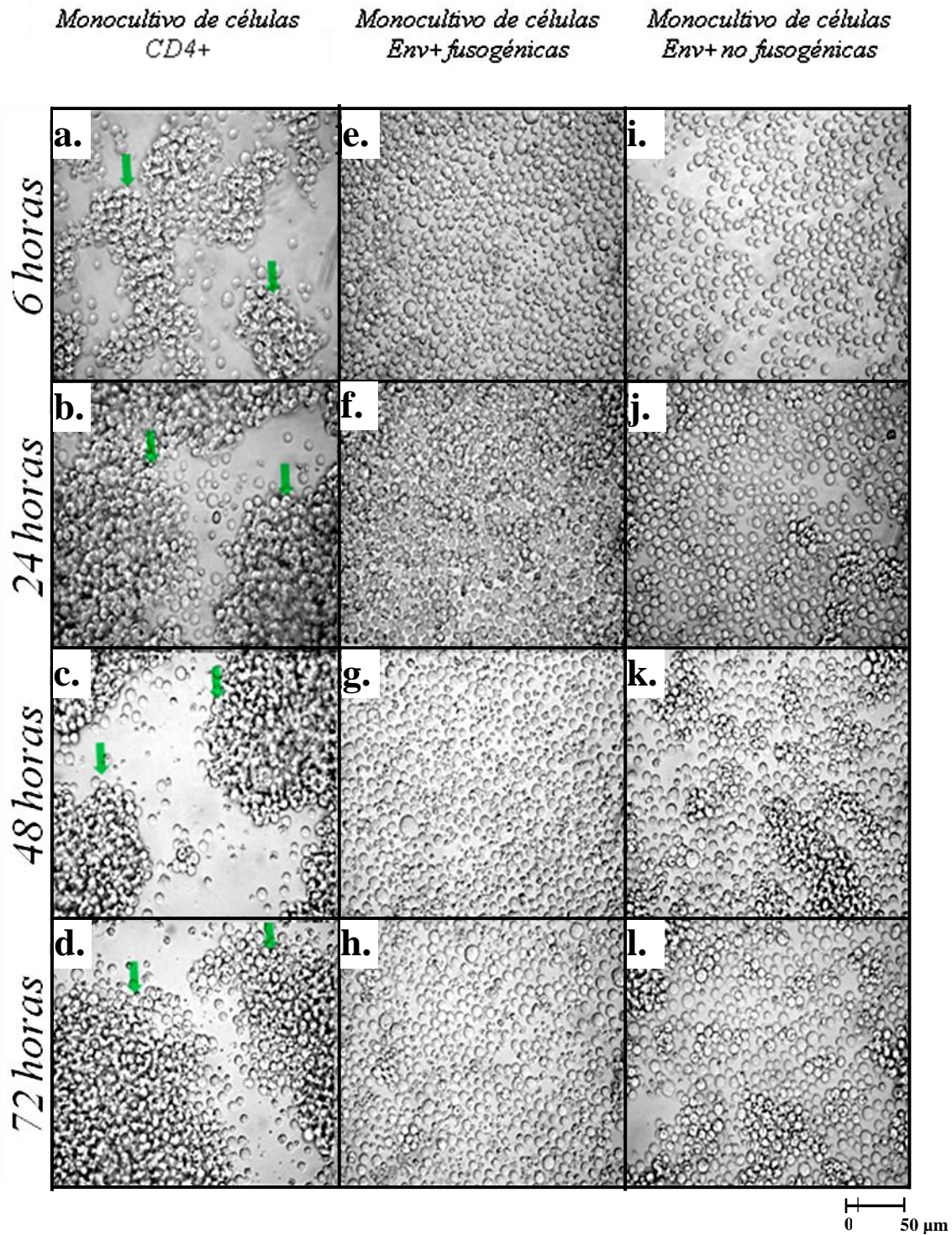


Figura 19. Microfotografías vistas a 40X de monocultivos en experimentos de setenta y dos horas. **a-d)** Monocultivo de células CD4⁺, (la gran cantidad de agregados sugiere alta expresión de moléculas de adhesión), **e-h)** monocultivo de células Env⁺ fusogénicas y **i-l)** monocultivo de células Env⁺ no fusogénicas. Las flechas azules señalan los sincicios, y las flechas verdes indican células individuales agregadas.

9.2 Dinámica de las poblaciones en cocultivo

En estudios iniciales, las dinámicas poblacionales de las células en cocultivo se caracterizaron mediante el conteo absoluto del número de células de cada tipo en los cocultivos. Con el conteo absoluto a distintos tiempos de cocultivo, se determinó que las células espectadoras (tanto Env⁺ como CD4⁺) disminuyeron rápidamente durante las primeras 8 horas de cocultivo. La disminución de las células espectadoras continuó hasta las 24 horas de cocultivo. El número de éstas células no aumentó considerablemente en tiempos subsecuentes de cocultivo. Las células CD4⁺ en monocultivo mostraron proliferación constante, ya que el número de células de su población se incrementó progresivamente a lo largo de las 96 horas del experimento.

La formación de sincicios fue evidente de las primeras 8 horas de cocultivo. El número de sincicios aumentó gradualmente hasta las 96 horas. Sin embargo, el lapso de tiempo en el que se formaron más rápidamente sincicios fue de las 0 a las 8 horas de cocultivo.

Además en dichos estudios iniciales, ya se podía distinguir que la población de células Env⁺ fusogénicas en monocultivo no parecía incrementar sus números a lo largo de los cuatro días del experimento. Las células Env⁺ en cocultivo con células CD4⁺, presentaron una disminución del número de células de su población a las 8 y 24 horas de cocultivo y posteriormente éste se estabilizó (Fig. 20).

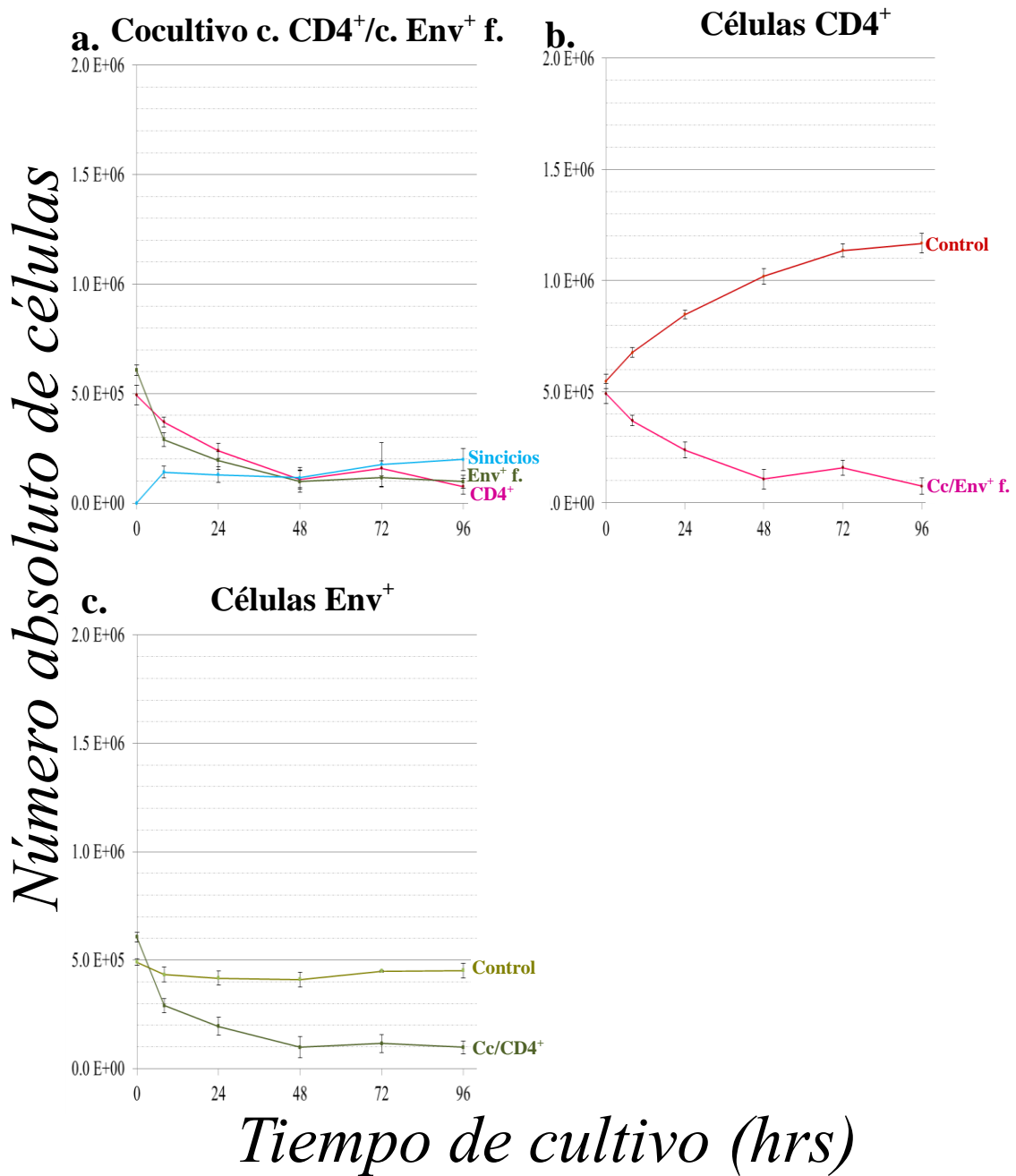


Figura 20. Dinámica las poblaciones celulares en cocultivos entre células CD4⁺ y células Env⁺ fusogénicas. a) Cocultivos entre células CD4⁺ espectadoras (■) y células Env⁺ fusogénicas espectadoras (■) y formación de sincicios (■); b) comparación entre células CD4⁺ en monocultivo (■) y células CD4⁺ espectadoras en cocultivo (■) y c) comparación entre células Env⁺ fusogénicas en monocultivo (■) y células Env⁺ fusogénicas espectadoras CD4⁺ (■).

Estudios posteriores mostraron que la adición de un inhibidor de fusión como el T-20 a partir de las 8 horas de cocultivo originó que el número de células $CD4^+$, después de éste tiempo no se redujera (Fig. 21). La dinámica poblacional de dichas células (después de las 24 horas de cocultivo) se asemeja al de las $CD4^+$ en cocultivo con las células Env^+ no fusogénicas (Fig. 22). Lo anterior indica que las células $CD4^+$ en presencia de células Env^+ y de sincicios siguieron proliferando ya que el número de células de su población aumentó desde las 8 hasta las 96 horas de cocultivo. Las células $CD4^+$ espectadoras en cocultivo con células Env^+ no fusogénicas duplicaron el número inicial de células de su población al finalizar las noventa y seis horas de cocultivo (Fig. 22A).

El efecto del inhibidor de la fusión se pudo apreciar al comparar las dinámicas poblacionales de los sincicios con o sin la adición de T-20. El número de sincicios no se incrementó con la presencia del inhibidor de fusión a partir de las 8 horas de cocultivo (Fig. 22B). El T-20 fue una alternativa adecuada a fin de estabilizar el número y proporción de sincicios en cocultivos entre células $CD4^+$ y células Env^+ fusogénicas.

El fenómeno que alteró el número de células Env^+ es la fusión (en el caso de las Env^+ fusogénicas que redujo su número) y fuera de ello su población permaneció sin incrementarse de manera importante. El inhibidor no alteró el número de células Env^+ fusogénicas, las cuales mantienen el número de células de su población aproximadamente constante aun sin fusión celular después de las 8 horas de cocultivo (Fig. 22C-D).

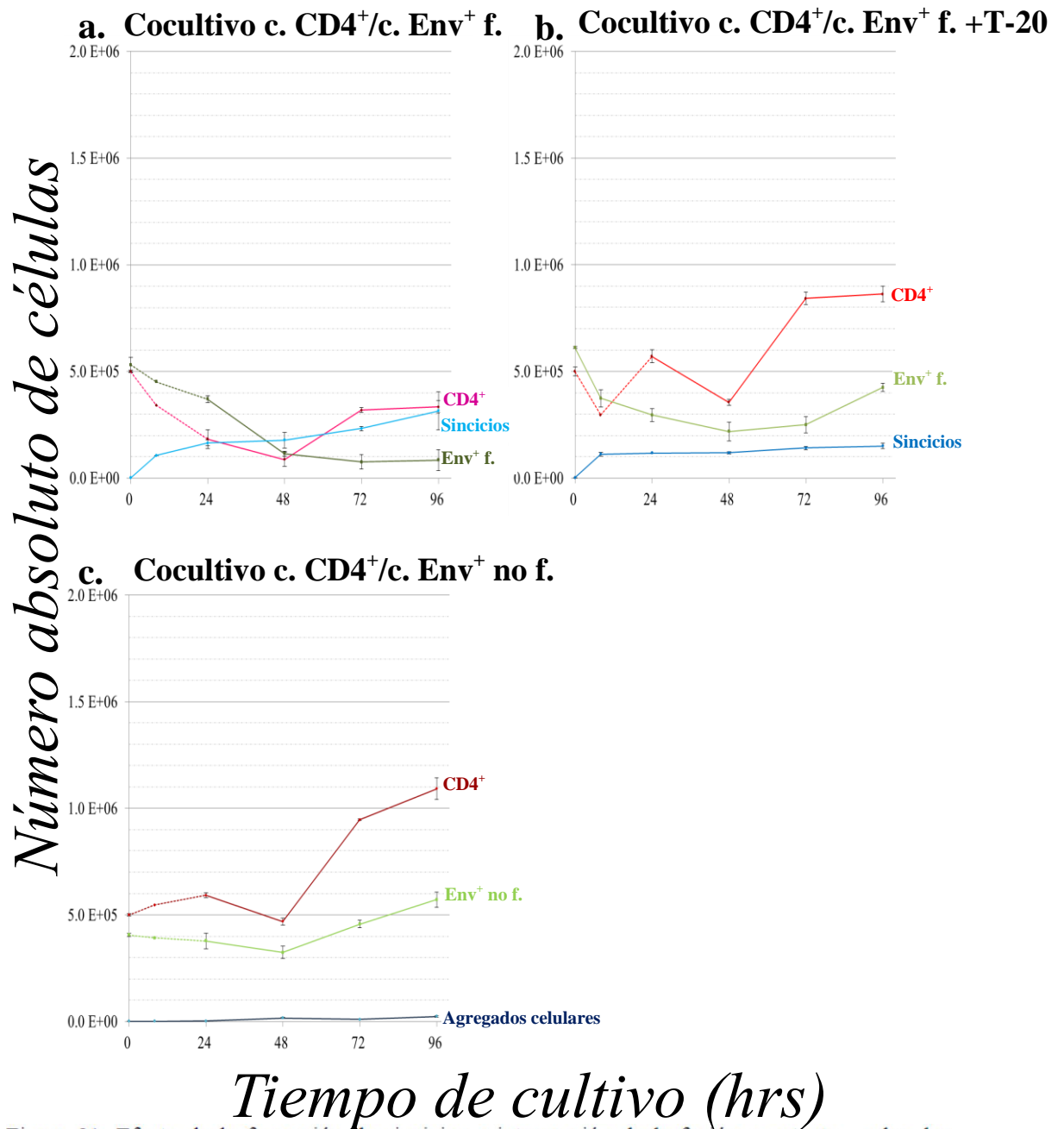


Figura 21. Efecto de la formación de sincicios e interrupción de la fusión constante, sobre las poblaciones de células espectadora. a) Cocultivos sin T-20, entre células CD4⁺ (■), células Env⁺ fusogénicas (■), y formación de sincicios (■); b) cocultivos con T-20 a partir de las 8 horas, entre células CD4⁺ (■) y células Env⁺ fusogénicas espectadoras (■) con la formación de sincicios (■), y c) cocultivos entre células CD4⁺ (■) y células Env⁺ no fusogénicas (■), se señala a las partículas doble fluorescentes (■).

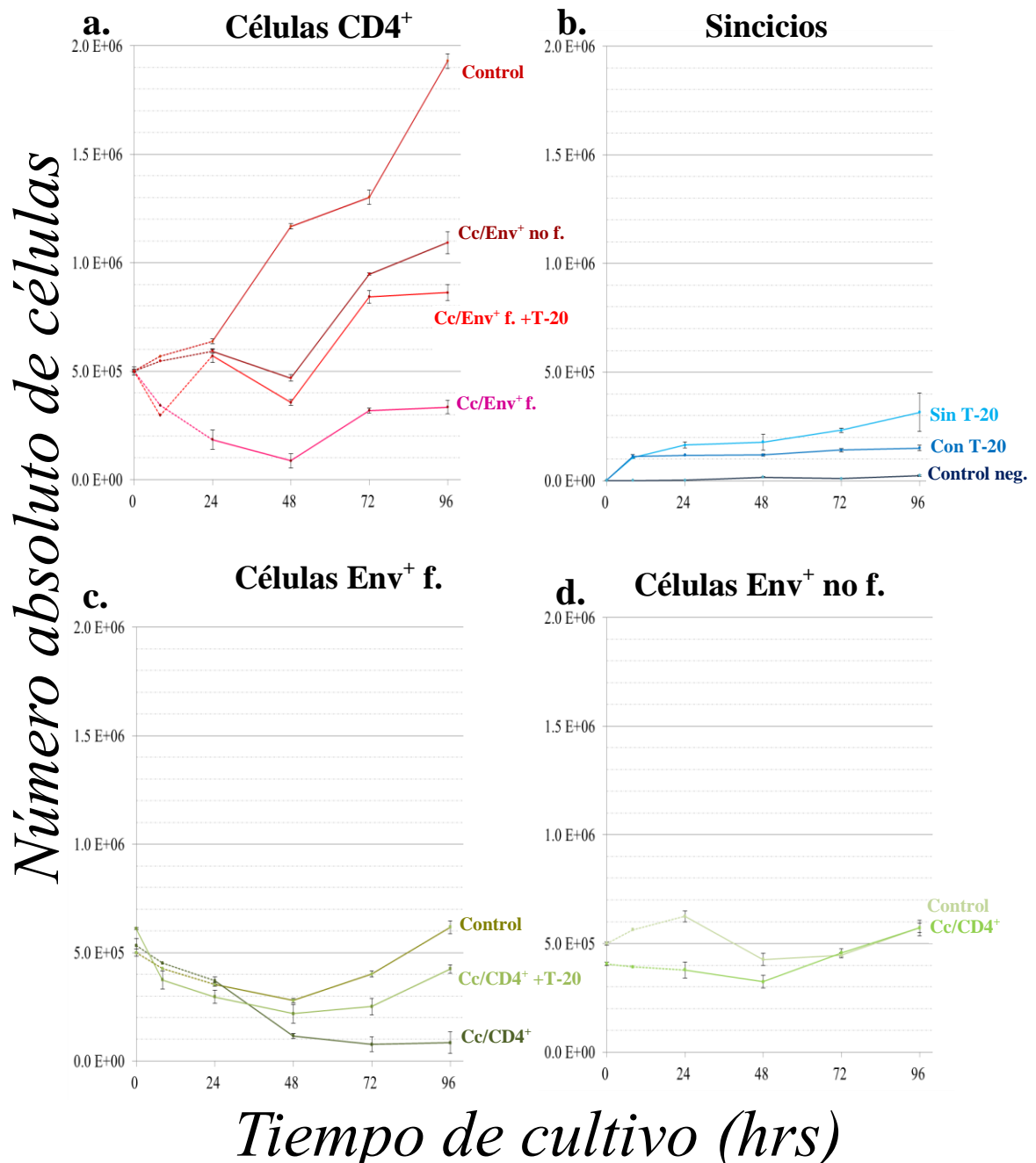


Figura 22. Dinámica las poblaciones celulares bajo distintas condiciones de cocultivo. a) Células CD4⁺ en monocultivo (■), células CD4⁺ espectadoras cocultivadas con células Env⁺ fusogénicas (■), células CD4⁺ espectadoras cocultivadas con células Env⁺ fusogénicas pero con la adición de T-20 a partir de las 8 horas de cocultivo (■) y células CD4⁺ espectadoras cocultivadas con células Env⁺ no fusogénicas (■); b) Sincicios obtenidos de cocultivos entre células CD4⁺ y células Env⁺ fusogénicas (■), sincicios formados en cocultivos de las mismas células pero añadiendo T-20 a partir de las 8 horas de cocultivo (■) y partículas doble fluorescentes de cocultivos entre células CD4⁺ y células Env⁺ no fusogénicas(■); c) Células Env⁺ fusogénicas en monocultivo (■), células Env⁺ fusogénicas espectadoras cocultivadas con células CD4⁺ (■) y células Env⁺ fusogénicas espectadoras cocultivadas con células CD4⁺ con T-20 a partir de las 8 horas de cocultivo (■); d) las células Env⁺ no fusogénicas en monocultivo (■) y células Env⁺ no fusogénicas espectadoras en cocultivo cocultivadas con CD4⁺ (■).

