



---

---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE COMPUESTOS GLICOCONJUGADOS  
DE LA LECHE HUMANA CON POTENCIAL MICROBICIDA PARA EL VIRUS  
DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1 (VIH-1)**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**ITZIA HACIBE ACOSTA BLANCO**



**MÉXICO, D.F.**

**AÑO 2015**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **JURADO**

### **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: José Pedraza Chaverri.

**VOCAL:** Profesor: Rocío Gabriela Tirado Mendoza.

**SECRETARIO:** Profesor: Mónica Viveros Rogel.

**1er. SUPLENTE:** Profesor: Perla Deyanira Maldonado Jiménez.

**2° SUPLENTE:** Profesor: Elizabeth Gómez Pérez.

### **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**DEPARTAMENTO DE INFECTOLOGÍA DEL INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN “SALVADOR ZUBIRÁN”.**

### **ASESOR DEL TEMA:**

**Dra. Mónica Viveros Rogel**

### **SUSTENTANTE:**

**Itzia Hacibe Acosta Blanco**

## ÍNDICE

<b>1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1 Planteamiento del problema.....	1
1.2 Objetivos .....	2
1.3 Hipótesis .....	3
<b>2. Marco teórico.....</b>	<b>4</b>
2.1 Características y clasificación de los glicoconjugados .....	4
2.2 Glicoconjugados en la leche humana.....	6
2.2.1 La leche humana y sus componentes principales.....	7
2.2.2 Función e importancia de los glicoconjugados de la leche humana .....	8
2.3 Virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) .....	12
2.3.1 Epidemiología de la infección por VIH-1 en México y en el mundo .....	12
2.3.2 Clasificación, estructura y genoma viral .....	14
2.3.3 Tropismo del VIH-1 .....	17
2.3.4 Entrada del VIH-1 a la célula blanco .....	17
2.3.5 Vías de transmisión del VIH-1.....	18
2.3.6 La leche humana como vector de transmisión del VIH-1.....	19
2.3.7 Glicoconjugados de la leche humana con actividad anti-VIH-1 .....	21
2.4 Técnicas de cromatografía utilizadas para la separación de especies de glicoconjugados de la leche humana .....	22
2.4.1 Cromatografía en columna de ácido silícico .....	23
2.4.2 Cromatografía en capa fina (CCF).....	24
<b>3. Materiales.....</b>	<b>25</b>
3.1 Material biológico .....	25
3.1.1 Leche humana .....	25
3.1.2 Estándares de glicoconjugados .....	25
3.1.3 Líneas celulares humanas .....	25
3.1.4 Cepas de referencia del VIH-1 .....	26
3.2 Medios de cultivo.....	27
3.3 Material de cultivo, reactivos, equipos e instrumentos para laboratorio .....	27
<b>4. Metodología .....</b>	<b>28</b>

4.1 Diagrama de trabajo.....	28
4.2 Extracción de las fracciones de glicolípidos y fosfolípidos de la leche humana .....	29
4.2.1 Extracción de la fracción de lípidos de la leche humana.....	29
4.2.2 Fraccionamiento de los lípidos.....	30
4.2.3 Hidrólisis alcalina y neutralización de los lípidos.....	31
4.3 Purificación de las fracciones de glicolípidos sulfatados y fosfolípidos de la leche humana.....	32
4.3.1 Estandarización de la cromatografía en columna de ácido silícico .....	32
4.3.2 Estandarización de la cromatografía en capa fina (CCF) .....	35
4.3.3 Purificación de las fracciones de glicolípidos de la leche humana .....	37
4.3.4 Identificación de las fracciones de glicolípidos de la leche humana .....	38
4.4 Ensayos celulares .....	39
4.4.1 Cultivo <i>in vitro</i> de las líneas celulares humanas CD4 positivas: MT2 y THP-1.....	39
4.4.2 Determinación de la viabilidad celular en cámara de Neubauer .....	40
4.4.3 Criopreservación de las células .....	42
4.4.4 Cultivo y propagación de las cepas de referencia IIIB y ADA-M del VIH-1 .....	43
4.4.5 Determinación de la dosis infectiva media (TCID <sub>50</sub> ) de las cepas del VIH- 1.....	43
4.4.6 Ensayos de citotoxicidad con los glicoconjugados de la leche humana.	45
4.4.7 Ensayos de infección <i>in vitro</i> de células CD4 positivas con las cepas IIIB y ADA-M del VIH-1.....	46
4.4.8 Ensayos de inhibición de la infección <i>in vitro</i> de células CD4 positivas por el VIH-1 con los glicoconjugados de la leche humana .....	47
4.4.9 Cuantificación del antígeno P24 de la cápside del VIH-1 por un ensayo inmunoenzimático de ELISA.....	51
<b>5. Resultados .....</b>	<b>53</b>
5.1 Extracción, purificación e identificación de las especies de glicoconjugados de la leche humana (glicolípidos y fosfolípidos).....	53

5.2 Efecto <i>in vitro</i> de los glicoconjugados de la leche humana en las líneas celulares humanas CD4 positivas: MT2 y THP-1 .....	58
5.3 Ensayos de infección de las células CD4 positivas humanas MT2 y THP-1 por las cepas de referencia ADA-M y IIIB del VIH-1 .....	62
5.4 Ensayos de inhibición de la infección de las células CD4 positivas humanas por cepas de referencia del VIH-1, con los glicoconjugados extraídos de la leche humana .....	62
5.4.1 Efecto inhibitorio de los glicoconjugados de la leche humana en la línea celular MT-2 infectada con la cepa viral IIIB .....	63
5.4.2 Efecto inhibitorio de los glicoconjugados de la leche humana en la línea celular THP-1 infectada con la cepa viral ADA-M .....	68
5.4.3 Efecto inhibitorio de los glicoconjugados de la leche humana en la línea celular U937 infectada con la cepa viral ADA-M .....	69
<b>6. Discusión de resultados .....</b>	<b>70</b>
<b>7. Conclusiones .....</b>	<b>75</b>
<b>8. Anexo .....</b>	<b>77</b>
8.1 Lista de claves y abreviaturas .....	77
8.2 Material de cultivo, reactivos, equipos e instrumentos de laboratorio .....	79
8.3 Glosario .....	83
<b>9. Referencias bibliográficas .....</b>	<b>93</b>

## Índice de gráfica

<b>Gráfica 1.</b> Porcentaje de inhibición de la infección de la línea celular MT-2 con el aislado viral IIIB por las fracciones F2, F3 y los sulfatados de cerebro bovino.....	67
---	----

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Clasificación de los glicolípidos con base en su molécula lipídica .....	5
<b>Figura 2.</b> Clasificación de los glicoesfingolípidos.....	6
<b>Figura 3.</b> Estructura de un virión maduro de VIH.....	15
<b>Figura 4.</b> Genoma del VIH-1 .....	15
<b>Figura 5.</b> Tropicismo del VIH-1.....	17

<b>Figura 6.</b> Entrada del VIH-1 a su célula blanco .....	18
<b>Figura 7.</b> Sincicios formados en la línea celular MT-2 .....	26
<b>Figura 8.</b> Diagrama de trabajo .....	28
<b>Figura 9.</b> Esquema de la cámara de Neubauer .....	40
<b>Figura 10.</b> Diagrama de la placa de cultivo de 96 pozos utilizada durante el ensayo de la determinación de TCID <sub>50</sub> .....	44
<b>Figura 11.</b> Pozos del ensayo de ELISA P24.....	51
<b>Figura 12.</b> ELISA P24.....	52
<b>Figura 13.</b> Separación por Cromatografía en capa fina (CCF) de la fracción de glicolípidos sulfatados de la leche humana (F2) después de su purificación a partir de la columna de ácido silícico.....	56
<b>Figura 14.</b> Separación por CCF de las fracciones F2 y F3 de la leche humana después de su purificación a partir de una columna de ácido silícico .....	57
<b>Figura 15.</b> Línea celular MT2 en presencia de concentraciones crecientes de la fracción de glicolípidos sulfatados de la leche humana (F2) .....	58
<b>Figura 16.</b> Línea celular THP-1 en presencia de concentraciones crecientes de la fracción de glicolípidos sulfatados de la leche humana (F2) .....	59
<b>Figura 17.</b> Línea celular U937 en presencia de concentraciones crecientes de la fracción de glicolípidos sulfatados de la leche humana (F2) .....	60
<b>Figura 18.</b> Controles del ensayo de inhibición de la infección <i>in vitro</i> de la línea de linfocitos humanos MT-2 por el aislado viral IIIB del VIH-1 con los glicoconjugados de la leche humana .....	64
<b>Figura 19.</b> Efecto inhibitorio de las fracciones de glicoconjugados de la leche materna en la infección <i>in vitro</i> de la línea de linfocitos humanos MT-2 por el aislado viral IIIB .....	65

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Factores antimicrobianos, antivirales e inmunoreguladores de la leche humana .....	10
<b>Tabla 2.</b> Epidemiología del VIH en el mundo .....	13
<b>Tabla 3.</b> Epidemiología del VIH-1 en México .....	13

<b>Tabla 4.</b> Clasificación y función de las proteínas del VIH-1 .....	16
<b>Tabla 5.</b> Componentes de la leche humana con actividad anti-VIH.....	21
<b>Tabla 6.</b> Estandarización de las condiciones de elución de la cromatografía en columna de ácido silícico .....	34
<b>Tabla 7.</b> Estandarización de las condiciones para la cromatografía en capa fina (TLC).....	36
<b>Tabla 8.</b> Concentraciones de F2 probadas en los ensayos de inhibición de la infección de la línea celular MT-2 por la cepa de referencia IIIB del VIH-1 .....	47
<b>Tabla 9.</b> Concentraciones de F2 probadas en los ensayos de inhibición de la infección de las líneas celulares THP-1 y U937 por la cepa de referencia ADA-M del VIH-1 .....	48
<b>Tabla 10.</b> Concentraciones de F3 probadas en los ensayos de inhibición de la infección de la línea celular MT-2 por la cepa de referencia IIIB del VIH-1 .....	48
<b>Tabla 11.</b> Concentraciones de F3 probadas en los ensayos de inhibición de la infección de las líneas celulares THP-1 y U937 por la cepa de referencia ADA-M del VIH-1 .....	49
<b>Tabla 12.</b> Cantidades extraídas de las fracciones F2 y F3, a partir de 2.4 litros de una mezcla de leches humanas .....	54
<b>Tabla 13.</b> Resultados de viabilidad celular de las células MT-2, THP-1 y U937 en presencia de las fracciones de glicolípidos sulfatados de la leche humana (F2), fosfolípidos de la leche humana (F3) y el estándar de sulfatados (Sulf) .....	61
<b>Tabla 14.</b> Cantidades óptimas para los ensayos de infección de las células MT-2, THP-1 y U937 por las cepas virales IIIB y ADA-M .....	62
<b>Tabla 15.</b> Inhibición de la infección <i>in vitro</i> de la línea de linfocitos humanos MT-2 por el aislado viral IIIB con tropismo X4 .....	66
<b>Tabla 16.</b> Inhibición de la infección <i>in vitro</i> de la línea de monocitos humanos THP-1 por el aislado viral ADA-M con tropismo R5 .....	68
<b>Tabla 17.</b> Inhibición de la infección <i>in vitro</i> de la línea de monocitos humanos U937 por el aislado viral ADA-M con tropismo R5 .....	69



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Planteamiento del problema

Los glicoconjugados son compuestos ampliamente distribuidos en la naturaleza. En el humano pueden encontrarse en diversos tipos de tejidos y fluidos, siendo uno de ellos la leche, que contiene un gran número de especies únicas de glicoconjugados. La leche no solamente representa la principal fuente nutricional en los mamíferos durante el primer año de vida, sino que además se le han atribuido otras funciones biológicas que ayudan a fortalecer el sistema inmunológico del recién nacido. A partir de la búsqueda de las funciones de los diferentes componentes de la leche, han surgido diversas investigaciones enfocadas principalmente en el estudio del efecto antimicrobiano que poseen algunos componentes de la fracción de carbohidratos de la leche, entre los cuales destacan los glicoconjugados y los oligosacáridos. En las últimas dos décadas varios autores han descrito la importancia de los glicoconjugados, en la protección contra agentes infecciosos para el humano, que incluyen a bacterias, parásitos, hongos y virus.

Un gran número de patógenos utilizan a los glicoconjugados para unirse a las células blanco e iniciar un proceso infeccioso. Si los glicoconjugados están presentes en las mucosas, recubriendo a las células epiteliales, o bien, están presentes también en otros fluidos biológicos como saliva, lágrimas, orina y en la leche humana, pueden actuar como un “señuelo” que se une a las glicoproteínas de los microorganismos patógenos provocando su erradicación por un mecanismo característico del tejido específico. De esta forma, los glicoconjugados solubles pueden prevenir la entrada del microorganismo a su célula blanco, actuando como receptores análogos.

En el caso particular de los virus, se ha descrito el efecto antiviral que tienen algunos glicoconjugados para inhibir la replicación *in vitro* del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), aunque es importante señalar que los

glicoconjugados de la mayoría de estos estudios provienen de un origen natural diferente a la leche humana. Un grupo de glicoconjugados con actividad anti-VIH son los glicolípidos sulfatados, los cuales interaccionan con las glicoproteínas de la envoltura del VIH-1, GP120 y GP41, impidiendo la entrada del virus a su célula blanco.

Por otra parte, se conoce que el contenido de los glicoconjugados en la leche es bajo (1.0 a 1.5 g/dl), por lo que es de gran relevancia contar con un método bioquímico que permita obtener una mayor concentración de estos compuestos y definir a los glicoconjugados con potencial inhibitorio para la infección por el VIH-1.

El propósito de este trabajo es desarrollar un método de extracción y de purificación de los glicolípidos de la leche humana que permita obtener un mayor rendimiento en la obtención de estos compuestos y con un alto grado de pureza. Una vez obtenida la fracción de glicolípidos sulfatados, se evaluará su efecto inhibitorio de la infección *in vitro* del VIH-1, utilizando 3 modelos de infección con líneas celulares de linfocitos T y monocitos humanos y 2 cepas de referencia del virus. Con los resultados obtenidos en este estudio, se contribuirá a la identificación de compuestos glicoconjugados de la leche con actividad anti-VIH y se definirá si el efecto inhibitorio es específico para cada cepa viral.

## 1.2 Objetivos

### Objetivo general

Evaluar la capacidad de los glicoconjugados extraídos de la leche humana, en particular de las especies de glicolípidos sulfatados y fosfolípidos, de inhibir la infección *in vitro* de linfocitos T y monocitos humanos por cepas de referencia del VIH-1.

### Objetivos particulares

1. Obtener la fracción de los glicolípidos de la leche humana mediante procesos de extracción con solventes orgánicos.
2. Estandarizar un método para purificar e identificar a los glicolípidos sulfatados extraídos de la leche humana, utilizando técnicas cromatográficas como la cromatografía en columna de ácido silícico y cromatografía en capa fina (CCF).
3. Determinar la dosis infectiva media (TCID<sub>50</sub>) de las cepas de referencia del VIH-1: IIB y ADA-M, que se usarán en los ensayos de infección.
4. Evaluar el efecto antiviral de las fracciones que contienen los glicolípidos sulfatados y fosfolípidos, en modelos de infección *in vitro* utilizando cepas de referencia del VIH-1 y líneas celulares CD4 positivas.
5. Establecer si la potencia de la actividad antiviral por los glicoconjugados de la leche es específico para la cepa viral con tropismo definido.
6. Evaluar si el efecto inhibitorio de la infección viral *in vitro* es específico de los glicolípidos de la leche humana, al comparar su actividad con otra fuente natural de glicolípidos sulfatados diferentes a la leche y que fueron obtenidos de cerebro bovino.

### 1.3 Hipótesis

Si las especies de glicoconjugados de la leche humana, glicolípidos y fosfolípidos inhiben la infección *in vitro* en las líneas celulares humanas de linfocitos T y de monocitos, por cepas de referencia linfotrópicas y monocito-trópicas del VIH-1, entonces, el efecto inhibitorio de los glicoconjugados en la infección *in vitro* por el VIH-1 es dosis dependiente y específico para la cepa viral.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Características y clasificación de los glicoconjugados

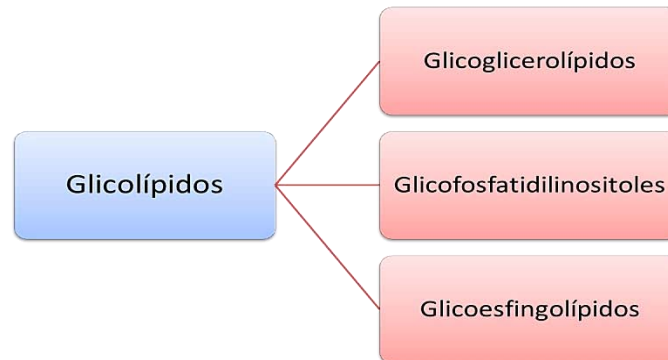
Los glicoconjugados son moléculas que contienen uno o más grupos carbohidrato unidos covalentemente a una proteína, un péptido, un lípido u otra molécula biológica o no biológica. Los principales tipos de glicoconjugados son: glicoproteínas, proteoglicanos, glicopéptidos, peptidoglicanos, lipopolisacáridos y glicolípidos [1].

Las **glicoproteínas** contienen uno o más glicanos unidos covalentemente a una proteína. Una subclase de las glicoproteínas son los **proteoglicanos**, que son moléculas constituidas por una proteína glicosilada con polisacáridos que contienen azúcares amino (estos polisacáridos son conocidos como glicosaminoglicanos). Los **glicosaminoglicanos** se encuentran como cadenas laterales de polisacáridos en los proteoglicanos, o bien, como polisacáridos complejos libres y se componen de unidades repetidas de disacáridos lineales, con una hexosamina y una hexosa o un ácido hexurónico. Dentro de las glicoproteínas también podemos encontrar a los **glicopéptidos** y a los **peptidoglicanos**; mientras que los glicopéptidos están formados por carbohidratos unidos a un oligopéptido (compuesto por L- y/o D-aminoácidos), por su parte, los peptidoglicanos están constituidos por glicosaminoglicanos (formados por residuos de D-glucosamina y de ácido murámico o ácido L-talosaminurónico) [2].

En cuanto a los **lipopolisacáridos**, se trata de compuestos naturales (encontrados en las paredes celulares de las bacterias Gram negativas) formados por una unidad repetida de trisacárido (dos heptosas y un ácido octulosónico) con cadenas laterales de oligosacáridos y unidades de ácido 3-hidroxitetradecanoico [3].

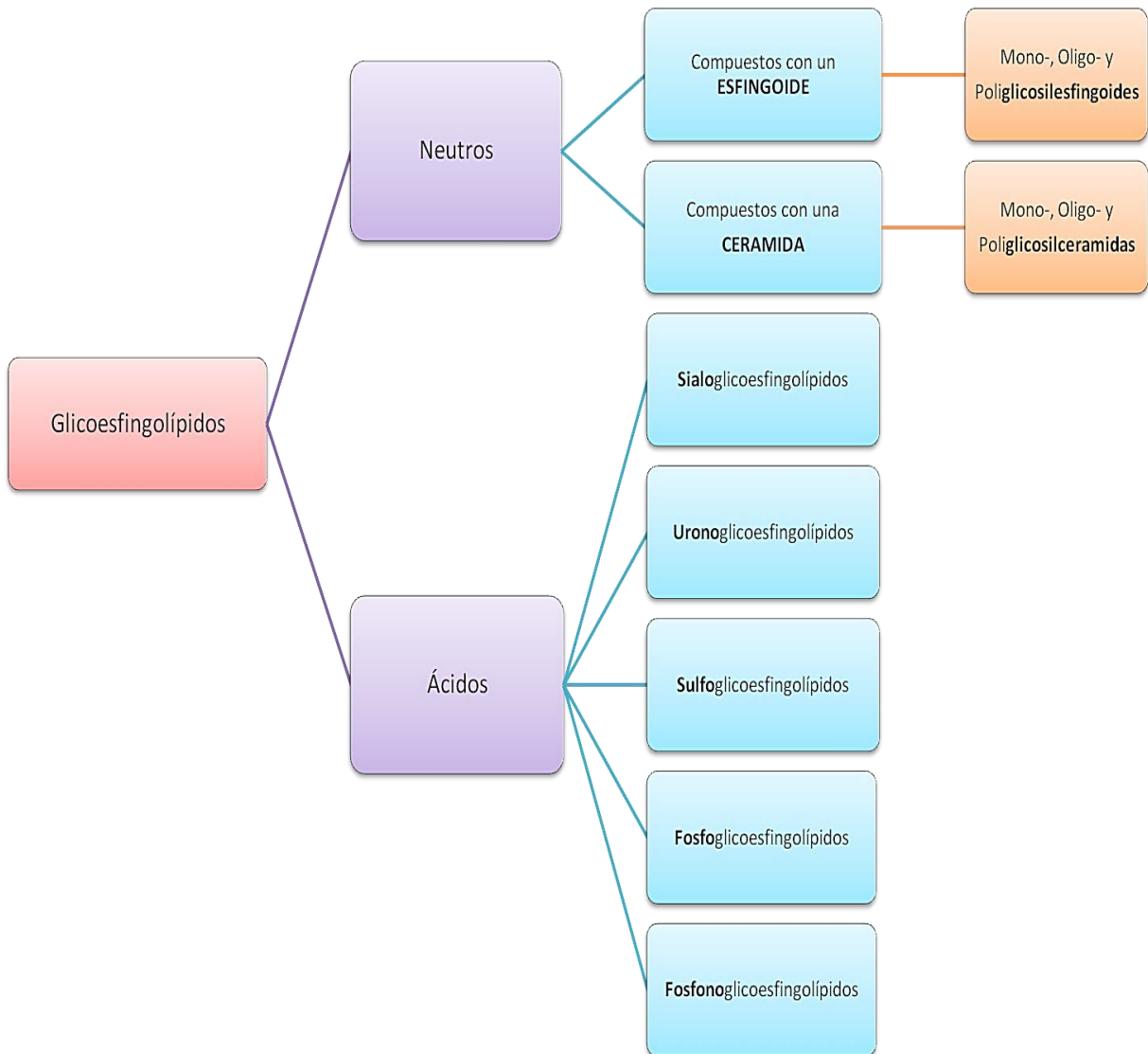
Los **glicolípidos** son compuestos que contienen uno o más residuos monosacáridos unidos por un enlace glicosídico, a una molécula hidrofóbica como

un acilglicerol, un esfingoide, una ceramida (N-acilesfingoide) o un fosfato de prenilo. Los glicolípidos se pueden clasificar con base a las moléculas lipídicas que contienen y se dividen en 3 grupos principales (**Figura 1**) [3].



**Figura 1. Clasificación de los glicolípidos con base en su molécula lipídica** [3].

- 1) Los glicoglicerolípidos son glicolípidos que contienen uno o más residuos glicerol.
- 2) Los glicofosfatidilinositoles son glicolípidos que contienen sacáridos unidos glicosídicamente a la molécula de inositol de los fosfatidilinositoles.
- 3) Los glicoesfingolípidos se componen de al menos un residuo monosacárido y un esfingoide o una ceramida. A su vez, se dividen en glicoesfingolípidos neutros y ácidos. Dentro de los neutros se encuentran las monoglicosilceramidas (también llamados **cerebrósidos**); y en los ácidos podemos hallar a los sulfoglicoesfingolípidos (**sulfatados**). Un cerebrósido está compuesto por una ceramida unida a una galactosa (galactosilceramida) o una glucosa (glucosilceramida). Mientras que los sulfatados son glicoesfingolípidos con un grupo éster sulfato (también se les conoce como sulfatoglicoesfingolípidos o ésteres de sulfato de los glicoesfingolípidos neutros) (**Figura 2**).



**Figura 2. Clasificación de los glicoesfingolípidos [3].**

## 2.2 Glicoconjugados en la leche humana

Los glicoconjugados se encuentran distribuidos en toda la naturaleza y con diferentes variaciones, ya que es posible encontrar diversos tipos de glicoconjugados en parásitos, hongos, virus, plantas, bacterias y animales [1]. En el hombre, los glicoconjugados se encuentran en diferentes tejidos y fluidos corporales, tales como: el tejido intestinal, el tejido neuronal, el semen, el líquido sinovial y la leche, entre otros [4].

### 2.2.1 La leche humana y sus componentes principales

La leche se produce en la glándula mamaria y durante la lactancia, por lo que ha sido la primera fuente de nutrientes para los neonatos de varias especies de mamíferos durante millones de años. Desde hace unos 10,000 años, los seres humanos aprendieron a domesticar al ganado, por lo que comenzaron a utilizar la leche de otros mamíferos para complementar o reemplazar a la leche materna; posteriormente los adultos comenzaron a utilizarla también como un alimento adicional a su dieta [5].

El embarazo se caracteriza por varios cambios hormonales que reflejan las principales contribuciones del hipotálamo y de la glándula pituitaria, con la colaboración de una serie de otras glándulas endocrinas (por ejemplo el páncreas, tiroides y paratiroides) para la secreción de los compuestos de la leche. El aumento de los niveles de estrógeno y de progesterona durante el embarazo estimula la secreción de prolactina en la pituitaria, mientras que el lactógeno de la placenta parece inhibir la liberación de un factor inhibidor de la prolactina en el hipotálamo. La prolactina, el lactógeno, el estrógeno y la progesterona ayudan en la preparación de la glándula mamaria para la lactancia. Al nacimiento, se pierde un factor regulador importante de la glándula mamaria: la placenta; pero se presentan nuevos factores reguladores, entre ellos, la interacción materno-infantil y la regulación neuroendocrina. El pezón se estimula por la succión y activa una vía neuronal que resulta en la liberación de prolactina y oxitocina; la prolactina es la responsable de estimular la producción de leche, mientras que la oxitocina estimula la expulsión de la leche [5]. La leche se produce por diferentes mecanismos de síntesis dentro de la glándula mamaria y del transporte de los componentes de la sangre. Por ejemplo, las proteínas específicas de la leche, se sintetizan en las células secretoras mamarias y posteriormente se envuelven en vesículas secretoras que son exocitadas dentro del lumen alveolar. Por otra parte, la lactosa se secreta en la leche de una manera similar a las proteínas [6].

