

75
lej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



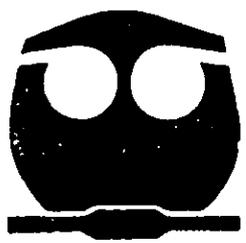
EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

DESARROLLO DE UN SISTEMA DE CULTIVO
CELULAR MIXTO PARA AISLAMIENTO DEL VIRUS
DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA A PARTIR DE
PLASMAS CONGELADOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A
EDGAR ENRIQUE SEVILLA REYES



MEXICO, D. F.

1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

278643



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente Prof. SATURNINO DE LEÓN CHAPA

Vocal Profra. LAURA CECILIA BONIFAZ ALFONZO

Secretaria Profra. CARMEN SOLER CLAUDÍN

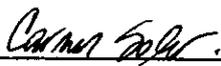
1er. suplente Prof. JORGE FERNANDO PANIAGUA SOLIS

2do. suplente Prof. ENRIQUE ORTEGA SOTO

Sitio donde se desarrolló el tema

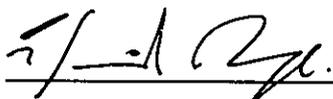
Unidad de Investigación en Retrovirus Humanos,
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM /
Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud.

Asesor del tema



M. en C. Carmen Soler Claudín

Sustentante



Edgar Enrique Sevilla Reyes

"Los AGRADECIMIENTOS"

***A mi Madre, a mi Padre y hermanos
que me han dado más de lo que debieran.***

***...a mis Amigos por ser, estar,
dejarnos ser y poder seguir juntos
todos estos años.***

***...a Ignacio Páramo, Rebeca Franco, Angela Sotelo y
Carmen Soler por confiarme que son más
las cosas que se aprenden que las enseñadas;
su tiempo y experiencia me han sido invaluableles.***

***...a cada uno de los miembros de la varias veces
H. Unidad de Investigación en Retrovirus Humanos.
Las crisis pueden convertirse en oportunidades si se
saben enfocar.***

***...a mis entrañables compañeros de la F. Q...
porque duele mucho crecer
pero es únicamente el dolor lo que
se olvida con el tiempo.***

“Las REFLEXIONES”

“No se puede construir una casa sin clavos en la madera. Si no quieres que un hombre se sienta políticamente desgraciado, no le enseñes dos aspectos de una misma cuestión para preocuparle; enséñale sólo uno. O mejor aún, no le des ninguno. Haz que olvide que existe una cosa llamada guerra”. “Dale a la gente concursos que puedan ganar recordando la letra de las canciones más populares o los nombres de las capitales de Estado o cuánto maíz produjo Iowa el año pasado. Atibórralo de datos no combustibles, lánzales encima tantos <<hechos>> que se sientan abrumados, pero totalmente al día en cuanto a información. Entonces, tendrán la sensación de que piensan, tendrán la impresión de que se mueven sin moverse. Y serán felices, porque los hechos de esta naturaleza no cambian. No les des ninguna materia delicada como Filosofía o Sociología para que empiecen a atar cabos. Por ese camino se encuentra la melancolía. Cualquier hombre que pueda desmontar un mural de televisión y volver a armarlo luego, y en la actualidad la mayoría de los hombres pueden hacerlo, es más feliz que cualquier otro que trate de medir, calibrar y sopesar el Universo, que no puede ser medido ni sopesado sin que un hombre se sienta bestial y solitario. Lo se, lo he intentado. ¡Al diablo con ello! Así pues, adelante con los clubes y las fiestas, los acróbatas y los prestidigitadores, los coches a reacción, las bicicletas, los helicópteros, el sexo y las drogas, más de todo lo que esté relacionado con los reflejos automáticos.”

Capitán Beatty
en “Fahrenheit 451”
de Ray Bradbury.

“Y tengamos presente una cosa: no somos importantes. No somos nada. Algún día, la carga que llevamos con nosotros puede ayudar a alguien. Pero incluso cuando teníamos los libros en la mano, mucho tiempo atrás, no utilizamos lo que sacábamos de ellos. Proseguimos impertérritos insultando a los muertos. Proseguimos escupiendo sobre las tumbas de todos los pobres que habían muerto antes que nosotros. Durante la próxima semana, el próximo mes y el próximo año vamos a conocer a mucha gente solitaria. Y cuando nos pregunten lo que hacemos, podemos decir: <<Estamos recordando.>> Ahí es donde venceremos a la larga. Y algún día recordaremos tanto, que construiremos la mayor pala mecánica de la Historia, con la que excavaremos la sepultura mayor de todos los tiempos, donde meteremos la guerra y la enterraremos.”

George
“Fahrenheit 451”
de Ray Bradbury.

"Sin laboratorios, los hombres de ciencia son como soldados sin armas"

Louis Pasteur

I'm living in the wierdest dream
Where nothing is the way it seems
Where no one's who they need to be
Where nothing seems that real to me
How can we build our lives upon
No wall of stone, no solid ground
The world is spinning endlessly
We're clinging to our own beliefs

"Born of Frustration"

James

"But what I have found over the years is that science is as much a belief system as religion and each belief system is best left in its own domain, rather than trying to usurp the ground of the other. With both religion and science, we're talking about what we believe is true. And in both cases, if we're wrong, we may end up in a place the religious among us might call hell"

C. J. Peters

TEMARIO:

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Planteamiento del problema

1.2 Objetivo

1.3 Hipótesis

2. ANTECEDENTES

2.1 La Epidemia

2.2 El caso de México

2.3 Biología del Virus de Inmunodeficiencia Humana

2.4 Respuesta inmune del hospedero

2.5 Sistemas para cultivo del VIH

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Diseño Experimental

3.2 Material

3.3 Metodologías empleadas

4. RESULTADOS

5. DISCUSIÓN

6. CONCLUSIONES

7. APÉNDICE

8. BIBLIOGRAFÍA

Abreviaturas

a. r.	Aumentos reales (en microscopía)
cbp	...cuanto baste para...
CL	Concentrado leucoplaquetario
DMSO	Dimetil sulfóxido
ICD	Disociación ácida de complejos inmunes (siglas en inglés)
IL2	Interleucina 2 (recombinante)
L. C.	Línea de corte del ELISA
Lin	Linfocitos
Mf	Macrófagos
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica (siglas en inglés)
PBS	Solución salina isotónica de fosfatos
PHA	Fitohemaglutinina
RE	Retículo endoplásmico
RS	RPMI-1640 y L-glutamina, enriquecido con 10% suero fetal bovino inactivado por calor (57°C, 30 minutos)
RS-IL2	RS más 10 U/mL IL2 (recombinante)
RS-SHA	RS más 10% lote de suero humano serotipo A
RS-SHA-IL2	RS más 10% SHA y 10 U/mL IL2 (recombinante)
SFB	Suero fetal bovino (inactivado por calor)
SHA	Lote de suero humano serotipo A (sin complemento; inactivado por calor)
SHA'	Lote de suero humano serotipo A

RESUMEN

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) ha sido ampliamente estudiado en los últimos quince años, lo cual ha ocasionado grandes avances en las áreas biomédicas e incluso se ha logrado mejorar y alargar la vida de los afectados; pero aún hay muchos aspectos asociados a la patogenia del VIH que no son claros.

Sin un modelo animal apropiado para estudiar al VIH, el cultivo celular sigue siendo la principal herramienta de investigación biológica. Para una mejor comprensión de la infección por el VIH son necesarios sistemas de cultivo poco restrictivos que permitan el aislamiento de una mayor variedad de cuasiespecies virales en poco tiempo y a bajo costo.

En este estudio se desarrolló un sistema de cultivo que permite la convivencia de linfocitos y macrófagos derivados de células mononucleares de sangre periférica recién obtenidas e incluso congeladas, empleando un medio de cultivo que contiene suero humano e IL2. Se estandarizaron las condiciones de cantidad celular óptima al inicio de cultivo, el medio de maduración para macrófagos y el tipo de placa de cultivo a usar.

Los cultivos fueron permisivos a la infección tanto con virus prototipo IIIb a bajas dosis infecciosas como con plasmas criopreservados de pacientes. Son necesarios análisis genéticos que permitan identificar a las poblaciones virales obtenidas en estos cultivos y compararlas con los virus presentes en las muestras biológicas ensayadas.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Planteamiento del problema

Se ha demostrado que dentro de un mismo paciente infectado por el Virus de Inmunodeficiencia Humana, coexisten infinidad de cuasiespecies virales que pueden estar circulando por los fluidos corporales o en estado latente integradas como provirus. Cada cuasiespecie tiene un tropismo particular por una o varias estirpes celulares, según sea su capacidad para utilizar los correceptores celulares, pero básicamente las principales estirpes celulares infectadas por el VIH son los linfocitos y los monocitos/macrófagos mediante ciclos virales particulares.

Sin un modelo animal apropiado para estudiar al VIH, el cultivo celular sigue siendo la principal herramienta de investigación biológica. Cuando se realiza un aislamiento viral *in vitro* ocurre una selección viral según sea el material biológico cultivado y el sistema de cultivo empleado. En el cultivo tradicional de células mononucleares de sangre periférica activadas con un mitógeno inespecífico (PHA) principalmente se logra el aislamiento de algunas cepas linfotrópicas o de tropismo dual. Para el cultivo de virus monotrópicos en ocasiones se requieren cultivos que contengan células monocíticas.

Para una mejor comprensión de la infección por el VIH son necesarios sistemas de cultivo más complejos y menos restrictivos que permitan el aislamiento de una mayor variedad de cuasiespecies virales, en poco tiempo y a bajo costo.

1.2 Objetivo

Estandarizar las condiciones de un cocultivo de linfocitos y macrófagos (cultivo mixto) que favorezcan la infección productiva por las diferentes cuasiespecies de VIH presentes en plasmas congelados.

1.3 Hipótesis

Si tanto los linfocitos como los macrófagos son las células más susceptibles *in vivo* a la infección por el VIH y considerando el variado citotropismo viral en las muestras biológicas, el desarrollo de un sistema de cocultivo de linfocitos y macrófagos permitirá el aislamiento de una mayor variedad de cepas virales. En este caso se probarán plasmas criopreservados.

2. ANTECEDENTES

2.1 La Epidemia

El primer caso del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) fue descrito en 1981 en los Estados Unidos. Al inicio, el SIDA fue relacionado únicamente a la homosexualidad masculina, pero entre 1982 y 1983 surgieron casos tanto de mujeres que tenían relaciones sexuales con enfermos de SIDA, así como de pacientes hemofílicos y otros receptores de hemoderivados¹.

En 1983, se aisló un nuevo retrovirus a partir de nódulos linfáticos de pacientes con SIDA²: fue llamado LAV (Lymphadenopathy-associated virus) por Montagnier, HTLV-III (Human T-lymphotropic Virus type III) por Gallo y ARV (AIDS-Associated Retrovirus) por Levy. Hasta 1986 se adoptó internacionalmente el nombre de HIV (Human Immunodeficiency Virus)² o por su traducción al español, VIH (Virus de la Inmunodeficiencia Humana), como será referido en esta tesis.

Más de 15 años de epidemia³ han transcurrido dejando (hasta noviembre de 1998) 33.4 millones de seres humanos infectados⁴ e incertidumbre en muchos aspectos inmunológicos y virológicos asociados al VIH/SIDA, pero también se han logrado avances científicos que mejoran e incluso alargan la vida de los afectados y nos aproximan al desarrollo de una terapia y/o profilaxis efectiva contra el VIH/SIDA.

Se sabe que el VIH se transmite principalmente por vía sexual, a través del semen y secreciones vaginales, teniendo a las enfermedades de transmisión sexual de tipo ulcerativo o inflamatorio como factores predisponentes; también se transmite por vía sanguínea (transfusiones,

órganos y tejidos, hemoderivados y por agujas o jeringas contaminados) o por vía perinatal (durante el embarazo, parto y/o lactancia)^{1, 5, 6}.

Las personas infectadas por el VIH han sido relacionadas a grupos sociales marginados, de baja escolaridad y acceso limitado a servicios de salud, sean de países industrializados o en desarrollo⁶. En África y en el sudeste asiático se presenta el mayor número de casos, con incrementos hasta del 100% en la prevalencia poblacional del VIH en el último lustro. Pero la epidemia que ha logrado avanzar sobre todos los países y niveles sociales, continuará evolucionando, según los factores de cada región⁶.

2.2 El caso de México

La epidemia del VIH/SIDA en México puede dividirse en 3 etapas: la primera, desde 1983, cuando se diagnostica el primer caso de SIDA, hasta 1986, al implantarse el control y diagnóstico de sangre y hemoderivados, a la vez que se impide su comercialización; en este periodo la epidemia crecía lentamente, atacando principalmente a hombres homo/bisexuales. La segunda etapa ocurre de 1987 a 1990, cuando el número de casos creció exponencialmente. A partir de 1991, la epidemia desacelera su crecimiento pero los reportes de transmisión heterosexual aumentan^{5, 7}.

La prevalencia de la infección por VIH en México ha oscilado entre 0.05 y 0.09 %; la principal forma de transmisión continúa siendo la sexual (89% de casos) seguida por la sanguínea (9%)⁶. En el grupo de adultos de 25 a 34 años, la muerte por SIDA ha tenido cada vez mayor impacto: en 1991 fue la cuarta y en 1996 la tercera causa de muerte en hombres, pero en las mujeres mexicanas pasó de la decimoquinta causa de muerte hasta ser la sexta en el mismo periodo⁷.

2.3 Biología del Virus de Inmunodeficiencia Humana

Estructura viral

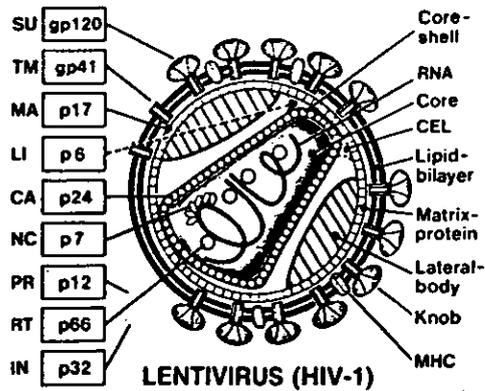
El Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1 se clasifica dentro de la familia *Retroviridae*, género *Lentivirus*⁸. Según su material genético es un virus con 2 copias de RNA de cadena sencilla (+) que utiliza la retrotranscripción e integración al genoma celular para sintetizar nuevas partículas virales. Sus viriones maduros miden entre 100 y 130 nm de diámetro⁹.

El VIH consta de una bicapa lipídica externa, como envoltura, que proviene de la membrana celular del hospedero, pero además cuenta con glicoproteínas virales, asociadas generalmente en trímeros o tetrámeros. La glicoproteína de superficie SU^{7,10} (gp120) está unida de forma no covalente a la también glicoproteína transmembranal TM (gp41); estos oligómeros son fundamentales para la actividad biológica del virión, pues son el sitio de interacción y fusión con las células blanco; la presencia de tales oligómeros constituye hasta 10 nm del tamaño del virus y por tanto son fácilmente identificables por microscopía electrónica⁹.

Debajo de la envoltura está la matriz viral, presumiblemente de forma icosaédrica y formada por p17 (figura 1). Al interior se encuentra la cápside que semeja a un cono y está constituida por la proteína viral más abundante en la partícula, CA (p24). Dentro del cono existe el material necesario para la síntesis del provirus¹⁶: las proteínas estructurales NC (p17), LI (p6), las enzimas PR (p15), RT (p51 y ribonucleasa H p66), IN (p11), más 2 cadenas idénticas de RNA y un par de iniciadores tRNA^{lys}

⁷ Por convención, las proteínas codificadas por los retrovirus se nombran por siglas de 2 letras, para evitar discrepancias en los pesos moleculares y para hacer comparaciones entre miembros de esta familia viral

Figura 1: Diagrama estructural del VIH
(tomado de Gelderblom 9)



El VIH es considerado un retrovirus complejo¹¹, pues además de contener los genes y productos comunes a esta familia viral, *gag-pol-env*, cuenta con *rev* y *tat* (Tabla 1), cuyos productos posiblemente no asociados al virus son capaces de regular el ciclo de replicación viral. El VIH tiene un genoma con varios marcos de lectura alternativos que forman sus genes reguladores y accesorios, además de contar con variados procesamientos postranscripcionales (más de 30 RNAm virales¹²). Esta compleja estructura genética permite al VIH regular su expresión dentro de la célula hospedera.

Ciclo viral

El virus maduro interacciona con la célula blanco mediante la proteína gp120, que se une inicialmente al receptor CD4 expresado principalmente por los linfocitos T cooperadores y las células monocíticas¹⁴; se postula que gp120 sufre un cambio conformacional que expone un dominio de unión para otra proteína celular transmembranal, llamada correceptor¹⁵ (ver sección siguiente).

Tabla 1: Los genes y las proteínas del VIH-1

Gen	Precursor proteico	Proteína		Presente en el virión	Funciones esenciales
Estructurales					
<i>gag</i>	Pr55 _{gag}	MA	p17	✓	Forma la matriz viral
		CA	p24	✓	Forma la cápside
		SP1		✓	Péptido espaciador dentro de la cápside
		NC	p7	✓	Forma la nucleocápside. Estabiliza al dímero de RNAv
		SP2		✓	Péptido espaciador dentro de la cápside
		LI	p6	✓	Ensamblado correcto de la cápside y unión a envoltura
<i>pol</i>	Pr 160 _{gag-pol}	PR	p15	✓	Proteólisis postraducciona de proteínas virales
		RT	p66	✓	DNA polimerasa RNA dependiente
			p51	✓	RNasa H
		IN	p32	✓	Endonucleasa para Integración del provirus
<i>env</i>	Pr160 _{env}	SU	gp120	✓	Glicoproteína externa. Une a receptores celulares y determina tropismo
		TM	gp41	✓	Glicoproteína transmembranal. Fusión celular y ensamblado viral en membranas
Reguladores					
<i>tat</i>		Tat	p14	No*	Transactivador transcripcional del LTR
<i>rev</i>		Rev	p19	No	Aumenta transcripción y exportación nuclear de RNAv
Accesorios					
<i>vif</i>		Vif	p23	✓*	Aumenta infectividad. Indispensable para replicar en PBMC y ayuda en el ensamblado
<i>vpr</i>		Vpr	p18	✓	Aumenta transcripción, principalmente en macrófagos. Estabiliza el complejo de preintegración
<i>vpu</i>		Vpu	p16	No	Aumenta liberación viral. Une a CD4 y MHC-I a nivel de RE impidiendo que llegue a membrana
<i>nef</i>		Nef	p27	No*	Regulador de replicación viral. Participa en el transporte proteico intracelular. Posible superantígeno

RE: retículo endoplásmico

*Aún no está bien definida la presencia de algunas proteínas reguladoras y accesorias en el virión.
Tabla adaptada de las referencias 13,14 y 15.

