



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

PRODUCCION DE ANTICUERPOS IgG CONJUGADOS A
FITC CONTRA EL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA
HUMANA TIPO 1 (VIH-1).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
GUSTAVO ROSALES PEDRAZA



MEXICO, D. F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

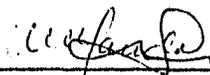
JURADO ASIGNADO.

Presidente	Profesor: Aida Navas Pérez.
Vocal	Profesor: Yolanda López Vidal.
Secretario	Profesor: Jose Sulivan López Gonzalez.
1er Suplente	Profesor: Ana Esther Aguilar Cardenas.
2do suplente	Profesor: Fernando Garcia Tamayo.

Sitio donde se desarrollo el tema

Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán".

Departamento de Infectología-Investigación.



Asesor del tema

Dra. Yolanda López Vidal



Sustentante

Gustavo Rosales Pedraza

A mi asesora y al jurado asignado.

Agradezco a la Dra. Yolanda López Vidal por su asesoría profesional y su apoyo, en la realización de este trabajo.

Al jurado asignado.

Al jefe del depto. de Infectología, Dr. Guillermo Ruiz-Palacios, por brindarme la oportunidad de realizar el presente trabajo.

Al Dr. Juan Sierra por su participación crítica y aplicación práctica, en la elaboración de la presente.

A Teresa Muñoz; por su gran cooperación.

Al departamento de infectología del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zúbiran".

A mis padres por su apoyo, cariño y la formación que me han dado; Gracias.

A mis hermanos; en especial a Isabel; por esas grandes vivencias que pasamos juntos.

A mis amigos y compañeros de la Facultad de Química.

Mis amigos y cuates: David y Karl; por todo lo que compartimos.

A Vero, Claudia, Pily, Mónica, Sandra, Chucho; por aquellos buenos tiempos.

Por las noches de desvelos: a Claudia, Adolfo, Carlos, Tomy, Omar, Pablo, Adriana y Tere.

A Carmen:

Por el apoyo y comprensión incondicional, y porque sin ella no habría llegado hasta esta importante parte de mi vida.

ABREVIATURAS.

Ac.	Anticuerpo.
ADN.	Acido desoxiribonucleico.
ADNc.	Acido desoxiribonucleico complementario.
Ag.	Antígeno.
ARN.	Acido ribonucleico.
ARNm.	Acido ribonucleico mensajero.
ARV.	Retrovirus asociado al Síndrome de inmunodeficiencia adquirida.
CMSP.	Células mononucleares de sangre periférica.
DMSO.	Dimetilsulfóxido.
ELISA.	Ensayo inmunoenzimático en fase sólida.
FDA	Administración en alimentos y medicamentos.
gp.	Glicoproteínas virales.
HTLV.	Virus linfotrópico de células T humanas.
IFA .	Inmunofluorescencia.
IgG.	Inmunoglobulina G.
FITC.	Isotiocianato de fluoresceína.
LAV.	Virus asociado a linfadenopatía.
nm.	Nanómetros.
OMS.	Organización mundial de la salud.
OPD.	Orto-fenilendiamina.
PCR.	Reacción en cadena de la polimerasa.
SAB.	Solución amortiguadora de bloqueo.
SAC	Solución amortiguadora de citratos.
SAF	Solución amortiguadora de fosfatos.
SAS.	Solución de sulfato de amonio saturada.
SSI.	Solución salina isotónica.
SIDA.	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida.
VIH.	Virus de inmunodeficiencia humana.

CONTENIDO.

	Página.
1.0 INTRODUCCIÓN.	1
2.0 ANTECEDENTES.	3
2.1 Generalidades.	4
2.1.1 Características generales del VIH-1.	4
2.1.2 Vías de transmisión.	5
2.1.3 Patogénesis.	6
2.1.4 Respuesta inmune.	9
3.0 TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN POR VIH-1.	10
4.0 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO.	11
4.1 Aislamiento del virus.	12
5.0 JUSTIFICACIÓN.	13
6.0 OBJETIVOS.	13
6.1 Objetivo primario.	13
6.2 Objetivos secundarios.	13
7.0 MATERIALES Y MÉTODOS.	14
7.1 Determinación de pureza del antígeno de VIH-1.	14
7.2 Preparación del antígeno VIH-1 para la inmunización.	14
7.3 Cuadro de inmunización.	15
7.4 Obtención de suero durante la inmunización.	15
7.4.1 Obtención de suero a partir de sangre total.	16
7.5 Detección de anticuerpos anti-VIH-1 en conejos durante el esquema de inmunización por inmuno-blot.	16

7.5.1 Método de inmuno-blot.	16
7.6 Titulación de suero hiperinmune de conejo por ELISA.	17
7.6.1 Titulación de sueros. ELISA.	17
7.7 Purificación de la fracción IgG del suero, por precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de afinidad con proteína A de <i>S. aureus</i> .	18
7.7.1 Precipitación de IgG en el suero.	18
7.7.2 Método de Bradford para la cuantificación de proteínas totales.	19
7.7.3 Cromatografía de afinidad con proteína A.	19
7.7.3.1 Procedimiento de cromatografía.	20
7.8 Caracterización y titulación de la fracción IgG purificada.	20
7.9 Marcaje de anticuerpos IgG antiVIH-1 con isotiocianato de fluoresceína.	21
7.9.1 Unión de anticuerpos con FITC.	21
7.9.2 Procedimiento de marcaje.	21
7.10 Purificación del conjugado IgG-FITC por filtración en gel.	21
7.10.1 Procedimiento de purificación.	22
7.11 Determinación del grado de unión IgG/FITC.	22
7.12 Co-cultivo de células T.	23
7.12.1 Aislamiento de linfocitos T.	24
7.13 Inmunofluorescencia directa.	25
7.13.1 Método directo.	25
7.13.2 Ensayo en laminillas.	25
7.13.3 Estandarización del ensayo de inmunofluorescencia con líneas celulares.	27
7.13.3.1 Determinación de la concentración óptima de células en el ensayo de IFA.	28
8.0 RESULTADOS.	29
8.1 Determinación de pureza del antígeno de VIH-1.	29
8.2 Obtención de suero durante la inmunización.	29

8.3 Detección de anticuerpos anti-VIH-1 durante el esquema de inmunización por inmuno-blot.	30
8.4 Titulación de suero hiperinmune de conejo anti-VIH-1 por ELISA.	32
8.5 Purificación de la fracción IgG del suero, por precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de afinidad con proteína A de <i>S. aureus</i> .	33
8.5.1 Precipitación de inmunoglobulinas.	33
8.5.2 Curva estandar para la determinación y cuantificación de proteínas.	33
8.5.3 Purificación de la fracción IgG anti-VIH-1 en columna cromatográfica de afinidad con proteína A de <i>S. aureus</i> .	34
8.5.4 Cuantificación de proteínas de la solución de IgG purificados.	35
8.6 Caracterización y titulación de la fracción IgG purificada.	36
8.6.1 Detección de antígeno viral con IgG anti-VIH-1 de conejo por inmuno-blot.	36
8.6.2 Titulación de los IgG anti-VIH-1 por ELISA.	37
8.7 Purificación del conjugado IgG-FITC anti-VIH-1 por filtración en gel.	38
8.8 Determinación del grado de unión IgG/FITC.	39
8.9 Co-cultivos de linfocitos T de pacientes.	40
8.10 Resultado de la estandarización del ensayo de inmunofluorescencia directa con líneas celulares.	41
9.0 DISCUSIÓN.	43
10.0 CONCLUSIONES.	46
11.0 APENDICE.	47
12.0 BIBLIOGRAFIA.	49

1.0 INTRODUCCIÓN.

La infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1) es considerada como causante de una serie de trastornos inmunológicos conocidos en conjunto como Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA)¹⁻⁴; la infección ocurre cuando el virus llega a circulación en individuos con factores de riesgo tales como: transfusiones sanguíneas, uso de drogas intravenosas, recién nacidos de madres infectadas, relaciones sexuales (promiscuidad).

Una vez establecida la infección por el VIH-1 se inicia el período asintomático del individuo, y el virus se mantiene en etapa de replicación muy baja o en forma latente (provirus); esta etapa depende de las características del virus y del huésped. Se ha demostrado que con el uso de agentes retrovirales, esta etapa de latencia viral puede prolongarse, ya que el virus se replica en forma limitada y casi imperceptible. La activación del ciclo de replicación del virus inicia la siguiente etapa de la enfermedad; se han propuesto un gran número de cofactores que pueden activar al VIH-1, como otras infecciones, tales como citomegalovirus y herpes, el deterioro del sistema inmune en el huésped y el desarrollo de resistencia de la cepa de VIH-1 a los fármacos retrovirales; esta etapa se define como el complejo relacionado a SIDA; y es en la cual se inician los primeros síntomas clínicos en el huésped. La deficiencia continua de los linfocitos T en el sistema inmune y presencia de infecciones oportunistas, determina el estadio de SIDA.¹⁻⁴

El Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida es un problema de salud mundial. Los defectos en el sistema inmune son progresivos e irreversibles en el individuo con SIDA y su tasa de mortalidad aproximada es del 100%.^{3,5}

En 1987 se han reportado aproximadamente 70,000 casos de SIDA en todo el mundo, y se incrementó en los siguientes años; para 1994 se estimó que la cifra de personas infectadas con VIH-1 fue de aproximadamente 20,000,000; de los cuales de un 15-25% han desarrollado SIDA en un periodo de 7 años promedio de la adquisición de la infección.^{3,5,6} El porcentaje restante de individuos infectados con VIH-1, probablemente aún no cumplen este periodo. En el continente Americano, México ocupa el tercer lugar en número de casos de SIDA reportados después de Estados Unidos y Brasil, A finales del año 1994 el número de casos de SIDA en México reportados fue de aproximadamente 20,000, con un promedio de 6.9 casos diarios.⁷

2.0 ANTECEDENTES.

En 1981 se reportó en Estados Unidos un caso de un paciente con sarcoma de kaposi y neumonía por *Pneumocystis carinii*; se reconoció una enfermedad de inmunosupresión celular grave llamado Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA).²⁻⁴

Hasta 1983 se reportaron numerosos casos de pacientes que presentaban inmunodeficiencia y múltiples infecciones oportunistas.⁸ Fue en el mismo año en Francia en donde se aisló un retrovirus de un paciente homosexual con linfadenopatía severa e inmunodeficiencia y le nombraron virus asociado a linfadenopatía (LAV).⁹

Posteriormente en el mismo año en Estados Unidos se aisló un virus molecular y biológicamente similar al descrito en Francia, de un paciente con SIDA y le llamaron virus linfotrópico de células T humanas tipo III (HTLV-III) por considerarlo dentro del grupo de los retrovirus.¹⁰⁻¹² Otro nombre que recibió por otro grupo en Estados Unidos fue el de virus asociado al síndrome de inmunodeficiencia adquirida (ARV).¹³

Para 1986 el Comité Internacional de Taxonomía de Virus recomendó, el término de virus de inmunodeficiencia Humana (VIH), para distinguir este virus como un nuevo patógeno reconocido en el humano.¹⁴

En el mismo año en África se aisló un subtipo de VIH-1 en pacientes con SIDA y le nombraron VIH-2; posteriormente fue aislado en otros países de Europa y Brasil.^{3,15}

Se ha demostrado que el VIH está relacionado al SIDA y enfermedades ligadas a este síndrome, además se encontraron anticuerpos del virus en individuos infectados sintomáticos (SIDA) y asintomáticos.^{1-3,16}

Se han desarrollado numerosas pruebas serológicas para diagnosticar la infección por VIH-1, siendo los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA e inmuno-blot) los recomendados por la FDA y la OMS como pruebas presuntivas y confirmatorias en el diagnóstico por VIH-1;¹⁷⁻²⁰ también se han propuesto terapias antivirales de ayuda en la infección por VIH-1, basadas en el uso de nucleósidos que impiden la replicación viral y finalmente se ha intentado diseñar vacunas con antígenos virales recombinantes con la expectativa de conferir inducción de la respuesta inmune y protección a la infección.