Las gotas de lípidos se pueden observar dentro de las células secretoras de la glándula mamaria, rodeadas por una membrana globular lipídica de la leche. En

algunos casos, el epitelio mamario puede comportarse como una barrera mamaria entre el fluido intersticial derivado de la sangre y la leche, debido a que la falta de espacio entre las células puede permitir una difusión directa de los componentes dentro de la leche [6].

Los componentes de la leche se encuentran en diferentes concentraciones de acuerdo con los siguientes factores: especie, el estado nutricional de la madre, el tiempo de lactancia, la edad de la madre, el tiempo de desarrollo del producto, entre otros. En el caso de la leche humana, sus principales constituyentes son: sólidos totales (113 g/l), grasa (30 g/l) y proteína (9 g/l). En cuanto a los carbohidratos, el componente principal es la lactosa (69-72 g/l) seguida por los oligosacáridos (12-14 g/l), la glucosa (0.02 g/l) y en menor concentración se encuentran los glicoconjugados, entre otros [5, 6]. En la membrana globular lipídica de la leche humana (*MLGM* por su siglas en inglés), se han podido identificar y cuantificar algunas especies de lípidos y de glicoconjugados de acuerdo con la relación de la cantidad de proteína que se encuentra en la *MLGM*. Las principales especies de lípidos que se encuentran en la leche son: lípidos neutros (1.1 mg/mg proteína), glicoesfingolípidos (32 µg/mg proteína) y fosfolípidos (0.35 mg/mg proteína) [6].

### 2.2.2 Función e importancia de los glicoconjugados de la leche humana en el organismo

Una nutrición temprana con la leche materna puede tener efectos a corto y largo plazo en la salud, el desarrollo del cerebro y el comportamiento de una persona. La leche materna comparada con las fórmulas lácteas comerciales, es una fuente más rica en sustancias gliconutricionales (por ejemplo oligosacáridos, glicoproteínas y otros glicoconjugados). Los oligosacáridos (azúcares complejos) se encuentran en gran cantidad (12-14 g/l) en la leche materna y contienen a la mayoría de los azúcares esenciales de los glicoconjugados, incluyendo a la fucosa, el ácido siálico (ácido N-acetilneuramínico), galactosa, manosa, N-



acetilglucosamina y N-acetilgalactosamina. Los tipos y la concentración de los oligosacáridos presentes en la leche humana pueden variar, lo que sugiere que la composición de la leche se modifica de acuerdo con la necesidad nutricional del infante; un ejemplo de ello es el uso de los oligosacáridos no digeridos en el intestino delgado, como fibra soluble de la leche materna, por lo que dicha estructura les permite unirse a los patógenos y como consecuencia, ayuda a prevenir infecciones causadas por *E. coli* y *V. cholerae*, entre otros [5, 6]. Además, los oligosacáridos pueden pasar a través del intestino delgado y entran al colon, donde son fermentados por las bacterias colonizadoras benéficas [7, 8].

En la **Tabla 1**, se describen algunos de los compuestos de la leche humana que actúan como factores antimicrobianos y como reguladores del sistema inmune.

Las glicoproteínas son otros compuestos que abundan en la leche. Una de las glicoproteínas más caracterizadas y reconocidas en el calostro, es el anticuerpo inmunoglobulina A (Ig A), el cual protege al infante contra alguna infección por virus, bacterias y hongos; así como también tiene la capacidad de activar a los macrófagos y estimular el desarrollo del ducto biliar. Por su parte, las citocinas son otras glicoproteínas importantes de la leche humana, ya que protegen al organismo contra las infecciones y activan al sistema inmune, entre otras funciones [8-12].

Los glicolípidos encontrados en la leche humana también desempeñan funciones importantes en el organismo como son: protección contra infecciones causadas por diferentes microorganismos y la protección de las células contra el ataque del sistema inmune. Por ejemplo, los gangliósidos (glicolípidos que contienen ácido siálico) son asociados con la inhibición de la unión de algunas toxinas; tal es el caso del gangliósido GM1, que inhibe a las enterotoxinas de *E. coli* y *V. cholerae* [6, 8].

**Tabla 1. Factores antimicrobianos, antivirales e inmunoreguladores de la leche humana [5-15].**

Compuesto	Función
Oligosacáridos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhiben la unión de bacterias patógenas y toxinas al epitelio [5-7, 11, 13, 15].</li> <li>• Estimulan el crecimiento de la microbiota (especialmente de las bifidobacterias) [11, 13].</li> </ul>
Glicoconjugados	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Protegen contra infecciones bacterianas, así como evita la unión de toxinas al epitelio [8, 10-12].</li> <li>• Algunas glicoproteínas mejoran la absorción de hierro, cobre, zinc y vitamina B12 [5, 8-9].</li> <li>• Estimulan el crecimiento de la microbiota [5-13].</li> </ul>
Lactoferrina	Disminuye la multiplicación de hongos y bacterias siderófilas por quelación del Fe <sup>3+</sup> [6, 10-12, 15].
Lisozima	Modifica a los peptidoglicanos de la pared celular en las bacterias gram positivas (por ejemplo, <i>Micrococcus luteus</i> y <i>Bacillus megaterium</i> ) [6, 10-11, 15].
Ig A secretora	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anticuerpos que inhiben la adherencia de los patógenos al epitelio (virus, bacterias y hongos) [6, 10-12].</li> <li>• Neutraliza a las toxinas [6, 10-12].</li> <li>• Estimula el desarrollo del ducto biliar [6, 8-9].</li> <li>• Activa a los macrófagos [6, 10-12].</li> </ul>
Lactadherina	Se une específicamente al rotavirus para inhibir su replicación [12-15].
Mucina 1	Evita la adhesión de <i>Escherichia coli</i> S-fimbriada a las células epiteliales [14-15].
Citocinas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Protegen contra infecciones [10-11, 14].</li> <li>• Activan el sistema inmune [5-7, 10-11, 14].</li> </ul>
Ácido siálico	Influyen en el desarrollo normal del cerebro [5, 7-8].
Ácido úrico, ascorbato, α-tocoferol, β-caroteno	Antioxidantes [5-9].
Prostaglandinas	Citoprotector [5-7].
Leucocitos	Protección mediante fagocitosis [11, 13-14].

En general, los glicoconjugados de la leche humana pueden cumplir diversas funciones inmunológicas, debido a que pueden participar de diferentes maneras en la protección del organismo contra los agentes extraños. Por ejemplo, pueden unirse a un patógeno por medio de la interacción con los glicoconjugados de la superficie de los microorganismos y evitar así la adherencia y/o la entrada del agente infeccioso a la célula huésped [5-12, 16]. Los glicoconjugados de la leche que son similares estructuralmente a los glicoconjugados de la superficie celular de la mucosa intestinal, actúan como receptores para los patógenos, por lo que se pueden unir a estos y evitan su penetración en la célula blanco [8, 11,12]. Se pueden llevar a cabo diferentes procesos que eviten la unión del patógeno a la célula blanco, entre estos se encuentran: bloqueo de la entrada por competencia de los receptores celulares y los glicoconjugados, activación de las células del sistema inmune (liberación de citocinas, IgA), alteración de la membrana celular bacteriana (lípidos, lisozima), competencia de nutrientes (lactoferrina, bacterias de la flora intestinal), entre otros [5-12, 15-16].

Por otra parte, se sabe que el suministro de oligosacáridos como complemento a algunos alimentos, puede servir como fuente de alimento para la microbiota que se desarrolla en el intestino y que ayuda a mejorar la absorción de vitaminas y minerales [8, 9].

## 2.3 Virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1)

En 1981 los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de Estados Unidos (*CDC* por sus siglas en inglés) comenzaron a notar que un grupo de hombres homosexuales presentaban síntomas de una rara infección oportunista en una clínica de San Francisco. Después se encontró que estos pacientes sufrían de una deficiencia inmune que fue llamada Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). Posteriormente, en 1983 se aislaron simultáneamente dos virus en los Estados Unidos de América y en Francia, y pensando que eran la causa de las infecciones, se nombraron como Virus T Linfotrópico Humano (*HTLV-III* por sus siglas en inglés) y Virus Asociado a Linfadenopatía (*LAV* por sus siglas en inglés) respectivamente. Luego se aisló un tercer virus de los pacientes con SIDA, llamado Retrovirus Asociado al SIDA (*ARV* por sus siglas en inglés); más tarde se descubrió, que se trataba del mismo virus y se nombró como Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH, o *HIV* por sus siglas en inglés). El VIH es el agente infeccioso que más se ha estudiado en la historia de la humanidad desde que se descubrió como el agente causal del SIDA [17, 18].

### 2.3.1 Epidemiología de la infección por el VIH-1 en México y en el mundo

La epidemiología (del griego *epi*, sobre, y *demos*, pueblo o población; y *logos*, estudio) es la ciencia que evalúa la aparición, los determinantes, la distribución y el control de la salud y la enfermedad en una población humana definida [8, 19-20]. La infección por VIH-1 es una pandemia debido a que se encuentra distribuida por todo el mundo y puede afectar tanto a niños como a adultos.

De acuerdo con las estadísticas de los últimos 5 años, se observa una disminución en el número de nuevos casos de personas infectadas por el VIH anualmente, de 3.3 millones de individuos en el 2002, a 2.1 millones en el 2013, y en las muertes relacionadas con SIDA. Esta disminución en la incidencia de la infección por el VIH (nuevos casos de la enfermedad [19,20]) se debe principalmente a una

disminución de casos de transmisión heterosexual. En cambio, la prevalencia global del VIH (la proporción de la población que padece la enfermedad [19,20]) ha aumentado de 31 millones de personas infectadas en el 2002, a 35 millones de personas reportadas por ONUSIDA en el 2013, debido al aumento del número de pacientes con acceso a los tratamientos antivirales y que por lo mismo, tienen un mayor tiempo de vida [21]. A nivel **mundial**, la información actualizada ha sido recopilada hasta el 2013 por el Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA y los datos se muestran en la **Tabla 2**.

**Tabla 2. Epidemiología del VIH en el mundo [21].**

<b>Personas infectadas con VIH</b>	<b>35.0 millones</b> (33.2- 37.2 millones)
<b>Prevalencia de VIH en adultos (15-49 años)</b>	<b>0.8%</b> (0.7 - 0.8 %)
<b>Nuevos casos de infección por VIH (niños y adultos)</b>	<b>2.1 millones</b> (1.9 - 2.4 millones)
<b>Defunciones relacionadas con SIDA (niños y adultos)</b>	1.5 millones (1.4 - 1.7 millones)

En **México**, la Secretaría de salud y el Centro nacional para la prevención y el control del VIH/SIDA (CENSIDA), ha contabilizado en forma acumulada, hasta el año 2014, la información epidemiológica que se muestra en la **Tabla 3** [22].

**Tabla 3. Epidemiología del VIH-1 en México [22].**

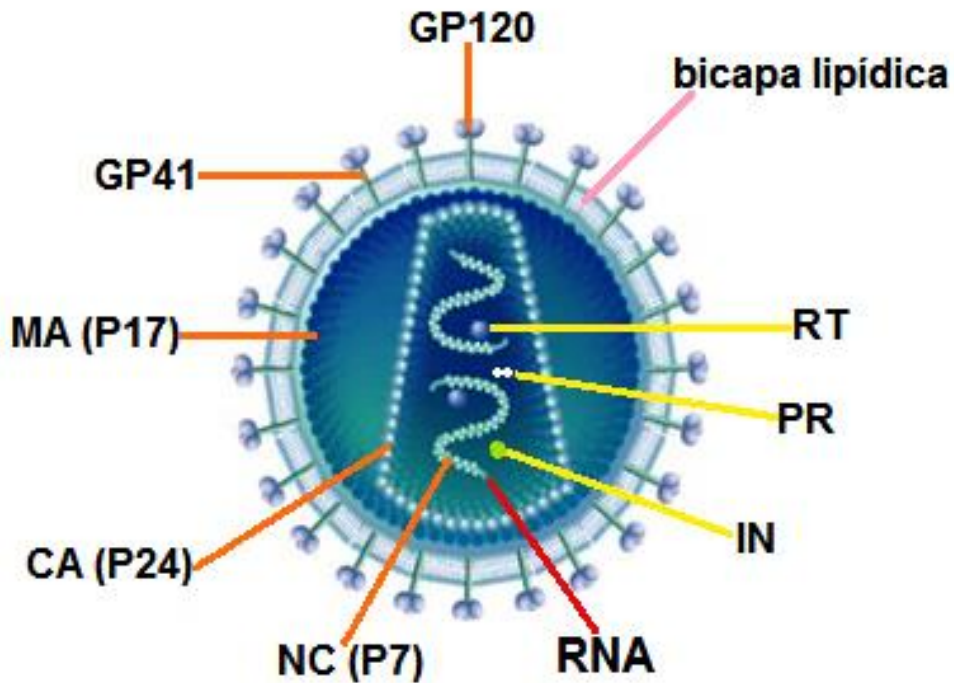
<b>Total de casos de VIH/SIDA notificados en el periodo 1983-2014</b>	<b>228,200</b>
<b>Prevalencia de VIH en adultos (15-49 años, estimación 2014)</b>	<b>0.24%</b>
<b>Casos de SIDA notificados (1983-2014)</b>	174,564
<b>Casos notificados de VIH/SIDA que se encuentran vivos</b>	Total: 119,200 SIDA: 65,975 VIH: 53,225
<b>Nuevos casos diagnosticados de VIH y SIDA notificados en 2014 (preliminar)</b>	<b>9,573</b>
<b>Defunciones relacionadas con SIDA (niños y adultos) 2013</b>	4 971
<b>Tasa de mortalidad en 2013 por cien mil habitantes</b>	4.2

### 2.3.2 Clasificación, estructura y genoma viral

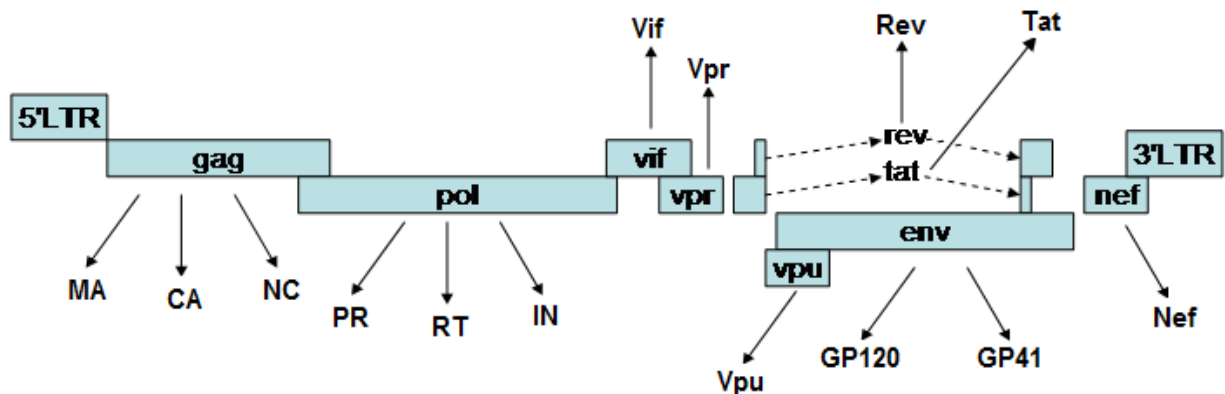
El VIH pertenece a la familia *Retroviridae*, la subfamilia *Orthoretrovirinae* y al género de los Lentivirus. Existen dos tipos de VIH: el 1 (VIH-1) y el 2 (VIH-2). El **VIH-1** es el más común, ya que se encuentra ampliamente distribuido, por lo que es el principal agente causal de las infecciones de VIH en el mundo; es muy similar a las cepas del virus de inmunodeficiencia en simios (*SIV* por sus siglas en inglés), aisladas de los chimpancés. El **VIH-2** es un virus de menor virulencia, con cargas virales y tasas de transmisión vertical bajas, así como una progresión de la enfermedad más lenta en individuos con la infección; se puede localizar en África, específicamente en el oeste del África central y se sugiere que se derivó del *SIV<sub>smm</sub>* (virus de inmunodeficiencia del mangabey ahumado) [17,18].

Se han descrito **cuatro grupos del VIH-1** llamados: **M, O, N y P** y **ocho grupos del VIH-2** (de la **A a la H**). Del grupo **M** se han reconocido nueve subtipos que son nombrados A, B, C, D, F, G, H, J y K, y 49 formas recombinantes circulantes; del grupo **O** se han identificado algunos subtipos y muy pocos del grupo **N** [23,24]. El grupo **P** es el que se describió más recientemente, en el 2009. Se aisló de una mujer de Camerún y está más relacionado con una cepa del virus de inmunodeficiencia del gorila [25]. Hasta la fecha, no se ha identificado algún subtipo del VIH-2.

El VIH es un virus esférico envuelto, con un diámetro de 90-130 nm. Dentro de la envoltura se encuentra una cápside en forma de cono que protege al genoma, el cual consiste en ARN positivo monocatenario diploide y consta de aproximadamente 9.8 kb (**Figura 3**). El genoma viral codifica para nueve genes que producen 15 proteínas y se clasifican en: genes estructurales (*gag, pol* y *env*), regulatorios (*tat, rev*) y accesorios (*vif, vpr, vpu, nef*) [17, 18, 26, 27] (**Figura 4 y Tabla 4**).



**Figura 3. Estructura de un virión maduro de VIH** (imagen tomada y modificada de [18]). Las principales proteínas que conforman al virión son: **a)** GP120, **b)** GP41, **c)** MA (P17), **d)** CA (P24), **e)** NC (P7), **f)** integrasa (IN), **g)** proteasa (PR), **h)** transcriptasa inversa (RT). La bicapa lipídica es de origen celular e incluye aproximadamente 72 espículas de las glicoproteínas de la envoltura viral y algunas proteínas celulares [17, 18, 26, 27].



**Figura 4. Genoma del VIH-1** (imagen tomada y modificada de [17]). Se muestra como se encuentran ordenados los nueve genes del VIH-1, y se indican las proteínas codificadas por cada gen (ver flechas).

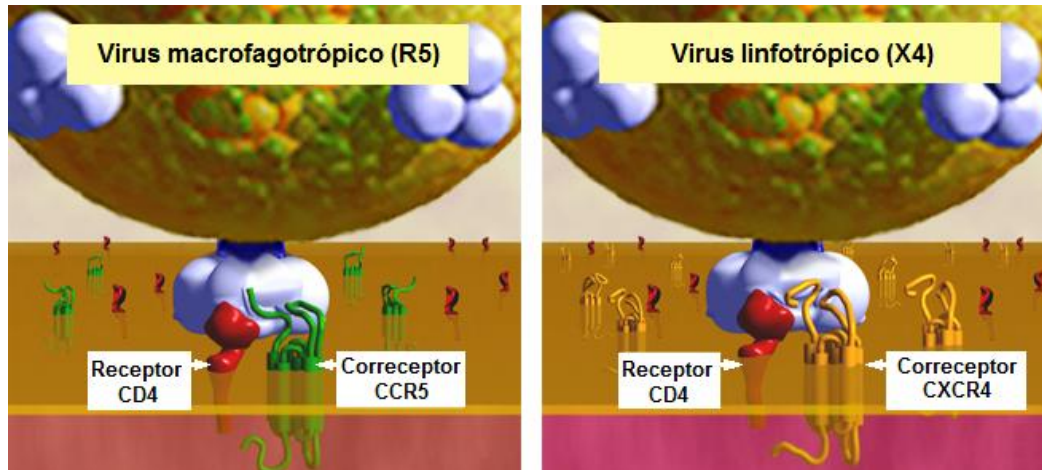
**Tabla 4. Clasificación y función de las proteínas del VIH-1 [17, 18, 26].**

Clase de Proteína	Proteína	Localización y/o función
<b>Estructural</b>	<b>GP120</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Se localiza en la parte más externa del virus, y sirve para unirse al receptor CD4 que se encuentra en la célula, debido a que tiene un dominio de unión a dicho receptor, además de contar con un sitio de unión al correceptor.</li> </ul>
	<b>GP41</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Es el dominio de transmembrana, que está unido a GP120 de manera no covalente. Sirve para fusionar la membrana viral y la membrana plasmática de la célula previa unión de GP120 al receptor y al correceptor, permitiendo la entrada de la cápside al citoplasma.</li> </ul>
	<b>MA</b> (proteína de la matriz, <b>P17</b> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>Forma un revestimiento asociado directamente al lado interior de la membrana a través de una unión N-terminal.</li> </ul>
	<b>CA</b> (proteína de la cápside, <b>P24</b> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>Constituye la cápside viral, mediante sus dominios N-terminales que son montados en anillos hexaméricos.</li> </ul>
	<b>NC</b> (proteína de la nucleocápside, <b>P7</b> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>Está implicada en la formación y estabilización de los dímeros del ARN genómico, así como en el ensamblaje de la nucleocápside.</li> </ul>
<b>Catalítica</b>	Transcriptasa inversa ( <b>RT</b> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>Realiza la transcripción inversa del genoma viral (ARN) a ADN complementario (cDNA).</li> </ul>
	Integrasa ( <b>IN</b> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>Insertan el genoma viral dentro del ADN cromosómico de la célula infectada.</li> </ul>
	Proteasa ( <b>PR</b> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>Actúa sobre las proteínas virales precursoras o poliproteínas Gag y Gag-Pol, las escinde y se obtienen las proteínas funcionales.</li> </ul>
<b>Regulatoria</b>	<b>Tat</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Es un activador transcripcional (aumenta la velocidad de transcripción).</li> </ul>
	<b>Rev</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Participa en la transcripción del gen <i>env</i>.</li> </ul>
<b>Accesoria</b>	<b>Vpu</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ayuda en el ensamblaje del virión.</li> </ul>
	<b>Vif</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Es importante para mantener la eficiencia de infección.</li> </ul>
	<b>Vpr</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Colabora en la mediación de la entrada nuclear y transporte del cDNA (producido por la transcripción inversa) dentro del núcleo celular.</li> </ul>
	Factor negativo ( <b>Nef</b> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>Puede perturbar la activación de la célula T y estimular la infectividad del virión.</li> </ul>



### 2.3.3 Tropismo del VIH-1

La entrada del VIH-1 a su célula blanco inicia cuando el virus se fija al receptor CD4 de los linfocitos T cooperadores, macrófagos, monocitos o células dendríticas; sin embargo, para seguir con el proceso de infección, el virus también utiliza a los receptores de quimiocinas CCR5 y CXCR4 como correceptores para poder entrar a la célula. Según el correceptor empleado, los virus pueden clasificarse en macrofagotrópicos si utilizan a CCR5 (R5) o linfotrópicos si utilizan a CXCR4 (X4) (**Figura 5**). Esta clasificación se relaciona con el **tropismo**, que es la atracción o afinidad específica que presenta el virus hacia un tejido del huésped [28, 29].

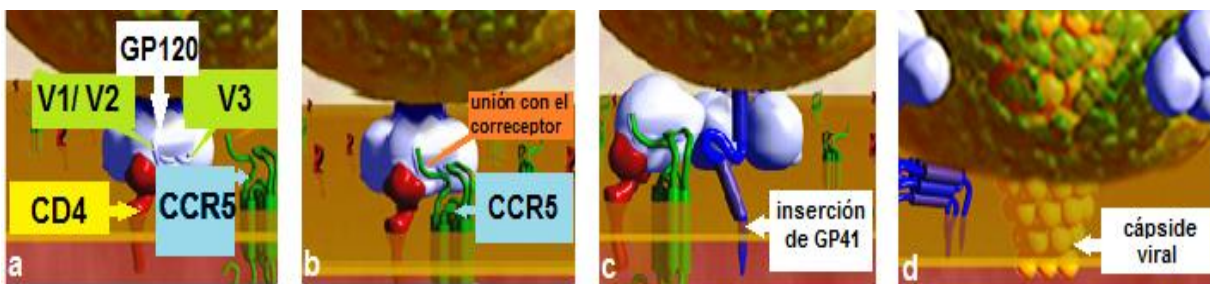


**Figura 5. Tropismo del VIH-1** (imagen tomada y modificada de [30]). La capacidad que tiene un virus para infectar diferentes tipos de células depende de la presencia del receptor CD4 y de los receptores de quimiocinas que utiliza como correceptores: CCR5 y CXCR4.

### 2.3.4 Entrada del virus a la célula blanco

El receptor CD4 de las células blanco del VIH-1 presenta cinco regiones variables (V1 a V5), también conocidas como bucles; de las cuales, V1, V2 y V3 participan en la entrada del virus a la célula.

El proceso de entrada del VIH-1 comienza con la interacción de GP120 y el sitio de unión del receptor CD4, lo que ocasiona un rearrreglo de V1 y V2 (**figura 6a**). Dichos cambios producen un puente en forma de hoja plegada y un reposicionamiento de V3 que participan en la atracción al correceptor CCR5 o CXCR4 (**figura 6b**). Una vez que GP120 se ha unido a su receptor y al correceptor, se induce la exposición del péptido de fusión GP41, que se inserta en la membrana celular (**figura 6c**), causando la fusión de las membranas y la posterior entrada de la cápside viral (**figura 6d**).



**Figura 6. Entrada del VIH-1 a una célula blanco** (imagen tomada y modificada de [30]). La entrada del virus se puede resumir en cuatro pasos: **a)** interacción de GP120 y CD4, **b)** unión de GP120 al correceptor correspondiente, **c)** exposición e inserción de GP41 a la membrana celular y **d)** fusión de las membranas y entrada de la cápside viral.

### 2.3.5 Vías de transmisión del VIH-1

Existen tres vías de transmisión del VIH-1: sexual, sanguínea y perinatal [31-37].

• **Vía sexual.** El VIH-1 se transmite mediante una exposición directa con el semen o secreción vaginal durante el acto sexual [31, 32-34]. Se ha encontrado que los componentes del semen, especialmente los péptidos derivados de los filamentos amiloides, mejoran la infectividad del virus, lo que puede ayudar a explicar el aumento del riesgo de transmisión del virus en la persona pasiva durante las relaciones sexuales con penetración sin protección. También se sabe que la penetración anal sin protección es de mayor riesgo que la penetración vaginal sin

protección, debido a que la mucosa rectal es más susceptible a abrasiones traumáticas en comparación con la mucosa vaginal o el cérvix, además de que carece de la protección de la barrera inmune humoral presente en las secreciones cervicovaginales [34]. La transmisión durante el sexo oral es de bajo riesgo, comparado con el sexo anal o vaginal; la persona que realiza el sexo oral tiene mayor probabilidad de infectarse si presenta lesiones en las encías o en la cavidad bucal [31, 32].