A la unión le sigue la fusión membranal independiente del pH. Las primeras etapas del ciclo viral no están claramente definidas pero se ha propuesto que la interacción gp120-CD4 genera un cambio conformacional en gp120, que permite la separación de SU-TM. La exposición del dominio amino terminal de TM, altamente hidrofóbico, permitiría su penetración a la membrana celular o su unión con otra proteína membranal aún desconocida.

Estas interacciones son casi indispensables para lograr la infección viral, aunque el virus pueda infectar células sin CD4 o correceptores, esto ocurre con mucha menor eficiencia.

Una vez dentro, la cápside comienza a desestabilizarse gracias a la ciclofilina A¹⁶. Se ha señalado que la síntesis del DNA viral de doble cadena ocurre antes de la entrada al núcleo, aunque hay discrepancias respecto a la presencia de CA y MA durante la entrada. La doble cadena de DNA circularizado, NC, LI, Vpr, IN y tal vez CA forman el llamado complejo de preintegración, el cual debido a su adecuada interacción con el citoesqueleto es transportado hasta el núcleo durante la interfase celular. Se nombra provirus al DNA viral ya integrado en el genoma celular. Las fases siguientes del ciclo de replicación dependerán de los sistemas celulares, parcialmente dirigidos por el virus.

El inicio de la transcripción proviral ocurre por la interacción de factores celulares reguladores de la transcripción sobre el segmento 5' del provirus (LTR), tal región aunque no codifica para ninguna proteína cuenta con múltiples sitios de unión para tales factores. Los primeros genes en traducirse serán *tat*, *rev* y *nef*, cuyo papel en la regulación de la expresión viral permitirá el establecimiento de una infección productiva o de un estado latente. Tales transcritos serán sometidos cuando menos a doble

procesamiento (*splicing*), mientras que los RNAm tardíos de genes estructurales conservarán su carácter policistrónico y tendrán menos procesamiento.

Los mecanismos para transportar las proteínas virales hacia la membrana así como los factores celulares asociados no han sido bien descritos. El precursor Pr160^{env} es cortado por una proteasa celular, formándose TM y SU que serán N-glicosiladas en el aparato de Golgi. Posteriormente estas glicoproteínas se incluyen en la membrana de vesículas de transporte que se fusionarán con la membrana celular. Una vez ahí, la TM interacciona con los productos de Pr55^{gag}, para comenzar el ensamblado de la partícula viral. Es posible que el procesamiento de éste precursor ocurra durante o después de la gemación (*budding*) de la partícula viral¹⁶. Luego de la salida del virión inmaduro, que mide entre 120 y 140 nm de diámetro, hay cambios estructurales que ocasionarán una disminución aproximada de 20 nm en el diámetro de la partícula y la formación de la cápside en forma de cono, claramente distinguible por microscopía electrónica⁹; entonces se considera como una partícula madura y posiblemente capaz de reiniciar el ciclo.

En algunas células, como los macrófagos, el proceso es algo distinto, pues el virus en vez de ensamblarse en la membrana celular, lo hace en la membrana del retículo endoplásmico y se acumula en grandes cantidades en vacuolas citoplasmáticas, aunque sea escaso el virus encontrado extracelularmente^{17,18}.

La partícula viral puede infectar muchos tipos celulares, pero también puede transmitirse de célula a célula¹⁹, resultando en algunos casos la fusión de membranas y la formación de sincicios (fenómeno dependiente de la temperatura que involucra carbohidratos y glicolípidos de ambas

membranas celulares). Este efecto citopático ha sido claramente atribuido a ciertas mutaciones en la región V3 de la gp120 viral²⁶.

Considerando únicamente la capacidad de un aislado viral para formar sincicios en cultivo con la línea linfocítica MT2 es posible clasificarlo como inductor de sincicios (SI) o como no formador de sincicios (NSI), aunque esta clasificación sea independiente de que el aislado pueda formar sincicios en cualquier otro cultivo. Por tanto es posible encontrar aislados virales clasificados como SI, pero que no tienen efecto citopático en cultivos de PBMC⁴⁴ y el caso contrario de aislados NSI, pero capaces de formar sincicios en cultivos de otras líneas celulares²⁰.

Se ha señalado que el proceso de infección célula-célula es hasta 100 veces más eficiente que la infección con virus libre en líneas celulares²¹ e incluso ocurre en presencia de anticuerpos neutralizantes. Por otra parte los macrófagos también pueden transmitir el virus a células vecinas mediante pseudópodos lamelares²² que generan el microambiente propicio para el proceso.

Correceptores y tropismo

En 1996 fueron descubiertos los segundos receptores o correceptores indispensables para la infección del VIH a células CD4 positivas^{23, 24}. Estas moléculas transmembranales, asociadas a proteína G, son el sitio de unión para una amplia variedad de citocinas quimiotácticas (quimiocinas). En la actualidad se conocen más de 10 correceptores para el VIH-1; en la tabla 2 se enlistan los más importantes.

Tabla 2: Algunos correceptores del VIH y las células que los expresan

Correceptor	Ligando (Quimiocina)	Células CD4+ que lo expresan	Fenotipo Viral favorecido
CXCR4	SDF-1	Macrófagos, LT (<i>naïve</i>)	SI
CCR5	MIP1- α , MIP1- β , RANTES	Macrófagos, LT (memoria)	NSI
CCR2b	MCP-1, 2,3 y 4	Monocitos, LT	SI
CCR3	RANTES, MCP-4, Eotaxina	LT, Macrófagos	NSI
STRL33	?	PBMC	NSI
GPR15	?	Macrófagos, LT	NSI

LT: linfocitos T. NSI: virus no inductor de sincicios. SI: virus inductor de sincicios

Tabla adaptada de referencias 15 y 25.

Los virus que utilizan CCR5, los más transmitidos por la vía sexual, han sido frecuentemente aislados al inicio de la infección²⁶, presentando el fenotipo no formador de sincicios (NSI) y generalmente infectan cultivos monocíticos pero no líneas celulares de linfocitos T²⁸; Connor²⁶ demostró que estos virus pueden competir con las quimiocinas RANTES, MIP1- α y MIP1- β por el uso del correceptor CCR5 en un fenómeno dependiente de la concentración.

Conforme avanza la infección emergen cuasiespecies virales que pueden usar otros correceptores tales como CXCR4, lo cual se ha propuesto como un método de escape a las presiones inmunológicas²⁶, pues la aparición de estas variantes es un factor asociado con la progresión a SIDA²⁷. Estas otras cepas virales, generalmente con el fenotipo inductor de sincicios, se aíslan principalmente de pacientes en estados avanzados de la infección e incluso antes de la disminución de linfocitos T CD4⁺²⁶; estos virus con tropismo a los linfocitos mencionados y sus líneas celulares, pueden aislarse en cultivos de células mononucleares de sangre periférica de pacientes sintomáticos, pero escasamente en cultivos monocíticos²⁸.

El citotropismo no puede explicarse sólo por la capacidad para usar ciertos correceptores, pues se ha logrado infectar macrófagos homocigotos a *ccr5-Δ32* (eliminación de 32 pares de bases en *ccr5* que impide su expresión en la membrana) con un virus que usa tanto CCR5 como CXCR4²⁹.

Por otra parte, hay datos sobre cepas virales que usan a CCR5 pero que no son monotrópicas^{30,63}. Los linfocitos T CD4⁺ y macrófagos coexpresan temporalmente CCR5 y CXCR4 (tabla 2), pero eso no implica que esas células sean infectables por todas las variantes virales²⁵. Recientemente se ha descrito que las proporciones de expresión de CD4/CCR5 y CD4/CXCR4 en la membrana celular son importantes para lograr una infección eficiente por el VIH^{31,32}. Es posible que el tropismo viral no se asocie únicamente a los receptores celulares y a cambios en la gp120, sino también a su cantidad, procesamiento postraduccional e interacción con otras moléculas de superficie durante la interacción virus-célula; incluso mecanismos intracelulares como transducciones de señal e interacción con el citoesqueleto pudieran estar involucrados.

2.4 Respuesta inmune del hospedero

Las estrategias del VIH para evadir la respuesta inmunológica, como son el control de su replicación, mimetismo y variabilidad genómica, pudieran causar la gran heterogeneidad de respuestas interindividuales e incluso individualmente variadas a lo largo del tiempo tanto a nivel celular como humoral.

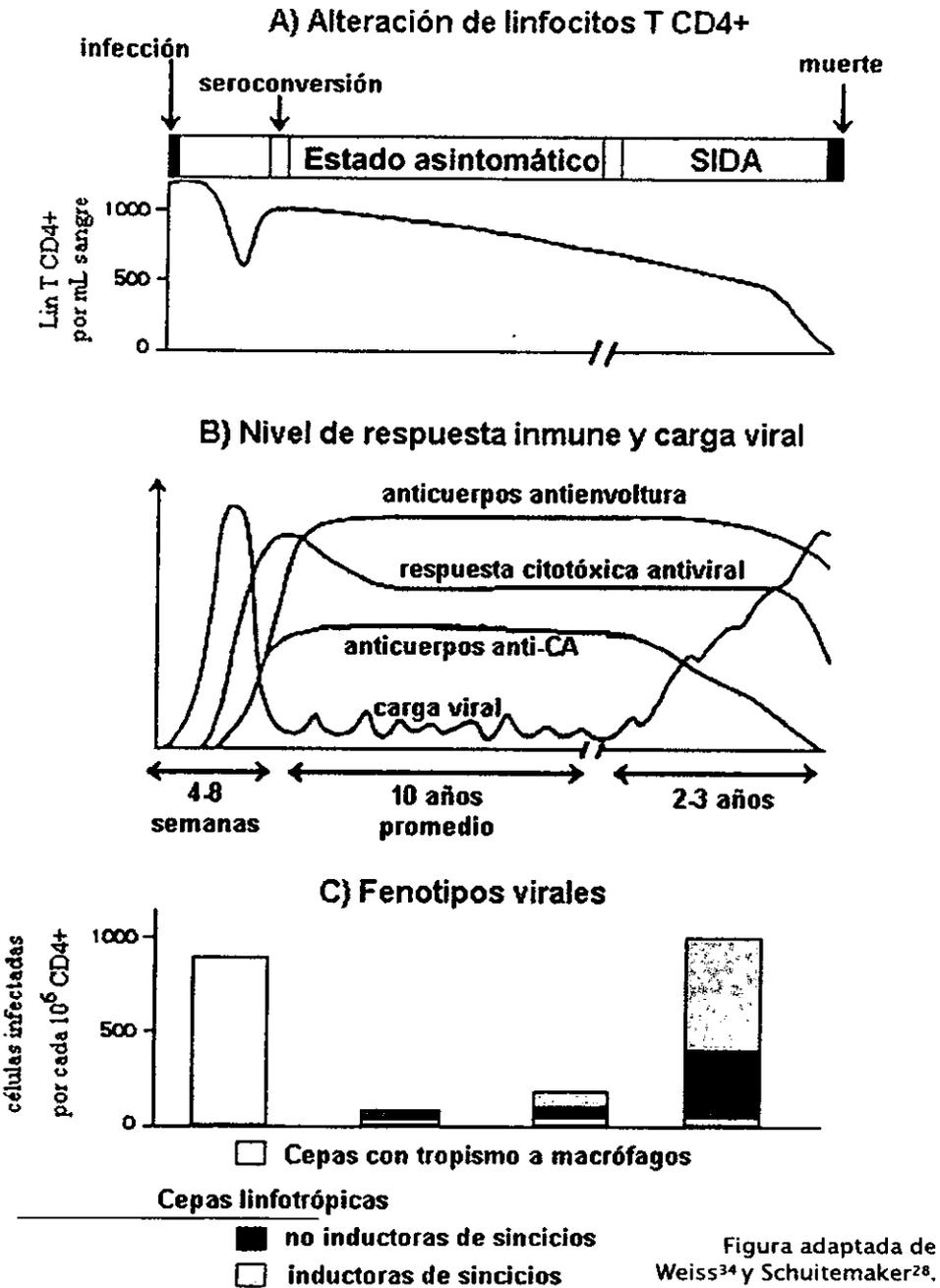
Aún así, se ha delineado la historia natural de la infección, aunque los procesos que ocurren durante la primoinfección están virtualmente basados en resultados del modelo de inmunodeficiencia en simios³³. Se reconocen 3 etapas de la infección por el VIH en adultos:

- Infección primaria
- Etapa de persistencia y latencia clínica
- Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA)

ETAPA DE INFECCIÓN PRIMARIA: Después de la entrada del VIH al organismo por las mucosas o directamente a sangre, en las siguientes 4 a 8 semanas algunos pacientes presentan un cuadro clínico no patognomónico: una mononucleosis de etiología viral con linfadenopatía³³. Los niveles de linfocitos T CD4+ disminuyen mientras la carga viral (cantidad de viriones en un volumen de sangre) es elevada pero genómicamente homogénea, lo cual ocurre antes de que sean detectables los anticuerpos anti-VIH en sangre.

Las cepas con tropismo monocítico son las predominantes en esta etapa lo que conduce a la hipótesis sobre una selección viral durante la transmisión por vía sexual y perinatal o tal vez exista transmisión de muchas cepas distintas que por sus características y por el medio al que llegan, sólo sean algunas las que logran establecer la infección²⁸.

Figura 2: Historia natural de la infección por VIH



Según los resultados de los estudios en simios, al entrar en contacto con el sistema inmunológico, el VIH sería llevado al nódulo linfático más cercano para ser procesado, presentado y así desarrollarse la respuesta adaptativa necesaria³⁹. En el proceso, linfocitos T, B y macrófagos habrían de ser activados en un microambiente que también favorece la replicación del VIH en células CD4+, pero que a veces causa apoptosis tanto de células infectadas como de no infectadas³⁸.

El VIH ocasiona una infección productiva con mayor facilidad en los linfocitos T que se encuentren en estado activado. Al tiempo de generarse una respuesta anti-VIH o ante cualquier inmunógeno, se produce la activación y se favorece esta infección viral. Es posible que el virus se disemine a otras regiones antes de que la respuesta inmune sea efectiva, lo cual se refleja en la carga viral elevada e incluso antigenemia (p24) en sangre periférica.

Hacia el final de esta etapa, disminuye la viremia, casi en correlación con el aumento de los linfocitos citotóxicos anti-VIH (CTL) y mucho antes que los anticuerpos neutralizantes sean detectables. Los linfocitos T CD4+ casi recuperan sus niveles normales (Figura 2A).

Desde esta etapa iniciaría el posible fenómeno de compartimentalización viral, que pudiera suponerse por varias evidencias: las diferencias encontradas en las poblaciones virales de semen con respecto a las de linfocitos en sangre periférica desde etapas asintomáticas de la infección³⁵ y por el caso de 2 virus prototipo (JRFL y JRCSF) aislados al mismo tiempo de 2 tejidos distintos de un paciente, pero con diferentes características cinéticas y citotrópicas³⁶.

ETAPA DE PERSISTENCIA Y LATENCIA CLÍNICA: Ocurre sin síntomas y con un conteo de linfocitos T CD4+ casi normal, pero que a lo largo de 10 años en promedio (progresor típico) va disminuyendo a razón de 25 a 60 células por año. La pérdida de los linfocitos T CD4+ puede atribuirse a muchos factores³⁷ que algunos autores han resumido³⁸ como:

- Efectos citopáticos del VIH en células CD4+ y sus precursores
- Formación de sincicios
- Autoinmunidad
- Respuesta celular y humoral contra células infectadas
- Apoptosis de CD4+ infectadas y de no infectadas en presencia de macrófagos
- Superantígenos

La carga viral en la periferia se mantiene baja aunque en nódulos linfáticos sea alta (incluso con terapia antiviral); la población viral se muestra más heterogénea, evidenciando la selección inmunológica a la que está sometido el virus: la replicación de cierta cuasiespecie puede ser limitada por una respuesta efectiva, pero otros viriones pueden emerger con tropismos menos restringidos y distinta afinidad por los correceptores²⁶.

Hacia el final de esta etapa, la carga viral aumenta mientras los linfocitos T CD4+ presentan alteraciones tanto funcionales como en la producción de quimiocinas y citocinas (IFN γ , TNF α)³⁹. En el caso de los macrófagos las alteraciones son menos claras: disminución de la quimiotaxis, actividad microbicida y presentación de antígenos. La estimulación crónica del sistema inmunológico puede impedir una respuesta inmune frente a ciertos viriones que finalmente no podrán ser controlados⁴⁰.

Si esta etapa dura entre 2 y 3 años el paciente se clasifica como progresor rápido; en el caso de una infección libre de síntomas por más de 10 años, con niveles de CD4+ estables y sin tratamiento antiviral en esos primeros 10 años, se clasifica entonces como una progresión lenta⁴¹.

SÍNDROME DE INMUNODEFICIENCIA ADQUIRIDA (SIDA): Es el estado clínico caracterizado por una grave disminución de los linfocitos T CD4+ y por el desarrollo de infecciones oportunistas y/o cáncer. La carga viral es muy alta en sangre y en el tejido linfoide que aún no haya sido fibrosado a causa de la destrucción leucocitaria crónica.

El genotipo viral vuelve a mostrarse homogéneo: hay cepas con fenotipo inductor de sincicios, alta cinética de replicación y de tropismo poco restringido. Los anticuerpos neutralizantes detectados en etapas anteriores ya no son efectivos ante estas cepas emergentes. Con el sistema inmunológico tan debilitado muchos microorganismos, incluso de flora habitual y/o padecimientos oncológicos pueden poner en peligro la vida del paciente.

2.5 Sistemas para cultivo del VIH

Hay 2 tipos de técnicas para la detección directa del VIH:

1. Sistemas para la detección de antígenos virales, principalmente p24 (CA) de forma simple o por disociación de complejos inmunes.
2. Sistemas para la cuantificación del RNA viral.

estos últimos pueden tener límites de detección incluso menores a 50 virus/mL de fluido⁴⁶; pero también hay ELISAs para p24 que son tan sensibles como un estuche comercial para cuantificar el RNA viral⁴². Con estas técnicas se ha detectado al VIH en casi cualquier fluido del paciente.

