



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE CIENCIAS**

**Especialización en Microscopía Electrónica en Ciencias Biológicas**

Aplicación de las técnicas de microscopía en el estudio de la acción de VLPs de parvovirus B19 en eritrocitos durante el proceso de aglutinación

REPORTE DE TRABAJO

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
Especialista en Microscopía Electrónica en  
Ciencias Biológicas

PRESENTA:  
JOSEFINA VALADEZ GARCÍA

TUTORES

Dra. Guadalupe Trinidad Zavala Padilla  
Unidad de Microscopía Electrónica  
Instituto de Biotecnología

Dr. Ismael Bustos Jaimes  
Departamento de Bioquímica  
Facultad de Medicina

Ciudad de México. Junio, 2023.



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.

## Agradecimientos

A Claudia que fue un pilar muy importante para llevar a cabo el proyecto, y sobre todo, hacer realidad la especialidad. Sin su apoyo hubiese sido imposible, empezar, realizar y terminar la especialidad.

A la Dra. Guadalupe Zavala por todas las enseñanzas y facilidades que me brindó tanto para el proyecto como para desenvolverme en la especialidad.

Al Dr. Ismael Bustos por creer en mí y darme la oportunidad de seguir formándome en el maravilloso mundo de la microscopía.

A la Dra. Reyna que fue un apoyo fundamental para mi desarrollo durante la especialidad y de quien aprendí mucho.

A Iris Ashanty por todo el trabajo que tuvo que realizar para que este proyecto se pudiera realizar y las horas de laboratorio invertidas en mi proyecto.

A Max por dedicar el tiempo que no le sobra para ayudarme en la microscopía óptica y en seguir adelante.

A Jocelyn y a Hugo que me ayudaron cuando iniciaba mi proyecto y que gracias a ellos pude tener gran parte de mis ensayos y errores.

A mi mamá que me dio ideas cuando más las necesitaba y quien siempre me ha impulsado a la investigación y exploración.

# Índice

Índice .....	3
Resumen .....	5
Abreviaturas usadas .....	6
Antecedentes.....	7
Parvovirus B19.....	7
Partículas tipo virus .....	11
Eritrocitos .....	12
Aglutinación.....	15
Microscopía óptica .....	16
Microscopía electrónica de transmisión .....	16
Microscopía de fuerza atómica .....	17
Hipótesis .....	19
Objetivos.....	20
Objetivo general .....	20
Objetivos específicos.....	20
Material y métodos .....	21
Esquema general de trabajo.....	21
Obtención de VLPs.....	21
Caracterización de VLPs.....	21
Obtención de eritrocitos .....	22
Experimento de aglutinación .....	22
Procesamiento del material biológico para observación en microscopía óptica.....	23
Para la tinción de eosina: .....	23
Para la tinción de azul de toluidina: .....	23
Procesamiento del material para observación en TEM .....	24
Para tinción negativa.....	24
Para los bloques de Epon .....	24
Procesamiento del material para observación en AFM .....	26
Resultados y análisis.....	26
Caracterización por DLS de las VLPs .....	26

Experimento de aglutinación .....	27
Microscopía óptica .....	28
Microscopía electrónica de transmisión .....	33
VLPs en tinción negativa.....	33
Experimento de aglutinación en TEM .....	36
Control de RBC en Epon mediante TEM.....	37
Experimento de aglutinación con VP1 observado en TEM .....	38
Experimento de aglutinación con VP2 observado en TEM .....	44
Microscopía de fuerza atómica .....	50
Discusión.....	52
1.- No internalización de las VLPs en los RBC aglutinados. ....	53
2.- Cambio de morfología de los RBC por contacto con las VLPs. ....	53
3.- La aparente diferencia entre la aglutinación con VP1 y VP2. ....	54
4.- Diferentes tipos de morfología en los RBC visualizado en AFM. ....	54
5.- Nanotubos en presencia de VLPs de VP1 y RBC.....	55
6.- La formación de nuevas estructuras en presencia de RBC y VP1 o VP2. ....	56
Conclusiones.....	56
Bibliografía.....	58

---

## Resumen

Las partículas tipo virus, VLPs (por sus siglas en inglés, *Virus-Like Particles*), son cápsides virales ensambladas con alguno o todos los componentes estructurales de los viriones, excepto su material genético. Una de las grandes ventajas del uso de VLPs es que conservan la estructura del virión, lo que les permite compartir su antigenicidad y tropismo, lo que las hace modelos ideales para estudiar los fenómenos de fisiopatogenia en ausencia de infección, ya que no poseen material genético. Del mismo modo, usando VLPs, es posible desarrollar vacunas, sondas, acarreadores de moléculas, así como estudiar las interacciones antígeno-célula.

El parvovirus B19 (B19V), es un virus icosaédrico, no envuelto, cuya cápside está formada por las proteínas estructurales VP1 y VP2. El B19V tiene tropismo por células eritroides, y de manera natural produce hemaglutinación. Actualmente es posible producir VLPs de B19V a partir de sus proteínas estructurales, ya sea de forma aislada o en conjunto, manteniendo sus propiedades antigénicas y de hemaglutinación. El presente trabajo tiene como objetivo observar y describir las diferencias entre la interacción de las VLPs de B19V, constituidas exclusivamente por VP1 o por VP2, con la membrana eritrocitaria después del proceso de aglutinación. Para ello haremos uso de distintos tipos de microscopía.

## Abreviaturas usadas

AFM	Microscopía de Fuerza Atómica
B19V	Eritroparvovirus de primate I/ Parvovirus B19
DLS	Dispersión Dinámica de Luz
fL	Femtolitro
Gb4Cer	Glicosfingolípido globósido neutral
GTA	Glutaraldehído
RBC	Glóbulos rojos
RBCcm	Membrana citoplasmática de los glóbulos rojos
TEM	Microscopía Electrónica de Transmisión
VLPs	Partículas Tipo Virus
VP1	Proteína Viral 1
VP2	Proteína Viral 2

# Antecedentes

## Parvovirus B19

El eritroparvovirus de primate I (Figura 1), generalmente conocido como parvovirus B19 (B19V), se clasifica dentro del género de los Eritroparvovirus, en la subfamilia Parvovirinae de la familia Parvoviridae. Como su nombre lo indica, presenta tropismo por células de la línea eritroide, y se considera uno de los virus más pequeños que infectan células de mamíferos. El genoma del B19V consiste en una cadena de ssDNA de ~5.6 kb, En el genoma del B19V (Figura 2) se encuentra una única región que codifica las dos proteínas estructurales VP1 y VP2, así como genes que codifican para la proteína no estructurales NS1, y otras pequeñas proteínas no estructurales (Broliden et al., 2006; Manaresi et al., 2019).

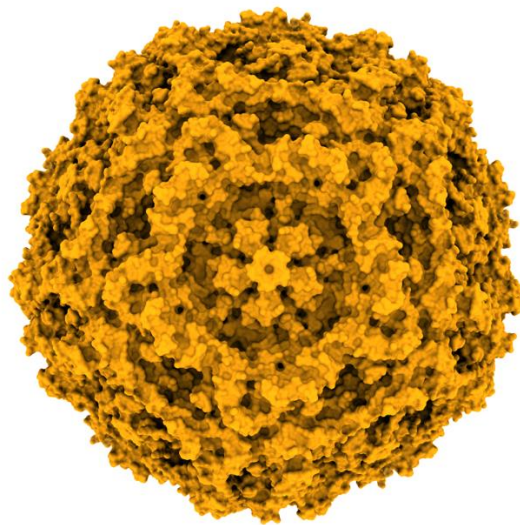


Figura 1. Estructura cristalográfica de la cápside de parvovirus B19 formada exclusivamente por la proteína VP2 (PDB 1S58).

La cápside icosaédrica del B19V tiene un diámetro de ~25 nm (Figura 3) y está compuesta por las proteínas estructurales VP1 (83 kDa, ~5 %) y VP2 (58 kDa, ~95 %). VP1 es idéntica a VP2, con la excepción de 227 aminoácidos adicionales en el extremo N-terminal de VP1, llamada región única de VP1 (VP1u). A pesar de que VP1u es el componente minoritario de la cápside, la respuesta inmune dominante contra B19V es provocada por esta región, que alberga fuertes



epítomos neutralizantes; asimismo, se ha localizado una actividad de fosfolipasa A2 (PLA2) secretada en la región única VP1 de B19V que se requiere para la infección de B19V (Bönsch et al., 2010).

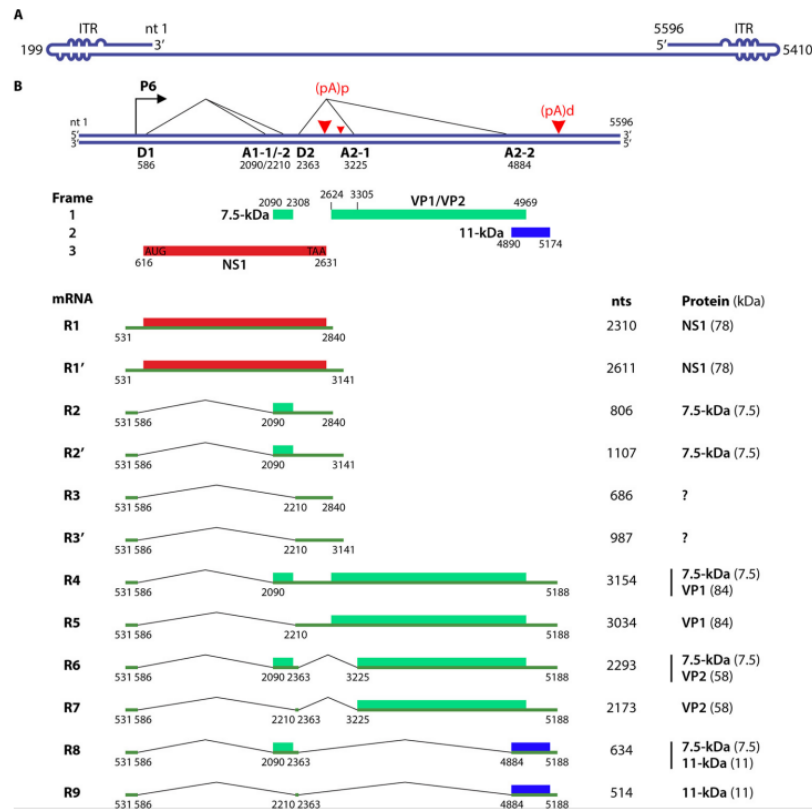


Figura 2. Mapa de transcripción de B19V. Panel A B19V empaqueta un genoma de ssDNA lineal de polaridad positiva o negativa. Panel B Diagrama esquemático de la forma replicativa dúplex del genoma B19V (Qiu et al 2017).

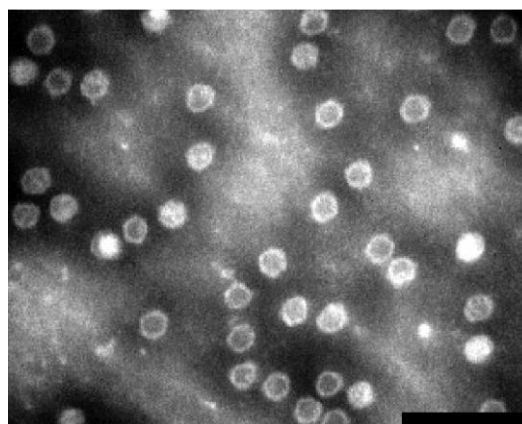


Figura 3. Micrografía de transmisión de electrones de VLPs de B19V a 250,000 aumentos. La barra de escala corresponde a 100 nm (Heegaard et al., 2002).

La infección y replicación del B19V depende de la etapa de diferenciación y tasa de proliferación de las células infectadas. Dadas sus características el B19V tiene un doble mecanismo de adaptación; el primero implica el reconocimiento y unión a receptores especializados que definen como células diana, una población celular restringida, las células eritroides, y el segundo implica la dependencia estricta de la replicación viral para la respuesta celular a estímulos fisiológicos convergentes específicos del linaje, como la activación de la vía de la eritropoyetina (Epo) y la hipoxia con un alto potencial proliferativo (Manaresi et al., 2019).

B19V usa al menos tres receptores celulares para la unión y entrada celular. El primero en ser identificado fue el glicolípido globósido. El receptor celular para B19V es el glicoesfingolípido globósido neutral (Gb4Cer), también conocido como antígeno P, que es abundante en células progenitoras eritroides (Manaresi et al., 2019). El antígeno P está presente en los precursores hematopoyéticos, eritroblastos y megacariocitos, por los que B19V muestra tropismo por células hematopoyéticas. Sin embargo, el Gb4Cer también está presente en otras células, incluidas las endoteliales, miocitos fetales, y trofoblastos placentarios; sin embargo, parece que estas últimas células representan células no permisivas en las que B19 puede entrar, pero no producir viriones completos.

Para que se produzca una infección productiva se requiere de un co-receptor, la integrina  $\alpha 5\beta 1$ . Esta integrina está involucrada en la adhesión celular y se expresa en los progenitores eritroides, lo que podría explicar el tropismo de B19V y la replicación activa en este tipo de células. Otra molécula, el autoantígeno Ku80, también se ha sugerido como co-receptor de B19V que permite la entrada en las células (Broliden et al., 2006). Se ha propuesto que El B19V entra en contacto con la globósida y expone una parte de VP1u, la cual puede interactuar con la integrina  $\alpha 5\beta 1$  para completar la endocitosis, transitar por el sistema endosoma/lisosoma y escapar de los lisosomas gracias a la actividad de PLA2 presente en el VP1u (Figura 4) (Tu, 2015).

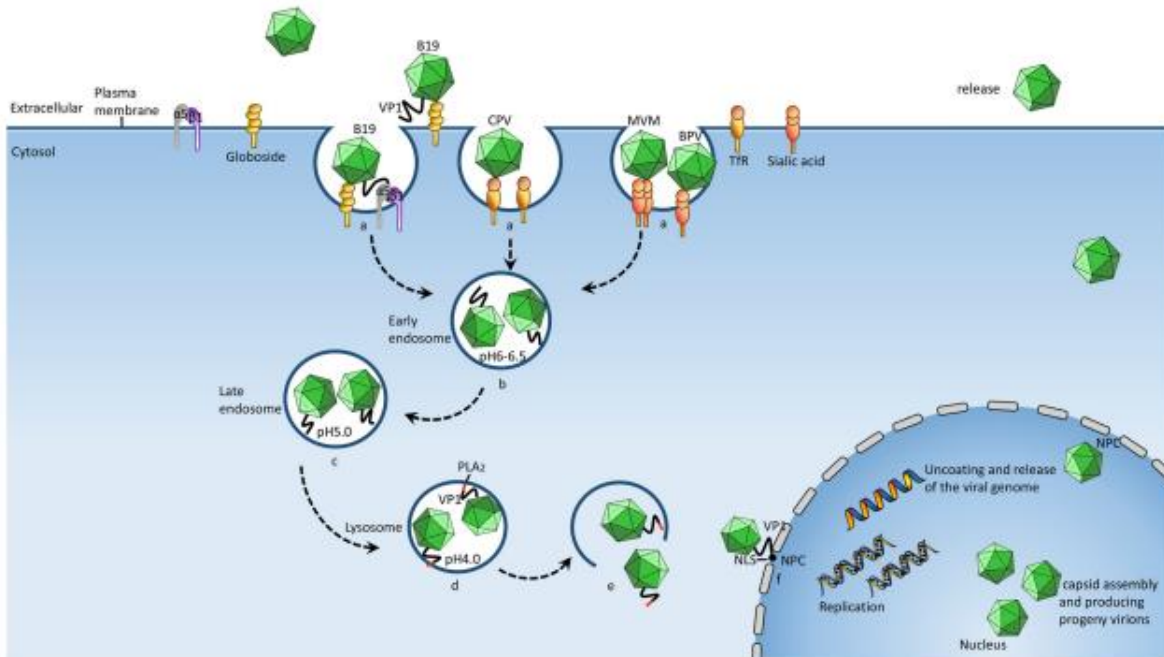


Figura 4. Esquema de internalización celular de diversos parvovirus, entre ellos el B19. MVM, virus diminuto del ratón; CPV, parvovirus canino; BPV, parvovirus bovino. El B19V entra en contacto con la globosidina y expone una parte de VP1u, la cual puede interactuar con la integrina  $\alpha 5 \beta 1$  para completar la endocitosis. El endosoma temprano se transforma en endosoma tardío y posteriormente se fusiona con lisosomas, donde ocurre una disminución de pH que activaría la actividad de PLA2 del VP1u, lo cual le permitiría al virión escapar del lisosoma y llegar al núcleo (Tu, et al. 2015).

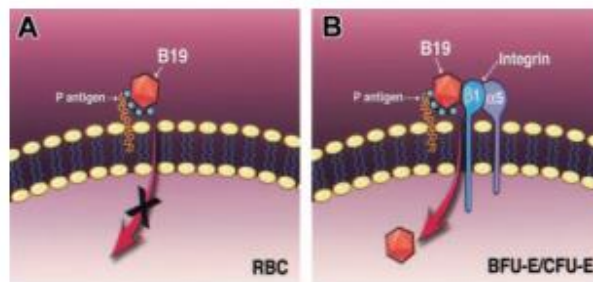


Figura 5. Esquema del antígeno P en unión con el B19V y la  $\alpha 5 \beta 1$ . BFU-E (unidades formadoras de erupción de eritroides) y CFU-E (unidades formadoras de colonias de eritroides) (Weigel-Kelley et al. 2003).