- **Vía sanguínea.** Es necesario que la sangre, los productos sanguíneos, los órganos o los tejidos contaminados se encuentren en contacto directo con la sangre de la persona no infectada; el riesgo de infección por ésta vía se ha reducido, debido a la implementación de pruebas rutinarias que se llevan a cabo en los bancos de sangre para determinar que la sangre y órganos donados no se encuentran contaminados. Una actividad de alto riesgo de transmisión del VIH-1, es el uso de jeringas compartidas durante la inyección de drogas ilícitas [31, 32].

- **Vía perinatal.** Una madre VIH-positiva puede transmitir el virus a su hijo durante el embarazo, el parto o la lactancia. A esta vía de transmisión del VIH también se le conoce como transmisión vertical [10, 35-37].

### 2.3.6 La leche humana como vector de transmisión del VIH-1

La transmisión del VIH-1 de la madre al hijo por medio de la leche materna es una forma de transmisión reconocida, por lo que en algunos países desarrollados la lactancia está contraindicada. Sin embargo, en los lugares donde la alimentación con fórmula no es factible, asequible o sostenible, se recomienda alimentar a los infantes con leche materna durante los primeros seis meses de vida, por los nutrientes y la gran cantidad de moléculas inmunomoduladoras que posee. Se ha estimado que la lactancia es la causa de un tercio de la mitad de los nuevos casos de infección por VIH-1 en infantes en todo el mundo [10, 37], sin embargo, los

mecanismos de transmisión del VIH-1 a través de la leche materna aún no se han esclarecido del todo [37].

A mediados de los años noventa, se encontró que el VIH-1 era detectable dentro de los compartimentos celulares (macrófagos y monocitos) de la leche materna. También se ha demostrado que la carga viral de la leche materna es más alta inmediatamente después del nacimiento [37]. Debido a que el calostro (la leche producida entre los 3 y 7 días después del nacimiento) es rico en linfocitos, los virus asociados a la célula pueden encontrarse en altas concentraciones, en comparación con la leche madura (leche producida a partir de la segunda o cuarta semana posterior al parto) [14, 15, 37, 38]. La cantidad de leucocitos (macrófagos, neutrófilos y linfocitos) presentes en el calostro (13%-70% de las células totales) es mayor comparada con el número que se encuentra en la leche madura (0%-2% de las células totales) [38]. Aún se desconoce cuándo hay más riesgo de transmitir el virus a través de la leche, algunos estudios indican que hay mayor riesgo de transmisión durante la alimentación temprana, mientras que otros sugieren que se lleva a cabo durante toda la lactancia; esto se debe a que la carga viral disminuye con el tiempo en que madura la leche, pero el volumen de leche que ingiere el neonato aumenta, por lo que la dosis viral podría mantenerse constante por algún tiempo [37].

A pesar de que la leche humana se ha descrito como una fuente de transmisión del VIH-1 al recién nacido, también contiene una gran cantidad de moléculas capaces de bloquear o disminuir la infección del virus. En la **Tabla 5** se describen los componentes principales de la leche humana con actividad anti-VIH que se han identificado.

De acuerdo con la literatura, existe una gran variedad de células, citocinas, anticuerpos, moléculas de adhesión y de compuestos como carbohidratos, proteínas y lípidos, que están presentes en la leche humana y que tienen actividad anti-VIH. Los glicoconjugados están entre los compuestos con mayor potencial antiviral que se han descrito [5-8,10-12,37].

**Tabla 5. Componentes de la leche humana con actividad anti-VIH [5, 6, 37].**

Humorales	Celulares	Innatos
Anticuerpos VIH-específicos IgG, IgA <sub>s</sub> , IgM	Linfocitos T CD8+ citotóxicos específicos para el VIH	Inhibidor de proteasa de los leucocitos secretores (SLPI)
Quimiocinas: RANTES (CCL5)	Linfocitos T CD4+ cooperadores específicos para el VIH	Lisozima
Citocinas: Interferón $\gamma$ , Interleucinas 1 $\beta$ , 6, 8 y 10, factor de crecimiento transformante (TGF) $\beta$ , $\beta$ - defensina, S-selectina, L- selectina	Células asesinas naturales (NK)	Lactoferrina, fibronectina, mucina , proteínas polianiónicas
Anticuerpos naturales	Macrófagos	Lípidos
CD14		
Molécula de adhesión intracelular I (ICAM-1) y molécula de adhesión vascular I (VCAM-1)		

### 2.3.7 Glicoconjugados de la leche humana con actividad anti-VIH

En el caso del VIH-1, se han descrito varias especies de glicoconjugados que participan en la interacción del virus con su célula blanco.

Por otra parte, la leche humana contiene algunas especies de glicoconjugados, como los glicosaminoglicanos y compuestos sulfatados que pueden inhibir la unión de GP120 al receptor CD4 en un ensayo inmunoenzimático de ELISA y la infección *in vitro* de cepas de referencia del VIH-1 [12, 39, 40]. También la lactoferrina que proviene de la leche humana madura y el calostro, puede inhibir la fusión y entrada del VIH-1 en las células T MT4 humanas (mediante la inducción

de un efecto citotóxico) [9, 12, 41, 42]. Así como la mucina tipo 1 (MUC 1) y la lipasa estimulada por sales biliares (*BSSL* por sus siglas en inglés) cuentan con un epítipo de Lewis X que se une a la molécula de adhesión intercelular-3 no integrina específica de células dendríticas (*DC-SIGN* por sus siglas en inglés), bloqueando de ésta manera, la interacción del VIH-1 con las células dendríticas, y evitando la transmisión del virus a partir de las células dendríticas a las células T CD4+ [43-45]. Por lo tanto, este tipo de compuestos, podrían influir en la transmisión vertical del VIH-1 durante la lactancia si están presentes en concentraciones relevantes en la leche.

#### **2.4 Técnicas de cromatografía para la separación de especies de glicoconjugados**

Las técnicas más utilizadas para la extracción y la purificación de los glicolípidos de diferentes fluidos o tejidos biológicos son las técnicas cromatográficas.

La cromatografía es un proceso de separación de varios compuestos que se encuentran en una mezcla, a través de su distribución entre dos fases: una fase estacionaria y una fase móvil. Consiste en la aplicación de la muestra que se desea analizar sobre la fase estacionaria que puede ser una superficie adsorbente, como sílica, alumina o celulosa y una vez aplicada la muestra, la fase móvil, ya sea un gas o un líquido, pasa a través de la fase estacionaria, de tal manera, que la mezcla de sustancias es separada dentro de sus componentes de acuerdo con su naturaleza química. Existen compuestos que se mantienen adsorbidos en la fase estacionaria por un tiempo prolongado, mientras que los otros compuestos se distribuyen selectivamente y en orden en la fase móvil, según su coeficiente de distribución [46-48]. Las técnicas cromatográficas proporcionan un estimado cuantitativo de cada componente de la mezcla [49].

Existen diferentes tipos de cromatografía y además, diversas maneras de clasificarlas. Una clasificación se realiza con base en la presentación de la fase estacionaria y se dividen en: **cromatografía en columna** y **cromatografía plana**. En la cromatografía en columna la fase estacionaria se encuentra dentro de una columna o tubo angosto y la fase móvil se hace pasar a través de la columna por efecto de la gravedad o por una presión aplicada. Mientras que la cromatografía plana consta de una fase estacionaria sujeta o adherida a un soporte rígido, por la que se asciende la fase móvil [48, 49].

#### 2.4.1 Cromatografía en columna de ácido silícico

En el caso particular de la cromatografía que comúnmente se utiliza para llevar a cabo la separación de los lípidos extraídos en las fracciones de lípidos neutros, glicolípidos y fosfolípidos, la fase estacionaria consiste en ácido silícico empacado generalmente en una columna de vidrio y la fase móvil está compuesta generalmente de mezclas de solventes con diferente polaridad, que puede cambiar de acuerdo con la cantidad de metanol o agua utilizada [50, 51].

Existen dos formas de interacción de los lípidos con el ácido silícico: a través de un puente de hidrógeno y por la unión electrostática. La formación del puente de hidrógeno, es posible, por a la presencia de grupos Si=O, Si-O-Si y Si-OH en el ácido silícico. Mientras que la unión electrostática se trata de reacciones de intercambio iónico que ocurren por la transferencia de protones del grupo Si-OH con grupos aceptores de protones (fosfato, sulfato y amino) de los lípidos iónicos. Por ejemplo, los lípidos no iónicos como el colesterol, los glicéridos, etc. que son menos polares que los cerebrósidos y las ceramidas, se eluyen con cloroformo estabilizado con metanol al 0.25% [51].

### 2.4.2 Cromatografía en capa fina (CCF)

El término **cromatografía en capa fina** (CCF o *TLC* por sus siglas en inglés) es un método que permite identificar a los componentes en un sistema de distribución de lámina, ya que la fase móvil asciende por la fase estacionaria debido al efecto de capilaridad. Es además una cromatografía plana, ya que los soportes rígidos (como es el vidrio, aluminio, etc.) son planos de igual manera que la cromatografía en papel [47, 52, 53]. Esencialmente se utilizan como adsorbentes (fase estacionaria) el gel de sílice y la alúmina. Ya que realizan la separación por medio de la retención de los compuestos sobre la superficie mediante una combinación de fuerzas de ácido de Lewis y base de Lewis; dichas fuerzas actúan con diferente intensidad sobre cada componente de la muestra. El tamaño del adsorbente también es de suma importancia, porque varios factores que influyen en la separación de los componentes de la mezcla dependen del tamaño del adsorbente. Con un adsorbente de gran tamaño, la fase móvil atraviesa rápidamente la fase estacionaria y no permite que las fuerzas lleguen al equilibrio, además de que el número de puntos de contacto se reduce, por lo que desciende la eficacia de algunas separaciones a medida que aumenta el tamaño de la partícula. Por lo tanto, es importante elegir la partícula de adsorbente del menor tamaño y la velocidad de flujo más alta que permita la separación de los componentes de la mezcla. También se ha encontrado que a mayor longitud de la placa, la separación es mejor, debido a que las fuerzas que efectúan la separación, tienen más oportunidad de actuar sobre cada componente [52-54].

Las fracciones de los lípidos que se eluyen en la cromatografía en capa fina, se prueban y comparan al mismo tiempo con estándares comerciales de composición conocida, con el fin de determinar la composición de la muestra y su grado de pureza [52-53, 55].



## **3. MATERIALES**

### **3.1. Material biológico**

#### **3.1.1. Leche humana**

Las muestras de leche humana, que se utilizaron en este proyecto, fueron excedentes de donaciones anónimas de leche que no pudieron ser usadas para alimentar a los infantes por diversas razones. Las diferentes especies de glicolípidos sulfatados se obtuvieron a partir de una mezcla de leches humanas obtenidas de 38 mujeres donadoras del banco de leches humanas de Nueva Inglaterra en Boston, Massachusetts, Estados Unidos. La mezcla de leches se liofilizó y se mantuvo en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso para la extracción de los glicoconjugados.

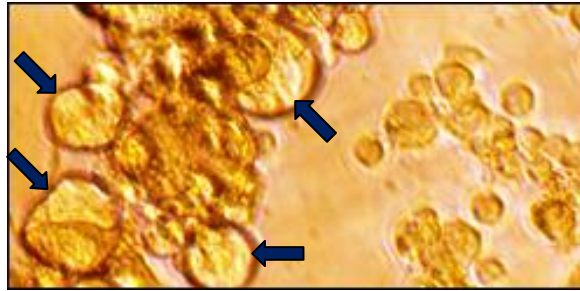
#### **3.1.2. Estándares de glicoconjugados**

Se utilizaron los estándares comerciales de galactosilceramida, lactosilceramida y sulfatados de cerebro bovino de la marca SIGMA/ALDRICH®, que se utilizaron como controles para los ensayos de CCF y para los ensayos celulares, como controles de glicoconjugados obtenidos de una fuente biológica distinta a la leche humana. También se utilizó como estándar de ácidos grasos la fracción superior que se obtuvo durante el fraccionamiento de lípidos extraídos de la leche humana y que se describe más adelante.

#### **3.1.3. Líneas celulares humanas**

Se utilizaron dos líneas celulares de monocitos humanos que se han descrito como modelos de infección para el VIH-1: THP-1 y U937; y como modelo de infección de los linfocitos T se utilizó la línea celular MT-2. La línea celular THP-1 se deriva de una población heterogénea de cultivos de células tumorales a partir de muestras de pacientes con leucemia monocítica. Las células U937, pertenecen

a una línea celular que se aisló de un paciente con linfoma histiocítico; son susceptibles a infectarse por aislados del VIH-1 (X4). Las células MT2 se obtuvieron a partir de células de leucemia T humanas y son muy usadas para evaluar la formación de sincicios (células gigantes multinucleadas) en los ensayos de titulación de aislados virales linfotrópicos (**Figura 7**).



**Figura 7. Sincicios formados en la línea celular MT-2 (señalados con flechas).**

Las líneas celulares de monocitos humanos THP-1 y U937 se adquirieron del ATCC (por sus siglas en inglés American Type Culture Collection) the Global Bioresource Center de Estados Unidos, a través del Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. En el caso de la línea celular de linfocitos humanos MT-2, se obtuvo del fondo de reactivos para la investigación en VIH/SIDA del Instituto Nacional de Salud (*NIH*: National Institute of Health por sus siglas en inglés) de los Estados Unidos de América (*NIH AIDS Research & Reference Reagent Program* por sus siglas en inglés).

#### 3.1.4. Cepas de referencia del VIH-1

El aislado viral que se utilizó para infectar a las células blanco U937 y THP-1 fue: ADA-M, que tiene tropismo para los monocitos; mientras que el aislado IIIB tiene tropismo para los linfocitos T, por lo que se usó para infectar a las células MT-2. Las cepas de referencia del VIH-1, ADA-M y IIIB, se obtuvieron también del *NIH AIDS Research & Reference Reagent Program*.

### **3.2. Medios de cultivo**

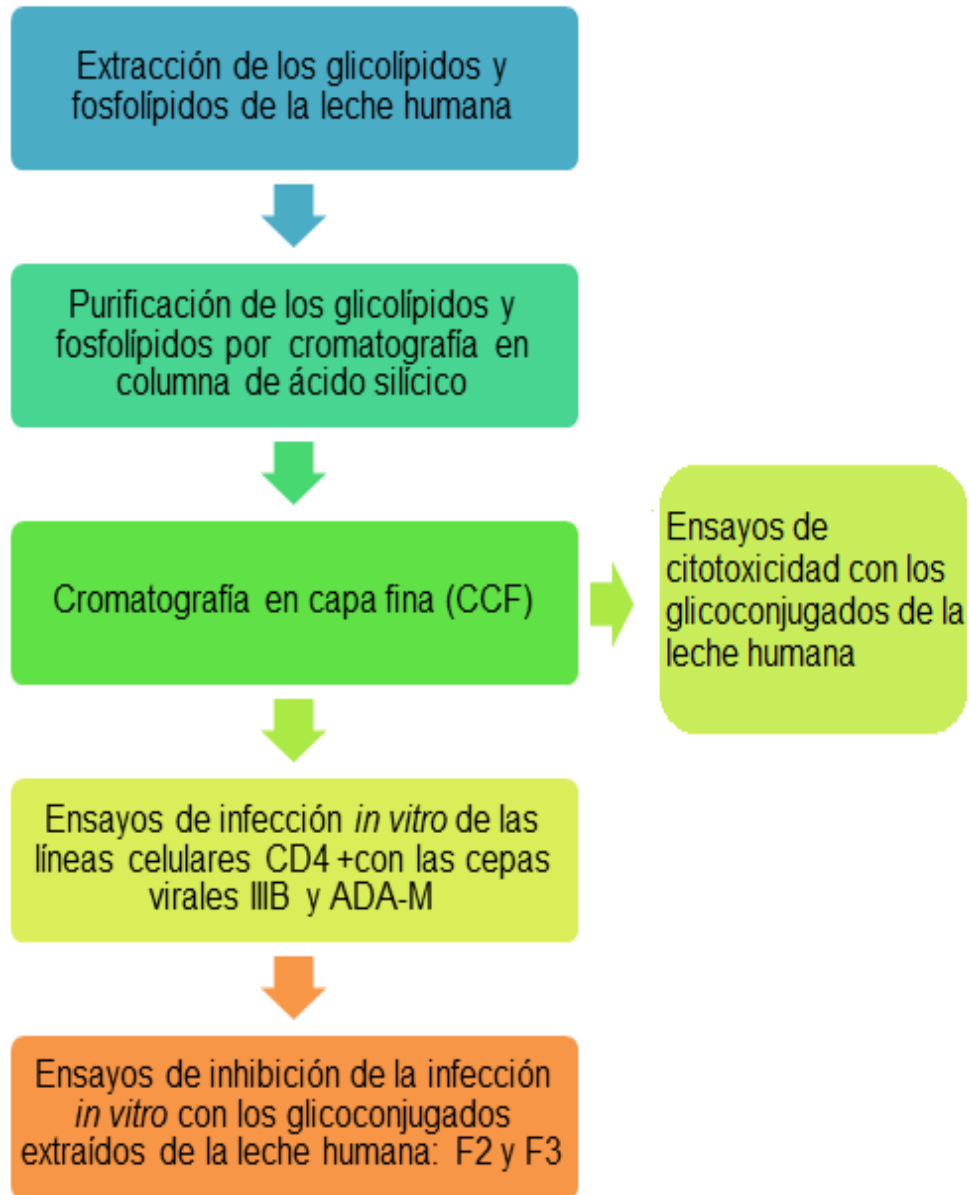
La composición y preparación de los medios de cultivo que se utilizaron en los ensayos celulares, se describen en la sección de métodos.

### **3.3. Material de cultivo, reactivos, equipos e instrumentos de laboratorio**

**Ver anexo.**

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1 Diagrama de trabajo



**Figura 8. Diagrama de trabajo.** Se presenta desde la extracción de los glicoconjugados de la leche, hasta los ensayos de infección *in vitro* con VIH-1.

## 4.2 Extracción de las fracciones de glicolípidos sulfatados y fosfolípidos de la leche humana

### 4.2.1 Extracción de la fracción de lípidos de la leche humana

El método experimental que se realizó para la extracción y la purificación de los glicolípidos sulfatados se basó en el método descrito por Newburg y Chaturvedi [56], con algunas modificaciones para optimizar el rendimiento del proceso.

Los dos litros de la leche humana liofilizada se resuspendieron en 250 ml de agua desionizada y tridestilada. Se extrajeron los lípidos de la leche adicionando 12 volúmenes de cloroformo/metanol 2:1 (3 litros) con respecto al volumen inicial, de la siguiente forma: primero se adicionó 1 litro de metanol y se dejó en agitación vigorosa a temperatura ambiente durante 2 horas; posteriormente se adicionó 1 litro de cloroformo y se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 2 horas. Finalmente se adicionó 1 litro más de cloroformo y se dejó en agitación a temperatura ambiente durante toda la noche. Para establecer el radio de distribución de lípidos de Folch et al [57] en 8:4:3 (cloroformo/metanol/agua) en la mezcla, al siguiente día se adicionaron 500 ml de agua desionizada y tridestilada a la mezcla y se agitó vigorosamente durante 5 minutos. Se observó la formación de tres fases: la fase superior (líquido transparente, incoloro), la fase intermedia (sólido blanco, de consistencia cremosa) y la fase inferior (líquido amarillo, transparente y oleoso).

Se removió el mayor volumen posible de la fase superior mediante decantación y con ayuda de una pipeta. Las fases intermedia e inferior fueron separadas mediante filtración, con ayuda de un embudo de cola larga y papel filtro. En este paso se descartaron las proteínas hidrofílicas, que interfieren en la extracción de los lípidos, por lo que su precipitación facilitó su eliminación. La fase inferior de la filtración se centrifugó a 1400 rpm (560 xg) durante treinta minutos y se observaron tres fases: la fase superior (líquido transparente), fase intermedia (anillo blanco) y la fase inferior (líquido amarillo, transparente y oleoso). Las fases

superior e intermedia se extrajeron con pipetas Pasteur de vidrio, cuidando de no tomar la parte de la fase inferior.

Terminado el proceso anterior, todas las fases inferiores se recolectaron en un galón ámbar. La fase inferior se lavó con 400 ml de la solución teórica de la fase superior (solución TUP por sus siglas en inglés: *theoretical upper phase*), que está constituida por cloroformo/metanol/agua 3:48:47 vol/vol/vol y que contiene cloruro de potasio (KCl) 0.1 M. Se mezcló vigorosamente la fase inferior con la TUP solution durante 10 minutos, haciendo pausas para liberar los gases y dejándola reposar toda la noche. Una vez separada la mezcla en dos fases, se descartó la fase superior (líquido transparente, incoloro) y se mantuvo la fase inferior en el galón (líquido ligeramente amarillo, translúcido).

Después de lavar la fase inferior con la solución TUP, se concentró en un rota-evaporador hasta reducir su volumen a 150 ml aproximadamente. Se trabajó a una temperatura de 55°C, a una velocidad de rotación del matraz de 70 a 80 rpm y a una presión de 15 mm Hg con ayuda de una bomba, para eliminar el cloroformo residual. Se obtuvo un líquido amarillo intenso de consistencia oleosa y translúcida.

#### 4.2.2 Fraccionamiento de los lípidos

Los lípidos de la fase orgánica inferior se fraccionaron con una mezcla de metanol acuoso al 88% y hexano, como se describe a continuación. El producto obtenido de la concentración por rota evaporación (lípidos de la fase orgánica inferior) se transfirió a un embudo de separación, en el cual también se añadieron 150 ml de metanol acuoso al 88% y 300 ml de hexano. La mezcla se agitó vigorosamente durante 5 minutos, liberando ocasionalmente los gases y dejando inmóvil el embudo para distinguir las fases y poder separarlas. Ambas fases se recolectaron por separado: la fase superior, que es el hexano, tiene un alto contenido de triglicéridos y la fase inferior, que es el metanol acuoso al 88%, contiene a las diferentes especies de glicolípidos y de fosfolípidos. La fase superior se decantó y

se descartó. A la fase inferior se le realizó una serie de seis lavados con hexano para extraer una mayor cantidad de triglicéridos. Las fases inferiores que se obtuvieron de los lavados, se recolectaron y se concentraron en un rota-evaporador hasta reducir su volumen a 160 ml aproximadamente. La concentración de la fase inferior se realizó a una temperatura de 55°C del baño María y con una velocidad de rotación del matraz de 80 rpm. Cuando se observó que ya no se destilaba el metanol, se aumentó la temperatura paulatinamente en 1 °C cada 5 minutos, hasta llegar a 60°C.

#### 4.2.3 Hidrólisis alcalina y neutralización de los lípidos

El extracto de lípidos de la fase inferior se transfirió a un recipiente ámbar de 4 litros con tapón de rosca, para realizar la reacción de hidrólisis alcalina con una solución de hidróxido de sodio metanólico 0.6 N preparada con 300 ml de NaOH 0.6 M en metanol y 300 ml de cloroformo, la reacción se llevó a cabo durante una hora a temperatura ambiente. La reacción de hidrólisis alcalina se neutralizó al adicionar 450 ml de una solución de ácido clorhídrico 0.4 M, e inmediatamente después se adicionaron 300 ml de metanol y 900 ml de cloroformo. La mezcla se agitó suavemente por 5 minutos y se dejó en reposo toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente se observó la separación de las dos fases, la fase superior que contiene sales y productos de hidrólisis, se descartó, mientras que la fase inferior (150 ml aproximadamente) se transfirió a un embudo de separación y se lavó dos veces con el mismo volumen (150 ml) de la solución TUP. Durante los lavados, la mezcla de reacción se agitó vigorosamente durante 10 minutos, se dejó en reposo para permitir la separación de las dos fases y finalmente se colectaron las fases inferiores. La fase inferior que contiene a los glicolípidos, se concentró primero en un rota-evaporador a 59°C y 80 rpm hasta reducir su volumen a 50 ml. La mezcla se secó posteriormente en un evaporador analítico a 60°C, en presencia de nitrógeno gaseoso. Es necesario que la mezcla de lípidos se seque en presencia de nitrógeno, ya que la atmósfera inerte que éste genera, evita la oxidación irreversible de los glicolípidos presentes [55].

Una vez concentrada la **fracción de lípidos**, se obtuvieron **9 ml de un líquido amarillo, transparente y oleoso**, que se almacenaron en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su purificación en la columna de ácido silícico.

### 4.3 Purificación de los glicolípidos sulfatados y fosfolípidos de la leche humana

#### 4.3.1 Estandarización de la cromatografía en columna de ácido silícico

Las columnas de ácido silícico son utilizadas para la separación de extractos de lípidos totales de tejidos o fluidos biológicos, en clases individuales de lípidos; de manera general, las 3 clases en las que se separan son: lípidos neutros, glicolípidos y lípidos polares [56, 58].

Primero se estandarizaron las condiciones de corrida para la cromatografía de ácido silícico en una pipeta Pasteur de vidrio, con estándares de lípidos y después se utilizó una pipeta serológica de vidrio de 10 ml (8 mm de diámetro y 150 mm de longitud) para el corrimiento de la muestra total de lípidos extraída de la leche humana. En ambos casos se colocó un tapón de fibra de vidrio en la parte inferior, para posteriormente empaquetar la columna con el ácido silícico en polvo 100-200 Mesh-Unisil. Con el fin de obtener una buena separación de sulfatados en una columna de ácido silícico, se recomienda pesar 75 veces más ácido silícico por cada unidad de peso de compuestos sulfatados, por lo que se pesaron 15 mg de ácido silícico para separar 200  $\mu\text{g}$  del estándar de sulfatados en la columna montada en la pipeta Pasteur y 1.5 gr de ácido silícico para separar aproximadamente 2 mg de la mezcla de lípidos extraída de la leche humana.