De las tres áreas mencionadas, el diagnóstico ha cumplido ya las expectativas de un alto grado de sensibilidad y especificidad; sin embargo tanto el tratamiento, como la generación de vacunas requieren de un mayor conocimiento y desarrollo.^{2,3,21-22}

2.1 GENERALIDADES

2.1.1 Características generales del VIH-1.

El Virus de inmunodeficiencia humana (VIH-1) es un miembro de la familia Retroviridae y subfamilia lentiviridae. Los retrovirus son virus de ARN que codifican por medio de la enzima llamada ADN polimerasa dependiente de ARN o transcriptasa reversa, la cual permite que el ARN viral se transcriba en ADN de doble cadena (ADNc).^{2,3,14} En esta forma puede integrarse al genoma celular y replicarse vía el ADN (ADN proviral). En particular los lentivirus tienen genomas muy extensos que contienen numerosos genes virales. Estos virus inducen efectos citopáticos en células infectadas y la enfermedad causa, después de un largo período de incubación, desórdenes en el sistema inmune y neurológico.

El Virus de inmunodeficiencia humana está envuelto, de forma esférica que mide de 80-130 nm de diámetro, la cápside es un icosaedro rodeado o envuelto por una membrana o pared con espículas. Algunas proteínas del VIH-1 se localizan en la cápside. La proteína de la superficie (gp120) se encuentra unida a la envoltura por la proteína transmembranal gp41, las proteínas que son codificadas por el gen gag conforman el centro (p24 y p17) y las fosfoproteínas se encuentran dentro del núcleo. La principal proteína "gag" tiene un peso molecular de 25,000 y se le nombra p24 (o p25) y forma la cubierta del centro. La proteína "gag" p17 se encuentra fuera del centro, junto de la membrana externa del virión o envoltura, parte de p17 puede proyectarse a través de la cápside viral. Por último, la proteína transcriptasa reversa se encuentra, íntimamente relacionada con las dos bandas del ARN viral que son copias exactas una de la otra. Esta condición diploide es característica de todos los retrovirus y es importante para su ciclo replicativo.^{2,3,24,25}

Figura 1.

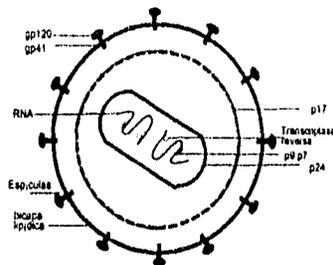


FIGURA 1. El virus de la inmunodeficiencia humana.²

2.1.2 Vías de transmisión

El Virus de inmunodeficiencia humana es transmitido por contacto sexual, con sangre o con productos de sangre contaminados, y por eventos perinatales de intercambio de fluidos de madre al feto.

Los grupos considerados de alto riesgo para adquirir la infección incluyen hombres homosexuales, bisexuales ó heterosexuales, adictos a drogas intravenosas, recién nacidos de madres seropositivas, y pacientes que necesitan transfusiones sanguíneas tales como sujetos hemofílicos, etc.

Hasta la fecha no existe vacuna que pueda proteger contra la infección por VIH-1, ni terapias que eliminen la infección y por lo tanto la enfermedad. El único tratamiento es el control de los enfermos y administración de drogas antivirales que inhiben la reproducción del virus; aunque se han ya identificado virus con resistencia a ciertas drogas.^{2,3}

2.1.3 Patogénesis

La patogénesis de la infección por el VIH-1 se caracteriza por una disminución progresiva de la función inmune asociada a un incremento, de la replicación del virus por la infección a linfocitos T con el receptor CD4. Los síntomas que distinguen la infección aguda por VIH-1 son en general linfadenopatía, fiebre, mialgia, artralgia, dolor de cabeza, fatiga, diarrea y manifestaciones neurológicas. Además de los síntomas clínicos se asocia con una replicación viral de alto grado, que ocasiona una antigenemia y viremia elevados y una disminución transitoria de células T CD4+ y por tanto una inversión en el cociente CD4+/CD8+. En esta etapa es difícil el diagnosticar la infección debido a ausencia de los anticuerpos en circulación; la respuesta del sistema inmune, ocurre en las primeras 9 semanas y puede ser la responsable de eliminar a las células T infectadas y de disminuir la viremia. Posterior a la disminución de antígeno circulante es la seroconversión y presencia de anticuerpos detectables en circulación, una respuesta intensa de células T citotóxicas; y los niveles de células T CD4+ regresan a su nivel basal y se inicia un período considerado como asintomático denominado latencia clínica.

En el período de latencia no hay alteraciones graves en el sistema inmune aunque hay aumento de las células T infectadas, disminución progresiva en el número de células CD4+ y niveles bajos pero constantes de virus. Posterior a la latencia y al progresar la enfermedad a SIDA, el sistema inmune se va deteriorando en forma drástica, disminuyendo las células T CD4+; un aumento en la replicación viral; así como la presencia de síntomas clínicos y las infecciones oportunistas como sarcoma de Kaposi, neumonía por *Pneumocystis carinii*, infecciones por citomegalovirus, herpes. *Cryptococcus neoformans*, etc.^{2,3,24,25}

Se acepta de manera general, que el VIH-1 se une a la membrana celular de los linfocitos T y en menor grado a monocitos y macrófagos, principalmente por la vía del antígeno CD4. Esta proteína se reconoció por primera vez como un marcador de superficie en las células T ayudadoras (T4). Pero se ha encontrado en células hematopoyéticas incluyendo linfocitos B y macrófagos, así como también en algunas células del cerebro. La presencia del antígeno CD4 por lo tanto, explica la susceptibilidad de muchas células al VIH-1.²²⁻²⁸

Se demostró una directa interacción entre la glicoproteína viral gp120 con la molécula CD4 y se comprobó que ambas proteínas son necesarias para la infección. La investigación en el laboratorio con fibroblastos y células del cerebro cultivadas, indican que los receptores CD4 no es el único de VIH-1, aunque no se ha demostrado la infección sin la presencia de este receptor.²³⁻²⁴

La proteína gp120 de la cubierta del VIH-1 parece unirse a la CD4 mientras que la gp41 puede actuar como una proteína de fusión entre la envoltura del virus y la membrana celular. Así ambas proteínas trabajan en conjunto permitiendo la entrada del VIH-1 al interior de la célula. Una vez que el virus entra en la célula, su ARN se libera del centro y por medio de un mecanismo de transcripción invertida se sintetiza un ADN de doble cadena, el cual se dirige al núcleo (ADNc). En este momento, dicho ADNc es integrado en el cromosoma del huésped por la enzima integrasa, donde permanecerá como un ADN proviral. De esta manera, las células infectadas pueden permanecer en un estado latente en el que se produzca muy poco o nada de ARN y proteínas virales.

El virus puede ser activado por cofactores celulares o virales, por otras infecciones o el propio sistema inmune; la célula infectada entra en la producción viral activa, en la que el ADNc proviral se transcribe en ARNm y este último es transcrito para sintetizar las proteínas precursoras del virus, que sufren desdoblamiento específicos y forman partículas virales que se unen nuevamente con el ARN del genoma del virus para formar nuevas partículas virales infecciosas. De este modo las células infectadas diseminan el virus, o también por la fusión con células no infectadas. Esta última interacción célula-célula es muy importante, ya que permite la transferencia de información viral a una célula no infectada por un mecanismo no afectado por anticuerpos neutralizantes. Por último, las células infectadas por el VIH-1 y que permanecen en estado latente o la replicación es mínima; los provirus pueden activarse más tarde por ciertos cofactores aún no definidos y activarse la producción viral.^{2,3,23,24} Figura 2.

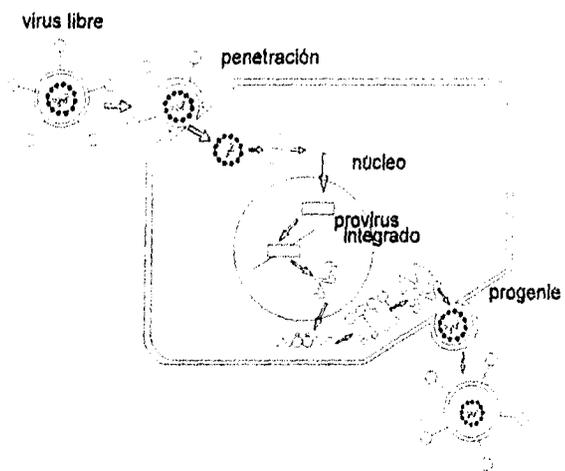


FIGURA 2. Ciclo de vida del VIH-1.²⁴

2.1.4 Respuesta inmune

El desenlace de cualquier infección viral depende de la virulencia y la capacidad de respuesta del huésped. Dado que el VIH-1 actúa sobre las células T4 del sistema inmune, su control representa un reto. El mecanismo de defensa del huésped contra las infecciones virales, consiste en respuestas humorales y celulares. El linfocito B constituye la principal célula de la respuesta humoral. A través de sus interacciones con macrófagos y linfocitos T ayudadores, la célula plasmática produce anticuerpos contra las proteínas virales. Para el VIH-1 los anticuerpos producidos son contra las principales proteínas estructurales y funcionales, principalmente los de gp120, gp41 y p24. Los anticuerpos capaces de neutralizar al virus son gp41 y gp120.^{2,3}

La citotoxicidad de células dependiente de los anticuerpos contra la envoltura del virus que se expresa en la superficie de la célula, son reconocidas por células efectoras "natural killer" (NK) o por macrófagos.

Además de los macrófagos y las NK, la participación de las células T efectoras y T citolíticas productoras de citocinas tales como IL-2, IFN- γ , y otras tales como IL-4, IL-5, IL-10 potencian la respuesta y promueven la diferenciación de células B a células plasmáticas productoras de anticuerpos.