Pero estas técnicas de detección no dan información sobre la capacidad de replicación que tienen los virus circulantes; sólo el cultivo del material biológico del paciente permite determinar de forma cualitativa o cuantitativa al virus infeccioso integrado en PBMC o presente en plasma, así como caracterizar su tropismo celular^{43,44,45}. Tanto plasma como PBMC se prefieren como material de estudio, principalmente por su facilidad de obtención, aunque en la actualidad se reconoce que la mayor parte de los virus y células infectadas están en el tejido linfático⁴⁶, que es mucho más problemático obtener.

El VIH se aísla con mayor frecuencia empleando cocultivos de PBMC del paciente más las células de un donador sano⁴³. También se hacen cultivos de plasma o suero aunque sean menos eficientes^{47,48}, pero su estudio es importante ya que las secuencias de RNA viral presentes en el plasma y las de DNA proviral de una misma muestra, pueden representar variantes virales antigénicamente distintas⁴⁹. Simmonds mostró cómo las cuasiespecies virales predominantes en plasma varían a mayor velocidad que los provirus de PBMC, al secuenciar las regiones V4 y V5 de la gp120 en muestras secuenciales de 2 pacientes. De hecho, en muestras tomadas a

3 años de la seroconversión se detectaron algunas secuencias provirales correspondientes a las variantes antigénicas más frecuentes en plasma al inicio del estudio.

Por su parte, Sabino⁵⁰ realizó un estudio similar comparando los virus aislados por cocultivo de PBMC *in vitro* con las cuasiespecies virales en plasma y en PBMC *in vivo*: el estudio aborda un caso donde el virus del cocultivo era representativo de los virus de plasma y en otro caso, una cuasiespecie minoritaria *in vivo* fue la única que logró detectarse *in vitro*. El cultivo de PBMC únicamente permitió la propagación de las clonas virales más infectivas, eclipsando a otras con propiedades distintas o menos favorecidas para replicar en el sistema de cultivo.

La reproducibilidad de los ensayos de cultivo celular depende de la capacidad para seguir con todo detalle los procedimientos⁵¹, pero cuando esto no es posible, se generan resultados discordantes. Las variaciones en las técnicas de cultivo reportadas son tan amplias que incluso entre los institutos de salud de los E.U.A. se han creado programas de control de calidad que actualmente permiten equiparar los resultados entre instituciones^{43,45}.

Otra área de difícil comparación entre estudios, es la de citotropismo viral, tanto de aislados primarios como de virus prototipo mantenidos en líneas celulares (IIIb), pues varios autores señalan que en sus sistemas de cultivo sólo observan tropismos duales por lo que son incapaces para distinguir entre virus linfotrópicos y monotrópicos, atribuyendo tal fenómeno a sus condiciones de obtención y cultivo de PBMC⁵².

Una variable inherente al cultivar PBMC, es precisamente el donador, pues las células de cada donador producen cantidades distintas de virus⁵³ y

tal fenómeno puede estar muy relacionado con el genotipo: sólo las células de gemelos homocigotos presentan patrones similares de producción viral al ser infectadas con aislados primarios o clonas virales⁵⁴, lo cual no ocurre siquiera con gemelos heterocigotos.

Para minimizar estos problemas, muchos estudios se realizan con líneas celulares, simplificando el modelo de cultivo, pero a la vez alejándose de lo que sucede *ex vivo* con células humanas normales o *in vivo*.

Básicamente, los linfocitos T CD4+ deben estar en estado activado para que el VIH pueda replicarse en ellos^{15,55} y por lo general tal activación se logra mediante algún mitógeno como la fitohemaglutinina (PHA). La PHA es una lectina que proporciona el estímulo necesario para iniciar una respuesta proliferativa de las células T, por la generación de receptores de IL-2 y la síntesis de la misma⁴³.

Con 4µg/mL de PHA como estímulo y luego de 3 días en cultivo, se obtiene un aumento significativo en el porcentaje de las células T CD4+ HLA-DR+ con respecto a los PBMC recién aislados⁵⁵, que puede justificar la susceptibilidad a lograr una infección productiva con ese tipo de cultivos activados. Los macrófagos (CD14+) son prácticamente eliminados en tales condiciones de cultivo con PHA. Sin el mitógeno y luego de varios días en cultivo, se promueve la maduración de los monocitos hacia macrófagos (CD14+HLA-DR+) que son muy adherentes al plástico de las placas de cultivo^{56,57}.

El VIH en macrófagos ha sido muy estudiado pues estas células pueden contener abundantes viriones en su interior sin liberarlos al medio en cantidades detectables⁵⁸, pero que pueden ser transmitidos por contacto célula-célula²¹. Por las múltiples variantes en las técnicas de

aislamiento, purificación y cultivo de los monocitos/macrófagos a partir de sangre periférica, se ha generado una gran controversia en los resultados reportados en la literatura; tales variaciones han sido revisadas y resumidas⁵⁹ como:

a) En el proceso de separación de monocitos:

- Por adherencia al plástico: método barato y con un buen rendimiento de macrófagos, pero la pureza es muy variable y es poco recomendable despegarlos para otros ensayos.
- Centrifugación por densidad, combinando Ficoll-Hypaque con Percoll o Nycodenz: se obtiene buena pureza pero son métodos largos y complejos.
- Por elución a contracorriente: requiere equipo especial, pero la pureza y rendimiento de monocitos es alta.

b) En el cultivo y maduración de monocitos: La infección *in vitro* de monocitos recién aislados de sangre periférica es casi nula, pero luego de unas pocas horas en cultivo la susceptibilidad aumenta⁶⁰; después de varios días la expresión de correceptores⁶¹ y factores de transcripción⁶⁰ va cambiando y favoreciendo aún más la infección: por lo que la infección celular está determinada por la diferenciación de monocitos hacia macrófagos.

Para la maduración de los monocitos hay 2 tipos de cultivo:

- los que contienen suero, fuente de muchos nutrientes, pero que no pueden ser controlados y varían de lote en lote.
- los que no tienen suero y deben ser enriquecidos con diversos nutrientes bien conocidos que pueden estandarizarse para todos los lotes.

Las ventajas y desventajas que cada variante otorga a los cultivos deben evaluarse según los estudios a realizar y las posteriores comparaciones de los resultados con datos previamente publicados.

Para aproximar los modelos de estudio del VIH a lo que sucede *in vivo*, el diseño de sistemas de cultivo con más de una estirpe celular, puede presentar expectativas amplias.

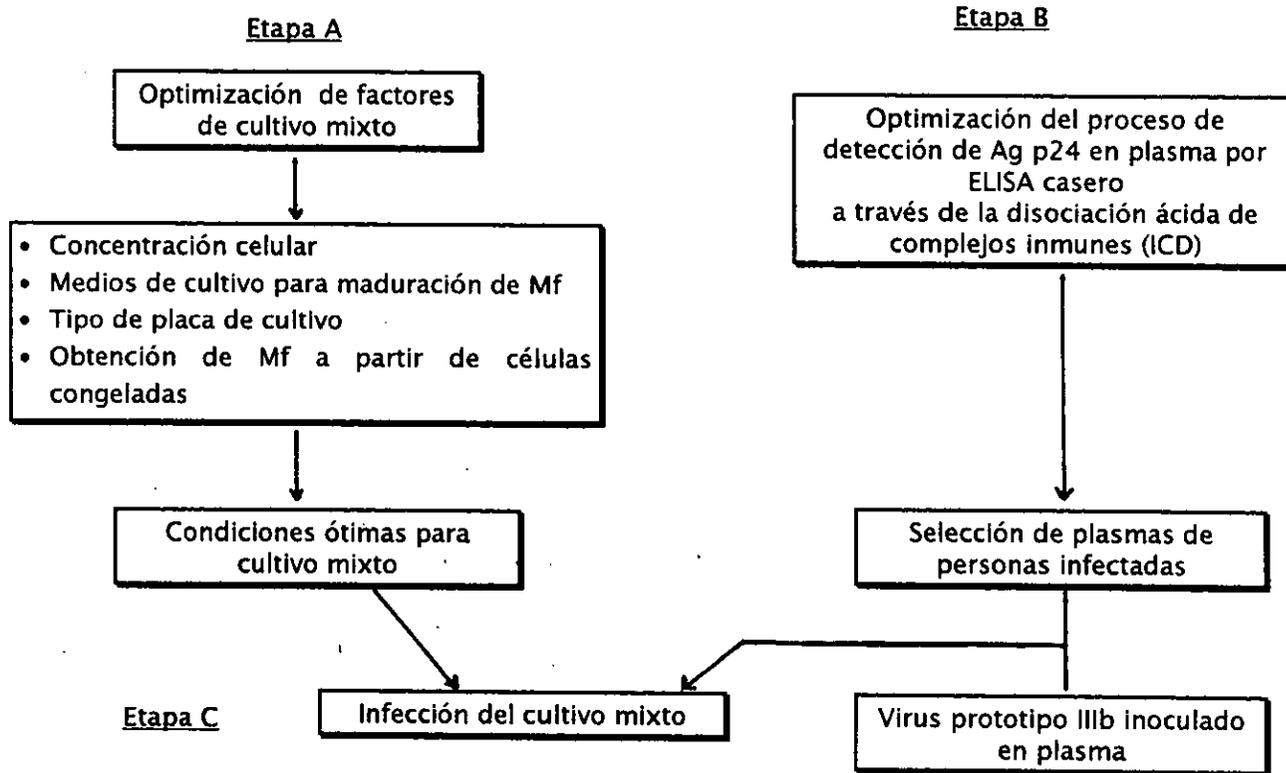
En principio, los cocultivos de macrófagos con linfocitos se han usado como sistemas de "mayor recuperación viral": a partir de cultivos de macrófagos, luego de 2 semanas de la infección, la adición de PBMC activados con PHA permite detectar Ag p24 en el cultivo, lo cual no hubiera sido posible sin los linfocitos⁵². En otro reporte⁵⁸, varios cultivos de macrófagos infectados, luego de varias semanas sin producir Ag p24 a niveles detectables, volvieron a producirlo por la adición de PBMC-PHA. Pero la adición de macrófagos a los sistemas de cultivo puede añadir nuevas variables al cultivo, por ejemplo la infección de macrófagos provoca la inclusión de lactosaminoglicanos en las glicoproteínas de superficie viral, que pudieran disminuir la neutralización mediada por anticuerpos⁶², sin que la capacidad del virus para usar el correceptor CCR5 se altere⁶³.

3. PARTE EXPERIMENTAL

Los experimentos se llevaron a cabo en las instalaciones de la Unidad de Investigación en Retrovirus Humanos (UNAM-SSa) y todo cultivo celular se realizó en el área de bioseguridad P3, siguiendo las normatividades de bioseguridad y manejo de residuos biológico-infecciosos vigentes.

3.1 Diseño Experimental

Figura 3: Esquema de las etapas de desarrollo experimental de esta tesis



3.2 Material

- Placas para cultivo de 24 y 96 pozos fondo plano*
- Placas para cultivo de 96 pozos fondo en "U"*
- Placas para ELISA de 96 pozos Maxisorb^{MR}
- Tubos cónicos de polipropileno de 15 y 50 mL*
- Frascos de cultivo F25 y F75*
- Pipetas de 2, 5 y 10 mL*
- Puntas para micropipetas*
- Pipette-aid
- Juego de micropipetas automáticas
- Cámara de Neubauer
- Microscopios ópticos (compuesto e invertido)
- Campana de bioseguridad clase II-A
- Centrífuga
- Incubadora (37°C y 5% CO₂)
- Baño de agua a 37°C y 56°C
- Lavador para placas de ELISA
- Guantes de látex
- Gasas

*Material de plástico para cultivo, estéril y desechable.

Soluciones

- PBS: Solución salina isotónica de fosfatos
- Azul tripano 0.4% en PBS
- Hystopaque^{MR} (SIGMA)
- Alcohol 70% y benzal

Medios de cultivo empleados

- **RS :** RPMI-1640 (Gibco BRL) y L-glutamina, enriquecido con 10% suero fetal bovino inactivado por calor (57°C, 30 minutos).
- **RS-IL2 :** RS más 10 U/mL IL2 recombinante (Gibco BRL).
- **RS-SHA':** RS más 10% lote de suero humano serotipo A (sin inactivación de complemento por calor).
- **RS-SHA :** RS más 10% lote de suero humano serotipo A. (con inactivación de complemento)
- **RS-SHA-IL2:** RS más 10% SHA y 10 U/mL IL2 (recombinante)
- **RS-SHA (x3)/ IL2-SHA (x4):**
Esta combinación indica que se usa el RS-SHA por 3 días y luego RS-IL2-SHA durante 4 días más.

El suero humano se obtenía de al menos 5 donadores serotipo A (SHA'). Los sueros se inactivaban a 57°C por 30 minutos; luego se mezclaban en partes iguales y eran mantenidos a -70°C en crioviales de 2 mL por no más de 3 meses (SHA).

3.3 Metodologías empleadas

Aquí se describen las técnicas desarrolladas para alcanzar los objetivos planteados. Las técnicas de rutina se detallan en la sección 6 (Apéndice) al final de esta tesis.

A. Cultivo mixto: Cocultivo de linfocitos y macrófagos primarios a partir de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donadores sanos. En la tabla 3 se resumen los experimentos y las condiciones para estandarizar los cultivos primarios de linfocitos-macrófagos, que abarcan la evaluación de:

- Medio de cultivo óptimo para la maduración de los macrófagos a partir de los monocitos de sangre periférica.
- Concentración inicial de PBMC.
- Tipo de placa de cultivo.
- Obtención de cultivos mixtos a partir de células congeladas.

A continuación se describe el procedimiento general:

1. Colocar PBMC recién separados en placas de cultivo y con el medio indicado para la maduración de macrófagos (Tabla 3).
2. Cultivar entre 5 y 7 días. Al día 3 ó 4 adicionar 100 μ L más del medio de maduración.
3. Observar la morfología celular al día 7 y verificar la viabilidad.
4. Hacer seguimiento o infección del cultivo. Cada 7 días se cambia la mitad del medio de cultivo por RS-IL2 (medio de mantenimiento).

En cada experimento se emplean mezclas celulares que provenían de 2 donadores sanos (con serología negativa a VIH) y cada ensayo fue realizado al menos por triplicado.

B. Pretratamiento de muestras de plasma por disociación ácida de complejos inmunes (ICD)

Con el objetivo de tener más datos bioquímicos de los plasmas criopreservados que se emplearon para esta tesis, se estudió el pretratamiento de plasma por disociación ácida de complejos inmunes. Varios autores han reportado incrementos significativos en la detección de Ag p24 en plasma⁶⁴ con la técnica descrita a continuación:

A 50 μ L de suero o plasma se le adicionan 50 μ L de una solución de glicina 1.5 M pH=1.85. Se mezcla e incuba por 1 h a 37°C. Posteriormente se neutraliza con 50 μ L de TRIS-HCl 1.5 M pH=8.6; se resuspende y el volumen total es adicionado al pozo de ELISA.

Para evaluar esta técnica se emplearon triplicados de 5 plasmas positivos a Western blot y 5 negativos a serología por ELISA.

C. Aislamiento del VIH de plasmas criopreservados empleando cultivos mixtos

Se utilizarán las condiciones de cultivo mixto que hayan resultado mejores según los experimentos realizados. A continuación se presenta el procedimiento general para la infección y mantenimiento del cultivo mixto para aislar al VIH a partir de plasma:

1. Los plasmas con VIH son descongelados y clarificados por centrifugación a 2500 r.p.m. por 5 minutos.
2. Cuando el cultivo mixto se encuentra entre el día 5 y 7 de cultivo, se retira la mitad del medio de cultivo.
3. Se repone el volumen inicial del cultivo mixto con plasma infectado.
4. Los cultivos se incuban a 37°C y 5% CO₂ durante 2 horas.
5. Se retira el volumen equivalente al plasma adicionado.
 - en algunos experimentos se hacen 2 lavados con PBS, centrifugando las placas a 1200 r.p.m. por 10 minutos.
6. Se repone el volumen con medio de mantenimiento RS-IL2.
7. Cada 7 días se recolecta la mitad del sobrenadante para determinarle Ag p24 y se agrega medio de mantenimiento a los cultivos.
8. Los cultivos mixtos pueden ser alimentados con células estimuladas con PHA, según sea el caso.

Experimento C1: Infección de cultivos mixtos con diluciones de virus IIIb en plasma

Para estandarizar las condiciones de infección de los cultivos mixtos, se requiere mucho plasma de paciente infectado, por lo cual se decidió preparar un plasma VIH negativo (obtenido de un donador sano), al cual se añadieron varias diluciones del virus prototipo IIIb. Se hicieron alícuotas que se almacenaron a -70°C hasta su empleo.

Los cultivos mixtos de tales plasmas se alimentaron con 180 000 PBMC activados con PHA por pozo de cultivo a los 12 y 24 días después de la infección. Se determinó la producción de Ag p24 en cada caso, con la finalidad de conocer el mejor método de cultivo.

Experimento C2: Cultivo celular mixto de plasmas criopreservados.

Se probaron los plasmas de 6 pacientes en el cultivo mixto de linfocitos-macrófagos con medio de maduración RS-SHA(x3)/IL2-SHA(x4). Se establecieron cultivos mixtos en placas de 96 pozos, añadiendo 4.5×10^6 PBMC/mL al inicio del cultivo.

Luego de la infección se hicieron 2 lavados con PBS para evitar la coagulación. Se usó RS-IL2 como medio de mantenimiento y cada 7 días se recolectó sobrenadante para determinar Ag p24. Los cultivos se alimentaron con 10^5 PBMC estimulados con PHA los días 11 y 25 después de la infección

4. RESULTADOS

A. Experimentos realizados para estandarizar las condiciones del cultivo mixto.

En la tabla 3 se resumen los experimentos desarrollados y los campos sombreados señalan la condición evaluada en cada caso. Cada ensayo es producto de los resultados del experimento respectivo anterior.

