



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
"SALVADOR ZUBIRÁN"**

**"EFECTO DE LOS GLICOCONJUGADOS DE LA LECHE HUMANA EN
LA INFECCIÓN *IN VITRO* DE AISLADOS PRIMARIOS DEL VIH-1"**

**TESINA QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE LA ESPECIALIZACIÓN
EN BIOQUÍMICA CLÍNICA**

PRESENTA:

QFB. GRACIELA ROSAS ALQUICIRA

México, D.F., a 31 de Octubre de 2013.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente: M. en C. Sara Ariadna Ochoa Pérez

Vocal: EBC. Jesús Reséndiz Sánchez

Secretario: Dra. Norma Velázquez Guadarrama

Primer Suplente: M. en C. Julio Granados Silvestre

Segundo Suplente: Dr. Rodolfo Pastelin Palacios

El trabajo fue realizado en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”. Departamento de Infectología. Laboratorio de Virología Molecular.

Asesor del Tema:

Dra. Mónica Viveros Rogel

Sustentante:

QFB. Graciela Rosas Alquicira

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	7
LISTA DE TABLAS	9
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE GRAFICAS	12
INTRODUCCIÓN	13
1.Componentes bioactivos de la leche humana	13
2.Glicoconjugados	17
2.1 Glicosaminoglicanos (GAGs)	17
3. Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH).....	19
3.1 Estructura del VIH.....	20
3.2 Envoltura del VIH-1 y su entrada en la célula huésped	22
3.3 Glicosaminoglicanos y VIH	25
JUSTIFICACIÓN	27
HIPÓTESIS	27
DISEÑO DEL ESTUDIO	28
OBJETIVO GENERAL	29
OBJETIVOS PARTICULARES	29
DIAGRAMA DE TRABAJO	30
MATERIALES	31
1.Material biológico.....	31
1.1 Medios de cultivo	31
1.2 Glicoconjugados	31

1.2.1 GAGs de leche humana.....	31
1.2.2 Estándar de condroitin sulfato de cartílago de tiburón de Sigma®	31
1.3 PBMCs de donadores de sangre	32
1.4 Aislados primarios del VIH-1 obtenidos de PBMCs de personas infectadas.	32
2. Material de cultivo, reactivos, equipos e instrumentos para laboratorio.....	32
MÉTODOS	33
1. Preparación de medios de cultivo	33
1.1 Medio RPMI 1640®.....	33
1.2 Medio RPMI suplementado (R10)	33
1.3 Medio de propagación (R10+IL-2).....	33
1.4 Medio de estimulación (R10 + IL-2 + PHA)	34
1.5 Medio de congelación	34
2. Preparación de los reactivos para el ensayo de ELISA P24 del VIH-1	34
3. Extracción y separación de las PBMCs de los donadores de sangre y de los pacientes infectados con el VIH-1.....	34
3.1 Conteo de células en el hemocitómetro o cámara de Neubauer para determinar viabilidad celular.	36
3.2 Criopreservación de las células.	37
4. Propagación de los aislados primarios del VIH-1	38
5. Cuantificación de la proteína de la cápside P24 de los aislados primarios del VIH-1 por un ensayo inmunoenzimático de ELISA.....	39
6. Determinación del tropismo de los aislados primarios del VIH-1 por secuenciación de la región V3 de la glicoproteína de envoltura GP120.	41
6.1 Extracción del ARN viral.	41

6.2 Cuantificación y determinación de la pureza del ARN viral.	42
6.3 Protocolo para la retrotranscripción y la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR por sus siglas en inglés).	42
6.4 Electroforesis	43
6.5 Purificación de los productos de RT-PCR	44
6.6 Secuenciación	44
6.6.1 Reacción de marcaje	44
6.6.2 Purificación de la marca	45
6.6.3 Análisis de las secuencias	45
7. Determinación de la dosis infectiva media viral (TCID ₅₀) en los sobrenadantes de cultivo de los aislados primarios del VIH-1.	46
8. Estandarización de los ensayos de infección de las PBMCs con los aislados primarios del VIH-1.....	47
9. Estandarización de los ensayos de inhibición <i>in vitro</i> de la infección de PBMCs por los aislados primarios del VIH-1, con glicosaminoglicanos de la leche humana.	48
10. Ensayos de inhibición de la infección de PBMCs por los aislados primarios del VIH-1 <i>in vitro</i> , con condroitin sulfato de cartílago de tiburón.....	51
RESULTADOS	52
1. Propagación <i>in vitro</i> de los aislados primarios del VIH-1.....	52
2. Evaluación del tropismo de los aislados primarios del VIH-1 mediante la secuenciación de la región V3 de la glicoproteína de la envoltura GP120.....	57
3. Cuantificación de la dosis de infectividad media viral (TCID ₅₀) de los aislados primarios del VIH-1.....	58
4. Ensayos de inhibición de la infección <i>in vitro</i> de PBMCs por los aislados primarios del VIH-1, con glicosaminoglicanos de la leche humana y con condroitin sulfato de cartílago de tiburón.....	59

DISCUSIÓN	72
CONCLUSIONES	76
PERSPECTIVAS	77
BIBLIOGRAFÍA	78
ANEXO	82
Materiales, reactivos, equipos e instrumentos de laboratorio	82
1. Materiales	82
1.1 Material de cultivo	82
2. Reactivos.....	83
2.1 Reactivos para cultivo celular	83
2.2 Reactivos para el ensayo inmunoenzimático de ELISA de captura del antígeno P24 de la cápside del VIH-1.....	83
2.3 Reactivos para la determinación del tropismo de los aislados primarios del VIH-1	84
3. Equipo e instrumentos de laboratorio	85

EFFECTO DE LOS GLICOCONJUGADOS DE LA LECHE HUMANA EN LA INFECCIÓN *IN VITRO* DE AISLADOS PRIMARIOS DEL VIH-1

RESUMEN

INTRODUCCIÓN Durante el proceso de infección del Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (VIH-1), el primer paso en el proceso de entrada del virus a la célula blanco, está dado por la interacción de la glicoproteína de la envoltura GP120 del VIH-1 con el receptor celular CD4, así como con moléculas de adhesión de naturaleza sacárida presentes en la superficie celular, como son los Glicosaminoglicanos (GAGs).

OBJETIVO En este trabajo se evaluará la capacidad de los glicoconjugados de la leche humana, particularmente de los glicosaminoglicanos, de inhibir la infección de las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs, por sus siglas en inglés) por los aislados primarios del VIH-1 *in vitro*.

METODOLOGÍA Los GAGs fueron extraídos de una mezcla de 2 L de leche humana, purificados por cromatografía de intercambio aniónico y caracterizados por espectrometría de masas. Se utilizaron 6 aislados primarios del VIH-1 obtenidos de sangre periférica de pacientes infectados con el virus y que no habían recibido tratamiento antirretroviral. El tropismo viral se determinó con base en la secuencia genética de la región hipervariable V3 de la glicoproteína de la envoltura GP120 del VIH-1, empleando el algoritmo de Geno2Pheno para inferir la utilización del correceptor CCR5 (R5) ó CXCR4 (X4). Los ensayos de inhibición de la infección *in vitro* se realizaron empleando PBMCs estimuladas con fitohemaglutinina (PHA) e interleucina 2 (IL-2). Diluciones seriadas de los GAGs se incubaron durante 2 horas con cada aislado viral antes de adicionar las PBMCs. Después de 7 días, se determinó la concentración del antígeno de la cápside P24 del VIH-1, por un ensayo inmunoenzimático de ELISA en los sobrenadantes de cultivo. Una inhibición significativa de la infectividad viral se definió como una reducción mayor o igual al 80% de la concentración de P24 con respecto al control de infección. Así mismo, se realizaron ensayos de inhibición empleando GAGs de una fuente natural diferente a la leche humana, en

este caso se utilizó condroitin sulfato de cartílago de tiburón (CS), para comparar su potencial efecto inhibitorio con el de los GAGs de la leche humana.

RESULTADOS Los GAGs de la leche humana inhibieron de 85 a 100%, la infección de los aislados primarios del VIH-1 con tropismo R5 (monocito/macrófago trópicos) en un rango de concentraciones de 2 a 17 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los 2 aislados primarios del VIH-1 con tropismo X4 (linfotrópicos) fueron inhibidos un 92% con 0.83 y 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente. El condroitin sulfato de cartílago de tiburón inhibió de 80 a 100%, la infección de 3 aislados primarios R5, en un rango de concentraciones de 2 a 33 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mientras que la infección del otro aislado primario R5 no se inhibió aun empleando la concentración más alta de CS (167 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Los dos aislados virales X4 se inhibieron significativamente en un 80 y 97% respectivamente, con 0.17 y 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CS. Los resultados obtenidos sugieren que el efecto inhibitorio de los GAGs de la leche humana en la infección de PBMCs por aislados primarios del VIH-1, es más potente para los aislados virales linfotrópicos X4 que para los aislados monocito/macrófagotrópicos R5. La especie de condroitin sulfato presentó una actividad inhibitoria similar a la obtenida con los GAGs, aunque con menor potencia hacia los aislados virales R5.

CONCLUSIONES Los GAGs de la leche humana inhiben significativamente, más del 80% la infección *in vitro* de las PBMCs por aislados primarios del VIH-1 de pacientes sin tratamiento antirretroviral. La actividad de los GAGs es de amplio espectro ya que se inhibió significativamente la infección tanto de los aislados con tropismo R5 como de los aislados X4 del VIH-1. La especie de condroitin sulfato pudiera ser la responsable de la actividad de la fracción de los glicosaminoglicanos. Los glicoconjugados de la leche humana, son un grupo de compuestos sulfatados naturales que pueden contribuir a una nueva intervención para bloquear la infección por el VIH-1.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Función protectora de los nutrientes de la leche humana.....	15
Tabla 2. Glicoconjugados que inhiben a patógenos.....	16
Tabla 3. Curva de calibración del antígeno de la cápside P24 del VIH-1.....	39
Tabla 4. Protocolo para la retrotranscripción y amplificación en cadena de la polimerasa.	43
Tabla 5. Protocolo para la reacción de secuenciación.	45
Tabla 6. Concentraciones de los glicosaminoglicanos (GAGs) probadas en los ensayos de inhibición de la infección de PBMCs por aislados primarios del VIH-1	50
Tabla 7. Aislados primarios del VIH-1	53
Tabla 8. Concentración y pureza del ARN viral extraído.	57
Tabla 9. Evaluación del tropismo viral y de la dosis de infectividad media (TCID ₅₀) de los aislados primarios del VIH-1.	59
Tabla 10. Ensayos de infección de las PBMCs con los aislados primarios del VIH-1.....	60
Tabla 11. Viabilidad de las PBMCs en presencia de los glicoconjugados: GAGs y Condroitin sulfato.....	61
Tabla 12. Inhibición de la infección por el aislado primario 1 con tropismo R5 (TCID ₅₀ /mL 158.5).	63
Tabla 13. Inhibición de la infección por el aislado primario 2 con tropismo R5 (TCID ₅₀ /mL 158.5).	63
Tabla 14. Inhibición de la infección por el aislado primario 3 con tropismo R5 (TCID ₅₀ /mL 158.5)	63
Tabla 15. Inhibición de la infección por el aislado primario 4 con tropismo R5 (TCID ₅₀ /mL 158.5).	64

Tabla 16. Inhibición de la infección por el aislado primario 5 con tropismo X4 (TCID₅₀/mL 158.5)65

Tabla 17. Inhibición de la infección por el aislado primario 6 con tropismo X4 (TCID₅₀/mL 158.5)65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de los glicosaminoglicanos	18
Figura 2. Organización del genoma del VIH-1.....	21
Figura 3. Estructura de una partícula del VIH-1.	22
Figura 4. Entrada del VIH-1 a su célula blanco	24
Figura 5. Separación de las células sanguíneas por gradiente de densidad.	35
Figura 6. Cámara de Neubauer o hemocitómetro.	36
Figura 7. Amplificación de la región V3 de GP120 por medio del sistema Bioanalyzer. ...	58

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Curva de replicación del aislado primario 1 en PBMCs.....	54
Gráfica 2. Curva de replicación del aislado primario 2 en PBMCs.....	54
Gráfica 3. Curva de replicación del aislado primario 3 en PBMCs.....	55
Gráfica 4. Curva de replicación del aislado primario 4 en PBMCs.....	55
Gráfica 5. Curva de replicación del aislado primario 5 en PBMCs.....	56
Gráfica 6. Curva de replicación del aislado primario 6 en PBMCs.....	56
Gráfica 7. Inhibición de la infección por el aislado primario 1 con tropismo R5 (TCID ₅₀ /mL 158.5).	66
Gráfica 8. Inhibición de la infección por el aislado primario 2 con tropismo R5 (TCID ₅₀ /mL 158.5).	67
Gráfica 9. Inhibición de la infección por el aislado primario 3 con tropismo R5 (TCID ₅₀ /mL 158.5).	68
Gráfica 10. Inhibición de la infección por el aislado primario 4 con tropismo R5 (TCID ₅₀ /ml 158.5)	69
Gráfica 11. Inhibición de la infección por el aislado primario 5 con tropismo X4 (TCID ₅₀ /mL 158.5).	70
Gráfica 12. Inhibición de la infección por el aislado primario 6 con tropismo X4 (TCID ₅₀ /mL 158.5).	71

INTRODUCCIÓN

1. Componentes bioactivos de la leche humana

A la leche humana se le atribuyen excelentes e inigualables propiedades nutricionales para los infantes durante los primeros 6 a 12 meses de vida y también constituye una fuente de una gran variedad de compuestos con actividad biológica contra diversos agentes infecciosos **(1)**.

Entre los componentes principales de la leche humana, 9% lo constituyen las proteínas, principalmente, lactoferrina, lisozima, β -caseína, y α -lactalbumina. Así mismo, la leche humana tiene un alto contenido de carbohidratos, principalmente lactosa (7%) y oligosacáridos libres (1%). Las grasas son el componente más variable de la leche humana, constituyen alrededor del 4%, que junto con la lactosa, representan las principales fuentes de energía para el recién nacido **(1)**.

La lactancia en el recién nacido reduce la morbilidad y la mortalidad producida por las enfermedades intestinales y respiratorias, debido en gran parte a sus componentes inmunológicos, específicos e inespecíficos, que actúan de manera integrada para asegurar la transferencia eficiente de los nutrientes y proteger al recién nacido de una amplia variedad de patógenos **(1)**.

El principal componente humoral del sistema inmune adquirido del recién nacido, es la inmunoglobulina A secretora (IgA), que se encuentra en una alta concentración en el calostro (10 g/L) y en menor concentración en la leche madura (1 g/L). Su función principal es bloquear la adherencia de los agentes patógenos a la mucosa intestinal, mediante la región F_{ab} del anticuerpo, que puede reconocer y neutralizar a diversos virus, bacterias, enzimas y toxinas. La especificidad de los anticuerpos IgA es en respuesta a los antígenos que penetran por vía respiratoria e intestinal de las madres, ante la presencia de los microorganismos del entorno que habita. Estos anticuerpos son transmitidos a las glándulas mamarias, posteriormente a la leche y finalmente al tracto

gastrointestinal del recién nacido en el momento de la lactancia. Por lo tanto la leche secretada provee a los niños protección específica contra agentes potencialmente patógenos presentes en el ambiente **(1)**.

El segundo componente del sistema inmune adquirido del recién nacido, lo constituyen, los leucocitos y los macrófagos, los cuales se encuentran en una alta concentración ($1-3 \times 10^9$ células/mL) durante los primeros días de la lactancia. A diferencia del calostro, la leche madura contiene una concentración de leucocitos menor, estimada entre 1×10^5 a 5×10^5 células/mL, de los cuales, el 80% son neutrófilos, el 15% macrófagos y el 5% linfocitos **(1,2)**.

Además de los componentes humorales y celulares, la estructura original de algunas proteínas y lípidos de la leche o bien, los productos de su digestión parcial como la lactoferrina, los triglicéridos, α -lactalbumina y los péptidos liberados de las proteínas, presentan actividad contra una amplia variedad de microorganismos proporcionando así un amplio espectro de actividad anti-infecciosa, lo que contribuye a la protección efectiva durante la lactancia materna. En la **Tabla 1** se muestran algunos ejemplos de la función protectora de los nutrientes principales de la leche humana **(1-3)**.

Por otro lado, se ha descrito que el intestino del recién nacido es muy sensible a los estímulos que favorecen la inflamación y por consecuencia, vulnerable a la acción de los microorganismos patógenos. La presencia de moléculas inmunomoduladoras con efectos anti-inflamatorios en la leche, como las citocinas IL-10 y TGF- β , antioxidantes, inhibidores de la proteasa y prostaglandinas, entre otros, ayuda a disminuir la inflamación intestinal y a frenar las infecciones intestinales **(1-3)**.

Tabla 1. Función protectora de los nutrientes de la leche humana (3).

Nutriente	Concentración [g/dL]	Función
Proteínas		
Lactoferrina	1 - 3	Fija iones de hierro, lo cual impide su utilización por bacterias como <i>Escherichia coli</i> , <i>Streptococcus mutans</i> y <i>Vibrio cholerae</i> . Inhibe la adhesión de <i>E. coli</i> enterotoxigénica y la adhesión e invasividad de <i>Shigella flexneri</i> . Induce la liberación de los lipopolisacáridos de la membrana externa de las bacterias Gram negativas. Inhibe la infección por Citomegalovirus, Virus de la Inmunodeficiencia humana, Herpes Virus y Virus de la Hepatitis C. Lactoferrina: actividad antimicrobiana de amplio espectro.
Producto de su digestión:		
Lisozima	0.05 - 0.25	Hidroliza los enlaces β 1-4 entre N-acetil-glucosamina y ácido N-acetil murámico de peptidoglicanos de la pared celular de bacterias Gram positivas.
β -Caseína	2 -3	Inhibe la adhesión de <i>Helicobacter pylori</i> a la mucosa gástrica y de <i>Streptococcus pneumoniae</i> y <i>Haemophilus influenzae</i> a las células epiteliales del tracto respiratorio. Caseína macropéptido: promotor del crecimiento para <i>Bifidobacterium bifidum</i> .
Producto de la digestión de la κ -caseína.		
α -Lactalbumina	2-3	Actividad anti VIH.
Carbohidratos		
Lactosa	6.5 - 7.3	Aporta energía.
Oligosacáridos	1.0 - 1.5	Actúan como ligando microbiano.
Gliconjugados		Actúan como ligando microbiano y viral.
Lípidos		
Triglicéridos	3.0 – 4.5	Aporta energía.
Productos de la digestión		Ácidos grasos libres y monoglicéridos: Acción lítica contra <i>Giardia lamblia</i> , <i>H. influenzae</i> , Estreptococos del grupo B, <i>Staphylococcus epidermidis</i> y virus del Herpes simple 1.

Los oligosacáridos de la leche humana pueden estar en forma libre o conjugada. Los oligosacáridos libres, en una concentración de 10 g/L (1%), suponen el tercer componente mayoritario de la leche tras la lactosa y la grasa. Están formados por una combinación variable de D-glucosa, D-galactosa, ácido siálico, L-fucosa y N-acetilglucosamina, con una longitud de 3 a 11 residuos de monosacáridos y una gran variedad de uniones entre ellos, lo que explica su alta diversidad. Los oligosacáridos más abundantes en la leche humana son libres, neutros, contienen fucosa y antígenos del grupo sanguíneo de Lewis. Los oligosacáridos fucosilados de la leche humana participan en la protección contra las infecciones diarreicas, estimulan el crecimiento de bifidobacterias en el colon y atenúan fuertemente los procesos inflamatorios en la mucosa intestinal (4).

Un amplio número de patógenos reconocen epítopes en los glicoconjugados de la superficie celular de las mucosas intestinales o respiratorias, como su sitio de unión, el cual es el primer paso en el proceso de su patogénesis. Debido a lo anterior, se han identificado glicoconjugados solubles de la leche humana que poseen estos epítopes como parte de su estructura y actúan como ligandos competitivos previniendo la adherencia de determinados patógenos (4) (Tabla 2).

Tabla 2. Glicoconjugados que inhiben a patógenos (4).

Glicoconjugado	Patógenos
Oligosacáridos	<i>S. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> enteropatógena, <i>Listeria monocytogenes</i> .
Oligosacáridos fucosilados	<i>Campylobacter jejuni</i> , <i>V. cholerae</i> .
Sialilactosa	Toxina del cólera, <i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , Virus de la Influenza, Poliomavirus, <i>H. pylori</i> .
Mucina	<i>E. coli</i> S fimbriada (<i>E. coli</i> con fimbrias que reconocen estructuras de ácido siálico).
Lactadherina	Rotavirus
Globotriaosilceramida (Gb ₃)	Toxina Shiga
GM1 y GM3 (Gangliósidos)	Toxinas de <i>V. cholerae</i> y <i>E. coli</i> .

