

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



**Caracterización de la inhibición de la infección *in vitro* por el VIH-1  
mediada por glicosaminoglicanos de la leche humana**

TESIS

Que para obtener el grado de  
Maestro en Biología Experimental

PRESENTA

**Dante Uriel Ruiz Segura**

Comité Tutorial:

**Dr. José Luis Gómez Olivares**

**Dra. Mónica Viveros Rogel**

**Dr. Santiago Ávila Ríos**

Septiembre 2018

**“El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”.**

**Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: 458454**

## **Miembros del jurado**

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada:

**"Caracterización de la inhibición de la infección *in vitro* por el VIH-1 mediada por glicosaminoglicanos de la leche humana"**, que presentó

**Dante Uriel Ruiz Segura**

El día 4 de septiembre del año 2018

## **Sinodales:**



**Presidente**

Dr. Héctor Fernando Serrano

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

División de Ciencias Biológicas y de la Salud.



**Secretario**

Dr. Santiago Ávila Ríos

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. Centro de Investigación en  
Enfermedades Infecciosas. SSA.



**Vocal 1**

Dra. Roxana Uri Miranda Labra

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

División de Ciencias Biológicas y de la Salud.



**Vocal 2**

Dr. Emilio Domínguez Salazar

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

División de Ciencias Biológicas y de la Salud.



**Vocal 3**

Mtro. Bio. Exp. Moisés Vergara Mendoza

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa/ Instituto Nacional de Ciencias

Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

## **Miembros del comité tutorial**

### **Dr. José Luis Gómez Olivares**

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

División de Ciencias Biológicas y de la Salud.

### **Dra. Mónica Viveros Rogel**

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. SSA.

Departamento de Infectología.

### **Dr. Santiago Ávila Ríos**

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. SSA.

Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas.

## Resumen

**Introducción.** La entrada del Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (VIH-1) a su célula blanco CD4<sup>+</sup> es un proceso que involucra múltiples pasos. La interacción del VIH-1 con la célula ocurre principalmente por uniones no específicas a lectinas, proteoglicanos de heparán sulfato que son glicosaminoglicanos (GAGs) unidos a una cadena proteica, glicolípidos, o por interacciones entre ligando y receptor del virus con proteínas de la superficie celular. Se ha descrito que glicoconjugados sulfatados como glicolípidos y GAGs en la superficie de las células del colon, del epitelio vaginal y de la glándula, se unen a la glicoproteína gp120 de la envoltura del VIH-1, lo que sugiere que estos glicoconjugados pueden tener un papel importante en la entrada del virus a la célula y en la infección. Los GAGs son compuestos polisacáridos polianiónicos que se encuentran en prácticamente todas las membranas celulares y en algunos fluidos, como la leche humana. El condroitín sulfato (CS) y la mezcla de heparán sulfato/heparina son las especies que predominan en la leche humana. En estudios previos *in vitro* se demostró la capacidad que tienen los GAGs de la leche humana para inhibir la unión de gp120 con el receptor celular CD4 y que tienen un efecto inhibitorio potente en la infección de células CD4<sup>+</sup> por cepas de referencia y aislados primarios del VIH-1. Se ha descrito también que la leche humana disminuye la expresión del receptor para quimiocinas y coreceptor para el VIH-1: CCR5 en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs), lo que podría sugerir además, que los GAGs presentes en la leche, podrían tener un efecto sobre las células CD4<sup>+</sup>, que contribuya a la inhibición de la infección del VIH-1, mediante la desregulación de la expresión de CCR5 y de esta forma prevenir la entrada del virus a la célula.

**Objetivo.** Caracterizar el efecto inhibitorio de los GAGs de la leche humana en la infección *in vitro* del VIH-1 y evaluar su posible impacto sobre las células humanas CD4<sup>+</sup>.

**Métodos.** Se utilizaron dos cepas de referencia linfotrópicas del VIH-1 con tropismo X4: VIH-1<sub>IIIB</sub> y VIH-1<sub>MN</sub>, la línea celular de linfocitos humanos MT2 y CS de cartílago de tiburón como control positivo de inhibición de la infección *in vitro* por el VIH-1. Los ensayos de inhibición se realizaron al pre-incubar diluciones seriadas de GAGs y CS (para comparar con GAGs de origen no humano) con los sobrenadantes virales de VIH-1<sub>IIIB</sub> y VIH-1<sub>MN</sub>, antes de infectar a las células MT2. Después de 5 días se cuantificó en el sobrenadante de cultivo por ELISA, la concentración del antígeno P24 de la cápside del VIH-1 y de las quimiocinas SDF-1 y MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  y RANTES. Se consideró una inhibición significativa de la infección viral, cuando la reducción en la concentración de P24 fue  $\geq 80\%$  con respecto al control. En las células MT2 de los ensayos de inhibición, se realizó la medición cuantitativa por citometría de flujo de la expresión de los receptores CD4, CXCR4 y CCR5, así como del marcador de activación inmune CD38 y del flujo de calcio (Ca<sup>2+</sup>) intracelular. En los ensayos de inhibición se probaron 6 grupos de muestras: controles de células MT2, controles de los 2 glicoconjugados (MT2 con CS o GAGs), controles de infección (células MT2 infectadas sin glicoconjugado) y las muestras a evaluar (células MT2 infectadas con glicoconjugado). Los datos se expresaron como el promedio  $\pm$  el error estándar de los triplicados de cada condición por experimento y son representativos de 3 experimentos independientes.

**Resultados.** Los GAGs de la leche humana inhibieron de forma significativa la infección de las células MT2 por las cepas VIH-1<sub>IIIB</sub> (91-100%)  $P < 0.0001$  y VIH-1<sub>MN</sub> (86-98%)  $P < 0.0001$  en comparación al control de CS (41-61% y 58-83%, respectivamente). No se observó una diferencia significativa en el efecto de los GAGs sobre la expresión de los receptores CD4, CXCR4 y CCR5, ni en las concentraciones de sus respectivos ligandos:

SDF-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  y RANTES. Por lo tanto, en estos modelos de infección con cepas X4 del VIH-1, se excluye la posibilidad de que los GAGs de la leche estimulen la producción de SDF-1, que pudiera inhibir la infección por VIH-1 al competir por el correceptor CXCR4 con el virus. No se encontraron diferencias en las determinaciones del flujo de Ca<sup>2+</sup> intracelular ni en la expresión de CD38 en las células MT2. Se observó que la desregulación de la expresión de CD4 ocasionada por el VIH-1 en las células MT2 infectadas, se revirtió con las dosis más altas de los GAGs y CS.

**Conclusiones.** La actividad inhibitoria de los GAGs sobre la infección *in vitro* de células CD4<sup>+</sup> por el VIH-1, se atribuye principalmente a su interacción directa con la glicoproteína gp120 de la envoltura viral, debido a que no se encontró que tuvieran ningún efecto significativo sobre las células CD4<sup>+</sup>, en cuanto a su estado de activación, a la expresión de los receptores para el VIH-1, ni en la producción de quimiocinas. Debido al potente efecto inhibitorio que han mostrado los GAGs de la leche humana en la infección *in vitro* por el VIH-1, podrían proponerse como candidatos a agentes microbicidas para el virus.

## Abstract

**Introduction.** HIV-1 entry into its target CD4<sup>+</sup> cell is a process that involves multiple steps. The initial interaction of HIV-1 with the cell occurs mainly by non-specific binding to lectins, heparan sulfate proteoglycans that are protein chains linked to glycosaminoglycans (GAGs), glycolipids, or by ligand-receptor interactions of the virion with cell surface proteins. Sulfated glycoconjugates such as glycolipids and GAGs present on the surface of colonic, vaginal epithelial and neuroglial cells bind to HIV gp120 envelope glycoprotein, suggesting that these glycoconjugates may have a role in HIV entry and infection. GAGs are polyanionic polysaccharides that are found ubiquitously in cell membranes and some fluids such as human milk. Chondroitin sulfate (CS) and sulfated heparan sulfate/heparin are the main species found in human milk. Previous *in vitro* studies showed that human milk GAGs inhibit HIV gp120 binding to its host cell CD4 receptor and have a potent inhibitory effect on CD4<sup>+</sup> cell infection by HIV-1 laboratory strains and primary isolates. It has also been reported that human milk decreases the expression of chemokine receptor and HIV co-receptor: CCR5 in human PBMCs, suggesting that GAGs could also have an effect on CD4<sup>+</sup> cells that contribute to inhibiting HIV-1 infection by downregulation of CCR5 expression and preventing HIV-1 entry.

**Objective.** To characterize the inhibitory effect of human milk GAGs on HIV-1 infection *in vitro* and evaluate their possible impact on human CD4<sup>+</sup> cells.

**Methods.** Two HIV-1 lymphotropic reference strains with X4 tropism: HIV-1<sub>IIIB</sub> and HIV-1<sub>MN</sub>, MT2 human lymphocyte cell line and CS from shark cartilage as a positive inhibition control of HIV infection *in vitro* were used. Inhibition assays were performed by preincubation of serial dilutions of human milk GAGs and CS (for comparison with non-human GAGs), with

HIV-1<sub>IIIIB</sub> and HIV-1<sub>MN</sub> supernatants before infecting the cells. After 5 days, HIV-1 p24 antigen and chemokines SDF-1 and MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  and RANTES were quantified by ELISA in culture supernatant. Significant inhibition of viral infectivity was defined as  $\geq 80\%$  reduction in p24 concentration with respect to the control. MT2 cells from the inhibition assays were analyzed by FACS for expression of CD4, CXCR4 and CCR5 receptors, as well as the immune activation marker: CD38 and the intracellular calcium (Ca<sup>2+</sup>) flux. Six groups of samples were tested in inhibition assays: MT2 controls, glycoconjugates controls (MT2 plus CS or GAGs), infection controls (infected MT2 with no glycoconjugates) and samples to test (infected MT2 plus CS or GAGs). Data were expressed as the mean  $\pm$  the standard error of triplicate wells for each condition per experiment and are representative of 3 independent experiments.

**Results.** Human milk GAGs significantly inhibited MT2 infection by HIV-1<sub>IIIIB</sub> (91-100%)  $P < 0.0001$  and HIV-1<sub>MN</sub> (86-98%)  $P < 0.0001$  in comparison to CS (41-61% and 58-83% respectively). No significant difference was observed in the effect of GAGs on CD4, CXCR4 and CCR5 expression neither in the concentration of their respective ligands: SDF-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  and RANTES. Hence, these HIV-1 X4 infection models rules out the possibility that human milk GAGs induce SDF-1 production that could inhibit HIV-1 infection by competing for CXCR4 receptor with the virus. There were also no differences in intracellular Ca<sup>2+</sup> flux, nor CD38 expression in MT2 cells. CD4 downregulation due to HIV-1 in infected MT2 cells was reverted at highest human milk GAGs and CS doses.

**Conclusions.** The inhibitory activity of human milk GAGs on HIV-1 infection of human CD4<sup>+</sup> cells *in vitro* is attributed mainly to their direct interaction with gp120 viral envelope glycoprotein, because they did not show a significant effect on CD4<sup>+</sup> cells, in terms of their

immune activation status, the expression of HIV-1 receptors or chemokine production. Due to the potent inhibitory effect of human milk GAGs have shown in HIV-1 infection *in vitro*, they could be proposed as potential HIV-1 entry inhibitors and they may qualify as efficient microbicide agents for the virus.

## Índice

Miembros del jurado .....	¡Error! Marcador no definido.
Miembros del comité tutorial .....	iv
<b>Resumen</b> .....	v
<b>Abstract</b> .....	viii
<b>Introducción</b> .....	1
Epidemiología y clasificación del VIH .....	1
Ciclo de infección del VIH-1 .....	2
Correceptores para el VIH-1: CXCR4 y CCR5 .....	5
Tropismo del VIH-1 .....	5
Vías de transmisión del VIH-1 y agentes microbicidas .....	6
Glicosaminoglicanos de la leche humana .....	7
<b>Antecedentes</b> .....	9
<b>Justificación</b> .....	10
<b>Hipótesis</b> .....	11
<b>Objetivo general</b> .....	11
<b>Objetivos particulares</b> .....	11
<b>Materiales</b> .....	12
1. Material biológico .....	12
Línea celular MT2. ....	12
Cepas de referencia del VIH-1 .....	12
GAGs de leche humana. ....	13
CS de cartílago de tiburón. ....	13
2. Material de cultivo, reactivos, equipos e instrumentos para laboratorio.....	13
<b>Métodos</b> .....	13
Cuantificación de la proteína de la cápside p24 de las cepas VIH-1 <sub>IIIB</sub> y VIH-1 <sub>MN</sub> por un ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA) .....	13
Determinación de la dosis infectiva media de cultivo tisular en los sobrenadantes de cultivo de las cepas de referencia VIH-1 <sub>IIIB</sub> y VIH-1 <sub>MN</sub> del VIH-1 .....	15
Cálculo de la multiplicidad de infección .....	17
Ensayos de infección <i>in vitro</i> de MT2 con las cepas VIH-1 <sub>IIIB</sub> y VIH-1 <sub>MN</sub> .....	17
Ensayo de inhibición de la infección de MT2 por VIH-1 <sub>IIIB</sub> y VIH-1 <sub>MN</sub> con GAGs de la leche humana.....	18

Cuantificación de la expresión de los receptores celulares CD4, CXCR4 y CCR5 por citometría de flujo en las células MT2 .....	21
Cuantificación de las quimiocinas MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES y SDF-1 por ELISA .....	22
Cuantificación temprana de las quimiocinas MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES y SDF-1 de los ensayos de inhibición en el modelo de infección MT2/VIH-1 <sub>III B</sub> .....	26
Determinación de la concentración intracelular de iones calcio Ca <sup>2+</sup> por citometría de flujo en las células MT2 .....	27
Cuantificación de la expresión del marcador de activación CD38 por citometría de flujo en las células MT2.....	28
Análisis estadístico.....	30
<b>Resultados</b> .....	30
1. Determinación de la concentración del antígeno p24 de la cápside, cálculo de TCID <sub>50</sub> y de MOI de las cepas linfotrópicas VIH-1 <sub>III B</sub> y VIH-1 <sub>MN</sub> .....	30
1.1 Concentración del antígeno p24 de la cápside del VIH-1 por ELISA.....	30
1.2 Cálculo de TCID <sub>50</sub> .....	30
1.3 Cálculo de MOI.....	33
2. Ensayos de inhibición de la infección de MT2 por la cepa VIH-1 <sub>III B</sub> con GAGs de la leche humana y CS de cartílago de tiburón .....	34
3. Ensayo de viabilidad de MT2 sin infectar e infectadas con VIH-1 <sub>III B</sub> , en presencia de GAGs de la leche humana y CS.....	36
4. Cuantificación por ELISA de MIP-1 $\alpha$ en los sobrenadantes de cultivo de los ensayos de inhibición de la infección de MT2 por VIH-1 <sub>III B</sub> en presencia de CS y GAGs .....	37
5. Cuantificación por ELISA de MIP-1 $\beta$ en los sobrenadantes de cultivo de los ensayos de inhibición de la infección de MT2 por la cepa VIH-1 <sub>III B</sub> en presencia de CS y GAGs.....	39
6. Cuantificación por ELISA de RANTES en los sobrenadantes de cultivo de los ensayos de inhibición de la infección de MT2 por la cepa VIH-1 <sub>III B</sub> en presencia de CS y GAGs.....	40
7. Cuantificación temprana de MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ y RANTES en los sobrenadantes de cultivo de los ensayos de inhibición de la infección de MT2 por la cepa VIH-1 <sub>III B</sub> en presencia de CS y GAGs .....	41
8. Cuantificación de la expresión de los receptores CD4, CXCR4 y CCR5 por citometría de flujo en células MT2 sin infectar e infectadas con VIH-1 <sub>III B</sub> en presencia de GAGs y CS.	45
9. Cuantificación de la expresión de CD38 por citometría de flujo, en las células MT2 sin infectar e infectadas con VIH-1 <sub>III B</sub> en presencia de CS y GAGs.....	48
10. Cuantificación del Flujo de Ca <sup>2+</sup> por citometría de flujo, en células MT2 tratadas con GAGs de la leche humana y CS de cartílago de tiburón.....	49
11. Ensayos de inhibición de la infección MT2 por la cepa VIH-1 <sub>MN</sub> con GAGs de la leche humana y CS de cartílago de tiburón .....	50

12. Cuantificación por ELISA de MIP-1 $\alpha$ en los sobrenadantes de los ensayos de inhibición de la infección de MT2 por VIH-1 <sub>MN</sub> en presencia de CS y GAGs .....	53
13. Cuantificación por ELISA de MIP-1 $\beta$ en los sobrenadantes de cultivo de los ensayos de inhibición de la infección MT2 por la cepa VIH-1 <sub>MN</sub> en presencia de CS y GAGs .....	55
14. Cuantificación por ELISA de RANTES en los sobrenadantes de cultivo de los ensayos de inhibición de la infección por MT2 por la cepa VIH-1 <sub>MN</sub> en presencia de CS y GAGs .....	57
15. Cuantificación de la expresión de los receptores CD4, CXCR4 y CCR5 por citometría de flujo en células MT2 sin infectar e infectadas con VIH-1 <sub>MN</sub> en presencia de GAGs y CS.....	58
<b>Discusión</b> .....	60
<b>Conclusiones</b> .....	69
<b>ANEXO</b> .....	70
1. Materiales .....	70
1.1 Material de cultivo.....	70
2. Reactivos .....	71
2.1 Reactivos para cultivo celular.....	71
2.2 Reactivos para el ensayo inmunoenzimático de ELISA de captura del antígeno p24 de la cápside del VIH-1.....	71
2.3 Reactivos para la cuantificación de las quimiocinas MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES y SDF-1 .....	72
2.4 Reactivos para la detección de los receptores CD4, CXCR4, CCR5 y CD38 por citometría de flujo.....	72
2.5 Reactivos para la cuantificación del flujo de Ca <sup>2+</sup> intracelular por citometría de flujo .....	73
3. Equipos e instrumentos de laboratorio.....	73
<b>Referencias Bibliográficas</b> .....	75

## **Introducción**

### **Epidemiología y clasificación del VIH**

El programa conjunto de las naciones unidas sobre el VIH/SIDA (ONUSIDA) estimó que a finales del 2017 existían 36.9 millones de personas infectadas con el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) en todo el mundo (ONUSIDA, 2018). En México la Secretaría de Salud a través del Centro Nacional para la Prevención y el Control del VIH y el SIDA (CENSIDA) reportó que desde 1983 hasta el 2018 el número de casos notificados de SIDA era de 196,227, de los cuales el 82.1% corresponde a hombres y el restante 17.9% a mujeres. La principal vía de transmisión del VIH es la sexual con el 94.7% de las infecciones, seguido de la vía sanguínea con 3.4% y la vía perinatal con 1.9%. En el 2017 el número de nuevos casos de VIH fue de 8,213 y de SIDA 5,670. Actualmente 152,787 personas viven con VIH y SIDA, aunque se estima que existe un subregistro importante de la cantidad de personas infectadas con el virus. Los grupos de edad con la mayor prevalencia de SIDA en México son 30-34 años con el 19.2%, 25-29 años con el 18.1% y 35-39 años con 16% (CENSIDA, 2018).

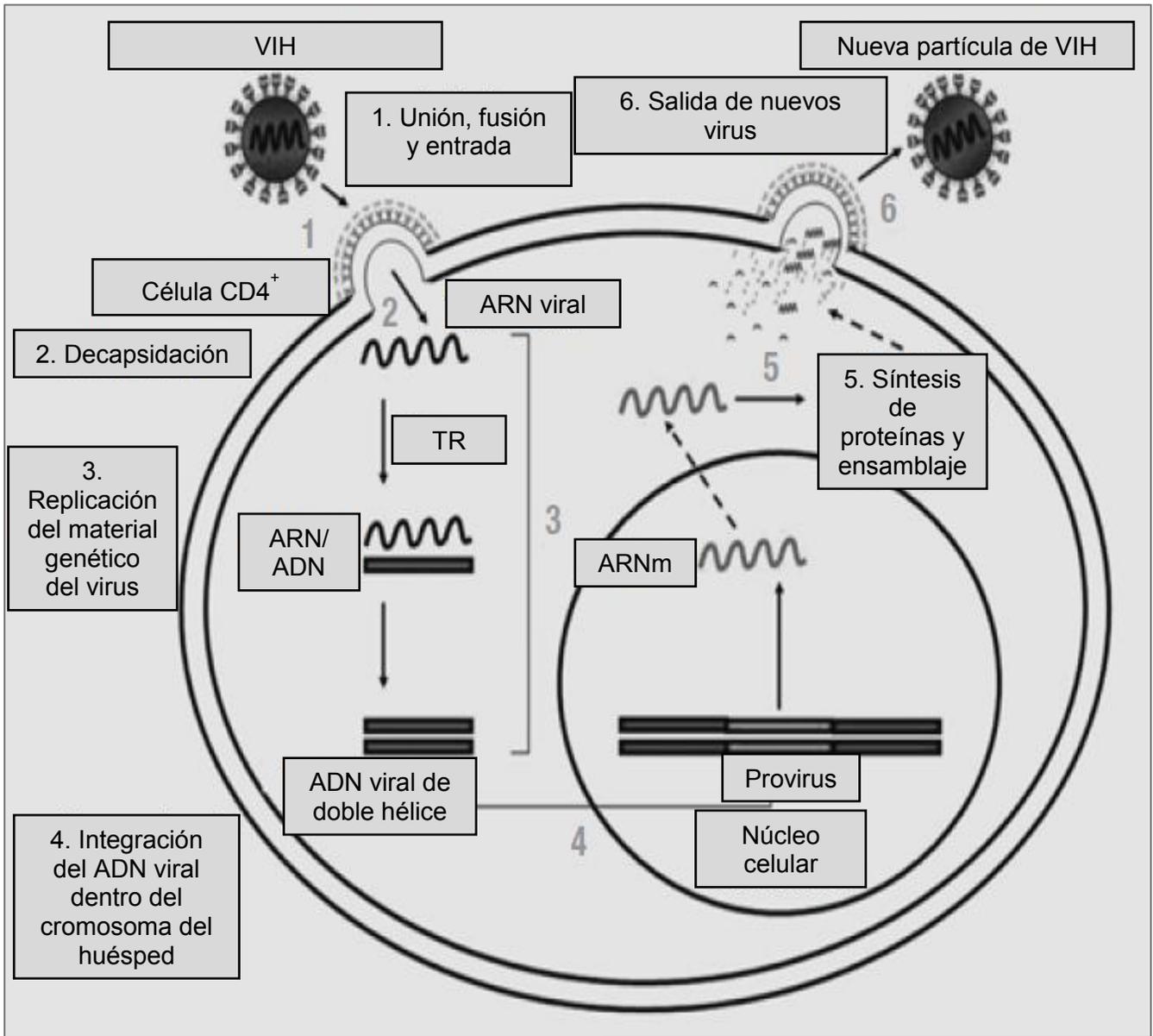
El VIH es clasificado en dos tipos: VIH-tipo 1 (VIH-1) y VIH-tipo 2 (VIH-2), que presentan diferencias en su origen evolutivo, la organización de su genoma y en su infectividad, se sabe que el VIH-1 es más virulento que el VIH-2. Otra diferencia notable entre los 2 tipos de VIH es su distribución geográfica, pues el VIH-2 es endémico de ciertas regiones de África, mientras el VIH-1 se encuentra distribuido en todo el mundo, por lo que existe un mayor número de personas infectadas con el (Fanales-Belasio et al., 2010). Una amplia heterogeneidad genética caracteriza al VIH-1, esta característica le es conferida por diversos factores como son la incapacidad de la transcriptasa reversa para corregir errores

o eventos recombinantes durante la replicación. Esta diversidad genética ha resultado en la generación de diversas variantes del VIH-1 que son clasificados en cuatro grupos filogenéticos principales: M, O, N y P. El grupo M se puede subdividir en subtipos o clados (A-K). A través de estudios epidemiológicos moleculares se ha establecido que el VIH-1 presenta un patrón de distribución geográfica que se traduce en la prevalencia de ciertos subtipos del virus en algunas poblaciones. A nivel mundial los subtipos A, B y C representan cerca del 50% de las infecciones por VIH-1. El subtipo A se encuentra principalmente en áreas de África central y oriental y en países de Europa del Este, el subtipo B predomina en Europa central y occidental, Australia, las Américas, en el sudeste de Asia, el norte de África y Medio Oriente. Los Virus del subtipo C predominan en el sur de África y la India (Buonaguro et al., 2007; Blood, G. A. C, 2016).

### **Ciclo de infección del VIH-1**

El ciclo de infección del VIH-1 comienza con su unión a la membrana de las células que expresan a la glicoproteína CD4 (CD4<sup>+</sup>), que se encuentra en la superficie de las células precursoras de linfocitos T dentro de la médula ósea y el timo, así como en los linfocitos T maduros, eosinófilos, macrófagos, células dendríticas y células de la glía (Fanales-Belasio et al., 2010). La glicoproteína CD4 es el receptor principal para el VIH, aunque existen otros receptores celulares involucrados en el proceso de unión de las partículas vírales con las células CD4<sup>+</sup>, como son los receptores para quimiocinas: CXCR4 y CCR5, que se han descrito como correceptores para el virus. Las quimiocinas son proteínas pequeñas de 70 a 90 residuos de aminoácidos que promueven el reclutamiento de células inmunes (Berger et al., 1999; Fanales-Belasio et al., 2010; Barré-Sinoussi et al., 2013).