9.3 Porcentaje de fusión celular

El porcentaje de fusión es definido como el porcentaje de células fusionadas (sincicios) presentes en un cocultivo. Los términos fusión celular y células fusionadas solo se pueden aplicar en el caso de cocultivos entre células CD4⁺ con células Env⁺ fusogénicas.

El tiempo de cocultivo de las células CD4⁺ con las Env⁺ alteró el porcentaje de fusión. Los porcentajes de fusión en cocultivos entre células CD4⁺ y células Env⁺ fueron de 24% para las 6 y 24 horas de cocultivo. Sin embargo, en dichos cocultivos los porcentajes de fusión fueron de 32 y 33% para las 48 y 72 horas de cocultivo (Fig. 23).

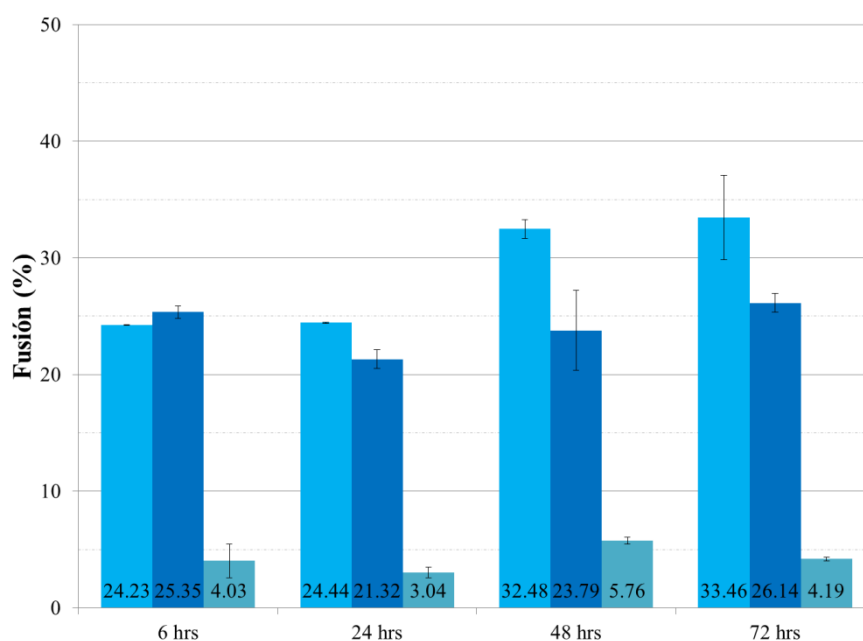


Figura 23. Porcentaje de fusión en; sincicios de cocultivos entre células CD4⁺ y Env⁺ fusogénicas, sin (■) y con (■) la adición de T-20 a partir de las seis horas de cocultivo, y partículas doble fluorescentes por agregación en cocultivos entre células CD4⁺ y células Env⁺ no fusogénicas (■).

Nuestro grupo había probado previamente que el T-20 añadido al momento de colocar los cocultivos entre células $CD4^+$ y células Env^+ inhibía la formación de sincicios (150). En éste estudio se probó en el mismo tipo de cocultivos si la adición del inhibidor de fusión a partir de las 6 horas de cocultivo (una vez formados sincicios) producía un cambio o modificación de los porcentajes de sincicios a lo largo del experimento.

La adición del inhibidor de la fusión T-20 mantuvo constantes los porcentajes de fusión obtenidos a lo largo de 72 horas de cocultivo. El porcentaje de sincicios después de 72 horas de cocultivo fue de un 26%, (similar al 24% a las 6 horas de cocultivo) (Fig. 17).

9.4 Viabilidad de las células en cocultivo

Con el propósito de determinar si la muerte celular participó en la reducción del número de células durante la formación de sincicios, se evaluó la viabilidad de células no fijadas en cocultivo (y sus controles en monocultivo) mediante la adición de 7-AAD.

La viabilidad se estudió en los cocultivos hasta las 72 horas. Los resultados de conteo absoluto sugieren que a partir de dicho tiempo las células disminuyeron su proliferación debido a la ausencia de suero. También, se estudió si la adición del inhibidor de la fusión T-20 a partir de las 6 horas de cocultivo correlacionó con algún cambio en la viabilidad de las células en cocultivo.

Las células $CD4^+$ en monocultivo tuvieron un porcentaje de viabilidad superior al 85%, excepto a las 72 horas (cuando su porcentaje de viabilidad fue de $\approx 70\%$). Las células $CD4^+$ espectadoras en cocultivo con Env^+ no fusogénicas tuvieron un porcentaje de viabilidad por encima del 85%, excepto a las 72 horas de cocultivo (cuando su viabilidad fue de $\approx 80\%$).

Las células CD4⁺ espectadoras cocultivadas con células Env⁺ fusogénicas tuvieron un porcentaje de viabilidad de aproximadamente 65% a las 6 horas de cocultivo. Sin embargo, después de 24 horas de cocultivo su porcentaje de viabilidad fue mayor al 80%. Lo anterior ocurrió tanto con o sin la adición del inhibidor de fusión T-20 a las seis horas de cocultivo.

La adición de T-20 a partir de las seis horas de cocultivo, pareció mejorar ligeramente la viabilidad de las células CD4⁺ espectadoras a partir de las 48 horas de cocultivo. El porcentaje de viabilidad de las células CD4⁺ espectadoras fue de 87 y 81% a las 48 y 72 horas de cocultivo respectivamente. El porcentaje de viabilidad de las células CD4⁺ espectadoras en cocultivo con células Env⁺ fusogénicas con T-20 (adicionada a partir de las 6 horas) fue de 92 y 88% a las 48 y 72 horas respectivamente (Fig. 24).

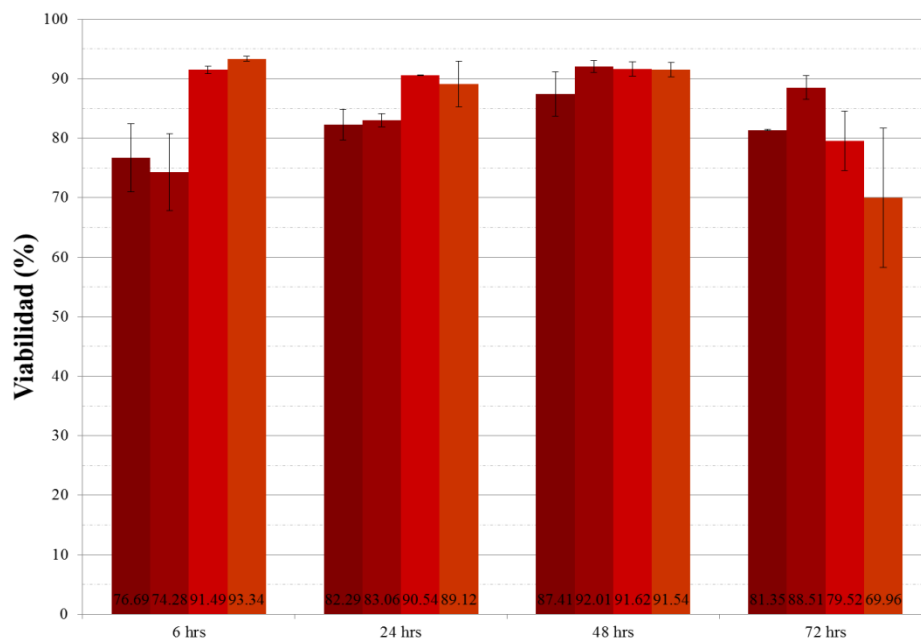


Figura 24. Porcentaje de viabilidad en células CD4⁺. Células CD4⁺ cocultivadas con células Env⁺ fusogénicas sin (■) y con (■) la adición de T-20 a partir de las seis horas de cocultivo. Células CD4⁺ cocultivadas con células Env⁺ no fusogénicas (■) y células CD4⁺ en monocultivo (■).

La viabilidad de las células Env⁺ fusogénicas espectadoras cocultivadas con células CD4⁺ fue considerablemente menor que la de las células CD4⁺ espectadoras (excepto a las 6 horas de cocultivo). El porcentaje viabilidad de dichas células Env⁺ espectadoras fue de 60-65% a las 6 horas de cocultivo, de 56-58% a las 24 y 48 horas de cocultivo y de aproximadamente 40% a las 72 horas de cocultivo. La adición del inhibidor T-20 no tuvo efecto sobre la viabilidad de las células Env⁺ fusogénicas en cocultivo.

El porcentaje de viabilidad de las células Env⁺ fusogénicas en monocultivo fue menor que el de células CD4⁺ en monocultivo (excepto a las 72 horas). El porcentaje de viabilidad dichas células fue de 65-70% a las 6 y 24 horas y de aproximadamente 80% a las 48 y 72 horas (Fig. 25).

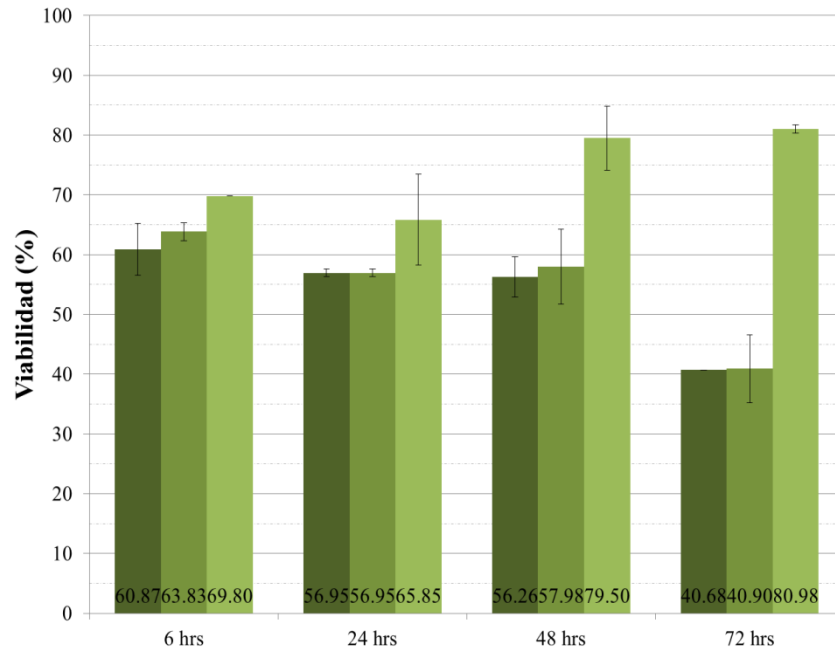


Figura 25. Porcentaje de células Env⁺ fusogénicas viables. Células Env⁺ cocultivadas con células CD4⁺ sin (■) y con (■) la adición de T-20 a partir de las seis horas de cocultivo. Células CD4⁺ en monocultivo (■).

La viabilidad de las células Env⁺ no fusogénicas espectadoras cocultivadas con células CD4⁺ fue mayor que la de las células Env⁺ fusogénicas espectadoras cocultivadas con células CD4⁺ (incluso a las 72 horas de cocultivo). El porcentaje viabilidad de dichas células Env⁺ espectadoras fue de 80-82% a las 6 y 24 horas de cocultivo, de 78% a las 48 horas de cocultivo y de aproximadamente 51% a las 72 horas de cocultivo.

El porcentaje de viabilidad de las células Env⁺ no fusogénicas en monocultivo fue mayor que el de células Env⁺ fusogénicas en monocultivo (excepto a las 72 horas). El porcentaje de viabilidad dichas células fue de 74% a las 6 horas, de 85-86% a las 24 y 48 horas y de aproximadamente 61% a las 72 horas (Fig. 26).

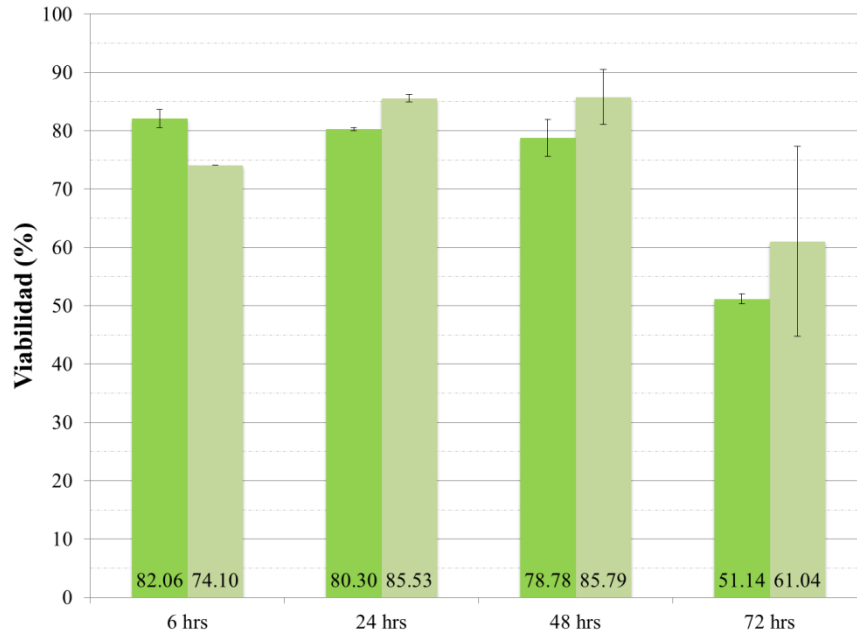


Figura 26. Porcentaje de células Env⁺ no fusogénicas viables. Células Env⁺ no fusogénicas en cocultivo con células CD4⁺ (■) y células CD4⁺ en monocultivo (■).

El porcentaje de viabilidad de los sincicios fue mayor que el de células Env⁺ fusogénicas cocultivadas con células CD4⁺ (incluso a las 72 horas de cocultivo). El porcentaje de viabilidad dichas células fue de 85% a las 6 horas, de 74% a las 24 horas, de 72-80% a las 48 horas y de 47-56% a las 72 horas. La presencia del inhibidor no mostró efectos discernibles sobre la viabilidad de los sincicios (Fig. 27).

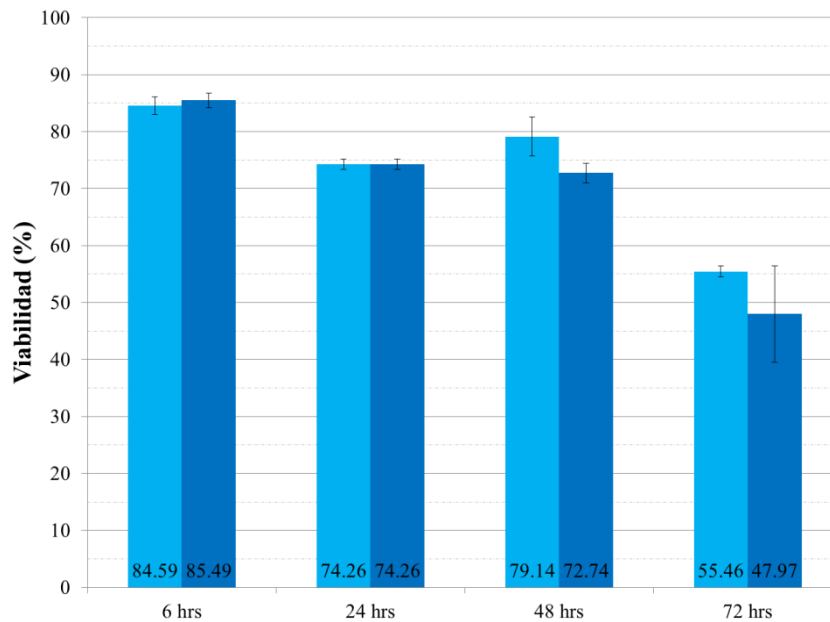


Figura 27. Porcentaje de viabilidad en sincicios de cocultivos entre células CD4⁺ y Env⁺ fusogénicas, sin (■) y con (■) la adición de T-20 a partir de las seis horas de cocultivo.

La reducción del porcentaje de viabilidad de los sincicios a las 72 horas mostró sus primeros indicios desde las 48 horas. La morfología (tamaño) y el contenido de ADN de un parte de los sincicios se redujeron a las 48 horas de cocultivo.

Las células en cocultivos entre células CD4⁺ y células Env⁺ se separaron por medio de un citómetro de flujo FACSaria fijadas para el análisis de su ciclo celular mediante la detección de incorporación de BrdU y su contenido total de ADN (los tiempos de fijación y permeabilización fueron del doble a los del protocolo estándar). La aparición de una subpoblación de sincicios de pequeño tamaño a las 48 horas de cocultivo se demostró en experimentos de fusión celular en cocultivos de hasta 48 horas (Fig. 28). La nueva población de sincicios parece tener un tamaño aproximadamente similar al de células espectadoras, aunque con una mayor granularidad.

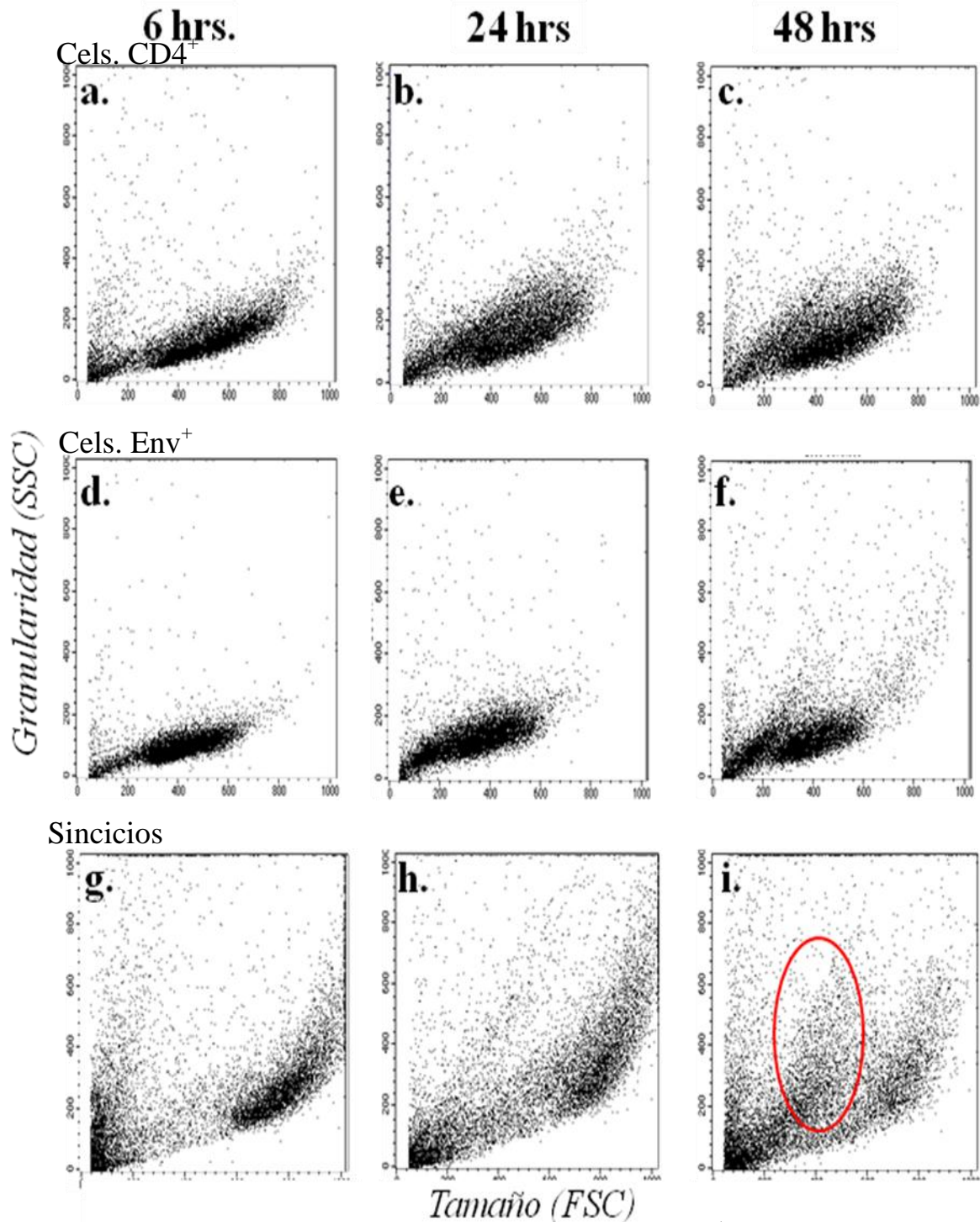


Figura 28. Perfil de tamaño contra granularidad de: **a-c**) células CD4⁺ espectadoras, **d-f**) células Env⁺ fusogénicas espectadoras y **g-i**) sincicios. Células separadas por un citómetro de flujo FACSaria de cocultivos de células CD4⁺ y Env⁺ fusogénicas. El círculo rojo señala la población de sincicios de menor tamaño que aparece a las 48 horas de cocultivo. Las condiciones de captura de las muestras en el citómetro de flujo fueron las mismas para todos los tiempos.