Con la progresión de la enfermedad y consecuente deterioro del sistema inmune hay una disminución de la función cooperadora y del número de las células TCD4+, pero se incrementa la actividad de las células B. Las células TCD8+ también participan en la respuesta inmune; las células T citotóxicas son capaces de reconocer a células infectadas con VIH-1 y destruirlas; en este sentido se demuestra una protección durante la infección primaria al controlar y eliminar al virus, pero en etapa avanzada de la enfermedad puede disminuir el número de células TCD4, responsables del equilibrio de la respuesta inmunológica.

3.0 TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN POR VIH-1.

El desarrollo de medicamentos para el tratamiento anti-VIH-1, se basa en el conocimiento del ciclo de replicación del virus; El provirus lineal de ADN del VIH-1 ya integrado al ADN del huésped es capaz de producir ARN de VIH-1 y por tanto proteínas virales.

Los agentes que bloquean las fases iniciales de replicación viral, evita la infección de nuevas células, pero no actúa sobre las células que tienen infección crónica. Los agentes que inhiben las fases tardías de la replicación viral, también actúan en la replicación viral de las células con infección crónica, pero no actúa en las células no infectadas.^{2,3}

Existe una serie de compuestos que se evalúan, desarrollan e interfieren en la replicación del VIH-1. De estos agentes, los más conocidos son los dideoxineucleósidos, que son inhibidores potentes del VIH-1 *in vitro*. Al igual que los 5'trifosfatos, estos agentes ejercen gran actividad anti-VIH-1 a nivel de la transcriptasa reversa. Los trifosfatos, compiten con los dideoxineucleótidos 5'trifosfatos celulares, que son sustratos indispensables para la formación del ADN proviral por la transcriptasa reversa. También sirven como terminadores de cadena en la síntesis de ADN proviral. La polimerasa alfa de ADN de los mamíferos es relativamente resistente a los efectos de este tipo de medicamentos, sin embargo, la polimerasa gamma de ADN de los mamíferos, y la polimerasa beta de ADN son sensibles a estos compuestos, lo cual explica su toxicidad.^{2,3}

Entre los agentes aprobados para el tratamiento se encuentra la azidotimidina o retrovir. La azidotimidina es un análogo de la timidina, que inhibe la replicación del VIH-1 *in vitro*. El medicamento es fosforilado por las enzimas celulares para formar el 5'trifosfato, que interviene en la polimerasa de ADN dependiente de ARN del VIH-1 (transcriptasa reversa) y en la elongación de la cadena de ADN viral, para inhibir la replicación viral.

Con base a las propiedades farmacológicas de la azidotimidina, y debido a la toxicidad y aspectos relacionados con la fórmula, la dosis que se recomienda es de 100 mg cada cuatro horas (600 mg dosis diaria total). Aunque la vida media sérica de la azidotimidina es de una hora, la intracelular del 5'trifosfato se aproxima a tres horas.^{2,3}

4.0 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO.

Los métodos de detección de la infección por VIH-1 son divididos en directos e indirectos. Los directos monitorean la presencia del virus o antígenos virales, los indirectos detectan la presencia de anticuerpos contra el VIH-1 y son divididos en métodos de escrutinio y de confirmación. En los métodos directos se encuentran el cultivo o co-cultivo y técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Los métodos aprobados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el escrutinio de la infección por VIH-1 son el Ensayo inmunoenzimático (ELISA) y los de confirmación son el inmuno-blot, y la inmunofluorescencia.^{2,3,17-20,33-37}

Otros ensayos son utilizados como predictores del avance de la enfermedad, entre ellos se encuentra la cuantificación de β 2-microglobulina, la proteína del centro del virus (p24), y la determinación de la carga viral en tejidos y plasma. Otros métodos que miden la carga viral, incluyen células T4 y las diluciones del plasma para realizar cultivos o co-cultivos del virus, la citometría de flujo es capaz de diferenciar el número de células infectadas, de las no infectadas, etc.

Diversos estudios demuestran que la detección de anticuerpos contra la proteína p24 del virus (VIH-1), es un importante indicador de actividad viral en etapa de infección activa inicial y la detección de antígeno p24 en la etapa terminal. En algunos estudios se detecta la presencia del antígeno en infecciones tempranas sin obtener gran impacto en sus hallazgos.^{2,3,17,33-37}

El aislamiento del virus es principalmente aplicado con fines de caracterización y en los individuos con diagnóstico dudoso, por ejemplo bebés de madres seropositivas, individuos con perfiles serológicos indeterminados o posibles falsos negativos. En la actualidad, la PCR se realiza únicamente con fines de investigación en apoyo a la eficacia a nuevos tratamientos mediante la determinación semi-cuantitativa de carga viral circulante.³⁸

4.1 Aislamiento del virus

El VIH-1 se puede detectar y aislar de fluidos del cuerpo como son plasma, suero, saliva, líquido cefalorraquídeo, orina, leche, secreciones genitales y biopsias de tejidos. Los mejores resultados para aislar el virus en las personas infectadas es posible mediante el co-cultivo de los linfocitos del paciente combinados con linfocitos T de donadores sanos o líneas celulares de linfocitos T. La detección del virus en el co-cultivo se realiza con la detección de la actividad biológica de la enzima transcriptasa reversa en cultivo celular y la presencia de antígeno p24 por ELISA.³

5.0 JUSTIFICACIÓN.

En los pacientes con el Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), es importante un método temprano con sensibilidad alta, que detecte la replicación viral in-vitro como el uso de anticuerpos fluorescentes contra p24 del Virus de inmunodeficiencia humana (VIH-1).

6.0 OBJETIVOS.

6.1 Objetivo primario.

Diseño de un método de Inmunofluorescencia utilizando IgG anti-VIH-1 en la detección del virus en el co-cultivo; alternativo en la respuesta a la replicación de VIH-1.

6.2 Objetivos secundarios.

- 1.-Producción de un suero hiperimmune en conejo contra el virus de inmunodeficiencia humana (VIH-1).
- 2.-Purificación de la fracción IgG anti-VIH-1 por cromatografía de afinidad con proteína A de *Staphylococcus aureus*.
- 3.-Titulación y caracterización de la fracción IgG anti-VIH-1 por los métodos de ELISA e inmuno-blot.
- 4.-Marcaje de la fracción IgG anti-VIH-1 purificada y caracterizada con isotiocianato de fluoresceína (FITC). (CONJUGADO).
- 5.-Utilización del conjugado IgG anti-VIH-1-FITC para la detección del virus en co-cultivos de pacientes con posible infección por VIH-1.

7.0 MATERIALES Y MÉTODOS.

7.1 DETERMINACIÓN DE PUREZA DEL ANTÍGENO DE VIH-1.

El antígeno de VIH-1 (Organon Teknika) utilizado es lisado viral derivado de la línea celular H9/HTLV-III infectada con el VIH-1. Purificado por sedimentación en gradiente de sacarosa y ultracentrifugación; Inactivado por disrupción en detergentes y altas concentraciones de sales. Se comprobó su inactivación por ensayos de transcriptasa reversa y cultivo en células. La concentración del lisado viral es de 1 mg/mL.

Se realizó un ensayo de electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), para determinar la presencia de las proteínas del virus (antígeno).

7.2 PREPARACIÓN DEL ANTÍGENO VIH-1 PARA LA INMUNIZACIÓN.

Se preparó el antígeno de VIH-1 con adyuvante completo de Freund en proporción 1:10 y a una concentración final de 0.1mg/mL de proteína del lisado viral, se homogenizó perfectamente con vortex, se realizaron alícuotas de 1 mL. mismas que se congelaron a -20°C hasta el momento de su uso.

Se preparó otra mezcla utilizando solución salina isotónica estéril (SSI) en proporción de 1:5 y concentración final de 0.2 mg/mL. Se realizó el mismo procedimiento de homogenización y congelación.

Una mezcla más se preparó utilizando adyuvante incompleto de Freund y concentración final de 0.1mg/mL, y con los mismos procedimientos.

7.3 CUADRO DE INMUNIZACIÓN.

Se inmunizaron dos conejos Nueva Zelanda adultos-jóvenes, utilizando el siguiente esquema de inmunización:

DÍAS	INMUNIZACIÓN	DOSIS APLICADA	VÍA DE ADMÓN.
0	1a	100µg	subcutánea con adyuvante completo de Freund.
15	2a	0.50µg	endovenosa con SSI estéril.
25	3a	0.50µg	endovenosa con SSI estéril.
35	4a	0.75µg	subcutánea con adyuvante incompleto de Freund.

7.4 OBTENCIÓN DE SUERO DURANTE LA INMUNIZACIÓN.

Se obtuvo suero de los conejos al inicio y antes de cada inmunización para monitorear la presencia de anticuerpos anti-VIH-1 y de acuerdo al siguiente cuadro:

toma de muestra	tiempo(días)	mL. de suero
basal	0	1
primera	15	1
segunda	25	1
tercera	35	1
cuarta	50	45

7.4.1 Obtención de suero a partir de sangre total.

- Obtener la sangre por la vena marginal de la oreja ó punción cardíaca, dejar coagular en refrigeración para formación y retracción del coágulo.
- Separar el coágulo formado de las paredes del tubo, utilizando un aplicador de madera.
- Centrifugar a 1500 g por 5 min.
- Separar el suero del paquete celular utilizando una pipeta Pasteur y aspirando suavemente.
- Alícuotar el suero obtenido en fracciones de 0.5 y 4 mL. Congelar de -20°C a -70°C. Bajo éstas condiciones puede ser conservado por períodos mayores a 6 meses.

7.5 DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-VIH-1 EN CONEJOS DURANTE EL ESQUEMA DE INMUNIZACIÓN POR INMUNO-BLOT.

La muestra basal de suero de los conejos fue tomada con objeto de conocer si existía algún anticuerpo contra alguna proteína de VIH-1 utilizando el método de inmuno-blot. Asimismo, las muestras de suero de cada etapa de la inmunización, fue probada para monitorear la producción de anticuerpos anti-VIH-1 por el mismo método.

7.5.1 Método de inmuno-blot. (Organón-Teknika).

A)-El ensayo consta de tiras de nitrocelulosa con las proteínas estructurales del VIH-1. Colocar las tiras con el VIH-1, en los pozos de la placa y humedecer en 2.5 mL de solución amortiguadora de fosfatos (SAF) por 30 min con agitación.

B)- descartar por aspiración el SAF.

C)- Adicionar 2 mL de solución de bloqueo(leche descremada al 5% en SAF) a cada tira, dejar de 5 a 10 min con agitación, en cuarto frío. Utilizar 0.3 gr de leche en 6 mL de SAF por cada tira utilizada.

- D)- colocar 20 μ L de muestra (suero) por cada 2 mL de solución de bloqueo; dilución de suero 1:100.
- E)- Descartar por aspiración la solución de bloqueo y agregar a las tiras la muestra diluida 1:100.
- F)- Agitar en cuarto frío durante toda la noche para la reacción Ag-Ac.
- G)- Eliminar los excesos de muestra agregando 5 mL de SAF y agitando por 5 min. repetir 3 veces.
- H)- Preparar el conjugado anti-conejo-peroxidasa diluido 1:500 en SAF.
- I)- Revelar agregando α -naftol y H_2O_2 como sustrato, para detectar la reacción Ag-Ac.

