



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE
INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

**“Formación de heterocariones por fusión celular, inducida por el VIH-1 entre
linfocitos T CD4+ y monocitos THP-1”.**

T E S I S

Que presenta

BIOL. JUAN ORTIZ ROMERO

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

Directores de la Tesis:

Dr. Juan Ernesto Ludert León

Dra. Leonor Huerta Hernández

Ciudad de México

Agosto, 2020

Agradecimientos

Agradezco profundamente a CONACYT por el apoyo económico brindado durante todo el proceso para la obtención de maestría con el número CVU 863145.

De igual manera agradezco enormemente a la Dra. Leonor Huerta Hernández y al Dr. Juan Ernesto Ludert León, por su excelente desempeño como tutores, por quienes me fue posible crecer tanto académica como profesionalmente, ayudándome a tener una visión emocionante y fresca del ámbito científico.

También quisiera agradecer a los miembros de mi comité tutorial, a la Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano y a la Dra. Patricia Talamás Rohana, por sus excelentes y detalladas críticas al proyecto, así como sus recomendaciones.

Cada logro que he obtenido en la vida, siempre viene acompañado del agradecimiento a las personas que formaron parte del camino hacia las metas que me he propuesto, por eso quisiera agradecer a todos mis amigos y profesores por su apoyo incondicional durante mi proceso de formación en la maestría, pero sobre todo darle gracias a mi familia; a mis hermanos y mi padre, que han sido proveedores de alegría en todo momento, a mi madre, que nunca ha dudado de mi capacidad para lograr todos mis objetivos a pesar de lo que pueda decir cualquier persona.

Quiero agradecer de forma muy especial, con todo mi amor y cariño a mi hermosa esposa; gracias Yareli, por llegar y revolucionar mi vida, no solo confiando en lo que soy, si no también apoyándome y motivándome con alegría en cada momento; la pareja que somos hace que me sobren motivos y alegrías para siempre caminar hacia adelante.

Por último, quiero agradecer a esa personita que ha hecho que mi vida tenga un nuevo sentido a la luz de su sonrisa; a mi preciosa hija, porque solo con su mirada me da energía para vivir con mas fortaleza a cada segundo, su simple llegada aumentó mi respeto por todas las mujeres, grandes pilares de la sociedad y de la vida. Yoalli, te amo con todo lo que soy.

Índice

1. Resumen	4
2. Introducción	6
2.1 Fusión celular	6
2.2 Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH).	8
2.3 Estructura del complejo Env	10
2.4 Mecanismo de fusión de membranas del VIH.....	12
2.5 Células susceptibles a la infección por VIH.....	12
2.6 Fusión celular mediada por VIH	13
2.7 Estudio de la fusión celular <i>in vitro</i> por citometría de flujo	16
3. Planteamiento del problema.	18
4. Hipótesis	20
5. Objetivos	20
6. Resumen de la estrategia experimental	21
7. Materiales y métodos	22
7.1 Cultivo de líneas celulares y aislamiento de células T CD4 + primarias.....	22
7.2 Inducción del complejo Env en las células Jurkat Env+ HXBc2	22
7.3 Cepa viral de VIH-1.....	23
7.4 Expresión del receptor CD4	23
7.5 Inhibidor de fusión T-20 y de la retrotranscriptasa Efavirenz.....	23
7.6 Ensayo de fusión célula-célula	24
7.7 Microscopia de fluorescencia.....	25
8. Resultados	26
8.1 Expresión del Receptor CD4	26
8.2 Análisis por citometría de flujo de las fusiones celulares	27
8.3 Análisis por microscopía de fluorescencia de las fusiones celulares.....	33
9. Discusión	36
10. Conclusiones	40
11. Perspectivas	41
12. Referencias	42

1. Resumen

El virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) induce la fusión de células que expresan en la membrana celular el receptor CD4 y el correceptor CXCR4 o CCR5. La fusión célula-célula tiene lugar cuando las proteínas de fusión del virus (complejo Env) se expresan en la membrana de células infectadas y entran en contacto con células blanco o cuando partículas virales extracelulares entran en contacto y se fusionan simultáneamente con células adyacentes no infectadas. Los linfocitos T CD4⁺ y los monocitos expresan los receptores para las proteínas del complejo Env, lo que les confiere la capacidad de interactuar con células Env⁺ o partículas virales libres, fusionarse con células adyacentes y generar células multinucleadas denominadas heterocariones; eventos que se han correlacionado con la progresión a SIDA en personas infectadas con VIH-1. Para determinar si el virión del VIH-1 es capaz de inducir la formación de heterocariones por la fusión entre linfocitos de cultivos primarios T CD4⁺ y monocitos THP-1, se utilizó un método de tinción diferencial con colorantes lipofílicos fluorescentes que combina la citometría de flujo con la detección de FRET (del inglés: Fluorescent resonance energy transfer) entre los colorantes, lo cual permite realizar el análisis cuantitativo de las fusiones obtenidas, mismas que se observaron por microscopia de fluorescencia. Los resultados muestran que las células T CD4⁺ primarias tienen la capacidad de fusionarse *in vitro* con células linfocíticas Env⁺ del VIH-1; además, se observó que la fusión a través de las partículas virales para la formación de sincicios y heterocariones está mediada por mecanismos FFWI (del inglés: fusion from within) en co-cultivos entre células Jurkat Env⁺ y células T CD4⁺. Las FFWI se vieron inhibidas al tratar los cultivos celulares con el péptido sintético T-20, que se une a la proteína Env, indicando así la especificidad de las fusiones observadas. Sin embargo, en nuestro estudio utilizando dos multiplicidades de infección o MOI (del inglés: multiplicity of infection) diferentes (0.1 y 1) no se logró detectar la inducción de FFWO (del inglés: fusion from without) *in vitro*, aunque este tipo de fusión con participación de linfocitos T CD4⁺ ha sido reportada por otros autores. Los resultados aquí obtenidos son compatibles con el concepto de que se requiere de células que estén activas o en constante replicación para que el VIH-1 lleve a cabo su ciclo replicativo, promoviendo la expresión del complejo Env en la membrana de la célula infectada para que ocurra el proceso de fusión celular.

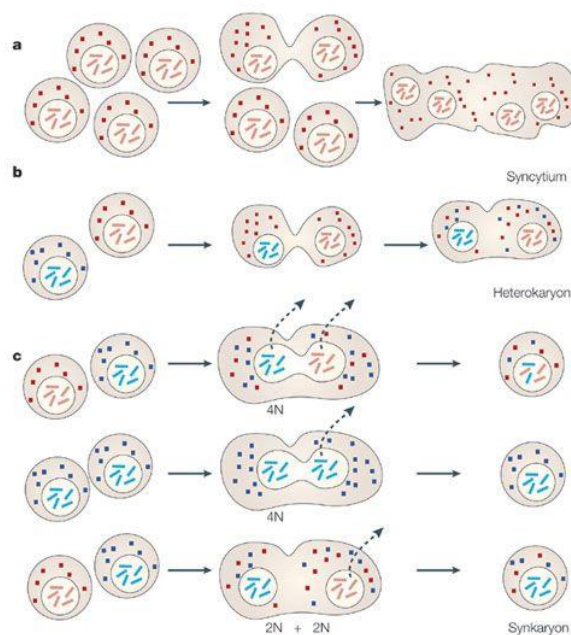
Summary

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) induces the fusion of cells that express the CD4 receptor and the co-receptor CXCR4 or CCR5 on the surface of their cell membranes. Cell-cell fusion occurs when the virus's fusion proteins (Env complex) are expressed in the membrane of infected cells and come into contact with target cells or when extracellular viral particles come into contact and merge simultaneously with an infected adjacent cell. T CD4⁺ lymphocytes and monocytes express receptors for Env complex proteins, giving them the ability to interact with Env⁺ cells or free viral particles, merging with adjacent cells, and generating multinucleated cells called heterokaryons, an event that has been correlated with progression to AIDS in people infected with HIV-1. To determine whether HIV-1 virions are capable of inducing heterokaryon formation by fusion between primary T CD4⁺ cultivated lymphocytes and THP-1 monocytes, a differential staining method with fluorescent lipophilic dyes was used; this method allows to combine flow cytometry with the detection of FRET (Fluorescent Resonance Energy Transfer) between the dyes, allowing the quantitative analysis of the obtained fused cells, which were observed by fluorescence microscopy. The results show that primary T CD4⁺ cells have the ability to fuse *in vitro* with Env⁺ lymphocytic cells, and that the fusion through viral particles for the formation of syncytia and heterokaryons is mediated by FFWI (Fusion from within) mechanisms in co-cultures between Jurkat Env⁺ cells and T CD4⁺ cells. FFWI's were inhibited by treating cell cultures with the synthetic peptide T-20, which binds to the Env protein, thus indicating the specificity of the observed fusions. Although induction of FFWO (Fusion from without) *in vitro* with T CD4⁺ cell product participation has been reported by other authors, our study, using two different MOI's (0.1 and 1), did not show FFWO to be a significant fusion mechanism. The results obtained here are consistent with the notion that activated cells or cells in constant replication, are required for the VIH-1 to carry out its replicative cycle, promoting the expression of the Env complex in the membrane of the infected cell for the cell fusion process to occur.

2. Introducción

2.1 Fusión celular

La fusión célula-célula es un proceso conspicuo tanto en situaciones fisiológicas como patológicas; por ejemplo, el desarrollo de metazoos, la placentación, la reparación de órganos por células madre, la transformación maligna, las infecciones virales y las reacciones a la lesión tisular. Los productos de fusión entre células de diferentes tipos se denominan heterocariones, en oposición a sincitios, que se originan a partir de la fusión de células homólogas (Figura 1). Las principales implicaciones biológicas de la fusión célula-célula son la sincronización funcional y la reprogramación celular [1].



Copyright © 2005 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figura 1.- Tipos de fusión celular. a) Las células del mismo linaje se fusionan para formar una célula gigante multinucleada, conocida como sincitio. La célula fusionada puede tener un fenotipo alterado y nuevas funciones como la formación de barreras. b) Las células de diferente linaje que se fusionan para formar una célula con múltiples núcleos (≥ 2), se le conoce como heterocarión. Las células fusionadas podrían haber sufrido una reversión del fenotipo o mostrar transdiferenciación. c) Células de diferente linaje o el mismo linaje se fusionan para formar una célula con un solo núcleo, se le denomina sincarión [1].

Una variedad de virus envueltos, presentan en su envoltura, complejos compuestos por glicoproteínas que interactúan con los receptores en las células blanco, lo que induce la fusión del virus y la célula. Las células infectadas sintetizan y exponen las proteínas de fusión virales en sus membranas, lo que les confiere la capacidad de fusionarse con las células no infectadas (fusión desde adentro, también conocida como “from within”). Por lo tanto, los virus envueltos pueden inducir la fusión célula-célula cuando las células infectadas que expresan proteínas de la envoltura viral interactúan con las células diana. Adicionalmente, el contacto o la interacción con partículas virales libres de células diana adyacentes, también puede resultar en la fusión celular (fusión desde afuera o también conocida como “from without”) [2]. Además, las propiedades de las células fusionadas generalmente difieren significativamente de las de las células parentales.

Para la entrada viral, las cargas negativas de las membranas opuestas (con las cabezas polares giradas hacia adentro y las cadenas de hidrocarburos hacia afuera) pone a las láminas externas en contacto directo y la fusión resultante genera una estructura en forma de reloj de arena con un tallo que se abre para formar un diafragma. La tensión en el diafragma extendido promueve la fusión de las láminas internas y la formación de un poro de fusión (Figura 2). La fusión viral se inicia mediante la unión de una glicoproteína insertada en la membrana viral (es decir, una proteína de fusión viral) a un receptor en la célula diana. Dado que las proteínas de fusión víricas están directamente involucradas en la fusión de las membranas víricas con las membranas celulares, se han clasificado como moléculas fusogénicas [2].

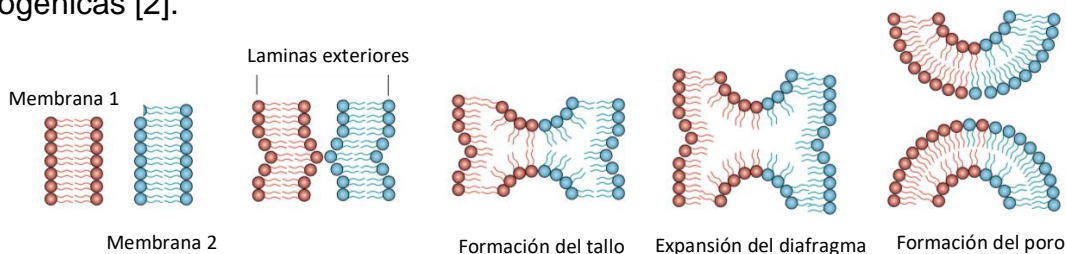


Figura 2.- Pasos de fusión entre membranas. Las cabezas polares de los fosfolípidos en las láminas externas de las membranas plasmáticas de dos células se aproximan entre sí. La energía requerida para este enfoque de láminas cargadas negativamente podría ser facilitada por las interacciones receptor-ligando. Las láminas externas se fusionan para formar una estructura similar a un tallo, que se expande para crear un diafragma. Las fuerzas generadas a partir de la extensión del diafragma promueven la fusión de las láminas internas y la creación de un poro de fusión [2].

