

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



INTERACCIÓN DE VIH-1 CON NANOPARTÍCULAS DE PLATA NPP

Por

HUMBERTO HERMAN LARA VILLEGAS

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en Microbiología

Febrero, 2010

INTERACCIÓN DE VIH-1 CON NANOPARTÍCULAS DE PLATA NPP

Comité de tesis

DRA. CRISTINA RODRÍGUEZ PADILLA
Director de tesis

DR. REYES TAMÉZ GUERRA
Secretario

DR. JUAN MANUEL ALCOCER
Vocal

DRA. DIANA RESÉNDEZ PÉREZ
Vocal

DRA. LYDIA RIVERA MORALES
Vocal

INTERACCIÓN DE VIH-1 CON NANOPARTÍCULAS DE PLATA NPP

Comité académico de Doctorado

Subdirector de estudios de postgrado

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a la Dra. Cristina Rodríguez Padilla, Asesora de mi tesis. Sin su apoyo y guía la presente tesis nunca se hubiera llevado a cabo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios.

Al Laboratorio de Inmunología y Virología por permitirme el uso de su equipo y su invaluable ayuda en el desarrollo de este estudio.

A todas las personas que contribuyeron de una forma u otra en la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

A todo aquello que me inspiró para trabajar más, investigar más, estudiar más, y así intentar ser un mejor ser humano en cada uno de mis pasos y a las personas que siempre me han dado su apoyo incondicional y gracias a ellas se ha podido realizar esta tesis .

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
1. RESUMEN Y ABSTRACT.....	x
2. INTRODUCCIÓN.....	1
3. HIPÓTESIS.....	4
4 OBJETIVOS.....	5
5. ANTECEDENTES.....	6
5.1 Historia de la infección por el VIH.....	6
5.2 Epidemiología de la infección por el VIH.....	9
5.2.1 Mecanismos de transmisión.....	9
5.2.2 Patrones epidemiológicos.....	11
5.2.3 Situación actual de la infección por el VIH.....	12
5.3 Historia natural de la infección por el VIH-1.....	13
5.3.1 Evolución de la infección.....	13
5.3.2 Pronóstico.....	16
5.4 El virus de la inmunodeficiencia humana.....	16
5.4.1 Estructura del virus.....	16
5.4.2 Ciclo replicativo del virus.....	18
5.5 Terapia antiviral.....	21
5.5.1	
Generalidades.....	21
5.5.2 Nucleósidos inhibidores de la transcriptasa inversa.....	26
5.5.3 Inhibidores de la entrada y la fusión del VIH.....	31
5.5.3.1 Enfuvirtida.....	33
5.5.3.2 Maraviroc.....	34
5.6 La nanobiotecnología.....	35
5.6.1 La nanobiotecnología.....	38
5.6.1.2 La nanomedicina.....	39

6. MÉTODOS.	41
6.1 Origen de los reactivos.....	41
6.2 Material biológico.....	41
6.3 Caracterización de las NPP	42
6.4 Ensayos de citotoxicidad.....	42
6.5 Ensayos de inhibición de la infectividad del VIH-1.....	43
6.6 Ensayos de fusión basado en células.....	43
6.7 Ensayo de Absorción viral	43
6.8 Ensayo de inhibición de la fusión basado en células.....	44
6.9 Tiempo mínimo para a inhibición de fusión basado en células.....	44
6.10 Las NPP y su inhibición de la interacción gp120-CD4 (ELISA).....	45
6.11 Experimentos por adición en tiempos.....	45
6.12 Análisis estadísticos.....	45
7. RESULTADOS.	46
7.1 Citotoxicidad.....	46
7.2 Actividad de inhibición de la infección.....	46
7.3 La actividad de antiviral de las NPP y los iones de plata.....	48
7.4 Inhibición de la absorción viral.....	48
7.5 Inhibición de la fusión mediada por las membranas ENV/CD4.....	49
7.6 Tiempo mínimo para inhibición de fusión basado en células.....	50
7.7 Las NPP interfieren en la integración gp120-CD4.....	52
7.8 Inhibición según las etapas del ciclo replicativo viral por las NPP.....	53
7.9 Actividad virucida de las NPP en VIH libre y asociado a células.....	59

7.10 Inhibición de la Infección de las NPP n virus asociado a células.....	62
8. DISCUSION.....	65
9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	70
10. LITERATURA CITADA.....	71

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I.	Adultos y niños viviendo con SIDA en el 2008	11
II.	Clasificación de la infección de VIH.	15
III.	Inhibición de la infección usando diferentes cepas del VIH-1 que se trataron con las NPP.....	4
IV.	Actividad de antiviral de las NPP y los iones de plata.	48

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Manifestaciones clínicas de Sarcoma de Kaposi.....	7
2. Ciclo biológico del VIH y los lugares de acción de los fármacos antirretrovirales	25
3. Inhibición de la interacción gp120-CD4+ por las NPP basado en células	50
4. Tiempo mínimo para la inhibición de la fusión en ensayo basado en células...	51
5. Inhibición de la interacción gp120-CD4.....	53
6. Experimentos por adición en tiempos con NPP contra inhibidor de fusión.....	55
7. Experimentos por adición en tiempos con NPP contra inhibidor de RT.....	56
8. Experimentos por adición en tiempos con NPP contra inhibidor de PI.....	57
9. Experimentos por adición en tiempos con NPP contra inhibidor de integrasa....	58
10. Actividad virucida de las NPP contra cepas de VIH-1 M –Trópicos.....	59
11. Actividad virucida de las NPP contra cepas de VIH-1 T- Trópicos.....	60
12. Actividad virucida de las NPP contra cepas de VIH-1 ambos virus.....	61
13. Inhibición de la infección del VIH-1 asociado a células H9 por las NPP.....	63
14. Inhibición de la infección del VIH-1 asociado a células PMN por las NPP	64

NOMENCLATURA

ADN	Ácido desoxiribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosina Trifosfato
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirido
SIV	Virus de la Inmunodeficiencia de los Simios
CDC	Centro de Control de Enfermedades
OMS	Organización Mundial de la Salud
LAV	Linfadenopatía
ZDV	Zidovudina
NRTI	Nucleósidos Inhibidores de la Transcriptasa Inversa
NNRTI	Inhibidores No Nucleósidos de la Transcriptasa Inversa
FDA	Administración de Alimentos y Fármacos de los EEUU
NPP	Nanopartículas de plata
AgSD	Silfadiazina de Plata
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
TAE	Experimento por adición de tiempos

μg Microgramo

μL Microlitro

1. RESUMEN

La interacción de nanopartículas con biomoléculas y microorganismos es un campo de investigación en expansión. La emergencia de virus resistentes a antirretrovirales indica la necesidad de nuevos biocidas de amplio espectro. Dentro del área de la Nanobiotecnología ha sido poco explorada la interacción de nanopartículas metálicas con los virus del VIH-1. Para conocer el mecanismo de acción antiviral de las nanopartículas de plata contra el VIH-1 se utilizó un panel de diferentes ensayos *in vitro* que incluyen: a) Citotoxicidad CC_{50} , b) Inhibición de la infección del VIH-1 (IC_{50}) incluyendo virus M-Trópicos, T-Trópicos, virus resistentes y no resistentes a antirretrovirales, c) Inhibición de infectividad de los iones de plata, d) Inhibición de la absorción viral, d) Ensayo de células fusogénicas, e) Ensayo de la interacción gp120/CD4 por ELISA, f) Ensayo del ciclo replicativo del VIH-1. Los resultados sugieren que las nanopartículas de plata actúan en una etapa temprana del ciclo replicativo del virus, como inhibidor de fusión o entrada viral al unirse a la gp120. Siendo su IC_{50} de 0.44mg/mL. Además, las nanopartículas de plata inhiben otras etapas después de la entrada del virus a la célula huésped, todo lo anterior nos indica que es un agente virucida de amplio espectro por inhibir un amplio panel de virus, por lo cual no fácilmente induce resistencia y pudiera utilizarse preventivamente contra una amplia variedad de cepas circulantes de VIH-1. La acción virucida es debida a las nanopartículas de plata y no a los iones de plata contenidos en el medio.

ABSTRACT

The interaction of nanoparticles with biomolecules and microorganisms is an expanding field of research. Within this field, an area that has been largely unexplored is the interaction of metal nanoparticles with viruses. The regular spatial arrangement of the attached nanoparticles, the center-to-center distance between nanoparticles, and the fact that the exposed sulfur-bearing residues of the glycoprotein knobs would be attractive sites for nanoparticle interaction suggest that silver nanoparticles interact with the HIV-1 virus via preferential binding to the gp120 glycoprotein knobs. Due to this interaction, silver nanoparticles inhibit the virus from binding to host cells, as demonstrated *in vitro*. To elucidate their mode of antiviral action against HIV-1 using a panel of different *in vitro* assays. Our data suggest that silver nanoparticles exert anti-HIV activity at an early stage of viral replication, most likely as an inhibitor of viral entry. Besides, silver nanoparticles inhibit post-entry stages of the HIV-1 cycle, which makes them a broad-spectrum agent not prone to inducing resistance that could be used preventively against a wide variety of circulating HIV-1 strains.

2. INTRODUCCIÓN

Se han estimado en más de 33 millones de personas que viven VIH en 2007 según la ONUSIDA, 2.7 millones menos que en 2001, aunque las nuevas infecciones por VIH han descendido en muchos países, la pandemia de VIH/SIDA es un serio problema de salud en todo el mundo (Joint United Nations Programme on HIV AIDS (UNAIDS), 2008). En México, según CONASIDA al 2009 se reportan 130,969 y en Nuevo León los casos acumulados son de 3650. La emergencia de cepas resistentes a los antirretrovirales es uno de los retos principales (Diazgranados *et al.*, 2009; Kiertiburanakul and Sungkanuparph, 2009; Mascolini *et al.*, 2008; Tremblay, 2008; Uy *et al.*, 2009; Yerly *et al.*, 2009). En diferentes países, estudios han comprobado que entre el 5% y el 78% de los pacientes tratados que recibieron terapia antirretroviral están infectados con el virus de VIH resistente a por lo menos un medicamento antirretroviral (Diazgranados *et al.*, 2009; Vercauteren *et al.*, 2008) Por lo tanto es urgente el desarrollo de nuevos agentes contra el VIH-1 que puedan funcionar en otras etapas virales y que puedan ser utilizada para prevenir la diseminación del VIH/SIDA (Lin *et al.*, 2003).

Los inhibidores de fusión o de entrada son considerados como una buena opción en la terapia contra el VIH/SIDA, ya que bloqueando la entrada del virus a la célula huésped se suprime la infectividad viral, la replicación y la citotoxicidad inducida por interacción virus – célula (Borkow and Lapidot, 2005). Desde el 2005, la FDA ha

aprobado únicamente dos inhibidores de fusión, el Enfurtivida y Maravirovic (Izumi et al., 2009; Ji et al., 2009; Makinson and Reynes, 2009; Sidhu et al., 2009)

En esta tesis se estudian las propiedades antivirales de las nanopartículas de plata contra el VIH-1 y encontramos en estudios *in vitro* que son activos contra una cepa adaptada al laboratorio de VIH-1, esta inhibición viral se observó a una dosis no tóxica (Elechiguerra *et al*, 2005; Lara *et al.*, 2010)

La nanotecnología ofrece oportunidades para explorar propiedades biológicas de compuestos antimicrobianos manipulando su tamaño (Arora *et al.*, 2008; Centers for Disease Control, 2004; Kumari A *et al.*, 2008; Dunn and Edwards-Jones, 2004) . La plata ha sido reconocida por sus propiedades microbiológicas, aunque con el advenimiento de novedosos antibióticos sus aplicaciones médicas fueron utilizándose cada vez menos. De cualquier forma, la profilaxis de Credé para la oftalmía neonatorum gonocócica en los recién nacidos permaneció como el estándar en el cuidado perinatal en muchos países hasta el siglo XX (Chen and Schluesener, 2008; Dunn, 2000; Gadeberg *et al.*, 1991; Gronlund *et al.*, 1987).

Es conocido que el modo de acción de la plata es dependiente de los iones de Ag^+ los cuales inhiben el crecimiento de las bacterias debido a la supresión de las enzimas respiratorias, por los componentes del transporte de electrones y debido a la interferencia de las funciones del ADN (Starodub and Trevors, 1989).

En el área médica se ha explorado el potencial de las Nanopartículas para la detección temprana, diagnóstico y tratamiento de enfermedades, aunque sus propiedades biológicas han permanecido sin estudiar (Chen and Schluesener, 2008).

Las Nanopartículas de plata han sido estudiadas y probadas como agentes antimicrobianos contra bacterias Gram positivas y Gram negativas y como agentes antivirales contra la hepatitis B (Kumari A *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2008). El desarrollo de productos con Nanopartículas de plata es un Mercado en expansión. Se utilizan actualmente en ropa, contenedores de comida, en bandas adhesivas para cubrir heridas, cremas, cubrimiento para implantes, y otros implementos. Algunas aplicaciones de plata han recibido la aprobación de la Administración de medicamentos y comida de los Estados Unidos (Aguilella and Alcaraz, 2009; Chen and Schluesener, 2008)

Para entender el modo de acción por el cual las Nanopartículas de plata inactivan el VIH-1 y su uso potencial como antiviral, usamos un panel de ensayos que incluyeron: Citotoxicidad de las NPP *in vitro*, Índice Terapéutico (IC₅₀/ CC₅₀) de las NPP contra el VIH-1, Independencia del uso por las NPP de los correceptores (CXCR4 y CCR5) de las células blanco en la inhibición del VIH-1, Inhibición de virus resistentes a antirretrovirales por las NPP, Experimento de adición de NPP por etapas de tiempo, Interacción entre células fusogénicas y NPP. Los resultados de estos experimentos prueban que las nanopartículas de plata tienen su actividad de inhibición de infectividad del VIH-1 en la etapa inicial de la replicación viral, como agente antiviral inhibidor de entrada.

3. HIPÓTESIS

Las nanopartículas de plata interactúan con las glicoproteínas del gp120 del VIH-1 y como resultado tendremos la inhibición de la infección al momento de la fusión virus-célula huésped.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar si las nanopartículas de NPP interactúan con el VIH-1 inhibiendo la infección viral en la etapa de fusión o entrada del virus a la célula.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la citotoxicidad de las Nanopartículas NPP *in Vitro*
- Determinar el porcentaje de inhibición de infección del VIH-1 *in Vitro*
- Determinar la actividad antiviral de los iones de plata con VIH-1 *in Vitro*
- Determinar la capacidad de las NPP de inhibir la adsorción viral
- Determinar el porcentaje de inhibición de las células fusogénicas tratadas con las NPP
- Determinar el tiempo mínimo de las NPP para inhibir la fusión celular
- Determinar la inhibición de las NPP contra la interacción gp120-CD4 (ELISA)
- Determinar en que etapa del ciclo replicativo del VIH-1 es donde las NPP actúan
- Determinar la capacidad virucida de las NPP
- Determinar la inhibición de la infección viral de las NPP contra VIH-1 asociado a células crónicamente infectadas

5. ANTECEDENTES

5.1. HISTORIA DE LA INFECCION POR EL VIH

Desde que en Junio de 1981 se describieron los primeros casos de neumonía por *Pneumocystis jirovecii* (antes conocido como *Pneumocystis carinii*) y posteriormente de sarcoma de Kaposi entre varones jóvenes homosexuales, hasta la actualidad, la sociedad ha recibido un tremendo impacto por una enfermedad que enseguida fue denominada como Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida, SIDA (Hillis, 2000)

Este impacto se explica no sólo en términos científicos, sino también sociales y económicos por su elevado número de muertes, y por afectar a una población joven, entre 20 y 49 años los cuales son el motor principal de una economía (Gouws *et al.*, 2008)

Además la aparición y extensión fulminante de esta infección, ha supuesto por un lado un enorme problema de Salud Pública, mientras que, por otra parte había que luchar contra el sensacionalismo y la marginación que van ligadas a algunas de las formas de transmisión de esta enfermedad.