Preparación de la columna montada en una pipeta Pasteur: se colocó un tapón de fibra de vidrio en la punta de una pipeta Pasteur de vidrio y posteriormente se adicionaron 2 ml de cloroformo, para verificar que fluyera de manera constante por goteo y en caso de que fluyera rápidamente, el tapón era ajustado. Se consideró como un flujo adecuado, el contar de 25 a 70 gotas por minuto. Se pesaron 15 mg



de ácido silícico, que se rehidrataron con 30 ml de cloroformo durante 20 minutos y se adicionaron en la columna (pipeta Pasteur). Debido a que el ácido silícico es un polvo fino, que tarda en aumentar su volumen cuando se hidrata, se hace uso del tapón de fibra de vidrio, ya que así se evita su salida de la columna. Se siguió el mismo procedimiento para cada columna montada para la estandarización. Una vez empacada la columna con el ácido silícico, se equilibró realizando la siguiente serie de lavados con solventes orgánicos:

- 1) Un lavado con 2.2 ml de cloroformo
- 2) Tres lavados con 6.6 ml de cloroformo/metanol (95:5)
- 3) Tres lavados con 6.6 ml de acetona/ metanol (9:1)
- 4) Un lavado con 2.2 ml de metanol
- 5) Un lavado con 2.2 ml de cloroformo.

Preparación de la mezcla de estándares: los estándares de sulfatados (Sulf) y ácidos grasos (AG) se resuspendieron en cloroformo/metanol (2:1), de acuerdo con el volumen indicado en los viales (frasquitos) y se preparó una mezcla de 100  $\mu$ l de sulfatados (1  $\mu$ g/ $\mu$ l y 1.8  $\mu$ g/ $\mu$ l, según el caso) y 20  $\mu$ l de ácidos grasos; luego se secó la mezcla en el evaporador analítico con nitrógeno gaseoso y se resuspendió en cloroformo o cloroformo/metanol (2:1).

Cromatografía en columna de ácido silícico: la mezcla se cargó en la columna y se permitió la salida del solvente; una vez que el flujo cesó, la muestra se eluyó con los diferentes volúmenes de las mezclas de solventes, en el orden establecido y colectando cada fracción en tubos de vidrio con tapón de rosca. Las muestras eluidas de la columna de ácido silícico, se concentraron en el evaporador analítico a baño María a 56°C y con nitrógeno gaseoso, hasta quedar secas y se almacenaron a -20°C, hasta realizar la cromatografía en capa fina (CCF).

Los lípidos se separaron utilizando cloroformo, metanol y acetona para incrementar la polaridad de los compuestos y eluir de forma selectiva las clases de lípidos en la columna de ácido silícico (ver **Tabla 6**).

**Tabla 6. Estandarización de las condiciones de elución de la cromatografía en columna de ácido silícico.**

	Estándares resuspendidos en	Fracción F1	Fracción F2	Fracción F3	Fracción F4
<b>Estandarización 1</b>	200 µl de cloroformo	400 µl de cloroformo	400 µl de cloroformo/metanol (95:5)	400 µl de metanol	1 ml de metanol
<b>Estandarización 2</b>	200 µl de cloroformo	1 ml de cloroformo	1 ml de acetona/metanol (9:1)	1 ml de metanol	1 ml de cloroformo
<b>Estandarización 3</b>	500 µl de cloroformo	500 µl de cloroformo	1 ml de acetona/metanol (9:1)	1 ml de metanol	----
<b>Estandarización 4</b>	200 µl de cloroformo	500 µl de cloroformo	1 ml de acetona/metanol (9:1)	1 ml de metanol	----
<b>Estandarización 5</b>	200 µl de cloroformo/metanol (2:1)	400 µl de cloroformo	400 µl de acetona/metanol (9:1)	400 µl de metanol	600 µl de metanol
<b>Estandarización 6</b>	200 µl de cloroformo/metanol (2:1)	400 µl de cloroformo	400 µl de cloroformo/metanol (95:5)	400 µl de metanol	600 µl de metanol
<b>Estandarización 7</b>	200 µl de cloroformo	400 µl de cloroformo	400 µl de acetona/metanol (9:1)	400 µl de metanol	600 µl de metanol
<b>Estandarización 8</b>	200 µl de cloroformo	400 µl de cloroformo	400 µl de cloroformo/metanol (95:5)	400 µl de metanol	600 µl de metanol

En la **Tabla 6** se describen las diferentes condiciones de elución de la cromatografía en columna de ácido silícico que se probaron con los estándares de sulfatados y de ácidos grasos, para posteriormente realizar la separación de los glicolípidos sulfatados de la leche humana en una columna de mayor tamaño (pipeta serológica de 10 ml).

#### 4.3.2 Estandarización de la cromatografía en capa fina (CCF)

Para identificar y separar a los glicolípidos sulfatados y fosfolípidos de la leche humana, se realizó una cromatografía en capa fina. En un tanque para cromatografía se colocó un papel filtro con las medidas del ancho de la cámara y de 2 centímetros por debajo de la altura de la misma; posteriormente la fase móvil se añadió al tanque para cromatografía hasta una altura de 1 centímetro, y se dejó equilibrar durante 2 horas (sin mover). La fase móvil consistió en cloroformo/metanol/ácido acético/agua (65:25:3:1) vol. /vol. /vol. Pasado el tiempo para equilibrar la cámara, se introdujo la placa (placa de vidrio con sílica gel de 10 x 10 cm, con tamaño de poro 60, marcada con F<sub>254</sub> de Merck®) y se dejó el tiempo necesario para que la fase móvil ascendiera por toda la placa. Esto se realizó con el fin de lavar previamente la placa, antes de aplicar las muestras en la misma. Una vez lavada la placa, se sacó del tanque y se dejó secar en una campana de extracción para posteriormente, marcar las líneas de aplicación de las muestras. Las fracciones colectadas de la columna de ácido silícico, se re suspendieron en cloroformo o en una mezcla de cloroformo/metanol (2:1) y se aplicaron en la placa de CCF con ayuda de una jeringa de vidrio Hamilton, distribuyendo pequeñas gotas en forma de una línea horizontal de 5 mm de longitud y a 1 cm de distancia del borde inferior de la placa. En la **Tabla 7** se presentan las condiciones que se probaron para correr los estándares y las muestras de lípidos en la cromatografía en capa fina.

Terminado lo anterior, se corrió la placa en la cámara de cromatografía previamente equilibrada, hasta que la fase móvil llegara a la línea marcada 1 centímetro antes del borde superior. Antes de revelar la placa con el colorante, se requiere secarla con la ayuda de una parrilla con temperatura controlada en un intervalo de temperatura de 100 a 120°C. Una vez seca y evaporados los solventes de la placa, ésta se colocó en la cámara para revelado, donde se aplicó el colorante  $\alpha$ -naftol con la ayuda de un spray para rociar la placa de forma homogénea. Se probaron dos colorantes que se utilizan para la identificación de carbohidratos:  $\alpha$ -naftol y antrona, y se observó que el primero revelaba claramente

las bandas de corrimiento de los estándares utilizados y que presentó un menor fondo de la tinción, por lo que se eligió al  $\alpha$ -naftol para trabajar con las muestras. Una vez rociada la placa con el colorante, se calentó en la parrilla a 100-120°C, hasta que se observó la aparición de las bandas definidas; en caso contrario, la placa se dejó enfriando para repetir la aplicación del colorante y el calentamiento de la placa. No se recomienda calentar la placa por más de 15 minutos para minimizar el fondo de la tinción.

**Tabla 7. Estandarización de las condiciones para la cromatografía en capa fina (CCF).**

	<b>Solvente utilizado para resuspender las muestras</b>	<b>Volumen de la muestra aplicado en la placa de CCF</b>
<b>Estandarización 1</b>	100 $\mu$ l de cloroformo	2.5 $\mu$ l y 5 $\mu$ l
<b>Estandarización 2</b>	50 $\mu$ l de cloroformo/metanol (2:1)	2.5 $\mu$ l y 5 $\mu$ l
<b>Estandarización 3</b>	50 $\mu$ l de cloroformo/metanol (2:1)	5 $\mu$ l y 10 $\mu$ l
<b>Estandarización 4</b>	50 $\mu$ l de cloroformo/metanol (2:1)	5 $\mu$ l y 10 $\mu$ l
<b>Estandarización 5</b>	50 $\mu$ l de cloroformo/metanol (2:1)	10 $\mu$ l
<b>Estandarización 6</b>	50 $\mu$ l de cloroformo/metanol (2:1)	10 $\mu$ l
<b>Estandarización 7</b>	50 $\mu$ l de cloroformo/metanol (2:1)	10 $\mu$ l
<b>Estandarización 8</b>	50 $\mu$ l de cloroformo/metanol (2:1)	10 $\mu$ l

### 4.3.3 Purificación de las fracciones de glicolípidos de la leche humana

La estandarización de las condiciones del corrimiento de los estándares en la columna de ácido silícico, fue útil para establecer las condiciones de corrimiento de las fracciones de glicolípidos de la leche humana, para las cuales se trabajó en las mismas condiciones pero utilizando un volumen mayor de los solventes. Se pesaron 1.5 g de ácido silícico que se rehidrataron con 30 ml de cloroformo durante 20 minutos y se cargó la columna, en este caso fue una pipeta serológica de 10 ml. Antes de adicionar el extracto de lípidos de la leche humana a la columna, ésta se equilibró realizando la siguiente serie de lavados:

- 1) 22 ml de cloroformo
- 2) 66 ml de cloroformo/metanol (95%:5%)
- 3) 66 ml de acetona/ metanol (9:1)
- 4) 22 ml de metanol
- 5) 22 ml de cloroformo.

La mezcla de lípidos extraídos de la leche humana (9 ml de un líquido amarillo, transparente y oleoso) se cargó en la columna de ácido silícico (en cuatro partes de 2 ml y una parte de 1 ml) y se permitió la salida del solvente donde se encontraba diluida la muestra. Para la elución de la muestra se realizaron las siguientes condiciones de elución:

- 1) Adicionar 20 ml de cloroformo. A esta fracción se le llamó **F1**
- 2) Adicionar 20 ml de acetona /metanol (9:1). A esta fracción se le llamó **F2**
- 3) Adicionar 20 ml de metanol. A esta fracción se le llamó **F3**
- 4) Adicionar 10 ml de metanol. A esta fracción se le llamó **F4**.

Las fracciones eluidas de la columna se recolectaron en tubos de vidrio con tapón de rosca y se concentraron en el evaporador analítico en baño María a 56°C y con nitrógeno gaseoso para evitar la oxidación de los compuestos.

#### 4.3.4 Identificación de las fracciones de glicolípidos de la leche humana

Para analizar la composición de la mezcla de lípidos de la leche en la cromatografía en capa fina, se realizó el mismo procedimiento que para los estándares de sulfatados. Se utilizó como fase móvil la mezcla de cloroformo/metanol/ácido acético/agua (65:25:3:1) vol. /vol. /vol./vol. Después de equilibrar la cámara, se lavó la cromatoplaqueta y se dejó secar antes de aplicar las muestras. Las fracciones de la leche y los estándares de sulfatados, lactosilceramida y galactosilceramida se resuspendieron en 5 ml de cloroformo/metanol (2:1) y se aplicaron 5 y 10  $\mu$ l de cada fracción en sus respectivas líneas, con ayuda de una jeringa para HPLC. El tiempo de migración de las muestras en la placa fue alrededor de 25 minutos o hasta 1 cm de distancia del borde superior de la placa. Una vez terminado el corrimiento de las muestras, la placa se sacó del tanque para secarse en la campana de extracción y una vez seca, se colocó en la cámara para revelado, donde se aplicó  $\alpha$ -naftol, como colorante de revelado. La placa se calentó en una parrilla a 120°C durante aproximadamente 5 minutos o hasta que se observó la aparición de bandas bien definidas.

## 4.4 Ensayos celulares

Las técnicas de cultivo celular que se utilizaron en este trabajo, están basadas principalmente en los métodos descritos en el Manual de Virología del Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas (*NIAID* por sus siglas en inglés) de los Institutos Nacionales de Salud (*NIH* por sus siglas en inglés) de EUA [59], aunque se realizaron algunas modificaciones con el fin de optimizar las condiciones experimentales llevadas a cabo en nuestro laboratorio.

### 4.4.1 Cultivo *in vitro* de las líneas celulares humanas CD4 positivas: MT2 y THP-1

Para los ensayos de inhibición de la infección por el VIH-1 con los glicoconjugados de la leche humana, se utilizaron como células blanco para el virus, las líneas celulares humanas MT-2, THP-1 y U937, las cuales expresan al marcador de superficie celular CD4 que es el receptor principal al que se une el VIH-1.

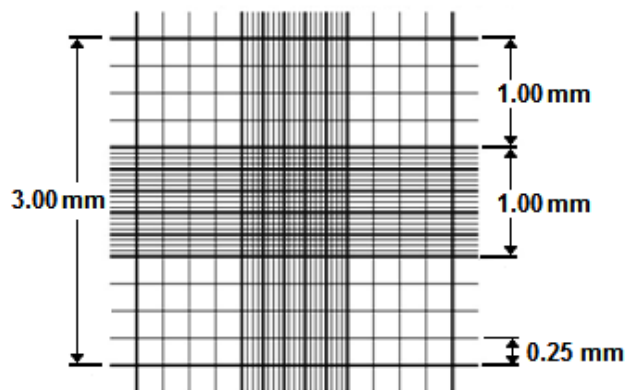
El medio utilizado para el cultivo de la línea celular MT-2 fue: medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina a concentraciones de 10,000 U/ml y 10 mg/ml, respectivamente) y 1% de L-glutamina (200 mM). Para las líneas de monocitos, THP-1 y U937, se utilizó el mismo medio de cultivo adicionado además con 1% de piruvato de sodio y 1% de aminoácidos no esenciales.

Las líneas celulares se mantuvieron en cultivo a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y 85% de humedad a una concentración de 0.2 a 0.5x10<sup>6</sup> células/ml en el caso de las células THP-1 y U937, mientras que las MT-2 se mantuvieron en una concentración de 0.5x10<sup>6</sup> células/ml. El medio de cultivo se cambió cada 48 horas, posterior a una centrifugación de 600 xg (1500 rpm) durante 5 minutos. Las células se cosecharon durante la fase logarítmica o de crecimiento exponencial, para utilizarlas en los ensayos de infección.

#### 4.4.2 Determinación de la viabilidad celular en cámara de Neubauer

Para llevar a cabo el mantenimiento adecuado de las células cultivadas, se realiza un conteo celular. Uno de los métodos más comunes es el conteo de la viabilidad celular por medio de la técnica de exclusión del colorante azul de tripán en la cámara de Neubauer. Su fundamento se enfoca en el conteo de las células viables, a la vez que se pueden distinguir de aquellas que se encuentran muertas. Por ello, el método se basa en la capacidad de las células viables para ser impermeables al colorante, y por el contrario las células no viables van a presentar una membrana comprometida, por lo que absorben una parte del colorante. Y gracias a esta diferencia de absorción es posible observar en el microscopio a las células viables con una apariencia clara y un anillo refráctil alrededor, mientras que las células muertas aparecen con un color azul oscuro y sin anillo refráctil [60].

El método consiste en mezclar 90  $\mu\text{l}$  del colorante azul tripán con una alícuota de 10  $\mu\text{l}$  de la suspensión celular, para obtener una dilución 1:10. Se toman 50  $\mu\text{l}$  de la mezcla de colorante con la suspensión celular y se depositan en la cámara de Neubauer. Se dejó sedimentar la suspensión de células en la cámara durante al menos 10 segundos antes de realizar el conteo al microscopio. La cámara de Neubauer tiene una superficie marcada con nueve cuadrados primarios. El conteo de los leucocitos se realiza en los cuadrados de las cuatro esquinas (**Figura 6**) [60, 61].



**Figura 9. Esquema de la cámara de Neubauer** (tomada y modificada de [62]).



Para determinar el número de células viables, se cuentan solamente las células que no se tiñen con el colorante, y se tomaron en cuenta los siguientes factores:

- $10^1$  = factor de dilución de las células en el colorante: 90  $\mu$ l de azul tripán + 10  $\mu$ l de la suspensión de PBMCs.
- $10^4$  = factor de corrección de la cámara: se emplea para convertir el número de células contadas en un volumen de  $1 \times 10^{-4}$  ml en 1 ml de la suspensión celular original.

El conteo de células se realiza en ambos retículos de la cámara, por lo que se realiza el conteo de los 8 cuadrados para leucocitos. Después, se descarta el valor más alto y el más bajo, y se obtiene el promedio de la cantidad de células a partir de los datos restantes.

La cantidad de células vivas en 1 ml de la suspensión celular se obtiene a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Cantidad de células/ml} = N \times 10^4 \times 10^1$$

- **N** = promedio de la cantidad de células contadas.

En el caso donde se tenga un volumen mayor a 1 ml de suspensión celular, es necesario considerar el volumen, para conocer la cantidad real de células [60]:

$$\text{Cantidad de células en la suspensión celular} = N \times 10^4 \times 10^1 \times V$$

- **V** = volumen total de la suspensión celular (en ml).

#### 4.4.3 Criopreservación de células

No es recomendable mantener las líneas celulares en cultivo por un tiempo indefinido, ya que pueden sufrir alteraciones en su morfología, patrón de crecimiento o función; por esta razón, se recomienda almacenar las células en congelación a temperaturas muy bajas. Las líneas celulares que se congelan y almacenan de una forma apropiada, pueden permanecer por largos periodos de tiempo (años o incluso indefinidamente) sin alteraciones sustanciales en la viabilidad o en otras características. El método utilizado para congelar células se conoce como criopreservación, y consiste en mantener a las líneas celulares en nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ . El proceso se basa en una congelación lenta y una descongelación rápida. Se utiliza medio de congelación con una alta concentración de proteína, en este caso se utiliza suero fetal bovino y la presencia de un agente criopreservador que incremente la permeabilidad de la membrana celular [como dimetil sulfóxido (DMSO), glicerol, etc.]. El DMSO y el glicerol son criopreservadores penetrantes, por lo que protegen a las células contra el daño causado por la congelación, debido a los cristales de hielo intracelulares y a los efectos osmóticos. Mientras que el suero es un criopreservador no penetrante que las protege del daño por cristales de hielo extracelulares. Debe considerarse la fase de crecimiento en la que se encuentran las células al momento de llevar a cabo la criopreservación, ya que se recomienda realizarse durante la fase de crecimiento exponencial (logarítmica), debido a que las células están activas y en división y tienen una mayor probabilidad de recuperación después de descongelarse [60].

Cuando las células se encontraban en la fase logarítmica en cultivo, se realizó su criopreservación para almacenarlas por tiempo indefinido para experimentos posteriores. Primero se contabilizaron las células de la suspensión celular, y posteriormente se centrifugaron y resuspendieron en el medio de congelación, para almacenar de 1 a 10 millones de células/ml por criovial. A continuación se congelaron por una hora a  $-20^{\circ}\text{C}$  con una disminución de la temperatura de  $1^{\circ}\text{C}$  por minuto, para después ser transferidos al ultra congelador a  $-70^{\circ}\text{C}$ , donde se

almacenaron por 3 o 4 semanas. Y finalmente, se transfirieron al tanque de nitrógeno a  $-196^{\circ}\text{C}$  donde se almacenaron por tiempo indefinido.

#### 4.4.4 Cultivo y propagación de las cepas de referencia IIB y ADA-M del VIH-1

El cultivo de los aislados virales IIB y ADA-M se realizó durante 4 semanas, cambiando el medio de cultivo de 2 a 3 veces por semana y añadiendo las células blanco al cultivo, una vez por semana. Durante el cultivo, cada vez que se cosechó el sobrenadante, se centrifugó a  $800 \times g$  (2000 rpm) durante 10 minutos para eliminar restos de células. El sobrenadante de cultivo se separó en alícuotas de 1.5 a 1.8 ml y se almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se determinó la concentración del antígeno de la cápside viral (antígeno P24), en los sobrenadantes de cultivo, mediante un ensayo inmunoenzimático de ELISA de captura del antígeno. La concentración del antígeno P24 en el sobrenadante de cultivo es directamente proporcional a la concentración del virus presente en la muestra.

En cuanto al cultivo del aislado linfotrópico IIB, se realizó comenzando con  $10 \times 10^6$  células H9 (línea celular de linfocitos humanos), mientras que para el cultivo del aislado macrofagotrópico ADA-M, se utilizaron macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica (MDM) que recubrían el fondo de los pozos de una placa de cultivo.

#### 4.4.5 Determinación de la dosis infectiva media ( $\text{TCID}_{50}$ ) de las cepas del VIH-1

Se trabajó con cepas virales que representaron a los dos tipos de tropismo del VIH-1: R5 (macrofagotrópica) y X4 (linfotrópica). En el caso de la cepa viral linfotrópica, se utilizó a IIB VIH-1; mientras que la cepa viral macrofagotrópica utilizada fue ADA-M. Para determinar la virulencia de los aislados utilizados, se realizaron ensayos de la dosis infectiva 50 del cultivo celular ( $\text{TCID}_{50}$  por sus siglas en inglés). Este método se emplea para titular un aislado viral y conocer aquella

dilución que contiene la cantidad de virus necesaria para infectar al 50% de las células susceptibles [63].

La determinación de la infectividad de las cepas virales del VIH-1 se realizó haciendo diluciones seriadas de base cuatro ( $4^{-2}$  a  $4^{-8}$ ) de los sobrenadantes virales concentrados y se realizó un triplicado de cada dilución (**Figura 7**). En los pozos del título  $4^{-2}$  se adicionaron 200  $\mu$ l del sobrenadante de cultivo de las cepas de referencia diluidas 1:12 y en los pozos correspondientes a los títulos  $4^{-3}$  a  $4^{-8}$ , se adicionaron 150  $\mu$ l del medio de cultivo, con una micropipeta multicanal. Posteriormente se transfirieron con una micropipeta multicanal, 50  $\mu$ l de los pozos correspondientes al título  $4^{-2}$ , a los pozos del título  $4^{-3}$ . Se repitió esta acción sucesivamente hasta descartar 50  $\mu$ l de los pozos rotulados con el título  $4^{-8}$ . Finalmente se adicionaron 50  $\mu$ l de la suspensión celular con una concentración de  $4 \times 10^6$  células/ml a todos los pozos. Alrededor de los pozos con las diluciones del sobrenadante viral, se adicionaron 200  $\mu$ l de solución amortiguadora (buffer) de fosfatos (PBS) 1X para mantener la humedad de la placa de cultivo de 96 pozos (**Figura 7**).

Placa de cultivo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	11	12
A	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
B	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
C	P	P	$4^{-2}$	$4^{-3}$	$4^{-4}$	$4^{-5}$	$4^{-6}$	$4^{-7}$	$4^{-8}$	P	P
D	P	P	$4^{-2}$	$4^{-3}$	$4^{-4}$	$4^{-5}$	$4^{-6}$	$4^{-7}$	$4^{-8}$	P	P
E	P	P	$4^{-2}$	$4^{-3}$	$4^{-4}$	$4^{-5}$	$4^{-6}$	$4^{-7}$	$4^{-8}$	P	P
F	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
G	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
H	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P

**Figura 10. Diagrama de la placa de cultivo de 96 pozos utilizada durante el ensayo de la determinación de TCID<sub>50</sub>.**

La placa se incubó a 37°C, con 5% CO<sub>2</sub> y 85% de humedad. Al cuarto día se resuspendieron las células con la micropipeta multicanal, desplazándose de derecha a izquierda a través de la placa y se descartaron 125 µl de cada pozo los cuales se reemplazaron por 150 µl de medio de cultivo fresco por pozo. La placa se incubó de nuevo en las mismas condiciones de cultivo durante 3 días más. Al día 7, se cosechó el sobrenadante viral y para calcular el título viral, se cuantificó por medio de un ensayo inmunoenzimático de ELISA de captura del antígeno P24. Una muestra se considera positiva cuando el valor del Ag P24 es mayor o igual a 50 pg/ml. El cálculo de la dosis infecciosa media por mililitro de cada sobrenadante de cultivo (TCID<sub>50</sub>/ml), fue analizado por el método estadístico de Spearman-Kärber [63, 64], de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$M = xk + d [0.5 - (1/n) (r)]$$

De donde **xk** = dilución más alta utilizada en el ensayo,  
**r** = es la suma de las muestras negativas (AgP24 < 50 pg/ml),  
**d** = diferencias entre los logaritmos de las diluciones realizadas,  
**n** = número de pozos por dilución.

Para expresar la TCID<sub>50</sub>/ml de sobrenadante viral, la dilución original se corrigió multiplicando el valor calculado por 5, debido a que se emplearon 200 µl para realizar el ensayo.

#### 4.4.6 Ensayos de citotoxicidad con los glicoconjugados de la leche humana

Antes de realizar los ensayos de inhibición de la infección por VIH con los glicoconjugados de la leche, se evaluó si éstos tenían algún efecto tóxico sobre las células CD4+. En un ensayo en placa de cultivo, se adicionaron 4x10<sup>4</sup> células (MT2 o THP-1) por pozo, en un volumen de 100 µl de medio de cultivo, para después añadir diluciones seriadas de las fracciones de glicolípidos sulfatados (F2) y de fosfolípidos (F3) de la leche humana, así como del estándar de

sulfatados de cerebro bovino (Sulf). Este último se utilizó como control de un glicoconjugado que se obtuvo de una fuente natural que no es la leche humana. La mezcla de células y glicoconjugado se incubó durante 2 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> y después se realizaron 2 lavados con PBS 1X. Finalmente, la placa se incubó en las mismas condiciones durante 5 días, en el caso de la línea celular MT-2 y 11 días para las líneas monocíticas THP-1 y U937 y al término de ese período de tiempo se determina la viabilidad celular.

#### **4.4.7 Ensayos de infección *in vitro* de células CD4 positivas con las cepas IIIB y ADA-M del VIH-1**

Se realizaron los ensayos de infección de las células CD4 positivas: MT2, THP-1 y U937, con los aislados virales IIIB y ADA-M, con el fin de definir las condiciones óptimas del número de células y dosis de virus con los que se obtuvo una infección productiva que pudiera ser inhibida posteriormente con los glicoconjugados de la leche humana.

El método consistió en añadir a cada pozo de la placa, los 100 µl de la suspensión celular y las dosis a probar del aislado viral correspondiente. Después, se incubó durante dos horas a 37°C. Posteriormente, se realizaron dos lavados con PBS 1X y se añadió el medio R10, con el que se mantuvieron las células durante el tiempo de incubación. Para el aislado viral IIIB VIH-1 se probaron dosis de 250, 500 pg/ml y 1, 2 y 3 ng/ml de P24 para infectar 40,000 células MT-2/100 µl/pozo durante 5 días. Mientras que con aislado viral ADA-M VIH-1 se probaron dosis de 20, 40 y 80 ng/ml para infectar 25,000 y 50,000 células THP-1 o U937/100 µl/pozo por 11 días. Las células sin virus fueron los controles negativos de infección.