La población de sincicios más pequeños que apareció en cocultivos a las 48 horas, es congruente con la presencia de sincicios con menor contenido de ADN (Fig. 29). Dicha disminución de tamaño y contenido de ADN probablemente indicó que ésta población estuvo en estadios tempranos de muerte celular.

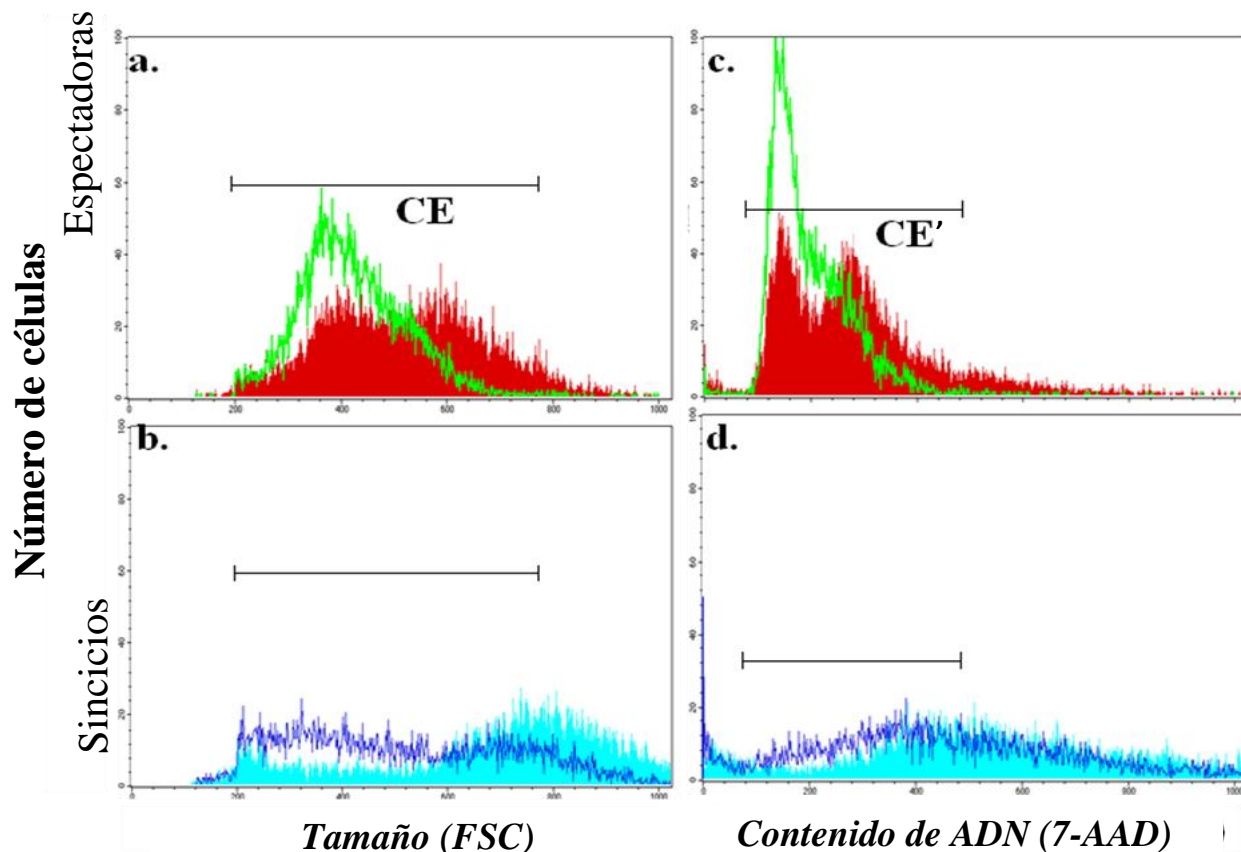
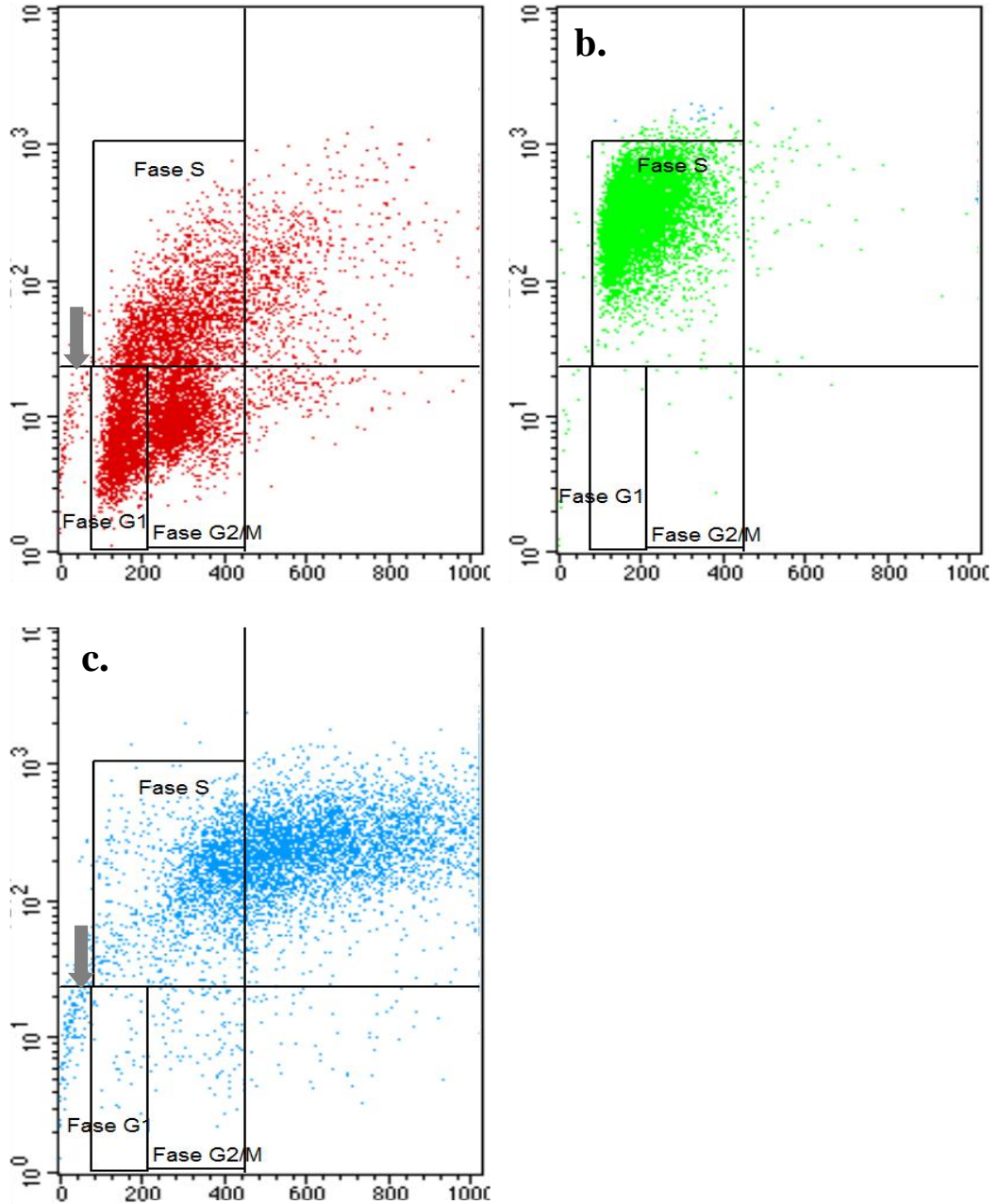


Figura 29. Comparación del tamaño y contenido de ADN de los sincicios y de las células espectadoras. **a)** La barra CE (*células espectadoras*) señala el rango de tamaño que poseen las células espectadoras, tanto $CD4^+$ (*rojo*) como Env^+ (*verde*), **b)** comparación del tamaño en sincicios de 6 horas de cocultivo (*turquesa*) contra sincicios después de 48 horas de cocultivo (*azul marino*), **c)** la barra CE' señala el rango de contenido de ADN de las células espectadoras $CD4^+$ (*rojo*) y Env^+ (*verde*) y **d)** comparación del contenido de ADN en sincicios a las 6 horas de cocultivo (*turquesa*) contra sincicios a las 48 horas de cocultivo (*azul marino*).

9.5 Desarrollo de una técnica para el estudio del ciclo celular en experimentos de fusión de células linfocitarias mediante citometría de cuatro colores

El estudio del ciclo celular de cada población después en cocultivos entre células CD4⁺ y células Env⁺, fue primero analizado en células cocultivadas y separadas (mediante un citómetro de flujo FACSAria) (Fig. 30). Sin embargo, se observó que en las lecturas de las células Env⁺ se generó un artefacto, debido probablemente a la apoptosis sufrida al separarlas por medio del citómetro de flujo FACSAria (Fig. 30A). El artefacto se atribuyó a que posiblemente la separación fue un evento muy estresante en las células que expresaban el gen *env* (que al parecer son más susceptibles ya que presentan menor porcentaje de viabilidad con respecto a las células CD4⁺), llevándolas a apoptosis. La fragmentación del ADN en células apoptóticas expondría entonces extremos 3' libres. Dichos extremos pueden ser sujetos de la incorporación de BrdU (por su semejanza estructural con la deoxi-Uridina) por parte de la enzima deoxi-nucleotidil transferasa terminal (TdT por sus siglas en ingles). La TdT es expresada en linfocitos T y B inmaduros, así como en células de leucemia linfoblástica aguda, por lo cual está presente en nuestras líneas celulares (55, 80, 167). Las células Env⁺ fusogénicas fueron positivas a la incorporación de BrdU (similar a lo que ocurre en la técnica de TUNEL para la detección de apoptosis en tejidos). Sin embargo, éste artefacto no indica una síntesis de ADN en fase S. Debido a esto se buscó como alternativa desarrollar una técnica de citometría de cuatro colores a fin de conservar los colorantes lipofílicos de membrana, pero a la vez fijar y permeabilizar las células para la entrada de 7-AAD para la detección del contenido total de ADN y un anticuerpo anti-BrdU (acoplado a APC), para determinar la síntesis de ADN en fase S.

Incorporación de BrdU por síntesis de ADN (anti-BrdU)



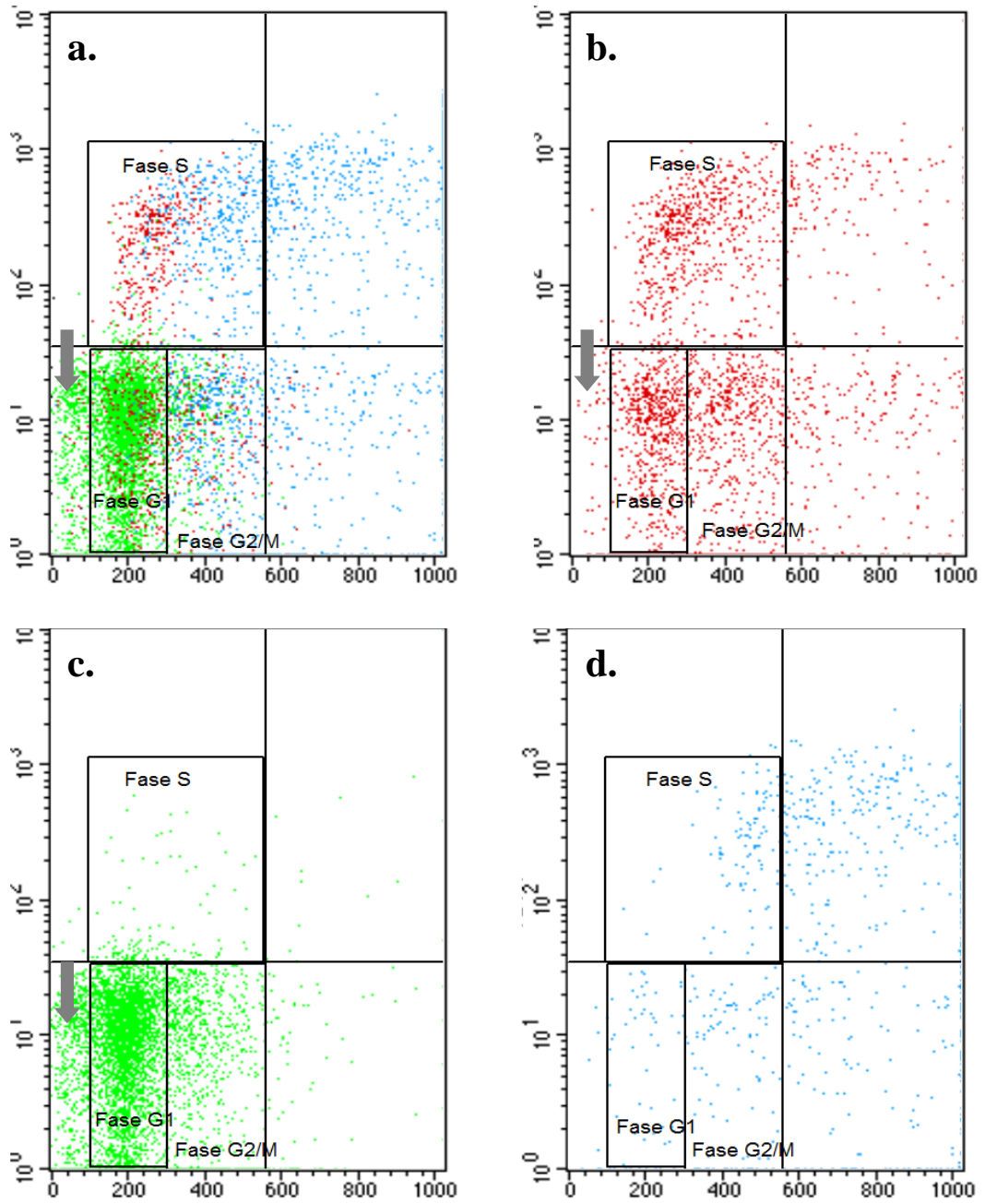
Contenido de ADN (7-AAD)

Figura 30. Análisis del ciclo celular en células separadas usando un citómetro de flujo FACSaria. **a)** Las células CD4⁺ espectadoras (*rojo*) se distribuyen en las tres fases del ciclo celular, **b)** las células Env⁺ fusogénicas espectadoras (*verde*) presentaron la formación de un artefacto debido el daño por apoptosis y **c)** los sincicios (*azul*) parecen en su totalidad positivos a la incorporación de la BrdU. Las células no viables presentan muy poco contenido de ADN (*flechas grises*).

La técnica de citometría de cuatro colores se desarrolló para el análisis del ciclo celular de cada una de las poblaciones en cocultivo (Fig. 31). Dicha técnica tuvo que satisfacer la condición de preservar los colorantes de membrana para permitir la identificación de cada población. Además de permitir la fijación y permeabilización de las células para el ingreso de la DNAsa, la 7-AAD y del anticuerpo anti-BrdU. Después de varias pruebas, se obtuvieron resultados satisfactorios disminuyendo el tiempo de fijación y permeabilización de 30 a 15 minutos y de 20 a 10 minutos, respectivamente.

Las ventajas de la determinación del ciclo celular por citometría de cuatro colores son: la posibilidad de analizar el ciclo celular de cada tipo de células en cocultivo sin la necesidad de separarlas, menor número de células requeridas para el análisis, evita la generación de artefactos por apoptosis debido a que se reduce el tiempo de manipulación de las células y sobretodo el hecho de que se pudo así determinar y comprar al mismo tiempo el ciclo celular de todas las poblaciones en cocultivo. La descripción completa del método desarrollado se describió en la sección “Materiales y Métodos”

Incorporación de BrdU por síntesis de ADN (anti-BrdU)



Contenido de ADN (7-AAD)

Figura 31. Ciclo celular por citometría de cuatro colores, en cocultivos de seis horas entre células CD4⁺ y células Env⁺ fusogénicas. Las células CD4⁺ espectadoras (*rojo*) se distribuyen en las tres fases del ciclo celular, las células Env⁺ fusogénicas espectadoras (*verde*) presentaron paro del ciclo celular en fase G₁ y los sincicios (*azul*) presentaron células positivas como negativas a la incorporación de BrdU. a) Se puede apreciar el ciclo celular de la totalidad de células en cocultivo, b) células CD4⁺ espectadoras, c) células Env⁺ fusogénicas espectadoras y sincicios. Las células no viables presentan muy poco contenido de ADN (*flechas grises*)

9.6 Ciclo celular en monocultivos de células $CD4^+$ y Env^+

Las células $CD4^+$ en monocultivo presentan entre un 25 al 30% de células en cada fase del ciclo celular (Fig. 32A), es decir, hay aproximadamente un tercio de la población de células en cada fase. Cuando ésta proporción se modifica es indicio de una alteración del ciclo celular que pudiese derivar en un paro o bloqueo del mismo. La técnica que utilizamos no distingue entre las células en fase G_2 y células en fase M (aparecen como una misma población). Debido a que éstas células provienen de una línea de leucemia linfoblástica aguda continuamente reingresan en el ciclo celular, no poseen fase G_0 . Las células Env^+ fusogénicas después de tres días de inducción de la expresión de *env* presentan un paro del ciclo celular en la fase G_1 , de modo que aproximadamente el 83% de ellas se encuentran en dicha etapa y solo un 16% están en fase G_2/M . No se observaron células Env^+ en fase S (Fig. 32B). Lo anterior indicó que su proliferación prácticamente se detuvo. Las células Env^+ no fusogénicas muestran la misma condición de paro de su ciclo celular.

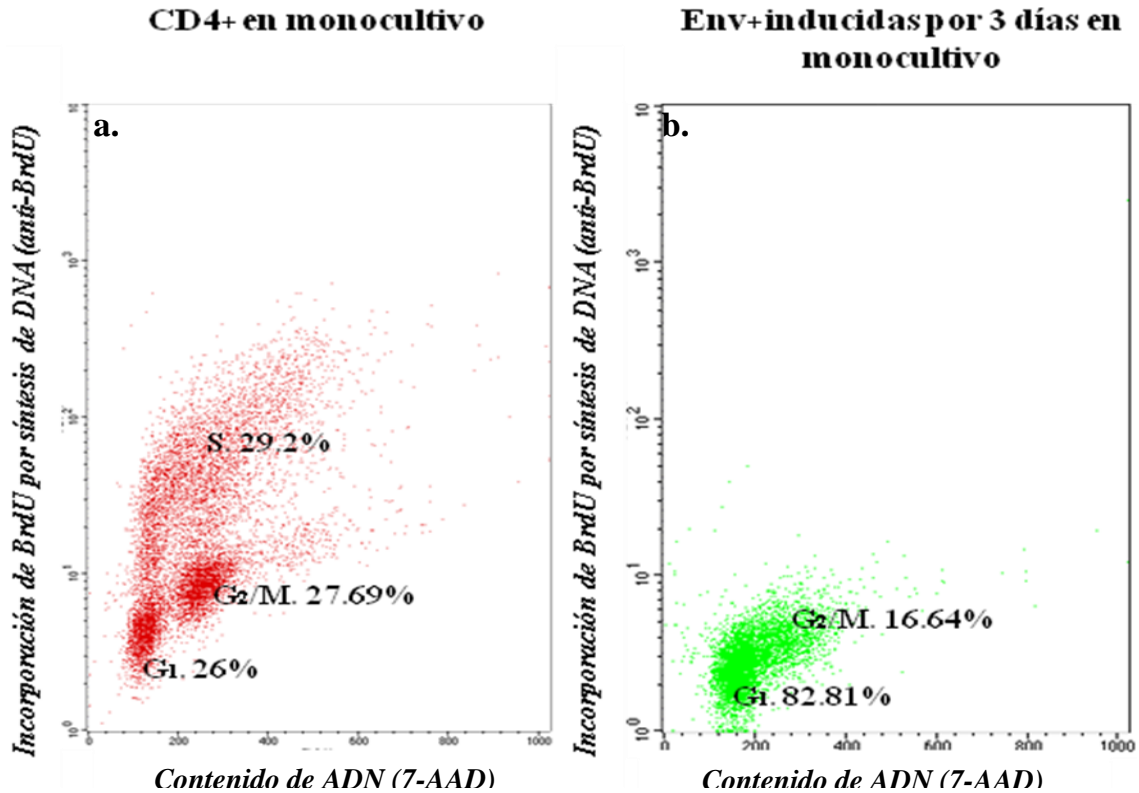


Figura 32. Estado del ciclo celular en: **a)** células CD4⁺ y **b)** células Env⁺ fusogénicas (después de tres días de inducción para la expresión del gen *env*).

