

T

1190

 XOLMILLO SERVICIOS DE INFORMACION  
ARCHIVO HISTORICO

124227

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



Casa abierta al tiempo

CARACTERIZACIÓN Y DESARROLLO DE RECEPTORES ANÁLOGOS  
GLICOCONJUGADOS PARA EL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA  
HUMANA TIPO 1 (VIH-1)

T E S I S

Que para obtener el grado de  
**Doctor en Ciencias Biológicas**

P R E S E N T A

**Mónica Viveros Rogel**

Comité Tutorial:

Cotutor: Dr. Luis Enrique Soto Ramírez

Cotutor: Dr. Rafael Bojalil Parra

Asesora: Dra. Goar Gevorkian Markosian

Febrero del 2006

El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las  
Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó

Mónica Viveros Rogel

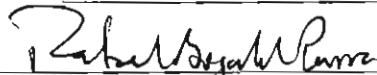
El día 28 de Febrero del año de 2006

Jurado:

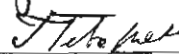
Cotutor: Dr. Luis Enrique Soto Ramírez



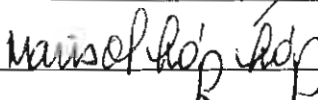
Cotutor: Dr. Rafael Bojalil Parra



Asesora: Dra. Goar Gevorkian Markosian



Sinodal: Dra. Marisol López López



Sinodal: Dr. Guillermo Miguel Ruiz-Palacios y Santos



“El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACYT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93”.

## El fracaso y el error

Los fracasos y los errores que cometemos sin querer, son una forma de aprendizaje, con ellos se adquiere la experiencia para no volver a cometerlos. Se puede aprender más de un fracaso que de un éxito. Pero después de un fracaso hay que probar de nuevo, tratando de no repetir el mismo error y buscar la razón por la cual hemos fallado. Se debe probar poco a poco y correr pequeños riesgos para que sirvan de práctica y acostumbrarse a no tomar tan a pecho nuestras fallas. Y si al probar volvemos a fallar, debemos intentarlo de nuevo, porque si nunca nos arriesgamos a fallar, nos quedaremos estancados.

## AGRADECIMIENTOS

- Al Dr. Luis Enrique Soto por la dirección de esta tesis y por darme la oportunidad de trabajar con su maravilloso grupo de investigación. Gracias por darme la libertad de realizar mi trabajo, por sus ideas y por su apoyo y cariño que me ha brindado siempre.
- Al Dr. Guillermo Ruiz-Palacios por su interés genuino en mi trabajo, por su apoyo y por darme una nueva oportunidad de seguir en este camino. Gracias.
- Al Dr. Rafael Bojalil por su apoyo incondicional y sus observaciones para la realización de este trabajo.
- A los miembros del jurado por enriquecer este trabajo con sus observaciones y sugerencias y por la revisión de esta tesis.
- A la Dra. Goar Gevorkian, gracias por tus enseñanzas, tus consejos y en especial por tu motivación, apoyo y amistad de tanto tiempo.
- Al Dr. David Newburg por ser un gran ejemplo de dedicación, entrega, lucha y amor por este difícil camino que es la investigación científica. Gracias por tus invaluable enseñanzas y tu apoyo.
- A la Dra. Luz María López por las facilidades prestadas para realizar la purificación de los compuestos glicolípidos en su laboratorio.
- A la Bióloga Erika Segura por su apoyo técnico en la purificación de los compuestos glicolípidos.
- A Luis y a Roberto por su invaluable e incondicional apoyo, por escucharme, tenerme paciencia e impulsarme a seguir adelante siempre. El camino hubiera sido muy difícil sin ustedes. Gracias por estar presentes en las buenas y en las malas y sobretodo gracias por ser mis amigos y por el gusto de compartir tantas experiencias juntos.

## DEDICATORIA

- A mi familia: mis padres, Carlos, Gerardo, Jorge, Verónica, Andrea y a mis mascotas, por ser mi equilibrio, mi fuente de inspiración y la fuerza que me motiva. A mis padres por su cariño, apoyo y por ser un gran ejemplo de esfuerzo, lucha y dedicación.
- A TODOS mis amigos, los de siempre y los de ahora, quienes son parte fundamental en mi vida y con quienes he compartido lo mejor de ella. Gracias por estar presentes.
- A todos los que han estado en el laboratorio de Virología Molecular, por ser mi segunda familia, por las experiencias y sueños compartidos, por las enseñanzas, la convivencia diaria, por su cariño y en especial por su amistad. Por que de todos ellos he aprendido algo. Gracias a todos ellos: Roberto, Luis, Erik, Gonzalo, Erika, Carlos, Angelina, Edna, Alberto, Daniel, Marlene, Minerva, Adriana, Karla, Saida, Memo, Cristian, Lucio, Verónica, Mario, Gricelda, Luis Z., Omar, Moisés, Eloísa, Miriam y Elsa. A los que sólo estuvieron brevemente con nosotros pero no por eso son menos importantes: Mariana, Salvador, Betty y David y a los que seguirán llegando al laboratorio para aprender y enriquecer el quehacer científico.
- A mis amigos de Serología y de la Clínica de diarreas por su apoyo y cariño.
- Al Departamento de Infectología, por adoptarme. En especial a Jazmín, Elba, Elsy, Roxana, Lucy y Ramiro. Por ayudarme siempre y “facilitar” las cosas.
- A las instituciones donde me he formado como estudiante y como profesionista: a la UNAM (Facultad de Química y el Instituto de Investigaciones Biomédicas), al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán y a la UAM.
- A todos mis maestros quienes contribuyeron a mi formación académica.
- A todos los pacientes con VIH por enseñarme que lo más importante es la lucha por la vida y el tener siempre fé y esperanza. En especial a Ángel, Marco, Arturo y a Héctor, gracias por su cariño y su ejemplo de vida.

Este trabajo se realizó casi en su totalidad en el laboratorio de Virología Molecular del Departamento de Infectología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, con la asesoría del Dr. Luis Enrique Soto. La parte final del trabajo se realizó en el Departamento de Gastroenterología Pediátrica y Nutrición del Hospital General de Massachusetts, Boston, EUA, con la asesoría del Dr. David Newburg, y en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, en el laboratorio de la Dra. Luz María López Marín.



# ÍNDICE

<b>Nombre de la sección</b>	<b>Número de página</b>
RESUMEN -----	1
SUMMARY -----	3
INTRODUCCIÓN -----	5
JUSTIFICACIÓN -----	21
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS -----	23
DISEÑO EXPERIMENTAL -----	25
MATERIALES Y MÉTODOS -----	27
RESULTADOS -----	53
DISCUSIÓN -----	73
CONCLUSIONES -----	79
PERSPECTIVAS -----	81
APÉNDICE I -----	82
GLOSARIO -----	87
BIBLIOGRAFÍA -----	91

## RESUMEN

Los glicolípidos sulfatados (SG) y los glicosaminoglicanos (GAG) presentes en la superficie del epitelio colónico y vaginal, así como en las células de la microglia, se unen a la glicoproteína de superficie gp120 del VIH-1, lo que sugiere que estos glicoconjugados pueden desempeñar una función en la infección por el VIH. El objetivo principal de este trabajo fue el de evaluar la capacidad de los SG y GAG extraídos de la leche humana, para inhibir la infección del VIH-1 *in vitro*.

Los SG y GAG se purificaron a partir de una mezcla de leches humanas y se caracterizaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y por espectrometría de masas. Se probaron ocho diferentes preparaciones de SG y una de GAG en los ensayos de inhibición de la infección. Se utilizaron dos aislados virales adaptados al laboratorio: VIH-1<sub>ADA</sub> (macrofagotrópico) y VIH-1<sub>SF2</sub> (linfotrópico) para los ensayos de inhibición con células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica (MDM).

Los ensayos de inhibición se realizaron preincubando diluciones seriadas de los glicoconjugados con cada uno de los virus, para posteriormente, infectar a la monocapa de MDM y a los PBMC. Después de cuatro días se determinó la cantidad del antígeno p24 de la cápside del VIH-1 presente en los sobrenadantes de cultivos, mediante un ensayo inmonoenzimático de ELISA de captura del antígeno viral. Se definió como una inhibición significativa de la infectividad viral al valor en donde se redujo más del 80% la concentración del antígeno p24. Los GAG mostraron un efecto inhibitorio bajo (8-44%) en la infección de PBMC por el VIH-1. La tabla 1 muestra la cantidad mínima de

glicolípidos sulfatados, expresados como volúmenes de la leche humana de la cual fueron extraídos, que inhibieron más del 80% la infección del VIH-1.

**Tabla 1. Cantidad mínima de los glicolípidos sulfatados que inhibieron más del 80% la infección del VIH-1 (ml)**

<b>Células blanco</b>	<b>VIH-1<sub>ADA</sub></b>	<b>VIH-1<sub>SF2</sub></b>
MDM	0.5	0.5
PBMC	0.25	0.25

Estos resultados muestran que los glicolípidos sulfatados extraídos de la leche humana, inhiben la infección de PBMC y MDM por aislados de laboratorio del VIH-1 *in vitro*.

## SUMMARY

Sulfated glycolipids (SG) and glycosaminoglycans (GAG) present on the surface of colonic, vaginal epithelial, and neuroglial cells bind to HIV gp120, suggesting that these glycoconjugates may have a role in HIV infection. The major goal of our study was to test the ability of SG and GAG from human milk to inhibit HIV-1 infection in vitro. SG and GAG were purified from pooled human milk and characterized by high pressure liquid chromatography (HPLC) and mass spectrometry. Eight different preparations of SG and one of GAG were tested for inhibition of infection. Two laboratory isolates, HIV-1<sub>ADA</sub> (macrophage-tropic virus) and HIV-1<sub>SF2</sub> (lymphotropic virus), were used for inhibition assays using peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and monocyte-derived macrophages (MDM). Inhibition assays were performed by preincubation of serial dilutions of glycoconjugates with each virus before infecting the monolayer of cultured MDM and PBMC. After 4 days, HIV p24 antigen was quantified by enzyme immunoassay (EIA) in culture supernatants. Significant inhibition of viral infectivity was defined as >80% reduction in p24 concentration. GAG showed a low inhibitory effect (8-44%) in HIV-1 infection of PBMC. Table 1 shows the minimal amounts of the most active SG fractions, expressed as volumes of human milk from which they were extracted, that inhibit >80% HIV-1 infection.

**Table 1. Minimal amounts of sulfated glycolipids that inhibit > 80% HIV-1 infection  
(ml).**

<b>Target cells</b>	<b>HIV-1<sub>ADA</sub></b>	<b>HIV-1<sub>SF2</sub></b>
MDM	0.5	0.5
PBMC	0.25	0.25

These results show that sulfated glycolipids from human milk inhibit infection of PBMC and MDM by HIV-1 laboratory isolates *in vitro*.

# INTRODUCCIÓN

## A. Generalidades de la pandemia del VIH/SIDA

En el principio del siglo 21, el Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (VIH-1), que es el agente causal del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), continúa siendo un gran problema de salud a nivel mundial, especialmente en los países en vías de desarrollo. Desde el inicio de la pandemia, hace más de dos décadas, más de 60 millones de personas han sido infectadas con el VIH y más de 20 millones de personas han fallecido a causa del SIDA. De acuerdo con las cifras reportadas por el Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA (ONUSIDA) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), hasta Diciembre del 2005, existen 40.3 millones de personas viviendo con el VIH, de las cuales 38 millones son adultos mayores de 15 años y 2.3 millones son menores de 15 años. Durante el 2005 se reportaron 4.9 millones de nuevas infecciones en el mundo y 3.1 millones de defunciones a causa del SIDA. Alrededor del 90% de las personas infectadas con el VIH viven en los países en vías de desarrollo, siendo la región de África subsahariana la de mayor prevalencia con 25.8 millones de personas infectadas, seguida de la región de Asia meridional y sudoriental con 7.4 millones de casos y de América Latina con 1.8 millones de casos reportados (1).

Desde 1983, año en que se inició la epidemia en México, hasta el 15 de Noviembre del 2005, la Secretaría de Salud y el Centro Nacional para la Prevención y el Control del VIH/SIDA (CENSIDA), han contabilizado en forma acumulada, 98,933 casos de SIDA, de los cuales el 83% son hombres y el 17% son mujeres. Tan sólo durante el 2005 se notificaron 4,965 casos de SIDA registrados. Considerando el subregistro y la notificación

tardía, se estima que existen alrededor de 180,000 personas adultas infectadas con el VIH en nuestro país (2).

En el año 2000, el SIDA ocupó el lugar 17 como causa de muerte en México, con una tasa de 4.1 por cada 100,000 habitantes. La población más afectada por la epidemia ha sido la población de 25 a 34 años de edad, en donde el SIDA representó la cuarta causa de muerte entre los hombres y la séptima causa entre las mujeres (3). La prevalencia de VIH/SIDA en México es del 0.3% entre la población adulta; el 92.2% de los casos acumulados de SIDA se han originado por transmisión sexual (y se concentra fundamentalmente en hombres que tienen sexo con hombres), 5.3% por vía sanguínea, 2.2% por vía perinatal y menos del 1% en la categoría combinada de usuarios de drogas intravenosas/hombres que tienen sexo con hombres.

Considerando el número total de casos reportados, México se ubica en el tercer lugar en el continente americano, después de Estados Unidos y Brasil; sin embargo, de acuerdo con la prevalencia del VIH en la población adulta (que es el indicador que utiliza ONUSIDA para comparaciones internacionales), México se ubica en el vigésimo tercer lugar en América y el Caribe, y en el sitio setenta y siete a nivel mundial.

En esta tesis se trabajó con aislados del VIH-1, por lo que los antecedentes se enfocan sólo en este tipo del virus.

## **B. Estructura y organización genómica del VIH-1**

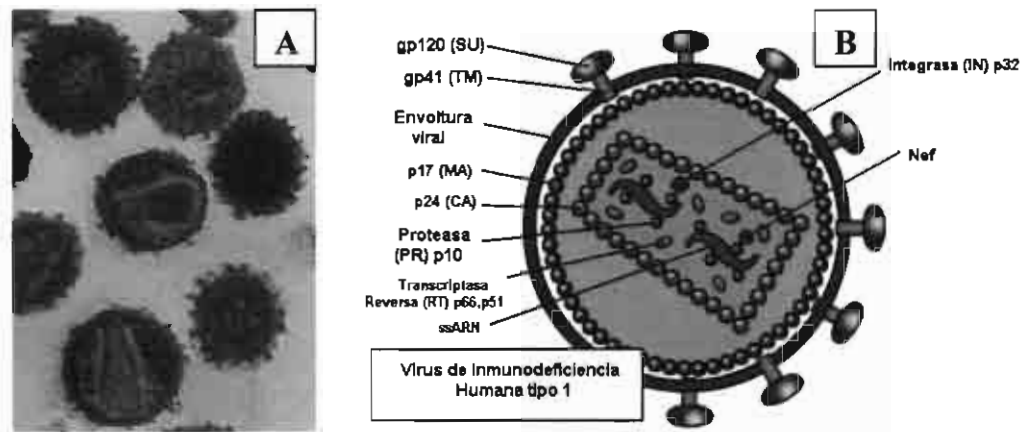
El VIH-1 es un retrovirus que pertenece a la familia *Retroviridae*, grupo de virus encapsulados que poseen la enzima transcriptasa reversa, que permite que el virus sintetice una copia de ADN de su genoma ARN. El VIH también pertenece al género de los

Lentivirus, que se caracterizan por tener períodos largos de incubación y causar inmunodeficiencia y encefalopatía (4).

Las partículas virales maduras miden entre 100 y 130 nm, son de forma esférica y están formadas por una doble membrana lipídica de origen celular denominada envoltura (ENV), que contiene 2 proteínas virales asociadas por enlaces no covalentes: una glicoproteína de superficie (SU) (gp120) y una transmembranal (TM) (gp41). Las proteínas de la envoltura se asocian en forma de trímeros, para formar alrededor de 72 protuberancias ancladas en la superficie. Después de la envoltura y hacia el interior del virión, se encuentra la matriz viral (MA) constituida por la proteína p17, y dentro de la matriz se encuentra la cápside (CA) de forma cónica, y que está formada por la proteína p24. La cápside contiene 2 cadenas sencillas de ARN, a las que se asocian las proteínas de la nucleocápside (NC) (p7). La transcriptasa reversa (RT) (p66, p51), la proteasa (PR) (p10) y la integrasa (IN) (p32) son las 3 enzimas que utiliza el virus para su replicación y se encuentran en la cápside. Las partículas virales también contienen a las proteínas accesorias: Nef, Vif y Vpr que actúan como adaptadores multifuncionales capaces de reclutar y modular a los procesos básicos de la célula huésped para optimizar la replicación viral. Existen otras proteínas accesorias Tat, Rev y Vpu que funcionan en la célula huésped (5) (Figura 1).

La envoltura también contiene algunas proteínas de la membrana celular, derivadas de la célula huésped como son: antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I y II, moléculas de adhesión y actina (6).





**Figura 1. Estructura del VIH-1.** A. Imagen de microscopía electrónica del VIH-1. B. Dibujo que representa la estructura morfológica del VIH-1. (7)

El genoma viral está compuesto por dos cadenas sencillas de ARN de polaridad positiva y contiene nueve genes constituidos por 9,749 nucleótidos. La organización genómica del VIH-1 difiere de otros retrovirus en que además de los genes estructurales *gag*, *pol* y *env*, presenta múltiples genes accesorios con funciones regulatorias: *tat* (transactivador de la transcripción), *rev* (regulador de la expresión de la proteína del virión), *nef* (factor regulador negativo, aunque es un término mal empleado ya que realmente tiene un efecto de promotor), *vif* (factor de infectividad del virus), *vpr* (proteína viral R) y *vpu* (proteína viral U). Los genes *gag* codifican para las proteínas estructurales internas y proteínas de la cápside y son: p7, p17 y p24; los genes *pol* codifican para las tres enzimas necesarias para la replicación viral: transcriptasa reversa (p51 y p66), proteasa (p10) y la integrasa (p32) y los genes *env*, que codifican para las glicoproteínas de la envoltura viral: gp120 y gp41 (7) (Figura 2).

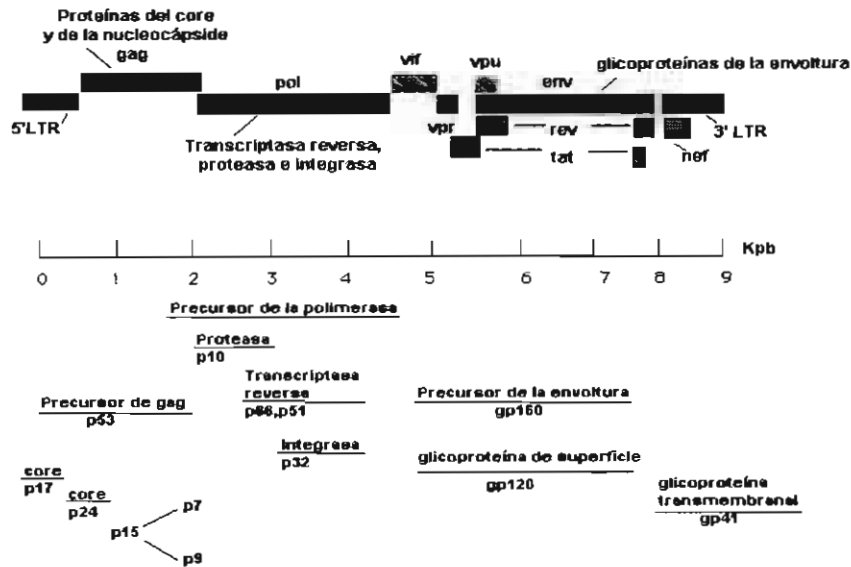


Figura 2. Organización genómica del VIH-1 (7).

### C. Variabilidad genética del VIH-1

El VIH es un virus muy variable, es decir, que tiene la capacidad de mutar muy fácilmente. Esto significa que pueden existir muchas cepas diferentes del virus en el organismo de un mismo individuo infectado. Con base en las similitudes genéticas, las numerosas cepas del virus se clasifican en tipos, grupos y subtipos.

Desde 1983 año en que se aisló al VIH, se han identificado dos tipos del virus: el VIH tipo 1 (VIH-1) que se encuentra distribuido en la mayor parte del mundo, principalmente en Europa, América y África Central, y el VIH tipo 2 (VIH-2), que se encuentra localizado en África occidental (8,9).

Las cepas del VIH-1 se dividen actualmente en 3 grupos: el grupo M (*major*), el O (*outlier*) y el N (*new*). Más del 90% de las infecciones pertenecen al grupo M y dentro de este grupo se han identificado al menos 9 subtipos virales (también llamados clades): A, B,

C, D, F, G, H , J y K y 15 formas recombinantes circulantes (CRFs), que son combinaciones de varios subtipos (10-14).

La expansión continua de la diversidad genética del VIH-1 con el tiempo, es el resultado de varios factores como son: la capacidad tan alta de cometer errores durante la transcripción del ARN viral, que posee la enzima transcriptasa reversa (RT) del virus, (15,16), el cambio brusco del VIH-1 en los individuos infectados, las recombinaciones virales y las presiones generadas por la respuesta inmune del huésped y por las drogas antivirales (17-19). Además, la respuesta inmune del huésped está relacionada con el sistema del HLA (antígeno de leucocitos humanos), cuyos polimorfismos varían entre las poblaciones humanas y pueden contribuir a una evolución genética viral diferente en varias partes del mundo (20).

#### **D. Ciclo de vida del VIH-1**

El ciclo de la replicación del genoma viral se divide en 2 fases: temprana y tardía. La fase temprana comienza con el reconocimiento de la célula blanco por el virión maduro e involucra a todos los procesos que llevan a la integración del ADN genómico viral en el cromosoma de la célula huésped. La fase tardía comienza con la transcripción y expresión regulada del genoma viral integrado, la traducción de las proteínas virales y culmina con el ensamblaje, gemación y maduración del virus (5).

La infección por el VIH-1 inicia con la unión de gp120 a su receptor de mayor afinidad, la molécula CD4 de la superficie de las células susceptibles: linfocitos T, macrófagos, células dendríticas y de la microglía. Existen otras moléculas de la superficie celular que funcionan como receptores secundarios o correceptores para el virus: los

receptores para quimiocinas: CCR5 (en el caso de los macrófagos) y CXCR4 o fusina (en el caso de los linfocitos T) (21-24). La unión de gp120 y CD4 produce cambios conformacionales en ambas moléculas que exponen ciertos epítopes de la cubierta viral, favoreciendo la unión a los correceptores. Después de la unión del virus a los correceptores, la proteína transmembranal gp41 se desdobla y expone su dominio fusogénico para iniciar la fusión con la membrana celular e iniciar el proceso de penetración. A continuación la cubierta del ARN genómico se pierde internalizándose a la célula blanco. La enzima transcriptasa reversa cataliza la transcripción del ARN genómico a ADN de doble cadena en el interior de la cápside. El ADN es translocado al núcleo, donde es integrado a los cromosomas de la célula huésped de manera aleatoria por medio de la enzima integrasa. En esta etapa el provirus puede permanecer inactivo o puede manifestar diversos niveles de expresión genética hasta la producción activa del virus. Al activarse el provirus, inicia la transcripción de los genes estructurales y la traducción de los mismos para producir las proteínas virales. La membrana plasmática se modifica al insertarse las proteínas gp120 y gp41; el ARN viral y las proteínas de la cápside se ensamblan por debajo de ésta y se adquiere la membrana modificada de la célula huésped, como su envoltura en un proceso denominado gemación. La replicación del virus dentro de la célula huésped es modulada por factores virales y celulares, lo que conlleva a 3 caminos: que el provirus quede integrado al ADN celular y permanezca latente, que la replicación sea controlada y se produzca una cantidad moderada de virus sin la muerte de la célula, o la producción masiva de virus acompañada de lisis celular (25) (Figura 3).

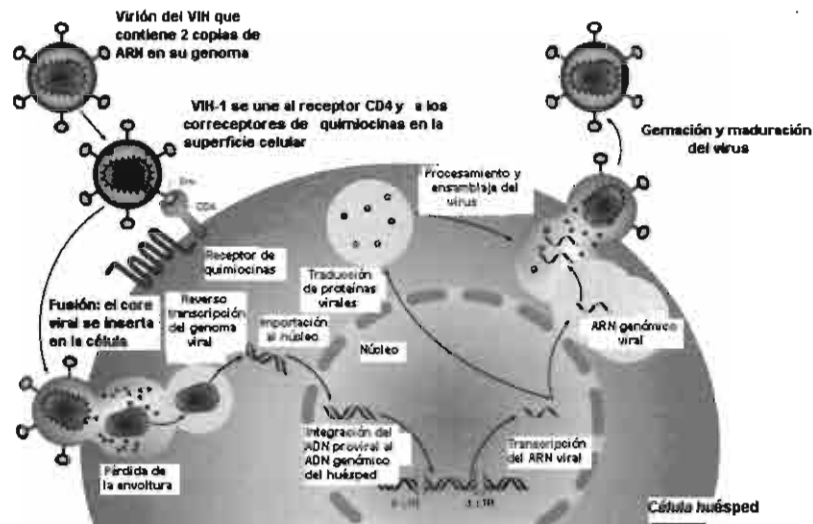


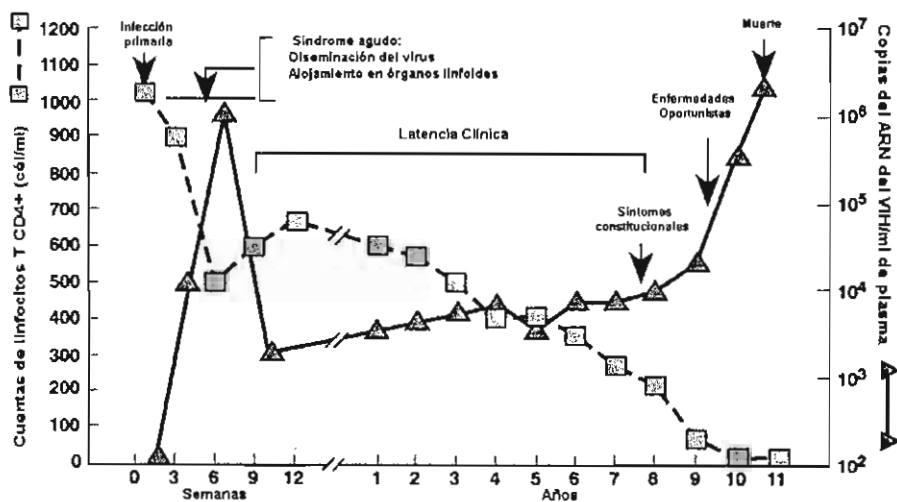
Figura 3. Ciclo de vida del VIH-1 (10).