Tabla 3: Experimentos para estandarizar el cultivo mixto de linfocitos-macrófagos

Experimento	Placa de cultivo # pozos	Concentración celular inicial (10 ⁶ /mL)	Medios de cultivo	
			maduración	mantenimiento
A1	24	2	RS RS-IL2 RS-IL2-SHA' RS-SHA'	RS-IL2
A2	24	0.7, 2 y 3.3	RS-IL2-SHA'	
A3	24	4	RS-IL2-SHA' RS-IL2-SHA' RS-SHA	
A4	24, 96 fondo plano y U	4.5	RS-IL2-SHA RS-SHA (x3)/ IL2-SHA (x4)	

x3, x4 : días en ese medio de cultivo

Experimento A1: Obtención de células adherentes a la placa de cultivo de 24 pozos, a partir de distintos medios de maduración.

Experimento	Placa de cultivo # pozos	Concentración celular inicial (10 ⁶ /mL)	Medios de cultivo	
			maduración	mantenimiento
A1	24	2	RS RS-IL2 RS-SHA' RS-IL2-SHA'	RS-IL2

En este experimento se evaluó la obtención de células adherentes según el medio de maduración empleado. Se observó la morfología de las células adherentes, así como la viabilidad de las no adherentes.

Luego de 7 días en cultivo hay diferencias morfológicas de las células adherentes a la placa de cultivo dependiendo del medio de maduración empleado. Cuando se cultivaron los PBMC con medio RS (RPMI 1640 y 10% SFB) se obtuvieron pocas células adherentes, las cuales no sobrevivieron más allá del día 14. Al madurar con RS-IL2 mejoró ligeramente la obtención de células adherentes: principalmente células redondas y células con lamelipodios, mientras la supervivencia en cultivo alcanzó los 25 días. Con RS-SHA' (suero humano con complemento) casi se obtuvo confluencia de células redondas y gigantes mononucleares, siendo escasos los lamelipodios.

Con la combinación RS-IL2-SHA' se obtuvo una adherencia similar al RS-SHA', pero la heterogeneidad celular aumentó, coexistiendo en el cultivo tantas células con lamelipodios (células de forma fibroblastoide, con pseudópodos uni o bipolares⁶⁵) como células gigantes. Este cultivo llegó a la confluencia el día 13.

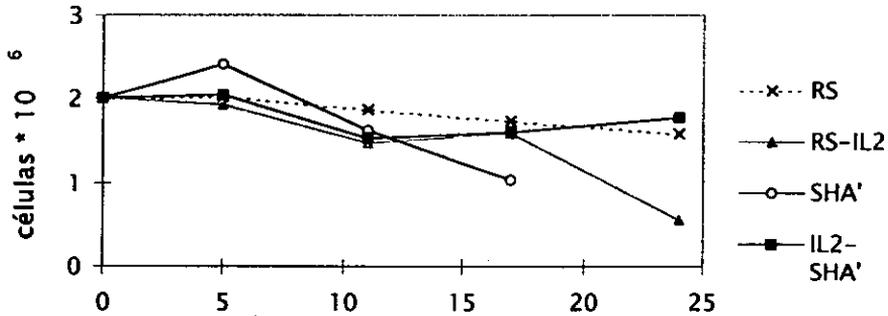
Al hacer seguimiento de la viabilidad de las células no adherentes con azul tripano (Gráfica 1), se observa buena viabilidad en el control con RS, pues sus linfocitos sobreviven adecuadamente los 24 días del seguimiento, aún sin tener algún activador celular. La presencia de IL2 no modifica mayormente los resultados hasta el día 17, presentándose una fuerte disminución de células viables al día 24.

En el cultivo con RS-SHA' la viabilidad disminuye desde el día 17; pero al combinar IL2 con SHA' (RS-IL2-SHA') el cultivo permanece viable a lo largo de los 24 días del estudio.

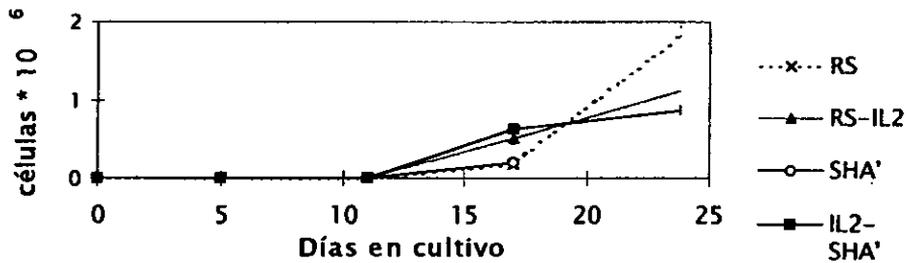
Con este experimento se determinó que el cultivo de PBMC con RS-SHA' produce gran cantidad de células adherentes, pero con baja viabilidad de linfocitos. En cambio con RS-IL2-SHA' se obtienen una cantidad similar de células adherentes, pero con más linfocitos viables.

Gráfica 1: Curva de crecimiento de linfocitos en cultivo mixto:
efecto del medio de maduración

Células vivas



Células muertas



Para hacer los conteos de células no adherentes, los pozos de cultivo se lavaban varias veces con PBS, pero en ocasiones se observaron pequeños cúmulos celulares que no era posible disgregar. Ha sido reportada la formación de cúmulos que consisten en mezclas de macrófagos o células dendríticas con linfocitos en cultivo⁶⁶; tales estructuras posiblemente afecten la confiabilidad de los resultados.

Experimento A2: Obtención de células adherentes a la placa de cultivo de 24 pozos, a partir de distintas concentraciones de PBMC.

Experimento	Placa de cultivo # pozos	Concentración celular inicial (10 ⁶ /mL)	Medios de cultivo	
			maduración	mantenimiento
A2	24	0.7, 2 y 3.3	RS-IL2-SHA'	RS-IL2

En este experimento se evaluó la concentración óptima inicial de PBMC para formar una monocapa de células adherentes a 7 días de cultivo mixto, usando en el medio de maduración RS-IL2-SHA', el cual según los resultados del experimento anterior, produjo la mejor adherencia y sobrevivencia celular. Se observó la morfología de las células adherentes a la placa de cultivo, así como la viabilidad de las no adherentes.

Luego de 7 días en medio de maduración RS-IL2-SHA' se observó una gran heterogeneidad morfológica de las células adherentes, encontrándose macrófagos lamelares así como células redondas de mayor tamaño que un linfocito e incluso células gigantes, que aparentemente son producto de la fusión de (4 o más) células vecinas (ver figura 4).

A medida que la concentración inicial de PBMC aumentó, se observaron más células adherentes que incluso sobrevivieron por más tiempo. Cuando se cultivaron 0.7×10^6 PBMC/mL, el rendimiento de células adherentes fue muy bajo y las pocas células obtenidas se deterioraron y finalmente murieron (se despegaron) luego de 17 días. Las adherentes de los cultivos más concentrados sobrevivieron 27 días.

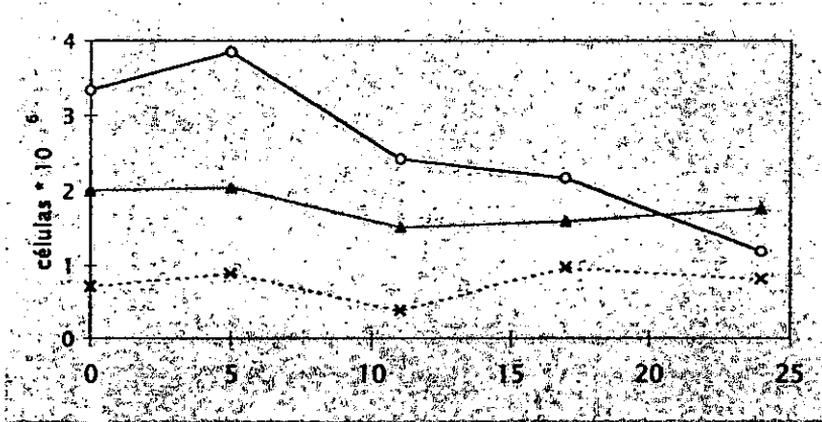
Con estas condiciones de cultivo no se alcanzó la confluencia de las células adherentes, ni una distribución homogénea de las mismas: la mayoría se adhirió a las orillas del pozo de cultivo, dejando el centro vacío.

También se hizo seguimiento de la viabilidad de las células no adherentes (Gráfica 2). Hasta el día 5 en cultivo se mantiene estable la concentración celular, pero al día 11 hay una fuerte disminución de células no adherentes en el cultivo más concentrado; esta tendencia difiere con los otros casos que mantuvieron más estable su viabilidad a lo largo del tiempo. El cultivo con 3.3×10^6 PBMC/mL produjo la mayor cantidad de células adherentes, pero por otra parte tuvo una gran mortalidad de sus células no adherentes en el periodo que se señala como el óptimo para realizar la infección de los macrófagos (entre el día 5 y 10), lo cual sugiere que en experimentos posteriores se ajuste la concentración de células no adherentes vivas para asegurar las mejores condiciones al momento de la infección.

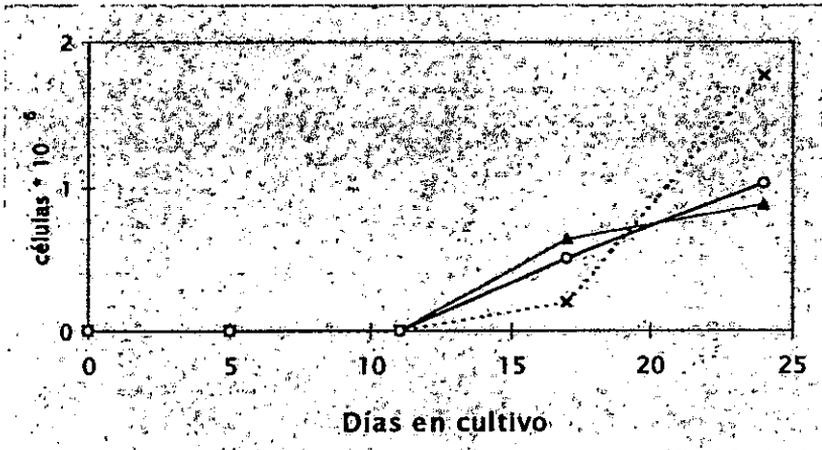
Gráfica 2: Curva de crecimiento de linfocitos en cultivo mixto:
efecto de la cantidad de células iniciales

0.7×10^6 cél/mL ---x---
 2.0×10^6 cél/mL —▲—
 3.3×10^6 cél/mL —○—

Células vivas



Células muertas



Experimento A3: Obtención de células adherentes a la placa de cultivo de 24 pozos, con mayor concentración de PBMC iniciales y medios para maduración sin complemento.

Experimento	Placa de cultivo # pozos	Concentración celular (10 ⁶ /mL)	Medios de cultivo	
			maduración	mantenimiento
A3	24	4	RS-IL2-SHA ⁷ RS-IL2-SHA RS-SHA	RS-IL2

En este experimento se aumentó la concentración inicial de células para alcanzar la confluencia de macrófagos, pues con las concentraciones evaluadas en el experimento anterior (hasta 3.3x10⁶ PBMC/mL) no se logró la confluencia al día 7 en cultivo.

Además se evaluaron los medios de maduración inactivando el complemento del suero humano. Debe considerarse que el cultivo mixto se hace con células de dos donadores con grupos sanguíneos no determinados, que se maduran con suero humano A, el cual contiene distintos anticuerpos particularmente anti-B por lo que la permanencia del complemento durante la fase de maduración podría causar lisis asociada a complemento en algunos cultivos. Incluso en los cultivos de PBMC de dos donadores, sin suero humano, se ha reportado que existe la eliminación de las células de uno de los donadores luego de 7 días en cultivo⁶⁷, lo cual supone que la presencia del complemento volvería más grave ese rechazo poblacional y por tanto una destrucción aparentemente azarosa de algunos cultivos mixtos.

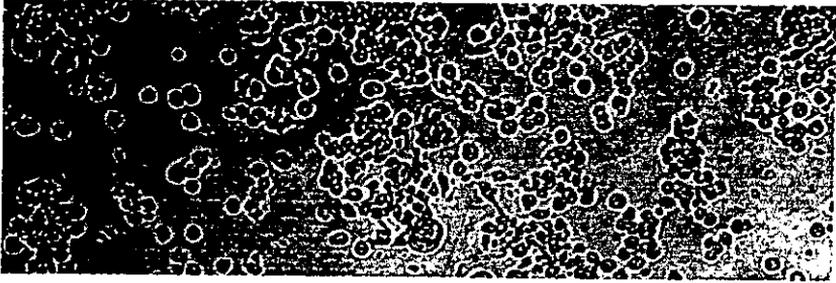
Por otra parte, para disminuir la estática y promover una adherencia celular más homogénea, se colocó una gasa húmeda con benzal debajo de

la placa de cultivo, lo cual favoreció una mejor distribución celular en todos los pozos. En la figura 4 se presentan las imágenes de las células adherentes al día 6 de cultivo, luego de hacer lavados para quitar a las no adherentes.

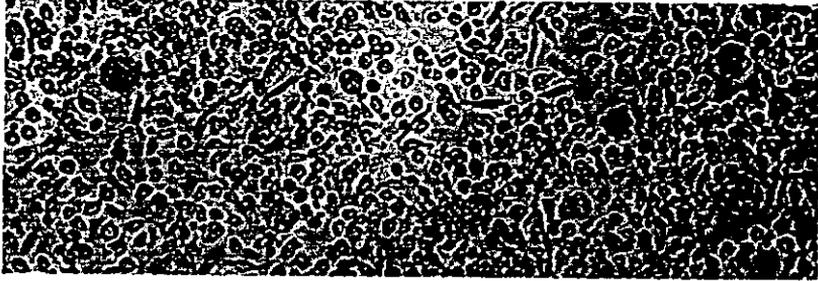
La inactivación del complemento del SHA' ocasionó una menor adherencia celular, pues el cultivo con RS-IL2-SHA' alcanzó la confluencia desde el día 7, mientras que el RS-IL2-SHA (sin complemento) fue confluyente hasta el día 9. En ausencia de la IL2 se observa que las células más comunes fueron redondas y gigantes, mientras que en presencia de IL2 son mayoritarios los macrófagos lamelares, que se entrecruzan formando "entramados". Pero se observa que la IL2 (sin el SHA') genera escasas células adherentes, lo cual evidencia la importancia del suero humano en la maduración de los macrófagos.

¹Figura 4: (siguiente hoja) Células adherentes a la placa de cultivo a los 6 días en cultivo mixto. Las células no adherentes se removieron con PBS a 37°C y se señala el medio de maduración empleado. (Imágenes tomadas a 250 a. r. en microscopio invertido que fueron digitalizadas y procesadas con el software Paint Shop Pro 5 - Jasc Software-).

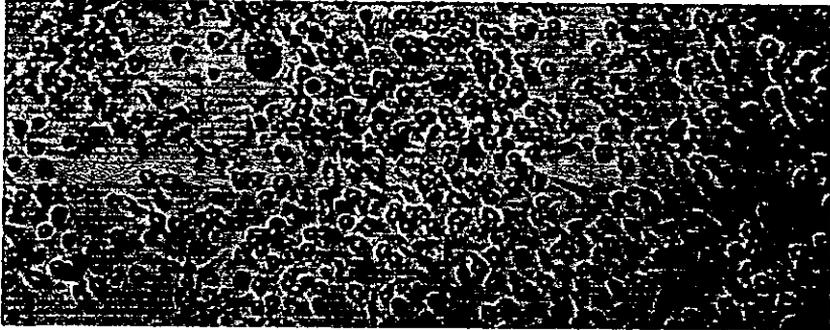
RS-IL2



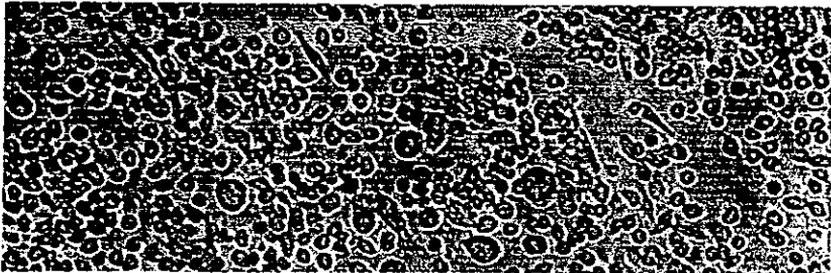
RS-IL2-SHA' (con complemento)



RS-IL2-SHA (complemento inattivado)



RS-SHA



Experimento A4: Microcultivo mixto de linfocitos y macrófagos en pozos de fondo plano y fondo en "U".

Experimento	Placa de cultivo # pozos	Concentración celular (10 ⁶ /mL)	Medios de cultivo	
			maduración	mantenimiento
A4	24 y 96 fondo plano y "U"	4.5	RS-IL2-SHA RS-SHA (x3)/ IL2-SHA (x4)	RS-IL2

Para disminuir el consumo de medios de cultivo se trató de adaptar el protocolo de cultivo mixto en placa de 24 pozos a microcultivo. Para una placa con 24 pozos se requieren 1.2 mL de medio de cultivo por pozo, mientras que para la placa de 96 pozos sólo se usan 0.2 mL/pozo. La desventaja es que el sobrenadante recuperado cada 7 días es apenas suficiente para hacer una sola determinación de Ag p24 y deben hacerse duplicados para almacenar algún sobrenadante.

Las células fueron cultivadas a la par en placas de 24 y 96 pozos con fondo plano, empleando como medio de maduración RS-IL2-SHA. La morfología celular correspondía a lo observado anteriormente y no se distinguieron diferencias atribuibles al tamaño del pozo de cultivo.

En cambio, cuando se estableció el cultivo mixto en pozos de fondo en "U", la conformación del cultivo fue completamente distinta. Se observó que al fondo del pozo no lograban desarrollarse células adherentes, pues ahí sólo permanecían células no adherentes. Mientras en la parte alta del pozo, un par de milímetros arriba, se desarrollaron gran cantidad de macrófagos con lamelipodios formando abundantes cúmulos con células no adherentes.

En este experimento se evaluó otra modificación al medio de cultivo para maduración de macrófagos. La combinación denominada como "RS-SHA (x3)/IL2-SHA (x4)" consta de cultivar los PBMC con medio RS-SHA los primeros 3 días, luego se retira la mitad del medio de cultivo y se repone con RS-IL2-SHA para los siguientes 4 días.