Entre los virus que inducen la fusión célula-célula se encuentran los asociados con enfermedades humanas, como los de las familias *Herpesviridae* (virus del herpes, citomegalovirus, varicela zóster, virus de Epstein-Barr), *Paramyxoviridae* (sarampión, paperas, virus respiratorio sincicial), y *Retroviridae* (VIH, HTLV) [3]. La capacidad de los virus para inducir sincicios generalmente se supone que es indicativa de que los virus se transmiten vía célula a célula, sin exposición al medio extracelular, lo que permite que el virus se propague rápidamente y evite exponerse a la respuesta inmune del hospedero [4]. Sin embargo, el alcance y todas las consecuencias de la formación de sincicios durante la infección por algunos de estos virus, aún no se conocen del todo.

2.2 Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH).

El VIH-1 pertenece a la subfamilia *Lentivirinae* de la familia *Retroviridae*. Los lentivirus se caracterizan por presentar largos periodos de infección antes de inducir síntomas clínicos en los hospederos. Los individuos infectados con VIH-1 pueden tardar en promedio hasta 10 años en presentar síntomas clínicos del Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) [5]. El genoma del VIH-1 presenta dos cadenas de RNA de cadena sencilla con polaridad positiva, organizado como un complejo de ribonucleoproteínas dentro de la cápside, asociado a las enzimas integrasa, proteasa y transcriptasa reversa. La membrana viral expresa las proteínas de fusión viral gp120 y gp41 las cuales conforman el complejo Env (Figura 3). Estas proteínas se encuentran asociadas por enlaces no covalentes y organizadas en trímeros en la membrana viral. Las proteínas del complejo Env son esenciales para la interacción de las membranas viral y celular, y la entrada del virus a las células blanco [5].

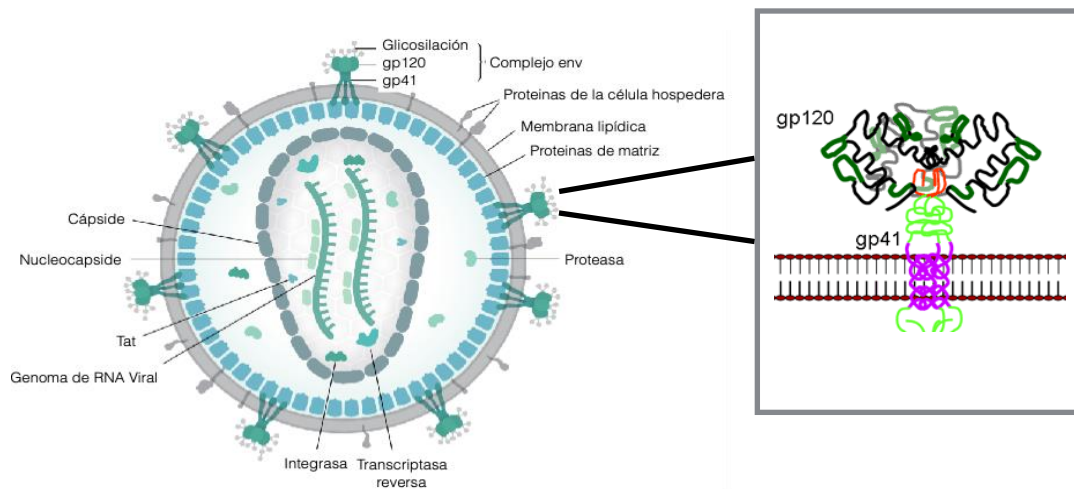


Figura 3. Esquema de la estructura general del VIH-1. En el recuadro de la derecha se muestran las proteínas gp120 y gp41 ancladas a la membrana viral que conforman el complejo Env.

El ciclo replicativo del VIH-1 consiste en una serie de pasos regulados por la interacción entre las proteínas virales y celulares.

En la fase de reconocimiento, las proteínas gp120 del complejo Env interactúan con el receptor CD4 expresado en la membrana de la célula blanco. Esta interacción promueve cambios conformacionales en gp120 y gp41 y el acercamiento de las membranas celular y viral, lo que facilita a su vez la formación de un poro de fusión [6]. Cuando las membranas del virus y la célula se fusionan, se libera la cápside viral en el citoplasma de la célula blanco, en donde se lleva a cabo el proceso de transcripción reversa. Durante este proceso la cápside se transporta, a través de la red de microtúbulos de la célula hospedera, hacia la periferia de la membrana nuclear en donde se promueve la disociación de las proteínas p24 que conforman la cápside liberando el complejo de preintegración formado por el DNA viral, las proteínas p6, p17, Vpr y las enzimas integrasa, proteasa y transcriptasa reversa [7]. El complejo de preintegración es entonces transportado por la maquinaria celular hacia el interior del núcleo en donde interactúa con el DNA de la célula hospedera y promueve su integración,

predominantemente, en regiones no codificantes de genes activos transcripcionalmente. Posteriormente, los mRNA virales son traducidos para dar origen a proteínas víricas, las cuales son procesadas en aparato de Golgi y ensambladas en regiones ricas en colesterol en la membrana plasmática. Por último, los virus ensamblados son liberados al espacio extracelular por gemación a través de la membrana plasmática, aquí, el virus adquiere su membrana finaliza el proceso de maduración de las proteínas gag, teniendo como resultado un virión maduro infeccioso [7].

2.3 Estructura del complejo Env

El complejo Env del VIH-1 media funciones que son críticas para el ciclo replicativo del virus, incluida la unión viral a las células diana y la fusión de las membranas víricas y celulares. El precursor de Env gp160 se transloca de forma cotranslacional al lumen del retículo endoplásmico, donde se producen etapas de maduración esenciales, como la N-glicosilación, la formación de enlaces disulfuro y la oligomerización. En su forma trimérica, la glicoproteína es transportada hacia el aparato de Golgi donde es escindida por una proteasa antes de la salida a la superficie celular. Los productos de escisión, la subunidad de superficie gp120 y la subunidad transmembranal gp41 permanecen asociadas a través de interacciones no covalentes. El dominio transmembranal de gp41 se ancla a las superficies de las células infectadas. Así, la forma funcional de Env es oligomérica [8].

Los análisis estructurales de gp120 sugieren que esta proteína contiene 5 regiones altamente variables V1-V5 separadas por 5 regiones constantes C1-C5. Estudios han demostrado que los aminoácidos de la corona del bucle de la región V3 son importantes para la determinación del tropismo del virus (Figura 4) [9].

Por otro lado, la proteína gp41 cuenta con un ectodominio, una región transmembranal y un dominio citoplásmico. En el ectodominio se encuentra una región rica en aminoácidos hidrofóbicos denominada péptido de fusión, seguido de dos dominios helicoidales (Figura 5) [10].

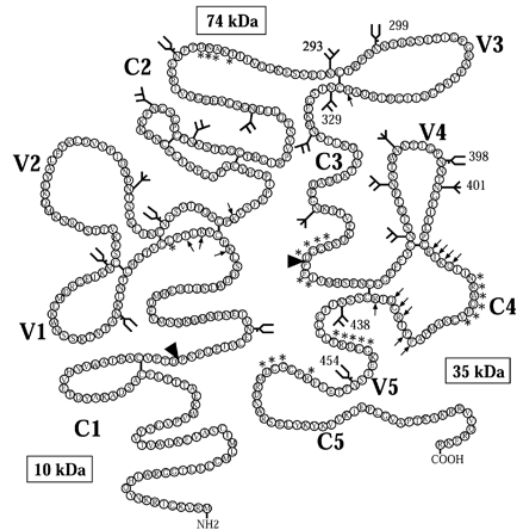


Figura. 4.- Representación esquemática de gp120. Se muestran las regiones conservadas (C1-C5) y los bucles variables (V1-V5). Las flechas indican los aminoácidos que están involucrados en la unión de los correceptores, los asteriscos indican los aminoácidos involucrados en la unión de CD4 [9].

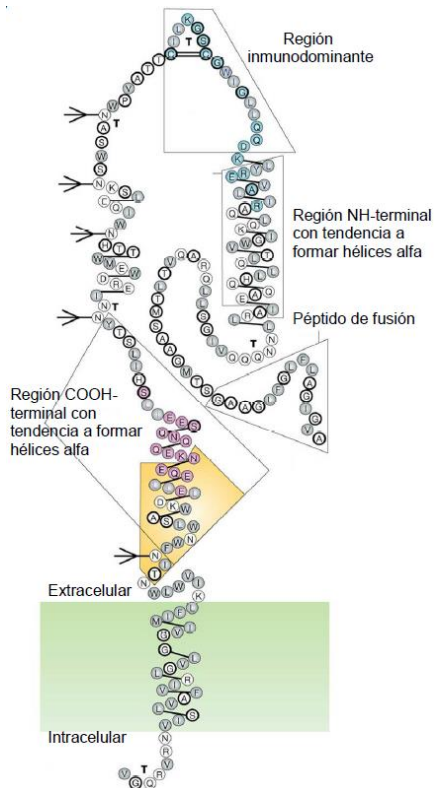


Figura. 5.- Representación esquemática de la molécula gp41. Las α -hélices están representadas como grupos alternos de tres y cuatro aminoácidos conectados por líneas simples; los aminoácidos hidrófobos están indicados con círculos grises, los aminoácidos con carga como círculos sin relleno y los aminoácidos neutros como círculos fuertemente delineados. Los giros fuertes están indicados por 'T' y los sitios de glicosilación por figuras de varilla ramificada. Las regiones funcionales y estructurales clave están en recuadros [10].

2.4 Mecanismo de fusión de membranas del VIH

Durante el contacto del VIH con la célula blanco, la subunidad gp120 del complejo Env de la envoltura viral se une primero a CD4 en la superficie celular (Fig. 6). Este enlace lleva a cambios conformacionales de la gp120 que permiten su enlace adicional al correceptor CXCR4 o CCR5. Un cambio conformacional posterior en la subunidad gp41 expone su péptido de fusión N-terminal y hace que éste se inserte en la membrana celular. La forma extendida de gp41 luego se pliega sobre sí misma en una estructura de horquilla en el cual las 3 hélices C próximas a la membrana viral interactúan con las hélices N más próximas a la membrana celular, este proceso permite que las membranas opuestas se lleven a una posición cercana en preparación para la fusión de membranas [11]. Posteriormente se forma un poro de fusión entre las membranas adyacentes y la fusión de estas [9].

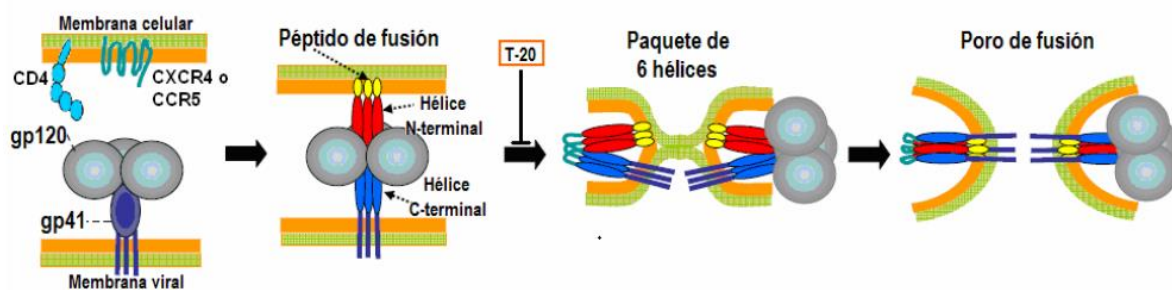


Figura 6. Mecanismo propuesto de fusión de las membranas viral y celular en la infección por VIH-1. Péptidos sintéticos análogos a las secuencias de las hélices alfa amino- y carboxilo-terminales (como el T-20), pueden unirse a estas regiones e inhibir la fusión [27].

2.5 Células susceptibles a la infección por VIH

Las células del sistema inmune susceptibles a la infección por VIH-1 son aquellas que expresan los receptores CD4 y de las quimiocinas CXCR4 y CCR5 que funcionan como correceptores para el virus [10]. Los aislados de VIH-1 han sido clasificados según su uso del correceptor. Se denomina X4 a los que son dependientes de CXCR4 y R5 a los que usan CCR5 principalmente. Algunas cepas virales presentan tropismo dual, por lo cual se les denomina X4/R5 [11]. Inicialmente se consideraba que los linfocitos T CD4⁺ eran el principal blanco del virus; sin

embargo, posteriormente se observó que el VIH-1 era capaz de infectar células del linaje mielóide *in vitro*, como son monocitos, macrófagos y células dendríticas; pero se observó que estas células no llevan a cabo una infección productiva, posiblemente por la forma de entrada del virus y por la expresión de moléculas tipo lectina que capturan las partículas virales en vesículas y degradan al virus de forma intracelular. Adicionalmente los monocitos y macrófagos suelen expresar al receptor CD4 hasta 6 veces menos en comparación con las células linfoides [12].