2. Glicoconjugados

Los glicoconjugados son compuestos de una gran importancia biológica con una estructura constituida por la unión covalente entre una o más unidades de glicanos y un componente no glicosídico, fundamentalmente lípidos y proteínas. Los carbohidratos presentes en las membranas plasmáticas están unidos covalentemente a los lípidos formando los glicolípidos y a las proteínas formando las glicoproteínas de membrana **(5)**.

En las glicoproteínas, la fracción hidrocarbonada representa una parte muy pequeña del peso molecular de la molécula mientras que la estructura proteica constituye el componente predominante. Por otra parte, en otro conjunto peculiar y diverso de glicoconjugados, conformado por los proteoglicanos (PG), la participación de los componentes sacáridos es tan importante, o en ocasiones más importante, que la participación del componente proteico **(5)**.

Los PG son moléculas ubicuas que pueden encontrarse, como parte de la matriz extracelular o plasmática, o en el interior de las células. Estas moléculas tienen múltiples y variadas funciones, entre las que destacan su participación en la organización estructural de los tejidos y en la regulación de algunos factores de crecimiento, a los cuales se unen y se almacenan por tiempos variables para liberarlos posteriormente; poseen propiedades adhesivas y antiadhesivas, promueven la angiogénesis y la fibriogénesis de las moléculas de colágeno **(5)**.

Los PG presentan un rasgo estructural común, todos ellos están conformados por una proteína central, generalmente rica en residuos de serina y treonina, a la cual se unen covalentemente una o múltiples cadenas lineales de carbohidratos conocidos como glicosaminoglicanos (GAGs) **(5)**.

2.1 Glicosaminoglicanos (GAGs)

Los GAGs son cadenas largas de polisacáridos lineales, compuestos por unidades repetitivas de disacáridos. Uno de los dos azúcares de este disacárido puede ser el ácido glucurónico o idurónico o la galactosa, el que se alterna con

una hexosamina que puede ser la N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina. Los GAGs se unen a una serina de la proteína central por medio de un trisacárido formado por la galactosil-galactosil-xilosa. Generalmente son agrupados en cuatro clases: 1) galactosaminoglicanos, representados por condroitin sulfato y dermatan sulfato, 2) queratan sulfato, 3) glucosaminoglicanos, heparan sulfato y heparina, y 4) el ácido hialurónico (hialuronato o hialuronano) (**Figura 1**) (5,6).

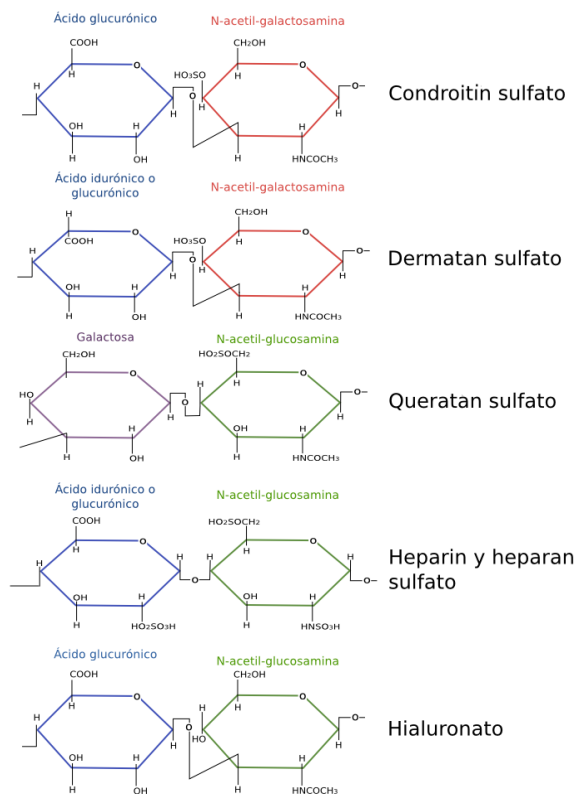


Figura 1. Estructura de los glicosaminoglicanos. Los GAGs se componen de unidades repetidas de disacáridos. El hialuronato carece de grupos sulfato, sin embargo, la mayoría de los GAGs contienen grupos sulfatos en varias posiciones (5).

Por sus características estructurales, los GAGs tienen carga aniónica fuerte que se atribuye principalmente a los grupos sulfato y carboxilo. Además, los ácidos urónicos se encuentran ionizados a pH fisiológico. La relevancia de esta característica radica en que iones positivos, como el sodio, son atraídos por una nube de cargas negativas, los que a su vez atraen a grandes números de moléculas de agua hacia las cadenas de los GAGs. Esto trae como consecuencia,

un agrupamiento de agua que es el principal responsable de la turgencia de los tejidos **(5,6)**.

Los glicosaminoglicanos sulfatados se encuentran generalmente en la naturaleza, unidos a una proteína central para formar proteoglicanos. Este tipo de biomoléculas tiene una función estructural y están presentes fundamentalmente en el tejido conectivo, epitelial y óseo. Son componentes de las matrices extracelulares y de la superficie celular, o se almacenan en los gránulos secretorios. En los gránulos secretorios secuestran y regulan la disponibilidad de los compuestos con carga positiva, como las proteasas y las aminas bioactivas. **(5,6)**.

Los GAGs en el tracto gastrointestinal de los recién nacidos, permanecen sin ser digeridos en el intestino, debido a que no existen enzimas en la pared intestinal con la capacidad de degradarlos. Por lo tanto, estos compuestos pueden actuar como receptores solubles que al interactuar con los patógenos impiden su adhesión a la pared intestinal, como se ha observado para los oligosacáridos de la leche humana. Sin embargo, algunos estudios señalan que ciertos receptores de la superficie celular están constituidos por GAGs, y diversos microorganismos como bacterias, virus y parásitos, utilizan a estos compuestos para producir una invasión eficiente y propagarse en la célula huésped. Particularmente, la mayoría de los microorganismos patógenos reconocen a los proteoglicanos de heparan sulfato como receptores celulares **(5,6)**.

3. Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)

El VIH es un retrovirus del género Lentivirus de la familia Retroviridae. De acuerdo con la similitud de las secuencias genómicas de los virus del VIH, se han descrito dos tipos: VIH-1 y VIH-2. En el mundo, el principal agente etiológico del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) es el VIH-1, mientras que el VIH-2 está restringido a algunas regiones de África Occidental **(7)**.

El VIH tipo 1 se clasifica en cuatro grupos: M (*Main* o principal), O (*Outlier* o externo), N (no M/no N) y P. El grupo M tiene hasta el momento nueve subtipos: A, B, C, D, F, G, H, J y K, de los cuales el A y el F poseen a su vez cuatro (A1, A2, A3 y A4) y dos (F1, F2) sub-subtipos respectivamente. El grupo M es el grupo mayoritario, ya que engloba a los virus causantes de más del 97% de las infecciones a nivel mundial. El subtipo B es el de mayor prevalencia en América del Norte y del Sur, Centro y Oeste de Europa y Australia. Así mismo en el grupo M se han caracterizado más de 30 formas recombinantes circulantes (mezcla de subtipos). En contraste, los grupos O y N se encuentran en áreas confinadas en la región del África Ecuatorial: Gabón y Camerún, cercana al hábitat natural de una subespecie del chimpancé común: *Pan troglodytes troglodytes* (7). El grupo P es el descrito más recientemente, en el 2009. Fue aislado en una mujer de Camerún y está más relacionado con una cepa del virus de inmunodeficiencia del gorila (8).

Con base en lo reportado en el 2011 por el Programa de las Naciones Unidas sobre VIH/SIDA (UNAIDS, por sus siglas en inglés), a finales del 2011, 34 millones de personas vivían con el VIH en todo el mundo (10).

En México, la prevalencia de las infecciones por el VIH-1 es del 0.24%, siendo el grupo M y el subtipo B, los predominantes desde el inicio de la epidemia y hasta la actualidad. En el 2011, se estimó que 179 478 personas vivían con el VIH y para el 2012, se reportaron 4 979 casos nuevos de SIDA adquiridos por transmisión sexual (96.7%), por usuarios de drogas intravenosas (2.1%) y por transmisión perinatal (1.2%). La tasa de muertes por SIDA fue de 4.4 por cada 100 000 habitantes con un total de 4737 defunciones por SIDA (11).

3.1 Estructura del VIH

El genoma de los virus VIH-1 y VIH-2 conserva una estructura básica compuesta por tres genes estructurales que codifican las proteínas del virión, dispuestos en el orden 5'-*gag-pol-env*-3'. En los extremos 5' y 3' se encuentran repeticiones terminales largas LTR (*long terminal repeats*, por sus siglas en

inglés) que permiten la integración en el genoma de la célula hospedadora. La diferencia principal entre los genomas del VIH-1 y el VIH-2 consiste en que el segundo de estos virus carece del gen *vpu* además de que contiene un gen *vpx*, del que, a su vez, carece el primero. Los genomas del VIH-1 y VIH-2, presentan una combinación compleja de genes regulatorios/accesorios (**Figura 2**) (7).

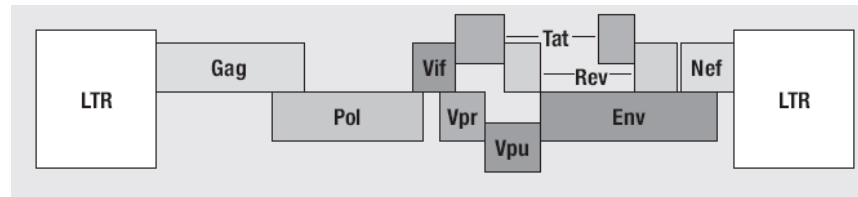


Figura 2. Organización del genoma del VIH-1. El genoma del VIH-1 está compuesto por tres genes estructurales (*gag*, *pol* y *env*) y seis genes reguladores o accesorios (*vif*, *vpr*, *vpu*, *tat*, *rev* y *nef*) (7).

En cada partícula vírica hay dos copias idénticas de moléculas de ARN de cadena sencilla y polaridad positiva (+) *ssRNA*, (*single strand RNA*, por sus siglas en inglés), cuyos extremos 5' están unidos entre sí mediante puentes de hidrógeno (7).

Los viriones del VIH son esféricos, con un diámetro de 100 nm, y poseen una membrana doble lipídica, rica en lipoproteínas. Las proteínas virales corresponden a tres grupos fundamentales: **a)** las codificadas por el gen *gag*: de tres a seis proteínas estructurales, que incluyen a las de la matriz (P17), la cápside (P24) y la nucleocápside (P7); **b)** las codificadas por el gen *pol* son las enzimas cruciales para la replicación viral, e incluyen a la reverso transcriptasa que convierte el ARN viral en ADN, a la integrasa que incorpora el ADN viral dentro del cromosoma de la célula huésped (provirus) y a la proteasa que fragmenta largas cadenas de los precursores de las proteínas GAG y POL en sus componentes; y **c)** las del gen *env* que codifican para las glicoproteínas de la envoltura viral GP120 y GP41, implicadas en la interacción con los receptores de la célula blanco y en la fusión de las membranas viral y celular (**Figura 3**) (7,9).

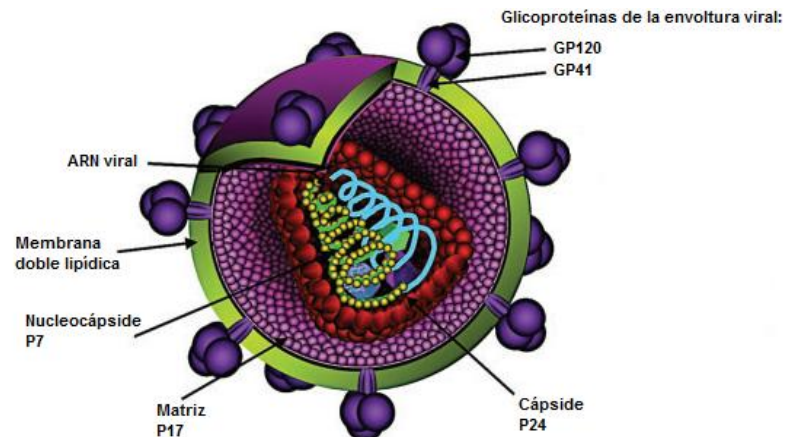


Figura 3. Estructura de una partícula del VIH-1. La parte central de la nucleocápside contiene dos copias del genoma viral (ARNs), proteínas del núcleo y transcriptasa inversa. La envoltura que lo rodea está compuesta de lípidos y glicoproteínas virales (GP120 y GP41) (9).

Los virus del VIH-1 presentan varios genes reguladores, que entre otras funciones regulan la replicación viral. De los seis genes con función reguladora dos de ellos, *tat* (proteína transactivadora) y *rev* (regulador de la expresión proteica viral), resultan imprescindibles para la replicación viral a través de las proteínas que codifican. Los otros cuatro genes reguladores del VIH-1, cuyas funciones están siendo estudiadas son *nef* (factor negativo), *vif* (factor de infectividad viral), *vpr* (proteína vírica reguladora) y *vpu* (proteína viral) (7).

3.2 Envoltura del VIH-1 y su entrada en la célula huésped

El VIH-1 entra a una célula huésped para replicarse y producir nuevos viriones. El virus inicia su ciclo replicativo mediante la unión altamente específica entre la glicoproteína de la envoltura viral GP120 y su receptor celular CD4 (presente en los linfocitos T y en las células de la estirpe monocito/macrófago). La interacción entre CD4 y GP120 es mayoritariamente de tipo electrostático, debido a que el sitio de unión al receptor CD4 en GP120 tiene carga negativa y atrae a la carga positiva del receptor. Además, hay fuerzas de Van der Waals y puentes de hidrógeno que ayudan a estabilizar la interacción CD4-GP120 (Figura 4A) (12-14). Esta interacción produce cambios conformacionales en el trímero de la GP120, exponiendo epítopes conservados que se unen entonces a otras

proteínas de la membrana celular, cuya función fisiológica es la de ser receptores para las quimiocinas. Estos receptores se denominan CCR5 o CXCR4 y funcionan como correceptores para el VIH. Inicialmente, el movimiento de los bucles VI/V2 de GP120 permite la exposición del bucle V3. Esta región es altamente heterogénea y determina el tropismo celular, definido como la capacidad del virus para establecer una infección en los diferentes tipos de células CD4 (**Figura 4B**) (12-15).

En conjunción con el bucle V3, la re-organización del puente de láminas beta localizado entre los dominios C1, C2 y C4 de GP120, conlleva a la formación de un segundo sitio de unión al correceptor y que es altamente conservado. Este sitio interacciona con la región N-terminal de un correceptor, ya sea CCR5 o CXCR4 (**Figura 4C**). Los correceptores para el VIH-1, pertenecen a la superfamilia de receptores de 7 dominios transmembranales acoplados a la proteína G. Presentan en su estructura un extremo N-terminal extracelular, 3 bucles extracelulares (ECLs), tres bucles intracelulares y un extremo C-terminal citoplasmático (12-15).

La carga neta positiva de la superficie de GP120 determina el uso preferencial del receptor CCR5 y/o CXCR4 por el VIH-1 para entrar a la célula. Los virus M-trópicos pueden infectar principalmente a las células CD4 como monocitos y macrófagos y emplean al correceptor CCR5, por lo que se denominan aislados CCR5-trópicos o R5; los virus T-trópicos pueden infectar a las células T CD4 y a las líneas celulares T vía el correceptor CXCR4, estos son los aislados CXCR4-trópicos o X4; y los virus dual-trópicos o con tropismo doble, pueden infectar a los tres diferentes tipos de células y pueden usar CCR5 y/o CXCR4 (12-15).

Algunos aislados virales macrófago-trópicos infectan a células que coexpresan bajos niveles de CD4 y CCR5/CXCR4. La baja cantidad de CD4 se ve recompensada con una alta cantidad de GAGs, proteoglicanos de heparan sulfato de la superficie celular, particularmente sindecanos, presentes en las células adherentes (células epiteliales y endoteliales), que el VIH emplea como

receptores en *cis* para infectar a los macrófagos y como receptores en *trans* para infectar a los linfocitos T **(16)**.

La unión al correceptor provoca un cambio conformacional en la glicoproteína transmembranal viral GP41, exponiendo al péptido de fusión, el cual se inserta en la membrana celular de la célula huésped **(Figura 4D)**. Posteriormente se forma un intermediario estructural de 6 hélices entre las regiones HR1 y HR2 de GP41 con la finalidad de aproximar el péptido de fusión insertado en la membrana celular y la GP41 asociada con la membrana viral **(Figura 4E)**. Las regiones HR2 se unen de forma antiparalela a las estructuras en espiral enrolladas de HR1. Dichas interacciones hidrofóbicas entre las regiones HR1 y HR2 confieren a la estructura de 6 hélices una gran estabilidad, lo que suministra la energía libre para la fusión de la membrana viral con la membrana celular y en consecuencia, se facilita la entrada de la cápside viral al interior de la célula **(Figura 4F) (12-15)**.

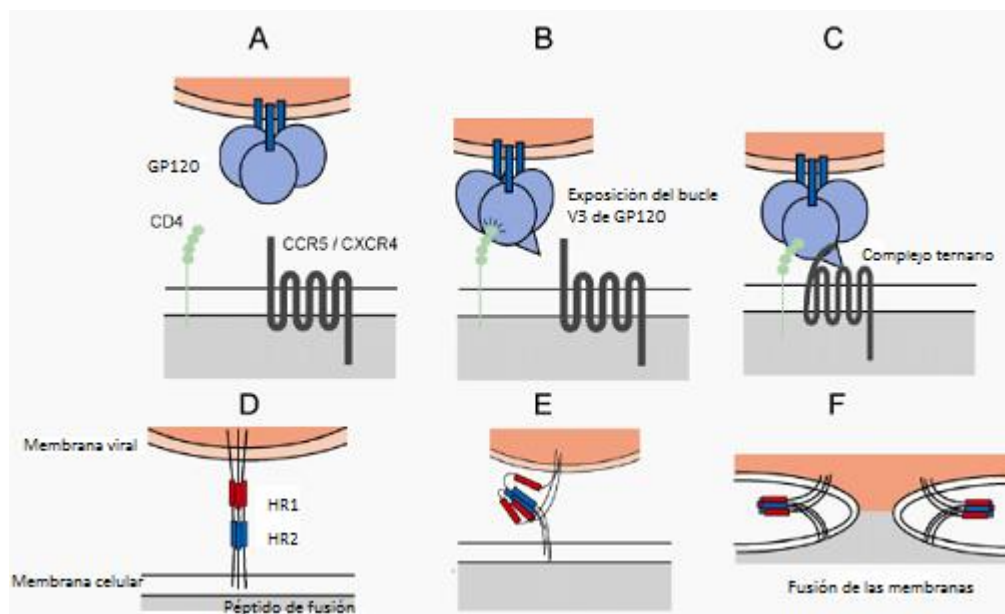


Figura 4. Entrada del VIH-1 a su célula blanco. El VIH-1 se fija a su célula blanco por medio de la molécula CD4, lo que resulta en un cambio de configuración en la molécula GP120 que le permite fijarse al correceptor CCR5/CXC4. La fusión entre la célula y el virus ocurre conforme el intermediario transicional de GP41 experimenta cambios ulteriores que causan una aproximación estrecha entre las membranas viral y celular **(14)**.

3.3 Glicosaminoglicanos y VIH

Se ha descrito que el VIH emplea moléculas de heparan sulfato como receptores celulares para producir una invasión eficiente y propagarse en la célula huésped **(17)**. Diversos estudios han reportado que varios compuestos sulfatados como la heparina, heparan sulfato, condroitin sulfato, dextrin sulfato, fucoidan, pentosan polisulfato, y dextran sulfato, inhiben la replicación del VIH-1 *in vitro*, ya que interactúan con componentes del virión, incluyendo a la región hipervariable de GP120 (bucle V3), así como al dominio conservado de interacción con el correceptor y a elementos de la glicoproteína de envoltura transmembranal GP41 **(18,19)**.