Estas características especiales han hecho que se desarrolle un enorme esfuerzo científico para conocer, entender e intentar controlar esta infección.

Tras los primeros casos, y aplicando el método epidemiológico, se concluyó que el causante del síndrome era un agente infeccioso, de origen vírico pues se describieron casos de la enfermedad en personas que habían recibido sangre o hemoderivados, en heroinómanos que compartían jeringuillas para inyectarse y entre las compañeras

heterosexuales de estos sin otros factores de riesgo. Esto permitió que se emitieran normas preventivas antes de aislar el agente infeccioso.

En septiembre de 1982 los Centros para el Control de Enfermedades (C.D.C.) de Atlanta publicaron la primera definición de caso de SIDA. Esta hacía referencia a las manifestaciones clínicas observadas (neumonía por pneumocystis, sarcoma de Kaposi, linfoma cerebral primario y otras infecciones oportunistas) en personas con disminución de la inmunidad celular (Figura 1), sin otra causa conocida de esta.(Hillis, 2000; Levy, 2009)



Figura 1. Manifestaciones clínicas de Sarcoma de Kaposi. Las lesiones púrpura del Sarcoma de Kaposi es el resultado de un cáncer raramente diagnosticado en pacientes jóvenes fue muy común al inicio de la enfermedad relacionada con una inmunodeficiencia adquirida, el SIDA (Historia en palabras de la NIH).

En 1983, en el Instituto Pasteur el equipo de Luc Montaner detecta la actividad de la enzima transcriptasa inversa producida en un medio de cultivo donde se cultivó una biopsia de adenopatía de un varón homosexual, lo que implicaba la presencia de *un* retrovirus al que llamó virus asociado a la linfadenopatía (LAV). Ese mismo año Gallo y colaboradores trabajaban intentando cultivar el patógeno causante del SIDA y

consiguieron líneas celulares de las que podía aislarse el agente denominado Human T-Leukemia Virus type III (HTLV—III), por su similitud con los virus HTLV 1 y II. Posteriormente se determinó que HTLV-III y LAV eran el mismo virus y una comisión internacional propuso el nombre de Virus de la Inmunodeficiencia Humana, VIH en 1986. (Gallo, 2006)

En 1986 se descubrió en África el VIH tipo 2, un virus muy similar al virus de la inmunodeficiencia de los simios (SIV).

Después de estos hallazgos y a la luz de una experiencia clínica más amplia, se intentó sistematizar la evolución de la infección, pues enseguida se diferenciaron varios estadios clínicos de la enfermedad: el síndrome de linfadenopatía crónica, el complejo relacionado con el SIDA y el SIDA propiamente dicho.

La clasificación de Walter Reed distingue varios grados evolutivos atendiendo a manifestaciones clínicas, inmunológicas y datos de laboratorio. Pretende tener gran valor pronóstico pero no se puede aplicar a niños ni a usuarios de drogas vía parenteral.

En Mayo de 1986 los C.D.C. presentaron una clasificación de la enfermedad según los grados de progresión de esta en 4 grupos, desde la primo infección hasta el grupo de enfermedades asociadas a la inmunodeficiencia. En 1990 la organización Mundial de la Salud (O.M.S.) propuso unos nuevos estadios basándose en la situación clínica ,4 grupos, y en parámetros inmunológicos. En esta última está inspirada la clasificación de los C.D.C. de 1993, que con algunas particularidades es la más usada en nuestro ámbito desde principios de 1994 (Trauger *et al.*, 1993).

En los niños, en los que se han observado casos desde 1982, se utiliza un sistema de clasificación distinta, pues la infección en la edad pediátrica presenta muchas peculiaridades (Andiman *et al.*, 2009; Guillen *et al.*, 2009) .

5.2. EPIDEMIOLOGÍA DE LA INFECCION POR EL VIH

5.2.1 MECANISMOS DE TRANSMISIÓN

La primera tarea que quedó resuelta fue el delimitar las formas de transmisión del virus. Esta además adquirió más relevancia si cabe con el paso de los años, cuando se han visto las dificultades para hallar una vacuna eficaz, y no se cuenta aún con terapia curativa. Así pues el arma más eficaz contra la enfermedad sigue siendo la prevención contra la exposición.

Está bien establecido que el VIH infecta y se replica en los linfocitos CD4, pero también infecta células de origen macrófagolinfocitario, por lo que el virus puede aislarse en cualquier fluido orgánico o tejido que contenga estas células. Así se ha visto en sangre y productos derivados de esta, en el semen y secreciones vaginales, en líquido cefalorraquídeo, en la leche materna, en saliva, lágrimas, etc. Sin embargo los estudios realizados entre personas que conviven con enfermos de SIDA indican que saliva, lágrimas y orina a pesar de contener el virus no transmiten la infección. Sólo se han demostrado tres vías de contagio hasta el momento: el contacto sexual, la vía parenteral por medio de la sangre y productos derivados, y de la madre infectada al hijo recién nacido (Hillis, 2000; Levy, 1993a) . Por tanto, las personas infectadas suelen presentar determinados factores o conductas de riesgo:

- a) El riesgo de contagio depende del estado de la infección en el transmisor, del número de parejas, del coito anal receptivo y de la coexistencia de otras enfermedades de transmisión sexual.
- b) Usuarios de drogas por vía parenteral, que es el mecanismo más frecuente en nuestro país.
- c) Transfusión de sangre y productos derivados de la misma, que produce la enfermedad en el 90 a 100% de las ocasiones. Desde que en 1985 se desarrolló un test serológico muy sensible y específico para identificar muestras contaminadas ha disminuido drásticamente esta forma de contagio, aunque hay dos circunstancias que debemos reseñar como son la existencia de falsos negativos y el haber un periodo ventana; entre la infección y la seroconversión en que se hace indetectable por este método la contaminación de la muestra.
- d) Transmisión heterosexual, que es la más frecuente en países africanos, y es la vía que más está aumentando en países desarrollados. Es más probable la transmisión de hombre a mujer que al contrario.
- e) El contagio perinatal. El riesgo de transmisión oscila del 20 al 25% y es mayor en países del tercer mundo. El contagio hematógeno o por secreciones genitales en el momento del parto es el mecanismo más probable aunque está demostrada la transmisión antes y después del parto.
- f) Contagio profesional tras exposición parenteral o en mucosas a sangre o fluidos de pacientes infectadas. La posibilidad de infección tras exposición parenteral es inferior al 1%.

5.2.2. PATRONES EPIDEMIOLÓGICOS

Las diferencias en la diseminación de la infección VIH han dado lugar a la descripción de tres patrones epidemiológicos. El tipo 1 es típico de países industrializados, en los que se debió propagar la enfermedad al principio del siglo XX (Worobey et al., 2008). Hay un gran número de casos declarados, aunque la prevalencia según datos serológicos no llega al 1%. Predominan los varones con una relación 10/1, y como conducta de riesgo más frecuente aparece la homo o bisexualidad. La transmisión vertical es poco importante respecto al total de casos (Joint United Nations Programme on HIV AIDS (UNAIDS), 2008b).

En el continente africano se presentó una diseminación más precoz de la infección. Se ha encontrado un primer suero positivo para VIH extraído en Kinshasa en 1959. Aquí la forma de transmisión más importante son las relaciones heterosexuales, lo que tiene como consecuencia una mayor prevalencia de la enfermedad (4—15%), una proporción de afectación similar entre ambos sexos con el consiguiente aumento de la transmisión vertical al haber más mujeres infectadas (Tabla I).

El patrón tipo III afecta a países en vías de desarrollo, donde la enfermedad ha sido introducida más recientemente, por personas que han entrado en contacto con la infección en países desarrollados, teniendo una prevalencia escasa todavía, y una proporción de los factores de riesgo similar al tipo 1.

El VIH tipo 2 se propaga con conductas de riesgo similares al tipo 1, y el cuadro clínico es similar, aunque menos virulento (Walker *et al.*, 2003).

Tabla I. Adultos y niños viviendo con SIDA en el 2008 (©UNAIDS/WHO *et al.*, 2008)

Continente	Viviendo con SIDA
America Latina	2000000
Sub-Sahara Africano	22400000
Caribe	240000
Mundo	33400000
Africa del norte y Medio Oriente	310000
Asia central	1500000
Este de Asia	850000
America del norte	1400000
Europa Central y Oriental	850000
Sur de Asia y Central	3800000
Oceanía	59000

5.2.3. SITUACION ACTUAL DE LA INFECCION POR EL VIH

Cabe pues afirmar que la infección por el VIH es una pandemia, con algunos lugares endémicos, como son los países centroafricanos. Las cifras apoyan esta afirmación. Según la OMS a finales de Junio de 1995 había 1, 169,811 casos de SIDA declarados a esta organización. Sin embargo estas mismas fuentes estiman que las cifras reales deben superar los 4.5 millones de casos, pues en los países en vías de desarrollo hay una declaración que no representa la cantidad actualizada con toda seguridad. Con los datos disponibles sobre distribución y propagación de esta infección se supone que, al término del 2008, unos 33.4 millones de personas estaban infectados por el VIH en

todo el mundo (Joint United Nations Programme on HIV AIDS (UNAIDS), 2008b; Walker et al., 2003) .

En España por ejemplo, en la misma fecha se registraban 33.105 casos de SIDA. De ellos 667 casos (el 2%) son pediátricos. Casi el 66% de los casos se dan entre UDVP (usuarios de drogas por vía parenteral), el 15% entre varones homosexuales, el 9% entre contactos heterosexuales, en el 3% se ha producido el contagio por hemoderivados, el 2% son hijos de madres que han tenido exposición de riesgo, y en el 5% no se reconoce ninguna conducta de riesgo para la transmisión. Esta distribución de los factores de riesgo, que como se aprecia es claramente diferente del resto de países desarrollados, supone un hecho diferencial de los países del entorno mediterráneo, con implicaciones en la evolución y tratamiento de la infección.

5.3. HISTORIA NATURAL DE LA INFECCION POR EL VIH-1

5.3.1. EVOLUCION DE LA INFECCIÓN

Una vez se ha producido el contagio, este se sigue de una fase de inactividad clínica de tiempo variable. Sin embargo, recientemente se ha visto, con cultivos virales cuantitativos, que el VIH prolifera continuamente. Por tanto, no existe un verdadero período de latencia y podemos distinguir: 1) una fase aguda de semanas de evolución; 2) una fase crónica de años de duración, y 3) una fase final de crisis que clínicamente corresponde con el complejo relacionado con el SIDA y luego el SIDA.

La fase aguda puede transcurrir asintomática o cursar como un síndrome mononucleósido hasta un 30—10% de las ocasiones. Entre las semanas 2 y 6 del contagio aparece el antígeno p24 circulante. En esta fase hay una gran replicación viral

y una inmunodepresión transitoria lo que puede provocar la aparición de infecciones oportunistas como candidiasis o CMV (Alemayehu *et al.*, 2009; Gershon *et al.*, 2009; Gitai *et al.*, 2009; Kamimura and Oka, 2009; Silverberg *et al.*, 2009). En los primeros momentos hay una gran proporción de linfocitos CD4 infectados. En estos primeros momentos puede detectarse antígeno vírico circulante, que se corresponde con la proteína mayor del core vírico, p24. Después aparecen los primeros anticuerpos (1—3 meses) e inmunidad celular lo que se acompaña de un descenso de la replicación viral y del número de CD4 infectados. Los anticuerpos dirigidos contra las proteínas de la estructura vírica (anti—Env), se encuentran prácticamente en el 100% de las personas infectadas independientemente de la situación clínica. Los anticuerpos frente a las proteínas del core (anti-GAG), se detectan con menor frecuencia a medida que la infección avanza (Levy, 2009).

En la fase crónica los linfocitos CD4 circulantes están infectados en menor medida (1 por 10000), y sólo el 10% de los infectados presenta actividad replicativa. Sin embargo en los órganos linfoides la carga viral es entre 10 y 100 veces superior a la circulante. Los pacientes suelen estar asintomáticos, pueden tener o no adenopatías y plaquetopenia o mínimos trastornos neurológicos. Los portadores asintomáticos progresan a SIDA entre un 30 y un 70% en 8 años. Los factores predictivos de progresión pueden ser clínicos como el muguet, la leucoplasia vellosa oral, o cualquiera de los incluidos como síntomas del grupo E en la clasificación de los CDC de 1993, o de laboratorio, entre los que destacamos el número total de linfocitos CD4 y la ratio CD4/CD8 como marcadores celulares y la neopterin y la B2 microglobulina entre los marcadores serológicos de progresión (Tabla II).

En la fase final se producen una serie de acontecimientos clínicos como son las infecciones oportunistas, las neoplasias o el síndrome consuntivo, que se acompañan de un notable incremento en la actividad replicativa del virus y una caída drástica de los recuentos de linfocitos CD4. En esta fase puede volver a detectarse antígeno vírico circulante y la ausencia de este con el deterioro progresivo no indica sino la tremenda destrucción de linfocitos CD4 que son el substrato de la replicación viral. Estas fases de la enfermedad pueden correlacionarse con los estadios de la última clasificación de los CDC (Lightfoot and Milburn, 2009)

Tabla II. Clasificación de la infección de VIH.(Visnegarwala *et al.*, 2007)

Categoría CD4	A	B	C
> 500/mm ³	A1	B1	C1
200-499/mm ³	A2	B2	C2
< 200/mm ³	A3	B3	C3

El grupo A incluye la primoinfección, el paciente asintomático y la linfadenopatía persistente. El grupo E incluye: Angiomatosis bacilar, muguet, candidiasis vulvovaginal, displasia cervical, síntomas constitucionales, leucoplasia vellosa, herpes zóster recidivante o multimetamérico, trombocitopenia idiopática, listeriosis, fiebre o diarrea prolongada, enfermedad inflamatoria pélvica y neuropatía periférica.

Son enfermedades diagnósticas de SIDA: 1) candidiasis de esófago, tráquea o pulmón, 2) criptococosis extrapulmonar, 3) criptosporidiasis con diarrea de más de un mes de evolución, 4)Infección diseminada por citomegalovirus, 5) isosporidiasis con diarrea de más de un mes, 6) úlcera crónica por herpes simplex, 2) sarcoma de Kaposi, 8) linfoma

cerebral primario, 9) neumonía intersticial linfoide en <18 años, 10) toxoplasmosis cerebral, 11) neumonía por pneumocystis carinii, 12) infección diseminada por micobacterias atípicas, 13) leucoencefalopatía multifocal progresiva, 14) infecciones bacterianas múltiples o recurrentes, 15) coccidiomicosis diseminada, 16) demencia HIV, VI) histoplasmosis diseminada, 18) linfoma no Hodgkin de células E, 19) infección por micobacteria tuberculosa, 20) septicemia recurrente por Salmonella sp (no tíficas), 21) síndrome consuntivo, 22) carcinoma invasivo de cérvix (Winslow, 2009; Guillen *et al.*, 2009; Dvaranauskaite *et al.*, 2009; Cox, 2009)

Se hace diagnóstico de SIDA con número de CD4 <200/mm³ o con una enfermedad definitiva (Visnegarwala *et al.*, 2007)

5.3.2. PRONÓSTICO

Con las pruebas diagnósticas del SIDA, las series históricas, antes del tratamiento con zidovudina y de la profilaxis de infecciones oportunistas, mostraban una mediana de supervivencia de 12.5 meses, y aumentaba a más de 21 meses en un pequeño grupo tratado con zidovudina. En 1988, antes de comenzar a usar la ZDV la supervivencia de los pacientes diagnosticados de SIDA al primer año era del 60%.

En esa misma época un estudio de supervivencia hecho con 4800 pacientes diagnosticados de SIDA y en tratamiento con zidovudina ya mostraba un aumento de la supervivencia al 73% a las 44 semanas (De, 2007).