Con esta modificación lo que se obtiene es un cultivo con gran cantidad de macrófagos con lamelipodios, como sucede comúnmente en los cultivos mixtos que tienen IL2, pero con más células gigantes que los cultivos de RS-IL2-SHA.

La capacidad para cultivar al VIH en estas variantes de cultivo mixto fue determinada y sus resultados se presentan más adelante.

Por otra parte, empleando cualquiera de estas condiciones de cultivo, se han logrado producir cultivos mixtos a partir de PBMC congelados. La susceptibilidad a la infección por el VIH no se determinó con estas células y aunque morfológicamente son muy similares a lo observado con células frescas, se distinguen por un rendimiento de macrófagos ligeramente menor.

B. Pretratamiento de muestras de plasma por disociación ácida de complejos inmunes (ICD)

Para evaluar el desempeño de esta técnica se seleccionaron cinco plasmas negativos a serología por ELISA (controles negativos C1 a C5) y cinco positivos a Western Blot (muestras P1 a P5) a los cuales se les determinó Ag p24 sin tratar y tratados con la técnica de disociación ácida. Algunas muestras también se probaron con glicina 1.5 M pH=2.5, según se indica en la tabla 4.

Con las absorbancias de los controles C1 a C5 en cada tratamiento se calculó la línea de corte respectiva (L. C.) al promediar las absorbancias de todas las muestras, más dos veces la desviación estándar de ese promedio, de acuerdo a lo señalado en la sección de Apéndice.

Tabla 4: Cálculo de las líneas de corte según el tratamiento de los controles negativos

Tratamiento	Muestra	Abs	Abs	Abs	
sin tratamiento	C1	0.255	0.341	0.258	Prom. 0.221 s= 0.085 c.v.= 38.6% L. C.= 0.392
	C2	0.309	0.384	0.115	
	C3	0.144	0.156	0.135	
	C4	0.182	0.185	0.143	
	C5	0.282	0.283	0.145	
ICD (Glicina pH=1.85)	C1	0.204	0.191	0.155	Prom. 0.196 s= 0.046 c.v.= 23.3% L. C.= 0.287
	C2	0.148	0.204	0.133	
	C3	0.235	0.235	0.239	
	C4	0.249	0.157	0.158	
	C5	0.129	0.240	0.258	
ICD (Glicina pH=2.5)	C1	0.186			Prom. 0.206 s= 0.101 c.v.= 49.0% L. C.= 0.409
	C2	0.385			
	C3	0.162	0.154	0.142	

Tabla 5: Índices (Abs/L.C.) de Ag p24 en plasmas VIH positivos según el pretratamiento de la muestra

Tratamiento	Muestra	índice	índice	índice
sin tratamiento L. C. = 0.392	P1	1.4	1.0	1.6
	P2	1.2	1.0	1.7
	P3	0.6	0.8	1.0
	P4	0.5	0.7	1.1
	P5	0.9	0.9	1.1

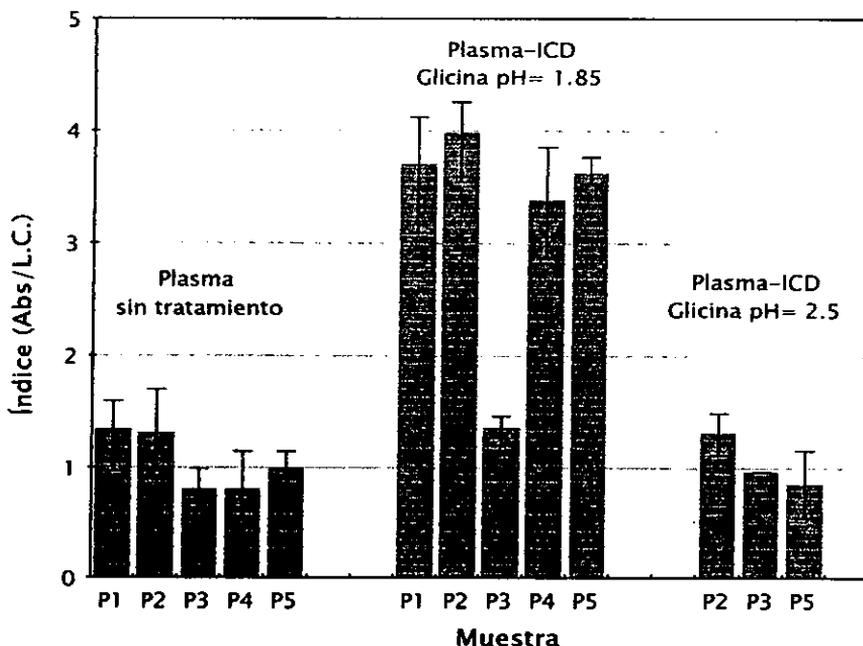
ICD Glicina pH=1.85 L. C. = 0.287	P1	4.1	3.9	3.1
	P2	4.3	4.1	3.6
	P3	1.4	1.2	1.5
	P4	2.9	3.4	3.9
	P5	3.5	3.6	3.8

ICD Glicina pH=2.5 L. C. = 0.409	P2	1.1	1.5	
	P3	1.0		
	P5	0.9	1.2	0.5

En la tabla 5, los resultados de absorbancia de cada muestra se dividen entre la línea de corte respectiva, obteniéndose un índice. El índice representa la razón de absorbancia con respecto a la línea de corte del ELISA. Un índice igual a 1 refiere que la absorbancia de la muestra es igual a la L. C. Un índice igual o inferior a 1 señala que la muestra es negativa, mientras que un índice superior, indica positividad al Ag p24.

Estos resultados se representan en la gráfica 3.

Gráfica 3: Ag p24 en plasmas con tratamiento de disociación ácida (ICD)



Al hacer la disociación ácida de los controles negativos no se detectaron falsos positivos. La L. C. fue menor con el ICD a pH=1.85, comparada con la determinación directa en plasma. El ICD a pH=2.5 no fue válido ya que sólo se disponía de 5 valores con un coeficiente de variación del 50%, lo cual no permite interpretar los resultados de las muestras P2, P3 y P5 bajo ese tratamiento.

El tratamiento de ICD a pH=1.85 generó un aumento en los índices de Ag p24 para todas las muestras (P1 a P5). En la gráfica 5 puede observarse como los índices llegan a cuadruplicarse con la disociación ácida y las muestras que eran positivas débiles e incluso una negativa (P3) se vuelven positivas luego del tratamiento con ICD a pH=1.85.

C. Aislamiento del VIH de plasmas criopreservados empleando cultivos mixtos

Se hicieron ensayos preliminares de plasmas obtenidos con EDTA como anticoagulante y almacenados por varios meses a -70°C . El plasma se incubó por 2 horas en el cultivo mixto, luego se retiró y se sustituyó con medio RS-IL2, sin hacer ningún lavado. A pocas horas de haber realizado la infección, se observó la formación de coágulos que obstruían las puntas de las micropipetas e incluso dificultaban la visualización de las células en el microscopio invertido. La mayoría de las células en cultivo se perdía si los coágulos eran retirados.

Al incubar plasma con EDTA y medio RS se formaban coágulos a las pocas horas. Puesto que hay bacterias como *Staphylococcus aureus* capaces de inducir coagulación de fibrina⁶⁸ las muestras fueron filtradas por membranas con poro de $0.22\ \mu\text{m}$ para asegurar su esterilidad. Al incubar con medio RS se apreció nuevamente la coagulación tanto en muestras filtradas como en controles sin filtrar. Se supuso que el efecto era provocado por la adición de iones Ca^{2+} con el medio RS, aunado a la dilución del EDTA.

Por otra parte, se incubaron plasmas heparinizados (muestras VGF y JZL) con medio RS, donde no se detectaron coágulos luego de 14 días. Pero cuando esos plasmas se incubaron con el cultivo mixto de Lin-Mf sin hacer ningún lavado, se observó que 6 días después se empezaba a formar un coágulo desde las orillas del pozo, que luego se iba retrayendo radialmente mientras una cantidad considerable de células quedaban atrapadas en él. Tal coágulo era más pequeño y fácil de eliminar aunque la pérdida de células seguía ocurriendo.

Para eliminar el fenómeno de la coagulación se realizaron lavados de los pozos de cultivo: el plasma incubado con el cultivo mixto era retirado y luego se adicionaba un volumen similar de PBS, en el que se resuspendían suavemente las células; luego las placas eran centrifugadas a 1200 r.p.m. durante 10 minutos y la mayor parte del sobrenadante se retiraba con cuidado de no tomar células del fondo del pozo ni dejarlo secar. El lavado se repitió hasta 2 veces.

Con este procedimiento se eliminó casi en su totalidad el fenómeno de la coagulación, aunque hay que remarcar que los lavados deben hacerse suavemente para evitar daños a las células adherentes y/o eliminar a las no adherentes.

Durante la estandarización de estas condiciones experimentales, se tuvieron muchos fracasos en la infección de cultivos mixtos con plasmas de pacientes infectados, por lo cual se decidió inocular virus prototipo IIB en un plasma con serología negativa a VIH. Esto generó el experimento C1.

Experimento C1: Infección de cultivos mixtos con diluciones de virus IIIb en plasma

- 1. Preparación del virus IIIb:** Se estableció infección aguda por cocultivo a proporciones iguales de la línea celular MT-2 con IIIb/Molt-4 en 4 frascos de cultivo F75. Luego de 3 días, los cultivos se centrifugaron a 3000 r.p.m. por 15 minutos a temperatura ambiente y el virus se concentró por ultracentrifugación a 20 000 r.p.m. por 2 horas a 4°C.
- 2. Preparación de plasmas artificialmente infectados con IIIb:** Cada concentrado viral se resuspendió en 1 mL de plasma heparinizado de un donador sano (se concentró 25:1 con respecto al sobrenadante original y se le denomina plasma estándar). Empleando plasma del mismo donador sano se hicieron las siguientes diluciones al plasma estándar:
 - 1:16
 - 1:64
 - 1:256
 - 1:1024
- 3. Preservación:** Se hicieron alícuotas de 0.5 mL de las diluciones de IIIb en plasma y se mantuvieron en crioviales a -70°C al menos por 3 semanas.
- 4. Titulación:** Se determinó la dosis infectiva media (DI_{50}) de los plasmas empleando PBMC como células blanco, activadas con PHA (la técnica se describe en la sección de Apéndice) y los resultados se presentan en la tabla 6.

Tabla 6: Resultados de absorbancia para Ag p24 de plasmas inoculados con IIIb y su cultivo (por triplicado)

Línea de corte = 0.226		Cultivos			Cultivo de virus inactivado
Dilución	Plasma Inoculado				
estándar	3.577	nd	nd	nd	nd
1:16	3.004	1.934	1.252	1.271	0.188
1:64	1.240	0.805	0.411	0.460	0.185
1:256	0.495	0.267	0.253	0.211	0.203
1:1024	0.272	0.211	0.192	0.226	0.181

titulación realizada con 45000 PBMC/pozo fondo U
nd : no disponible

Según el método de Reed y Muench:

Dilución	log dilución	Ensayos (+/-)			% respuesta positiva
1:16	-1.2	+	+	+	100
1:64	-1.8	+	+	+	100
1:256	-2.4	+	+	-	66.6
1:1024	-3.0	-	-	-	0

Los cálculos para obtener la DI_{50} son:

$$\% \text{ distancia} = (66.6 - 50) / (66.6 - 0) = 0.249$$

$$\log \text{ factor de dilución} = \log (1/4) = -0.6$$

$$\log DI_{50} = -2.4 + (0.249)(-0.6)$$

$$DI_{50} = 10^{-2.549}$$

Haciendo el despeje, $10^{2.549} DI_{50}$ están en 0.1 mL utilizados para hacer el ensayo, entonces se tendrán 3540 DI_{50} /mL del plasma estándar. Entonces las diluciones realizadas tienen las DI_{50} que se indican en la tabla 7.

Tabla 7: DI_{50} de los plasmas inoculados con IIIb y usados para estandarizar el cultivo mixto

Dilución viral	DI_{50} /mL
estándar	3540
1:16	221.0
1:64	55.3
1:256	13.8
1:1024	3.5

5. **Cultivo mixto:** En placas de 96 pozos con fondo plano se establecieron una serie de cultivos mixtos añadiendo 4.5×10^6 PBMC/mL por pozo de cultivo, con medio RS-IL2-SHA como medio de maduración y otra serie con medio RS-SHA por 3 días e IL2-SHA por 4 días más. Una tercera serie de cultivos mixtos se realizó en placas de 96 pozos con fondo en "U" con medio RS-IL2-SHA. Luego de la infección en las 3 series se hicieron 2 lavados con PBS y se añadió medio RS-IL2 como medio de mantenimiento cada 7 días. Se alimentó con 180 000 PBMC activados con PHA por pozo de cultivo a los 12 y 24 días después de la infección. Cada serie contaba con controles negativos de plasma sin virus. Los cultivos mixtos y las infecciones se hicieron por cuadruplicado.

6. Observaciones morfológicas:

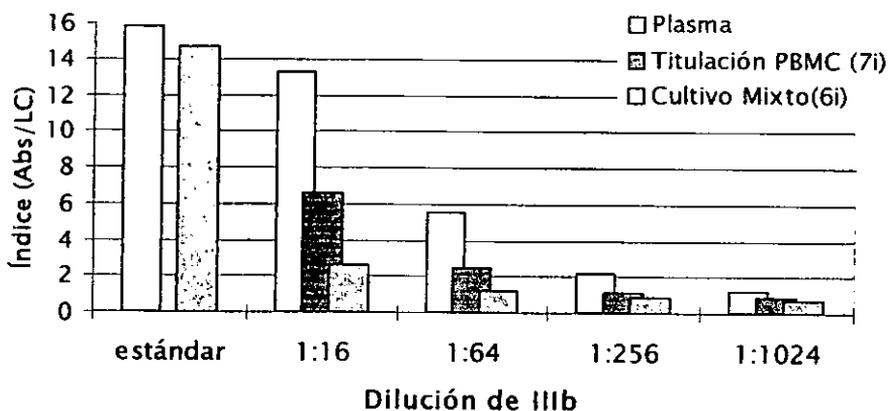
Las diluciones del virus prototipo IIIb en plasma fueron cultivadas a lo largo de 28 días. Al tercer día de infección (3i) se observaron pequeños sincicios en la dilución 1:16 del cultivo RS-IL2-SHA en fondo plano, por lo cual se decidió monitorear Ag p24 en las diluciones estándar, 1:16 y 1:64 de las 3 series de cultivo: el Ag p24 fue positivo en todos los casos.

Al día 6i (a 6 días de haber infectado el cultivo) se observaba gran destrucción celular en todos los cultivos de la dilución estándar y 1:16. Al día 7i aparecen coágulos en algunos pozos, pero se deshacen con una ligera agitación con micropipeta. En el resto de las diluciones no se observaron diferencias celulares morfológicas con sus controles negativos, hasta alrededor del día 25 cuando disminuyó la cantidad de macrófagos presentes en todos los pozos de cultivo.

En la placa de fondo en "U" la destrucción celular fue mayor, incluso en los controles negativos, lo cual parece indicar que la cantidad de células por pozo era excesiva para ese tipo de placa. Como se observará en la gráfica 7C, con este cultivo se obtuvieron menores cantidades de Ag p24 en las primeras diluciones, y únicamente al día 13i sus niveles fueron ligeramente superiores en la dilución 1:256 y 1:1024 que en los cultivos de placas de fondo plano.

En estos experimentos generalmente se incluye un control de virus inactivado, requerido para cuantificar al virus residual en las titulaciones, pero en este caso no fueron adecuados, pues al inactivar el virus a 56°C muchas proteínas del plasma se desnaturalizaron y formaron un coágulo blanquecino que causó la muerte de los cultivos mixtos respectivos, por lo cual no fueron considerados. Para experimentos futuros, el virus debe inactivarse antes de ser incorporado al plasma.

Gráfica 6: Comparación del Ag viral en plasma inoculado, cultivo mixto y titulación en PBMC



7. Producción de Ag p24

Se comparó la cantidad de Ag p24 presente en los plasmas inoculados con I11b con el Ag producido por el cultivo mixto al día 6 (Gráfica 6); además se incluyó la cantidad de Ag producido por el cultivo de PBMC (titulación) para evaluar cuantitativamente la efectividad del cultivo mixto. En la gráfica 6 se aprecia que la cantidad de Ag p24 en el plasma inoculado con I11b es superior para todas las diluciones al Ag obtenido de cualquiera de los cultivos. Se aprecia que la titulación de los plasmas en 45000 PBMC produjo más Ag p24 que en cultivo mixto a la semana de la infección; este fenómeno puede deberse a que la titulación es una técnica bien estandarizada, mientras que el cultivo mixto apenas está en desarrollo. Por otra parte, el cultivo mixto cuenta con macrófagos que posiblemente modifiquen las curvas de crecimiento viral obtenidas con cultivos clásicos de linfocitos.

En la tabla 8 se muestran los resultados de Ag p24 para las 3 variantes de cultivo probadas y se grafican sus índices (Gráfica 7).

Hasta el día 6 de infección sólo eran positivas a Ag p24 por ELISA casero las diluciones estándar, 1:16 y 1:64 en los 3 sistemas de cultivo evaluados. Para el día 13i se positivizan todas las diluciones 1:256 y sólo la 1:1024 en fondo en "U" con medio RS-IL2-SHA. El resto de las diluciones 1:1024 se vuelven positivas hasta el día 20i.

Para confirmar este último dato se determinó Ag p24 el día 28i, sólo para las diluciones 1:1024 y estándar, esta última como un control positivo. Se observó un fuerte repunte del Ag en la dilución 1:1024 del cultivo RS-SHA (x3)/IL2-SHA (x4), en tanto que no hubo ninguna producción en el RS-IL2-SHA a esa misma dilución. Hay que remarcar que al día 3i en pozos de fondo plano el Ag p24 era mayor que al día 6i.

De la gráfica 7 se pueden distinguir 2 cinéticas de crecimiento viral: por una parte las que comienzan con valores de Ag p24 muy altos (infección aguda) y que van disminuyendo conforme pasa el tiempo, pero que pueden remontar sus valores luego de alimentar al cultivo con células frescas; este comportamiento se distingue claramente en las diluciones estándar, 1:16 y 1:64 principalmente. Por otra parte están los cultivos que son negativos al Ag p24 en las primeras determinaciones, pero que se positivizan luego del día 13i, como es el caso de las diluciones 1:256 y 1:1024 que cuentan con 13.8 y 3.5 DI_{50} respectivamente.