En resumen, la fusión celular requiere la aposición cercana de las membranas superficiales de las células, la inducción de perturbaciones lipídicas y la formación de poros de fusión que eventualmente se expanden y conducen a la fusión completa célula-célula [13]. Durante la infección por VIH, la fusión virus-célula se logra mediante la participación del complejo macromolecular de envoltura de VIH (Env), compuesto por homotrímeros de las glicoproteínas gp120 y gp41. La fusión requiere una secuencia de cambios conformacionales complejos que involucran la interacción específica de Env con la molécula CD4 y un correceptor de la familia de receptores de quimiocinas; La fusión célula-célula mediada por Env-VIH se induce por un mecanismo análogo al del proceso de fusión virus-célula [14].

2.6 Fusión celular mediada por VIH

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

Tabla 2

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

Consecuencia

- Muerte celular *in vitro*
- Agotamiento de células T en sangre
- Diseminación de virus por contacto célula - célula
- Reservorios de virus replicantes
- Sitios de recombinación de diferentes cepas
- Mejoramiento de la replicación viral
- Modificación del fenotipo celular
- Supervivencia de las células infectadas por fusión con células sanas
- Reducción del número de células en el microambiente
- Reducción de replicación viral
- Daño a tejidos por producción de citocinas

Así mismo se ha observado la presencia de células multinucleadas en biopsias de tejido linfoide, como en el anillo de Waldeyer, en pacientes con SIDA (Figura 7) y se sugiere que estas células tienen un posible origen mieloide [15].

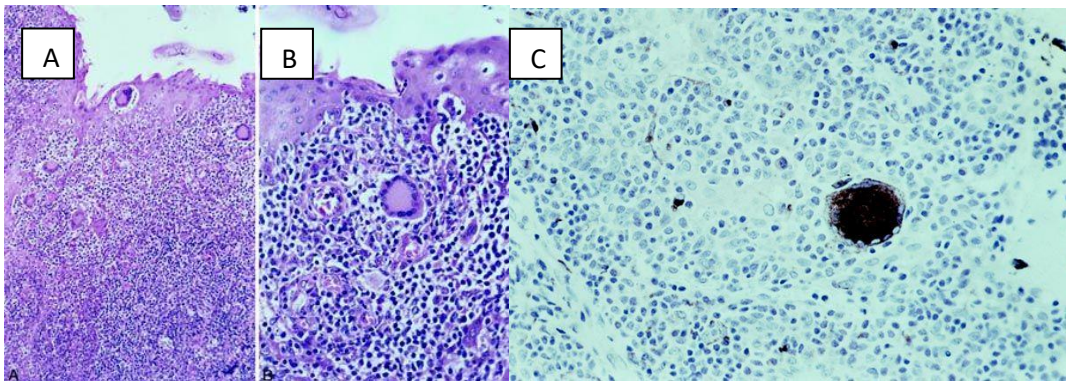


Figura. 7. Secciones teñidas con hematoxilina y eosina (A, B) de un espécimen de amigdalectomía con numerosas células gigantes multinucleadas. El análisis inmunohistoquímico, (C) de las células gigantes multinucleadas mostrando expresión constante de CD68, proteína altamente expresada en la membrana plasmáticas de células de origen mieloide [15].

También existen evidencias de que el VIH tiene la capacidad de invadir el SNC desde etapas tempranas de la infección causando meningitis, y también se han detectado partículas virales en el líquido cerebrospinal de los pacientes [16].

De igual manera se han realizado estudios con el virus de inmunodeficiencia simiohumana SHIVSF162P3N en macacos *Rhesus*, donde de igual forma encontraron células gigantes e infección microglial [17]. La presencia de policariones en pacientes se ha relacionado con complicaciones asociadas a daño neuronal, como demencia asociada a SIDA.

Se han propuesto dos mecanismos principales por los cuales el VIH-1 puede inducir la fusión de células adyacentes, a los que se les ha denominado fusión desde adentro o “fusión from within” (FFWI) y fusión desde afuera o “fusión from without” (FFWO) [18]. En la fusión desde adentro (FFWI), la expresión de las proteínas gp120 y gp41 (Env) del VIH en la membrana de las células infectadas, favorece la fusión de las células infectadas con células CD4⁺ sanas. Por otra parte, Clavel y Charneau (1994) han propuesto, a través de estudios con partículas de VIH-1 purificadas, que éstas pueden tener la capacidad de mediar la fusión entre células adyacentes no infectadas (FFWO) [19]. En contraste con la FFWI, la FFWO presenta requerimientos adicionales como son: i) el contacto de la partícula viral con los receptores CD4 de dos células adyacentes; ii) la formación de dos poros de fusión con células distintas para completar el proceso y iii) altas concentraciones tanto de partículas virales libres como de células que expresen el receptor CD4, para así poder favorecer la formación de contactos entre las células y el virus. Por lo tanto, se ha propuesto que este tipo de fusión podría ocurrir con menos frecuencia que la FFWI; sin embargo, las condiciones para la FFWO podrían cumplirse *in vivo* en sitios como los ganglios linfáticos, órganos que contienen una alta concentración de virus [20]. Adicionalmente, las partículas de VIH-1 transmitidas a través de las sinapsis virológicas podrían servir como puente para FFWO en el reducido espacio sináptico [21].

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

Los métodos experimentales para el estudio de la fusión celular han considerado dos premisas que la definen: la mezcla de los lípidos de las membranas y la mezcla de los contenidos acuosos de las células que se fusionan [13].

En el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, se diseñó una estrategia experimental para abordar el estudio de la fusión celular, la cual se basa en el uso de líneas celulares linfocíticas humanas (Jurkat) transfectadas con un gene que codifica para las proteínas de fusión de una variante del VIH-1 altamente fusogénica [23], las cuales serán denominadas aquí como células Env⁺. En co-cultivos con células Jurkat no transfectadas, las cuales expresan los receptores CD4 y CXCR4, la fusión celular se observa en pocas horas como la formación de células gigantes multinucleadas.

El análisis cuantitativo de la fusión se efectúa mediante la tinción previa de las células con colorantes lipofílicos o citoplásmicos fluorescentes (rojo para las células Env⁺ y verde para las células blanco). Una vez que la fusión ha tenido lugar, todas las células en el co-cultivo son analizadas por citometría de flujo, de modo que 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. El ensayo combina la citometría de flujo con la detección de FRET (por sus siglas en inglés para “Fluorescent Resonance Energy Transfer”) entre los colorantes lo cual permite la distinción entre sincicios verdaderos y meros agregados celulares. La fusión medida por este procedimiento es sensible a anticuerpos monoclonales y policlonales anti-CD4, anti-gp120 y al péptido T-20, inhibidor de la infección por el VIH [22-24, 26-28] Herramientas metodológicas adicionales permiten comprobar la mezcla de los contenidos citoplasmáticos en las partículas con fluorescencia mixta y distinguir así entre la señal producida por células meramente agregadas de aquélla debida a las células verdaderamente fusionadas [22].

Dado que la cuantificación de la fusión celular es objetiva y automática, este sistema es útil para explorar y caracterizar los eventos asociados a la fusión mediada por proteínas del VIH, así como el efecto de inhibidores potenciales de las proteínas de la envoltura viral.

En el ensayo de fusión se utilizan los colorantes lipofílicos fluorescentes DiO (perclorato de 3,3–dioctadecil-oxacarbocianina) y Dil (perclorato de 1,1-dioctadecil-3,3,3 tetrametil-indocarbocianina). Estos compuestos contienen una región polar fluorescente y 2 cadenas hidrofóbicas de 18 carbonos, las cuales se intercalan en la membrana celular. Cuando son excitados a 488 nm, el Dil y el DiO fluorescen en verde y rojo, respectivamente. Las células fusionadas son detectadas por citometría de flujo como partículas con fluorescencia mixta, mientras que las células no fusionadas fluorescen en un solo color. Las células fusionadas pueden distinguirse de las células agregadas debido a la ocurrencia de FRET entre los dos colorantes. Cuando dos colorantes fluorescentes se encuentran muy próximos, pueden interactuar y provocar cambios en sus emisiones de fluorescencia. El FRET se presenta cuando la emisión de un fluorocromo (donador) se traslapa con la absorción de otro (aceptor). Es un proceso altamente dependiente de la distancia entre las moléculas de fluorocromos, requiriendo una distancia máxima de 10 nm. El FRET provoca un incremento en la intensidad de fluorescencia emitida por el aceptor y frecuentemente una reducción en la emisión del donador. En el ensayo de fusión entre las células Env⁺ y CD4⁺ el espectro de emisión del colorante DiO (verde) se traslapa con el de absorción del colorante Dil (rojo), aumentando la energía de éste y su fluorescencia en las células fusionadas. En los policariones, pero no en las células agregadas, los colorantes colocalizan y se observa un aumento en la intensidad de la fluorescencia roja (Figura 8) [22-23].

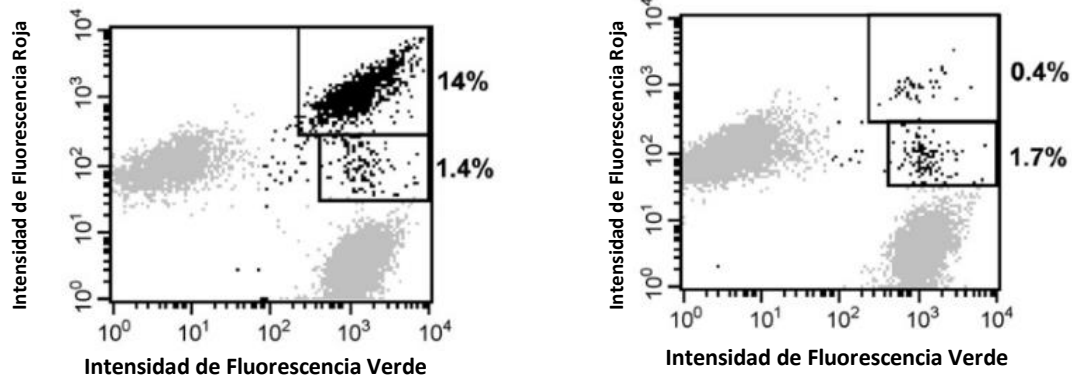


Figura. 8. Análisis por citometría de flujo de la fusión entre células Jurkat que expresan glicoproteínas de la envoltura del VIH funcionales (HXBc2) y células Jurkat CD4 no transfectadas (E6-1). A) Co-cultivo celular con un 14% de fusión celular expresada por arriba de la intensidad media de fluorescencia roja B) Co-cultivo con fusión inhibida por el péptido T-20 [22-23].

Utilizando esta metodología, recientemente se ha observado la fusión entre células monocíticas de la línea THP-1 y células linfocitarias Jurkat que expresan las proteínas de fusión del VIH, generando heterocariones funcionales con un fenotipo de tipo monocito activado, incluso mostrando actividad fagocítica [24].

3. Planteamiento del problema.

La fusión de células inducida por el VIH es un evento conspicuo en cultivos de células mononucleares de sangre periférica infectados *in vitro*. Asimismo, la presencia de células gigantes multinucleadas se observa, con frecuencia, en diversos tejidos de los individuos con esta infección, indicando la posibilidad de su ocurrencia *in vivo*. Se sabe que la fusión de células inducida por el virus puede producir ya sea la muerte celular o la creación de nichos de alta replicación viral, además de modificar el fenotipo de las células fusionadas.

La investigación sobre los mecanismos y las consecuencias de la fusión de células inducida por el VIH se ha realizado principalmente sobre sincicios producidos por la fusión entre linfocitos T CD4⁺.

Estudios previos en nuestro laboratorio han mostrado que células linfocíticas Jurkat que expresan las proteínas de fusión del VIH-1 (células Env⁺) son capaces de fusionarse con células monocíticas CD4⁺ de la línea celular THP-1, formando heterocariones. Este evento implica FFWI de dos células de linajes diferentes, células linfocitarias (Jurkat) y monocíticas (THP-1), por medio de las proteínas de la membrana del VIH-1 resultando en entidades celulares que, además, mostraron ser funcionales.

En el presente trabajo se busca determinar si partículas virales (en lugar de proteínas Env expresadas en la membrana) pueden inducir FFWO de linfocitos primarios CD4⁺ con células monocíticas THP-1. Es decir, la fusión de dos células CD4⁺ no infectadas mediante partículas virales solubles y así generar resultados que permitan sugerir si la FFWO también podría estar contribuyendo a la patogénesis del SIDA

4. Hipótesis

La formación de heterocariones por la fusión entre monocitos y linfocitos no infectados puede ser promovida por el virión del VIH-1 a través de las proteínas Env, mediante un mecanismo FFWO.

5. Objetivos

General:

-Determinar si el virión del VIH-1 es capaz de inducir la formación de heterocariones por la fusión entre linfocitos de cultivos primarios T CD4⁺ y monocitos THP-1.