#### 4.4.8 Ensayos de inhibición de la infección *in vitro* de células CD4 positivas por el VIH-1 con los glicoconjugados de la leche humana

Para evaluar el efecto de los glicoconjugados de la leche humana en la infección de los monocitos y linfocitos por el VIH-1, se realizaron ensayos de inhibición de la infección *in vitro* de las células blanco CD4+, con los aislados de referencia del VIH-1.

Primero se prepararon las muestras de las fracciones de glicoconjugados, resuspendiéndolas en solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 1X estéril. Debido a la naturaleza hidrofóbica de las fracciones fue necesario sonicar la suspensión de las fracciones a 37°C en un baño de agua; la concentración de la fracción F2 se ajustó a 10X, mientras que la fracción F3 se ajustó a una concentración de 20X. El rango de concentraciones utilizado para ambas fracciones en los ensayos celulares fue de 5 a 100 µg/pozo. En las **tablas 8 a 11** se indica la proporción de la concentración de cada fracción con respecto a la concentración fisiológica de los glicoconjugados en la leche humana, la cual fue de 40 µg/ml leche de F2 y 96.8 µg/ml leche de F3.

**Tabla 8. Concentraciones de F2 probadas en los ensayos de inhibición de la infección de la línea celular MT-2 por la cepa de referencia IIB del VIH-1.**

Concentración de F2/poro (µg/150 µl)	Concentración de F2 (µg/ml leche)	Proporción de F2 con respecto a la concentración fisiológica en la leche humana
5	33	0.8X
10	67	2X
30	200	5X
50	333	8X
100	667	17X

**Tabla 9. Concentraciones de F2 probadas en los ensayos de inhibición de la infección de las líneas celulares THP-1 y U937 por la cepa de referencia ADA-M del VIH-1.**

Concentración de F2/pozo (µg/150 µl)	Concentración de F2 (µg/ml leche)	Proporción de F2 con respecto a la concentración fisiológica en la leche humana
12.5	83	2X
25	167	4X
50	333	8X
60	400	10X
80	533	13X
90	600	15X
100	667	17X

**Tabla 10. Concentraciones de F3 probadas en los ensayos de inhibición de la infección de la línea celular MT-2 por la cepa de referencia IIB del VIH-1.**

Concentración de F3/pozo (µg/150 µl)	Concentración de F3 (µg/ml leche)	Proporción de F3 con respecto a la concentración fisiológica en la leche humana
5	33	0.3X
10	67	0.7X
30	200	2X
50	333	3X
100	667	7X



**Tabla 11. Concentraciones de F3 probadas en los ensayos de inhibición de la infección de las líneas celulares THP-1 y U937 por la cepa de referencia ADA-M del VIH-1.**

Concentración de F3/pozo ( $\mu\text{g}/150 \mu\text{l}$ )	Concentración de F3 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ leche)	Proporción de F3 con respecto a la concentración fisiológica en la leche humana
50	333	3X
100	667	7X

Para el **aislado viral IIIB**, se utilizaron dosis de 250 pg/ml, 500 pg/ml, 1 ng/ml y 2 ng/ml. Mientras que para el **aislado viral ADA-M** se utilizaron 40 ng/ml y 80 ng/ml para infectar a las células CD4 positivas.

Las células MT-2 se infectaron con el aislado viral IIIB y se utilizaron 40,000 células/pozo. En el caso de los ensayos de inhibición de la infección de las células THP-1 y U937 por ADA-M, se utilizaron 50,000 células/pozo. Las cantidades de células y las dosis infectivas se determinaron previamente en los ensayos de infección.

Los glicoconjugados en diluciones seriadas se incubaron con 50  $\mu\text{l}$  por pozo de sobrenadante de virus durante 2 horas a 37°C, una atmósfera de 5% de  $\text{CO}_2$  y 85% de humedad. Después se adicionaron 100  $\mu\text{l}$  de la suspensión celular, y se incubaron por 2 horas en las mismas condiciones. Al término de este tiempo, se realizaron dos lavados con PBS 1X. Luego, se añadieron 200  $\mu\text{l}$  de medio a cada pozo, y permanecieron en incubación por 5 u 11 días. Al final, se cosecharon los sobrenadantes de cultivo, se centrifugaron para eliminar restos de células y se realizó un ensayo de ELISA P24 para determinar cuantitativamente la concentración del antígeno de la cápside del virus.

La cantidad de antígeno P24 en la muestra se determina mediante la comparación de su absorbancia con la del estándar de calibración preparado con el antígeno

P24 purificado. Se considera una inhibición significativa de la infección viral, cuando el porcentaje de inhibición de la muestra en presencia de las fracciones de la leche es **mayor o igual al 80%** con respecto a los controles de infección sin adición de los glicoconjugados.

El **porcentaje de inhibición de la infección por el VIH-1** se obtiene utilizando el valor de la concentración del antígeno P24 de cada muestra y se calcula de la siguiente forma:

1) Primero se determina el valor del porcentaje de infección con respecto a los controles.

$$\% \text{ infección} = \frac{\text{concentración de P24 en la muestra}}{\text{concentración de P24 en el control de infección}} \times 100$$

- **Concentración de P24 en la muestra** = cantidad de P24/ml de sobrenadante: se refiere al sobrenadante de cada pozo de cultivo en el que se incubaron el virus + las células + la fracción F2 o F3.
- **Concentración de P24 en el control de infección** = cantidad de P24/ml de sobrenadante: se considera como el promedio de los valores de concentración de P24, determinados a partir de los sobrenadantes de los pozos de cultivo en los que sólo se incubaron el virus + las células.

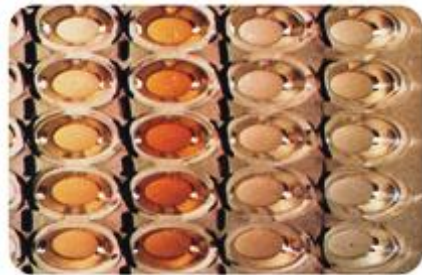
2) Finalmente, el porcentaje de inhibición se obtiene al restar el porcentaje de infección a 100.

$$\% \text{ Inhibición} = 100 - \% \text{ infección}$$

Cada muestra y sus respectivos controles se probaron por triplicado y cuadruplicado en cada experimento, y cada experimento se repitió al menos 3 veces, con el fin de tener el mayor número de réplicas en cada caso.

#### 4.4.9 Cuantificación del antígeno P24 de la cápside del VIH-1 por un ensayo inmunoenzimático de ELISA

El fundamento de este ensayo consiste en determinar la cantidad de antígeno P24 de la cápside del VIH, en el sobrenadante de la muestra a analizar, mediante el uso de un anticuerpo monoclonal anti-P24 adsorbido en el fondo de la placa y la adición posterior de un segundo anticuerpo marcado con una enzima; éste al reaccionar con el sustrato desarrolla un color que se mide por espectrofotometría. En este método se utiliza un estándar del antígeno P24 previamente cuantificado, del cual se hacen diluciones seriadas para generar la curva estándar en la que se interpolan los valores de densidad óptica de las muestras, para obtener el valor de la concentración de antígeno correspondiente. La absorbancia se mide con un espectrofotómetro a 490 nm y la intensidad del color desarrollado es directamente proporcional a la cantidad de antígeno P24 del VIH en la muestra.

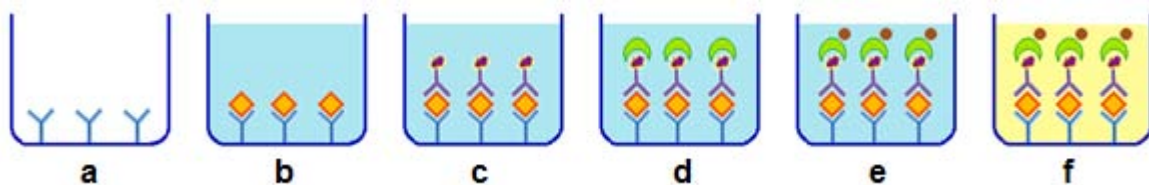


**Figura 11. Pozos del ensayo de ELISA P24.** Los pozos correspondientes a las muestras que contienen antígeno P24 desarrollan una coloración amarilla, que varía en intensidad según la cantidad de antígeno presente: a mayor intensidad, mayor cantidad de proteína P24.

El método de ELISA de captura del antígeno P24 del VIH-1, se realiza conforme se describe en el manual del estuche comercial de Perkin Elmer®. La microplaca del ELISA contiene 12 tiras removibles con 8 pozos cada uno recubierto con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-P24 del VIH-1. A cada pozo se le adicionó un volumen de 200 µl del sobrenadante de cultivo y de cada una de las diluciones de la curva estándar del antígeno, excepto al pozo que sirvió como blanco. La curva estándar se preparó haciendo una dilución inicial con 980 µl de medio de cultivo y 10 µl del control positivo (cuya concentración es de 200 ng P24/ml) a la que se

nombró como dilución A; su concentración fue de 4000 pg P24/ml. Luego, se realizaron diluciones seriadas de la curva estándar que contenían 100, 50, 25 y 12.5 pg P24/ml.

A continuación, se añadieron 20 µl de Tritón X-100 a cada pozo, que actúa como buffer de lisis, excepto a los pozos de las diluciones de la curva estándar y al blanco y se incubaron durante 2 horas a 37°C. Pasado el tiempo de incubación, se realizaron 6 lavados con el buffer de lavado 1X, se agregaron 100 µl de la solución del anticuerpo detector a cada pozo (excepto al blanco) y se incubaron por una hora a 37°C. El anticuerpo detector es un anticuerpo policlonal de conejo anti-P24 y que está biotinilado. Posteriormente, la placa se lavó 6 veces, para después añadir en cada pozo 100 µl de la solución de estreptavidina, con la que se mantuvo en incubación por un tiempo de 30 minutos a temperatura ambiente. Inmediatamente, se hicieron 6 lavados y se adicionaron 100 µl de la solución del sustrato OPD a todos los pozos y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente y protegida de la luz. Finalmente, la solución de paro ( $H_2SO_4$  4N) fue añadida en un volumen de 100 µl/pozo y se procedió a leer la placa en el espectrofotómetro a 490 nm. El espectrofotómetro que se utilizó cuenta con un programa que analiza las absorbancias obtenidas del blanco, la curva estándar y las muestras, para después mostrar la concentración de P24 presente en cada pozo.



**Figura 12. ELISA P24.** a) La microplaca se encuentra recubierta por anticuerpos anti-P24. b) La muestra añadida es lisada por efecto del tritón X-100. c) Después se añade el anticuerpo detector biotinilado. d) La estreptavidina (marcada con peroxidasa de rábano), se une a la parte biotinilada del anticuerpo detector. e) El OPD es utilizado como sustrato de la peroxidasa, dando como resultado un producto colorido. f) Finalmente se añade una solución de paro y se determina la absorbancia de cada pozo en un espectrofotómetro a 490 nm.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Extracción, purificación e identificación de las especies de glicoconjugados de la leche humana (glicolípidos y sulfatados)

Los métodos bioquímicos que se realizaron para la extracción y purificación de las especies de glicolípidos de la leche humana se basaron en el procedimiento original descrito por Newburg y Chaturvedi [56], con algunas modificaciones para obtener un mejor rendimiento en la obtención de los compuestos de la leche. Las modificaciones que se realizaron fueron: 1) aumentar el número de lavados a la fase orgánica inferior que contiene a los glicolípidos durante la fase del fraccionamiento de los lípidos, para extraer una mayor concentración de los mismos. 2) No se realizó la eliminación de sales a través de una columna C-18, ni la cromatografía de intercambio iónico en columna de DEAE celulosa, ya que después de la hidrólisis alcalina y la neutralización del extracto de lípidos, se realizaron lavados adicionales con la solución TUP, que favorece la ionización de los glicolípidos sulfatados y por consecuencia mejora su separación de las sales presentes en el extracto.

La purificación de la fracción de los glicolípidos se realizó en una cromatografía en columna de ácido silícico de la que se obtuvieron cuatro fracciones: F1 a F4, de las cuales se almacenaron las fracciones F2 y F3 para su corrimiento en la CCF, debido a que en estas fracciones se esperaba que eluyeran las especies de glicolípidos presentes en la muestra. Las fracciones F2 y F3 se evaporaron en el evaporador analítico en presencia de nitrógeno gaseoso, para almacenarse a -70°C. En la **Tabla 12** se muestran las cantidades obtenidas de las fracciones F2 y F3.

**Tabla 12. Cantidades extraídas de las fracciones F2 y F3, a partir de 2.4 litros de una mezcla de leches humanas.**

FRACCIÓN	Cantidad de la fracción obtenida a partir de 2.4 L de la mezcla de leches humanas	Concentración fisiológica de las fracciones de la leche humana	Cantidad equivalente a la concentración fisiológica de las fracciones de la leche humana adicionada por pozo ( $\mu\text{g}/150 \mu\text{l}$ )
<b>F2</b>	<b>95.9 mg</b>	40 $\mu\text{g}$ F2/ml leche	6 $\mu\text{g}$ F2/ pozo
<b>F3</b>	<b>232.4 mg</b>	96.8 $\mu\text{g}$ F3/ml leche	14.5 $\mu\text{g}$ F3/pozo

La concentración fisiológica es la relación entre la cantidad total de la fracción y el volumen inicial de la mezcla de leches, mientras que la cantidad equivalente a la concentración fisiológica es la relación de la concentración fisiológica y el volumen que contiene un pozo de una placa de cultivo (150  $\mu\text{l}$ ), es decir, la cantidad de F2 y F3 que se encuentra en 150  $\mu\text{l}$  de leche, y que se consideró para trabajar en los ensayos celulares con concentraciones similares a las fisiológicas.

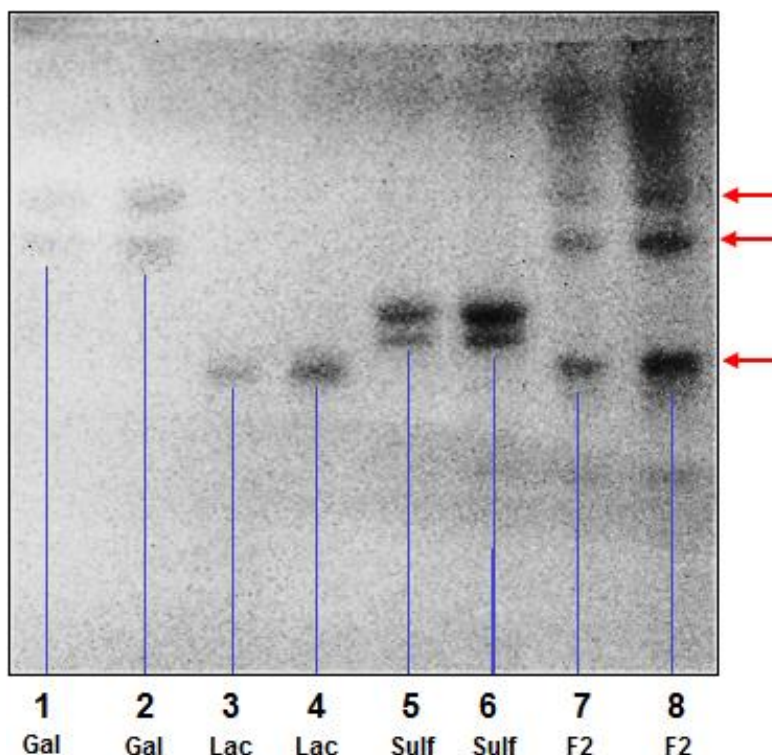
### **Cromatografía en capa fina (CCF)**

Con el fin de identificar las especies de glicolípidos sulfatados presentes en las fracciones F2 y F3 de la leche, que habían sido purificados previamente en la cromatografía en columna de ácido silícico, se realizó una CCF utilizando como fase móvil una mezcla de cloroformo/metanol/ácido acético glacial/agua (65:25:3:1) (v/v/v/v), como se describe en Viveros-Rogel y col. [40]. En esta mezcla de solventes de la fase móvil, se favorece la migración de los siguientes lípidos (a partir de la parte superior de la placa hasta la parte inferior): ácidos grasos, triglicéridos, monoglicéridos y todos los lípidos neutros migran en el frente del solvente hasta la parte superior de la placa. Después migran los diferentes tipos de ceramidas, los sulfatados y las ceramidas compuestas (di y trihexosidas). Los diversos tipos de fosfolípidos presentes en la mezcla, migran en la parte

inferior de la placa y tienden a permanecer cerca del punto de aplicación de la muestra. Se utilizaron como controles de glicolípidos, los estándares comerciales de galactosilceramida (GalCer), lactosilceramida (LacCer) y sulfatados de cerebro bovino (Sulf). Los resultados del corrimiento de las fracciones F2 y F3 de la leche humana y de los estándares comerciales se muestran en las **Figuras 13 y 14**.

La cromatografía en capa fina que se representa en la **Figura 13**, se realizó al finalizar la purificación en la columna de ácido silícico, por lo que se desconocía la cantidad exacta de la fracción F2, y se decidió utilizar dos volúmenes conocidos de la misma. El objetivo de llevar a cabo una primera cromatografía, era conocer si la fracción F2 contenía alguna sustancia que coincidiera con los estándares comerciales, para poder utilizarlos como referencia en la cromatografía en capa fina.

De acuerdo con lo que se observa en la **figura 13**, las líneas 7 y 8 que corresponden a la fracción F2, presentan 3 bandas que coinciden con los estándares de galactosilceramida y lactosilceramida, por lo que se puede pensar que dicha fracción contiene compuestos semejantes a los estándares. Fue posible estimar la concentración de los glicolípidos sulfatados y fosfolípidos extraídos de la leche (líneas 7 y 8 de la figura 8, y líneas 1 y 5 de la figura 9), al comparar la intensidad de las bandas de la fracción F2 con las bandas de los estándares de galactosilceramida y lactosilceramida.



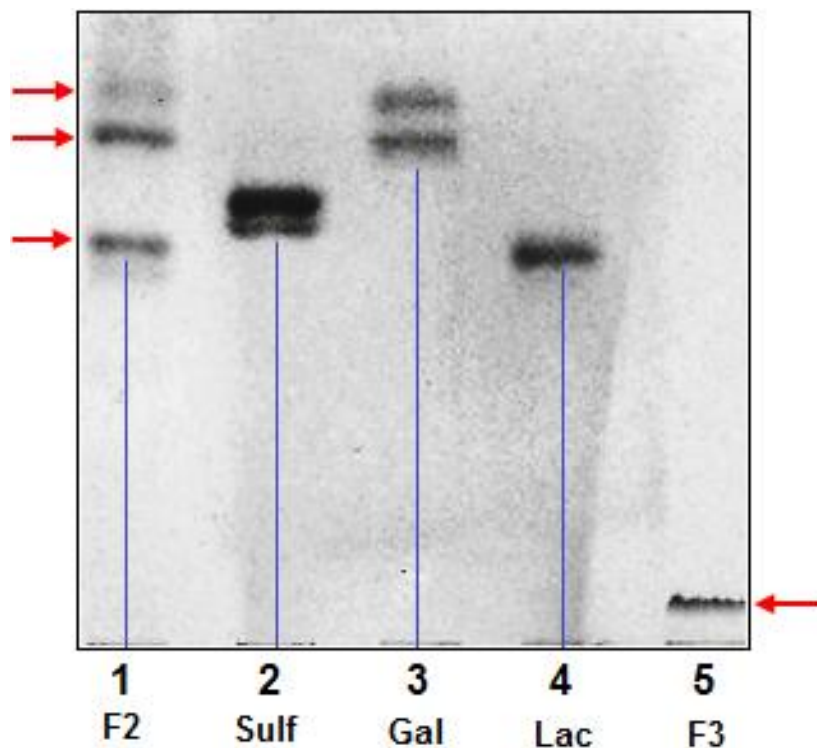
**Figura 13.** Separación por Cromatografía en capa fina (CCF) de la fracción de glicolípidos sulfatados de la leche humana (F2) después de su purificación a partir de la columna de ácido silícico. Líneas 1 y 2: estándar de galactosilceramida (Gal), 10 µg y 20 µg, respectivamente. Líneas 3 y 4: estándar de lactosilceramida (Lac), 10 µg y 20 µg, respectivamente. Líneas 5 y 6: estándar de sulfatados de cerebro bovino (Sulf), 10 µg y 20 µg, respectivamente. Líneas 7 y 8: segunda fracción extraída de la leche humana (F2). Se eluyeron con una mezcla de acetona/metanol 9:1; se aplicaron 1 µl y 3 µl de F2 respectivamente. La fase móvil utilizada para la elución de las muestras fue: cloroformo/metanol/ácido acético glacial/agua (65:25:3:1 v/v/v/v).

Se llevó a cabo una segunda cromatografía en capa fina (**Figura 14**), utilizando una mayor cantidad de estándares comerciales y una cantidad determinada de las fracciones F2 y F3 de la leche humana. Gracias a estos cambios, se observaron unas bandas más definidas, que demostraban claramente, la separación de las sustancias que se encuentran en la fracción F2. Además, es posible observar que las sustancias que conforman la fracción F3, tienen un comportamiento diferente



## Resultados

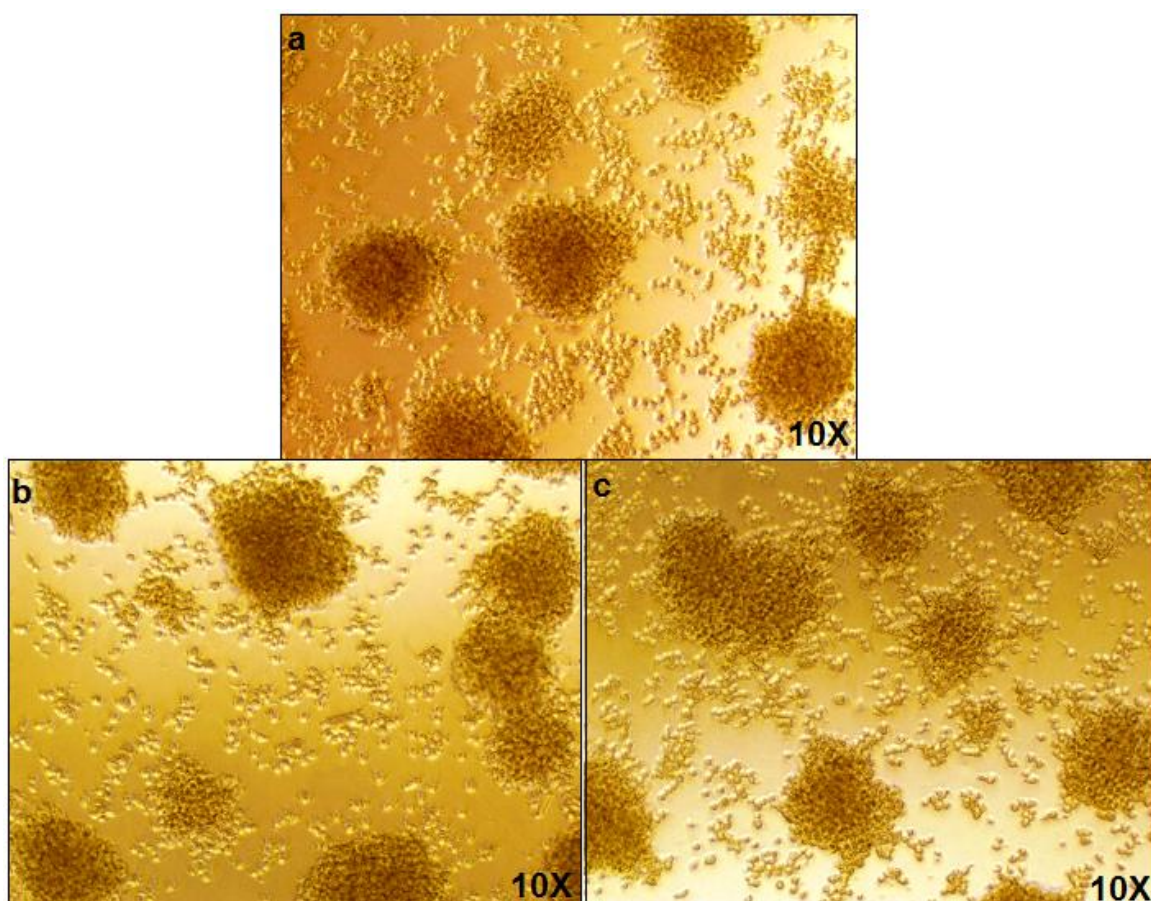
al de las sustancias contenidas en F2 y en los estándares comerciales, ya que no migraron de la misma manera.



**Figura 14. Separación por CCF de las fracciones F2 y F3 de la leche humana después de su purificación a partir de una columna de ácido silícico. Línea 1:** fracción **F2** de la leche humana eluída con una mezcla de acetona/metanol 9:1. **Línea 2:** estándar de sulfatados de cerebro bovino (Sulf). **Línea 3:** estándar de galactosilceramida (Gal). **Línea 4:** estándar de lactosilceramida (Lac). **Línea 5:** fracción **F3** de la leche humana eluída con 100% de metanol. Fase móvil utilizada: cloroformo/metanol/ácido acético glacial/agua (65:25:3:1) (v/v/v/v). Se aplicaron en la placa de sílice 40 µg de los estándares y de las muestras de la leche. Se utilizó  $\alpha$ -naftol como colorante.