Diversos estudios han reportado que los glicoconjugados naturales de la leche humana, específicamente los glicosaminoglicanos y los glicolípidos sulfatados, inhiben la infección del VIH-1 *in vitro* **(20,21)**. Particularmente, la actividad antiviral de la fracción de los glicosaminoglicanos de la leche humana se debió a la inhibición de la interacción de GP120 a su receptor principal CD4. La caracterización de la inhibición identificó a la especie de condroitin sulfato, como la responsable de dicho efecto **(22)**. Estos estudios se realizaron en modelos de infección controlados con proteínas recombinantes de GP120 y CD4, y con aislados de laboratorio del VIH-1, por lo que es importante evaluar el efecto inhibitorio de los GAGs de la leche humana en un modelo experimental con aislados primarios del VIH-1 y células primarias CD4, ya que este modelo de infección *in vitro* representa lo más cercano a lo que ocurre en la infección por el VIH-1 *in vivo*.

Se define como aislado primario a una muestra viral que se ha obtenido a partir de un individuo infectado. El cultivo de un aislado primario del VIH-1 es una herramienta invaluable para estudiar la dinámica de replicación del virus en los individuos infectados. Un método común para obtener un aislado primario del VIH-1 es cocultivando las PBMCs de los individuos infectados con el virus, con PBMCs de donadores sanos **(23)**.

Se define como célula primaria aquella que es extraída de un tejido u órgano (o fragmento) sano y no a partir de un tumor o una lesión patológica de un organismo donador, por lo que tienen un crecimiento *in vitro* muy limitado **(23)**.

JUSTIFICACIÓN

Se ha descrito que algunos compuestos polianiónicos tienen actividad anti-VIH. Los glicoconjugados de la leche humana, particularmente los glicosaminoglicanos (GAGs), son compuestos polianiónicos con un potencial efecto inhibitorio *in vitro*, para prevenir la entrada del VIH a su célula blanco. La evaluación del efecto inhibitorio de los GAGs la leche humana en un modelo de infección *in vitro*, empleando aislados primarios del VIH-1 y células primarias CD4, permitiría proponer a los GAGs, como inhibidores potenciales de entrada para el VIH-1.

HIPÓTESIS

La infección *in vitro* de PBMCs por aislados primarios del VIH-1, no es afectada por la exposición a los glicosaminoglicanos de la leche humana.

DISEÑO DEL ESTUDIO

- ✓ Estudio analítico experimental.
- ✓ Transversal.
- ✓ Comparativo.

Criterios de inclusión:

- ✓ Personas con diagnóstico confirmado de infección por el VIH-1.
- ✓ Personas mayores de 18 años.
- ✓ Personas infectadas con el VIH-1 que no han recibido tratamiento antirretroviral.
- ✓ Personas que cumplan con los criterios de inclusión previos y que hayan firmado un consentimiento informado.

Criterios de exclusión:

- ✓ Personas no infectadas con el VIH-1.
- ✓ Personas infectadas con el VIH-1, menores de 18 años.
- ✓ Personas infectadas con el VIH-1 que hayan recibido tratamiento antirretroviral o que reciban tratamiento antirretroviral en el momento de la toma de la muestra sanguínea.

Criterios de eliminación:

- ✓ Aislado primario del VIH-1 cultivado en PBMCs, con baja replicación *in vitro* determinada por la cuantificación de la proteína P24 de la cápside mediante un ensayo de ELISA.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad de los glicoconjugados de la leche humana, particularmente de los GAGs de inhibir la infección de las PBMCs por los aislados primarios del VIH-1 *in vitro*.

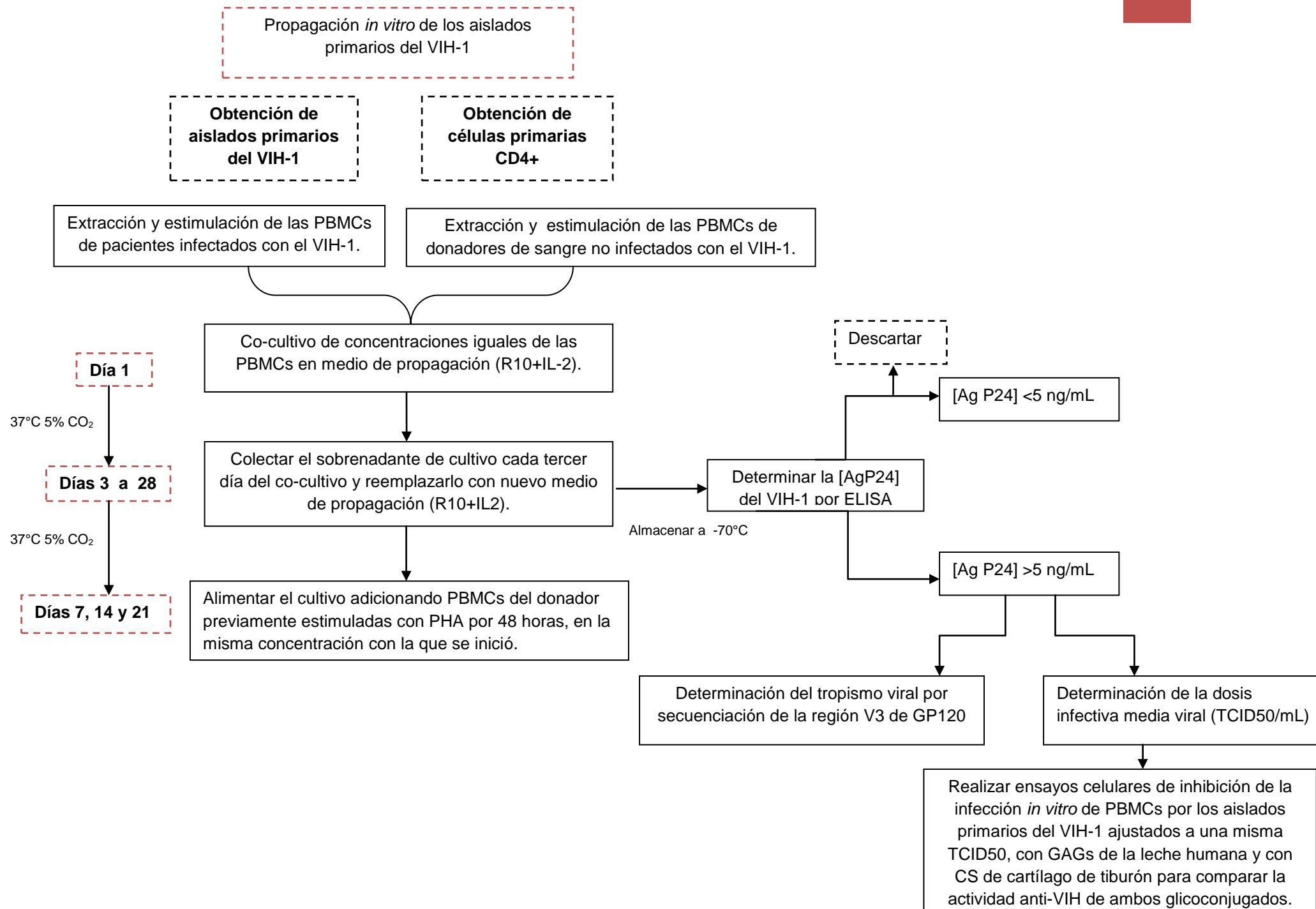
OBJETIVOS PARTICULARES

1. Aislar y propagar *in vitro* los aislados primarios del VIH-1 de pacientes del INCMNSZ infectados con el virus y que no hayan recibido tratamiento antirretroviral.
2. Caracterizar a los aislados primarios del VIH-1 propagados *in vitro*, mediante la determinación del tropismo del virus y de la dosis infectiva media viral.
3. Estandarizar los ensayos de infección y de inhibición de la infección de PBMCs *in vitro*, por los aislados primarios del VIH-1.
4. Establecer si la potencia de la actividad antiviral de los GAGs de la leche humana, es dependiente del tropismo viral.
5. Evaluar si el potencial efecto inhibitorio de la infección viral es específico de los GAGs de la leche humana, comparando su actividad con otra fuente natural de GAGs diferente a la leche humana: condroitin sulfato de cartílago de tiburón.

DIAGRAMA DE TRABAJO

[DIAGRAMA DE TRABAJO]

30



MATERIALES

1. Material biológico.

1.1 Medios de cultivo.

Los medios de cultivo que se utilizaron en los ensayos celulares, se describen en la sección de métodos.

1.2 Glicoconjugados.

1.2.1 GAGs de leche humana.

En este trabajo se trabajó con una fracción de GAGs extraída de la porción descremada de una mezcla de 2 L de leche humana, obtenida de 38 muestras de leches del banco de leches de Nueva Inglaterra, en Boston, Massachusetts, EUA. La extracción y la purificación de los GAGs se realizaron por ultrafiltración y cromatografía de intercambio iónico, por la Dra. Mónica Viveros, en el laboratorio de Inmunología en Mucosas y Gastroenterología Pediátrica de los Institutos de Investigación del Massachusetts General Hospital, en Boston, Massachusetts, EUA. A partir de esta mezcla de leches se obtuvieron 467 mg de glicosaminoglicanos. Por lo tanto la concentración fisiológica de GAG en la leche humana fue de 233.5 mg/L.

La determinación de la composición de dicha fracción por electroforesis capilar y espectrometría de masas específicas para carbohidratos, estuvo a cargo del grupo de colaboradores de este proyecto que se encuentran en la Escuela de Medicina de la Universidad de Boston, Massachusetts, EUA, bajo la supervisión del Dr. David Newburg. Se identificaron al menos 36 especies de glicosaminoglicanos, siendo la especie de heparan sulfato (HS) y la mezcla de especies de condroitin sulfato (CS) con dermatan sulfato (DS): CS/DS, las prevalentes en la fracción.

1.2.2 Estándar de condroitin sulfato de cartílago de tiburón de Sigma®.

Es un polímero natural de ácido β -glucurónico (1 \rightarrow 3) N-acetil- β -galactosamina (1 \rightarrow 4) [β -GlcA-(1 \rightarrow 3)-GalNAc-(1 \rightarrow 4)]. La sulfatación puede ocurrir

en la posición 6 y/o 4 de la galactosamina o no estar sulfatada. El estándar de condroitin sulfato de cartílago de tiburón fue adquirido de la compañía SIGMA-ALDRICH®.

1.3 PBMCs de donadores de sangre.

El banco de sangre del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) nos proporcionó los paquetes leucocitarios de 4 personas que cumplieron los requisitos para la donación de sangre (tener buen estado de salud en general, ser mayor de 18 años, peso mínimo de 50 kg) y con resultados de serología negativa para VIH, virus de Hepatitis C, antígeno de superficie del virus de Hepatitis B y Sífilis. Las PBMCs fueron extraídas y separadas a partir de los paquetes leucocitarios como se describe en la sección de métodos.

1.4 Aislados primarios del VIH-1 obtenidos de PBMCs de personas infectadas.

Los aislados primarios se obtuvieron partir de sangre periférica obtenida por venopunción en tubos con anticoagulante EDTA de 32 personas infectadas con el VIH-1 que asistieron al INCMNSZ, y que nunca habían recibido tratamiento antirretroviral. A las muestras de estos pacientes se les realizó la determinación de la carga viral en plasma y el conteo de los linfocitos T CD4 positivos. Estos estudios de laboratorio, son los que se realizan las personas infectadas con el VIH para monitorear el estadio y la evolución de la enfermedad.

2. Material de cultivo, reactivos, equipos e instrumentos para laboratorio. Ver Anexo

MÉTODOS

Los procedimientos experimentales que se utilizaron en este trabajo, están basados en los protocolos descritos en el Manual de Virología para laboratorios de VIH del Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas de Estados Unidos (24). En estos protocolos se describen las condiciones óptimas para el manejo del material biológico-infeccioso, específicamente para el material infectado con el VIH. Se realizaron algunas modificaciones a los protocolos con el fin de optimizar las condiciones experimentales llevadas a cabo en nuestro laboratorio.

1. Preparación de medios de cultivo.

1.1 Medio RPMI 1640®

Para preparar 1 L, se adicionó el medio en polvo a un volumen aproximado de 500 mL de agua bidestilada y se mezcló con un agitador magnético hasta disolver completamente. Se adicionaron 2.0 g de NaHCO_3 y se ajustó el pH del medio a 7 ± 0.2 empleando NaOH 1 N o HCl 1 N. Se vertió el medio a un matraz y se aforó a 1 L con agua bidestilada. El medio de cultivo preparado se esterilizó por filtración con membranas de $0.22 \mu\text{m}$ y se almacenó a temperatura ambiente protegiéndolo de la luz.

1.2 Medio RPMI suplementado (R10).

El medio RPMI se suplementó con 10% suero fetal bovino previamente inactivado por calor, 1% de glutamina 200 mM y 1% de solución de penicilina-estreptomicina (10,000 U/mL y 10mg/mL). El medio se almacenó a 4°C y antes de utilizarse, se atemperó a 37°C .

1.3 Medio de propagación (R10+IL-2).

Al medio RPMI suplementado (R10) se le adicionó IL-2 humana recombinante en una concentración de 20 U/mL. El medio se almacenó a 4°C y antes de utilizarse, se atemperó a 37°C .

1.4 Medio de estimulación (R10 + IL-2 + PHA).

Al medio de propagación (R10 + IL-2) se le adicionó fitohemaglutinina-L (PHA-L) en una concentración de 5 µg/mL. El medio se almacenó a 4°C y antes de utilizarse, se atemperó a 37 °C.

1.5 Medio de congelación.

Al suero fetal bovino previamente inactivado por calor y estéril, se le adicionó dimetilsulfóxido en una concentración de 10% volumen/volumen. El medio se almacenó a 4°C.

2. Preparación de los reactivos para el ensayo de ELISA P24 del VIH-1.

Los reactivos del estuche de ELISA de captura del antígeno P24 del VIH-1 se prepararon de acuerdo con las instrucciones del fabricante Perkin Elmer®. Los detalles se describen en la sección de ELISA de captura del antígeno P24 del VIH-1.

3. Extracción y separación de las PBMCs de los donadores de sangre y de los pacientes infectados con el VIH-1.

La separación de las PBMCs se realizó mediante la técnica de gradiente de densidad empleando una solución separadora de linfocitos (Ficoll) **(25)**.

Esta técnica se empleó para separar a los leucocitos a partir de un concentrado leucocitario obtenido de sangre completa de los donadores de sangre y de muestras de sangre periférica de los pacientes infectados con el VIH-1.

Para las muestras de los pacientes VIH positivos, se separó un volumen aproximado de 1 mL de sangre periférica para la cuantificación de los linfocitos T CD4 por citometría de flujo.

El plasma se separó por centrifugación a 792 xg durante 10 minutos a temperatura ambiente y se almacenó en tubos para microcentrífuga de 1.5 mL previamente rotulados con el número de registro del paciente y la fecha para la determinación de su carga viral y el conteo de los linfocitos T CD4, y para su posterior almacenamiento en congelación a -70 °C. Después de transferir el plasma para almacenarlo, el concentrado leucocitario se diluyó con un volumen de solución amortiguadora de fosfatos 1X (PBS 1X) estéril por cada volumen del

concentrado leucocitario, quedando una dilución final de 1:2. El concentrado leucocitario diluido se mezcló con suavidad para disminuir la aglomeración de las células durante la separación y se transfirió lentamente con una pipeta serológica a un tubo de centrifuga de 50 mL que contenía 15 mL de Ficoll. Para separar a las PBMCs de los pacientes infectados con el VIH-1, se realizó el mismo procedimiento utilizando tubos de centrifuga de 15 mL que contenían 6 mL de Ficoll. Al transferir la sangre diluida a la solución de Ficoll es muy importante dispensar lentamente para que no se mezclen las dos fases.

La mezcla de sangre diluida y el Ficoll se centrifugó a temperatura ambiente durante 30 minutos a 792 xg sin freno, para facilitar la formación del anillo de las PBMCs en la interfase de la mezcla. Después del centrifugado, la interfase turbia o la capa leucoplaquetaria (capa de PBMCs) se transfirió a tubos de centrifuga de 50 mL que contenían PBS 1X, aspirando cuidadosamente las células con una pipeta de transferencia estéril (**Figura 5**).

Las PBMCs se lavaron con al menos 8 volúmenes equivalentes de PBS 1X (completando a 50mL). Se centrifugó a 792 xg durante 10 minutos a temperatura ambiente, para descartar el sobrenadante por decantación. Se recomienda realizar un segundo lavado con 50mL de PBS 1X. Al final las PBMCs se resuspendieron en PBS 1X o en medio de cultivo para determinar su viabilidad.

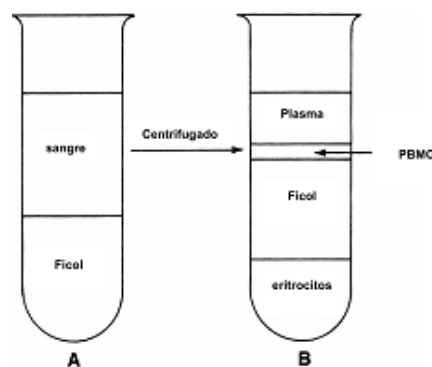


Figura 5. Separación de las células sanguíneas por gradiente de densidad. (A) La sangre completa diluida con PBS 1X se adiciona encima del Ficoll. B) Después del centrifugado, el Ficoll promueve la agregación de los eritrocitos y favorece su sedimentación, permitiendo que la capa leucoplaquetaria pueda ser colectada en la parte superior de la solución de Ficoll (**25**).

3.1 Conteo de células en el hemocitómetro o cámara de Neubauer para determinar viabilidad celular.

Para conocer el número de PBMCs viables por mililitro, se realizó el conteo de células en el hemocitómetro **(23)**.

El botón celular de las PBMCs se resuspendió en PBS 1X. Se transfirieron con una pipeta serológica, aproximadamente 100 μL de la suspensión de las PBMCs a un tubo Eppendorf de 0.5 mL. Se tomaron 10 μL de esta solución y se mezclaron con 90 μL de azul tripan al 0.4%, para obtener una dilución de 1:10. Se recomienda hacer la dilución de las células en un pozo de una placa estéril de 96 pozos, utilizando micropipetas para evitar la formación de aerosoles.

Para cargar el hemocitómetro, se adicionó por capilaridad, la suspensión celular diluida en azul de tripan hasta llenar el área debajo del cubreobjetos (aproximadamente 20 μL) y se dejó que la suspensión de células se asentara en el hemocitómetro durante al menos 10 segundos antes de contarlas en el microscopio. La cámara de Neubauer posee una superficie marcada con nueve cuadrados primarios. En el cuadrado central se realiza el conteo de los hematíes, mientras que en los cuadrados de los bordes superiores e inferiores de la cámara se hace el recuento leucocitario. Para determinar el número de células viables, se cuentan únicamente las células viables que permanecen sin teñir con el colorante azul de tripan, un colorante insoluble en lípidos, que penetra la membrana plasmática dañada de las células muertas tiñéndolas de azul **(Figura 6)**.

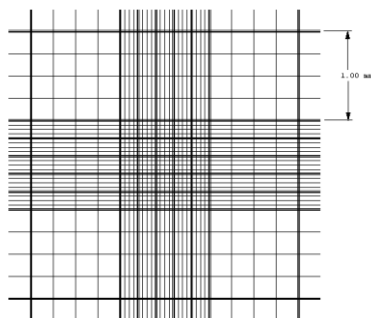


Figura 6. Cámara de Neubauer o hemocitómetro. La cámara de Neubauer posee una superficie marcada con nueve cuadrados primarios, con una longitud de 1 mm por lado (área 1 mm^2) y 0.1 mm de profundidad. Cuando se carga correctamente la cámara, el volumen que ocupa la suspensión celular en cada cuadrícula primaria es de 0.1 mm^3 ($1.0 \text{ mm}^2 \times 0.1 \text{ mm}$) o $1 \times 10^{-4} \text{ mL}$ **(23)**.

Para calcular el número de las PBMCs/mL se tomaron en cuenta los siguientes factores:

- 10^1 = factor de dilución de las células en el colorante: 90 μ L de azul tripan + 10 μ 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 1×10^{-4} mL en 1 mL de la suspensión celular original.

Para determinar el número total de células por mililitro, se multiplicó el promedio de las PBMCs contadas en los cuatro recuadros de conteo leucocitario de la cámara de Neubauer, por el factor de dilución de las células y por el factor de corrección de la cámara. Para calcular el número de células en el volumen en el que se resuspendieron para contar, se multiplicó el número de células por mililitro, por el volumen de PBS 1X en el que se resuspendió el botón de las PBMCs.