El paro del ciclo celular por parte de las células Env⁺ fusogénicas es consecuencia directa de la expresión del gene *env*. El tiempo de inducción de la expresión de *env* es un factor que se refleja en el ciclo celular. Entre menor fue el tiempo durante el cual expresó el gene *env* observamos un mayor porcentaje de células que aún permanecen en fase G₂/M. Por ejemplo, cuando se indujo la expresión de *env* por tres días, el 83% de células permanece en fase G₁ y de 12 o 16 % de células se encuentran en fase G₂/M (Fig. 26B). En contraste, cuando se indujo la expresión de *env* por solo dos días, el 63% permanecen en fase G₁ y el 32% de las células se encuentran en fase G₂/M (Fig. 33). Lo anterior indicó, que la condición de paro del ciclo celular fue mucho más extendida entre la población de células Env⁺ entre mayor fue el tiempo de inducción de éstas células.

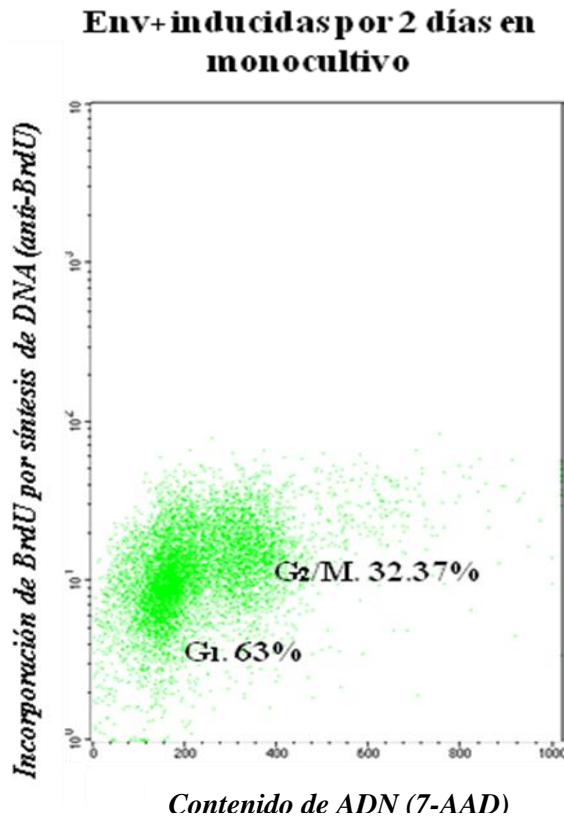


Figura 33. Estado del ciclo celular en de células Env⁺ fusogénicas después de dos días de inducción para la expresión del gen *env*.

El estudio del ciclo celular muchas veces solo se realiza analizando el contenido total de ADN usando yoduro de propidio (IP) o 7-AAD en células fijadas. Mediante la evaluación de la incorporación de BrdU se logró una mejor definición de la subpoblación de células en fase S y una mejor delimitación de las que se encontraron en fase G₁ y G₂/M. En la Fig. 34 se muestra un ejemplo de un análisis de ciclo celular mediante contenido de ADN (utilizando los datos de captura de las muestras presentadas en la Fig. 26). Aunque se pueden distinguir las fases G₁ y G₂/M en células las CD4⁺, se dificulta establecer los límites de la fase S. El problema se acentúa en el caso de las células Env⁺, ya que como se ha descrito anteriormente no existen células en fase S. Sin embargo, ésto no se logra apreciar

debido a la falta de definición de los límites entre las tres fases, aunque si se puede observar el paro del ciclo celular en fase G₁.

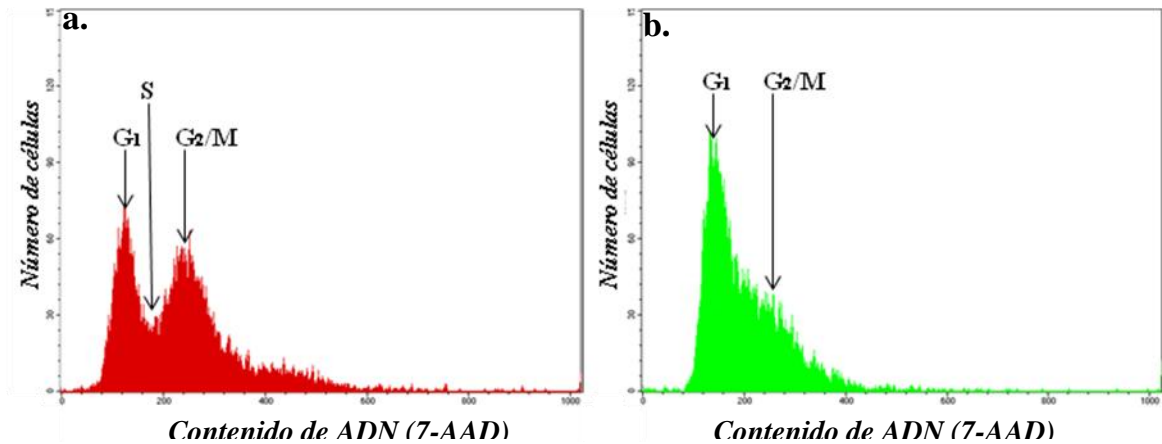


Figura 34. Estado del ciclo celular (con base en su contenido de ADN), en: **a)** células CD4⁺ y **b)** células Env⁺ fusogénicas después de tres días de inducción para la expresión del gen *env*.

Un factor que se vigiló rigurosamente fue que el color del medio AIM-V no perdiera su tono rojo (dado por el indicador rojo de fenol), pues la acidificación del medio que provoca el cambio de color hacia un tono amarillo puede afectar la viabilidad de las células. El medio AIM-V carece de suero fetal bovino y aunque posee glutamina, la cual favorece la replicación celular, la ausencia de suero en el medio de cultivo puede detener el ciclo celular en fase G₁. Lo anterior parece ocurrir a las células CD4⁺ después de incubar 72 horas en medio AIM-V.

9.7 Ciclo celular en cocultivos de células $CD4^+$ y Env^+

Una vez bien desarrollada la técnica para el estudio de ciclo celular en cocultivos mediante citometría de cuatro colores, se analizó el ciclo celular de las poblaciones en cocultivo. En los sincicios solo se puede saber si éstos presentan síntesis de ADN o no debido a la incorporación de ADN, pero no se pueden definir como tal una fase S, G_1 o G_2 . Lo anterior se debe a que pueden fusionarse células en distintas fases del ciclo celular se pueden presentar núcleos en distintas fases del ciclo en un mismo sincicio. Además, uno de los parámetros que se utilizan para analizar el ciclo celular es el contenido de ADN que en el caso de los sincicios también se ve aumentado y no corresponde al de una población de células individuales.

Las células espectadoras tanto $CD4^+$ como Env^+ sí se reconocieron en alguna de las tres fases del ciclo celular (Fig. 35). Las primeras presentaron una constante proliferación ya que durante las 48 horas que se analizó el ciclo celular se observó células en cada una de las distintas fases del ciclo. A las 48 horas de cocultivo se observó una mayor prevalencia de células en fase G_1 . Sin embargo las células en fase S en el peor de los casos se mantuvo alrededor del 23%. La población de células que se encuentra en fase S es la primera población que tiende a desaparecer cuando se presenta un paro del ciclo celular. Por lo cual, la formación de sincicios o la interacción con Gp120 circundante no generó el paro del ciclo celular en células Jurkat $CD4^+$ no activadas.

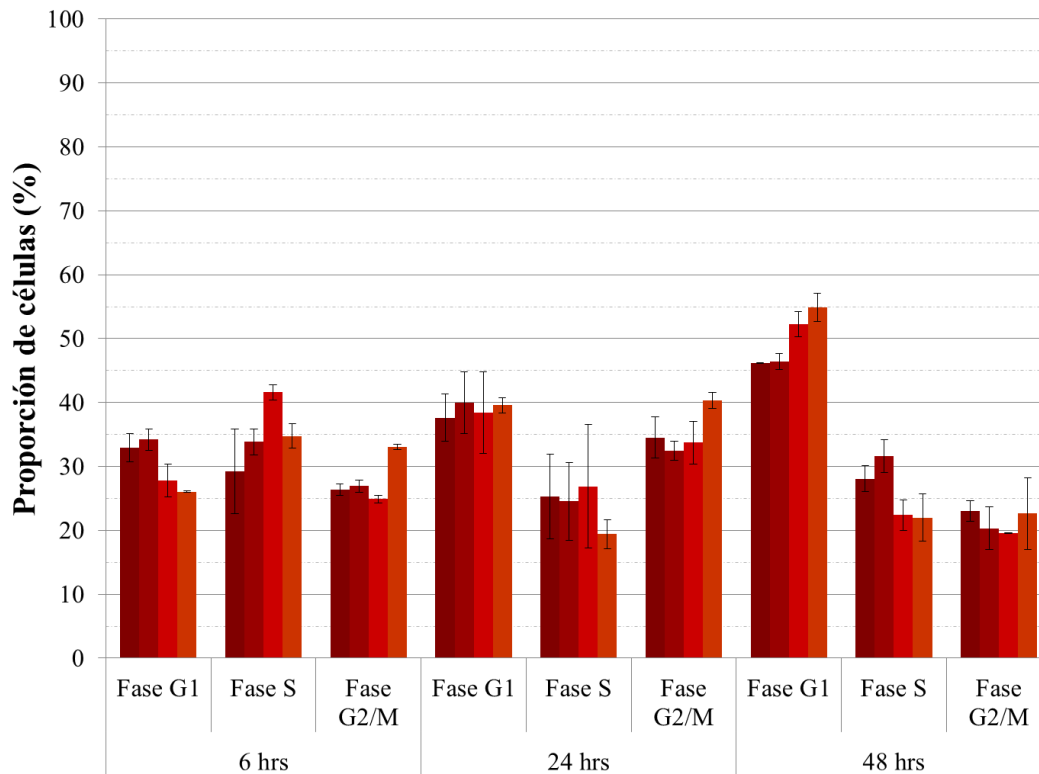


Figura 35. Estado del ciclo celular de células CD4⁺. Células CD4⁺ cocultivadas con células Env⁺ fusogénicas sin (■) y con (■) la adición de T-20 a partir de las seis horas de cocultivo, células CD4⁺ cocultivadas con células Env⁺ no fusogénicas (■) y células CD4⁺ en monocultivo (■).

La población de células Env⁺ espectadoras tanto fusogénicas como no fusogénicas presentó un paro del ciclo celular en fase G₁. Dicho resultado, es congruente a lo que se observó en monocultivos de éstas líneas celulares inducidas para la expresión de *env*. La proporción de células Env⁺ espectadoras fusogénicas en fase G₁ fue desde 84% hasta 90%, éste patrón se repite en los monocultivos de células Env⁺ tanto fusogénicas como no fusogénicas. Lo anterior indicó que no existió cambio en el estado del ciclo celular de éstas líneas celulares con respecto a su estado antes de iniciar los cocultivos, debido a la formación de sincicios (Fig. 36 y 37).

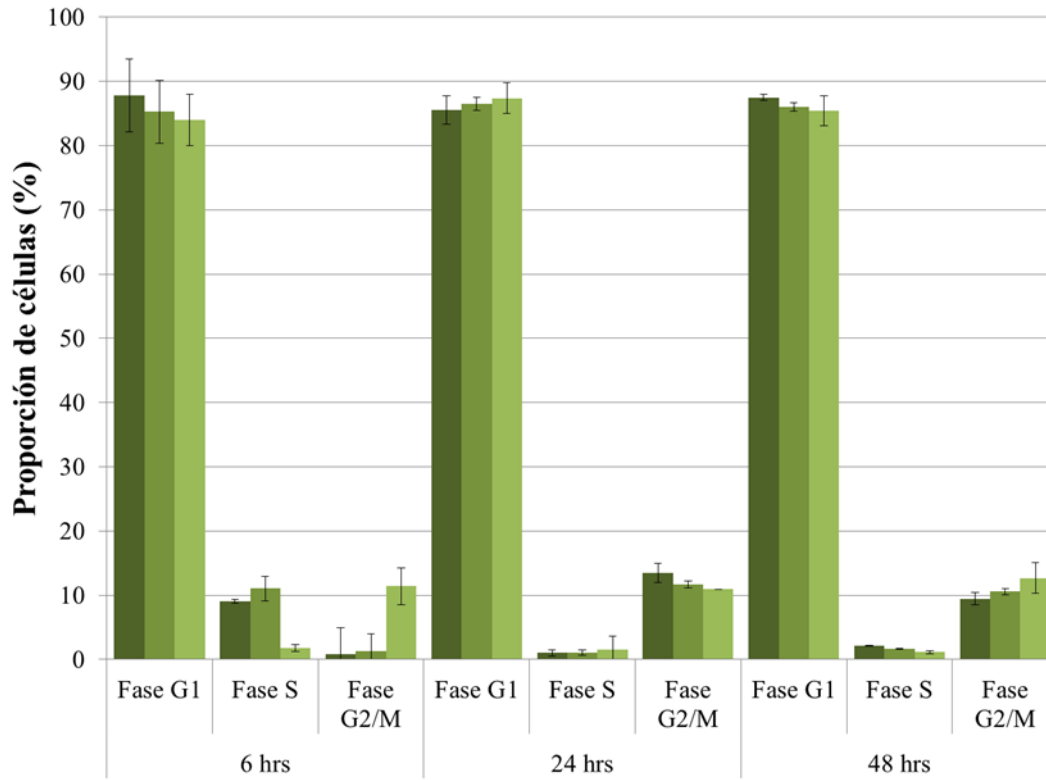


Figura 36. Estado del ciclo celular de células Env⁺ fusogénicas. Células Env⁺ fusogénicas cocultivadas con células CD4⁺ sin (■) y con (■) la adición de T-20 a partir de las seis horas de cultivo, y células Env⁺ en monocultivo (■).

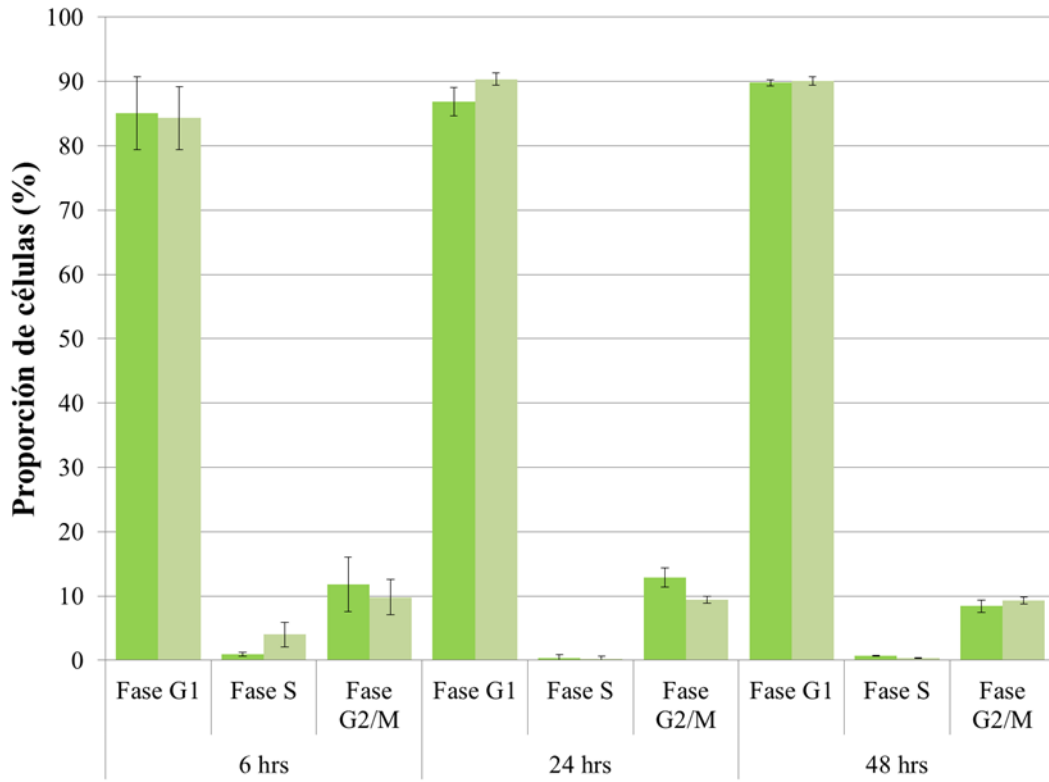


Figura 37. Estado del ciclo celular de células Env⁺ no fusogénicas. Células Env⁺ no fusogénicas cocultivadas con células CD4⁺ (■) y células Env⁺ no fusogénicas en monocultivo (■).

La síntesis de ADN se comparó entre sincicios de cocultivos en los cuales ocurría constante incorporación de células CD4⁺ y sincicios de cocultivos donde se inhibió la constante incorporación de células CD4⁺ en sincicios y la formación de nuevos sincicios. Ésto último se inhibió con la adición de T-20 a las 6 horas de cocultivo, por lo cual se estudiaron solo los sincicios generados durante las primeras 6 horas. La incorporación de BrdU en ambos casos presentó un perfil similar, por lo que la síntesis de ADN no solo se debe a la incorporación de células CD4⁺ en fase S en los sincicios, sino que es una característica intrínseca de los mismos.

El porcentaje de sincicios que sintetizaron ADN a las 6 horas de cocultivo fue de 63-71%. Sin embargo, el porcentaje de sincicios con síntesis de ADN a las 24 horas de cocultivo fue de 31-36%. A pesar de la reducción del porcentaje de sincicios con síntesis de ADN, tenemos que a las 48 horas de cocultivo el entre el 23-24% de los sincicios sintetizaron ADN (Fig. 38).

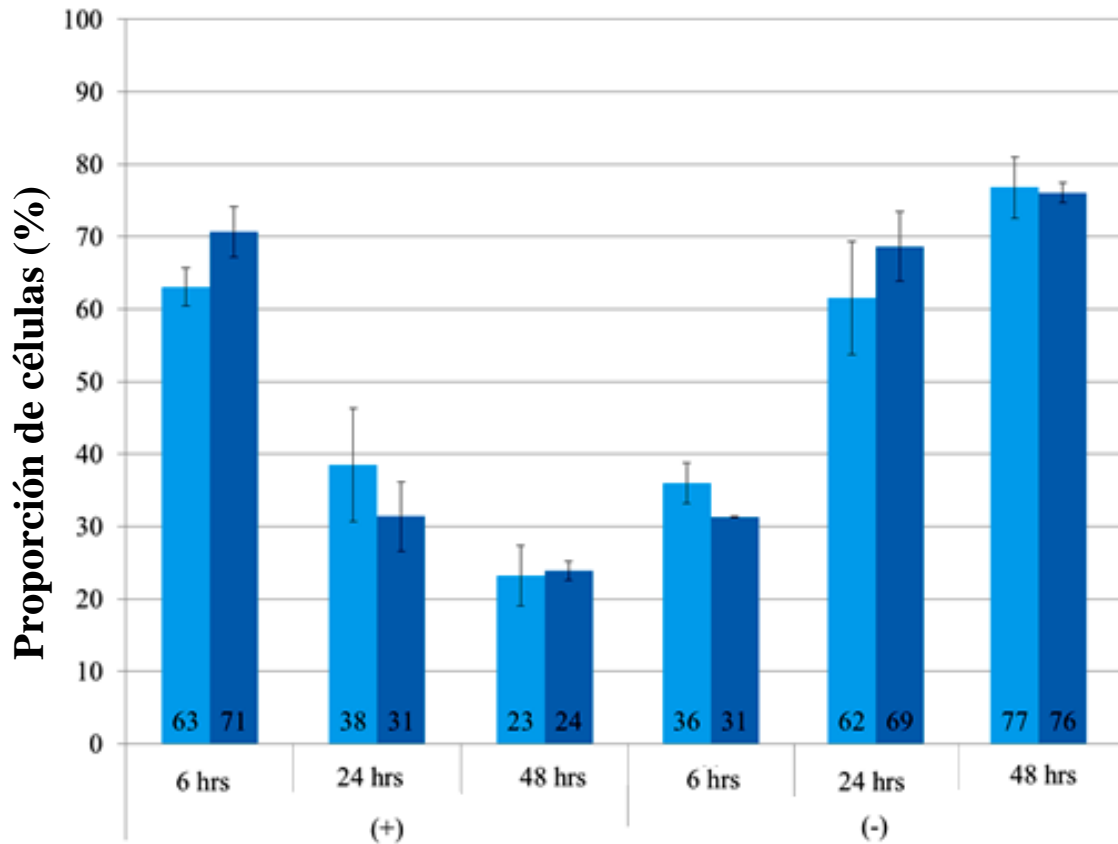


Figura 38. Porcentaje de sincicios positivos (*izq*) y negativos (*der*) a la incorporación de BrdU. Sincicios provenientes de cocultivos entre células CD4⁺ y Env⁺ fusogénicas, sin (■) y con (■) la adición de T-20 a partir de las seis horas de cocultivo.