7.6 TITULACIÓN DE SUERO HIPERINMUNE DE CONEJO ANTI-VIH-1 POR ELISA.

El suero hiperinmune contra el VIH-1 obtenido de ambos conejos se tituló por el método de ELISA, utilizando microplacas sensibilizadas con recombinante antigénico de VIH-1 que principalmente contiene gp120, gp41 y p24.

7.6.1 Titulación de sueros. ELISA.

- A)- Lavar las microplacas sensibilizadas con antígeno recombinante de VIH-1 con SAF.
- B)- Colocar en cada pozo 150 μ L de albúmina al 1% en SAF para bloquear los sitios inespecíficos e incubar por 30 min a 37°C.
- C)- Lavar 1 vez con SAF.
- D)- Adicionar a cada pozo 100 μ L de SAF-albúmina al 0.1%.
- E)- Agregar 25 μ L de suero o solución de anticuerpos al primer pozo y homogenizar con micropipeta, tomar 25 μ L de ese pozo y pasar al siguiente pozo y homogenizar; realizar lo mismo hasta el último pozo en el que se descarta los 25 μ L.
- F)- Aplicar suero humano de paciente positivo a VIH-1 como control positivo y suero de paciente seronegativo como control negativo. Realizar por duplicado.
- G)- Incubar a 37°C por 60 min.
- H)- Lavar 3-5 veces con SAF.

- I)- Colocar en cada pozo 100 μ L de conjugado anti-conejo-peroxidasa diluido 1:500 en SAF-albúmina 0.1% para las muestras de conejo y anti-humano-peroxidasa diluido 1:1000 en SAF-albúmina al 0.1% para los controles.
- J)- Incubar a 37°C por 60 min.
- K)- Lavar 3 veces con SAF-tween 20 al 0.05%.
- L)- Preparar el sustrato OPD, a 5.4 mg de OPD y disolverlo en 10 mL de solución amortiguadora de citratos (SAC) pH 5.5, agregar 6 μ L de H₂O₂ al 30%; preparar el sustrato antes de ser aplicado.
- M)- Agregar 100 μ L de solución de sustrato a cada pozo. Incubar 5 min.
- N)- Detener la reacción con H₂SO₄ 3M y leer absorbancia a 492nm.
- O)- Calcular el título de anticuerpos en la gráfica absorbancia contra logaritmo de la dilución.

7.7 PURIFICACIÓN DE LA FRACCIÓN IgG DEL SUERO, POR PRECIPITACIÓN CON SULFATO DE AMONIO Y CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD CON PROTEÍNA A DE *Staphylococcus aureus*.

Para la obtención de la fracción de anticuerpos IgG del suero hiperinmune anti-VIH-1, se utiliza la precipitación de inmunoglobulinas con una solución saturada de sulfato de amonio(SAS):

7.7.1 Precipitación de IgG en el suero:

- A)- Agregar a 10 mL de suero total una solución saturada al 100% de (NH₄)₂SO₄ hasta una concentración de 45% V/V. Incorporar lentamente y con agitación. Agitar por toda la noche para asegurar la precipitación de las inmunoglobulinas.
- B)- Centrifugar a 12,000 g por 30 min a 4°C.
- C)- Resuspender el sedimento en un volumen mínimo de SSI.
- D)- Dializar contra una solución de SSI 4 a 5 veces, en 4 volúmenes de la muestra, utilizando una membrana de poro 12000-14000.
- E)- Determinar la concentración de proteínas totales del dializado por el método de Bradford.

7.7.2 Método de Bradford para la cuantificación de proteínas totales.

- A)- Utilizar una solución de azul de Coomassie. Disolver 5 mg de azul de Coomassie brillante R-250 (BioRad), en 2.5 mL de alcohol etílico al 96%. Adicionar 5 mL de ácido fosfórico al 85%, y aforar a 50 mL con agua destilada. Filtrar con papel filtro Whatman No. 1.
- B)- Preparar antes de usar y guardar protegido de la luz.
- C)- Preparar concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina de 100, 75, 50, 25 μg en 100 μL de agua destilada para la curva estándar.
- D)- Adicionar 5 mL de la solución de Coomassie a 100 μL de la muestra estándar o la muestra problema. La mezcla debe estar protegida de la luz.
- E)- Leer absorbancia a 595 nm. La intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de proteínas.
- F)- Calcular la concentración de proteínas en la gráfica concentración de proteínas vs. absorbancia.

7.7.3 Cromatografía de afinidad con proteína A.

Una vez obtenida nuestra solución proteica de inmunoglobulinas, se purifica la fracción IgG por cromatografía de afinidad con proteína A de *Staphylococcus aureus* utilizando una columna Afigel-proteína A-agarosa.

La proteína A de *Staphylococcus aureus* tiene la propiedad de unirse con alta especificidad a la región Fc de la inmunoglobulina G. Se encuentra unida a esferas de agarosa por enlaces amida estables, este enlace químico más la estabilidad de la proteína A nativa, da como resultado resistencia a agentes desnaturizantes.

Los enlaces proteína A-IgG son débiles puentes de hidrógeno, al cambiar el pH se liberan las IgG de las proteínas, debido a que la reacción es reversible.

7.7.3.1 Procedimiento de cromatografía de afinidad:

A)- Lavar la columna con SAF pH 8.0, para eliminar el buffer de conservación con azida de sodio.

B)- La estabilización y lavado de la columna se realizó con buffer de fosfatos a pH de 8.0 hasta obtener fracciones con densidad óptica de cero a una longitud de onda de 280nm

C)- Agregar a la columna la muestra con anticuerpos e incubar por 2 horas.

D)- Lavar con SAF pH 8.0 hasta absorbancia de cero a 280 nm. En este punto se eliminan proteínas no IgG.

E)- Eluir con un buffer de citrato de sodio pH 3, en fracciones de 1 mL; éstas fracciones son recibidas y neutralizadas con 50 µL de tris-base 2M.

F)- Leer absorbancia a 280 nm.

G)- Recuperar las fracciones con mayor absorbancia y dializar contra SAF pH 7.3 por tener la mayor concentración de IgG.

7.8 CARACTERIZACIÓN Y TITULACIÓN DE LA FRACCIÓN IgG PURIFICADA.

Se determina la concentración final de proteínas totales en la fracción de anticuerpos IgG purificados por el método de Bradford; se titula por el método de ELISA descrito anteriormente, y se caracteriza los anticuerpos IgG contra las diferentes proteínas de VIH-1 por inmuno-blot.

7.9 MARCAJE DE ANTICUERPOS IgG ANTI-VIH-1 A ISOTIOCIANATO DE FLUORESCÉINA.

7.9.1 Unión de anticuerpos con FITC.

Los anticuerpos se unen a la molécula de isotiocianato de fluoresceína (FITC) por enlaces del grupo amino libre (principalmente en los aminoácidos lisina) y parte del grupo $N=C=S$ de la moléculas de FITC; por enlaces covalentes.

7.9.2 Procedimiento de marcaje:

A)- Dializar 1 mg del anticuerpo purificado en 500 mL de solución amortiguadora de boratos (SAB) a 4°C; realizando 2 a 3 cambios por 2 días. Generalmente 5 mL de muestra se dializan con 500 mL de SAB.

B)- Determinar concentración de anticuerpos en el espectrofotómetro a 280 nm ó por Bradford.

$$\text{Conc. (mg/mL)} = \text{ABS}(280\text{nm}) \times 0.74 \times \text{factor de dilución.}$$

C)- Adicionar 20 µL de Isotiocianato de fluoresceína en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración de 5 mg/mL, por cada mg de anticuerpos. La solución con DMSO debe ser preparada antes de usar y en condiciones anhidras. Incubar toda la noche a 4°C.

D)- Dializar en 500 mL de solución de dializado, a 4°C con 3 cambios por 2 días.

E)- Evitar la exposición a la luz.

7.10 PURIFICACIÓN DEL CONJUGADO IgG-FITC POR FILTRACIÓN EN GEL.

Una vez obtenida la fracción IgG conjugada a FITC, purificar en una columna cromatográfica de gel sephadex G-25 de filtración, para separar los anticuerpos conjugados a FITC de los no conjugados y del FITC libre.

7.10.1 Procedimiento de purificación:

A)- Hidratar el gel durante 4 h a temperatura ambiente, no se debe usar agitador magnético.

B)- Después de la hidratación, decantar la mitad del sobrenadante y cerrar la parte extrema de la columna, misma que debe estar nivelada verticalmente, utilizando un soporte universal.

C)- Agregar buffer para ocupar el 20 % de la columna.

D)- Lentamente agregar el gel por las paredes sin formar burbujas, dejar sedimentar el gel y agregar solución amortiguadora, 2 veces el volumen de la columna. La solución no debe bajar del nivel del gel.

E)- Colocar la muestra problema, dejar que sea absorbido por el gel y antes de alcanzar el nivel del gel, agregar solución de elución y coleccionar en fracciones de 1 mL. Se recomienda un flujo de elución de 1 gota por minuto.

F)- Leer absorbancia a 280 nm y a 492nm. Determinar las fracciones anticuerpo-FITC.

7.11 DETERMINACIÓN DEL GRADO DE UNIÓN IgG/FITC.

A)- Para determinar el grado de marcado FITC-Ac, se diluye la muestra con buffer de diálisis hasta una absorbancia <2.0.

B)- Se determina ABS a 280nm y ABS a 492 nm.

C)- Se calcula concentración proteica:

$$\text{proteína(mg/mL)} = \frac{\text{ABS}_{280\text{nm}} - (\text{ABS}_{492\text{nm}} \times 0.35)}{1.4}$$

Donde 1.4 es recíproco de FITC-conjugado coeficiente molar.

E)- Moles de proteína:

$$\text{mol} = \frac{\text{proteína mg/mL}}{1.5 \times 10^5}$$

$$\text{FITC(mol)} = \frac{\text{ABS } 492 \text{ nm}}{0.69 \times 10^5}$$

Donde 1.5×10^5 = mol peso de inmunoglobulina.
y 0.69×10^5 = mol de FITC.

F)- Determinar grado fluorocromo/proteína (F/P):

$$F/P = \frac{\text{mol FITC}}{\text{mol proteína}}$$

F/P de 1:5-6 es el resultado óptimo.

7.12 CO-CULTIVO DE CÉLULAS T.

En un co-cultivo poblaciones de linfocitos de pacientes y linfocitos de un donador normal seronegativo HIV son estimulados mitogénicamente (independientemente) y después se juntan.

A)- Aislar la fracción de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de pacientes y de donadores seronegativos utilizando gradiente de Ficoll-Hypaque.

B)- Inocular 1×10^6 células en medio RPMI completo, suplementado con $1 \mu\text{g/mL}$ de fitohemaglutinina.