Particulares:

-Determinar si la formación de heterocariones puede ser inducida por mecanismos de FFWO.

-Determinar las características morfológicas de los heterocariones formados.

6. Resumen de la estrategia experimental

- Se utilizaron tres tipos de células CD4⁺: la línea celular Jurkat E6-1 (linfocitaria), la línea celular THP-1 (monocítica), y linfocitos T CD4⁺ primarios purificados de la sangre de donadores sanos.
- Se determinó la expresión del receptor CD4 en cada tipo celular.
- Se comprobó que los tres tipos de células CD4⁺ fueron capaces de fusionarse con células Jurkat que expresan las proteínas de fusión del VIH-1 (Jurkat Env⁺). Las células Jurkat Env⁺ se encuentran transfectadas en forma estable con el gene *Env* del VIH-1 y expresan las proteínas de la envoltura viral de manera inducible. La fusión se determinó mediante un ensayo de citometría de flujo, previamente caracterizado por nuestro grupo de investigación. El ensayo utiliza la tinción diferencial de las células con los colorantes lipofílicos Dil y DiO. Cuando son excitados a 488 nm estos colorantes fluorescen en rojo y verde, respectivamente.
- La fusión celular se determinó por la cuantificación de células con fluorescencia mixta. Como inhibidor específico de la fusión se utilizó el péptido T-20. Este péptido se une a la molécula gp41 de Env y bloquea los cambios conformacionales de la proteína requeridos para inducir la fusión de membranas.
- Se buscó inducir la fusión entre células THP-1 y linfocitos T CD4⁺ primarios utilizando partículas virales.

7. Materiales y métodos

7.1 Cultivo de líneas celulares y aislamiento de células T CD4 + primarias

Se utilizaron las líneas celulares THP-1 de ATCC (ATCC TIB-202), Jurkat Clona E6-1 (ATCC® TIB-152™) y Jurkat Env+ HXBc2. Las células THP-1 y E6-1 se cultivaron en RPMI 1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado (Gibco) con 600 µg / ml de penicilina, 600 µg / ml de estreptomina, 2 mM de L-glutamina, 100 mM de aminoácidos no esenciales y 1 mM de piruvato de sodio, manteniéndose a 37 °C y 5% de CO₂. Las células se mantuvieron a una densidad de 0.5 x 10⁶ células / ml. Las muestras de sangre humana para el aislamiento de linfocitos T CD4 + se tomaron de donantes sanos del banco de sangre del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán y las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aislaron con medio de separación de linfocitos Ficoll-paque Premium (BD). Las células T CD4 + primarias en PBMC se separaron y enriquecieron por selección negativa, utilizando un kit de aislamiento de células T CD4 + humanas (Miltenyi Biotech), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células T CD4 + primarias se cultivaron en medio RPMI 1640 manteniéndose a 37 °C y 5% de CO₂.

7.2 Inducción del complejo Env en las células Jurkat Env+ HXBc2

Esta línea celular contiene un transactivador dependiente de tetraciclina inducible y se encuentra transfectada con los genes Env y Rev de la cepa VIH-1 HXBc2 acoplada a un promotor de citomegalovirus y a las secuencias del operador de tetraciclina [23]. Esta construcción permite la expresión de Env (gp120 / gp41) después de la eliminación de la tetraciclina del medio de cultivo. Las células se cultivaron en medio RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY) suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado (Gibco) (RPMI-10), 200 µg / ml de geneticina e higromicina, y 1 µg / ml de tetraciclina. Para inducir la expresión de Env, las células

se lavaron con PBS y se cultivaron en medio sin tetraciclina. El cultivo se mantuvo a 37 °C y 5% de CO₂.

7.3 Cepa viral de VIH-1

Se utilizó la cepa VIH-1 IIIB obtenida por donación del AIDS Reagent Program, de los Institutos Nacionales de Salud (NIH) de Estados Unidos. Los stocks se titularon por citometría de flujo mediante el método de Grigorov, el cual se basa en la identificación de células infectadas Jurkat JL TRG-R5, las cuales expresan la proteína verde fluorescente (EGFP) al ser infectada por el virus; el título viral se calcula a partir del número de células no infectadas por la proporción de células infectadas (Verde fluorescentes positivas) después de la exposición de un número dado de células a un volumen dado de suspensión del virus, por último, aplicando la distribución de probabilidad de Poisson se determina la concentración del virus en el sobrenadante [25]. Posteriormente se centrifugaron en tubos Amicon a 4000 rpm. X 10 min para obtener en 1 mL el concentrado viral.

7.4 Expresión del receptor CD4

Se determinó la expresión del receptor CD4 utilizando el anticuerpo comercial APC Mouse Anti-Human CD4, mediante citometría de flujo. Se seleccionó la región de células viables y se analizó en gráficos de Dot-Blot, donde el porcentaje de células individuales fluorescentes se determinó en 10,000 eventos en un citómetro Attune (BD) equipado con láser rojo y azul

7.5 Inhibidor de fusión T-20 y de la retrotranscriptasa Efavirenz

T-20 es un péptido sintético de 36 aminoácidos que comprende a la región repetida heptad 2 (HR2) de gp41, y es complementario a gp41 HR1. Interfiere

específicamente con el proceso de fusión impidiendo el ensamblaje de la conformación fusogénica gp41 [3]. El T-20 se disolvió en PBS a 98 µg / ml y se ajustó a una concentración de 60 nM en el ensayo de fusión.

El efavirenz pertenece a una clase de medicamentos contra el VIH llamados inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de los nucleósidos (ITINN). Actúan directamente en un espacio activo de la transcriptasa inversa, adhiriéndose a la transcriptasa inversa en un sitio diferente al sitio activo, lo que provoca un cambio conformacional que modifica la actividad catalítica, evitando que el ARN del VIH se transforme en ADN, evitando así su replicación. El efavirenz se disolverá en medio RPMI y se ajustará a una concentración de 40 nM en los ensayos de fusión.

7.6 Ensayo de fusión célula-célula

Las células utilizadas para los experimentos de fusión se tiñeron con los marcadores fluorescentes, Dil y DiO rojo y verde fluorescentes respectivamente, obtenidos de Molecular Probes (Eugene, OR). Las soluciones madre de Dil y DiO se prepararon disolviendo 3 mg / ml de colorante en DMSO, y las soluciones de trabajo se prepararon diluyendo los stocks 1:10 en el mismo disolvente. Las células se ajustaron a $5-15 \times 10^6$ células / ml en RPMI-10 y se añadió 15 µl de Dil y 30 µl de DiO de las soluciones de trabajo a las células dependiendo del marcador que se fuera a utilizar para cada cultivo celular. Las suspensiones celulares se cubrieron de la luz y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 min con agitación suave. Las células se lavaron luego dos veces con 10 ml de RPMI-10 y se resuspendieron en el mismo medio. Los cultivos de células marcadas se incubaron durante la noche a 37 °C y 5% de CO₂. Las células marcadas con Dil y DiO y se co-cultivaron en una relación 1:1 (4×10^5 células de cada tipo) en una placa de fondo plano de 48 pozos en un volumen total de 200 µl, incubándose a 37 °C y 5% CO₂ durante 24 h. Para los experimentos con partículas virales de VIH -1 se utilizaron las mismas condiciones de incubación utilizando MOI de 0.1 y MOI de 1 como concentraciones virales. En los ensayos de inhibición de la fusión, las células con la expresión del

complejo Env y el virus se preincubaron durante 30 min con el péptido inhibidor de la fusión del VIH, el T-20, a una concentración de 60 nM o con 10 nM del inhibidor de la retrotranscriptasa efavirenz antes de la adición de las células CD4+. Las células con DiO y Dil también se colocaron solas en pocillos separados para ser usadas como controles para ajustar las configuraciones de FACS. Cada condición se probó por duplicado. Después de los tiempos indicados, las células se recogieron de los pocillos, se centrifugaron para eliminar el medio de cultivo y se fijaron en paraformaldehído al 2%. Las células se analizaron mediante citometría de flujo usando células marcadas y sin marcar para el ajuste y compensación del citómetro. Se seleccionó la región de células viables y se analizó en gráficos de Dot-Blot FL-1 frente a FL-2, donde el porcentaje de células individuales fluorescentes verdes, rojas, y fusiones celulares se determinaron en 10,000 eventos en un citómetro Attune (BD) equipado con láser rojo y azul

7.7 Microscopia de fluorescencia

Los cambios morfológicos de las células con fluorescencia mixta se analizaron con un microscopio ZOE™ Fluorescent Cell Imager. Las células fijadas se colocaron en una placa con cámara para el análisis.

8. Resultados

8.1 Expresión del Receptor CD4

En el presente trabajo se utilizaron células Jurkat E6-1, THP-1, así como linfocitos T CD4⁺ de sangre humana purificados por selección negativa. Estas células expresan las moléculas CD4 y CXCR4, las cuales funcionan como receptor y correceptor respectivamente, para la unión del complejo Env y la posterior entrada del VIH -1 a la célula hospedera.

El receptor CD4 se expresa de manera estable en linfocitos T CD4⁺ de la sangre, aunque sus niveles varían en diferentes líneas celulares. Dado que en este estudio se examinó la fusión de diferentes tipos de células, se determinó, primeramente, el nivel de expresión del receptor CD4 en estas 3 líneas celulares. La presencia del receptor CD4⁺ en las células E6-1, THP-1 y linfocitos T CD4⁺ primarios se determinó con el fin de comparar el efecto del nivel de expresión del receptor sobre las fusiones observadas por citometría de flujo. La figura 9 muestra que tanto las células THP-1 como los linfocitos T CD4⁺ presentan una alta expresión del receptor con el 98.8% y 94.1% de células positivas respectivamente, en contraste con la línea celular Jurkat E6-1 la cual presenta solo el 24.9%. Sin embargo, como se observa más adelante, esta situación no afecta el potencial fusogénico de las células.

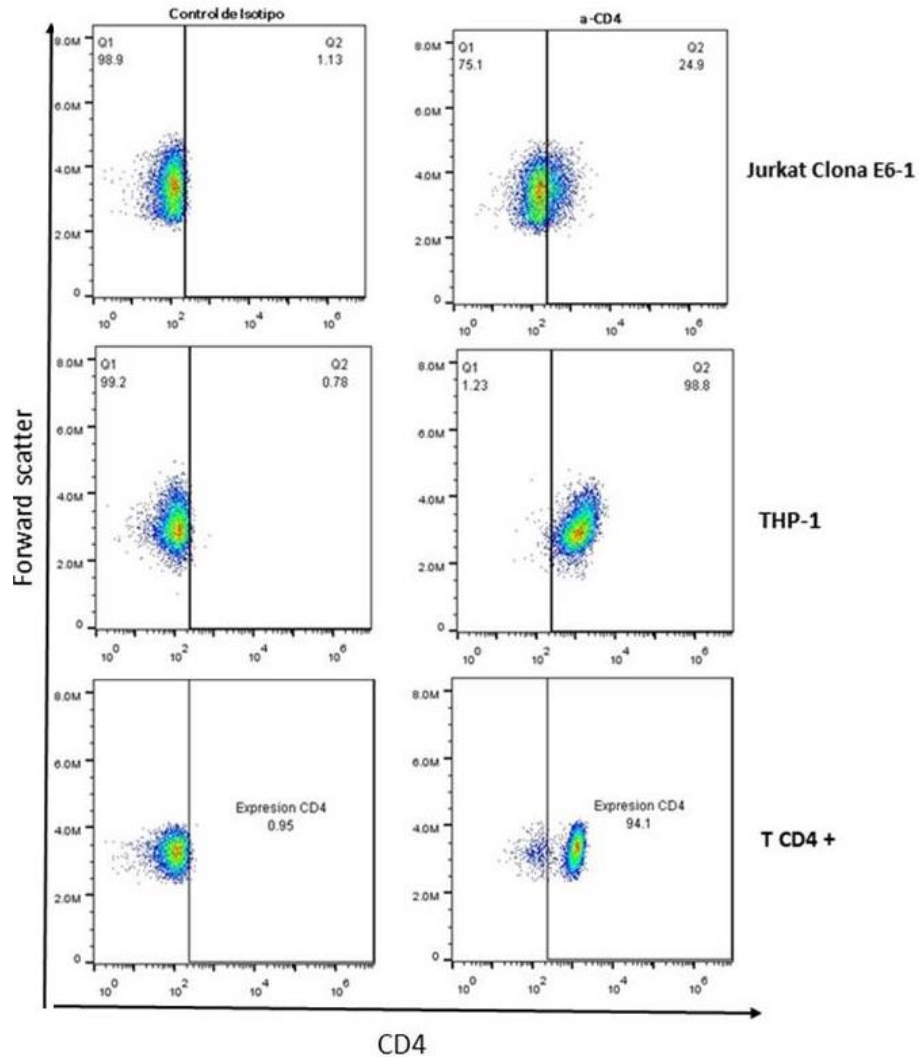


Figura. 9. Expresión del receptor CD4 en las células E6-1, THP-1 y T CD4⁺. Se muestra el porcentaje de células positivas utilizando un anticuerpo anti-CD4 acoplado a APC y un anticuerpo irrelevante como control de isotipo.