Los sincicios negativos para la incorporación de BrdU son en su mayoría pequeños, es decir con un contenido de ADN menor o igual a 4c. Dicha población representó el 20-23% de los sincicios a las 6 horas, el 34-37% a las 24 horas y el 43-47% de todos los sincicios en cocultivo a las 48 horas. El aumento de ésta población de sincicios correlacionó con la aparición de un mayor número de sincicios de menor tamaño a las 48 horas de cocultivo descrito anteriormente en la sección “viabilidad de las células en cocultivo”. El porcentaje de sincicios pequeños y positivos a la síntesis de ADN fue de 23-26% a las 6 horas, de 15-20% a las 24 horas y de 8-10% a las 48 horas (Fig. 39).

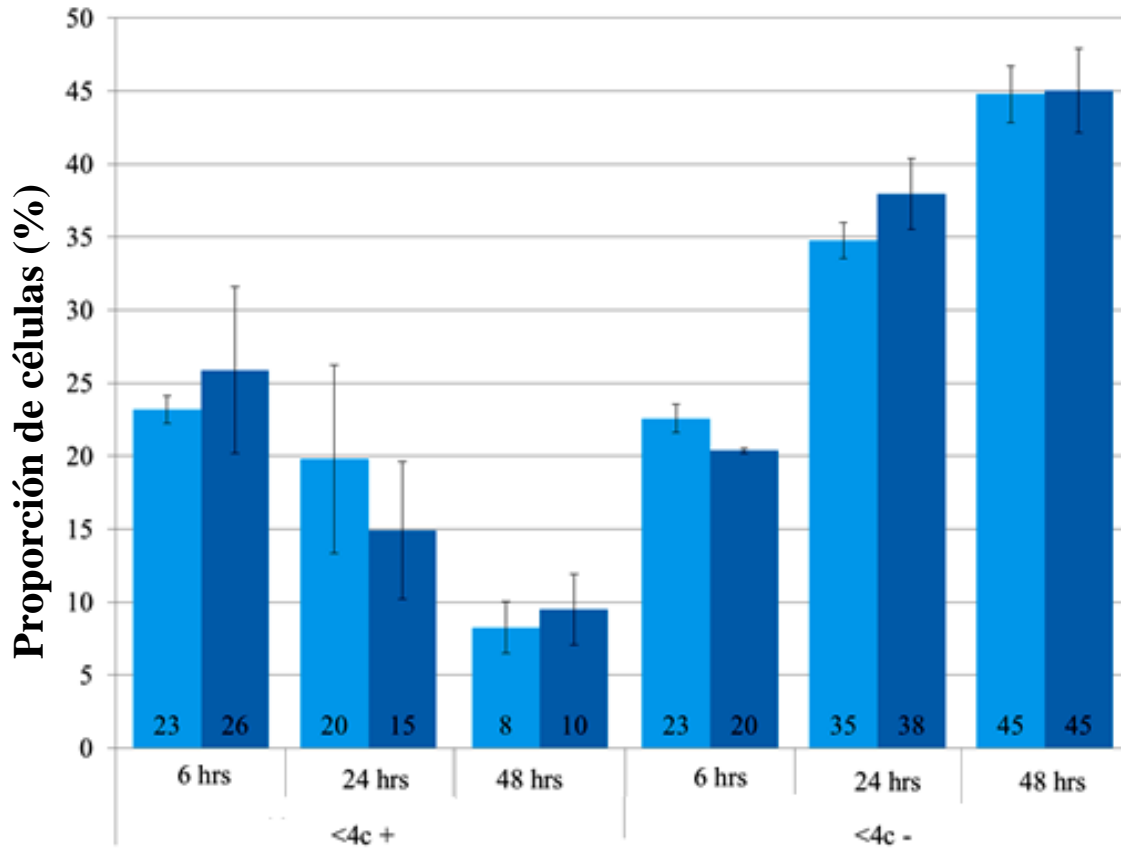


Figura 39. Porcentaje de sincicios pequeños positivos (*izq*) y negativos (*der*) a la incorporación de BrdU, provenientes de cocultivos entre células CD4⁺ y Env⁺ fusogénicas, sin (■) y con (■) la adición de T-20 a partir de las seis horas de cocultivo.

El porcentaje de sincicios de mayor tamaño negativos a la síntesis de ADN fue de 11-13% a las 6 horas, de 27-31% a las 24 horas y de 31-32% a las 48 horas de cocultivo. El porcentaje de sincicios grandes (contenido de ADN mayor a 4c), fue de 40-45% a las 6 horas, de 16-19% a las 24 horas y de 14-15% a las 48 horas de cocultivo (Fig. 40).

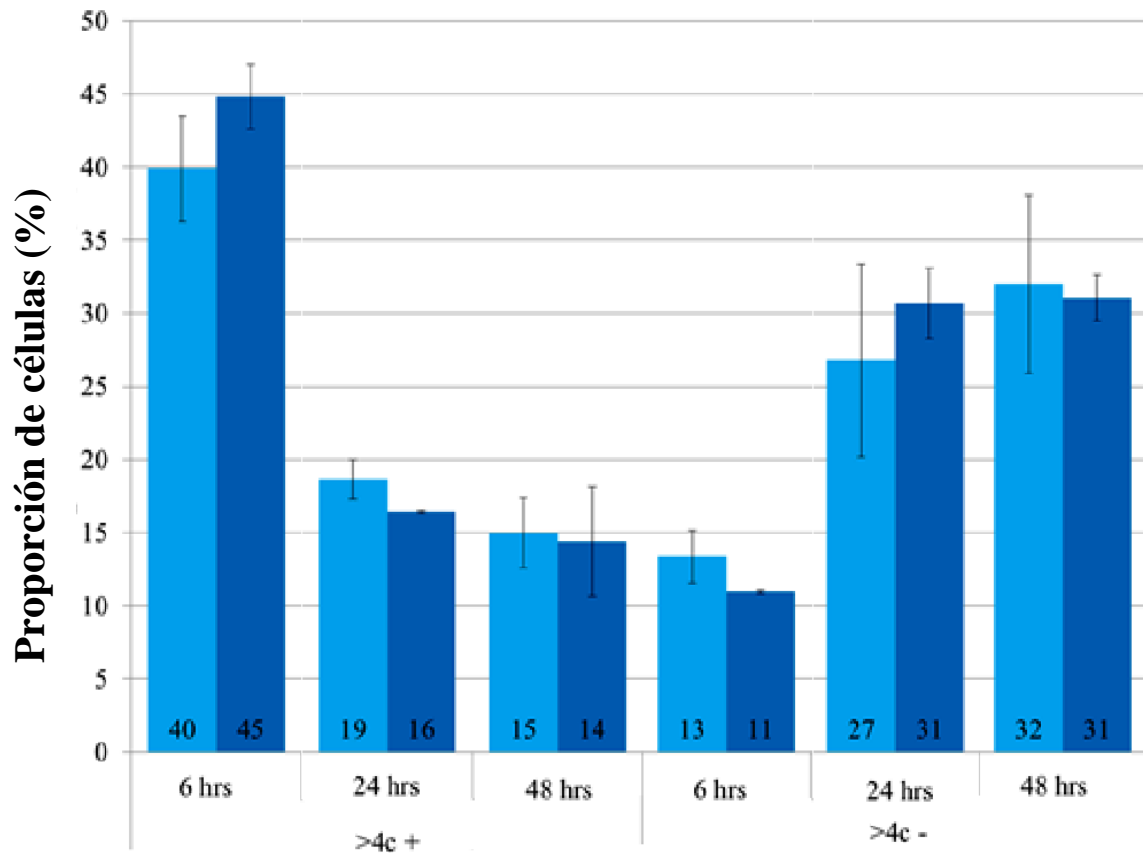


Figura 40. Porcentaje de sincicios grandes positivos (*izq*) y negativos (*der*) a la incorporación de BrdU, provenientes de cocultivos entre células CD4⁺ y Env⁺ fusogénicas, sin (■) y con (■) la adición de T-20 a partir de las seis horas de cocultivo.

10. Discusión

La infección por HIV-1 conlleva un sinnúmero de alteraciones fisiológicas, las cuales son ocasionadas por distintos mecanismos (60, 100). La acción directa de proteínas virales solubles como Gp120 puede evitar la proliferación celular (154). El paro del ciclo celular debida a Gp120 es una consecuencia posible en ciertos tipos celulares, como son células progenitores neuronales del hipotálamo, células IL-2-dependientes y células CD8⁺ obtenidas de PBMCs activadas (133, 153). En el presente trabajo se buscó determinar el efecto de la fusión celular mediada por las proteínas de la envoltura del VIH, sobre la capacidad proliferativa de las células en cocultivo. Lo anterior se logró al analizar las dinámicas poblacionales mediante conteo absoluto, la viabilidad y el ciclo celular de las células en cocultivo. El modelo estudiado puede dar una noción del escenario que podría suceder en nódulos linfáticos, donde concurren las condiciones de alta densidad celular y la presencia de células infectadas que expresan proteínas virales.

10.1 Características de los sincicios generados por fusión celular

La adecuada identificación de las distintas poblaciones cocultivadas (fusionadas y no fusionadas) se realizó por citometría de flujo, según un protocolo diseñado y caracterizado en nuestro grupo (69, 70, 71, 106, 151). El método permitió observar cambios en sus dinámicas poblacionales, sus porcentajes de viabilidad y ciclo celular. La identificación se basó primordialmente en las fluorescencias de los colorantes lipofílicos de membrana y en las características morfológicas como el tamaño y granularidad, así como el fenómeno de FRET. Trabajos previos de nuestro grupo mostraron que los sincicios presentan un mayor tamaño y granularidad que las poblaciones de células espectadoras (70,

106). Los sincicios se identifican además por mostrar doble fluorescencia proveniente de los colorantes DiI y DiO, utilizados para marcar las células antes del cocultivo. El efecto de transferencia de energía del colorante DiO al colorante DiI es una característica exclusiva de los sincicios, ya que los agregados con ambos tipos celulares no lo presentan (70, 106).

Las características morfológicas y probablemente funcionales de los sincicios son heterogéneas (106), y ésto quedó nuevamente manifestado al observar la variable cantidad de material genético y la síntesis de ADN que presentan algunos sincicios. En nuestro modelo, el 60% de los sincicios no contienen más de cuatro núcleos y no muestran un aumento considerable de su tamaño (106). Lo anterior recuerda los sincicios generados de la fusión entre linfocitos T en tejidos de pacientes infectados, los cuales contienen pocos núcleos y no presentan aumento considerable de su tamaño (por ello son de difícil detección) (136).

10.2 Dinámicas de las poblaciones en cocultivo (aumento o disminución del número absoluto de células)

El conteo de eventos absolutos mediante el uso de perlas TruCOUNT permitió tener un panorama inicial del comportamiento de las poblaciones celulares en cocultivo en experimentos de hasta 96 horas. Las dinámicas poblacionales mostraron la reducción del número de células espectadoras y que éstas no incrementaron nuevamente su cantidad. Lo anterior, podría ser ocasionado ya sea porque su viabilidad se viera comprometida, su ciclo celular fuera detenido o bien porque se incorporaran continuamente en sincicios.

La fusión celular es un evento que ocurre con mayor rapidez dentro las primeras horas de cocultivo. El número de sincicios continua aumentando aunque de manera más lenta durante las 96 horas de cocultivo. Al inhibir la fusión de más células a partir de las 8 horas del cocultivo mediante la adición del péptido T-20, se obtuvo que el número de sincicios permaneciera constante, indicando que el inhibidor impidió la formación de nuevos sincicios.

La muerte celular, el paro del ciclo celular o incorporación constante en los sincicios pudieran originar que las poblaciones de células espectadoras no vuelvan a incrementarse. Por lo anterior, se detuvo la incorporación constante en los sincicios (adicionando un inhibidor de la fusión) después de las 8 horas de cocultivo.

Las células Env⁺ fusogénicas en cocultivo con células CD4⁺ no proliferaron aun después de la adición del inhibidor de la fusión. Al inhibir la fusión después de 8 horas de cocultivo, aumentó la población de células CD4⁺ en cocultivo con células Env⁺ fusogénicas. La simple presencia de sincicios (sin más eventos de fusión) no fue suficiente para limitar el crecimiento de la población de éstas células espectadoras y por ende se requiere de la constante fusión celular para generar nuevos sincicios o bien el continuo reclutamiento de células CD4⁺ por parte de los sincicios.

Las razones del por qué se mantienen números bajos de células espectadoras en cocultivo fueron diferentes para cada tipo de población de espectadoras. Las células Env⁺ dejaron de proliferar, mientras que las células CD4⁺ espectadoras (cocultivadas con células Env⁺ fusogénicas), aunque en constante proliferación, fueron casi a la misma velocidad constantemente reclutadas en sincicios.

10.3 Porcentaje de fusión y efecto del inhibidor T-20

El efecto del inhibidor añadido después de la formación de los primeros sincicios (a las 6 horas de cocultivo) sobre el porcentaje de los mismos generados es evidente a partir de las 48 horas de cocultivo. El inhibidor de fusión evita que el porcentaje de sincicios se incremente, mientras que en ausencia del mismo el porcentaje de fusión aumenta. Lo anterior termina de confirmar lo ya antes reportado de que el T-20 evita la fusión celular (151), sin importar que ya se hubiesen generado células fusionadas a causa de las mismas. Por lo cual, es una buena alternativa a fin de estabilizar el número y proporción de sincicios a lo largo del tiempo de cocultivo. También se disminuye la heterogeneidad, al menos en cierto grado pues el tiempo de formación es muy parecido. Además, se evita posibles cambios de fenotipo o de características propias de los sincicios por la contribución de una nueva célula que llegue a fusionarse.

Los sincicios que son de muy difícil detección sin algún marcador específico (136), sobre todo por el hecho de que dejan de expresar CD4 (151). La probabilidad de que dichos sincicios permanezcan en un microambiente disminuyendo el número de células CD4⁺, puede ser reducida enormemente por la administración de enfuvirtida (T-20).

10.4 Porcentajes de viabilidad de las células en cocultivo

La muerte celular de las células en cocultivo en éste modelo no es la razón por la cual disminuye el número de células espectadoras tanto CD4⁺ como Env⁺. Las células CD4⁺ espectadoras en cocultivo con células Env⁺ fusogénicas por ejemplo no mostraron una disminución de su porcentaje de viabilidad a lo largo de 72 horas de cocultivo, excepto a las 6 horas de cultivo. Sin embargo, la menor viabilidad a las 6 horas de cocultivo se

debió a que la incorporación de un gran número de células viables a los sincicios por lo cual la proporción de éstas disminuyó. Para las 24 y 48 horas de cocultivo se observó una recuperación del porcentaje de viabilidad de las células CD4⁺ espectadoras en cocultivo con Env⁺ fusogénicas (con o sin la adición de T-20). Existen reportes que indican que la disminución del número de células CD4⁺ debida a la fusión celular con células infectadas mediante las proteínas Env del VIH se presenta a las 24 horas de cocultivo. Sin embargo, la disminución fue asociada a la fusión celular y a la suposición de que los sincicios poseen un corto tiempo de vida, lo cual no demostraron con estudios de viabilidad (161, 162).

Las células Env⁺ fusogénicas poseen una menor viabilidad con respecto a las poblaciones de células CD4⁺ y células Env⁺ no fusogénicas (ya sea en cocultivo o monocultivo), ésta menor viabilidad se debió a la expresión de proteínas de envoltura. Sin embargo, el hecho de que las células Env⁺ no fusogénicas presenten buena viabilidad, sugiere que la capacidad fusogénica de las proteínas de envoltura implica una disminución de la viabilidad.

El porcentaje de viabilidad que presentan los sincicios desde las primeras 6 horas de cocultivo fue superior incluso al de las células Env⁺ fusogénicas. La disminución en la viabilidad de los sincicios se presentó hasta las 72 horas de cocultivo. Lo anterior contrasta con reportes donde se considera que los sincicios son sistemas desorganizados que mueren rápidamente por apoptosis (43, 139). Aunque no se descarta que una proporción de sincicios presenten estadios muy tempranos de muerte celular, desde las 48 horas de cocultivo, pero que sigan manteniendo cierta estabilidad metabólica y por tanto no presenten alteraciones en su membrana plasmática. La posibilidad de que existan sincicios viables por más de 72 a 96 horas pudiera sugerir que al menos una parte de dichas células

logran cierto grado de estabilidad, lo cual dependería de las condiciones, número y fase del ciclo celular de las células que se fusionan. Aunque se ha reportado en estudios post mortem que el 50% de los sincicios en el sistema nervioso central se encuentran en apoptosis, se desconoce cuál es el tiempo vida media de éstos (123).

10.5 Ciclo celular previa y posteriormente a la formación de sincicios

Las proteínas de envoltura (al parecer Gp120) inducen el paro del ciclo celular en ciertos tipos celulares (38, 133, 153, 154). Los reportes sobre paro del ciclo celular mediado por la expresión de Env, indican que su acción es por la presencia de Gp120 soluble, y la interacción de ésta con receptores de quimiocinas (133). Dichas características parecen presentarse en éste modelo. Las células Env⁺ son susceptibles al paro del ciclo celular por la expresión de Env (independiente de la interacción con CD4 y de la capacidad fusogénica de Gp120), por ello su falta de proliferación posterior es debido a esto. Como las células Env⁺ no expresan CD4 (151) podemos postular a partir de éste punto, que el paro o bloqueo es independiente de CD4. Lo anterior coincide con lo reportado anteriormente al respecto (133, 153). La detención del ciclo celular fue igual entre células Env⁺ fusogénicas y no fusogénicas por lo cual tampoco influye la capacidad fusogénica. La reducción inicial de la población de células Env⁺ es debida a la incorporación de dichas células en los sincicios pero su falta de proliferación posterior es debida principalmente por el paro de su ciclo celular.

Las células Jurkat CD4⁺ no presentaron paro de su ciclo celular, lo cual coincide con reportes previos en los cuales células CD4⁺ no dependientes de IL-2, no detienen su ciclo celular por la acción de Gp120 (154). La reducción de la población de células CD4⁺

aun a pesar de su constante proliferación es debida a la incorporación constante en sincicios. Por lo anterior, el número de células $CD4^+$ que se incorporan a los sincicios es al parecer mayor al de células Env^+ que se integran a los mismos. Estudios previos en el laboratorio en los cuales se estudió la composición relativa de los sincicios apoyan ésta afirmación (106). La incorporación de un mayor número de células $CD4^+$ en los sincicios, podría ser un aspecto de importancia en relación a la patogénesis de VIH, al tener en cuenta que una célula infectada (Env^+) pudiese reclutar a varias células $CD4^+$ no infectadas, reduciendo el número de éstas células en el microambiente.

Las células Env^+ tanto fusogénicas como no fusogénicas en cocultivo con células $CD4^+$ siguen mostrando su estado de paro del ciclo celular en fase G_1 , por lo anterior se descarta que la formación o presencia de sincicios altere el ciclo celular de las células circundantes por la acción de factores solubles secretados por los sincicios.

En los sincicios la delimitación del ciclo celular se vuelve confusa cuando no se fusionan células sincronizadas. El análisis del ciclo celular normalmente se basa en la presencia de ciertos complejos ciclina/CDK, características como la síntesis de ADN, el tamaño de las células y en el contenido de ADN de la célula. Al fusionar células no sincronizadas, en un inicio se presenta una mezcla de las características de ambas células fusionadas, y si más células se fusionan como es el caso de éstos sincicios, pues cada célula aporta sus características al sincicio.