Además de los receptores y correceptores específicos para el VIH-1, existen diversas moléculas de la membrana celular que propician el contacto del virus con su célula blanco, así como también el contacto célula-célula, favoreciéndose así la formación de sincicios. Entre estas moléculas membranales destacan las adhesinas (ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, VCAM-1, LFA-1), los glicoconjugados (glicoproteínas, glicoesfingolípidos, glicosaminoglicanos), lectinas tipo C tales como DC-SIGN y DC-SIGNR, tangerina y el receptor de manosa (26-31).

### E. Historia natural de la infección por el VIH-1

La infección por el VIH-I se caracteriza por la pérdida significativa, constante y progresiva de los linfocitos T CD4+ y el aumento de la cantidad de virus detectado en la sangre periférica de los individuos infectados (32). Los niveles de linfocitos T CD4+ y de carga viral en sangre periférica, son los principales marcadores clínicos que se utilizan para

monitorear la progresión de la enfermedad y para el manejo clínico del paciente (33). La historia natural de la infección se esquematiza en la **Figura 4**, donde se observa que se divide básicamente en 3 etapas: la infección aguda (dura de una semana a 3 meses y comprende desde la infección inicial, el síndrome agudo y la respuesta inmune específica para el VIH), la etapa de latencia clínica (10 a 11 años en promedio en los pacientes adultos sin tratamiento antirretroviral) y el desarrollo del SIDA (2 años en promedio)(34).



**Figura 4. Historia natural de la infección por el VIH-1 (34).**

Después de la infección inicial, del 40 al 70% de los infectados entran en la fase aguda y desarrollan síntomas semejantes al resfriado, diarrea y linfadenopatía generalizada. La fase aguda se resuelve generalmente en 2 a 3 semanas y comienza el período de latencia clínica, durante el cual la carga viral se mantiene estable aunque con algunas fluctuaciones, al igual que los niveles de los linfocitos CD4, que llegan a estar en los niveles normales o se estabilizan en niveles bajos o declinan lentamente. Aunque no se presentan síntomas durante este período, el virus permanece activo en el sistema linfoide y

su replicación en las células T puede ocasionar la muerte de hasta 10 billones de células por día. Conforme disminuye el número de células CD4+ comienza la aparición de los síntomas ya que el virus ya no está delimitado a los nódulos linfáticos, sino que está diseminado en la sangre. Es en esta etapa cuando comienza el desarrollo del SIDA, que es el estado terminal de la infección por el VIH. Cuando el número de CD4+ está por debajo de las 200 células/ml, se manifiestan las infecciones oportunistas (neumonía causada por *Pneumocystis carinii*, sarcoma de Kaposi, candidiasis, toxoplasmosis, encefalopatía, etc) y las neoplasias poco comunes.

Aunque el tiempo promedio en que ocurre la infección por el VIH y el desarrollo del SIDA en adultos es de 10 a 11 años (35,36), existen algunos individuos infectados que evolucionan rápidamente al SIDA en menos de 5 años, se les denomina progresores rápidos y constituyen menos del 5% de la población infectada (37,38). Por otro lado, existen los individuos de larga sobrevivencia, llamados también no-progresores o progresores lentos, que permanecen asintomáticos, sin evidencia de deterioro inmunológico y consecuentemente de lenta evolución clínica, por más de 20 años. Estos individuos constituyen menos del 10% de la población infectada y presentan niveles normales de linfocitos T CD4+ y con una carga viral baja aún sin haber recibido el tratamiento antirretroviral (39,40).

Aunque aún no se conocen las bases biológicas de la variabilidad de la progresión a SIDA en los individuos infectados, la información que existe hasta ahora, revela que puede deberse a la contribución de varios factores, entre ellos están: las diferentes cepas virales (cepas atenuadas del VIH-1)(41,42), la respuesta inmune antiviral (anticuerpos neutralizantes, linfocitos T citotóxicos CD8+)(43-47), los factores genéticos del huésped

(haplotipos del HLA y genotipos del correceptor CCR5) (48-51) y la exposición a cofactores microbianos (52) o ambientales.

## **F. La paradoja de la leche humana: ¿vector de transmisión del VIH-1 o fuente de agentes antivirales?**

### **F.1. La leche humana como vector de transmisión del VIH-1**

Como se mencionó con anterioridad, la transmisión vertical del VIH-1 o transmisión de la madre al infante, es la tercera causa de transmisión del virus en los individuos infectados; y se estima que la transmisión a través de la lactancia prolongada, es la tercera parte o hasta la mitad de las nuevas infecciones en infantes que ocurren en el mundo (53-56). El mecanismo, el sitio de entrada y las rutas de la transmisión vertical del VIH a través de la lactancia no se han esclarecido del todo. El VIH-1 se expresa en el calostro y en la leche madura como partícula libre o en las células infectadas, pero aún se desconoce cuál de estas 2 formas se asocia con la transmisión. El virus también se propaga por las células epiteliales en los alveolos mamarios y en los ductos (57,58).

Aunque el riesgo de la transmisión del VIH por la leche materna persiste durante la lactancia, el riesgo de transmisión es mayor durante los primeros 4 a 6 meses, cuando la carga del ARN viral en el calostro y en la primera leche son significativamente mayores que en la leche materna madura (59).

El riesgo de la transmisión del VIH-1 a través de la leche humana se atribuye tanto a factores maternos como a la susceptibilidad individual del infante. Entre estos factores se han descrito: el tamaño del inóculo viral, la cantidad de virus libre o de células infectadas con el VIH-1, la duración de la lactancia, la susceptibilidad individual y la respuesta inmune local específica (60-63). La mastitis o inflamación del seno materno y la presencia de absesos en el seno, puede también aumentar la propagación del VIH-1 en la leche (64).



## F.2. La leche humana como fuente de agentes antivirales

Aunque la leche humana puede ser una fuente de transmisión del VIH-1 al recién nacido, este fluido también contiene una gran cantidad de sustancias que pueden bloquear o modular la infección del virus. En la **Tabla 2** se describen los principales factores no-inmunes, preinmunes e inmunes que pueden modular la infectividad de la leche humana y por consecuencia, el riesgo de la transmisión del virus durante la lactancia.

**Tabla 2. Factores con actividad anti-VIH-1 en la leche humana\***

<b>Solubles/Humorales (inmunes/preinmunes)</b>	<b>Celulares (inmunes/preinmunes)</b>	<b>Innatos (no-inmunes)</b>
Anticuerpos VIH-específicos IgG, IgA <sub>s</sub> , IgM	Linfocitos T CD8+ citotóxicos específicos para el VIH	Inhibidor de proteasa de los leucocitos secretores (SLPI)
Quimiocinas: RANTES	Linfocitos T CD4+ cooperadores específicos para el VIH	Lisozima
Citocinas: Interferón γ, Interleucinas 1β, 6, 8 y 10, factor de crecimiento transformante (TGF)β, β- defensina, S-selectina, L-selectina	Células asesinas naturales (NK)	Lactoferrina, fibronectina, mucina , proteínas polianiónicas
Anticuerpos naturales CD14	Macrófagos	Lípidos
Molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1) y molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1)		

\*Referencias: 65-78

### **F.3. Componentes de la leche humana**

Los principales componentes de la leche humana se distribuyen de la siguiente manera: las grasas o lípidos (crema de la leche) constituyen el 4% (4.19 g/dl) y en ellas se incluyen al colesterol, los triglicéridos, fosfolípidos, lípidos solubles y hormonas; el suero de la leche que está compuesto principalmente por los carbohidratos, entre los cuales el principal componente es la lactosa, 6% (6.7 g/dl), la glucosa y los oligosacáridos 1%, la lactoferrina que es la principal glicoproteína de la leche 1% (0.2 g/dl), la inmunoglobulina secretora IgA (IgA<sub>s</sub>) y los iones monovalentes: sodio, potasio y cloro. Un tercer componente de la leche humana son las células, entre las cuales destacan las células epiteliales y los leucocitos: macrófagos, neutrófilos y linfocitos. Las micelas de caseína y las cenizas constituyen los componentes menos abundantes, 0.2% y 0.3%, respectivamente (79,80).

### **F.4. Carbohidratos de la leche humana con actividad anti-VIH**

La leche humana contiene un gran número y cantidad de carbohidratos complejos como los oligosacáridos y los glicoconjugados (glicolípidos, glicoproteínas, mucinas y glicosaminoglicanos), algunos de los cuales son biológicamente activos y que protegen al infante de una gran variedad de patógenos infecciosos que incluye bacterias, virus, hongos y parásitos (81-86). Se ha descrito que la actividad biológica de estos compuestos depende de la estructura de los glicanos, ya que los azúcares del extremo terminal del glicano, son vulnerables a la ruptura ocasionada por las glicosidasas, enzimas que hidrolizan a los oligosacáridos y glicoconjugados y que también están presentes en la leche (87).

Un gran número de patógenos utilizan a las proteínas unidas a carbohidratos (glicoproteínas) para unirse a las células blanco e iniciar un proceso infeccioso. La primera línea de defensa contra estas enfermedades infecciosas consiste en un “señuelo” de oligosacáridos presentes en la capa de la mucosa y que recubren a todas las células epiteliales y están presentes también en la saliva, lágrimas, orina, sudor y en la leche materna. El señuelo de oligosacáridos se une a las glicoproteínas de los microbios y los patógenos son erradicados por un mecanismo fisiológico y característico del tejido específico. Los oligosacáridos solubles pueden prevenir la entrada del microorganismo o bien, separar a éste una vez que ya se ha adherido a su célula blanco.

En el caso del VIH-1, se han descrito varios compuestos de naturaleza sacárida que están involucrados en la interacción del virus con su célula blanco. Recientemente se ha descubierto que en las células CD4+, los glicoesfingolípidos tienen un papel predominante en el anclaje del virus a la célula y el subsecuente uso de los receptores CD4 y de quimiocinas. En ese estudio se documentó que los glicolípidos involucrados no forman parte de los receptores, pero se encuentran en regiones ricas en estos compuestos, que por otra parte son necesarios para el proceso final de la entrada viral. Otro punto de gran relevancia es que el glicoesfingolípido varía de acuerdo al tropismo del virus, lo que hace más interesante aún el papel de estos compuestos de anclaje primario en la infección por el VIH (88).

En el caso de las células CD4 negativas (células colónicas y neurales), se ha demostrado claramente el papel de un glicolípido, la galactosilceramida como ligando natural del VIH (89,90). Esta molécula se une directamente a la región inmunodominante de la gp120, denominada V3 y por lo tanto, análogos de este compuesto han podido por

bloqueo directo, inhibir la entrada viral en células CD4 negativas, aunque debido a que se unen a V3, también inhiben la entrada a células CD4 positivas (91,92).

Los glicolípidos sulfatados han sido reportados por varios autores, como receptores para una variedad de microbios, incluyendo al VIH-1 (93-97). Los glicolípidos están presentes en la superficie de las membranas celulares y el dominio de las membranas que es rico en glicolípidos, curiosamente también incluye a proteínas relacionadas con la transducción de señales intracelulares. Algunas investigaciones han sugerido que los glicolípidos sulfatados desempeñan funciones importantes en las áreas del reconocimiento celular, en la adhesión célula-célula, en la migración y en la transducción de señales mediada por los receptores (98,99). La carga iónica negativa que poseen los glicolípidos sulfatados, les permite unirse a los aminoácidos con carga iónica positiva de las cadenas laterales de las proteínas. De esta forma, al conferir una carga negativa a los glicoconjugados, los grupos sulfatados pueden promover la concentración de cargas negativas en la superficie de la célula en la proximidad a la bicapa lipídica, favoreciendo así, los procesos tales como la adhesión celular, la invasión a la célula, la fusión celular y la endocitosis.

También se ha descrito la inhibición de la unión de la glicoproteína gp120 del VIH-1 al receptor CD4, por los glicosaminoglicanos (compuestos caracterizados por presentar cadenas grandes de polisacáridos sulfatados) de la leche humana (100). Existe una razón para asumir que alguna interacción entre los polianiones sulfatados y los componentes de la superficie celular de los CD4, que tienen carga opuesta, pueden ser los responsables de esta inhibición.

Los glicolípidos sulfatados y los glicosaminoglicanos presentes en la superficie del epitelio colónico y vaginal, así como en las células neurogliales, se unen a la glicoproteína

gp120 del VIH-1, lo que sugiere que estos glicoconjugados pueden tener un papel importante en la infección por el VIH-1 (101,102).

La leche humana contiene glicosaminoglicanos y compuestos sulfatados que son capaces de inhibir la unión de gp120 al receptor CD4 en un ensayo inmunoenzimático. Por consiguiente, los glicosaminoglicanos y los sulfatados de la leche humana, podrían influir en la transmisión vertical del VIH-I durante la lactancia si están presentes en concentraciones biológicamente relevantes en la leche. En la **figura 5** se muestra la estructura molecular de los glicolípidos sulfatados y de los glicosaminoglicanos (122).

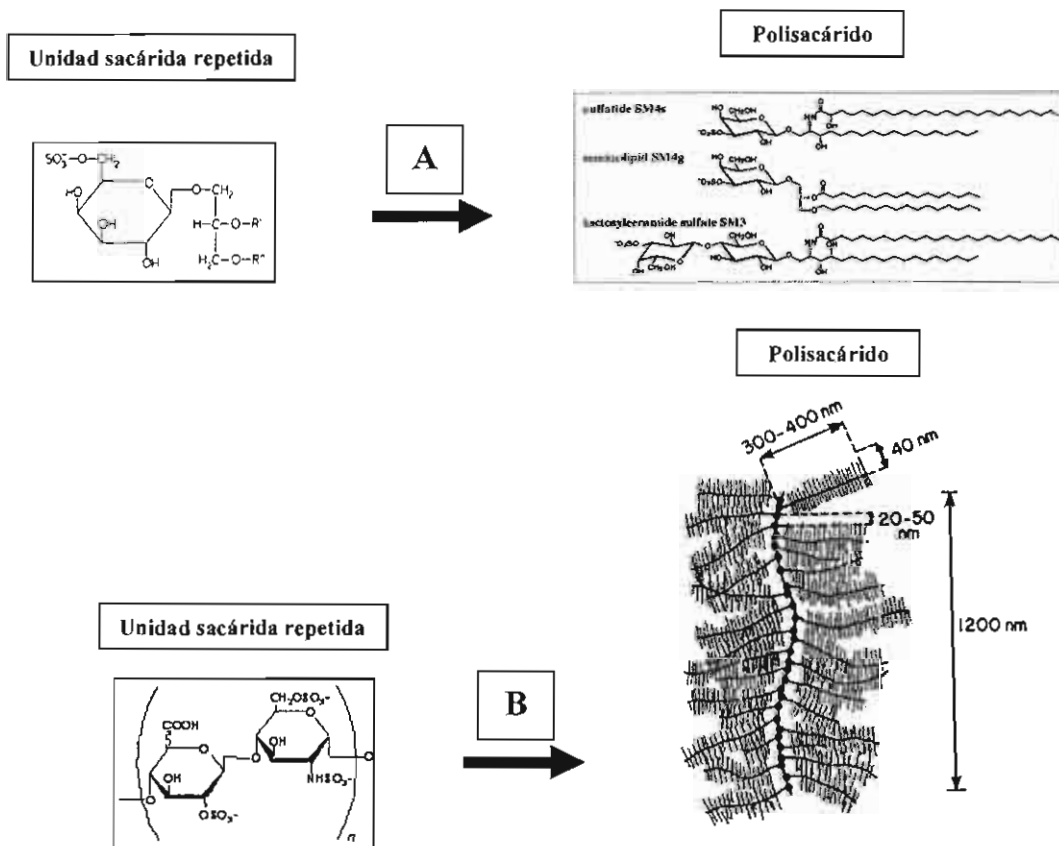


Figura 5. Estructura molecular de los glicolípidos sulfatados (A) y de los glicosaminoglicanos (B) (122).

## JUSTIFICACIÓN

Algunos componentes de la leche humana y animal poseen actividad antibacteriana y antiviral por analogía estructural con complejos proteicos (adhesinas, lectinas o hemaglutininas) presentes en la superficie de organismos patógenos (81, 103). La importancia del VIH como patógeno a nivel mundial, lo ha incluido en los blancos del estudio de posibles efectos de las fracciones de la leche humana, en particular de los glicoconjugados.

Aunque se ha demostrado el efecto inhibitorio de la infección por VIH que poseen las fracciones proteica, lipídica y sacárida de la leche humana, estos estudios han tenido algunas limitantes como el hecho de haber trabajado con fracciones crudas, es decir que contienen mezclas de diferentes compuestos, o bien con un número reducido de cepas virales adaptadas al laboratorio, o en otros casos, su efecto se ha evaluado en ensayos con proteínas recombinantes del virus (gp120) y a su receptor CD4 también recombinante (104-108).

Con los resultados alentadores que se obtuvieron de todos estos estudios previos, donde se ha demostrado el efecto inhibitorio de la infección por el VIH-1 *in vitro* que tiene la fracción sacárida de la leche humana, se planteó lo siguiente para aportar información que hasta el momento no ha sido reportada:

1. Se procedió a fraccionar la preparación cruda de los glicoconjugados de la leche materna, mediante procesos bioquímicos de extracción y purificación que permitieran definir a los glicoconjugados que toman parte en la inhibición de la infección de las células blanco del VIH: CD4 positivas y así, disecar más el fenómeno inhibitorio.

2. Se utilizaron tanto cepas virales adaptadas a su crecimiento en el laboratorio, como aislados primarios o clínicos obtenidos de individuos VIH-infectados. De las cepas de laboratorio, se utilizaron aislados virales de cada uno de los tropismos conocidos (macrofagotrópico y linfotrópico) para observar si existía algún efecto inhibitorio específico para cada cepa viral.
3. Se desarrolló un método de cromatografía en capa fina para evaluar la pureza de los glicoconjugados extraídos. Aunque existen métodos para evaluar la pureza de los glicoconjugados, la cromatografía en capa fina es un método más económico y fácil de realizar, que proporciona resultados rápidos y fidedignos.
4. Es la primera vez que se evaluó el efecto de glicoconjugados sulfatados (glicolípidos y glicosaminoglicanos) extraídos de la leche humana, sobre la infección de células CD4+ por el VIH-1.

Con los resultados obtenidos en este trabajo se profundizará en el conocimiento de la patogénesis de la infección por el VIH-1, específicamente en los mecanismos moleculares de unión del virus con su célula huésped, lo que permitirá a futuro la creación de nuevas formas para evitar esta interacción.

## HIPÓTESIS

La hipótesis general de este proyecto es que la entrada del Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (VIH-1) a sus células blanco, puede ser bloqueada al impedir la unión del virus con su receptor celular específico mediante la utilización de receptores análogos obtenidos de fracciones de glicoconjugados (glicolípidos sulfatados y glicosaminoglicanos) de la leche humana que compitan con los receptores celulares naturales para el virus.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Identificar y caracterizar receptores análogos glicoconjugados que inhiban competitivamente la adhesión del VIH-1 a sus células blanco *in vitro*.

### Objetivos particulares

1. Definir cuáles de las fracciones de glicoconjugados de la leche humana, participan en la inhibición de la infección de células mononucleares de sangre periférica (PBMC por sus siglas en inglés) y macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica (MDM), por el VIH-1.
2. Determinar si existen diferencias en la inhibición del anclaje del VIH-1 a sus receptores y por lo tanto en la infección por el VIH, de diferentes células blanco CD4+, como PBMC y MDM.



3. Evaluar si el efecto inhibitorio de la infección de PBMC y MDM por el VIH-1, debido a la presencia de los glicoconjugados de la leche humana, es célula-específico y aislado viral-específico.
4. Diseñar y caracterizar un método de cromatografía en capa fina, que permita identificar y evaluar la pureza de los glicolípidos sulfatados extraídos de la leche humana.

## DISEÑO EXPERIMENTAL

El presente trabajo de tesis, se desarrolló en las etapas que se describen a continuación.

**1ª etapa.** Extracción y purificación de diferentes fracciones de glicoconjugados de la leche humana, específicamente de compuestos sulfatados: glicosaminoglicanos y glicolípidos. Las primeras fracciones de glicoconjugados de la leche humana que se probaron en los ensayos de inhibición de la infección por el VIH-1, fueron proporcionadas por el Shriver Center for Mental Retardation, University of Massachusetts Medical School, en Waltham, Massachusetts, EUA y la metodología de la extracción y purificación de estos compuestos, se describe en la sección de material y métodos del primer artículo que se deriva de esta tesis y que se anexa al final de la misma (109). Se probaron ocho preparaciones de la fracción de glicolípidos sulfatados y una fracción de glicosaminoglicanos extraídos de la leche humana.

**2ª etapa.** Estandarización de un método de inhibición de la infección de PBMC y MDM por el VIH-1 *in vitro*, utilizando diferentes fracciones de glicoconjugados (glicosaminoglicanos y glicolípidos sulfatados) en varias concentraciones y con diferentes aislados virales. Para realizar los ensayos de inhibición, fue necesario previamente, propagar *in vitro* y determinar la concentración del antígeno viral p24 del VIH-1, de los 4 aislados virales con los que se trabajó, que fueron dos aislados primarios (NP12 y NP54) y dos aislados de laboratorio (VIH-1<sub>ADA</sub> y VIH-1<sub>SF2</sub>), así como cultivar a los dos tipos de células blanco CD4 positivas, que se eligieron para los ensayos: PBMC y MDM.

Debido a que se obtuvieron porcentajes altos de inhibición de la infección por el VIH-1 (más del 80% de inhibición de la infección), con las primeras preparaciones de la

fracción de los glicolípidos sulfatados proporcionadas por el Shriver Center, se decidió extraer de nuevo dichas fracciones con algunas modificaciones al método de extracción original, y diseñar y estandarizar un método de cromatografía en capa fina para su identificación, con el fin de obtener fracciones de glicolípidos con un mayor grado de pureza. En un futuro se evaluará el efecto de inhibición de la infección por el VIH-1 *in vitro* de esta nueva fracción de glicolípidos y se comparará con los resultados de inhibición obtenidos con las primeras preparaciones que se reportan en esta tesis.

Se decidió también extraer de nuevo la fracción de glicosaminoglicanos de la leche humana ya que en los ensayos de inhibición, la primera fracción de glicosaminoglicanos extraída, mostró un porcentaje bajo de inhibición de la infección por el VIH-1 *in vitro* (menor al 50%). Sin embargo existe la posibilidad de que los glicosaminoglicanos individuales y no la fracción completa, puedan tener un efecto inhibitorio más potente, por lo mismo, se evaluará el efecto de inhibición de todas las fracciones con peso molecular mayor a 300,000 obtenidas durante la purificación de los glicosaminoglicanos.

**3ª etapa.** Extracción y purificación de las fracciones de glicosaminoglicanos y glicolípidos de la leche humana con modificaciones a las técnicas originales.

**4ª etapa.** Diseño y desarrollo de un método de cromatografía en capa fina, que permita identificar y evaluar la pureza de los glicolípidos sulfatados extraídos de la leche humana.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## *1. Ensayos de inhibición de la infección por VIH-1 in vitro con glicoconjugados*

Los métodos que se describirán a continuación, están basados principalmente en los métodos descritos en el Manual de Virología del Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas (NIAID por sus siglas en inglés) de los Institutos Nacionales de Salud (NIH por sus siglas en inglés) de EUA (115), aunque se realizaron algunas modificaciones con el fin de optimizar las condiciones experimentales llevadas a cabo en nuestro laboratorio.

Todos los procedimientos en los cuales se utilizó material biológico infeccioso o potencialmente infeccioso, se realizaron en una campana de flujo laminar de clase 2 de bioseguridad, en condiciones de esterilidad y siguiendo los estándares que el CDC (Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, por sus siglas en inglés) y el NIH de EUA especifican para el manejo de agentes infecciosos como el VIH (116).

### *1.1 Aislamiento y propagación de las células blanco*

Para los ensayos de inhibición de la infección por VIH-1 con los glicoconjugados, se utilizaron como células blanco para el virus, células mononucleares de sangre periférica (PBMC por sus siglas en inglés) y macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica (MDM), ambos tipos de células tienen el marcador de superficie celular CD4 que es el receptor principal al que se une el VIH-1 al infectar a su célula blanco.

**Células mononucleares de sangre periférica (PBMC)**: se obtuvieron a partir de sangre de donadores no infectados con el VIH-1 y se purificaron por gradiente de densidad en un medio de separación de linfocitos: Lymphoprep. Posteriormente las células se estimulan por 48 hrs en medio RPMI suplementado con 20% de suero fetal bovino, fitohemaglutinina-L (PHA) (5 ug/ml), interleucina 2 (IL-2) (20 U/ml), penicilina (100 U/ml) y estreptomycinina (100 ug/ml). Las PBMC se estimularon con PHA en presencia de IL-2, para promover la formación blastoide y la replicación de las células T. Después de 48 hr de incubación a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, se lavan con PBS 1X y se resuspenden en medio RPMI suplementado pero sin PHA, antes de ser infectadas con una concentración conocida del aislado viral.

El procedimiento para aislar a las PBMC por gradiente de densidad en el medio de separación de linfocitos es el siguiente: se utilizó un concentrado leucocitario obtenido a partir de sangre completa, al cual se le realizaron las pruebas de detección de anticuerpos anti-VIH, anti-virus de hepatitis B y anti-virus de hepatitis C, para poder utilizar a las células en los ensayos posteriores. El concentrado leucocitario es una unidad de sangre completa a la cual se le han separado el plasma y los eritrocitos. El volumen obtenido puede ser de 30 a 50 ml y deberá almacenarse a temperatura ambiente y procesarse antes de 30 horas después de haber sido colectada la muestra.

El concentrado leucocitario se diluyó al adicionar un volumen de PBS 1X por cada volumen de paquete. La sangre diluída se adicionó lentamente y con cuidado de no mezclar las 2 fases, a un tubo de centrifuga de 50 ml que contiene medio de separación de linfocitos. Las proporciones utilizadas del medio de separación de linfocitos y de la sangre diluída son: 3 partes del medio de separación de linfocitos por cada 4 partes de sangre diluída. Se centrifugaron los tubos a temperatura ambiente a 2000 rpm por 30 minutos.

Después de la centrifugación, se observa la presencia de 2 fases. Se tomó el mayor volumen posible de la fase superior con una pipeta serológica y se descartó. Posteriormente se tomó con una pipeta la interfase que se observa como una película de color blanco, la cual contiene a las PBMC. Esta interfase se depositó en tubos de centrifuga a los cuales se les adicionó previamente PBS 1X. Se realizaron 2 lavados de las PBMC con PBS 1X, al decantar el sobrenadante después de centrifugar a 2000 rpm por 10 minutos y resuspender el botón celular en PBS 1X.