3.2 Criopreservación de las células.

Para congelar las PBMCs en criovales se resuspendieron las células en el medio de congelación frío para lograr una concentración de 5 a 20×10^6 células/mL. Una vez adicionado el medio de congelación a las células, se almacenaron a -70 °C por 4 a 6 semanas y posteriormente se almacenaron por tiempo indefinido a -150 °C en un tanque de nitrógeno líquido.

Se recomienda que las PBMCs de los donadores de sangre obtenidas por esta metodología sean conservadas a -70 °C hasta su uso. Para el cultivo de los aislados primarios del VIH-1 se descongelaron PBMCs una vez por semana para alimentar los cultivos como se describe más adelante. Las PBMCs de los pacientes infectados con el VIH-1, no se almacenaron en congelación, sino que se cultivaron inmediatamente después de separarse de la sangre completa, para favorecer la replicación del VIH-1 *in vitro*.

4. Propagación de los aislados primarios del VIH-1.

Las PBMCs obtenidas a partir de la sangre completa de los donadores de sangre fueron cocultivadas con las PBMCs de los pacientes infectados con el VIH-1. En un cocultivo se mantienen las PBMCs de un paciente con VIH-1 y las PBMCs de un donador sin VIH-1 previamente estimuladas con PHA, en condiciones óptimas de temperatura, humedad y suministro de bióxido de carbono (CO₂) que favorezcan la replicación viral *in vitro*.

Antes de iniciar el cocultivo, las PBMCs del donador previamente congeladas, se descongelaron rápidamente a 37 °C en baño María y se transfirieron a un tubo para centrifuga con 30 mL de medio R10, con el fin de diluir el medio de congelación donde se encontraban y evitar su lisis. Posterior a su centrifugación a 792 xg durante 10 minutos, el botón de PBMCs se resuspendió en medio de estimulación (R10+IL-2+PHA) en una concentración de 1X10⁶ células/mL y se incubaron en una botella de cultivo a 37°C, 5% de CO₂ y 85% de humedad durante 48 horas. Asimismo, las PBMCs de los pacientes infectados con el VIH-1 se cultivaron en medio de estimulación (R10+IL-2+PHA) en una concentración de 1X10⁶ células/mL y se incubaron en las mismas condiciones que las PBMCs del donador por 48 horas.

Este procedimiento se realizó 48 horas antes de iniciar el cocultivo para promover la formación de blastos y la replicación de las células T tanto del donador como del paciente.

El cocultivo se inició colocando en una botella de cultivo, la misma cantidad de PBMCs de un paciente y las PBMCs del donador, en una concentración final de 1x10⁶ PBMCs/mL de medio de propagación (R10+IL-2) y se incubó 37 °C y 5% de CO₂ y 85% de humedad. Posteriormente, cada tercer día se colectó el sobrenadante del cultivo cuidando de no resuspender las células sedimentadas en el fondo de la botella de cultivo y se reemplazó con medio de propagación en la misma cantidad que se colectó del sobrenadante. En ocasiones es necesario reemplazar con una mayor cantidad de medio de cultivo, dependiendo del grado de acidez de éste. Si se observa un color amarillento del medio, es necesario reemplazarlo porque la acidez del medio afecta a la viabilidad del virus. El

sobrenadante colectado se almacenó en crioviales a -70°C para determinar la concentración del Ag P24 en un ensayo de ELISA. Una vez por semana se alimentó el cultivo adicionando PBMCs del donador previamente estimuladas con PHA por 48 horas, en la misma concentración con la que se inició el cultivo. El cultivo se mantuvo durante 28 días, cosechando el sobrenadante cada tercer día y alimentando el cultivo con PBMCs estimuladas del donador una vez por semana.

5. Cuantificación de la proteína de la cápside P24 de los aislados primarios del VIH-1 por un ensayo inmunoenzimático de ELISA.

La replicación del VIH-1 es cuantificada por un ensayo inmunoenzimático empleado para la detección y la cuantificación de la proteína de la cápside P24 del VIH-1 en especímenes como plasma, suero o sobrenadante de cultivo. En este trabajo, se siguió el protocolo descrito por el fabricante Perkin Elmer® para la determinación del antígeno P24 en los sobrenadantes de cultivo cosechados cada tercer día durante el cocultivo de las PBMCs. El procedimiento fue el siguiente:

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. La curva estándar se preparó haciendo una dilución inicial del control positivo (tubo A) y a partir del cual se hicieron diluciones seriadas en medio de cultivo (tubo B a F), como se muestra en la **Tabla 3**. El primer pozo del total de las tiras seleccionadas se reservó, ya que corresponde al blanco del sustrato.

Tabla 3. Curva de calibración del antígeno de la cápside P24 del VIH-1.

Estándar (pg/mL)	Tubo	Diluyente (μL)	Adicionar (μL)
4000	A	490	10 Control positivo
200	B	950	50 Tubo A
100	C	500	500 Tubo B
50	D	500	500 Tubo C
25	E	500	500 Tubo D
12.5	F	500	500 Tubo E

Posteriormente, se inactivó el virus del VIH-1 libre en el sobrenadante de cultivo y en las soluciones de la curva estándar, al adicionar 20 μL de 5% de Triton X-100 a cada pozo, excepto al blanco. El triton es un detergente que lisa la membrana del virus del VIH-1, provocando que se liberen las partículas del Ag P24 de la cápside viral, las cuales son capturadas por el anticuerpo monoclonal anti-P24 absorbido en los pozos de la microplaca. Este proceso se llevó a cabo durante 2 horas \pm 5 minutos, incubando la placa a 37°C. Posteriormente, se eliminaron las partículas virales que no se fijaron en la superficie del pozo, realizando 6 lavados con 200 μL /pozo de la solución de lavado 1X. Al concluir el último lavado, la placa se invirtió sobre papel absorbente y se le golpeó gentilmente para eliminar el líquido remanente. Posteriormente, se adicionaron 100 μL de anticuerpo detector a cada pozo y la placa se incubó a 37°C durante 1 hora \pm 5 minutos. El anticuerpo detector es un anticuerpo policlonal de conejo anti-P24 biotinilado que se une al Ag P24 capturado en cada pozo. Los lavados se repitieron con 200 μL /pozo de la solución de lavado 1X. Como sistema de revelado, se le adicionaron 100 μL /pozo de la solución de estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante diluida 1:100, para la formación de un complejo con el anticuerpo detector, permitiendo su interacción al incubar la placa a 15-30°C en la oscuridad durante 30 \pm 5 minutos. Al término de este tiempo se repitieron los lavados con 200 μL /pozo de la solución de lavado 1X. Después de la serie de lavados, se adicionaron 100 μL del sustrato de la enzima peroxidasa, orto-fenilendiamina-HCl (OPD), para producir un complejo de color amarillo y se permitió la reacción a temperatura ambiente en la oscuridad durante 30 \pm 5 minutos. Finalmente se adicionaron 100 μL de ácido sulfúrico 4N a todos los pozos para detener la reacción y se realizó la lectura de la absorbancia por espectrofotometría a 490 o 492 nm. La intensidad del color desarrollado es directamente proporcional a la cantidad de antígeno P24 presente en los sobrenadantes de cultivo y fue determinada extrapolando la absorbancia de cada muestra, en la curva de calibración obtenida por las absorbancias de las diluciones del estándar del antígeno P24.

6. Determinación del tropismo de los aislados primarios del VIH-1 por secuenciación de la región V3 de la glicoproteína de envoltura GP120.

La prueba genotípica del tropismo viral se determinó con base en la secuencia genética de la región hipervariable V3 de la glicoproteína de la envoltura GP120 del VIH-1 empleando el algoritmo de Geno2Pheno para inferir la utilización del correceptor CCR5 (R5) ó CXCR4 (X4) **(26)**. Para realizar la prueba de tropismo se requiere de al menos 1.5 mL de muestra de plasma o sobrenadante de cultivo. El protocolo comprendió las siguientes etapas:

6.1 Extracción del ARN viral.

De cada aislado primario se seleccionó el sobrenadante de cultivo que presentó la mayor concentración del antígeno P24 cuantificada por ELISA, para extraer el ARN viral, empleando los reactivos del estuche de extracción de ARN de QIAGEN®. Adicionalmente se extrajo el ARN viral del sobrenadante de cultivo de un aislado de referencia del VIH-1 (ADA-M, R5-trópico) como control positivo y del sobrenadante de cultivo de PMBCs sin virus como control negativo. Los sobrenadantes de cultivo se alicuotaron en tubos para microcentrifuga de 1.5 mL y se centrifugaron a 2743 xg durante 2 horas. El sobrenadante se eliminó cuidadosamente con una pipeta de transferencia para no remover el botón viral. Se adicionaron 560 µL de buffer de lisis AVL y se mezcló con agitador vórtex. Después de 10 minutos, se adicionaron 560 µL de etanol al 100% para precipitar el ARN viral, mezclando nuevamente con agitador vórtex y se transfirió toda la mezcla a una columna de filtración etiquetada con el nombre de la muestra. Se centrifugó a 593 xg por 1 minuto y se desechó el filtrado. El ARN viral extraído permaneció unido a la membrana. Para purificar el ARN viral de contaminantes como proteínas, nucleasas y otros inhibidores, se realizaron lavados con dos soluciones amortiguadoras: AW1 y AW2. El primer lavado se realizó adicionando 500 µL de la solución amortiguadora AW1 a la columna de filtración y se centrifugó a 593 xg por 1 minuto. Posteriormente se realizaron dos lavados con la solución amortiguadora AW2, adicionando 500 µL de esta solución a la columna de filtración y centrifugando a 1817 xg por 3 minutos. El exceso de la solución amortiguadora AW2 se eliminó centrifugando nuevamente la columna de filtración

a 1817 xg por 1 minuto. Finalmente, el ARN purificado se eluyó adicionando 15 μ L de la solución amortiguadora AVE a la columna de filtración y se centrifugó a 593 xg por 1 minuto. Este último paso se repitió para dar un volumen total de 30 μ L.

6.2 Cuantificación y determinación de la pureza del ARN viral.

El ARN viral extraído se cuantificó por espectrofotometría en el equipo NanoVue Plus, empleando 4 μ L del ARN diluido en la solución amortiguadora AVE. Para determinar la pureza del ARN de cada muestra se realizaron dos lecturas de absorbancia a 260 y 230 nm. El pico máximo de absorción de los ácidos nucleicos se determinó a 260 nm, mientras que la absorción debida a las impurezas de la muestra se determinó a 230 nm. Una muestra de ARN con una adecuada pureza se consideró si la relación de las absorbancias 260/230 fue mayor a 2.0.

6.3 Protocolo para la retrotranscripción y la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR por sus siglas en inglés).

La retrotranscripción y la amplificación en cadena de la polimerasa se realizaron en un solo paso, para amplificar un fragmento de aproximadamente 963 pares de bases (pb) que contiene a la región V3 de la glicoproteína GP120 del VIH-1. Se utilizó la enzima SuperScriptTM III RT/Platinum®*Taq*, que tiene actividad de retrotranscriptasa y de ADN polimerasa. Los iniciadores que se utilizaron para la reacción de RT-PCR se indican en la **Tabla 4**.

Durante la reacción de retrotranscripción (RT), la actividad de la SuperScriptTM III RT/Platinum®*Taq* en su función de ADN polimerasa fue bloqueada y se permitió la actividad de la retrotranscriptasa durante un tiempo de 30 minutos a 52°C. Posteriormente, durante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la actividad de ADN polimerasa fue restablecida y funcionó bajo las siguientes condiciones de temperaturas: una etapa de 2 minutos a 94°C para la desnaturalización, 40 ciclos de tres etapas: la primera de 15 segundos a 94°C para la desnaturalización, la segunda de 30 segundos a 55°C para la alineación del iniciador y la tercera de 1.5 minutos a 68 °C para la extensión del

producto de amplificación, y una etapa final de extensión de 5 minutos a 68 °C. El producto de RT-PCR obtenido se almacenó a 4 °C.

Tabla 4. Protocolo para la retrotranscripción y amplificación en cadena de la polimerasa.

Reactivo	Concentración	Volumen (μL)
Agua desionizada y tridestilada estéril		10.40
Solución de sacarosa al 50% con 0.04% de azul de bromofenol		4.0
Mezcla 2X (dNTP's y MgSO ₄)	0.4 mM, 2.4 mM	20.0
Iniciador 5'-GAG CCA ATT CCC ATA CAT TAT TGT- 3'	0.5 pmol/μL	0.4
Iniciador 3'-GCC CAT AGT GCT TCC TGC TGC TCC CAA GA- 5'	0.5 pmol/μL	0.4
SuperScript TM III RT/Platinum®Taq		0.80
ARN (muestra o control)	80 a 120 ng/μL	4.0
Total		40

6.4 Electroforesis.

La electroforesis de los productos de RT-PCR de cada muestra viral se visualizaron en un chip marca Agilent DNA Technologies® que emplea una matriz teñida con el colorante de ADN Agilent. La detección se realiza mediante la medición de la fluorescencia del colorante de Agilent que se intercala entre las moléculas de los ácidos nucleicos de la muestra o del control positivo.

Para preparar la matriz teñida con el colorante de ADN Agilent se adicionaron 25 μL de colorante de DNA Agilent al vial de la matriz de ADN Agilent. Esta solución se mezcló con agitador vórtex y se transfirió a una columna de filtración. Se centrifugó a 1500 xg por 10 minutos y se almacenó a 4°C protegida de la luz.

El chip se cargó inyectando 9 μL de la matriz previamente preparada y se adicionaron 5 μL de marcador de ADN en todos los pozos. Posteriormente se adicionaron: 1 μL de marcador de masa en el pozo indicado, 1 μL de los productos de RT-PCR de las muestras virales, de los controles positivo y negativo y 1 μL del control negativo de los reactivos de amplificación. El chip se mezcló con agitador vortex durante un minuto a 2400 rpm. Inmediatamente después, el chip se colocó en el lector Bioanalyzer Agilent 2100®, que generó un gel virtual en el que se visualizó la presencia de una banda de aproximadamente 963 pb

correspondiente a la región V3 de la glicoproteína de envoltura GP120 en las muestras de los aislados primarios del VIH-1 y del control positivo.

6.5 Purificación de los productos de RT-PCR.

La purificación de los productos de RT-PCR se realizó previamente a la reacción de secuenciación, para eliminar restos de iniciadores, dNTPs y otros compuestos que pudieran afectar la calidad de las secuencias. Para realizar la purificación del producto de RT-PCR de cada muestra, se adaptaron tubos con filtro dentro de tubos para microcentrífuga y se les adicionaron 250 μ L de KCl 0.2 M. Posteriormente, se adicionaron 40 μ L de los productos de RT-PCR en la solución de KCl 0.2 M y se centrifugaron a 593 xg durante 15 minutos. Se adicionaron 250 μ L de agua desionizada y tridestilada estéril y se centrifugaron nuevamente a 593 xg durante 15 minutos. Finalmente, se adicionaron 25 μ L de agua desionizada y tridestilada para eluir los productos de RT-PCR, se invirtieron los tubos con filtro dentro de tubos para microcentrífuga nuevos y se centrifugaron nuevamente a 593 xg durante 5 minutos. Los productos de RT-PCR purificados se almacenaron a 4 °C.

6.6 Secuenciación.

6.6.1 Reacción de marcaje.

Para realizar la reacción de marcaje de los productos de amplificación previamente purificados, que son moléculas de ADN complementario (ADNc), se realizaron 4 reacciones y para cada reacción se utilizó uno de los iniciadores que se indican en la **Tabla 5**. Se adicionaron a una placa de 96 pozos: 6 μ L de ADNc de cada muestra viral a 4 pozos de cada columna y la mezcla de reacción para cada iniciador en cada fila. La placa se selló con una tira de tapas de polipropileno y se centrifugó hasta alcanzar 2250 xg. Al finalizar el centrifugado, la reacción de marcaje se realizó en las siguientes condiciones: etapa inicial de 94°C durante 2 minutos, 25 ciclos con tres etapas: la primera con 10 segundos a 96°C, la segunda de 5 segundos a 50°C y la tercera de 55 segundos a 60° C. Por último, la reacción se mantuvo a 4°C durante 10 minutos.

Tabla 5. Protocolo para la reacción de secuenciación.

Reactivo	Concentración	Volumen (μL)
Agua desionizada y tridestilada estéril		1
Solución amortiguadora 5x		2
Iniciadores 5'---3' 5'-TGT GCC CCA GCT GGT TTT GCG AT-3' 5'-AAT GTC AGY ACA GTA CAA TGT ACA C-3'	0.5 pmol/ μL	0.5
Iniciadores 3'---5' 3'-GAA AAA TTC CCT TCC ACA ATT AAA-5' 3'-TAT AAT TCA CTT CTC CAA TTG TCC-5'	0.5 pmol/ μL	0.5
Mezcla de nucleótidos terminales (<i>BigDye v3.1</i>)		4
ADNc de las muestras		6
Total		12.5

6.6.2 Purificación de la marca.

La purificación de la marca se realizó adicionando a cada pozo 80 μL de isopropanol al 80% y centrifugando a 2250 xg durante 1 hora. Se eliminó por decantación el exceso de isopropanol y nuevamente se adicionaron 80 μL de etanol al 70%. Se decantó el exceso de etanol y se centrifugó la placa invertida con papel absorbente para eliminar todo el etanol. La placa se mantuvo a temperatura ambiente para la evaporación completa del etanol aproximadamente por 2 minutos. Finalmente, se adicionaron 14 μL de formamida grado biología molecular a cada pozo y se resuspendió vigorosamente por pipeteo. Nuevamente se centrifugó la placa hasta alcanzar 2250 xg. Se colocó una tapa de caucho a la placa y se colocó en el brazo automático del secuenciador 3130xl Genetic Analyzer Applied Biosystems y se preparó la orden de trabajo con el software del secuenciador.

6.6.3 Análisis de las secuencias.

Los archivos de las secuencias generadas se almacenaron en la computadora del secuenciador. Posteriormente se realizó el acoplamiento y la obtención de las secuencias consenso por medio del programa SeqScape versión 2.1. Se empleó el algoritmo de interpretación de geno2pheno versión 2.0, que predice el uso del correceptor del VIH y que se basa en la secuencia genética de la región V3 de los aislados virales, para analizar la secuencia consenso de las muestras.

El algoritmo de geno2pheno emplea como punto de corte un valor denominado radio de falsos positivos (*false positive rate* o FPR, por sus siglas en inglés). Las secuencias virales con FPR >5 pertenecen a regiones de V3 de una población viral mayoritaria que emplea al correceptor CCR5, mientras que las secuencias virales con FPR <5 indica que la población viral no emplea el correceptor CCR5, sino al correceptor CXCR4 **(26)**.

7. Determinación de la dosis infectiva media viral (TCID₅₀) en los sobrenadantes de cultivo de los aislados primarios del VIH-1.

Este ensayo 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 **(24)**.

La titulación de la infectividad de los aislados virales del VIH-1 se realizó en los sobrenadantes de los aislados primarios del VIH-1 con las concentraciones mayores del Ag P24 de la cápside del VIH-1, que se cuantificaron durante el cultivo de los virus.

La titulación de la infectividad de los aislados virales del VIH-1 se realizó haciendo siete diluciones seriadas de base cuatro (4^{-2} a 4^{-8}) de los sobrenadantes virales concentrados (cada título por triplicado), en placas de 96 pozos estériles. En los pozos correspondientes a los títulos 4^{-3} a 4^{-8} , se adicionaron 150 μ L de medio de cultivo con una micropipeta multicanal, mientras que en los tres pozos del título 4^{-2} se adicionaron 200 μ L del sobrenadante de cultivo del aislado primario diluido 1:12. Posteriormente, con una micropipeta multicanal, se transfirieron 50 μ L de los pozos correspondientes al título 4^{-2} a los pozos del título 4^{-3} , y así consecutivamente hasta descartar 50 μ L de los pozos rotulados con el título 4^{-8} . Posteriormente se adicionaron 150 μ L de una suspensión de 2×10^5 PBMCs/mL del donador previamente estimuladas durante 48 horas con PHA+IL2 desplazándose de derecha a izquierda a través de la placa y las placas se incubaron a 37 °C con una atmósfera de 5% de CO₂ y 85% de humedad.

En el día 4, se resuspendieron las células en cada pozo con la micropipeta multicanal, desplazándose de derecha a izquierda a través de la placa, y se descartaron 125µL de cada suspensión celular. Finalmente, se adicionaron 150µL de medio de cultivo fresco a cada pozo, nuevamente desplazándose de derecha a izquierda y la placa se incubó en las mismas condiciones durante 3 días más.