## 5.2 Efecto *in vitro* de los glicoconjugados de la leche humana en las líneas celulares humanas CD4 positivas: MT2, U937 y THP-1

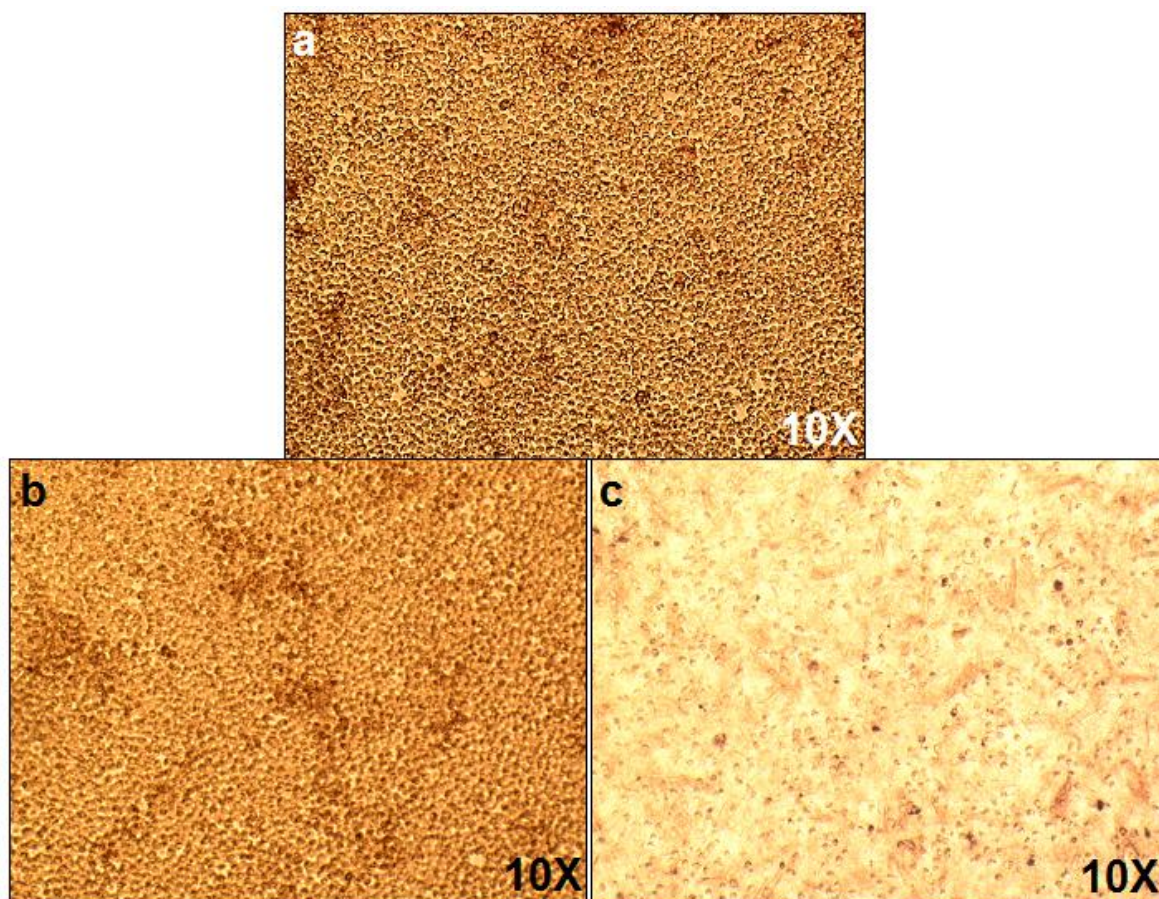
Se evaluó si las fracciones de glicoconjugados F2 (glicolípidos sulfatados) y F3 (fosfolípidos) de la leche, tenían un efecto citotóxico en las líneas celulares de linfocitos humanos: MT2 y de monocitos humanos THP-1 y U937, las cuales se utilizaron para los ensayos de infección del VIH-1 *in vitro*. Después de 5 días en el caso de la línea celular MT2 y 11 días de incubación en el caso de las células THP-1 y U937, se determinó la viabilidad de las células en presencia de los compuestos y se comparó con el control de células sin compuesto. En las **Figuras 15-17** se ilustran los cambios morfológicos que se presentaron en las células MT2, THP-1 y U937 en presencia de F2.



**Figura 15.** Línea celular MT2 en presencia de concentraciones crecientes de la fracción de glicolípidos sulfatados de la leche humana (F2). a) Control de células MT-2, b) 6.7 µg F2/ml y c) 600 µg F2/ml.

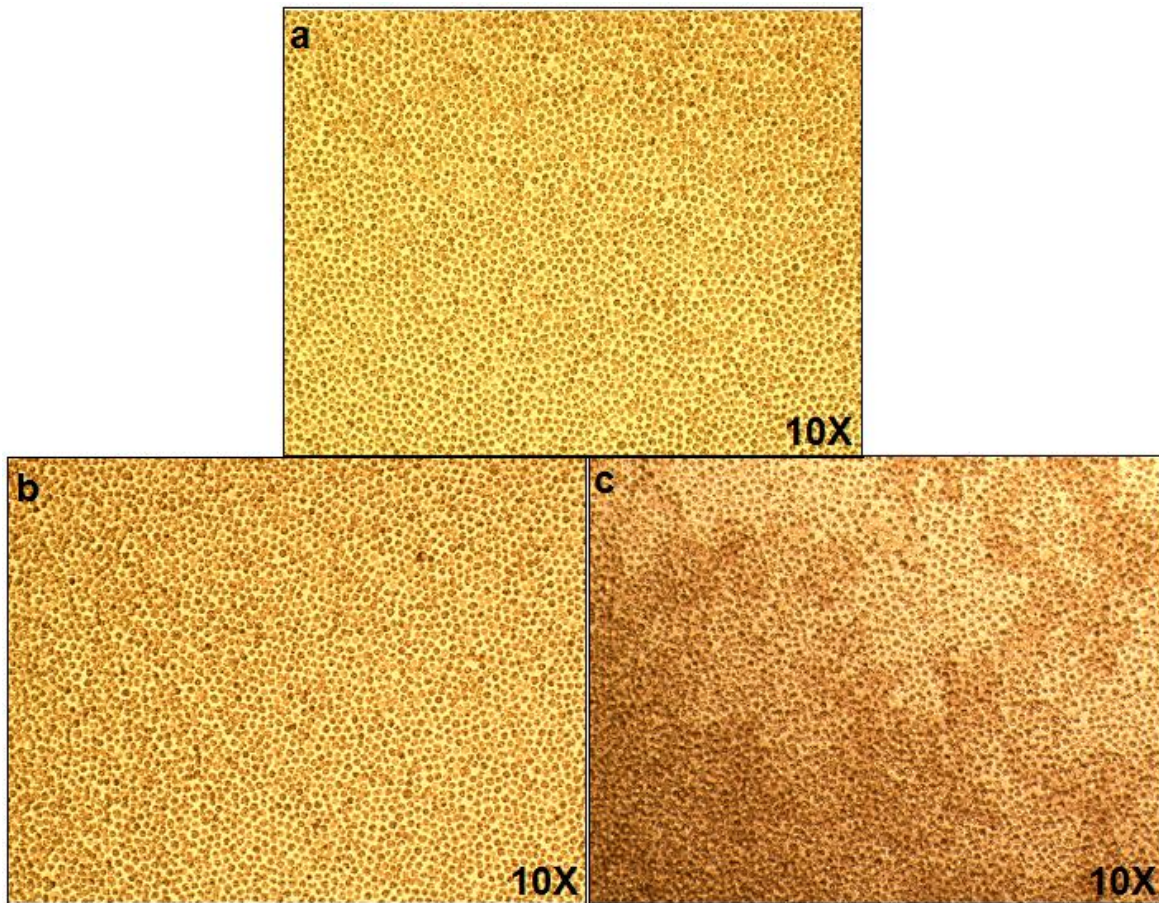
## Resultados

Las células MT-2 tienen una forma redonda definida y tienden a agruparse en forma de pequeños racimos (**Figura 15a**). Al añadir la dosis baja (6.7  $\mu\text{g/ml}$ ) y una dosis alta de F2 (600  $\mu\text{g/ml}$ ), no se observó un cambio en la morfología de las células (**Figuras 15b, 15c**); al igual que la disminución de la viabilidad celular en presencia de F2 y F3 de la leche, no fue significativa al realizar la determinación cuantitativa en la cámara de Neubauer (ver **Tabla 13**).



**Figura 16.** Línea celular THP-1 en presencia de concentraciones crecientes de la fracción de glicolípidos sulfatados de la leche humana (F2). a) Control de células THP-1, b) 6.7  $\mu\text{g}$  F2/ml y c) 600  $\mu\text{g}$  F2/ml.





**Figura 17. Línea celular U937 en presencia de concentraciones crecientes de la fracción de glicolípidos sulfatados de la leche humana (F2). a) Control de células U937, b) 6.7  $\mu\text{g}$  F2/ml y c) 600  $\mu\text{g}$  F2/ml.**

Con las líneas celulares THP-1 y U937, se observó un efecto citotóxico en presencia de la fracción F2, ya que la mayoría de las células estaban muertas y habían perdido por completo la forma celular característica (**Figuras 16 y 17**). La fracción F3 de la leche humana no tuvo efecto citotóxico significativo en las células CD4 positivas MT2, THP-1 y U937, por lo que no se observaron cambios en la morfología de las células, en presencia del compuesto.

Tabla 13. Determinación de la viabilidad celular de las líneas MT-2, THP-1 y U937 en presencia de las fracciones de glicolípidos sulfatados de la leche humana (F2), fosfolípidos de la leche humana (F3) y el estándar de sulfatados (Sulf). Se realizó un conteo de las células vivas y muertas en la cámara de Neubauer a 10X.

Fracción	Concentración de glicoconjugados (µg/ml)	Porcentaje de viabilidad		
		Líneas celulares		
		MT-2	THP-1	U937
Glicolípidos sulfatados de la leche humana (F2)	6.7	87%	70%	32%
	33	91%	65%	-
	67	84%	62%	37%
	133	89%	50%	-
	200	83%	62%	-
	267	88%	46%	-
	333	89%	59%	48%
	400	85%	54%	-
	467	88%	59%	-
	533	88%	49%	-
600	92%	0%	52%	
Estándar de sulfatados de cerebro bovino (Sulf)	6.7	84%	73%	16%
	33	84%	66%	26%
	67	78%	65%	46%
	133	90%	61%	43%
	200	82%	60%	66%
	267	85%	61%	70%
	333	92%	59%	58%
	400	84%	67%	72%
	467	86%	66%	77%
	533	87%	56%	64%
600	88%	0%	67%	
Fosfolípidos de la leche humana (F3)	133	83%	70%	74%
	267	76%	64%	75%
	400	80%	57%	78%
	533	83%	64%	73%
	667	80%	60%	74%
1333	74%	55%	74%	

### 5.3 Ensayos de infección de las células CD4 positivas humanas MT-2, U937 y THP-1 por las cepas de referencia ADA-M y IIIB del VIH-1

Los ensayos de infección fueron útiles para determinar la cantidad de células y la dosis de virus que se requerían para obtener una infección productiva en los diferentes modelos de infección con aislados de referencia linfotrópicos y monocito-macrófagotrópicos. Se trabajó con las cepas virales IIIB VIH-1 (linfotrópica, X4) y ADA-M VIH-1 (macrofagotrópica, R5), y con las líneas celulares MT-2 (linfocitos) y las líneas celulares THP-1 y U937 (monocitos).

**Tabla 14. Cantidades óptimas de células y de inóculo viral para los ensayos de infección de las células MT-2, THP-1 y U937 por las cepas virales IIIB y ADA-M.**

Cepa viral	Cantidad de células	Dosis de virus
IIIB	40,000 células/100 µl/pozo	1 y 2 ng/ml
ADA-M	50,000 células/100 µl/pozo	40 y 80 ng/ml

### 5.4 Ensayos de inhibición de la infección de las células CD4 positivas humanas por cepas de referencia del VIH-1, con los glicoconjugados extraídos de la leche humana

Con el fin de evaluar el efecto inhibitorio de los glicoconjugados de la leche humana F2 y F3 en la infección *in vitro* por el VIH-1, se realizaron los ensayos de inhibición con 3 líneas celulares CD4 positivas: MT2 (linfocitos humanos), THP-1 y U937 (monocitos humanos) y dos aislados virales de referencia: IIIB y ADA-M. En los ensayos celulares se probaron de 5 a 7 concentraciones de ambos glicoconjugados.

#### 5.4.1 Efecto inhibitorio de los glicoconjugados de la leche materna en la línea celular MT-2 infectada con la cepa viral IIIB

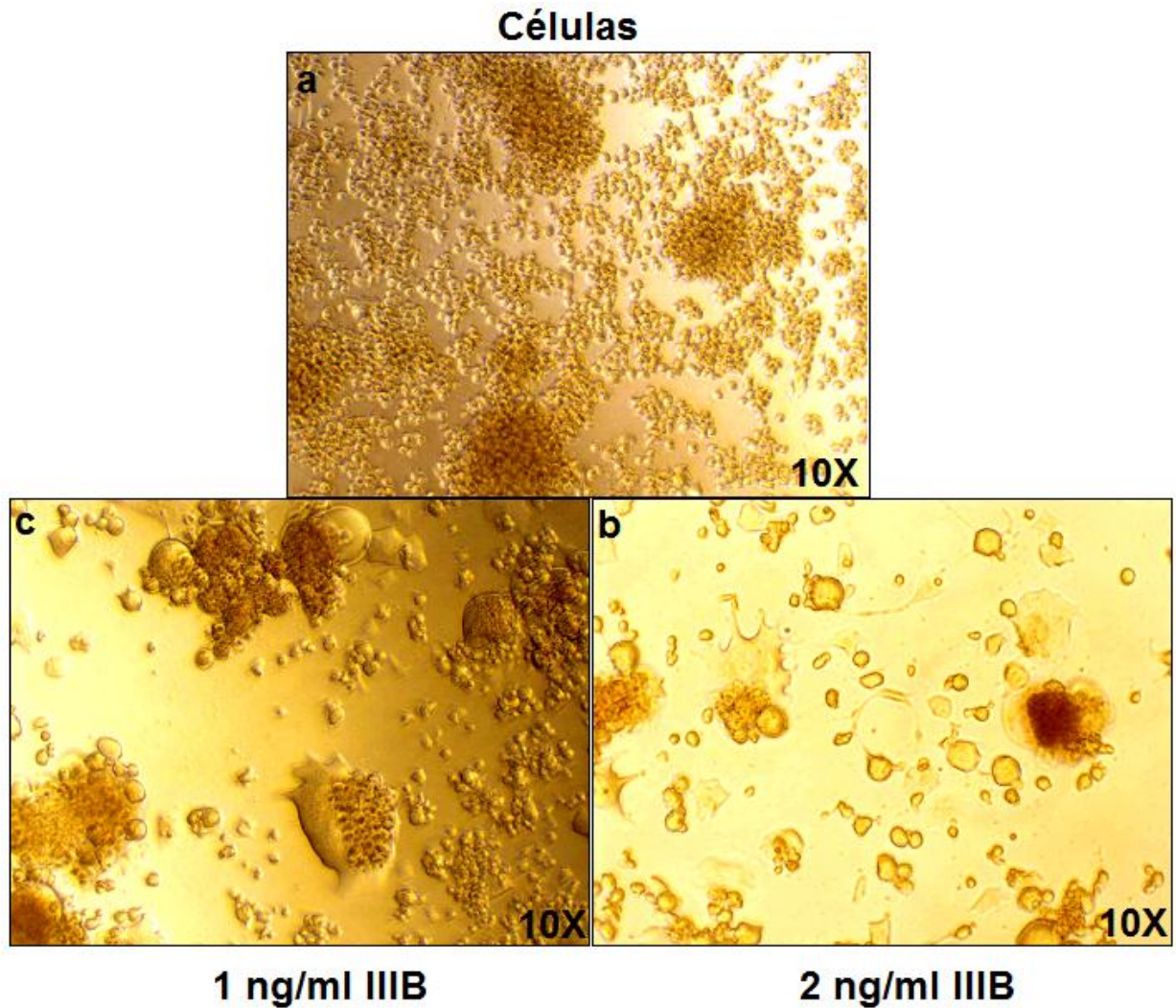
Como se mencionó anteriormente, las células linfocíticas que han sido infectadas forman sincicios, lo cual es indicativo de una infección productiva. En el presente trabajo, la línea celular MT-2 infectada con el aislado de referencia IIIB VIH-1, forma sincicios desde los primeros días de la infección como se aprecia en la **Figura 18**.

Con el fin de conocer el efecto inhibitorio que presentan las fracciones de glicoconjugados extraídos de la leche humana, glicolípidos sulfatados (F2) y de fosfolípidos (F3) y si este efecto pudiera ser dosis dependiente, se utilizaron diferentes concentraciones de los glicoconjugados de la leche humana y del estándar de sulfatados de cerebro bovino para inhibir la infección de dos dosis infecciosas de las cepas de referencia del VIH-1 IIIB y ADA-M **Figura 19**.

La descripción de la manera en la que se obtuvieron los valores del porcentaje de inhibición de la infección se encuentra en la parte de metodología (**página 50**).

En la **Tabla 15** y la **Gráfica 1** se observa que a partir de una concentración de 67  $\mu\text{g/ml}$  de F2, y con una dosis de 1  $\text{ng/ml}$  de IIIB VIH-1, hay un efecto inhibitorio significativo ( $>80\%$ ), mientras que con una dosis de 2  $\text{ng/ml}$ , fue necesaria una mayor concentración de F2 (200  $\mu\text{g/ml}$ ) para observar el mismo efecto. Por otra parte, con la fracción F3 sólo se observó un efecto inhibitorio importante, a partir de la concentración de 200  $\mu\text{g/ml}$  y solamente con la dosis de 1  $\text{ng/ml}$  de IIIB VIH-1, ya que con 2  $\text{ng/ml}$  no se observó un efecto inhibitorio significativo, aún con las concentraciones mayores de F3.

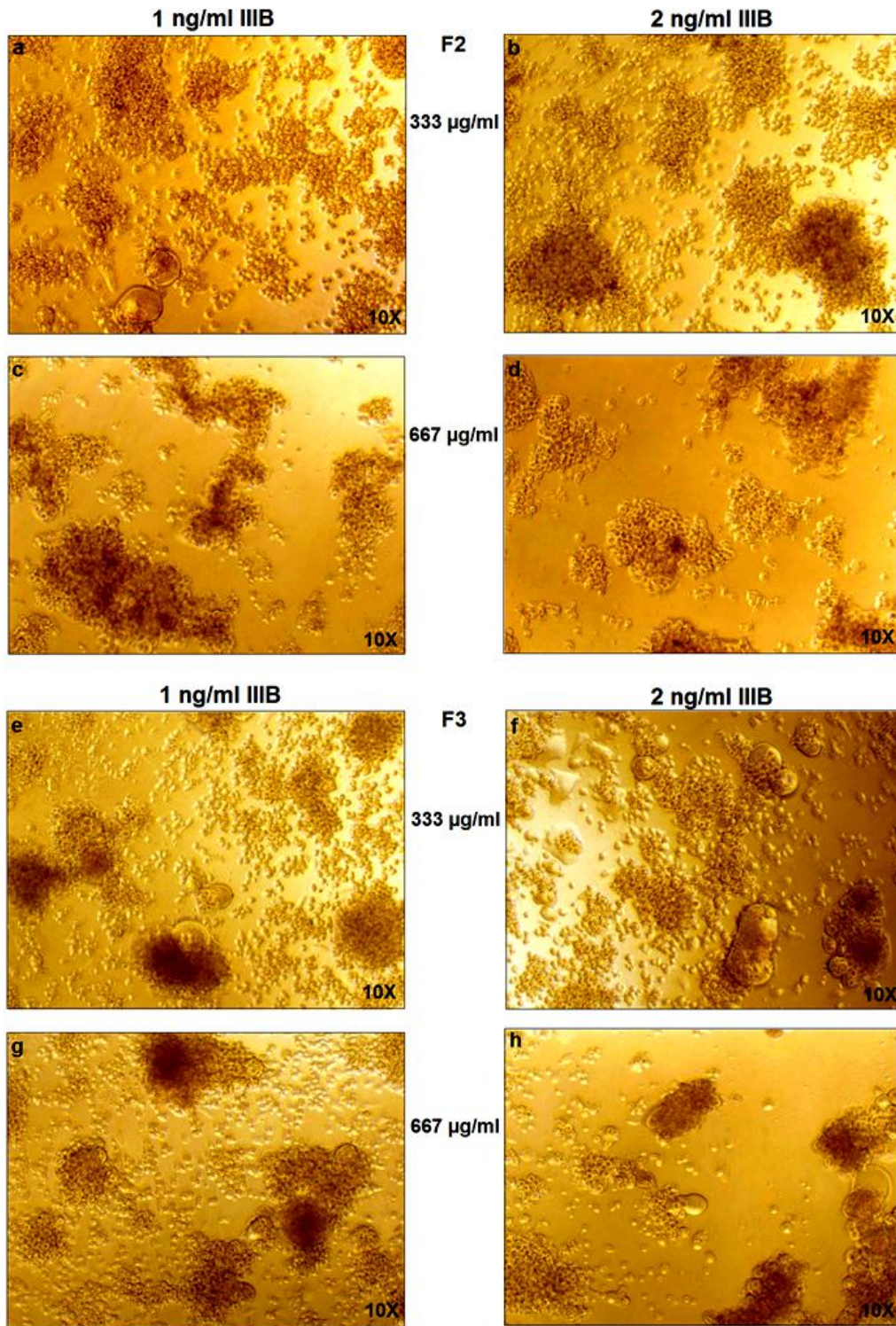




**Figura 18. Controles del ensayo de inhibición de la infección *in vitro* de la línea de linfocitos humanos MT-2 por el aislado viral IIB del VIH-1 con los glicoconjugados de la leche humana. a) Control de células MT-2, b) Control de infección IIB 1 ng/ml, c) control de infección IIB 2 ng/ml.**



Resultados



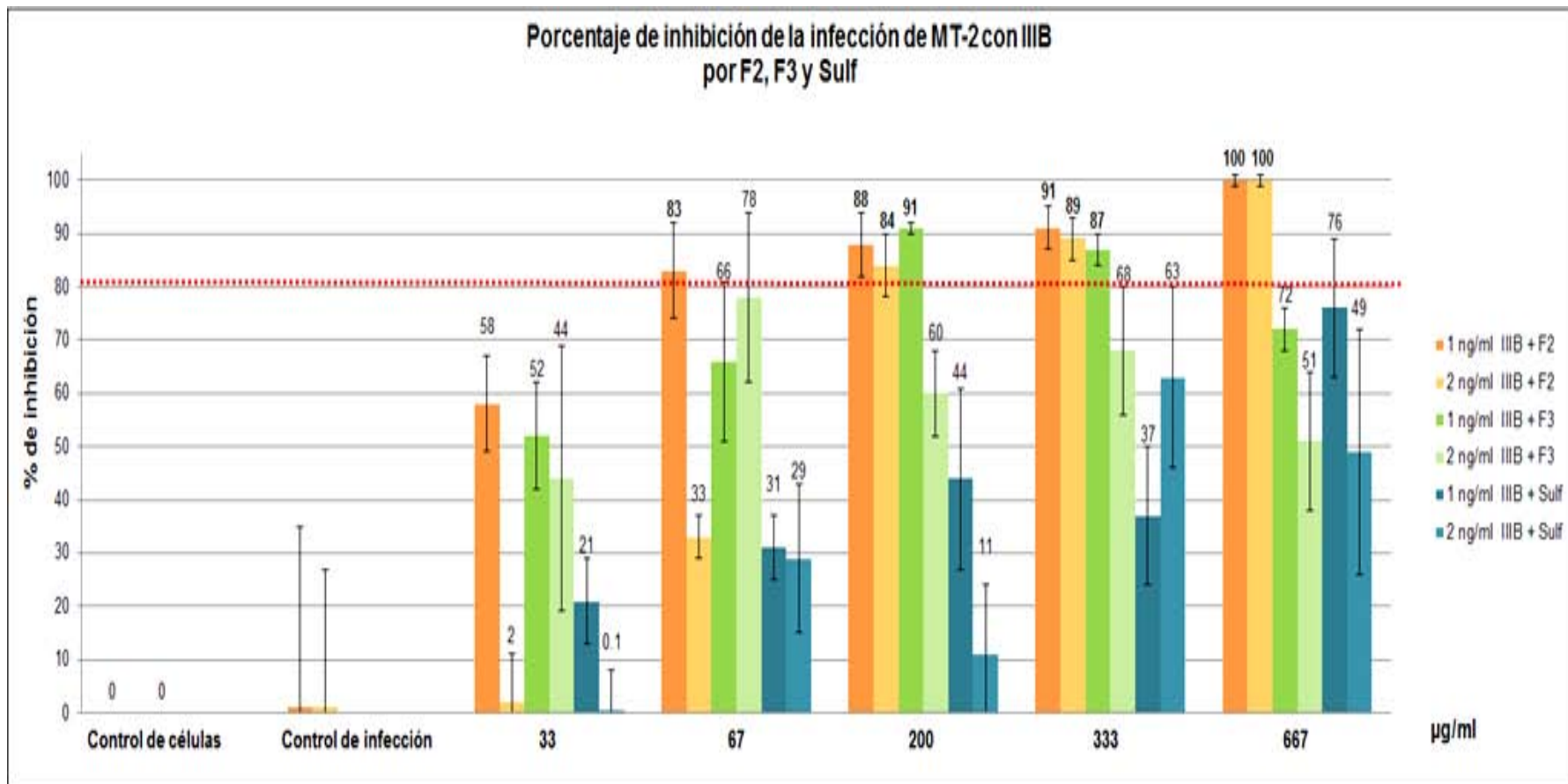
**Figura 19. Efecto inhibitorio de las fracciones de glicoconjugados de la leche materna en la infección *in vitro* de la línea de linfocitos humanos MT-2 por el aislado viral IIIB. a) Células infectadas con 1 ng/ml de IIIB y 333 µg/ml F2, b) células infectadas con 2 ng/ml de IIIB y 333 µg/ml F2, c) células infectadas con 1 ng/ml de IIIB y 667 µg/ml F2, d) células infectadas con 2 ng/ml de IIIB y 667 µg/ml F2, e) células infectadas con 1 ng/ml de IIIB y 333 µg/ml F3, f) células infectadas con 2 ng/ml de IIIB y 333 µg/ml F3, g) células infectadas con 1 ng/ml de IIIB y 667 µg/ml F3, h) células infectadas con 2 ng/ml de IIIB y 667 µg/ml F3.**

Tabla 15. Inhibición de la infección *in vitro* de la línea de linfocitos humanos MT-2 por el aislado viral IIB con tropismo X4.