5.4. EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA

5.4.1 ESTRUCTURA DEL VIRUS

El virus de la inmunodeficiencia humana, VIH, es un retrovirus de la familia de los lentivirus. Hay dos tipos de VIH: el VIH-1 y el VIH-2 que tienen códigos genéticos diferentes, ambos producen una enfermedad semejante, aunque nos centraremos en la descripción del tipo 1. El VIH tipo 1 está construido como una partícula esférica de 80—110 nanómetros de diámetro, con una estructura en tres capas: la más interna contiene el mensaje genético codificado en una secuencia monocatenaria de ARN y las enzimas virales; la intermedia es una cápside proteica icosaédrica y la más externa o envoltura expresa glicoproteínas del virus y los antígenos de histocompatibilidad tipo 1 y II de la célula huésped. La estructura genética del virus ha sido ampliamente estudiada.

En ambos extremos del genoma viral se encuentran las secuencias LTR, secuencias repetitivas de nucleótidos, que contienen las señales que gobiernan la transcripción y terminación de esta. Los genes estructurales son 3: Gag, Pol y Env.

Gag codifica las proteínas del core. Su producto es una proteína miristilada de 55 Kilodaltons (1(d), p55, que a su vez es la precursora de otras tres, p17 o matriz, p24 o cápside y la P6 y P7 que forman la nucleocápside. Todas ellas son antígenos de grupos internos. El gen Pol codifica una proteína de 90 kDa, precursora de enzimas virales, p10, la proteasa, p15 una ARNasa, p50 con función transcriptasa inversa, y finalmente la integrasa p31.

Env se expresa como una proteína que posteriormente se glicosilará, la gp160, que es precursora de la gp120, glicoproteína de la envoltura superficial, y la gp41 que es una glicoproteína transmembrana. Estas dos últimas estructuras en el VIH tipo 2 son distintas, la gp125 y la gp36, y su precursora pesa 300 kDa (Dar *et al.*, 2009; Furukawa *et al.*, 2009; Henao-Mejia *et al.*, 2009; Saliou *et al.*, 2009) .

Además existen una serie de genes reguladores cuya función aún está sometida a revisión. Tat es un gen de expresión temprana que codifica una proteína de 86 aminoácidos,

p14, que se encuentra en el núcleo y nucléolo de la célula huésped. La proteína Tat actúa sobre una secuencia del ácido nucleico viral, denominada Tar (receptor de Tat), cuya función sería dificultar el uso de los ARR mensajeros. Tat vendría a suprimir esa función haciendo que el ARR iniciado por Tar dirija la síntesis proteica con extraordinaria eficacia.

Todos los *ARR* virales contienen la secuencia Tar en su extremo 5 terminal. El gen Rev codifica una proteína p19 que a su vez regula positivamente la expresión de proteínas virales y negativamente la expresión de genes reguladores. Además facilita el transporte de ARN mensajero al citoplasma (De, 2007; De, 2001; Stevens *et al.*, 2006) .

Nef parece tener un papel en la infectividad del virus y codifica la proteína p27.

El gen Vif produce una proteína, p23, también asociada a la infectividad. El producto del gen Vpr, p18, acelera el ciclo de replicación. Tev codifica una proteína, p26, que es un activador de Tat y Rev. Este gen tiene tres fragmentos en Tat, Env y Rev. El gen Vpu sólo está presente en el VIH tipo 1. Su producto, p15 aumenta la liberación de viriones y evita la formación de sincitios y la muerte celular.

El gen Vpu por el contrario, sólo se encuentra en el VIH tipo 2 y es un factor positivo para la infectividad (Stevens *et al.*, 2006)

5.4.2. CICLO REPLICATIVO DEL VIRUS

El conocimiento de este ciclo es de vital importancia pues será el que nos ofrezca las distintas posibilidades existentes para luchar contra el virus. Se pueden distinguir varias fases en el ciclo vital del virus: 1) adsorción, fusión e internalización del virión; 2) transcripción inversa; 3) integración; 4) transcripción del mensaje genético; 5) maduración y ensamblaje de proteínas; y 6) salida de la célula.

La fase de adsorción del virus comienza con la interacción de la glicoproteína de membrana gp120 con el receptor CD4, aunque existen otros receptores como los de la

fracción Fc de las inmunoglobulinas o los del complemento. Las células así infectadas serán las que expresen estas moléculas espontáneamente, como ocurre con los linfocitos CD4. Pero también se pueden expresar estos receptores tras infecciones previas por otros virus, como les ocurre a los linfocitos CD8 tras la infección por herpes virus tipo 6. Además se han descrito receptores distintos de estos en líneas celulares de glioma, y pueden existir otros condicionantes del tropismo en la misma gp120 fuera de la región conocida como de la unión a CD4, que pueden explicar mejor la unión a células fagocíticas mononucleares. La lista de células que pueden infectarse por el VIH es muy extensa. De ella señalamos los linfocitos T, los macrófagos, células dendríticas y progenitoras dentro de la serie hematopoyética, los oligodendrocitos, astrocitos, microglia y posiblemente neuronas dentro del sistema nervioso, los fibroblastos en la piel, las células columnares y epiteliales del intestino y las células trofoblásticas en la placenta. Después de la interacción debe producirse la fusión de membranas, previa a la internalización, paso en el que desempeña un papel primordial la gp41, con un marcado carácter lipofílico (Huang *et al.*, 2007; Noor, 2007; Aida, 2007; Masuda, 2007) .

Una vez que el virus está en el interior de la célula y se ha desprendido de su cubierta, se produce la replicación del mensaje genético mediada por la transcriptasa inversa. Esta es una enzima producida por el clivaje que realiza la proteasa sobre la poliproteína Gag—Pol, y se compone de dos subunidades de 66 y 51 kDa respectivamente, que en condiciones fisiológicas forman un heterodímero. La transcripción se realiza en un primer momento en una cadena simple de DNA. La síntesis de la segunda cadena precisa de la acción de la ribonucleasa H que degrade parcialmente el ARR original. Esta doble cadena de DNA viral se incorpora en el mensaje genético de la célula gracias a la integrasa viral. Si penetran múltiples viriones en la célula y se da un acúmulo de DNA sin integrar puede producirse la lisis celular. Posteriormente la infección entra en estado de latencia. El

material genético del virus está integrado en aproximadamente un 1% de los linfocitos CD4 y sólo la décima parte de estos expresa RNA viral. La presencia del provirus o de formas incompletas de transcripción no produce alteraciones patológicas.

La activación de la célula huésped por antígenos, citocinas y mitógenos provoca la expresión génica del virus en dos fases. Primero se transcriben los genes reguladores y posteriormente los estructurales Gag, Pol y Env y el gen regulador Rev, responsable la traslación del RNAm al citoplasma. El paso de la transcripción “no estructural” a la “estructural” se ha estudiado por ser un punto posiblemente crítico en la replicación viral.

El montaje y maduración de las proteínas se lleva a cabo en el citoplasma celular. En este paso desempeña un papel primordial y limitante la proteasa viral. Si esta proteína es ineficaz se compromete la infectividad viral. En el momento de la exocitosis, favorecida por la proteína Vpu, se realiza la miristilación de la p17 y se envuelve el virión por la membrana celular en donde estaban expresadas las glicoproteínas de la cubierta viral (Balin et al., 2008; Borkow and Lapidot, 2005b; Levy, 1993b; Stevens et al., 2006).

Tras la replicación del VIH se produce la lisis de la célula huésped. Este efecto citopático se ha explicado por múltiples mecanismos, como el acúmulo de DNA viral no integrado, el acúmulo de proteínas de la cubierta viral producido por la misma célula, la apoptosis o muerte celular programada, el hecho de que ciertos péptidos virales actúen como superantígenos, o la interacción de ciertas interleucinas con células infectadas.

Sin embargo los monocitos resisten relativamente bien los efectos citopáticos del VIH, probablemente debido a una menor expresión del CD4, y esto constituye para

el virus un mecanismo de perpetuación y almacenaje, y permite su distribución por distintos órganos de la economía.

5.5. TERAPIA ANTIVIRAL

5.5.1. GENERALIDADES

El conocimiento del ciclo replicativo del VIH ha supuesto por un lado el conocimiento de las dificultades que va a entrañar la lucha contra el virus debido a sus múltiples mecanismos de defensa, y por otro el desarrollo de una serie de productos que dificulten o impidan el ciclo vital del virus. Algunos de estos no han pasado de la fase experimental de laboratorio, otros sin embargo han sido utilizados con éxito en humanos, y sólo unos pocos han pasado a ser aceptados como de uso común. Se ha podido inhibir cada paso de la replicación del virus probando diversos medicamentos específicos para cada etapa (Barnard et al., 1997; Eron and Hogan, 2002a; Este and Telenti, 2007).

La interacción entre el virus y el linfocito se produce gracias a la afinidad de la glicoproteína gp120 por la molécula CD4 de los linfocitos y otras células. Por esto se intentó usar CD4 soluble para evitar dicha interacción con diferentes resultados clínicos. Estos fueron mejores al unirlo a un fragmento de la endotoxina A de la pseudomona o al fragmento Fc de las inmunoglobulinas humanas. También se ha ensayado con polisacáridos sulfatados, como el sulfato de dextrano, que inhibe la adsorción viral in vitro, pero sin suponer ningún avance en cuanto a eficacia clínica.

El paso limitante en la replicación del VIH es la transcripción del RNA en DNA, realizado por la enzima transcriptasa inversa, y sobre ella actúan multitud de sustancias. Estas se pueden dividir genéricamente en análogos de nucleósidos y no nucleósidos. El primer grupo será descrito en el próximo apartado.

Los inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleósidos se agrupan porque parece que inhiben la enzima por un mecanismo similar, aún no bien determinado y distinto de la competencia con los nucleósidos fisiológicos. Ninguno de ellos parece ser efectivo contra la transcriptasa inversa del HIV-2. Este grupo incluye los derivados del TIBO, un análogo de las benzodiazepinas, la nevirapina, un derivado de la dipiridodiazepinona, el derivado piperacídínico BHAPs, y los derivados de las piridinonas L697.639 y L697.661, también llamadas drogas “L”. Se han hecho estudios clínicos con derivados de las piridinonas y no se ha encontrado mayor efecto antiviral que con la zidovudina como se había descrito in vitro, además de desarrollar resistencias rápidamente, lo que se había anticipado en los estudios de laboratorio.

El foscarnet es un inhibidor de la transcriptasa inversa que no pertenece a ninguno de los dos grupos anteriores. Es un análogo del pirofosfato y el porcentaje de respuesta clínica a este fármaco es bajo.

Como ya hemos señalado la primera fase de expresión del genoma viral se da en los genes reguladores. La expresión de la proteína codificada por el gen Tat es crítica para la transcripción del resto de proteínas. Tras un programa de búsqueda se descubrió un producto, el Ro 5—3335, que inhibía la transactivación del gen Tat. Posee una estructura similar a las benzodiazepinas, pero a diferencia del TIBO, no inhibe la transcriptasa inversa y si es efectivo contra el VIH—2. Además por su mecanismo de

acción es capaz de inhibir la replicación en células crónicamente infectadas, lo que supone una ventaja respecto a los inhibidores de la transcriptasa inversa. Sin embargo no tienen acción conocida en el sistema nervioso central.

La tricosantina (GLQ 223), un compuesto usado como abortivo, parece que inhibe la traducción y que actúa sobre el linfocito T y sobre el sistema monocito macrófago, pero no se ha desarrollado su investigación clínica.

Una vez el ARNm del virus en el citoplasma celular hay varios tipos de compuestos que podrían actuar sobre él. La ribavirina, un análogo de la guanosina tiene una conocida actividad antiviral. Su efecto anti VIH ha sido descrito aunque varía según los autores y se han descrito resistencias. Esta podría actuar sobre el ARNm o sobre la formación de las proteínas virales. Como monoterapia no ha demostrado gran eficacia clínica y es antagonista de los análogos de nucleósidos procedentes de la pirimidina aunque no de los que provienen de las purinas. Otro de los puntos críticos en la replicación del virus reside en la acción de la proteasa. Esta para ser activa tiene que realizar un proceso autocatalítico del precursor Gag-Pol. Los intentos terapéuticos en este punto del ciclo viral se han intentado con inhibidores del C2 simétrico, que es el lugar de clivaje específico de la proteasa y péptidos que mimetizan el substrato proteico de la proteasa . Aunque son varios los que han demostrado efectividad tanto in vivo como in vitro, es el Saquinavir el que se ha elegido para múltiples ensayos clínicos demostrando la disminución de la carga viral y el aumento del número de linfocitos CD4, tanto en monoterapia como asociado a zidovudina. Actualmente se han ensayado otros inhibidores de la proteasa, como el Ritonavir, con éxito en la mejora de parámetros virológicos, aunque queda por precisar el beneficio clínico. Sin embargo

también se ha observado la aparición de resistencias tempranas, y que estas son cruzadas entre diferentes inhibidores de la proteasa, por lo que sus utilidades futuras estarán en la terapia combinada.

Se ha intentado interferir en otros lugares del ciclo viral como en la miristilación de las proteínas ofreciendo al virus ácidos grasos que reduzcan la capacidad hidrófoba de los componentes de la membrana para que emigren al citoplasma, aunque de momento no contamos con resultados. Se postula que la catanospermina impide la glicosilación de las proteínas virales y la formación de sincitios, pero apenas hay experiencia clínica (Shimada, 1993; Kawamura *et al.*, 1993; Balin *et al.*, 2008; Stevens *et al.*, 2006)

El interferón actúa a varios niveles, pues no sólo tiene efectos antivirales sino también inmunomoduladores. De los tres tipos descritos, parece ser que el alfa y el beta interferón son más útiles que el gamma contra el VIH. El más utilizado es el interferón alfa pues se vio que en pacientes VIH con sarcoma de Kaposi disminuía las infecciones oportunistas. Este efecto beneficioso sobre la enfermedad no ha podido demostrarse en pacientes sin Kaposi, por lo que sus indicaciones probablemente estén en la terapia combinada. Otras sustancias se han empleado como inmunomoduladores, lo que ocurrió con la interleucina-2, aunque pronto se comprobó que la estimulación indiscriminada de linfocitos era perjudicial, al aumentar la replicación viral. Otros modificadores de la respuesta biológica son el ampligén, que inhibe *in vitro* la replicación del VIH impidiendo la síntesis de proteínas víricas, con pocos resultados *in vivo*, el imutiol y el AS-101, otro compuesto sintético.

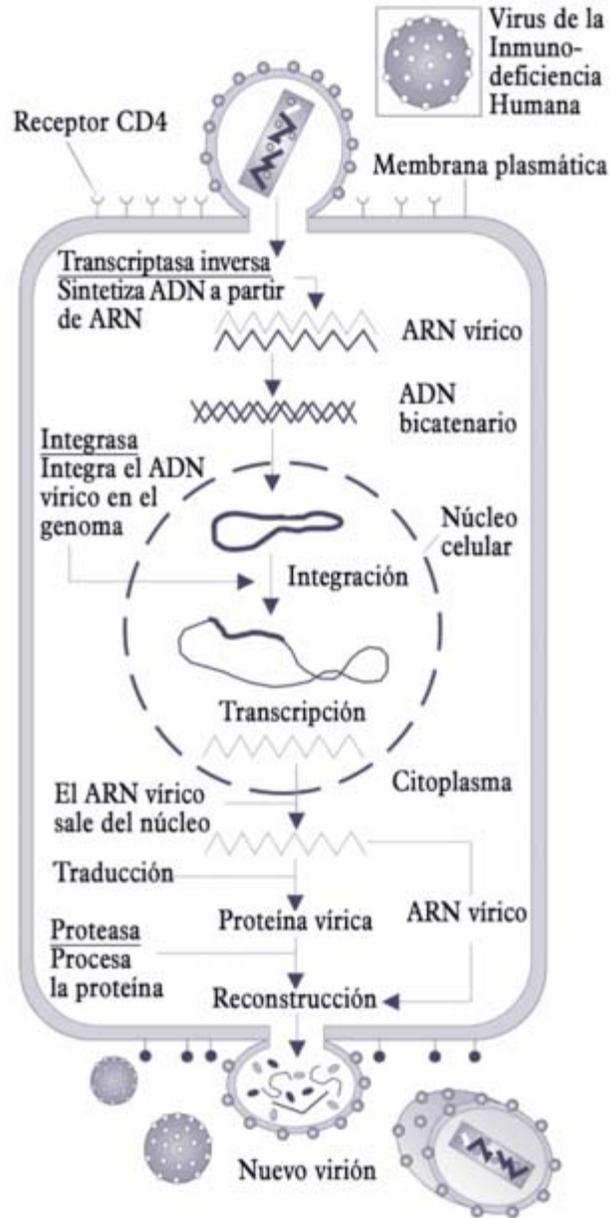


Figura 2. Ciclo replicativo viral del VIH-1 en células. Se resume en la figura el ciclo biológico del VIH y los lugares de acción de los fármacos antivirales (De, 2007)

5.5.2. NUCLEÓSIDOS INHIBIDORES DE LA TRANSCRIPTASA INVERSA

La primera clase de agentes antirretrovirales que se desarrolló fueron los inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de los nucleósidos. La transcriptasa inversa es un enzima, contenida en el virión, que el VIH necesita para replicarse a través de una fase ADN que se integra en el genoma de la célula que ha infectado (formación de cadenas de ADN a partir del ARN viral). La inhibición pueden ser competitiva (el antirretroviral imita los sustratos naturales para la síntesis del ADN) y por terminación de cadena que impide que se añadan nuevos nucleótidos a la cadena de ADN (Figura 2).