**Conteo de viabilidad celular.** Para saber el número de PBMC viables por ml, se realizó el conteo de células en un hematocitómetro o cámara de Neubauer (117). Después de resuspender el botón celular en 10 ml de PBS 1X (este volumen depende del volumen de PBMC que se obtuvo después de la centrifugación), se tomaron con una micropipeta 10 ul de la suspensión celular, se transfirieron a un pozo de 200 ul de una placa de cultivo y se adicionaron a 90 ul del colorante azul tripan; se mezcló cuidadosamente por pipeteo y se cargó la cámara de Neubauer. Las células se observaron en un microscopio compuesto con el objetivo de 10 X, se contó el número de células presentes en los cuatro cuadros grandes de los extremos que se observan en la rejilla de la cámara y se obtuvo el número de PBMC por ml con el siguiente cálculo: se obtuvo el promedio de las PBMC, contando en los 4 cuadros y dividiendo entre 4 y el resultado se multiplica por  $10^5$ . Una vez calculado el número de PBMC por ml, este valor se multiplicó por 10, ya que el botón celular se resuspendió en 10 ml de PBMC.

Cuando se cuenta el número total de células, se cuentan indistintamente las células vivas y las células muertas. Para calcular el número de células viables presentes en la suspensión celular, se cuenta solamente a las células que no se tiñeron con el colorante. El número de células viables se determina tiñiendo las células con el colorante azul de tripan.

Las células vivas son capaces de excluir al azul tripan y por lo mismo permanecen incoloras o traslúcidas, mientras que las células muertas no pueden excluir al colorante y por lo tanto se tiñen de azul.

Una vez obtenido el número total de PBMC viables, se realizaron los cálculos para cultivar una concentración de 2 a  $5 \times 10^6$  de células/ml en el medio de estimulación con PHA e IL-2. El volumen total en cada botella de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> puede variar de 40-120 ml. Las botellas de cultivo se incubaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> con humedad, durante 48 hr antes de usarse.

***Macrófagos derivados de monocitos (MDM):*** se aislaron de sangre periférica por el método de adherencia al plástico (118). Una vez separadas las PBMC por gradiente de densidad con el medio de separación de linfocitos, se colocaron  $4 \times 10^6$  de PBMC/ cm<sup>2</sup> a cada pozo de las placas de cultivo con 48 pozos, y se adicionó 1 ml de medio de cultivo a cada pozo. El medio de cultivo es RPMI suplementado con 20% de suero fetal bovino y 5% de suero normal humano. Las células se mantuvieron en este medio durante 5 días a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, posteriormente se lavaron por pipeteo 2 veces con PBS 1X y se mantuvieron en medio RPMI suplementado con 20% de suero fetal bovino, 100 U/ml de penicilina y 100 ug/ml de estreptomina, hasta que el fondo de los pozos se cubrió con las células en cultivo (10-12 días). Las placas de cultivo se lavaron por pipeteo cada 2 o 3 días con PBS 1X y se alimentaron con medio de cultivo fresco.

### ***1.2. Cultivo de los aislados primarios y aislados de laboratorio del VIH-1***

Se aislaron PBMC a partir de sangre de donadores seronegativos para el VIH-1, mediante un gradiente de densidad con el medio de separación de linfocitos, como se

describió previamente. Las PBMC se estimularon con el mitógeno PHA-L [5 ug/ml de medio de cultivo], en presencia de IL-2 [20 unidades/ml de medio de cultivo], durante 24 a 72 hr antes de usarse. Después de 48 hr de estimulación, las células se lavaron con PBS 1X para eliminar la PHA y se resuspendieron en medio de cultivo RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de antibióticos (penicilina y estreptomina) hasta ajustar a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml. Se adicionó 1 ml de cada uno de los concentrados de los aislados primarios NP12 y NP54, al cultivo de células, por cada botella de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>. El cultivo se inició en botellas de 25 cm<sup>2</sup> y a las 2 semanas se cambió a botellas de cultivo más grandes de 75 cm<sup>2</sup>.

Se cultivaron 2 aislados de laboratorio del VIH-1: VIH-1<sub>ADA</sub> y VIH-1<sub>SF2</sub> y dos aislados primarios o clínicos: NP54 y NP12. Los aislados primarios o clínicos del VIH-1 son aquellos aislados virales que se obtuvieron de sangre periférica de pacientes VIH-1 positivos y que se mantuvieron en cultivo no más de 3 meses y se les realizaron máximo 3 pases de cultivo para que mantengan sus características genéticas originales. En cambio, los aislados virales de laboratorio son aquellos virus que ya se adaptaron al cultivo *in vitro* con líneas celulares y pueden cultivarse por más de 3 meses.

Las características de los aislados virales que se propagaron son las siguientes:

**VIH-1<sub>ADA</sub>**: es un aislado de laboratorio con tropismo para macrófagos (macrófago-trópico), que utiliza al co-receptor CCR5 para entrar a la célula blanco.

**VIH-1<sub>SF2</sub>**: es un aislado de laboratorio con tropismo para linfocitos (linfo-trópico), que utiliza al co-receptor CXCR4 para entrar a la célula blanco.

**NP54**: es un aislado primario que fue obtenido de un paciente con progresión típica a SIDA.



**NP12:** es un aislado primario que fue obtenido de un paciente con progresión lenta a SIDA.

En el caso de los aislados virales primarios NP12 y NP54, es importante mencionar que no está caracterizado su tropismo celular.

El cultivo celular se incubó a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y 85% de humedad durante 28 días. El sobrenadante de cultivo se cambió 2 veces por semana con medio RPMI suplementado fresco y se alimentó con PBMC frescas estimuladas previamente con PHA-L e IL-2 por 48 hrs, una vez por semana. Es importante mencionar que las PBMC que se utilizaron para alimentar al cultivo de los aislados virales fueron del mismo donador. Después de haber contado a las PBMC viables, se separó una cantidad de células para cultivarlas en el medio de cultivo de estimulación con PHA-L e IL-2 por 48 hr, y el resto de las células se congeló a -70°C en alícuotas para alimentar el cultivo cada semana (ver procedimiento de criopreservación de células). Cada vez que se cambió el sobrenadante de cultivo se centrifugó a 3000 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente para eliminar a las células y/o restos celulares presentes. El sobrenadante de cultivo centrifugado se almacenó a -70°C para determinar la concentración del antígeno p24 de la cápside mediante la técnica de ELISA.

**Criopreservación de células.** Se le llama criopreservación al almacenamiento de células a temperaturas muy bajas, de tal manera que cualquier actividad metabólica y enzimática es virtualmente igual a cero. Las células pueden almacenarse indefinidamente sin una pérdida significativa de viabilidad, si se congelaron en el medio adecuado y si se descongelan de la manera correcta (119,120). Los agentes criopreservadores o crioprotectores se usan para prevenir el daño celular durante el proceso de congelación. El daño celular se debe principalmente a la formación de cristales grandes de agua, a cambios

osmóticos durante el proceso de congelación y descongelación, cambios en el pH, deshidratación y desnaturalización de proteínas. En ausencia de un agente crioprotector como el glicerol o el dimetil sulfoxido (DMSO), el proceso de congelación es letal para la mayoría de las células de mamífero.

Para congelar a las PBMC que se utilizaron para la alimentación de los cultivos virales se realizó el siguiente procedimiento: las células en suspensión, se transfirieron con una pipeta serológica a un tubo para centrífuga y se centrifugaron a 2000 rpm por 10 min. Se decantó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 5 o 10 ml de PBS 1X estéril para determinar la viabilidad celular. Una vez determinado el número de células viables, se volvieron a centrifugar las células a 2000 rpm por 10 min para eliminar el PBS. Se decantó el sobrenadante, se resuspendió el botón celular y se adicionó lentamente el medio de congelación (90% de suero fetal bovino y 10% de dimetil sulfoxido) a temperatura ambiente. Previamente se calculó la concentración de células que se congelaron por cada criovial; se recomienda congelar una concentración de células de 2 a  $10 \times 10^6$  células viables/ml. Se congelaron los crioviales a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 1 hr y después en un ultracongelador a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Para descongelar a las células, se sacaron los crioviales del ultracongelador y se colocaron inmediatamente en un baño de agua a  $37^{\circ}\text{C}$ . Una vez descongeladas las células, se abrieron los crioviales en condiciones de asepsia y se transfirieron las suspensiones celulares a un tubo de centrífuga con medio de cultivo a temperatura ambiente. Se centrifugó a 2000 rpm por 10 minutos para eliminar el medio de congelación. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en medio de cultivo suplementado (RPMI con 20% de SFB y 1% de antibióticos). Se transfirió la suspensión celular a botellas de

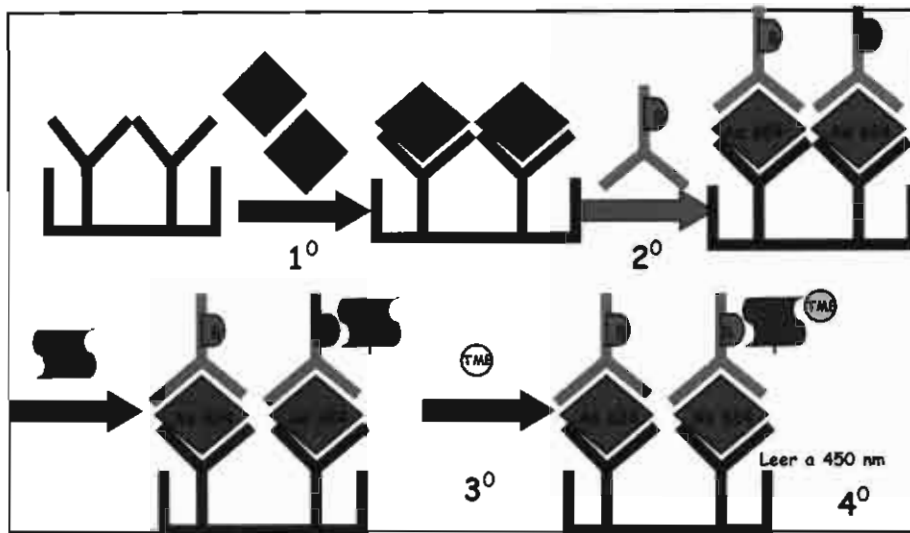
cultivo estériles y se incubaron a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y con 85% de humedad. Después de 24 hr de incubación se cambió el medio de cultivo y se observaron las células al microscopio.

### ***1.3. Ensayo inmunoenzimático de ELISA para la determinación de antígeno p24 del VIH-1***

Una vez terminado el cultivo y la propagación de los aislados virales, se realizó la titulación de los sobrenadantes de cultivo que se colectaron cada semana, haciendo diluciones seriadas de cada sobrenadante y se cuantificó la concentración del antígeno p24 por ELISA en cada uno. Se utilizó un estuche comercial para detectar antígeno p24 del VIH-1 de la marca Beckman Coulter, el cual es un inmunoanálisis enzimático (ELISA o análisis de inmunoadsorción ligada a enzimas) cuantitativo *in vitro* desarrollado para la detección de la proteína p24 de la cápside del VIH-I en plasma humano, suero humano, o sobrenadantes de cultivo. La evidencia directa de la presencia de virus infeccioso en una muestra se obtiene mediante el cultivo combinado de muestras con células blanco susceptibles de infección por el VIH-I, tales como los monocitos humanos inmortalizados, linfocitos T o linfocitos humanos de sangre periférica. La detección y determinación cuantitativa del antígeno p24 del VIH-1 en sobrenadantes de cultivos se usa para controlar y caracterizar la reproducción del virus (121).

El principio del procedimiento es el siguiente: el ensayo para cuantificar al antígeno p24 del VIH-1 utiliza un anticuerpo monoclonal murino contra el antígeno p24 del virus para revestir a los micropozos de titulación dispuestos en tiras sobre las placas. El antígeno p24 purificado y proveniente de una línea de linfocitos T humanos infectados con la cepa HTLV-III del VIH-1 se usa como estándar de calibración cuantitativa. Al micropozo revestido con el anticuerpo monoclonal, se le adiciona la muestra del

sobrenadante del cultivo viral y el tampón de lisis, y se incuban. El tampón de lisis rompe a las partículas de virus que podrían estar presentes en la muestra, y el antígeno p24 del VIH-1 liberado, si está presente, se une al anticuerpo monoclonal en el micropozo de titulación. Después de un paso de lavado, se agrega una IgG humana biotinilada anti-VIH-1 a los micropozos. Durante la incubación, esta IgG se une al antígeno p24 unido a los micropozos. Después de otro paso de lavado, se agrega estreptavidina-peroxidasa de rábano, que forma un complejo con los anticuerpos biotinilados. En un paso final, se agrega un reactivo de sustrato que contiene tetrametilbencidina (TMB) y agua oxigenada, y éste reacciona con la peroxidasa del complejo, formándose un color azul. La reacción se detiene a los 30 min al agregar ácido: el reactivo de paro ( $H_2SO_4$  4N). La absorbancia se mide con un espectrofotómetro a 450/570 nm. La intensidad del color desarrollado es directamente proporcional a la cantidad de antígeno p24 del VIH-1 presente en la muestra. La cantidad de antígeno p24 en una muestra, se determinó mediante la comparación de su absorbancia con la de los estándares de calibración preparados con el antígeno p24 purificado (**Figura 6**).



**Figura 6. Esquema del ensayo de ELISA de captura del antígeno viral p24 del VIH-1. 1<sup>er</sup> paso:** Al micropozo revestido con el anticuerpo monoclonal, se le adiciona la muestra y el buffer de lisis; éste rompe las partículas virales presentes en la muestra y el antígeno p24 del VIH-1 liberado, se une al anticuerpo monoclonal. **2<sup>o</sup> paso:** se adiciona una IgG humana biotinilada anti-VIH-1, la cual se une al antígeno p24 unido al anticuerpo monoclonal de la placa. **3<sup>er</sup> paso:** se agrega estreptavidina-peroxidasa de rábano, que forma un complejo con los anticuerpos biotinilados y posteriormente se adiciona el sustrato que contiene tetrametilbencidina (TMB) y agua oxigenada. **4<sup>o</sup> paso:** el sustrato reacciona con la peroxidasa del complejo, desarrollándose un color azul. Se mide la absorbancia con un espectrofotómetro a 450/570 nm (Información tomada del inserto del estuche de la prueba del ELISA de captura del Ag p24 del VIH-1).

#### **1.4. Ensayos de inhibición de la infección por VIH-1 in vitro**

##### **1.4.1. Preparación de las fracciones de glicoconjugados de la leche materna.**

Se probaron 8 diferentes preparaciones de glicolípidos sulfatados y una preparación de glicosaminoglicanos. Las preparaciones de glicoconjugados se disolvieron con la ayuda de un agitador o vortex, en un volumen de PBS 1X estéril equivalente a 0.05 veces el volumen de leche humana del cual se aislaron, para obtener una solución 20 veces concentrada. En el caso de los glicolípidos sulfatados, las preparaciones se obtuvieron a partir de 100 y 200 ml de leche humana, y en el caso de los glicosaminoglicanos, a partir de 75 ml de leche. Para obtener una solución homogénea de los glicoconjugados, después de disolverlos con el vortex, se sonicaron durante 15 a 30 minutos a 37°C. Se hicieron

alícuotas de cada preparación de los glicoconjugados y se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

A partir de la solución concentrada y homogénea de cada uno de los glicoconjugados, se realizaron diluciones seriadas para probarlas en los ensayos de inhibición con células y las diferentes cepas de virus. Los glicolípidos sulfatados se probaron en los ensayos celulares en un rango de concentraciones expresados en 0.5 a 13 volúmenes equivalentes de leche humana y la preparación de los glicosaminoglicanos, en un rango de concentraciones de 0.03X a 3.3X, siendo 1X la concentración equivalente en PBS que se encuentra en una mezcla de leches humanas.

**1.4.2. Aislados del VIH-1 utilizados:** Para los ensayos de inhibición se utilizaron dos aislados de laboratorio (VIH-1<sub>ADA</sub> y VIH-1<sub>SF2</sub>) y dos aislados primarios del VIH-1 (NP54 y NP12).

La concentración de cada solución concentrada de virus se ajustó a 1 ng/ml del antígeno p24 de la cápside del VIH-1, la cual se determinó por el ensayo de ELISA de captura del antígeno p24.

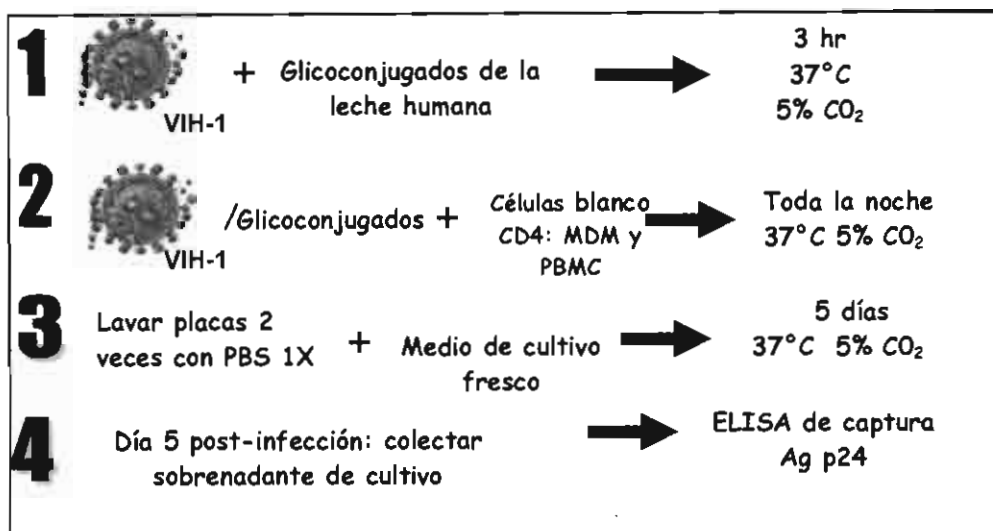
**1.4.3. Ensayos de inhibición.** Cada fracción de los glicoconjugados en diferentes diluciones se incubó con 1 ng/ml de cada stock viral (NP12, NP54, ADA y SF2), durante 3 hr a  $37^{\circ}\text{C}$ , para posteriormente ser añadida a  $5 \times 10^5$  PBMC/pozo (previamente estimuladas con PHA e IL-2 durante 48 hr), o en el caso de los macrófagos al pozo cubierto por la monocapa de células. La mezcla de VIH/glicoconjugados y células blanco, se dejó incubando toda la noche (18 hrs aproximadamente) a  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  y 85% de humedad. Posteriormente se centrifugaron las placas de cultivo, se lavaron 2 veces con

PBS 1X y se adicionaron 500 ul/pozo de medio RPMI suplementado con 20% de suero fetal bovino y 1% de antibióticos, para incubar el cultivo durante 5 a 7 días, después de los cuales se toma una alícuota del sobrenadante del cultivo para hacer ELISA p24 y cuantificar la replicación viral (**Figura 7**). En las placas de cultivo, las filas de pozos de alrededor se llenan con PBS 1X para mantener la humedad de los cultivos, de esta manera, las muestras quedan en los pozos centrales. En los ensayos de inhibición, cada concentración de glicoconjugados se probó por duplicado, al igual que los controles negativos y positivos y se calculó el promedio de los duplicados previamente al cálculo del porcentaje de inhibición de la infección.

Los resultados de la inhibición de la infección por el VIH-1 se expresaron como un porcentaje de inhibición contra un control sin la adición de ninguna de las preparaciones de los glicoconjugados, considerándose un valor de inhibición significativo, cuando la inhibición es igual o mayor al 80%. El porcentaje de inhibición de la infección por el VIH-1 se calculó de la siguiente forma:

$$\% \text{ Inhibición} = 1) \frac{\text{Virus} + \text{Células} + \text{Glicolípido}}{\text{Virus} + \text{Células}} \times 100 = x \% \text{ infección}$$

$$2) 100\% - x \% \text{ infección} = \% \text{ Inhibición}$$



**Figura 7. Esquema del ensayo de inhibición de la infección por VIH-1 *in vitro* con glicoconjugados. 1er paso:** los glicoconjugados de la leche humana en diferentes diluciones, se incuban con 1 ng/ml de cada stock del VIH-1 durante 3 hrs a 37°C. **2º paso:** el complejo VIH/glicoconjugados se adiciona a  $5 \times 10^5$  PBMC/pozo o a los pozos recubiertos con MDM, según sea el caso y se deja incubando toda la noche. **3er paso:** las placas de cultivo se lavan 2 veces con PBS 1X, se adicionan 500 ul/pozo de medio RPMI suplementado y se dejan incubando durante 5 a 7 días. **4º paso:** al día 5 post-infección se toma sobrenadante del cultivo y se determina la concentración del antígeno viral de la cápside por el ensayo de ELISA de captura.

## 2. Aislamiento y purificación de glicolípidos sulfatados de la leche materna

### 2.1. Muestras de leche materna

Las muestras de leche humana que se utilizaron en este proyecto, son excedentes de donaciones de leche que no pudieron ser usadas para alimentar a los infantes por diversas razones. Se registraron los datos de colección de las muestras como la hora y el volumen de colección de la leche así como su grado de madurez, es decir, si la muestra colectada fue el calostro (secreción producida en los primeros 4 a 6 días de la producción láctea) o fue leche producida desde el primer hasta el sexto mes de lactancia. Las donadoras fueron anónimas y se hizo una mezcla de varias leches humanas que se almacenó en congelación a -70°C hasta su uso para la extracción de los glicoconjugados.



Las diferentes especies de glicolípidos sulfatados se obtuvieron a partir de una mezcla de leches humanas obtenidas de 36 mujeres donadoras del banco de leches maternas de Nueva Inglaterra en Boston, Massachusetts, Estados Unidos.

## **2.2. Extracción de lípidos**

El método experimental que se realizó para la extracción y purificación de los glicolípidos sulfatados se basó en el método descrito por Newburg et al (110), con algunas modificaciones.

**Extracción de los lípidos de la leche humana.** Se liofilizaron dos litros de una mezcla de leches humanas y se resuspendieron en 150 ml de agua bidestilada. A partir de esta mezcla de leches, se extrajeron los lípidos adicionando 20 volúmenes de cloroformo/metanol/ 2:1 (3 litros) de la siguiente forma: primero se adicionó 1 litro de metanol y se dejó en agitación vigorosa a temperatura ambiente durante 2 hrs; después se adicionó 1 litro de cloroformo y se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 2 hrs y finalmente se adicionó 1 litro más de cloroformo y se dejó en agitación a temperatura ambiente durante toda la noche. Para establecer el radio de distribución de lípidos de Folch (111) en 8:4:3 (cloroformo/metanol/agua) en la mezcla, se adicionaron 600 ml de agua bidestilada. Después de centrifugar la mezcla a 1400 rpm y 20°C durante 1 hr, se observó la separación de 2 fases: fase superior y fase inferior. La fase superior se removió con una pipeta serológica y la fase inferior que contiene a los lípidos, se lavó con 400 ml de solución teórica de la fase superior (solución TUP por sus siglas en inglés: *theoretical upper phase*) que está constituida por cloroformo/metanol/agua 3:48:47 vol/vol/vol y que contiene cloruro de potasio (KCl) 0.1 M. Una vez lavada, la fase inferior se filtró a través

de fibra de vidrio para remover las proteínas de la leche y posteriormente se concentró en un rotoevaporador hasta reducir su volumen a 100 ml aproximadamente.

**Fraccionamiento de los lípidos.** Los lípidos de la fase orgánica inferior se fraccionaron con una mezcla de metanol acuoso al 90% y hexano, realizando el siguiente proceso: se preparó una mezcla de metanol acuoso al 90% y hexano. En un embudo de separación se adicionó la mezcla de metanol-hexano y a esta mezcla se le adicionó la fase inferior concentrada previamente, y se agitó vigorosamente durante 10 min. Se dejó reposar la mezcla hasta observar la separación de las 2 fases en el embudo. La fase superior es el hexano que tiene un alto contenido de triglicéridos; esta fase se decantó y se eliminó. La fase inferior es el metanol que contiene diferentes especies de glicolípidos y fosfolípidos y a esta fase se le realizó una serie de siete lavados con una mezcla de metanol acuoso al 88% y hexano para extraer una mayor concentración de glicolípidos de la fase inferior. Todas las fases inferiores que se obtuvieron de los lavados, se colectaron y se concentraron en un rotoevaporador hasta reducir su volumen a 50 ml aproximadamente.

**Hidrólisis alcalina y neutralización de los lípidos.** El extracto de lípidos se transfirió a una botella de 3.8 litros con tapón de rosca para realizar una reacción de hidrólisis alcalina con una solución de hidróxido de sodio metanólico 0.6 N preparada con 300 ml de hidróxido de sodio 0.6 M en metanol y 300 ml de cloroformo. Se dejó reposando la mezcla de reacción durante una hora a temperatura ambiente para hidrolizar los ésteres de los ácidos grasos derivados del glicerol y para eliminar los fosfolípidos. La reacción de hidrólisis alcalina se neutralizó con una solución de ácido hidroclicórico preparada con 450 ml de ácido hidroclicórico 0.4 M con 300 ml de metanol y 900 ml de cloroformo. La mezcla de reacción se dejó incubando toda la noche a temperatura ambiente hasta observar la separación de dos fases. La fase superior contiene sales y productos de hidrólisis y se

descartó, mientras que la fase inferior se transfirió a otra botella y se lavó dos veces con la solución TUP. La fase inferior colectada contiene la fracción de glicolípidos, la cual se secó por evaporación en baño María a 56°C y con nitrógeno gaseoso. Es importante que la fracción se seque en presencia de nitrógeno, ya que la atmósfera inerte que éste genera, evita la oxidación irreversible de los glicolípidos presentes (112). Una vez seca la fracción de lípidos, se almacena a 4°C hasta su uso.

### ***2.3 Purificación por cromatografía en columna***

Se realizaron dos tipos de cromatografía en columna para el fraccionamiento de la mezcla de lípidos obtenida de la leche humana. Para la separación inicial se utilizó una columna de ácido silícico de la cual se obtuvieron 3 fracciones, las cuales se purificaron en un segundo paso, en una columna de intercambio iónico (aniónico) con Dietilaminoetil (DEAE) celulosa, seguida de una separación completa utilizando por segunda vez una columna de ácido silícico.

#### ***2.3.1. Preparación de la columna DEAE celulosa y corrimiento de la muestra***

Se preparó la columna de DEAE celulosa para la cromatografía de intercambio aniónico basado en el método de Rouser, G et al. (113). Se utilizó una pipeta serológica de vidrio de 10 ml como columna, a la cual se le colocó un tapón de fibra de vidrio en la parte inferior. Se pesaron 10 g de DEAE celulosa a los que se les realizaron varios lavados antes de adicionarla a la columna de vidrio de 8 mm de diámetro x 150 mm de longitud.