La infección por B19V causa aplasia de glóbulos rojos, anemia e hidropesía fetal, entre otras alteraciones (Figura 6), siendo estas las patologías más importantes derivadas de su tropismo (Heegaard et al., 2002).

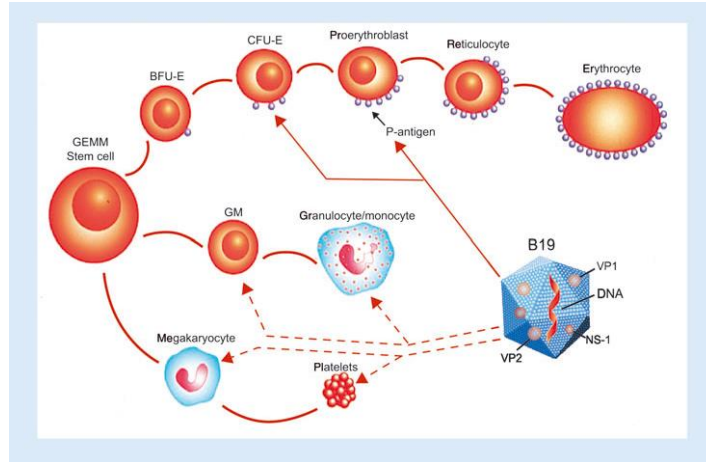


Figura 6. Esquema del tropismo del B19V en células eritroides, GEMM (granulocitos, eritrocitos, monocitos, megacariocitos), GM (colonias de granulocitos), BFU-E (unidades formadoras de erupción de eritroides), CGU-E (unidades formadoras de colonias de eritroides), (Broliden, 2006).

## Partículas tipo virus

Las partículas tipo virus (VLPs) son nanopartículas biológicas idénticas a los viriones naturales, pero sin material genético. Las VLPs son adecuadas para el análisis de los mecanismos de infección viral, la producción de vacunas, la administración de fármacos específicos de tejidos, y como nanomateriales biológicos (Figura 7). Se forman por el autoensamblaje de proteínas de la cubierta y/o cápside de virus (Sánchez-Rodríguez et al., 2012; Mejía-Méndez et al., 2022).

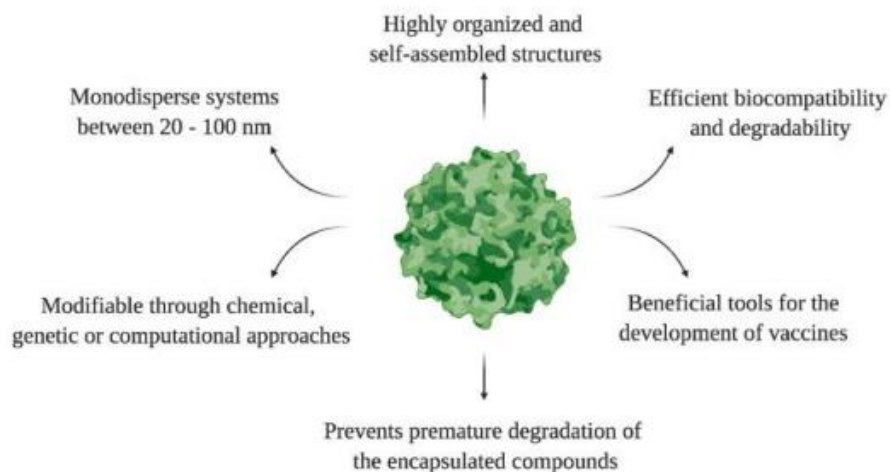


Figura 7. Aplicaciones potenciales de las VLPs (Mejía-Méndez et al., 2022).

Ha sido demostrado que es posible que se realice el autoensamblaje de las proteínas de la cápside VP1 y VP2 por separado formando cápsides completamente funcionales desde el punto de vista antigénico, idénticas al virus original. (Soto-Valerio et al., 2022).

En el caso de VLPs de B19V, las VLPs se manufacturan a partir del autoensamblaje de las proteínas estructurales VP2 o VP1, o ambas, ya sea por expresión heteróloga en sistemas eucariontes o procariontes. En el caso de eucariontes se pueden utilizar células de insecto o levaduras, generando VLPs ensambladas. Por el contrario, en sistemas procariontes, particularmente en *Escherichia coli*, estas proteínas se expresan en forma de cuerpos de inclusión. Estos cuerpos de inclusión se pueden resuspender en presencia de un agente caotrópico, particularmente Cloruro de Guanidinio (GndHCl), purificar por métodos cromatográficos, y posteriormente replegar y ensamblar las VLPs mediante la eliminación del agente caotrópico por diálisis (Figura 8) (Sánchez-Rodríguez et al., 2012).

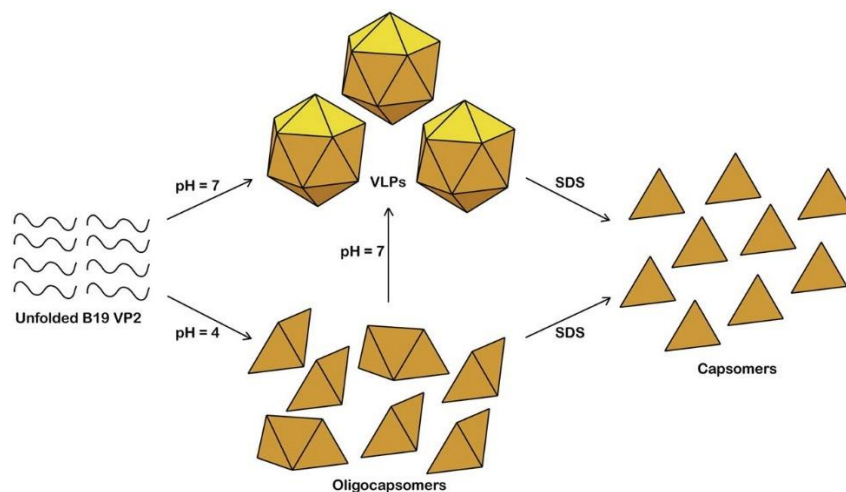


Figura 8. Esquema de autoensamblaje de VLPs de B19V. La proteína desplegada se puede replegar por diálisis para formar VLPs, las cuales pueden ser desensambladas en presencia de dodecíl sulfato de sodio (SDS) (Sánchez-Rodríguez et al).

## Eritrocitos

Los glóbulos rojos (RBC) son el tipo de célula más abundante en el cuerpo humano y proveedores críticos de oxígeno. Son células anucleadas de características simples, sin

organelos, su capa exterior de dos capas se compone del glicocálix al exterior, rico en carbohidratos, y de una membrana citoplasmática (RBCcm) unida al citoesqueleto de espectrina, que permite que la célula sea flexible pero resistente. Estas propiedades mecánicas están intrínsecamente ligadas a la composición y organización molecular de su cubierta (Himbert & Rheinstädter, 2022).

Los RBC tienen un periodo de vida de 100 a 120 días. Tienen una forma de esfera desinflada, descrita como un “disco bicóncavo”. Su diámetro oscila entre 7 y 8  $\mu\text{m}$  con 2  $\mu\text{m}$  de espesor promedio, y en el humano constan de un volumen promedio de 94 fL y una superficie de casi 135  $\mu\text{m}^2$  (Figura 9) (Piedras et al., 2022; Yeow et al., 2017).

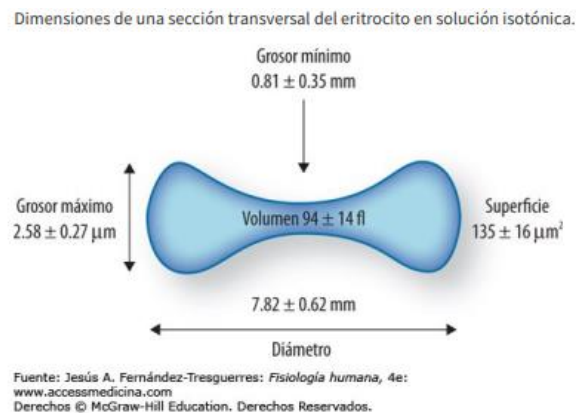


Figura 9. Esquema de las características morfológicas del eritrocito humano.

El eritrocito es capaz de atravesar capilares de 2.8  $\mu\text{m}$ , ya que tiene un exceso de membrana que además le permite formar una esfera de aproximadamente 150 fl cuando se hincha; asimismo requiere de un ingreso constante de glucosa para mantener su metabolismo energético, asimismo, obtiene los compuestos de alta energía por dos vías: la glucólisis anaeróbica y la vía aeróbica de la hexosa monofosfato (Himbert & Rheinstädter, 2022).

Según Kim et al. 2012, la estructura de la membrana del RBC tiene tres capas: (1) una capa externa rica en carbohidratos, (2) un fosfolípido bicapa de 4-5 nm de espesor, incrustada con proteínas transmembrana, y (3) una red de citoesqueleto de actina-espectrina similar a una malla triangular 2-D unida a las bicapas superficiales. La capa exterior está compuesta por dos

capas, una membrana citoplasmática (RBCcm) y un citoesqueleto basado en espectrina (Himbert & Rheinstädter, 2022). El espesor de la membrana es variable, ya que depende de la solución en la que se encuentren, es decir, si es hipertónica o hipotónica, así como derivado de las fuerzas a las que se encuentre sometida la membrana, observándose espesores de membrana entre los 20 a los 100 nm, dependiendo la zona del eritrocito donde se mida la membrana (Heinrich et al., 2001). El citoesqueleto de los RBC es una estructura bidimensional que está formado por filamentos de espectrina dispuestos triangularmente paralelos al RBCcm. El citoesqueleto está anclado al RBCcm a través de sitios de anclaje que están formados por dos complejos macromoleculares de proteínas de membrana, el complejo basado en anquirina y el complejo basado en la proteína 4.1R o Sinarpina. Ambos complejos son altamente móviles dentro de la bicapa lipídica y permiten que el RBCcm se deslice contra el citoesqueleto (Figuras 10 y 11) (Himbert & Rheinstädter, 2022).

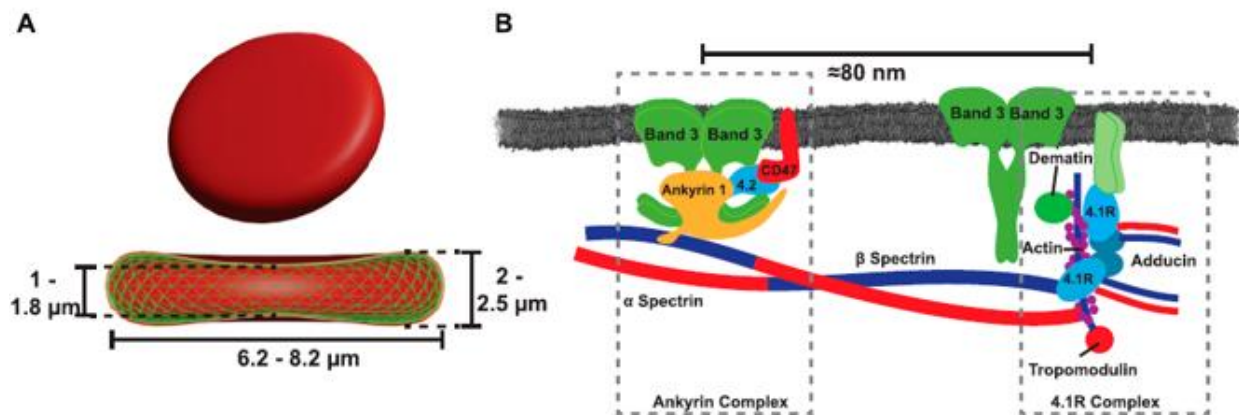


Figura 10. Esquema de las características estructurales del eritrocito y la interacción de su membrana citoplasmática con el citoesqueleto (Himbert & Rheinstädter, 2022).

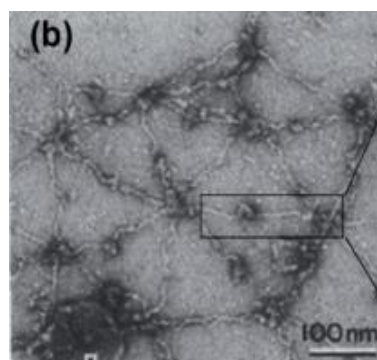


Figura 11. Imagen microscopía electrónica de transmisión de la espectrina del eritrocito (Kim et al., 2012).



# Aglutinación

La aglutinación es una reacción antígeno-anticuerpo. Las reacciones de hemaglutinación ocurren cuando los anticuerpos se unen a los sitios de unión específicos en los antígenos de glóbulos rojos adyacentes. La agregación de glóbulos rojos por las moléculas de anticuerpos, conducen a la formación de cúmulos significativamente más grandes que no pueden suspenderse de manera estable en la fase plasmática. Por otro lado, la ausencia de cúmulos de glóbulos rojos aglutinados indica que no hay reacción de hemaglutinación (Jarujamrus et al., 2012).

La capacidad inmunogénica de distintas partículas es, en orden decreciente, la siguiente: proteínas, glicoproteínas, polisacáridos, lípidos y azúcares. La aglutinación se clasifica de la siguiente manera:

- Aglutinación directa: Un antígeno celular o de partículas insolubles es aglutinado directamente por un anticuerpo.
- Aglutinación indirecta: Se refiere a la aglutinación de las células recubiertas de antígeno o a las partículas inertes que son portadoras pasivas de antígenos solubles.
- Hemaglutinación viral: Aglutinación espontánea de los eritrocitos por ciertos virus. Algunos virus, como el B19V se unen a los RBC. Los virus hemaglutinantes se unen a los residuos de ácido siálico sobre los glóbulos rojos. Un solo virión puede unirse a varios glóbulos rojos, y un glóbulo rojo puede estar unido por múltiples viriones para formar una gran red de células y virus que se visualiza fácilmente (Figura 12) (Payne, 2017).

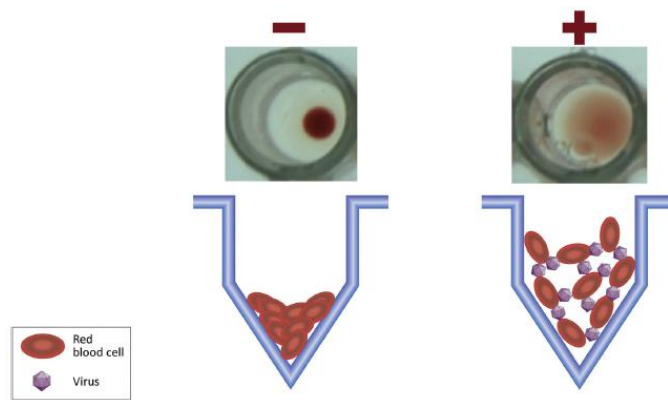


Figura 12. Ejemplo de hemaglutinación viral (Payne. 2017).



## Microscopía óptica

En el estudio de la sangre, la microscopía óptica aporta valiosa información a través del estudio de frotis de sangre periférica en su modalidad con y sin tinción específica para sangre, por lo cual es un pilar de la evaluación y diagnóstico hematológico, debido a su practicidad, facilidad y rapidez con la que se puede realizar. El estudio hematológico a través de microscopía óptica brinda información relevante de morfología, tamaño, cantidad de celularidad con alguna característica específica, color, y cuerpos de inclusión (Barbalato et al., 2022).

## Microscopía electrónica de transmisión

Zacharias Janssen, en 1595, descubrió por accidente que cuando se estira el tubo de un telescopio, se puede lograr un mayor aumento y así permitir transformarlo en un microscopio. El microscopio electrónico de transmisión está compuesto en primera instancia por una fuente de electrones llamada cañón electrónico, que por lo general es un filamento en forma de V hecho en Hexaboruro de Lantano ( $\text{LaB}_6$ ) o de Tungsteno ( $\text{WB}_6$ ), ahí se aplica un potencial eléctrico positivo al ánodo, lo que hace que el filamento (cátodo) se caliente hasta producir una corriente de electrones con una longitud de onda dada por la ecuación de De Broglie (Escalante, 2019).

El haz de electrones incide en la muestra donde los electrones que inciden en la muestra se dispersan evitando la pérdida de energía. Posteriormente la lente objetiva, que tiene la función de enfocar los haces dispersos para formar la primera imagen gracias a un proceso de difracción realizado por la lente de proyección que expande el haz de electrones y lo refleja en la pantalla de fósforo (Figura 13) (Escalante, 2019).

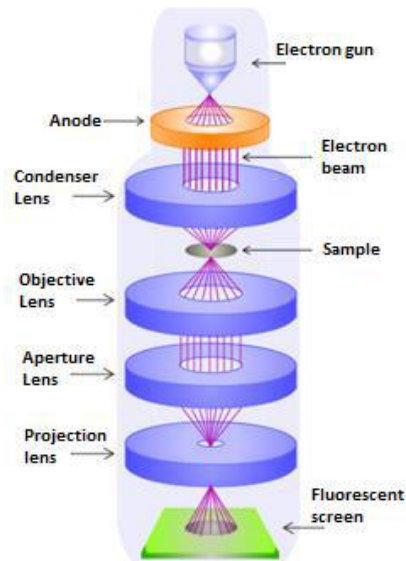


Figura 13. Esquema de las partes del microscopio de transmisión de electrones (TEM) (Escalante, 2019).

Para el estudio de los RBC, la microscopía ha sido de utilidad en revelar detalles de la red del citoesqueleto y las fosas y vacuolas en la superficie de las células (Barbalato y Pillarisetty, 2022).