Se ha demostrado que los medicamentos de este grupo aumentan la supervivencia y disminuye la frecuencia y la severidad de las infecciones oportunistas en los pacientes que tienen avanzada su infección por el VIH; también disminuye la progresión de la infección por el VIH en los pacientes en fases iniciales con recuentos basales de CD4 menores de 500 células/mm³. Sin embargo es posible que los beneficios en este último grupo puedan ser relativamente breves ya que si bien retrasa la progresión a SIDA el beneficio disminuye con el paso del tiempo.

Diferentes estudios han demostrado que los miembros de este grupo de medicamentos son menos efectivos en monoterapia que cuando se combinan entre ellos y que incluso los efectos de la monoterapia son superiores cuando se cambian los diferentes inhibidores de la transcriptasa inversa.

Alguna de las pautas establecidas en el tratamiento de combinación de antirretrovirales asocia dos NRTI como AZT-ddI, AZT-ddC, AZT-3TC, 4dT-3TC o 4dT-ddI. Por lo general, estas combinaciones usadas de un modo exclusivo no logran

una reducción potente y mantenida de la carga viral y se asocian por lo general con otros antirretrovirales como los IP o los NNRTI.

El primer ensayo doble ciego controlado monoterapia AZT – placebo comenzó en 1986 y se denominó BW02. Después de 6 meses el análisis demostró que los pacientes que recibían el placebo presentaban de un modo significativo más infecciones oportunistas y muertes que los que recibían AZT. El estudio ACTG 002 comparó las dosis altas de AZT con dosis más bajas; en él se demostró que las dosis menores presentaban menos toxicidad y mejor supervivencia sin aumento significativo de evolución a SIDA comparado con dosis mayores (1500 mg vs 1200 mg durante 4 semanas y después 600 mg/día).

El ensayo Concorde se desarrolló en Europa desde 1988 a 1990; en él se buscaba comparar el tratamiento precoz (pacientes con más de 500 CD4/mm³) con AZT frente a la terapia diferida en pacientes asintomáticos con un placebo. Se incluyeron más de 1700 pacientes aleatorizados en una rama que recibía AZT (250 mg 4 veces al día) y otra que recibía placebo durante un tiempo de seguimiento de 3 años. Los pacientes en el grupo placebo pasaban al grupo AZT cuando su recuento de CD4 era menor de 500 cel. /mm³. En los pacientes del grupo de tratamiento con AZT se observaron pequeños aumentos en el recuento de CD4 y las proporciones de supervivencia a los 3 años no mostraron diferencias significativas entre los grupos (Souza *et al.*, 2009; Schiller and Youssef-Bessler, 2009; Ortega *et al.*, 2009) .

Los estudios ACTG 116/A y ACTG 116/B/ACTG 117 compararon la monoterapia con AZT y con ddI mientras que el ACTG 114 comparaba AZT con ddC mientras que el ACTG 106 era un estudio de la eficacia de la combinación AZT+ddC.

Estos estudios se realizaron con pacientes con enfermedad avanzada y en ellos se utilizaron diferentes dosis de los fármacos en un intento de establecer la dosificación más adecuada.

El estudio ACTG 175 proporcionó la primera evidencia de que la terapia que combinaba dos antirretrovirales era superior en términos de progresión de la infección y supervivencia al empleo de la monoterapia. Además por vez primera se obtuvo una evidencia de que la terapia combinada utilizada en pacientes con la enfermedad ligeramente avanzada prolongaba la vida a la vez que supuso que el AZT en monoterapia dejase de ser de primera elección.

En él se enrolaron a 2500 pacientes con recuentos moderados de CD4 (entre 250-500 CD4/mm³) de los que 1400 habían recibido previamente antirretrovirales; se aleatorizaron en 4 ramas: monoterapia con AZT, monoterapia con ddI, combinación de AZT+ddI y combinación de AZT+ddC. Los pacientes se siguieron durante 143 semanas. Entre los resultados se comprobó que las dos combinaciones y la monoterapia con ddI eran superiores a la monoterapia con AZT, con significación clínica y estadística. Un 16% de los pacientes con sólo AZT evolucionaron o murieron, comparado con la evolución de solo el 11% en la rama AZT+ddI, 12% con AZT+ddC u 11% con solo ddI. Las tendencias eran similares en los subgrupos de pacientes ingenuos o previamente tratados con antirretrovirales, salvo en la rama AZT+ddC en la que el beneficio se observó solo en los pacientes que no habían recibido previamente tratamiento. El estudio virológico se realizó en 391 pacientes; la rama AZT produjo a las 8 semanas un descenso medio de la carga viral de 0,26 lg10, que fue de 0,65 lg10 para la monoterapia con ddI; los valores fueron de 0,93 lg10 para AZT+ddI y de 0,89

Ig10 para AZT+ddC. Se observó que el descenso a las 8 semanas permitía predecir la evolución clínica posterior (Al-Jabri and Alenzi, 2009; Balzarini *et al.*, 1998; Barnard *et al.*, 1997; De, 2002; Rajesh *et al.*, 2009; Ray, 2009; Souza *et al.*, 2009; Stevens *et al.*, 2006).

Los estudios NUCA y NUCB evaluaron la combinación de AZT y 3TC y aportaron datos sobre la mejoría mantenida sobre los marcadores de progresión que aportan la combinación de NRTI. EL NUCA se realizó con 366 pacientes que no habían recibido previamente AZT y que tenían sus CD4 entre 200 y 500. Se diseñó para aleatorizar a los pacientes en 4 ramas: AZT solo, 3TC solo, AZT+3TC (150 mg 2 veces/día) y AZT+3TC (300 mg 2 veces/día). En los grupos con monoterapia se observó un ligero aumento de CD4 que con el tiempo volvían a sus niveles basales, un descenso medio de 0,6 Ig10 de la carga viral que volvía a los niveles previos en menos de 6 meses. En contraposición en los grupos con combinación el aumento medio de CD4 era mayor (30 vs 80 cels./mm³) y persistía al año de seguimiento y la carga viral descendía 1,6 Ig10 para estabilizarse en un descenso cercano a 1 Ig10 al año de seguimiento. El NUCB (europeo) obtuvo resultados similares. Unas variantes de estos estudios (NUCA 3002 y NUCB 3002) evaluaron la combinación en pacientes que habían sido tratados previamente con AZT; los resultados de la combinación fueron superiores a los de cualquier monoterapia, sin embargo los resultados no se mantuvieron tanto tiempo como en los sujetos ingenuos a AZT (Lightfoot and Milburn, 2009; Balzarini *et al.*, 1998).

De un modo similar el estudio CEASAR proporcionó evidencia clínica de que la combinación AZT+3TC producía retraso en la evolución de la infección. En el grupo en

el que se utilizó AZT+3TC frente al grupo AZT+placebo se observó que existía una reducción superior al 50% del riesgo de progresión de la enfermedad.

El estudio ACTG 306 se diseñó para valorar si la combinación de AZT+3TC era superior a otras combinaciones de 3TC y otros NRTI diferentes al AZT (dado que 3TC puede prevenir o modificar la resistencia a AZT tanto in vitro como in vivo). Se aleatorizaron 299 pacientes, con una carga viral media de 10.000 copias/ml y un recuento de CD4 medio de 400 cels./mm³, en dos grupos: el grupo d4T y el grupo ddI. En el primero se aleatorizaron en d4T frente a d4T+3TC frente a AZT+3TC y en otro, ddI frente a ddI+3TC frente a AZT+3TC. En el estudio se observó que la monoterapia d4T era inferior a las combinaciones y que estas a las 48 semanas eran similares, además de que la combinación ddI+3TC no mejoraba los resultados virológicos (Lightfoot and Milburn, 2009; Barnard *et al.*, 1997) .

Dentro del grupo de los inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de los nucleósidos se encuentran los siguientes fármacos:

- Zidovudina. AZT (Retrovir)
- Didanosina. ddI (Videx)
- Zalcitabina. ddC (Hivid)
- Estavudina. d4T (Zerit)
- Lamivudina. 3TC (Epivir)
- Abacavir (Ziagen)

Los datos más recientes parecen apuntar a que los beneficios clínicos obtenidos con los inhibidores de la transcriptasa inversa son moderados tanto en su amplitud como

en su duración. La aparición de VIH resistentes parece ser el mayor problema ya que es responsable del descenso de la eficacia con el paso del tiempo. Este problema es aún más patente en los de la transcriptasa inversa no análogos de los nucleósidos (NNRTI) entre los que se encuentran, entre otros, la delavirdina y la nevirapina (Lightfoot and Milburn, 2009; Al-Jabri and Alenzi, 2009; Cutler and Justman, 2008)

5.5.3. MEDICAMENTOS INHIBIDORES DE LA ENTRADA O LA FUSION DEL VIH A LA CÉLULA BLANCO.

Los inhibidores de la entrada evitan el ingreso del VIH a las células CD4 (células T) en el cuerpo. Estos inhibidores trabajan de una manera diferente a la mayoría de los medicamentos anti-VIH aprobados [los inhibidores de la proteasa, los inhibidores nucleósidos de la transcriptasa reversa y los inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa reversa, los cuales son activos contra el VIH, después de que el virus entra a la célula CD.

Los inhibidores de la entrada se adhieren a las proteínas de superficie de las células T o a las proteínas de superficie del VIH. Para que el VIH se una y pueda entrar a las células T, las proteínas de la capa externa del VIH deben unirse a las proteínas de superficie de las células T. Los inhibidores de la entrada evitan que este proceso ocurra. Algunos inhibidores de la entrada se adhieren a las proteínas gp120 ó gp41 de la capa externa del VIH. Otros inhibidores utilizan la proteína CD4 ó los receptores CCR5 ó CXCR4 de la superficie de las células T. Si los inhibidores de la entrada logran adherirse eficientemente a las proteínas, éstas quedan bloqueadas y entonces el VIH no

puede unirse a la superficie de las células T e ingresar a las mismas (Lightfoot and Milburn, 2009; He et al., 2008b) .

La FDA (Administración de Alimentos y Fármacos de los EEUU) ha aprobado dos inhibidores de la entrada. Fuzeon (enfuvirtide) de Roche en marzo de 2003, que actúa a nivel de la proteína gp41 en la superficie del VIH y Selzentry (maraviroc) de Pfizer, aprobado en agosto de 2007 que actúa a nivel de la proteína CCR5. Los medicamentos en experimentación incluyen a vicriviroc (un inhibidor de la entrada, bloqueador de CCR5) de Shering-Plough, el anticuerpo monoclonal bloqueador de CCR5 PRO 140 de Progenics y a TNX-355 de Tanox, que actúa a nivel de la proteína CD4 en las células CD4.

Las personas VIH positivas que tienen resistencia a los IP, INTR e INNTR probablemente se beneficien de los inhibidores de la entrada, dado que son una clase diferente de medicamentos. Estas son buenas noticias para las personas VIH positivas que han probado y fracasado con muchos de los medicamentos anti-VIH aprobados actualmente (McElrath *et al.*, 2010; Huet *et al.*, 2010).

Fuzeon es un inhibidor de la fusión. La Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos lo aprobó en marzo de 2003. Está aprobado para el tratamiento de personas VIH positivas que hayan tomado otros medicamentos anti-VIH en el pasado, pero que no pueden mantener sus cargas virales indetectables con los medicamentos que están disponibles en la actualidad. Aún no se ha aprobado para las personas VIH positivas que comienzan un tratamiento con medicamentos anti-VIH por primera vez. Fuzeon se debe usar en combinación con otros medicamentos para tratar el VIH (De, 2001; He et al., 2008b; Makinson and Reynes, 2009) .

5.5.3.1 ENFUVIRTIDE

El enfurvitide es un antirretroviral polipeptídico de la familia de los inhibidores de fusión, siendo el primero en su especie. Ha sido utilizado en adultos y en niños mayores de 6 meses de edad infectados con VIH-1 que han recibido tratamiento antirretroviral altamente supresora en la que el virus ha desarrollado resistencia a otros medicamentos.

La enfurtivide impide la unión del virus a las células del individuo para infectarlo, especialmente en los linfocitos CD4, los cuales en su membrana contienen una estructura llamada Receptor CD4 gracias a la proteína p145, al contacto con el receptor se convierte en la proteína GP41, es capaz de permitir el paso de la cápside del virus al interior de la célula. La enfurtivida detiene este proceso de fusión en el punto donde está la proteína, por lo que el VIH no puede transmitir su información a la célula y por tanto no la puede infectar (Steffen and Pohlmann, 2009; Oliveira et al., 2009; Sidhu et al., 2009b).

Dada la naturaleza polipéptica de la enfurtivide, si su administración fuera por vía oral, el medicamento sería destruido por los ácidos del estómago. En consecuencia no se puede usar vía oral. La enfurtivide se administra por inyección debajo de la piel. Esto se conoce como inyección subcutánea (He et al., 2008a)

Entre los efectos adversos que llega a presentar el medicamento son diarrea, náuseas, vómitos, dolores de cabeza, dolor y adormecimiento en pies y piernas e insomnio (De, 2001; De, 2002; He et al., 2008b; Makinson and Reynes, 2009) .

5.5.3.2 MARAVIROC

El maraviroc, también conocido como Selzentry, es un tipo de medicamento llamado inhibidor de la entrada. Estos productos bloquean la entrada del VIH a las células humanas.

El maraviroc fue autorizado por la Administración de Alimentos y Medicamentos el 6 de agosto de 2007 para el tratamiento de la infección por el VIH-1 con tropismo por el correceptor CCR5 en pacientes adultos previamente tratados. Se administra en combinación con otro tratamiento antirretroviral. Este medicamento no cura ni previene la infección por el VIH o el SIDA ni reduce el riesgo de transmisión del virus a otras personas.

En 2006, Pfizer estableció un programa mundial de acceso ampliado para suministrar el maraviroc a los pacientes con pocas opciones de tratamiento o sin ninguna. El programa de acceso ampliado (EAP, por sus siglas en inglés) seguirá proporcionando maraviroc a los pacientes en los países donde todavía no está disponible. Para más información los pacientes y los profesionales de salud.

El maraviroc se fabrica en tabletas de administración oral. Se puede tomar con comida o solo. Se vende en tabletas de 150 y 300 mg y a la mayoría de las personas debe dárseles 300 mg dos veces al día. Algunas personas, por ejemplo, quienes tomen medicamentos que afecten la concentración de maraviroc o tengan insuficiencia renal, deben tomar diferentes dosis de este producto.

Los pacientes deben informarle al médico sobre cualquier problema de salud que tengan antes de tomar este medicamento.