El proceso que se realizó fue el siguiente: a 10 g de DEAE celulosa, se le realizaron 3 veces los siguientes lavados:

1 lavado con HCl 1 N (4 volúmenes)

1 lavado con agua bidestilada (4 volúmenes)

1 lavado con NaOH 1N (4 volúmenes)

1 lavado con agua bidestilada (4 volúmenes)

Se dejó reposando la celulosa 30 minutos en cada una de las soluciones anteriores. Se realizó un último lavado de la DEAE celulosa con ácido acético glacial concentrado (4 volúmenes) y se dejó reposando toda la noche a temperatura ambiente. Para eliminar el ácido acético glacial, se lavó la celulosa como sigue:

1 lavado con agua bidestilada (4 volúmenes)

1 lavado con metanol (4 volúmenes)

1 lavado con cloroformo/metanol 2:1 (4 volúmenes)

Para la columna de 8 mm x 150 mm se adicionaron 250 mg de la DEAE celulosa previamente lavada y se empacó en la columna vaciando lentamente la celulosa para evitar la formación de burbujas que impedirían un buen corrimiento de la muestra. Una vez empaquetada la celulosa, se lavó con 4 volúmenes de cloroformo/metanol 2:1 para después adicionar la muestra de lípidos extraída de la leche humana. La muestra se resuspendió previamente en cloroformo/metanol 2:1. El volumen de los solventes colectados con las diferentes mezclas de solventes es variable, pero debe de estar dentro del rango de 5 a 10 volúmenes de la columna. Se eluyeron 4 fracciones de la columna de DEAE celulosa en el siguiente orden:

*Fracción 1:* adicionar 5 volúmenes de cloroformo/metanol 2:1 para eluir a los lípidos neutros como son: esteroides, ésteres de esteroles, glicéridos, lecitina, esfingomielina, fosfatidil etanolamina, lisofosfatidil etanolamina y a los componentes no-lipídicos solubles en agua.

*Fracción 2A:* adicionar 5 volúmenes de cloroformo/metanol 4:1 y 2% de NH<sub>4</sub>OH concentrado para comenzar a eluir a los lípidos ácidos como el fosfatidil inositol que es similar a los glicolípidos sulfatados en sus características de elusión.

*Fracción 2B:* mismas condiciones de elusión que se utilizaron para eluir a la fracción 2A.

*Fracción 3:* adicionar 5 volúmenes de una solución de acetato de amonio 1.0 M en cloroformo/metanol 4:1 y 2% de NH<sub>4</sub>OH concentrado, para eluir a todos los lípidos ácidos, en particular a los glicolípidos sulfatados, ya que los sulfatados eluyen más rápido si los solventes contienen una concentración alta de acetato de amonio.

*Fracción 4:* adicionar 5 volúmenes de cloroformo/metanol 2:1 para remover al amonio y a las sales generadas.

Las fracciones colectadas se secaron por evaporación en baño María a 56°C y con nitrógeno gaseoso para evaporar a los solventes orgánicos. Una vez secas las fracciones, se liofilizaron toda la noche para eliminar al acetato de amonio y al hidróxido de amonio y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

### ***2.3.2 Preparación de la columna de ácido silícico y corrimiento de la muestra***

Las columnas de ácido silícico se utilizan para la separación de extractos de lípidos totales de las fracciones colectadas de una columna de DEAE celulosa, en clases individuales de lípidos (113). Las columnas para la cromatografía de ácido silícico se elaboraron utilizando primero una pipeta Pasteur de vidrio con el fin de estandarizar las condiciones del corrimiento de los lípidos, utilizando los estándares correspondientes, y después para el corrimiento de la muestra total de lípidos de la leche humana, se utilizó una pipeta serológica de vidrio de 10 ml (8 mm de diámetro y 150 mm de longitud). En ambas

columnas se colocó en la parte inferior un tapón pequeño de fibra de vidrio previamente al empaquetamiento de la columna con el ácido silícico en polvo 100-200 mesh-Unisil.

La cantidad de ácido silícico que se cargó en la columna (pipeta Pasteur), se calculó de acuerdo con la concentración del estándar de sulfatados que se corrió; en este caso se utilizó un estándar de sulfatados con una concentración de [200 ug/100 ul]. Para obtener una buena separación de sulfatados en una columna de ácido silícico, se recomienda pesar 75 veces más de ácido silícico por cada unidad de peso de compuestos sulfatados, por lo tanto se pesaron 15 mg de ácido silícico para separar 200 ug del estándar de sulfatados, de acuerdo con el siguiente cálculo:

$$\frac{75 \text{ ug ácido silícico}}{1 \text{ ug sulfatados}} \times 200 \text{ ug sulfatados} = 15,000 \text{ ug} = 15 \text{ mg ácido silícico}$$

Una vez cargada la columna con el ácido silícico, se equilibró realizando los siguientes lavados:

- 1 lavado con 100% cloroformo (10 volúmenes)
- 3 lavados con cloroformo/5% metanol (3 volúmenes)
- 3 lavados con acetona/metanol 9:1 (10 volúmenes)
- 1 lavado con 100% metanol (10 volúmenes)
- 1 lavado con 100% cloroformo (3 volúmenes)

Para estandarizar las condiciones de corrimiento de los estándares, se preparó una mezcla de estándares de ácidos grasos (100 ug) y sulfatados (200 ug) (relación 2:1), la cual se secó por evaporación en baño María a 56°C y con nitrógeno gaseoso para evaporar a los solventes orgánicos. La mezcla se resuspendió en 200 ul de 100% cloroformo y se cargó en

la columna. Se eluyeron 3 fracciones con un volumen de 400 ul por cada fracción, de los siguientes solventes:

1ª fracción: 100% cloroformo

2ª fracción: acetona/metanol 9:1

3ª fracción: 100% metanol

De acuerdo con las condiciones de elusión obtenidas con los estándares de sulfatados y de ácidos grasos, se realizó la separación de los sulfatados de la mezcla de lípidos de la leche humana en una columna de mayor tamaño (8 mm de diámetro por 150 mm de longitud) y consecuentemente se utilizó una mayor cantidad de ácido silícico. La fracción de lípidos que se eluyó de la columna de DEAE celulosa, se analizó en cromatografía en capa fina y se observó que la concentración de sulfatados presente en la muestra era aproximadamente 100 veces mayor (20 mg) que la concentración del estándar de sulfatados (0.2 mg), por lo tanto, se calculó pesar 100 veces más la cantidad de ácido silícico que en la columna pequeña y se pesaron 1.5 g.

La columna se equilibró haciendo los mismos lavados que se hicieron en la columna pequeña y para eluir la muestra de lípidos extraída de la columna de DEAE celulosa, se utilizaron también los mismos solventes pero con volúmenes mayores: 20 ml para cada fracción. La muestra de lípidos se resuspendió en 4 ml de 100% cloroformo y se cargó en la columna. Para la 1ª fracción se eluyó con 20 ml de 100% cloroformo, la 2ª fracción con 20 ml de acetona/metanol 9:1 y la 3ª fracción con 20 ml de 100% metanol. Una vez colectadas las fracciones, se secaron por evaporación en baño María a 56°C y con nitrógeno gaseoso y se resuspendieron en 3 ml de cloroformo/metanol 2:1 para analizar su composición en las placas de cromatografía en capa fina.

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

Se realizó un sistema de CCF para identificar y separar a los glicolípidos sulfatados de la leche humana. Para este procedimiento se hizo lo siguiente:

Se utilizaron placas para CCF de 10 x 10 cm, a las cuales se les realizó un lavado previo al corrimiento de las muestras, utilizando como fase móvil una mezcla de cloroformo/metanol (1:1 vol/vol). Se dejó correr la fase móvil en las placas para CCF, a una distancia de 1 cm antes del borde superior de la placa, en un tanque de vidrio para CCF. Las placas se dejaron secar al aire en una campana de extracción para evaporar los solventes antes de la aplicación de las muestras. Este paso de prelavado de las placas de CCF se requiere para remover cualquier material que pudiera interferir con los análisis de las muestras.

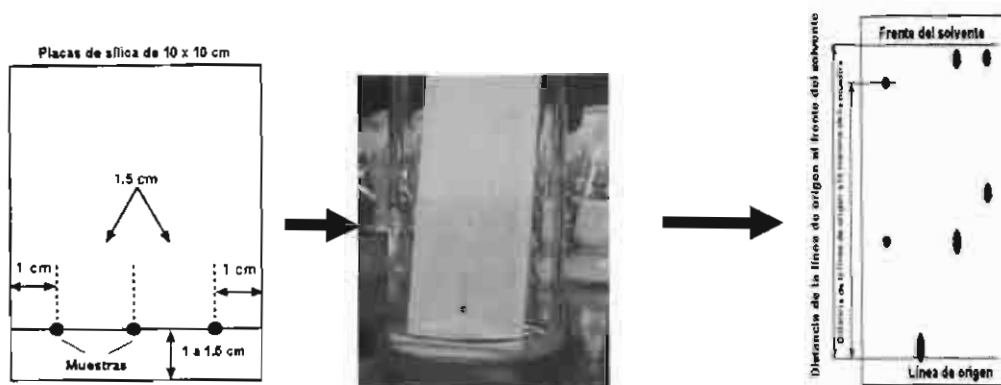
Se trabajó con 2 estándares caseros: triglicéridos (TG) y ácidos grasos (AG), los cuales se extrajeron de una muestra de leche humana, y con 3 estándares comerciales: lactosilceramida (concentración de la solución: 5 mg), galactosilceramida (concentración de la solución: 50 mg) y sulfatados (concentración de la solución: 50 mg). Se prepararon soluciones concentradas de los 3 estándares comerciales de lípidos con una concentración de 1 mg/ml. La lactosilceramida se resuspendió en una mezcla de cloroformo/metanol/agua 5:1:0.1, mientras que la galactosilceramida y los sulfatados se resuspendieron en cloroformo/metanol 2 : 1. A partir de estas soluciones concentradas, se tomó un volumen de 5 ul (5 ug) para realizar la CCF.

Los estándares de triglicéridos, ácidos grasos, lactosilceramida, galactosilceramida y sulfatados, así como las fracciones colectadas de la columna de ácido silícico, se resuspendieron en 3 ml de una mezcla de cloroformo/metanol 2:1. Una vez resuspendidas las muestras y los estándares, se aplicaron rápidamente en las placas de CCF, con una



jeringa Hamilton, distribuyendo pequeñas gotas en forma de una línea horizontal de 5 mm de longitud y a 1 cm de distancia del borde inferior de la placa. La cantidad de estándares que se aplicó en la placa fué de 2 a 5  $\mu$ l que equivale a un rango de concentración de 4 a 40  $\mu$ g, mientras que los extractos de glicolípidos de la leche humana, se aplicaron en cantidades mayores, generalmente de 2 a 10  $\mu$ l ya que se desconoce la concentración de estos compuestos en el extracto de lípidos.

Las placas de CCF se colocaron en un tanque de vidrio para CCF con papel filtro y que contiene aproximadamente 50 ml de la fase móvil compuesta por cloroformo/metanol/ácido acético glacial/agua en proporciones de 65:25:3:1 vol/vol. La fase móvil se adicionó al tanque 2 hrs antes de realizar el corrimiento de las placas de CCF, para lograr el equilibrio de la mezcla de solventes en el tanque. El tiempo de migración de las muestras en la placa fue alrededor de 25 min o hasta 1 cm de distancia del borde superior de la placa. Las placas se sacaron del tanque y se dejaron secar al aire en una campana de extracción alrededor de 5 minutos. Finalmente, se realizó la detección de los azúcares presentes en las muestras, rociando la placa con una solución de orcinol al 0.2% en  $H_2SO_4$  2N (200 mg de orcinol se disolvieron en 100 ml de  $H_2SO_4$  2N y la solución se almacenó en oscuridad y en refrigeración hasta su uso) (114). Las placas se calentaron en una parrilla a 115°C durante 10 a 15 min hasta observar la aparición de las bandas presentes en la placa (**Figura 8**). El tiempo de calentamiento varía dependiendo de la marca de las placas para CCF que se utilice y no se recomienda calentar la placa más de 15 min para minimizar el fondo de la tinción.



**Figura 8. Cromatografía en capa fina.** *1er paso:* se aplican las muestras en la parte inferior de las placas de sílica. *2º paso:* las muestras migran en la placa al ser colocadas en un tanque para cromatografía que contiene a la fase móvil compuesta por : cloroformo/metanol/ácido acético glacial/agua en proporciones: 65:25:3:1 vol/vol. *3er paso:* las placas se rocían con una solución de orcinol al 2% en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N y se calientan a 115°C durante 10 a 15 minutos, hasta observar la aparición de las manchas o bandas de los compuestos sacáridos en la placa.

### ***3. Purificación de los glicolípidos sulfatados por Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)***

Las especies individuales de glicolípidos sulfatados se purificaron usando una combinación de HPLC en fase normal con HPLC en fase reversa. La HPLC en fase normal se realizó en una columna de sílica utilizando un gradiente de elusión con cloruro de metileno/metanol/acetato de amonio 0.1 M (pH 4.0). Se midió la absorbancia a 200 nm para detectar a los glicolípidos y se colectaron las fracciones de acuerdo comparando con los patrones de elusión de estándares comerciales de glicolípidos sulfatados, o por el número de unidades de carbohidrato o el tipo de la cadena de ácidos grasos presente en la parte de la ceramida de la molécula, como se determinó por medio de la espectrometría de masas. Las fracciones colectadas se purificaron posteriormente basándose en la longitud de la cadena de ácidos grasos en una columna de fase reversa, utilizando metanol/cloruro de metileno como la fase móvil. Las fracciones colectadas que corresponden a las especies moleculares puras de los glicolípidos sulfatados, se liofilizaron y se almacenaron. Para

confirmar la presencia de los glicolípidos sulfatados, la muestra se analizó por espectrometría de masas de inyección directa y electro-spray ion-negativa (109).

#### ***4 Aislamiento y purificación de los glicosaminoglicanos de la leche materna***

##### ***4.1. Extracción de los glicosaminoglicanos***

El método experimental que se realizó para la extracción y purificación de los glicosaminoglicanos se basó en el método descrito por Newburg et al (100).

Se hizo una mezcla de 36 leches humanas y se almacenó en congelación a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso para la extracción de los glicosaminoglicanos. A dos litros de la mezcla de 36 leches humanas, se les realizaron 3 ciclos de descongelación-sonicación-congelación de la siguiente forma: la mezcla de leches se descongeló en baño de agua a  $37^{\circ}\text{C}$  y se sonicó durante 10 minutos a una intensidad máxima. Posteriormente se congeló la mezcla en un baño de metanol y hielo seco y se repitió este ciclo 2 veces más. La mayoría de los glicosaminoglicanos de la leche materna, se presume que están asociados con la membrana globular de las grasas de la leche, por lo tanto al realizar los ciclos de descongelación-sonicación-congelación, se provoca la ruptura de las membranas y se liberan los glicosaminoglicanos.

Después de los ciclos de descongelación-sonicación-congelación, la mezcla de leches se centrifugó a 3000 rpm y  $12^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos, para eliminar la crema de la leche, la cual se retira de la superficie con la ayuda de una espátula, y la leche descremada se colecta en un vaso de precipitados. Para extraer más cantidad de glicosaminoglicanos, la crema de la leche que se separó previamente, se resuspendió en 500 ml de PBS 1X, se sonicó durante 10 minutos a una intensidad máxima y se centrifugó a 3000 rpm y  $12^{\circ}\text{C}$

durante 30 minutos. Se eliminó la crema de la leche de la superficie y la leche descremada se colectó junto con la leche descremada que se separó en la primera centrifugación.

#### ***4.2 Purificación por ultrafiltración y cromatografía de intercambio iónico***

Para concentrar a la leche descremada y separar las fracciones de acuerdo con el peso molecular de los diferentes componentes de la leche, ésta se filtró en una unidad de ultrafiltración AMICON 8400 (para un volumen de 400 ml) con agitación moderada, 4 atmósferas de presión de nitrógeno y a 4°C. Se utilizaron membranas de polietersulfona para separar a las moléculas de peso molecular mayor a 300,000 y mayor a 10,000. Después de filtrar la leche descremada con las 2 membranas, se obtuvieron 3 fracciones de la leche: la primera fracción contiene aquellas moléculas con peso molecular mayor a 300,000 y es en la cual se encuentran los glicosaminoglicanos; una segunda fracción con las moléculas con peso molecular mayor a 10,000 y menor a 300,000 y una tercera fracción que contiene a las moléculas con peso molecular menor a 10,000.

Las 3 fracciones colectadas se dializaron en agua bidestilada que se cambió 2 veces al día por lo menos durante una semana, con agitación moderada y a 4°C, a través de membranas de celulosa para diálisis con un tamaño de poro de 12,000 a 14,000 de peso molecular. Una vez dializadas, las 3 fracciones de la leche se liofilizaron, se pesaron y se almacenaron a -20 C, hasta su uso. Se continuó trabajando solamente con la fracción 1 que contiene las moléculas con peso molecular mayor a 300,000, ya que en esta fracción se encuentran los glicosaminoglicanos, que son moléculas muy grandes, aunque las fracciones 2 y 3 se almacenaron para probarlas en los ensayos celulares como controles de otros compuestos oligosacáridos y de glicoconjugados.

Para purificar a los glicosaminoglicanos, la fracción 1 se resuspendió en 150 ml de agua bidestilada y se corrió en una columna de 1.5 litros que contiene 625 g de la resina de intercambio aniónico *Dowex macroporous resin MSA-2*, la cual es un tipo de intercambiador aniónico con carácter fuertemente básico.

Antes de cargar la fracción 1 de la leche en la columna, ésta se lavó con aproximadamente 4 litros de agua bidestilada. La muestra se corrió en la columna de intercambio aniónico y se colectaron 3 fracciones al eluir a la columna con 3 soluciones diferentes. La primera fracción se colectó al eluir a la columna con 6 litros de agua bidestilada, esta es la fracción que contiene a los compuestos neutros. Posteriormente se eluyó la segunda fracción con 6 litros de una solución al 1% de NaCl (10g/l 0.17 M), para remover a las glicoproteínas débilmente adherentes. La tercera fracción es la que contiene a los glicosaminoglicanos y se eluyó con 6 litros de una solución al 16% de NaCl (160 g/l 2.7 M). Las tres fracciones se concentraron por ultrafiltración con membranas de peso molecular de 300,000, y después se dializaron al menos durante una semana con agua bidestilada (2 cambios de agua por día) y a 4°C, utilizando membranas para diálisis con un tamaño de poro de 12,000 a 14,000 de peso molecular. Las fracciones dializadas se liofilizaron, pesaron y almacenaron a -20°C hasta su uso en los ensayos celulares.

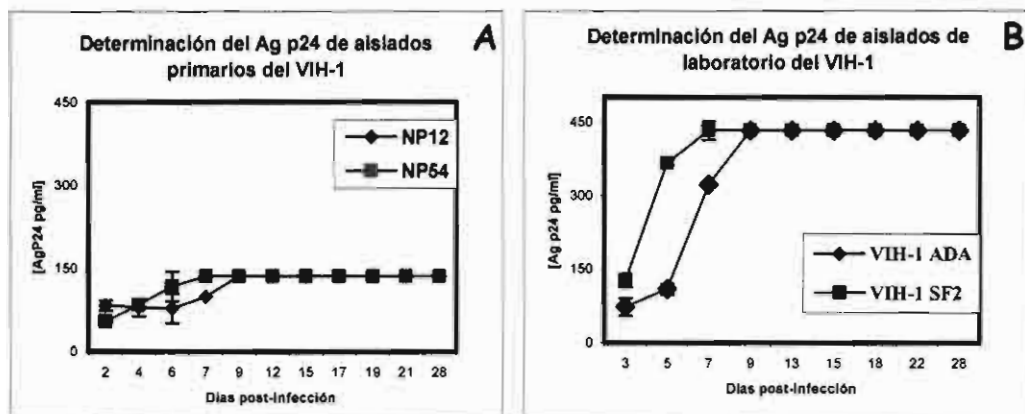
## RESULTADOS

### 1. Propagación y titulación de los aislados primarios y aislados de laboratorio del VIH-1

Para los ensayos de inhibición de la infección por el VIH-1 con los glicoconjugados, se utilizaron 2 aislados primarios: NP12 (aislado viral de un paciente VIH positivo con lenta progresión a SIDA) y NP54 (aislado viral de un paciente VIH positivo con progresión típica a SIDA). También se utilizaron 2 aislados de laboratorio del VIH-1: VIH-1<sub>ADA</sub> (aislado macrófago-trópico) y VIH-1<sub>SF2</sub> (aislado linfotrópico).

La **figura 9** muestra los resultados obtenidos de la determinación del antígeno p24 de los sobrenadantes de cultivo de los aislados primarios (**Figura 9A**) y de los aislados de laboratorio (**Figura 9B**), donde se observa un incremento de la concentración del antígeno desde el inicio del cultivo, alcanzando los niveles máximos de detección del ensayo de ELISA de captura (125 pg/ml), a partir del día 7 post-infección en el caso del aislado NP54 y del día 9 post-infección en el caso del aislado NP12. Las diferencias en las curvas de determinación del antígeno p24 de los aislados primarios (**Figura 9A**) sugieren que cada aislado viral tiene diferente tropismo celular, aunque habría que realizar un ensayo de fenotipificación para conocer su tropismo.

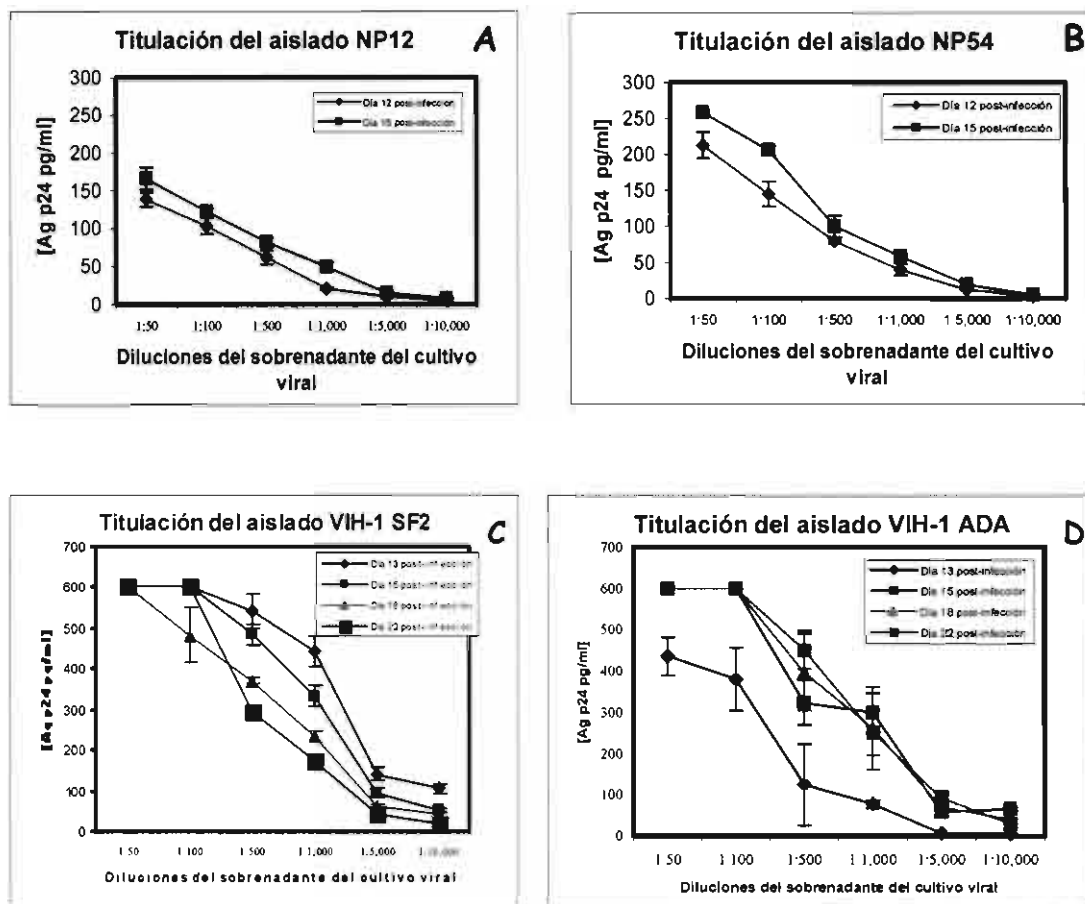
La propagación de los aislados de laboratorio fue más rápida, ya que la concentración del antígeno p24, fué mayor que la concentración determinada con los aislados primarios, alcanzando el máximo nivel de detección del ensayo a partir del día 3 post-infección en el caso del aislado VIH-1<sub>SF2</sub> y del día 5 post-infección en el caso del aislado VIH-1<sub>ADA</sub>. Es importante resaltar que los aislados macrófagotrópicos como el aislado VIH-1<sub>ADA</sub> tardan más en crecer que los aislados linfotrópicos como el aislado VIH-1<sub>SF2</sub>.



**Figura 9. Determinación del antígeno de la cápside p24 de aislados primarios y de laboratorio del VIH-1.** Los aislados virales se propagaron en PBMC de donadores seronegativos para el VIH-1, previamente estimuladas por 48 hr con fitohemaglutinina-L (PHA-L) (5 ug/ml) e interleucina 2 (IL-2) (20 U/ml) durante 28 días. Se cosechó el sobrenadante de cultivo en diferentes tiempos de incubación y se determinó la concentración del antígeno viral p24 del VIH-1 de cada uno de los sobrenadantes cosechados, mediante un ensayo de ELISA de captura de antígeno viral a 450 nm. Cada punto representa al promedio de los duplicados obtenidos en el ensayo de ELISA.

Una vez determinada la concentración del antígeno p24 de los aislados virales, se ajustó la concentración de cada uno de ellos a 1 ng/ml para los ensayos de inhibición de la infección de PBMC y MDM por el VIH-1 con los glicoconjugados extraídos de la leche humana. Para ajustar la concentración de los aislados virales a 1 ng/ml, fue necesario hacer diluciones seriadas de los sobrenadantes de cultivo que mostraron la mayor concentración del antígeno en el ensayo de ELISA de captura, y de esta forma seleccionar la dilución óptima para cada aislado viral. En el caso de los aislados primarios NP12 y NP54 (**Figura 9A**), se seleccionaron los sobrenadantes de cultivo de los días 12 y 15 post-infección para realizar las diluciones seriadas, partiendo de una dilución 1:50 hasta 1:10,000. Para los aislados de laboratorio VIH-1<sub>ADA</sub> y VIH-1<sub>SF2</sub> (**Figura 9B**), se seleccionaron los sobrenadantes de cultivo de los días 13, 15, 18 y 22 post-infección, ya que fueron los que tuvieron la mayor concentración del antígeno p24 en el ensayo de ELISA previo. La **figura 10** muestra los resultados de la concentración del antígeno p24

que se obtuvieron al realizar diluciones seriadas de los sobrenadantes de cultivo que se seleccionaron para cada aislado viral.



De acuerdo con los resultados obtenidos de la titulación de los aislados virales, se seleccionó trabajar en los ensayos de inhibición, con los sobrenadantes de cultivo cosechados al día 15 post-infección, tomando en cuenta la dilución 1:500 para ajustar la concentración de cada aislado viral a 1 ng/ml (Figura 10 A-D).