## Microscopía de fuerza atómica

El microscopio de fuerza atómica (AFM) fue introducido por Binnig en 1986, y permite obtener imágenes de muestras biológicas en aire o en soluciones acuosas, simulando condiciones fisiológicas no invasivas. Los tres modos principales de operación de AFM: contacto, oscilación y fuerza, los cuales se utilizan para obtener imágenes de muestras biológicas, también permite obtener imágenes (reconstrucción topológica de la superficie de la muestra) a alta resolución, hasta la escala subnanométrica (Yeow et al., 2017; Mukherjee et al., 2015).

Mediante AFM, las membranas biológicas en su estado nativo se pueden visualizar con una resolución lateral y una resolución vertical de 0.5 a 1.0 nm y de 0.1 a 0.2 nm, respectivamente. El AFM puede proporcionar una caracterización fisicoquímica cuantitativa de los sistemas inmunohematológicos de dos maneras importantes, el modo de imagen topográfico, que define la forma y las características topológicas de la superficie así como la rugosidad de los glóbulos rojos; y la segunda, la espectroscopia de fuerza, que permite la medición de fuerzas en el orden

de los pN, con lo cual se brinda información sobre la fuerza de interacción entre la punta y la superficie, así como elasticidad y rigidez de la superficie/membrana celular, y la mecánica de moléculas expresadas en la superficie celular (Yeow et al., 2017).

## Hipótesis

- Las VLPs de B19V, al ser sistemas polivalentes, interactúan con más de un RBC provocando así la hemaglutinación. Para la internalización de estas partículas, se requeriría del receptor Gb4Cer, así como de su interacción con la integrina  $\alpha5\beta1$ , la cual sólo se encuentra en precursores hematopoyéticos. Derivado de lo anterior, se espera que las VLPs constituidas por VP1 o VP2 se unan a la membrana externa de los RBC pero que no se internalicen en estas al ser células maduras. Las VLPs de VP1, al contener a VP1u, tienen actividad de PLA2, cuya acción puede modificar las propiedades mecánicas de la membrana celular. Estas interacciones entre VLPs y la membrana externa de las RBC puede provocar cambios morfológicos en esta última, mismos que podrán ser observados por métodos de microscopía.

# Objetivos

## Objetivo general

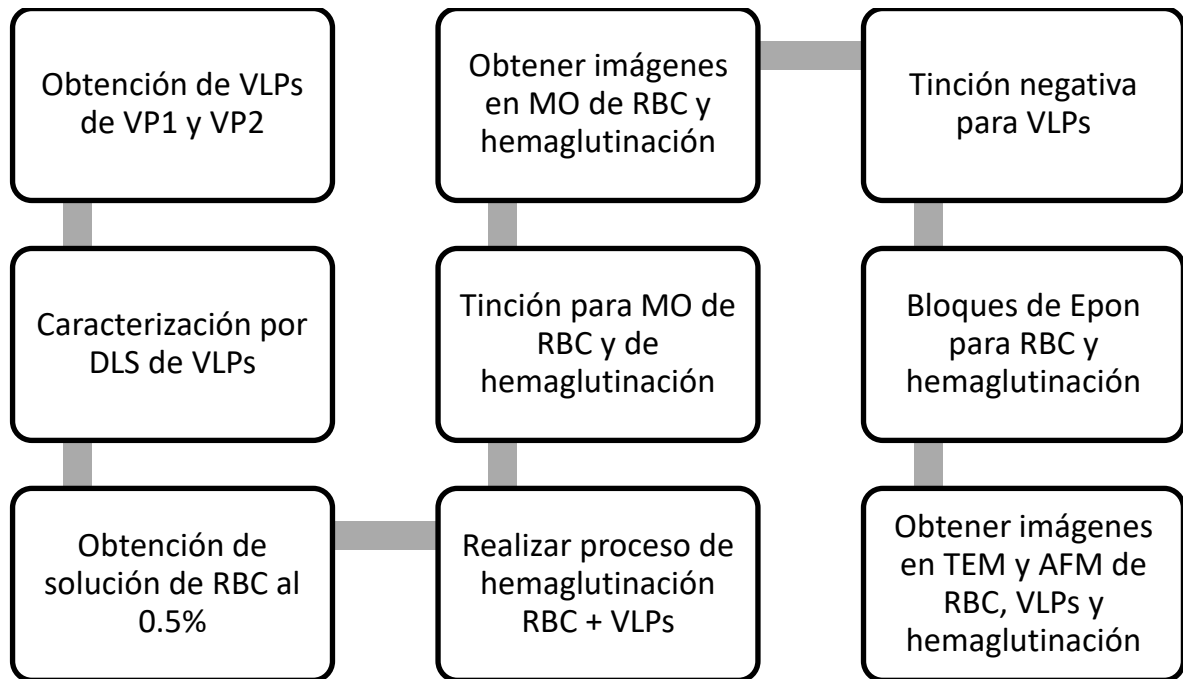
- Establecer si existen cambios morfológicos en la membrana externa de los RBC provocados por las VLPs de B19V en el proceso de aglutinación mediante técnicas de microscopía electrónica de transmisión.

## Objetivos específicos

1. Observar diferencias morfológicas entre los agregados de RCB aglutinados por las VLPs de B19V constituidas por VP1 o VP2, mediante técnicas de microscopía electrónica de transmisión.
2. Observar los cambios morfológicos en la membrana eritrocitaria ocasionados por las VLPs de B19V constituidas por VP1 o VP2, y las diferencias entre ellas.
3. Observar si se producen arreglos supramoleculares de nanopartículas, al interactuar con la membrana eritrocitaria durante el proceso de aglutinación.

# Material y métodos

## Esquema general de trabajo



## Obtención de VLPs

Las VLPs utilizadas en este proyecto fueron proveídas por la M. en C. Iris Ashanty Soto Valerio, quien en sus estudios doctorales produce de forma recombinante a las proteínas VP1 y VP2, las purifica y ensambla estas partículas por métodos ya descritos en la literatura (Soto-Valerio et al., 2022).

## Caracterización de VLPs

Para la caracterización de las VLPs a través de la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS), se utilizó el equipo Zetasizer  $\mu$ V (Malvern Instruments), con lo cual se determina el perfil de distribución de tamaño y masa que presentan materiales en solución. El protocolo para seguir fue el siguiente:

1. Las muestras fueron filtradas en una membrana de 0.45  $\mu\text{m}$ .
2. Posteriormente se filtraron en una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$ .
3. Se pasan las muestras a una celda de cristal con capacidad 500  $\mu\text{L}$  para las mediciones.
4. Se analizan mediante 5 ciclos de 10 determinaciones por ciclo.

Las condiciones se fijaron en 1.33 para el índice de refracción, viscosidad de 1.003 cP y 20°C de temperatura. Las muestras se mantuvieron en hielo antes del análisis.

## Obtención de eritrocitos

Se extrajeron 5 mL de sangre de voluntarios sanos. Se colocaron en tubos con EDTA para posteriormente obtener una suspensión al 0.5%. Para la obtención de la suspensión al 0.5% se utilizó el siguiente protocolo:

1. Se preparó un amortiguador PiBs (PIPES 20 mM, NaCl 123 mM, KCl 2.7 mM, pH 6.3) y se esterilizó. Se preparó solución fisiológica (NaCl 0.9%) y se esterilizó.
2. Se lavó la sangre con 9 mL de solución fisiológica estéril y se recuperó el paquete celular por centrifugación a 2500 rpm durante 5 min. Este paso se realizó 3 veces.
3. Finalmente se diluyeron 25  $\mu\text{L}$  del concentrado eritrocitario en 5 mL del amortiguador de PiBs.

## Experimento de aglutinación

En un sistema cubreobjetos de 8 cámaras Nunc (Thermo Scientific, cat. 155411) estériles, se mezclaron VLPs (0.3 mg/mL en amortiguador PBS) con la suspensión 0.5% de los eritrocitos, siguiendo estos pasos:

1. En la primera cámara se coloca 70  $\mu\text{L}$  de RBC al 0.5% con 140  $\mu\text{L}$  de amortiguador PiBs.
2. En la segunda cámara se coloca 70  $\mu\text{L}$  de RBC al 0.5% con 140  $\mu\text{L}$  de VP1.
3. En la tercera cámara se coloca 70  $\mu\text{L}$  de RBC al 0.5% con 140  $\mu\text{L}$  de VP2.
4. Se dejan reaccionar a temperatura ambiente por 35 min para su posterior

observación.

## Procesamiento del material biológico para observación en microscopía óptica

Para la observación de RBC se hicieron dos técnicas para microscopía óptica, la primera fue con tinción de eosina y la segunda fue con tinción de azul de toluidina.

### Para la tinción de eosina:

1. Del sistema de 8 cámaras se extraen 10  $\mu$ L de la solución de aglutinación con el fijador (que fue agregado posterior a la aglutinación y es una mezcla de GTA con buffer de cacodilatos, a proporción 1:10) y se colocan en un portaobjetos de vidrio.
2. Se deja secar al aire ambiente.
3. Una vez secada la muestra se colocan en un vaso de Coplin con alcohol a 96%.
4. 24 horas después se realiza la tinción de eosina.
  - a. Se colocan cubetas para tinción histológica con los siguientes reactivos en el siguiente orden:
  - b. Lavado con agua 1 minuto.
  - c. Etanol al 100% 1 minuto.
  - d. Eosina 45 segundos.
  - e. Etanol al 95% 1 minuto.
  - f. Etanol al 100% 1 minuto.
  - g. Xileno al 100% 1 minuto.

### Para la tinción de azul de toluidina:

Del sistema de 8 cámaras se extrae todo el contenido que se utilizará para la realización de las resinas y posteriormente:

2. Se retiran las cámaras para dejar solamente el cubreobjetos de borosilicato.
3. Se realiza la tinción de azul de toluidina al 2%.
  - a. Para realizar la tinción de azul de toluidina, se agregan 2 ml de azul de toluidina sobre el cubreobjetos



- b. Se deja actuar durante 1 minuto.
- c. Se lava con agua bidestilada a chorro hasta que desaparezca el colorante.
- d. El cubreobjetos se deja secar a temperatura ambiente.

La visualización de las muestras teñidas por ambas tinciones, fueron observadas en un microscopio óptico Zeiss, modelo Axio. Las fotografías de todas las muestras fueron tomadas con AxioCam.

## Procesamiento del material para observación en TEM

### Para tinción negativa

Para la caracterización de las VLPs a través de microscopía electrónica de transmisión, se siguió el siguiente protocolo:

1. En una rejilla de cobre con membrana de Formvar/Carbon se colocaron 10  $\mu$ L de VLPs en PiBs en una dilución 1:5 y se dejaron 1 minuto sobre la rejilla.
2. Posteriormente se retiró el excedente.
3. Por último, las rejillas fueron contrastadas con acetato de uranilo al 2.5% durante 1 minuto y se retiró el excedente.

### Para los bloques de Epon

Para realización de los bloques de resina para su posterior corte se realizó el siguiente protocolo:

- Fijación: Una vez que se realizó el proceso de aglutinación en el sistema de 8 cámaras descrito en el paso de aglutinación, se colocan 150  $\mu$ L de amortiguador de cacodilatos-GTA (cacodilato de sodio 0.1 M pH 6.5, y glutaraldehído 50% en solución acuosa).
- Obtención del botón: Del sistema de 8 cámaras se extraen los 360  $\mu$ L de la muestra y se pasan a tubos eppendorf de 0.5 mL. Se centrifugan durante 5 min a 800 rpm, se retira el sobrenadante y se coloca amortiguador de cacodilatos-GTA para volver a centrifugar y

retirar sobrenadante.

- Postfijación: Posterior a la obtención del botón se adicionan 100  $\mu$ L de tetraóxido de osmio al 1% y se incuba durante 60 min.
- Deshidratación: Se realizan tres lavados, el primero con alcohol al 70%, el segundo con alcohol al 96% y el último con alcohol absoluto. Todos los lavados se realizan durante 10 min.
- Preinclusión: Se realizan 3 lavados de 10 min con óxido de propileno al 100% P210 como medio intermediario. Posteriormente en una dilución 1:1 de Epon con óxido de propileno, la cual se deja reposar durante 24 h con la finalidad de que se evapore el óxido de propileno.
- Inclusión: Finalmente se termina el proceso de inclusión con resina Epon al 100% y se deja polimerizar durante 24 a 48 h a 60°C.
- Corte. Posterior a la inclusión, las resinas se retiran de los tubos eppendorf, se tallan caras trapezoidales con navaja y posteriormente se realizan cortes de 20 nm de grosor con cuchilla de vidrio en ultramicrotomo LEICA. Los cortes son colocados en rejillas de carbono con membrana de colodión para su contraste.
- Contraste: Se realiza contraste con 40  $\mu$ L de acetato de uranilo al 4% durante 20 min, luego se lavan para posteriormente contrastarlos con 40  $\mu$ L de citrato de plomo durante 10 min. Una vez terminado el tiempo, se lavan con 5 ml de agua bidestilada y se dejan secar al ambiente para su observación al microscopio.

Tanto las tinciones negativas como los bloques de Epon fueron observados en microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM 10-10, con cámara digital Gatam y software Digital Micrograph, así como microscopio Libra 120 Zeiss, ambos a 80 kV.

## Procesamiento del material para observación en AFM

Para la visualización del experimento de aglutinación, con la finalidad de observar la morfología de los eritrocitos en cada uno de los experimentos y el control, se realizó lo siguiente:

1. Del sistema cubreobjetos de 8 cámaras Nunc, se retiraron las cámaras para sólo dejar el cubreobjetos.
2. Se colocó con cinta doble cara el cubreobjetos correspondiente a cada muestra sobre un portamuestra magnético.
3. Se observaron las muestras en un equipo Veeco Innova, en modo tapping, con sonda SNL-10 de la marca Bruker, el cantiléver A.
4. Se realizaron barridos de 30  $\mu\text{m}$  con acercamientos de entre 15 y 10  $\mu\text{m}$ .
5. Se utilizó el programa NanoScope v 8.02.

## Resultados y análisis

### Caracterización por DLS de las VLPs

Para la caracterización de las VLPs, se realizó DLS con la finalidad de comprobar la existencia de formación de cápsides completas. El diámetro esperado para las VLPs de VP1 era de  $27 \pm 7$  nm y para VP2 de  $23 \pm 6$  nm (Soto-Valerio, 2022). Sin embargo, pese a lo observado en la literatura, no se encontraron diferencias significativas entre las cápsides formadas por VP1 y VP2 en cuanto al diámetro de estas.

En la figura 13 se presentan las gráficas de DLS tanto para VP1 como VP2, donde se demuestra la existencia de las nanopartículas.

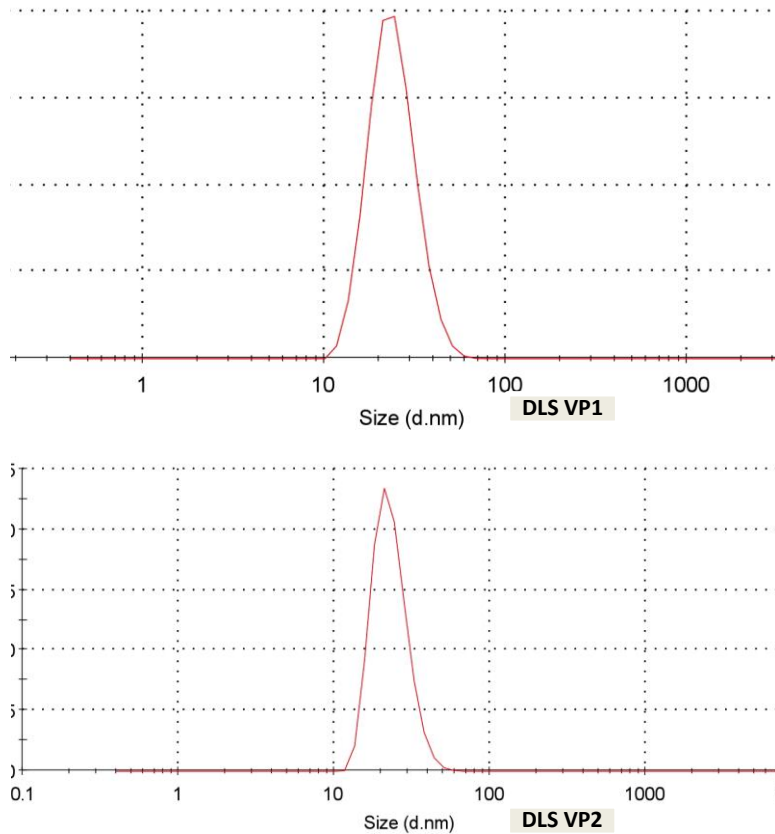


Figura 14. Análisis por DLS de VLPs de VP1 (arriba) y VP2 (abajo).

## Experimento de aglutinación

Se realizó el ensayo de aglutinación colocando siempre en la primera cámara los RBC solos, en el segunda VLPs VP1 + RBC y en la tercera cámara VLPs VP2 + RBC (Figura 15). Sin embargo, derivado de que el sistema de cámaras está sobre un cubreobjetos, a simple vista no es muy factible registrar fotográficamente la aglutinación, ya que para que se observe claramente, lo ideal sería realizarlo en una placa con pozos de fondo V con la finalidad de que la aglutinación y el botón de células sea plenamente diferenciable al descender este último, sin embargo, la aglutinación se comprueba plenamente en la microscopía óptica.