8.2 Análisis por citometría de flujo de las fusiones celulares

Para evaluar si estas 3 líneas celulares tenían la capacidad de fusionarse en presencia de la proteína Env de VIH, se ensayó la capacidad de estas líneas de fusionarse con la línea celular Jurkat que expresa Env constitutivamente. Las células Jurkat Env⁺ se marcaron con el colorante lipofílico fluorescente en verde (Dil) y se colocaron en co-cultivo en proporción 1:1 con cada línea celular (Jurkat E6-1 y THP-1), así como con los linfocitos T CD4⁺, previamente marcados con el

colorante lipofílico fluorescente en rojo (DiO). Las fusiones celulares fueron cuantificadas después de 24 horas de cultivo por el método previamente descrito [23], el cual se basa en la detección por citometría de flujo de las células doble fluorescentes que expresen FRET.

El primer ensayo de fusiones celulares se realizó entre células E6-1 y Env⁺, en las cuales se ha descrito la capacidad de formar células gigantes multinucleadas a través de la fusión entre estas dos líneas. En las gráficas de fluorescencia roja contra verde se observa que hay alrededor del 5.4% de células con fluorescencia mixta que exhiben una intensidad de fluorescencia roja más alta que la de la población de células solo rojas, correspondiente a células CD4⁺ no fusionadas. Este porcentaje se reduce hasta 0.57% al usar el péptido inhibidor específico de la fusión T-20 (Figura 10). Estos resultados indican que las células Jurkat Env⁺ son capaces de fusionarse con las células Jurkat CD4⁺ mediante las proteínas de la envoltura del VIH -1.

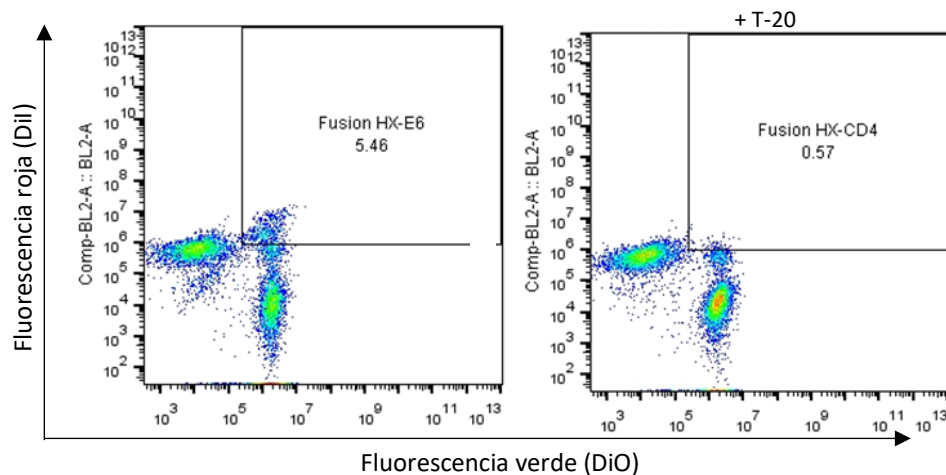


Figura 10. Análisis por citometría de flujo de fusiones celulares en co-cultivos entre células Jurkat Env⁺ marcadas con DiI y Jurkat E6-1 (CD4⁺) marcadas con DiO. Los gráficos de puntos indican el porcentaje de células con fluorescencia mixta, así como el efecto del péptido inhibidor de la fusión del VIH -1 T-20 (derecha).

Posteriormente se llevó a cabo un ensayo de fusión entre linfocitos T CD4⁺ primarios purificados de donadores sanos y células Jurkat Env⁺.

Las células Jurkat Env⁺ marcadas con DiO (verde) se co-cultivaron con los linfocitos T CD4⁺ marcadas con DiI (rojo) en proporción 1:1. Las fusiones celulares

fueron cuantificadas después de 24 horas de cultivo por el método previamente descrito.

Se observaron alrededor del 6.3% de células con fluorescencia mixta y que mostraron una intensidad de fluorescencia roja mayor que las correspondientes células no fusionadas. Este porcentaje se redujo hasta 0.75% cuando se añadió el inhibidor T-20 (Figura 11), comprobando con este resultado que los linfocitos T CD4+ purificados y en estado no activado tienen la capacidad de fusionarse con las células Env⁺.

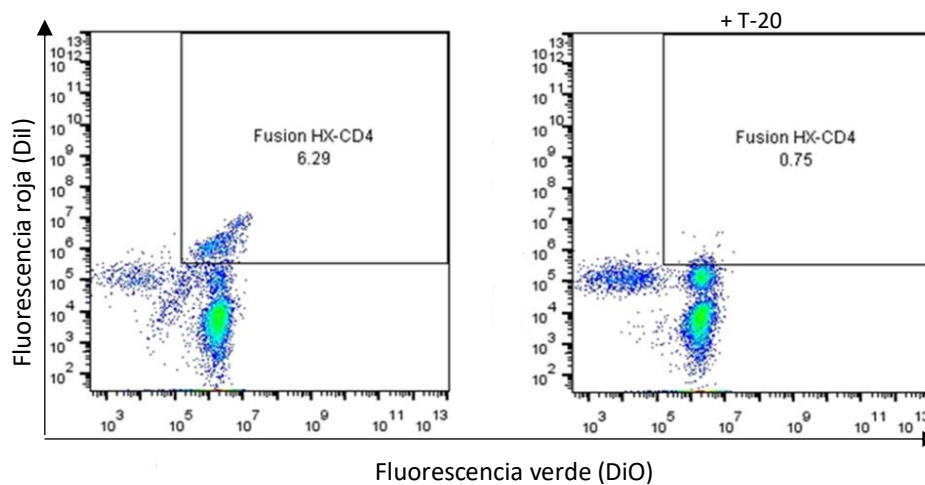


Figura 11. Análisis por citometría de flujo de fusiones celulares en co-cultivos entre células Jurkat Env⁺ marcadas con DiI y linfocitos T CD4⁺ primarios marcados con DiO. Se indica el porcentaje de células con fluorescencia mixta, así como el efecto del péptido inhibidor de la fusión del VIH -1 T-20 (derecha).

Para evaluar la formación de heterocariones entre células de origen mielóide y linfoide, las células Jurkat Env⁺, marcadas ahora con el colorante DiO (verde) se co-cultivaron con células monocíticas de la línea THP-1 (marcadas con rojo). Se observó alrededor de 4.56 % de células fusionadas en el co-cultivo, porcentaje que se vio disminuido al 0.89% en presencia del péptido inhibidor T-20 (Figura 12). Estos datos sugieren en concordancia con los descritos por Martínez y colaboradores [24], que la proteína Env expresada en las células Jurkat, también es capaz de mediar la fusión con células mieloides

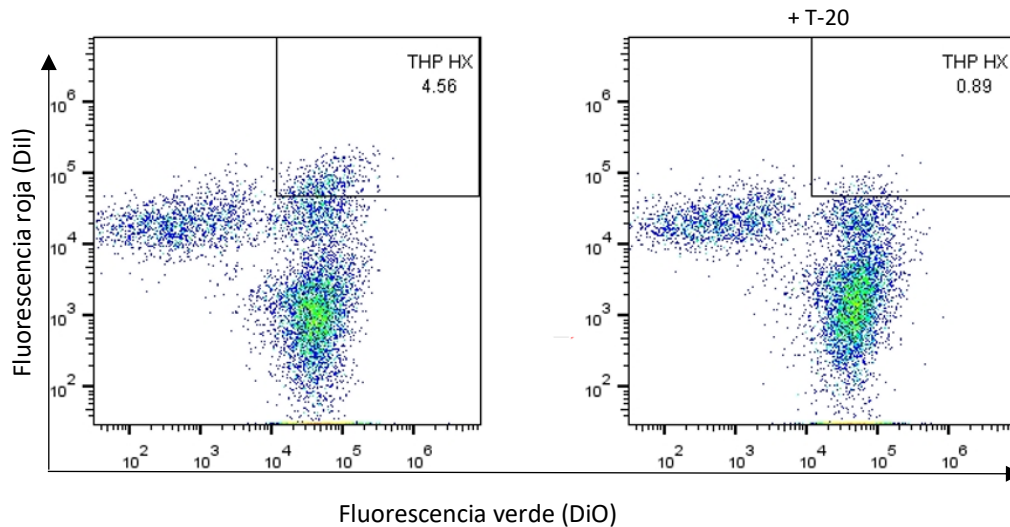


Figura. 12. Análisis por citometría de flujo de fusiones celulares entre THP-1 marcadas con Dil y Jurkat Env⁺ marcadas con DiO. Se indica el porcentaje de células con fluorescencia mixta, así como el efecto del péptido inhibidor de la fusión del VIH -1 T-20 (derecha).

Después de llevar a cabo el análisis de fusiones con la línea celular que expresa Env⁺, se procedió a realizar los experimentos con partículas virales de VIH-1 para evaluar la capacidad fusogénica del virus y determinar si los eventos de fusiones celulares están determinados no solo por mecanismos de FFWI debido a la expresión de la proteína Env viral en la membrana celular, sino también pudieran darse desde afuera (FFWO) mediada por la presencia de la proteínas Env presente en las partículas virales extracelulares. El primer abordaje consistió en realizar un co-cultivo entre células THP-1 y linfocitos T CD4⁺ primarios en las mismas condiciones que los experimentos anteriores, pero esta vez usando una MOI viral de 0.1 como concentración viral. Sin embargo, al hacer el análisis en el citómetro de flujo se observó que la formación de heterocariones apenas superó el 3% en el cultivo en el que se incubaron solamente células y virus. Este porcentaje de fusión se redujo aproximadamente a la mitad en aquellos cultivos controlados tratados con efavirenz y T-20, (Figura 13).

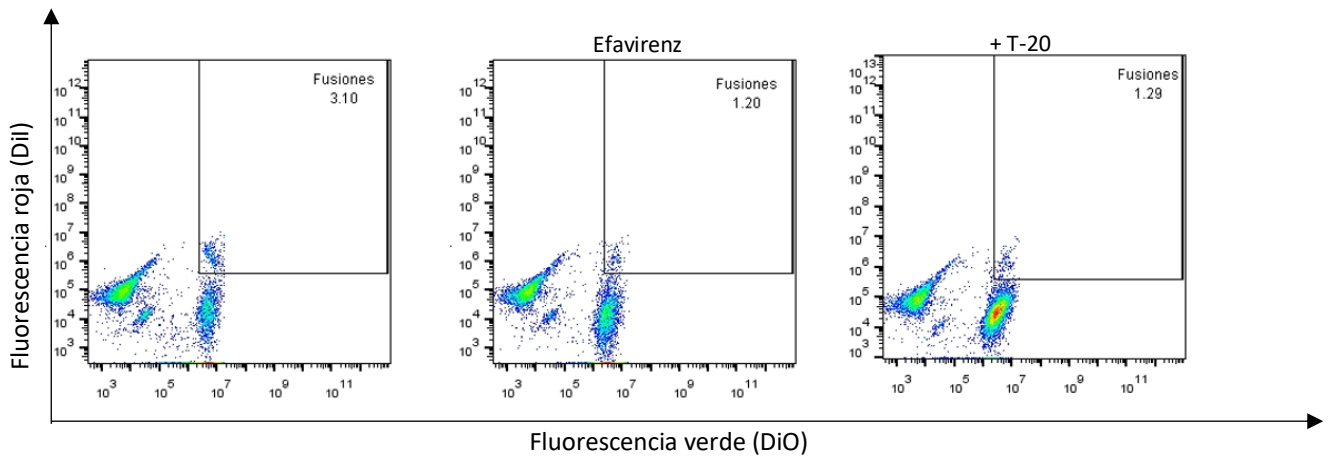


Figura 13. Análisis por citometría de flujo de fusiones celulares en co-cultivos entre células THP-1 CD4⁺ marcadas con DiI y linfocitos T CD4⁺ primarios marcados con DiO en presencia del VIH-1 (MOI = 0.1). Las gráficas de puntos indican el porcentaje de células con fluorescencia mixta, así como el efecto del efavirenz y el péptido inhibidor de la fusión del VIH -1 T-20.

Debido a los resultados obtenidos con la MOI= 0.1 se decidió repetir el experimento, pero esta vez utilizando una MOI de 1; esto con el objetivo de observar si aumentando la concentración viral se promovían las fusiones celulares debido a un mayor contacto entre las proteínas del complejo Env presentes en el virus y los receptores CD4⁺ de las células. Sin embargo, al observar el resultado del ensayo de fusión en el citómetro, tampoco hubo presencia significativa de poblaciones celulares con fluorescencia mixta por FRET, lo cual indica la ausencia de FFWO entre las células (Figura 14).