Concentración de glicoconjugados ( $\mu\text{g/ml}$ )	Porcentaje de inhibición $\pm$ EDE*					
	Dosis IIB 1 ng/ml			Dosis IIB 2 ng/ml		
	F2	F3	Sulf	F2	F3	Sulf
33	58 $\pm$ 9	52 $\pm$ 10	21 $\pm$ 8	2 $\pm$ 9	44 $\pm$ 25	0.1 $\pm$ 8
67	<b>83 <math>\pm</math> 9</b>	66 $\pm$ 15	31 $\pm$ 6	33 $\pm$ 4	78 $\pm$ 16	29 $\pm$ 14
200	<b>88 <math>\pm</math> 6</b>	<b>91 <math>\pm</math> 1</b>	44 $\pm$ 17	<b>84 <math>\pm</math> 6</b>	60 $\pm$ 8	11 $\pm$ 13
333	<b>91 <math>\pm</math> 4</b>	<b>87 <math>\pm</math> 3</b>	37 $\pm$ 13	<b>89 <math>\pm</math> 4</b>	68 $\pm$ 12	63 $\pm$ 17
667	<b>100 <math>\pm</math> 1</b>	72 $\pm$ 4	76 $\pm$ 13	<b>100 <math>\pm</math> 1</b>	51 $\pm$ 13	49 $\pm$ 23

\*EDE: error de la desviación estándar.

**Gráfica 1. Porcentaje de inhibición de la infección de la línea celular MT-2 con el aislado viral IIIB por las fracciones F2, F3 y los sulfatados de cerebro bovino.**



### 5.4.2 Efecto inhibitorio de los glicoconjugados de la leche humana en la línea celular THP-1 infectada con la cepa viral ADA-M

**Tabla 16.** Inhibición de la infección *in vitro* de la línea de monocitos humanos THP-1 por el aislado viral ADA-M con tropismo R5.

Concentración de glicoconjugados ( $\mu\text{g/ml}$ )	Porcentaje de inhibición $\pm$ EDE*					
	Dosis ADA-M 40 ng/ml + THP-1			Dosis ADA-M 80 ng/ml + THP-1		
	F2	F3	Sulf	F2	F3	Sulf
83	6 $\pm$ 12	-	-	0 $\pm$ 12	-	-
167	12 $\pm$ 21	-	-	0 $\pm$ 16	-	-
333	12 $\pm$ 12	32 $\pm$ 18	33 $\pm$ 26	0 $\pm$ 9	54 $\pm$ 4	10 $\pm$ 31
400	11 $\pm$ 4	-	28 $\pm$ 31	0 $\pm$ 53	-	21 $\pm$ 1
533	4 $\pm$ 3	-	24 $\pm$ 6	0 $\pm$ 10	-	14 $\pm$ 38
600	0 $\pm$ 26	-	34 $\pm$ 11	0 $\pm$ 19	-	23 $\pm$ 16
667	10 $\pm$ 7	46 $\pm$ 18	25 $\pm$ 50	24 $\pm$ 31	41 $\pm$ 10	0 $\pm$ 9

Como puede observarse en la **Tabla 16**, no se observó efecto inhibitorio de la infección de THP-1 por la cepa ADA-M, con ninguna de las fracciones extraídas de la leche humana ni con el control de sulfatados de cerebro bovino.

\***EDE**: error de la desviación estándar.

### 5.4.3 Efecto inhibitorio de los glicoconjugados de la leche humana en la línea celular U937 infectada con la cepa viral ADA-M

Tabla 17. Inhibición de la infección *in vitro* de la línea de monocitos humanos U937 por el aislado viral ADA-M con tropismo R5.

Concentración de glicoconjugados (µg/ml)	Porcentaje de inhibición ± EDE					
	Dosis ADA-M 40 ng/ml + U937			Dosis ADA-M 80 ng/ml + U937		
	F2	F3	Sulf	F2	F3	Sulf
83	0 ± 14	-	0 ± 15	4 ± 14	-	0 ± 37
167	0 ± 22	-	0 ± 22	7 ± 45	-	0 ± 18
333	0 ± 22	29 ± 2	0 ± 10	8 ± 44	35 ± 2	0 ± 15
400	0 ± 96	-	0 ± 54	0 ± 13	-	0 ± 14
533	1 ± 90	-	0 ± 13	3 ± 73	-	0 ± 35
600	0 ± 47	-	0 ± 10	0 ± 36	-	0 ± 61
667	0 ± 40	30 ± 8	0 ± 29	0 ± 34	33 ± 3	0 ± 40

## 6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La leche humana presenta diversos beneficios para el desarrollo del recién nacido, no sólo se trata de una fuente nutricional, también contiene diversos componentes que actúan como una línea de defensa contra algunos patógenos, evitando así, ciertas infecciones en los neonatos. Una parte de sus propiedades protectoras se debe a sus oligosacáridos libres, glicoproteínas y glicolípidos; que pueden ejercer una exclusión inmune gracias a que son sintetizados por las enzimas que producen los glicanos que se encuentran en las moléculas de la superficie epitelial de los tejidos del cuerpo, a los que varios patógenos utilizan como sitios de unión [9-12]. También cuentan con la ventaja de ser resistentes a la digestión y por lo general, permanecen intactos durante el tránsito a través del tracto digestivo [9,12]. Como consecuencia, los glicanos de la leche humana se mimetizan con los sitios de adhesión reconocidos por los patógenos, pudiendo así, unirse a ellos y evitar el proceso infeccioso [12]. Cabe mencionar, que en estudios anteriores, se demostró que los glicolípidos sulfatados inhiben la unión entre la glicoproteína GP120 del VIH-1 y la superficie de las células epiteliales de la vagina y del colon, *in vitro* [12, 39, 40].

Uno de los objetivos principales del proyecto, era determinar si las fracciones extraídas de la leche humana, F2 y F3, presentaban algún efecto inhibitorio de la infección del VIH-1. Se realizaron los ensayos de inhibición de la infección por VIH-1 de las líneas de células CD4+ para determinar si había un efecto de inhibición de la infección, si ese efecto era dosis dependiente de la concentración de glicoconjugados de la leche humana y saber si las fracciones producen el mismo efecto con diferentes cepas del VIH-1 (con una cepa linfotrópica y una macrofagotrópica).

Como se mencionó previamente, la cantidad de glicoconjugados que podemos encontrar en la leche humana, es muy baja, por lo que se consideró realizar algunos cambios en el método detallado por Newburg y Chaturvedi [56], en el que



se describe el proceso para extraer diferentes glicoconjugados de la leche humana y de esta forma, obtener un mejor rendimiento y pureza de estos compuestos.

Primero se realizó una extracción de la fracción de lípidos de la leche con solventes orgánicos para posteriormente separar a los glicolípidos mediante una cromatografía en columna de ácido silícico. Para la extracción de los glicoconjugados, específicamente la fracción de glicolípidos, a partir de una fuente compleja como es la leche humana, es preciso utilizar una variedad de solventes orgánicos en concentraciones específicas, cuyas características químicas como la polaridad, ayudan a obtener una separación eficaz de los componentes de acuerdo con su solubilidad. El número de lavados que se realizó durante el proceso de extracción, resultó ser un factor determinante para mejorar el rendimiento del proceso, debido a que se favorece la obtención de una mayor cantidad de glicolípidos de la muestra.

En cuanto al proceso de purificación de los glicolípidos, se decidió no realizar la cromatografía de intercambio iónico que se describe en el trabajo de Newburg y Chaturvedi [56], ya que mediante este método se obtiene un rendimiento bajo de los compuestos glicoconjugados, de acuerdo con experimentos realizados por el mismo grupo de investigación (comunicación personal). Por lo que una vez extraída y separada la fracción de glicoconjugados de la leche, se realizó una cromatografía en columna de ácido silícico para separar específicamente a las especies de glicolípidos presentes en la leche. Al finalizar la cromatografía en columna de ácido silícico, se mejoró el rendimiento de las fracciones de glicoconjugados de la leche humana, en particular de las especies de glicolípidos y fosfolípidos, con respecto a otros trabajos relacionados [56]. Por lo que se confirmó que no fue necesario realizar la cromatografía de intercambio iónico para purificar a los compuestos glicoconjugados, sino que el llevar a cabo la purificación de éstos mediante una columna de ácido silícico, fue suficiente para obtener un buen rendimiento y pureza de los compuestos.

Posteriormente, se llevó a cabo una cromatografía en capa fina (CCF) de la fracción F2 obtenida y de los estándares comerciales de glicolípidos: galactosilceramida (GalCer), lactosilceramida (LacCer) y sulfatados de cerebro bovino (Sulf) (ver **Figura 13**), con el fin de determinar de forma cualitativa la presencia y concentración de ciertas sustancias en la fracción F2. Es posible observar que las líneas de galactosilceramida y lactosilceramida coinciden con las de F2, lo cual podría indicarnos que F2 contiene compuestos con una naturaleza química similar.

Por otra parte, la línea de los sulfatados de cerebro bovino no coincidió con alguna de las líneas de F2; sin embargo, no se puede descartar la idea de que F2 contenga algunos compuestos sulfatados, ya que se trata de una mezcla, por lo que se consideró que la variación en el corrimiento de la CCF, puede deberse a la diferencia en la composición o a la interferencia de otras sustancias.

Uno de los objetivos fue evaluar el posible efecto inhibitorio de los glicoconjugados de la leche humana, en la infección *in vitro* con el VIH-1. Para ello, era preciso conocer primero las condiciones óptimas con las que se podría lograr una infección productiva *in vitro* de las cepas de referencia del VIH-1 en los ensayos celulares. Por consiguiente, se estandarizaron las condiciones experimentales para los ensayos de infección con las cepas virales de referencia IIIB y ADA-M, linfotrópica (X4) y macrofagotrópica (R5), respectivamente y las líneas celulares CD4 positivas MT-2, THP-1 y U937. De acuerdo con los resultados obtenidos, se estableció la cantidad de células y de virus que se utilizarían en los ensayos de inhibición de la infección. Las células MT-2 (que se obtuvieron a partir de linfocitos T humanos de un paciente con leucemia), fueron infectadas con el aislado viral IIIB del VIH-1 y se observó el punto máximo de infección después de cinco días de cultivo, con una concentración de 40,000 células MT-2/100 µl/pozo, y utilizando las dosis de 1 y 2 ng/ml de antígeno P24 de IIIB. Asimismo, con las células THP-1 y U937, las condiciones óptimas para obtener la máxima concentración de antígeno P24 en el sobrenadante de cultivo



se observaron en el día 11 post-infección al infectar 50,000 células/100  $\mu$ l/pozo con una dosis de virus de 40 y 80 ng/ml del aislado de referencia ADA-M.

Debido a que la infección por VIH-1 es una pandemia que no se ha podido erradicar, continuamente se busca identificar a nuevas moléculas o compuestos que tengan el potencial para inhibir la entrada del VIH-1 a su célula blanco y que sean útiles para los tratamientos de las personas infectadas. Cabe mencionar, que es de suma importancia realizar un análisis costo-beneficio para determinar si es factible el uso de los compuestos propuestos; entre los aspectos a considerar está el precio que implica su extracción o síntesis y los posibles efectos secundarios que se presenten en los humanos.

Tomando en cuenta que las fracciones extraídas de la leche humana podrían ser candidatos para el desarrollo de nuevos tratamientos para la infección por VIH-1, se consideró indispensable realizar ciertos ensayos *in vitro*, que permitieran saber si existe algún efecto en las células por parte de los glicoconjugados de interés.

Con base a los resultados obtenidos en los ensayos (**Figuras 16 y 17, Tabla 13**), se demostró que la fracción F2 de la leche humana presenta un efecto citotóxico a partir de un concentración de 133  $\mu$ g/ml, con un porcentaje de mortalidad del 50% en las células monocíticas THP-1 y para las células U937, a partir de 6.7  $\mu$ g/ml, con un 68% de mortalidad; mientras que, F2 no provocó un aumento significativo en la muerte celular de la línea de linfocitos humanos MT-2, ya que con las concentraciones de 67  $\mu$ g/ml y 200  $\mu$ g/ml, la proporción de células muertas fue de 16% y 17%, respectivamente.

Las fracciones F3 de la leche humana y los sulfatados de cerebro bovino (Sulf), no presentaron un efecto citotóxico en las líneas celulares humanas, aún en presencia de las concentraciones mayores de estos compuestos, solamente se observó la formación de conglomerados celulares de mayor tamaño.

Como se puede constatar en la **Figura 19**, **Tabla 15** y la **Gráfica 1**, la fracción de glicolípidos sulfatados de la leche materna (F2), presentó un efecto inhibitorio significativo durante la infección de las células linfocíticas MT-2: a partir de 67  $\mu\text{g/ml}$  con la dosis de 1 ng/ml de IIB VIH-1, y de 200  $\mu\text{g/ml}$  con 2 ng/ml de IIB. Sin embargo, el efecto inhibitorio en las líneas monocíticas, THP-1 y U937, no fue relevante. Otro aspecto importante que debe considerarse, para reconocer el efecto inhibitorio de F2, es la posibilidad de que una parte de la disminución en la replicación del virus, se deba al efecto citotóxico que causa, lo que reduce la cantidad de células que puede infectar el virus.

En el caso de la fracción de fosfolípidos de la leche humana (F3) y el estándar de sulfatados de cerebro bovino (Sulf), no hubo algún efecto inhibitorio significativo en la infección de las líneas celulares THP-1 y U937, mientras que con la línea celular MT-2, la fracción F3 mostró un efecto inhibitorio significativo con las concentraciones de 200  $\mu\text{g/ml}$  y 333  $\mu\text{g/ml}$  utilizadas con la dosis viral de 1 ng/ml de IIB VIH-1. Sin embargo estas concentraciones de F3 son mayores a la concentración fisiológica que se encuentra en la leche, por lo que su efecto de inhibición no es relevante.

Es posible que F2 actúe de manera eficiente con las cepas de VIH-1 linfotrópicas, ya que sólo mostró un efecto inhibitorio significativo con la cepa IIB y no mostró un efecto de inhibición significativo con la cepa macrofagotrópica ADA-M. Sin embargo, para confirmar esto, será necesario evaluar el efecto inhibitorio de F2 con más cepas virales linfotrópicas y macrofagotrópicas.

## 7. CONCLUSIONES

- ❖ La combinación de una técnica de extracción con solventes orgánicos, con dos cromatografías: ácido silícico y en capa fina, permitió una determinación cualitativa y semicuantitativa eficaz, así como una buena caracterización de los glicoconjugados de la mezcla de lípidos presentes en la leche humana, particularmente de glicolípidos sulfatados y fosfolípidos.
- ❖ En este estudio se demostró la efectividad de un método sencillo y económico como la cromatografía en capa fina, para detectar a los diferentes componentes glicoconjugados de la leche humana.
- ❖ Los glicolípidos de la leche humana (fracción F2) se identificaron como potenciales receptores análogos glicoconjugados para el VIH-1 ya que inhiben significativamente (>80%) la infección *in vitro* de linfocitos T CD4 positivos por una cepa de referencia linfotrópica.
- ❖ El efecto inhibitorio de la fracción F2 de la leche humana en la infección de células CD4 positivas, podría ser más eficiente para ciertas cepas virales, de acuerdo con el tropismo que presenten, ya que se inhibió de manera significativa la infección de la cepa linfotrópica (X4) pero no se inhibió la infección de la cepa viral monocito/macrofagotrópica (R5).
- ❖ La fracción F2 de la leche causa un efecto citotóxico a partir de concentraciones mayores a: 133 µg/ml en la línea celular THP-1 y 6.7 µg/ml en la línea celular U937, a diferencia de la fracción F3 y de los estándares de sulfatados de cerebro bovino, que sólo causan la formación de pequeños conglomerados de células, por lo que es importante considerar que la muerte celular pudiera contribuir a la disminución de la infección viral.

## Conclusiones

- ❖ Aun cuando F3 fue inocuo para las líneas celulares utilizadas, no muestra una gran posibilidad para ser considerado como candidato de la inhibición de la infección por el VIH-1, ya que sólo causó un efecto inhibitorio significativo con la dosis menor del virus linfotrópico IIIB (1 ng/ml) y en concentraciones superiores a las concentraciones fisiológicas (200 µg/ml y 333 µg/ml).
- ❖ El efecto inhibitorio de los glicolípidos de la leche humana, comparado con el de los sulfatados de cerebro bovino (Sulf), presenta una diferencia significativa (83-100% y 31-76%, respectivamente) en la infección *in vitro* de las células MT2 por la cepa IIIB del VIH-1, que puede atribuirse a una diferencia en su estructura molecular y en sus patrones de sulfatación.

## PERSPECTIVAS

- ❖ El siguiente paso en la investigación de los compuestos glicoconjugados de la leche humana, será el dilucidar su estructura molecular, para en un futuro, realizar su síntesis química y producir y manufacturar a gran escala estos compuestos, con el fin de crear estructuras glicoconjugadas sintéticas, efectivas y seguras y proponerlas como agentes antivirales y microbicidas en general.

## 8. ANEXO

### 8.1 Lista de claves y abreviaturas

**ADN:** ácido desoxirribonucleico.

**AG:** ácidos grasos.

**ARN:** ácido ribonucleico.

**°C:** grado centígrado.

**CA:** proteína de la cápside (VIH).

**CCF:** Cromatografía en capa fina.

**CD4:** grupo diferencial (del inglés *cluster of differentiation*).

**CDC:** Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de Estados Unidos (del inglés ***Centers for Disease Control and Prevention***).

**CENSIDA:** Centro Nacional para la Prevención y el Control del VIH/SIDA.

**D-aminoácidos:** aminoácidos dextrógiros.

**DC-SIGN:** Molécula de adhesión intercelular-3 no integrina específica de células dendríticas (del inglés *Dendritic Cell specific ICAM-3 grabbing non integrin*).

**dl:** decilitro.

**EDE:** error de la desviación estándar.

**ELISA:** ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*).

**F2:** Fracción de glicolípidos sulfatados de la leche humana.

**F3:** Fracción de fosfolípidos de la leche humana.

**g:** gramo.

**GAG:** Glicosaminoglicano.

**GalCer:** Galactosilceramida.

**ICAM:** Molécula de adhesión intercelular (del inglés *Intercellular adhesion molecule*).

**Ig:** Inmunoglobulina.

**IN:** integrasa.

**KCl:** cloruro de potasio.

**l:** litro.

**L-aminoácidos:** aminoácidos levógiros.

**LacCer:** Lactosilceramida.

**M:** molar (molaridad).

**MA:** proteína de la matriz (VIH).

**ml:** mililitro.

**MLGM:** membrana globular lipídica de la leche humana (del inglés *milk lipid globule membrane*).

**mm Hg:** milímetros de mercurio.

**μl:** microlitro.

**NC:** proteína de la nucleocápside (VIH).

**NIH:** Instituto Nacional de Salud (del inglés *National Institute of Health*).

**NK:** Células asesinas naturales (del inglés *natural killer*).

**OPD:** o-fenilendiamina (del inglés *o-Phenylenediamine*).

**PBMCs:** Células mononucleares de sangre periférica (del inglés *Peripheral Blood Mononuclear Cells*).

**PR:** proteasa.

**RANTES:** citocina expresada y secretada por el linfocito T normal en función de su grado de activación (del inglés *regulated on activation normal T cell expressed and secreted*), también se conoce como CCL5.

**rpm:** revoluciones por minuto.

**RT:** transcriptasa reversa.

**SFB:** suero fetal bovino.

**SIDA:** Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida.

**SLPI:** inhibidor de proteasa de los leucocitos secretores (del inglés *secretory leukocyte protease inhibitor*).

**Sulf:** sulfatados.

**TCID<sub>50</sub>:** dosis infectiva media.

**TGF:** factor de crecimiento transformante (del inglés *transforming growth factor*).

**TUP:** fase superior teórica (del inglés *theoretical upper phase*).

**VCAM-1:** molécula de adhesión vascular 1 (del inglés *vascular cell adhesion molecule 1*).

**VIH:** Virus de Inmunodeficiencia Humana.

**vol:** volumen.

**xg:** gramos fuerza.

## 8.2 Material de cultivo, reactivos, equipos e instrumentos de laboratorio

### ◆ Reactivos para la extracción y purificación de los glicoconjugados de la leche humana

- Mezcla de muestras de leche humana liofilizadas.
- Agua desionizada y tridestilada.
- Cloroformo grado HPLC.
- Metanol grado HPLC.
- Acetona grado HPLC.
- Hexano grado HPLC.
- Cloruro de potasio.
- Hidróxido de sodio.
- Ácido clorhídrico.
- Nitrógeno gaseoso.
- Ácido silícico.
- Estándar de sulfatados de cerebro bovino SIGMA-ALDRICH®.
- Estándares de ácidos grasos.
- Colorante para revelado de carbohidratos en cromatografía en capa fina:  $\alpha$ -naftol.

### ◆ Material para cultivo celular

- Pipetas serológicas estériles de 1,2,5,10, 25 y 50 ml.
- Botellas de cultivo celular estériles de 25 cm<sup>2</sup>.
- Botellas de cultivo celular estériles de 75 cm<sup>2</sup>.
- Tubos para centrifuga de 15 y 50 ml.
- Tubos para microcentrifuga de 0.5 ml.
- Crioviales de polipropileno de 2 ml con base y tapón de rosca interno.

- Placas de cultivo estériles de 96 pozos con tapa.
- Cajas Petri de plástico estériles.
- Puntas para micropipeta estériles con filtro de 0.2-10  $\mu$ l.
- Puntas para micropipeta estériles con filtro de 1-200  $\mu$ l.
- Unidades de filtración de 500 ml con membranas de polietersulfona de 0.22  $\mu$ m.
- Reservorios reutilizables de 100 ml.
- Guantes de nitrilo.
- Bata quirúrgica desechable, impermeable, con manga larga y puños.
- Vaso de precipitados de 1 l.
- Matraz aforado de 1 l.

#### ◆ Reactivos para cultivo celular

- Medio de cultivo RPMI 1640 en polvo.
- Bicarbonato de sodio.
- Suero fetal bovino inactivado a 56°C durante 30 minutos y esterilizado por filtración.
- Penicilina-estreptomina (10,000 U/ml-10 mg/ml).
- Glutamina-L 200 mM 100X estéril.
- PBS 1X Solución amortiguadora de fosfatos estéril Dulbecco's.
- Aminoácidos no esenciales.
- Piruvato de sodio.
- Líneas celulares humanas: THP-1, U937 y MT-2.
- Cepas de referencia del VIH-1: ADA-M y IIIB.
- Colorante para células Azul Tripán (0.4%).
- Dimetilsulfóxido.
- Placa de cultivo de 96 pozos recubiertos de anticuerpos monoclonales para p24 del VIH.
- Solución de tritón X-100 5%.
- Solución de estreptavidina-HRP concentrada.
- Diluyente de la solución de estreptavidina-HRP.
- Anticuerpo detector anti p24.



- Solución de tris (tris-hidroximetil-aminometano).
- Tabletas de ortofenilendiamina (OPD)
- Solución de paro para ELISA p24 (ácido sulfúrico 4N)
- Solución de lavado para ELISA p24

#### ◆ **Materiales, equipos e instrumentos**

- Probetas de un litro y 500 ml.
- Galones de vidrio ámbar con capacidad de uno y cuatro litros con tapón de rosca.
- Parrilla eléctrica con agitador magnético.
- Vasos de precipitado de 25, 50, 100, 250, 500 y 1000 ml.
- Pinzas para tubos con nuez.
- Pipetas graduadas de vidrio con capacidades de 1, 2, 5, 10 y 20 ml.
- Propipeta.
- Embudo de vidrio de cola larga.
- Papel filtro del No 1.
- Pipetas Pasteur.
- Matraz de 2 l para rota-evaporador.
- Bomba de vacío.
- Embudos de separación de 250, 500, 1000 y 2000 ml.
- Soporte universal con anillo metálico.
- Pinzas para soporte universal.
- Tubos de vidrio con tapón de rosca de diferentes tamaños.
- Fibra de vidrio.
- Cronómetro.
- Matraces Erlenmeyer de vidrio con tapón de rosca de 250, 500 y 1000 ml.
- Tanque para cromatografía en capa fina.
- Placa de sílice para cromatografía en capa fina.
- Jeringa de vidrio para HPLC.
- Hematocitómetro superior Marienfeld ® de 0.0025 mm<sup>2</sup>.
- Pipetas de plástico de 1, 2, 5, 10, 25 y 50 ml.

## Anexo

- Pipetor.
- Matraz aforado de 1 y 2 l.
- Espátula.
- pH metro.
- Incubadora de CO<sub>2</sub>.
- Centrífuga de alta velocidad.
- Campana de flujo laminar clase IIA.
- Microscopio óptico Olympus CH-2 ®.
- Microscopio invertido Swift ®.
- Rota-evaporador.
- Evaporador analítico.
- Campana de extracción.
- Rociador para placas de cromatografía en capa fina.
- Micro pipetas de 1, 10, 20, 100 y 1000 µl.

### 8.3 Glosario [1-3, 14-16, 19-20, 31, 46, 65-67]

**Ácido graso:** es un ácido carboxílico, específicamente un ácido alifático de cadena larga, que puede obtenerse por medio de la hidrólisis de grasas animales o aceites vegetales.

**Acilglicerol:** también conocido como glicérido, es un éster del trihidroxialcohol glicerol y ácidos grasos.

**Agua MilliQ:** agua ultra pura, bidestilada y deionizada que se purifica por ósmosis inversa.

**Aminoácido:** es la unidad estructural de las proteínas, que se caracteriza por tener una estructura variable; es una molécula que contiene un radical amino y un radical carboxilo unidos al carbono asimétrico alfa, que a su vez se une a un hidrógeno y una cadena lateral.



**Anticuerpo (inmunoglobulina):** es una proteína producida por los linfocitos B de memoria, en respuesta a sustancias extrañas o microorganismos (antígenos) y que se encuentra en el plasma. Posee la capacidad de unirse al antígeno que estimuló su producción, para poder inactivarlo. También se le denomina inmunoglobulina (Ig).