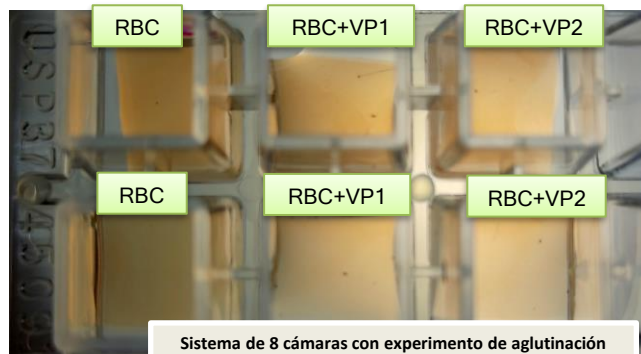


Figura 15. Experimento de hemaglutinación, primera cámara RBC, segunda cámara RBC + VP1, tercera cámara RBC + VP2. Mismo experimento arriba y abajo, pero con sangre distinta.

## Microscopía óptica

Posterior al ensayo de aglutinación, se realizaron dos tinciones diferentes para microscopía óptica, una con eosina y otra con azul de toluidina. La diferencia de tinciones se hizo con la finalidad de distinguir el experimento que había sido teñido y observado directamente de donde se hizo la aglutinación, es decir del sistema de 8 cámaras con cubreobjetos (azul de toluidina), de la muestra que había sido retirada del mismo sistema (eosina).

Las células sanguíneas pueden ser teñidas con distintas tinciones, entre ellas Giemsa, Wright y hematoxilina y eosina. Tinciones como Giemsa o Wright, dentro de sus componentes contienen colorantes metacromáticos como el azul de metileno, entre otros. Considerando que, para el presente proyecto no se utiliza sangre completa, sino sólo los eritrocitos, se escogió realizar eosina y como comparador azul de toluidina, que también es una tinción con características metacromáticas (Barbalato y Pillarisetty, 2022; Bergholt et al., 2019).

Partiendo del hecho de que la aglutinación es una interacción débil que tiene como característica la reversibilidad si se alteran factores del medio y de la propia muestra, como temperatura, pH, y fuerza iónica entre otros (Bautista-Juárez, 2005), se consideró que al tomar una muestra de dónde ocurrió la reacción podría alterarse la visibilidad de la reacción de aglutinación toda vez que la muestra había salido del medio original donde ocurrió la reacción.

Se esperaba encontrar diferencias entre ambas tinciones, partiendo del hecho que son partes distintas del mismo experimento, ya que en la eosina era de esperarse cierto grado de ruptura de la aglutinación en comparación con la tinción de azul de toluidina que sería realizada dentro del mismo sistema de 8 cámaras donde se llevó a cabo la reacción.

En ambas tinciones se pudo observar no sólo el proceso de aglutinación, que fue más evidente en el caso de la tinción de azul de toluidina, derivado de la mayor celularidad con respecto al ensayo teñido con eosina, sino también un cambio en la morfología de los eritrocitos, presentando un patrón “espiculado”.

En la Figura 16 se presenta un panel de imágenes comparativo, donde se observa la diferencia en la aglutinación observada por las mismas muestras de RBC, RBC + VP1 y RBC + VP2 a 63x aumentos para ambas tinciones.

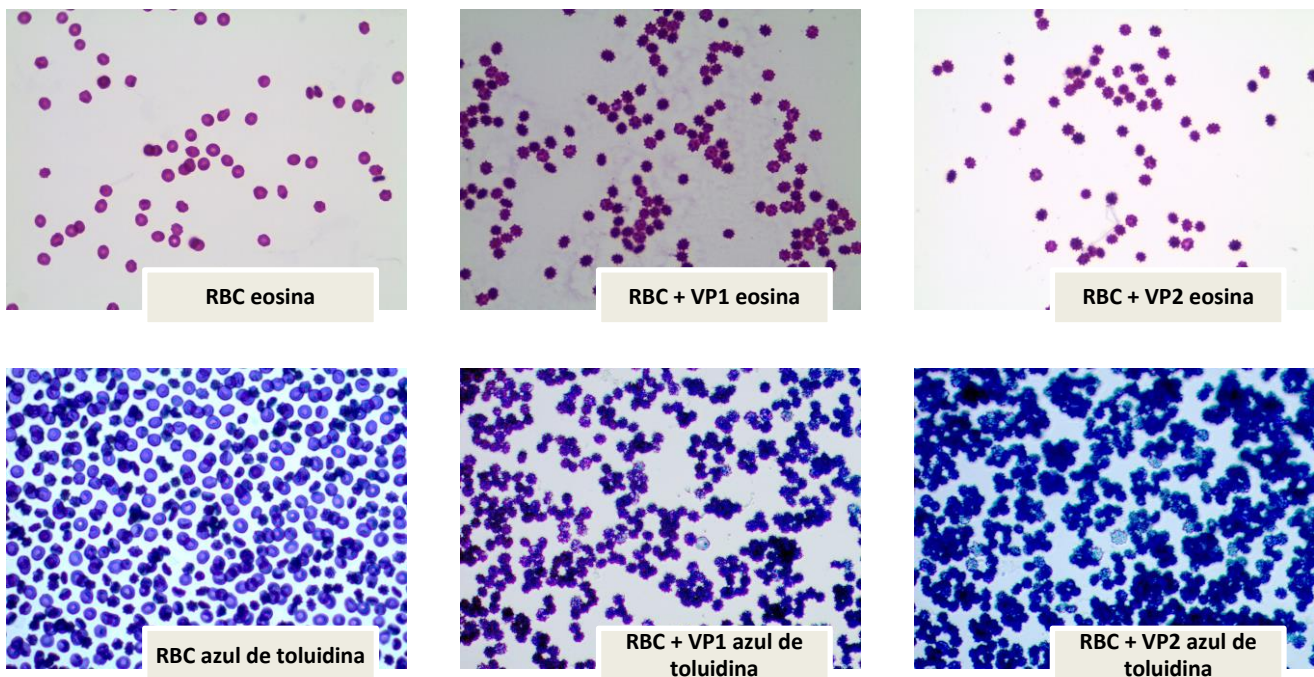


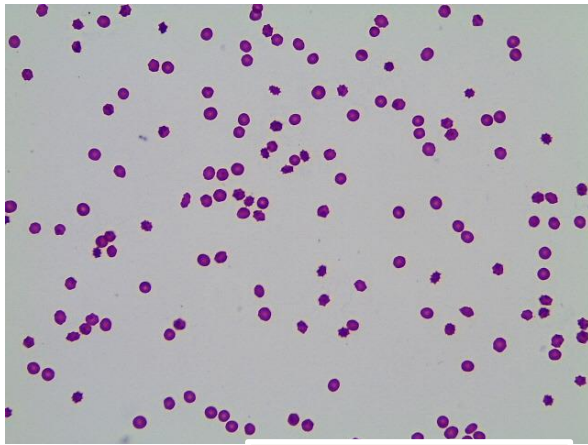
Figura 16. Microscopía óptica comparativa a 63x del ensayo de aglutinación con el control con la tinción de eosina (arriba) y azul de toluidina (abajo).

En ambos casos es posible identificar que en las micrografías donde sólo están los RBC la morfología es la esperada para eritrocitos en su estado nativo, es decir, discos bicóncavos (Barbalato y Pillarisetty, 2022) aun cuando la celularidad es diferente, sin embargo, esto también es esperado derivado de que en las muestras con eosina se coloca una pequeña fracción del experimento completo.

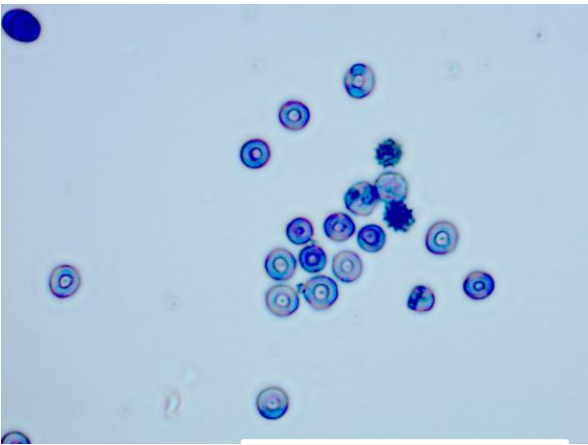
Por otro lado, se observa un aparente aumento de aglutinación con VP2 con respecto a VP1, ya que se observan mayores conglomerados celulares en la tinción de azul de toluidina para el experimento RBC + VP2.

La interacción de los receptores de superficie del eritrocito con las VLPs produce la aglutinación. Las cápsides de VP1 y VP2 han demostrado macroscópicamente su capacidad para realizar esta hemaglutinación de manera independiente, por lo cual se esperaba la aglutinación y considerando que VP1 cuenta con la región VP1u, que juega un papel importante en la respuesta inmunitaria, era de esperarse que VP1 aglutinara más que VP2, algo que no se observó en el presente trabajo (Brown y Cohen, 1992; Soto-Valerio et al., 2022). No obstante, la hemaglutinación con VLPs de B19V ocurre a través de la interacción del Gb4Cer en la superficie de los RBC con los residuos Gln399, Gln400, Tyr401, Thr402, Asp403, Gln404 y Glu406, de tres subunidades diferentes en el eje de simetría de orden 3 de la partícula icosaédrica (Huang et al., 2014). Además, se sabe que el VP1u se expone a través del eje de simetría de orden 5 y queda en la superficie de la partícula. Teniendo estos dos hechos en mente, la menor aglutinación celular observada en las partículas constituidas exclusivamente por VP1 podría deberse a un impedimento estérico ocasionado por la presencia de VP1u cerca del eje de simetría de orden 3, que impediría, de manera parcial, que cada VLP interactuara con varias RBC.

En la Figura 17 se presentan los eritrocitos solos, observados con ambas tinciones a distintos aumentos, donde se aprecia la morfología conservada.



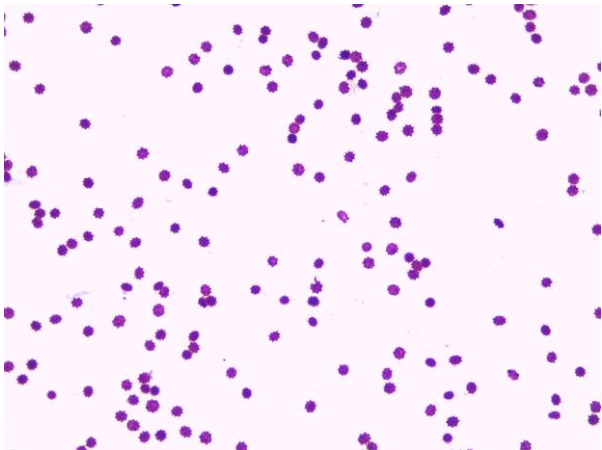
RBC 40x Eosina



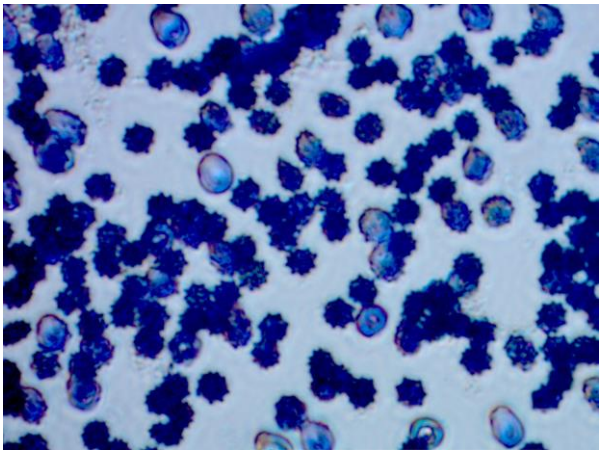
RBC 100x Azul de toluidina

Figura 17. Microscopía óptica de RBC teñidos con eosina y azul de toluidina a distintos aumentos.

En la Figura 18 se presenta el panel a 40x con eosina y a 100x con azul de toluidina de los experimentos de aglutinación con VP1 y VP2 respectivamente, donde se observa el patrón espiculado generalizado en los RBC.

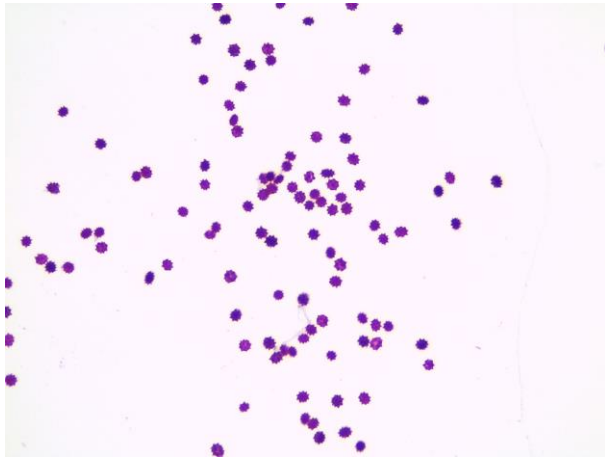


RBC + VP1 40x Eosina

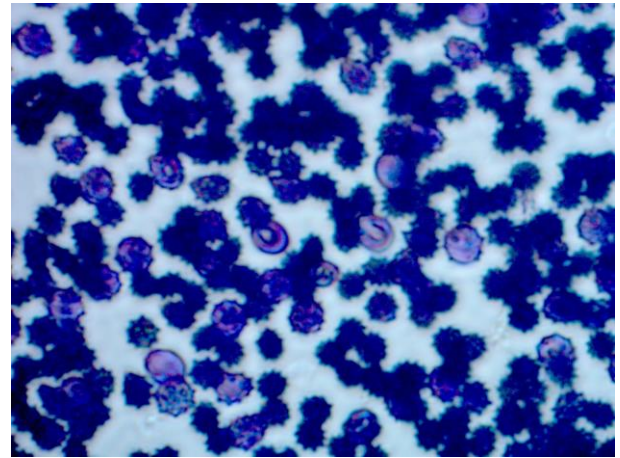


RBC + VP1 100x Azul de toluidina





RBC + VP2 40x Eosina



RBC + VP2 100x Azul de toluidina

Figura 18. Microscopía óptica de RBC + VP1 y RBC + VP2 en eosina y azul de toluidina a distintos aumentos

Como se aprecia, además de que se presenta el fenómeno de aglutinación, es decir células agrupadas, se aprecian RBC con cambios en su morfología. En ambos casos, se visualizan proyecciones que salen de los RBC.

En la literatura se describen varios tipos de RBC de acuerdo a la morfología que presentan, entre ellos el acantocito y el equinocito, que aparentemente son los que se obtuvieron posterior a la aglutinación. Los acantocitos son células en espuela, que se caracterizan por tener proyecciones irregulares en tamaño y distancias variables entre sí. El equinocito se caracteriza por células con proyecciones uniformes y equidistantes entre sí (Barbalato y Pillarisetty, 2022). Aun cuando se obtuvo un cambio de morfología distinguible en microscopía óptica de campo claro, se analizaron las muestras por TEM y AFM con la finalidad de dilucidar qué especies de eritrocitos están presentes con respecto a su morfología.

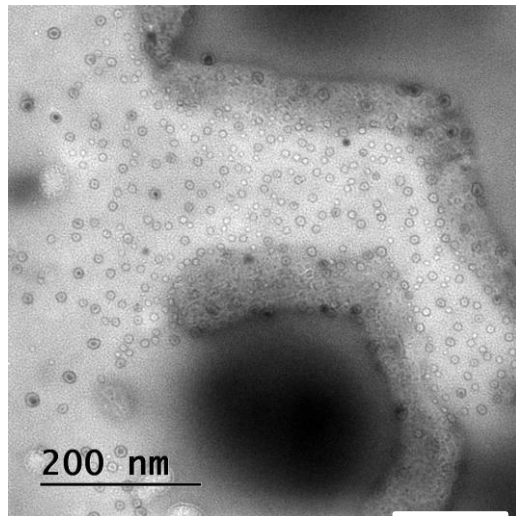
# Microscopía electrónica de transmisión

## VLPs en tinción negativa

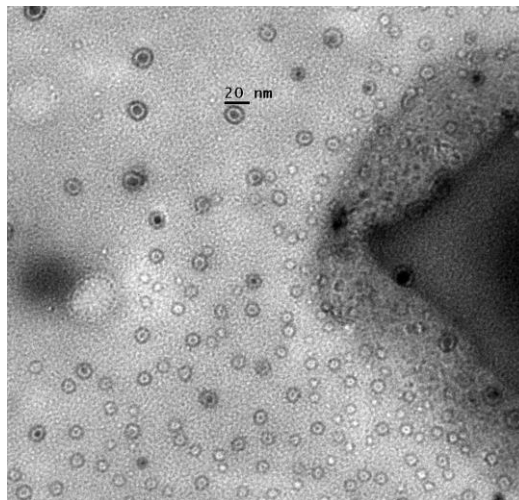
En la Figura 19 se presenta la caracterización de VP1 a distintos aumentos a través de TEM, en la cual se observa la presencia de VLPs de aproximadamente 20 nm, observando un patrón ligeramente polidisperso, lo que es compatible con lo reportado por DLS para estas VLPs, donde se logró medir un radio hidrodinámico de  $24 \pm 7$  nm, compatible con el tamaño de partículas hidratadas.

En la Figura 20 se presenta la caracterización de VP2, observado a distintos aumentos, logrando el mayor aumento a 31.5 K para visualizarlas individualmente. En TEM se pudo caracterizar VLPs de VP2 de 20 a 29 nm, que corresponde a lo medido por DLS para VP2, donde se encontró que su tamaño era de  $23 \pm 6$  nm. En microscopía electrónica de transmisión, al ver nanopartículas, es posible realizar focos extremos, uno donde se aprecian las nanopartículas en color negro y otro donde se ven de color blanco. Generalmente se ven en el foco blanco, pero para comprobar su existencia se pueden ver en foco negro. Para las cápsides de VP2, fue necesario realizarse ambos focos ya que no se lograba obtener ni la misma nitidez ni los aumentos que pudieron lograrse en VP1.