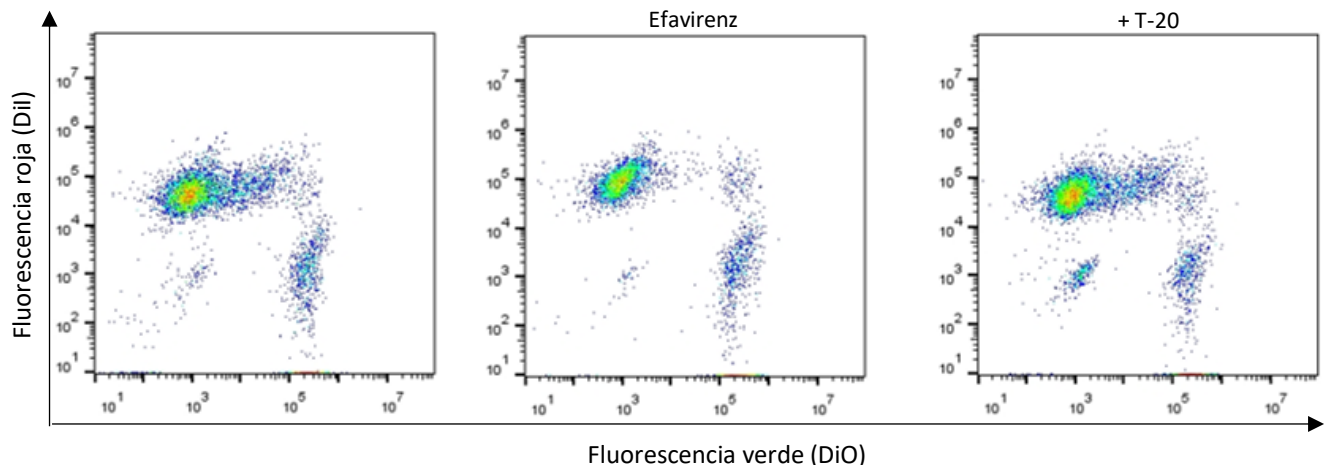


Figura. 14. Análisis por citometría de flujo de fusiones celulares en co-cultivos entre células THP-1 CD4⁺ marcadas con DiI y linfocitos T CD4⁺ primarios marcados con DiO, en presencia de VIH -1 (MOI = 1). Las gráficas de puntos indican la ausencia de células con fluorescencia mixta, así como en los grupos de Efavirenz y péptido inhibidor de la fusión del VIH-1 T-20.

Una posibilidad es que la ausencia de fusión celular mostrada en los resultados de las figuras 13 y 14 se deba a una falta de detección, ya que los linfocitos T CD4⁺ podrían estar fusionándose entre sí, reduciendo la probabilidad de su fusión con las células THP-1.

Para verificar si la ausencia de fusiones celulares se debía a las posibles fusiones entre células T CD4⁺ y por lo tanto, a su menor disponibilidad, se procedió a hacer un ensayo de fusión celular entre estas mismas células, marcando un total de 4×10^5 células, la mitad con Dil y la otra mitad con DiO, quedando a una relación 1:1 en el co-cultivo, el cual fue incubado a una MOI de 1. Como se observa en la figura 15, la presencia del virus no indujo fusión celular. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la ausencia de fusión en el co-cultivo entre células T CD4⁺ y células THP-1, no se debe a la disminución en la disponibilidad de células T CD4⁺, debido a su interacción entre ellas mismas, sino más bien a la incapacidad de los viriones de VIH añadidos de inducir FFWO, al menos en las cantidades aquí utilizadas.

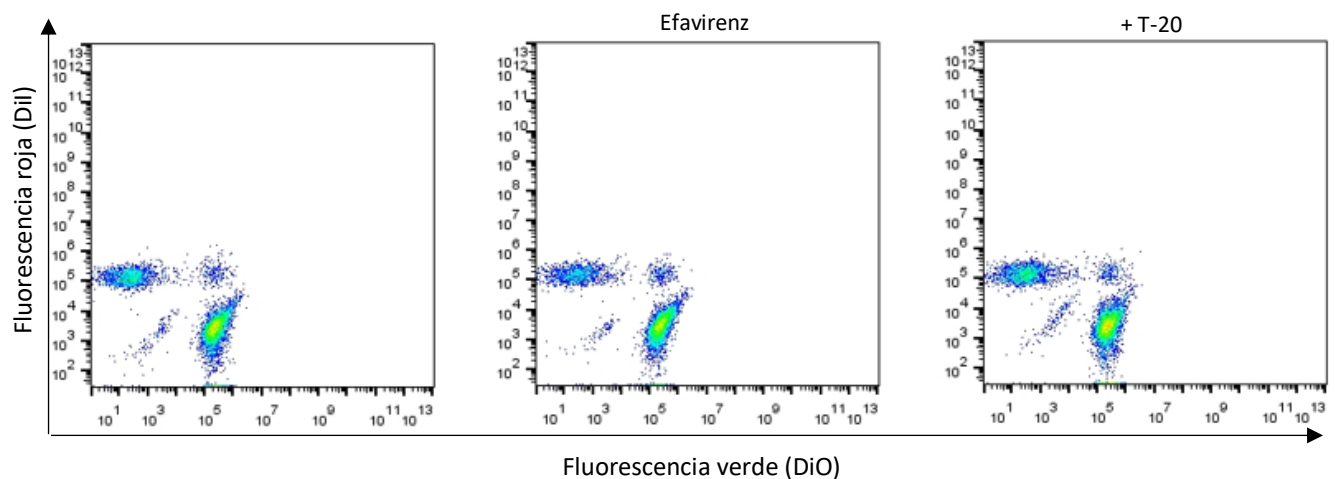


Figura. 15. Análisis por citometría de flujo de co-cultivos entre células T CD4⁺ marcadas con Dil y células T CD4⁺ marcadas con DiO a una MOI de 1 de VIH -1. Las gráficas de puntos indican la ausencia de células con fluorescencia mixta, así como en los grupos con Efavirenz y péptido inhibidor de la fusión del HIV-1 T-20.

8.3 Análisis por microscopía de fluorescencia de las fusiones celulares

El análisis por microscopía de fluorescencia de los co-cultivos entre las células Env⁺ y los tres tipos de células CD4⁺ (Jurkat E6-1, THP-1 linfocitos T CD4⁺ primarios) incubados durante 24 h, reveló la presencia de células con fluorescencia verde y roja, confirmando así los datos obtenidos por citometría de flujo que indicaban la generación tanto de sincicios como de heterocariones.

Como se observa en la figura 17, la presencia de fusiones celulares es muy evidente en el co-cultivo entre las células Jurkat Env⁺ y E6-1, las cuales muestran una diversidad de tamaños, en concordancia con observaciones previas [23]. Dado que la fusión no se observó después de la adición del inhibidor T-20, la generación de fusión celular se puede atribuir a la actividad del complejo Env.

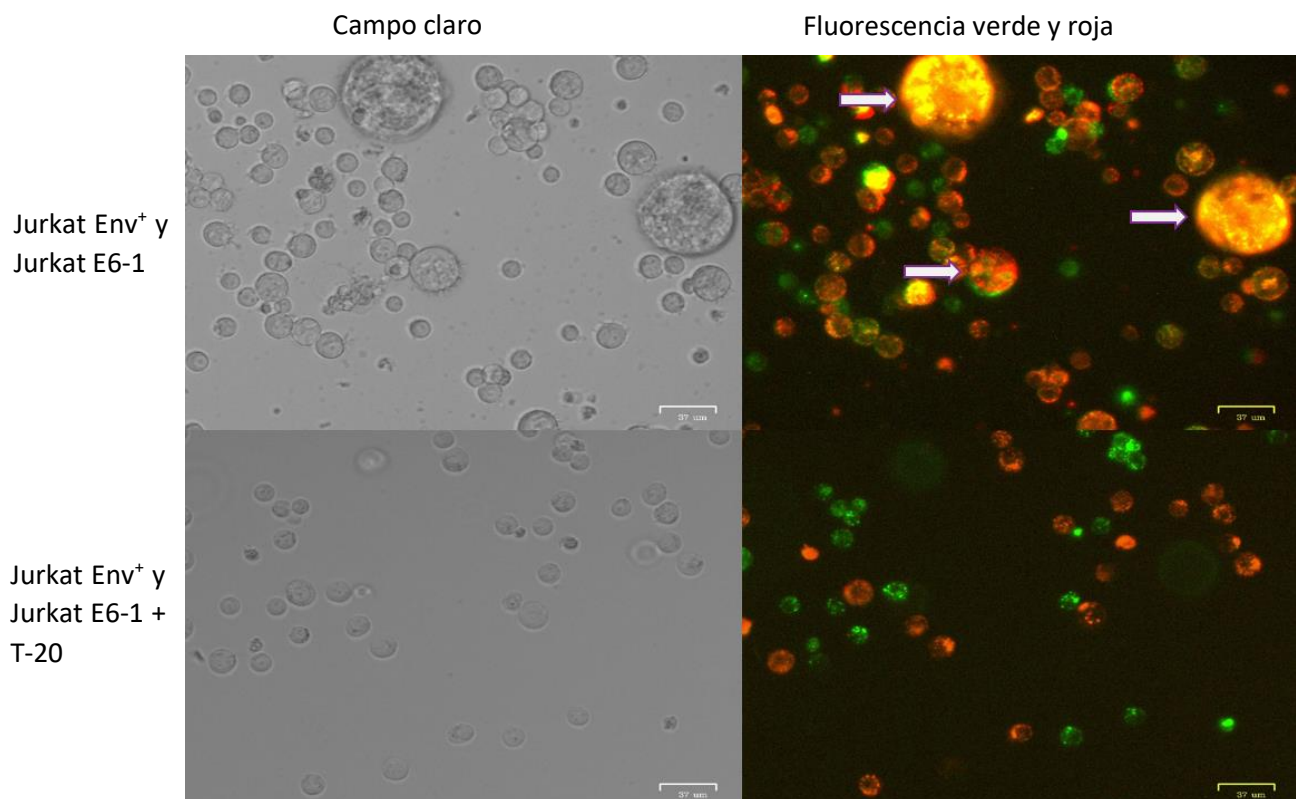


Figura 17. Análisis por microscopía de fluorescencia de fusiones celulares en co-cultivos entre Jurkat Env⁺ marcadas con Dil (Fluorescencia roja) y Jurkat E6-1 (CD4⁺) marcadas con DiO (Fluorescencia verde) incubadas durante 24 h. Las flechas señalan las células gigantes con fluorescencia doble, así como el efecto del péptido inhibidor de la fusión del VIH -1 T-20.

Al visualizar los co-cultivos de células T CD4⁺ primarias y Jurkat Env⁺ la formación de sincicios se observa claramente, pero a diferencia de los formados con las células E6-1, el tamaño de estos fue mucho menor y su morfología fue homogénea. La formación de los sincicios desaparece al añadir T-20, quedando solo células con una sola fluorescencia, confirmando así la especificidad de la fusión observada (Figura 18).

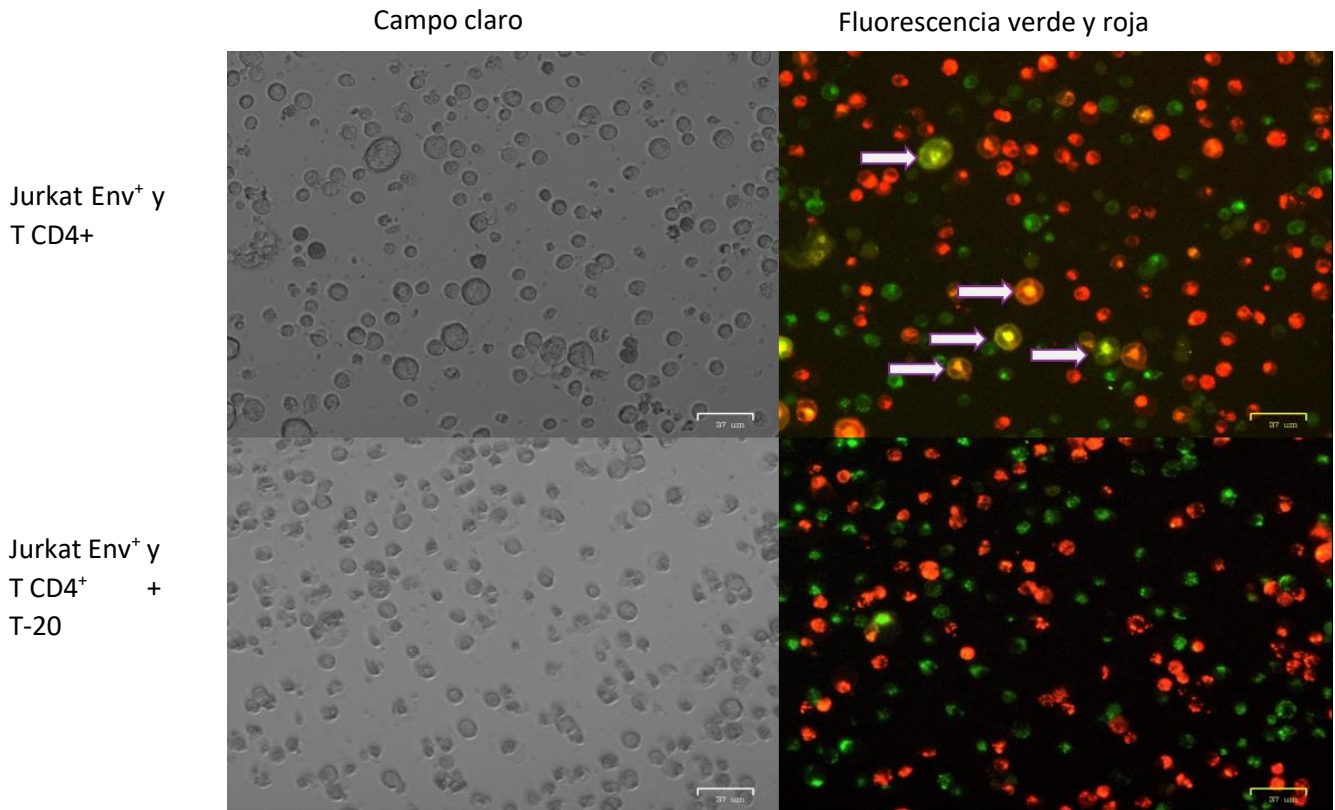


Figura. 18. Microscopia de fluorescencia de co-cultivos entre células Jurkat Env⁺ marcadas con Dil (Fluorescencia roja) y linfocitos T CD4⁺ primarios marcados con DiO (Fluorescencia verde) incubadas durante 24 h. Las flechas señalan las células de mayor con fluorescencia doble. También se muestra efecto del péptido inhibidor de la fusión del VIH-1 T-20.