Además de sus efectos deseables, el maraviroc puede causar algunos efectos adversos. Entre los efectos secundarios más comunes observados en estudios hasta la fecha están: tos, fiebre, mareo, dolor de cabeza, hipotensión arterial, náusea e irritación de la vejiga urinaria. En dos estudios de fase III se notificaron posibles trastornos hepáticos y cardíacos, mayor riesgo de algunas infecciones y un ligero aumento de las concentraciones de colesterol.

Los estudios de interacción medicamentosa muestran cambios en la exposición al maraviroc cuando se administra con otros medicamentos contra el VIH, incluso efavirenz y lopinavir/ritonavir. Estos cambios exigen el empleo de diferentes dosis de maraviroc (Eron and Hogan, 2002b).

5.6. LA NANOTECNOLOGÍA

La nanotecnología es un campo de las ciencias aplicadas dedicadas al control y manipulación de la materia a una escala menor que un micrómetro, es decir, a nivel de átomos y moléculas (nanomateriales). Lo más habitual es que tal manipulación se produzca en un rango de entre uno y cien nanómetros. Para hacerse una idea de lo pequeño que puede ser un nanobot, un nanobot de 50 nm tiene el tamaño de 5 capas de moléculas o átomos.

Nano- es un prefijo griego que indica una medida, no un objeto, de manera que la nanotecnología se caracteriza por ser un campo esencialmente multidisciplinario, y

cohesionado exclusivamente por la escala de la materia con la que trabajan (McNeil, 2005a).

La nanotecnología promete soluciones vanguardistas y más eficientes para los problemas ambientales, así como muchos otros enfrentados por la humanidad. Las nanotecnologías prometen beneficios de todo tipo, desde aplicaciones médicas nuevas o más eficientes a soluciones de problemas ambientales y muchos otros; sin embargo, el concepto de nanotecnología aún no es muy conocido en la sociedad.

Pero estos conocimientos fueron más allá debido a que con esto se pudo modificar la estructura de las moléculas como es el caso de los polímeros o plásticos que hoy en día los encontramos en todos nuestros hogares y que sin ellos no podríamos vivir. Pero hay que decir que este tipo de moléculas se les puede considerar de grandes cualidades. Con todos estos avances el hombre tuvo una gran fascinación por seguir investigando más acerca de estas moléculas, ya no en el ámbito de materiales inertes, sino en la búsqueda de moléculas orgánicas que se encontrarán en nuestro organismo.

Hoy en día en medicina se le da más interés a la investigación en el mundo microscópico ya que en este se encuentran posiblemente las alteraciones estructurales que provocan la enfermedad, y no hay que decir de las ramas de la medicina que han salido más beneficiadas como es la microbiología. Inmunología, fisiología, en fin casi todas las ramas de la biología. Con todos estos avances han surgido también nuevas especialidades como es la ingeniería genética que hoy en día todos han oído escuchar acerca de las repercusiones que puede traer la humanidad como es la clonación o la mejora de especies. Entre estas ciencias también se encuentra otras no muy conocidas como es la nanotecnología, a la cual se le puede definir como aquella que se dedica a la

fabricación de la tecnología en miniatura (Klippstein and Pozo, 2010; Oberdorster, 2010; Retnakumari *et al.*, 2010; Singhal *et al.*, 2010) .

La característica fundamental de la nanotecnología es que constituye un ensamblaje interdisciplinar de varios campos de las ciencias naturales que están altamente especializados. Por tanto, los físicos juegan un importante rol no sólo en la construcción del microscopio usado para investigar tales fenómenos sino también sobre todas las leyes de la mecánica cuántica. Alcanzar la estructura del material deseado y las configuraciones de ciertos átomos hacen jugar a la química un papel importante. En medicina, el desarrollo específico dirigido a nanopartículas promete ayuda al tratamiento de ciertas enfermedades. Aquí, la ciencia ha alcanzado un punto en el que las fronteras que separan las diferentes disciplinas han empezado a diluirse, y es precisamente por esa razón por la que la nanotecnología también se refiere a ser una tecnología convergente (Aguilella and Alcaraz, 2009; McNeil, 2005b) .

La nanotecnología avanzada, a veces también llamada fabricación molecular, es un término dado al concepto de ingeniería de nanosistemas (máquinas a escala nanométrica) operando a escala molecular. Se basa en que los productos manufacturados se realizan a partir de átomos. Las propiedades de estos productos dependen de cómo estén esos átomos dispuestos. Así por ejemplo, si reubicamos los átomos del grafito (compuesto por carbono, principalmente) de la mina del lápiz podemos hacer diamantes (carbono puro cristalizado). Si reubicamos los átomos de la arena (compuesta básicamente por sílice) y agregamos algunos elementos extras se hacen los chips de un ordenador.

A partir de los incontables ejemplos encontrados en la biología se sabe que miles de millones de años de retroalimentación evolucionada pueden producir máquinas biológicas sofisticadas y estocásticamente optimizadas. Se tiene la esperanza que los desarrollos en nanotecnología harán posible su construcción a través de algunos significados más cortos, quizás usando principios biomiméticos. Sin embargo, K. Eric Drexler y otros investigadores han propuesto que la nanotecnología avanzada, aunque quizá inicialmente implementada a través de principios miméticos, finalmente podría estar basada en los principios de la ingeniería mecánica.

Determinar un conjunto de caminos a seguir para el desarrollo de la nanotecnología molecular es un objetivo para el proyecto sobre el mapa de la tecnología liderado por Instituto Memorial Battelle (el jefe de varios laboratorios nacionales de EEUU) y del Foresight Institute (Aguilella and Alcaraz, 2009; McNeil, 2005b) .

5.6.1. LA NANOBIOOTECNOLOGIA

La nanobiotecnología es una rama de la nanotecnología con aplicaciones o usos biológicos y bioquímicos. A menudo la nanobiotecnología estudia elementos existentes en la naturaleza para fabricar nuevos dispositivos.

El término bionanotecnología es usado a menudo como sinónimo de nanobiotecnología, aunque a veces se hace una distinción entre ambas. Si hacemos la distinción entre ambas, la nanobiotecnología se refiere a usar la nanotecnología para alcanzar las metas de la biotecnología, mientras que la bionanotecnología puede referirse a cualquier superposición entre la biología y la nanotecnología, incluyendo el

uso de biomoléculas como parte o inspiración de dispositivos nanotecnológicos (Feldkamp, 2009; McNeil, 2005b).

5.6.1.2 LA NANOMEDICINA

La nanomedicina es la rama de la medicina que aplica los conocimientos de nanotecnología en las ciencias y procedimientos médicos. En teoría con la nanotecnología se podrían construir pequeños nano robots nanobots que serían un ejército a nivel nanométrico en nuestro cuerpo, programados para realizar casi cualquier actividad (Dubey *et al.*, 2010; Kokura *et al.*, 2010; Webber *et al.*, 2010; Ozpolat *et al.*, 2010; Fadeel *et al.*, 2010). Una de las aplicaciones más prometedoras sería la habilidad de programar estos nanobots para buscar y destruir las células responsables de la formación del cáncer. Los nanobots de la nanomedicina podrían producirse con la función de reestructurar o reparar tejidos musculosos u óseos. Las fracturas podrían ser cosa del pasado, los nanobots podrían programarse para identificar fisuras en los huesos y arreglar éstos de dos formas; realizando algún proceso para acelerar la recuperación del hueso roto o fundiéndose con el hueso roto o inclusive las dos. Y así con infinidad de enfermedades de varios tipos disolviendo sustancias de múltiples variedades según, en sangre o en la zona a tratar específicamente, inyectando pequeñas cantidades de antibióticos o antisépticos en caso de resfriados o inflamaciones, etc (Sandler, 2009).

Actualmente, las nanopartículas de plata se están usando como desinfectantes y antisépticos, en productos farmacéuticos y quirúrgicos, en ropa interior, guantes, medias y zapatos deportivos, en productos para bebés, productos de higiene personal, cubiertos,

refrigeradores y lavadoras de ropa. Un problema derivado de estas aplicaciones es su impacto ambiental, ya que en 2005, un estudio encontró que la plata en nanopartículas es 45 veces más tóxica que la corriente y además, en 2008, otro estudio indicó que pueden pasar nanopartículas sintéticas a los desagües, con fuerte toxicidad para la vida acuática, eliminando también bacterias benignas en los sistemas de drenaje (Swai *et al.*, 2009; McGee, 2009; Chen and Schluesener, 2008).

Por lo tanto, el poder desarrollar y manipular nanopartículas que sean capaces de inhibir directamente el virus del VIH-1 en forma específica será de gran importancia, ya que la mayoría de los compuestos antirretrovirales solo actúan a nivel de la célula y no contra el virus. Al actuar las NPP directamente contra el virus sin permitirle la entrada de este a las células y sin permitir que el virus se integre al genoma de la célula huésped no permitir que se desarrolle resistencia contra las NPP.

6. MÉTODOS

6.1. Origen de los reactivos

Las NPP de 30-50 nm con 0.2 % PVP de Nanoamor en Houston Texas. La sulfadiazina de plata (Sigma-Aldrich) y nitrato de plata (Sigma-Aldrich) se prepararon en una solución de RPIM 1640.

6.2. Material biológico

Las líneas celulares HeLa-CD4-LTR- β -gal y MT-2, los virus VIH-1_{IIIb}, VIH-1_{Bal}, VIH-1_{Beni}, VIH-196USSN20, VIH-1BCF01, VIH-1NNRTI_{RV}, HIV-1AZT_{RV}, HIV-1 PI_{RV}, HIV-1 3TC_{RV}, HIV-1 Saquinavir_{RV}, los antirretrovirales AZT, Indinavir, 118-D-24, Tak-779, y el Enfuvirtide fueron obtenidos a través de programa de referencia del NIH en los Estados Unidos. Los aislados virales HIV-1_{Eli} y HIV-1_{Beni} fueron aislados de pacientes del Instituto de Inmunología Clínica y centro de SIDA en Rehovot Israel, siendo donados por el Dr. Gadi Borkow. Se prepararon alícuotas de sobrenadantes virales libres de células por medio de cultivo los cuales fueron utilizados como inóculos virales. El UC781 fue donado por el Dr. Gadi Borkow.

6.3. Caracterización de las nanopartículas de plata

En un microscopio electrónico de transmisión HRTEM JEOL 2010F con ultra resolución equipado con detector para detectar ángulo de resolución oscura se realizó la caracterización de las NPP. Una gota de la solución de NPP con 1 mg/mL se

prepararon en una rejilla de cobre con base de carbón, se permitió que se evaporara la solución. Se analizaron hasta 400 partículas para hacer las medidas de las nanopartículas y poder definir sus formas.

6.4. Ensayos de citotoxicidad

Una solución base de Nanopartículas de Plata fue diluida 1/2 en forma seriada a las concentraciones deseadas en medios para cultivo , posteriormente se añaden a los pozos que contienen células 5×10^4 HeLa-CD4-LTR- β -gal. Las placas de 96 pozos fueron incubadas a 37 °C en una incubadora de 5% CO₂ con atmosfera humidificada por 48 horas. La viabilidad se cuantificó utilizando el reactivo CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Lara *et al.*, 2010).

6.5. Los ensayos de inhibición de la infectividad del VIH-1 por las NPP

Diluciones seriadas 1:2 de NPP, fueron mezcladas con los virus VIH-1_{IIIb}, VIH-1_{Bal}, VIH-1_{Beni}, VIH-196USSN20, VIH-1BCF01, VIH-1NNRTI_{RV}, HIV-1AZT_{RV}, HIV-1 PI_{RV}, HIV-1 3TC_{RV}, HIV-1 Saquinavir_{RV} a un 10^5 TCID₅₀ y esta mezcla fue puesta a incubar con las células HeLa-CD4-LTR- β -gal, dando como resultado un MOI de 0.2 – 0.5 (Borkow et al., 2003; Borkow et al., 2007; Elechiguerra et al., 2005b) . La infección por VIH-1 se cuantificó después de 48 horas de incubación midiendo la actividad de la β -galactosidasa producida debido a la infección, esta se detecta y cuantificó con el sistema de Beta-Glo de Promega. La eficacia de los compuestos para inhibir la infección del VIH-1 (IC₅₀) se cuantificó según el control positivo y se analiza la dosis respuesta.

6.6. Los ensayos de inhibición de la infectividad del VIH-1 por los iones de plata

Diluciones seriadas 1:2 de sulfadiazina de plata y nitrato de plata, fueron mezcladas con el virus VIH-1_{III B} libre de células a un 10^5 TCID₅₀ y esta mezcla fue puesta a incubar con las células HeLa-CD4-LTR- β -gal, dando como resultado un MOI de 0.2 – 0.5 (Borkow et al., 2003; Borkow et al., 2007; Elechiguerra et al., 2005b). La infección por VIH-1 se cuantifica después de 48 horas de incubación midiendo la actividad de la β -galactosidasa producida debido a la infección, esta se detecta y cuantifica con el sistema de Beta-Glo de Promega. La eficacia de los compuestos para inhibir la infección del VIH-1 (IC₅₀) se cuantifica según el control positivo y se analiza la dosis respuesta.

6.7. Adsorción viral

Se agregaron diluciones seriadas 1:2 de NPP a HIV-1_{III B} a un m.o.i de 0.2-0.5. Después de la infección, se incubaron a temperatura ambiente. Posteriormente esta mezcla se centrifuga tres veces a 10,000 rpm, se desechó el sobrenadante y se lavó tres veces el remanente. Al final el remanente fue resuspendido en DMEM y colocado en las placas de 96 pozos con células HeLa. Las células fueron incubadas en CO₂ 5% en incubadora humidificada a 37 °C por 48 horas. La cuantificación de la inhibición viral fue detectada por medio del ensayo Beta-Glo (Soule *et al.*, 1998).

6.8. Ensayo de fusión basado en células

Las células HL2/3 fueron cocultivadas en relación 1:1 con las células HeLa-CD4-LTR- β -gal que como su nombre indica, expresan el CD4, y por 48 horas de

incubación en presencia o ausencia de NPP, para poder determinar si los compuestos anteriormente citados interferían de algún modo con la unión Env con el receptor CD4. Al establecerse la fusión de ambas líneas celulares, la proteína Tat de las células HL2/3 activa el indicador por la expresión génica en las células HeLa-CD4-LTR- β -gal (Ciminale *et al.*, 1990). La actividad β -gal fue cuantificada por el ensayo Beta-Glo de Promega. El porcentaje de inhibición de las células fusogénica HL2/3 fue calculado con respecto al control de células fusionadas sin tratamiento por NPP.

6.9. Ensayo de tiempo mínimo para inhibir la fusión basado en células fusogénicas

Las células HL2/3 fueron cocultivadas en relación 1:1 con las células HeLa-CD4-LTR- β -gal que expresan el CD4, y por 48 horas de incubación en presencia o ausencia de NPP, para poder determinar el tiempo mínimo requerido para los compuestos anteriormente citados en la inhibición de la fusión con la unión Env y con el receptor CD4. Los tiempos fueron 60, 30, 15, 7, 3, y 1 minuto, así como las dosis de NPP que fueron 2,1 y 0.5 mg/mL. Al establecerse la fusión de ambas líneas celulares, la proteína Tat de las células HL2/3 activa el indicador por la expresión génica en las células HeLa-CD4-LTR- β -gal (Ciminale *et al.*, 1990). La actividad β -gal fue cuantificada por el ensayo Beta-Glo de Promega. El porcentaje de inhibición de las células fusogénicas HL2/3 fue calculado con respecto al control de células fusionadas sin tratamiento por NPP.

6.10. Las NPP y la interacción gp120-CD4 por ELISA

La actividad inhibitoria por parte de las NPP contra la interacción gp120-CD4 se cuantifico por medio de un inmunoensayo de ELISA gp120 capture Assay Immunodiagnosics Incorporated para la captura competitiva de gp120. Una cantidad constante de gp120 fue incubada por 10 minutos a temperatura ambiente con cantidades diferentes de NPP de 5, 2.5, 1.25, 0.62, 0.31 y un control sin NPP únicamente con gp120, la mezcla de gp120 con NPP a diferentes dosis fue depositada en los pozos con CD4 impregnados para cuantificar la cantidad de gp120 que se unió al pozo a una absorbancia de 450 nm en un lector de ELISA.