El complejo heterodimérico compuesto de las glicoproteínas gp120 y gp41 de la envoltura viral (Env) interacciona con el receptor CD4, provocando un cambio conformacional en gp120 que deja expuestos dominios específicos que se unen a su vez a los correceptores CXCR4 y/o CCR5. Esta doble interacción le permite al virus unirse a su célula blanco de manera más estable. Posteriormente, gp41 penetra a la membrana celular a través de su extremo N-terminal, mientras que las secuencias repetidas denominadas HR1 y HR2 de gp41 y que se localizan en la región extracelular, interactúan entre sí generando un bucle que proporciona la fuerza necesaria para acercar a la membrana celular y a la envoltura viral y favorecer su fusión. Una vez que las membranas se han fusionado, la cápside viral entra a la célula, el ARN viral es liberado al citoplasma y comienza el proceso de transcripción reversa del ARN a ADN mediado por la transcriptasa reversa del virus y se genera una doble hélice híbrida ARN/ADN. Posteriormente, la transcriptasa viral a través de su acción de ribonucleasa procede a fragmentar la hebra del ARN. Una vez eliminada la hebra del ARN, la transcriptasa reversa finaliza su tarea generando una hebra de ADN complementario (ADNc) para formar una doble hebra de ADN vírico. La enzima integrasa es la encargada de insertar el ADN viral en el ADN de la célula hospedera. Cuando el ADN viral es transcrito, el ARNm del virus migra hacia el citoplasma donde se da la síntesis de las proteínas virales para la formación de nuevos viriones que posteriormente serán liberados al medio extracelular para propagar la infección (Figura 1) (Fanales-Belasio et al., 2010; Barré-Sinoussi et al., 2013).



Tomado de (Fanales-Belasio et al., 2010).

**Figura 1.** Ciclo de replicación del VIH resumido en seis pasos: 1) Unión, fusión de membranas y entrada; 2) Decapsidación; 3) Transcripción reversa (TR); 4) Integración del ADN viral (provirus); 5) Síntesis de proteínas virales y ensamblaje; 6) Salida de nuevos virus.

## **Correceptores para el VIH-1: CXCR4 y CCR5**

Los receptores para quimiocinas son una subfamilia de los receptores acoplados a proteínas G y se clasifican en 4 grupos dependiendo de la posición de sus residuos de cisteína con respecto a su amino terminal. Se sabe que al menos 17 de estos receptores participan como correceptores en el proceso infeccioso del VIH-1; sin embargo, se ha descrito que los correceptores con mayor participación en el proceso de entrada del virus a su célula blanco son los receptores CXCR4 y CCR5 cuyos ligandos en condiciones normales son las quimiocinas SDF-1 y RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  respectivamente. Los correceptores promueven la entrada del virus a las células CD4<sup>+</sup> y son un componente crítico para la patogénesis del VIH-1. Cuando existen alteraciones en la preferencia del uso del correceptor y en el mecanismo de interacción con el virus, ocurren consecuentemente, cambios significativos en la susceptibilidad de las células CD4<sup>+</sup> a la infección, que pueden influir a su vez en varias facetas de la patogénesis del VIH-1 como son: el establecimiento de reservorios latentes, la transmisión del virus, el tropismo viral, la progresión de la enfermedad y en la respuesta a los antagonistas del correceptor (Fanales-Belasio et al., 2010).

## **Tropismo del VIH-1**

La definición de tropismo del VIH-1 se refiere a la habilidad del virus para infectar diferentes tipos de células CD4<sup>+</sup> y está influenciada por el uso del correceptor. Los virus M-trópicos pueden infectar a células T CD4<sup>+</sup> primarias, macrófagos y monocitos al utilizar al correceptor CCR5, por eso se les denomina cepas R5; los virus T-trópicos pueden infectar a células T CD4<sup>+</sup> y a líneas de células T al usar al correceptor CXCR4 y se les denomina cepas X4. Los virus con tropismo doble pueden infectar a los tres tipos de células, utilizando CCR5 y/o CXCR4 y son denominados virus X4R5. Existen estudios donde se ha descrito

el efecto inhibitor que tienen las quimiocinas SDF-1, RANTES, MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$  en la infección *in vitro* de las células CD4<sup>+</sup> por el VIH-1, pues compiten con las partículas virales por sus receptores diana impidiendo su unión a las células (Fanales-Belasio et al., 2010). Los aislados virales obtenidos de sangre periférica poco después de la infección por VIH-1 y durante la etapa asintomática de la enfermedad, muestran una predominancia de cepas R5, mientras la infección progresa las cepas X4 aumentan en número, éstas tienen efectos citopáticos mayores que las cepas R5 por lo que tienen un papel importante en la disminución de las células T CD4<sup>+</sup> que es una característica distintiva del SIDA (Berger et al., 1999).

### **Vías de transmisión del VIH-1 y agentes microbicidas**

Las tres vías de transmisión del VIH son: sexual, sanguínea (transfusión de sangre y sus hemoderivados o por uso de jeringas o punzocortantes contaminados con el virus) y vertical (transmisión de madre a hijo). La mayoría de las infecciones por el VIH son causadas por las relaciones sexuales sin protección, y por lo mismo, es la vía de transmisión que representa un gran reto a nivel de salud pública. Actualmente, existe una amplia cantidad de estrategias y fármacos antirretrovirales que ayudan a prevenir y combatir la transmisión sexual por el VIH, desde el uso de los preservativos, hasta la administración de la terapia antirretroviral altamente activa (TARAA) y el uso de microbicidas (Shattock y Moore, 2003; Connell y Lortat-Jacob, 2013).

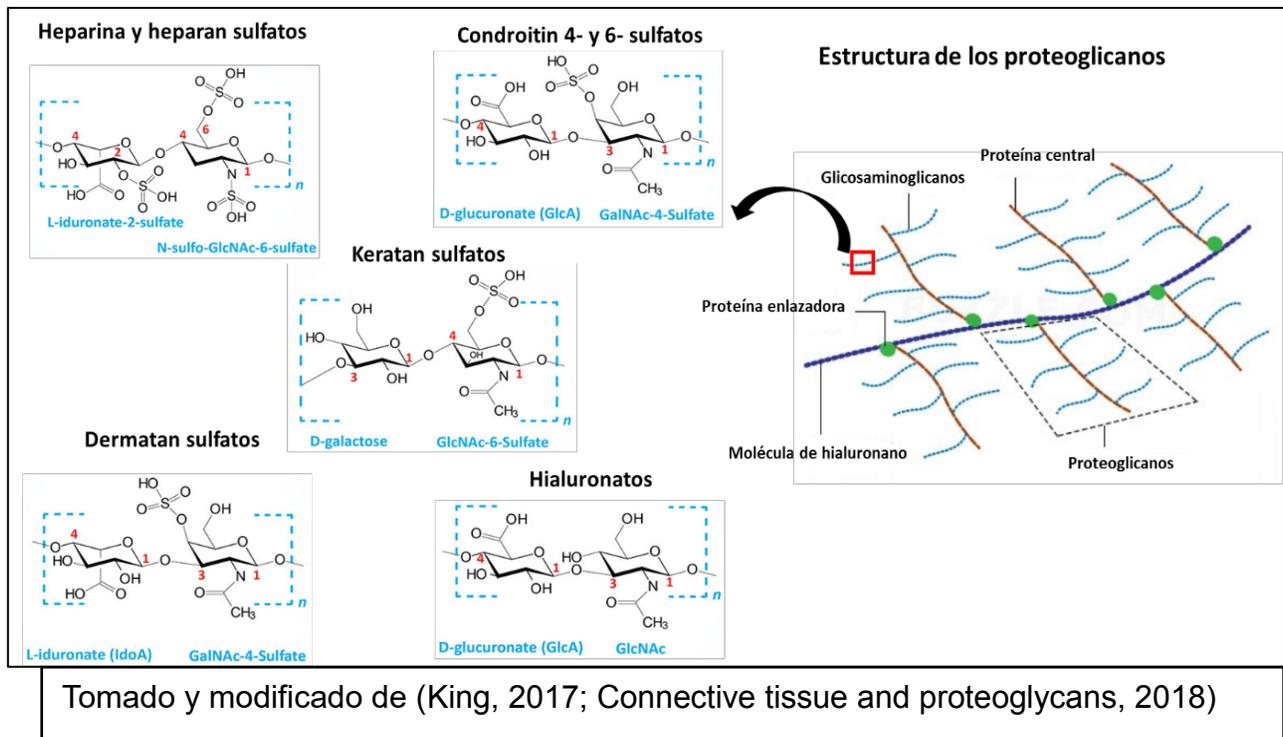
Los microbicidas son compuestos que se aplican de manera tópica, como agentes antibacterianos, antivirales y como desinfectantes, en la vagina o en el recto, como medida de protección para las enfermedades de transmisión sexual, entre ellas la infección por el VIH. El mecanismo de acción de los microbicidas contra el VIH es por inactivación directa

a nivel de los receptores celulares o en la superficie del virus, donde el sitio de acción es sobre gp120 y gp41, o bien a nivel intracelular. Cuando actúan a nivel de mucosa, la inactivación es indirecta. Entre los microbicidas de especificidad moderada a alta, destacan los polímeros aniónicos que impiden los procesos de adsorción y fusión del virus, debido a que se unen a la envoltura viral por medio de cargas iónicas negativas, bloqueando así, la entrada del virus a la célula blanco. Además, estas moléculas aniónicas poseen una baja toxicidad, por lo que sus posibilidades terapéuticas son más amplias que las de otros microbicidas como los detergentes o surfactantes (Pauwels y De Clercq, 1996). La susceptibilidad de los virus al efecto inhibitor de los polianiones depende del tipo de correceptor que utilice el virus, CCR5 o CXCR4 pues la región V3 de la proteína gp120 de los virus X4 presenta más cargas positivas que las de los virus R5 favoreciendo un mayor efecto de los polianiones en los virus con afinidad al correceptor CXCR4 (Scordi-Bello et al., 2005; Connell y Lortat-Jacob 2013).

### **Glicosaminoglicanos de la leche humana**

Debido al papel relevante que juegan los carbohidratos en la interacción de patógenos con su célula hospedera, las investigaciones en el área de la Glicobiología, se enfocaron en extraer de diferentes fuentes biológicas, compuestos sacáridos con potencial microbicida. En esta búsqueda se incluyeron diferentes fluidos biológicos, entre los que destaca la leche humana debido a la enorme cantidad de compuestos de naturaleza sacárida que contiene. La leche humana contiene diversos tipos de oligosacáridos y glicoconjugados como son: glicolípidos, glicoproteínas, mucinas y glicosaminoglicanos (GAGs), que son biológicamente activos y protegen contra la infección de diversos microbios, virus y toxinas (Newburg, 1996; Newburg, 1999). Los GAGs son polisacáridos lineales polianiónicos que se unen de forma covalente a un núcleo proteico para formar los proteoglicanos (PGs),

estos complejos se encuentran de forma ubicua sobre las membranas celulares y en la matriz extracelular y poseen una amplia diversidad estructural que les permite participar en una amplia cantidad de procesos celulares como la adhesión celular, la diferenciación celular, vías de señalización, entre otros (Mikami y Kitagawa, 2017; Wang et al., 2017). La carga negativa de los GAGs se atribuye a los grupos sulfatos presentes en su estructura que se encuentran distribuidos en patrones específicos para cada especie. Los grupos sulfato de los GAGs facilitan la interacción de tipo iónico con factores de crecimiento, moléculas de señalización intracelular y con las partículas virales. Los GAGs son clasificados en 2 categorías con base en su composición química, dichas categorías son: 1) no sulfatados cuyo único miembro es el ácido hialurónico (HA), y 2) sulfatados que son el condroitín sulfato (CS), queratán sulfato (KS), heparina (HP) y heparán sulfato (HS) (Figura 2) (Gandhi y Mancera, 2008).



**Figura 2.** Estructura de las diferentes especies de glicosaminoglicanos.

Se ha descrito que la leche humana contiene una concentración 7 veces mayor de GAGs que la leche bovina y el 55% de los GAGs corresponde al CS, el HS constituye el 40% y el porcentaje restante se distribuye entre el HA y el DS. Por otra parte, se ha reportado que los GAGs como el HS participan en la inhibición de la entrada de patógenos a su célula blanco, interactuando directamente con las proteínas virales o bien, con los receptores de la superficie celular. Estudios previos donde se ha aislado al CS de la leche humana muestran que este compuesto es capaz de inhibir la unión de la glicoproteína gp120 al receptor celular CD4 (Coppa et al., 2013; Maccari et al., 2016; Peila et al., 2016).

### **Antecedentes**

Como antecedentes directos a este proyecto, se describen a continuación los resultados de 3 trabajos publicados. El grupo de Newburg y colaboradores (1995) reportó el efecto inhibitorio de la leche humana sobre la unión de las glicoproteínas recombinantes gp120 del VIH con el receptor CD4. A su vez, este mismo grupo caracterizó a los glicosaminoglicanos de la leche humana y determinó que la acción inhibitoria de los GAGs en la interacción de gp120 con CD4, se debía principalmente a especies de condroitín 4- y 6- sulfato (Newburg et al., 1995).

Posteriormente, Viveros-Rogel y colaboradores (2004) describieron el efecto inhibitorio de los glicoconjugados (glicolípidos y GAGs) de la leche humana sobre cepas del VIH-1 con tropismo para macrófagos (cepa VIH-1<sub>ADA</sub>) y para linfocitos T (cepa VIH-1<sub>SF2</sub>), en un modelo *in vitro* donde se usaron células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) y macrófagos derivados de monocitos. Los resultados obtenidos por este grupo de investigación mostraron una inhibición mayor al 80% de la infección y un efecto dosis-dependiente (Viveros-Rogel et al. 2004).

Lyimo y colaboradores (2009) evaluaron el efecto inhibitorio de la leche humana descremada sobre la infección por el VIH-1 en un modelo *in vitro* exponiendo a la leche, tanto a partículas virales libres como a PBMCs y a células TZM-bl previamente infectadas. Los resultados muestran una mayor inhibición de la infección sobre las partículas virales libres que sobre las células previamente infectadas, en presencia de la leche humana. Este grupo también evaluó la expresión a nivel de membrana del receptor CD4 y de los correceptores para el VIH-1: CXCR4 y CCR5 de las PBMCs incubadas en presencia de la leche durante 30 minutos; se observó una disminución significativa en la expresión fenotípica de CCR5, mientras que CD4 y CXCR4 no presentaron diferencias con respecto a los grupos control (Lyimo et al., 2009).

### **Justificación**

La importancia del VIH-1 como patógeno a nivel mundial lo ha incluido como un blanco importante para el desarrollo de estrategias terapéuticas. Sin una vacuna actualmente disponible, con más del 90% de nuevas infecciones ocasionadas por la vía sexual en países como México (CENSIDA, 2018) y una aún insuficiente cobertura médica que brinde acceso a la terapia antirretroviral (59% a finales de 2017 en el mundo) (ONUSIDA, 2018), la prevención sigue siendo la mejor opción para evitar la propagación de la infección por el VIH-1. Por esta razón, la identificación y la generación de nuevas moléculas que bloqueen la entrada del virus a su célula blanco, se considera una prioridad. Los modelos *in vitro* implementados por los grupos de Newburg, Viveros-Rogel y Lyimo han probado la capacidad de los GAGs para inhibir la infección por el VIH-1. Sin embargo, los resultados donde se obtuvo una baja en la expresión fenotípica del receptor CCR5, sugieren un posible efecto de los glicoconjugados o algún componente de la leche humana sobre las células

CD4<sup>+</sup>. De acuerdo con la información previamente reportada, es importante caracterizar el mecanismo molecular por medio del cual los GAGs de la leche humana inhiben la infección *in vitro* del VIH-1 y conocer en particular, si tienen algún efecto sobre las células CD4<sup>+</sup>, con la finalidad de validar a estos glicoconjugados como potenciales agentes microbicidas y descartar cualquier efecto negativo de su posible uso en modelos *in vivo*. La información generada en esta investigación será de utilidad para proponer a los GAGs como candidatos efectivos e inocuos a inhibidores de la entrada de VIH-1 a las células CD4<sup>+</sup>.

### **Hipótesis**

Los GAGs tendrán un efecto de activación en las células CD4<sup>+</sup>, que se verá reflejado en el mantenimiento de la expresión del receptor principal para VIH-1: CD4 y en la regulación negativa de los correceptores CXCR4 y CCR5, así como en el aumento en la producción de sus ligandos, mediando la inhibición de la infección *in vitro* por el VIH-1.

### **Objetivo general**

Caracterizar el efecto inhibitorio de los GAGs de la leche humana en la infección *in vitro* del VIH-1 y evaluar su posible impacto sobre las células humanas CD4<sup>+</sup>.

### **Objetivos particulares**

- Evaluar el efecto de los GAGs de la leche humana sobre la expresión fenotípica del receptor principal para VIH: CD4 y de los receptores para quimiocinas CXCR4 y CCR5.
- Analizar si los GAGs inducen en las células CD4<sup>+</sup>, un cambio en la producción de las quimiocinas MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES y SDF-1 que son ligandos de CCR5 y CXCR4 respectivamente.

- Analizar las señales de calcio intracelular ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y la expresión fenotípica del receptor  $\text{CD38}^+$  en las células  $\text{CD4}^+$  en presencia de los GAGs de la leche humana, como una medida de activación celular.

## **Materiales**

Para evaluar el efecto inhibitorio de los GAGs de la leche humana en la infección *in vitro* de la línea de linfocitos T humanos MT2 ( $\text{CD4}^+$ ) por el VIH-1, se utilizaron dos modelos de infección con cepas linfotrópicas o con tropismo X4: 1.- Modelo de infección con la cepa VIH-1<sub>III B</sub>. 2.- Modelo de infección con la cepa VIH-1<sub>MN</sub>.

### **1. Material biológico**

**Línea celular MT2.** La línea celular de linfocitos T humanos: MT2 se derivó del co-cultivo de células de leucemia de células T del adulto con leucocitos provenientes del cordón umbilical humano de un donador sano. Las células MT2 expresan principalmente a los receptores celulares  $\text{CD4}$  y  $\text{CXCR4}$  y en menor medida a  $\text{CCR5}$  y son susceptibles a la infección con cepas del VIH-1 con tropismo X4. Se cultivaron en medio RPMI suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB), 1 % de L-glutamina 20mM y 1 % de penicilina/estreptomicina (10,000 U/ml y 10 mg/ml), a 37 °C, 5 % de  $\text{CO}_2$  y 85 % humedad. A este medio lo mencionaremos como medio R-10. Las MT2 se cultivaron a una concentración de  $0.5 \times 10^6$  células/ml. Esta línea fue donada por el fondo de reactivos para la investigación en VIH/SIDA de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos de América (NIH AIDS Research & Reference Reagent Program, por sus siglas en inglés).

**Cepas de referencia del VIH-1.** Se utilizaron las cepas de referencia del VIH-1: VIH-1<sub>III B</sub> y VIH-1<sub>MN</sub> que se obtuvieron por donación del NIH AIDS Research & Reference Reagent Program. La cepa viral VIH-1<sub>III B</sub> se obtuvo a partir del cultivo de células mononucleares de

sangre periférica (PBMCs por sus siglas en inglés) o de médula ósea de pacientes infectados con SIDA o enfermedades relacionadas, mientras que el origen de la cepa VIH-1<sub>MN</sub> es a partir de PBMCs de pacientes con SIDA. Ambas cepas tienen una alta capacidad para replicarse en líneas celulares T humanas y utilizan al correceptor CXCR4 para infectar, por lo que se les denomina cepas X4.

**GAGs de leche humana.** Los GAGs se extrajeron a partir de una mezcla de 2 litros de leches de mujeres norteamericanas, mediante técnicas bioquímicas y de cromatografía de intercambio aniónico. Se evaluó la composición y pureza de los GAGs obtenidos por espectrometría de masas por ionización por electrospray asociado a un analizador de tiempo de vuelo (MS-ESI/TOF) y acoplado a HPLC (cromatografía líquida de alta resolución) (Briones-Peña. Efecto de los Glicosaminoglicanos “GAGs” de la leche humana sobre modelos de infección *in vitro* por el virus de Hepatitis C. Tesis de doctorado actualmente en proceso).

**CS de cartílago de tiburón.** Se utilizó CS de cartílago de tiburón de la marca Sigma-Aldrich® como control positivo de inhibición de la infección por VIH-1.

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

## **Métodos**

### **Cuantificación de la proteína de la cápside p24 de las cepas VIH-1<sub>III B</sub> y VIH-1<sub>MN</sub> por un ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA)**

Para determinar la concentración de VIH-1<sub>III B</sub> y VIH-1<sub>MN</sub> a utilizar en los ensayos de inhibición de la infección por VIH-1 con los GAGs de la leche humana, se realizaron ensayos

de ELISA para la cuantificación de la proteína p24 de los concentrados de cada virus. La proteína p24 forma la cápside del VIH-1, por lo que su cuantificación es una medida directa de la cantidad de virus producido en el sobrenadante de cultivo y por lo tanto de su replicación. Los ensayos de ELISA dirigida a p24 se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante Perkin Elmer®. El estuche de ELISA p24 del VIH-1 contiene una microplaca con 12 tiras removibles con 8 pozos, cada uno recubierto con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-p24 del VIH-1. En las placas de 96 pozos se colocaron 200 µl de muestra y de cada una de las diluciones de la curva estándar del antígeno p24. La curva estándar se preparó haciendo una dilución inicial del control positivo (tubo A) y a partir del cual se hicieron diluciones dobles seriadas en medio de cultivo R10 (tubo B a F), como se muestra en la Tabla 1. Se reservó el primer pozo de las tiras seleccionadas debido a que corresponde al blanco del sustrato.

<b>Estándar (pg/mL)</b>	<b>Tubo</b>	<b>Diluyente (µL)</b>	<b>Adicionar (µL)</b>
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

**Tabla 1.** Curva de calibración del antígeno o proteína p24 de la cápside del VIH-1.

Posteriormente, se inactivó al virus presente en el sobrenadante de cultivo, al adicionar 22 µl de solución de lisis (5% de Triton X-100) a cada pozo, excepto al blanco y se incubó 2 horas a 37 °C. El Triton X-100 es un detergente que rompe la membrana del VIH-1, provocando que se liberen las partículas del antígeno p24 de la cápside viral, las cuales interaccionarán con el anticuerpo monoclonal anti-p24 absorbido en los pozos de la microplaca. Se realizaron 6 lavados con la solución de lavado al 1X (PBS + 1% de Tween 20 + 2% de 2-cloroacetamida), se adicionaron 100 µl/pozo del anticuerpo detector

biotinilado y se incubó durante 1 hora a 37 °C. El anticuerpo detector es un anticuerpo policlonal de conejo anti-p24 biotinilado que se une al antígeno p24 capturado en cada pozo. Se realizó nuevamente un ciclo de 6 lavados con la solución de lavado 1X, se adicionaron 100 µl/pozo de estreptavidina-avidina conjugada con peroxidasa de rábano diluida 1:100 y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Después de realizar un ciclo de 6 lavados, se adicionaron a cada pozo 100 µl/pozo del sustrato de la enzima peroxidasa: o-fenilendiamina (OPD), para producir un complejo de color amarillo y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente, la reacción se detuvo al adicionar 100 µl/pozo, de la solución de paro (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N) y se realizó la lectura de la absorbancia por espectrofotometría a una longitud de onda de 490 nm. La intensidad del color que se desarrolla en la reacción es directamente proporcional a la cantidad de antígeno p24 contenido en los sobrenadantes de cultivo y se determinó al interpolar la absorbancia de cada muestra, en la curva de calibración del antígeno p24.

### **Determinación de la dosis infectiva media de cultivo tisular en los sobrenadantes de cultivo de las cepas de referencia VIH-1<sub>III B</sub> y VIH-1<sub>MN</sub> del VIH-1**

La dosis infectiva media de cultivo tisular o TCID<sub>50</sub> por sus siglas en inglés (50% Tissue Culture Infectious Dose) es la dosis de virus competente que se requiere para infectar al 50 % de las células susceptibles. Se considera una medida directa de la infectividad viral (Jennings et al., 2004).

La determinación de la TCID<sub>50</sub> de las cepas VIH-1<sub>III B</sub> y VIH-1<sub>MN</sub> del VIH-1 se realizó haciendo 14 diluciones cuádruple seriadas ( $4^{-2}$  a  $4^{-15}$ ) de los sobrenadantes virales concentrados y cada título se probó por triplicado en placas de cultivo de 96 pozos con fondo plano (Figura 3).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C			4 <sup>-2</sup>	4 <sup>-3</sup>	4 <sup>-4</sup>	4 <sup>-5</sup>	4 <sup>-6</sup>	4 <sup>-7</sup>	4 <sup>-8</sup>			
D			4 <sup>-2</sup>	4 <sup>-3</sup>	4 <sup>-4</sup>	4 <sup>-5</sup>	4 <sup>-6</sup>	4 <sup>-7</sup>	4 <sup>-8</sup>			
E			4 <sup>-2</sup>	4 <sup>-3</sup>	4 <sup>-4</sup>	4 <sup>-5</sup>	4 <sup>-6</sup>	4 <sup>-7</sup>	4 <sup>-8</sup>			
F												
G												
H												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C			4 <sup>-9</sup>	4 <sup>-10</sup>	4 <sup>-11</sup>	4 <sup>-12</sup>	4 <sup>-13</sup>	4 <sup>-14</sup>	4 <sup>-15</sup>			
D			4 <sup>-9</sup>	4 <sup>-10</sup>	4 <sup>-11</sup>	4 <sup>-12</sup>	4 <sup>-13</sup>	4 <sup>-14</sup>	4 <sup>-15</sup>			
E			4 <sup>-9</sup>	4 <sup>-10</sup>	4 <sup>-11</sup>	4 <sup>-12</sup>	4 <sup>-13</sup>	4 <sup>-14</sup>	4 <sup>-15</sup>			
F												
G												
H												

**Figura 3.** Esquema de la distribución de los pozos empleados en las placas durante la determinación de TCID<sub>50</sub> de las cepas VIH-1<sub>IIIB</sub> y VIH-1<sub>MN</sub> del VIH-1.