Tabla 8: Índices de producción de Ag p24 de IIIb/plasma en cultivo mixto

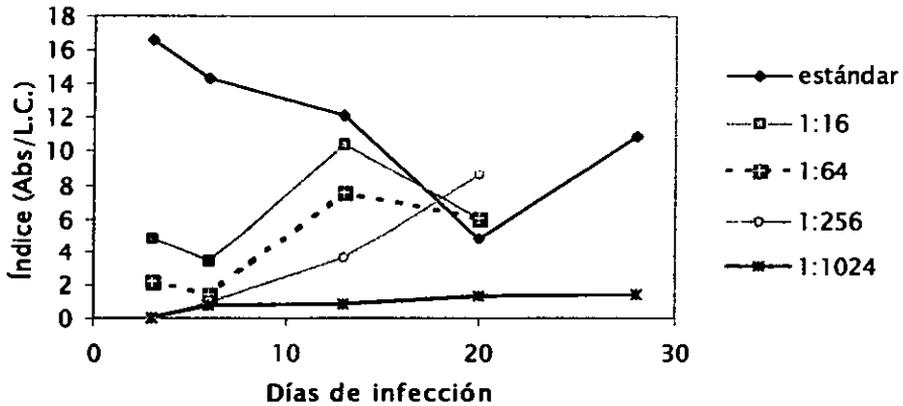
Sistema de cultivo	Día	3i	6i	13i	20i	28i
	Línea de corte	0.144	0.210	0.233	0.203	0.226
fondo plano RS-IL2-SHA	Dilución					
	estándar	16.6	14.3	12.1	4.8	10.9
	1:16	4.8	3.4	10.4	6.1	nd
	1:64	2.2	1.5	7.5	6.0	nd
	1:256	nd	0.9	3.6	8.7	nd
1:1024	nd	0.7	0.9	1.3	1.4	
fondo plano RS-SHA (x3)/ IL2-SHA (x4)	estándar	17.3	14.7	10.1	3.7	14.0
	1:16	4.1	2.6	9.6	3.2	nd
	1:64	1.8	1.2	9.6	3.4	nd
	1:256	nd	0.9	2.7	9.1	nd
	1:1024	nd	0.7	1.1	2.4	10.7
fondo U RS-IL2-SHA	estándar	7.8	10.7	8.6	1.0	nd
	1:16	4.7	4.6	5.4	1.4	nd
	1:64	1.8	1.6	5.7	2.2	nd
	1:256	nd	0.9	3.8	2.1	nd
	1:1024	nd	0.8	2.0	2.5	nd

Gráfica 7: Producción de Ag p24 de IIIb/plasma en cultivos mixtos

Nota: Los cultivos se alimentaron con 180 000 PBMC/pozo al día 12 y 24.

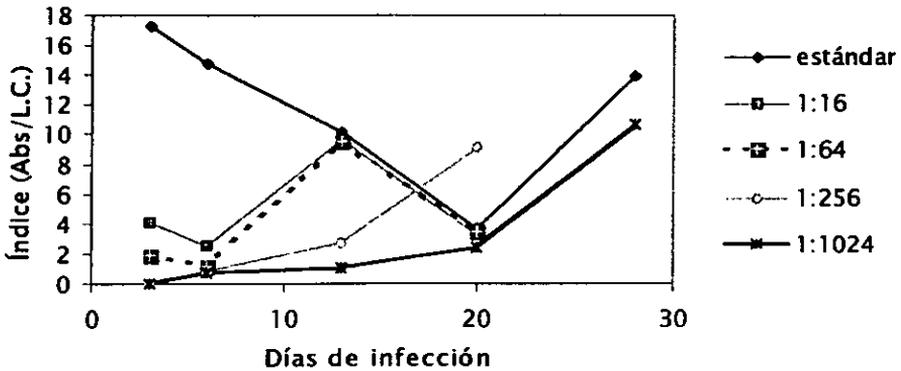
Gráfica 7A)

**Índices de Ag p24-IIIb en el cultivo mixto
RS-IL2-SHA, fondo plano**



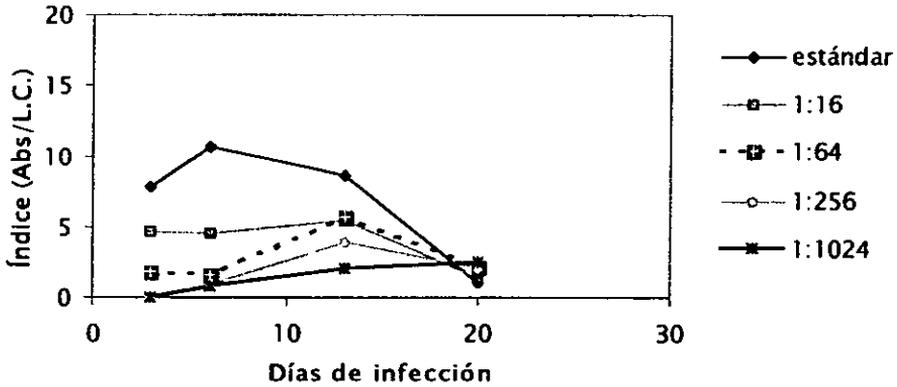
Gráfica 7B)

**Índices de Ag p24-IIIb en el cultivo mixto
RS-SHA (x3)/IL2-SHA (x4) fondo plano**



Gráfica 7C)

Índices de Ag p24-IIIb en el cultivo mixto
RS-IL2-SHA, fondo "U"



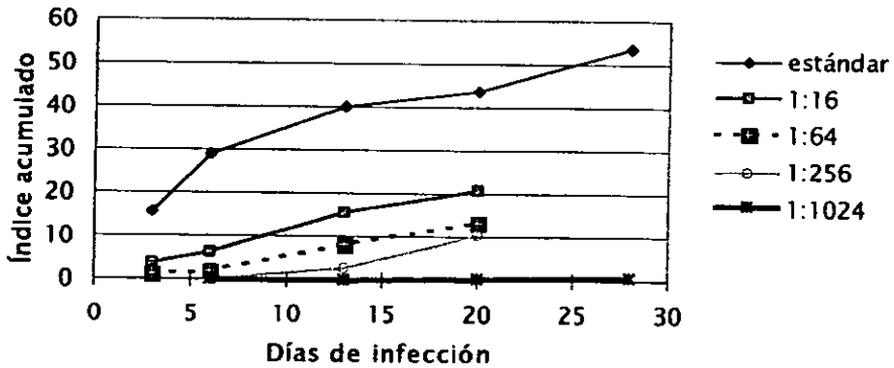
Al cambiar la mitad del medio de cultivo semanalmente no es posible hacer una cinética de crecimiento viral a lo largo de un mes directamente con los resultados de Ag p24. Puede hacerse una suma acumulada de la cantidad de Ag detectado y tener una mejor representación de tal cinética. Con los resultados expresados como índices es necesario normalizar los datos, pues un índice igual a 3 no indica una contribución de 3 unidades a la curva, y solo cuentan 2, dado que el 1 restante es igual a la línea de corte y no representa un valor positivo.

En la gráfica 8 se presentan las curvas de producción acumulada y normalizada de Ag p24 en los 3 sistemas de cultivo.

Gráfica 8: Producción acumulada de p24 en cultivos mixtos

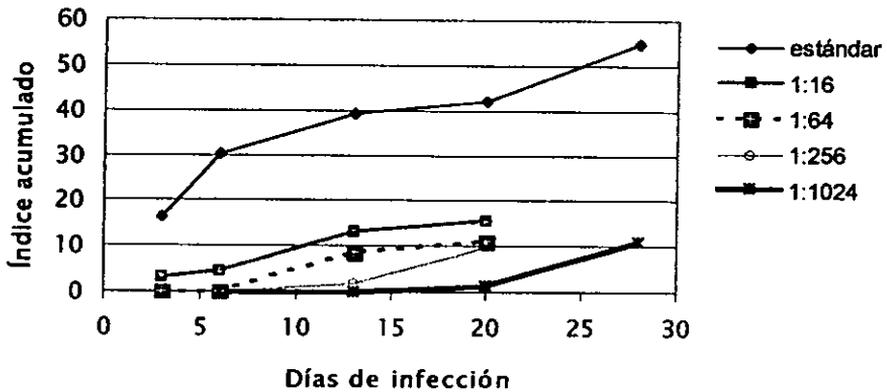
Gráfica 8A)

Índices normalizados y acumulados de Ag p24-IIIb en cultivo mixto (RS-IL2-SHA, fondo plano)



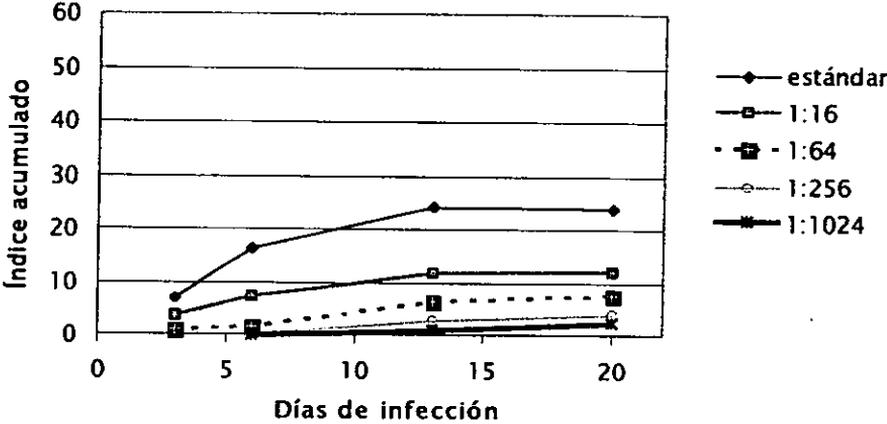
Gráfica 8B)

Índices normalizados y acumulados de Ag p24-IIIb en cultivo mixto RS-SHA(x3)/-IL2-SHA(x4) fondo plano



Gráfica 8C)

Índices normalizados y acumulados de Ag p24-IIIb en cultivo mixto (RS-IL2-SHA, fondo "U")



Experimento C2: Cultivo celular mixto de plasmas criopreservados.

Para este experimento se utilizaron plasmas que habían estado un largo tiempo en ultracongelación y que en la medida de lo posible se tuvieran más datos sobre el estadio de su infección (Tabla 9).

Los plasmas seleccionados habían permanecido entre 10 y 17 meses a -70°C . El material biológico fue descongelado y centrifugado a 2500 r.p.m. por 5 minutos. Posteriormente se usaron 100 μL de cada plasma para infectar cultivos mixtos establecidos en placas de 96 pozos.

Tabla 9: Datos de los pacientes del experimento C2

Fecha de ingreso	Paciente	Tratamiento	CD4 cél/mL	relación CD4/CD8	CV (log)	Ag (índice) directo	ICD
161097	VGf	nd	nd	nd	4.6	neg	7.9
161097	JZL	3TC	nd	nd	3.8	neg	9.2
090997	ICL	AZT/ddC	417	1.09	3.3	neg *	
061197	EGH	AZT/Inh.prot	419	0.82	3.9	neg	10.1
061197	NRM	no	258	0.27	4.2	neg	2.3
010498	LTS11B	AZT/ddC	296	0.50	<2.7	neg*	nd

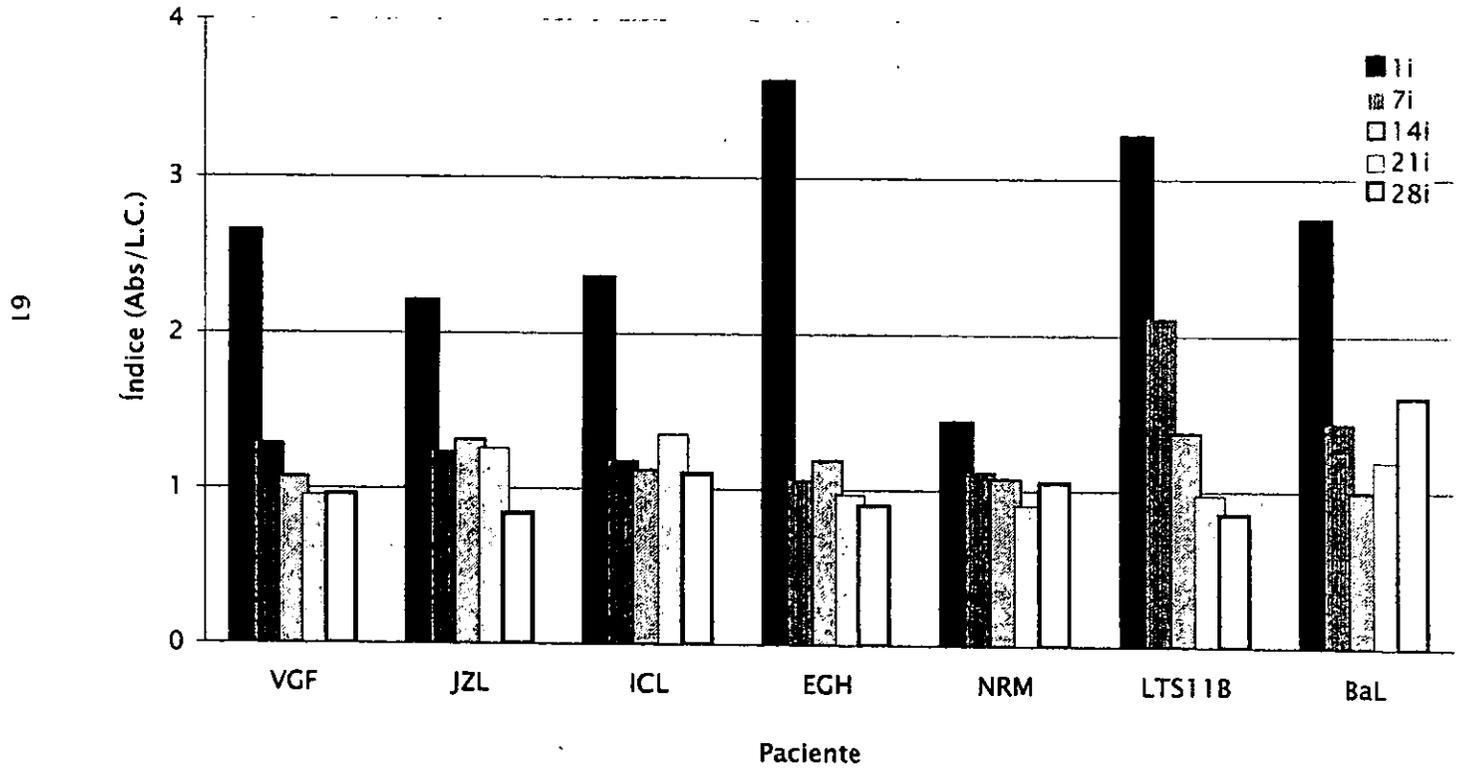
nd: no disponible

CV: carga viral expresada.

*: determinaciones realizadas en ELISA comercial.

Los cultivos de estos plasmas se mantuvieron por 28 días; además se cultivó un sobrenadante del virus prototipo BaL como control positivo. Los cultivos se alimentaron a los días 11 y 25 después de la infección con 10^5 PBMC estimulados con PHA. Cada 7 días se determinó el Ag p24 y los resultados se presentan en la gráfica 9.

Gráfica 9: Producción de Ag p24 del cultivo mixto de plasma de pacientes



Al día 1i se retiró el sobrenadante de los cultivos pues se observó nuevamente el fenómeno de la coagulación. Es muy notorio que se hayan presentado niveles de Ag p24 tan altos y muy superiores a cualquier otra lectura realizada en este experimento.

Debe tomarse en cuenta que en la determinación directa de Ag p24 en plasma todas las muestras fueron negativas, por lo cual esos niveles de p24 al día 1 de la infección no pueden atribuirse a antígenos residuales del plasma que se usó en la infección.

Hay que notar que al día 1i, en el caso de la muestra EGH se obtuvo el mayor índice de producción de Ag p24 en cultivo (índice=3.6) y a su vez la mayor cantidad de Ag p24 en plasma tratado con la técnica de disociación ácida de complejos inmunes (índice de Ag-ICD=10.1). El caso contrario es el de la muestra NRM, que produjo escaso Ag en cultivo mixto (índice=1.4) y tenía escaso Ag en plasma (índice de Ag-ICD=2.3).

5. DISCUSIÓN

Las principales estirpes celulares infectadas por el VIH son los linfocitos y los monocitos/macrófagos, pero en cada una se presenta un ciclo viral distinto⁶⁹. Los aislados primarios del VIH muestran una selección viral dependiente del material biológico cultivado³⁶ y del sistema de cultivo empleado²⁶. En este estudio se desarrolló un sistema de cultivo celular mixto que permite el aislamiento viral en un cocultivo de macrófagos (derivados de monocitos) y linfocitos a partir de células mononucleares de sangre periférica de donadores sanos.

El cultivo mixto consiste de dos fases: en la primera (de 5 a 7 días) se produce la maduración de los monocitos hacia macrófagos por adherencia a la placa de cultivo por cultivo en un medio que debe contener 10% SHA (suero humano serotipo A). La segunda fase o de mantenimiento se caracteriza por la eliminación del SHA y el uso del medio de cultivo RS-IL2. Es en el punto intermedio a las dos fases que se hace la infección del cultivo mixto.

Existe una gran variedad de métodos reportados para el cultivo de macrófagos^{57,59} y se escogió el método de adherencia a la placa de cultivo pues se recomienda por su alto rendimiento, poca selección de subpoblaciones celulares y bajo costo, al no requerir equipo especial. Los experimentos de adherencia fueron igualmente exitosos en frascos F25 así como en placas de 96 ó 24 pozos de 3 marcas comerciales (Nunclon™, Falcon™ y Evergreen™).

El experimento A1 mostró el efecto de diferentes medios de cultivo en la obtención de células adherentes, así como en la viabilidad de las no adherentes: al cultivar los PBMC con medio RS (RPMI1640 y 10% SFB) se

produjeron pocas células adherentes, con RS-IL2 se obtuvieron un poco más, pero cuando se utiliza RS-SHA' (RS y 10% SHA) casi se obtuvo confluencia de células redondas y gigantes mononucleares. Con la combinación RS-IL2-SHA' se obtuvo una adherencia muy similar, mostrando el efecto que tiene el SHA' en la maduración de los monocitos aún en presencia de la IL2, pero con este medio aumentó la heterogeneidad celular, pues coexistían células gigantes (productos de fusión de macrófagos) con macrófagos lamelares.