C)-Células mononucleares de sangre periférica del donador normal de HIV seronegativo son estimuladas de la misma manera. Este cultivo de linfocitos requiere ser mantenido con interleucina-2.

D)- Incubar los cultivos a 37°C en atmósfera de 5% de CO_2 , en una incubadora con 85% de humedad.

E)-Tomar muestras de sobrenadantes de cultivo y células, a intervalos de 4 días. Al tiempo que se adicionan nuevas células de donador seronegativo estimuladas y medio de cultivo fresco.

F)- El pico de expresión de virus en los co-cultivos como en cultivos primarios, usualmente ocurre entre los días 12 y 21. En algunos casos, sin embargo, el pico ocurre antes del día 12, por esta razón, es importante monitorear apropiadamente los sobrenadantes de cultivo para la detección temprana de la expresión viral.

G)- Las células que se tomaron a diferentes tiempos son procesadas para ensayo de inmunofluorescencia directa.

7.12.1 Aislamiento de linfocitos T.

A)- Colocar en un tubo para centrifuga, 3 mL solución de Ficoll-Hypaque (Medio LSM, Organón Teknika), mas 9 mL de la sangre del paciente heparinizada.

B)- Centrifugar a 650 g por 30 minutos.

C)- Descartar el sobrenadante con el objeto de eliminar la mayor cantidad posible de plaquetas.

E)- Colectar la interfase, donde se encuentran los linfocitos T, transfiriéndolos en otro tubo estéril.

F)- Lavar los linfocitos T recuperados 3 veces con 45 mL SAF a 350 g durante 10 minutos; con el objeto de eliminar el Ficoll.

G)- Contar las células en cámara de Newbauer y ajustar la concentración de acuerdo al método de inmunofluorescencia. Realizar la cuenta en los 4 cuadrantes de las esquinas.

$$\text{Células/mL} = \frac{\text{\# células totales}}{\text{\# cuadrantes}} \times \text{factor dilución} \times 10^4$$

Donde: 10^4 es considerando el volumen de los cuadrantes.

7.13 INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA.

Luminiscencia es la emisión espontánea de luz, que ocurre durante el tiempo, en que las moléculas regresan a un nivel de energía menor después del estado de excitación. Cuando esta reversión ocurre a una velocidad máxima de 10^{-8} segs. después de la excitación, se llama fluorescencia. Si la reversión dura más de 10^{-8} se llama fosforescencia.

Las moléculas de anticuerpo se conjugan químicamente a los fluorocromos, sin destruir su especificidad inmunológica. Los colorantes empleados para su conjugación son: isocianato de fluoresceína (ICF), isotiocianato de fluoresceína (ICTF), derivados de rodamina, cloruro de 1-dimetilaminonaftaleno sulfónico (DANSC).

La fluorescencia se utiliza en ensayos inmunológicos para hacer evidente la reacción Ag-Ac en apoyo al diagnóstico en la búsqueda de anticuerpos contra antígenos de numerosos microorganismos y en infecciones y/o enfermedades.

7.13.1 Método directo.

En este método el conjugado se aplica diluido sobre el antígeno y no se utiliza un anticuerpo secundario marcado con el fluorocromo, si no directamente.

Ventajas.

A)- Se emplea un solo reactivo de tinción.

B)- Una vez que el conjugado ha sido titulado y evaluado, las reacciones requieren un mínimo de controles para establecer la especificidad.

7.13.2 Ensayo en laminillas.

Preparación de las laminillas.

A)- Lavar las células 2 veces con SAF.

B)- Suspender las células a ensayar a concentración de 2×10^6 /mL en SAF.

C)- Colocar 10 ó 20µL de las siguientes suspensiones de células en las laminillas.

- Células a ensayar.

- Control positivo. Células infectadas con VIH-1.

- Control negativo. Células libres de VIH-1.

D)- Secar con aire a temperatura de 4°C. Fijar las células, sumergiendo las laminillas en acetona o metanol a 4°C por 10 min. Lavar con agua destilada para eliminar las sales de SAF. La laminilla puede guardarse a -20°C ó tratarse directamente.

E)- Bloquear con gelatina o albúmina sérica bovina al 1% en SAF.

F)- Preparar el conjugado IgG-FITC anti-VIH-1 a la dilución óptima probada. (Este reactivo debe estar a -20°C evitando exposición a la luz), Adicionar azul de Evans al 1% diluido en proporción 1:100. Adicionar 100 µL de conjugado IgG-FITC anti-VIH-1 en cada laminilla.

G)- Incubar de 30-45 min. a 37°C en cámara húmeda y oscuridad.

H)- Lavar 5 veces con SAF por 5 min con agitación, para remover el exceso de conjugado; concluir el lavado con agua destilada 2 veces. Dejar secar con aire las laminillas.

I)- Adicionar una gota de fluido de montaje sobre la superficie de la laminilla y colocar un cubreobjetos.

J)- Refrigerar a 4°C en la oscuridad o leer inmediatamente utilizando un microscopio de fluorescencia.

K)- Leer con objetivos 40-100 X. Las células infectadas o positivas aparecen con fluorescencia amarillo-verde; las células no infectadas o negativas aparecen de color rojo.

L)- Determinar el porcentaje de células positivas por evaluación de 100 o 200 células, o por ciento de células positivas por campo.

Consideraciones del ensayo:

A)- Dilución óptima de IgG-FITC.

B)- Comparar células positivas y negativas en una mezcla.

C)- Hay mayor sensibilidad si se incuban las laminillas a 4°C toda la noche, porque optimiza la unión Ag-Ac.

7.13.3 Estandarización del ensayo de inmunofluorescencia con líneas celulares.

Una vez obtenida la fracción IgG anti-VIH-1 conjugada a isotiocianato de fluoresceína se intenta estandarizar el ensayo de Inmunofluorescencia directa. La fluorescencia es un método utilizado para determinar el número de células productivamente infectadas con virus.

Dentro de las características de destacar son que el ensayo no es caro, es semicuantitativo y se puede hacer con células fijas o células vivas. El uso de células fijadas tiene la ventaja principal de que el virus es inactivado por el procedimiento de fijación. El ensayo de células vivas es usado cuando se trabaja con antígenos lábiles que pueden perderse durante la fijación o cuando se emplea el citómetro de flujo.

Para el ensayo con VIH-1, se realiza el ensayo con células fijas, por que el método de fijación no afecta las partículas antigénicas y por seguridad del operador.

Para la estandarización del ensayo de inmunofluorescencia se utilizan líneas celulares de linfocitos, infectadas y no infectadas con VIH-1 en diferentes proporciones.

A)- Cultivar y crecer las líneas celulares en medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal de bovino al 10%:

U937 células sin infectar con VIH-1. Control negativo.

IIIB/MOLT células infectadas con VIH-1. Control positivo.

La línea celular U937 es derivada de células malignas de linfoma histiocítico, que expresa la mayor parte de características estructurales de la línea de monocitos-macrófagos.

La línea celular IIIB/MOLT es derivada de una línea de células T CD4+ de humano. Las células representan una clona de células T con VIH-1/ (A3.01); es una clona infectada que produce constantemente bajos niveles de transcriptasa reversa en sobrenadante.

B)- Adicionar el medio de cultivo (RPMI 1640 + 10% Suero fetal bovino) a las células en crecimiento.

C)- Incubar por 24h a 37°C, 5% de CO₂ y 85% de humedad.

D)- Ajustar la concentración de células a una concentración de 1x10⁵ céls/mL.

Rotular los tubos y colocar el número de células de acuerdo a la siguiente tabla:

7 13.3 1 Determinación de la concentración óptima de células en el ensayo de IFA.

Tubo	# células IIIB/Molt	vol (µL) 1x10 ⁵ C/mL	dil 1:10 IIIB/Molt	# Células U937	vol.(µL) 1x10 ⁵ C/mL
1	0	-	0 µL	200000	2000
2	500	0	50 µL	199500	1995
3	2,500	0	250	197500	1975
4	5,000	50	-	195000	1950
5	50,000	500	-	150000	1500
6	100000	1000	-	100000	1000
7	200000	2000	-	0	0

A)- Centrifugar a 1000 g a 4°C por 15 min.

B)- Lavar 2 veces en SAF y resuspender en un volumen mínimo de SAF (100 µL).

C)- Continuar con el proceso de inmunofluorescencia directa utilizando 20 µL de cada muestra de los tubos 1-7, como se mencionó anteriormente.

8.0 RESULTADOS.

8.1 DETERMINACIÓN DE PUREZA DEL ANTÍGENO DE VIH-1.

VIH	PM
	200
gp120	116
	97.4
	66
gp66	
gp55	
gp51	45
gp41	
p31	31
p24	21.5
p17	
	14.5

Figura 3. La electroforesis realizada para el lisado viral de VIH-1, muestra la presencia únicamente de las proteínas estructurales del virus, sin mostrar presencia de ninguna otra proteína.

8.2 OBTENCIÓN DE SUERO DURANTE LA INMUNIZACIÓN.

inmunización	tiempo (días)	mL. de suero	
		conejo 1	conejo 2
basal	0	1	1
1a	15	1	1
2a	10	1	1
3a	10	1	1
Final	15	50	55

Las muestras de sangre durante el período de inmunización se tomaron en la vena marginal y al término de las inmunizaciones por punción cardíaca.

8.3 DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-VIH-1 DURANTE EL ESQUEMA DE INMUNIZACIÓN POR INMUNO-BLOT.

	Antígeno de VIH-1	
	conejo1	conejo 2
Inmunización basal	ninguno	ninguno
1a inm.	ninguno	ninguno
2a inm.	p17,p24	p17,p24,p51,p55,gp41
3a inm.	p17,p24	p17,p24,p31,p51,p55 gp41
4a inm.	p17,p24	p17,p24,p31,p51,p55 gp41

Figura 4.

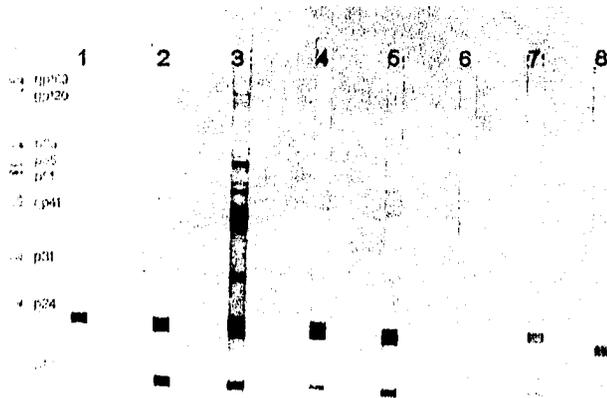


FIGURA 4.