En los pozos correspondientes a los títulos 4<sup>-3</sup> a 4<sup>-15</sup> se adicionaron 150 µl del medio R-10 con una micropipeta multicanal, mientras que a los pozos del título 4<sup>-2</sup> se les adicionaron 200 µl del sobrenadante de cultivo de VIH-1<sub>IIIB</sub> o VIH-1<sub>MN</sub> previamente diluidos 1:12 en el medio R-10 (100 µl del concentrado de VIH-1<sub>IIIB</sub> o VIH-1<sub>MN</sub> en 1.1 ml de R-10). Empleando una pipeta multicanal se transfirieron 50 µl de los pozos 4<sup>-2</sup> a los 4<sup>-3</sup>, este proceso se repitió consecutivamente hasta descartar 50 µl de los pozos del título 4<sup>-15</sup>. Posteriormente, se adicionaron 50 µl de una suspensión de 2 x 10<sup>5</sup> de células MT2 a todos los pozos desde 4<sup>-2</sup> a 4<sup>-15</sup>. Las placas se incubaron a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub> y al día 4 con una pipeta multicanal desplazándose de derecha a izquierda se resuspendieron las células de cada columna y se eliminaron 125 µl de la suspensión celular. Desplazándose nuevamente de derecha a izquierda se agregaron 150 µl de R-10 a los pozos y las placas se incubaron en las mismas condiciones durante 3 días más. Al día 7 post-infección se observaron las placas en el microscopio óptico para identificar los títulos de virus donde ya no se observaba la presencia de sincicios (células gigantes multinucleadas) originados por la infección del VIH-

1. Se colectaron los sobrenadantes de cultivo para la determinación de la concentración de p24 por ELISA. Se consideró una muestra positiva cuando el valor del antígeno p24 fue  $\geq 50$  pg/ml.

### **Cálculo de la multiplicidad de infección**

La multiplicidad de infección (MOI) es un término usado frecuentemente en Virología, que se refiere al número de virus infecciosos que se adicionan a una célula durante la infección. Para calcular el MOI de un virus, es necesario conocer el título infeccioso de la cepa (TCID<sub>50</sub>), el volumen del inóculo viral que se utilizó para infectar y el número de células que se infectaron. Se utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{MOI} = \text{Volumen del inóculo viral (ml)} \times \text{TCID}_{50}/\text{ml} / \# \text{ células infectadas}$$

### **Ensayos de infección *in vitro* de MT2 con las cepas VIH-1<sub>III B</sub> y VIH-1<sub>MN</sub>**

Se realizaron ensayos de infección de células MT2 con las cepas de referencia VIH-1<sub>III B</sub> y VIH-1<sub>MN</sub>, para definir las dosis óptimas de virus con las que se obtuviera una infección productiva, que pudiera ser inhibida posteriormente con los GAGs de la leche humana. Los ensayos de infección se realizaron en placas de cultivo de 96 pozos con fondo plano y consistieron en añadir a cada pozo, 40, 000 células MT2 en 100  $\mu$ l de medio R-10 y 50  $\mu$ l de la dosis a probar de la cepa de VIH-1 correspondiente. La mezcla de células y virus se dejó incubar durante 2 hrs a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> y 85% humedad. Posteriormente, se realizaron 2 lavados con solución amortiguadora de fosfatos (PBS 1X), centrifugando a 453 x g durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y se añadieron 200  $\mu$ l de R-10, para mantener a las células en cultivo durante 5 días. Se cosechó el sobrenadante de cultivo para la cuantificación del antígeno p24 del VIH-1 por ensayos de ELISA. Cada concentración de virus se probó por triplicado y se realizaron 3 experimentos

independientes. Se dejaron células sin infectar como controles negativos. En la Tabla 2 se indican las condiciones experimentales que se probaron para cada modelo de infección.

<b>Célula blanco CD4<sup>+</sup></b>	<b>Cepa (Tropismo viral)</b>	<b>Dosis del VIH-1 [Ag P24/ml]</b>	<b>Tiempo post- infección</b>
MT2	VIH-1 <sub>IIIB</sub> (X4)	1, 2 y 3 ng/ml	5 días
MT2	VIH-1 <sub>MN</sub> (X4)	1 y 2 ng/ml	5 días

**Tabla 2.** Ensayos de infección *in vitro* de células CD4<sup>+</sup> con cepas de referencia linfotrópicas (X4) del VIH-1.

### **Ensayo de inhibición de la infección de MT2 por VIH-1<sub>IIIB</sub> y VIH-1<sub>MN</sub> con GAGs de la leche humana**

Los ensayos de inhibición de la infección de MT2 por VIH-1<sub>IIIB</sub> y VIH-1<sub>MN</sub> con GAGs de la leche humana se realizaron por triplicado y duplicado respectivamente y en cada ensayo se probaron controles de células (que no fueron expuestas al VIH ni a los glicoconjugados), controles de GAGs y CS (células sin virus y con GAGs o CS, para valorar un posible efecto citotóxico de los GAGs), controles de infección (células con virus) y las muestras a probar (células infectadas con GAGs y CS). Los controles de infección y de células se probaron por cuadruplicado, mientras que las muestras (con virus y glicoconjugado) y los controles de glicoconjugado se probaron por triplicado en cada ensayo. Con el fin de tener un mayor volumen de sobrenadante de cultivo de los ensayos celulares para cuantificar tanto al antígeno p24 como a las quimiocinas MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES y SDF-1 de manera simultánea, se aumentaron 4 veces las concentraciones de células, virus y glicoconjugados empleadas. En placas de cultivo de 48 pozos con fondo plano, se adicionó el sobrenadante de virus con la dosis de 1 ng p24/ml y  $\text{TCID}_{50}/\text{ml} = 1.65 \times 10^6/\text{ml}$  para VIH-1<sub>IIIB</sub> o bien, con la dosis de 2 ng p24/ml y  $\text{TCID}_{50}/\text{ml} = 6.45 \times 10^3$  para VIH-1<sub>MN</sub>. Las dosis de los sobrenadantes virales se ajustaron a un volumen de 200  $\mu\text{l}$ /pozo de R-10. Se decidió

trabajar con el doble de concentración de p24 de VIH-1<sub>MN</sub> con respecto a la concentración de VIH-1<sub>III B</sub>, debido a que la infectividad de VIH-1<sub>MN</sub> es del orden de 3 logaritmos menor en su valor de TCID<sub>50</sub> que el de VIH-1<sub>III B</sub>. Los sobrenadantes virales se incubaron con diferentes concentraciones de GAGs y CS, que varían desde 1 µg hasta 100 µg/pozo y que habían sido previamente resuspendidos en PBS 1X y dejados en una concentración de 1 mg/ml (Tabla 3). La mezcla de virus y glicoconjugados se incubó durante 2 horas a 37 °C, para posteriormente adicionar 160, 000 células MT2/pozo, resuspendidas en 400 µl de R-10 y se incubó durante 2 horas a 37 °C. Después del período de incubación, se realizaron 2 lavados con PBS1X, centrifugando la placa de cultivo a 453 x g durante 10 minutos, se retiró el sobrenadante de PBS1X y se adicionaron 850 µl de R-10. La placa de cultivo se dejó a 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> y 85 % de humedad durante 5 días y se recolectó el sobrenadante para realizar la cuantificación del antígeno p24 y de las quimiocinas MIP-1α, MIP-1β, RANTES y SDF-1 por ELISA. Los ensayos de ELISA p24 se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante Perkin Elmer® descritas anteriormente. La cantidad de antígeno p24 en la muestra se determinó mediante la comparación de su absorbancia con la del estándar de calibración preparado con el antígeno p24 purificado. Se consideró una inhibición significativa de la infección viral, cuando el porcentaje de inhibición de la muestra en presencia de los glicoconjugados (GAGs o CS), fue mayor o igual al 80% con respecto a los controles de infección sin adición de los glicoconjugados. El porcentaje de inhibición de la infección por el VIH-1 se calculó de la siguiente forma, primero se determinó el valor del porcentaje de infección con respecto a los controles:

$$\% \text{ infección} = (\text{concentración del antígeno p24 en la muestra}) (100) / \text{concentración del antígeno p24 en el control de infección}$$

Donde la concentración del antígeno p24 en la muestra es la que se obtuvo del sobrenadante de cultivo en el que se incubaron el virus, las células y los GAGs de la leche humana o el CS de cartílago de tiburón. La concentración del antígeno p24 en el control de infección, es la que se obtuvo de los sobrenadantes de cultivo donde sólo se incubaron las células con el virus. El porcentaje de inhibición se obtuvo al restar el porcentaje de infección obtenido a 100:

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

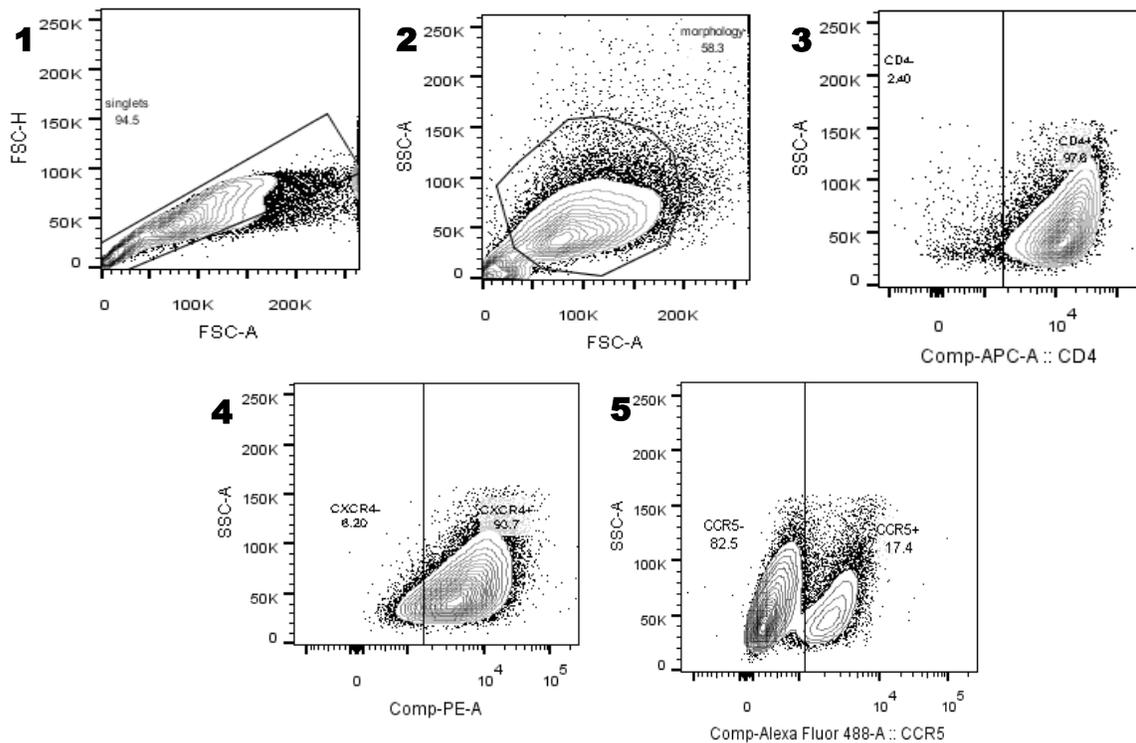
Concentración de GAGs o CS/pozo ( $\mu\text{l}/600\mu\text{l}$ )		Concentración de GAGs o CS/ml ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Proporción entre la concentración fisiológica de GAGs y la concentración experimental empleada
Ensayos 1X	Ensayos 4X		
1	4	6.6	167 X
5	20	32.2	34 X
10	40	62.5	18 X
15	60	90.9	12 X
25	100	142.8	8 X
35	140	189.1	6 X

**Tabla 3.** Concentraciones de GAGs o CS probadas en los ensayos de inhibición de la infección por VIH-1<sub>IIB</sub> y VIH-1<sub>MN</sub> comparadas con la concentración fisiológica de GAGs.

Se probaron muestras adicionales de los controles de GAGs y CS y de las muestras de MT2 infectadas en presencia de los GAGs o CS, para la determinación de la viabilidad celular por el método de exclusión del colorante azul tripán.

## **Cuantificación de la expresión de los receptores celulares CD4, CXCR4 y CCR5 por citometría de flujo en las células MT2**

Las células MT2 de los ensayos de inhibición, se resuspendieron en 2 ml de PBS 1X frío y se transfirieron a tubos de citometría de flujo, para realizar la detección de los receptores CD4, CXCR4 y CCR5 con los siguientes anticuerpos monoclonales humanos: anti-CD4 acoplado a APC, anti-CD195 (CCR5) acoplado a FITC y anti-CD184 (CXCR4) acoplado a PE de la marca Becton Dickinson®. Las MT2 se centrifugaron a 453 x g durante 10 minutos para eliminar al PBS 1X, se resuspendieron en 2 ml de PBA frío (PBS 1X con 1 % de albúmina sérica bovina y 0.1 % de azida de sodio) por tubo y se centrifugaron a 453 x g durante 10 minutos. Después de la centrifugación se decantó cuidadosamente el sobrenadante, se resuspendió el botón celular y se añadieron 15, 15 y 20 µl de los anticuerpos para los receptores CXCR4, CCR5 y CD4 respectivamente. Se incubó en hielo y en oscuridad por 30 minutos. Después de la incubación se realizó un lavado con 2 ml de PBA frío a cada tubo y se centrifugó a 4°C a 453 x g durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el agregado celular al que se le adicionaron 250 µl de formaldehído al 4.2% (Cytifix de Becton Dickinson®) a cada tubo y se incubó durante 30 minutos. Se realizó un lavado con 2 ml de PBS 1X frío y se centrifugó a 453 x g durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y se agregaron 200 µl de PBA a cada tubo y se mantuvieron en hielo hasta ser analizadas en el citómetro de flujo modelo FACS Aria II de la marca Becton Dickinson®. Se adquirieron 50, 000 eventos para todas las muestras. Los datos adquiridos se analizaron con el programa FlowJo versión 10 y se calculó el índice de intensidad media de fluorescencia (IMF) de los anticuerpos unidos a los receptores CD4, CXCR4 y CCR5 y el porcentaje de células positivas para estos receptores (Figura 4).



**Figura 4.** Estrategia de análisis para la cuantificación de la expresión de los receptores CD4, CXCR4 y CCR5 por citometría de flujo en la línea de linfocitos T humanos MT2. 1) Selección de eventos únicos. 2) Selección de la población de linfocitos T con base en su morfología (tamaño y granularidad). 3) Selección de las células CD4<sup>+</sup>. 4) Selección de las células CXCR4<sup>+</sup> dentro del grupo CD4<sup>+</sup>. 5) Selección de las células CCR5<sup>+</sup> dentro del grupo CD4<sup>+</sup>.

#### **Cuantificación de las quimiocinas MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES y SDF-1 por ELISA**

La cuantificación de las quimiocinas MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES y SDF-1 se realizó con los estuches comerciales de la marca R&D Systems® siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para los ensayos de **ELISA de MIP-1 $\alpha$**  se realizó una curva estándar de la quimiocina; para ello se reconstituyó el estándar de MIP-1 $\alpha$  humano con 6 ml del diluyente RD5K, para

obtener una concentración de 1000 pg/ml y a partir de esta concentración, se realizaron diluciones dobles seriadas tomando 500 µl del estándar resuspendido que se mezclaron con 500 µl del diluyente RD5K en el primer tubo. Se tomaron 500 µl del tubo 1 y se transfirieron al tubo 2 que contenía previamente 500 µl del diluyente RD5K, se mezcló por agitación moderada y se realizaron las diluciones seriadas subsecuentes. El proceso de dilución seriada se realizó 5 veces para obtener una curva con las concentraciones de 1000, 500, 250, 125, 62.5 y 31.3 pg/ml. El medio R-10 sirvió como blanco de reacción. Se adicionaron a la placa de ELISA 200 µl de cada dilución de la curva estándar de MIP-1 $\alpha$  y 200 µl de las muestras en cada pozo y se cubrieron con una mica adhesiva para evitar evaporación de las muestras. La placa se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente, se retiró el sobrenadante y se realizaron 3 lavados con 200 µl de la solución de lavado 1X; después del último lavado se desechó el sobrenadante y se adicionaron 200 µl del conjugado anti-MIP-1 $\alpha$  a cada pozo y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados con 200 µl de la solución de lavado 1X y se adicionaron 200 µl de la solución del sustrato a cada pozo; esta solución se preparó 15 minutos antes de utilizarse mezclando los reactivos tetrametilbencidina (cromógeno) y peróxido de hidrógeno, en cantidades iguales. La placa se incubó a temperatura ambiente en oscuridad durante 20 minutos y finalmente se adicionaron 50 µl de la solución de paro: 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para leer en el espectrofotómetro de microplacas Benchmark plus®. Se realizó la lectura de densidad óptica a 450 nm y a 570 nm para la corrección de la longitud de onda correspondiente a las imperfecciones de la placa.

Para los ensayos de **ELISA de MIP-1 $\beta$**  se elaboró la curva estándar de la quimiocina, reconstituyendo el estándar de MIP-1 $\beta$  humano con 5 ml del diluyente RD5K, para obtener una concentración de 2000 pg/ml y a partir de esta concentración, se realizaron diluciones

dobles seriadas tomando 500 µl del estándar resuspendido que se mezclaron con 500 µl del diluyente RD5K en el primer tubo. Se tomaron 500 µl del tubo 1 y se transfirieron al tubo 2 que contenía previamente 500 µl del diluyente RD5K, se mezcló por agitación moderada y se realizaron las diluciones seriadas subsecuentes. Se realizaron 7 diluciones seriadas para producir una curva con las concentraciones de 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.3 y 15.6 pg/ml. El medio R-10 sirvió como el blanco. Se colocaron 200 µl de cada concentración de la curva estándar y de las muestras a cada pozo de la placa de ELISA, a los que se les había adicionado previamente 50 µl del diluyente RD1X. La placa se cubrió con una mica adhesiva para evitar evaporación y se incubó durante 85 minutos a temperatura ambiente, se retiró el sobrenadante y se realizaron 3 lavados con 200 µl de la solución de lavado 1X; después del último lavado se desechó el sobrenadante, se adicionaron 200 µl del conjugado MIP-1β a cada pozo, y se incubó durante 85 minutos a temperatura ambiente. Después de una segunda serie de 3 lavados con 200 µl de la solución de lavado 1X, se adicionaron 200 µl de la solución de sustrato a cada pozo. El sustrato se preparó 15 minutos antes de utilizarse mezclando los reactivos tetrametilbencidina (cromógeno) y peróxido de hidrógeno, en cantidades iguales. La placa se incubó a temperatura ambiente en oscuridad durante 20 minutos y finalmente se adicionaron 50 µl de la solución de paro: 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para leer en el espectrofotómetro de microplacas Benchmark plus®. Se realizó la lectura de densidad óptica a 450 nm y a 570 nm para la corrección de la longitud de onda correspondiente a las imperfecciones de la placa.

Para los ensayos de **ELISA de SDF-1α** se elaboró la curva estándar de la quimiocina; para ello se reconstituyó el estándar de SDF-1α humano con 800 µl de agua desionizada, y obtener una concentración de 100,000 pg/ml a partir de la cual se realizaron 6 diluciones dobles seriadas con 500 µl del diluyente RD6Q en cada tubo, para generar una curva con

las concentraciones de 10,000, 5000, 2500, 1250, 625, 313 y 156 pg/ml. El medio R-10 sirvió como el blanco. Se colocaron 200 µl/pozo de cada concentración de la curva estándar y de las muestras. A cada pozo se le adicionaron previamente 100 µl/pozo del diluyente RD1-55. La placa de ELISA se cubrió con una mica adhesiva para evitar evaporación y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación, en un agitador horizontal de microplacas ajustado entre 50 y 500 rpm con una órbita de 0.12 pulgadas. Se retiró el sobrenadante y se realizaron 4 lavados con 200 µl de la solución de lavado 1X; después del último lavado se desechó el sobrenadante y se adicionaron 200 µl del conjugado SDF-1 $\alpha$  a cada pozo y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación. Se realizó una segunda serie de 4 lavados con 200 µl de solución de lavado 1X y se adicionaron 200 µl de la solución de sustrato a cada pozo; el sustrato se preparó 15 minutos antes de utilizarse mezclando tetrametilbencidina (cromógeno) y peróxido de hidrógeno, en cantidades iguales. La placa se incubó a temperatura ambiente en oscuridad durante 30 minutos y finalmente se adicionaron 50 µl de la solución de paro: 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para leer en el espectrofotómetro de microplacas Benchmark plus®. Se realizó la lectura de densidad óptica a 450 nm y a 570 nm para la corrección de la longitud de onda correspondiente a las imperfecciones de la placa.

Para los ensayos de **ELISA de RANTES** se elaboró la curva estándar de la quimiocina al reconstituir el estándar de RANTES humano con 5 ml del diluyente RD6-11, para obtener una concentración de 2,000 pg/ml, para la obtención de los demás puntos se colocaron 500 µl del diluyente RD6-11 en 6 tubos, en uno de estos tubos se colocaron 500 µl del estándar resuspendido y se mezcló por agitación, se tomaron 500 µl de este tubo y se colocaron en el siguiente tubo con RD6-11, este proceso de dilución seriada se realizó 5 veces para producir una curva con las concentraciones de 1000, 500, 250, 125, 62.5 y 31.3 pg/ml. El

medio R-10 sirvió como el blanco. Se colocaron 100 µl/pozo de cada concentración de la curva estándar y de las muestras, a los que previamente se les adicionaron 100 µl del diluyente RD1W. La placa se cubrió con una mica adhesiva y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente, se retiró el sobrenadante y se realizaron 3 lavados con la solución de lavado 1X. Después del último lavado se desechó el sobrenadante y se adicionaron 200 µl/pozo del conjugado anti-RANTES y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Se realizó una segunda serie de 3 lavados con 200 µl de la solución de lavado 1X y se adicionaron 200 µl de la solución de sustrato a cada pozo. El sustrato se preparó 15 minutos antes de utilizarse mezclando tetrametilbencidina (cromógeno) y peróxido de hidrógeno, en cantidades iguales. La placa se incubó a temperatura ambiente en oscuridad durante 20 minutos y finalmente se adicionaron 50 µl de la solución de paro: 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para leer en el espectrofotómetro de microplacas Benchmark plus®. Se realizó la lectura de densidad óptica a 450 nm y a 570 nm para la corrección de la longitud de onda correspondiente a las imperfecciones de la placa.

### **Cuantificación temprana de las quimiocinas MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES y SDF-1 de los ensayos de inhibición en el modelo de infección MT2/VIH-1<sub>III</sub>B**

Se realizó la cuantificación de las quimiocinas MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES y SDF-1 del sobrenadante de cultivo de las células MT2 de los ensayos de inhibición, a los días 1, 2 y 3 post-infección, para evaluar si había algún cambio en su concentración durante los primeros días de la infección por VIH-1, en presencia de los GAGs. Se realizaron tres ensayos de inhibición de la infección de MT2 por VIH-1<sub>III</sub>B con los GAGs de la leche humana y CS y cada ensayo se realizó en las mismas condiciones como se describió previamente en la metodología de los ensayos de inhibición. Todas las condiciones se probaron por triplicado. Las placas de cultivo se incubaron a 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> y 85 % de humedad durante 1, 2 o 3

días, para posteriormente recolectar el sobrenadante y realizar la cuantificación de las quimiocinas MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES y SDF-1 por ELISA. En estos ensayos se probaron las concentraciones de 15 y 35  $\mu$ g de GAGs y CS, en donde se había observado una inhibición mayor o igual al 80% de la infección por VIH-1<sub>III</sub>B con los GAGs. Se utilizó la dosis de 1 ng p24/ml de VIH-1<sub>III</sub>B para infectar a las MT2.

### **Determinación de la concentración intracelular de iones calcio Ca<sup>2+</sup> por citometría de flujo en las células MT2**

La activación de los linfocitos T es un indicador de la respuesta de estas células a estímulos como citocinas, anticuerpos o antígenos específicos. El proceso de activación de las células T se debe a la acción de segundos mensajeros intracelulares que regulan diversas vías de señalización. Dentro de estos mensajeros que median la activación linfocitaria se encuentra el Ca<sup>2+</sup>, por lo que evaluar el contenido intracelular de los iones Ca<sup>2+</sup>, brinda información sobre la cinética de activación (Maino et al., 1995). Con el fin de evaluar si los GAGs de la leche humana y el CS producían un efecto de activación sobre las células MT2, se llevó a cabo la medición cuantitativa de la concentración intracelular de iones Ca<sup>2+</sup> por citometría de flujo. Para este fin se utilizaron los fluorocromos Fluo-3 y Fura Red de Invitrogen®, que son excitados en el rango del espectro visible a 488 nm. Fluo-3 tras su unión al Ca<sup>2+</sup> aumenta su emisión a 525 nm, mientras que Fura Red disminuye su emisión a 695 nm. La relación entre las intensidades medias de fluorescencia (IMFs) de Fluo-3 y Fura Red brinda información acerca del flujo de Ca<sup>2+</sup> intracelular (Rijkers et al., 1990; Kaposi et al., 2008). Los resultados se analizan como el cociente de la fluorescencia de Fluo-3 sobre la señal del Fura Red en cada tiempo y la respuesta celular al entrecruzamiento de los respectivos receptores se analizó por citometría de flujo con el programa CellQuest. Se usaron 30  $\mu$ l de Fluo 3 y 50  $\mu$ l de Fura Red y se adicionaron a un tubo con 5 ml de RPMI con 2 % de SFB y

24 x 10<sup>6</sup> células MT2 y se incubó a 37 °C durante 45 minutos en oscuridad, agitando suavemente cada 10 minutos. Posteriormente se centrifugó con un pulso en una microcentrífuga y se realizó un primer lavado con RPMI al 2 % de SFB y un segundo lavado con RPMI sin suplementar. Después de los lavados, las células fueron resuspendidas en 1 ml de RPMI y se incubó a temperatura ambiente por 45 minutos en oscuridad agitando cada 10 minutos. Se dio un pulso en la microcentrífuga y se lavó nuevamente en una ocasión con RPMI al 2 % de SFB y una segunda con RPMI, las células fueron resuspendidas dejando una concentración de 3 X 10<sup>6</sup> MT2 en 2 ml de RPMI en cada uno de los tubos para citometría. Se midió la IMF de las muestras en el citómetro de flujo, donde se tomó registro de la fluorescencia basal durante los primeros 10 minutos antes de adicionar a los tubos CS o GAGs. Las concentraciones de los glicoconjugados que se utilizaron en las células MT2 fueron 15, 25 y 35 µg de CS y 15, 25, 35 y 50 µg de GAGs. Una vez adicionado el glicoconjugado a las células, se registró la lectura de fluorescencia en el citómetro FACScalibur de Becton Dickinson® durante 20 minutos. Se adquirieron 1,000,000 eventos y todas las muestras se probaron por duplicado. Se utilizó como control de activación ionomicina de Sigma-Aldrich® y la proteína recombinante humana SDF-1 de abcam® en concentraciones de 10 mg/ml y 80 ng/ml respectivamente.