## **2. Ensayos de inhibición de la infección por VIH-1 con glicoconjugados de la leche humana**

Para evaluar la capacidad de inhibir la infección por el VIH-1 *in vitro*, de los glicoconjugados obtenidos de la leche humana, se realizaron los ensayos de inhibición con dos tipos de células blanco para el VIH-1: MDM y PBMCs (ambas células expresan al marcador celular CD4) y cuatro aislados virales: VIH-1<sub>ADA</sub>, VIH-1<sub>SF2</sub>, NP12 y NP54.

En los ensayos de inhibición, se probaron 8 diferentes preparaciones de la fracción de glicolípidos sulfatados y una fracción de glicosaminoglicanos. Las preparaciones de glicolípidos sulfatados y de glicosaminoglicanos fueron extraídas y purificadas en el Shriver Center for Mental Retardation, University of Massachusetts Medical School, Waltham, Massachusetts, EUA.

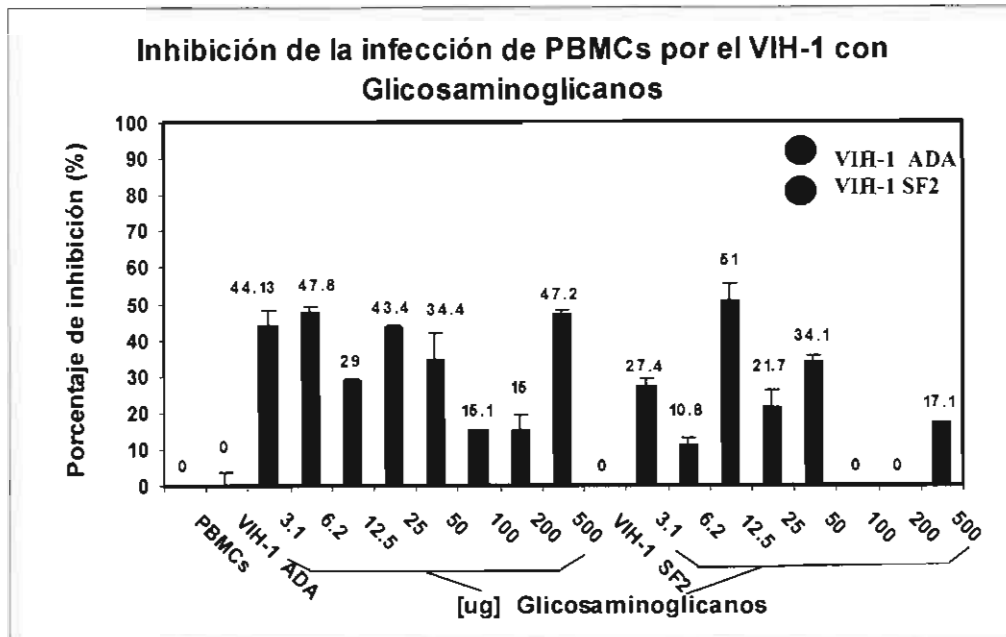
### **2.1. Ensayos de inhibición de la infección por VIH-1 *in vitro* con glicosaminoglicanos**

Para los ensayos de inhibición de la infección por el VIH-1 con glicosaminoglicanos, se trabajó con una solución concentrada de 12 mg que se obtuvo a partir de 75 ml de leche humana. Las concentraciones de glicosaminoglicanos que se probaron en los ensayos de inhibición, así como la cantidad expresada como volúmenes equivalentes de leche humana se muestran en la **tabla 3**. La concentración 1X es la concentración equivalente en PBS que se encuentra en una mezcla de leches humanas.

**Tabla 3. Concentraciones de glicosaminoglicanos probados en los ensayos de inhibición de la infección causada por el VIH-1 *in vitro*.**

Volumen GAGs tomados de la solución concentrada [10X] (ul)	Cantidad equivalente de GAGs tomados de la solución concentrada [10X] (ug)	Concentración de GAGs	Cantidad de GAGs expresados como volúmenes equivalentes de la leche humana (ml)
0.31	3.1	0.03 X	0.2
0.62	6.2	0.06 X	0.4
1.25	12.5	0.1 X	0.75
2.5	25	0.2 X	1.5
5	50	0.4 X	3
10	100	0.9 X	6.7
20	200	1.6 X	12
50	500	3.3 X	25

Al evaluar la capacidad de inhibir la infección de MDM y PBMC por el VIH-1, de la preparación de glicosaminoglicanos, se encontró un porcentaje de inhibición bajo, del 10 al 51% con los aislados virales VIH-1<sub>ADA</sub> y VIH-1<sub>SP2</sub>, aunque como se observa en la **figura 11**, los porcentajes de inhibición de la infección fueron variables y no hay un efecto inhibitorio dependiente de la concentración de los glicosaminoglicanos con ninguno de los 2 aislados de laboratorio que se utilizaron.



**Figura 11. Porcentaje de inhibición de la infección de PBMC por aislados de laboratorio del VIH-1 con glicosaminoglicanos de la leche humana.** Diferentes concentraciones de glicosaminoglicanos se incubaron a 37°C, 85% de humedad y 5% CO<sub>2</sub> durante 3 hrs, en presencia de 1 ng/ml de los aislados de laboratorio VIH-1<sub>ADA</sub> (rojo) y VIH-1<sub>SF2</sub> (azul). Posteriormente se adicionaron 5 x 10<sup>5</sup> PBMC /pozo, previamente estimuladas durante 48 hrs con PHA-L e IL-2, y se incubó durante toda la noche a 37°C. Las placas de cultivo se lavaron 2 veces con PBS 1X estéril y se adicionaron 500 ul/pozo de medio RPMI suplementado con 20% de suero fetal bovino y 1% de antibióticos. Se cosecharon los sobrenadantes de cultivo al día 5 post-infección y se determinó la concentración del antígeno p24 mediante un ensayo de ELISA de captura del antígeno viral a 450 nm. Como controles negativos se cultivaron 4 pozos con células (PMBC) y como controles de infección se cultivaron 4 pozos con células en presencia de cada aislado viral. En la gráfica cada barra representa al promedio obtenido de cada muestra y cada control probados por duplicado.

## 2.2 Ensayos de inhibición de la infección por VIH-1 *in vitro* con glicolípidos sulfatados

A diferencia de los resultados obtenidos con los glicosaminoglicanos, se obtuvo un efecto de inhibición de la infección por el VIH-1 muy alto: mayor al 80% con seis de las ocho preparaciones de glicolípidos sulfatados probadas. Como se observa en la **tabla 4**, solamente las fracciones 6 y 7 no inhibieron la infección de PBMC por el aislado VIH-

I<sub>ADA</sub>, sin embargo sí se obtuvo un efecto inhibitorio alto, 95 y 90 % respectivamente, de la infección de PBMC por el aislado VIH-1<sub>SF2</sub>.

Debido a que la cantidad de glicolípidos sulfatados que se extraen de la leche humana es muy pequeña, no es posible determinar su peso, sin embargo, como se conoce el volumen de leche humana a partir del cual fueron extraídas, es posible determinar su concentración equivalente en volúmenes de leche humana. Las preparaciones 1 y 2 se obtuvieron a partir de 200 ml de leche humana, mientras que las preparaciones 3 a 8, fueron extraídas a partir de 100 ml de leche.

La **tabla 4** muestra las cantidades de glicolípidos sulfatados expresados en volúmenes equivalentes de leche humana, que inhibieron más del 80% de la infección de los aislados de laboratorio VIH-1<sub>ADA</sub> y VIH-1<sub>SF2</sub> y están resaltadas las cantidades mínimas de las preparaciones de glicolípidos sulfatados que inhibieron más del 80% la infección del VIH-1 *in vitro*, estas preparaciones fueron la 2 y la 4 que tuvieron un efecto de inhibición más potente de la infección de PBMCs y MDM respectivamente.

En cada ensayo de inhibición las muestras y los controles se probaron por duplicado y cada ensayo a su vez, se repitió tres veces.

**Tabla 4. Inhibición de la infección por aislados de laboratorio del VIH-1 con diferentes preparaciones de glicolípidos sulfatados extraídos de la leche humana.**

Células Blanco	Número de preparación de glicolípidos sulfatados	VIH-1 <sub>ADA</sub>		VIH-1 <sub>SF2</sub>	
		Cantidad de glicolípidos sulfatados expresados como volúmenes equivalentes de la leche humana (ml)	Porcentaje de inhibición	Cantidad de glicolípidos sulfatados expresados como volúmenes equivalentes de la leche humana (ml)	Porcentaje de inhibición
MDM	1	13	99	13	86
	2	3.6	100	3.6	95
	3	1	97	0.5	100
	4	0.5	100	0.5	100
	5	1	100	0.5	100
	6	7.4	100	0.5	100
	7	1	96	0.5	100
	8	1	85	4	100
PBMC	1	24	100	4	100
	2	0.25	100	0.25	84
	3	2	92	2	88
	4	2	89	4	99
	5	2	83	2	93
	6	---	0	2	95
	7	---	0	2	90
	8	4	100	2	93

Solamente las preparaciones 1 y 2 de los glicolípidos sulfatados, se probaron con los aislados primarios NP12 y NP54 y los resultados se muestran en la **tabla 5**.

**Tabla 5. Inhibición de la infección por aislados primarios del VIH-1 con glicolípidos sulfatados extraídos de la leche humana.**

		NP 12		NP54	
Células Blanco	Número de preparación de glicolípidos sulfatados	Cantidad de glicolípidos sulfatados expresados como volúmenes equivalentes de la leche humana (ml)	Porcentaje de inhibición (%)	Cantidad de glicolípidos sulfatados expresados como volúmenes equivalentes de la leche humana (ml)	Porcentaje de inhibición (%)
MDM	1	66.6	87	22.2	55
	2	40	100	22.2	13
PBMCs	1	22.2	90	40	30
	2	22.2	99	40	57

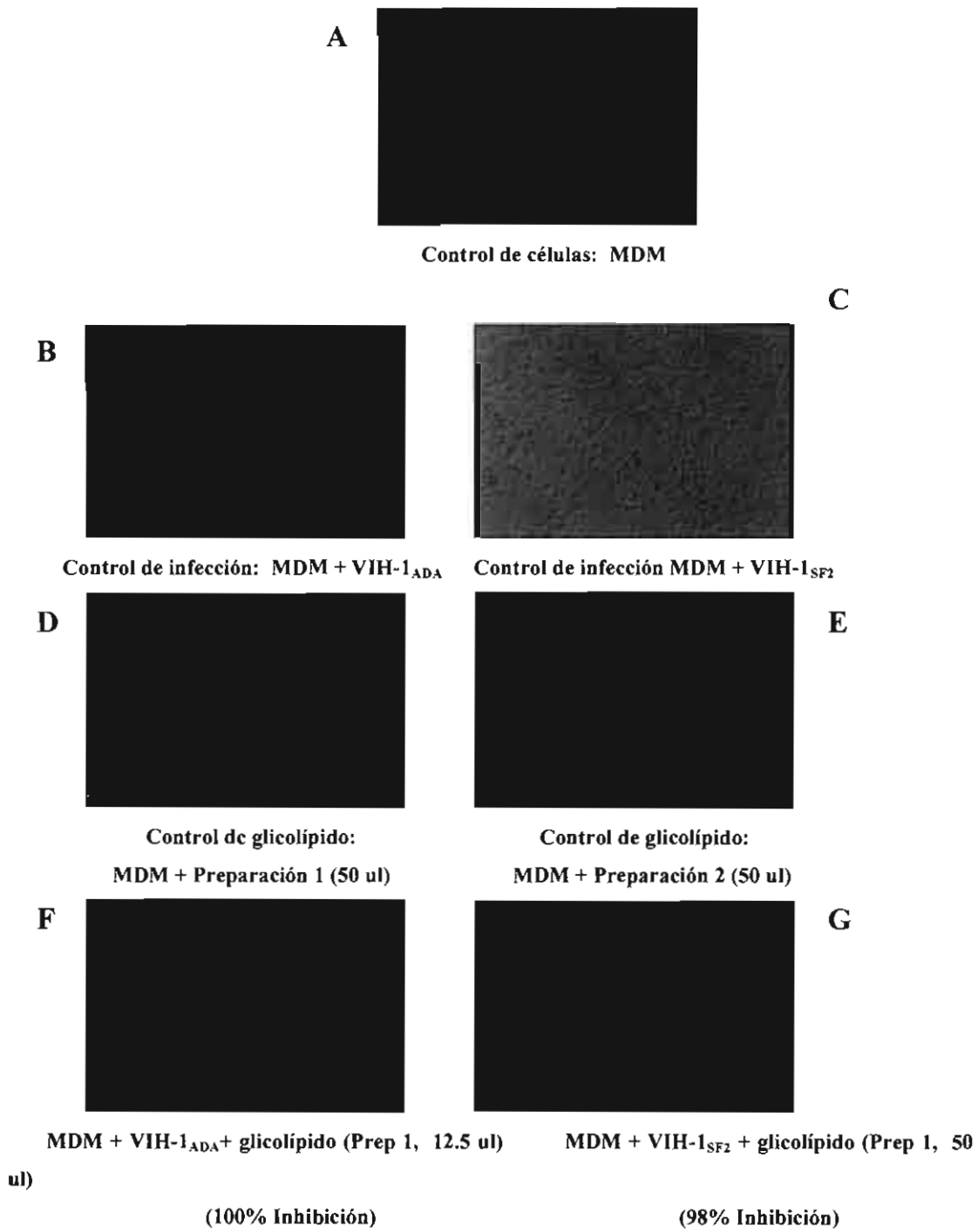
Como se observa en la **tabla 5**, se obtuvo un mayor efecto de inhibición del aislado primario NP12 (87 al 100%), en comparación con el porcentaje de inhibición obtenido del aislado NP54 (13 al 57%). Este efecto se observó en los 2 tipos de células que se probaron en los ensayos de inhibición: MDM y PBMC.

La preparación 2 de los glicolípidos sulfatados inhibió más la infección de MDM y PBMC por los aislados NP12 y NP54, que la preparación 1, con la excepción de la infección de MDM por el aislado NP54, donde el porcentaje de inhibición fue mayor con la preparación 1 que con la 2. Este resultado sugiere que la preparación 2 de los glicolípidos sulfatados podría ser más potente para inhibir la infección de MDM y PBMC por aislados primarios del VIH-1, aunque es necesario probar su efecto con un mayor número de aislados primarios para corroborar este resultado.

De acuerdo con los resultados de las tablas 4 y 5, se observa que la infección de MDM y PBMC por los aislados VIH-1<sub>ADA</sub>, VIH-1<sub>SF2</sub> y NP12, se inhibió más por efecto de los glicolípidos sulfatados, que la infección causada por el aislado primario NP54. También se observa que para inhibir la infección de MDM y PBMCs causada por los aislados primarios NP12 y NP54, fue necesario una mayor cantidad de glicolípidos

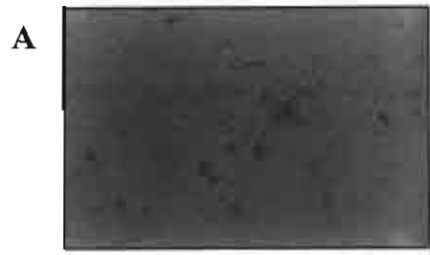
sulfatados (22.2 a 66.6 ml expresados como volúmenes equivalentes de la leche humana), que la cantidad utilizada para inhibir la infección de los aislados VIH-1<sub>ADA</sub> y VIH-1<sub>SF2</sub> (0.25 a 24 ml), es decir, el efecto de los glicolípidos sulfatados en los aislados primarios del VIH-1 es menor.

Por otra parte, se realizó un análisis microscópico de las placas de cultivo de los ensayos de inhibición en donde se utilizaron las preparaciones 1 y 2 de los glicolípidos sulfatados y los aislados VIH-1<sub>ADA</sub> y VIH-1<sub>SF2</sub>. Los resultados de los ensayos con MDM se muestran en las **figuras 12 A-G** y los resultados con PBMC se muestran en las **figuras 13 A-I**. Como se muestra en las figuras, en algunos casos se observa un cambio en la morfología de las células en presencia de los glicolípidos; en el caso de los MDM, éstos se despegan del plástico en algunas zonas del pozo de la placa y tienden a agruparse; en el caso de los PBMC se observa un efecto similar al observado con los MDM, es decir, en presencia del glicolípido, las células tienden a formar grumos. Sin embargo este efecto no es específico de la especie del glicolípido ni de su concentración. Esta tendencia a agruparse que presentaron las células, tampoco mostró relación alguna con el porcentaje de inhibición de la infección que se obtuvo en cada caso. Además la viabilidad celular en los pozos de los controles de glicolípidos (células con glicolípido) (**Figuras 10D, 10E, 11D y 11E**) fue similar (entre el 80 y el 90% de células viables) a la viabilidad en los pozos de los controles de células (**Figuras 10A y 11A**), con lo que se descarta que el cambio en la morfología de las células se deba a un efecto citotóxico del glicolípido. Sin embargo habría que realizar otro tipo de experimentos para identificar a qué nivel interaccionan los glicolípidos con las membranas celulares para que se produzcan los cambios morfológicos en este tipo de células.



**Figura 12. Ensayo de inhibición de la infección de MDM por VIH-1<sub>ADA</sub> y VIH-1<sub>SF2</sub> con glicolípidos sulfatados (40X)**

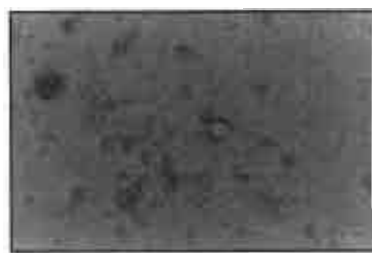




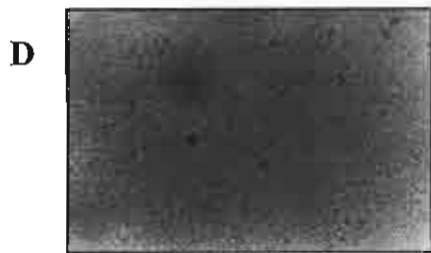
**Control de células: PBMCs**



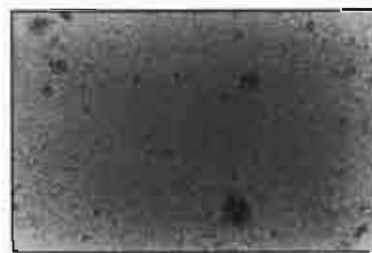
**Control de infección: PBMCs + VIH-1<sub>ADA</sub>**



**Control de infección: PBMCs + VIH-1<sub>SF2</sub>**



**Control de glicolípido:  
PBMCs + Preparación 1 (50 ul)**



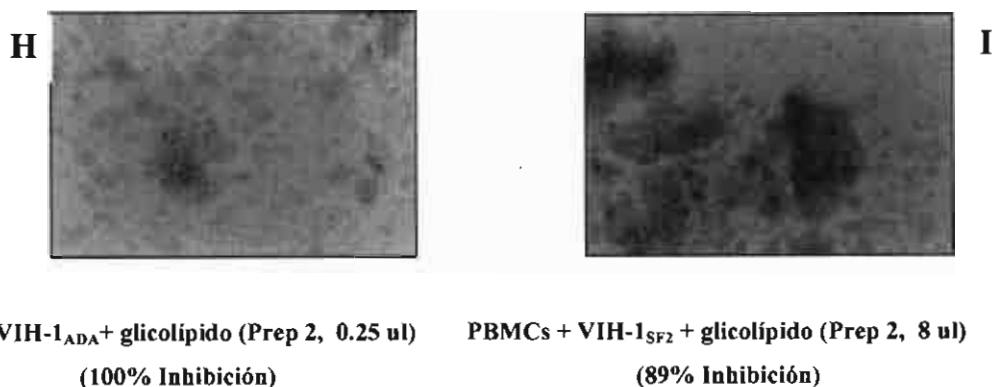
**Control de glicolípido:  
PBMCs + Preparación 2 (50 ul)**



**PBMCs + VIH-1<sub>ADA</sub> + glicolípido (Prep 1, 32 ul)  
(89% Inhibición)**



**PBMCs + VIH-1<sub>SF2</sub> + glicolípido (Prep 1, 4 ul)  
(100% Inhibición)**



**Figura 13. Ensayo de inhibición de la infección de PBMCs por VIH-1<sub>ADA</sub> y VIH-1<sub>SF2</sub> con glicolípidos sulfatados (40X)**

### 3. Extracción y purificación de los glicosaminoglicanos de la leche humana

La fracción de glicosaminoglicanos de la leche materna se extrajo después de descremar la leche completa y de separar y concentrar por ultrafiltración, 3 diferentes fracciones de acuerdo con su peso molecular. Se sabe que los glicosaminoglicanos son moléculas de peso molecular alto ya que su estructura molecular es compleja (122) por esta razón se trabajó con la fracción de la leche que contiene a las moléculas con un peso molecular mayor a 300,000. Las otras 2 fracciones que se colectaron fueron: la fracción 2, que contiene moléculas con peso molecular menor a 300,000 y mayor a 10,000 y la fracción 3 con moléculas cuyo peso molecular es menor a 10,000; ambas fracciones se utilizarán también en los ensayos celulares como controles de otros oligosacáridos y glicoconjugados presentes en la leche.

En la fracción de la leche humana que contiene a los glicosaminoglicanos, también están presentes otro tipo de moléculas con peso molecular elevado como son las glicoproteínas, diferentes tipos de oligosacáridos, proteoglicanos, enzimas, etc (80), y para

separar a los glicosaminoglicanos del resto de las otras moléculas, se realizó la purificación en una columna de intercambio aniónico con la resina macroporosa *Dowex MSA-2*.

Se eluyeron 3 diferentes fracciones de la columna de intercambio aniónico: una fracción neutra que se eluyó con agua tridestilada y que contiene diferentes tipos de oligosacáridos neutros fucosilados de alto peso molecular, como los monofucosil lactosas, difucosilacto-N-tetraosas y trifucosilacto-N-hexaosas. Una segunda fracción que contiene a las glicoproteínas débilmente adherentes como son: mucinas, ácido siálico e inmunoglobulinas de clase A, y que se eluyó con una solución 0.17 M de NaCl. Finalmente la tercera fracción que contiene a los glicosaminoglicanos y que se eluyó con una solución 2.7 M de NaCl. Al final del proceso se obtuvieron 360 mg de glicosaminoglicanos a partir de 2 litros de una mezcla de leches humanas.

Como se mencionó con anterioridad en la sección de material y métodos, la resina *Dowex MSA-2*, es un tipo de intercambiador aniónico con carácter fuertemente básico, en donde los grupos cargados positivamente en la fase estacionaria (grupos amino cuaternarios: R<sub>3</sub>N<sup>+</sup>), atraen a los aniones del soluto, en este caso los glicosaminoglicanos de la fracción de la leche. Por lo tanto, los glicosaminoglicanos que son moléculas polisulfatadas cargadas negativamente, se unirán a las cargas positivas de la fase estacionaria (resina) y debido a que esta interacción es fuerte, para eluir a los glicosaminoglicanos de la columna, se necesita aumentar la carga iónica del eluyente, de forma que se alcance el punto isoeléctrico de los glicosaminoglicanos o el de la fase estacionaria, para neutralizar a la fuerza que retiene a éstos en la columna; en este caso, se utilizó una solución de cloruro de sodio concentrada.

La resina *Dowex* está constituida por una matriz de partículas de tamaño de 20-40 de estireno entrecruzadas con divinilbenceno, el cual controla la porosidad de las

partículas, en este caso la resina es macroporosa y por lo tanto tiene una mayor capacidad de intercambio iónico. Las 3 fracciones que se eluyeron de la columna de intercambio iónico, se liofilizaron y almacenaron para su uso posterior en los ensayos de inhibición.

#### **4. Extracción y purificación de los glicolípidos sulfatados de la leche materna**

Durante los procesos de extracción y de purificación de la segunda preparación de los glicolípidos sulfatados de la leche humana, se realizaron algunas modificaciones al procedimiento original descrito por Newburg, DS y col. (110).

Básicamente las modificaciones que se realizaron fueron: 1) Durante la etapa del fraccionamiento de los lípidos, se realizó una serie de lavados adicionales a la fase que contiene a los glicolípidos (fase orgánica inferior) con una mezcla de metanol acuoso al 90% y hexano; esto fue con el fin de extraer una mayor concentración de glicolípidos y mejorar el rendimiento del proceso. 2) No se realizó la eliminación de sales a través de una columna C-18, previa a la cromatografía de intercambio iónico en la columna de DEAE-celulosa. Se decidió no realizar la desalinización de la fracción de lípidos en la columna C-18, ya que después de la hidrólisis alcalina y la neutralización del extracto de lípidos, se realizaron lavados adicionales con la solución TUP, la cual favorece la ionización de los glicolípidos sulfatados y por consiguiente mejora la separación de éstos de las sales presentes en el extracto. 3) Se realizó una cromatografía en columna con ácido silícico antes y después de realizar la cromatografía de intercambio iónico, con el fin de mejorar la separación de los lípidos totales en 3 clases: lípidos neutros, glicolípidos y lípidos polares. Para la separación de los lípidos se utilizaron cloroformo, acetona y metanol para incrementar la polaridad de los compuestos y eluir selectivamente a las clases de lípidos de la columna de ácido silícico (123).

La conjugación de las dos cromatografías: ácido silícico-DEAE/celulosa-ácido silícico, permitió una determinación cualitativa y semicuantitativa, así como una buena caracterización de los componentes de la mezcla de lípidos presentes en la leche, como se observa en los resultados obtenidos en la cromatografía en capa fina.

### 5. Cromatografía en capa fina (CCF)

Se diseñó y desarrolló un sistema de CCF que permitió la identificación y separación de los glicolípidos sulfatados presentes en la leche humana. Durante la estandarización de la técnica de CCF, se trabajó con una mezcla de los estándares de triglicéridos, ácidos grasos libres, y sulfatados, y se probaron las siguientes fases móviles para encontrar las condiciones óptimas de separación de los glicolípidos sulfatados:

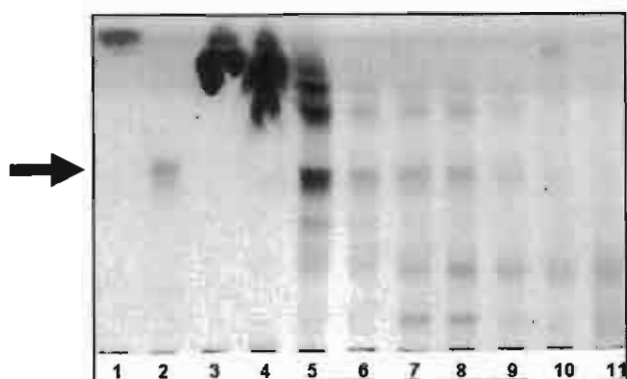
- Etil-éter / Piridina / Etanol /  $\text{NH}_4\text{OH}$  2 M (65 : 30 : 8 : 2) (v/v)
- Cloroformo / Piridina / Agua / (50 : 51 : 5) (v/v)
- Cloroformo / Metanol / Ácido acético glacial / Agua (65 : 45 : 2 : 6) (v/v)
- Cloroformo / Metanol / Ácido acético glacial / Agua (60 : 30 : 5 : 5) (v/v)
- Cloroformo / Metanol / Ácido acético glacial / Agua (65 : 25 : 3 : 1) (v/v)

La fase móvil con la cual se obtuvo la mejor separación de los glicolípidos sulfatados fue:

Cloroformo / Metanol / Ácido acético glacial / Agua (65 : 25 : 3 : 1) (v/v), y una vez determinadas las condiciones para la separación de los estándares de lípidos, se realizó la identificación de los glicolípidos extraídos de la leche humana y que fueron previamente purificados en las columnas de ácido silícico y de DEAE-celulosa.