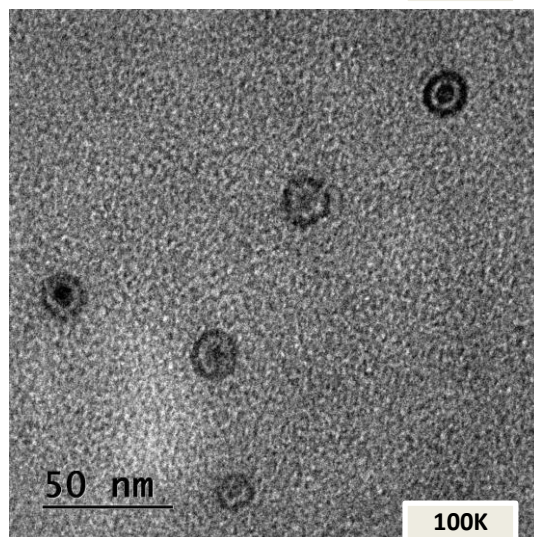
Lo observado en DLS, en comparación con lo caracterizado por TEM para ambas VLPs, corresponde a lo reportado en la literatura, donde se describen VLPs constituidas por VP1 o VP2 de alrededor de 25 nm, por lo cual este es el control del experimento en cuanto a morfología y tamaño para VLPs en TEM (Soto-Valerio, 2022).



31.5K

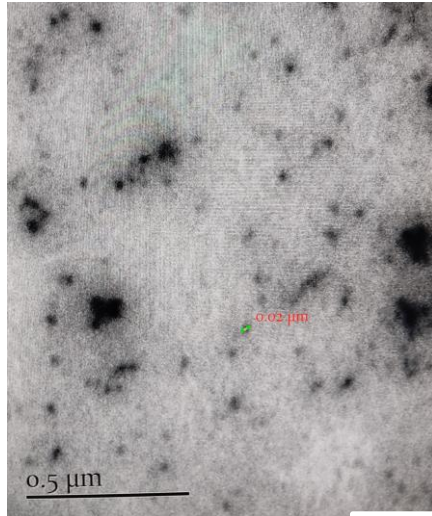


50K

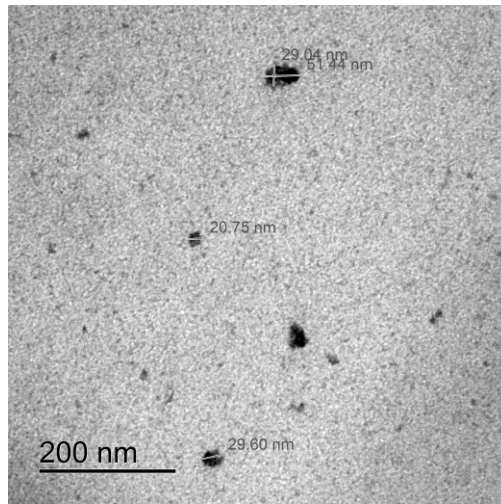


100K

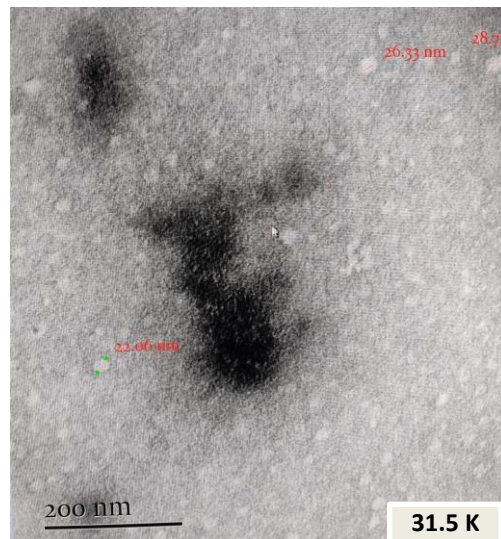
Figura 19. VLPs de VP1 a distintos aumentos por TEM.



**VP2**



**31.5 K**

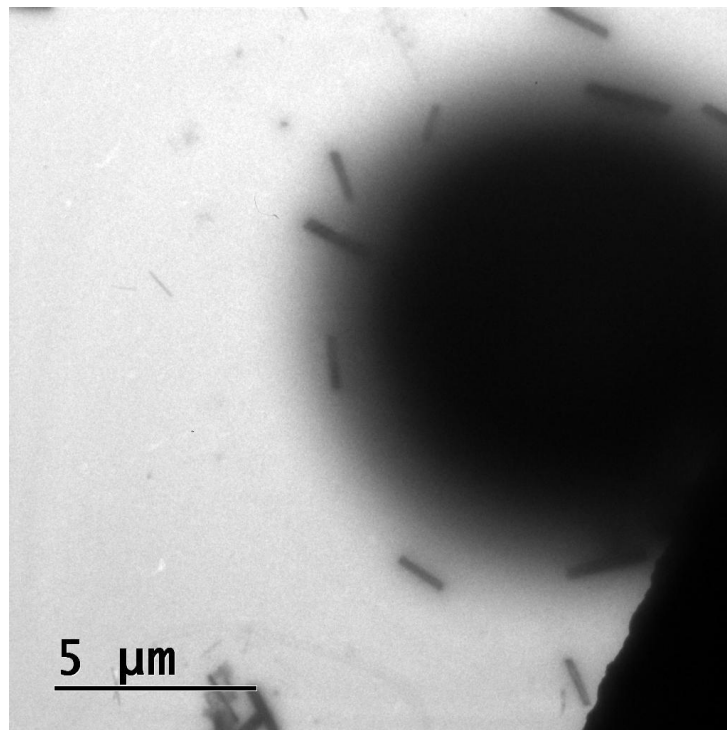


**31.5 K**

Figura 20. VLPs de VP2 a distintos aumentos por TEM.

## Experimento de aglutinación en TEM

Un experimento adicional fue la tinción negativa con acetato de uranilo al 2.5%, para la reacción de aglutinación de RBC + VP1, donde se observó la presencia de nanotubos. En la búsqueda de las condiciones para producir una hemaglutinación que pudiera replicarse con una tasa de éxito de más del 80%, se realizó un experimento donde se colocan VLPs de VP1 + RBC en proporción 1:3, con lo cual pudieron observarse nanotubos aún cuando no era posible identificar plenamente la hemaglutinación. Si bien se trata de un evento no esperado y el cual no se volvió a reproducir derivado que no era el propósito del presente proyecto, es interesante observar la presencia de nanotubos cuando entran en contacto VLPs de VP1 en contacto con RBC, ya que al no presentarse durante la caracterización de las VLPs puras, es posible que sólo se produzcan por la interacción con los RBC.



RBC + VP1 1.2K

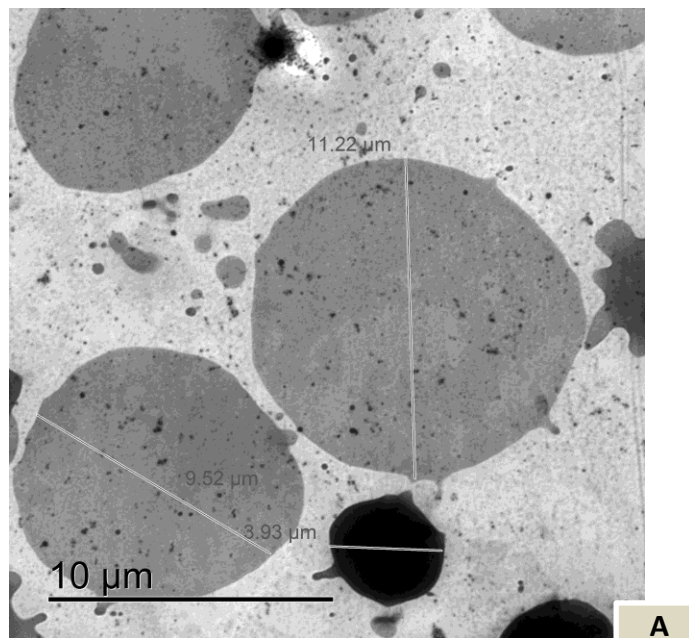
Figura 21. Tinción negativa de reacción de hemaglutinación con VP1 en TEM.



## Control de RBC en Epon mediante TEM

Los RBC observados por TEM, que no fueron expuestos a las VLPs, conservan su morfología descrita en la literatura de discos bicóncavos. En la Figura 22, panel A, se observa la morfología esférica esperada para un corte frontal de RBC y en el panel B se observa la forma lateral de los RBC con su tamaño conservado.

La morfología bicóncava típica de los RBC, así como su tamaño de aproximadamente 8  $\mu\text{m}$  de diámetro y 2  $\mu\text{m}$  de grosor, está dada por el medio en el que se encuentran, es decir, cambios físicos (estados hipertónicos, hipotónicos o térmicos), químicos (contacto con fármacos, fosfolípidos, etc.), patologías preexistentes y envejecimiento (Yeow et al., 2017). Por lo anterior, el amortiguador en el que se llevó a cabo la reacción de aglutinación debía ser lo más cercano a las condiciones fisiológicas normales humanas, y además debe ser un vehículo idóneo para las VLPs. Nuestros resultados sugieren que esto se logró, ya que los RBC sin VLPs conservaron la morfología esperada, con lo cual comprobamos que el control para RBC es adecuado.



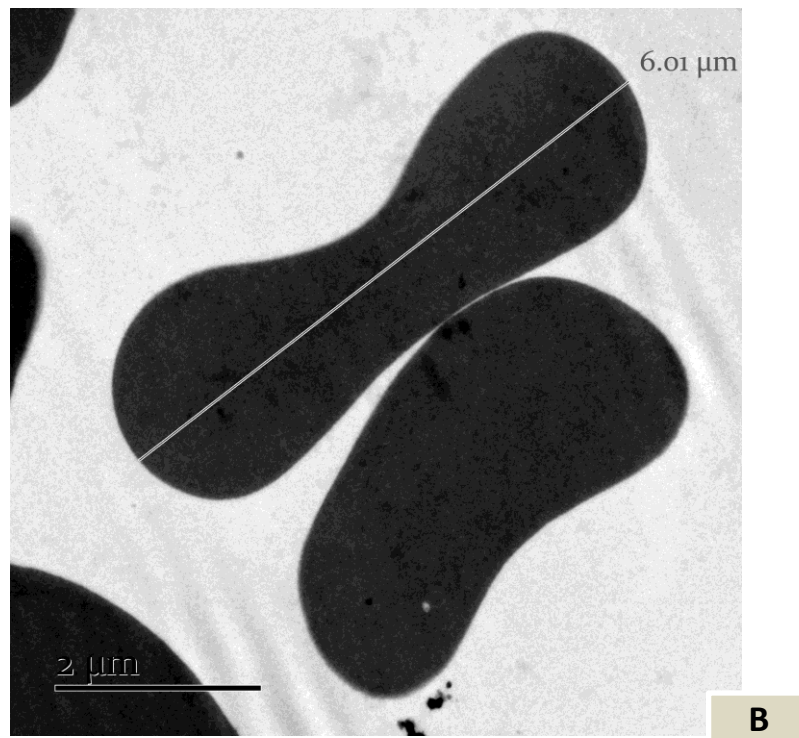


Figura 22. RBC en Epon vistos en TEM.

### Experimento de aglutinación con VP1 observado en TEM

De las Figuras 23 a la 25 se observan los resultados obtenidos de la interacción entre VLPs de VP1 y RBC. Conforme a lo mostrado en las Figuras 16 y 18, se demostró que la aglutinación había ocurrido. Sin embargo, observarla en TEM es complicado, derivado de la diferencia de aumentos y considerando que se realizaron cortes desde la superficie para observar el interior de los RBC.

En la Figura 23, se observa, a bajo aumento, la presencia de múltiples RBC con morfología alterada, así como con presencia de pequeñas sombras redondeadas que se encuentran en la periferia externa de su membrana, misma que tiene un aspecto rugoso comparada con la de los RBC en la Figura 22. En el panel A de la Figura 23, se observan varios RBC que se encuentran cercanos entre ellos y que en algunos casos exhiben prolongaciones que hacen contacto entre ellos.

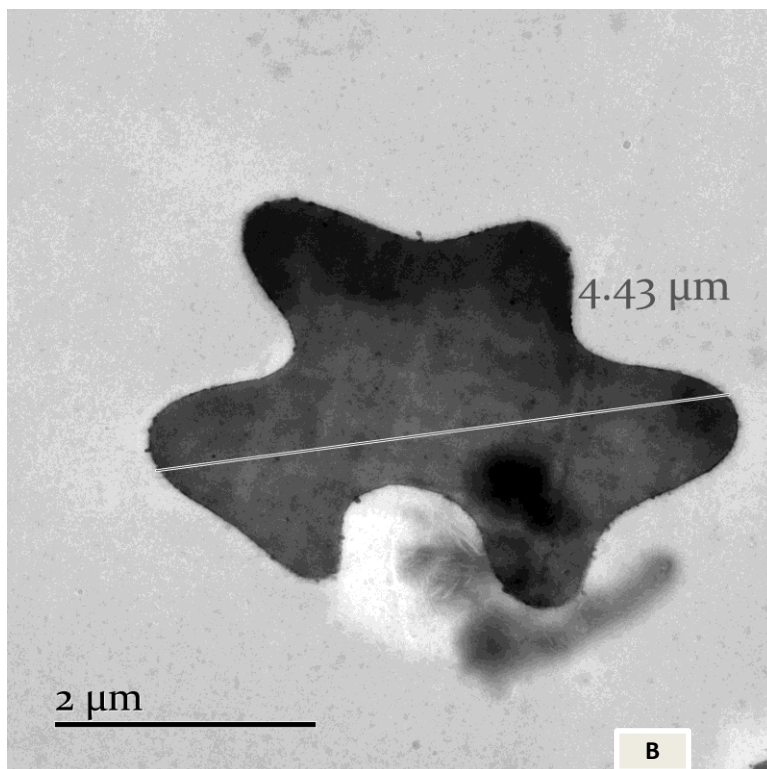
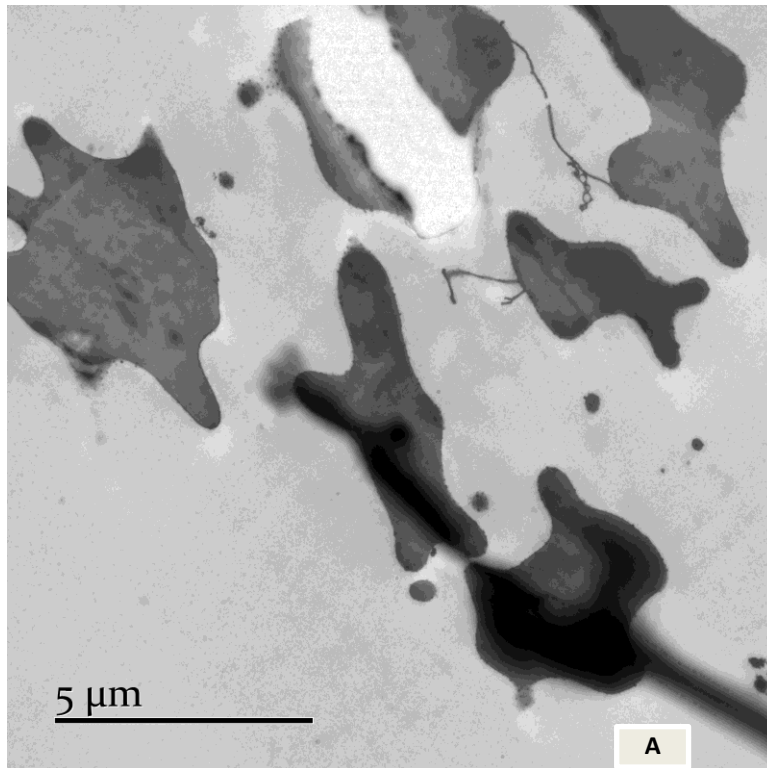


Figura 23. Hemaglutinación con VP1 (A) y VP2 (B) en TEM a bajo aumento.



En el panel B de la Figura 23 y en la Figura 24 se observa que las dimensiones de los RBC son un poco más pequeñas a lo reportado en la literatura, esto se puede deber a dos factores: 1) los RBC al ser cortados pueden quedar en zonas más proximales o distales de donde su diámetro es el reportado, por lo cual podrían parecer más pequeños que el RBC en su estado natural, y 2) el cambio de morfología hacia equinocitos o acantocitos, siendo el tamaño esperado para los equinocitos  $7.6 \pm 0.6 \mu\text{m}$  y para los acantocitos de  $7.7 \pm 0.5 \mu\text{m}$  (Tsui et al., 2020), lo cual, aparentemente no es mucha diferencia en tamaño, sin embargo al juntar ambos factores se obtienen RBC de menor diámetro.

En la Figura 25, paneles A y B, se observan a mayor aumento los RBC, sus membranas celulares, así como la aparición de nuevas estructuras muy alargadas. A los nuevos filamentos que presentan estructuras redondeadas dentro de su misma estructura se les llamará en lo sucesivo “*filamento en constelación*” (FC).