Para calcular el título viral, se cuantificó por un ensayo inmunoenzimático de ELISA, el Ag P24 en los sobrenadantes de cultivo cosechados al día 7. 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 (TCID₅₀/mL), fue analizado por el método estadístico de Spearman-Kärber **(24)** de acuerdo con la siguiente ecuación:

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

En donde:

xk = dilución más alta empleada en el ensayo

r = 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 TCID₅₀/mL del sobrenadante viral, la dilución original se corrigió multiplicando el valor calculado por 5, dado que se emplearon 200 µL para realizar el ensayo.

8. Estandarización de los ensayos de infección de las PBMCs con los aislados primarios del VIH-1.

Para realizar los ensayos de infección, los sobrenadantes de los aislados primarios del VIH-1 con diferentes dosis infectivas medias, fueron diluidos con medio de propagación para ajustarlos a una misma TCID₅₀/mL, con la finalidad de infectar a las PBMCs con la misma dosis infectiva media viral.

En una placa de cultivo de 48 pozos se adicionaron 100 µL de sobrenadante de cultivo del aislado primario, por triplicado y 200 µL de una suspensión de 5×10^5 PBMCs/mL del donador previamente estimuladas por 48 horas con PHA+ IL2 y se permitió su interacción durante 24 horas a 37 °C, una atmósfera de 5% de CO₂ y 85% de humedad. Transcurrido el tiempo de incubación, se eliminó el virus que no interaccionó con las células realizando dos lavados con 300 µL de PBS 1X estéril. Para realizar el primer lavado, se centrifugó la placa a 792 xg por 10 minutos y se eliminó el sobrenadante de cultivo con una micropipeta multicanal cuidando de no remover las células sedimentadas en el fondo del pozo e inmediatamente se adicionaron 300 µL de PBS 1X estéril a cada pozo. Para realizar el segundo lavado, se centrifugó nuevamente la placa a 792 xg por 10 minutos, se eliminó el PBS 1X con una micropipeta multicanal y se adicionaron 300 µL de PBS 1X estéril a cada pozo. Finalmente, se centrifugó la placa a 792 xg por 10 minutos, se eliminó el PBS 1X con una micropipeta multicanal y se adicionaron 500 µL de medio de propagación (R10+ IL2) a cada pozo de la placa de cultivo. La placa se incubó a 37 °C, en una atmósfera de 5% de CO₂ y 85% de humedad durante 7 días. Se incluyeron como controles negativos de infección, tres pozos de PBMCs que no fueron expuestas al VIH. Después de 7 días, se colectó el sobrenadante de cultivo y se determinó la concentración del Ag P24 de la cápside del VIH-1 por ELISA de captura del antígeno viral. La estandarización de los ensayos de infección de las PBMCs con los aislados primarios del VIH-1, permitió establecer la TCID₅₀ viral para probar en los ensayos de inhibición de la infección de PBMCs, con los glicosaminoglicanos de la leche humana y una especie de glicosaminoglicano obtenido de una fuente biológica diferente a la leche humana. En este caso se utilizó la especie comercial de SIGMA® de condroitin sulfato obtenida de cartílago de tiburón.

9. Estandarización de los ensayos de inhibición *in vitro* de la infección de PBMCs por los aislados primarios del VIH-1, con glicosaminoglicanos de la leche humana.

Los sobrenadantes de los aislados primarios del VIH-1 en los cuales se cuantificó la máxima concentración de antígeno P24 durante su propagación, fueron diluidos con medio de propagación para ajustarlos a una misma

TCID₅₀/mL, esto con la finalidad de inhibir la misma dosis infectiva media viral con los GAGs de la leche humana.

En las placas de cultivo de 48 pozos se incubaron 100 µL de sobrenadante de cultivo viral con diluciones seriadas del inhibidor, en este caso: GAGs de la leche. En cada ensayo se incluyeron por triplicado, controles de infección que son PBMCs infectadas con el VIH-1 en ausencia de los glicosaminoglicanos de la leche, controles de células, es decir, PBMCs que no fueron expuestas al VIH ni al glicoconjugado y controles del glicoconjugado que son PBMCs con glicosaminoglicanos de la leche pero sin virus para valorar un posible efecto citotóxico de los GAGs.

Para evaluar las concentraciones de 10, 25 y 50 µg de GAGs de la leche humana se tomaron 2, 5, 10 y 20 µL de una solución concentrada 5X de GAG [5 mg de GAGs/1 mL PBS 1x estéril], respectivamente. Para las dosis de 5, 2.5 y 1.25 µg, así como para las dosis de 625 y 312.5 ng se realizaron diluciones seriadas 1:2 a partir de una solución concentrada 5X (50 µL solución 5X + 50 µL PBS 1x estéril) empleando 2 µL para cada dosis. Para las dosis de 10, 25, 50, 100 y 250 ng se realizaron diluciones de la solución concentrada 5X con PBS 1x estéril) empleando 5 µL para cada dosis. La concentración final del inhibidor por pozo en los cuales se adicionaron 312.5 ng, 625 ng y 1.25, 2.5, 5, 10, 25, 50 µg, fue por lo tanto de 1, 2, 4, 8, 17, 33, 83 y 167 µg/mL, respectivamente.

El sobrenadante del virus y los GAGs se incubaron durante 2 horas a 37 °C y una atmósfera de 5% de CO₂ y 85 % de humedad. Posteriormente se adicionaron a cada pozo, 200 µl de PBMCs del donador por pozo, que contenían 5X10⁵ PBMCs/mL, previamente estimuladas por 48 horas con PHA+IL2 y la placa se incubó nuevamente durante 24 horas a 37 °C y una atmósfera de 5% de CO₂. Durante esta etapa, el virus que no fue neutralizado con los GAGs de la leche, infectará a su célula blanco.

En la **Tabla 6**, se indica el porcentaje equivalente de los GAGs al que corresponde cada concentración del inhibidor empleada, con respecto a la

concentración fisiológica de los GAGs en la leche humana, la cual fue de 233.5 mg GAGs/L.

Tabla 6. Concentraciones de los glicosaminoglicanos (GAGs) probadas en los ensayos de inhibición de la infección de PBMCs por aislados primarios del VIH-1.

Concentración de GAGs/pozo (µg/0.3mL)	Concentración de GAGs (µg/mL)	Porcentaje equivalente de GAGs con respecto a la concentración fisiológica de 233.5 mg/L de leche humana (%)
0.010	0.03	0.014
0.025	0.08	0.035
0.050	0.17	0.073
0.100	0.33	0.14
0.250	0.83	0.35
0.312	1	0.4
0.625	2	0.8
1.25	4	1.7
2.5	8	3.4
5	17	7
10	33	14
25	83	35
50	167	71

Al finalizar esta interacción, la placa se lavó 2 veces con 300 µL de PBS 1X estéril para eliminar al virus libre y los compuestos de la leche que no interaccionaron con las células. Para realizar el primer lavado, se centrifugó la placa a 792 xg por 10 minutos y se eliminó el sobrenadante de cultivo con una micropipeta multicanal cuidando de no remover las células sedimentadas en el fondo del pozo e inmediatamente se adicionaron 300 µL de PBS 1X estéril a cada pozo. Para realizar el segundo lavado, se centrifugó nuevamente la placa a 792 xg por 10 minutos, se eliminó el PBS 1X con una micropipeta multicanal y se adicionaron 300 µL de PBS 1X estéril a cada pozo. Finalmente, se centrifugó la placa a 792 xg por 10 minutos, se eliminó el PBS 1X con una micropipeta

multicanal y se adicionaron 500 μ L de medio R10 con IL-2 durante 7 días a 37 °C y a una atmósfera de 5% de CO₂ y 85% de humedad. Al día 7 posterior a la infección, se colectó el sobrenadante y se le determinó la concentración del antígeno P24 del VIH-1 por un ELISA de captura del antígeno viral.

El porcentaje de inhibición *in vitro* de la infección de las PBMCs por los aislados primarios del VIH-1 con los GAGs de la leche humana, se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$x\% \text{ infección} = (\text{virus} + \text{PBMCs} + \text{GAGs}) / (\text{virus} + \text{PBMCs}) * 100$$

$$\% \text{ inhibición} = (100 - x \% \text{ infección})$$

Una inhibición significativa de la infectividad viral se definió como una reducción mayor o igual al 80% de la concentración del antígeno P24 con respecto al control de infección.

10. Ensayos de inhibición de la infección de PBMCs por los aislados primarios del VIH-1 *in vitro*, con condroitin sulfato de cartílago de tiburón.

Una vez conocidas las concentraciones de los glicosaminoglicanos de la leche humana que presentaron una inhibición significativa de la infectividad viral mayor o igual al 80%, se realizaron los ensayos de inhibición de la infección de cada aislado primario, empleando ahora como inhibidor un estándar comercial de condroitin sulfato de cartílago de tiburón. El condroitin sulfato es una especie de glicosaminoglicanos, que se obtiene de una fuente natural que no es la leche humana. Se utilizó este estándar para evaluar si el efecto inhibitorio de la infección de las PBMCs por los aislados primarios del VIH-1 es específico de los glicosaminoglicanos de la leche humana. Las condiciones experimentales y las concentraciones que se probaron del condroitin sulfato, fueron las mismas con las que se realizaron los ensayos de inhibición con los GAGs de la leche.

RESULTADOS

1. Propagación *in vitro* de los aislados primarios del VIH-1.

Se propagaron *in vitro*, un total de 32 aislados virales primarios, a partir del cocultivo de las células mononucleares de sangre periférica de pacientes infectados con el VIH-1 y que asistieron al INCMNSZ, con las células de donadores con serología negativa para el VIH-1. Sin embargo, únicamente se emplearon 6 aislados primarios para evaluar el efecto de los GAGs de la leche en los ensayos celulares. Los aislados primarios de estos pacientes representaron el 19% de los 32 aislados virales propagados y que presentaron concentraciones del antígeno P24 mayores a 5 ng/mL en los sobrenadantes de cultivo. Esta concentración es la mínima requerida para realizar los ensayos celulares de infección e inhibición. Doce aislados virales (37%) presentaron concentraciones de Ag P24 entre 0.5 a 4.9 ng/mL y 14 (44%) concentraciones menores a 0.5 ng/mL.

La cuantificación de la carga viral en plasma y el conteo de los linfocitos T CD4 positivos, son los estudios de laboratorio principales que se realizan las personas infectadas con el VIH para monitorear el estadio y la evolución de la enfermedad. En la **Tabla 7** se muestran los resultados de la carga viral y del conteo linfocitario y de los 6 pacientes de los cuales se emplearon sus aislados primarios para la evaluación de los ensayos celulares de infección e inhibición *in vitro*.

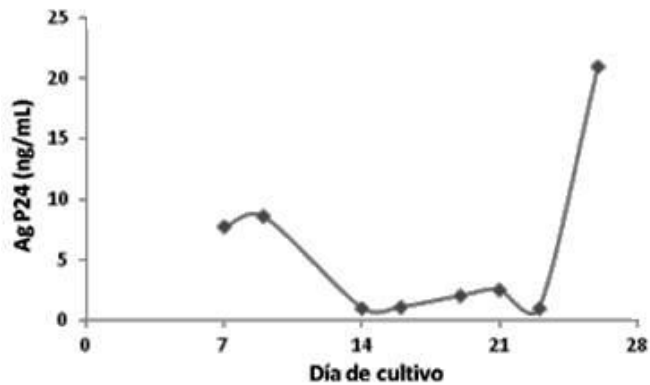
Tabla 7. Aislados primarios del VIH-1

No. Aislado primario	Carga viral (copias/mL)	Conteo de linfocitos CD4 (células/ μ L)
1	420 434 ²	123
2	25 831 ²	35
3	26 742 ²	110
4	45 300 ¹	330
5	176,271 ²	52
6	>100, 000 ¹	47

Cuantificación de la carga viral con los equipos Ampliprep Taqman®¹ y Abbott Real Time HIV-1®². El conteo de linfocitos CD4+se realizó con el equipo Facscalibur®.

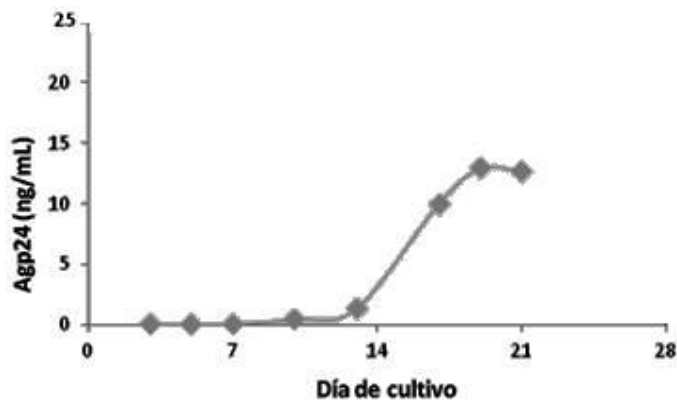
En las **gráficas 1-6**, se muestran las curvas de replicación *in vitro* de los 5 aislados primarios del VIH-1 en las células primarias que son PBMCs de donadores con serología negativa para el VIH-1. La cinética de la replicación viral se realizó cuantificando por un ensayo inmunoenzimático de ELISA de captura de antígeno, al antígeno de la cápside P24 del VIH-1 en los sobrenadantes de cultivo cosechados cada tercer día durante la propagación de los aislados primarios. En las gráficas se observa la variabilidad que existe en la capacidad de replicación *in vitro* que presentan los aislados primarios. Estos resultados muestran la diferente capacidad de adaptación de las cuasiespecies del VIH-1 que predominan en el cultivo.

Día de cultivo	Ag P24 (ng/mL)
7	8
9	9
14	1
16	1
19	2
21	3
23	1
26	21



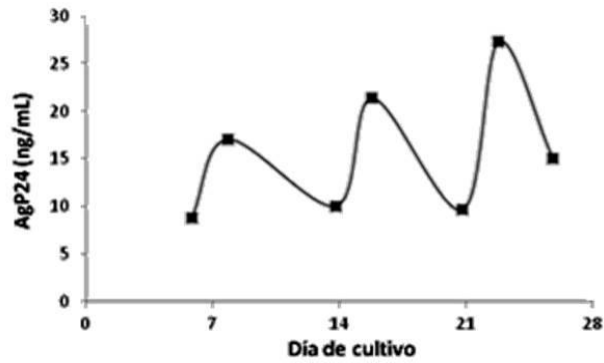
Gráfica 1. Curva de replicación del aislado primario 1 en PBMCs. La replicación viral fue alta durante la primera semana del cultivo y decayó considerablemente hasta la adición de nuevas células blanco previamente estimuladas con PHA e IL-2 en el día 21 de cultivo donde se incrementó hasta alcanzar una concentración de 21 ng/mL de Ag P24.

Día de cultivo	Ag P24 (ng/mL)
3	0
5	0
7	0
10	0.5
13	1
17	10
19	13
21	13



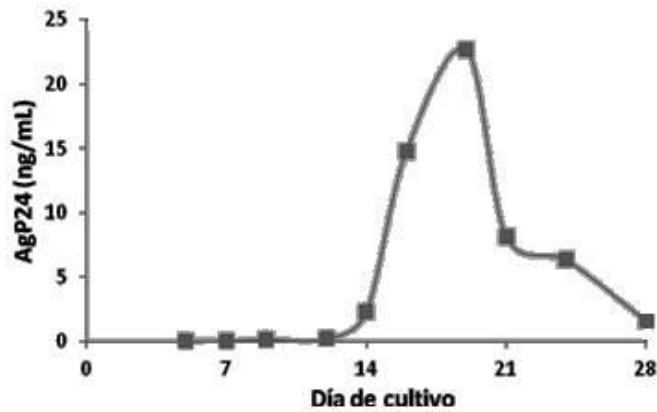
Gráfica 2. Curva de replicación del aislado primario 2 en PBMCs. La replicación viral fue nula durante los primeros 14 días de cultivo. La adición de nuevas PBMCs, altamente susceptibles a la infección por este aislado viral, al día 14 de cultivo, favoreció la replicación del aislado primario ya que ésta aumentó progresivamente hasta alcanzar una concentración de 13 ng/mL de AgP24.

Día de cultivo	Ag P24 (ng/mL)
6	9
8	17
14	10
16	21
21	9
23	27
26	15



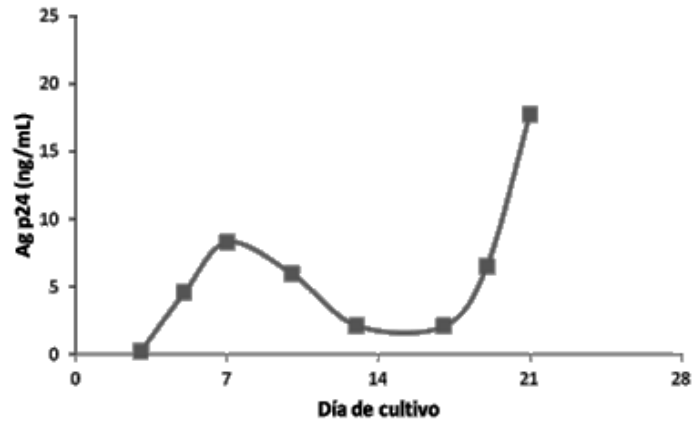
Gráfica 3. Curva de replicación del aislado primario 3 en PBMCs. El aislado 3 mostró una alta infectividad viral, ya que su replicación fue sostenida durante todo el cultivo, tras la adición de nuevas células blanco previamente estimuladas con PHA e IL-2, a los días 7, 14 y 21 de cultivo.

Día de cultivo	Ag P24 (ng/ml)
5	0,0
7	0,1
9	0,2
12	0,2
14	2
16	15
19	23
21	8
24	6
28	2



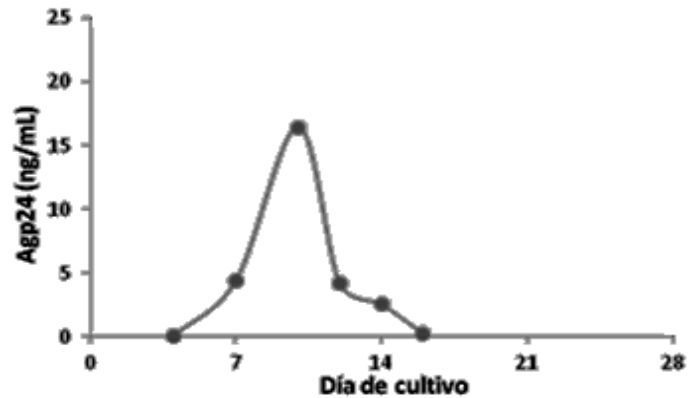
Gráfica 4. Curva de replicación del aislado primario 4 en PBMCs. La replicación viral únicamente aumentó progresivamente tras la adición de células blanco el día 14 de cultivo y disminuyó al cabo de la tercera semana.

Día de cultivo	Ag P24 (ng/mL)
3	0,25
5	5
7	8
10	6
13	2
17	2
19	7
21	18



Gráfica 5. Curva de replicación del aislado primario 5 en PBMCs. La replicación viral fue sostenida en la primera y tercera semana del cultivo hasta alcanzar una concentración de 18 ng/mL de AgP24 el día 21 de cultivo.

Día de cultivo	Ag P24 (ng/mL)
4	0,08
7	4
10	16
12	4
14	3
16	0,29



Gráfica 6. Curva de replicación del aislado primario 6 en PBMCs. La replicación de este aislado aumentó progresivamente tras la primera adición de PBMCs al día 7 de cultivo, alcanzándose el máximo pico de replicación al día 10 del cultivo.

2. Evaluación del tropismo de los aislados primarios del VIH-1 mediante la secuenciación de la región V3 de la glicoproteína de la envoltura GP120.

El ARN viral extraído de cada uno de los aislados primarios fue cuantificado y se determinó su pureza. Como se observa en la **Tabla 8** el ARN viral de los seis aislados primarios del VIH-1, presentó un grado de pureza bueno, considerando que la relación de absorbancias de 260/230 fue mayor a 2 en todos los casos.

Tabla 8. Concentración y pureza del ARN viral extraído.

Aislado primario del VIH-1	Concentración del RNA viral extraído (ng/μL)	Pureza * A260/A230
1	83.6	4.591
2	92.8	4.735
3	83.6	3.732
4	114.4	4.931
5	109.2	4.2
6	113.2	2.802

*Si la relación A260/230 es >2.0 la pureza de la muestra es buena, si es <2.0 se considera una mala pureza.

Se determinó el tropismo de los aislados primarios del VIH-1 en los sobrenadantes con mayor concentración del antígeno P24 cuantificado previamente por ELISA, con base en la secuencia genética de la región V3 de la glicoproteína GP120 y empleando el algoritmo de la interpretación geno2pheno, que predice el uso del correceptor CCR5 o CXCR4 para el VIH-1 (**Figura 7**).