6.11. Experimentos por adición en tiempos

Las células HeLa-CD4-LTR- β -gal fueron infectadas con VIH-1 al 10^5 TCID₅₀. Las Nanopartículas de plata, T-20, AZT e Indinavir, y fueron agregados en diferentes tiempos (0, 1, 2, 3... 12 h) después de la infección. La inhibición de la infección se cuantificó después de 48 horas midiendo la actividad del β -gal con el sistema de ensayo Beta – Glo de Promega (Hombrouck *et al.*, 2008; Esimone *et al.*, 2009).

6.12. Análisis estadísticos

Las gráficas mostraron los valores de desviación estándar como resultado de cada experimento repetido tres veces en momentos diferentes y cada uno por duplicado. Los estudios de adición por etapas del ciclo replicativo del virus se realizó por regresión no linear por el programa SigmaPlot 10.0.

7.0 Resultados

7.1 Citotoxicidad

Las líneas celulares HeLa-CD4-LTR- β -gal (que expresan ambos correceptores CXCR4 y CCR5), MT-2 (línea humana celular linfoide la cual expresa CXCR4), y linfocitos polimorfonucleares humanas, fueron utilizadas en la medición de citotoxicidad contra las NPP. Se cuantificó la citotoxicidad por un ensayo basado en la cuantificación de ATP que contienen las células viables en el cultivo celular. La citotoxicidad del 50% (CC50) fue de 3.9 ± 1.6 mg/mL para las células HeLa-CD4-LTR- β -gal, para los linfocitos polimorfonucleares fue de 1.11 ± 0.32 mg/mL y para la línea celular MT-2 fue de $.3 \pm 0.58$ mg/mL (Tabla III).

7.2 Actividad de inhibición de la infección

Las NPP de 30 a 50 nm fueron utilizadas contra un panel de aislados de VIH-1 III_B, VIH-1_{Bal}, VIH-1_{Beni}, VIH-196USSN20, VIH-1BCF01, VIH-1NNRTI_{RV}, HIV-1AZT_{RV}, HIV-1 PI_{RV}, HIV-1 3TC_{RV}, HIV-1 Saquinavir_{RV} usando células indicadoras por medio de las cuales se puede cuantificar la infección del VIH-1 *in vitro* con un estudio basado en la luciferasa. Las NPP inhibieron todas las cepas, mostrando una potencia de inhibición de la infección contra T-trópicos, M-trópicos, dual trópicos y aislados resistentes a antiretrovirales (Tabla IV). La concentración de las NPP necesarias para inhibir el 50% (IC₅₀) fue de .44 a 0.91 mg/mL. El índice terapéutico

refleja la actividad del compuesto relacionando la toxicidad (CC₅₀) con la efectividad (IC₅₀), en las mismas condiciones del estudio *in vitro*. Para las diferentes cepas del VIH-1 que se trataron con las NPP, no se encontró disminución significativa en el índice terapéutico, siendo estas cepas resistentes a antirretrovirales NNRTI, NRTI, PI y PII, comparadas con las cepas no resistentes (Tabla IV).

Tabla III. Citotoxicidad de las nanopartículas de plata

Línea celular	Origen	Correceptores	CC ₅₀ *
HeLa-CD4-LTR-β-gal	Línea celular humana derivada de cáncer cervical	CXCR4 y CCR5	3.9 ± 1.6 mg/mL
MT-2	Línea humana celular linfoide	CXCR4	0.3 ± 0.58 mg/mL
PMN	Linfocitos humanos	CXCR4	1.11 ± 0.32 mg/mL

*Los valores representan la media de los triplicados ± la desviación estándar.

Tabla IV. Actividad de inhibición de la infección de las NPP usando diferentes Cepas del VIH-1.

Cepa de VIH-1	Tropismo (co-receptor)	IC ₅₀ (mM)*	IT
IIIB	T (X4)	0.44 (± 0.3)	8.9
Eli	T (X4)	0.42 (± 0.2)	9.3
Beni	T (X4)	0.19 (± 0.1)	20.5
96USSN20	T (X4)/ M (R5)	0.36 (± 0.2)	12.5
Bal	M (R5)	0.27 (± 0.2)	14.4
BCF01	M (R5)	0.37 (± 0.3)	10.5
AZT _{RV}	T (X4)	0.19 (± 0.01)	20.5
NNRTI _{RV}	T (X4)	0.61 (± 0.24)	6.4
PI _{RV}	T (X4)	0.91 (± 0.09)	4.3
3TC _{RV}	T (X4)	0.73 (± 0.12)	5.3
Saquinavir _{RV}	T (X4)	0.81 (± 0.11)	4.8

* Los valores representan la media (triplicado) ± la media del error estándar.

** La CC₅₀ de las células HeLa (mg/mL) se cuantificó en 3.9 (± 1.6)

NNRTI: inhibidor de la retrotranscriptasa no nucleósido, PI: inhibidor de proteasa, RV: virus resistente.

7.3 La actividad de antiviral de las NPP y los iones de plata.

La sulfadiazina de plata (AgSD) y el nitrato de plata (AgNO₃) fueron utilizadas contra aislados de VIH-1_{IIIB}, utilizando células indicadoras por medio de las cuales se puede cuantificar la infección del VIH-1 *in vitro* con un estudio basado en la luciferasa. El Índice Terapéutico se obtuvo al dividir el IC₅₀ entre el CC₅₀ de cada compuesto. El Índice Terapéutico para las NPP es de 8.9, mientras que para las AgSD, como para las AgNO₃ el Índice terapéutico fue de 0.7. Como resultado tenemos una inhibición de la infección del VIH-1 12 veces mayor para las NPP comparado con medicamentos liberadores de iones de plata (Tabla V).

Tabla V. Índice Terapéutico de medicamentos con iones de plata.

Compuestos de plata	IC ₅₀	células HeLa CC ₅₀ *	IT
NPP	0.44 mg/mL (± 0.3)	3.9 mg/mL (± 1.6)	8.9
AGSO	39.33 µg/mL (± 14.6)	28.25 µg/mL (± 7.28)	0.7
AgNO ₃	0.00059% (± 0.00022%)	0.00044% (± 0.00002%)	0.7

* Los valores representan la media (triplicado) ± la media del error estándar.

7.4 Inhibición de la adsorción viral

Un método utilizado que nos comprueba si la actividad de las NPP contra el VIH-1 es debido a la inhibición de la unión o fusión del VIH-1 a las células, por lo cual se realizó el ensayo de inhibición de la adsorción viral. Un inhibidor de fusión (Efurvitide) se incluyó como control, ya que es un inhibidor de fusión utilizado clínicamente. Las NPP inhibieron la unión del virus HIV_{IIIB} a las células blanco, siendo

su IC_{50} de 0.44 mg/mL (Figura 3). El inhibidor de fusión Enfuvirtide se incluyó como control dando 10.1 μ g/ml (Figura 4) y también se incluyó como control el UC781, el cual, por ser un inhibidor de la transcriptasa reversa no nucleósido no inhibió en esta prueba (Figura 5).

7.5 Inhibición de la fusión mediada por las membranas Env/CD4

El ensayo de fusión basado en células fusogénicas fue utilizado para poder simular el proceso de la fusión que realiza el VIH-1 con la célula huésped el cual es debido a la unión gp120-CD4. Utilizamos para este estudio las células HL2/3, las cuales expresan HIV-1 Env en su superficie y la proteína Tat en su citoplasma (células efectoras) las cuales se cocultivaron con células HeLa-CD4-LTR- β -gal (células indicadoras) ambas se fusionan dando como resultado la interacción entre la gp120-CD4, y la cantidad de células que se fusionan puede ser medida de forma cuantitativa por el gen reportero de β -gal . Con el cocultivo de ambas células, las NPP bloquearon la fusión de ambas células de forma eficiente (Figura 6) en una forma dependiente a la dosis (1.0-2.5 mg/mL). Los controles utilizados, que actúan en diferentes etapas del ciclo replicativo del VIH-1, como el UC781 (NNRTI), AZT (NRTI), y el Indinavir (PI), como era de esperarse, no inhibieron la fusión celular en este ensayo basado en células. . Además las células HL2/3 y HeLa-CD4-LTR- β -gal fueron incubadas con diluciones 2,1 y 0.5 mg/mL de NPP a tiempos de 1, 15,30 y 60 minutos para determinar el tiempo mínimo de acción de las NPP, resultando que inicia en minutos y dura hasta 1 hora su acción.

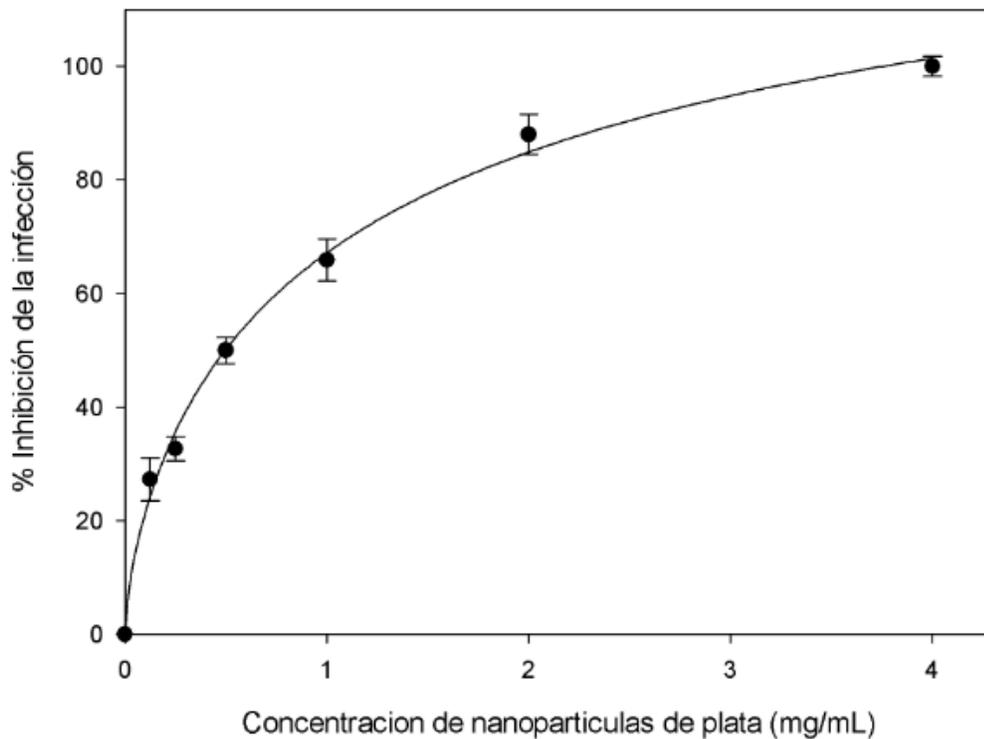


Figura 3. Adsorción viral y NPP. A diluciones seriales 2:1 de NPP se les agregó el VIH-1_{IIB} a 10^5 TCID₅₀ de virus libre de células resultando un m.o.i de 0.2 – 0.5. Después de incubar por 1 minuto a temperatura ambiente, se centrifuga la mezcla tres veces a 10,000rpm posteriormente el sobrenadante es removido y el concentrado viral se lava tres veces. El concentrado final es colocado en placas de 96 pozos con células HeLa-CD4-LTR- β -gal. La cuantificación de infección del VIH-1 se realiza con un ensayo de luciferasa. El porcentaje de la adsorción viral se calcula con respecto al control positivo de virus no tratado con NPP. El estudio se realiza por triplicado representando cada punto la media \pm la desviación estándar y las líneas son por regresión lineal calculadas por el programa SigmaPlot 10.0

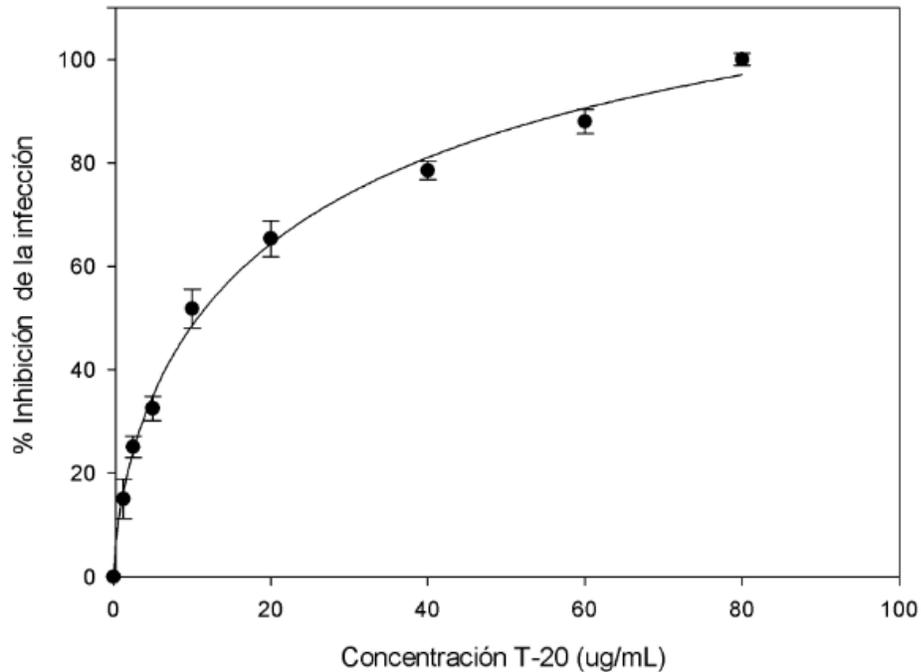


Figura 4. Adsorción viral y Enfuvirtide (T-20). A diluciones seriales 2:1 de Enfuvirtide se les agregó el VIH-1_{III B} a 10^5 TCID₅₀ de virus libre de células resultando un m.o.i de 0.2 – 0.5. Después de incubar por 1 minuto a temperatura ambiente, se centrifuga la mezcla tres veces a 10,000rpm, posteriormente el sobrenadante es removido y el concentrado viral se lava tres veces. El concentrado final es colocado en placas de 96 pozos con células HeLa-CD4-LTR- β -gal. La cuantificación de infección del VIH-1 se realiza con un ensayo de luciferasa. El porcentaje de la adsorción viral se calcula con respecto al control positivo de virus no tratado con Enfuvirtide. El estudio se realiza por triplicado representando cada punto la media \pm la desviación estándar y las líneas son por regresión lineal calculadas por el programa SigmaPlot 10.0

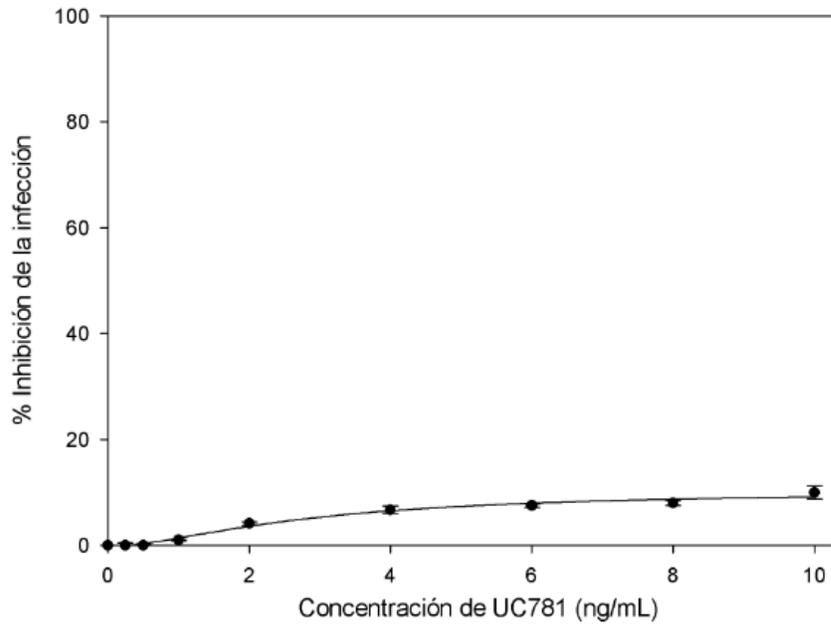


Figura 5. Adsorción viral y el UC781. A diluciones seriales 2:1 de UC781 se les agregó el VIH-1_{IIB} a 10^5 TCID₅₀ de virus libre de células resultando un m.o.i de 0.2 – 0.5. Después de incubar por 1 minuto a temperatura ambiente, se centrifuga la mezcla tres veces a un 10,000rpm, posteriormente el sobrenadante es removido y el concentrado viral se lava por tres veces. El concentrado viral libre final es colocado en placas de 96 pozos con células HeLa-CD4-LTR- β -gal. La cuantificación de infección del VIH-1 se realiza con un ensayo de luciferasa. El porcentaje de la adsorción viral se calcula con respecto al control positivo de virus no tratado con UC781. El estudio se realiza por triplicado representando cada punto la media \pm la desviación estándar y las líneas son por regresión linear calculadas por el programa SigmaPlot 10.0