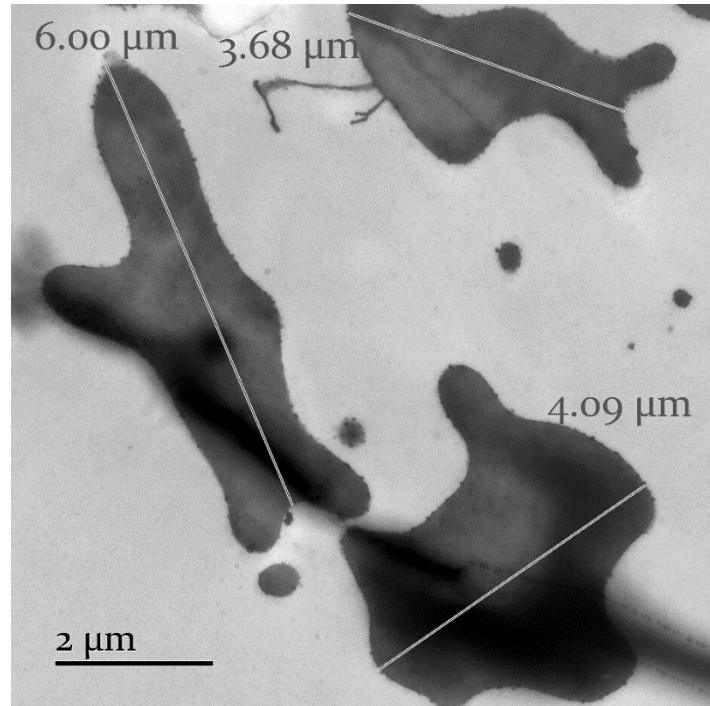
El FC tiene una electrondensidad similar a la mostrada por la membrana eritrocitaria lo cual sugiere que su composición está relacionada con restos de otras membranas celulares de otros eritrocitos, además de que mantienen VLPs adosadas al filamento como se observa en la Figura 26 panel A, donde se puede ver un fragmento de filamento y varias estructuras redondeadas de mayor tamaño adosadas al filamento en la muestra con VLPs de VP1. Sin embargo, este mayor tamaño de las estructuras unidas al filamento podría ser resultado de estar midiendo parte del filamento con las VLPs. Los tamaños para las VLPs putativas en el FC está en 40 nm.

Los RBC en contacto con las VLPs de B19V muestran FC rectos y algunos ramificados. Sin embargo, como se observa en el panel A de la Figura 26, parece existir siempre relación entre las VLPs putativas y los FC, que incluso pueden producir estructuras FC más complejas como se observa en la Figura 25 panel B.

Como se observa en las Figuras 23 panel B, 24, 25 y 26 panel B, se aprecia la presencia de estas VLPs putativas adosadas en la membrana exterior de los eritrocitos, independientemente de la presencia o no de filamentos, lo cual está de acuerdo con la literatura, la cual señala que

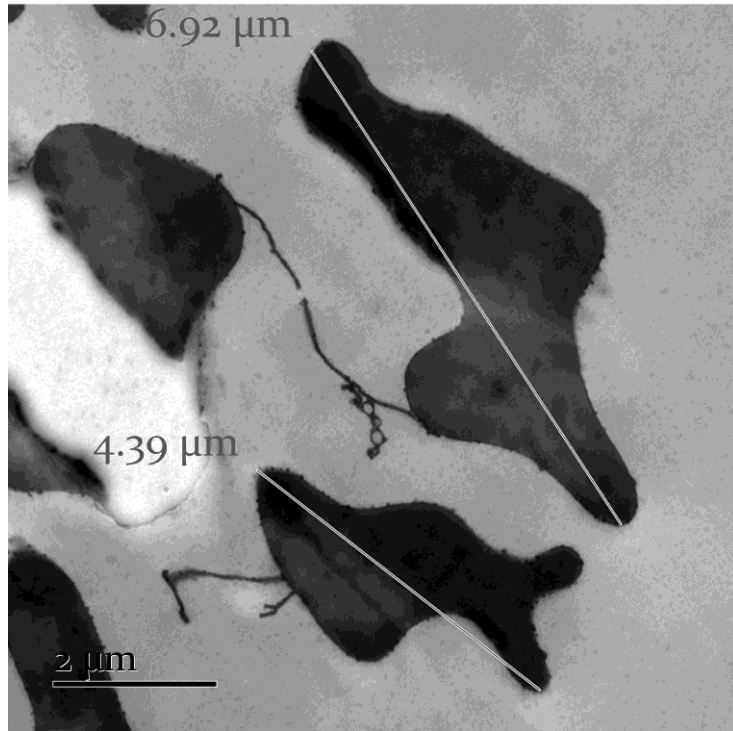
los RBC maduros tienen una alta concentración de antígeno P, lo que permitiría la adhesión de las VLPs con independencia de la internalización (Weigel-Kelley et al., 2003). Se ha descrito que para la internalización de VLPs es necesario que éstas sean reconocidas por los receptores de membrana y posteriormente sean internalizadas a través de endocitosis y puedan transitar a través de los microtúbulos a partir de endosomas (Lyi et al., 2014). En este caso, los RBC no cuentan con todos los receptores requeridos para su internalización.

En la Figura 26, panel B, se observa la presencia de VLPs de VP1 inmersas en el contenido citoplasmático que quedó expuesto posterior a la ruptura de la membrana celular, sin embargo, por imagen, no es posible determinar si las VLPs fueron capaces de internalizarse a través de la ruptura eritrocitaria o si, simplemente fueron atrapadas por el contenido del citoplasma una vez que éste fue expuesto al exterior. Por otro lado, recordemos que VP1 tiene actividad de PLA2, lo cual podría haber promovido cambios bioquímicos en la membrana, haciéndola más propensa al daño mecánico.

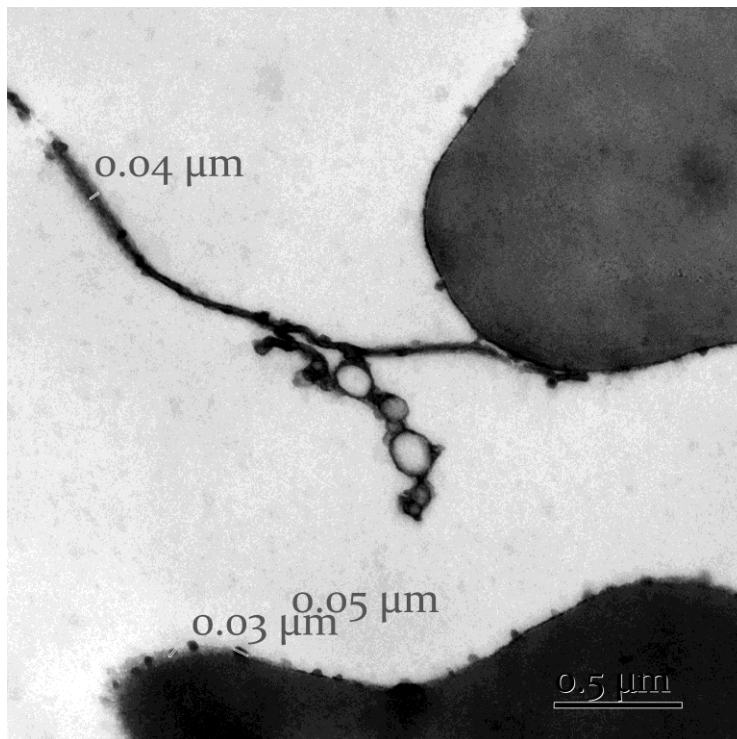


A

Figura 24. Acercamiento de los patrones formados durante la aglutinación de RBC + VP1 en TEM.



A



B

Figura 25. Acercamiento de los patrones formados durante la aglutinación de RBC + VP1 en TEM.

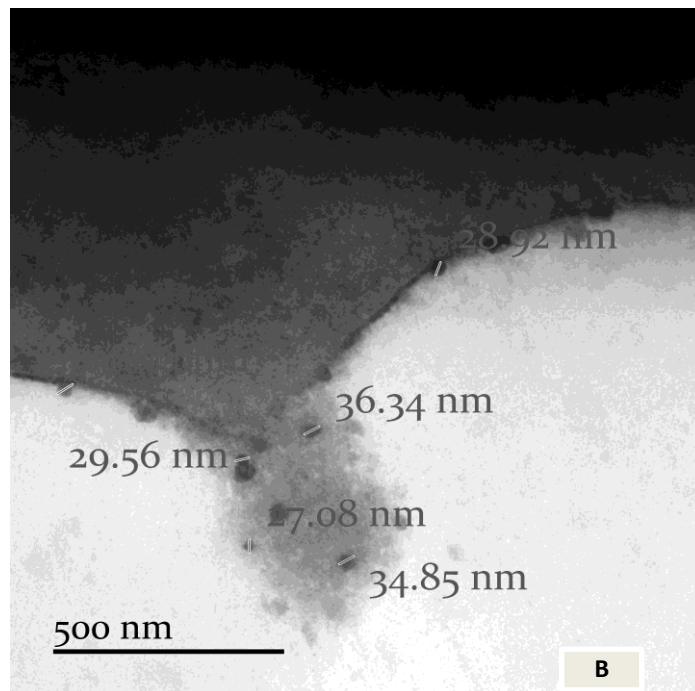
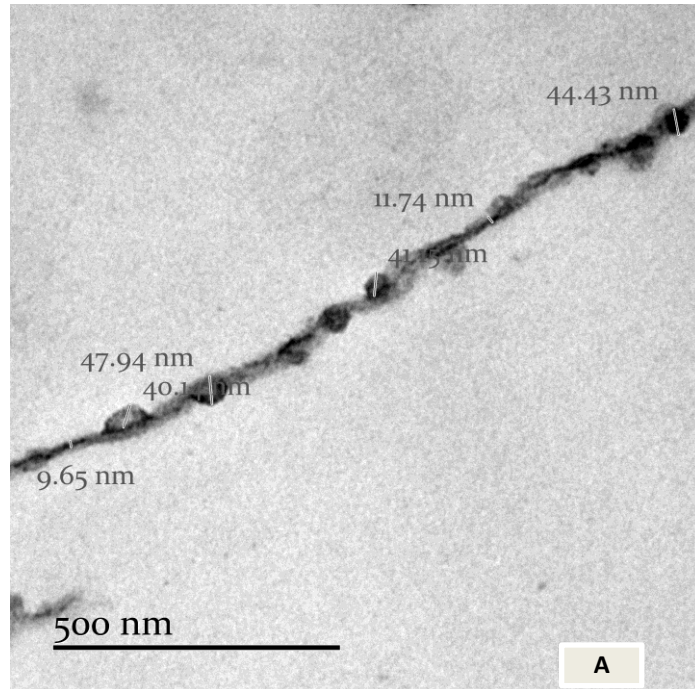


Figura 26. Acercamiento de los patrones formados durante la aglutinación de RBC + VP1, así como de la ruptura de la membrana de RBC en TEM.

## Experimento de aglutinación con VP2 observado en TEM

En la Figura 27, al igual que en el experimento de aglutinación con VLPs de VP1, vemos que con las VLPs de VP2 también se observa una disminución de tamaño en el diámetro del eritrocito, probablemente por las mismas causas mencionadas para las VLPs de VP1. En el cuadrante superior derecho, se observa la formación de estructuras alargadas que parecen estar formadas por estructuras más pequeñas redondas que se atraen entre sí en compañía de otras estructuras alargadas que parecen ser una misma estructura alargada que no está formada por otros componentes. Dichas estructuras alargadas no parecen estar relacionadas con otros eritrocitos, sin embargo, se encuentran en el límite de la micrografía por lo cual no es posible dilucidar si existe algún o algunos eritrocitos a los que estén asociados. Las estructuras alargadas pudieran ser restos celulares o alguna neoformación ocasionada de la interacción entre los RBC y las VLPs de VP2, ya que la electrondensidad es diferente a la que presentan los eritrocitos y su membrana. Los eritrocitos son altamente electrondensos, así como las figuras redondeadas que se encuentran asociadas a las estructuras alargadas que en lo consiguiente serán llamadas "*filamentos VP2*".

La electrondensidad de los *filamentos VP2* en la Figura 27, así como su estructura es similar a los nanotubos observados en la Figura 21, lo cual podría indicar una correlación entre la formación de macroestructuras tubulares cuando los RBC entran en contacto con la VLPs de B19V. Esto es una hipótesis que requiere más experimentación para comprobarse.

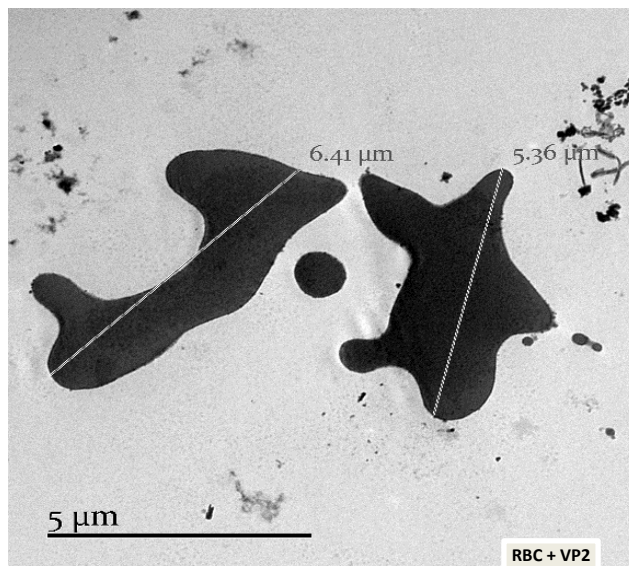


Figura 27. Acercamiento de los patrones formados durante la aglutinación de RBC + VP2 en TEM.

En las Figuras 28 y 29 panel A, se observa lo mismo que para el experimento de aglutinación de VP1, es decir múltiples VLPs adosadas a la membrana eritrocitaria externa. Sin embargo, a diferencia de lo observado con las VLPs de VP1, con VP2 se observa que no sólo se adosan a la membrana si no se superponen unas VLPs con otras, sin que necesariamente se forme un filamento derivado de la poca extensión de éstas VLPs, lo cual se aprecia en la Figura 28 panel B, en el cuadrante superior derecho, donde se ve como, lo que parecen ser VLPs, se juntan y sólo una de ellas está en contacto directo con la membrana eritrocitaria.

En la misma Figura 28, panel B, se miden las distintas VLPs adosadas a la membrana, dando mediciones de entre los 30 y 49 nm, no pudiendo descartar que las aparentes VLPs de más de 35 nm sean agregados de más de una VLP como se observa en la conformación antes descrita.

Tanto en la Figura 28 panel B como en la Figura 29 panel A, se observa un patrón “espumoso” menos electrodensos que la membrana eritrocitaria. Sin embargo, no puede apreciarse como tal una ruptura de dicha membrana; aun así, puede tratarse de contenido citoplasmático que fue vertido por otro eritrocito pero que por el sitio de corte sólo se logró capturar una porción del componente citoplasmático sin evidencia de su célula asociada. La razón por la que se asocia

el patrón espumoso a contenido del citoplasma es que las características de electrondensidad y patrón son similares a lo observado en la Figura 26, donde claramente se ve que la membrana perdió continuidad y el citoplasma quedó expuesto. El hecho de que no se vea ruptura de membrana, pero si patrón el espumoso de citoplasma en la aglutinación con VP2, sugiere que suceden eventos distintos cuando se trata de VLPs de VP1 que cuando son constituidas por VP2.

En la figura 29 panel B se observan otra vez patrones parecidos a los *filamentos en constelación* que habían sido observados en VP1, sin embargo, en este caso, las aparentes VLPs están dentro del filamento y casi no protruyen al exterior del filamento, algo que sería la diferencia entre los filamentos en constelación entre VP1 y VP2, así mismo, tampoco son similares a los *filamentos VP2* ya que en ellos no se observa integridad de VLPs.