Algunos autores han descrito la sincronización del ciclo celular en sincicios binucleados, pero en dichos modelos se conocía la fase en la cual se encontraban ambas células pues habían sido sincronizadas previamente y se analizaba por autoradiografía las características de cada núcleo (181). Sin embargo en el modelo con el cual se trabajó

durante éste estudio, solo las células Env⁺ se encontraban sincronizadas por lo cual solo tendríamos la certeza del estado de ellas pero no de las células CD4⁺ que se fusionan. Además de que el análisis por citometría de flujo no permitía conocer las características particulares de cada núcleo de los sincicios. Aun así se pudo observar que la síntesis de ADN característica de la fase S del ciclo celular se presenta de manera muy extensa en la población de sincicios a las 6 horas de cocultivo lo cual probablemente se deba al efecto de la incorporación de células CD4⁺ en fase S en sincicios. Sin embargo, después de 24 horas de cocultivo se observa que la síntesis de ADN se reduce de manera significativa y aun la incorporación de más células CD4⁺ en sincicios (de las cuales aproximadamente una de cada tres se encuentra en fase S) no puede impedir dicho fenómeno. Aunque lo importante de resaltar es que la síntesis de ADN se mantiene en cierto grupo de sincicios aun después de 48 horas de cocultivo y al 42 horas después de impedir el reclutamiento de más células (entre ellas células en fase S). La síntesis de ADN posiblemente sea intermitente en los sincicios, es decir, es poco probable (aunque no imposible) que los sincicios que sintetizan ADN a las 48 horas de cocultivo lo hubiesen hecho durante los dos días del experimento. Lo anterior, no lo podemos asegurar aún pero es de considerar que la síntesis de ADN en fase S se lleva a cabo en un lapso de tiempo de entre 6 a 8 horas y las síntesis continua de ADN en sincicios tendría que ser un tiempo de 6 a 8 veces mayor. Nosotros sugerimos entonces que en caso de que la síntesis de los sincicios fuera cíclica, podrían dar indicios de que algunos sincicios pudiesen continuar el ciclo celular y quizás replicarse incluso. Lo anterior, podría seguir un mecanismo similar al sucedido en los sincicios formados por células en fase S y células en fase G₁, donde la fusión fue seguida de la sincronización de los núcleos en fase S y de varias rondas replicativas (181).

11. Conclusiones

La formación sincicios reduce drásticamente el número de células CD4⁺ y de células Env⁺ fusogénicas en cocultivo. Después de cuatro días, el número de células CD4⁺ espectadoras fue diez veces menor al de los cultivos control. En esta tesis se estudiaron la viabilidad celular, la capacidad proliferativa, el ciclo celular y el reclutamiento continuo de estas células en los sincicios como causas de esta disminución

El análisis del ciclo celular de las células CD4⁺ y Env⁺ mostró que la disminución de su número durante la formación de sincicios tiene causas diferentes. Las células CD4⁺ espectadoras cocultivadas con células Env⁺ presentaron porcentajes normales de células en las fases G₁, S y G₂/M, indicando que las células no fusionadas no presentan una alteración de su capacidad proliferativa durante la formación de sincicios. La adición al cocultivo del péptido T-20 (inhibidor específico de la fusión) una vez que se ha permitido la formación de sincicios durante 6 horas, indujo una recuperación del crecimiento del número de células CD4⁺ espectadoras. Adicionalmente, se mostró que el porcentaje de células CD4⁺ viables en los cocultivos fué igual al de las células control. Estas observaciones indican que las células CD4⁺ sí se dividen y que no ocurre muerte de éstas células durante el cocultivo, por lo que la aparente disminución de su capacidad proliferativa se debió a su reclutamiento continuo en los sincicios.

En cambio, las células Env⁺ presentaron nula capacidad proliferativa y su ciclo celular se encontró detenido en la fase G₁. Esta detención del ciclo celular ocurrió tanto en células Env⁺ fusogénicas como no fusogénicas (debido a una mutación en el péptido de fusión), por lo cual se concluye que este evento es independiente de su capacidad fusogénica. Por otra parte, estudios de nuestro laboratorio y reportes de la literatura indican

que las células que expresan Env carecen de la molécula CD4. Por lo tanto, la detención del ciclo celular no se debió tampoco a la interacción de Gp120 con este receptor. Es posible que la detención del ciclo celular se relacione con la interacción de Gp120 con receptores de quimiocinas, ya que numerosos reportes indican que esta interacción puede desencadenar vías de señalización que ejercen una diversidad de efectos sobre distintos tipos celulares.

El porcentaje de células viables Env⁺ fusogénicas fué menor al de células Env⁺ no fusogénicas, tanto en monocultivo como en cocultivo. Por lo tanto, la expresión de Env y particularmente, de moléculas de Gp41 funcional redujo la viabilidad celular. Las causas de este efecto deben ser estudiadas posteriormente.

Estas observaciones indican que disminución del número de células Env⁺ durante las primeras 6 horas de cocultivo se debe solamente a su incorporación en los sincicios. La falta de proliferación de estas células y la pérdida de viabilidad son características intrínsecas de estas debido a la expresión de Env.

En el modelo *in vitro* utilizado en este trabajo, la gran mayoría de los sincicios (aproximadamente el 75%) permaneció viable hasta por 2 días horas y la mitad de los sincicios fueron viables hasta por 3 días. La presencia de sincicios no afectó la viabilidad de las células circundantes, ya que el porcentaje de viabilidad de las células espectadoras (tanto Env⁺ como CD4⁺) fué semejante al de las células control (en monocultivo). El estado del ciclo celular de las células espectadoras (tanto Env⁺ como CD4⁺) en cocultivo no se alteró por la formación o presencia de los sincicios. La mayor parte de los sincicios (60-70%) mostró actividad de síntesis de ADN a las 6 horas de cocultivo. Este porcentaje se redujo a aproximadamente 35% las 24 horas. La síntesis de ADN continuó en cerca de 23%

de los sincicios después de 48 horas. Esta actividad se mantuvo en presencia del péptido inhibidor de la fusión T-20, y por lo tanto no se debió a la incorporación de nuevas células en fase S, por lo que fué una actividad propia de los sincicios. Dado que el contenido de ADN en estos sincicios no aumentó de manera desproporcionada (lo que podría ocurrir si la síntesis de ADN fuera continua durante las 48 horas) es factible que la síntesis de ADN fuera cíclica y no continua. Por lo tanto, estas observaciones sugieren que una fracción de los sincicios generados mantiene la capacidad de proliferar.

La consecuencia inmediata de la formación de los sincicios sobre las células circundantes es la disminución del número de células en el microambiente, especialmente por la continua desaparición de las células CD4⁺. Lo anterior excluye la muerte de las células circundantes y alteraciones a su ciclo celular inducida por la presencia de sincicios. La disminución del número de células CD4⁺ debida a la fusión y la sobrevida de cierto porcentaje de sincicios, podrían ser relevantes para la patogénesis del SIDA. Estos eventos podrían producirse durante la infección por el VIH *in vivo*, particularmente en los tejidos linfáticos, en donde la alta densidad celular y la presencia de numerosas células infectadas favorecerían la formación de sincicios.

12. Bibliografía

1. Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, Murphy PM, Berger EA. 1996. CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science*, 272: 1955-58.
2. Amati B, Brooks MW, Levy N, Littlewood TD, Evan GI, Land H. 1993. Oncogenic activity of the c-Myc protein requires dimerization with Max. *Cell*, 72: 233-45.
3. Amati B, Littlewood TD, Evan GI, Land H. 1993. The c-Myc protein induces cell cycle progression and apoptosis through dimerization with Max. *EMBO J*, 12: 5083-87.
4. Andersen SS. 1999. Balanced regulation of microtubule dynamics during the cell cycle: a contemporary view. *BioEssays*, 21: 53-60.
5. Anderson JL, Hope TJ. 2004. HIV accessory proteins and surviving the host cell. *Curr HIV/AIDS Rep*, 1: 47-53.
6. Arellano M, Moreno S. 1997. Regulation of CDK/cyclin complexes during the cell cycle. *Int J Biochem Cell Bio*, 29: 559-73.
7. Arhel N, Genovesio A, Kim KA, Miko S, Perret E, Olivo-Marin JC, Shorte S, Charneau P. 2006. Quantitative four-dimensional tracking of cytoplasmic and nuclear HIV-1 complexes. *Nat Methods*, 3: 817-24.
8. Azzam R, Chen SL, Shou W, Mah AS, Alexandru G, Nasmyth K, Annan RS, Carr SA, Deshaies RJ. Phosphorylation by cyclin B-Cdk underlies release of mitotic exit activator Cdc14 from the nucleolus. *Science*, 305: 516-19.
9. Barraud P, Paillart JC, Marquet R, Tisné C. 2008. Advances in the structural understanding of Vif proteins. *Curr HIV Res*, 6: 91-99.

- 10.** Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L. 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, 220: 868-71.
- 11.** Basu VP, Song M, Gao L, Rigby ST, Hanson MN, Bambara RA. 2008. Strand transfer events during HIV-1 reverse transcription. *Virus Res*, 134: 19–38.
- 12.** Beach D, Durkacz U, Nijrse. 1982. Functionally homologous cell cycle control genes in fission yeast and budding yeast. *Nature*, 300: 706-09.
- 13.** Blaak H, Van't Wout AB, Brouwer M, Hooibrink B, Hovenkamp E, Schuitemaker H. 2000. In vivo HIV-1 infection of CD45RA(+)CD4(+) T cells is established primarily by Syncytium-inducing variants and correlates with the rate of CD4(+) T cell decline. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 1269-74.
- 14.** Blow J. 1997. Preventing rereplication of ADN in a single cell cycle: evidence for a replication licensing factor. *Cell Biol*, 122: 143-52.
- 15.** Boden D, Markowitz M. 1998. Resistance to human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 2775–2783.
- 16.** Bolinger C, Boris-Lawrie K. 2009. Mechanisms employed by retroviruses to exploit host factors for translational control of a complicated proteome. *Retrovirology*, 6: 8.
- 17.** Brando B, Göhde W, Scarpati B, D'Avanzo G. 2001. The “Vanishing Counting Bead” Phenomenon: Effect on absolute CD34+ cell counting in phosphate-buffered saline-diluted leukapheresis samples. *Cytometry*, 43: 154-60.
- 18.** Budka H. 1986. Multinucleated giant cells in brain: a hallmark of the acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Acta Neuropathol*, 69: 253–58.

19. Bukrinskaya A. 2007. HIV-1 matrix protein: a mysterious regulator of the viral life cycle. *Virus Res*, 124: 1–11.
20. Burke AP, Anderson D, Mannan P, Ribas JL, Liang YH, Smialek J, Virmani R. 1994. Systematic lymphadenopathic histology in human immunodeficiency virus-1-seropositive drugs addicts without apparent acquired immunodeficiency syndrome. *Hum Pathol*, 25: 248-56.
21. Cao J, Park IW, Cooper A, Sodroski J. 1996. Molecular determinants of acute single-cell lysis by human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, 70: 1340-54.
22. Campbell EM, Nunez R, Hope TJ. 2004. Disruption of the actin cytoskeleton can complement the ability of Nef to enhance human immunodeficiency virus type 1 infectivity. *J Virol*, 78: 5745–55.
23. Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Valent A, Raslova H, Yakushijin K, Horne D, Feunteun J, Lenoir G, Medema R, Vainchenker W, Kroemer G. 2004. Mitotic catastrophe constitutes a special case of apoptosis whose suppression entails aneuploidy. *Oncogene*, 23: 4362–70.
24. Castedo M, Roumier T, Blanco J, Ferri KF, Barretina J, Tintignac LA, Andreau K, Perfettini JL, Amendola A, Nardacci R, Leduc P, Ingber DE, Druillennec S, Roques B, Leibovitch SA, Vilella-Bach M, Chen J, Este JA, Modjtahedi N, Piacentini M, Kroemer G. 2002. Sequential involvement of Cdk1, mTOR and p53 in apoptosis induced by the HIV-1 envelope. *EMBO J*, 21: 4070-80.
25. Centers for Disease Control. 1981. Pneumocystis pneumonia-Los Angeles. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 30: 205-12.

26. Centers for Disease Control. 1981. Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men-New York City and California. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 30: 305-18.
27. Centers for Disease Control. 1981. Follow-up on Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 30: 409-10.
28. Chiu HC, Wang FD, Chen YM, Wang CT. 2006. Effects of human immunodeficiency virus type 1 transframe protein p6* mutations on viral protease-mediated Gag processing. *J Gen Virol*, 87: 2041-46.
29. Clark E, Santiago F, Deng L, Chong SY, De La Fuente C, Wang L, Fu P, Stein D, Denny T, Lanka V, Mozafari F, Okamoto T, Kashanchi F. 2000. Loss of G1/S Checkpoint in Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Cells Is Associated with a Lack of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor p21/Waf1. *J Virol*, 74: 5040-52.
30. Coffin JM. 1992. Structure and clasification of retroviruses. En Levy JA (ed) *The Retroviridae*. Vol 1. Plenum Press. New York, NY pp. 19-50.
31. Cooper DA, Gold J, Maclean P et al. 1985. Acute AIDS Retrovirus infection. Definition of a clinical illness associated with seroconversion. *Lancet*, 1: 537-40.
32. Cullen BR. 2003. Nuclear mRNA export: insights from virology. *Trends Biochem Sci*, 28: 419-24.
33. Cullen BR. 2009. Viral RNAs: lessons from the enemy. *Cell*, 136: 592-97.
34. Dagleish AG, Beverley PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA. 1984. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature*, 312: 763-67.

35. DeHart JL, Bosque A, Harris RS, Planelles V. 2008. Human immunodeficiency virus type 1 Vif induces cell cycle delay via recruitment of the same E3 ubiquitin ligase complex that targets APOBEC3 proteins for degradation. *J Virol*, 82: 9265-72.
36. Draetta G, Luca F, Westendorf J, Brizuela L, Ruderman J, Beach D. 1989. Cdc 2 protein kinase is complexed with cyclin A and E: evidence for proteolytic inactivation of MPF. *Cell*, 56: 829-38.
37. Dretta O, Brizuela L, Potashkin J, Beach D. 1987. Identification of p34 and p13, human homologs of the cell cycle regulators of fission yeast encoded by *cdc2+* and *suc1+*. *Cell*, 50: 319- 25.
38. Donnellan R, Chetty R. 1999. Cyclin E in human cancers. *The FASEB Journal*, 13: 773-80.
39. Ehmann GL, McLean TI, Bachenheimer SL. 2000. Herpes simplex virus type 1 infection imposes a G(1)/S block in asynchronously growing cells and prevents G(1) entry in quiescent cells. *Virology*, 267: 335-49.
40. Eilers M, Schirm S, Bishop JM. 1991. The myc protein activates transcription of the alpha-prothymosin gene. *EMBO J*. 10: 133-41.
41. Etemad-Moghadam B, Rhone D, Steenbeke T, Sun Y, Manola J, Gelman R, Fanton JW, Racz P, Tenner-Racz K, Axthelm MK, Letvin NL, Sodroski J. 2001. Membrane-fusing capacity of the by human immunodeficiency virus envelope protein determines the efficiency of CD4+ T-cell depletion in macaques infected by a simian-human immunodeficiency virus. *J Virol*, 75: 5646-55.
42. Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. 1996. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science*, 272: 872-77.

43. Ferri KF, Jacotot E, Blanco J, Esté JA, Zamzami A, Susin SA, Brothers G, Reed JC, Penninger JM 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: 1081–92.
44. Fisher BK, Warner LC. 1987. Cutaneous Manifestations of AIDS. *Int J Dermatol*, 26: 615-30.
45. Frankel SS, Wenig BM, Burke AP, Mannan P, Thompson LD, Abbondanzo SL, Nelson AM, Pope M, Steinman RM. 1996. Replication of HIV-1 in dendritic cell-derived syncytia at the mucosal surface of the adenoid. *Science*, 272: 115–17.
46. Frankel SS, Wenig BM, Ferlito A. 1997. Human immunodeficiency virus-1 infection of the lymphoid tissues of Waldeyer’s ring. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 106(1): 611-18.
47. Foster JL, Garcia JV. 2008. HIV-1 Nef: at the crossroads. *Retrovirology*, 5: 84.
48. Galaktionov K, Chen X, Beach D. 1996. Cdc25 cell-cycle phosphatase as a target of c-myc. *Nature*, 382: 511–17.
49. Gallay P, Stitt V, Mundy C, Oettinger M, Trono D. 1996. Role of the karyopherin pathway in human immunodeficiency virus type 1 nuclear import. *J Virol*, 70: 1027–32.
50. Gallay P, Swingler S, Song J, Bushman F, Trono D. 1995. HIV nuclear import is governed by the phosphotyrosine-mediated binding of matrix to the core domain of integrase. *Cell*, 83: 569–76.
51. Ganser-Pornillos BK, Yeager M, Sundquist WI. 2008. The structural biology of HIV assembly. *Curr Opin Struct Biol*, 18: 203–17.
52. Garry RF. 1989. Potential mechanisms for the citopathic properties of HIV. *AIDS*, 3: 683-94.

53. Girard F, Strausfeld U, Fernandez A, Lamb NJC. 1991. Cyclin A is required for the onset of AND replication in mammalian fibroblasts. *Cell*, 67:1169–79.
54. Gottlieb MS, Groopman JE, Weinstein WM, Fahey JL, Detels R. 1983. The acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Inter Med*, 99: 208-20.
55. Gore SD, Kastan MB, Civin CI. 1991. Normal human bone marrow precursors that express terminal deoxynucleotidyl transferase include T-cell precursors and possible lymphoid stem cells. *Blood*, 77: 1681-90.
56. Gordon S. 1975. Cell fusion and some subcellular properties of heterokaryons and hybrids. *J Cell Biol*, 67: 257–80.
57. Graves JAM. 1972. ADN synthesis in heterokaryons formed by fusion of mammalian cells from different species. *Exp Cell Res*, 72: 393-403.
58. Groom HC, Anderson EC, Dangerfield JA, Lever AM. 2009. Rev regulates translation of human immunodeficiency virus type 1 RNAs. *J Gen Virol*, **90**: 1141–47.
59. Hahn BH, Shaw GM, De Cock KM, Sharp PM. 2000. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science*, 287: 607–14.
60. Haase AT. 1986. Pathogenesis of lentivirus infections. *Nature*, 322: 130-36.
61. Haase AT, Henry AT, Zupancic M, Sedgewick G, Faust RA, Melroe H, Cavert W, Gebhard K, Staskus K, Zhang SQ, Dailey PJ, Balfour HH, Erice JA, Perelson AS. 1996. Quantitative image analysis of HIV-1 infection in lymphoid tissue. *Science*, 274: 985-89.
62. Hartwell LH, Culotti J, Pringle JR, Reid BJ. 1974. Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science*, 183: 46-51.

63. Hayashi ML, Blankenship C, Shenk T. 2000. Human cytomegalovirus UL69 protein is required for efficient accumulation of infected cells in the G1 phase of the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 2692-96.
64. Heikkila R, Schwab G, Wickstrom E, Loke SL, Pluznik DH, et al. 1987. A cmyc antisense oligodeoxynucleotide inhibits entry into S phase but not progression from G0 to G1. *Nature*, 328: 445-49.
65. Heinkelein M, Sopper S, Jassoy C. 1995. Contact of human immunodeficiency virus type 1-infected and uninfected CD4⁺ T lymphocytes is highly cytolytic for both cells. *J Virol*, 69: 6925-31.
66. Hinds PW, Mittnacht S, Dulic V, Arnold A, Reed SI, Weinberg RA. 1992. Regulation of retinoblastoma protein functions by ectopic expression of human cyclins. *Cell*, 70: 993-1006.
67. Huard S, Elder RT, Liang D, Zhao RY. 2008. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr induces cell cycle G₂ arrest through Srk1/MK2-mediated phosphorylation of cdc25. *J Virol*, 82: 2904-17.
68. Huerta L, Gomez-Icazbalceta G, Soto-Ramirez L, Viveros-Rogel M, Rodriguez R, Fuentes L, Lamoyi E, Larralde C. 2005. Human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) envelope-dependent cell-cell fusion modulation by HIV-positive sera is related to disease progression. *J Gen Virol*, 86: 1961-66.
69. 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: 100-06.

70. Huerta L, López-Balderas N, Larralde C, Lamoyi E. 2006. Discriminating in vitro cell fusion from cell aggregation by flow cytometry combined with fluorescence resonance energy transfer. *J Virol Method*, 138: 17-23.
71. Huerta L, López-Balderas N, Rivera-Toledo E, Sandoval G, Gómez-Icazbalceta G, Villarreal C, Lamoyi E, Larralde C. 2009. HIV-Envelope-Dependent Cell-Cell Fusion: Quantitative Studies. *TheScientificWorldJournal*, 9: 746-63.
72. Hunt T. 1989. Maturation promoting factor, cyclin and the control of M-phase. *Curr Opin Cell Bio*, 1: 274-86.
73. Hunter T, Pines J. 1994. Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell*, 79: 573-82.
74. Johnson RT, Rao PN. 1970. Mammalian cell fusion: induction of premature chromosome condensation in interphase nuclei. *Nature*, 226: 717-22.
75. Johnson RT, Rao PN. 1971. Nucleocytoplasmic interactions in the achievement of nuclear synchrony in ADN synthesis and mitosis in multinucleate cells. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 46: 97-155.
76. Johnson DG, Walker CL. 1999. Cyclins and cell cycle checpoints. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 39: 295-312.
77. Johnston ER, Zijenah LS, Mutetwa S, Kantor R, Kittinunvorakoon C, Katzeinstein DA. 2003. High frequency of syncytium-inducig and CXCR4-tropic viruses among human immunodeficiency virus type 1 subtype C-infected patients receiving antirretroviral treatment. *J Virol*, 77: 7682-88.

78. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). 2010. Global Report: UNAIDS report on the global epidemic 2010. *WHO Library Cataloguing-in-Publication Data*. pp. 16-19.
79. Jowett JB, Planelles V, Poon B, Shah NP, Chen ML, Chen IS. 1995. The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene arrests infected T cells in the G2 + M phase of the cell cycle. *J Virol*, 69: 6304-13.
80. Kalwinsky DK, Weatherred WH, Dahl GV, Bowman WP, Melvin SL, Coleman MS, Bollum FJ. 1981. Clinical utility of initial terminal deoxynucleotidyl transferase determinations in childhood acute leukemias. *Cancer Res*, 41: 2877-81.
81. Kaplan MH, Sadick N, McNutt NS, Meltzer M, Sarngadharen MG, Pahwa S. 1987. Dermatologic Findings and Manifestations of AIDS. *J Am Acad Dermatol*, 16: 485-506.
82. Karlsson Hedestam GB, Fouchier RA, Phogat S, Burton DR, Sodroski J, Wyatt RT. The challenges of eliciting neutralizing antibodies to HIV-1 and to influenza virus. *Nat Rev Microbiol*, 6: 143-55.
83. Katayama K, Nakumura A, Sugimoto Y, Tsuruo T, Fujita N. 2008. FOXO transcription factor-dependent p15(INK4b) and p19(INK4d) expression. *Oncogene*, 27: 1677-86.
84. Keele BF, Van Heuverswyn F, Li Y, Bailes E, Takehisa J, Santiago ML, Bibollet-Ruche F, Chen Y, Wain LV, Liegeois F, Loul S, Ngole EM, Bienvenue Y, Delaporte E, Brookfield JF, Sharp PM, Shaw GM, Peeters M, Hahn BH. 2006. Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. *Science*, 313: 523-26.
85. Kilmarx PH. 2009. Global epidemiology of HIV. *Curr Opin HIV AIDS*, 4: 240-46.
86. King RW, Jackson PK, Kirschner MW. 1994. Mitosis in transition. *Cell*, 79: 563-71

87. Koenig S, Gendelman HE, Orenstein JM, Dal Canto MC, Pezeshkpour GH, Yungbluth M, Janotta F, Aksamit A, Martin MA, Fauci AS. 1986. Detection of AIDS virus in macrophages in brain tissue from AIDS patients with encephalopathy. *Science*, 233: 1089–93.
88. Krek W, Nigg EA. 1991. Mutations of p34cdc2 phosphorylation sites induce premature mitotic events in HeLa cell: evidence for a double block to p34cdc2 kinase activation in vertebrates. *EMBO J*, 10: 3331-41.
89. Kuiken C, Leitner T, Foley B, Hahn B, Marx P, McCutchan F, Wolinsky S, Korber B. 2009. HIV Sequence Compendium 2009. Theoretical Biology and Biophysics. Los Alamos National Laboratory. New Mexico U.S.A. pp. 5-9.
90. Kumagai A, Dunphy WG. 1991. The cdc 25 protein controls tyrosine dephosphorylation of cdc2 protein in a cell free system. *Cell*, 64: 903-14.
91. Labib K, Nurse P. 1993. Bring on phosphatases. *Curr Biol*, 3: 164-66.
92. LaBonte JA, Madani N, Sodroski J. 2003. Cytolysis by CCR5-using human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins by high levels of CD4 expression. *J Virol*, 77: 6645-59.
93. LaBonte JA, Patel T, Hofmann W, Sodroski J. 2000. Importance of membrane fusion mediated by human immunodeficiency virus envelope glycoproteins for lysis of primary CD4-positive T cells. *J Virol*, 74: 10690-98.
94. Landau NR, Warton M, Littman DR. 1988. The envelope glycoprotein of the human immunodeficiency virus binds to the immunoglobulin-like domain of CD4. *Nature*, 334: 159–62.

95. Lee MG, Nurse P. 1987. Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*. *Nature*, 327: 31-35.
96. Lehner CF, O'Farrell PH. 1989. Expression and function of drosophila cyclin A during embryonic cell cycle progression. *Cell*, 56: 957-68.
97. Levin A, Hayouka Z, Helfer M, Brack-Werner R, Friedler A, Loyter A. 2009. Peptides derived from HIV-1 integrase that bind Rev stimulate viral genome integration. *PLoS One*, 4: e4155.
98. Levy JA. 1978. Xenotropic type C viruses. *Curr Top Microbiol Immunol*, 79: 111-213.
99. Levy JA. 1986. The multifaceted retrovirus. *Cancer Res*, 46: 5457-68.
100. Levy JA. 2007. HIV and the pathogenesis of AIDS. Tercera edición. American Society for Microbiology Press. Washington DC. pp. 1-11.
101. Lewin B. 1990. Driving the cell cycle: M-phase kinase, its partners and substrates. *Cell*, 61: 743-52.
102. Lifson AR, Rutherford GW, Jaffe HW. 1988. The Natural History of human Immunodeficiency Virus infection. *J Infect Dis*, 138: 1360-67.
103. Lifson J, Coutre S, Huang E, Engleman E. 1986. Role of envelope glycoprotein carbohydrate in human immunodeficiency virus (HIV) infectivity and virus-induced cell fusion. *J Exp Med*, 164: 2101-06.
104. Lin GY, Lamb RA. 2000. The paramyxovirus simian virus 5 V protein slows progression of the cell cycle. *J Virol*, 74: 9152-66.
105. Lohka MJ, Hayes MK, Maller JL. 1988. Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85: 3009-19.

- 106.** López-Balderas N, Huerta L, Villareal C, Rivera-Toledo E, Sandoval G, Larralde C, 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: 130-46.
- 107.** Louis JM, Ishima R, Torchia DA, Weber IT. 2007. HIV-1 protease: structure, dynamics, and inhibition. *Adv Pharmacol*, 55: 261–98.
- 108.** Magnus C, Rusert P, Bonhoeffer, Trokola A, Regoes R. 2008. Estimating the stoichiometry of human immunodeficiency virus entry. *J Virol*, 83: 1523–31.
- 109.** Markosyan RM, Cohen FS, Melikyan GB. 2003. HIV-1 envelope proteins complete their folding into six-helix bundles immediately after fusion pore formation. *Mol Biol Cell*, 14: 926–38.
- 110.** Masui Y, Market C. 1971. Cytoplasmatic control of nuclear behaviour during meiotic maturation of frog oocytes. *J Exp Zool*, 177: 129-46.
- 111.** Matsui S, Weinfeld H, Sandregg AA. 1972. Fate of chromatin of interphase nuclei subjected to "prophasing" in virus-fused cells. *J Natl Cancer Inst*, 49: 1621-30.
- 112.** McDonald D, Vodicka MA, Lucero G, Svitkina TM, Borisy GG, Emerman M, Hope TJ. 2002. Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells. *J Cell Biol*, 159: 441–52.
- 113.** Melikyan GB. 2008. Common principles and intermediates of viral protein-mediated fusion: the HIV-1 paradigm. *Retrovirology*, 5: 111.
- 114.** Melikyan GB, Markosyan RM, Hemmati H, Delmedico MK, Lambert DM, Cohen FS. 2000. Evidence that the transition of HIV-1 gp41 into a six-helix bundle, not the bundle configuration, induces membrane fusion. *J Cell Biol*, 151: 413–23.

- 115.** Miranda LR, Schaefer BC, Kupfer A, Hu Z, Franzusoff A. 2002. Cell surface expression of the HIV-1 envelope glycoproteins is directed from intracellular CTLA-4-containing regulated secretory granules. *Proc Natl acad Sci USA*, 99: 8031-36.
- 116.** Moreno S, Nurse P, Russell P. 1990. Regulation of mitosis by cyclic accumulation of p80cdc25 mitotic inducer in fission yeast. *Nature*, 344: 549-52.
- 117.** Morgan DO, Kaplan JM, Bishop JM, Varmus HE. 1989. Mitosis-specific phosphorylation of p60p60c-src by p34cdc2-associated protein kinase. *Cell*, 57: 775-86.
- 118.** Moss AR, Bacchetti P. 1989. Natural history of HIV infection. *AIDS*, 3: 55-61.
- 119.** Mougel M, Houzet L, Darlix JL. 2009. When is it time for reverse transcription to start and go? *Retrovirology* 6: 24.
- 120.** Muhlemann MF, Anderson MG, Paradinas FJ, Key PR, Dawson SG, Evans BA, Murray-Lyon IM, Cream JJ. 1986. Early warning skin signs in AIDS and persistent generalized lymphadenopathy. *Br J Dermatol*, 114: 419-24.
- 121.** Murray AW. 1993. Turning on mitosis. *Curr Biol*, 3: 291-93.
- 122.** Murray AW, Kirschner MW. 1989. Cyclin synthesis drives to early embryonic cell cycle. *Nature*, 339: 275-80.
- 123.** Nardacci R, Antinori A, Larocca LM, Arena V, Amendola A, Perfettini JL, Kroemer G, Piacentini. 2005. Characterization of cell death pathways in human immunodeficiency virus-associated encephalitis. *Am J Pathol*, 167(3): 695-705.
- 124.** Nashmyt K. 1996. Viewpoint: putting the cell cycle in order. *Science*, 274: 1643-45.
- 125.** Neil SJ, Zang T, Bieniasz PD. 2008. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature*, 451: 425-30.

- 126.** Nigg EA. 2001. Mytotic Kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2: 21-32.
- 127.** Nomaguchi M, Fujita M, Addchi A. 2008. Role of HIV-1 Vpu protein for virus spread and pathogenesis. *Microbes Infect*, 10: 960–67.
- 128.** Norbury C, Nurse P. 1992. Animal cell cycles and their control. *Ann Re Biochem*, 61: 441-70.
- 129.** Nurse P. 1990. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature*, 344: 503-08.
- 130.** Nurse P. 2000. The incredible life and times of biological cells. *Science*, 289: 1711-16.
- 131.** Nurse P, Bisset Y. 1981. Gene required in G1 for commitment to cell cycle and in G2 for control of mitosis in fission yeast. *Nature*, 292: 558-60.
- 132.** Ohtsubo M, Theodoras AM, Schumacher J, Roberts JM, Pagano M. 1995. Human cyclins e, a nuclear protein essential for the G1-to-s phase transition. *Mol Cel Biol*, 15: 2612-24.
- 133.** Okamoto S, Kang YJ, Brechtel CW, Siviglia E, Russo R, Clemente A, Harrop A, McKercher S, Kaul M, Lipton SA. 2007. HIV/gp120 Decreases Adult Neural Progenitor Cell Proliferation via Checkpoint Kinase-Mediated Cell-Cycle Withdrawal and G1 Arrest. *Cell Stem Cell*, 1: 230–36.
- 134.** Okumura A, Alce T, Lubyova B, Ezelle H, Strebel K, Pitha PM. 2008. HIV-1 accessory proteins VPR and Vif modulate antiviral response by targeting IRF-3 for degradation. *Virology*, 373: 85–97.
- 135.** Op De Beeck A, Anouja F, Mousset S, Rommelaere J, Caillet-Fauquet P. 1995. The nonstructural proteins of the autonomous parvovirus minute virus of mice interfere with the cell cycle, inducing accumulation in G2. *Cell Growth Differ*, 6: 781-87.

- 136.** Orenstein JM. 2000. In vivo cytolysis and fusion of human immunodeficiency virus type 1-infected lymphocytes in lymphoid tissue. *J Infect Dis*, 182: 338-42.
- 137.** Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, Butini L, Montroni M, Fox CH, Orenstein JM, Kotler DP, Fauci AS. 1993. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature*, 362: 355-58.
- 138.** Paxton W, Connor RI, Landau NR. 1993. Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 virions: requirement for the p6 region of gag and mutational analysis. *J Virol*, 67: 7229-37.
- 139.** Perfettini JL, Castedo M, Roumier T, Andreau K, Nardacci R, Piacentini M, Kroemer G. 2005. Mechanisms of apoptosis induction by the HIV-1 envelope. *Cell Death Differ*, 1: 916-23
- 140.** Philips AN, Pezzotti P, Lepri AC, Rezza G. 1994. CD4 lymphocyte count as a determinant of the time from HIV seroconversion to AIDS and death from AIDS: evidence from the Italian seroconversion study. *AIDS*, 8: 1299-305.
- 141.** Pluta K, Kacprzak MM. 2009. Use of HIV as a gene transfer vector. *Acta Biochim Pol*, 56: 531-95.
- 142.** Poeschla EM. 2008. Integrase, LEDGF/p75 and HIV replication. *Cell Mol Life Sci*, 65: 1403-24.
- 143.** Qu Z, Weiss JN, MacLellan WR. 2003. Regulation of the mammalian cell cycle: a model of the G1-to-S transition. *Am J Physiol Cell Physiol*, 284: C349-64.
- 144.** Rao PN, Johnson RT. 1972. Premature chromosome condensation: a mechanism for the elimination of chromosomes in virus-fused cells. *J Cell Sci*, 10: 495-513.

- 145.** Rao PN, Johnson RT. 1973. Induction of chromosome condensation in interphase cells. *Adv Cell Mol Biol*, 3: 136-90.
- 146.** Rao PN, Johnson RT. 1974. Regulation of cell cycle on hybrid cells. *Cold Spring Harbor Conf. Cell Proliferation*. 1: 785-800.
- 147.** Reed SI, Hadwiger JA, Lörincz AT. 1985. Protein kinase activity associated with the product of the yeast cell division cycle gene CDC 28. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82: 4055-59.
- 148.** Rhodes T, Wargo H, Hu WS. 2003. High rates of human immunodeficiency virus type 1 recombination: nearrandom segregation of markers one kilobase apart in one round of viral replication. *J Virol*, 77: 11193–200.
- 149.** Rinfret A, Latendresse H, Lefebvre R, St-Louis G, Jolicoeur P, Lamarre L. 1991. Human immunodeficiency virus-infected multinucleated histiocytes in oropharyngeal lymphoid tissues from two asymptomatic patients. *Am. J. Pathol*, 138: 421–26.
- 150.** Rivera-Toledo, Huerta L, Larralde C, Lamoyi E. 2011. Quantitative and phenotypic analyses of lymphocyte-monocyte heterokaryons induced by the HIV envelope proteins: Significant loss of lymphoid markers. *Exp Mol Pathol*, 90: 157–66.
- 151.** Rivera-Toledo, López-Balderas, Huerta L, Lamoyi E, Larralde C. 2010. Decreased CD4 and wide-ranging expression of other immune receptors after HIV-envelope-mediated formation of syncytia in vitro. *Arch Virol*, 155: 1205-16.
- 152.** Sakai K, Dimas J, Lenardo MJ. 2006. The Vif and Vpr accessory proteins independently cause HIV-1-induced T cell cytopathicity and cell cycle arrest. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103: 3369-74.

- 153.** Sakaida H, Kawamata S, Hattori T, Uchiyama T. 1998. V3 loop of human immunodeficiency virus type 1 reduces cyclin E expression and induces G1 arrest in interleukin 2-dependent T cells. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 14: 31-38.
- 154.** Sakaida H, Murakami T, Kawamata S, Hattori T, Uchiyama T. 1997. V3 loop of human immunodeficiency virus type 1 suppresses interleukin 2-induced T cell growth. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 13: 151-59.
- 155.** Salgado GF, Marquant R, Vogel A, Alves ID, Feller SE, Morellet N, Bouaziz S. 2009. Structural studies of HIV-1 Gag p6ct and its interaction with Vpr determined by solution nuclear magnetic resonance. *Biochemistry*, 48: 2355–67.
- 156.** Santiago ML, Range F, Keele B. 2005. Prevalence and genetic diversity of simian immunodeficiency virus in free-ranging sooty mangabeys (*Cercocebus atys atys*) from the Taï Forest, Côte d'Ivoire: implications for the origins of epidemic HIV-2. *J Virol*, 79: 12515–27.
- 157.** Sattentau QJ, Moore JP. 1991. Conformational changes induced in the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein by soluble CD4 binding. *J Exp Med* 174: 407–15.
- 158.** Scarlata S, Carter C. 2003. Role of HIV-1 Gag domains in viral assembly. *Biochim Biophys Acta*, 1614: 62–72.
- 159.** Schafer KA. 1998. The cell cycle: a review. *Vet Pathol*, 35: 461-78.
- 160.** Schnizlein-Bick CT, Spritzler J, Wilkening CL, Nicholson JKA, O’Gorman MNG. 2000. Evaluation of TruCount Absolute-Count Tubes for Determining CD4 and CD8 Cell Numbers in Human Immunodeficiency Virus-Positive Adults. *Clin Diagn Lab Immunol*, 7: 336–43.

- 161.** Schols D, Pauwels R, Baba M, Desmyter J, De Clercq E. 1989. Syncytium formation and destruction of bystanders CD4⁺ cells cocultured with T cells persistently infected with human immunodeficiency virus as demonstrated by flow cytometry. *J Gen Virol*, 70: 2397-408.
- 162.** Schols D, Pauwels R, Desmyter J, De Clercq E. 1990. Flow cytometric method to monitor the destruction of CD4⁺ cells following their fusion with HIV-infected cells. *Cytometry*, 11: 736-46.
- 163.** Seelamgari A, Maddukuri A, Berro R, de la Fuente C, Kehn K, Deng L, Dadgar S, Bottazzi ME, Ghedin E, Pumfery A, Kashanchi F. 2004. Role of viral regulatory and accessory proteins in HIV-1 replication. *Front Biosci*, 9: 2388-413.
- 164.** Sharer LR, Eun-sook C, Epstein LG. 1985. Multinucleated giant cells and HTLV-III and AIDS encephalopathy. *Hum Pathol*, 16: 760.
- 165.** Sherr CJ. 1994. G1 phase progression cycling in cue. *Cell*, 79: 551-55.
- 166.** Shuljak BF. 2006. Lentiviruses in ungulates I General features, history and prevalence. *Bulgarian J Vet Med*, 3: 175-81
- 167.** Slaper-Cortenbach IC, Admiraal LG, Kerr JM, van Leeuwen EF, von dem Borne AE, Tetteroo PA. 1988. Flow-cytometric detection of terminal deoxynucleotidyl transferase and other intracellular antigens in combination with membrane antigens in acute lymphatic leukemias. *Blood*, 72: 1639-44.
- 168.** Song B, Yeh KC, Liu J, Knipe DM. 2001. Herpes simplex virus gene products required for viral inhibition of expression of G1-phase functions. *Virology*, 290: 320-28.
- 169.** Spirin PV, Vil'gelm AE, Prasolov VS. 2008. Lentiviral vectors. *Mol Biol*, 42: 913–26.

170. Sridhar KS, Flores MR, Raub WA, Saldana M. Lung cancer in patients with human immunodeficiency virus infection compared with historic control subjects. *Chest*, 102: 1704-08.
171. Srinivasakumar N. 2001. HIV-1 vector systems. *Somat Cell Mol Genet*, 26: 51–81.
172. Stevens JB, Abdallah BY, Regan SM, Liu G, Bremer SW, Ye CJ, Heng HH. 2010. Comparison of mitotic cell death by chromosome fragmentation to premature chromosome condensation. *Mol Cytogenet*, 3: 20-31.
173. Straka BF, Whitaker DL, Morrison SH, Oleske JM, Grant-Kels JM. 1988. Cutaneous manifestations of AIDS in children. *J Am Acad Dermatol*, 18: 1089-102.
174. Stumptner-Cuvelette P, Morchoisne S, Dugast M, Le Gall S, Raposo G, Schwartz O, Benaroch P. 2001. HIV-1 Nef impairs MHC class II antigen presentation and surface expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 12144–49.
175. Suhasini M, Reddy TR. 2009. Cellular proteins and HIV-1 Rev function. *Curr HIV Res*, 7: 91–100.
176. Teo I, Veryard C, Barnes H, An SF, Jones M, Lantos PL, Luthert P, Shaunak S. 1997. Circular forms of unintegrated human immunodeficiency virus type 1 ADN and high levels of viral protein expression: association with dementia and multinucleated giant cells in the brains of patients with AIDS. *J Virol*, 71: 2928-33.
177. Van Heuverswyn F, Li Y, Neel C, Bailes E, Keele BF, Liu W, Loul S, Butel C, Liegeois F, Bienvenue Y, Ngolle EM, Sharp PM, Shaw GM, Delaporte E, Hahn BH, Peeters M. 2006. Human immunodeficiency viruses: SIV infection in wild gorillas. *Nature*, 444: 164.
178. Van Heuverswyn F, Peeters M. 2007. The Origins of HIV and Implications for the Global Epidemic. *Curr Infect Dis Rep*, 9: 338–46.