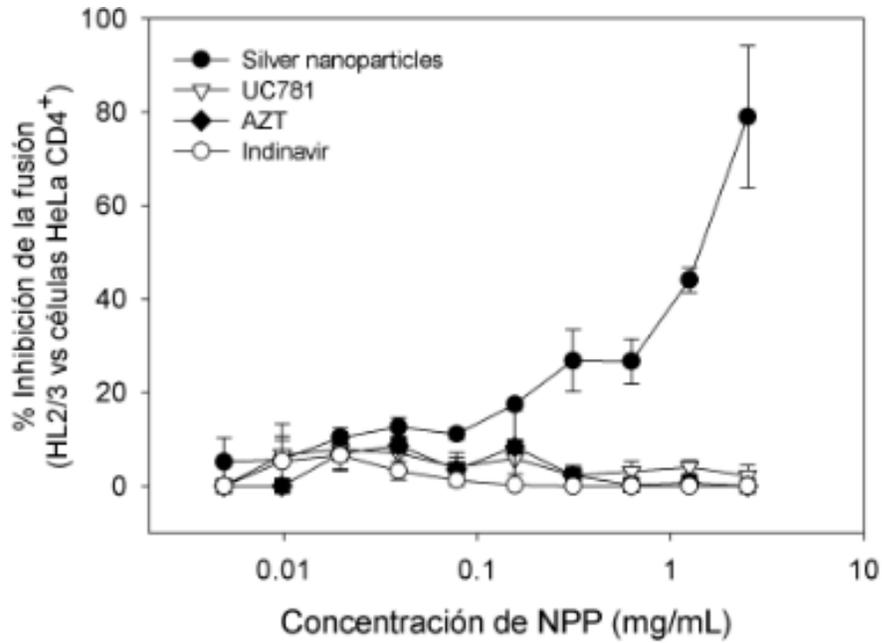


Figura 6. Inhibición de la interacción gp120-CD4⁺ por las NPP basado en células.

Ensayo de fusión basado en células fue usado para simular la fusión de gp120-CD4⁺ del virus a las membranas del huésped. Células HL2/3 y HeLa-CD4-LTR-β-gal fueron incubadas con diluciones seriadas de NPP y antiretrovirales ya conocidos (UC781 (NNRTI), AZT (NRTI), y el Indinavir (PI). El ensayo se realizó por triplicado; donde cada punto representa la media ± la media del error estándar.

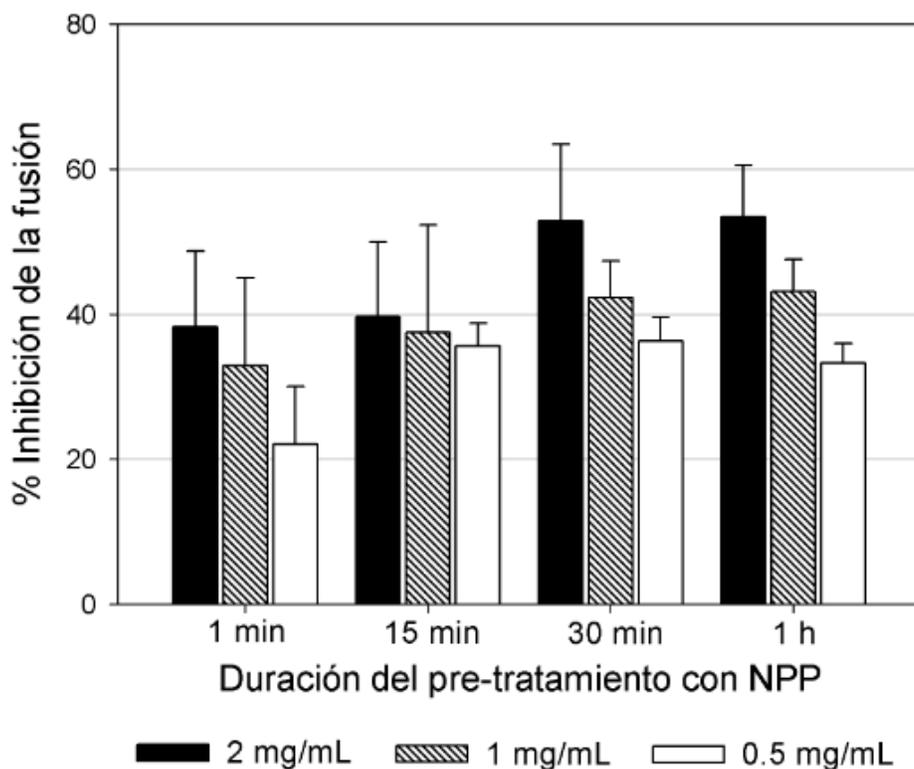


Figura 7. Inhibición de la fusión en ensayo basado en células en diferentes tiempos de pretratamiento. Ensayo de fusión basado en células fue usado para simular la fusión de gp120-CD4+ del virus a las membranas del huésped. Células HL2/3 y HeLa-CD4-LTR- β -gal fueron incubadas con diluciones 2,1 y 0.5 mg/mL de NPP a tiempos de 1, 15,30 y 60 minutos. Hay efectos inhibitorios hasta 1 hora después del pretratamiento de células fusogénicas con NPP. El ensayo se realizó por triplicado; donde cada punto representa la media \pm la media del error estándar.

7.7 Las NPP interfieren en la interacción gp120-CD4

La actividad inhibitoria por parte de las NPP contra la interacción gp120-CD4 con un inmunoensayo de ELISA para la captura competitiva de gp120. Una cantidad constante de gp120 fue incubada por 10 minutos a temperatura ambiente con cantidades diferentes de NPP, la mezcla de gp120 con NPP a diferentes dosis fue depositada en los pozos con CD4 impregnados para cuantificar la cantidad de gp120 que se unió al pozo. Comparando los resultados con el control (0.0 mg/mL), se obtuvo un decremento hasta del 60% de gp120 en el pozo con la cantidad mas alta de NPP de gp120 que se unió a los pozos impregnados de CD4. Como se muestra en la figura 8, se observó un decremento en los valores de absorbancia con la presencia de la combinación de gp120 y NPP (0.3-5.0 mg/mL). Los datos obtenidos en el ELISA de captura de gp120, combinados con los resultados del ensayo de fusión basado en células, comprueban la hipótesis de que las NPP inhiben la infección del VIH-1 bloqueando la entrada viral , y muy en particular con la interacción gp120-CD4.

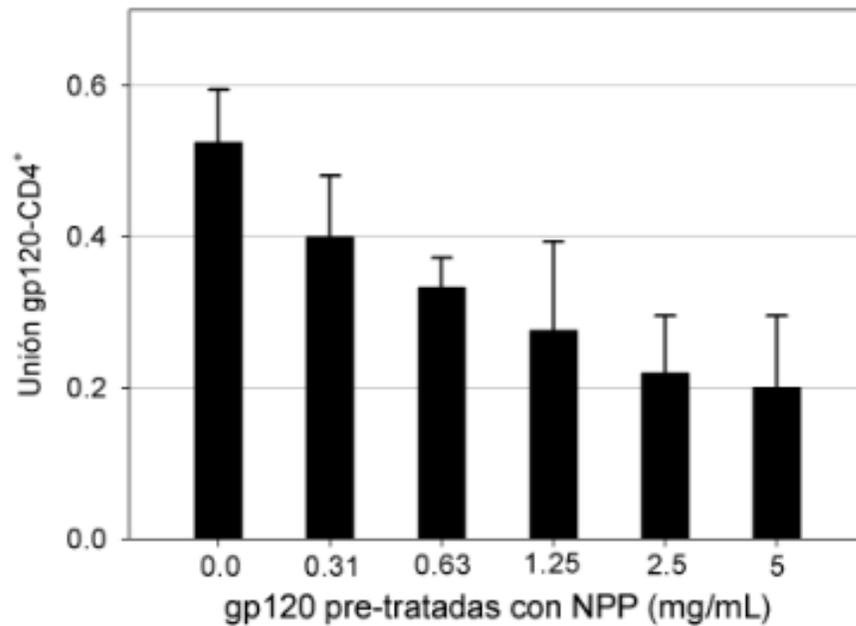


Figura 8. Inhibición de la interacción gp120-CD4. El grado de inhibición de la unión de las proteínas gp120-CD4 se evaluó en un ELISA gp120/CD4 en la presencia o ausencia de NPP. Gp120 fue expuesta a diluciones seriales de NPP por 10 minutos, y luego añadida a una placa con CD4 para medirse posteriormente a 450mn. El ensayo se realizó por duplicado; donde cada barra representa la media \pm la media del error estándar.

7.8. Inhibición según etapas del ciclo replicativo viral por las NPP

Para poder determinar el blanco de acción de las NPP, implementamos el llamado experimento por adición en tiempos o por sus siglas en inglés (TAE), el cual se realiza durante el ciclo replicativo del virus. El TAE se utiliza para delimitar la etapa del ciclo replicativo viral donde hay un bloqueo por parte de las NPP. Las células HeLa (expresan CD4, CXCR4 y CCR5) fueron infectadas con virus libre HIV-1_{IIIB} primero y después se adicionaron los antirretrovirales: NPP (1.0 mg/mL), Tak-779 (2.0 μ M), AZT (20.0 μ M), Indinavir (0.25 μ M), o 118-D-24 (100.0 μ M), en tiempo cero y a diversas horas después de la inoculación viral. Los medicamentos antirretrovirales fueron escogidos como controles ya que actúan en diferentes sitios del ciclo replicativo viral (fusión o entrada, transcripción reversa, actividad de proteasa, e integración al genoma). Como puede observarse en las Figuras 9,10,11 y 12, la actividad de Tak-779, AZT, Indinavir, y 118-D-24 empieza su actividad de inhibición viral posteriormente de que se pasa la etapa del ciclo replicativo en el cual hacen blanco, por lo tanto, la actividad de inhibición de los inhibidores de fusión empieza a declinar después de las 2 horas (Figura 9), los inhibidores de transcriptasa reversa declinan después de 4 horas (figura 10), los inhibidores de la proteasa declinan después de las 7 horas (Figura 11), y los inhibidores de integrasa declinan su actividad antiviral después de 12 horas (Figura 12). En contraste, las NPP tienen la capacidad de retener su actividad antiviral hasta después de 1 hora de haber inoculado el virus. Estos resultados muestran que las NPP

intervienen en otras etapas del ciclo replicativo viral, no únicamente en el de fusión o entrada

Estas etapas del ciclo replicativo viral que son inhibidas incluyen fusión o entrada e integración al genoma de la célula huésped.

7.9. Actividad virucida de las NPP

Para estudiar el efecto de las NPP contra virus libre tratado con diferentes dosis de NPP. Los virus libres y los virus asociadas a células están presentes en el semen y secreciones cervicovaginales y son infecciosos permitiendo transmitirse a través de la barrera mucosa del cérvix. Se cuantificó la infectividad residual después de tratarse con NPP a diferentes dosis por un ensayo de luciferasa de virus libres de células (un T trópico y un M-trópico). Como se muestra en la Figuras 13,14 y 15 el virus VIH-_{111B} y el VIH-1_{Bal} disminuyeron la infectividad de las partículas virales después de 5 minutos de exposición a las NPP. El efecto de inhibición de la infección aumentó al exponerse los virus por 60 minutos a las NPP, por lo que demostramos que las NP actúan directo en el virión, inactivándolo.

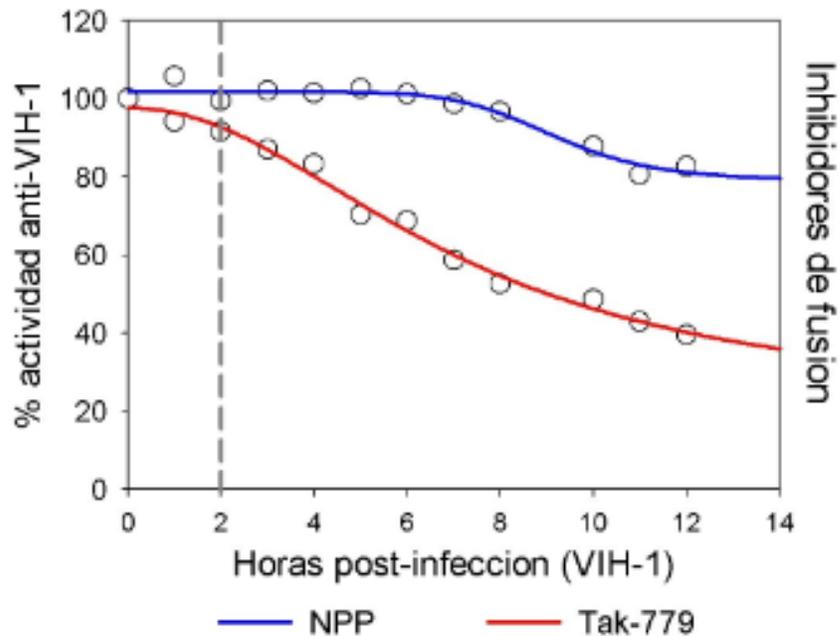


Figura 9. Experimentos por adición en tiempos con NPP contra inhibidor de fusión. Las células HeLa-CD4-LTR- β -gal infectadas (VIH_{III}B) fueron expuestas a NPP (1 mg/mL) inhibidores de fusión (Tak-799, 2.0 μ M), en diferentes tiempos (horas). La línea punteada indica el momento cuando las NPP y el antirretroviral difieren. El ensayo se realizó por triplicado; cada punto representa la media y la líneas de color son las curvas de regresión no lineal realizadas mediante el software Sigma Plot 10.0. A las 2 horas empieza a decaer la inhibición del medicamento.

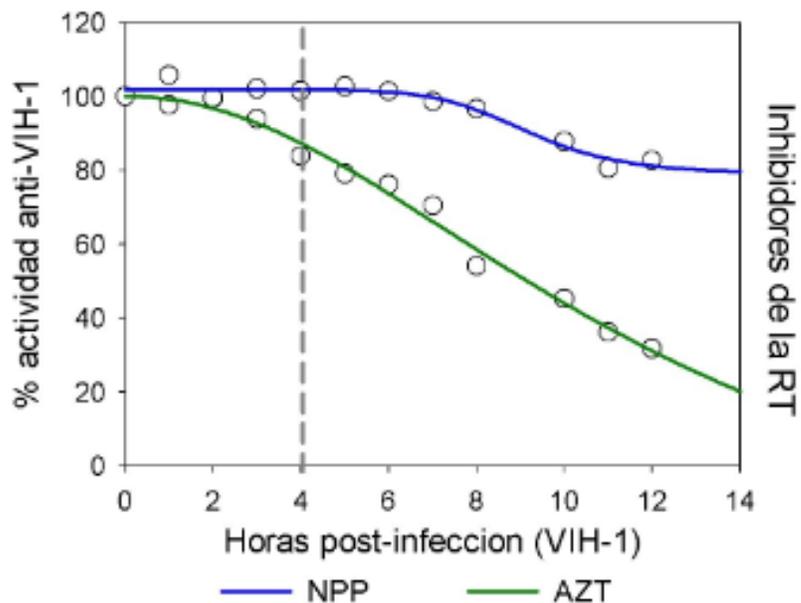


Figura 10. Experimentos por adición en tiempos con NPP contra inhibidores de RT. Las células HeLa-CD4-LTR- β -gal infectadas (VIH_{III}B) fueron expuestas a NPP (1 mg/mL) y inhibidores de RT (AZT, 20 μ M), en diferentes tiempos (horas). La actividad de las NPP fue comparada con este antirretroviral. La línea punteada indica el momento cuando las NPP y el antirretroviral difieren. El ensayo se realizó por triplicado; cada punto representa la media y las líneas de color son las curvas de regresión no lineal realizadas mediante el software Sigma Plot 10.0. En este caso a las 4 horas empieza a decaer la actividad de inhibición viral de los RT, la actividad de las NPP se mantienen en ese lapso de tiempo del ciclo replicativo viral.