En los co-cultivos de células Jurkat Env⁺ y THP-1 se aprecia claramente la presencia de células fusionadas (heterocariones), con tamaños diversos, aunque más pequeños que los formados por las células Jurkat Env⁺ y Jurkat E6-1. La

formación de estos heterocariones se inhibe al añadir T-20 lo cual indica la participación de la proteína Env en la inducción de las fusiones (Figura 19).

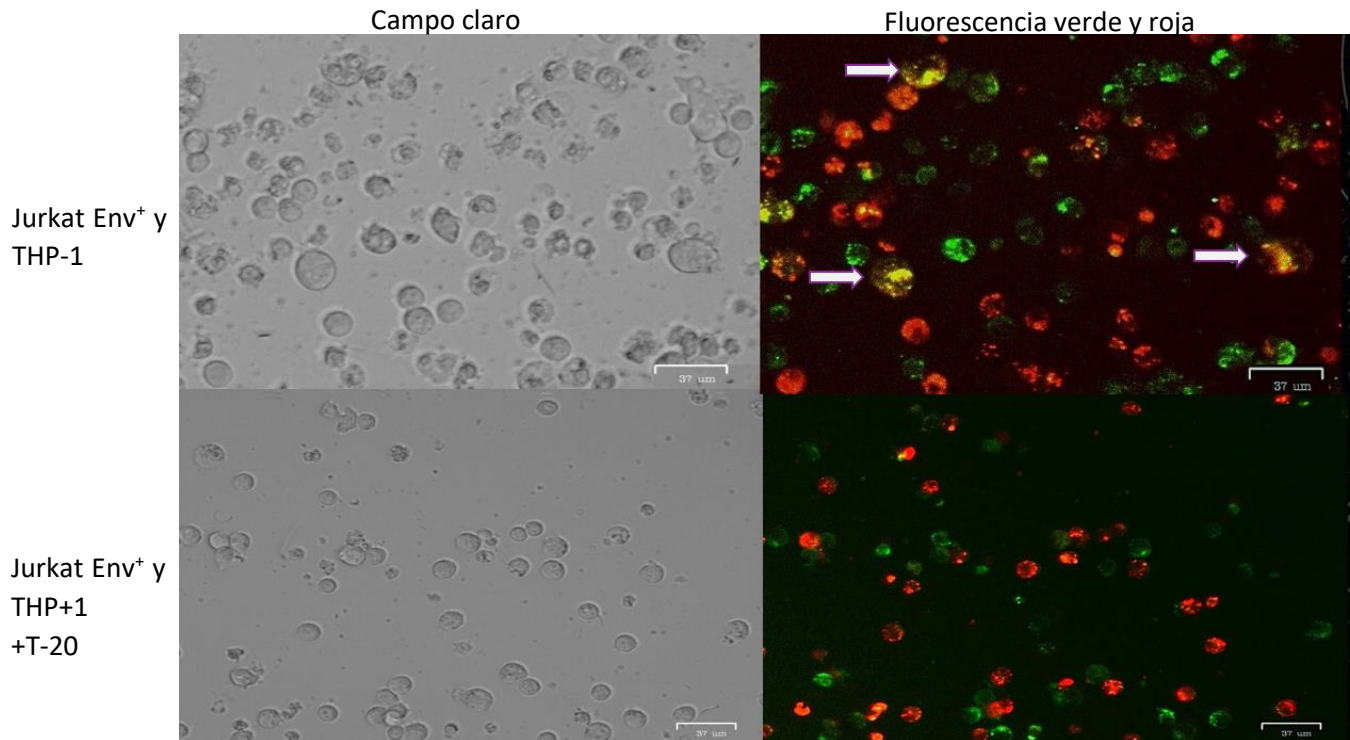


Fig. 19. Microscopia de fluorescencia de fusiones celulares en co-cultivos entre THP-1 (CD4⁺) marcados con Dil (Fluorescencia roja) y Jurkat Env⁺ marcadas con DiO (Fluorescencia verde) incubadas durante 24 h. Las flechas señalan las células con fluorescencia doble más características. Los recuadros inferiores presentan células de una sola fluorescencia cuando se adiciona T-20.

Finalmente, en los co-cultivos de células THP-1 con linfocitos T CD4⁺ no se observaron células con fluorescencia mixta, indicando que estas células no se fusionan entre sí en ausencia de la proteína Env (datos no mostrados).

9. Discusión

La patogénesis asociada a la infección por VIH es compleja y aunque ha sido motivo de intenso estudio [26], aun no se conocen a fondo todos sus mecanismos; en particular el papel que puede tener la fusión de células y la formación de heterocariones durante la infección y el posterior desarrollo del SIDA. Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con los descritos previamente sobre la interacción de líneas de células linfocitarias que expresan el complejo Env del VIH -1 y las que expresan los receptores para el mismo, principalmente CD4. En dichos estudios se mostró que los porcentajes de poblaciones con doble fluorescencia que presentan FRET van del 5% al 17% [23, 28, 29] en co-cultivos de 24 h, evaluados por citometría de flujo. Los resultados obtenidos en este trabajo son congruentes con estos estudios.

También se puede observar que el porcentaje de fusiones entre células Jurkat Env⁺ y los linfocitos T CD4⁺ es similar al que se obtiene para la fusión entre células Jurkat Env⁺ y las células Jurkat E6-1, lo que muestra la capacidad de los linfocitos de cultivos primarios para fusionarse con células que expresen las proteínas gp120/gp41. Es interesante señalar que el porcentaje de fusión observado entre las células Jurkat Env⁺ y los linfocitos T CD4⁺ no es muy diferente al observado entre Jurkat Env⁺ y las células Jurkat E6-1 (6.29 versus 5.46%), a pesar de que solo el 25% de las células E6-1 resultaron positivas a CD4. Estos resultados sugieren que otros factores además de la presencia de CD4 en la superficie celular, influyen en la generación de células fusionadas.

Al analizar las fusiones heterotípicas entre las células THP-1 y las Jurkat Env⁺ (Figura 12), se observa que hay un 4.5% de heterocariones formados, resultados que coinciden con los reportados por Rivera y colaboradores [28], así como por Martínez y colaboradores [14], aunque cabe destacar que la cantidad de fusiones celulares en estos estudios llegaron a ser hasta del 24% a las 48 horas, lo que muestra que un mayor tiempo de interacción en los co-cultivos favorece la fusión de las células y en consecuencia y aumento en el número de células fusionadas.

En este estudio, como en los anteriormente mencionados, se ha reunido evidencia de que las células doble fluorescentes que expresan FRET, formadas en los co-cultivos entre células Env⁺ y células CD4⁺ corresponden a verdaderas fusiones celulares, descartando aglomerados o fenómenos como fagocitosis por parte de los monocitos, ya que se observa que la población de las células fusionadas no se genera cuando al co-cultivo se le añade el péptido inhibidor T-20, determinando así que la expresión de las proteínas gp120/gp41 y su unión al receptor CD4 es el evento responsable de la formación de células con doble fluorescencia en todos los co-cultivos.

Los resultados de fusiones celulares que se observaron en el citómetro se confirmaron con las observaciones realizadas por microscopía de fluorescencia, donde se observan células con fluorescencia doble, tanto para la formación de sincicios como de heterocariones, siendo de mayor tamaño las fusiones formadas por las células E6-1 (Figura 17) que las formadas por las T CD4⁺ (Figura 18) y los heterocariones formados por las células THP-1 (Figura 19). Si se contrasta con el análisis de la expresión del receptor CD4 (Figura 9), se puede determinar que la morfología y el tamaño de las células fusionadas no depende solamente de la presencia del receptor, sino también de características intrínsecas de las líneas celulares.

Estos resultados morfológicos se correlacionan con los obtenidos por Huerta y colaboradores [23], donde muestran que los sincicios entre las células Env⁺ y las E6-1 forman células gigantes multinucleadas. Posteriormente, al analizar los heterocariones formados entre las células THP-1 y Jurkat Env⁺, observamos que sólo se presentan entre dos y cuatro núcleos, resultados anteriormente reportados por Rivera y colaboradores [30], lo que sugiere que los distintos tamaños de las células fusionadas están dados por su capacidad de integrar distintos números de células durante el evento de fusión celular, siendo más prominente tanto en cantidad como en tamaño la formación de sincicios que de heterocariones. De igual manera que en el análisis por citometría de flujo, en los ensayos de microscopía se puede apreciar que al agregar T-20 se reduce de manera notable la presencia de células

con doble fluorescencia, quedando únicamente células con fluorescencia roja o verde validando nuevamente los resultados.

Al hacer el análisis de los co-cultivos en presencia de partículas virales para determinar si los eventos de fusiones celulares pueden estar dados por mecanismos de FFWO, cultivando células T CD4⁺ con THP-1 en presencia del virus a una MOI de 0.1, no se observó la formación de poblaciones con doble fluorescencia que presentaran FRET (Figura 13). Al aumentar la MOI viral a 1 el resultado fue el mismo (Figura 14), al igual que el resultado obtenido en los co-cultivos entre células T CD4⁺ (Figura 15), donde tampoco se observa la formación de sincicios. Estos resultados difieren con los reportados por otros autores que muestran fusiones celulares FFWO por partículas virales de VIH -1 [19] [20]. La diferencia puede radicar tanto en las líneas celulares que usaron durante la experimentación, así como en la concentración de partículas virales que se utilizaron para inducir la fusión. Por ejemplo, Clavel y Charneau [19] reportan la formación de sincicios por mecanismos FFWO usando células HeLa-CD4. Las células HeLa son células adherentes con amplias zonas de contacto intercelular estrecho en comparación con cultivos de células en suspensión, de modo que esta característica podría aumentar la probabilidad de interacciones entre las membranas que produzcan la fusión de membranas, minimizando el requerimiento energético en la formación de sincicios. Otro estudio realizado por Kondo y colaboradores [20] en células CEM.NKR-CCR5 las cuales son células en suspensión, también muestra fusiones FFWO a través de pseudovirus HXB2, esto analizado a través de microscopía de fluorescencia, pero a diferencia de nuestro trabajo, donde la mayor concentración viral fue de una MOI de 1, ellos utilizaron una MOI de 10, promoviendo la unión de las partículas pseudovirales a los receptores por medio de centrifugación y bajando la temperatura a 4 °C. Estos procedimientos pueden favorecer el aumento de la unión y de la concentración de partículas virales sobre las membranas de las células blanco, lo que a su vez facilita la unión a los receptores de las células vecinas, permitiendo que se lleve a cabo el puente necesario para el mecanismo de fusión celular. Esta observación es congruente con la necesidad de una concentración muy alta de

partículas fusogénicas y la inducción de estrechos contactos celulares actuando simultáneamente para inducir la fusión celular por mecanismos FFWO.

Otra variable que se debe considerar en el análisis de la FFWO vs. FFWI, es el estado de activación de las células. Cuando las células se infectan por el VIH -1, el virus utiliza la maquinaria de su célula hospedera para facilitar aspectos clave de su propia replicación, permitiendo que se expresen las proteínas gp120/gp41 sobre la membrana de la célula infectada, en mayor concentración que la que puede expresar una sola partícula viral. Así, Bracq y colaboradores [31], muestran que a partir de macrófagos y linfocitos T CD4⁺ primarios activados con PHA más ionomicina, se obtienen células gigantes multinucleadas por mecanismo FFWI. Por lo tanto, es posible que el estado activado de los linfocitos induzca una mayor permisividad de la célula para la fusión, ya sea por la cantidad de proteína Env expresada en la membrana, como por otros procesos asociados a la activación, como la expresión de moléculas de adhesión o una mayor fluidez de la membrana celular. En este sentido, la FFWO es un proceso que se puede dar sin la necesidad de tener células activadas ya que éste es independiente del ciclo viral, pero el cual depende de la cantidad de virus circundante en el microambiente [1].