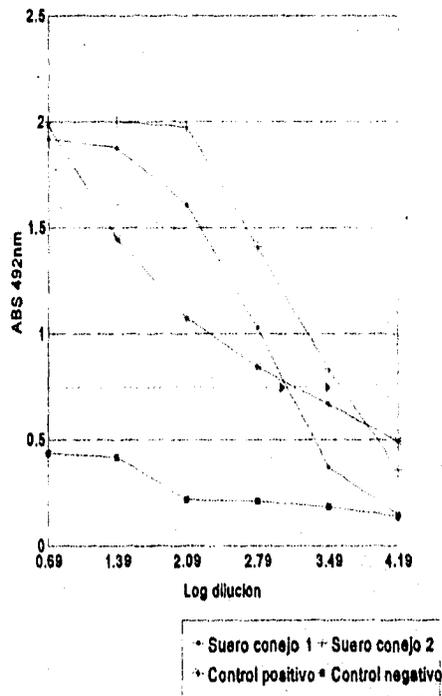
Ensayo de Inmuno-blot para las proteínas del VIH-1, con los sueros de los conejos 1 y 2.

1, 4. Muestra posterior a la 2a Inmunización. (Conejo 1, conejo 2). 2, 5. Muestra posterior a la 3a inmunización. (Conejo 1, conejo2). 3. Control positivo. 6. Control negativo. 7, 8. Muestra posterior a la 4a. inmunización. (Conejo 1, conejo 2).

8.4 TITULACIÓN DE SUERO HIPERINMUNE DE CONEJO ANTI-VIH-1 POR ELISA.

Titulación de suero hiperinmune al término del esquema de inmunización.

Ambos conejos presentaron una buena respuesta de anticuerpos anti-VIH-1 por ELISA, con títulos de 1:1500 Y 1:3000 respectivamente. Grafica 1.



GRAFICA 1.
Titulación de los sueros hiperinmunes
de conejo contra el VIH-1 por ELISA.

8.5 PURIFICACIÓN DE LA FRACCIÓN IgG DEL SUERO, POR PRECIPITACIÓN CON SULFATO DE AMONIO Y CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD CON PROTEINA A de *S aureus*.

8.5.1 Precipitación de Inmunoglobulinas.

Volumen inicial de suero	10 mL
volumen final solución proteica	10 mL

8.5.2 Curva estándar para la determinación y cuantificación de proteínas.

Se cuantificó proteínas precipitadas y del sobrenadante de precipitación.

µg de proteína	Abs. 598nm.
25	0.186
50	0.332
75	0.434
100	0.530
solución Ac's.	0.907
solución 1:5	0.483
sobrenadante	1.050
sobrenadante 1:5	0.903

Cálculo para la solución de Ac's 1:5.

$$\text{mg/mL} = 88\mu\text{g} \times 5 \times 10 = 4.4 \text{ mg/mL de proteína.}$$

donde: 5 factor de dilución.

10 para llevar a 1 mL.

sedimento 4.4 mg/mL de proteína total.

sobrenadante 9.64 mg/mL.

8.5.3 PURIFICACIÓN DE LA FRACCIÓN IgG ANTI-VIH-1 POR COLUMNA CROMATOGRÁFICA DE AFINIDAD CON PROTEÍNA A DE *Staphylococcus aureus*.

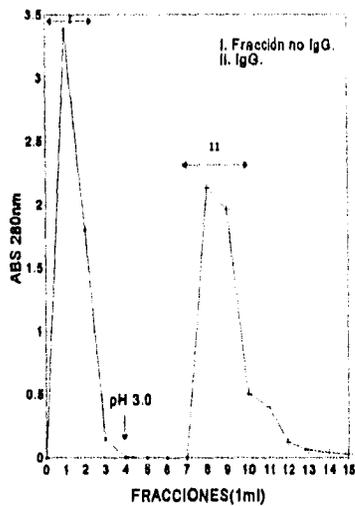
FRACCIÓN	VOL.(mL)	ABS.280nm
1	1	3.383
2	1	1.80
3	1	0.146
4	1	0.003
*5	1	0
6	1	0
7	1	0
8	1	2.132
9	1	1.965
10	1	0.505
11	1	0.398
12	1	0.124
13	1	0.064
14	1	0.040
15	1	0.029

Adicionando 2 mg/mL de proteínas en la columna; *cambio de SAF a SAC.

Las fracciones 8-11 fueron colectadas, y se dializaron; Obteniendo un volumen total de 7 mL.

El primer pico indica la estabilización y remoción de proteínas no adheridas a la columna (lavados) hasta obtener una absorbancia de cero, el segundo pico indica la porción donde se encuentra la mayor concentración de IgG totales adheridos a proteína A (eluido).

Grafica 2.



GRAFICA 2
Purificación de IgG anti-VIH1 en columna cromatografica
de afinidad algal-agarosa-proteina A de *S. aureus*.

8.5.4 Cuantificación de proteínas de la solución de IgG purificados.

Curva estándar.

µg de proteína/mL	abs. 598nm.
25	0.150
50	0.293
75	0.408
100	0.520
MUESTRA 18.33	0.110

Cálculo:

µg de anticuerpo/mL = $18.33 \times 10 = 180.33 \mu\text{g/mL}$.

Vol. final de 7 mL 1.28mg. Rendimiento 63%.

8.6 CARACTERIZACIÓN Y TITULACIÓN DE LA FRACCIÓN IgG PURIFICADA.

8.6.1 Detección de antígeno viral con IgG de conejo anti-VIH-1 por Inmuno-blot.

Del suero hiperinmune de conejo contra el VIH-1 se obtuvieron dos fracciones. En la primera fracción que no fue adsorbida en la columna con proteína A no presentó ninguna reactividad en contra de las proteínas del VIH-1 por Inmuno-blot. En el caso de la segunda fracción, corresponde a las IgG anti-VIH-1 en dilución 1:5, y las proteínas reconocidas fueron p24 y p17 de VIH-1. Figura 5.



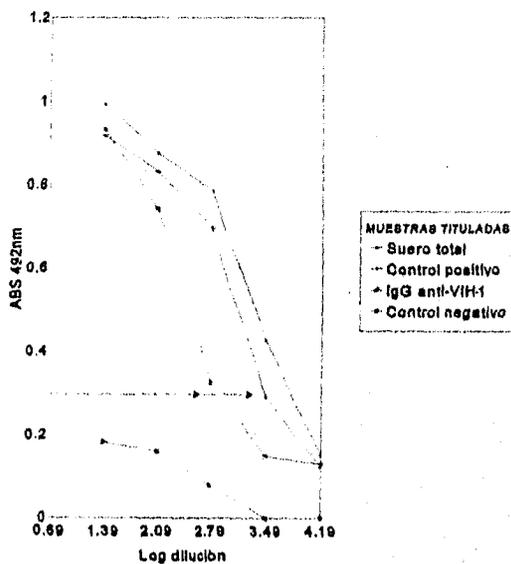
FIGURA 5.
Reactividad de la fracción IgG purificada contra las proteínas del VIH-1. (Conejo 1).
1. IgG vs VIH-1 purificada. 2. Control positivo. 3. Control negativo.

8.6.2 Titulación de los IgG anti-VIH-1 por ELISA.

Absorbancia 498 nm.

Log dilución	suero total	IgG anti-VIH-1	C+	C-
0.69	ND	ND	ND	ND
1.39	0.993	0.933	0.919	0.183
2.09	0.875	0.742	0.831	0.181
2.79	0.785	0.326	0.696	0.08
3.49	0.427	0.149	0.292	ND
4.19	0.151	0.131	0.13	ND

ND: No determinado. Grafica 3.



GRAFICA 3
TITULACIÓN DE LA FRACCIÓN IgG ANTI-VIH-1

TÍTULO DE LOS IgG ANTI-VIH-1.

Muestra	Título anti-VIH-1 (Log dilución)
IgG anti-VIH-1	3.0
suero total	3.4
control +	3.2
control -	<0.69

8.7 PURIFICACIÓN DEL CONJUGADO IgG-FITC ANTI-VIH-1 POR FILTRACIÓN EN GEL G25.

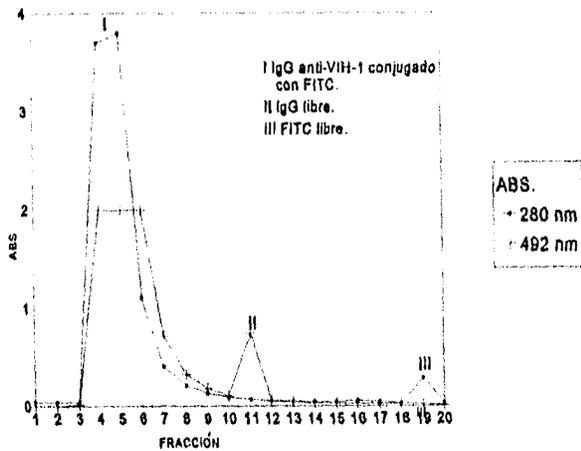
FRACCIÓN	vol. mL	ABS 280nm	ABS 492nm
1	0.5	0.040	0.001
2	1.0	0.041	0.001
3	1.5	0.038	0.012
4	2.0	3.701	ND
dil 1:100	ND	0.056	0.072
5	2.5	3.800	ND
dil 1:100	ND	0.098	0.180
6	3.0	1.122	ND
7	3.5	0.407	0.714
8	4.0	0.207	0.321
9	4.5	0.132	0.179
10	5.0	0.095	0.104
11	5.5	0.070	0.074
12	6.0	0.056	0.050
13	6.5	0.047	0.043
14	7.0	0.042	0.034
15	7.5	0.045	0.028
16	8.0	0.055	0.026
17	8.5	0.044	0.022
18	9.0	0.031	0.023
19	9.5	0.029	0.019
20	10.0	0.033	0.014

Se tomaron las fracciones 4, 5 y 6, se hace una poza y se calcula el grado de marcado FITC-proteína.

Grafica 4.

Vol de fracciones= 0.5 mL.

vel.de flujo = 1-2 gotas/min.



GRAFICA 4
 Purificación del conjugado IgG anti-VIH-1 con FITC por filtración en gel.

8.8 DETERMINACIÓN DEL GRADO DE UNIÓN IgG/FITC.

Se tomaron 10 μ L del conjugado, se diluyen 1:50 y se leen en espectrofotómetro.

ABS 280nm = 0.062

ABS 492nm = 0.125

Cálculo en la concentración de proteínas.

mg/mL de proteína = 0.651 mg/mL de proteína. Rendimiento 65.1%.

mol proteína = 4.34×10^{-6} moles de proteína.

Cálculo en la concentración de FITC.

mol FITC = 9.05×10^{-5} moles de FITC

Grado fluorocromo/proteína

F/P = 20.85

8.9 CO-CULTIVOS CON LINFOCITOS T DE PACIENTES.

El resultado de los ensayos de inmunofluorescencia para los co-cultivos fue de un 5-10 % de células positivas en el día 11 de iniciado el co-cultivo. A los 21 días aumento hasta un 35-40 % de células positivas.

El contorno de las células T de co-cultivo se presentan perfectamente fluorescentes por lo que se consideran muestras positivas; las células rojas son negativas. Figura 6.

8.10 RESULTADO DE LA ESTANDARIZACIÓN DEL ENSAYO DE INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA CON LÍNEAS CELULARES.