- 179.** Walker DH, Maller JL. 1991. Role of cyclin A in the dependence of mitosis on completion of ADN replication. *Nature*, 354: 314–17.
- 180.** Wang J, Shackelford JM, Casella CR, Shivers DK, Rapaport EL, Liu B, Yu XF, Finkel TH. 2007. The Vif accessory protein alters the cell cycle of human immunodeficiency virus type 1 infected cells. *Virology*, 359: 243-52.
- 181.** Westerveld A, Freeke MA. 1971. Cell cycle of multinucleate cells after cell fusion. *Exp Cell Res*, 65: 140-44.
- 182.** Weissenhorn W, Hinz A, Gaudin Y. 2007. Virus membrane fusion. *FEBS Lett* 581: 2150–55.
- 183.** Woodward CL, Prakobwanakit S, Mosessian S, Chow SA. 2009. Integrase interacts with nucleoporin NUP153 to mediate the nuclear import of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 83: 6522–6533.
- 184.** XionY. 1996. Why are there so many CDK inhibitors?. *Biochim Biophys Acta*, 1288: 1-5.
- 185.** Yang X, Kurteva S, Ren X, Lee S, Sodroski J. 2005. Stoichiometry of envelope glycoprotein trimers in the entry of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, 79: 12132-47.
- 186.** Yoffe B, Lewis DE, Petrie BL, Noonan CA, Melnick JL, Hollinger FB. 1987. Fusion as a mediator of cytolysis in mixtures of uninfected CD4+ lymphocytes and cells infected by human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84: 1429-33.
- 187.** Zhao RY, Elder RT. 2005. Viral infections and cell cycle G2/M regulation. *Cell Res*, 15: 143-49.
- 188.** Zheng ZM. 2010. Viral Oncogenes, noncoding RNAs, and RNA splicing in human tumor viruses. *Int J Biol Sci*, 6: 730-55.

13. Apéndice A

13.1 Origen y epidemiología del VIH/SIDA

El origen del SIVcpz (SIV de chimpancés) progenitor del HIV-1, se considera surgió a partir de la recombinación de varios linajes de SIV ancestrales. Las cepas que actualmente infectan monos en el Centro-Oeste África surgieron de éstas cepas ancestrales, que se transmitieron al ser humano mediante zoonosis (59).

Los clados M y O de HIV-1 surgieron de transmisiones independientes entre especies transmisiones a principios del siglo 20. Las cepas de VIScpz que dieron origen al HIV-1 del clado M, pertenecían a un linaje viral que persiste hoy en día en los monos en el sur de Camerún. Las cepas de HIV-1 del clado N parecen provenir de un segundo linaje SIVcpzPtt (SIV de chimpancé *Pan troglodytes troglodytesen*) del sur de Camerún central. En contraste las cepas de HIV-1 del clado O parece estar relacionado con cepas de SIVgor presentes en los gorilas occidentales (*Gorilla gorilla*) y chimpancés (los cuales parecen haber sido el vehículo de infección hacia los seres humanos (178).

El HIV-2, está más estrechamente relacionado con SIVsmm en mangabeyes (*Cercocebus atys*) de África Occidental (84, 156, 177). El HIV-2 tiene a los clados A y B que son los importantes epidemiológicamente, ya que la mayoría de otros clados (C-H) representan secuencias únicas que se encuentran en un solo paciente (178) (Fig. A1).

En 2007 los datos de vigilancia del Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH / SIDA (78), indicaban que la prevalencia mundial del HIV-1 se había estabilizado en el 0,8%, con 33 millones de personas que vivían con el VIH / SIDA 2,7 millones de nuevas infecciones y 2,0 millones de muertes por sida en ese mismo año. El África subsahariana seguía siendo la región más afectada con un 67% de las infecciones con VIH (85). En 2009, se estimaba que había 2,6 de nuevas infecciones con el VIH, lo que representa un 19% menos de las 3,1 millones 1999, y un 21% menos que los 3,2 millones en 1997, año en que alcanzó su máximo anual de nuevas infecciones (78) (Fig. A2).

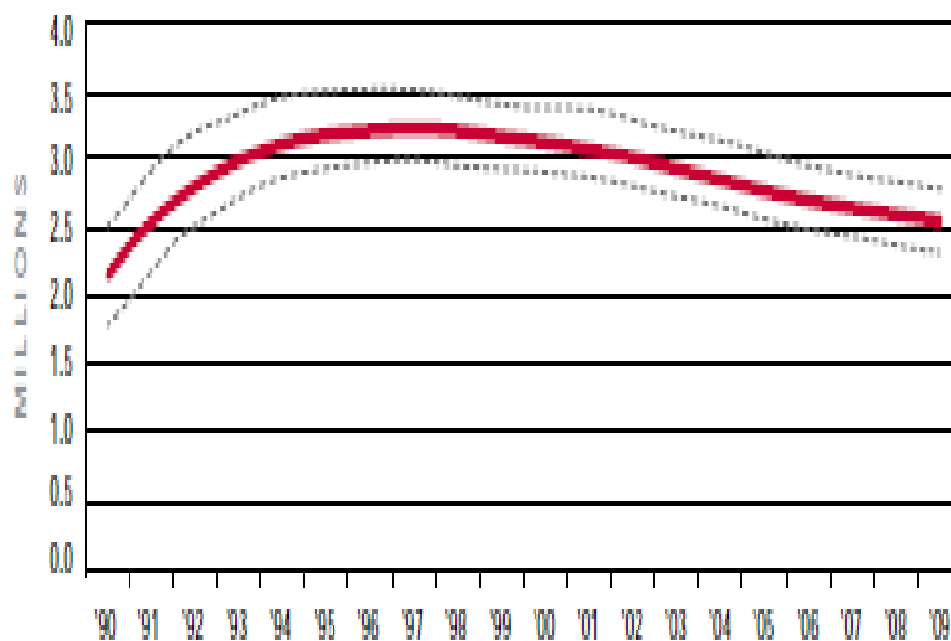


Figura A2. Nuevas infecciones por HIV-1 reportadas por año en todo el mundo. Imagen tomada de Global report, 2010.

En 33 países, la incidencia del VIH disminuyó en más del 25% entre 2001 y 2009, de los cuales 22 se encuentran en el África subsahariana, donde ocurrieron 1,8 millones de nuevas infecciones por el HIV en 2009. Lo anterior es considerablemente inferior a la cifra estimada de 2,2 millones en 2001. La tendencia de reducción refleja la combinación de factores como el impacto de esfuerzos en la prevención del contagio con VIH y el curso natural de la epidemia de VIH (78, 85) (Fig. A3).

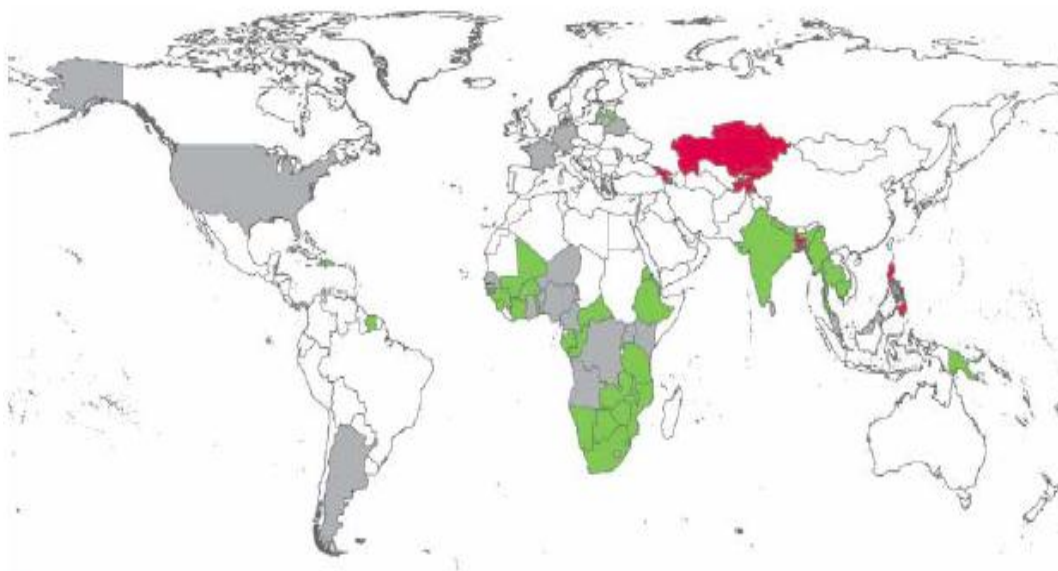


Figura A3. Países con mayor incremento (*rojo*), decremento (*verde*) en la incidencia de nuevas infecciones por año, además de países sin aumento ni decremento (*gris*) de la misma. Imagen tomada de Global report. 2010.

Entre los factores más relevantes que influyen en la velocidad de propagación de la infección con VIH se encuentra la migración hacia las ciudades. Lo anterior incrementa el contacto interpersonal y está íntimamente relacionado al comportamiento sexual, la prostitución ligada a problemas de pobreza, el uso de drogas de inyección intravenosa, y transfusiones sanguíneas (100).

13.2 Manifestaciones clínicas tempranas y marcadores de progresión a SIDA

La infección primaria por HIV-1 puede en ciertos casos presentar un síndrome viral agudo de la infección en el cual los niveles normales de linfocitos T CD4⁺ que oscilan entre 800-900 células/ μ l. Las personas muestran síntomas que muchas veces son similares a los de la mononucleosis (118). Los índices de progresión son sumamente variables estudios estiman que menos del 2% de los pacientes infectados progresan en dos años después de la infección, entre el 5 y el 10% progresa a los cuatro años, del 10 al 25% progresa después de seis años y del 30 al 40% progresa a los 8 años (118).

La infección aguda por VIH es caracterizada por una fiebre aguda la cual dura alrededor de dos semanas (31). Las manifestaciones clínicas incluyen fiebre, linfadenopatía generalizada, dolor de garganta, erupción macular eritematosa troncal, letargo, anorexia, náusea, mialgia, artralgia, dolores de cabeza, diarrea y síntomas neurológicos.

La linfadenopatía generalizada es definida como una inflamación ganglionar palpable de 1 cm o más en dos sitios extrainguinales por más de 3 meses, indolora y sin evidencia de alguna otra infección. Dicha linfadenopatía usualmente es simétrica y firme y dada por una hiperplasia folicular no específica seguida de una involución (118).

La infección por HIV-1 es asociada con numerosas manifestaciones cutáneas incluso antes de la disfunción inmunológica y SIDA (44, 81, 120, 173). Las manifestaciones cutáneas abarcan desde lesiones por la reactivación de herpes simplex y herpes zoster, molusco contagioso (causado por el molluscipoxvirus), infecciones dermatológicas por hongos (dermatofitosis, intertrigo candidiásico o pitiriasis versicolor) o bien bacterianas (impetigo en el cuello y barba, ectima, absesos superficiales, fístulas y senos perianales). Las manifestaciones papuloescamosas incluyen a la dermatitis seborreica y

psoriasis sin antecedentes previos o bien exacerbación de cuadros de psoriasis preexistentes. Entre otras manifestaciones cutáneas se encuentran xeroderma (piel seca), reacciones alérgicas, alopecia de patrón difuso, foliculitis con prurito.

Las manifestaciones relativamente tempranas de la infección por HIV-1 también engloban un conjunto de patologías bucales como la candidiasis bucal, leucoplasia vellosa oral (la cual es característica de personas infectadas con HIV como marcador de progresión a SIDA), gingivitis de muy difícil resolución y en menor medida ulceraciones aftosas. La fiebre persistente por más de un mes, la pérdida de peso corporal superior al 10%, diarrea persistente por más de un mes, fatiga que reduce la actividad física y sudores nocturnos (102)

13.3 Organización genómica

El genoma de los lentivirus está constituido por dos moléculas de RNA lineal de polaridad positiva. La naturaleza dimerica del genoma de ARN HIV-1 es en gran parte responsable de la alta variabilidad genética de los virus debido a las posibles recombinaciones durante el reverso transcripción (148). Debido al compacto tamaño del genoma viral se utilizan varias estrategias para la expresión de su información genética (141) (Fig. A4).

Las regiones que codifican a las proteínas virales están flanqueadas por LTR en sus extremos 5' y 3'. Los LTR consisten en un elemento único 3' (U3), seguido por un elemento de repetitivo (R) y un elemento único 5' (U5). Además, presentan elementos *cis* que contienen importantes señales para la integración en el genoma del huésped (repeticiones ATT, que se encuentran en el 5' y 3' de provirus ADN), potenciador de

secuencias de promotor, elemento de respuesta para transactivación (TAR) y la señal de poliadenilación (poliA) (141). Fuera de los LTR existen otras secuencias *cis* entre las que se incluyen el sitio de unión al primer; señales de dimerización y empaquetamiento del ARN viral (ψ y DIS); región central de polipurina (cPPT) y la secuencia de terminación central (CTS), que conduce a la formación de un “central Flap” durante la transcripción inversa. Además, está el elemento de respuesta a Rev (RRE) que es esencial para el transporte postranscripcional de los ARNm virales (sin o con incompleto corte y empalme) desde el núcleo hasta el citoplasma. La región rica en purinas (PPT), provee un segundo primer para la síntesis adicional de hebras de ADN por retrotranscripción virus específica (89, 141, 169, 171).

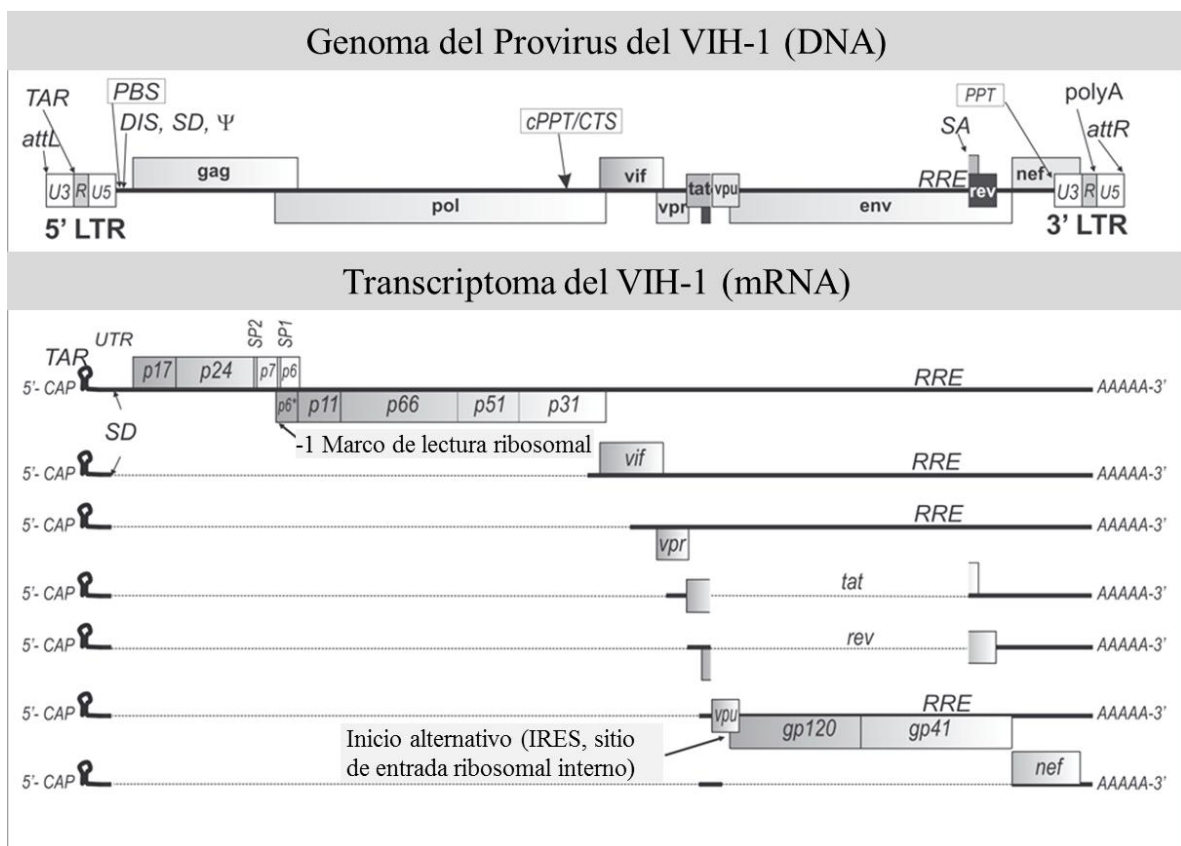


Figura A4. Representación del genoma y transcriptoma del HIV-1. Imagen adaptada de Pluta K *et al.*, 2009.

Los elementos *trans* del HIV-1 incluyen nueve marcos de lectura abierta (ORF). Los ORF Gag-pol, Gag y Env codifican proteínas estructurales, los otros 6 marcos de lectura codifican para las proteínas reguladoras esenciales Tat y Rev y proteínas accesorias Vif, Vpu, Vpr y Nef. Hay diecinueve productos de proteína codificada por el provirus. El LTR 5' dirige la transcripción de un genoma inicial de ARN que actúa como un ARNm para la traducción de las proteínas Gag y Pol.

La proteína precursora Gag (Pr55) es proteolíticamente escindida por la proteasa viral en las proteínas de la matriz (MA, p17), la cápside (CA, p24), la nucleocápside (NC, p7), p6 y dos polipéptidos espaciadores (SP1 y SP2) (19). La proteína precursora Gag-pol (Pr160), es sometida a corte por la misma proteasa dando origen al polipéptido p6 (TF, de transframe), la proteasa (PR, p11), la transcriptasa inversa con actividad de ribonucleasa H (RT, constituida por un heterodímero de p66/p51 y la RNAsa H o p15), y la integrasa (IN, p31) (141).

El transcrito inicial puede sufrir de corte y emplame que genera la codificación de los genes Tat, Rev y Nef o bien es parcialmente procesado para la codificación de las proteínas Vif, Vpu y Vpr. El transcrito contiene el ORF Env que codifica el precursor Gp160 de las glicoproteínas de envoltura, durante la maduración de la partícula viral, las proteasas celulares cortan a la Gp160 para producir la subunidad Gp120 superficie (SU) y la subunidad Gp41 transmembranal (TM) (16, 32, 33).

13.4 Descubrimiento de los factores que regulan el ciclo celular

Trabajos pioneros en el estudio de ciclo celular utilizando oocitos de *Xenopus* descubrieron que la microinyección de citoplasma de células en fase M en células en cualquier otra fase del ciclo celular inducía la división celular. Lo anterior, sugería la existencia de una sustancia capaz de llevar a cabo dicho proceso y se le denominó Factor Promotor de la Mitosis (MPF por sus siglas en inglés) (110). El MPF no se logró aislar sino hasta 17 años después, su actividad fluctúa durante el ciclo celular pues es detectada en fase M pero no durante la interfase, consta de dos subunidades proteicas de 34 y 45 kD, y su oscilación en cuanto a actividad depende de la síntesis de otras proteínas citoplasmáticas llamadas ciclinas (105)

Estudios con la cepa *cdc2* de *Schizosaccharomyces pombe* mutantes para el gen que codifica la proteína *cdc2*, revelaron bloqueos del ciclo celular en fase G₁ y fase G₂, antes del inicio de la fase S y M respectivamente, lo que indicaba que era necesaria para éstos dos procesos de transición. Tiempo después se descubrió que ésta proteína poseía un peso molecular de 34 kD, y que era uno de los componentes del MPF, por lo que se le llamó p34^{cdc2} (62, 101, 131, 147). Se han descubierto una variedad de genes homólogos al gen *cdc2* de *S. pombe*, tal es el caso del gen *cdc28* encontrado en *S. cerevisiae* que posee un 63% de homología (12). En humanos se presenta el gen que codifica para CDK1 que lleva a cabo las funciones de *cdc2* o *cdc28* (37, 95).

Mediante estudios con embriones de almejas se descubrieron proteínas que se iban acumulando a lo largo de la interfase del ciclo celular y que eran degradadas por completo al terminar la mitosis (72). A dichas proteínas se les llamó ciclinas, poseen un peso molecular de 45 kD y al unirse a la p34^{cdc2} conforman el MPF.

Actualmente se conoce que el complejo MPF está constituido por la proteína p34^{cdc2} también llamada CDK1 (que hace referencia a su actividad de cinasa dependiente de ciclina) y por la ciclina A o B. Distintos complejos de ciclinas/CDK se ven involucrados en la regulación de diferentes etapas del ciclo celular.