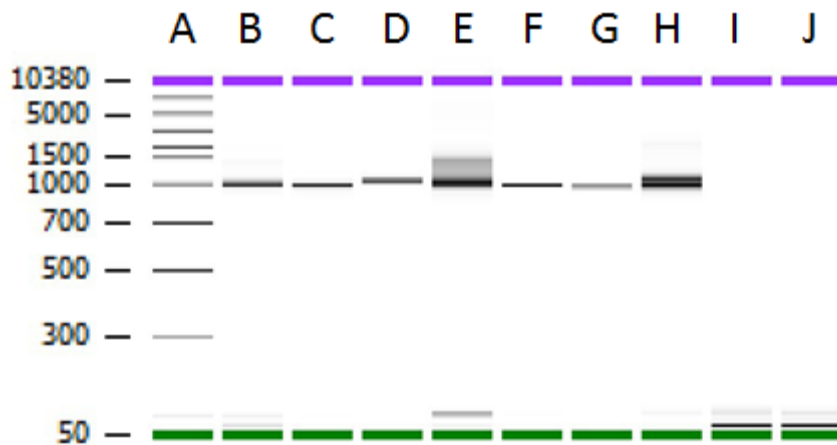


Figura 7. Amplificación de la región V3 de GP120 por medio del sistema Bioanalyzer. Línea A, marcador de talla molecular del ADN, en el cual se observan bandas de amplificación de 50 a 10380 pares de bases (pb). Línea B, control positivo de amplificación: se utilizó la cepa de referencia ADA-M del VIH-1. Líneas C a H, se observa la banda amplificada de 963 pb correspondiente a la región V3 de GP120 de cada uno de los 6 aislados primarios del VIH-1. Línea I, control negativo de amplificación (sobrenadante de cultivo sin VIH). Línea J, control negativo de reactivos de amplificación.

De acuerdo con los resultados obtenidos de la secuenciación de V3, cuatro de los aislados virales emplean preferentemente al correceptor CCR5 (tropismo R5) y dos emplean al correceptor CXCR4 (tropismo X4) para infectar a la célula blanco (**Tabla 9**).

3. Cuantificación de la dosis de infectividad media viral (TCID₅₀) de los aislados primarios del VIH-1.

Al realizar la determinación de TCID₅₀ de los sobrenadantes de cultivo de los aislados primarios con mayor concentración del antígeno P24 cuantificado previamente por ELISA, se observó que presentaron diferentes grados de infectividad para las células blanco. Los títulos de TCID₅₀ obtenidos fueron desde 1.5×10^3 hasta 107×10^3 TCID₅₀/mL (**Tabla 9**).

Tabla 9. Evaluación del tropismo viral y de la dosis de infectividad media (TCID₅₀) de los aislados primarios del VIH-1.

Aislado primario del VIH-1	P24 [ng/mL]	Tropismo FPR* (%)	TCID ₅₀ /mL
1	21	R5 (20.8)	10 x10 ³
2	13	R5 (9.0)	6.5 x10 ³
3	27	R5 (68.8)	15 x10 ³
4	23	R5 (23.4)	630
5	18	X4 (0.1)	107 x10 ³
6	16	X4 (1.70)	1.5 x10 ³

*Si el valor de FPR es mayor a 5%, la población viral utiliza al correceptor CCR5, mientras que un FPR menor a 5% indica que la población viral no utiliza al correceptor CCR5 sino al correceptor CXCR4.

4. Ensayos de inhibición de la infección *in vitro* de PBMCs por los aislados primarios del VIH-1, con glicosaminoglicanos de la leche humana y con condroitin sulfato de cartílago de tiburón

Los ensayos celulares se realizaron con los sobrenadantes de los aislados primarios del VIH-1 R5 y X4 ajustados a una dosis infectiva media de 158.5/mL y con PBMCs de 4 donadores distintos. Todas las muestras probadas en los ensayos de inhibición y que incluyen a los controles de células, controles de infección (sin inhibidor), controles de glicoconjugado (sin virus) y las muestras con diferentes concentraciones de los glicoconjugados (inhibidores), se evaluaron por triplicado en cada ensayo y cada ensayo se repitió al menos 2 veces.

El efecto inhibitorio de las dosis de los GAGs de 0.03 a 167 µg/mL, se evaluó empleando PBMCs del donador 1. Las dosis de GAGs de 1 a 17 µg/mL fueron evaluadas empleando PBMCs del donador 2, mientras que para las dosis mayores a 17 µg/mL se emplearon PBMCs del donador 3. Todas las concentraciones del estándar comercial de condroitin sulfato (CS) se evaluaron

con las PBMCs del donador 4. Cabe destacar que todas las dosis de ambos inhibidores (GAGs de la leche y del estándar de CS) fueron evaluadas empleando PBMCs del donador 1 para inhibir la infección del aislado 4. El motivo por el cual se utilizaron PBMCs de diferentes donadores en los ensayos celulares con los aislados primarios del VIH-1, fue debido a que se requiere de una gran cantidad de células para los experimentos y no fue posible obtenerlas de un mismo donador.

En la **Tabla 10**, se muestra la variabilidad en la susceptibilidad a la infección de las PBMCs de un mismo donador por diferentes aislados virales con la misma TCID₅₀, lo cual se refleja en los distintos valores de la concentración del Ag P24 cuantificada en los sobrenadantes de cultivo. Estos resultados confirman que uno de los factores que determinan la infección de las células blanco por el VIH-1, es la susceptibilidad genética del huésped.

Tabla 10. Ensayos de infección de las PBMCs con los aislados primarios del VIH-1.

Aislado primario del VIH-1	Concentración de AgP24 (ng/mL en los sobrenadantes de cultivo)			
	PBMCs donador 1	PBMCs donador 2	PBMCs donador 3	PBMCs donador 4
1	40.8	33.7	75.9	3.9
2	110.5	4.5	0.4	3.2
3	35.9	14.2	6.2	1.3
4	4.9			
5	98.9	35.1	2.3	3.3
6	9.8	45.4	1.2	0.9

En la **Tabla 11** se muestra que en presencia de los glicoconjugados, aún en la concentración más alta (167 $\mu\text{g}/\text{mL}$), la viabilidad de las PBMCs no se vió afectada significativamente con respecto a los controles de células sin inhibidor, que presentaron una viabilidad del 88 %, lo cual indica que estos compuestos no causaron citotoxicidad.

Tabla 11. Viabilidad de las PBMCs en presencia de los glicoconjugados: GAGs y Condroitin sulfato.

Concentración de glicoconjugado [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	Porcentaje de viabilidad celular (%)*	
	GAGs	Condroitin sulfato
0	88	88
1	73	84
2	82	88
4	87	91
8	93	83
17	91	93
33	81	88
83	83	87
167	86	80

*Viabilidad celular determinada por conteo en la cámara de Neubauer al día 7 de los ensayos celulares de inhibición de la infección viral.

Con respecto al efecto inhibitorio de los glicosaminoglicanos de la leche humana, se observó que inhibieron significativamente (85-100%) la infección de las PBMCs por los aislados primarios del VIH-1 con tropismo R5 (macrófago-trópicos) en un intervalo de concentraciones de 2 a 17 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (**Tablas 12 a 15, Gráficas 7 a 10**), mientras que la infección de los aislados con tropismo X4 (linfotrópicos) fué inhibida significativamente (92%) con 2 y 0.83 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (**Tablas 16 y 17, Gráficas 11 y 12**). En las gráficas se señala con una línea punteada roja el porcentaje de inhibición considerado como significativo.

El condroitin sulfato de cartílago de tiburón tuvo un efecto inhibitorio de la infección de todos los aislados primarios del VIH-1, similar que los GAGs de la leche humana. El condroitin sulfato inhibió significativamente (80-100%) la infección de las PBMCs de 3 de los 4 aislados primarios R5, en un rango de

concentraciones de 2 a 33 $\mu\text{g}/\text{mL}$. (**Tablas 12 a 14, Gráficas 7 a 9**), mientras que el otro aislado primario R5 no se inhibió aún empleando la concentración más alta de éste inhibidor (167 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (**Tabla 15, Gráfica 10**). El condroitin sulfato de cartílago de tiburón inhibió significativamente (97 y 80%), la infección de los aislados primarios del VIH-1 X4 empleando 2 y 0.17 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente. (**Tabla 16 y 17, Gráficas 11 y 12**).

Tabla 12. Inhibición de la infección por el aislado primario 1 con tropismo R5 (TCID₅₀/mL 158.5).

Concentración del inhibidor [µg/mL]	Porcentaje de inhibición (%)±EDE*	
	GAGs de leche humana	Condroitin sulfato
0.03	15±10	21±16
0.08	21±7	32±17
0.17	19±11	24
0.33	40±22	13±13
0.83	21±21	61±11
1	57±13	68±12
2	90±6	95±3
4	100	80±13
8	100	82±13
17	100	100
33	100	88±12
83	92±8	86±9
167	99±1	96±4

*EDE: error de desviación estándar.

Tabla 13. Inhibición de la infección por el aislado primario 2 con tropismo R5 (TCID₅₀/mL 158.5).

Concentración del inhibidor [µg/mL]	Porcentaje de inhibición (%)±EDE*	
	GAGs de leche humana	Condroitin sulfato
0.03	0	0
0.08	0	0
0.17	0	0
0.33	0	0
0.83	0	0
1	52±14	50±16
2	94±3	73±18
4	87±9	76±10
8	100	76±16
17	96±3	76±16
33	96±2	83±11
83	100	95±4
167	100	83±9

*EDE: error de desviación estándar.

Tabla 14. Inhibición de la infección por el aislado primario 3 con tropismo R5 (TCID₅₀/mL 158.5).

Concentración del inhibidor [µg/mL]	Porcentaje de inhibición (%)±EDE*	
	GAGs de leche humana	Condroitin sulfato
0.03	0	0
0.08	0	0
0.17	0	0
0.33	0	0
0.83	0	0
1	50±16	48±14
2	32±16	89±8
4	61±15	89±6
8	74±13	88±4
17	85±9	81±6
33	100	82±10
83	99	94±4
167	99±1	83±10

*EDE: error de desviación estándar.

Tabla 15. Inhibición de la infección por el aislado primario 4 con tropismo R5 (TCID₅₀/mL 158.5).

Concentración del inhibidor [µg/mL]	Porcentaje de inhibición (%)±EDE*	
	GAGs de leche humana	Condroitin sulfato
0.03	62±6	31±31
0.08	58±11	44±14
0.17	62±17	36±22
0.33	40±10	77±0
0.83	51±23	49±23
1	78±14	75±6
2	69±14	44±24
4	51±32	8±5
8	55±13	0
17	92±3	19±17
33	97±1	64±7
83	100	ND
167	100	41±21

*EDE: error de desviación estándar; ND: no determinado.

Tabla 16. Inhibición de la infección por el aislado primario 5 con tropismo X4 (TCID₅₀/mL 158.5).

Concentración de inhibidor [µg/mL]	Porcentaje de inhibición (%)±EDE*	
	GAGs de leche humana	Condroitin sulfato
0.03	0	0
0.08	0	0
0.17	9	2
0.33	0	0
0.83	0	0
1	65±16	62±18
2	99±1	97±3
4	100	100
8	98±1	97±3
17	99±1	97±2
33	100	100
83	92±5	100
167	93±7	100

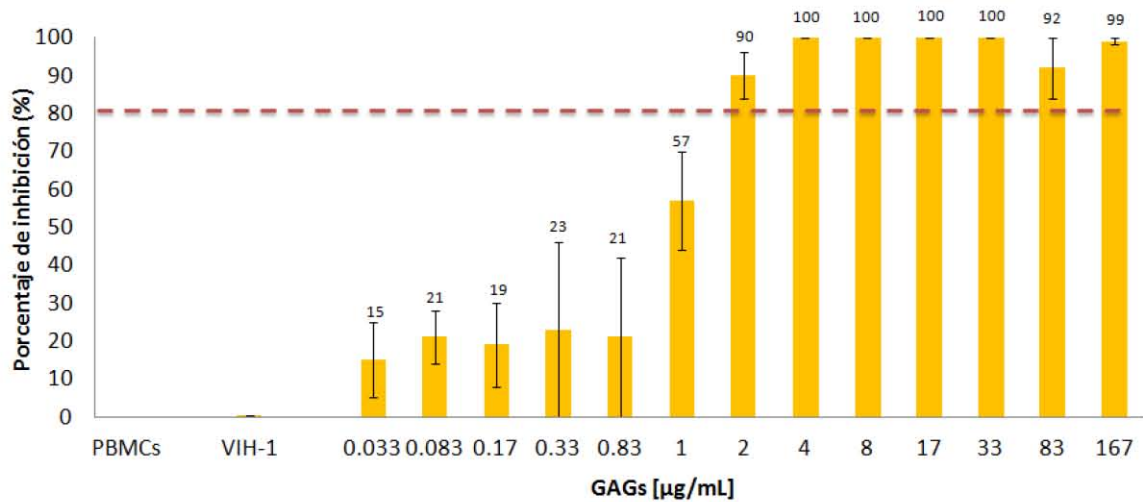
*EDE: error de desviación estándar.

Tabla 17. Inhibición de la infección por el aislado primario 6 con tropismo X4 (TCID₅₀/mL 158.5).

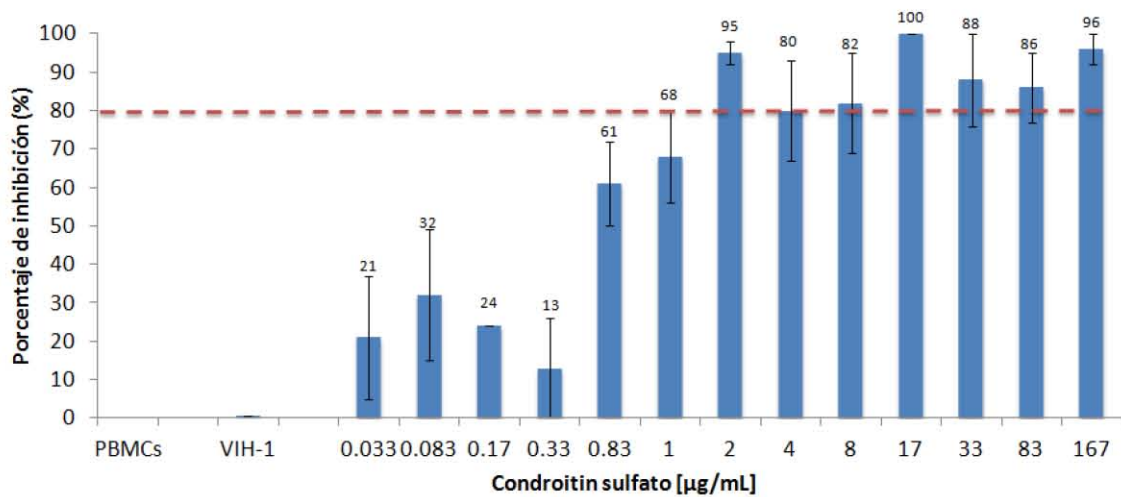
Concentración del inhibidor [µg/mL]	Porcentaje de inhibición (%)±EDE*	
	GAGs de leche humana	Condroitin sulfato
0.03	ND	77±8
0.08	74±20	69±22
0.17	52±22	80±4
0.33	52±12	98±2
0.83	89	97
1	97±3	85±12
2	97±2	80±20
4	100	100
8	95±5	95±4
17	93±7	89±7
33	92±7	81±9
83	100	83±17
167	100	98±2

*EDE: error de desviación estándar; ND: no determinado

A)

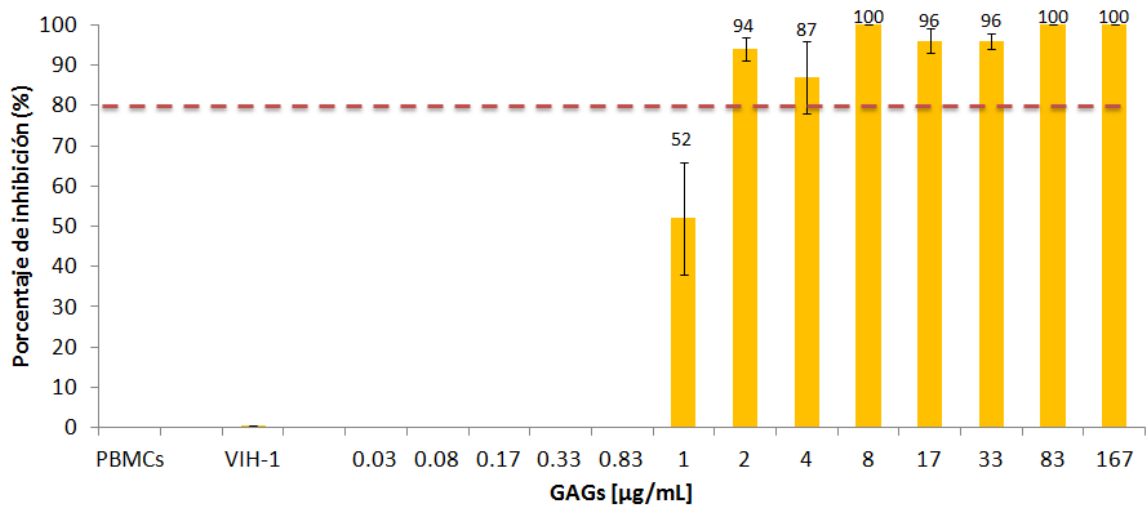


B)

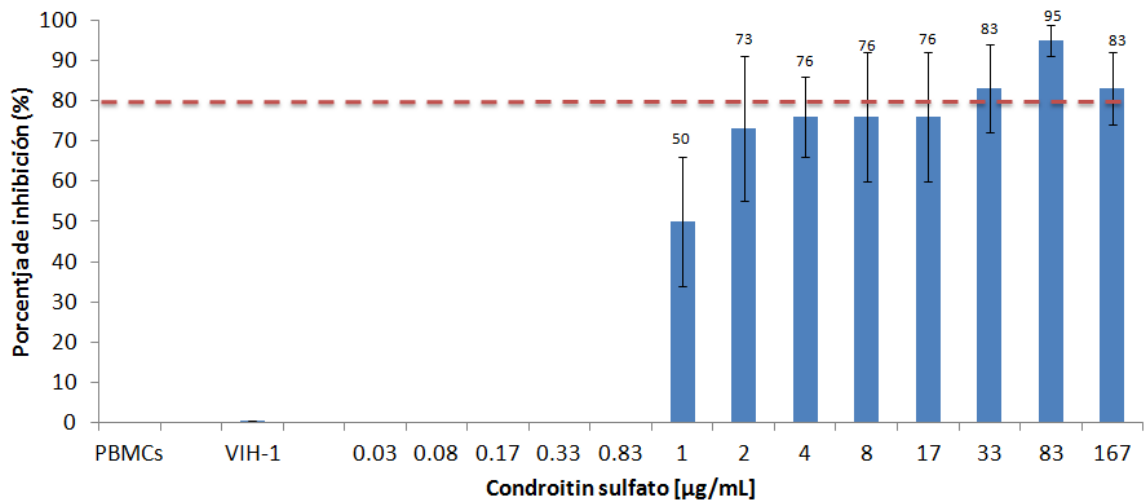


Gráfica 7. Inhibición de la infección por el aislado primario 1 con tropismo R5 (TCID₅₀/mL 158.5). **A)** La infección viral de las PBMCs fue inhibida significativamente (90-100%) con 2 µg/mL de GAGs. **B)** La infección viral de las PBMCs fue inhibida significativamente (80-100%) con 2 µg/mL de CS.