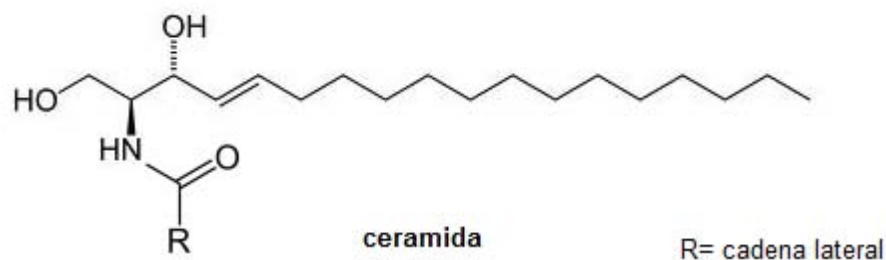
**Calostro:** es la leche amarilla producida en los primeros días después del parto (los primeros 3 a 7 días); la cantidad de grasas y carbohidratos es baja, por lo que

su contenido calórico es menor comparado con el de la leche transicional o la leche madura. Por otra parte, sus niveles de componentes inmunológicos (IgA, lactoferrina, leucocitos, etc.), vitamina E y zinc son elevados; además, la gran cantidad de beta caroteno que contiene (10 veces más que la leche madura) le confiere su color característico.

**Carbohidrato:** es un compuesto orgánico, formado por carbono, hidrógeno y oxígeno, que a su vez conforman a las moléculas de polihidroxialdehídos o polihidroxicetonas.

**Células asesinas naturales (NK):** es un linfocito diferente a las células B o T, que muestra actividad citolítica independiente del MHC, frente a células tumorales.

**Ceramida:** es un esfinguido N-acilado, compuesto por un alcohol de cadena larga insaturado (esfingosina) y un ácido graso, unidos por un enlace amida.



**Cerebrósido:** es el glicolípido más simple, formado por un residuo de azúcar (glucosa o galactosa) unido a una molécula hidrofóbica.

**Citocina:** es una proteína o glicoproteína soluble, liberada por una población celular, que actúa como mediador intercelular o molécula de señalización.

**Citopático:** daño causado por la infección de un virus en un cultivo celular.

**Citotóxico:** es la capacidad que tiene una sustancia química o célula inmune para ser tóxica a un tipo determinado de células.

**Cromatografía:** es un proceso de separación de varios compuestos que se encuentran en una mezcla, a través de su distribución entre dos fases: una fase estacionaria y una fase móvil; consiste en la aplicación de la muestra sobre la fase estacionaria, y posteriormente, hacer pasar la fase móvil a través de la fase estacionaria, de tal manera, que la mezcla de sustancias es separada dentro de sus componentes de acuerdo con su naturaleza química.

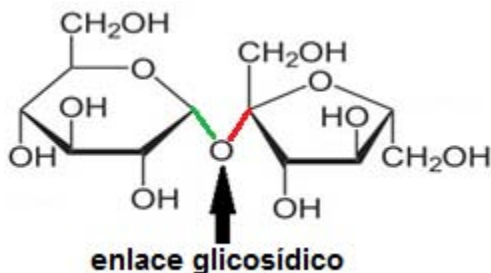
**Cultivo celular:** se trata del crecimiento de células en un medio nutritivo.

**Disacárido:** es un carbohidrato que se puede hidrolizar y dar lugar a dos monosacáridos.

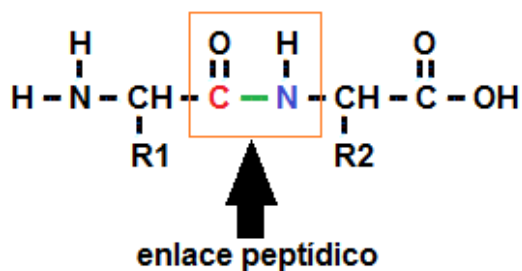
**ELISA:** *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, que se traduce como “ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas”. Es un método que consiste en determinar la cantidad de antígeno P24 de la cápside del VIH presente en el sobrenadante de la muestra a analizar, mediante el uso de un anticuerpo monoclonal anti-P24 adsorbido en el fondo de una placa, al que se une la proteína de la cápside (P24). Posteriormente se usa un segundo anticuerpo (marcado con una enzima), que se adhiere a su antígeno y que reacciona al estar en contacto con el sustrato, desarrollando un color que se mide por espectrofotometría.

**Endemia:** es la presencia de casos habituales de una enfermedad en una población concreta; que pueden producirse constantemente o en épocas específicas.

**Enlace glicosídico:** enlace mediante el cual se unen entre sí dos o más monosacáridos, formando disacáridos o polisacáridos.

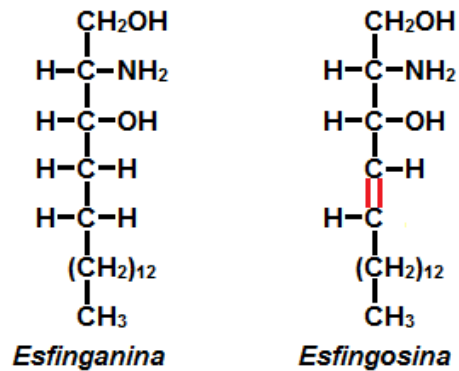


**Enlace peptídico:** es un enlace covalente que se forma entre el grupo carbonilo de un aminoácido y el grupo amino de otro aminoácido, es decir, un enlace amida.



**Epidemia:** se refiere al incremento exagerado de la cantidad de personas afectadas por una enfermedad, en una región determinada y en un período de tiempo concreto. Hace referencia a un incremento inesperado de los casos de la enfermedad frente a su nivel de endemia.

**Esfingoide:** es un alcohol de cadena larga amino alifático. Su estructura base está representada por el compuesto llamado dihidroesfingosina, también conocido como esfinganina. Mientras que el esfingoide insaturado más común fue originalmente llamado esfingosina, actualmente se conoce como (E)-esfing-4-enina.



**Esfingolípido:** compuesto formado por una molécula de un ácido graso de cadena larga, una molécula de esfingosina o esfinganina (o uno de sus derivados) y un alcohol polar de cabeza. Por lo tanto, tienen una cabeza polar y dos colas no polares.

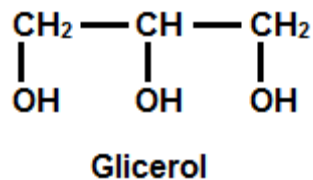
**Fosfatidilinositol:** es un fosfoglicérido formado por un esqueleto de glicerol, dos cadenas de ácidos grasos y un inositol fosforilado (un alcohol fosforilado).

**Fosfolípido:** es una molécula lipídica compuesta por dos ácidos grasos unidos a una variedad de grupos polares, a través de glicerol fosfato.

**Gangliósido:** esfingolípido complejo, constituido por un oligosacárido unido al grupo hidroxilo terminal del cerámido (N-acilesfingosina). Se trata de un glicolípido que contiene ácido siálico.

**Glicano:** se refiere a un polisacárido u oligosacárido.

**Glicerol:** es un alcohol de tres carbonos.



**Glicobiología:** es el estudio de la estructura, biosíntesis y funciones biológicas de los glicanos y los glicoconjugados.

**Glicoconjugado:** es una molécula que contiene uno o más carbohidratos unidos covalentemente a otro tipo de constituyente químico (como es una proteína, un péptido, un lípido u otra molécula biológica o no biológica).

**Glicoesfingolípido:** es un compuesto que contiene al menos un residuo monosacárido y un esfingoide o una ceramida. A su vez, se dividen en glicoesfingolípidos neutros y ácidos.

**Glicofosfatidilinositol:** es un glicolípido que contiene sacáridos unidos glicosídicamente a la molécula de inositol de los fosfatidilinositoles.

**Glicoglicerolípido:** es un glicolípido que contiene uno o más residuos glicerol.

**Glicolípido:** compuesto que contiene uno o más residuos monosacáridos unidos por un enlace glicosídico, a una molécula hidrofóbica como un acilglicerol, un esfingoide, una ceramida (N-acilesfingoide) o un fosfato de prenilo.

**Glicómica:** es el estudio del papel biológico de los glicanos y glicoconjugados.

**Glicoproteína:** compuesto formado por la unión covalente de un azúcar a una proteína.

**Glicosaminoglicano:** familia de polisacáridos de alto peso molecular, que contiene aminoazúcares (azúcares con un grupo amino).

**Heptosa:** monosacárido simple con siete átomos de carbono.



**Incidencia:** es el número de casos nuevos de personas que padecen una enfermedad, y que aparecen en un período de tiempo previamente determinado.

**Inmunoglobulina (Ig):** ver anticuerpo.

**Leche madura:** se refiere a la leche humana producida 28 o 30 días (algunas veces puede presentarse a partir de los 15 días) después del parto; el tiempo de maduración de la leche depende de varios factores relacionados con las características de la madre (tales como: su edad, su estado nutricional, su genética, etc.) y las necesidades nutricionales del neonato o lactante. La leche madura a diferencia de la leche transicional, presenta una disminución en la concentración de varios nutrientes (por ejemplo, el zinc) y un aumento en la cantidad de lípidos, proteínas y lactosa; además, su apariencia es más fluida.

**Leche transicional:** es la leche que se produce entre la transición del calostro a la leche madura (se produce a partir de la primera semana hasta la segunda o cuarta semana después del parto), en la que se presenta un aumento en la producción de la leche (para satisfacer la necesidad nutricional y de desarrollo del neonato). Su contenido de lípidos, proteínas y lactosa aumenta en comparación con el calostro.

**Leucocitos (glóbulos blancos):** son diferentes células sanguíneas que forman parte del sistema inmunológico. Existen cinco tipos de leucocitos: los basófilos, los eosinófilos, los linfocitos, los monocitos y los neutrófilos.

**Línea celular:** población de células de origen vegetal o animal capaz de dividirse indefinidamente en cultivo.

**Linfocito:** célula sanguínea que media la respuesta inmunitaria a agentes extraños (antígenos). Existen dos tipos de linfocitos: los B, que secretan anticuerpos; y los T, que se encargan del sistema de respuesta inmunitaria mediado por células.

**Lípido:** es una biomolécula insoluble en agua que presenta solubilidad elevada en disolventes orgánicos no polares (como el cloroformo), y tiene una estructura química diversa.

**Lipopolisacárido:** compuesto natural, formado por una unidad repetida de trisacárido (dos heptosas y un ácido octulosónico) con cadenas laterales de oligosacáridos y unidades de ácido 3-hidroxitetradecanoico; se encuentra en las paredes celulares de las bacterias Gram negativas.

**Lisozima:** enzima que degrada los peptidoglicanos por la hidrólisis del enlace  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4), que une al ácido N-acetilmurámico y la N-acetilglucosamina.

**Macrófago:** célula que se encuentra en los tejidos animales, y que se especializa en la captación de partículas por fagocitosis. Proceden de los monocitos.

**Monocito:** leucocito mononuclear fagocítico circulante en la sangre antes de migrar a los tejidos donde se convierte en macrófago.

**Monosacárido:** conocido como azúcar simple, es un carbohidrato que no puede hidrolizarse a compuestos más simples.

**Oligopéptido:** polímero corto de aminoácidos.

**Oligosacárido:** polímero corto de azúcares, es decir, compuesto que se origina por la unión de dos o más monosacáridos, mediante enlaces O-glicosídicos.

**Pandemia:** se refiere a una epidemia global, que afecta a un gran número de personas o a un área muy extensa (un continente o todo el planeta). También se puede denominar pandemia cuando ataca a todos los individuos de una región determinada, aunque esta sea pequeña.

**Péptido:** molécula formada por dos o más  $\alpha$ -aminoácidos, unidos por enlaces peptídicos.

**Peptidoglicano:** polímero grande compuesto por cadenas largas de residuos alternantes de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico.

**Polímero:** es una molécula grande, formada por la unión covalente de varias moléculas simples (menores e idénticas o similares), con mayor frecuencia en cadenas largas.

**Polisacárido:** polímero lineal o ramificado, compuesto por azúcares.

**Prevalencia:** es la proporción de la población que padece una enfermedad, que se desea estudiar, en un momento determinado.

**Proteína:** es un polímero lineal de  $\alpha$ - aminoácidos, es decir, es un compuesto de cadenas constituidas por aminoácidos unidos por enlaces peptídicos.

**Proteoglicano:** molécula que consiste en una o más cadenas de glicosaminoglicanos.

**Sacárido:** prefijo utilizado para denotar un azúcar.

**SIDA (Síndrome de inmunodeficiencia adquirida):** síndrome de una enfermedad infecciosa causada por el VIH, que se caracteriza por la pérdida de la respuesta inmunitaria.

**Sincicio:** célula gigante multinucleada.

**Sulfatados:** también conocidos como sulfoglicoesfingolípidos, sulfatoglicoesfingolípidos o ésteres de sulfato de los glicoesfingolípidos neutros; son glicoesfingolípidos con un grupo éster sulfato.

**Triglicérido:** es un lípido en el que la molécula de glicerol tiene unido tres ácidos grasos.

**Tropismo:** atracción o afinidad específica que presenta un virus hacia un tejido del huésped; también se define como la capacidad que tiene un virus para infectar diferentes tipos de células.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Varki A., Cummings R., Esko J., Freeze H., Hart G. and Marth J. *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1999. 28.
2. Sharon N. 1986. Nomenclature of glycoproteins, glycopeptides and peptidoglycans. *European Journal of Biochemistry*. 159: 1–6.
3. IUPAC. 1997. Nomenclature of glycolipids. *Pure and Applied Chemistry*. 69 (12): 2475-2487.
4. Gadella B., Hammache D., Pie'roni G., Colenbrander B., Van Golde L. and Fantini J. 1998. Glycolipids as potential binding sites for HIV: topology in the sperm plasma membrane in relation to the regulation of membrane fusion. *Journal of Reproductive Immunology*. 41: 233–253
5. Ogra P., Rassin D. and Garofalo R. Chapter 5. Human Milk. En: Remington J., Klein J., Baker C. and Wilson C. *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant*. 6th edition. Elsevier. 2006. 211-243.
6. Jensen R. G. *Handbook of milk composition*. Academic Press. 1995.
7. Walker A. 2010. Breast Milk as the Gold Standard for Protective Nutrients. *The Journal of Pediatrics*. 156 (2) Suppl. 1: S3-S7.
8. Gardiner T. and Ramberg J. 2000. The benefits throughout life of breastfeeding with emphasis on the role of glycoconjugates. *Glycoscience and Nutrition*. 1 (26): 1-5.
9. Lönnerdal B. 2003. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 77(suppl): 1537S–1543S.
10. Chirico G., Marzollo R., Cortinovis S., Fonte C. and Gasparoni A. 2008. Antiinfective Properties of Human Milk. *The Journal of Nutrition*. 138: 1801S–1806S.
11. Goldman A. 2007. The Immune System in Human Milk and the Developing Infant. *Breastfeeding Medicine*. 2(4): 195-204
12. Peterson R., Cheah WY, Grinyer J., Packer N. 2013. Glycoconjugates in human milk: Protecting infants from disease. *Glycobiology*. 23(12): 1425-1438.

13. Donnet A., Schiffrin E. and Walker W. Chapter 31. Protective Properties of Human Milk. En: Duggan C., Watkins J. and Walker W. *Nutrition in Pediatrics: Basic Science, Clinical Applications*. 3<sup>rd</sup> edition. BC Decker. 2008. 355-360.
14. Ballard O. and Morrow A. 2013. Human Milk Composition: Nutrients and Bioactive Factors. *Pediatric Clinics of North America*. 60 (1): 49–74.
15. Salazar S., Chávez M., Delgado X., Pacheco T. y Rubio E. 2009. Lactancia materna. *Archivos Venezolanos de Puericultura y Pediatría*. 72 (4):163 – 166.
16. Prescott L., Harley J. y Donald K. *Microbiología*. 5<sup>a</sup> edición. Mc Graw Hill. 2002. 641-681, 869-891, 915-940.
17. Costin J. 2007. Cytopathic Mechanisms of HIV-1. *Virology Journal*. 4: 100.
18. Shehu-Xhilaga M. and Oelrichs R. Chapter 1. Basic HIV virology. En: Hoy J., Lewin S., Post J. and Street A. *HIV Management in Australasia: a guide for clinical care*. Australasian Society for HIV Medicine. 2009. 9-14.
19. Forbes B., Sahm D. y Weissfeld A. *Bailey & Scott; diagnóstico microbiológico*. 12<sup>a</sup> edición. Médica Panamericana. 2009. 42.
20. Hernández F. Fundamentos de epidemiología: el arte detectivesco de la investigación epidemiológica. EUNED. 2002. 225-226, 229, 240-241.
21. ONUSIDA. *Informe de ONUSIDA sobre la epidemia mundial de SIDA*. 2013 <http://www.unaids.org/resources/publications/2013>
22. CENSIDA. *Vigilancia epidemiológica de casos de VIH/SIDA en México. Registro Nacional de casos de SIDA*. Actualización al cierre de 2014. <http://www.censida.salud.gob.mx>
23. Knipe D. and Howley P. *Fields Virology*. 6th edition. Volumes 1, 2. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins Publisher. 2013.
24. Levy J.A. *El VIH y la patogénesis del SIDA*. 1<sup>a</sup> edición. Editorial Fondo de Cultura Económica. 2008. 21-112, 179.
25. Plantier J., Leoz M., Dickerson J., De Oliveira F., Cordonnier F., Lemée V., Damond F., Robertson D. and Simon F. 2009. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nature Medicine*. 15(8): 871-872.
26. Sierra S., Kupfer B. and Kaiser R. 2005. Basics of the virology of HIV-1 and its replication. *Journal of Clinical Virology*. 34: 233-244.

- 27.** Lythgo P. 2004. Molecular virology of HIV-1 and current antiviral strategies. *BioTeach Journal*. 2: 81-87.
- 28.** Wilen C., Tilton J., Doms R. 2012. HIV: Cell Binding and Entry. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2(8).
- 29.** Blumenthal R., Durell S., Viard M. 2012. HIV entry and envelope glycoprotein-mediated fusion. *The Journal of Biological Chemistry*. 287(49): 40841-40849.
- 30.** McGowan J. and Shah S. The PRN Notebook. *Understanding HIV Tropism*. 2010. Volume 15. [www.prn.org](http://www.prn.org)
- 31.** Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *HIV Transmission*. 2010. <http://www.cdc.gov/hiv/resources/qa/transmission.html>
- 32.** Minnesota AIDS Project. *HIV Transmission*. Fecha de consulta: 2 de mayo del 2015. <http://www.mnaidsproject.org/education/index.php>
- 33.** Asjö B. Chapter 32. Human Immunodeficiency Virus (HIV). En: Haaheim L., Pattison J. and Whitley R. *A Practical Guide to Clinical Virology*. 2<sup>nd</sup> edition. John Wiley & Sons. 2002. 213-218.
- 34.** Fox J. and Fidler S. 2010. Sexual transmission of HIV-1. *Antiviral Research*. 85: 276–285.
- 35.** World Health Organization. *Mother-to-child transmission of HIV*. Fecha de consulta: 2 de mayo del 2015. <http://www.who.int/hiv/topics/mtct/en/>
- 36.** World Health Organization. *WHO recommendations on the diagnosis of HIV infection in infants and children*. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. 2010. 3.
- 37.** Kourtis A., Butera S., Ibegbu C., Belec L. and Duerr A. 2003. Breast milk HIV-1: vector of transmission or vehicle of protection? *The Lancet Infectious Diseases*. 3: 786-793.
- 38.** Hassiotou F., Hepworth A., Metzger P., Tat Lai C., Trengove N., Hartmann P. and Filgueira L. 2013. Maternal and infant infections stimulate a rapid leukocyte response in breastmilk. *Clinical & Translational Immunology*. 2, e3.
- 39.** Newburg D., Linhardt R., Ampofo S.A. and Yolken R.H. 1995. Human milk glycosaminoglycans inhibit HIV glycoprotein gp120 binding to its host cell CD4 receptor. *Journal of Nutrition*. 125: 419-424.

- 40.** Viveros-Rogel M., Soto-Ramírez L., Chaturvedi P., Newburg D.S. and Ruiz-Palacios G.M. Inhibition of HIV-1 Infection in vitro by Human Milk Sulfated Glycolipids and Glycosaminoglycans. En: Pickering, L.K., Morrow, A.L., Ruiz-Palacios, G.M. and Schanler, R.J. Protecting Infants Through Human Milk. Advancing the Scientific Evidence. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Volume 554. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers. 2004. 481-487.
- 41.** Harmsen M.C., Swart P.J., de Béthune M.P., Pauwels R., De Clercq E., The T.H. and Meijer D.K. 1995. Antiviral effects of plasma and milk proteins: Lactoferrin shows potent activity against both human immunodeficiency virus and human cytomegalovirus replication in vitro. *The Journal of Infectious Diseases*. 172:380–388.
- 42.** Swart P.J., Kuipers M.E., Smit C., Pauwels R., de Béthune M.P., de Clercq E., Meijer D.K. and Huisman J.G. 1996. Antiviral effects of milk proteins: Acylation results in polyanionic compounds with potent activity against human immunodeficiency virus types 1 and 2 in vitro. *AIDS Research and Human Retroviruses*.12:769–775.
- 43.** Saeland E., de Jong M.A., Nabatov A.A., Kalay H., Geijtenbeek T.B. and van Kooyk Y. 2009. MUC1 in human milk blocks transmission of human immunodeficiency virus from dendritic cells to T cells. *Molecular Immunology*. 46:2309–2316.
- 44.** Naarding M.A., Ludwig I.S., Groot F., Berkhout B., Geijtenbeek T.B., Pollakis G. and Paxton W.A. 2005. Lewis X component in human milk binds DC-SIGN and inhibits HIV-1 transfer to CD4+ T lymphocytes. *The Journal of Clinical Investigation*. 115:3256–3264.
- 45.** Naarding M.A., Dirac A.M., Ludwig I.S., Speijer D., Lindquist S., Vestman E.L., Stax M.J., Geijtenbeek T.B., Pollakis G., Hernell O, et al. 2006. Bile saltstimulated lipase from human milk binds DC-SIGN and inhibits human immunodeficiency virus type 1 transfer to CD4+ T cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 50:3367–3374.



- 46.** Harris D. Capítulo 23. Introducción a las separaciones analíticas. *Análisis químico cuantitativo*. 3ª edición. Editorial Reverté. 2007. 548-577.
- 47.** Columbia University Press. Questia Encyclopedia. *Chromatography*. The Columbia Encyclopedia. 6<sup>th</sup> edition. 2004.  
<http://www.questia.com/library/encyclopedia/chromatography.jsp>
- 48.** Harvey D. Capítulo 12. Métodos cromatográficos y electroforéticos. *Química analítica moderna*. 3ª edición. Mc Graw Hill. 2002. 379-434.
- 49.** Scott R. Book 1. Chrom-Ed Book Series. *Principles and Practice of Chromatography*. 2003.  
<http://faculty.ksu.edu.sa/Dr.almajed/Books/practical%20HPLC.pdf>
- 50.** Rouser G., Kritchevsky G. and Simon G. 1966. Quantitative Analysis of Brain and Spinach Leaf Lipids Employing Silicic Acid Column Chromatography and Acetone for Elution of Glycolipids. *Lipids*. 2(1): 37-40.
- 51.** Rouser G., Kritchevsky G., Heller D. and Lieber E. 1963. Lipid Composition of Beef Brain, Beef Liver, and the Sea Anemone: Two Approaches to Quantitative Fractionation of Complex Lipid Mixture. *The Journal of the American Oil Chemists' Society*. 40: 425-454.
- 52.** Fuchs B., Süß R., Teuber K., Eibisch M. and Schiller J. 2011. Lipid analysis by thin-layer chromatography-A review of the current state. *Journal of Chromatography A*. 1218: 2754–2774
- 53.** UCLA Chemistry. *Thin Layer Chromatography*. Última actualización: 18 de abril del 2015. <http://www.chem.ucla.edu/~bacher/General/30BL/tips/TLC1.html>
- 54.** Christie W. The Lipid Library. *Thin-layer chromatography of lipids*. Última actualización: 25 de Julio del 2011. <http://lipidlibrary.aocs.org/index.cfm>
- 55.** Skipski V., Smolowe A. and Barclay M. 1967. Separation of neutral glycosphingolipids and sulfatides by thin-layer chromatography. *Journal of Lipid Research*. 8: 295-299.
- 56.** Newburg D.S. and Chaturvedi P. 1992. Neutral Glycolipids of Human and Bovine Milk. *Lipids*. 27 (11): 923-927.

- 57.** Folch J., Lees M. and Sloane-Stanley G.H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*. 226: 497-509
- 58.** Rouser G., Bauman A. J., Kritchevsky G., Heller D. J. and O'Brien J. S. 1961. Quantitative chromatographic fractionation of complex lipid mixtures: Brain lipids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 38: 544-555
- 59.** hanc HIV/AIDS Network Coordination. *The ACTG/IMPAACT Laboratory Manual* (The AIDS Clinical Trials Group [ACTG] Laboratory Manual). Virology archives. <https://www.hanc.info/Pages/default.aspx>
- 60.** Celis J., Carter N., Simons K., Small J., Hunter T. and Shotton D. Chapter 2: General Procedures for Cell Culture. Chapter 3: Counting Cells. Chapter 38: Cytotoxicity and Cell growth assays. *Cell Biology: A laboratory handbook*. 3rd edition. Elsevier-Academic Press. 2006. 1: 18-20, 21-24, 315-324.
- 61.** Lonza. *Protocol for Performing a Trypan Blue Viability Test, Technical Reference Guide*. 2012. <http://www.lonza.com/>
- 62.** Electron Microscopy Sciences. *Double Neubauer Ruled Metallized Counting Chamber*. Fecha de consulta: 2 de mayo del 2015. <https://www.emsdiasum.com/microscopy/technical/datasheet/63510.aspx>
- 63.** hanc HIV/AIDS Network Coordination. *HIV Drug susceptibility assay*. 2004. [https://www.hanc.info/labs/labresources/procedures/ACTGIMPAACT Lab Manual Archive/TCID50 Determination - ARCHIVED\\_WM.pdf](https://www.hanc.info/labs/labresources/procedures/ACTGIMPAACT_Lab_Manual_Archive/TCID50_Determination_-_ARCHIVED_WM.pdf)
- 64.** Hamilton M., Russo R., and Thurston R. 1977. Trimmed Spearman-Kärber Method for Estimating Median Lethal Concentrations in Toxicity Bioassays. *Environmental Science and Technology*. 11(7): 714-719; Correction 12(4):417 (1978).
- 65.** Stryer L., Berg J. M. y Tymoczko J. L. *Bioquímica*. 5ª edición. Editorial Reverté. 2003.
- 66.** Melo V. y Cuamatzi O. *Bioquímica de los Procesos Metabólicos*. 2ª edición. Editorial Reverté. 2007.
- 67.** Wide L. G. *Química Orgánica*. 5ª edición. Pearson Educación. 2004.