Los resultados aquí mostrados junto con los observados en los estudios anteriormente mencionados proveen evidencia de que el mecanismo FFWO descrito para las fusiones celulares, no es el responsable de la formación de sincicios y heterocariones, al menos en presencia de concentraciones moderadas de virus. Esta situación puede ser equivalente a la primera fase del establecimiento de la infección por VIH -1 *in vivo*, en donde el número de viriones que penetran la barrera mucosa es reducido en comparación con la cantidad de virus insemñado, resultando en poblaciones virales muy pequeñas, siendo apenas las suficientes para infectar células de forma productiva en el portal de entrada [32].

Se puede inferir que después de algunos ciclos de replicación posteriores al establecimiento de la infección, el virus puede usar las interacciones célula-célula [33] [34], que juegan un papel crítico en la función normal del sistema inmunitario, para facilitar su transmisión desde las células presentadoras de antígeno, como las

células dendríticas, a las células T CD4⁺ a través de una estructura especializada designada como sinapsis virológica [35]. La transmisión del virus a las células T CD4⁺ es mucho más eficiente a través de una sinapsis virológica que a través de la difusión libre de células [34]. Posteriormente procesos involucrados en la rápida y masiva transferencia del VIH -1 de célula a célula mediante mecanismos de fusión celular FFWI conducirán a la producción de células gigantes multinucleadas que pueden ser tanto sincicios como heterocariones [31]. En tejidos linfoides, la alta densidad de células T CD4⁺ en los ganglios linfáticos y la gran cantidad de células infectadas que expresan el complejo Env en su membrana parece favorecer formación de sincicios [37], evento equiparable a nuestro modelo de fusión entre células Jurkat Env⁺ y células CD4⁺ que hasta el momento describen mecanismos FFWI para la formación de sincicios como de heterocariones.

10. Conclusiones

- Las células T CD4⁺ primarias tienen la capacidad de fusionarse *in vitro* con células linfocíticas que expresan el complejo Env del VIH.

- La fusión a través de las partículas virales para la formación de sincicios y heterocariones está mediada por mecanismos FFWI en co-cultivos entre células Jurkat Env⁺ y células T CD4⁺.

- Aunque la inducción de FFWO *in vitro* con participación de linfocitos T CD4⁺ ha sido reportada por otros autores, en nuestro estudio no muestra ser un mecanismo significativo de fusión, al menos en presencia de concentraciones moderadas de virus.

- Nuestros estudios son compatibles con la proposición de que se requiere de células que estén activas o en constante replicación para que el virus lleve a cabo su ciclo replicativo, promoviendo la expresión del complejo Env en la membrana de la célula infectada para que se dé el proceso de fusión celular.

11. Perspectivas

Los resultados obtenidos en el presente estudio dan origen a algunas perspectivas que se deben tomar en cuenta para la continuidad de esta investigación, y así aumentar el conocimiento acerca del proceso de fusiones celulares por VIH-1:

- Utilizar una mayor concentración viral, con el fin de observar si se promueve el mecanismo FFWO; aunque la concentración utilizada en este trabajo ya se considera alta para estudios *in vitro*, se podría utilizar una concentración que se ajuste a las encontradas en ganglios linfáticos durante el estado agudo de la infección.

- Usar líneas celulares Jurkat, (ya sea previamente infectadas o colocando las partículas virales durante los ensayos en co-cultivos) ya que al tener la característica intrínseca de encontrarse en un estado de replicación constante y de actividad metabólica más activa, promueven de forma efectiva la replicación viral, esto a su vez, permite que se presenten las proteínas del complejo Env en la membrana de las células infectadas en mayor concentración, lo que promovería en los ensayos de co-cultivos con células THP-1, mayor probabilidad de observar si hay formación de heterocariones.

- Activar previamente con algún mitógeno las células T CD4⁺ primarias antes de colocarlas en los ensayos de fusión celular, con el objetivo de mantener las células metabólicamente activadas y que se promueva la replicación viral de forma constante para tener altas concentraciones del complejo Env en las células infectadas, posteriormente, al utilizarlas en los co-cultivos con las células THP-1, observar si hay formación de heterocariones.

12. Referencias

- 1.- Ogle, B. M., Cascalho, M., & Platt, J. L. (2005). Biological implications of cell fusion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(7), 567.
- 2.- Hoekstra, D., Klappe, K., Hoff, H., & Nir, S. (1989). Mechanism of fusion of Sendai virus: role of hydrophobic interactions and mobility constraints of viral membrane proteins. Effects of polyethylene glycol. *Journal of Biological Chemistry*, 264(12), 6786-6792.
- 3.- Podbilewicz, B. (2014). Virus and cell fusion mechanisms. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30, 111-139.
- 4.- Terada, N., Hamazaki, T., Oka, M., Hoki, M., Mastalerz, D. M., Nakano, Y. & Scott, E. W. (2002). Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature*, 416(6880), 542.
- 5.- Clements, J. E., & Zink, M. C. (1996). Molecular biology and pathogenesis of animal lentivirus infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 9(1), 100-117.
- 6.- Arhel, N. J., Souquere-Besse, S., Munier, S., Souque, P., Guadagnini, S., Rutherford, S., ... & Charneau, P. (2007). HIV-1 DNA Flap formation promotes uncoating of the pre-integration complex at the nuclear pore. *The EMBO Journal*, 26(12), 3025-3037.
- 7.- Simon, V., Bloch, N., & Landau, N. R. (2015). Intrinsic host restrictions to HIV-1 and mechanisms of viral escape. *Nature Immunology*, 16(6), 546.
- 8.- Center, R. J., Leapman, R. D., Lebowitz, J., Arthur, L. O., Earl, P. L., & Moss, B. (2002). Oligomeric structure of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein on the virion surface. *Journal of Virology*, 76(15), 7863-7867.
- 9.- McCaffrey, R. A., Saunders, C., Hensel, M., & Stamatatos, L. (2004). N-linked glycosylation of the V3 loop and the immunologically silent face of gp120 protects human immunodeficiency virus type 1 SF162 from neutralization by anti-gp120 and anti-gp41 antibodies. *Journal of Virology*, 78(7), 3279-3295.

- 10.- Zolla-Pazner, S. (2004). Identifying epitopes of HIV-1 that induce protective antibodies. *Nature Reviews Immunology*, 4(3), 199.
- 11.- Berger, E. A., Murphy, P. M., & Farber, J. M. (1999). Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annual Review of Immunology*, 17(1), 657-700.
- 12.- Lee, B., Sharron, M., Montaner, L. J., Weissman, D., & Doms, R. W. (1999). Quantification of CD4, CCR5, and CXCR4 levels on lymphocyte subsets, dendritic cells, and differentially conditioned monocyte-derived macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(9), 5215-5220.
- 13.- Kondo, N., Marin, M., Kim, J. H., Desai, T. M., & Melikyan, G. B. (2015). Distinct requirements for HIV-cell and HIV-mediated cell-cell fusion. *Journal of Biological Chemistry*, jbc-M114.
- 14.- Martínez Méndez, David. (2013). "Caracterización de heterocariones linfocito-monocito inducidos por las proteínas de fusión del VIH-1". (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, México. Recuperado de <https://repositorio.unam.mx/contenidos/177458>
- 15.- Dargent, J. L., Lespagnard, L., Kornreich, A., Hermans, P., Clumeck, N., & Verhest, A. (2000). HIV-associated multinucleated giant cells in lymphoid tissue of the Waldeyer's ring: a detailed study. *Modern Pathology*, 13(12), 1293.
- 16.- Kramer-Hämmerle S., Rothenaigner., Wolff H., Bell JE., Brack-Werner R., 2005. Cells of the central nervous system as targets and reservoirs of the human immunodeficiency virus. *Virus Research*, 111:194-213.
- 17.- Harbison, C., Zhuang, K., Gettie, A., Blanchard, J., Knight, H., Didier, P., ... & Westmoreland, S. (2014). Giant cell encephalitis and microglial infection with mucosally transmitted simian-human immunodeficiency virus SHIV SF162P3N in *Rhesus macaques*. *Journal of Neurovirology*, 20(1), 62-72.

- 18.- Bratt, M. A., and W. R. Gallaher. 1969. Preliminary analysis of the requirements for fusion from within and fusion from without by Newcastle disease virus. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, 64:536-543.
- 19.- Clavel, F., & Charneau, P. (1994). Fusion from without directed by human immunodeficiency virus particles. *Journal of Virology*, 68(2), 1179-1185.
- 20.- Kondo, N., Marin, M., Kim, J. H., Desai, T. M., & Melikyan, G. B. (2015). Distinct requirements for HIV-cell fusion and HIV-mediated cell-cell fusion. *Journal of Biological Chemistry*, 290(10), 6558-6573.
- 21.- Frankel, S. S., Wenig, B. M., Burke, A. P., Mannan, P., Thompson, L. D., Abbondanzo, S. L., ... & Steinman, R. M. (1996). Replication of HIV-1 in dendritic cell-derived syncytia at the mucosal surface of the adenoid. *Science*, 272(5258), 115-117.
- 22.- Gómez-Icazbalceta, G., Ruiz-Rivera, M. B., Lamoyi, E., & Huerta, L. (2015). FRET in the Analysis of In Vitro Cell–Cell Fusion by Flow Cytometry. *In Cell Fusion* (pp. 217-227). Humana Press, New York, NY.
- 23.- 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. *Journal of virological methods*, 138(1-2), 17-23.
- 24.- Martínez-Méndez, D., Rivera-Toledo, E., Ortega, E., Licona-Limón, I., & Huerta, L. (2017). Monocyte-lymphocyte fusion induced by the HIV-1 envelope generates functional heterokaryons with an activated monocyte-like phenotype. *Experimental Cell Research*, 352(1), 9-19.
- 25.- Grigorov, B., Rabilloud, J., Lawrence, P., & Gerlier, D. (2011). Rapid titration of measles and other viruses: optimization with determination of replication cycle length. *PloS one*, 6(9), e24135.

- 26.- De-Scheerder, M. A., Depelseneer, B., Vandekerckhove, L., & Wim, T. (2020). Evolution of Experimental Design and Research Techniques in HIV-1 Reservoir Studies: A Systematic Review. *Aids Reviews*, 2020;22:16-24.
- 27.- Melikyan, G. B. (2008). Common principles and intermediates of viral protein-mediated fusion: the HIV-1 paradigm. *Retrovirology*, 5(1), 111.
- 28.- Lopez-Balderas, N., Huerta, L., Villarreal, 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 Research*, 123(2), 138-146.
- 29.- Rivera-Toledo, E., López-Balderas, N., 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. *Archives of Virology*, 155(8), 1205-1216.
- 30.- Rivera-Toledo, E., 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. *Experimental and Molecular Pathology*, 90(2), 157-166.
- 31.- Bracq, L., Xie, M., Lambelé, M., Vu, L. T., Matz, J., Schmitt, A., ... & Benichou, S. (2017). T cell-macrophage fusion triggers multinucleated giant cell formation for HIV-1 spreading. *Journal of Virology*, 91(24), e01237-17.
- 32.- Miller, C. J., Li, Q., Abel, K., Kim, E. Y., Ma, Z. M., Wietgreffe, S., ... & Zupancic, M. (2005). Propagation and dissemination of infection after vaginal transmission of simian immunodeficiency virus. *Journal of Virology*, 79(14), 9217-9227.
- 33.- Grakoui, A., Bromley, S. K., Sumen, C., Davis, M. M., Shaw, A. S., Allen, P. M., & Dustin, M. L. (1999). The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science*, 285(5425), 221-227.

- 34.- Revy, P., Sospedra, M., Barbour, B., & Trautmann, A. (2001). Functional antigen-independent synapses formed between T cells and dendritic cells. *Nature Immunology*, 2(10), 925.
- 35.- Sattentau, Q. (2008). Avoiding the void: cell-to-cell spread of human viruses. *Nature Reviews Microbiology*, 6(11), 815.
- 36.- Chen, P., Hübner, W., Spinelli, M. A., & Chen, B. K. (2007). Predominant mode of human immunodeficiency virus transfer between T cells is mediated by sustained Env-dependent neutralization-resistant virological synapses. *Journal of Virology*, 81(22), 12582-12595.
- 37.- Murooka, T. T., Deruaz, M., Marangoni, F., Vrbanac, V. D., Seung, E., Von Andrian, U. H., ... & Mempel, T. R. (2012). HIV-infected T cells are migratory vehicles for viral dissemination. *Nature*, 490(7419), 283.