A)

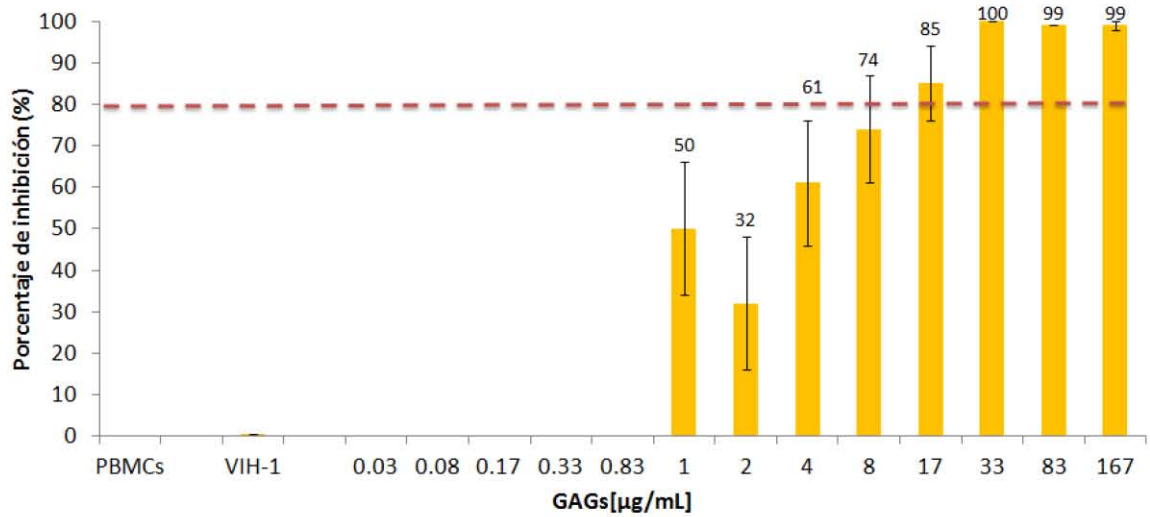


B)

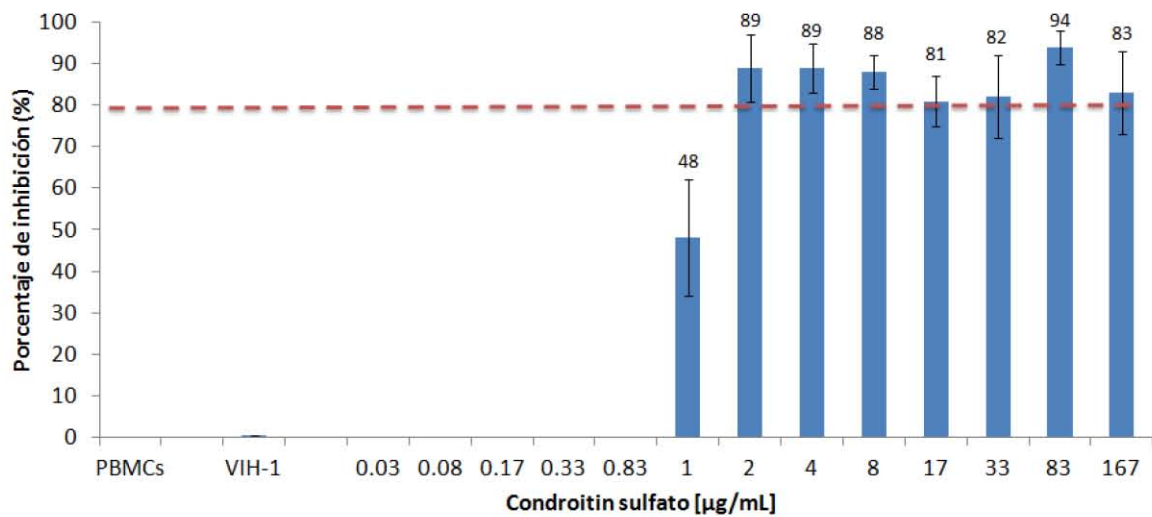


Gráfica 8. Inhibición de la infección por el aislado primario 2 con tropismo R5 (TCID₅₀/mL 158.5). A) La infección viral de las PBMCs fue inhibida significativamente (87-100%) con 2 µg/mL de GAGs. B) La infección viral de las PBMCs fue inhibida significativamente (83-95%) con 33 µg/mL de CS.

A)

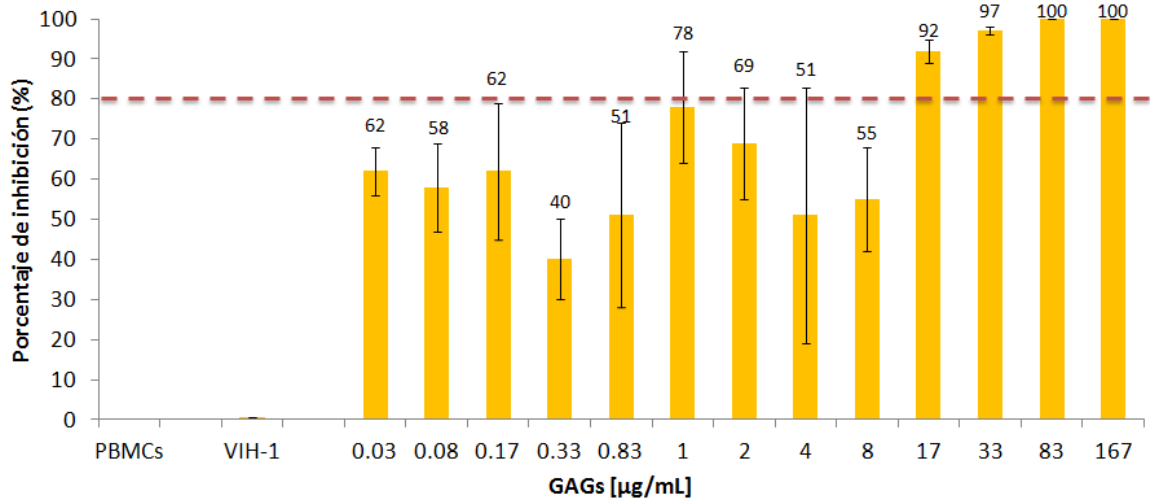


B)

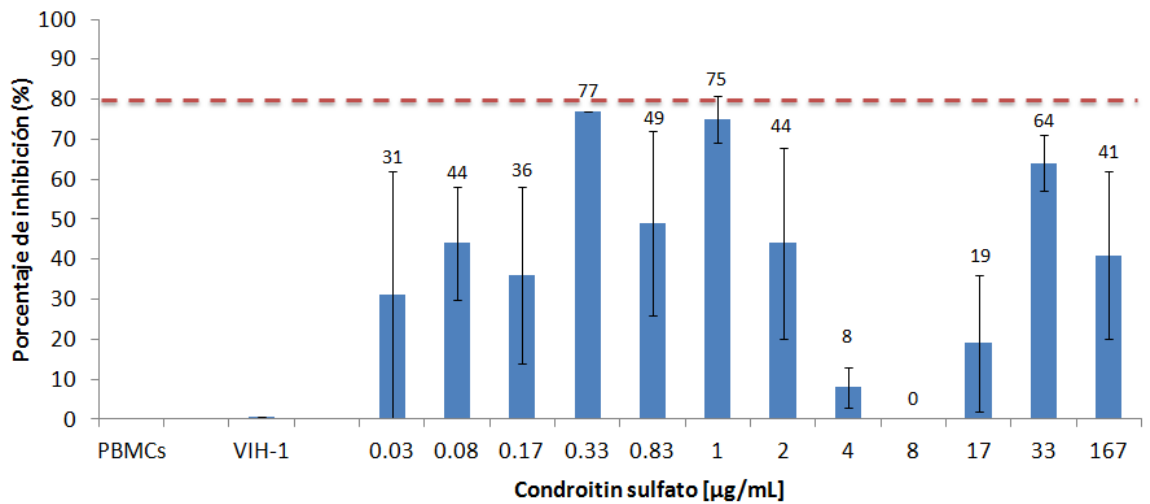


Gráfica 9. Inhibición de la infección por el aislado primario 3 con tropismo R5 (TCID₅₀/mL 158.5). **A)** La infección viral de las PBMCs fue inhibida significativamente (85-100%) con 17 µg/mL de GAGs. **B)** La infección viral de las PBMCs fue inhibida significativamente (81-94%) con 2 µg/mL de CS.

A)

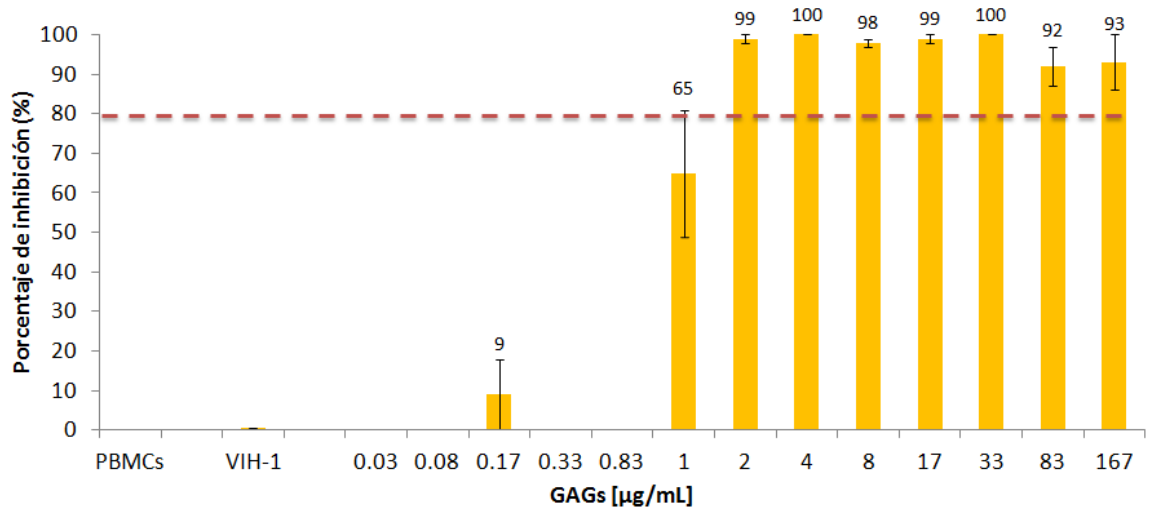


B)

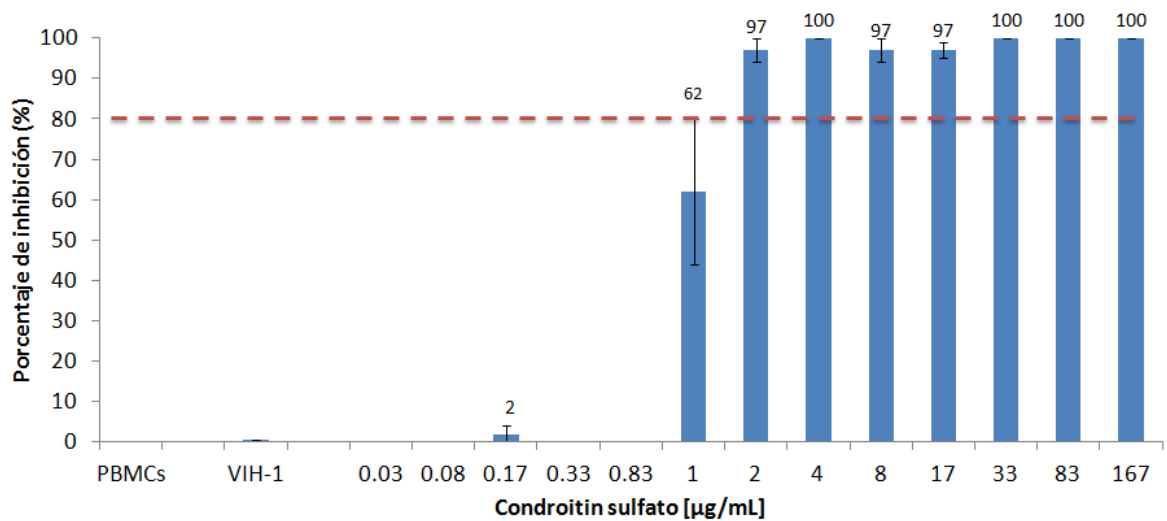


Gráfica 10. Inhibición de la infección por el aislado primario 4 con tropismo R5 (TCID₅₀/ml 158.5). **A)** La infección viral de las PBMCs fue inhibida significativamente (92-100%) con 17 µg/mL de GAGs. **B)** La infección viral de las PBMCs no fue inhibida significativamente aún empleando la dosis mayor de CS (167 µg/mL).

A)

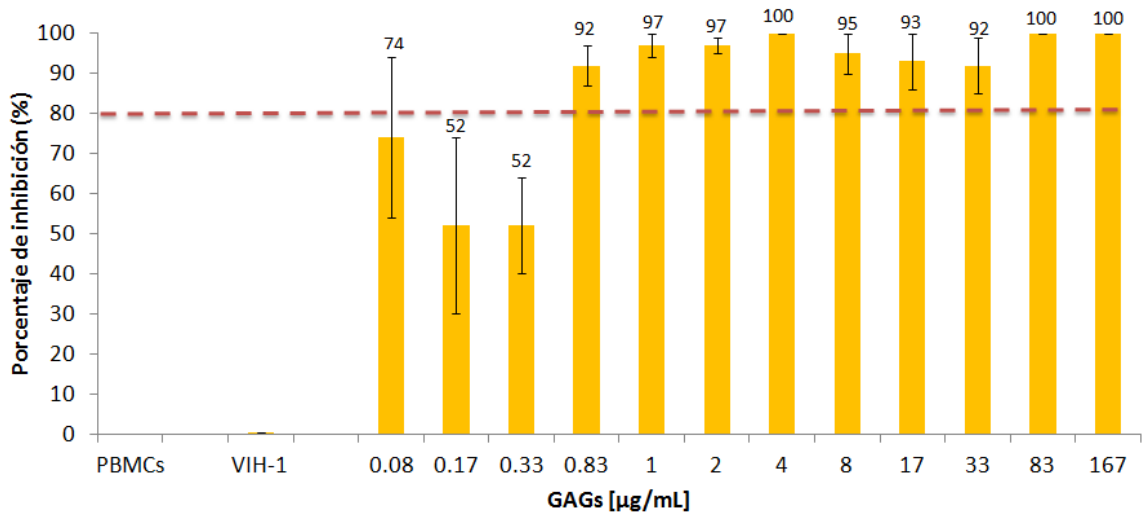


B)

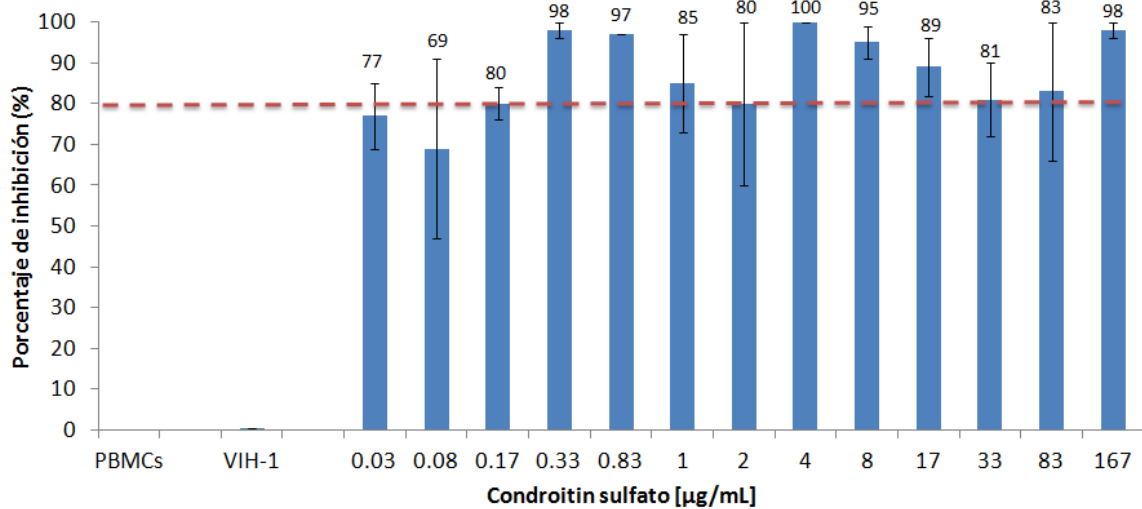


Gráfica 11. Inhibición de la infección por el aislado primario 5 con tropismo X4 (TCID₅₀/mL 158.5). La infección viral de las PBMCs fue inhibida significativamente (92-100%) con 2 µg/mL de GAGs. **B)** La infección viral de las PBMCs fue inhibida significativamente (97-100%) con 2 µg/mL de CS.

A)



B)



Gráfica 12. Inhibición de la infección por el aislado primario 6 con tropismo X4 (TCID₅₀/mL 158.5). La infección viral de las PBMCs fue inhibida significativamente (92-100%) con 0.83 µg/mL de GAGs. **B)** La infección viral de las PBMCs fue inhibida significativamente (80-100%) con 0.17 µg/mL de CS.

DISCUSIÓN

Las glicoproteínas de la envoltura del VIH-1 median la entrada del virus a la célula a través de la interacción secuencial con su receptor celular principal CD4, con el correceptor (CCR5 o CXCR4), y de la subsecuente fusión de las membranas viral y celular. La eficiencia de la entrada del VIH a su célula blanco está determinada por factores virales y celulares entre los que destacan: la afinidad de la envoltura viral por el correceptor, los niveles de expresión de los correceptores y la selección natural de las variantes virales por el huésped. El proceso de infección del VIH-1 es variable debido a la alta frecuencia de mutación de las glicoproteínas de la envoltura viral, la cual es mayor a 15% entre los diferentes subtipos virales y del 10 al 15% entre aislados del mismo subtipo **(14)**.

En este estudio, la infección de los 6 aislados primarios del VIH-1 que se evaluaron, disminuyó más de 80% en presencia de los GAGs, que son compuestos polianiónicos extraídos de la leche humana. La disminución de la capacidad de replicación de los aislados virales, sugiere que dichos compuestos bloquean la entrada de las cuasiespecies del VIH-1 a la célula, debido a que pueden actuar como receptores solubles análogos a los glicosaminoglicanos de la superficie celular, que se encuentran generalmente en la naturaleza como proteoglicanos de heparan sulfato, previniendo así la interacción del virus con su célula blanco **(17)**. Hasta ahora, se han caracterizado cuatro dominios de la glicoproteína de la envoltura viral GP120 que se unen al heparan sulfato y que son expuestos después del cambio estructural que sufre GP120 al unirse al receptor celular CD4. Tres de los dominios de GP120 están involucrados en la interacción con el correceptor, incluyendo a la región del bucle V3 **(27, 28)**.

Se ha identificado a la región del bucle V3 de GP120 como el sitio en el cual ejerce su actividad anti-VIH una variedad de compuestos polianiónicos de origen sintético ó natural diferente a la leche humana, debido a que esta región de la envoltura viral posee una alta carga positiva, la cual es neutralizada por los polianiones **(16, 18, 19, 29)**. De una forma similar, los glicosaminoglicanos

sulfatados de la leche humana, debido a su alta carga negativa, pueden ejercer su actividad anti-viral, al interaccionar con la región V3 de las variantes virales del VIH-1 independientemente de su tropismo viral.

Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que los aislados del VIH-1 con tropismo R5 y X4 son inhibidos significativamente por los GAGs de la leche humana, aunque el efecto antiviral, es al parecer más potente sobre los aislados X4 que para los aislados R5. Los dos aislados X4 se inhibieron con concentraciones de 0.83 y 2 $\mu\text{g/mL}$ de GAGs, mientras que los aislados R5 mostraron mayor resistencia a la inhibición ya que se requirieron concentraciones hasta de 17 $\mu\text{g/mL}$ para inhibirlos. Estos resultados pueden asociarse a su vez, en congruencia con lo reportado, a que la carga neta del bucle V3 de los aislados R5 es menor que la de los aislados X4, por lo que hay una interacción electrostática débil entre los compuestos polianiónicos y la región V3 **(17,30)**. Sin embargo, para establecer si la potencia del efecto antiviral de los GAGs es dependiente del tropismo de los aislados primarios, es necesario evaluar el efecto inhibitorio de los GAGs ante un número mayor de aislados virales con diferente tropismo.

Este trabajo es de gran relevancia ya que en otros modelos de inhibición de la infección *in vitro* por el VIH-1, se han utilizado cepas de referencia del virus X4 propagadas en líneas celulares, que son fácilmente neutralizables en comparación con los virus o aislados primarios X4 propagados en células primarias como células T CD4 activadas y macrófagos, como se realizó en este estudio. Esto se debe a que los aislados primarios presentan bucles V3 con una alta carga positiva que contribuye a una fuerte interacción electrostática con los grupos sulfato de estos compuestos aniónicos **(16, 19, 29)**.