Los resultados de las cromatografías en capa fina se muestran en las **figuras 14 y 15**. Como se observa en la **figura 14**, después de la purificación del extracto de lípidos en la columna de DEAE-celulosa, no hay una buena separación de los glicolípidos sulfatados, ya que se observa la presencia de al menos 5 bandas además de la banda que corresponde a los compuestos sulfatados. Esto se observa al comparar las líneas 5 a la 10 *versus* la línea 2 que corresponde a los sulfatados totales. Se estableció que la proporción 9:1 de la mezcla de acetona/metanol, fue la mejor para eluir a los compuestos sulfatados en la primera separación de los lípidos en la columna de ácido silícico, previa a la separación en la columna de DEAE-celulosa (**Figura 14, líneas 5-7**). Sin embargo, si fue posible separar a los ácidos grasos que eluyeron con 100 % de cloroformo (líneas 3 y 4) y que están presentes en una gran concentración en la mezcla de lípidos.

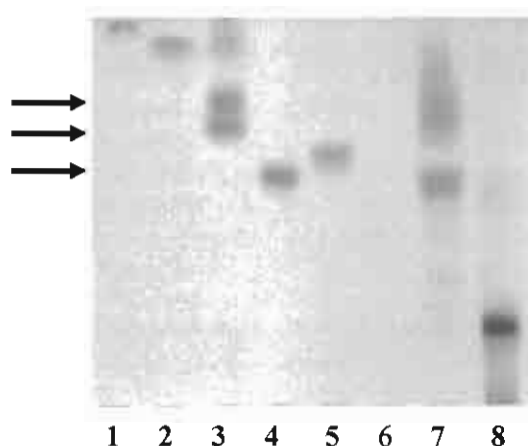
En este sistema de solventes de la fase móvil y de acuerdo con su estructura química conocida, se favorece la migración de los siguientes lípidos (partiendo desde la parte superior de la placa hasta la parte inferior): los ácidos grasos, triglicéridos, monoglicéridos y todos los lípidos neutros migran con el frente del solvente hasta la parte superior de la placa. Posteriormente migran los diferentes tipos de ceramidas (monohexosidas), los sulfatados y las ceramidas compuestas (di y trihexosidas). Las bandas que se observan en la parte inferior de la placa corresponden a los diversos tipos de fosfolípidos presentes en la mezcla y que tienden a permanecer cerca del origen o punto de aplicación de la muestra.



**Figura 14.** Separación por CCF de glicolípidos sulfatados extraídos de la leche humana, después de su purificación a partir de una columna DEAE-celulosa. Línea 1: estándar de ácidos grasos . Línea 2: estándar de glicolípidos sulfatados totales. Las líneas 3 a 11 corresponden a las fracciones del extracto de glicolípidos de la leche humana. Líneas 3 y 4: primeras fracciones eluidas con 100% de cloroformo. Líneas 5-7: segundas fracciones eluidas con una mezcla de acetona/metanol 9:1. Líneas 8 y 9: segundas fracciones eluidas con una mezcla de acetona/metanol 8.5 : 1.5. Línea 10: segunda fracción eluida con una mezcla de acetona/metanol 8 : 2. Línea 11: tercera fracción eluida con 100% de metanol. Fase móvil utilizada: Cloroformo / Metanol /Ácido acético glacial / Agua (65 : 25 : 3 : 1 ) (v/v).

Después de la cromatografía en la columna DEAE-celulosa, el extracto de glicolípidos se purificó utilizando una columna de ácido silícico y las fracciones eluidas de esta columna, se colectaron y se evaluó su pureza en CCF. Los resultados se muestran en la **figura 15**. Se obtuvo una buena separación de los glicolípidos en la segunda fracción colectada de la columna de ácido silícico (línea 7), donde se observa la presencia de 3 bandas que corresponden a los glicolípidos galactosilceramida (línea 3) y a la lactosilceramida (línea 4). Sin embargo no se observa la presencia de glicolípidos sulfatados totales si comparamos la muestra (línea 7) con el estándar de éstos (línea 5). Esto puede deberse a la ruptura de enlaces en las cadenas de los ácidos grasos que constituyen a los glicolípidos, favoreciéndose así la formación de moléculas más pequeñas como la galactosilceramida y la lactosilceramida. Se observa que la totalidad de los

fosfolípidos presentes en la muestra y que no se había separado en la columna de DEAE-celulosa, se separó en la columna de ácido silícico al eluir estos compuestos con 100% de metanol. En la línea 6 no se observa la presencia de triglicéridos ni de ácidos grasos, ya que se lograron separar en la cromatografía de intercambio iónico que se realizó previamente.



**Figura 15. Separación por CCF de glicolípidos sulfatados extraídos de la leche humana después de su purificación a partir de una columna de ácido silícico.** Línea 1: estándar de triglicéridos. Línea 2: estándar de ácidos grasos libres. Línea 3: estándar de galactosilceramida. Línea 4: estándar de lactosilceramida. Línea 5: estándar de glicolípidos sulfatados totales. Las líneas 6, 7 y 8 corresponden a las fracciones del extracto de glicolípidos de la leche humana. Línea 6: primera fracción eluida con 100% de cloroformo. Línea 7: segunda fracción eluida con una mezcla de acetona/metanol 9:1. Línea 8: tercera fracción eluida con 100% de metanol. Fase móvil utilizada: Cloroformo / Metanol / Ácido acético glacial / Agua (65 : 25 : 3 : 1) (v/v).

Se puede estimar la concentración de los compuestos sulfatados extraídos de la leche (línea 7 de la figura 15), al comparar la intensidad de las bandas observadas con la intensidad de las bandas de los estándares de lactosil y galactosilceramida, cuya concentración es de 5 ug. Al comparar los estándares con la muestra, se observa una concentración similar, por lo que se puede inferir que la concentración de los compuestos sulfatados extraídos de la leche es alrededor de 5 ug.



De acuerdo con los resultados obtenidos de la CCF, el hecho de combinar los dos tipos de cromatografía (de intercambio iónico o DEAE-celulosa y la de ácido silícico), permite tener una buena separación de los componentes de la mezcla de lípidos presentes en la leche humana.

## DISCUSIÓN

Como se mencionó previamente, existen varios reportes de glicoconjugados, específicamente glicolípidos, glicoesfingolípidos, glicosaminoglicanos y proteoglicanos, donde se demuestra su participación en el proceso de unión y entrada del VIH-1 a su célula blanco *in vitro* (124-127). Es importante señalar que en estos trabajos existen algunas limitantes metodológicas como el uso exclusivo de cepas o aislados de laboratorio del VIH-1, que son más fáciles de inhibir que los aislados primarios, o bien se han utilizado glicoconjugados sintéticos o fracciones crudas de glicoconjugados que contienen varios compuestos. Otra limitante de estos estudios es que en algunos casos utilizan proteínas recombinantes de la envoltura viral y el receptor CD4+ como modelo de infección o bien se utilizan ensayos de trans migración artificial para evaluar la contribución del glicoconjugado en la interacción virus-célula (128). Es cierto que por un lado con este tipo de ensayos de modelo de membrana se puede obtener información a cerca de la interacción virus-célula, pero por otro lado, se considera que es mejor el trabajar con partículas completas del VIH-1 y líneas celulares o células aisladas de individuos, ya que refleja de una manera más cercana, los mecanismos moleculares que podrían ocurrir *in vivo*.

Con esta información y los resultados que se han reportado acerca de la actividad antimicrobiana que poseen las diversas fracciones de la leche humana, se decidió evaluar el efecto inhibitorio potencial de dos componentes de la fracción sacárida de la leche: los glicolípidos sulfatados y los glicosaminoglicanos. Ambos compuestos han demostrado su efecto en la inhibición de la entrada del virus a la célula blanco, aunque en el caso de los glicolípidos sulfatados, su origen no ha sido de la leche humana sino se utilizaron

compuestos sintéticos, y en el caso de los glicosaminoglicanos aunque si fueron extraídos de la leche humana, se evaluó su efecto en un modelo *in vitro* con proteínas recombinantes.

Todas las fracciones de la leche se evaluaron en concentraciones que podrían ser relevantes en los infantes alimentados con leche humana. La fracción de glicosaminoglicanos aún en concentraciones altas, mostró solamente una baja inhibición de la infección por VIH-1 en PBMC y el efecto inhibitorio no fue dependiente de la concentración de los GAG. Aunque se desconoce la razón de la discordancia de estos resultados, podría deberse a una mala resuspensión del compuesto en la muestra. Los GAG tienen una estructura molecular muy grande y compleja, lo cual dificulta su resuspensión en algunas soluciones. En los ensayos de inhibición, los GAG se resuspendieron en solución salina de fosfatos (PBS 1X) y la suspensión se sonicó para favorecer la resuspensión de los glicoconjugados en la muestra. Sin embargo, es posible que la resuspensión de la muestra no haya sido homogénea o bien que los GAG no se hubieran disuelto en su totalidad. Para los ensayos de inhibición que se realizarán a futuro, será necesario evaluar otro solvente para resuspender a los GAG, como el dimetil sulfóxido pero en bajas concentraciones para minimizar su efecto citotóxico.

El rango de concentraciones de la fracción de GAG que contribuye a la inhibición de la infección por VIH-1 de las células blanco, tiene que ser evaluado con mayor profundidad. Es posible que los GAG individualmente puedan inhibir con mayor potencia la infección del VIH-1 *in vitro*. Por este motivo se realizó una segunda extracción de GAG con algunas modificaciones al método original, lo que permitirá obtener diversas fracciones de estos compuestos, las cuales se probarán a futuro en los ensayos de inhibición.

Es la primera vez que se reporta en la literatura, la actividad anti-VIH *in vitro* que poseen glicolípidos sulfatados extraídos de la leche humana. El hecho de que estos glicoconjugados provengan de un fluido biológico natural como lo es la leche humana, enfatiza aún más la paradoja que existe en definir a la leche como un vehículo de agentes antimicrobianos o en el caso de la transmisión del VIH-1, como un vector de transmisión del virus.

Las preparaciones de los glicolípidos sulfatados de la leche humana, inhibieron la infección por los aislados de laboratorio del VIH-1, de PBMC y MDM *in vitro*, aún en concentraciones bajas, lo cual indica la alta potencia biológica que poseen estos glicoconjugados. La inhibición de la infectividad del virus fue independiente de la cepa viral (VIH-1<sub>ADA</sub> y VIH-1<sub>SF2</sub>) o del tipo de célula que se utilizó como célula blanco.

Con respecto a los resultados de inhibición de la infección de PBMC y MDM por los aislados primarios NP12 y NP54 del VIH-1, se observó que es necesario adicionar una mayor concentración de los glicolípidos sulfatados que la utilizada para los aislados de laboratorio, para obtener un porcentaje de inhibición mayor del 80%. Este resultado era esperado, ya que se conoce que es más difícil inhibir la infección de los aislados virales primarios que la de los aislados de laboratorio. Aunque la concentración de cada aislado viral utilizado para los ensayos de inhibición fue la misma (1 ng de antígeno p24/ml), es probable que la dosis infecciosa de cada uno de ellos sea diferente, es decir, su infectividad no es la misma, por lo tanto, en los ensayos de inhibición que se realizarán para evaluar la potencia de las nuevas fracciones de glicoconjugados extraídas, será necesario determinar la dosis de infectividad media (TCID<sub>50</sub>) de cada aislado y ajustar la misma dosis para todos los aislados virales en los ensayos.

La fracción de glicolípidos sulfatados de la leche humana contiene diferentes especies de éstos que varían en sus características estructurales como la longitud de la cadena de ácidos grasos, los residuos de azúcares y los grupos sulfato. Esta información se obtuvo del análisis de los glicolípidos sulfatados por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC normal y de fase reversa), así como del análisis por espectrometría de masas de las primeras preparaciones de glicolípidos sulfatados que se probaron en los ensayos de inhibición. La heterogeneidad y complejidad estructural de los glicolípidos sulfatados de la leche humana, en conjunción con nuestro descubrimiento que las diferentes fracciones purificadas tienen una actividad inhibitoria alta con MDM y PBMCs, sugiere la posibilidad de que algunas especies individuales de glicolípidos, pueden ser muy potentes aunque su concentración en la fracción total de glicolípidos sea muy baja.

A pesar de la presencia de los glicoconjugados de la leche humana con actividad antiviral, incluyendo las especies activas de glicolípidos sulfatados, la continua exposición al VIH que sufren los niños alimentados con leche de madres VIH-positivas, puede llevar a la transmisión del VIH a través de la alimentación con seno materno, la cual es una causa importante de la infección por VIH en algunos niños. Sin embargo, la alimentación exclusiva con leche materna, es considerada la mejor forma de alimentar al niño durante los primeros meses de vida por las excelentes propiedades nutricionales que posee y porque es una fuente importante de sustancias bioactivas que pueden funcionar como agentes antimicrobianos o inmunógenos. En el caso de la transmisión del VIH en poblaciones donde la mortalidad de los infantes es alta, el riesgo de muerte asociada con la carencia de alimentación por seno materno puede ser mayor que el riesgo de adquirir la infección por el VIH a través de la leche humana.

En resumen, los glicolípidos sulfatados presentes en la leche humana tienen funciones biológicas y pueden desempeñar un papel importante en la protección contra los patógenos virales. Además, la fracción de los glicolípidos sulfatados extraídos de la leche humana puede ser una fuente útil a partir de la cual se pueda caracterizar su función biológica.

La identificación de los componentes de la leche humana que protegen contra la infección por el VIH-1 contribuiría significativamente a la información a cerca de la alimentación con leche humana y a la transmisión vertical del virus. La fuerte actividad inhibitoria *in vitro* en contra del VIH-1 que mostraron los glicolípidos sulfatados extraídos de la leche humana, apoya la posibilidad de que estos glicoconjugados pueden actuar como receptores análogos solubles, previniendo la interacción del VIH-1 con sus células blanco. El conocer la relación precisa entre la estructura y la función de estos glicoconjugados, podría conducir a la identificación y consecuentemente al desarrollo de futuras generaciones de reactivos farmacéuticos con un efecto potente y altamente selectivo.

Los receptores del VIH-1 en las células blanco son glicoconjugados que son reconocidos por el virus mediante la identificación de las cadenas oligosacáridas expuestas al exterior. La modificación química de dichos glicoconjugados permitirá la creación de análogos sintéticos con un poder inhibitorio mayor, de tal manera que sus concentraciones requeridas para bloquear la entrada viral y para un posible uso terapéutico y preventivo, sean aún menores. El utilizar oligosacáridos análogos sintéticos tiene una gran ventaja sobre los oligosacáridos naturales, que es su potencial multivalencia, es decir, tienen la capacidad de interactuar en diferentes regiones con los receptores de las membranas celulares de los microorganismos patógenos, aumentando así la probabilidad de inhibir la adhesión del patógeno a su célula blanco.

Por otro lado, en este estudio se demostró la efectividad de un método sencillo de realizar como lo es la cromatografía en capa fina (CCF), para detectar los diferentes componentes glicoconjugados obtenidos de la leche humana. Aunque la CCF se ha utilizado desde hace varias décadas para la separación de lípidos neutros y fosfolípidos, el análisis sistemático de éstos aún presenta problemas, ya que el principal obstáculo para la separación de los glicolípidos en las placas de cromatografía, es que muchas especies de fosfolípidos migran junto con los glicolípidos e interfieren en su separación.

El sistema de separación de los glicolípidos descrito en este trabajo, se basa en el hecho de que los lípidos neutros migran en todos los solventes polares y se moverán junto con la fase móvil, mientras que los fosfolípidos permanecen cerca del origen o punto de aplicación. Además, el silicato de magnesio presente en las placas, retiene con mayor fuerza a los fosfolípidos que a los glicolípidos. Basándose en esta información y en las diferentes condiciones en las que se estandarizó la técnica de CCF, se logró definir un método para evaluar la pureza de los glicolípidos extraídos de la leche humana y de los cuales se evaluará en un futuro, su potencia para inhibir la infección por el VIH-1 *in vitro*.

## CONCLUSIONES

1. La entrada del Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (VIH-1) a sus células blanco, puede ser bloqueada *in vitro*, al impedir la unión del virus con su receptor celular específico mediante la utilización de receptores análogos obtenidos de fracciones de glicoconjugados (glicolípidos sulfatados y glicosaminoglicanos) de la leche humana.
2. Se logró identificar a los glicolípidos sulfatados como potenciales receptores análogos glicoconjugados que inhiben competitivamente la adhesión del VIH-1 a sus células blanco *in vitro*.
3. Los resultados obtenidos con los glicosaminoglicanos, indican que aunque su efecto sobre la inhibición de la infección del VIH-1 *in vitro* es limitado, es necesario optimizar las condiciones de solubilidad de estos compuestos en los ensayos de inhibición y probar diferentes especies individuales de estos compuestos para evaluar de nuevo su efecto inhibitorio.
4. El efecto inhibitorio de la infección de PBMC y MDM por el VIH-1, debido a la presencia de los glicoconjugados de la leche humana, no fue específico del tipo celular ni del aislado viral que se utilizó en los ensayos de inhibición, aunque sería muy valioso el probar la potencia de estos compuestos con un mayor número de aislados virales, tanto cepas de laboratorio como aislados clínicos con tropismo celular conocido.
5. En este estudio se demostró la efectividad de un método sencillo de realizar como la cromatografía en capa fina, para detectar los diferentes componentes glicoconjugados obtenidos de la leche materna.



6. El método de cromatografía en capa fina que se diseñó y desarrollo en este trabajo, permitió la identificación de los glicolípidos sulfatados presentes en la leche humana. La conjugación de las dos cromatografías: ácido silícico-DEAE/Sephadex-ácido silícico, permitió una determinación cualitativa y semicuantitativa, así como una buena caracterización de los componentes de la mezcla de lípidos presentes en la leche, como se observa en los resultados obtenidos en la cromatografía en capa fina.

## PERSPECTIVAS

En esta tesis se describen los resultados obtenidos con las primeras preparaciones de glicoconjugados (glicolípidos sulfatados y glicosaminoglicanos) que se obtuvieron de la leche humana. Una vez probada la potencia de estas preparaciones en los ensayos de inhibición con el VIH-1, se decidió realizar modificaciones a las técnicas de extracción y purificación de estos compuestos, con el fin de obtener nuevas fracciones más puras y cuyo efecto sobre la inhibición de la infección del virus *in vitro*, se evaluará a futuro.

Por otro lado, ahora que la producción y manufactura en gran escala de los oligosacáridos humanos es posible, éstos pueden ser probados con una amplia variedad de microorganismos infecciosos. Mediante la manipulación bioquímica o química combinatoria de carbohidratos, se pueden crear estructuras oligosacáridas sintéticas (homólogas y análogas), para encontrar cuál es la estructura con mayor efecto de inhibición del proceso infeccioso viral.

En teoría, los oligosacáridos y glicoconjugados humanos específicos deben ser efectivos, seguros y constituyen una alternativa no-inmunogénica y adicional para los antibióticos convencionales. Si a estas ventajas le aunamos que a estos carbohidratos complejos no se les ha atribuído ninguna actividad bactericida, tampoco es probable que se genere una resistencia a ellos como en el caso de los antibióticos.

Los glicolípidos sulfatados y probablemente los glicosaminoglicanos extraídos de la leche humana, constituyen una alternativa real para ser utilizados no solamente como agentes antivirales, sino también como agentes antimicrobianos o microbicidas en general.

# APÉNDICE I

## Materiales, reactivos y equipos

### Materiales para los ensayos celulares

#### Material de cultivo estéril:

- Botellas de cultivo de plástico de 25 y 75 cm<sup>2</sup>
- Pipetas serológicas de plástico de 1,2,5,10 y 25 ml
- Placas de cultivo de 48 y 96 pozos con fondo plano y tapa
- Puntas de polipropileno de 300 ul a 1000 ul
- Crioviales de 1 y 1.5 ml para el almacenamiento de muestras
- Reservorios de plástico desechables
- Tubos cónicos para centrífuga, de polipropileno de 15 y 50 ml
- Unidades de filtración de plástico con membranas de 0.22 um

#### Instrumentos:

- Hematocitómetro o cámara de Neubauer
- Microscopio compuesto
- Microscopio invertido
- Contador de células manual
- Pipetor automático
- Micropipetas unicanal de 0.2 ul a 1000 ul
- Micropipetas multicanal de 250 ul a 1000 ul

#### Equipo:

- Autoclave
- Centrífuga de mesa de alta velocidad
- Campana de flujo laminar de nivel 2 de bioseguridad
- Incubadora con flujo de CO<sub>2</sub> y cámara de humedad

- Espectrofotómetro
- Ultracongelador a -70°C
- Sonificador
- Agitador o vórtex
- Baño de agua con medidor de temperatura
- Refrigerador
- Congelador

Reactivos:

- Solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 1X (GIBCO BRL, Grand Island, NY, EU. Núm. Catálogo: 12377-024)
- Medio de cultivo RPMI 1640 con 2mM de L-glutamina (GIBCO BRL, Grand Island, NY, EU. Núm. Catálogo: 31800-014)
- Medio de congelación: 90% de suero fetal bovino inactivado + 10% de dimetil sulfóxido
- Medio de separación de linfocitos: Lymphoprep (Axis-Shield Poc.AS, Oslo, Noruega. Núm. Catálogo:1053980)
- Penicilina/Estreptomicina. Penicilina: 10,000 unidades/ml y Estreptomicina: 10,000 ug/ml. (GIBCO BRL, Grand Island, NY, EU. Núm. Catálogo:15140-122)
- Suero fetal bovino (GIBCO BRL, Grand Island, NY, EU. Núm. Catálogo:16000-044)
- Interleucina 2 humana (IL-2, 50,000 U, 25 ug en 5 ml) (ROCHE, Indianapolis, IN, EUA. Núm. Catálogo: 1 147 528)
- Fitohemaglutinina-L (PHA-L, 5 mg) (ROCHE, Indianapolis, IN, EUA. Núm. Catálogo: 1 249 738)
- Dimetilsulfóxido (JT Baker, Xalostoc, Edo. Méx. México. Núm. Catálogo: 9224-01)
- Colorante azul tripan al 0.4% (GIBCO BRL, Grand Island, NY, EU. Núm. Catálogo: 15250-061)
- Kit de ELISA para la determinación cuantitativa del antígeno p24 de la cápside del VIH-1. Beckman Coulter, número de catálogo: PN 4238020-F R 6-01

- Hipoclorito de sodio al 1%
- Etanol al 70%
- Solución de Isodine (1g de yodo/100 ml)(Promeco-Boehringer Ingelheim)
- Agua tridestilada

Material para protección del usuario:

- Guantes de látex desechables
- Bata de laboratorio desechable
- Bata de algodón
- Lentes de plástico para protección en el laboratorio
- Contenedor de plástico esterilizable por autoclave, para los desechos líquidos

**Materiales y equipo para la extracción y purificación de los glicoconjugados**

- Unidad de ultrafiltración AMICON 8400 (Millipore, Billerica, MA, EUA. Núm. catálogo: 5124).
- Membranas de polietersulfona de 76 mm de diámetro, para separar moléculas con peso molecular de 10,000 y 300,000 (Millipore, Billerica, MA, EUA. Núm. catálogo: BioMax PBGC 076 10 y BioMax PBMK 076 10, respectivamente).
- Membranas de celulosa para diálisis con un tamaño de poro de 12,000 a 14,000 de peso molecular (Spectra/POR, Los Ángeles, CA, EUA. Núm. catálogo: 132682).
- Resina de intercambio aniónico *Dowex macroporous resin MSA-2*. Tamaño de la partícula: 20-40 mesh, forma: clorada. Características de la resina: macroporosa con una matriz de estireno-divinilbenceno y con carga aniónica fuertemente básica. (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA. Núm. catálogo: 436623).
- Dietilaminoetil (DEAE) celulosa (Whatman, Kent, ME, England. Celulosa microgranular, forma iónica: base libre. Grado: DE52, Núm. Lote: 0152128).
- Rotoevaporador
- Liofilizadora
- Embudos de separación

Reactivos:

- Cloroformo
- Metanol
- Ácido acético glacial
- Hexano
- Cloruro de potasio
- Hidróxido de sodio
- Ácido clorhídrico
- Hidróxido de amonio
- Acetato de amonio
- Ácido silícico en polvo 100-200 mesh-Unisil (Clarkson Chemical Co., Williamsport, PA, EUA).

Material, reactivos y equipo para la cromatografía en capa fina:

- Placas para cromatografía en capa fina de 10 x 10 cm, cubiertas por una capa de gel de sílica con un grosor de 250 um. (EM Science, Gibbstown, NJ, EUA. Silica Gel 60 F254. Núm. catálogo :1.05715-7)
- Tanque de vidrio con tapa, para cromatografía. Para prelavar las placas de CCF y evitar la evaporación de los solventes.
- Concentrador de muestras con termo-block (Techne. Sample concentrator. DRI-Block DB3A).
- Parrilla con temperatura controlada para calentar las placas de CCF
- Cámara de extracción para rociar las placas de CCF (CAMAG TLC Spray cabinet II).
- Campana de extracción
- Jeringas de vidrio Hamilton de 10 ul
- Papel filtro de número 1 (Whatman International Ltd, Maidstone, England)
- Orcinol ferric chloride spray reagent. 100 ml. (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO. Núm. catálogo: 07875)
- Estándar de Lactosilceramida con una concentración del stock de 5 mg (Matreya LLC, Pleasant Gap, PA, EUA. Núm catálogo : 1507-50).

- Estándar de Galactosilceramida con una concentración del stock: 50 mg (Matreya LLC, Pleasant Gap, PA, EUA. Núm. catálogo: 1050).
- Estándar de Sulfatados con una concentración del stock: 50 mg (Matreya LLC, Pleasant Gap, PA, EUA. Núm. catálogo: 1049).
- Estándar casero de triglicéridos, obtenido de leche humana.
- Estándar casero de ácidos grasos, obtenido de leche humana.
- Cloroformo (HPLC grade) (Fisher Scientific Company. Nueva York, NY. EUA)
- Metanol (Biotech grade) (Fisher Scientific Company. Nueva York, NY. EUA)
- Ácido acético glacial (Reagent grade) (Fisher Scientific Company. Nueva York, NY. EUA)
- Ácido sulfúrico (Reagent grade) (J.T. Baker. Xalostoc, Edo. Méx., Méx.)
- Agua tridestilada

## GLOSARIO

**Acetal.** Compuesto orgánico derivado de un hemiacetal, por una reacción con un alcohol. Si el hemiacetal es un azúcar, el acetal es un glicósido.