La mejor viabilidad de las células no adherentes se tuvo con el medio RS-IL2-SHA' a lo largo de los 24 días del estudio, mientras que el cultivo con RS-SHA' presentó una disminución en la viabilidad desde el día 17.

Al conjuntar los resultados de células adherentes y no adherentes se aprecia que el medio de maduración RS-IL2-SHA' fue el mejor de los 4 medios de cultivo probados, por generar tanto buena viabilidad en linfocitos (células no adherentes) como gran obtención de macrófagos (células adherentes).

En el experimento A2 se comenzó a investigar la cantidad de células necesarias para formar una monocapa de macrófagos madurados con RS-IL2-SHA': con 3.3×10^6 PBMC/mL aún no se alcanzaba la confluencia de células adherentes, por lo que en experimentos posteriores esta concentración se aumentó hasta lograr ese objetivo, como puede observarse en la tabla 3. Con 3.3×10^6 PBMC/mL iniciales, hubo aumento en las células adherentes, pero a costa de la disminución de viabilidad en las células no adherentes particularmente entre el día 5 y el 11, lo cual se muestra en la gráfica 2; considerando que la infección debe hacerse entre el día 5 y 7, debe verificarse la viabilidad de células no adherentes antes de infectar los cultivos (entre el día 5 y 10 de cultivo).

Hay que remarcar que en los experimentos A1 y A2 se usó SHA sin inactivación de complemento, lo cual generó una gran cantidad de macrófagos con bajas concentraciones celulares. Esto explica que para tener observaciones similares en el experimento A3 (ver figura 4) se necesitara duplicar la concentración celular al inicio del ensayo, pues con el SHA descomplementado se producen menos macrófagos.

Cuando el medio se enriquece con SHA con o sin complemento, la concentración total de suero aumenta a 20% y una gran variedad de sustancias⁵⁹ provocan una mejor maduración de monocitos. De hecho la supervivencia de los macrófagos *ex vivo* se incrementa (más de 45 días) cuando se usa el medio de cultivo RS-SHA como medio de mantenimiento. Estas observaciones son congruentes con varios reportes de la literatura⁵³ sobre el efecto del suero humano en los cultivos de macrófagos.

Aunque se ha mostrado que el suero humano serotipo B tiene algún efecto neutralizante para la infección por VIH⁷⁰, generalmente se reporta el uso de suero humano serotipo AB^{44,57} para el cultivo de macrófagos; pero en México ese serotipo no es frecuente ni se puede obtener suero de forma comercial. En caso de usar suero serotipo O, se estarían adicionando anticuerpos anti-A y anti-B que pueden provocar daño a las células del cultivo. La opción restante es usar suero humano serotipo A, aunque tenga anticuerpos anti-B.

En el cultivo mixto son frecuentes las células adherentes (macrófagos) con morfologías disímiles. En el caso de las células gigantes, se encuentran más frecuentemente y son de mayor tamaño en los cultivos que tienen SHA y se les han quitado los linfocitos. Se ha reportado que el empleo de IL4 y GM-CSF genera células gigantes en cultivos de

macrófagos^{67,71}, de manera similar que el SHA. En el caso de los macrófagos lamelares, estos se observan más frecuentemente en cultivos con IL2 y que tienen linfocitos presentes. Para tratar de conjuntar en un solo cultivo ambos fenotipos celulares se comenzaron a trabajar los medios de cultivo RS-IL2-SHA y posteriormente el RS-SHA (x3)/-IL2-SHA (x4), con los que además se obtiene una mejor sobrevivida de los linfocitos en cultivos mixtos.

En un experimento posterior para conocer el efecto que tienen las células no adherentes más la IL2 en el desarrollo de las adherentes, se retiraron las células no adherentes al día 7 y como medio de mantenimiento se usó RS. Se formaron células fibroblastoides y gigantes de mayor tamaño que en los cultivos donde permanecían las células no adherentes. En otro caso similar, el medio de mantenimiento fue RS-SHA, con el cual se favoreció el desarrollo de células gigantes y el cultivo sobrevivió más allá de los 50 días.

Para hacer la identificación de macrófagos adherentes a la placa de cultivo, se emplea comúnmente la técnica de detección de la estearasa no específica⁷². Se realizaron algunos ensayos pero no se contaba con los reactivos adecuados, por lo cual se observaban falsos positivos en los cultivos y no se tenía una identificación confiable, por lo cual se decidió comparar morfológicamente las células adherentes con imágenes de los múltiples reportes sobre cultivo de macrófagos²⁸, determinando así que las células adherentes de los cultivos eran morfológicamente similares a las reportadas.

Por otra parte, en el experimento A4 se desarrollaron exitosamente los cultivos mixtos en microcultivo, lo cual representó un ahorro considerable de material, tanto biológico como de cultivo. En las placas de

cultivo con pozos de fondo plano se logró finalmente la confluencia celular de macrófagos añadiendo una concentración de 4.5×10^6 PBMC/mL inicial, además se obtuvo una adherencia homogénea empleando una placa antiestática (gasa con benza) debajo de la placa de cultivo durante el periodo de maduración.

Cuando el cultivo mixto se estableció en placas de fondo "U", el cultivo mixto cambió su conformación completamente: en las partes altas del pozo se desarrollaron los macrófagos lamelares, mientras que en la sima permanecieron únicamente células no adherentes. Las ventajas o desventajas que esto pueda tener frente al cultivo del VIH no es claro. Ciertamente el cultivo del VIH en esas condiciones no fue muy exitoso, principalmente porque esos cultivos tuvieron mucha destrucción celular incluso en los controles negativos sin virus, lo cual sugiere posteriores optimizaciones. Una razón para establecer el cultivo mixto en estos pozos en "U" fue que la titulación viral se realiza en estos mismos pozos, pero únicamente con 45 000 PBMC/pozo. Si el cultivo mixto se optimiza en estos pozos sería posible desarrollar estudios de titulación viral en cultivo mixto de linfocitos-macrófagos y tener información menos sesgada sobre la infectividad y tropismo de inóculos virales.

La función de los distintos fenotipos de macrófagos no ha sido claramente determinada: algunos autores señalan que los macrófagos lamelares posiblemente tienen capacidad estimuladora y por ello forman entramados mediante largas prolongaciones celulares, mientras que las células gigantes tienen una función principalmente fagocítica^{28,71}.

Dado que el objetivo de esta tesis es cultivar al VIH en un sistema celular mixto y por las múltiples variantes de cultivo desarrolladas, se procedió a buscar el material biológico que permitiera tal estudio. La

cantidad de plasma necesario superaba los 20 mL, lo cual significa que casi el doble de sangre debía ser obtenida de un paciente; por ética se optó a extraer esa sangre de un donador sano e inocular en el plasma diluciones del virus prototipo IIIb y con ello hacer los cultivos.

El empleo de plasma presenta una dificultad técnica particular: los cultivos de plasma se coagulan al quedar en ellos factores de la cascada de la coagulación, el anticoagulante se diluye y su efecto se elimina. En esta tesis se decidió hacer lavados para minimizar este fenómeno, pero hay algunos estudios que indican que la coagulación no interfiere con el contacto célula-célula o virus-célula⁴⁵, aunque es posible que los macrófagos presentes incrementen sustancialmente el fenómeno de coagulación.

Las diluciones de IIIb/plasma fueron inoculadas en los 3 cultivos mixtos mencionados en el experimento A4 y se lograron cultivar todas las diluciones de IIIb en los 3 sistemas de cultivo, incluso la dilución 1:1024 que tenía 3.5 DI_{50} fue cultivable a niveles altos luego de 28 días.

Debe señalarse que la primera determinación de Ag p24 al día 3 de infección (3i) no estaba programada y se hizo únicamente a las diluciones estándar, 1:16 y 1:64 porque se observaron sincicios en la dilución 1:16 del cultivo RS-IL2-SHA en fondo plano. Esta determinación mostró que esas 3 diluciones de IIIb habían producido altas cantidades de Ag p24 en poco tiempo. Al día 6i se volvió a medir el Ag p24 en el sobrenadante de los cultivos y se confirmaron los casos positivos pero el nivel de Ag era menor que al día 3i.

Al día 12i se alimentaron los cultivos con PBMC recién activados con PHA y acto seguido, al día 13i se determinó Ag p24. Desde la dilución

estándar hasta la dilución 1:256 se observan Ag p24 positivos e incluso superiores en todos los casos a la determinación del día 6i. Nuevamente llama la atención que el cultivo mixto produjera altos niveles de p24 al día siguiente de haberlo alimentado, aparentemente haciendo un proceso de infección aguda. Para el día 20i todos los cultivos son positivos para todas las diluciones virales, lo cual se confirma el día 28i.

En la gráfica 8 se representa una cinética de producción acumulada de Ag viral. Es muy notorio que el cultivo con RS-IL2-SHA en pozo de fondo "U" produjo menos Ag viral a lo largo del estudio. En contraste, los otros dos cultivos en pozos de fondo plano produjeron cantidades superiores de Ag p24 pero muy similares entre ambas.

Con los pocos datos que se obtuvieron es imposible determinar si existe diferencia alguna entre el cultivo RS-IL2-SHA y el cultivo RS-SHA (x3)/IL2-SHA (x4); hay que considerar que sus comportamientos fueron muy similares hasta el día 20i, pero en la determinación del día 28i, únicamente RS-SHA (x3)/IL2-SHA (x4) en la dilución 1:1024 tuvo un aumento importante, mientras que el cultivo RS-IL2-SHA mantuvo un bajo nivel de producción. Esto último posiblemente se deba a un error experimental, puesto que en las determinaciones de días anteriores no había ninguna diferencia y sería poco probable que hasta el día 28 se viera reflejado algún efecto atribuible a la maduración de los cultivos.

Existe una clasificación de los aislados virales según su cinética de crecimiento en cultivo⁷³: a los aislados virales capaces de producir niveles detectables de p24 al tercer día de cultivo se les atribuye un patrón de replicación rápido, mientras que los aislados que requieren entre 7 y 27 días para producir p24 son de replicación lenta. En los ensayos realizados con el virus prototipo IIIb se presentaron los dos fenotipos: desde la

dilución estándar hasta la 1:64 se observa una abundante producción de Ag p24 al tercer día de cultivo (fenotipo rápido), en cambio las diluciones 1:256 y 1:1024 se volvieron positivas hasta después del día 13 (fenotipo lento). Este fenómeno sugiere que el fenotipo observado *in vitro* no corresponde únicamente a la capacidad replicativa del genoma viral sino que la cantidad de virus presente es un factor fundamental en la cinética de replicación viral observada, pues tradicionalmente el prototipo IIIb ha sido clasificado con el fenotipo de crecimiento rápido.

En lo que refiere a economía de materiales, es un hecho que en el cultivo RS-SHA (x3)/IL2-SHA (x4) se emplea la tercera parte de IL2 que en el cultivo RS-IL2-SHA, por lo cual se escogió como el medio de maduración de macrófagos para el experimento con plasmas de pacientes infectados.

A su vez, en el experimento C2 se pusieron a cultivar los plasmas de 6 pacientes infectados. En la gráfica 9 se aprecia que nuevamente al inicio del cultivo mixto (1i) aparecen niveles altos de Ag p24, que semejan un proceso de infección aguda. Ese Ag no es residuo del Ag libre presente en los plasmas, según muestra la tabla 9, pues todos los plasmas eran negativos al Ag p24 por determinación directa.

Con la finalidad de tener resultados más confiables sobre la presencia de Ag p24 en plasma se estandarizó la técnica de disociación ácida de complejos inmunes (experimento B). Mediante esta técnica se volvieron positivas todas las muestras evaluadas en el ELISA casero. Estos resultados indican que el Ag p24 se encontraba formando complejos con anticuerpos que impedían su determinación.

El plasma EGH obtuvo el mayor índice de producción de Ag p24 en cultivo y también la mayor cantidad de Ag p24 por ICD en plasma. El caso

contrario fue la muestra NRM que produjo escaso Ag p24 en cultivo mixto y era escaso el Ag p24 por ICD en plasma. El resto de las muestras no presenta una relación tan clara entre sus valores, pero se necesitarían más muestras para hacer un análisis más detallado de la posible correlación entre el Ag encontrado en etapas tempranas del cultivo con el Ag presente en plasma.

Ciertamente no se logró establecer por largo tiempo el cultivo viral de pacientes infectados por el VIH en el sistema de cultivo celular mixto de linfocitos-macrófagos, aunque se obtuvieron niveles altos de Ag p24 en etapas tempranas de la infección, lo cual sugiere un estadio de infección aguda.

Por todos los resultados presentados deben realizarse más estudios sobre la infección del cultivo mixto de linfocitos-macrófagos madurados con medio RS-SHA (x3)/IL2-SHA (x4). Particularmente deben estudiarse las etapas tempranas de la postinfección, pues tanto en los resultados de infección con IIIb como con plasmas de pacientes se observan elevaciones importantes del Ag p24 al poco tiempo de haber realizado la infección (1 a 3 días). Además esos aislados primarios pudieran cultivarse en líneas celulares (MT2) para asegurar la validez de estos resultados y poder hacer estudios moleculares sobre los virus infecciosos circulantes en el plasma al momento de recolectar esa muestra.

Finalmente, el sistema de cultivo celular mixto de células humanas normales representa un material de estudio potencialmente útil para estudiar interacciones célula-célula, así como a la infección viral que pueda ser facilitada por el microambiente resultante de la interacción.

6. CONCLUSIONES

Se estandarizó un sistema de cocultivo celular que permite la convivencia de diferentes células susceptibles a la infección *ex vivo* por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH): los linfocitos y los macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica, empleando un medio de cultivo que contiene suero humano e IL2.

Los cultivos desarrollados fueron permisivos a la infección tanto por el virus prototipo IIIb a bajas dosis infecciosas, como por los virus provenientes de plasmas criopreservados de personas infectadas.

Son necesarios más estudios sobre las etapas tempranas de la postinfección de los cultivos mixtos (linfocitos-macrófagos), pues tanto en las infecciones con IIIb como con plasmas de pacientes se observan elevaciones importantes en la producción viral a pocos días de realizada la infección.

Además, análisis genéticos de las poblaciones virales predominantes en estos cultivos permitirían comparaciones con los virus presentes en las muestras biológicas ensayadas; de esta manera se podría establecer la posible utilidad de este sistema de cultivo en la recuperación de una mayor variedad de cuasiespecies virales y su papel en posteriores estudios sobre la infección por el VIH.

Finalmente, el sistema de cultivo celular mixto de células humanas normales representa un material de estudio potencialmente útil para estudiar interacciones célula-célula, así como a la infección viral que pueda ser facilitada por el microambiente resultante de la interacción.

7. APÉNDICE (Técnicas de rutina⁴⁵)

Obtención de PBMC frescos a partir de concentrados leucoplaquetarios

1. Diluir a partes iguales el concentrado leucoplaquetario (CL) con PBS.
2. Poner 25 mL de Hystopaque^{MR} en tubos cónicos de 50 mL y luego añadir 25 mL del CL muy lentamente por la pared del tubo, sin romper la interfase que se forma entre líquidos.
3. Centrifugar estos tubos sin freno a 1400 r.p.m. por 30 minutos.
4. En otros tubos, añadir aproximadamente 40 mL de PBS donde se lavarán los PBMC obtenidos en el siguiente paso.
5. Al término de la centrifugación, recolectar la capa blanquecina de PBMC que se forma en la interfase (con cuidado de no agitar el tubo). Los PBMC se agregan a los tubos del paso 4.
6. Centrifugar a 1200 r.p.m. por 10 minutos.
7. Desechar sobrenadante. Resuspender células y llenar el tubo con PBS.
8. Repetir los pasos 6-7 y tomar una alícuota para hacer conteo celular.
9. Repetir el paso 6. Resuspender las células en el medio de cultivo y la concentración necesarios.

Conteo celular con azul tripano

1. Añadir a un tubo de microcentrifuga 10 μ L muestra en 90 μ L azul tripano 0.4%. Agitar.
2. Cargar la cámara de Neubauer y hacer conteo diferencial (vivas y muertas) en los cuadrantes para leucocitos.
3. Calcular $\text{PBMC/mL} = \frac{\text{PBMC vivas}}{4} \cdot 10^4 \cdot \text{dilución en colorante}$

Congelamiento de PBMC

1. Centrifugar los PBMC a 1200 r.p.m. por 10 minutos.
2. Desechar sobrenadante. Resuspender las células en una concentración aproximada de 10^7 PBMC/mL con medio de congelamiento (90% SFB inactivado y 10% DMSO).
3. Preservar en crioviales de 2 mL a -70°C por 24 horas para luego transferirlos a un tanque de nitrógeno líquido.

Descongelamiento de PBMC

1. Agregar aproximadamente 10 mL RPMI-1640-10% SFB (RS) a 37°C a un tubo cónico de 15 mL.
2. Las células deben manejarse con cuidado y deben descongelarse rápidamente en un baño de agua a 37°C , hasta que sólo quede un pequeño cristal de hielo en el criovial.
3. Transferir las células al tubo con medio y resuspender suavemente. Agregar medio de cultivo cbp 15 mL.
4. Centrifugar a 1000 r.p.m. por 10 minutos.
5. Desechar sobrenadante. Resuspender células y llenar el tubo con PBS.
6. Repetir los pasos 4-5-4.
7. Desechar sobrenadante. Resuspender las células en el medio de cultivo y la concentración necesarios.

Preparación de PBMC de donador sano estimuladas con PHA

1. Ajustar los PBMC a 2×10^6 cél/mL en medio RS en frascos o placas de cultivo según sea el caso.
2. Añadir PHA para tener una concentración final entre 2 y 5 $\mu\text{g/mL}$ (según indicaciones del fabricante).

- Mantener en la incubadora a 37°C y 5% CO₂ por 2 días
- Cambiar el medio de cultivo a RS-IL2 durante 1 día.