### **Cuantificación de la expresión del marcador de activación CD38 por citometría de flujo en las células MT2**

CD38 es una proteína transmembranal que se expresa en los linfocitos T una vez que son activados, por lo que la detección en la membrana celular se emplea con frecuencia como un marcador fenotípico de activación. Por otra parte, se conoce que la infección por VIH se caracteriza por una activación crónica del sistema inmunológico, que genera un incremento en la expresión de algunos receptores de membrana como HLA-DR o CD38 (Kestens et

al., 1992; Kestens et al., 1994; Hazenberg et al., 2003). Para evaluar si los GAGs y el CS también podrían activar a las MT2, se llevó a cabo la detección del receptor CD38 por citometría de flujo. Se realizó un ensayo de inhibición de la infección de MT2 por VIH-1<sub>III</sub>B con 15, 25 y 35 µg de GAGs y CS, como se describió previamente en la metodología de los ensayos de inhibición. Después de los 5 días post-infección y de haber cosechado el sobrenadante de cultivo, las células MT2 se resuspendieron en 2 ml de PBS 1X frío y se transfirieron a tubos de citometría para cuantificar la expresión del receptor CD38 por citometría de flujo. Para realizar la tinción del receptor CD38 se empleó el anticuerpo monoclonal humano anti-CD38 acoplado a ficoeritrina (PE). Para garantizar que el marcaje detectado de CD38 solo correspondiera a la población de linfocitos T, se usó un anticuerpo monoclonal humano anti-CD4 acoplado a APC-Cy7, ambos de la marca Becton Dickinson®. Las MT2 se centrifugaron a 453 x g durante 10 minutos para eliminar el PBS 1X, se resuspendieron en 2 ml de PBA frío por tubo y se centrifugaron a 453 x g durante 10 minutos. Después de la centrifugación se decantó cuidadosamente el sobrenadante, se resuspendió el botón celular y se añadieron 2 y 20 µl de los anticuerpos para los receptores CD4 y CD38 respectivamente, se incubó en hielo y en oscuridad por 30 minutos. Posteriormente, se realizó un lavado con 2 ml de PBA frío a cada tubo y se centrifugó a 4°C a 453 x g durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el agregado celular al que se le adicionaron 250 µl de formaldehído al 4.2% (Cytifix de Becton Dickinson®) a cada tubo y se incubó durante 30 minutos. Se realizó un lavado con 2 ml de PBS 1X frío y se centrifugó a 453 x g durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y se agregaron 200 µl de PBA por tubo y se mantuvo a las células en hielo hasta ser analizadas. Las muestras fueron leídas en el citómetro de flujo FACS Aria II de la marca Becton Dickinson®. Se adquirieron 50, 000 eventos para todas las muestras. Los datos adquiridos

se analizaron con el programa FlowJo versión 10 y se calculó la IMF del anticuerpo unido a CD38 así como el porcentaje de células positivas para este receptor.

### **Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico de los datos se utilizaron los softwares NCSS 2004 y Prisma 7.04. Si los datos cumplieron con distribución normal e igualdad de varianzas se aplicó la prueba no paramétrica de Tukey para la comparación entre grupos; si los datos no presentaron una distribución normal y/o igualdad de varianzas se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. Todos los análisis se realizaron con un valor de significancia (*P*) menor a 0.05.

## **Resultados**

### **1. Determinación de la concentración del antígeno p24 de la cápside, cálculo de TCID<sub>50</sub> y de MOI de las cepas linfotrópicas VIH-1<sub>III</sub>B y VIH-1<sub>MN</sub>**

Se realizó la cuantificación de la concentración del antígeno p24 de la cápside viral por ELISA, así como la determinación de la TCID<sub>50</sub> y de MOI de las cepas VIH-1<sub>III</sub>B y VIH-1<sub>MN</sub> con el fin de definir las dosis infecciosas de virus, que se utilizaron en los ensayos celulares.

**1.1 Concentración del antígeno p24 de la cápside del VIH-1 por ELISA.** Los concentrados de los sobrenadantes de cultivo de VIH-1<sub>III</sub>B y VIH-1<sub>MN</sub> tuvieron una concentración de 23.6 ng/ml y 12.02 ng/ml de la proteína p24, respectivamente.

**1.2 Cálculo de TCID<sub>50</sub>.** Las observaciones al microscopio, así como la cuantificación de p24 por ELISA, mostraron que 19 de los 42 pozos totales de la placa de cultivo, resultaron negativos en el ensayo de TCID<sub>50</sub> para VIH-1<sub>III</sub>B, mientras que para VIH-1<sub>MN</sub> fueron 31 pozos negativos. El cálculo de la TCID<sub>50</sub>/mL para cada cepa viral, se realizó por el método estadístico de Spearman-Kärber de acuerdo a la siguiente fórmula (Ramakrishnan, 2016):

Fórmula de Spearman-Kärber:

$$M = x_k + d \left[ 0.5 - \frac{1}{n} (r) \right]$$

Donde:

$x_k$  = dosis de la dilución más alta

$r$  = suma del número de pozos negativos

$d$  = espacio entre diluciones

$n$  = pozos por dilución

Entonces para VIH-1<sub>III B</sub>, tenemos:

$$x_k = 15$$

$$r = 19$$

$$d = 1$$

$$n = 3$$

Sustituyendo en la fórmula de Spearman-Kärber, tenemos:

$$M = 15 + 1 \left[ 0.5 - \frac{1}{3} (19) \right]$$

$$M = 9.17$$

El punto final del 50% es  $4^{-9.17}$

Convirtiendo a  $10^x$ :

$$X = 9.17 * \log 4$$

$$= 5.52 \text{ el título es de } 10^{5.52}$$

Para calcular el TCID50/ml del concentrado de virus, la dilución original debe corregirse multiplicando por 5 (1000  $\mu$ l/ 200  $\mu$ l):

$$\text{TCID50/ml} = 5 * 10^{5.52}$$

$$= 10^{0.7} * 10^{5.52}$$

$$= 10^{6.22}$$

$$\underline{\text{TCID50/ml VIH-1}_{\text{IIB}} = 1.65 \times 10^6}$$

Para VIH-1<sub>MN</sub>, tenemos:

$$x_k = 15$$

$$r = 31$$

$$d = 1$$

$$n = 3$$

Entonces:

$$M = 15 + 1[0.5 - (1/3)(31)]$$

$$M = 5.17$$

El punto final del 50% es  $4^{-5.17}$

Convirtiendo a  $10^x$ :

$$X = 5.17 * \log 4$$

$$= 3.11 \text{ el título es de } 10^{5.52}$$

Multiplicando por 5:

$$\text{TCID50/ml} = 5 * 10^{3.11}$$

$$= 10^{0.7} * 10^{3.11}$$

$$= 10^{3.81}$$

$$\underline{\text{TCID50/ml VIH-1}_{\text{MN}} = 6.45 \times 10^3}$$

Los valores obtenidos de TCID50  $1.65 \times 10^6/\text{ml}$  para VIH-1<sub>IIIB</sub> y  $6.45 \times 10^3/\text{ml}$  para VIH-1<sub>MN</sub>, indican una mayor infectividad de la cepa VIH-1<sub>IIIB</sub> sobre las células MT2 que la cepa VIH-1<sub>MN</sub>.

**1.3 Cálculo de MOI.** Se realizó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{MOI} = \text{Volumen del inóculo viral (ml)} \times \text{TCID50/ml} / \# \text{ células infectadas}$$

Utilizando la fórmula con los datos de las cepas utilizadas en los ensayos de inhibición, el cálculo de MOI para IIIB y MN es el siguiente:

$$\text{MOI VIH-1}_{\text{IIIB}} = 0.2 \text{ ml} \times 1.65 \times 10^6/\text{ml} / 160,000 \text{ MT2} = 2$$

$$\text{MOI VIH-1}_{\text{MN}} = 0.2 \text{ ml} \times 6.45 \times 10^3/\text{ml} / 160,000 \text{ MT2} = 0.8$$

Por lo tanto, se probaron MOI VIH-1<sub>IIIB</sub> = 2 y MOI VIH-1<sub>MN</sub> = 0.8 en los ensayos celulares.

Los resultados muestran que la cepa VIH-1<sub>IIIB</sub> tuvo valores mayores de la concentración de p24, TCID50 y MOI, que la cepa VIH-1<sub>MN</sub>, lo que indica que hay una mayor cantidad de virus en el concentrado VIH-1<sub>IIIB</sub> y que además esta cepa es más infecciosa que VIH-1<sub>MN</sub> (Tabla 4).

	<b>VIH-1<sub>III B</sub></b>	<b>VIH-1<sub>MN</sub></b>
<b>Concentración de antígeno p24 [ng/mL]</b>	23.6	12
<b>TCID50/mL</b>	$1.65 \times 10^6$	$6.45 \times 10^3$
<b>MOI</b>	2	0.8

**Tabla 4.** Determinación de [p24/ml], TCID50/ml y MOI de las cepas VIH-1<sub>III B</sub> y VIH-1<sub>MN</sub>.

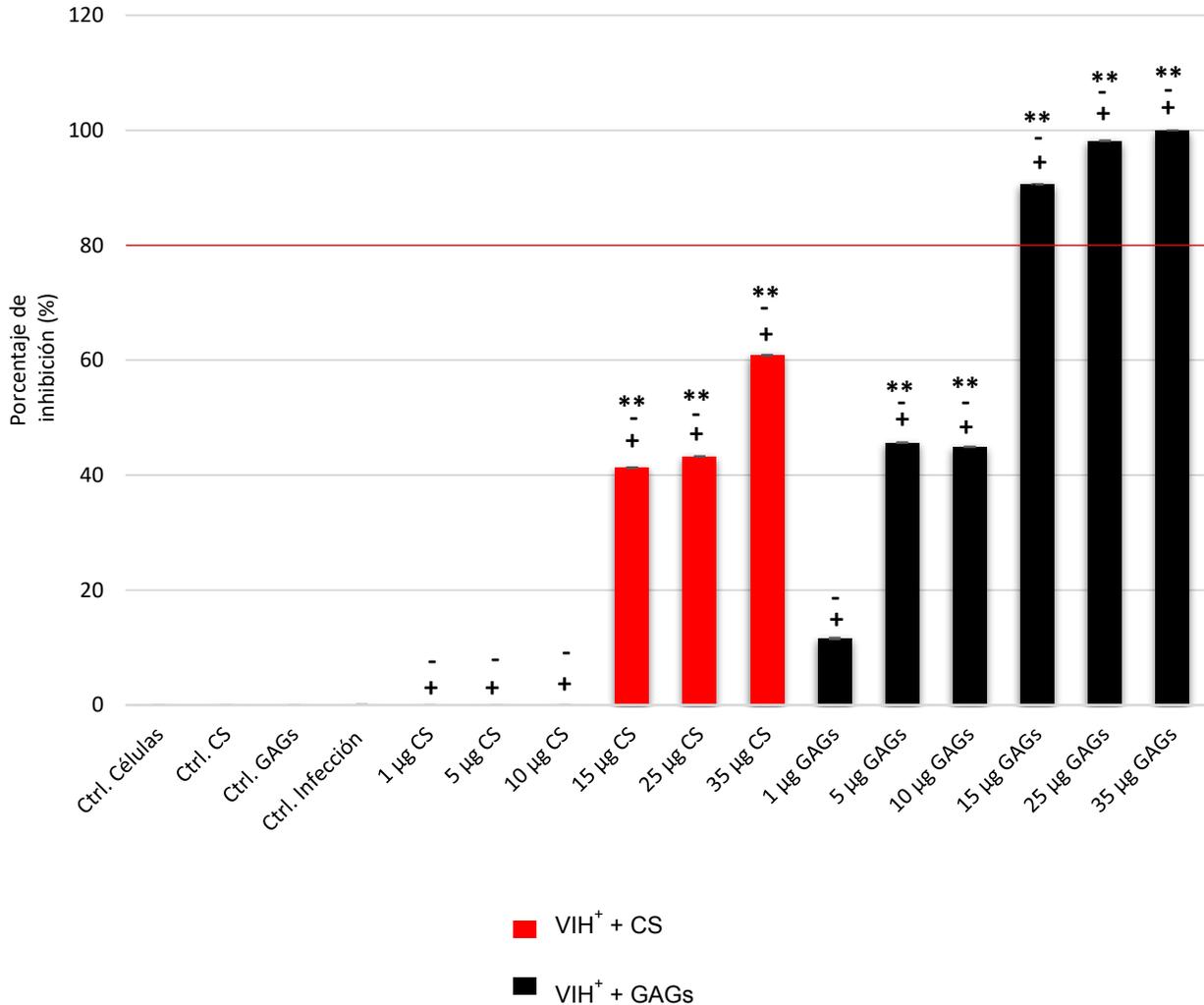
Para cada aislado de virus se seleccionó la dosis con la que se obtuviera una infección eficiente de las células MT2, que se visualizara con la formación de sincicios en el microscopio invertido y que la viabilidad de las células no decayera después de la infección (mayor o igual al 80% al día 5 post-infección).

## **2. Ensayos de inhibición de la infección de MT2 por la cepa VIH-1<sub>III B</sub> con GAGs de la leche humana y CS de cartílago de tiburón**

Los resultados de los ensayos de inhibición con la cepa VIH-1<sub>III B</sub> en presencia de diferentes concentraciones de GAGs de la leche humana y CS de cartílago de tiburón, mostraron que los datos no presentaron una distribución normal ni varianzas iguales, por lo que se aplicó la prueba no paramétrica Kruskal Wallis con un valor de *P* menor a 0.05 para la comparación entre los grupos.

Se observó que los GAGs de la leche humana tuvieron un mayor efecto inhibitorio de la infección de las MT2 por la cepa VIH-1<sub>III B</sub>, que el control comercial de CS, debido a que los GAGs inhibieron significativamente a partir de la dosis de 5 µg/pozo (*P*=0.0001) y el CS con la dosis de 15 µg/pozo (*P*=0.0009). Sin embargo, para este tipo de ensayos se considera que la inhibición de la infección por VIH-1 debe ser mayor o igual al 80% para que los inhibidores pudieran tener relevancia en modelos de infección *ex-vivo* o en modelos animales. Considerando lo anterior, sólo los GAGs de la leche tuvieron un efecto inhibitorio significativo del 91 al 100% a partir de la dosis de 15 µg/pozo, a diferencia de las muestras

tratadas con CS, donde la inhibición significativa máxima que se obtuvo fue del 61% ( $P < 0.0001$ ) (Gráfica 1).



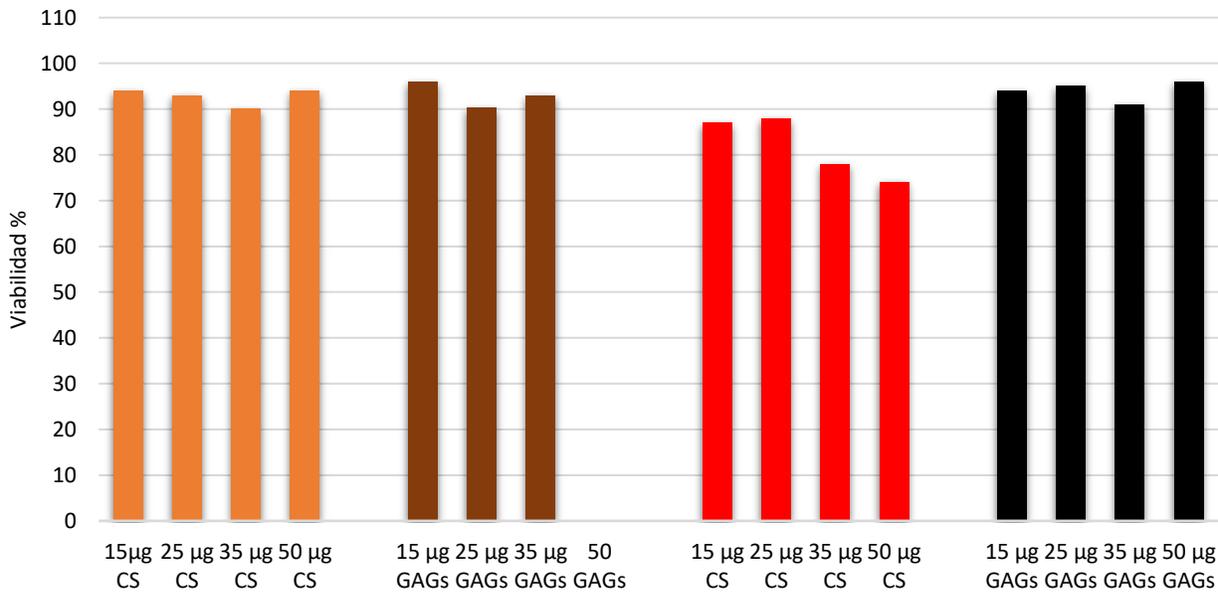
**Gráfica 1. Porcentaje de inhibición de la infección de MT2 con la cepa VIH-1<sub>III</sub>B en presencia de diferentes concentraciones de CS y GAGs de la leche humana.** Las barras representan al promedio de los 3 experimentos y cada muestra se probó por triplicado. Las diferencias significativas se indican por \*\* (diferencias con el control de infección), - (diferencias entre grupos tratados con CS), + (diferencias entre grupos tratados con GAGs).

Antes de realizar la cosecha del sobrenadante de cultivo del ensayo de inhibición para cuantificar el antígeno p24, se realizó la observación de la placa de cultivo en el microscopio invertido y se evidenció la presencia de sincicios en los controles de infección, así como la disminución del número de sincicios en las muestras tratadas con GAGs de la leche humana, y en menor medida, en las muestras tratadas con el CS de cartílago de tiburón.

### **3. Ensayo de viabilidad de MT2 sin infectar e infectadas con VIH-1<sub>III</sub>B, en presencia de GAGs de la leche humana y CS**

En los ensayos de inhibición, se probaron muestras adicionales de los controles de GAGs y CS y de las muestras de MT2 infectadas en presencia de los dos glicoconjugados, para determinar la viabilidad celular, por el método de exclusión del colorante azul tripán. Este ensayo se realizó para descartar que la inhibición de la infección por VIH-1 observada, se debiera a la muerte celular causada por un efecto citotóxico de los glicoconjugados sobre las células MT2. Se observó 100% de muerte celular en los grupos tratados con 50 y 100 µg de GAGs por lo que los datos obtenidos bajo estas condiciones, no se tomaron en cuenta para el análisis de los resultados. Sin embargo, en las concentraciones de 15, 25 y 35 µg de GAGs en las MT2 sin infectar, la viabilidad fue del 96, 90.2 y 93% respectivamente, mientras que en las MT2 infectadas en presencia de 15, 25 y 35 µg de GAGs las viabilidades fueron del 94, 95 y 91%. En las células MT2 infectadas con VIH-1<sub>III</sub>B en presencia de 50 µg de GAGs la disminución en la viabilidad se vio contrarrestada con respecto al grupo solo tratado con 50 µg de GAGs ya que obtuvieron un 96%. Las células tratadas con las concentraciones de 15, 25 y 35 µg de CS obtuvieron una viabilidad de 94, 93 y 90% y en las MT2 infectadas en presencia del CS las viabilidades de las concentraciones de 15, 25 y 35 µg fueron de 87, 88 y 78 respectivamente (Gráfica 2). Los

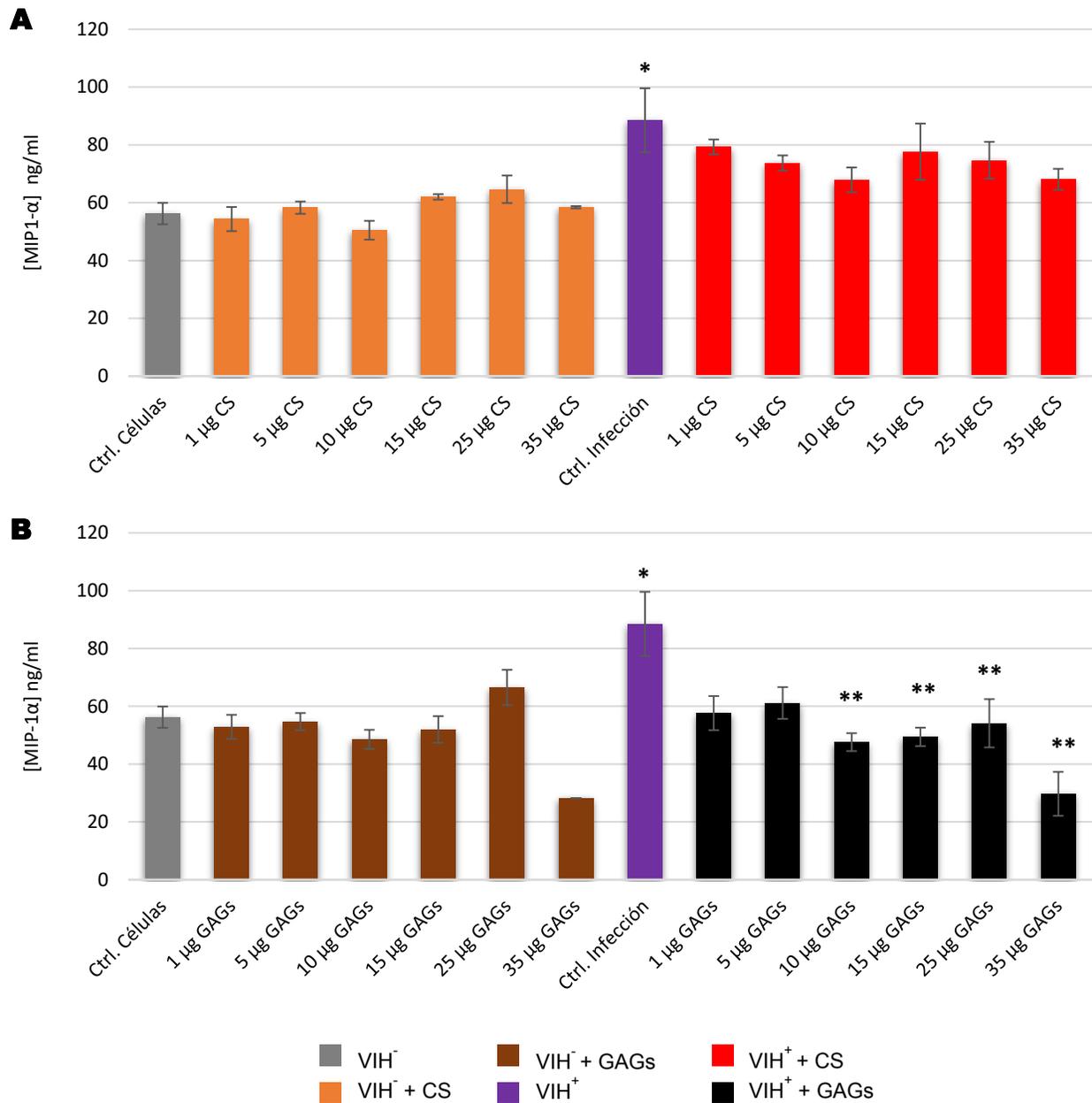
resultados mencionados corresponden a un duplicado por lo que son necesarias más repeticiones para determinar si hay diferencias significativas.



**Gráfica 2. Porcentaje de viabilidad de MT2 sin infectar e infectadas con VIH-1<sub>III</sub>B en presencia de diferentes concentraciones de CS y GAGs de la leche humana.** Las barras representan el promedio de 1 experimento donde cada muestra se evaluó por duplicado.