8.10.1 Condiciones finales de ensayos de fluorescencia.

- A)- Los linfocitos deben ser separados por gradiente de Ficoll-Hypaque.
- B)- Se fijan las células con metanol 4°C por 8-10 min.
- C)- Las laminillas se colocan a 4°C por toda la noche.
- D)- bloqueo de laminillas con Albúmina sérica bovina 3% por 30 min a 37°C.
- E)- dilución de conjugado 1:1000, en SAF-albúmina sérica bovina 0.1%.
- F)- Dilución de azul de Evans al 1% de 1:100.
- G)- Incubación con el conjugado de 30-45 min.

8.10.2. Resultado de IFA con las células IIB/MOLT-HIV-1 y U937.

Los ensayos de inmunofluorescencia con las líneas celulares en la estandarización de la técnica demuestran un 100% de células positivas en la línea celular infectada con VIH-1 IIB/MOLT y un 100% de células negativas para la línea celular U937 no infectada. Figuras 7 y 8.

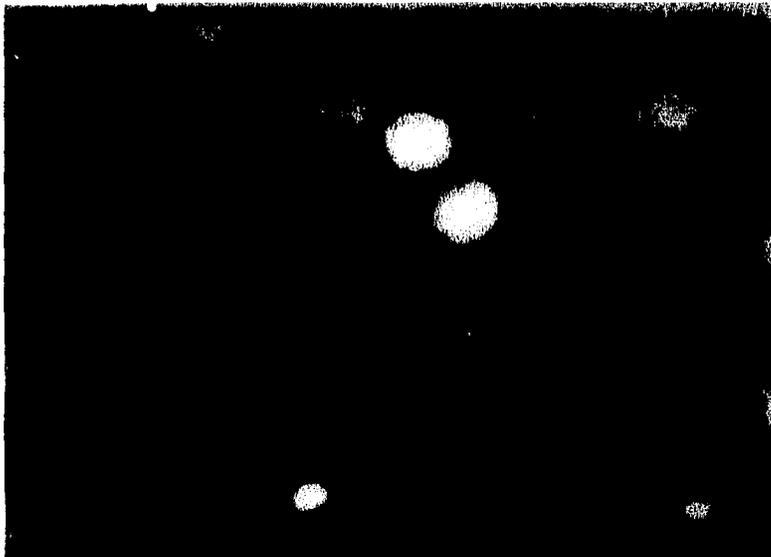


FIGURA 6. Inmunofluorescencia de co-cultivo de paciente con SIDA, detectado con anticuerpos fluorescentes contra VIH-1.

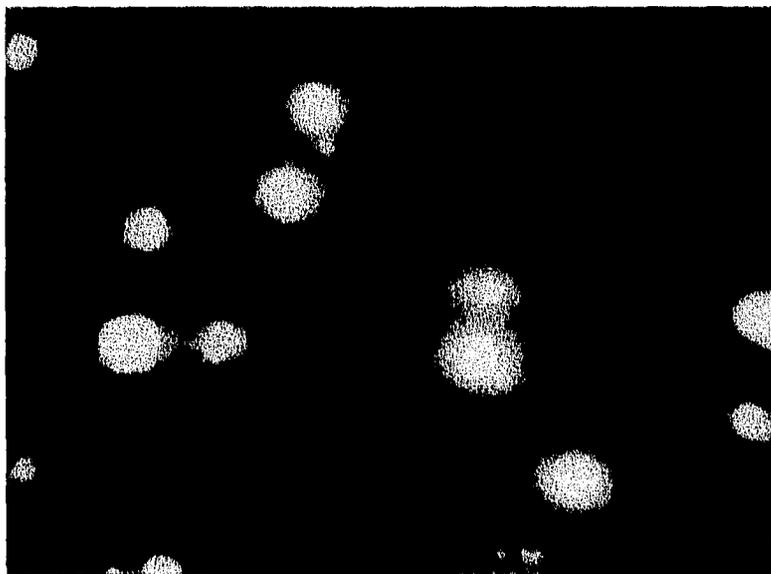


FIGURA 7. Inmunofluorescencia de células IIB/MOLT detectadas con anticuerpos fluorescentes contra VIH-1 (control positivo).

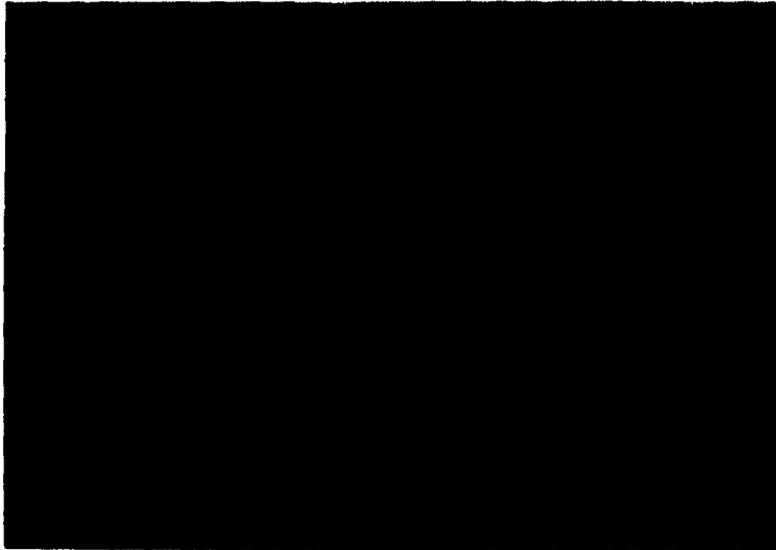


FIGURA 8. Inmunofluorescencia negativa de células U937 con anticuerpos fluorescentes contra VIH-1 (control negativo).

9.0 DISCUSIÓN.

Los títulos de anticuerpos anti-VIH-1 generados fueron de 1:1500 y 1:3000 por ELISA con el uso del antígeno de VIH-1, a una concentración de 1mg/mL, y 275 µg de proteínas totales, durante todo el esquema de inmunización. En el esquema de inmunización la primera dosis representa la mayor y posteriormente se aplicaron dosis de refuerzo con menor cantidad de antígeno; la respuesta de anticuerpos en los conejos se observó desde la segunda dosis aplicada, y se incrementó al completarse las siguientes inmunizaciones.

El reconocimiento de los sueros hiperinmunes a las diferentes proteínas virales, demuestra una predominancia de p17, p24 en el primer conejo; y de p17, p24, gp31, gp41, gp55; en el segundo conejo, considerando la ausencia de la glicoproteína gp160 debido a que son subunidades proteicas menores (gp41, gp120); y que la gp120 se detectó en menor concentración que las demás (figura 3); dado que el antígeno utilizado, fue un lisado viral de VIH-1, proveniente de un cultivo. Cabe señalar que en el análisis de este lisado no se detectaron proteínas provenientes de la línea celular humana H9/HTLVIII¹² (línea celular derivada de células T) en la cual fue cultivado el VIH-1, por lo que no se encontró reacción cruzada al enfrentar los anticuerpos con las células mononucleares de humano.

La proteína p24 es un importante marcador en la progresión de la enfermedad.^{3,17} Debido a la utilidad que esta proteína representa en el diagnóstico, se consideró el utilizar principalmente el antisuero obtenido, contra p24 y p17.

El co-cultivo es uno de los métodos más sensibles y confiables utilizados para aislar y determinar o verificar la infección de las células mononucleares con el VIH-1; en el se determina actividad de transcriptasa reversa y antígeno p24 en sobrenadante por ELISA, el co-cultivo representa un método lento por examinar muestras de hasta 30 días o en ocasiones mayor tiempo y relativamente caro por necesitar examinar un gran número de sobrenadantes.^{2,12,43}

Dada la necesidad de contar con nuevos métodos que permitan la detección temprana de virus o ag p24 de co-cultivos y la disminución de costos, se realizó la purificación de la fracción IgG anti-VIH-1, para optimizar los procesos para el marcaje con isotiocianato de fluoresceína y la estandarización de un ensayo de inmunofluorescencia. El rendimiento del conjugado que se obtuvo, fue de 10^3 y una concentración de 1 mg/mL de proteínas totales, para 40,000 células provenientes de pacientes infectados con VIH-1.

En el co-cultivo se toman sobrenadantes cada 3 días, hasta completar 28 días y se determina antígeno p24; se ha encontrado que a partir de la 2a semana de iniciado el co-cultivo algunas muestras pueden ser positivas, considerando positivo un co-cultivo mayor de 30 pg del antígeno p24.⁴³ Aunque algunos resultados pueden ser positivos hasta los 30 días de iniciado el co-cultivo o en ocasiones hasta 60 días.⁴³

En los ensayos de Inmunofluorescencia realizados, después de estandarizado el método, se determinó positividad de al menos una célula fluorescente en un ensayo, dado que el control negativo fue siempre del 100 % de células negativas. Se encontró que al término del día 11 después de iniciado el co-cultivo fue posible detectar en los casos positivos, de un 5 a 10 % de las células cultivadas; lo que anticipa la evaluación de un problema y se reduce el tiempo de 10 días de co-cultivo. Al compararse éstos resultados con el método de ELISA para la determinación de ag p24 que detecta de 30 pg en adelante, generalmente detectados a partir del día 21 de co-cultivo en el diagnóstico de la infección.⁴³⁻⁴⁴

En el día 21 se encontró de un 35 a un 40 % de células positivas a VIH-1 por tFA en las células cultivadas, lo que da un margen de seguridad en el resultado del co-cultivo. Observándose una correlación de 100 % en ELISA y los ensayos de tFA con el conjugado obtenido.

Se podría inferir un punto de corte para las células en el ensayo cercano al 1 % de células fluorescentes para dar como positiva la prueba.^{32,34,35}

Algunos estudios revelan que con la introducción de terapias antivirales, como en el caso de la zidovudina los niveles de antígeno p24 en pacientes ha disminuído, y asimismo la carga viral; en este sentido las muestras de pacientes infectados con VIH-1 que reciben terapias antivirales, se esperaría un co-cultivo con mayor tiempo y mayores costos.⁴⁶

A la fecha se realizan estudios que podrían recibir apoyo de la inmunofluorescencia, como son los realizados con células de sistema nervioso central (SNC) en recién nacidos, niños y adultos en los que se diagnostica e investiga la infección por VIH-1 y en los que se reporta la detección de antígeno p24 en sobrenadantes a los 57 días y en ocasiones hasta los 90 días de co-cultivo.^{47,48}

Algunos otros estudios de investigación revelan que cepas como la HIV-IIIB puede desarrollar in vitro la infección muy lentamente y otras como HIV-IADA puede producir incrementos progresivos de antígeno p24, como indicador del desarrollo de la infección en células hematopoyéticas; por lo que la detección de p24 puede ser mas lenta para algunos virus.⁴⁹

El conjugado obtenido puede ser utilizado como alternativa en la identificación de co-cultivos positivos en y como apoyo en la determinación de antígeno p24 en sobrenadante. Otros usos futuros como detección de p24 en muestras clínicas serán exploradas.