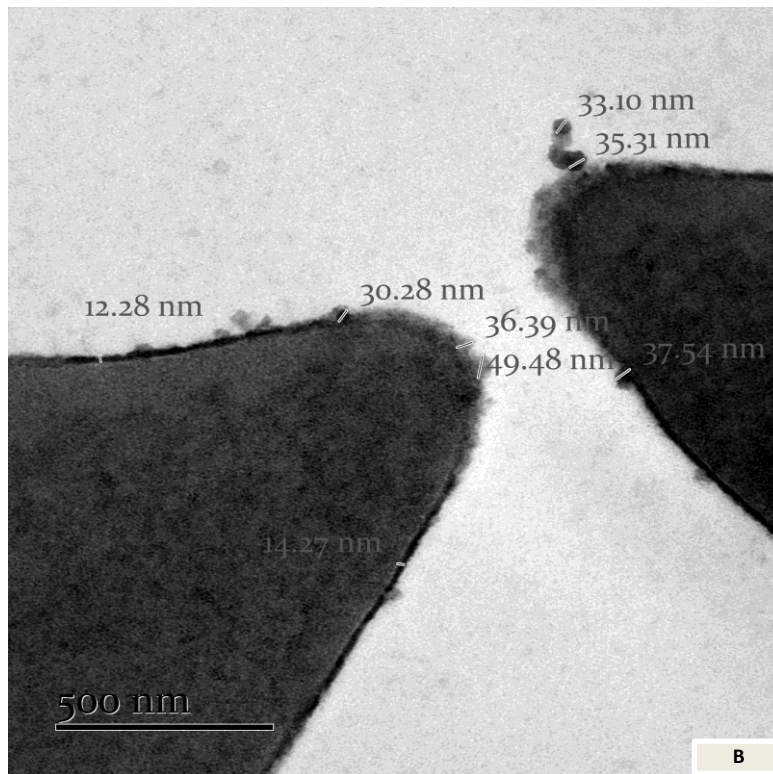
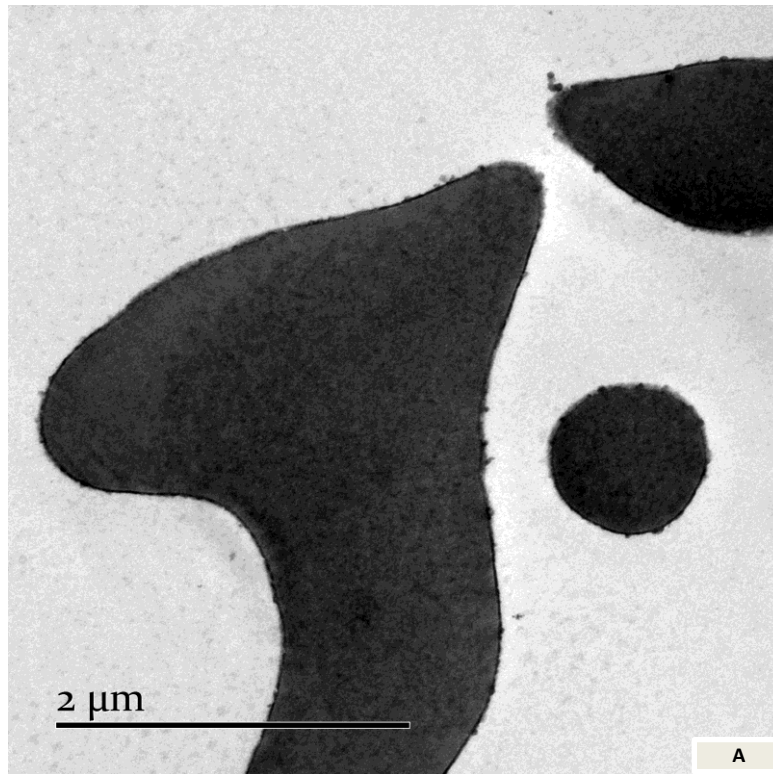


Figura 28. Acercamiento de los patrones formados durante la aglutinación de RBC + VP2 en TEM.



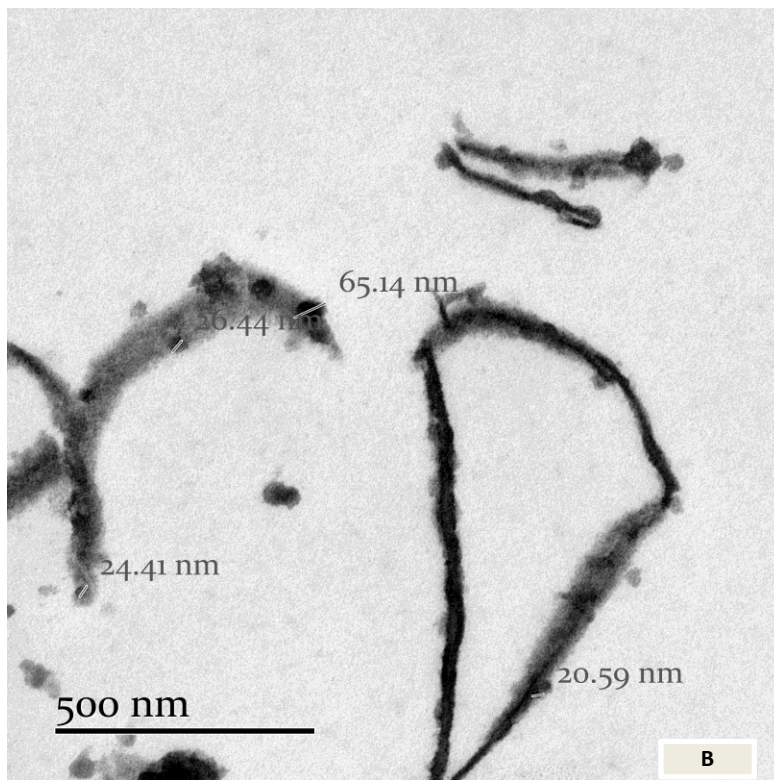
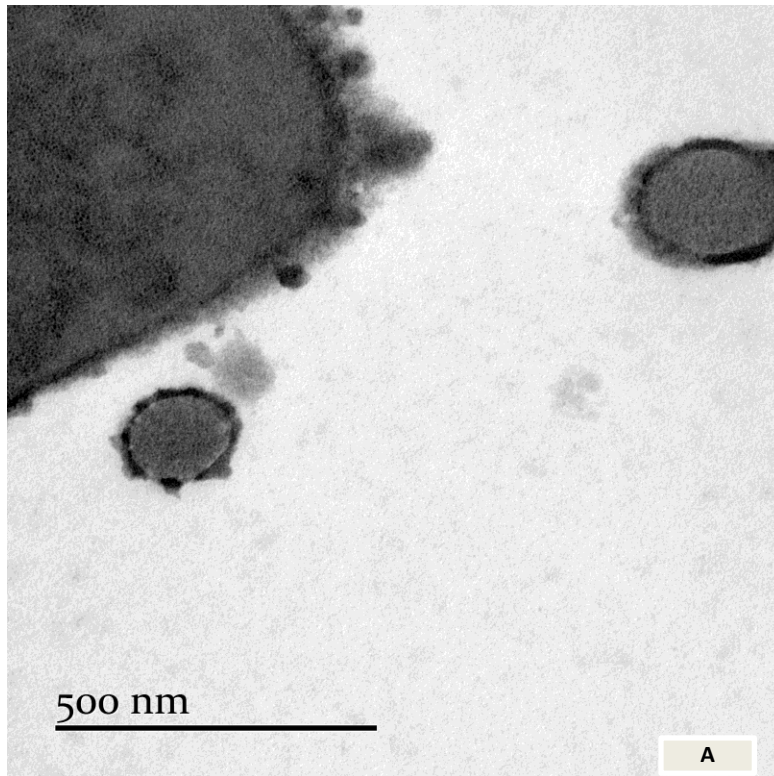


Figura 29. Acercamiento de los patrones formados durante la aglutinación de RBC + VP2 en TEM.

En la Figura 30 se observa el corte de un eritrocito, donde se observan las VLPs de VP2 adosadas a la membrana celular, sin embargo, el primer cuarto superior derecho del eritrocito presenta irregularidad en la membrana, con respecto al resto del eritrocito donde se observa claramente la diferencia entre la membrana celular, el citoplasma y las VLPs. No era de esperarse la internalización de VLPs, sin embargo, si se observa el interior se alcanzan a apreciar pequeñas manchas redondas más electrondensas, lo que sugiere que algunas VLPs pueden llegar a entrar si la membrana eritrocitaria está comprometida.

Los RBC maduros se caracterizan por presentar al antígeno P en su membrana externa, pero no a la integrina  $\alpha 5\beta 1$ , lo cual es una condicionante para la internalización de las cápsides de B19V. No obstante, parece existir algún otro mecanismo para la internalización de VLPs cuando hay ruptura de membrana celular (Weigel-Kelley et al., 2003).

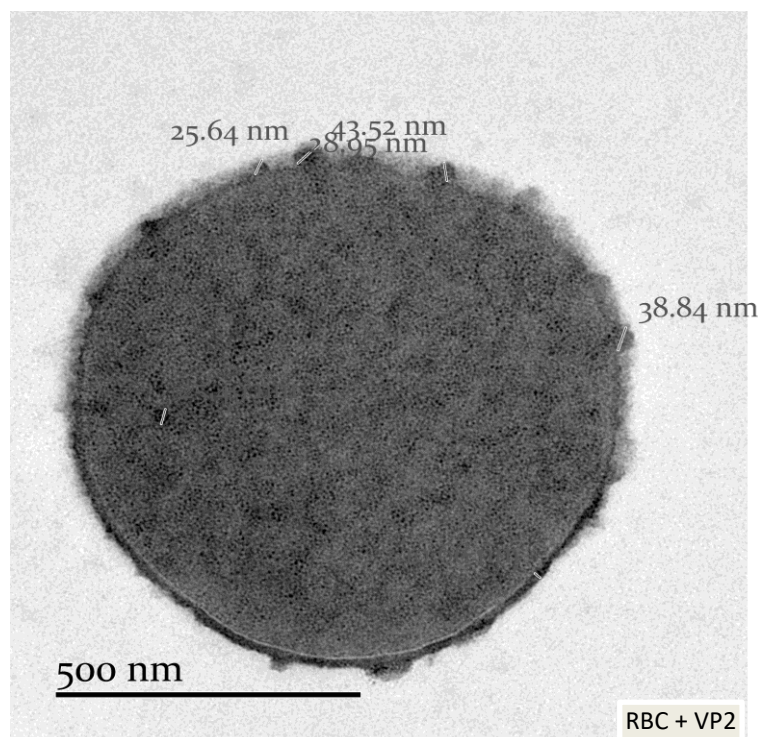


Figura 30. Acercamiento de un corte de RBC del experimento RBC + VP2 en TEM.

## Microscopía de fuerza atómica

En la Figura 31 se muestran las micrografías de AFM obtenidas para los RBC control y los que tuvieron contacto con VLPs. Cabe resaltar que la finalidad de analizar los RBC en AFM es ver su morfología en solitario, más que ver el proceso de aglutinación. Así, la morfología observada en las Figuras 16 y 18 de microscopía óptica, se relacionan con los cambios morfológicos vistos por TEM.

En los paneles A y D de la Figura 31 se presenta la morfología normal del eritrocito típico, tanto en el canal de altura como en la imagen 3D. Sin embargo, en los paneles B, C, E y F, se observa el cambio de morfología de los RBC en presencia de VLPs de B19V, que guardan cierta similitud al observado por AFM para equinocitos. Si bien, existen diferencias entre ambos “equinocitos”, es decir los que se pudieron observar para las VLPs de VP1 o de VP2, los producidos con VP2 son más similares a lo reportado en la literatura (Yeow et al., 2017). Por otro lado, en el caso de las VLPs de VP1, fue más difícil obtener imágenes de RBC aislados, ya que casi todos los campos observados tenían alto grado de aglutinación.

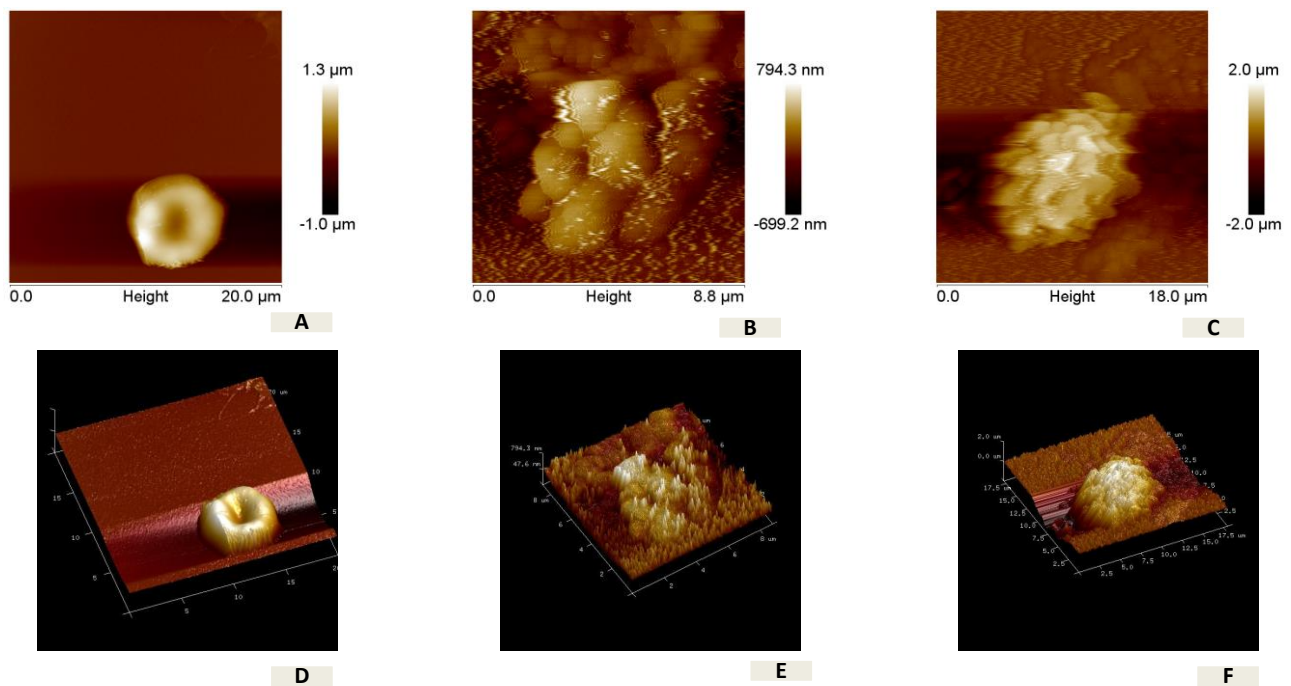


Figura 31. Micrografías de AFM de RBC (panel izquierdo), RBC + VP1 (panel central) y RBC + VP2 (panel derecho), en el modo de altura (paneles superiores) y reconstrucción 3D (paneles inferiores).

En la Figura 32 se presentan cuatro morfologías de eritrocitos diferentes encontradas durante el proceso de aglutinación por VLPs de VP2. A diferencia de la aglutinación por VP1, donde tanto en microscopía óptica como en TEM se observaron eritrocitos con forma espiculada similares a equinocitos o a acantocitos, en el análisis por AFM de ambas muestras, para las VLPs de VP1 siempre se encontraban eritrocitos aglutinados con forma similar a los equinocitos, mientras que con las VLPs de VP2 se observaron más de dos especies morfológicas.

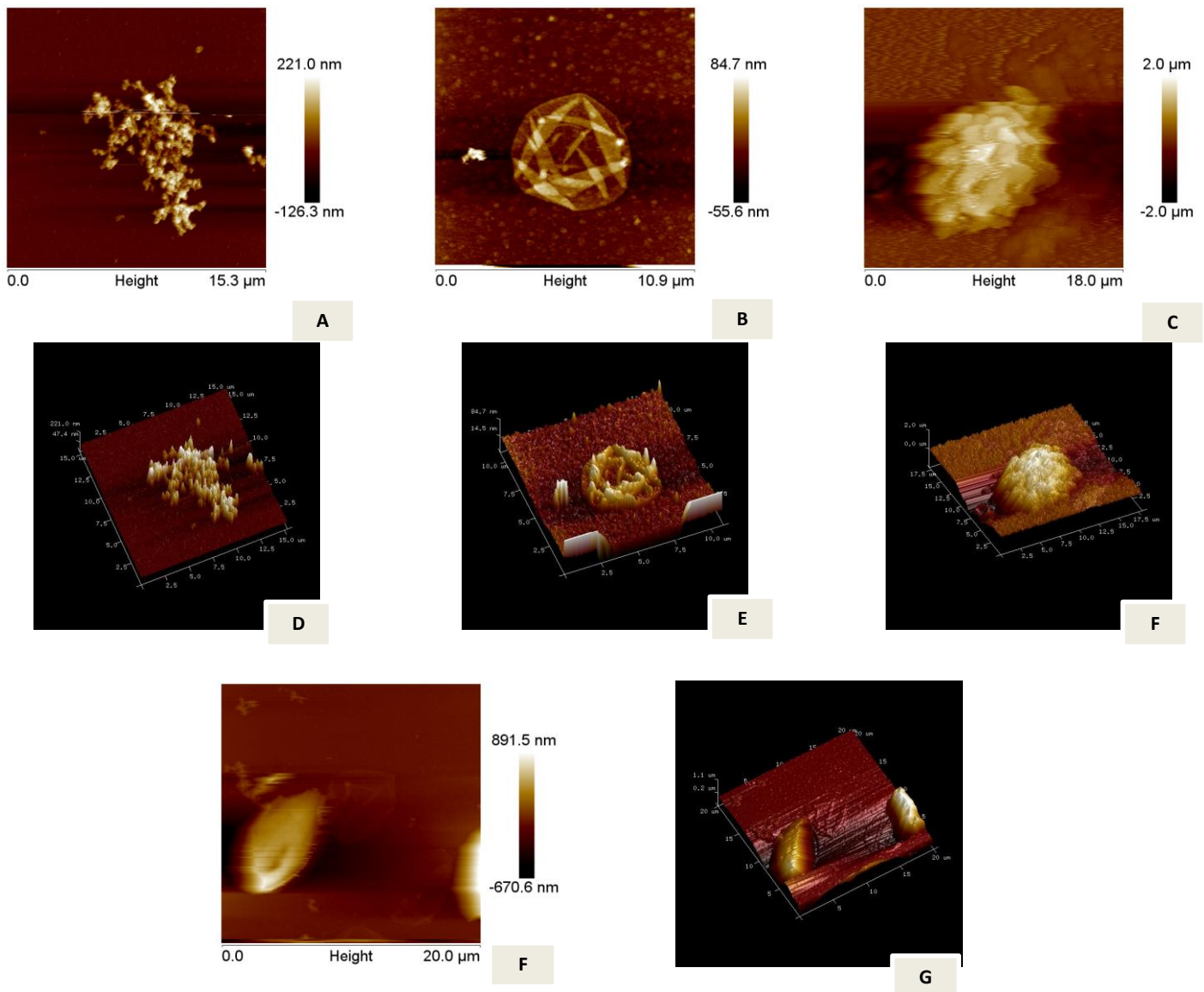


Figura 32. Micrografías de AFM de las distintas morfologías encontradas en el experimento de aglutinación para VP2.