#### 4. Cuantificación por ELISA de MIP-1 $\alpha$ en los sobrenadantes de cultivo de los ensayos de inhibición de la infección de MT2 por VIH-1<sub>III</sub>B en presencia de CS y GAGs

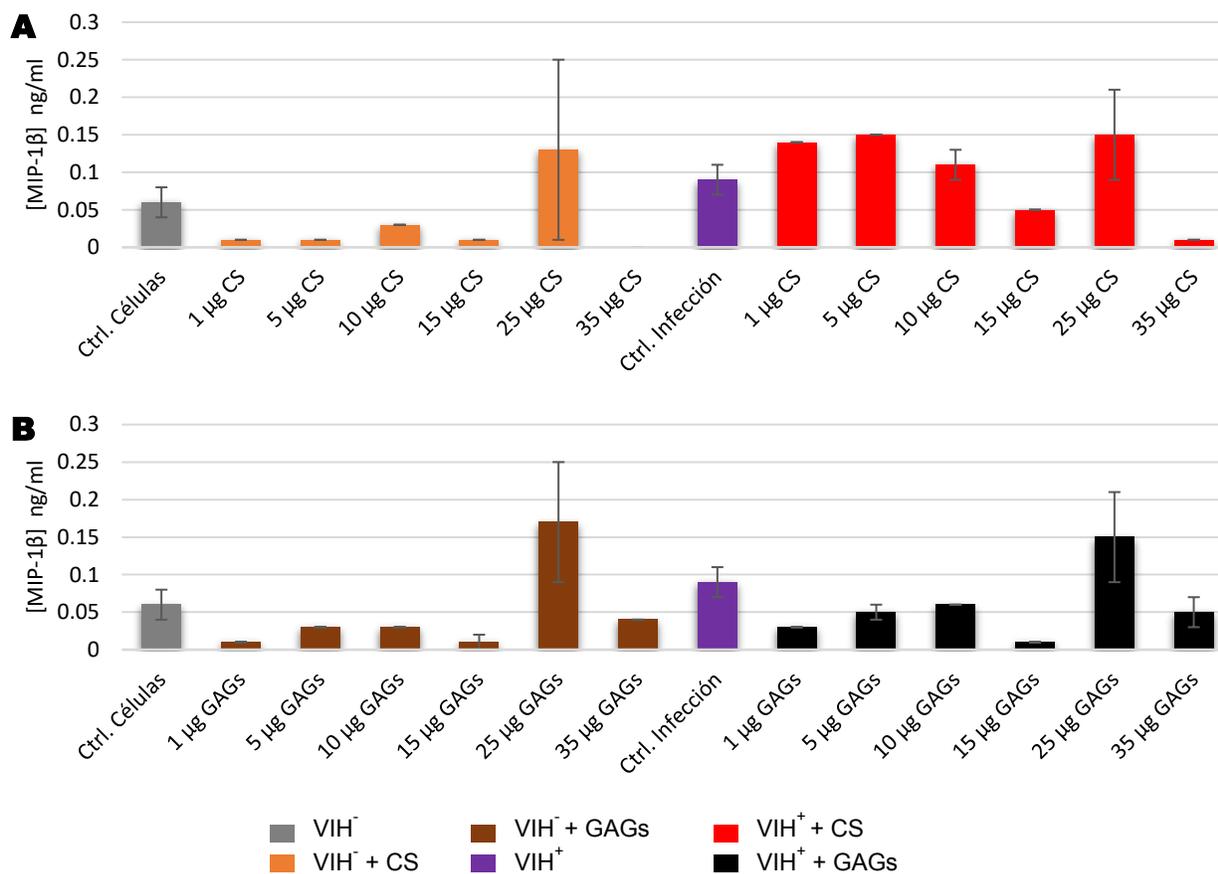
Los datos no presentaron una distribución normal ni varianzas iguales. Se aplicó la prueba no paramétrica Kruskal Wallis con una  $P$  menor a 0.05 para la comparación entre grupos. El análisis comparativo entre los grupos mostró cambios significativos en la concentración de MIP-1 $\alpha$  entre el control de infección y el control de células ( $P=0.0004$ ) y los grupos de MT2 infectadas con VIH-1<sub>III</sub>B y tratadas con 10, 15, 25 y 35  $\mu$ g de GAGs ( $P=0.0052$ ,  $P=0.0106$ ,  $P=0.0104$ ,  $P<0.0001$ ) (Figura 5).



**Figura 5. Cuantificación por ELISA de MIP-1α en los sobrenadantes de cultivo de los ensayos de inhibición de la infección de MT2 por la cepa VIH-1<sub>III</sub>B en presencia de diferentes concentraciones de CS y GAGs de la leche humana. A) MT2 sin infectar e infectadas con VIH-1<sub>III</sub>B tratadas con diferentes concentraciones de CS, B) MT2 sin infectar e infectadas con VIH-1<sub>III</sub>B tratadas con diferentes concentraciones de GAGs. Las barras corresponden al promedio de los 3 experimentos realizados. Las diferencias significativas se indican por \* (diferencias con el control de células), \*\* (diferencias con el control de infección).**

## 5. Cuantificación por ELISA de MIP-1 $\beta$ en los sobrenadantes de cultivo de los ensayos de inhibición de la infección de MT2 por la cepa VIH-1<sub>III B</sub> en presencia de CS y GAGs

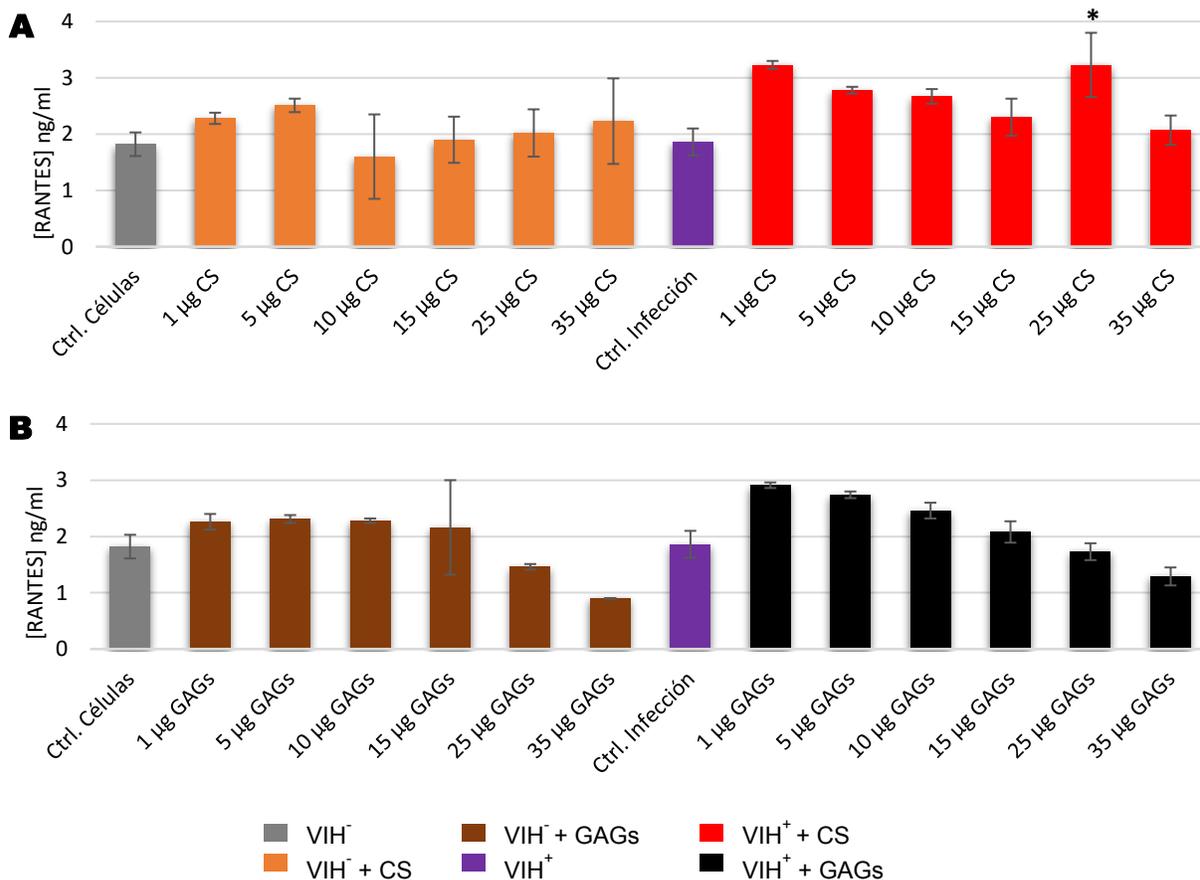
Los datos no presentaron una distribución normal pero sí varianzas iguales. Se aplicó la prueba no paramétrica Kruskal Wallis con un valor de *P* menor a 0.05 para la comparación entre grupos. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos (Figura 6).



**Figura 6. Cuantificación por ELISA de MIP-1 $\beta$  en los sobrenadantes de cultivo de los ensayos de inhibición de la infección de MT2 por la cepa VIH-1<sub>III B</sub> en presencia de diferentes concentraciones de CS y GAGs de la leche humana. A) MT2 sin infectar e infectadas con VIH-1<sub>III B</sub> tratadas con diferentes concentraciones de CS, B) MT2 sin infectar e infectadas con VIH-1<sub>III B</sub> tratadas con diferentes concentraciones de GAGs. Las barras corresponden al promedio de los 3 experimentos realizados.**

## 6. Cuantificación por ELISA de RANTES en los sobrenadantes de cultivo de los ensayos de inhibición de la infección de MT2 por la cepa VIH-1<sub>III</sub>B en presencia de CS y GAGs

Los datos no presentaron una distribución normal ni varianzas iguales por lo que se aplicó la prueba no paramétrica Kruskal Wallis con un valor de  $P$  menor a 0.05 para la comparación entre grupos. La única diferencia significativa encontrada en el análisis entre grupos se observó al comparar el control de células con el grupo de MT2 infectadas con VIH-1<sub>III</sub>B y tratadas con 25  $\mu\text{g}$  de CS ( $P=0.0215$ ) (Figura 7).



**Figura 7. Cuantificación por ELISA de RANTES en los sobrenadantes de cultivo de los ensayos de inhibición de la infección de MT2 por la cepa VIH-1<sub>III</sub>B en presencia de diferentes concentraciones de CS y GAGs de la leche humana. A) MT2 sin infectar e infectadas con VIH-1<sub>III</sub>B tratadas con diferentes concentraciones de CS, B) MT2 sin infectar e infectadas con VIH-1<sub>III</sub>B tratadas con diferentes concentraciones de GAGs. Las barras**

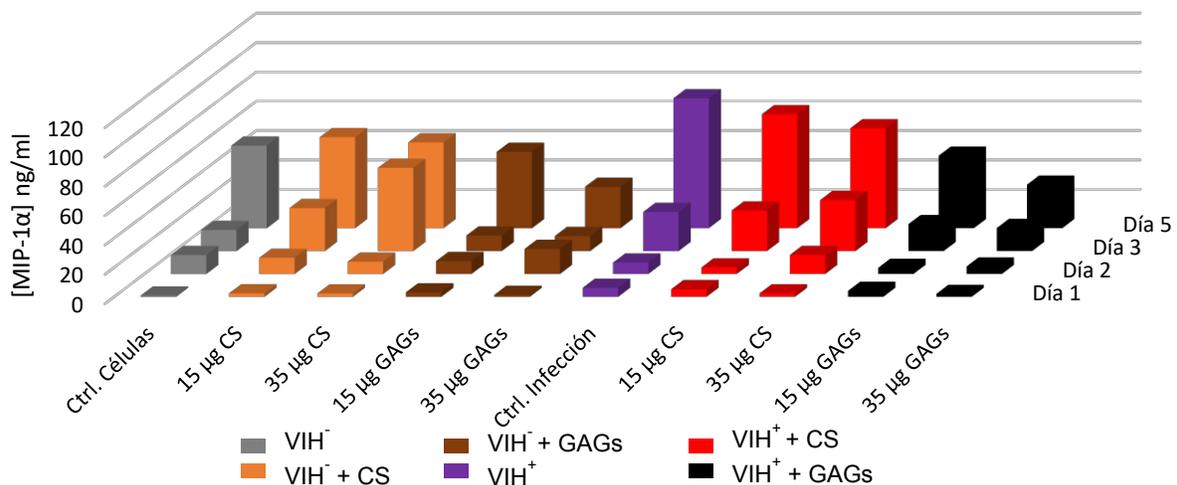
corresponden al promedio de los 3 experimentos realizados. Las diferencias significativas se indican por \* (diferencias con el control de células).

### **7. Cuantificación temprana de MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ y RANTES en los sobrenadantes de cultivo de los ensayos de inhibición de la infección de MT2 por la cepa VIH-1<sub>III B</sub> en presencia de CS y GAGs**

Se realizó la cuantificación temprana de las quimiocinas MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES y SDF-1 del sobrenadante de cultivo de las células MT2 de los ensayos de inhibición, a los días 1, 2 y 3 post-infección, para evaluar si había algún cambio en su concentración durante los primeros días de la infección por VIH-1, en presencia de los GAGs y de CS y compararla con las concentraciones de quimiocinas que se cuantificaron al final del ensayo (día 5 post-infección). Como se observa en las gráficas 3-5:

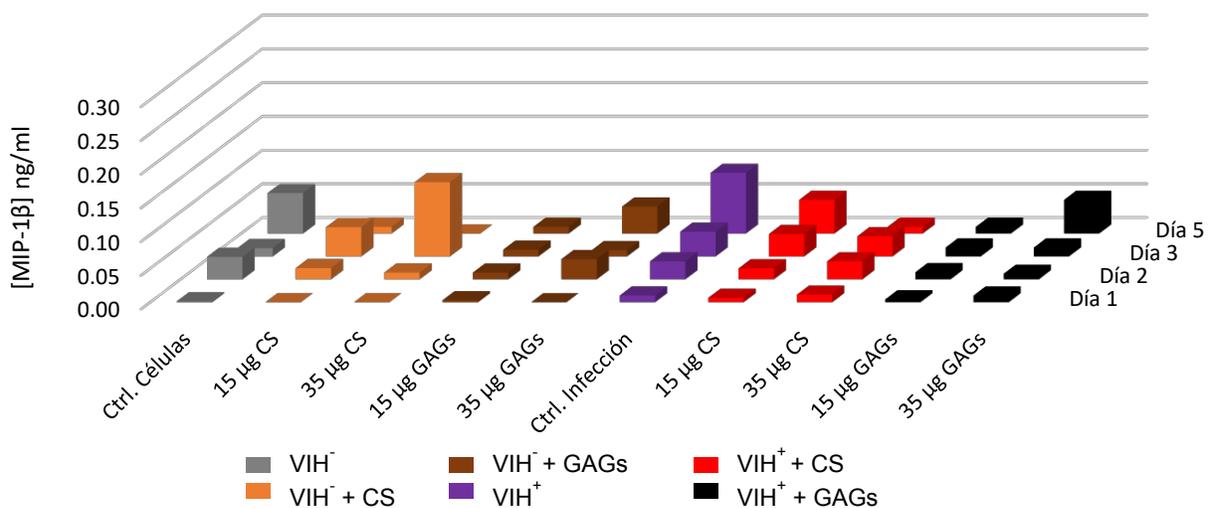
**MIP-1 $\alpha$ .** Los datos no presentaron una distribución normal pero si varianzas iguales por lo que se aplicó la prueba no paramétrica Kruskal Wallis con un valor de  $P$  menor a 0.05 para la comparación entre grupos. Se realizó primero el análisis comparativo entre los grupos por día de infección y los resultados fueron los siguientes: En el día 1 el control de células presentó diferencias con el grupo VIH<sup>+</sup> y tratados con 15  $\mu$ g de CS ( $P=0.0207$ ) y con el control de infección ( $P=0.0004$ ). El control de infección a su vez, presentó diferencias con los grupos VIH<sup>-</sup> y tratados con 15 ( $P=0.0166$ ) y 35  $\mu$ g de CS ( $P=0.0153$ ) y 35  $\mu$ g de GAGs ( $P=0.0013$ ), con el grupo VIH<sup>+</sup> y tratado con 35  $\mu$ g de CS ( $P=0.0170$ ). En el día 2 post-infección en el control de células se observaron diferencias con respecto al control de infección ( $P=0.0103$ ) y a los grupos de VIH<sup>+</sup> y tratados con 15 y 35  $\mu$ g de GAGs ( $P<0.0001$ ,  $P<0.0001$ ) y 15  $\mu$ g de CS ( $P<0.0001$ ); el control de células también presentó diferencias con el grupo VIH<sup>-</sup> tratado con 35  $\mu$ g de CS ( $P=0.0286$ ). El control de infección presentó diferencias con el grupo VIH<sup>+</sup> y tratado con 35  $\mu$ g de CS ( $P=0.0095$ ) y el grupo

VIH<sup>-</sup> y tratado con 35 µg de GAGs ( $P<0.0001$ ). En el día 3 post-infección se observaron diferencias significativas en la concentración de MIP-1α entre el control de células y el control de infección ( $P=0.0319$ ) y los grupos VIH<sup>+</sup> de 15 y 35 µg de CS ( $P=0.0164$ ,  $P=0.0001$ ); también se obtuvieron diferencias significativas con los grupos VIH<sup>-</sup> de 15 y 35 µg de CS ( $P=0.0057$ ,  $P<0.0001$ ). En el control de infección se observaron diferencias entre los grupos VIH<sup>-</sup> de 15 y 35 µg de GAGs ( $P=0.0025$ ,  $P=0.0020$ ) y el grupo VIH<sup>-</sup> de 35 µg de CS ( $P<0.0001$ ). En el día 5 post-infección en el control de células se observaron diferencias con respecto al control de infección ( $P<0.0001$ ) y a los grupos VIH<sup>-</sup> de 15 y 35 µg de GAGs ( $P=0.0422$ ,  $P=0.0014$ ) y los grupos VIH<sup>+</sup> de 15 µg de CS ( $P=0.0215$ ) y 35 µg de GAGs (0.0141). Al realizar el análisis comparativo entre los días 1, 2, 3 y 5 post-infección los resultados obtenidos en el análisis comparativo entre los grupos de muestras en cada tiempo de infección, mostraron que a excepción del grupo VIH<sup>+</sup> y tratado con 35 µg de GAGs, solo los valores obtenidos al día 5 presentaron diferencia significativa entre los grupos tratados con CS y GAGs (Gráfica 3).



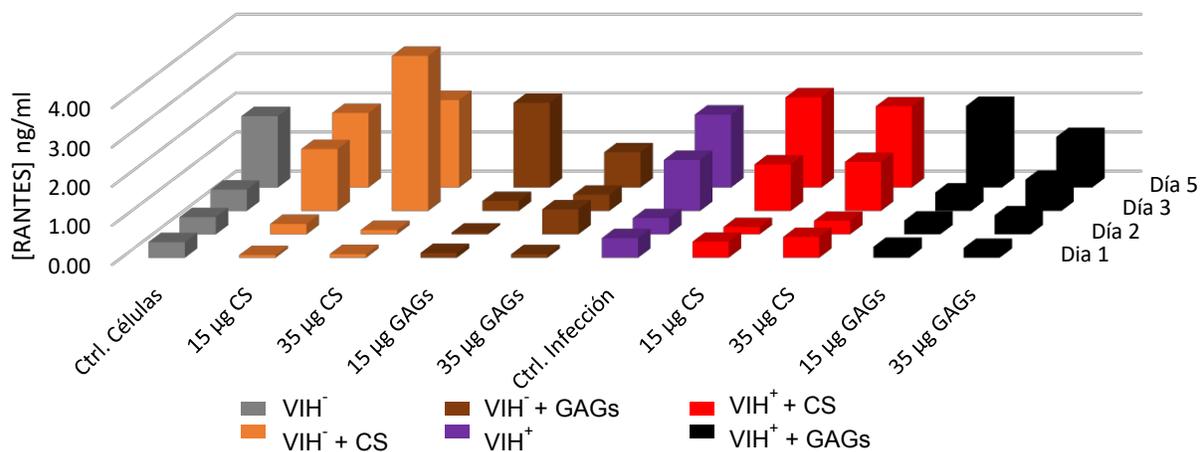
**Gráfica 3. Cuantificación temprana de MIP-1α en los sobrenadantes de cultivo de los ensayos de inhibición de la infección de MT2 por la cepa VIH-1<sub>III B</sub> en presencia de diferentes concentraciones de CS y GAGs de la leche humana. Cada barra corresponde al promedio de un triplicado.**

**MIP-1 $\beta$ .** Los datos presentaron una distribución normal y varianzas iguales por lo que se aplicó la prueba paramétrica Tukey con un valor de *P* menor a 0.05 para la comparación entre grupos. En los días 1 y 2 post-infección no se observaron diferencias entre los grupos. En el día 3 post-infección el control de células presentó diferencias con los grupos de células tratadas con 15 y 35  $\mu$ g de CS ( $P=0.0311$ ,  $P<0.0001$ ) y el control de infección presentó diferencias con el grupo de células tratadas con 35  $\mu$ g de CS ( $P<0.0001$ ). En el día 5 post-infección el control de células presentó diferencias con el grupo de células infectadas y tratadas con 35  $\mu$ g de GAGs ( $P=0.0131$ ). Al realizar el análisis comparativo entre los días 1, 2, 3 y 5 post-infección se observó que todos los grupos a excepción de los grupos de células tratadas con 15 y 35  $\mu$ g de GAGs y el grupo de células infectadas y tratadas con 35  $\mu$ g de GAGs, obtuvieron diferencias significativas de los valores del día 5 con respecto al día 1 (Gráfica 4).



**Gráfica 4. Cuantificación temprana de MIP-1 $\beta$  en los sobrenadantes de cultivo de los ensayos de inhibición de la infección de MT2 por la cepa VIH-1<sub>III B</sub> en presencia de diferentes concentraciones de CS y GAGs de la leche humana. Cada barra corresponde al promedio de un triplicado.**

**RANTES.** Los datos presentaron una distribución normal y varianzas iguales por lo que se aplicó la prueba paramétrica Tukey con un valor de  $P$  menor a 0.05 para la comparación entre grupos. En el día 1 post-infección se observó que el control de células presentó diferencia significativa con el grupo de células tratadas con 15  $\mu\text{g}$  de CS ( $P=0.0338$ ). Se observaron diferencias significativas al comparar el control de infección con respecto a los grupos de células tratadas con 15 y 35  $\mu\text{g}$  de CS ( $P=0.0003$ ,  $P=0.0007$ ) y GAGs ( $P=0.0018$ ,  $P=0.0007$ ), así como con el grupo células infectadas y tratadas con 35  $\mu\text{g}$  de GAGs ( $P=0.0196$ ). En el día 2 post-infección no se presentaron diferencias con respecto a los grupos control de células e infección. En el día 3 post-infección el control de células y el control de infección obtuvieron diferencias con respecto al grupo de células tratadas con 35  $\mu\text{g}$  de CS ( $P<0.0001$ ,  $P<0.0001$ ). Al realizar el análisis comparativo entre los días 1, 2, 3 y 5 post-infección sólo el control de infección y el grupo de células infectadas y tratadas con 15  $\mu\text{g}$  de CS obtuvieron diferencias significativas ( $P<0.0001$ ,  $P=0.0336$ ) de los valores del día 5 con respecto al día 1 post-infección (Gráfica 5).



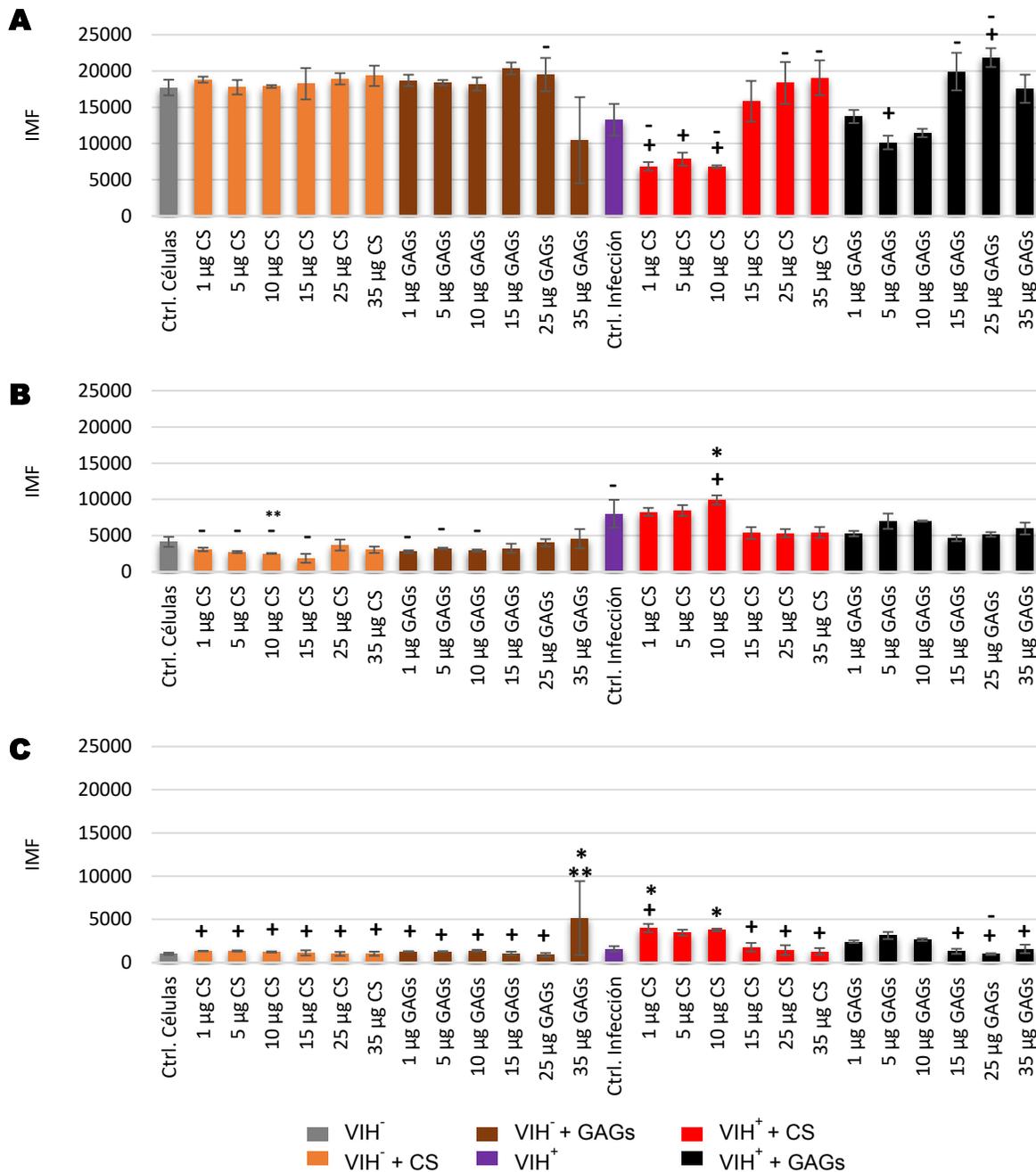
**Gráfica 5. Cuantificación temprana de RANTES en los sobrenadantes de cultivo de los ensayos de inhibición de la infección de MT2 por la cepa VIH-1<sub>III B</sub> en presencia de diferentes concentraciones de CS y GAGs de la leche humana. Cada barra corresponde al promedio de un triplicado.**

## 8. Cuantificación de la expresión de los receptores CD4, CXCR4 y CCR5 por citometría de flujo en células MT2 sin infectar e infectadas con VIH-1<sub>III</sub>B en presencia de GAGs y CS.