**Adhesina.** Proteína presente en la superficie de bacterias, virus o parásitos, que se une a un ligando presente en la superficie de las células de organismos eucariontes superiores.

**Aglicona.** Porción de naturaleza no sacárida, que es la porción de un glicoconjugado o glicósido que está unido mediante un enlace glicosídico a un glicano a través de un azúcar terminal reducido.

**Carbohidratos.** Término genérico que se usa para denominar a los azúcares, sacáridos o glicanos. Incluye a los monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos así como a los derivados de estos compuestos.

**Ceramidas.** Componente lipídico de los glicoesfingolípidos, que está compuesto de una cadena larga de alcohol ( esfingosina ) y de una amida unida a un ácido graso.

**Cerebrósido.** Glicolípido compuesto de una ceramida unida a una galactosa (galactosilceramida) o a una glucosa (glucosilceramida).

**Cromatografía de intercambio iónico.** La cromatografía de intercambio iónico está basada en la atracción entre iones del soluto y puntos cargados que existen en la fase estacionaria. En el caso de intercambiadores aniónicos, grupos cargados positivamente en la fase estacionaria atraen aniones del soluto. Los intercambiadores catiónicos contienen puntos cargados negativamente que atraen cationes del soluto. Los intercambiadores iónicos se clasifican en ácidos o básicos, fuertes o débiles. Las resinas ácidas fuertes siguen ionizadas incluso en disoluciones muy ácidas, en cambio las resinas ácidas débiles se protonan a un pH próximo a 4 y pierden su capacidad de intercambio catiónico. Los grupos



muy básicos de amonio cuaternario siguen siendo catiónicos a cualquier valor de pH. Los básicos débiles de amonio terciario se desprotonan en disoluciones moderadamente básicas y pierden entonces su capacidad. Las resinas de intercambio iónico tienen aplicación en estudios donde intervienen moléculas pequeñas (PM=500) que pueden penetrar en los poros pequeños de la resina. Los intercambiadores iónicos de poliestireno son tan grandes que las macromoléculas muy cargadas, como las proteínas, se pueden enlazar irreversiblemente a ellos. Los de celulosa y dextranos sirven para intercambio iónico de macromoléculas.

**Enlace glicosídico.** Unión de un monosacárido a otro vía un grupo hidroxilo anomérico. La unión resulta generalmente de la reacción de un hemiacetal con un alcohol (es decir, un grupo hidroxilo en otro monosacárido o amino ácido) para formar un acetal.

**Gangliósido.** Glicoesfingolípido aniónico que contiene uno o más residuos de ácido siálico.

**Glicano.** Término genérico que se utiliza para denominar a un azúcar o a azúcares ensamblados, en forma libre o unidos a otra molécula. También se utiliza este término para denominar a los sacáridos o carbohidratos.

**Glicobiología.** Estudio de la estructura, química, biosíntesis y funciones biológicas de los glicanos y sus derivados.

**Glicoconjugado.** Una molécula en la cual uno o más unidades de glicanos están unidos covalentemente a una molécula que no es un carbohidrato.

**Glicolípido.** Término general que se utiliza para denotar a una molécula que contiene a un sacárido unido a un lípido. En los organismos superiores, la mayoría de los glicolípidos son glicoesfingolípidos, pero también existen otras especies como los gliceroglicolípidos entre otros.

**Glicoproteína.** Proteína con uno o más glicanos unidos covalentemente.

**Glicosaminoglicanos.** Cadenas laterales polisacáridas de un próteoglicano o polisacáridos complejos libres, compuestos de unidades repetidas lineales de disacáridos, compuesta cada una de un hexosamina y una hexosa o un ácido hexurónico (heparina, heparan sulfato, condroitin sulfato, dermatan sulfato y hialuronano). Los glicosaminoglicanos (GAGs) son los heteropolisacáridos más abundantes en el organismo. Son moléculas muy grandes de polisacáridos no ramificados que contienen unidades repetidas de disacáridos. Las unidades de disacáridos pueden presentar dos moléculas de azúcares modificados: N-acetilgalactosamina (GalNAc) o N-acetilglucosamina (GlcNAc) y una molécula de ácido urónico como el glucuronato o iduronato. Los GAGs son moléculas con una carga fuertemente negativa y con una conformación extendida que le confiere una consistencia altamente viscosa a la solución que los contiene. Al mismo tiempo, su rigidez provee una integridad estructural a las células, favoreciendo el paso entre las mismas y permitiendo así la migración celular. Los GAGs se localizan principalmente en la superficie de las células o en la matriz extracelular.

**Glicoesfingolípido.** Glicolípido que contiene a un glicano unido glicosidicamente al grupo primario hidroxilo de una ceramida.

**Lectina.** Proteína que reconoce específicamente y se une a un glicano sin catalizar una modificación en éste.

**Lectinas tipo C.** Clase de lectinas dependientes de calcio, que se identifican por tener una secuencia característica que contiene un dominio de reconocimiento constituido por carbohidratos.

**Ligando.** Molécula que es reconocida por un receptor específico. En el caso de las lectinas, los ligandos están parcial o completamente basados en un glicano y son denominados contrarreceptores.

**Mucina.** Glicoproteína de gran tamaño con un alto contenido de residuos de serina, treonina y prolina y numerosos sacáridos unidos mediante un enlace 0-glicosídico. Se encuentran frecuentemente en grupos en el polipéptido.

**Receptor.** Es una proteína que se une a un ligando e inicia la transmisión de señales u otra actividad celular.

**Sacárido.** Término genérico para cualquier carbohidrato o ensamblaje de carbohidratos, en forma libre o unidos a otra molécula. Se les llama también carbohidratos y glicanos

## BIBLIOGRAFÍA

1. Reporte del Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA. Informe sobre la epidemia mundial de VIH/SIDA. <http://www.unaids.org/epi/2005>.
2. Estimaciones de CENSIDA con base en datos del Registro Nacional de casos de SIDA. <http://www.salud.gob.mx/conasida/>.
3. Estimaciones de CENSIDA con base en datos de mortalidad de las Direcciones Generales de Estadística y de Epidemiología de la Secretaría de Salud. <http://www.salud.gob.mx/conasida/>.
4. Luciw PA. Human immunodeficiency viruses and their replication. En: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, eds. *Virology*. Volume 2. 3ª ed. Lippincott-Raven, Publishers, Philadelphia, 1996, pp. 1881-1952.
5. Turner BG and Summers MF. 1999. Structural Biology of HIV. *J Mol Biol* 285: 1-32.
6. Arthur LO, Bess JW, Sowder RCI, Benveniste RE, Mann DL, Chermann JC and Henderson LE. 1992. Cellular proteins bound to immunodeficiency virus: Implications for pathogenesis and vaccines. *Science* 258: 1935-1938.
7. Levy JA. Discovery and Origin of HIV. En: Levy JA, ed. *HIV and the Pathogenesis of AIDS*. 2<sup>nd</sup> ed. American Society for Microbiology Press, Washington, 1998, pp 7-11.
8. Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret F, Gruest J, Daughet C and Montagnier L. 1983. Isolation of a T-Lymphotropic retrovirus from a patient at risk for Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS). *Science* 220: 868-871.
9. Clavel F, Guetard D, Brun-Vezinet F, Chamaret S, Rey M-A, Santos-Ferreira MO, Laurent AG and Montagnier L. 1986. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 233: 343-346.
10. Rambaut A., Posada D., Crandall KA and Holmes EC. 2004. The causes and consequences of HIV Evolution. *Nature Reviews Genetics* 5: 52-61.
11. Wainberg MA. 2004. HIV-1 subtype distribution and the problem of drug resistance. *AIDS* 18(Suppl 3): S63-S68.
12. McCutchan FE. 2000. Understanding the genetic diversity of HIV-1. *AIDS*, 14(Suppl 3): S31-S44.
13. Burke DS. 1997. Recombination in HIV: An important viral evolutionary strategy. *Emerg Infec Dis* 3(3): 253-259.

14. Levy JA. Heterogeneity of HIV and its relation to pathogenesis. En: Levy JA, ed. *HIV and the Pathogenesis of AIDS*. 2<sup>nd</sup> ed. American Society for Microbiology Press, Washington, 1998, pp. 137-158.
15. Bebenek K, Abbotts J, Roberts JD, Wilson SH, Kunkel TA. 1989. Specificity and mechanism of error-prone replication by human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase. *J Bio Chem* 264: 16948-16956.
16. Boyer JC, Bebenek K and Kunkel TA. 1992. Unequal human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase error rates with RNA and DNA templates. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 6919-6923.
17. Perrin L, Kaiser L and Yerly Sabine. 2003. Travel and the spread of HIV-1 genetic variants. *The Lancet Infectious Diseases* 3: 22-27.
18. Hogan CM and Hammer SM. 2001. Host determinants in HIV infection and disease. Part 1: Cellular and Humoral Immune Responses. *Ann Intern Med* 134: 761-776.
19. Hogan CM and Hammer SM. 2001. Host determinants in HIV infection and disease. Part 2: Genetic factors and implications for antiretroviral therapeutics. *Ann Intern Med* 134: 978-996.
20. Moore CB, John M, James IR, Christiansen FT, Witt CS, Mallal SA. 2002. Evidence of HIV-1 adaptation to HLA-restricted immune responses at a population level. *Science* 288: 55-56.
21. Deng HK, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Sutton RE, et al. 1996. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 381: 661-666.
22. Lapham CK, Ouyang J, Chandrasekhar B, Nguyen NY, Dimitrov DS and Golding H. 1996. Evidence for cell-surface association between fusin and the CD4-gp120 complex in human cell lines. *Science* 274:602-605.
23. Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Paxton WA, et al. 1996. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 381 (6584): 667-673.
24. Berger EA, Murphy PM and Farber JM. 1999. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: Roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol* 17: 657-700.
25. Levy JA. Steps involved in HIV: Cell interaction and virus entry. En: Levy JA, ed. *HIV and the Pathogenesis of AIDS*. 2<sup>nd</sup> ed. American Society for Microbiology Press, Washington, 1998, pp. 43-59.

26. Fortin JF, Cantin R, Lamontagne G and Tremblay MJ. 1997. Host derived ICAM-1 glycoproteins incorporated on human immunodeficiency virus type 1 are biologically active and enhance viral infectivity. *J Virol* 71: 3588-3596.
27. Fortin JF, Cantin R and Tremblay MJ. 1998. T cell expressing activated LFA-1 are more susceptible to infection with human immunodeficiency virus type 1 particles bearing host-encoded ICAM-1 *J Virol* 72: 2105-2112.
28. Rizzuto, C.D., and Sodroski JG. 1997. Contribution of virion ICAM-1 to human immunodeficiency virus infectivity and sensitivity to neutralization. *J Virol* 71: 4847-4851.
29. Bashirova AA, Geijtenbeek TB, Van Duijnhoven GC, Van Vliet SJ, Eilering JB, Martin MP, Wu L, Martin TD, Viebig N, Knolle PA, KewalRamani VN, Van Kooyk Y and Carrington M. 2001. A dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin (DC-SIGN)-related protein is highly expressed on human liver sinusoidal endothelial cells and promotes HIV-1 infection. *J Exp Med* 193: 671-678.
30. Geijtenbeek TB, Kwon DS, Torensma R, Van Vliet SJ, Van Duijnhoven GC, Middel J, Cornelissen IL, Nottet HS, KewalRamani VN, Littman DR, Figdor CG and Van Kooyk Y. 2000. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 100 : 587-597.
31. Ji X, Gewurz H and Apear GT. 2005. Mannose binding lectin (MBL) and HIV. *Mol Immunol* 42: 145-152.
32. Luciw PA. Human immunodeficiency viruses and their replication. En: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, eds. *Virology*. Volume 2. 3<sup>a</sup> ed. Lippincott-Raven, Publishers, Philadelphia, 1996, pp. 1953-1976.
33. Kiepiela P, Smith AN and Rosenberg E. 2005. Laboratory markers associated with progression of HIV infection. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology* 19(2): 243-254.
34. Fauci AS, Pantaleo G, Stanley S, et al. 1996. Immunopathogenic mechanisms of HIV reproduction. *Ann Intern Med* 124-654.
35. Muñoz A, Wang MC, Bass S et al. 1989. Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)-free time alter human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) seroconversion in homosexual men. *Am J Epidemiol* 130: 530-539.
36. Rutherford GW, Lifson AR, Hessel NA. 1990. Course of HIV-1 infection in a cohort of homosexual and bisexual men: An 11-year follow-up study. *Br Med J* 301(6762): 1183-1188.
37. Phair J, Jacobson L, Detels R, Rinaldo C, Saah A, et al. 1992. Acquired immune deficiency syndrome occurring within 5 years of infection with human

- immunodeficiency virus type 1. The multicenter AIDS cohort study. *JAIDS* 5: 490-496.
38. Sheppard HW, Ascher MS, McRae B, Anderson RE, Lang W, Allain JP. 1991. The initial immune response to HIV and immune system activation determine the outcome of HIV disease. *JAIDS* 4(7): 704-712.
  39. Sheppard HW, Lang W, Ascher MS et al. 1993. The characteristics of non progressors: long term HIV-1 infection with stable CD4+ T cell levels. *AIDS* 7: 1159-1166.
  40. Levy JA. Overall features of HIV pathogenesis: Prognosis for Long-Term survival. En: Levy JA, ed. *HIV and the pathogenesis of AIDS*. 2<sup>nd</sup> ed. American Society for Microbiology Press, Washington, 1998, pp. 311-338.
  41. Deacon NJ, Tyskin A, Solomon A, Smith K, Ludford-Menting M, Hooker DJ, McPhee DA, Greenway AL, Ellet A, Chatfield C, Lawson VA, Crowe S, Maerz A, Sonza S, Learmon J, Sullivan JS, Cunningham A, Dwyer D, Dowton D, Mills J. 1995. Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients. *Science* 270: 988-991.
  42. Learmont JC, Geczy AF, Mills J, Ashton LJ, Raynes-Greenow CH, Garsia RJ, Sullivan JS. 1999. Immunologic and virologic status after 14 to 18 years of infection with an attenuated strain of HIV-1. *N Engl J Med* 340: 1715-1722.
  43. De Vico AL and Gallo RC. 2004. Control of HIV-1 infection by soluble factors of the immune response. *Nature Reviews Microbiology*, 2: 401-413.
  44. Westby M, Manca F, Dalgleish AG. 1996. The role of host immune responses in determining the outcome of HIV infection. *Immunol Today* 17: 120-126.
  45. Pilgrim AK, Pantaleo G, Cohen OJ, Fink LM, Ying Zhou J, Tao Zhou J, Bolognesi DP, Fauci AS, Montefiori DC. 1997. Neutralizing antibody responses to human immunodeficiency virus tipe 1 in primary infection and long-term-nonprogressive infection. *J Infect Dis* 176: 924-932.
  46. Lubaki NM, Ray SC, Dhruva B, Quinn TC, Siliciano RF, Bollinger RC. 1997. Characterization of a polyclonal cytolytic T lymphocyte response to human immunodeficiency virus in persons without clinical progression. *J Infect Dis* 175: 1360-1367.
  47. Blackburn DJ, Mackewicz CE, Barker E, Hunt TK, Herndier B, Haase AT, Levy JA. 1996. Suppression of HIV replication by lymphoid tissue CD8+cells correlates with the clinical state of HIV-infected individuals. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 13125-13130.

48. Kaslow RA, Duquesnoy R, Van Raden M et al. 1990. AI, Cw7, B8, DR3 HLA antigen combination associated with rapid decline of T helper lymphocytes in HIV-1 infection. A report from multicenter AIDS cohort study. *Lancet* 335: 927-930.
49. Eugen-Olsen J, Iversen AKN, Barred P, Koppelhus U, Pedersen C, Benfield TL, Sorensen AM, Katzenstein T, Dickmeiss E, Gerstoft J, Skinhoj P, Svejgaard A, Nielse JO, and Hoffman B. 1997. Heterozygosity for a deletion in the CKR-5 gene leads to prolonged AIDS-free survival and slower CD4+ T cell decline in a cohort of HIV-seropositive individuals. *AIDS* 11:305-310.
50. O'Brien SJ, Moore JP. 2000. The effect of genetic variation in chemokines and their receptor on HIV transmission and progression to AIDS. *Immunol Rev* 177: 99-111.
51. Clegg AO, Ashton LJ, Biti RA, Badhwar P, Williamson P, Kaldor JM, Stewart GJ. 2000. CCR5 promoter polymorphisms, CCR5 59029A and CCR5 59353C, are under represented in HIV-1-infected long-term non-progressors. The Australian long-term non-progressor study group. *AIDS* 14: 103-108.
52. Webster A, Lee CA, Cook DG et al. 1989. Cytomegalovirus infection and progression towards AIDS in haemophiliacs with human immunodeficiency virus infection. *Lancet* 2: 63-66.
53. Richardson BA, John-Stewart GC, Hughes JP, Nduati R, Mbori-Ngacha D, Overbaugh J, Kreiss JK. 2003. Breastmilk infectivity in human immunodeficiency virus type 1-infected mothers. *J Infect Dis* 187: 736-740.
54. Nicoll A, Newell ML, Peckham C, Luo C and Savage F. 2000. Infant feeding and HIV-1 infection. *AIDS* 14 (Suppl 3): S57-S74.
55. Powler MG, Newell ML. 2002. Breast-feeding and HIV-1 transmission in resource-limited settings. *J AIDS* 30: 230-239.
56. Miotti I'G, Taba TE, Kumwenda N, et al. 1999. HIV transmission through breastfeeding. A study in Malawi. *JAMA*. 282: 744-749.
57. WHO/UNICEF/UNAIDS. HIV and infant feeding: a review of HIV transmission through breastfeeding. *WHO/FRH/NUT/CHD 98.3. United Nations Children's Fund (UNICEF/PD/NUT/(J)98-3. UNAIDS/98.5. Geneva: World Health Organization; 1998 (one of a trio of documents).*
58. Van de Perre P. 1999. Transmission of human immunodeficiency virus type 1 through breast-feeding: how can it be prevented?. *J Infect Dis* 179: S405-S407.
59. Rousseau C.M. Nduati RW., Richards BA., et al. Longitudinal analysis of Human Immunodeficiency Virus type 1 RNA in breast milk and of its relationship to infant infection and maternal disease. *J Infect Dis* 2003; 187: 741-747.



60. Kourtis AP, Butera S, Ibegbu C, Belec L and Duerr A. 2003. Breast milk and HIV-1: vector of transmission or vehicle of protection?. *The Lancet Infectious Diseases* 3 (12): 786-793.
61. Rousseau CM, Nduati RW, Richardson BA, et al. 2003. Longitudinal analysis of HIV-1 RNA in breast milk and its relationship to infant infection and maternal disease. *J Infect Dis* 187: 741-747.
62. Fawzi W, Msamanga G, Spiegelman D, et al. 2002. Transmission of HIV-1 through breastfeeding among women in Dar es Salaam, Tanzania. *J Acquir Immune Defic Syndr* 31: 331-338.
63. Lewis P, Nduati R, Kreiss JK, et al. 1998. Cell-free human immunodeficiency virus type 1 in breastmilk. *J Infect Dis* 177: 34-39.
64. Semba R, Neville M. 1999. Breast-feeding, mastitis, and HIV transmission: nutritional implications. *Nutr News* 57: 146-153.
65. Ebrahim GJ. 1995. Breast milk immunology. *J Trop Pediatr* 41: 2-4.
66. Becquart P, Hocino H, Levy M, et Al. 2000. Secretory anti-HIV antibodies in colostrum and breast milk are not a major determinant of the protection of early postnatal transmission of HIV. *J Infect Dis* 181: 532-539.
67. Jia HP, Starner T, Ackermann M, et al. 2001. Abundant human beta-defensin-1 expression in milk and mammary gland epithelium. *J Pediatr* 138: 109-112.
68. Tunzi CR, Harper PA, Bar-Oz B, et al. 2000. Beta-defensin expression in human mammary gland epithelia. *Pediatr Res* 48: 30-35.
69. Farquhar C, Van Cott T, Mbori-Ngacha DA, et al. 2002. Salivary secretory leukocyte protease inhibitor is associated with reduced transmission of HIV-1 through breast milk. *J Infect Dis* 186: 1173-1176.
70. Xyni K, Rizos D, Giannaki G, et al. 2000. Soluble form of ICAM-1, VCAM-1, E- and L-selectine in human milk. *Mediat Inflamm* 9: 133-140.
71. Filipp D, Alizadeh-Khiavi K, Richardson C, et al. 2001. Soluble CD14 enriched in colostrum and milk induces B cell growth and differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 603-608.
72. Mitchie CA, Tantscher E, Schall T, et al. 1998. Physiological secretion of chemokines in human breast milk. *Eur Citokine Netw* 9: 123-129.
73. Rothenberg R, Scarlett M, Del Río C, Reznik D, O'Daniels C. 1998. Oral transmission of HIV. *AIDS* 12: 2095-2105.

74. Shugars DC. 1999. Endogenous mucosal antiviral factors of the oral cavity. *J Infect Dis* 179: S431-S435.
75. Leigh JE, Steele C, Wormley FR Jr, et al. 1998. Th1/Th2 cytokine expression in saliva of HIV-positive and HIV-negative individuals: a pilot study in HIV-positive individuals with oropharyngeal candidiasis. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 19: 373-380.
76. Van de Perre P. 2000. Breast milk transmission of HIV-1. Laboratory and clinical studies. *Ann NY Acad Sci* 918: 122-127.
77. Hocino H, Belec L, Iscaki S, et al. 1997. High-level ability of secretory IgA to block HIV-1 transcytosis: contrasting secretory IgA and IgG responses to glycoprotein gp160. *AIDS Res Hum Retroviruses* 13: 1179-1185.
78. Lilius EM, Marnila P. 2001. The role of colostrum antibodies in prevention of microbial infections. *Curr Opin Infect Dis* 14: 295-300.
79. Barrón-Urbe C. La leche materna. En: Ramos-Galván R, ed. *Alimentación normal en niños y adolescentes. Teoría y práctica*. El Manual Moderno, S.A. de C.V., México, D.F., 1985, pp. 564.
80. Newburg, DS. Bioactive Components of Human Milk. Evolution, Efficiency and Protection. En: Newburg, DS., ed. *Bioactive Components of Human Milk. Advances in Experimental Medicine and Biology*, Volume 501. New York : Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2001, pp. 3-10.
81. Zopf D, Roth S. 1996. Oligosaccharide anti-infective agents. *Lancet* 347: 1017-1021.
82. Newburg DS. 1999. Human milk glycoconjugates that inhibit pathogens. *Curr Med Chem* 6: 117-127.
83. Newburg DS. 1996. Oligosaccharides and glycoconjugates in human milk: their role in host defense. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1: 271-283.
84. Newburg DS, Peterson JA, Ruiz-Palacios GM, Matson DO, Morrow AL, Shultz J, Guerrero ML, Chaturvedi P, Newburg SO, Scallan CD, Taylor MR, Ceriani RL, Pickering LK. 1998. Protection of breast-fed children against symptomatic rotavirus infection by human milk lactadherin. *Lancet* 351: 1160-1164.
85. Peterson JA, Patton S, Hamosh M. 1998. Glycoproteins of the human milk fat globule in the protection of the breast-fed infant against infection. *Biol Neonate* 74: 143-162.
86. Schrotten H, Plogmann R, Hanisch FG, Hacker J, Nobis-Bosch R, Wahn V. 1993. Inhibition of adhesion of S-fimbriated *E. coli* to buccal epithelial cells by human

skim milk is predominantly mediated by mucins and depends on the period of lactation. *Acta Paediatr* 82: 6-11.

87. Wiederschain GY and Newburg DS. 2001. Glycoconjugate stability in human milk: glycosidase activities and sugar release. *J Nutr Biochem* 12: 559-564.
88. Hammache D, Yahi N, Maresca M. et al. 1999. Human erythrocyte glycosphingolipids as alternative cofactor for human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) entry: evidence for CD4-induced interactions between HIV-1 gp120 and reconstituted membrane microdomains of glycosphingolipids. *J Virol* 73: 5244-5248.
89. Harouse J, Collman R and Scarano F. 1995. Human Immunodeficiency virus type 1 infection of SK-N-MC cells: Domain of gp120 involved in entry into a CD4-negative, galactosylceramide/3' sulfa-galactosyl ceramide-positive cell line. *J Virol* 69: 7383-7390.
90. Fantini J, Cook D, Nathanson N. et al. 1993. Infection of colonic epithelial cell line by type 1 human immunodeficiency virus is associated with cell surface expression of galactosylceramide, a potential alternative gp120 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 2700-2704.
91. Cook D, Fantini J, Spitalnik S and Scarano F. 1994. Binding of Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) gp120 to galactosylceramide (GalCer): relationship to the V3 loop. *Virology* 201: 204-214.
92. Fantini J, Hammache D, Delazay O, et al. 1997. Synthetic soluble analogs of galactosylceramide bind to the V3 domain of HIV-1 gp120 and inhibit HIV-1 induced fusion and entry. *J Biol Chem* 272: 7245-7252.
93. Kamisago S, Iwamori M, Tai T, Mitamura K, Yazaki Y, Sugano K. 1996. Role of sulfatides in adhesion of *Helicobacter pylori* to gastric cancer cells. *Infect Immun* 64: 624-628.
94. Suzuki T, Sometani A, Yamazaki Y, Horiike G, Mizutani Y, Masuda H, Yamada M, Tahara H, Xu G, Miyamoto D, Oku N, Okada S, Kiso M, Hasegawa A, Ito T, Kawaoka Y, Suzuki Y. 1996. Sulphatide binds to human and animal influenza A viruses, and inhibits the viral infection. *Biochem J* 318 (Part 2): 389-393.
95. Yahi N, Baghdiguian S, Moreau H, Fantini J. 1992. Galactosyl ceramide (or a closely related molecule) is the receptor for human immunodeficiency virus type 1 on human colon epithelial HT29 cells. *J Virol* 66: 4848-4854.
96. Bath S, Mettus RV, Reddy EP, Ugen KE, Srikanthan V, Williams WV, Weiner DB. 1993. The galactosylceramide/sulfatide receptor binding region of HIV-1 gp120 maps to amino acids 206-275. *AIDS Res Human Retrovir* : 175-181.