El condroitin sulfato de cartílago de tiburón presentó un efecto antiviral sobre los aislados R5 y X4, aunque para inhibir la infección de los aislados R5 se emplearon concentraciones mayores del inhibidor (2 a 33 $\mu\text{g/mL}$) que las que se utilizaron de los GAGs de la leche, e incluso la infección de un aislado R5 no se inhibió significativamente aún empleando la dosis mayor de inhibidor (167 $\mu\text{g/mL}$). Como lo señalan los reportes de dos análisis cuantitativos de los GAGs totales en

muestras de leche de mujeres sanas **(6)**, el condroitin sulfato es uno de los componentes mayoritarios de la mezcla de GAGs presentes en la leche humana, lo que sugiere, como se ha descrito anteriormente, que la especie de condroitin sulfato puede ser la responsable principal del efecto inhibitorio de la fracción de los GAGs **(22)**. Sin embargo, las diferencias en la estructura molecular entre los GAGs de la leche humana y el condroitin sulfato de cartílago de tiburón, además de la presencia de otras especies de GAGs en la leche, pueden explicar la actividad inhibitoria más potente de éstos sobre los aislados primarios del VIH-1, en comparación con el efecto inhibitorio mostrado por el condroitin sulfato.

A pesar de la presencia de los GAGs con actividad anti-VIH en la leche humana, y que se requieren bajas concentraciones de estos compuestos para inhibir al VIH *in vitro* (0.35 al 7% de la concentración fisiológica, de acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo), la exposición diaria a las partículas virales y la presencia de los reservorios celulares del VIH-1 que persisten en la leche materna durante la lactancia, son factores que aumentan el riesgo de transmisión postnatal de una madre VIH positiva a su hijo, aún cuando se administre terapia antirretroviral **(2)**. Paradójicamente la lactancia es considerada la principal fuente de nutrientes y de agentes anti-infecciosos, inmunomoduladores y anti-inflamatorios para los niños durante las etapas tempranas de la vida. Por esta razón, hay opiniones encontradas con respecto a que las madres VIH-positivas no den leche materna a sus hijos específicamente en algunos países en vías de desarrollo, en los que la leche materna es la única fuente de alimento con la que se cuenta, dadas las condiciones precarias de higiene y de pobreza extrema que prevalecen.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que hasta diciembre del 2009, la transmisión vertical del VIH de una madre a su hijo, era del 27%. Aunque hay avances en el tratamiento profiláctico del VIH-1 que han disminuido la transmisión perinatal, se estima que el riesgo de transmisión del VIH-1 por la lactancia, es de 3.2 por cada 100 niños por año. A pesar de lo preocupante que pueden ser estos datos estadísticos, la gran mayoría de los niños expuestos al

VIH, no se infecta. Al parecer esto se debe a la presencia de componentes protectores en la leche, como los glicoconjugados y a factores de susceptibilidad genética del huésped **(2, 31, 32)**.

Por consecuencia, la OMS recomienda la lactancia como única forma de alimento para los recién nacidos en los primeros 6 meses de vida, a pesar del estatus VIH de la madre y hasta los 12 meses cuando a partir del séptimo mes de vida se combine con leche de fórmula y con otros alimentos sólidos. Se ha reportado que los infantes alimentados exclusivamente con leche materna durante los primeros 6 meses, sin ningún otro alimento líquido o sólido, adquieren el VIH-1 en una tasa de infección hasta cuatro veces menor que aquellos infantes alimentados con una dieta mixta. Cuando se compara la tasa de infección del VIH en niños alimentados con una dieta donde predomine la leche materna pero que también incluye la ingesta temprana de leche artificial u otros líquidos o sólidos, con respecto a la lactancia exclusiva, la diferencia entre ambas es de aproximadamente tres veces menor **(33-35)**.

Es la primera vez que se evalúa el efecto anti-VIH de los GAGs de la leche humana con aislados primarios del VIH-1 con tropismo viral genotipificado y con células primarias para el virus. Este modelo de infección *in vitro*, es más parecido al proceso de infección que ocurre *in vivo*, por lo tanto los resultados obtenidos en este trabajo, dan la pauta para identificar moléculas de naturaleza sacárida que participan en el proceso de entrada del virus a su célula blanco y que pueden proponerse como agentes antivirales tanto para el VIH, así como para otros virus envueltos con estructura molecular parecida.

Debido a que todavía no se ha esclarecido en su totalidad el mecanismo de transmisión del VIH-1 por la lactancia, la identificación de estos compuestos presentes en la leche humana que protegen contra la infección del VIH *in vitro*, conlleva a estudiar con mayor profundidad el mecanismo molecular mediante el cual los GAGs de la leche inhiben la infección viral, así como sus posibles implicaciones terapéuticas en la infección por el VIH-1.

CONCLUSIONES

- ❖ Los GAGs de la leche materna son un grupo de compuestos sulfatados inocuos, que no producen citotoxicidad y que en bajas concentraciones fisiológicas (del 0.35 al 7%), inhiben significativamente (>80%) la infección *in vitro* de PBMCs por aislados primarios del VIH-1 de pacientes sin tratamiento antirretroviral.
- ❖ El efecto inhibitorio de los GAGs de la leche humana en la infección de PBMCs por los aislados primarios del VIH-1 es de amplio espectro, ya que se inhibió la replicación de las variantes virales con tropismo R5 y X4.
- ❖ Los GAGs de la leche humana y el condroitin sulfato de cartílago de tiburón, inhiben con la misma potencia las variantes virales del VIH-1 con tropismo X4, sin embargo, los GAGs de la leche humana mostraron mayor potencia para inhibir las variantes virales con tropismo R5 que el condroitin sulfato. Por lo tanto, la especie de condroitin sulfato pudiera ser la responsable principal del efecto inhibitorio de la fracción de los GAGs.
- ❖ Los glicoconjugados de la leche humana, son un grupo de compuestos sulfatados naturales que pueden contribuir a una nueva intervención para bloquear la infección *in vitro* por el VIH-1.

PERSPECTIVAS

La actividad anti-VIH de los GAGs de la leche humana tiene importantes implicaciones terapéuticas, debido a que este tipo de compuestos sulfatados, mostró una potente actividad contra las variantes R5 y X4 del VIH-1, sin causar citotoxicidad, por lo que se sugiere que estos compuestos podrían proponerse también como agentes antimicrobianos potentes, eficaces y seguros.

Debido a que el VIH-1 tiene una estructura similar a la de otros virus envueltos, sería de gran relevancia evaluar la capacidad de los GAGs de la leche humana de inhibir la infección de otros patógenos como son los virus de Hepatitis C, Hepatitis B, virus de la familia *Herpesviridae* (Citomegalovirus, Varicela zoster, Epstein Barr), virus de Influenza y Parainfluenza, etc, para conocer el espectro de actividad antiviral de estos compuestos.

Se ha comenzado a analizar la estructura química de la fracción de los GAGs de la leche humana, para establecer una relación entre la estructura molecular de las especies presentes y la función antiviral de los componentes de la mezcla. Una vez terminado el análisis se espera definir a las especies de GAGs a las que se les atribuya el efecto anti-VIH.

Otro aspecto importante de esta investigación es el identificar el sitio de interacción en la envoltura del VIH-1 de los GAGs de la leche humana, lo que permitiría conocer con mayor profundidad el mecanismo de acción de estos compuestos.

En un futuro, este tipo de glicoconjugados pueden producirse en gran escala mediante síntesis química, con el fin de obtener GAGs con un alto grado de pureza y conservando la potencia de su actividad antiviral, para la creación de un nuevo agente terapéutico anti-VIH.

BIBLIOGRAFÍA

1. Newburg DS and Walker WA. Protection of the neonate by the innate immune system of developing gut and of human milk. *Pediatr Res.* 2007; 61(1): 2-8.
2. Van de Perre P, Rubbo PA, Viljoen J, Nagot N, Tylleskar T, Lepage P. et al. HIV-1 reservoirs in breast milk and challenges to elimination of breast-feeding transmission of HIV-1. *Sci Transl Med.* 2012; 4(143):1-14.
3. Hamosh M. Bioactive factors in human milk. *Pediatr Clin North Am.* 2001; 48(1):69-86.
4. Newburg DS. Neonatal protection by an innate immune system of human milk consisting of oligosaccharides and glycans. *J Anim Sci.* 2009; 87(1):26-34
5. Varki A, Cummings R, Esko J. et al. Proteoglycans and Glycosamioglycans En: Varki A, Cummings R, Esko J, Freeze H, Hart G, Marth J. Editors. *Essentials of Glycobiology.* N. York: Cold Spring Harbor Laboratoy Press; 1999. p. 145- 157.
6. Coppa GV, Gabrielli O, Buzzega D, Zampini L, Galeazzi T, Maccari F, et al. Composition and structure elucidation of human milk glycosaminoglycans. *Glycobiology.* 2011; 21(3): 295-303.
7. Fanales-Belasio E, Raimondo M, Suligoj B, Butto S. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. *Ann Ist Super Sanità.* 2010; 46:5-14.
8. Plantier JC, Leoz M, Dickerson JE, De Oliveira F, Cordonnier F, Lemée V, Damond F, Robertson DL and Simon F. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat. Med.* 2009; 15(8): 871-872.
9. Steckbeck JD, Kuhlmann AS and Montelaro RC. C-terminal tail of human immunodeficiency virus GP41: functionally rich and structurally enigmatic. *J Gen Virol.* 2013; 94,1-19.

10. ONUSIDA, *Informe de ONUSIDA sobre la epidemia mundial de SIDA 2012*; <http://www.unaids.org/es/resources/publications/2012/name,76121,es.asp>
11. CENSIDA, Vigilancia Epidemiológica de casos de VIH/SIDA en México Registro Nacional de Casos de SIDA Actualización al 31 de Marzo de 2013; <http://www.censida.salud.gob.mx/interior/panorama.html>.
12. Wilen CB, Tilton JC, Doms RW. Molecular Mechanisms of HIV Entry. *Adv Exp Med Biol.* 2012; 726:223-242
13. Briz V, Poveda E, Soriano V. HIV entry inhibitors: mechanisms of action and resistance pathways. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 57:619-627
14. Lobritz MA, Ratcliff AN, Arts EJ. HIV-1 Entry, inhibitors, and resistance. *Viruses.* 2010; 2:1069-1105.
15. Gorry PR, Ancuta P. Coreceptors and HIV-1 Pathogenesis. *Curr HIV/AIDS Rep.* 2011; 8:45-53.
16. Saphire AC, Bobardt MD, Zhang Z, David G, Galloway PA. Syndecans serve as attachment receptors for human immunodeficiency virus type 1 on macrophages. *J Virol.* 2001; 75:9187-9200.
17. Vives RR, Imberty A, Sattentau QJ, Lortat-Jacob H. Heparan sulfate targets the HIV-1 envelope glycoprotein GP120 coreceptor binding site. *J Biol Chem.* 2005; 280(22):21353-21357.
18. Harrop HA, Rider CC. Heparin and its derivatives bind to HIV-1 recombinant envelope glycoproteins, rather than to recombinant HIV-1 receptor, CD4. *Glycobiology.* 1998; 8(2):131-137.
19. Zhang Y, Hatzioannou T, Zang T, Braaten D, Luban J, Goff SP, Bieniasz PD. Envelope-dependent, cyclophilin-independent effects of glycosaminoglycans on Human Immunodeficiency Virus Type 1 attachment and infection. *J Virol.* 2002; 76(12):6332-6342.
20. Newburg DS, Viscidi RP, Ruff A, Yolken RH. A human milk factor inhibits binding of human immunodeficiency virus to the CD4 receptor. *Pediatr Res.* 1992; 31(1):22-28.
21. Viveros-Rogel M, Soto-Ramirez L, Chaturvedi P, Newburg DS, Ruiz-Palacios GM. Inhibition of HIV-1 Infection in vitro by human milk sulfated

- glycolipids and glycosaminoglycans. *Adv Exp Med and Biol.* 2004; 554:481-487.
22. Newburg DS, Linhardt R, Ampofo SA, Yolken RH. Human milk glycosaminoglycans inhibit HIV glycoprotein GP120 binding to its host cell CD4 receptor. *J Nutr.* 1995; 125:419-424.
23. McAteer JA, Davis JM. Basic cell culture technique and the maintenance of cell lines. En: Davis JM. *Basic Cell Culture*. 2nd ed. New York: Oxford University Press; 2002:135-189.
24. Jennings CL, Bosch RJ, Dragavon J, Kabat W, Shugarts DL, Boone L. et al. The virology manual for HIV laboratories. National Institute for Allergy and Infectious Disease. 2004; <http://aactg.s-3.com/LabManual.htm>
25. MacDonald C. Primary culture and the establishment of cell lines. En: Davis JM. *Basic Cell Culture*. 2nd ed. New York: Oxford University Press; 2002:191-225.
26. McGovern RA, Harrigan PR, Swenson LC. Genotypic inference of HIV-1 tropism using population-based sequencing of V3. *J Vis Exp.* 2010:1-6
27. De Parseval A, Bobardt MD, Chatterji A, Chaterji U, Elder JH, David G, et al. A highly conserved arginine in GP120 governs HIV-1 binding to both syndecans and CCR5 via sulfated motifs. *J Biol Chem.* 2005; 280(47):39493-39504.
28. Crublet E, Andrieu JP, Vivés RR, Lortat-Jacob H. 2008. The HIV-1 envelope glycoprotein GP120 features four heparin sulfate binding domains, including the co-receptor binding site. *J. Biol Chem.* 2008; 283:15193-15200.
29. Ibrahim J, Griffin P, Coombe DR, Rider CC, James W. Cell-surface heparin sulfate facilitates human immunodeficiency virus type 1 entry into some lines but not primary lymphocytes. *Virus Res.* 1999; 60:159-169.
30. Moulard M, Lortat-Jacob H, Mondor I, Roca G, Wyatt Richard, Sodroski J, et al. Selective interactions of polyanions with basic surfaces on Human Immunodeficiency Virus type 1 GP120. *J Virol.* 2000; 74(4):1948-1960.

31. World Health Organization. *Towards the elimination of Mother-to-Child transmission of HIV. Report of a WHO Technical Consultation*. (World Health Organization, Geneva, 2010); http://whqlibdoc.who.int/publication/2011/9789241501910_eng.pdf.
32. Neveu D, Viljoen J, Bland RM, Nagot N, Van de Perre P, Newell ML. Cumulative exposure to cell-free HIV in breast milk, rather than feeding pattern per se, identifies postnatally infected infants. *Clin. Infect. Dis.* 2011; 52(6):819-825.
33. World Health Organization, *HIV and Infant Feeding. Revised Principles and Recommendations. Rapid Advice*. (World Health Organization, Geneva, 2009); http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241598873_eng.pdf.
34. Coutoudis A, Pillay K, Spooner E, Kuhn L, Coovadia HM. Influence of infant-feeding patterns on early mother-to child transmission of HIV-1 in Durban, South Africa: A prospective cohort study. South African Vitamin A Study group. *Lancet.* 1999; 354:471-476.
35. Liff PJ, Piwoz EF, Tavengwa NV, Humphrey JH. ZVITAMBO study group, early exclusive breastfeeding reduces the risk of postnatal HIV transmission and increases HIV-free survival. *AIDS.* 2005; 19:699-708.

ANEXO

Materiales, reactivos, equipos e instrumentos para laboratorio.

1. MATERIALES

1.1 Material de cultivo

- Pipetas serológicas estériles de 5mL.
- Pipetas serológicas estériles de 10 mL.
- Pipetas serológicas estériles de 25mL.
- Pipetas serológicas estériles de 50 mL.
- Botellas de cultivo celular estériles de 25 cm².
- Botellas de cultivo celular estériles de 75 cm².
- Tubos para microcentrífuga de 0.5 mL.
- Crioviales de polipropileno de 2 mL con base y tapón de rosca interno.
- Tubos para centrífuga de 15 mL.
- Tubos para centrífuga de 50 mL.
- Placas para cultivo estériles de 48 pozos con tapa.
- Puntas para micropipeta estériles con filtro de 0.2-10 µL.
- Puntas para micropipeta estériles con filtro de 1-200 µL.
- Unidades de filtración de 500 mL con membranas de polietersulfona de 0.22 µm.
- 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.

2. Reactivos

2.1 Reactivos para cultivo celular

- Solución separadora de linfocitos, Ficoll- Lymphoprep estéril. Densidad de 1.077 ± 0.001 g/mL, Axis-Shield PoC AS®.
- Suero fetal bovino inactivado a 56 °C durante 30 minutos y esterilizado por filtración.
- Medio RPMI 1640 en polvo.
- Interleucina 2 humana recombinante (IL-2) de *E.coli* 50 000 U (25µg/5mL).
- Fitohemaglutinina-L (PHA-L) (1mg/mL).
- Glutamina-L 200 mM 100 X estéril.
- Penicilina-estreptomicina (10,000U/mL-10mg/mL).
- PBS 1 X Solución amortiguadora de fosfatos estéril Dulbecco´s.
- Solución de teñido azul-tripán (0.4%).
- Dimetilsulfóxido.
- Estándar de Condroitin sulfato de sodio de cartílago de tiburón Sigma®.
- Bicarbonato de sodio.

2.2 Reactivos para el ensayo inmunoenzimático de ELISA de captura del antígeno P24 de la cápside del VIH-1.

- Estuche ELISA P24-VIH PerkinElmer® el cual contiene:
 1. Microplaca conteniendo 12 tiras removibles con 8 pozos cada una, recubiertos con anticuerpo monoclonal de ratón anti-P24 del VIH-1.
 2. Tritón X-100 al 5%.
 3. Anticuerpo detector (Anticuerpo policlonal de conejo anti-P24 biotinilado).
 4. Diluyente de Estreptavidina-HRP.
 5. Estreptavidina-HRP concentrada. (Estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante).
 6. Diluyente de estreptavidina.
 7. Tabletas del substrato orto-fenilendiamina-HC (OPD).

8. Diluyente del sustrato.
9. Solución de lavado 20X.
10. Solución de paro (ácido sulfúrico 4N).

2.3 Reactivos para la determinación del tropismo de los aislados primarios del VIH-1

- Estuche de extracción de ARN Viral Qiagen® el cual contiene:
 1. Solución amortiguadora AVL (contiene isotiocianato de guanidina)
 2. Solución amortiguadora AW1 (cloruro de guanidinio)
 3. Solución amortiguadora AW2
 4. Solución amortiguadora AVE (contiene agua libre de RNAasas con 0.04% de azida de sodio).
- Polímero para electroforesis capilar POP6 3100 Applied Biosystems®
- Isopropanol grado biología molecular.
- Iniciadores para la reacción de secuenciación sintetizados en el Instituto de Biotecnología de la UNAM.
- Acetato de sodio.
- Acido etilendiaminotetraacético.
- Formamida Hi-Di Applied Biosystems®.
- Big Dye Terminator V3.1 Applied Biosystems®.
- Azul de bromofenol de sodio.
- SuperScript™ III RT/Platinum® Taq High Fidelity Invitrogen®.
Mezcla 2X (solución amortiguadora con 0.4 mM de cada dNTP y 2.4 mM MgSO₄)
- dNTP's grado PCR Roche®.
- Estuche de electroforesis de ADN 7500, el cual contiene:
 1. Chip Agilent Technologies DNA 7500®
 2. Marcador de masa molecular de ADN (50 a 10380 pb) Agilent®
 3. Colorante concentrado de ADN Agilent®
 4. Matriz de ADN Agilent®
 5. Marcador de ADN Agilent®

3. Equipo e instrumentos de laboratorio.

- Micropipeta unicanal para volúmenes de 0.5 a 5 μL , de 2 a 20 μL , de 20 a 200 μL , de 100 a 1000 μL .
- Micropipeta multicanal para volúmenes de 5 a 50 μL y de 50 a 300 μL .
- Hemocitómetro Superior Marienfeld® de 0.0025 mm^2 .
- Microscopio óptico Olympus CH-2®.
- Microscopio invertido Swift®.
- Incubador de CO_2 Thermo Scientific Steri-Cult CO_2 incubator®.
- Centrífuga Eppendorf 5810R®.
- Campana de Flujo Laminar de Seguridad Biológica VECO®.
- Ultracongelador Sanyo Scientific MDFU33V®.
- Tanque de nitrógeno Thermo Scientific Modelo 8141®.
- Baño María con temperatura controlada.
- Bomba de vacío.
- Parrilla de agitación magnética Thermolyne Cimarec 2®.
- Espectrofotómetro Microplate BenchmarkPlus Biorad®.
- Balanza analítica AccuLab V-600®.
- Potenciómetro 530 Corning Pinnacle®.
- Agitador vortex-T Genre 2®.
- Secuenciador 3130xl Genetic Analyzer Applied Biosystems Hitachi®.
- Termociclador Gene Amp PCR System 9700 Applied Biosystems®.
- Espectrofotómetro NanoVue™ UV/Visible GE Healthcare®.
- Bioanalizador Agilent 2100®.