**CD4.** Los datos no presentaron una distribución normal pero si igualdad de varianzas. Se aplicó la prueba no paramétrica Kruskal Wallis con un valor de  $P$  menor a 0.05 para la comparación entre grupos. Los grupos de células infectadas y tratadas con 15 y 25  $\mu\text{g}$  de GAGs presentaron diferencias con los grupos de células infectadas y tratadas con 1 y 10  $\mu\text{g}$  de CS ( $P=0.0082, 0.0080$ ) ( $P=0.0008, 0.0008$ ). El grupo de células infectadas y tratadas con 5  $\mu\text{g}$  de CS presentó diferencias con los grupos de células infectadas y tratadas con 15 y 25  $\mu\text{g}$  de GAGs ( $P=0.0238, 0.0028$ ). En el grupo de células infectadas y tratadas con 25  $\mu\text{g}$  de GAGs también se observaron diferencias con el grupo de células infectadas y tratadas con 5  $\mu\text{g}$  de GAGs ( $P=0.0346$ ). El grupo de células tratadas con 25  $\mu\text{g}$  de GAGs presentó una diferencia significativa con el grupo de células infectadas y tratadas con 10  $\mu\text{g}$  de CS ( $P=0.0493$ ) (Figura 8 A).

**CXCR4.** Los datos no presentaron una distribución normal pero sí igualdad de varianzas. Se aplicó la prueba no paramétrica Kruskal Wallis con un valor de  $P$  menor a 0.05 para la comparación entre grupos. El grupo de células infectadas y tratadas con 10  $\mu\text{g}$  de CS presentó una diferencia significativa con el control de células ( $P=0.0402$ ) y con los grupos de células tratadas con 1, 5, 10 y 15  $\mu\text{g}$  de CS ( $P=0.0303, P=0.0161, P=0.0111, P=0.0156$ ) y con los grupos de 1, 5 y 10  $\mu\text{g}$  de GAGs ( $P=0.0176, P=0.0396, P=0.0232$ ). El grupo de células tratadas con 10  $\mu\text{g}$  de CS presentó diferencias con el control de infección ( $P=0.0427$ ) (Figura 8 B).

**CCR5.** Los datos no presentaron una distribución normal ni igualdad de varianzas. Se aplicó la prueba no paramétrica Kruskal Wallis con un valor de  $P$  menor a 0.05 para la comparación entre grupos. El grupo de células tratadas con 35  $\mu\text{g}$  de GAGs presentó diferencias con los grupos control de células ( $P=0.0010$ ) y de infección ( $P=0.0066$ ) y con los grupos de células tratadas con 1, 5, 10, 15, 25 y 35  $\mu\text{g}$  de CS ( $P=0.0192$ ,  $P=0.0197$ ,  $P=0.0133$ ,  $P=0.0302$ ,  $P=0.0061$ ,  $P=0.0231$ ) y los grupos de células tratadas con 1, 5, 10 y 25  $\mu\text{g}$  de GAGs ( $P=0.0165$ ,  $P=0.0154$ ,  $P=0.0225$ ,  $P=0.0040$ ), así como con los grupos de células infectadas y tratadas con 15, 25 y 35  $\mu\text{g}$  de CS ( $P=0.0297$ ,  $P=0.0085$ ,  $P=0.0076$ ) y de GAGs ( $P=0.0051$ ,  $P=0.0014$ ,  $P=0.0150$ ). El grupo células infectadas y tratadas con 1  $\mu\text{g}$  de CS presentó diferencias con el control de células ( $P=0.0179$ ) y el grupo células infectadas y tratadas con 25  $\mu\text{g}$  de GAGs ( $P=0.0231$ ). El grupo de células infectadas y tratadas con 10  $\mu\text{g}$  de CS presentó diferencia significativa al compararlo con el control de células ( $P=0.0450$ ) (Figura 8 C).

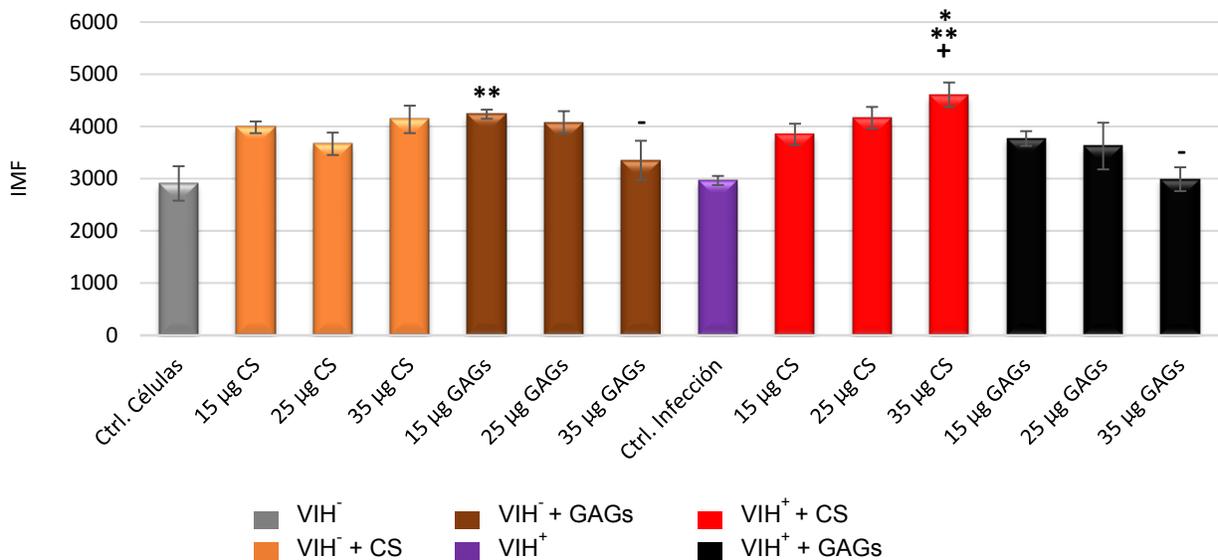


**Figura 8. Cuantificación de la expresión de CD4, CXCR4 y CCR5 por citometría de flujo, en las células MT2 sin infectar e infectadas con VIH-1<sub>III</sub>B en presencia de CS y GAGs de la leche humana.** A) Expresión de CD4 en MT2 sin infectar e infectadas con VIH-1<sub>III</sub>B tratadas con diferentes concentraciones de CS y GAGs, B) Expresión de CXCR4 en MT2 sin infectar e infectadas con VIH-1<sub>III</sub>B tratadas con diferentes concentraciones de CS y GAGs, C) Expresión de CCR5 en MT2 sin infectar e infectadas con VIH-1<sub>III</sub>B tratadas con diferentes concentraciones de CS y GAGs. Los valores representados en unidades de intensidad media de fluorescencia (IMF), corresponden al valor promedio de 3 experimentos. Las diferencias significativas se indican por \* (diferencias con el control de

células), \*\* (diferencias con el control de infección), - (diferencias entre grupos tratados con CS), + (diferencias entre grupos tratados con GAGs).

### 9. Cuantificación de la expresión de CD38 por citometría de flujo, en las células MT2 sin infectar e infectadas con VIH-1<sub>III</sub>B en presencia de CS y GAGs.

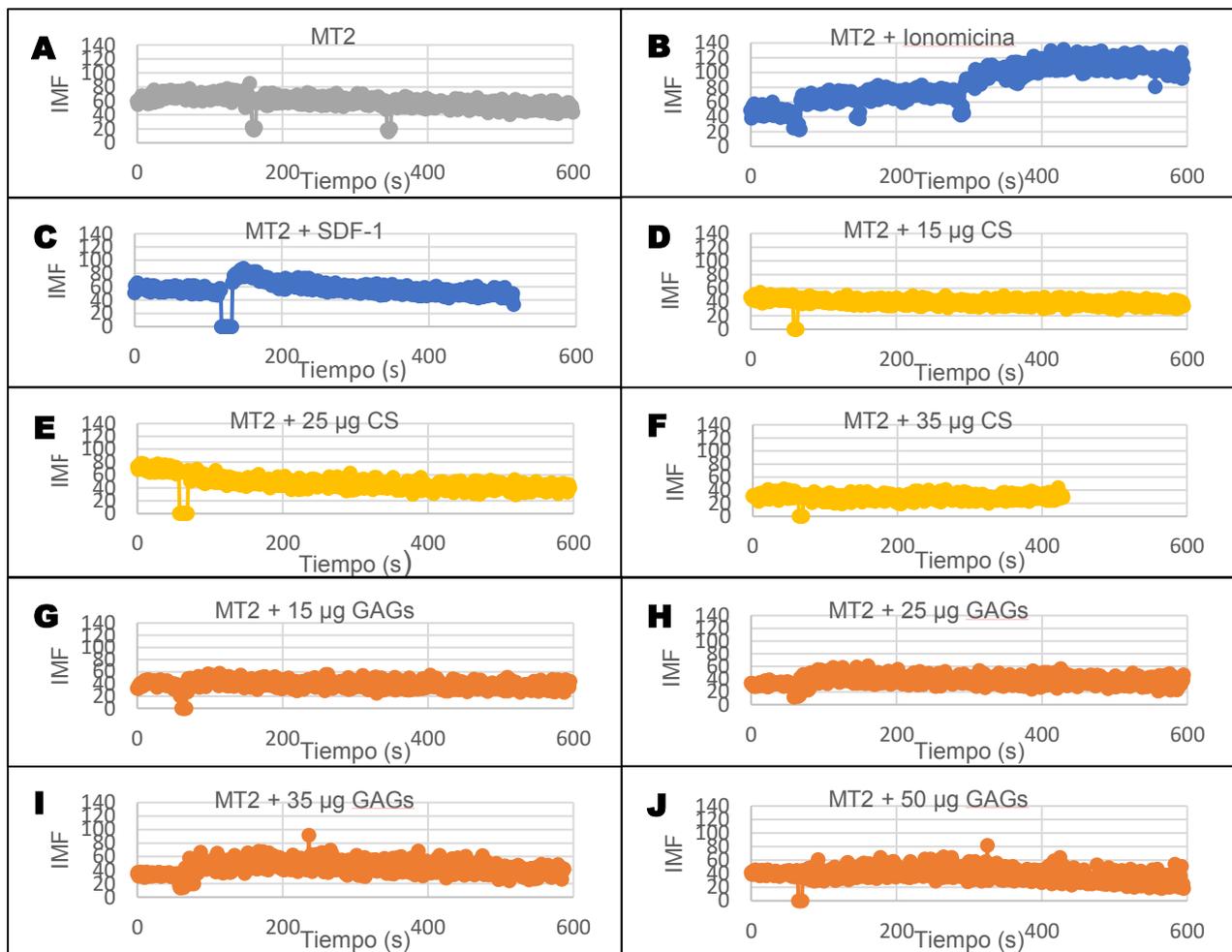
Los datos presentaron una distribución normal e igualdad de varianzas. Se aplicó la prueba paramétrica Tukey con un valor de *P* menor a 0.05 para la comparación entre grupos. El grupo de células infectadas y tratadas con 35 µg de CS presentó diferencias significativas con los controles de células (*P*=0.0075), con el control de infección (*P*=0.0030) y con los grupos de células sin infectar y células infectadas tratadas con 35 µg de GAGs (*P*=0.0463, *P*=0.0036). El grupo de células tratadas con 15 µg de GAGs presentó diferencias con el control de infección (*P*=0.0432) (Gráfica 6).



**Gráfica 6. Cuantificación de la expresión de CD38 por citometría de flujo, en las células MT2 sin infectar e infectadas con VIH-1<sub>III</sub>B en presencia de CS y GAGs de la leche humana.** Los valores representados en unidades de IMF, corresponden a los valores promedio de 1 experimento donde se realizarán 3 determinaciones por grupo. Las diferencias significativas se indican por \* (diferencias con el control de células), \*\* (diferencias con el control de infección), - (diferencias entre grupos tratados con CS), + (diferencias entre grupos tratados con GAGs)

## 10. Cuantificación del Flujo de $\text{Ca}^{2+}$ por citometría de flujo, en células MT2 tratadas con GAGs de la leche humana y CS de cartílago de tiburón

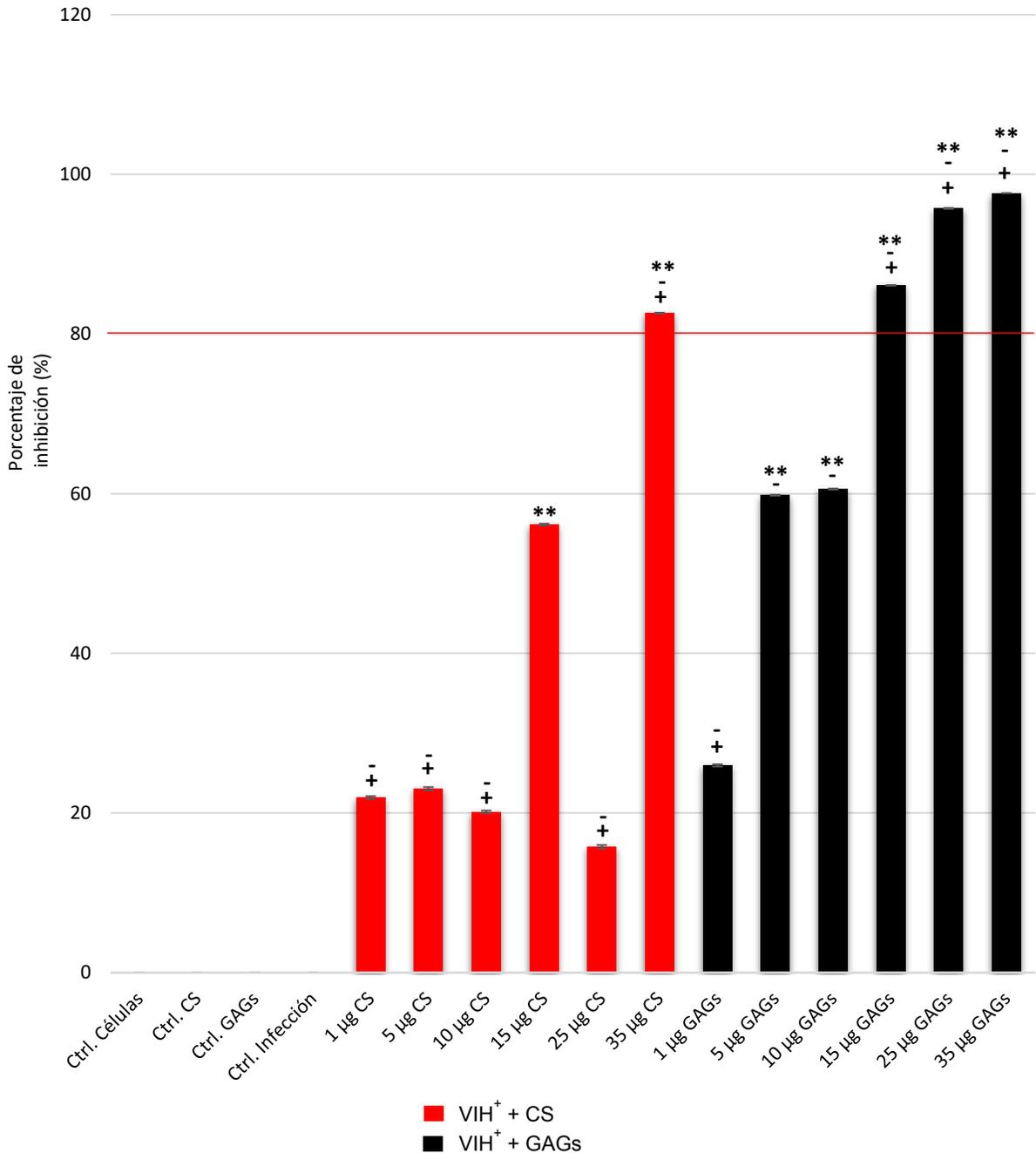
Se observaron incrementos en el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  en las células tratadas con ionomicina y la proteína recombinante humana SDF-1. Siendo la ionomicina la que causó un mayor aumento en la IMF. Ninguno de los grupos tratados con CS o GAGs presentó cambios. Los resultados corresponden a un duplicado por lo que son necesarias más repeticiones para determinar si hay diferencias significativas (Figura 9).



**Figura 9. Cuantificación del Flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  por citometría de flujo, en células MT2 cargadas con Fluo 3 y Fura Red.** Control de células (A), Células + ionomicina (B), Células + SDF-1 (C), Células + CS (D, E, F), Células + GAGs (G, H, I, J). Los valores representados en unidades de IMF, corresponden a los valores promedio de 1 experimento donde se realizaron 2 determinaciones por grupo.

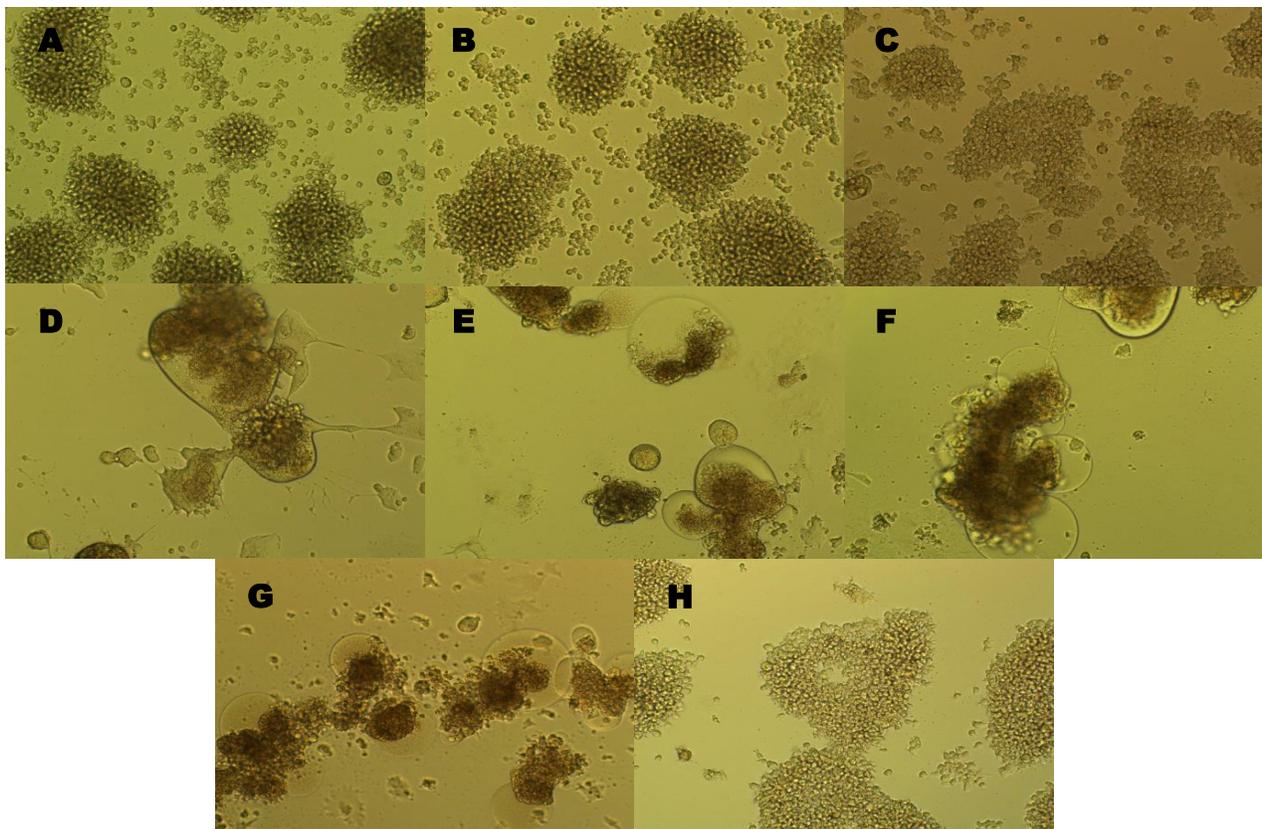
## **11. Ensayos de inhibición de la infección MT2 por la cepa VIH-1<sub>MN</sub> con GAGs de la leche humana y CS de cartílago de tiburón**

Los datos presentaron una distribución normal pero no varianzas iguales. Se aplicó la prueba no paramétrica Kruskal Wallis con un valor de  $P$  menor a 0.05 para la comparación entre grupos. Los grupos de células MT2 tratados con 15 y 35  $\mu\text{g}$  de CS ( $P=0.0015$ ,  $P<0.0001$ ) presentaron un porcentaje de inhibición significativa y diferencias con respecto al control de infección. El grupo de células tratadas con 35  $\mu\text{g}$  de CS presentó diferencias con los grupos tratados con 1, 5, 10 y 25  $\mu\text{g}$  de CS ( $P=0.0008$ ,  $P=0.0010$ ,  $P=0.0005$ ,  $P=0.0001$ ). Se observó una inhibición significativa de la infección por VIH-1<sub>MN</sub> en los grupos de células infectadas y tratadas con 5, 10, 15, 25 y 35  $\mu\text{g}$  de GAGs ( $P=0.0003$ ,  $P=0.0002$ ,  $P<0.0001$ ,  $P<0.0001$ ,  $P<0.0001$ ). Los grupos de células tratadas con 15, 25 y 35  $\mu\text{g}$  de GAGs tuvieron diferencias con los grupos de 1, 5, 10 y 25  $\mu\text{g}$  de CS ( $P=0.0003$ ,  $P=0.0004$ ,  $P=0.0002$ ,  $P<0.0001$ ) ( $P=<0.0001$ ,  $P<0.0001$ ,  $P<0.0001$ ,  $P<0.0001$ ) ( $P=0.0052$ ,  $P=0.0063$ ,  $P=0.0037$ ,  $P=0.0016$ ) y con el grupo tratado con 1  $\mu\text{g}$  de GAGs ( $P=0.0003$ ,  $P<0.0001$ ,  $P=0.0070$ ). Los grupos de 5 y 10  $\mu\text{g}$  de GAGs presentaron diferencias con el grupo de 25  $\mu\text{g}$  de CS ( $P=0.0337$ ,  $P=0.0282$ ) (Gráfica 7).



**Gráfica 7. Porcentaje de inhibición de la infección de MT2 con la cepa VIH-1<sub>MN</sub> en presencia de diferentes concentraciones de CS y GAGs de la leche humana.** Las barras representan al promedio de los 2 experimentos realizados y cada muestra se probó por triplicado. Las diferencias significativas se indican por \*\* (diferencias con el control de infección), - (diferencias entre grupos tratados con CS), + (diferencias entre grupos tratados con GAGs).

En la infección de las células MT2 por la cepa VIH-1<sub>MN</sub> se observó bajo el microscopio la aparición de sincicios (células gigantes multinucleadas) (Figura 10 D). No se presentaron efectos citotóxicos en los controles de CS y GAGs aún con las concentraciones de 35 µg (Figura 10 B y C). Los GAGs de la leche humana demostraron una inhibición dosis-dependiente de la formación de sincicios en las MT2 infectadas con VIH-1<sub>MN</sub> (Figura 10 G y H) en comparación con las células tratadas con CS donde no se observó una inhibición significativa de la formación de sincicios (Figura 10 E y F).

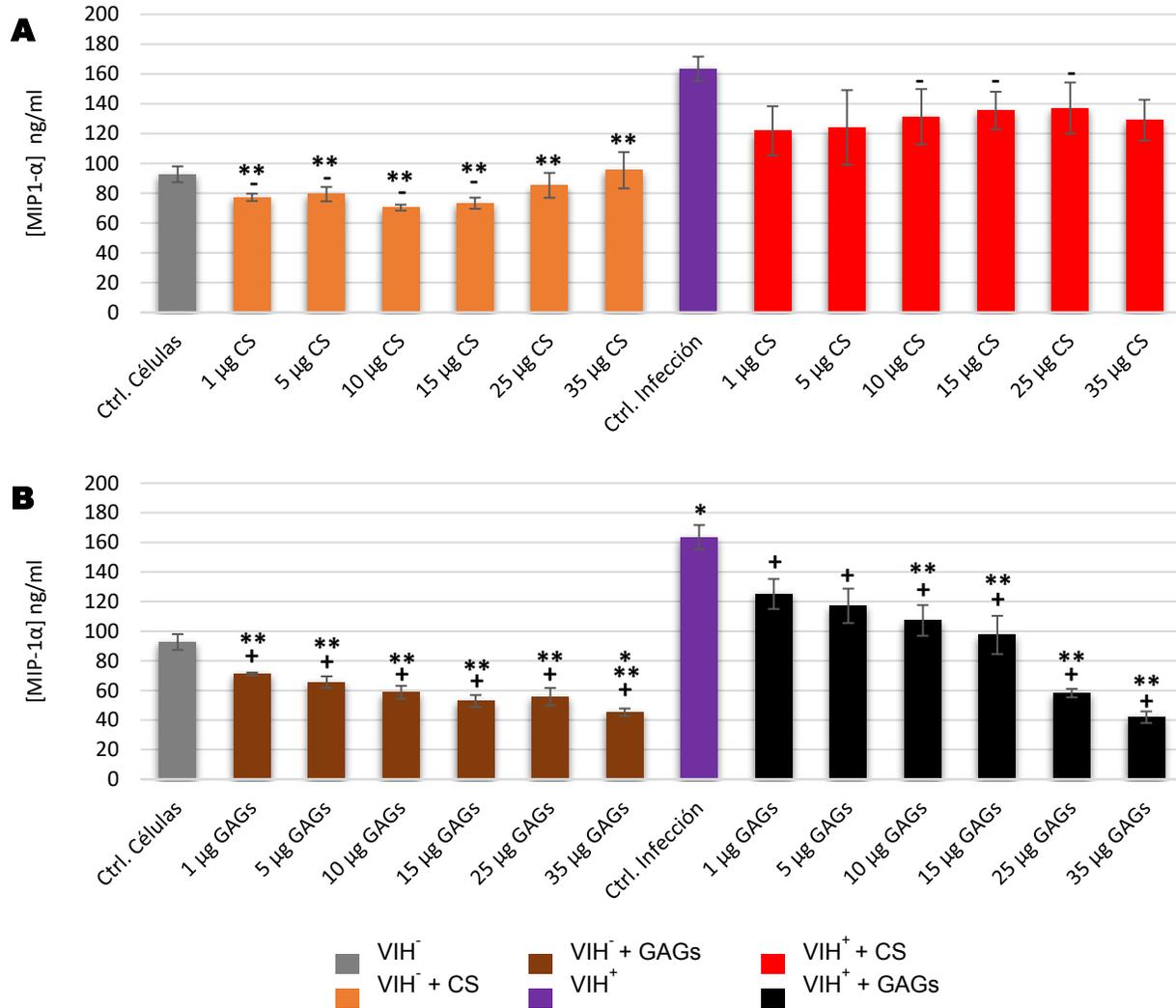


**Figura 10. Inhibición de la formación de sincicios en células MT2 infectadas con VIH-1<sub>MN</sub> en presencia de GAGs de la leche humana.** Se observan al microscopio con un aumento de 400X: Control de células (A), Células + 35 µg de CS (B), Células + 35 µg de GAGs (C), Células + VIH-1<sub>MN</sub> (D), Células + VIH-1<sub>MN</sub> + 1 µg de CS (E), Células + VIH-1<sub>MN</sub> + 35 µg de CS (F), Células + VIH-1<sub>MN</sub> + 1 µg de GAGs (G), Células + VIH-1<sub>MN</sub> + 35 µg de GAGs (H).