97. Schneider-Schaulies J. 2000. Cellular receptors for viruses: links to tropism and pathogenesis. *J Gen Virol* 81: 1413-1429.
98. Vos JP, Lopes-Cardozo M, Gazella BM. 1994. Metabolic and functional aspects of sulfogalactolipids. *Biochim Biophys Acta* 1211: 125-149.
99. Hirabayashi Y, Ichikawa S. En: Fukuda M, Hindsgaul O, eds. Roles of glycolipids and sphingolipids in Biological membrane. The Frontiers in Molecular Biology Series. Oxford: IRL Press at Oxford University Press, 1999; pp 220-248.
100. Newburg D, Linhardt R, Ampofo SA and Yolken RH. 1995. Human milk glycosaminoglycans inhibit HIV glycoprotein gp120 binding to its host cell CD4 receptor. *J Nutr* 125: 419-424.
101. Furuta Y, Eriksson K, Svennerholm B, Fredman P, Horal P, Jeansson S, VAhne A, Holmgren J, Czerkinsky C. 1994. Infection of vaginal and colonic epithelial cells by the human immunodeficiency virus type 1 is neutralized by antibodies raised against conserved epitopes in the envelope glycoprotein gp120. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 12559-12563.
102. Harouse JM, Bhat S, Spitalnik SL, Laughlin M, Stefano K, Silberberg DH, Gonzalez-Scarano F. 1991. Inhibition of entry of HIV-1 in neural cell lines by antibodies against galactosylceramide. *Science* 253: 320-323.
103. Yarema K and Bertozzi C. 1998. Chemical approaches to glycobiology and emerging carbohydrates-based therapeutic agents. *Curr Opin Chem Biol* 2: 49-61.
104. Davis MK. Human milk and HIV infection: Epidemiologic and laboratory data. En: Immunology of milk and neonate. Mestecky J, et al., eds. Plenum Press, N:Y: 1991 pp 271-279.
105. Berkhout B, et al. 1997. Structural and functional analysis of negatively charged milk proteins with anti-HIV activity. *AIDS Res Hum Retrovir* 13: 1101-1107.
106. Newburg DS et al. 1991. Characterization of a human milk factor inhibits binding of HIV gp120 to its CD4 receptor. *Adv Exp Med Biol* 310: 281-291.
107. Harmsen MC, et al. 1995. Antiviral effects of plasma and milk proteins: Lactoferrin shows potent activity against both human immunodeficiency virus and cytomegalovirus replication in vitro. *J Infect Dis* 172: 380-388.
108. Baba M, De Clercq E, Schols D. et al. 1990. Novel sulfated polysaccharides: Dissociation of anti-human immunodeficiency virus activity from antithrombin activity. *J Infect Dis* 161: 208-213.
109. Viveros-Rogel, M., Soto-Ramírez, L., Chaturvedi, P., Newburg, D.S. and Ruiz-Palacios, G.M. Inhibition of HIV-1 Infection in vitro by Human Milk

- Sulfated Glycolipids and Glycosaminoglycans. En: Pickering, L.K., Morrow, A.L., Ruiz-Palacios, G.M. and Schanler, R.J., ed. Protecting Infants Through Human Milk. Advancing the Scientific Evidence. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Volume 554. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2004, pp. 481-487.
110. Newburg DS and Chaturvedi P. 1992. Neutral Glycolipids of Human and Bovine Milk. *Lipids* 27 (11): 923-927.
111. Folch J, Lees M and Sloane-Stanley G.H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-509.
112. Rouser G, Bauman A J, Kritchevsky G, Heller D J and O'Brien J S. 1961. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 38: 544-555.
113. Rouser, G., Kritchevsky, G., Heller, D., and Lieber, E. 1963. Lipid composition of beef brain, beef liver, and the sea anemone: two approaches to quantitative fractionation of complex lipid mixtures. *Journal of the American Oil Chemist's Society* 40: 425-454.
114. Svennerholm L. 1956. The quantitative estimation of cerebrosides in nervous tissue. *J Neurochem* 1:42-53.
115. [http://niaid.nih.gov/daids/vir\\_manual](http://niaid.nih.gov/daids/vir_manual) o <http://aactg.s-3.com/labmanual.htm>. The AIDS Clinical Trials Group (ACTG). Lab Manual. Section: Virologic Methods.
116. <http://cdc.gov> Nombre del archivo: bioseguridad1.cdr. CDC NIH Bioseguridad en laboratorios de Microbiología y Biomedicina. 4th edition. Richmond, J Y. and McKinney, R W. editors. Sección III: Criterios de nivel de bioseguridad de los laboratorios; pp: 12-37. Sección VI: Niveles de bioseguridad recomendados para agentes infecciosos y animales infectados; pp: 62-65. Sección VII-F: Agentes virales; pp: 114-142.
117. Burleson Florence G., Chambers Thomas M. and Wiedbrauk Danny L. 1992. Counting cells with a hemacytometer. In *Virology. A Laboratory Manual*. Academia Press, Inc., N.Y. pp. 19-24.
118. Soto-Ramírez, LE., Renjifo, B., McLane, MR., Marlink, R. and Essex, M. 1996. HIV-1 Langerhans' cell tropism associated with heterosexual transmission of HIV. *Science* 271: 1291-1293.
119. Burleson Florence G., Chambers Thomas M. and Wiedbrauk Danny L. 1992. Criopreservation of cells. In *Virology. A Laboratory Manual*. Academia Press, Inc., N.Y. pp. 33-36.

120. Butler, M., and Dawson, M. 1992. Cryopreservation. In *Cell Culture*. LABFAX. Academia Press, Inc., N.Y., pp 141-145.
121. Burgard M., Mayaux M.J., Blanche S. et al. 1992. The use of viral culture and p24 antigen screening to diagnose human immunodeficiency virus infection in neonates. *N Engl J Med* 327: 1192-1197.
122. Varki A, Cummings R, Esko J, Freeze H, Hart G and Marth J. Proteoglycans and glycosaminoglycans. En: Varki A, Cummings R, Esko J, Freeze H, Hart G and Marth J. eds. *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, La Jolla, 1999, pp. 145-148.
123. Techniques in Microbial Ecology. Burlage, R.S., Atlas, R., Stahl, D., Geesey, G. and Saylor, G. Oxford University Press. 1998. pp 258-259.
124. Naarding MA, Ludwig IS, Froot F, Berkhout B, Geijtenbeek TBH, Pollakis G and Paxton WA. 2005. Lewis X component in human milk binds DC-SIGN and inhibits HIV-1 transfer to CD4+ T lymphocytes. *J Clin Invest* :1-9.
125. Rawat SS, Gallo SA, Eaton J, Martin TD, Ablan S, KewalRamani VN, Wang JM, Blumenthal R and Puri A. 2004. Elevated expression of GM3 in receptor-bearing targets confers resistance to human immunodeficiency virus type 1 fusion. *J Virol* 78 (14): 7360-7368.
126. Chang TLY, Gordon CJ, Roscic-Mrkic B, Power C, Proudfoot AEI, Moore JP and Trkola A. 2002. Interaction of the CC-chemokine RANTES with glycosaminoglycans activates a p44/p42 mitogen-activated protein kinase-dependent signaling pathway and enhances human immunodeficiency virus type 1 infectivity. *J Virol* 75 (5): 2245-2254.
127. Puri A, Hug P, Jernigan K, Barchi J, Kim HY, Hamilton J, Wiels J, Murray GJ, Brady RO and Blumenthal R. 1998. The neutral glycosphingolipid globotriaosylceramide promotes fusion mediated by a CD4-dependent CXCR4-utilizing HIV type 1 envelope glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 14435-14440.
128. Bobardt MD, Salmon P, Wang L, Esko JD, Gabuzda D, Fiala M, Trono D, Van der Schueren B, David G and Gallay PA. 2004. Contribution of proteoglycans to human immunodeficiency virus type 1 brain invasion. *J Virol* 78 (12): 6567-6584.

## INHIBITION OF HIV-1 INFECTION IN VITRO BY HUMAN MILK SULFATED GLYCOLIPIDS AND GLYCOSAMINOGLYCANS

M. Viveros-Rogel<sup>1</sup>, L. Soto-Ramirez<sup>1</sup>, P. Chaturvedi<sup>2</sup>, D.S. Newburg<sup>2</sup>,  
and G.M. Ruiz-Palacios<sup>1</sup>

### 1. INTRODUCTION

Sulfated glycolipids (SG) and glycosaminoglycans (GAG) present on the surface of colonic, vaginal epithelial, and neuroglial cells bind to HIV gp120, suggesting that these glycoconjugates may have a role in HIV infection. The major goal of our study was to test the ability of SG and GAG from human milk to inhibit HIV-1 infection in vitro. SG and GAG were purified from pooled human milk and characterized by high pressure liquid chromatography (HPLC) and mass spectrometry. Eight different preparations of SG and one of GAG were tested for inhibition of infection. Two laboratory isolates, HIV-1<sub>ADA</sub> (macrophage-tropic virus) and HIV-1<sub>SF2</sub> (lymphotropic virus), were used for inhibition assays using peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and monocyte-derived macrophages (MDM). Inhibition assays were performed by preincubation of serial dilutions of glycoconjugates with each virus before infecting the monolayer of cultured MDM and PBMC. After 4 days, HIV p24 antigen was quantified by enzyme immunoassay (ELA) in culture supernatants. Significant inhibition of viral infectivity was defined as >80% reduction in p24 concentration. GAG showed a low inhibitory effect (8–44%) in HIV-1 infection of PBMC. Table 1 shows the minimal amounts of the most active SG fractions, expressed as volumes of human milk from which they were extracted, that inhibit >80% HIV-1 infection.

**Table 1.** HIV infection of dendritic cells is inhibited by human milk sulfatides (mL)

Target cells	HIV-1 <sub>ADA</sub>	HIV-1 <sub>SF2</sub>
MDM	0.5	0.5
PBMC	0.25	0.25

HIV=human immunodeficiency virus; MDM=monocyte-derived macrophages; PBMC=peripheral blood mononuclear cells

<sup>1</sup>Department of Infectious Diseases, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico

<sup>2</sup>Shriver Center, University of Massachusetts Medical School, Waltham, MA, USA

These results show that sulfated glycolipids from human milk inhibit infection of PBMC and MDM by HIV-1 laboratory isolates *in vitro*.

## 2. BACKGROUND

The global epidemic of AIDS has become one of the most pressing public health emergencies of the last 20 years. The Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS) and the World Health Organization (WHO) at the end of December 2002 recorded 42 million people living with HIV/AIDS worldwide (UNAIDS 2002).

Transmission of HIV can occur through contact with infected body fluids. Vertical transmission of HIV from an infected mother to her child is a special problem. Almost all HIV-infected children acquire the virus from their mothers either before or during birth or from ingestion of milk from their mothers (Schwartz *et al.* 1999). WHO has estimated that up to one-third of all cases of transmission of HIV-1 from an infected mother to her child may occur via human milk (Nicoll *et al.* 2000; Richardson *et al.* 2003).

Although maternal milk can serve as a source of virus transmission to the newborn, this fluid also contains many substances that can block virus infection. Human milk contains large numbers and amounts of complex carbohydrates including glycoconjugates and oligosaccharides that protect infants against a variety of infectious pathogens (Zopf *et al.* 1996; Newburg *et al.* 1996, 1999).

Glycoconjugates, including glycoproteins, glycolipids, mucins, and glycosaminoglycans, contain complex oligosaccharide structures attached to proteins, lipids, and other molecular backbones. Complex carbohydrate moieties of glycoconjugates and oligosaccharides are synthesized by the many glycosyltransferases in the mammary gland; those with homology to cell surface glycoconjugate pathogen receptors may inhibit pathogen binding, thereby protecting the nursing infant (Yarema *et al.* 1998; Bertozzi *et al.* 2001). Sulfated glycolipids have been reported to be receptors for a variety of microbes, including HIV-1 virus (Kamisago *et al.* 1996; Suzuki *et al.* 1996; Yahi *et al.* 1992; Bath *et al.* 1993; Schneider-Schaulies *et al.* 2000).

Glycolipids are ubiquitous in cell surface membranes, and importantly, the glycolipid-enriched membrane domain also includes proteins related to signal transduction. Several investigations suggest that sulfated glycolipids perform important functions in the areas of cellular recognition, cell-cell adhesion, migration, and receptor-mediated signal transduction (Vos *et al.* 1994; Hirabayashi *et al.* 1999). The negative charge of the sulfated glycolipids allows them to bind to positively charged amino acid side-chains of proteins. By imparting a negative charge to the glycoconjugates, the sulfated groups may promote concentration of negative charges at the cell surface in proximity to the lipid bilayer, thereby helping processes such as cell adhesion, cell invasion, cell fusion, and endocytosis.

Evidence suggests that glycosaminoglycans (a class of compounds characterized by large sulfated polysaccharides) of human milk also inhibit HIV infection *in vitro* by binding to the CD4 host cell receptor (Newburg *et al.* 1995).

Sulfated glycolipids and glycosaminoglycans present on the surface of colonic and vaginal epithelium and neuroglial cells bind to gp120, the outer membrane protein of HIV, suggesting that these glycoconjugates may have a role in HIV infection (Furuta *et al.* 1994; Harouse *et al.* 1991). Human milk contains both GAGs and sulfatides that inhibit the binding of gp120 to CD4 in an EIA. Therefore, the GAGs and sulfatides of



human milk could influence the rate of vertical transmission of this virus through breast-feeding if they are present in human milk in biologically relevant concentrations.

The purpose of this study was to test the ability of several sulfated glycolipid species and glycosaminoglycans from human milk to inhibit the infection of human MDM and PBMC cells by laboratory strains of HIV-1. Human MDM and PBMC cells are good models to study HIV infection *in vitro* because they are primary target cells of HIV.

### 3. OBJECTIVES

We tested the ability of the human milk GAGs and SG to inhibit the infection of primary human MDM and PBMC cells by HIV-1 *in vitro*.

### 4. MATERIALS AND METHODS

#### 4.1. Isolation and Purification of Sulfated Glycolipids from Human Milk

Purified individual sulfated glycolipid species from pooled human milk were obtained as follows: human milk was obtained from the New England Milk Bank and was kept frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use. Lipids were extracted from milk using chloroform/methanol/water, and the lipids of the organic lower phase were partitioned between 90% aqueous methanol and hexane. The hexane phase containing the bulk of triglycerides was discarded and the lipid extract was subjected to alkaline hydrolysis with 0.6 N methanolic sodium hydroxide to eliminate phospholipids. After neutralization with hydrochloric acid, the sample was desalted on a C-18 column followed by ion-exchange chromatography on a DEAE-Sephadex column (acetate form) equilibrated with chloroform. The sample was loaded in chloroform and the column was washed with 8 column volumes of chloroform to remove neutral glycolipids. The sulfated glycolipids were eluted with a 0.5 M potassium acetate solution in chloroform/methanol (4:1) containing 10 mL of ammonium hydroxide per 500 mL of solution, followed by desalting on a C-18 column. This sulfatide sample, designated 1, was dried under nitrogen and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until testing.

The individual sulfated glycolipid species were purified using a combination of normal and reversed-phase HPLC. The normal-phase HPLC was carried out on a silica column using a gradient elution with methylene chloride/methanol/0.1 M ammonium acetate (pH 4.0). Absorption at 200 nm was used to detect glycolipids, and peak fractions were collected on the basis of their correspondence to authentic sulfated glycolipids available, or by the number of sugar moieties or type of fatty acid chain in the ceramide part of the molecule as determined by mass spectrometry. The fractions were further purified based on the fatty acid length on a reversed-phase column with methanol/methylene chloride as the mobile phase. Individual peaks corresponding to pure molecular species were collected, dried, and stored. In order to confirm the presence of sulfated glycolipids, the sample was analyzed by direct-injection negative-ion electrospray mass spectrometry.

The sulfatides of sample 1 were further purified on a silicic acid column. Sample 1, dissolved in chloroform, was loaded onto a silicic acid column that had been equilibrated with chloroform. After rinsing the column with an aliquot of chloroform, the sulfatides were eluted from the column with acetone, and this purified sulfatide fraction, designated

2, was dried under nitrogen and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until testing. Sample 1 was sub-fractionated on an aminopropyl silica column (100 mg Bond-Elut cartridge, Varian, Harbor City, CA) that had been conditioned with hexane. Sample 1 was dissolved in chloroform and loaded onto the column. Fractions were eluted sequentially from the column with: ethyl acetate/hexane (15:85), yielding sample 3; chloroform/methanol (23:1), sample 4; di-isopropylether/acetic acid (98:5), sample 5; acetone/methanol (9:1.35), sample 6; chloroform/methanol (2:1), sample 7; and chloroform/methanol/3.6 M ammonium acetate (30:60:8), sample 8. All samples were dried under nitrogen and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until testing. The glycosaminoglycan fraction was prepared from pooled human milk as described previously (Newburg et al. 1995).

#### 4.2. Cell-Based Assay for Inhibition of HIV-1 Infection

Human milk SG and GAG were tested for their ability to inhibit infection by HIV. The above eight different preparations of SG and the GAG preparation were tested by first dissolving (with vortexing) the glycoconjugates in a volume of sterile PBS (phosphate buffer saline) equal to 0.05 times the volume of human milk from which it was isolated (20 $\times$ ) to obtain a stock solution.

Two laboratory isolates, HIV-1<sub>ADA</sub> (macrophage-tropic virus) and HIV-1<sub>SF2</sub> (lymphotropic virus), were used for inhibition assays; concentration of HIV-1 p24 antigen was determined by a HIV-1 p24 EIA. Virus stock concentration was adjusted to 1 ng/mL for the inhibition assay. PBMCs from an HIV-1 seronegative individual were purified by the Ficoll/Hypaque method, stimulated with 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of phytohemagglutinin A (PHA) and activated with 10 U/mL of recombinant human interleukin 2 (IL-2) for 48 h at  $37^{\circ}\text{C}$  and 5%  $\text{CO}_2$ . PBMCs were cultured with RPMI 1640 medium containing 20% fetal bovine serum and 1% of antibiotics (100 U/mL of penicillin and 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of streptomycin). MDM cells were isolated by their adherence to plastic using  $4 \times 10^6$  PBMCs per well in a 48-well cell culture plate. MDM were maintained in RPMI 1640 plus 5% human serum and 20% fetal bovine serum at  $37^{\circ}\text{C}$  and 5%  $\text{CO}_2$ . After 5 days, cells were washed twice with PBS and maintained in RPMI 1640 with 20% fetal bovine serum and 1% antibiotics at  $37^{\circ}\text{C}$  and 5%  $\text{CO}_2$  until a monolayer of MDM was formed (10–12 days).

Serial dilutions of glycoconjugates were preincubated with each viral stock (1 ng/mL of HIV-1 p24 antigen) for 3 h at  $37^{\circ}\text{C}$  prior to their addition to monolayers of cultured MDC or PBMC ( $5 \times 10^5$  cells/well). This mixture of cells, virus, and glycoconjugates was incubated overnight (16 h) at  $37^{\circ}\text{C}$  and 5%  $\text{CO}_2$ . After overnight incubation, cells were washed twice with PBS and maintained with RPMI 1640 medium with 20% fetal bovine serum and 1% antibiotics (500  $\mu\text{L}/\text{well}$ ) for 4 days. At day 4 postinfection, culture supernatant was collected to quantify HIV p24 antigen by EIA. Significant inhibition of viral infectivity was defined as >80% reduction in p24 concentration. The percent of inhibition was calculated as follows:

- a)  $\text{p24 concentration from the sample (virus+cells+glycolipid)} / \text{p24 concentration from the positive control (virus+cells)} * 100 = \text{x\% infection}$
- b)  $100\% \text{ infection} - \text{x\%} = \text{\% inhibition.}$

## 5. RESULTS

We found low inhibition (8–44%) with the human milk GAG preparation in HIV-1 infection of PBMC. Glycosaminoglycans were tested in a range of concentration of 0.03× to 3.3×, 1× being the equivalent concentration in PBS as it is found in pooled human milk. In six of the eight preparations of SG tested, we found a high inhibitory effect (>80%) on HIV-1 infection of PBMC and MDM cells; fractions 6 and 7 did not inhibit HIV-1<sub>ADA</sub> infection of PBMCs. Table 2 shows the minimal amounts of SG expressed in equivalent amounts per volume of human milk that inhibit >80% infection of HIV-1<sub>ADA</sub> and HIV-1<sub>SF2</sub> laboratory isolates.

**Table 2.** Inhibition of HIV infection by human milk sulfatide fractions

Target cells	Preparation of sulfated glycolipids	HIV-1 <sub>ADA</sub>		HIV-1 <sub>SF2</sub>	
		Amount of sulfated glycolipids expressed as equivalent volumes of human milk	Percent inhibition	Amount of sulfated glycolipids expressed as equivalent volumes of human milk	Percent inhibition
MDM	1	13	99	13	86
	2	3.6	100	3.6	95
	3	1	97	0.5	100
	4	0.5	100	0.5	100
	5	1	100	0.5	100
	6	7.4	100	0.5	100
	7	1	96	0.5	100
	8	1	85	4	100
PBMC	1	24	100	4	100
	2	0.25	100	0.25	84
	3	2	92	2	88
	4	2	89	4	99
	5	2	83	2	93
	6	---	0	2	95
	7	---	0	2	90
	8	4	100	2	93

Sulfated glycolipid fractions from human milk inhibited HIV-1 infection of PBMC and MDM *in vitro*, even at low concentrations, indicating high biologic potency. The inhibition of virus infectivity was independent of virus strain (HIV-1<sub>ADA</sub> and HIV-1<sub>SF2</sub>) or cell type used as infection target.

## 6. DISCUSSION

All of the human milk fractions were tested at concentrations that would be relevant to breastfed infants. The human milk glycosaminoglycan fractions, even in high concentrations, show only low inhibition of HIV-1 infection in PBMC cells. The range of concentrations that the GAG fraction contributes to the inhibition of HIV-1 infection of target cells should be further evaluated. It is possible that individual GAGs might more strongly inhibit HIV-1 infection *in vitro*.

The sulfated glycolipid fraction of human milk contains sulfated glycolipids that vary in fatty acid chain length, sugar residues and sulfate groups, as identified by normal and reversed-phase HPLC and mass spectrometric analysis. The heterogeneity and structural complexity of the human milk sulfated glycolipids, in conjunction with our finding that different purified fractions have highest activity with MDM and PBNCs, suggest the possibility that some individual glycolipid species may be highly potent, as the absolute amounts of individual active species present in the glycolipid fraction could be extremely minute.

Despite the presence of human milk glycoconjugates with antiviral activity, including active sulfated glycolipid species, the continuous exposure to HIV in children nursing HIV-positive mothers can lead to HIV transmission through breastfeeding being a significant cause of HIV infection in some children. However, exclusive breastfeeding is considered the best form of feeding for the child during the early months of life, and in the case of HIV transmission for populations where the infant mortality rate is high, the risk of death associated with the lack of breastfeeding may be greater than the risk of HIV infection acquired through human milk.

In summary, sulfated glycolipids in human milk have biologic functions, and may play a role in protection against viral pathogens. Furthermore, the sulfated glycolipid fraction of human milk can be a useful source from which to characterize the biological role of sulfated glycolipids.

The identification of human milk components that protect against HIV infection would contribute significantly to the information regarding breastfeeding and vertical transmission of HIV. The strong inhibitory activity against HIV-1 infection *in vitro* by human milk sulfated glycolipids support the possibility that these glycoconjugates may act as soluble receptor homologues, preventing HIV-1 interaction with target cells. Knowing the precise structure/function relationship could lead to future generations of highly selective and potent therapeutic and pharmaceutical reagents.

## 7. ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by a program project grant from the National Institute of Child Health and Human Development (HD13021).

## 8. REFERENCES

- Bertozzi CR, Kiessling LL. Chemical glycobiology. *Science* 2001;291:2357-2364.
- Bhat S, Mettus RV, Reddy EP, Ugen KE, Srikanthan V, Williams WV, Weiner DB. The galactosyl ceramide/sulfatide receptor binding region of HIV-1 gp120 maps to amino acids 206-275. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1993;9:175-181.

- Furuta Y, Eriksson K, Svennerholm B, Fredman P, Horal P, Jeansson S, Vahlne A, Holmgren J, Czerkinsky C. Infection of vaginal and colonic epithelial cells by the human immunodeficiency virus type 1 is neutralized by antibodies raised against conserved epitopes in the envelope glycoprotein gp120. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:12559-12563.
- Harouse JM, Bhat S, Spitalnik SL, Laughlin M, Stefano K, Silberberg DH, Gonzalez-Scarano F. Inhibition of entry of HIV-1 in neural cell lines by antibodies against galactosyl ceramide. *Science* 1991;253:320-323.
- Hirabayashi Y, Ichikawa S. In: Fukuda M, Hindsgaul O, editors. *Roles of Glycolipids and Sphingolipids in Biological Membrane. The Frontiers in Molecular Biology Series*. Oxford: IRL Press at Oxford University Press, 1999; pp 220-248.
- Kamisago S, Iwamori M, Tai T, Mitamura K, Yazaki Y, Sugano K. Role of sulfatides in adhesion of *Helicobacter pylori* to gastric cancer cells. *Infect Immun* 1996;64:624-628.
- Newburg DS. Human milk glycoconjugates that inhibit pathogens. *Curr Med Chem* 1999;6:117-127.
- Newburg DS. Oligosaccharides and glycoconjugates in human milk: their role in host defense. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1996;1:271-283.
- Newburg DS, Linhardt RJ, Ampofo SA, Yolken RH. Human milk glycosaminoglycans inhibit HIV glycoprotein gp120 binding to its host cell CD4 receptor. *J Nutr* 1995;125:419-424.
- Nicoll A, Newell ML, Peckham C, Luo C, Savage F. Infant feeding and HIV-1 infection. *AIDS* 2000;14 Suppl 3:S57-74.
- Richardson BA, John-Stewart GC, Hughes JP, Nduati R, Mbori-Ngacha D, Overbaugh J, Kreiss JK. Breast-milk infectivity in human immunodeficiency virus type 1-infected mothers. *J Infect Dis* 2003;187:736-740.
- Schneider-Schaulies J. Cellular receptors for viruses: links to tropism and pathogenesis. *J Gen Virol* 2000;81:1413-1429.
- Schwartz SA, Nair MP. Current concepts in human immunodeficiency virus infection and AIDS. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999;6:295-305.
- Suzuki T, Sometani A, Yamazaki Y, Horiike G, Mizutani Y, Masuda H, Yamada M, Tahara H, Xu G, Miyamoto D, Oku N, Okada S, Kiso M, Hasegawa A, Ito T, Kawaoka Y, Suzuki Y. Sulphatide binds to human and animal influenza A viruses, and inhibits the viral infection. *Biochem J* 1996;318(Part 2):389-393.
- UNAIDS. *AIDS Epidemic Update, December 2002*.
- Vos JP, Lopes-Cardozo M, Gadella BM. Metabolic and functional aspects of sulfogalactolipids. *Biochim Biophys Acta* 1994;1211:125-149.
- Yahi N, Baghdiguian S, Moreau H, Fantini J. Galactosyl ceramide (or a closely related molecule) is the receptor for human immunodeficiency virus type 1 on human colon epithelial HT29 cells. *J Virol* 1992;66:4848-4854.
- Yarema KJ, Bertozzi CR. Chemical approaches to glycobiology and emerging carbohydrate-based therapeutic agents. *Curr Opin Chem Biol* 1998;2:49-61.
- Zopf D, Roth S. Oligosaccharide anti-infective agents. *Lancet* 1996;347:1017-1021.