Los paneles C y F de la Figura 32 corresponden a la morfología similar a la reportada para equinocitos por AFM (Yeow et al., 2017). Sin embargo, los paneles A, B, D y E tienen diámetros similares a los tamaños para acantocitos y/o equinocitos, pero ninguna de esas morfologías ha sido reportada en la literatura con AFM. Los paneles A y D podrían corresponder a acantocitos, debido a que estos se caracterizan por células con pocas espigas distribuidas irregularmente, en cambio los equinocitos de los paneles C y F se caracterizan por muchas espículas distribuidas regularmente en la superficie de la membrana del eritrocito (Foglia et al., 2010; Mukhopadhyay et al., 2002).

Los paneles B y E corresponden a una morfología no descrita en la literatura para los eritrocitos, no sólo por AFM sino en general. Sin embargo, estas células conservan las dimensiones características de los RBC. Derivado la morfología presentada, podría incluso ser otra vista de equinocitos ya que presentan en la imagen 3D, distintas espigas, pero a diferencia del equinocito típico, se encuentran múltiples y profundas depresiones casi geométricas, en un patrón similar a pétalos de rosa.

Por último, los paneles F y G de la Figura 32 se asemejan a la morfología de los eliptocitos, por su forma elíptica, sin embargo, tampoco han sido descritos mediante AFM (Ford et al., 2013).

## Discusión

El estudio de la aglutinación de los RBC mediante su interacción con VLPs constituidas exclusivamente por VP1 o VP2, generó varios resultados interesantes:

1. La aparente no internalización de las VLPs en los RBC durante el proceso de aglutinación.
2. El cambio de morfología presentando por los eritrocitos en contacto con cualquiera de las VLPs.
3. La aparente diferencia entre la aglutinación con las VLPs de VP1 o de VP2.
4. Diferentes tipos de morfología en los RBC en el proceso de aglutinación con VP2 vistos por AFM.

5. La formación de nanotubos en presencia de VP1 y RBC.
6. La formación de nuevas estructuras en presencia de RBC y VP1 o VP2, durante el proceso de aglutinación.

Derivado de los múltiples resultados encontrados, se realizará el abordaje de cada uno por separado.

### 1.- No internalización de las VLPs en los RBC aglutinados.

La no internalización de las VLPs independientemente de si son de VP1 o VP2, está fundamentada en la falta de la integrina  $\alpha 5\beta 1$ , conforme a lo reportado en la literatura, sin embargo, el hecho de que se logre apreciar aunque sea de manera aislada la aparición de VLPs dentro del eritrocito maduro (Weigel-Kelley et al., 2003), podría indicar que aun cuando no entre la VLP a través del mecanismo ya conocido, podrían existir otros mecanismos en los cuales exista internalización, tal vez mediado por gradientes de concentración, mediante transporte pasivo, derivado de la alteración de la membrana celular (Lyi et al., 2014).

En la Figura 30 se observa que las VLPs están dentro del citoplasma que quedó expuesto posterior a la ruptura de la membrana celular. Sin embargo, no es posible determinar si las VLPs se adhirieron antes o después de la ruptura de la membrana, con lo cual, la única manera de observar si se adhieren o no, aunque sea una pequeña fracción de las VLPs sería a través de inmunomarcaje en células que no hayan comprometido su membrana celular.

### 2.- Cambio de morfología de los RBC por contacto con las VLPs.

La presencia de equinocitos en la aglutinación, tanto con las VLPs constituidas por VP1 como por las de ensambladas con VP2, así como la leve diferencia de morfología encontrada en ellos, aunque no era un resultado esperado, puede explicarse por la facilidad de los eritrocitos para cambiar de forma ante cambios en el medio en el que se encuentren. A diferencia de otro tipo de morfologías en los eritrocitos, los equinocitos no necesariamente se quedan permanentemente en esa forma, sino que cambios en el medio pueden hacer que recuperen su estructura normal (Mukhopadhyay et al., 2002).

Los equinocitos, a diferencia de otras morfologías, pueden llegar a ser funcionales e incluso se pueden encontrar en sujetos sanos como células aisladas o en baja proporción. En consecuencia, la utilización de VLPs de B19V como agente terapéutico o de diagnóstico, sobretodo las de VP1 que promueven predominantemente esta morfología, podrían no ser de relevancia clínica.

### 3.- La aparente diferencia entre la aglutinación con VP1 y VP2.

A través de la microscopía óptica se observa que hay mayor aglutinación con VP2 que con VP1, sin embargo, derivado de la VP1u (Bieri et al., 2021), se esperaría que fuera al revés, ya que está presente en VP1 y no en VP2 y favorece el mayor tropismo eritroide. Sin embargo, la hemaglutinación con VLPs de B19V ocurre a través de la interacción del Gb4Cer en la superficie de los RBC a través de residuos de tres subunidades diferentes en el eje de simetría de orden 3 de la partícula icosaédrica (Huang et al., 2014). Por ello, la menor aglutinación generada por las VLPs de VP1 podría deberse a un impedimento estérico ocasionado por la presencia de VP1u.

Por otro lado, al realizar la observación con AFM, era muy difícil aislar eritrocitos para su visualización derivado a que se encontraban muchos campos con grandes secciones de aglutinación. Considerando que se realizaron ambos experimentos con la misma concentración de solución eritrocitaria y la misma proporción de VLPs, valdría la pena realizar métodos de cuantificación por microscopía óptica para dilucidar si existen cambios reales en cuanto a la aglutinación entre ambas VLPs.

### 4.- Diferentes tipos de morfología en los RBC visualizado en AFM.

La infección por B19V tiene como manifestaciones clínicas hematológicas a la crisis aplásica transitoria y a la anemia crónica. Esto se ha considerado derivado de su tropismo principalmente eritroide, por lo cual, al atacar células eritroides no es de extrañar que cause anemia como condición subsecuente a la infección (Heegaard y Brown, 2002).

Los eliptocitos, equinocitos y acantocitos que fueron observados en la microscopía óptica, y comprobados por TEM y AFM corresponden a morfologías eritrocitarias encontradas de manera general en distintos tipos de anemias (Faramarz et al., 2013). El encontrar morfologías propias de la anemia en eritrocitos en experimentos donde no estuvo de por medio células eritroides podría indicar que otro mecanismo fisiopatológico de la anemia por B19V está relacionado intrínsecamente con la interacción del parvovirus, específicamente de su cápside con los eritrocitos maduros. La anemia por parvovirus podría estar mediada por más de un mecanismo fisiopatológico, derivado de la alteración provocada por las cápsides en el eritrocito que impide su correcto paso por los vasos sanguíneos (Yeow et al., 2017).

## 5.- Nanotubos en presencia de VLPs de VP1 y RBC.

La formación de nanotubos de manera espontánea a partir de proteínas, aunque sucede en la naturaleza, es un reto a nivel experimental dada la complejidad que conllevan las estructuras terciarias totalmente plegadas. Una de las dificultades del estudio del ensamblaje de nanotubos es, en general, sus tamaños más o menos fijos, por lo que es difícil adaptarlos a ciertas necesidades de uso biomédico (Audette et al., 2019).

Actualmente la formación de nanotubos se ha descrito de manera más extendida en sistemas bacterianos, virus filamentosos, y sistemas eucariontes relacionados con *Plasmodium falciparum*. El beneficio de la utilización de nanopartículas biológicas y/o sintéticas en la medicina es un hecho en la actualidad. Gracias a la heterogeneidad y a la alta organización estructural de las VLPs, éstas han sido utilizadas para vacunas, agentes de formación de imágenes, y como vectores para suministrar fármacos, genes y enzimas; asimismo, también pueden ser utilizados para inducir e autoensamblaje de nanofibras, nanotubos y nanocinturones para administrar medicamentos o desarrollar materiales para la ingeniería de tejidos, gracias a su mayor biocompatibilidad, así como su capacidad de internalización celular y su facilidad de funcionalización para la célula. Las VLPs son sujetas a provocar respuestas inmunitarias tanto humorales como celulares, sin embargo, estos fenómenos dependen de las características fisicoquímicas y bioquímicas de las VLPs (Mejía-Méndez, 2022).



No se dispone de información con respecto a la formación in vitro o in vivo de nanotubos a partir de B19V. Sin embargo, con el hallazgo reportado en el presente trabajo y considerando que la producción de nanotubos tiene implicaciones en biomedicina, sería de utilidad profundizar en esa línea de estudio.

## 6.- La formación de nuevas estructuras en presencia de RBC y VP1 o VP2.

Actualmente existe un esfuerzo constante por desarrollar métodos analíticos que solos, o en combinación con otros, permitan evaluar la influencia de los parámetros fisicoquímicos sobre las actividades biológicas de los nanomateriales (Mejía-Méndez et al., 2022).

Aún existe poca información con respecto a la respuesta celular causada por VLPs. Sin embargo, el presente trabajo propone desentrañar características funcionales de las VLPs de B19V a través del estudio morfológico de los eritrocitos humanos aglutinados por estas partículas, considerando a estas células como el blanco final para aplicaciones biomédicas.

## Conclusiones

El estudio de las características morfológicas de las células en adición con biomateriales a través de la microscopía puede resolver interrogaciones en cuanto a la función tanto de las células como los biomateriales. El conocimiento del alcance de cada microscopía y el uso de las fortalezas de cada una de ellas en el estudio de eventos biológicos controlados ayuda a entender con mayor claridad los procesos biológicos que se llevan a cabo en modelos in vivo, aun cuando se reproduzcan in vitro.

La microscopía electrónica de transmisión era la herramienta de estudio original del presente proyecto. Sin embargo, en el proceso de estudio de la hemaglutinación por VLPs se utilizaron otros tipos de microscopía que complementaron la información de la microscopía de transmisión, enriqueciendo esta investigación.

El objetivo principal del presente estudio se cumplió al evidenciar que existen cambios morfológicos en la membrana externa de los RBC provocados por las VLPs de B19V en el proceso de aglutinación. Sin embargo, será necesario hacer uso de técnicas especiales específicas de TEM o de microscopia de fluorescencia redondear los resultados reportados en el presente trabajo.

# Bibliografía

1. Aguilar García, V. VI. Reacciones de aglutinación. *Gac Méd Méx.* (2004). Vol. 140, Suplemento No. 3.
2. Audette GF, Yaseen A, Bragagnolo N, Bawa R. Protein Nanotubes: From Bionanotech towards Medical Applications. *Biomedicines.* 2019 Jun 23;7(2):46.
3. Bautista-Juárez J, Factores que intervienen en la reacción antígeno-anticuerpo y clasificación antigénica eritrocitaria. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social.* 2005;43(1):S9-S12.
4. Barbalato L, Pillarisetty LS. Histology, Red Blood Cell. 2022 Nov 14.
5. Bergholt NL, Lysdahl H, Lind M, Foldager CB. A Standardized Method of Applying Toluidine Blue Metachromatic Staining for Assessment of Chondrogenesis. *Cartilage.* 2019 Jul;10(3):370-374.
6. Bieri J, Leisi R, Bircher C, Ros C. Human parvovirus B19 interacts with globoside under acidic conditions as an essential step in endocytic trafficking. *PLoS Pathog.* 2021 Apr 20;17(4):e1009434.
7. Bönsch C, Zuercher C, Lieby P, Kempf C, Ros C. The globoside receptor triggers structural changes in the B19 virus capsid that facilitate virus internalization. *J Virol.* 2010 Nov;84(22):11737-46.
8. Broliden K, Tolfvenstam T, Norbeck O. Clinical aspects of parvovirus B19 infection. *J Intern Med.* 2006 Oct;260(4):285-304.
9. Brown KE, Cohen BJ. Haemagglutination by parvovirus B19. *J Gen Virol.* 1992 Aug;73 ( Pt 8):2147-9.
10. Escalante, C. Fundamentals of transmission electron microscopy, the technique with the best resolution in the world. ER. 2019.
11. Faramarz Naeim, P. Nagesh Rao, Sophie X. Song, Wayne W. Grody. (2013) 61 - Disorders of Red Blood Cells—Anemias, Editor(s): Faramarz Naeim, P. Nagesh Rao, Sophie X. Song, Wayne W. Grody, Atlas of Hematopathology, Academic Press, 2013. Pages 675-704.
12. Foglia A. The acanthocyte-echinocyte differential: The example of chorea-acanthocytosis. *Swiss Med Wkly.* 2010 Jul 16;140:10.4414/smw.2010.13039.
13. Ford J. Red blood cell morphology. *Int J Lab Hematol.* 2013 Jun;35(3):351-7.
14. Heegaard ED, Brown KE. Human parvovirus B19. *Clin Microbiol Rev.* 2002 Jul;15(3):485-505.
15. Heinrich V, Ritchie K, Mohandas N, Evans E. Elastic thickness compressibility of the red cell membrane. *Biophys J.* 2001 Sep;81(3):1452-63.
16. Himbert S, Rheinstädter MC. Structural and mechanical properties of the red blood cell's

- cytoplasmic membrane seen through the lens of biophysics. *Front Physiol.* 2022 Sep 12;13:953257.
17. Huang LY, Halder S, Agbandje-McKenna M. Parvovirus glycan interactions. *Curr Opin Virol.* 2014 Aug;7:108-18.
  18. Jarujamrus, P., Tian, J., Xu Li, Siripinyanond, A., Shiowatana, J., and Shen, W. Mechanisms of red blood cells agglutination in antibody treated paper. *The Royal Society of chemistry.* 2012. 137. 2205-2210.
  19. Kim, Y.; Kim, K.; Park, Y.K. Measurement techniques for red blood cell deformability: Recent advances. In *Blood Cell—An Overview of Studies in Hematology*; Moschandreu, T.E., Ed.; InTech: New York, NY, USA, 2012; Volume 10, pp. 167-194.
  20. Lyi SM, Tan MJ, Parrish CR. Parvovirus particles and movement in the cellular cytoplasm and effects of the cytoskeleton. *Virology.* 2014 May;456-457:342-52.
  21. Manaresi E, Gallinella G. Advances in the Development of Antiviral Strategies against Parvovirus B19. *Viruses.* 2019 Jul 18;11(7):659.
  22. Mejía-Méndez JL, Vazquez-Duhalt R, Hernández LR, Sánchez-Arreola E, Bach H. Virus-like Particles: Fundamentals and Biomedical Applications. *Int J Mol Sci.* 2022 Aug 2;23(15):8579.
  23. Mukherjee R, Saha M, Routray A, Chakraborty C. Nanoscale Surface Characterization of Human Erythrocytes by Atomic Force Microscopy: A Critical Review. *IEEE Trans Nanobioscience.* 2015 Sep;14(6):625-33.
  24. Mukhopadhyay R, Lim H W G, Wortis M. Echinocyte shapes: bending, stretching, and shear determine spicule shape and spacing. *Biophys J.* 2002 Apr;82(4):1756-72.
  25. Payne S. Methods to Study Viruses. *Viruses.* 2017:37–52.
  26. Piedras, J. *Fisiología Humana. Capítulo 21. Fisiología del Eritrocito.* McGraw Hill. 2022. 4° Ed.
  27. Qiu J, Söderlund-Venermo M, Young NS. Human Parvoviruses. *Clin Microbiol Rev.* 2017 Jan;30(1):43-113.
  28. Quattrocchi S, Ruprecht N, Bönsch C, Bieli S, Zürcher C, Boller K, Kempf C, Ros C. Characterization of the early steps of human parvovirus B19 infection. *J Virol.* 2012 Sep;86(17):9274-84.
  29. Ros C, Bieri J, Leisi R. The VP1u of Human Parvovirus B19: A Multifunctional Capsid Protein with Biotechnological Applications. *Viruses.* 2020 Dec 18;12(12):1463.
  30. Rosenfeld SJ, Yoshimoto K, Kajigaya S, Anderson S, Young NS, Field A, Warrenner P, Bansal G, Collett MS. Unique region of the minor capsid protein of human parvovirus B19 is exposed on the virion surface. *J Clin Invest.* 1992 Jun;89(6):2023-9.
  31. Sánchez-Rodríguez SP, Münch-Anguiano L, Echeverría O, Vázquez-Nin G, Mora-Pale M,

- Dordick JS, Bustos-Jaimes I. Human parvovirus B19 virus-like particles: In vitro assembly and stability. *Biochimie*. 2012 Mar;94(3):870-8.
32. Soto-Valerio IA, Cayetano-Cruz M, Valadez-García J, Guadarrama P, Méndez C, Bustos-Jaimes I. In vitro refolding of the structural protein VP1 of parvovirus B19 produces virus-like particles with functional VP1 unique region. *Virology*. 2022 May;570:57-66.
  33. Tsui SM, Ahmed R, Amjad N, Ahmed I, Yang J, Manno FA, Barman I, Shih WC, Lau C. Single red blood cell analysis reveals elevated hemoglobin in poikilocytes. *J Biomed Opt*. 2020 Jan;25(1):1-13.
  34. Tu M, Liu F, Chen S, Wang M, Cheng A. Role of capsid proteins in parvoviruses infection. *Virology*. 2015 Aug 4;12:114.
  35. Yeow N, Tabor RF, Garnier G. Atomic force microscopy: From red blood cells to immunohaematology. *Adv Colloid Interface Sci*. 2017 Nov;249:149-162.
  36. Weigel-Kelley KA, Yoder MC, Srivastava A. Alpha5beta1 integrin as a cellular coreceptor for human parvovirus B19: requirement of functional activation of beta1 integrin for viral entry. *Blood*. 2003 Dec 1;102(12):3927-33.