## **12. Cuantificación por ELISA de MIP-1 $\alpha$ en los sobrenadantes de los ensayos de inhibición de la infección de MT2 por VIH-1<sub>MN</sub> en presencia de CS y GAGs**

Los datos no presentaron una distribución normal ni varianzas iguales. Se aplicó la prueba no paramétrica Kruskal Wallis con un valor de  $P$  menor a 0.05 para la comparación entre grupos. Los grupos de células tratadas con 1, 5, 10, 15, 25 y 35  $\mu\text{g}$  de CS presentaron diferencias con el control de infección ( $P<0.0001$ ,  $P<0.0001$ ,  $P<0.0001$ ,  $P<0.0001$ ,  $P<0.0001$ ,  $P=0.0003$ ). El grupo de células infectadas y tratadas con 25  $\mu\text{g}$  de CS presentó diferencias con los grupos de células tratadas con 1, 5, 10 y 15  $\mu\text{g}$  de CS ( $P=0.0226$ ,  $P=0.0359$ ,  $P=0.0093$ ,  $P=0.0089$ ), el grupo de células infectadas y tratadas con 15  $\mu\text{g}$  de CS presentó diferencias con los grupos de células tratadas con 1, 10 y 15  $\mu\text{g}$  de CS ( $P=0.0326$ ,  $P=0.0136$ ,  $P=0.0132$ ). El grupo de células infectadas y tratadas con 10  $\mu\text{g}$  de CS presentó diferencias con los grupos de células tratadas con 10 y 15  $\mu\text{g}$  de CS ( $P=0.0334$ ,  $P=0.0341$ ). El control de infección obtuvo diferencia significativa con respecto al control de células ( $P<0.0001$ ) y los grupos de células tratadas con 1, 5, 10, 15, 25 y 35  $\mu\text{g}$  de GAGs ( $P<0.0001$ ,  $P<0.0001$ ,  $P<0.0001$ ,  $P<0.0001$ ,  $P<0.0001$ ) y VIH<sup>+</sup> tratadas con 10, 15, 25 y 35  $\mu\text{g}$  de GAGs ( $P=0.0115$ ,  $P=0.0007$ ,  $P<0.0001$ ,  $P<0.0001$ ). El grupo de células tratadas con 1  $\mu\text{g}$  de GAGs obtuvo diferencias con el control de infección ( $P<0.0001$ ) y el grupo de células infectadas y tratadas con 1  $\mu\text{g}$  de GAGs ( $P=0.0127$ ), mientras que el grupo de células tratadas con 35  $\mu\text{g}$  de GAGs presentó diferencias con el control de infección ( $P<0.0001$ ) y con los grupos de células infectadas y tratadas con 1, 5, 10 y 15  $\mu\text{g}$  de GAGs ( $P<0.0001$ ,  $P=0.0002$ ,  $P=0.0031$ ,  $P=0.0400$ ). El grupo de células infectadas y tratadas con 1  $\mu\text{g}$  de GAGs presentó diferencia con los grupos de células tratadas con 1, 5, 10, 15, 25, 35  $\mu\text{g}$  de GAGs ( $P=0.0127$ ,  $P=0.0026$ ,  $P=0.0003$ ,  $P<0.0001$ ,  $P=0.0001$ ,  $P<0.0001$ ) y con los grupos de células infectadas y tratadas con 35 y 25  $\mu\text{g}$  de GAGs ( $P<0.0001$ ,  $P=0.0002$ ). El grupo

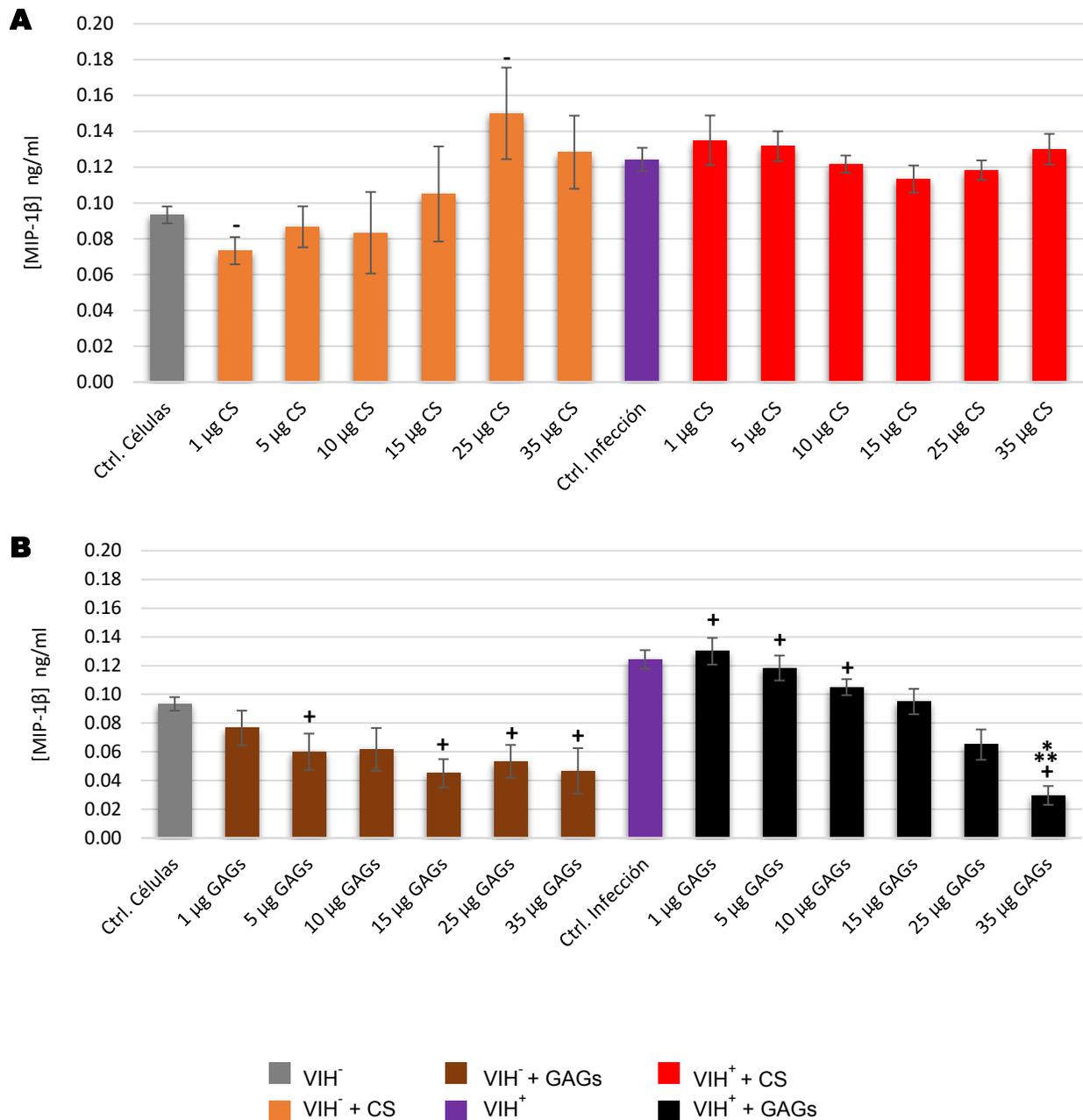
de células infectadas y tratadas con 35 µg de GAGs obtuvo diferencias con el control de infección ( $P<0.001$ ) y con los grupos de células infectadas y tratadas con 1, 5, 10 µg de GAGs ( $P<0.0001$ , 0.0002, 0.0031) (Figura 11).



**Figura 11. Cuantificación por ELISA de MIP-1α en los sobrenadantes de cultivo de los ensayos de inhibición de la infección de MT2 por la cepa VIH-1<sub>MN</sub> en presencia de diferentes concentraciones de CS y GAGs de la leche humana.** A) MT2 sin infectar e infectadas con VIH-1<sub>MN</sub> tratadas con diferentes concentraciones de CS, B) MT2 sin infectar e infectadas con VIH-1<sub>MN</sub> tratadas con diferentes concentraciones de GAGs. Las barras corresponden al promedio de los 2 experimentos realizados. Las diferencias significativas se indican por \* (diferencias con el control de células), \*\* (diferencias con el control de infección), - (diferencias entre grupos tratados con CS), + (diferencias entre grupos tratados con GAGs).

### **13. Cuantificación por ELISA de MIP-1 $\beta$ en los sobrenadantes de cultivo de los ensayos de inhibición de la infección MT2 por la cepa VIH-1<sub>MN</sub> en presencia de CS y GAGs**

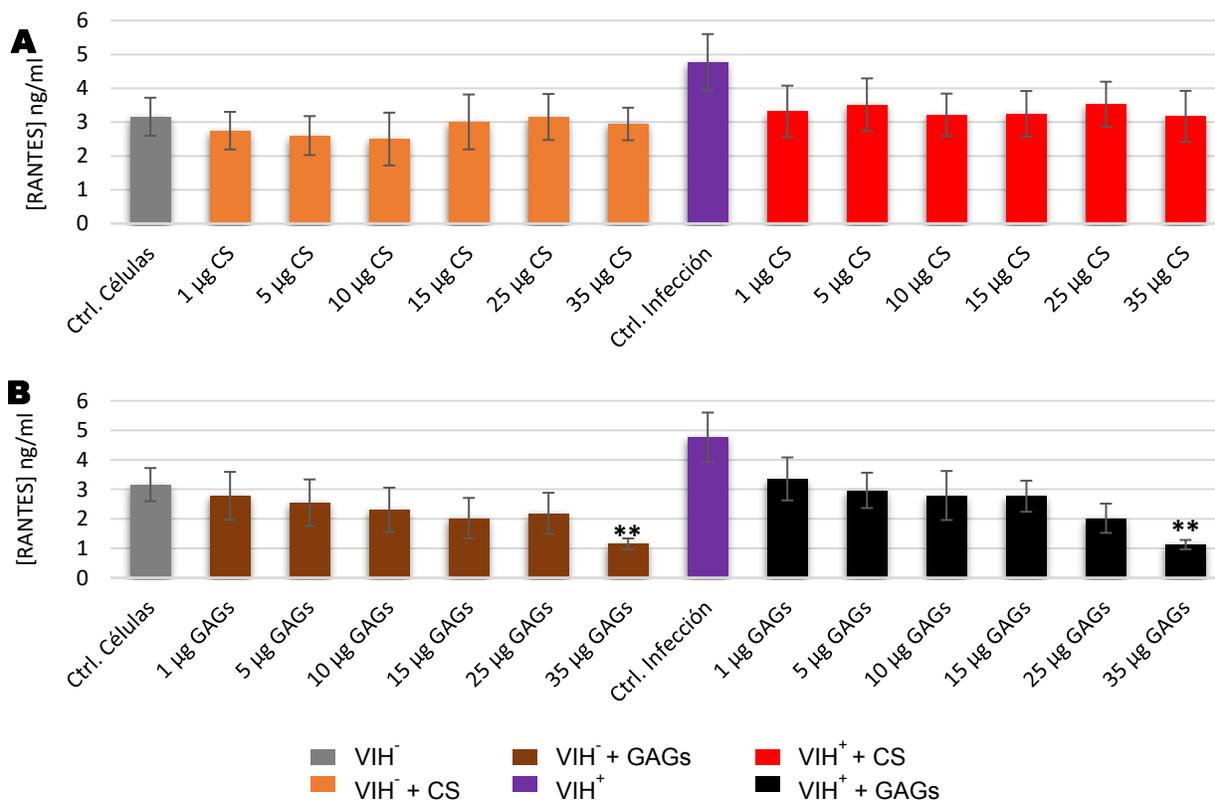
Los datos presentaron una distribución normal pero no varianzas iguales. Se aplicó la prueba no paramétrica Kruskal Wallis con un valor de  $P$  menor a 0.05 para la comparación entre grupos. Se presentó diferencia entre los grupos de células tratadas con 1  $\mu$ g y 25  $\mu$ g de CS ( $P=0.0117$ ). Los grupos de células tratadas con 15 y 35  $\mu$ g de GAGs presentaron diferencias con los grupos de células infectadas y tratadas con 1 y 5  $\mu$ g de GAGs ( $P=0.0021$ ,  $P=0.0219$ ) ( $P=0.0030$ ,  $P=0.0296$ ). El grupo de células infectadas y tratadas con 1  $\mu$ g de GAGs presentó diferencias con los grupos de células tratadas con 5, 15, 25 y 35  $\mu$ g de GAGs ( $P=0.0397$ ,  $P=0.0021$ ,  $P=0.0117$ ,  $P=0.0030$ ) y con el grupo de células infectadas y tratadas con 35  $\mu$ g de GAGs ( $P<0.0001$ ). El grupo de células infectadas y tratadas con 35  $\mu$ g de GAGs presentó diferencias con los controles de células ( $P=0.0415$ ) y de infección ( $P<0.0001$ ), así como con los grupos de células infectadas y tratadas con 1, 5, y 10  $\mu$ g de GAGs ( $P<0.0001$ ,  $P=0.0009$ ,  $P=0.0151$ ) (Figura 12).



**Figura 12. Cuantificación por ELISA de MIP-1β en los sobrenadantes de cultivo de los ensayos de inhibición de la infección de MT2 por la cepa VIH-1<sub>MN</sub> en presencia de diferentes concentraciones de CS y GAGs de la leche humana.** A) MT2 sin infectar e infectadas con VIH-1<sub>MN</sub> tratadas con diferentes concentraciones de CS, B) MT2 sin infectar e infectadas con VIH-1<sub>MN</sub> tratadas con diferentes concentraciones de GAGs. Las barras corresponden al promedio de los 2 experimentos realizados. Las diferencias significativas se indican por \* (diferencias con el control de células), \*\* (diferencias con el control de infección), - (diferencias entre grupos tratados con CS), + (diferencias entre grupos tratados con GAGs).

#### 14. Cuantificación por ELISA de RANTES en los sobrenadantes de cultivo de los ensayos de inhibición de la infección por MT2 por la cepa VIH-1<sub>MN</sub> en presencia de CS y GAGs

Los datos no presentaron una distribución normal ni varianzas iguales. Se aplicó la prueba no paramétrica Kruskal Wallis con un valor de *P* menor a 0.05 para la comparación entre grupos. Solo los grupos de células sin infectar y células infectadas tratadas con 35 µg de GAGs presentaron diferencias con el control de infección (*P*=0.0306, 0.0282) (Figura 13).



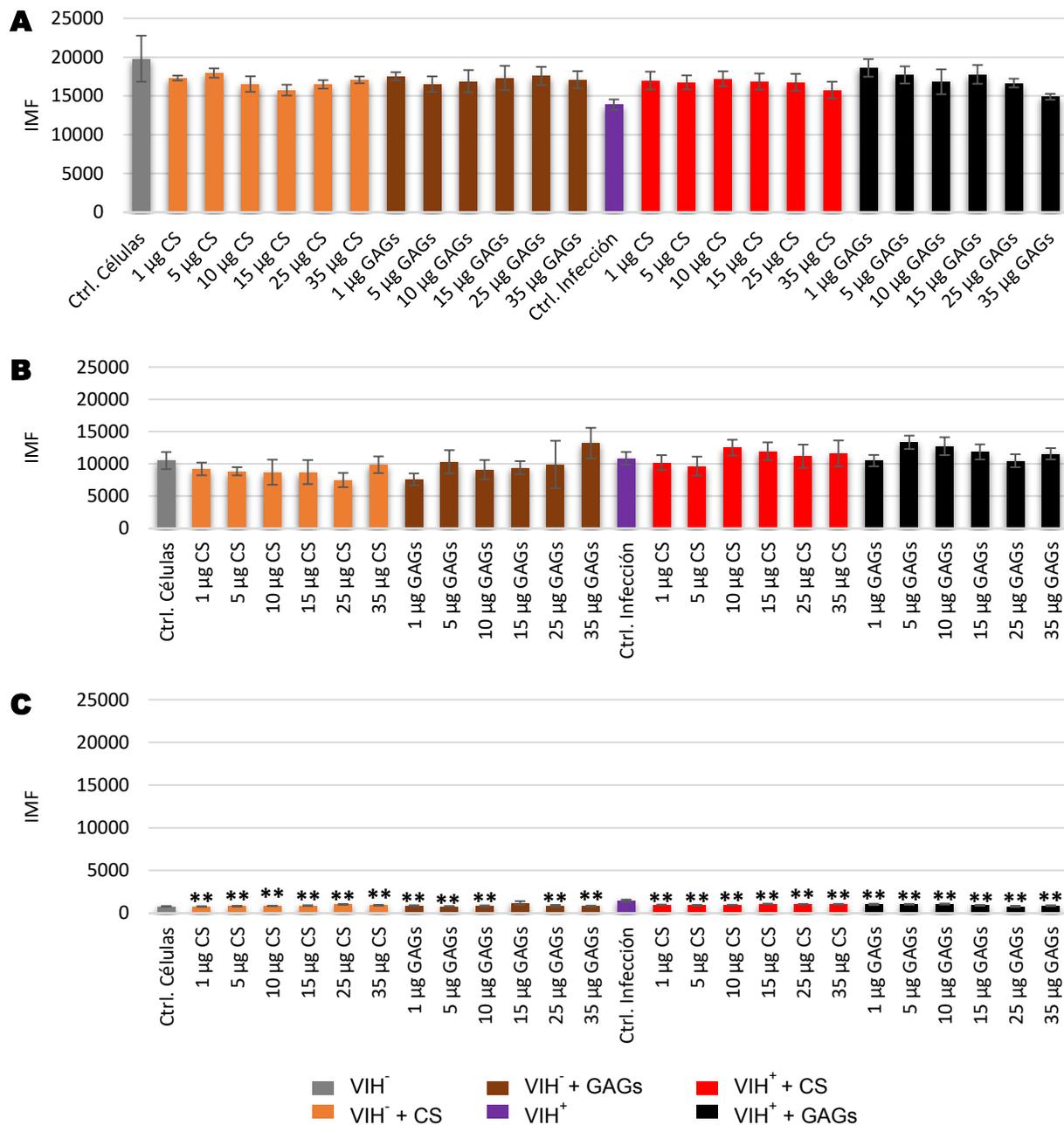
**Figura 13. Cuantificación por ELISA de RANTES en los sobrenadantes de cultivo de los ensayos de inhibición de la infección de MT2 por la cepa VIH-1<sub>MN</sub> en presencia de diferentes concentraciones de CS y GAGs de la leche humana. A) MT2 sin infectar e infectadas con VIH-1<sub>MN</sub> tratadas con diferentes concentraciones de CS, B) MT2 sin infectar e infectadas con VIH-1<sub>MN</sub> tratadas con diferentes concentraciones de GAGs. Las barras corresponden al promedio de los 2 experimentos realizados. Las diferencias significativas se indican por \*\* (diferencias con el control de infección).**

**15. Cuantificación de la expresión de los receptores CD4, CXCR4 y CCR5 por citometría de flujo en células MT2 sin infectar e infectadas con VIH-1<sub>MN</sub> en presencia de GAGs y CS**

**CD4.** Los datos no presentaron una distribución normal ni igualdad de varianzas. Se aplicó la prueba no paramétrica Kruskal Wallis con un valor de *P* menor a 0.05 para la comparación entre grupos. No se observaron diferencias entre los grupos (Figura 14 A).

**CXCR4.** Los datos presentaron una distribución normal e igualdad de varianzas. Se aplicó la prueba paramétrica Tukey con un valor de *P* menor a 0.05 para la comparación entre grupos. No se observaron diferencias entre los grupos (Figura 14 B).

**CCR5.** Los datos no presentaron una distribución normal pero si igualdad de varianzas. Se aplicó la prueba no paramétrica Kruskal Wallis con un valor de *P* menor a 0.05 para la comparación entre grupos. Todos los grupos excepto el control de células y el grupo de células tratadas con 15 µg de GAGs presentaron diferencias con el control de infección (Figura 14 C).



**Figura 14. Cuantificación de la expresión de CD4, CXCR4 y CCR5 por citometría de flujo, en las células MT2 sin infectar e infectadas con VIH<sub>MN</sub> en presencia de CS y GAGs de la leche humana.** A) Expresión de CD4 en MT2 sin infectar e infectadas con VIH-1<sub>MN</sub> tratadas con diferentes concentraciones de CS y GAGs, B) Expresión de CXCR4 en MT2 sin infectar e infectadas con VIH-1<sub>MN</sub> tratadas con diferentes concentraciones de CS y GAGs, C) Expresión de CCR5 en MT2 sin infectar e infectadas con VIH-1<sub>MN</sub> tratadas con diferentes concentraciones de CS y GAGs. Los valores representados en unidades de intensidad media de fluorescencia (IMF), corresponden al valor promedio de 2 experimentos. Las diferencias significativas se indican por \*\* (diferencias con el control de infección).

## Discusión

Los resultados obtenidos en el modelo con la línea celular MT2 infectada con VIH-1<sub>III</sub>B en presencia de los GAGs de la leche humana, concuerdan con lo reportado en estudios previos de Viveros-Rogel y colaboradores (2004), debido a que los glicoconjugados inhibieron en más de un 80 % la infección y se observó que el efecto fue dosis dependiente. Los GAGs presentaron un efecto inhibitor más potente sobre la infección con VIH-1<sub>III</sub>B, en comparación con el CS comercial (Gráfica 1). Este efecto se debe probablemente a que en la fracción de GAGs que se probó en los ensayos celulares, están presentes diversas especies con características estructurales distintas, como la longitud de sus cadenas y con diferentes grados de sulfatación que al tener cargas aniónicas de distinta intensidad, permiten una amplia gama de interacciones con los dominios de la glicoproteína gp120 del VIH-1 con carga catiónica, que limita por más tiempo el contacto de esta proteína viral con el receptor CD4, con respecto al CS comercial que al ser sólo una especie de glicoconjugado, ve limitada su capacidad de interacción con la envoltura viral permitiendo un mayor contacto del VIH-1 con las células CD4<sup>+</sup> (Gandhi y Mancera, 2008).

La quimiocina SDF-1 no pudo ser cuantificada pues los valores obtenidos en los ensayos de ELISA dieron lecturas por debajo de la curva estándar utilizada, este resultado hace necesario aumentar la sensibilidad para su cuantificación en estudios posteriores y permite considerar que la infección por VIH-1<sub>III</sub>B, CS y los GAGs no tienen efecto en la generación de SDF-1. Además, el no observar un aumento en sus niveles por la infección con VIH-1<sub>III</sub>B posiblemente indique que SDF-1 no contribuye a la inhibición de la infección ocupando al receptor CXCR4 impidiendo la interacción de éste con la glicoproteína gp120 del VIH-1.

Las proteínas MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  y RANTES no juegan un rol prioritario en los modelos de inhibición de la infección empleados (células MT2 infectadas con las cepas VIH-1<sub>III B</sub> y VIH-1<sub>MN</sub>), pues al ser ligandos de CCR5, no compiten por el correceptor CXCR4 con las glicoproteínas gp120 de estos virus X4, como ocurre con SDF-1. Sin embargo, se realizó la cuantificación de MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  y RANTES para evaluar si el CS o los GAGs de la leche humana podían tener un efecto sobre su receptor CCR5 induciendo su producción. Los resultados obtenidos muestran que las concentraciones de MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  y RANTES no se ven modificadas con el CS o los GAGs, lo que rechaza la hipótesis planteada (Figuras 6 y 7). MIP-1 $\beta$  y RANTES no presentaron cambios en los controles de infección a diferencia de MIP-1 $\alpha$  lo que indica que durante el proceso de infección en las células MT2 por VIH-1<sub>III B</sub> solo esta quimiocina forma parte de la respuesta para contrarrestar la propagación del virus. En los grupos de células infectadas y tratadas con 10, 15, 25 y 35  $\mu$ g de GAGs se obtuvieron disminuciones significativas de MIP-1 $\alpha$  con respecto al control de infección ( $P=0.0052$ ,  $P=0.0106$ ,  $P=0.0104$ ,  $P<0.0001$ ) (Figura 5). Estas diferencias correlacionan con los elevados porcentajes de inhibición obtenidos por estas concentraciones de GAGs (Gráfica 1), debido a que al ser la infección por VIH-1<sub>III B</sub> el estímulo para el aumento en la síntesis de MIP-1 $\alpha$ , entre menor sea la infección, la producción de la quimiocina se verá disminuida. Es interesante notar que el grupo de células infectadas y tratadas con 35  $\mu$ g de CS presentó un porcentaje de inhibición mayor (61%) que el grupo de células infectadas y tratadas con 10  $\mu$ g de GAGs (45%), y aun así el grupo tratado con 10  $\mu$ g de GAGs provocó una disminución significativa en la cuantificación de MIP-1 $\alpha$  con respecto al control de infección ( $P=0.0052$ ), mientras que en las células tratadas con CS no se observó una disminución. Este efecto podría atribuirse a la abundancia de la especie HS en la leche humana (40% de la composición total de GAGs) que posiblemente impidió su cuantificación,

ya que se ha descrito que el HS tiene la capacidad de interactuar de forma directa con RANTES y MIP-1 $\alpha$  (Koopmann y Krangel, 1997; Martin et al., 2001; Gandhi y Mancera., 2008).