10.0 CONCLUSIONES.

1. La respuesta hiperinmune inducida en conejos se logró utilizando 275 µg de lisado viral de VIH-1, en un término de 7 semanas; obteniendo títulos por ELISA de 1:1500 a 1:3000.
2. Se obtuvo un rendimiento de Inmunoglobulina G purificada por cromatografía de afinidad con proteína A del 63%.
3. La Inmunoglobulina G purificada presentó un título final por ELISA de 1:1000, y reconoció las proteínas estructurales de VIH-1, exclusivamente p17 y p24.
4. Se obtuvo un rendimiento final de conjugado IgG-FITC anti-VIH-1 purificada por filtración en gel del 65.1% y un grado fluorocromo/proteína de 20.85.
5. Se logró obtener un ensayo de inmunofluorescencia en el co-cultivo para la detección de actividad biológica de VIH-1, de menor costo y tiempo; comparado con la determinación de p24 por ELISA reportado en bibliografía.

11.0 APENDICE.

Preparación de reactivos:

- Solución de dializado

0.1 M tris-Cl, pH 7.4

0.1 % P/V de azida de sodio (NaN_3).

0.2 M NaCl.

Ajustar pH a 7.4 con NaOH y guardar a 4°C.

H_2O desionizada

- Solución amortiguadora de boratos.

0.05 M de ácido bórico.

0.2 M NaCl.

ajustar a pH 9.2 con NaOH y guardar a 4°C.

Preparar este buffer 2 semanas antes de ser utilizado.

H_2O desionizada

- Solución amortiguadora de citratos.

Ácido cítrico 0.730g

Na_2HPO_4 1.180g

H_2O desionizada. 1litro.

- Solución saturada de sulfato de amonio(SAS).

Sulfato de amonio

H_2O desionizada

Disolver el sulfato de amonio hasta saturar por completo la solución. Calentar un poco para facilitar la disolución.

- Solución salina isotónica.(SSI).

NaCl 0.85%.

H₂O desionizada.

- Solución amortiguadora de fosfatos.(SAF)

Na₂HPO₄ 5.4 g

NaCl 16g

KH₂PO₄ 5.4 g

Kcl 0.4g

H₂O desionizada

12.0 BIBLIOGRAFIA

1. Cooper A; Imrie A; Penny R. Antibody response to Human Immunodeficiency Virus after primary infection. *J. Infect. Dis.* 1987;(155):1113-1118.
2. Barnett S; Levy J. *Manual of Clinical Microbiology*. Fifth edition, 1991 American Society for Microbiology.
3. Levy J. Pathogenesis of Human Immunodeficiency Virus infection. *Microb. Rev.* 1993;(57):183-289.
4. Gottlieb M; Schroff H; Schanker M. Pneumocystis carinii pneumonia among homosexual men: Evidence of a newly acquired cellular immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* 1981;(305):1425-1431.
5. Curran J; Jaffe H; Hardy A; Epidemiology of HIV infection and AIDS in the United States. *Science* 1988;(239):610-616.
6. Merson M. Slowing the spread of HIV: agenda for the 1990s. *Science* 1993;(260):1266-1268.
7. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE). *Boletín mensual de SIDA/ETS; México* 8,(1-5):2596-2673. Enero-mayo 1994.
8. Jaffe H; Dennis J; Selik R; Acquired Immunodeficiency Syndrome in the United States: The first 1000 cases. *J. Infect. Dis.* 1983;(148):339-345.

9. Barre SF; Nugeyre M; Dauguet C; Brun-V; Montagnier L. Isolation of a T-Lymphotropic retrovirus from a patient at risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). *Science* 1983;(220):868-871.
10. Gallo R; Sarin P; Gelmann P; Mann D; Popovic M. Isolation of Human T-cell leukemia virus in Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). *Science* 1983;(220):865-867.
11. Gallo R; Salahuddin M; Popovic G; Shearer M. Frequent detection and isolation of cytopathic retrovirus (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 1984;(224):500-502
12. Gallo R; Read E; Popovic M. Detection, Isolation, and continuous production of cytopathic retrovirus (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* 1983;(224):497-500.
13. Kaminsky L; Mchugh T; Stites D; Henle G. High prevalence of antibodies to AIDS-associated retrovirus (ARV) in AIDS and related conditions but not in other disease states. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1985;(82):5535-5539.
14. Coffin J; Levy H; Montagnier L; Teich N; Temin H; Toyoshima K. Human immunodeficiency virus. *Science* 1986;(232):697. (Letter).
15. Clavel F; Guetard F; Brun-Vezinet S; Chamaret M; Rey M. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 1986;(233):343-346.
16. Kalyanaraman S; Cabradilla C; Narayanan R; Braff E; Montagnier L. Antibodies to the core protein of lymphadenopathy associated virus (LAV) in patients with AIDS. *Science* 1984;(225):321-323.

ESTA TESTS TO BE
OF LA

17. McDougal J; Cort S; Kennedy C. Immunoassay for the detection and quantitation of infectious human retrovirus, lymphadenopathy associated virus (LAV). *J. Immunol. Meth.* 1985;(76):171-83.
18. Phair J; Wolinsky S. Diagnosis of infection with the human immunodeficiency virus. *J. Infect. Dis.* 1989;(159):320-323.
19. Gaines H; Sydow M; Albert J. Antibody response in primary human immunodeficiency virus infection. *Lancet.* 1987(8570):1249-1253.
20. Schindzielorz A; Huntington W. HIV-1 serology and AIDS testing: A practical approach to understanding. *South. Med. J.* 1989;1529-1533.
21. Girard M; Kiény M; Pinter A. Immunization of chimpanzees confers protection against challenge with human immunodeficiency virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1991;(88):542-546.
22. Johnston MI; Noe J; Killen J. Recent advances in AIDS vaccine research and development. *AIDS Res. Hum. Retrovirus.* 1994;(10supl2):317-323.
23. Fauci AS. The human immunodeficiency virus: Infectivity and mechanisms of pathogenesis. *Science* 1988;(239):617-622.
24. Kiény PM. Structure and regulation of the human AIDS virus; Special feature. *J Adq. Imm. Def. Synd.* 1990;(3):395-402.
- 25 Steffy K; Wong-Staal F. Genetic regulation of human immunodeficiency virus. *Microb. Rev.* 1991;(55):193-205.

26. Barré F; Thérèse M; Vilmer E; Gluckman J; Montagnier L. Selective tropism of Lymphadenopathy Associated virus(LAV) for helper-inducer T lymphocytes. *Science* 1984;(225):59-63.
27. Schnittman S; Lane H; Thompson L; Massari F; Fauci A. The reservoir for HIV-1 in human peripheral blood is a T cell that maintains expression of CD4. *Science* 1989;(245):305-308.
28. Gallo R; Gartner S; Markovits P; Popovic M. The role of mononuclear phagocytes in HTLV-III/LAV infection. *Science* 1986;(233):215-219.
29. Wolf F; Lange J; Houweling J. Numbers of CD4+ cells and the levels of core antigens of and antibodies to the human immunodeficiency as predictors of AIDS among seropositive homosexual men. *J. Infect. Dis.* 1988;(158):615-622.
30. David Ho; Moudgh T; Alam M. Quantitation of human immunodeficiency virus type 1 in the blood of infected persons. *N. Engl. J. Med.* 1989;(321):1621-1625.
31. Coligan J; Krusbeek A; Margulies DH; Shevach E; Strober W. *Current Protocols in Immunology*. National Institutes of Health. 1992;vol1-2:caps 2,5,12.
32. Cory J; Ohlsson B; Brock E; Sheaffer N. Detection of human immunodeficiency virus-infected lymphoid cells at low frequency by flow cytometry. *J. Immunol. Meth.* 1987;(105):71-78.
33. Scillian J; McHugh T; Busch M; Tam M. Early detection of antibodies against rDNA-produced HIV proteins with a flow cytometric assay. *Blood* 1989;(73):2041-2048.

34. McSarry J; Costantino R; Lehman J. Detection and quantitation of human immunodeficiency virus-infected peripheral blood mononuclear cells by flow cytometry. *J. Clin. Microb.* 1990;(28):724-733.
35. Re M; Furlini G; Gibellini D. Quantification of human immunodeficiency virus type 1-infected mononuclear cells in peripheral blood of seropositive subjects by flow cytometry. *J. Clin. Microb.* 1994;(32):2152-2157.
36. Harper M; Marselle L; Gallo R. Detection of lymphocytes expressing human T-lymphotropic virus type III in lymph nodes and peripheral blood from infected individuals by *in situ* hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1986;(83):772-776.
37. Dunn K; Maxfield F. Use of fluorescence microscopy in the study of receptor-mediated endocytosis. *Noninvasive Techniques in Cell Biology*. 1990:153-176. Chapter 7; Wiley-Liss, Inc.
38. Zaki S; Markham P; Gallo R. Isolation of infectious human T-cell leukemia/lymphotropic virus type III from patients with Acquired Immunodeficiency Syndrome or AIDS-related complex (ARC) and from healthy carriers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1985;(82):5530-5534.
39. Morilla Antonio; Bautista C.
Manual de Inmunología. México 1986 pp.98-119.
40. Centers for Disease Control(CDC).
The CDC AIDS definition. USA 1992.
41. Pierce; *Practical aspects of doing chemistry on antibodies. Catalog and Handbook.*
Pierce Chemical. USA 1994.

42. Blumberg R; Sandstrom E; Paradis T. Detection of human T-cell lymphotropic virus type III-related antigens and anti-human T-cell lymphotropic virus type III antibodies by anticomplementary immunofluorescence. *J. Clin. Microb.* 1986;23:1072-77
43. AIDS Clinical Trials Group(ACTG). *Virology Manual for HIV Laboratories. Version 2.0.* USA Enero 1993.
44. Dimitrov DH, Melnick JL, Hollinger FB. Microculture assay for isolation of human immunodeficiency virus type 1 and for titration of infected peripheral blood mononuclear cells. *J Clin Microbiol* 28:734-737, 1990.
45. Roitt I; Brostoff J; Male D.
Inmunología. 1991 España. 2a edición Salvat.
46. Molina J; Ferchal F; Cherret S; Barateau V; Poiret C. Quantification of HIV-1 virus load under zidovudine therapy in patients with symptomatic HIV infection: relation to disease progression. *AIDS* 1994;(8):27-33.
47. Achim C; Miners D; Burrola P; Martin F; Wiley C. In vivo model of HIV infection of the human brain. *Dev. Neurosci.* 1993;(6):423-432.
48. Hatch W; Pousada E; Losev L; Lyman W. Neural cell targets of human immunodeficiency virus type 1 in human fetal organotypic cultures. *AIDS Res. Hum. Retrov.* 1994;(12):1597-1607.
49. Schwarts G; Kessler S; Rotchwell S; Burrell L; Reid T. Inhibitory effects of HIV-1-infected stromal cell layers on the production of myeloid progenitor cells in human long-term bone marrow cultures. *Exp. Haematol.* 1994;(13):1288-1296.