ELISA casero de captura para antígeno p24 ⁷⁴

Soluciones

Amortiguador de sales y fosfatos (PBS) pH 7
 1000 mL agua destilada
 8 g cloruro de sodio
 0.2 g cloruro de potasio
 1.44 g fosfato dibásico de sodio
 0.24 g fosfato monobásico de sodio

Amortiguador para lisis de muestras
 50 mL agua desionizada
 0.394 g TRIS HCl
 0.438 g NaCl
 0.5 mL Tritón X100
 0.5 g deoxiglicolato
 500 µl estándar 1M de floruro de fenil-metil-sulfonilo (PMSF)

Solución de pegado pH 7
 PBS + 0.1 mM merthiolate

Amortiguador de dilución pH 7 Filtrado
 100 mL PBS
 2 g albúmina sérica bovina
 2 mL tween 20
 0.1 mM merthiolate

Amortiguador de citrofosfatos pH 5.5
 1000 mL agua desionizada
 4.52 g ácido cítrico
 15.29 g fosfato dibásico de sodio heptahidratado

Solución de paro
 36.5 mL ácido clorhídrico
 463.5 mL agua desionizada

Procedimiento

- En una placa para ELISA Maxisorb^{MR}, colocar para cada pozo 200 µL de amortiguador de pegado con 1 µg del anticuerpo 6C6 y 1 µg del anticuerpo 8G11 o del 8D2.
- Cubrir e incubar toda la noche a temperatura ambiente (20–25°C).
- Lavar con agua desionizada una vez y eliminar todo el líquido residual golpeando sobre un papel absorbente.
- Bloquear con 300 µL de amortiguador de dilución 1h a 37°C.

5. Lavar 4 veces con agua desionizada.
6. Control positivo: de una alícuota de sobrenadante de IIB/Molt, de concentración conocida de p24, tomar 100 μ L y colocarlos en un pozo; luego hacer al menos 6 diluciones seriadas con 100 μ L de amortiguador de dilución y finalmente 100 μ L de amortiguador de lisis en cada pozo.
7. Muestras: adicionar 100 μ L de muestra y 100 μ L de amortiguador de lisis.
8. Cubrir e incubar toda la noche a temperatura ambiente o 4 h a 37°C.
9. Eliminar el contenido de cada pozo sobre una solución desinfectante y lavar 4 veces con agua.
10. Adicionar 200 μ L de la siguiente mezcla de anticuerpos marcados con peroxidasa: 1G3, 1G10 y 5E1 a la dilución indicada para cada lote en amortiguador de dilución.
11. Cubrir e incubar 90 minutos a 37°C.
12. Lavar 4 veces con agua desionizada.
13. Preparar la solución del sustrato 1.5 mg/mL de o-fenilendiamina en amortiguador de citrofosfatos más 0.02% de H₂O₂ y adicionar 200 μ L por pozo.
14. Sin cubrir, incubar 20 min a temperatura ambiente y en la obscuridad.
15. Adicionar 50 μ L de la solución de paro.
16. Leer la densidad óptica con un filtro de 492 nm teniendo como referencia un filtro de 620 nm.
17. Calcular la línea de corte con el promedio de los controles negativos más dos veces el valor de la desviación estándar de tales valores.

Como método de referencia se utilizó el ensayo comercial Abbot HIVAg-1 monoclonal p24 Ag assay, siguiendo el protocolo del fabricante.

Determinación de la dosis infectiva media (DI₅₀) en PBMC⁴⁵

(Se realiza al menos por triplicado).

1. Colocar 45000 PBMC en 100 μ L de RS-IL2 por cada pozo de placa de 96 pozos con fondo en "U".
2. Tomar 2 alícuotas del material a titular (sobrenadante). Inactivar una alícuota a 56°C por 40 minutos (control de virus inactivado).
3. Diluir tales alícuotas en factor de 2, 3 ó 10 según se requiera y tomar 100 μ L de cada dilución, para ser agregados a la placa de cultivo, sobre los 100 μ L de células añadidos anteriormente.
4. Incubar 24 horas a 37°C y 5% CO₂.
5. Centrifugar la placa a 1200 r.p.m. por 10 minutos.
6. Retirar el sobrenadante y agregar 200 μ L de PBS.
7. Repetir el paso 6.
8. Retirar el sobrenadante y adicionar 250 μ L RS-IL2.
9. Al día 7 recolectar el sobrenadante y determinar Ag p24 a todas las diluciones.
10. Por el método de Reed y Muench se calcula la DI₅₀, completando la siguiente tabla:

Dilución	log dilución	Ensayos (+/-)				% respuesta positiva

12. Con esos datos resolver la siguiente ecuación:

$$\% \text{ distancia} = \frac{(\% \text{ respuesta positiva superior a } 50\%) - 50\%}{(\% \text{ respuesta positiva superior a } 50\%) - (\% \text{ respuesta positiva inferior a } 50\%)}$$

13. Finalmente tomando en cuenta los logaritmos de dilución:

$$\log ID_{50} = (\log \text{ dilución superior a } 50\%) + (\% \text{ distancia} * \log \text{ factor dilución})$$

8. BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Kassler, W., *An Introduction to HIV*, Benjamin/Cummings Pub. Co., 1993, EUA
- ² Levy, J., Pathogenesis of Human Immunodeficiency Virus infection. *Microbiology Review* 57 (1993) :183-289.
- ³ Informe sobre la epidemia mundial del VIH/SIDA, ONUSIDA-OMS (versión en español) <http://www.unaids.org/>
- ⁴ ONUSIDA, OMS, La epidemia de SIDA: situación en diciembre de 1998.
- ⁵ Valdespino-Gómez, J., et al., Epidemiología del SIDA/VIH en México; de 1983 a marzo de 1995, *Salud Pública Mex* 37 (1995) : 556-571.
- ⁶ Joint United Nations Programme on HIV/AIDS, World Health Organization, Report on the global HIV/AIDS epidemic: June 1998. pp. 75.
- ⁷ Actualización epidemiológica de las ETS/VIH/SIDA, *El SIDA en México: Panorama en 1997. SIDA-ETS (1997) vol. 3, núm. 4, México*
- ⁸ The International Committee on Taxonomy of Viruses <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTV>
- ⁹ Gelderblom, H., Fine Structure of HIV and SIV, en *HIV Molecular Immunology Database 1997*, editores Korber, B., et al., National Institute of Allergy and Infectious Diseases (1997), EUA.
- ¹⁰ Leis, J., et al., Standardized and simplified nomenclature for proteins common to all retroviruses, *J. Virol.* 62 (1988): 1808-1809.
- ¹¹ Cullen, B., HIV as a prototype complex retrovirus, *J. Virol.* 65 (1991): 1053-1056.
- ¹² Pavlakis, G., et al., Genome Organization and Regulation of HIV-1 Expression, en *Genetic Structure and Regulation of HIV. Vol. 1*, editado por Haseltine, W., Wong-Steel, F., (1991), Raven Press, EUA.
- ¹³ Trono, D., HIV accessory proteins: Leading roles for the supporting cast, *Cell* 82 (1995): 189-192.
- ¹⁴ Emerman, M., Malim, M., HIV Regulatory/Accessory Genes: Keys to Unraveling Viral and Host Cell Biology, *Science* 280 (1998): 1880-1884.
- ¹⁵ Levy, J., *HIV and Pathogenesis of AIDS*, 2ª. ed., American Society of Microbiology, 1998, EUA.
- ¹⁶ Garnier, L., et al., Recent advances and remaining problems in HIV assembly, *AIDS* 12 suppl A (1998): S5-S16.
- ¹⁷ Pautrat G., et al., Human immunodeficiency virus type 1 infection of U937 cells promotes cell differentiation and a new pathway of viral assembly, *Virology.* 179 (1990): 749-758.

-
- ¹⁸ Gendelman, H., et al., Efficient isolation and propagation of human immunodeficiency virus on recombinant colony-stimulating factor 1-treated monocytes, *J. Exp. Med.* 167 (1988): 1428-1441.
- ¹⁹ Gupta, P., et al., Cell-to-cell transmission of human immunodeficiency virus type 1 in the presence of azidothymidine and neutralizing antibody, *J. Virol.* 63 (1989): 2361-2365
- ²⁰ Fenyö, E., et al., Distinct replicative and cytopathic characteristics of human immunodeficiency virus isolates, *J. Virol.* 62 (1988): 4414-4419.
- ²¹ Sato, H., et al., Cell-to-cell spread of HIV-1 occurs within minutes and may not involve the participation of virus particles, *Virol.* 186 (1992): 712-724.
- ²² Perotti, M., et al., Directional budding of human immunodeficiency virus from monocytes, *J. Virol.* 70 (1996): 5961-5921.
- ²³ Deng, H., et al., Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1, *Nature* 381 (1996): 661-666.
- ²⁴ Oberlin, E., et al., The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1, *Nature* 382(1996): 833-835.
- ²⁵ Hoffman, T., Doms, R., Chemokines and coreceptors in HIV/SIV-host interactions, *AIDS* 12 suppl A (1998) : S17-S26.
- ²⁶ Connor, R., et al., Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1-infected individuals, *J. Exp. Med.*,185 (1997): 621-628.
- ²⁷ Zhang, L., et al., Chemokine coreceptor usage by diverse primary isolates of human immunodeficiency virus type 1, *J. Virol.* 72 (1998): 9307-9312.
- ²⁸ Schuitemaker, H., Macrophage-tropic HIV-1 variants: initiators of infection and AIDS pathogenesis?, *J. Leukocyte Biol.* 56 (1994): 218-224.
- ²⁹ Yi, Y., et al., CXCR-4 is expressed by primary macrophages and supports CCR5-independent infection by dual-tropic but not T-tropic isolates of Human Immunodeficiency Virus type 1, *J. Virol.* 72 (1998): 772-777.
- ³⁰ Dittmar, M., et al., HIV-1 tropism and co-receptor use, *Nature* 385 (1997): 495-496.
- ³¹ Platt, E., et al., Effects of CCR5 and CD4 cell surface concentrations by macrophage-tropic isolates of human immunodeficiency virus type 1, *J. Virol.* 72 (1998): 2855-2864.
- ³² Kozak, S., et al., CD4, CXCR4 and CCR5 dependencies for infections by primary patient and laboratory-adapted isolates of human immunodeficiency virus type 1, *J. Virol.* 71 (1997): 873-882.
- ³³ Pantaleo, G., Fauci, A., New concepts in the immunopathogenesis of HIV infection, *Annu. Rev. Immunol.* 13 (1995): 487-512.
- ³⁴ Weiss, R., How does HIV cause AIDS?, *Science* 260 (1993): 1273-1276.
- ³⁵ Kiessling, A., et al., Human immunodeficiency virus in semen arises from a genetically distinct virus reservoir, *AIDS Res Hum Retroviruses* 14 suppl 1(1998): S33-41.

-
- ³⁶ Koyanagi, Y., et al., Dual infection of the Central Nervous System by AIDS viruses with distinct cellular tropisms, *Science* 236 (1987): 819-822.
- ³⁷ Ref.15, tabla 9.3
- ³⁸ Herbein, G., et al., Distinct mechanisms trigger apoptosis in human immunodeficiency virus type 1-infected and in uninfected bystander T lymphocytes, *J. Virol.* 72 (1998): 660-670.
- ³⁹ Steinman, R., Germain, R., Antigen presentation and related immunological aspects of HIV-1 vaccines, *AIDS* 12 suppl A (1998): S97-S112.
- ⁴⁰ Nowak, M, McMichael, A., How HIV defeats the immune system, *Sci. Am.* 273 (1995): 58-65.
- ⁴¹ Montefiori, D., et al., Neutralizing and infection-enhancing antibody responses to human immunodeficiency virus type 1 in long-term nonprogressors, *J. Infect. Dis.* 173 (1996): 60-67.
- ⁴² Schüpbach, J., et al., Heat-mediated immune complex dissociation and enzyme-linked immunosorbent assay signal amplification render p24 antigen detection in plasma as sensitive as HIV-1 RNA detection by polymerase chain reaction, *AIDS* 10(1996):1085-1090
- ⁴³ Hollinger, F.B., et al., Standardization of sensitive human immunodeficiency virus coculture procedures and establishment of a multicenter quality assurance program for the AIDS clinical trials group, *J. Clin. Microbiol.* 30 (1992): 1787-1794.
- ⁴⁴ Wu, S.C., et al., A cytopathic infectivity assay of human immunodeficiency virus type 1 in human primary macrophages, *J. Virol. Methods* 59 (1996): 45-55.
- ⁴⁵ Division of AIDS, National Institute of Allergy and Infectious Diseases. 1997. DAIDS Virology Manual for HIV Laboratories. Publication NIH-97-3828. U.S. Department of Health and Human services, Washington, D.C.
- ⁴⁶ Cavert, W., In vivo detection and quantitation of HIV in blood and tissues, *AIDS* 12 suppl A (1998): S27-S34.
- ⁴⁷ Dewar, R., et al., Isolation of HIV-1 plasma of infected individuals: an analysis of experimental conditions affecting successful virus propagation, *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 5 (1992): 822-828.
- ⁴⁸ Paul, M., et al., Effective use of frozen donor peripheral blood mononuclear cells for human immunodeficiency virus type 1 isolation from vertically infected pediatric patients, *J. Clin. Microbiol.* 32 (1994): 1379-1382.
- ⁴⁹ Simmonds, P., et al., Discontinuous sequence change of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 env sequences in plasma viral and lymphocyte-associated proviral populations in vivo: implications for models of HIV pathogenesis, *J. Virol.* 65 (1991): 6266-6276.
- ⁵⁰ Sabino, E., et al., Comparison of in vivo plasma and peripheral blood mononuclear cell HIV-1 quasispecies to short-term tissue culture isolates: an analysis of tat and C2-V3 env regions, *AIDS* 8 (1994): 901-909.

-
- ⁵¹ Jakoby, W., Pastan, I., *Cell Culture, Methods in Enzymology* 58 (1979).
- ⁵² Stent, G., et al., Macrophage tropism: fact or fiction?, *J. Leukocyte Biol.* 62 (1997): 4-11.
- ⁵³ Chang, J., et al., The magnitude of HIV replication in monocytes and macrophages is influenced by environmental conditions, viral strain, and host cells, *J. Leukocyte Biol.* 56 (1994): 230-235.
- ⁵⁴ Chang, J., et al., Twin studies demonstrate a host cell genetic effect on productive human immunodeficiency virus infection of human monocytes and macrophages in vitro, *J. Virol.* 70 (1996): 7792-7803.
- ⁵⁵ Kinter, A., et al., HIV replication in IL-2-stimulated peripheral blood mononuclear cells is driven in an autocrine/paracrine manner by endogenous cytokines, *J. Immunol.* 154 (1995): 2448-2459.
- ⁵⁶ Gartner, S., et al., The role of mononuclear phagocytes in HTLV-III/LAV infection, *Science* 233 (1986): 215-219.
- ⁵⁷ Collin, M., et al., HIV infection of macrophages, capítulo 4 de Karn, J., *HIV, a practical approach*, Vol. 1, Oxford Univ. Press (1995), EUA.
- ⁵⁸ Valentin, A., et al., HIV-1 infection of normal human macrophage culture: implication for a silent infection, *Virology* 177 (1990): 790-794.
- ⁵⁹ Bennett, S., Breit, S., Variables in the isolation and culture of human monocytes that are of particular relevance to studies of HIV, *J. Leukocyte Biol.* 56 (1994): 236-240.
- ⁶⁰ Lewin, S., et al., Constitutive expression of p50 homodimer in freshly isolated human monocytes decreases with in vitro and in vivo differentiation: a possible mechanism influencing human immunodeficiency virus replication in monocytes and mature macrophages, *J. Virol.* 71 (1997): 2114-2119.
- ⁶¹ Naif, H., et al., CCR5 expression correlates with susceptibility of maturing monocytes to human immunodeficiency virus type 1 infection, *J. Virol.* 72 (1998): 830-836.
- ⁶² Willey, R., et al., Differential glycosylation, virion incorporation, and sensitivity to neutralizing antibodies of Human Immunodeficiency Virus type-1 envelope produced from infected primary T-Lymphocyte and macrophage cultures, *J. Virol.* 70 (1996): 6431-6436.
- ⁶³ Rudensey, L., et al., Changes in extracellular envelope glycoprotein of variants that evolve during the course of simian immunodeficiency virus SIMVne infection affect neutralizing antibody recognition, syntitium formation and macrophage tropism but not replication, cytopathicity, or CCR-5 coreceptor recognition, *J. Virol.*, 72 (1998): 209-217.
- ⁶⁴ Nishanian, P., et al., A simple method for improved assay demonstrates that HIV p24 antigen is present as immune complexes in most sera from HIV-infected individuals, *J. Infect. Dis.* 162 (1990): 21-28.
- ⁶⁵ Rojas-Espinoza, O., *Bioquímica de la fagocitosis: una breve revisión*, *Bioquímica* 22 (1997): 612-637.
- ⁶⁶ Sasson, B., et al., Specific binding of lymphocyte T to macrophages, *J. Immunol.* 120 (1978): 1902-1906.

⁶⁷ Sato, T., et al., Interactions of allogeneic human mononuclear cells in the two-way mixed leucocyte culture (MLC): influence of cell numbers, subpopulations and cyclosporin, *Clin. Exp. Immunol.* 115 (1999): 301-308

⁶⁸ Tortora, G., et al., *Microbiology: An Introduction*, 4^a. ed., Benjamin/Cummings Pub., EUA, (1992).

⁶⁹Orenstein, J. et al., Cytoplasmic assembly and accumulation of Human Immunodeficiency Virus types 1 and 2 in recombinant human colony-stimulating factor-1-treated human monocytes: an ultrastructural study, *J. Virol.* 62 (1988): 2578-2586.

⁷⁰ Ref. 15, cap. 10.

⁷¹ Dugast, C., et al., Generation of multinucleated giant cells by culture of monocyte-derived macrophages with IL4, *J. Leukocyte Biol.* 61 (1997): 517-521.

⁷² Li, C., et al., Esterases in human leukocytes, *J. Histo. Chem.* 21 (1973): 1-12.

⁷³ Ometto, L., et al., Viral phenotype and host-cell susceptibility to HIV-1 infection as risk factors for mother-to-child HIV-1 transmission, *AIDS* 9 (1995): 427-434.

⁷⁴ Adalid, L., Tesis de licenciatura, Desarrollo de un ELISA para detectar antígeno p24 del VIH, FES-Zaragoza, UNAM (1996), pp. 53.