La evaluación de la producción de las quimiocinas SDF-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  y RANTES en los días 1, 2 y 3 post-infección se efectuó para conocer la dinámica que seguía este evento y verificar que cambios importantes no estuviesen siendo omitidos por una cuantificación tardía de las quimiocinas (Gráficas 3, 4 y 5). SDF-1 no pudo ser cuantificada en estos intervalos de tiempo pues nuevamente los valores obtenidos se salieron por debajo de la curva estándar empleada, lo que parece indicar que esta quimiocina tampoco participa en la inhibición de la infección en intervalos relativamente cortos de tiempo después de la infección y que SDF-1 no compite con la glicoproteína gp120 del VIH-1<sub>III</sub>B por CXCR4; sin embargo, como se mencionó anteriormente estudios más sensibles para su cuantificación son necesarios para la confirmación de estos resultados.

De forma general las concentraciones de MIP-1 $\beta$  y RANTES no sufrieron cambios debidos a la exposición de las células MT2 al VIH-1<sub>III</sub>B, el CS o los GAGs, lo que corrobora lo observado en las cuantificaciones al día 5 post-infección (Gráficas 4 y 5). En cambio MIP-1 $\alpha$  sí presentó diferencias en su concentración, principalmente en los grupos de células infectadas y tratadas con CS y GAGs, corroborando el hallazgo de un aumento de esta quimiocina como respuesta a la infección por VIH-1<sub>III</sub>B incluso en etapas tempranas de la infección (Gráfica 3).

Para evaluar si los GAGs producían un efecto en la expresión de los receptores CD4, CXCR4 y CCR5 que contribuyera a la inhibición de la infección de las células MT2, se evaluó su expresión en la membrana celular por citometría de flujo (Figura 8). No se

observaron diferencias significativas en la expresión del receptor CD4 en ningún grupo con respecto al control de células, lo que descarta un efecto de los GAGs sobre la expresión de este receptor, aunque sí se observaron diferencias entre los grupos de células infectadas y tratadas con CS o GAGs. El grupo de células infectadas y tratadas con 35 µg de CS, presentó diferencias con respecto a los grupos de células infectadas y tratadas con 1 y 10 µg de CS ( $P=0.0353$ ,  $P=0.0345$ ). Mientras, que el grupo de células infectadas y tratadas con 25 µg de GAGs presentó diferencias con el grupo de células infectadas y tratadas con 5 µg de GAGs ( $P=0.0346$ ) y con los grupos de células infectadas y tratadas con 1, 5 y 10 µg de CS ( $P=0.0008$ ,  $P=0.0028$ ,  $P=0.0008$ ) (Figura 8 A). Este resultado era esperado, debido a que una vez que la célula CD4<sup>+</sup> es infectada por el VIH-1, se produce una regulación a la baja del receptor CD4 mediada por las proteínas virales Nef y Vpu (Lindwasser, Chaudhuri et al., 2007). Por lo que, en los grupos donde la inhibición de la infección fue baja con valores menores al 80%, la expresión de este receptor disminuyó, siendo este efecto contrarrestado por el aumento de las concentraciones de CS y GAGs (Gráfica 1). En general los resultados para los receptores CXCR4 y CCR5 indican que ni el VIH-1<sub>III</sub>B, el CS o los GAGs tienen efecto sobre su expresión (Figura 8 B y C). Esto es contrario a lo esperado pues al ser CXCR4 el correceptor que las cepas virales X4 utilizan preferentemente para infectar, se esperaba que se obtendrían niveles bajos en la evaluación fenotípica de este receptor en las células infectadas pues se consideraba que al interactuar las proteínas gp120 de los virus con dicho receptor disminuiría la cantidad de receptores marcados con el anticuerpo anti-CXCR4 y su IMF.

La cuantificación del receptor y marcador de activación del sistema inmune: CD38 en los grupos de células tratadas con CS y GAGs no presentó cambios con respecto al control (Gráfica 6). Esto concuerda con los resultados obtenidos en la cuantificación de la

producción de las quimiocinas y sus respectivos correceptores, ya que se corrobora que los glicoconjugados no tienen efecto sobre las células MT2. Sin embargo, el control de infección no presentó un incremento significativo en la expresión de CD38, lo que no concuerda con lo reportado, debido a que este receptor se considera como un marcador de activación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> ante la infección por VIH-1 y se tiene la certeza de que se obtuvo una infección de las células MT2 por la cepa VIH-1<sub>III B</sub>. Este resultado sugiere la necesidad de emplear una metodología alterna o realizar un mayor número de repeticiones de la determinación de CD38 para descartar que no se trató de un error experimental o confirmar que la infección por la cepa VIH-1<sub>III B</sub> no induce un aumento significativo en la expresión de este receptor en las células MT2.

En la evaluación por citometría del flujo de Ca<sup>2+</sup> intracelular en las células MT2 tratadas con diferentes concentraciones de CS y GAGs durante 10 minutos tampoco se observaron diferencias con respecto al grupo control (Figura 9). Señalando nuevamente que el CS y los GAGs no ejercen un efecto de activación sobre estas células. Sin embargo, al ser datos obtenidos de un duplicado no pudo realizarse una prueba estadística para determinar si hubo diferencias significativas.

En el modelo con la línea celular MT2 infectada con VIH-1<sub>MN</sub> en presencia de los GAGs y CS se observó también una inhibición significativa de la infección y este efecto fue dosis-dependiente. Las células infectadas y tratadas con los GAGs de la leche humana, alcanzaron porcentajes de inhibición del 86, 96 y 98% al utilizar las concentraciones de 15, 25 y 35 µg, respectivamente (P<0.0001). Mientras, que, con el tratamiento con CS se obtuvo una inhibición máxima del 83 % con 35 µg (P<0.0001) (Gráfica 7). Los porcentajes mayores de inhibición alcanzados por los GAGs con respecto al CS se deben posiblemente,

al igual que en el modelo de infección con VIH-1<sub>III B</sub>, a la diversidad de especies de GAGs que existen en la leche humana y que limitan de una forma más efectiva que el CS comercial, la interacción de los virus con el receptor CD4.

La quimiocina SDF-1 tampoco pudo ser cuantificada en este modelo de infección ya que los valores obtenidos en los ensayos de ELISA fueron menores a los de la curva estándar, este resultado resalta nuevamente la necesidad de aumentar la sensibilidad para la cuantificación de la quimiocina en posteriores estudios y deja abierta la posibilidad de que SDF-1 no participe en la inhibición de la infección compitiendo por CXCR4 con la proteína gp120 del VIH-1<sub>MN</sub>. Aunque estudios previos realizados con neutrófilos, monocitos y linfocitos T han mostrado la expresión de SDF-1 durante la infección por cepas X4 y su capacidad para inhibir la infección por impedimento estérico de la unión de la proteína gp120 con CXCR4 (Arenzana-Seisdedos, 2015). Es posible que los resultados obtenidos indiquen en particular, que la cepa MT2 no expresa en concentraciones suficientes a SDF-1 para emplearla en modelos de infección por cepas X4 como VIH-1<sub>III B</sub> y VIH-1<sub>MN</sub>. Para MIP-1 $\beta$  y RANTES no se obtuvieron diferencias significativas en sus concentraciones dependientes del CS o del VIH-1<sub>MN</sub>, sin embargo, ambas quimiocinas parecen presentar un ligero aumento en los controles de infección y una tendencia a la baja tanto en las muestras tratadas con GAGs infectadas y sin infectar (Figuras 12 y 13) y en las muestras sin infección y tratadas con las diferentes concentraciones de GAGs. Este fenómeno puede deberse a una posible interacción directa de los glicoconjugados sobre las quimiocinas que pudiera impedir su cuantificación. En las muestras infectadas con VIH-1<sub>MN</sub> y expuestas a diferentes concentraciones de GAGs, la disminución en la expresión de las quimiocinas puede correlacionarse con los elevados porcentajes de inhibición (Gráfica 7), indicando poco efecto del virus sobre las MT2 o bien deberse a la interacción directa de los glicoconjugados

sobre MIP-1 $\beta$  y RANTES. MIP-1 $\alpha$  vio aumentada su concentración por la infección por VIH-1<sub>MN</sub> (163 ng/ml) con respecto al grupo control de células (93 ng/ml) ( $P < 0.0001$ ). El CS no generó cambios significativos en la concentración de MIP-1 $\alpha$ , aunque se observa una aparente disminución en su concentración en los grupos infectados y tratados con este glicoconjugado (Figura 11). Este resultado podría explicarse como resultado de la inhibición de la infección causada por CS. Los grupos infectados y sin infectar tratados con las diferentes concentraciones de GAGs presentan la misma tendencia de disminución mencionada anteriormente para MIP-1 $\beta$  y RANTES pues al aumentar la concentración de GAGs disminuye la de MIP-1 $\alpha$ . De igual forma en los grupos sin infección este comportamiento a la baja puede deberse a la interacción directa de los glicoconjugados sobre MIP-1 $\alpha$  y en las células infectadas a los altos niveles de inhibición de la infección (Gráfica 7).

La cuantificación de la expresión de CXCR4 no presentó ninguna diferencia entre grupos (Figura 14 B), sin embargo, se esperaba una disminución de la expresión de este receptor producto de su interacción con las proteínas gp120 del VIH-1<sub>MN</sub>. El no observar una disminución de la expresión fenotípica de CXCR4 en los dos modelos de infección con las cepas VIH-1<sub>III B</sub> y VIH-1<sub>MN</sub>, puede deberse a que al día 5 post-infección, en el cual se realizó la cuantificación de CXCR4, la mayoría de las células ya habían sido infectadas y los virus X4 habían entrado en una etapa de la infección con bajos niveles de replicación. CCR5 no presentó cambios en presencia de CS, GAGs o el VIH-1<sub>MN</sub> (Figura 14 C), lo que descarta cambios en su expresión por la acción de los glicoconjugados. De igual forma la expresión de CD4 no fue modificada de forma significativa por el CS, los GAGs o el VIH-1<sub>MN</sub>, aunque se observó una ligera disminución en la expresión de este receptor en los controles de

infección (Figura 14 A) lo que concuerda con su regulación a la baja causada por las proteínas virales Nef y Vpu y que ha sido previamente reportada.

Es importante mencionar que, aunque el valor obtenido de TCID<sub>50</sub> para la cepa VIH-1<sub>III</sub>B  $1.65 \times 10^6$ /ml fue mayor que el de VIH-1<sub>MN</sub>  $6.45 \times 10^3$ /ml (Tabla 4), lo cual indica una mayor infectividad del VIH-1<sub>III</sub>B, los GAGs inhibieron de forma más efectiva a esta cepa 91-100% (Gráfica 1) que a VIH-1<sub>MN</sub> 86-98 % (Gráfica 7). Este efecto puede deberse a las diferencias en la carga iónica positiva del dominio V3 de la glicoproteína gp120 entre ambas cepas, y que se atribuye a la presencia de aminoácidos básicos como arginina, lisina e histidina. Recordemos que los GAGs de la leche humana son moléculas polianiónicas constituidas de unidades repetidas de diferentes disacáridos con alto grado de sulfatación (Figura 2), por lo que los grupos sulfato que confieren la carga iónica negativa de los GAGs, son los que interaccionan con los aminoácidos básicos del dominio V3 de la gp120, bloqueando así la entrada del virus a su célula blanco CD4<sup>+</sup>. Se sabe que el dominio V3 es la región con mayor variabilidad genética de la envoltura viral. Por lo tanto, la secuencia de aminoácidos del dominio V3 no sólo afecta el tropismo de las cepas del VIH-1, sino también su interacción con los GAGs. Los resultados sugieren que la región V3 de la glicoproteína gp120 de VIH-1<sub>III</sub>B pudiera tener un mayor número de aminoácidos básicos (con carga iónica positiva) que la del VIH-1<sub>MN</sub>, haciéndola más susceptible a la interacción con los GAGs (Connell y Lortat-Jacob., 2013).

Los resultados obtenidos tanto en el modelo MT2/VIH-1<sub>III</sub>B como MT2/VIH-1<sub>MN</sub> indican que los GAGs no tienen un efecto de activación sobre las células MT2 que modifique la expresión del receptor CD4 o de los receptores CXCR4 y CCR5 o la expresión de sus ligandos, sin embargo, las metodologías que se utilizaron en este estudio para la

determinación de la activación celular, no parecen ser las más adecuadas o bien requieren de consideraciones adicionales para su realización, haciendo necesario la realización de más experimentos para validar los datos obtenidos. Otro factor importante a considerar, es aumentar la sensibilidad de las técnicas para la cuantificación de SDF-1, ya que esta quimiocina es esencial y no pudo ser cuantificada lo que no permitió determinar su participación en la inhibición de la infección por las cepas X4 a través de una competencia directa por el receptor CXCR4. Es importante considerar que los efectos tanto de las cepas virales empleadas como de los GAGs de la leche humana en estos modelos de infección con cepas X4 del VIH-1, posiblemente presenten diferencias a lo ya reportado, debido al tipo de células utilizado.

## Conclusiones

- ❖ Los GAGs de la leche humana son glicoconjugados con un alto grado de sulfatación, que demostraron ser inhibidores potentes de la infección de las células MT2, por cepas del VIH-1 con tropismo X4, en bajas concentraciones fisiológicas (hasta 6 veces menos), en los dos modelos *in vitro* que se utilizaron y el efecto inhibitorio fue dosis-dependiente.
- ❖ El efecto inhibidor de los GAGs de la leche humana en la infección de las células MT2 por las cepas VIH-1<sub>III B</sub> y VIH-1<sub>MN</sub>, fue más potente que la inhibición observada con el CS de cartílago de tiburón, ya que se requirió de una menor concentración de GAGs que del CS, para inhibir más del 80% de la infección por el VIH-1.
- ❖ Debido a que no se encontró que los GAGs de la leche humana tuvieran ningún efecto significativo sobre las células MT2 (CD4<sup>+</sup>), en cuanto a su estado de activación, a la expresión de los receptores para el VIH-1, ni en la producción de quimiocinas, el efecto inhibidor de los GAGs de la leche humana, se atribuye principalmente a su interacción directa con la glicoproteína gp120 de la envoltura viral.
- ❖ Los GAGs de la leche humana son un grupo de compuestos sulfatados naturales que podrían producirse por síntesis química para proponerse como candidatos a agentes microbicidas y contribuir a una nueva intervención para bloquear la entrada y por consecuencia la infección del VIH-1 a su célula blanco.

## **ANEXO**

### **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 cm<sup>2</sup>.
- Botellas de cultivo celular estériles de 75 cm<sup>2</sup>.
- 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**

- Suero fetal bovino inactivado a 56 °C durante 30 minutos y esterilizado por filtración.
- Medio RPMI 1640 en polvo.
- 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 tinte azul-tripán (0.4%).
- Estándar de condroitín sulfato de sodio de cartílago de tiburón Sigma-Aldrich®.
- Bicarbonato de sodio.
- Albúmina sérica bovina fracción V de Sigma-Aldrich®, número de catálogo A-4503.

### **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®, número de catálogo: NEK050B, que 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. Tabletas del substrato orto-fenilendiamina-HC (OPD).

7. Diluyente del substrato.
8. Solución de lavado 20X (PBS con 1% Tween 20 y 2% 2-cloroacetamida)
9. Solución de paro (ácido sulfúrico 4N).

### **2.3 Reactivos para la cuantificación de las quimiocinas MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES y SDF-1**

- Estuche de detección para MIP-1 $\alpha$  de R&D Systems®, número de catálogo DMA00.
- Estuche de detección para MIP-1 $\beta$  de R&D Systems®, número de catálogo DMB00.
- Estuche de detección para RANTES de R&D Systems®, número de catálogo DRN00B.
- Estuche de detección para SDF-1 de R&D Systems®, número de catálogo DSA00.

### **2.4 Reactivos para la detección de los receptores CD4, CXCR4, CCR5 y CD38 por citometría de flujo**

- Anticuerpo monoclonal humano anti-CD4 acoplado a APC de Becton Dickinson®, número de catálogo 555349.
- Anticuerpo monoclonal humano anti-CD184 (CXCR4) acoplado a PE de Becton Dickinson®, número de catálogo 555974.
- Anticuerpo monoclonal humano anti-CD195 (CCR5) acoplado a FITC de Becton Dickinson®, número de catálogo 555992.
- Anticuerpo monoclonal humano anti-CD38 acoplado a PE de Becton Dickinson®, número de catálogo 555460.
- PBA (PBS 1X con 1% de albúmina sérica bovina y 0.1% de azida de sodio).
- Cytotfix de Becton Dickinson®, número de catálogo 554655.

## **2.5 Reactivos para la cuantificación del flujo de Ca<sup>2+</sup> intracelular por citometría de flujo**

- Fluo-3 de Invitrogen®, número de catálogo F1241.
- Fura de Invitrogen®, número de catálogo F3021.
- Proteína recombinante humana SDF-1 de abcam®, número de catálogo ab9798.
- Ionomicina de Sigma-Aldrich®, número de catálogo I0634.

## **3. Equipos 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<sup>2</sup>.
- Microscopio óptico Olympus CH-2®.
- Microscopio invertido Swift®.
- Incubador de CO<sub>2</sub> Thermo Scientific Steri-Cult CO<sub>2</sub> incubator®.
- Centrífuga refrigerada de mesa. Marca Eppendorf 5810R®.
- Gabinete de bioseguridad clase 2 tipo A2 Thermo Scientific Serie 1300 ®.
- Ultracongelador ThermoFisher®.
- 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®.
- Citómetro de flujo modelo FACS Aria II de Becton Dickinson®.
- Citómetro de flujo modelo FACScalibur de Becton Dickinson®.

## Referencias Bibliográficas

- ONUSIDA. (2018). UNAIDS DATA 2018. Consultado el 28 de julio del 2018 de: [http://www.unaids.org/sites/default/files/media\\_asset/unaid-data-2018\\_en.pdf](http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/unaid-data-2018_en.pdf)
- CENSIDA (2018). Vigilancia Epidemiológica de casos de VIH/SIDA en México Registro Nacional de Casos de SIDA Actualización al 1er. trimestre del 2018. Consultado el 28 de julio del 2018 de: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/328400/RN\\_1er\\_trim\\_2018.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/328400/RN_1er_trim_2018.pdf)
- Fanales-Belasio, E., Raimondo, M., Suligoj, B., and Buttò, S. (2010). HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. *Annali dell'Istituto superiore di sanita*, 46, 5-14.
- Buonaguro, L., Tornesello, M. L., & Buonaguro, F. M. (2007). Human immunodeficiency virus type 1 subtype distribution in the worldwide epidemic: pathogenetic and therapeutic implications. *Journal of virology*, 81(19), 10209-10219.
- Blood, G. A. C. (2016). Human Immunodeficiency Virus (HIV). *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 43(3), 203.
- Berger, E. A., Murphy, P. M., and Farber, J. M. (1999). Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annual Review of Immunology*, 17(1), 657-700.
- Barré-Sinoussi, F., Ross, A. L., and Delfraissy, J. F. (2013). Past, present and future: 30 years of HIV research. *Nature Reviews Microbiology*, 11(12), 877.
- Shattock, R. J., and Moore, J. P. (2003). Inhibiting sexual transmission of HIV-1 infection. *Nature Reviews Microbiology*, 1(1), 25.

- Connell, B. J., and Lortat-Jacob, H. (2013). Human immunodeficiency virus and heparan sulfate: from attachment to entry inhibition. *Frontiers in Immunology*, 4, 385.
- Pauwels, R., and De Clercq, E. (1996). Development of vaginal microbicides for the prevention of heterosexual transmission of HIV. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 11(3), 211-221.
- Scordi-Bello, I. A., Mosoian, A., He, C., Chen, Y., Cheng, Y., Jarvis, G. A., and Herold, B. C. (2005). Candidate sulfonated and sulfated topical microbicides: comparison of anti-human immunodeficiency virus activities and mechanisms of action. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49 (9), 3607-3615.
- Newburg, D. S. (1996). Oligosaccharides and glycoconjugates in human milk: their role in host defense. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 1(3), 271-283.
- Newburg, D. S. (1999). Human milk glycoconjugates that inhibit pathogens. *Current Medicinal Chemistry*, 6(2), 117-128.
- Mikami, T., and Kitagawa, H. (2017). Sulfated glycosaminoglycans: their distinct roles in stem cell biology. *Glycoconjugate Journal*, 34(6), 725-735.
- Wang, M., Liu, X., Lyu, Z., Gu, H., Li, D., and Chen, H. (2017). Glycosaminoglycans (GAGs) and GAG mimetics regulate the behavior of stem cell differentiation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 150, 175-182.
- Gandhi, N. S., and Mancera, R. L. (2008). The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins. *Chemical Biology & Drug Design*, 72(6), 455-482.
- King, M. (2017). Glycosaminoglycans. The medical biochemistry page. Consultado el 28 de julio del 2018 de: <https://themedicalbiochemistrypage.org/glycans.php>

- Connective tissue and proteoglycans. (2018). Memorang. Consultado el 28 de julio del 2018 de: <https://www.memorangapp.com/flashcards/115042/Connective+Tissue+and+Proteoglycans/>
- Coppa, G. V., Gabrielli, O., Bertino, E., Zampini, L., Galeazzi, T., Padella, L., and Volpi, N. (2013). Human milk glycosaminoglycans: the state of the art and future perspectives. *Italian Journal of Pediatrics*, 39(1), 2.
- Maccari, F., Mantovani, V., Gabrielli, O., Carlucci, A., Zampini, L., Galeazzi, T., and Volpi, N. (2016). Metabolic fate of milk glycosaminoglycans in breastfed and formula fed newborns. *Glycoconjugate Journal*, 33(2), 181-188.
- Peila, C., Moro, G. E., Bertino, E., Cavallarin, L., Giribaldi, M., Giuliani, F., and Coscia, A. (2016). The effect of holder pasteurization on nutrients and biologically-active components in donor human milk: A review. *Nutrients*, 8(8), 477.
- Newburg, D. S., Linhardt, R. J., Ampofo, S. A., and Yolken, R. H. (1995). Human milk glycosaminoglycans inhibit HIV glycoprotein gp120 binding to its host cell CD4 receptor. *The Journal of Nutrition*, 125(3), 419-424.
- M. Viveros-Rogel, L.E. Soto-Ramírez, P. Chaturvedi, D.S. Newburg, G.M. Ruiz-Palacios. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 2004; Volume 554: Protecting Infants through Human Milk. Chapter: Anti-infective properties of Human milk and viral transmission via Human Milk. "Inhibition of HIV-1 infection *in vitro* by human milk sulfated glycolipids and glycosaminoglycans". pp: 481-487. Springer, Boston MA.
- Lyimo, M. A., Howell, A. L., Balandya, E., Eszterhas, S. K., and Connor, R. I. (2009). Innate factors in human breast milk inhibit cell-free HIV-1 but not cell-associated HIV-

1 infection of CD4+ cells. *JAIDS. Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 51(2), 117-124.

- Jennings, C.L., Bosch, R.J., Dragavon, J., Kabat, W., Shugarts, D.L., Boone, L., et al. (2004). The virology manual for HIV laboratories. National Institute for Allergy and Infectious Disease; <http://aactg.s-3.com/LabManual.htm>
- Maino, V. C., Suni, M. A., & Ruitenber, J. J. (1995). Rapid flow cytometric method for measuring lymphocyte subset activation. *Cytometry*, 20(2), 127-133.
- Rijkers, G. T., Justement, L. B., Griffioen, A. W., & Cambier, J. C. (1990). Improved method for measuring intracellular Ca<sup>++</sup> with fluo-3. *Cytometry*, 11(8), 923-927.
- Kaposi, A. S., Veress, G., Vasarhelyi, B., Macardle, P., Bailey, S., Tulassay, T., & Treszl, A. (2008). Cytometry-acquired calcium-flux data analysis in activated lymphocytes. *Cytometry Part A*, 73(3), 246-253.
- Kestens, L., Vanham, G., Gigase, P., Young, G., Hannet, I., Vanlangendonck, F., & Bach, B. A. (1992). Expression of activation antigens, HLA-DR and CD38, on CD8 lymphocytes during HIV-1 infection. *AIDS*, 6(8), 793-797.
- Kestens, L., Vanham, G., Vereecken, C., Vandenbruaene, M., Vercauteren, G., Colebunders, R. L., & Gigase, P. L. (1994). Selective increase of activation antigens HLA-DR and CD38 on CD45RO<sup>+</sup> T lymphocytes during HIV-1 infection. *Clinical & Experimental Immunology*, 95(3), 436-441.
- Hazenberg, M. D., Otto, S. A., van Benthem, B. H., Roos, M. T., Coutinho, R. A., Lange, J. M., & Miedema, F. (2003). Persistent immune activation in HIV-1 infection is associated with progression to AIDS. *AIDS*, 17(13), 1881-1888.
- Ramakrishnan, M. A. (2016). Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World Journal of Virology*, 5(2), 85.

- Koopmann, W., & Krangel, M. S. (1997). Identification of a glycosaminoglycan-binding site in chemokine macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ . *Journal of Biological Chemistry*, 272(15), 10103-10109.
- Martin, L., Blanpain, C., Garnier, P., Wittamer, V., Parmentier, M., & Vita, C. (2001). Structural and functional analysis of the RANTES-glycosaminoglycans interactions. *Biochemistry*, 40(21), 6303-6318.
- Wolf Lindwasser, O., Chaudhuri, R., & Bonifacino, J. S. (2007). Mechanisms of CD4 downregulation by the Nef and Vpu proteins of primate immunodeficiency viruses. *Current Molecular Medicine*, 7(2), 171-184.
- Arenzana-Seisdedos, F. (2015). SDF-1/CXCL12: a chemokine in the life cycle of HIV. *Frontiers in immunology*, 6, 256.