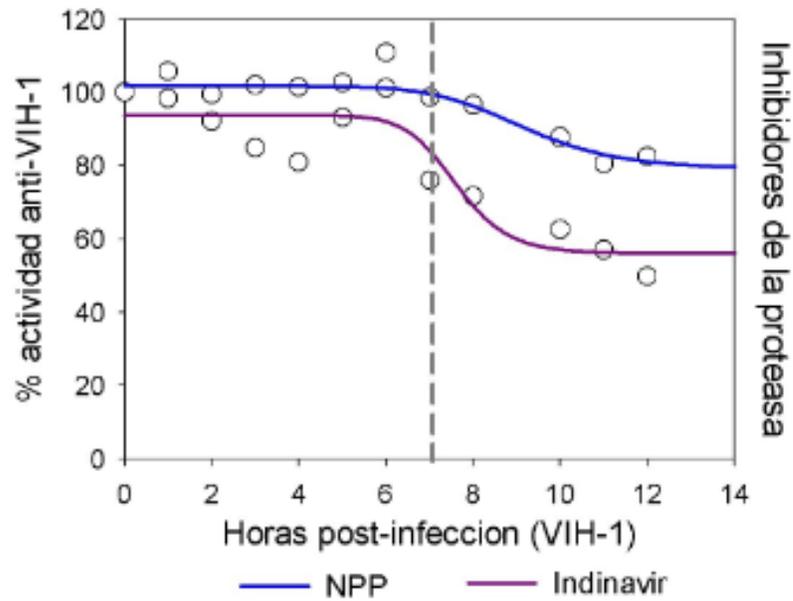


Figura 11. Experimentos por adición en tiempos con NPP contra inhibidores de proteasa. Las células HeLa-CD4-LTR- β -gal infectadas (VIH_{III}B) fueron expuestas a NPP (1 mg/mL) y inhibidores de proteasa (Indinavir, 0.25 μ M) en diferentes tiempos (horas). La actividad de las NPP fue comparada con este antirretroviral. La línea punteada indica el momento cuando las NPP y el antirretroviral difieren. El ensayo se realizó por triplicado; cada punto representa la media y las líneas de color son las curvas de regresión no lineal realizadas mediante el software Sigma Plot 10.0. En este caso a las 7 horas empieza a decaer la actividad de inhibición viral de los inhibidores de proteasa (Indinavir, 0.25 μ M).

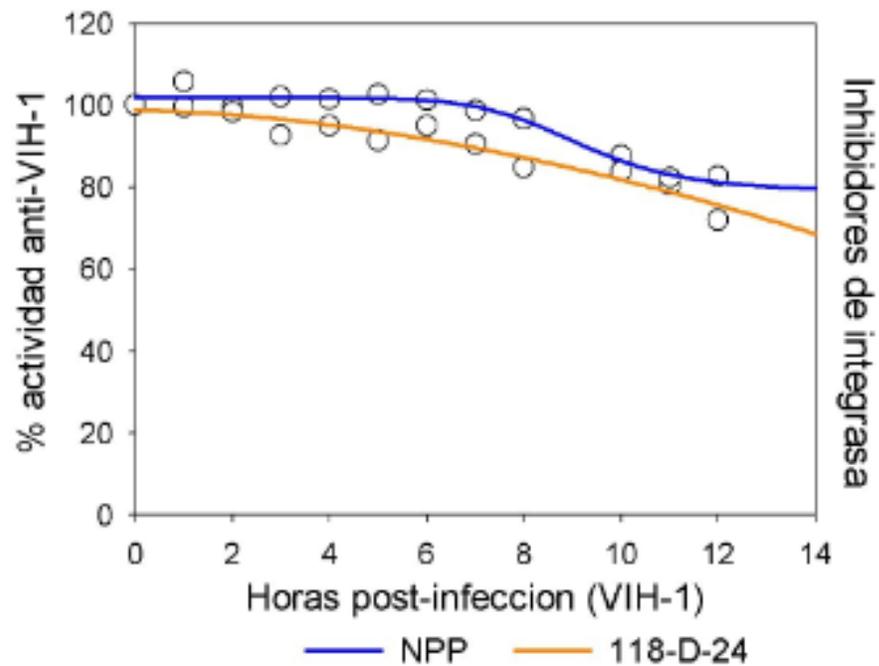


Figura 12. Experimentos por adición en tiempos con NPP contra inhibidores de integrasa. Las células HeLa-CD4-LTR- β -gal infectadas (VIH_{III}B) fueron expuestas a NPP (1 mg/mL) o inhibidores de integrasa (118-D-24, 100 μ M) en diferentes tiempos (horas). La actividad de las NPP fue comparada con este antirretroviral. La línea punteada indica el momento cuando las NPP y el antirretroviral difieren. El ensayo se realizó por triplicado; cada punto representa la media y las líneas de color son las curvas de regresión no lineal realizadas mediante el software Sigma Plot 10.0. En este caso a las 14 horas se aprecia que ambos compuestos actúan en forma similar.

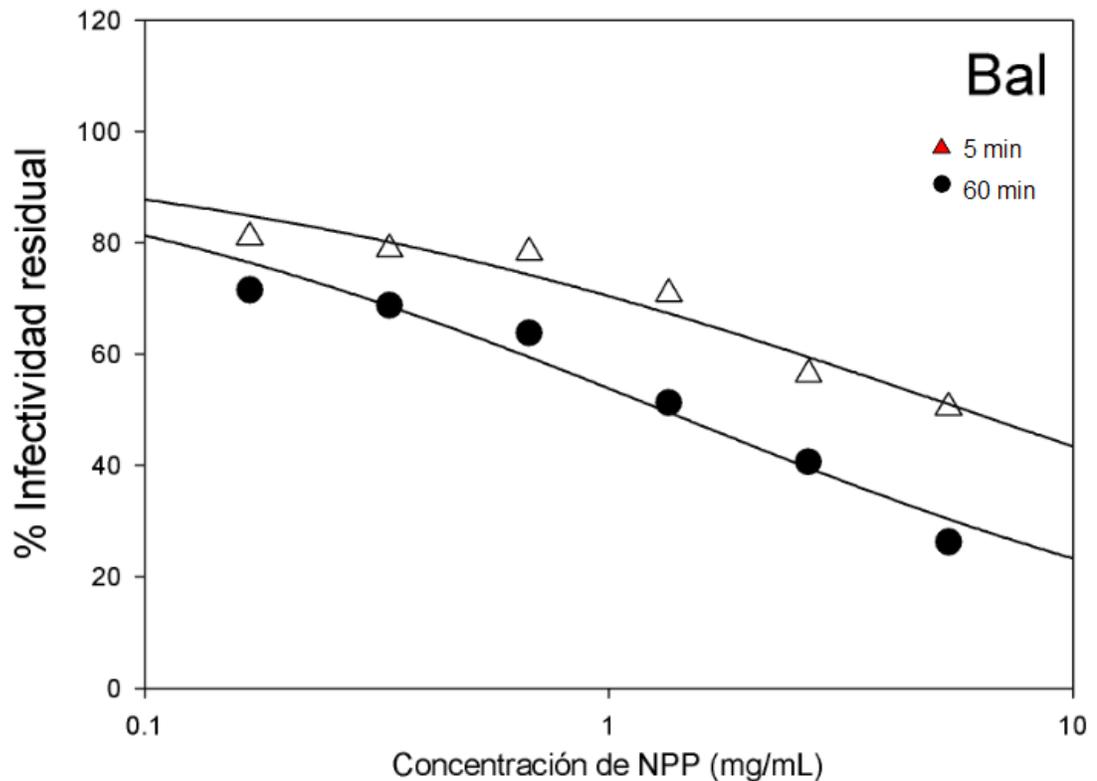


Figura 13. Actividad virucida de las NPP contra cepas de VIH-1 M-Trópicos

Diluciones seriadas de NPP fueron agregadas a 10^5 TCID₅₀ del VIH-1_{Bal} virus libre no asociado a células a 0.2-0.5 m.o.i. Después de la incubación por 5 min y 60 min, las mezclas fueron centrifugadas a 10,000 rpm. El sobrenadante fue desechado y el concentrado fue lavado 3 veces. Finalmente el concentrado fue colocado en los pocillos de las placas de 96 con células HeLa-CD4-LTR-β-gal. El ensayo de infección viral se realizó mediante un ensayo basado en luciferasa. El porcentaje de infectividad residual después del tratamiento con las NPP fue calculado respecto al control positivo (virus no tratado con NPP). El ensayo se realizó por triplicado; donde cada punto representa la media y las líneas continuas son las curvas de regresión no lineal realizadas mediante el software Sigma Plot 10.

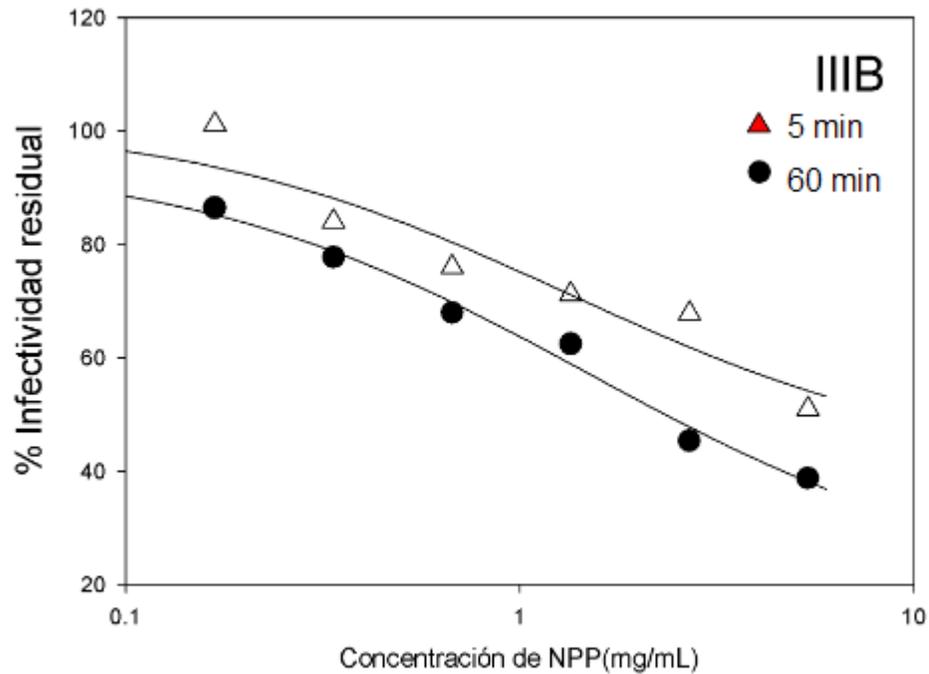


Figura 14. Actividad virucida de las NPP contra virus T trópicos. Diluciones seriadas de NPP fueron agregadas a 10^5 TCID₅₀ de VIH-1_{IIB} virus libre a 0.2-0.5 m.o.i. Después de la incubación por 5 min y 60 min, las mezclas fueron centrifugadas a 10,000 rpm. El sobrenadante fue desechado y el concentrado fue lavado 3 veces. Finalmente el concentrado fue colocado en los pocillos de las placas de 96 con células HeLa-CD4-LTR-β-gal. El ensayo de infección viral se realizó mediante un ensayo basado en luciferasa. El porcentaje de infectividad residual después del tratamiento con las NPP fue calculado respecto al control positivo (virus no tratado con NPP). El ensayo se realizó por triplicado; donde cada punto representa la media y las líneas continuas son las curvas de regresión no lineal realizadas mediante el software Sigma Plot 10.

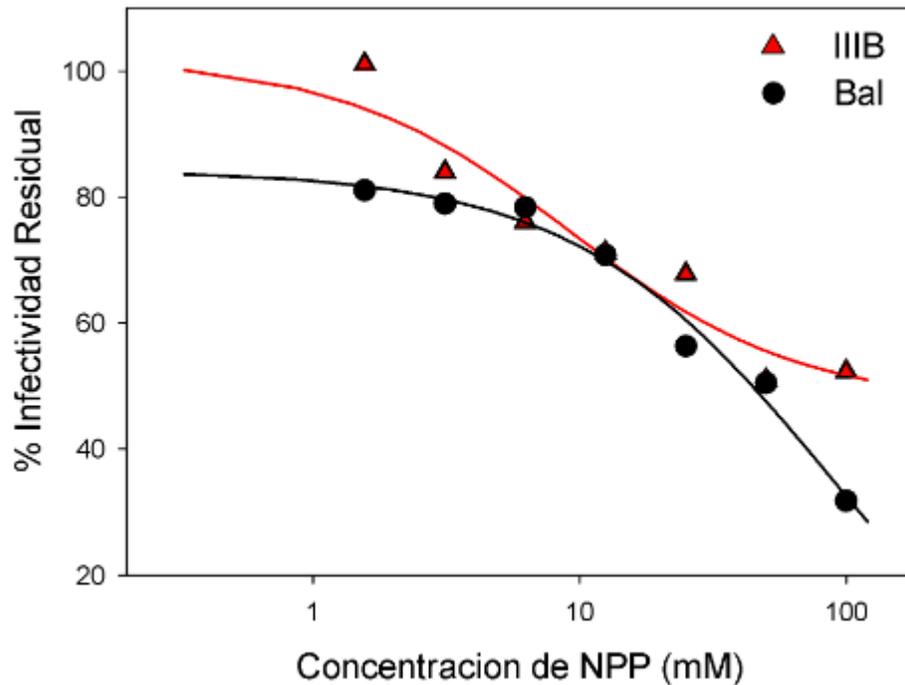


Figura 15. Actividad virúcida de las NPP contra los virus T y M trópicos.

Diluciones seriadas de NPP fueron agregadas a 10^5 TCID₅₀ de VIH-1_{IIB} y VIH-1_{Bal} virus libre a 0.2-0.5 m.o.i. Después de la incubación por 5 min y 60 min, las mezclas fueron centrifugadas a 10,000 rpm. El sobrenadante fue desechado y el concentrado fue lavado 3 veces. Finalmente el concentrado fue colocado en los pocillos de las placas de 96 con células HeLa-CD4-LTR-β-gal. El ensayo de infección viral se realizó mediante un ensayo basado en luciferasa. El porcentaje de infectividad residual después del tratamiento con las NPP fue calculado respecto al control positivo (virus no tratado con NPP). El ensayo se realizó por triplicado; donde cada punto representa la media y las líneas continuas son las curvas de regresión no lineal realizadas mediante el software Sigma Plot 10.

7.10. Inhibición de la infección de VIH-1 asociado a células crónicamente infectadas

Las NPP también fueron efectivas contra la transmisión de la infección del VIH-1 por medio de los virus asociados a células, utilizando células infectadas crónicamente con el VIH-1, como los linfocitos polimorfonucleares y las células H9⁺ (línea celular de linfocitos humanos). Se logró la inhibición de la infección en un 50% aun cuando las NPP fueron únicamente expuestas por 1 minuto a las células infectadas (Figuras 16 y 17).

A

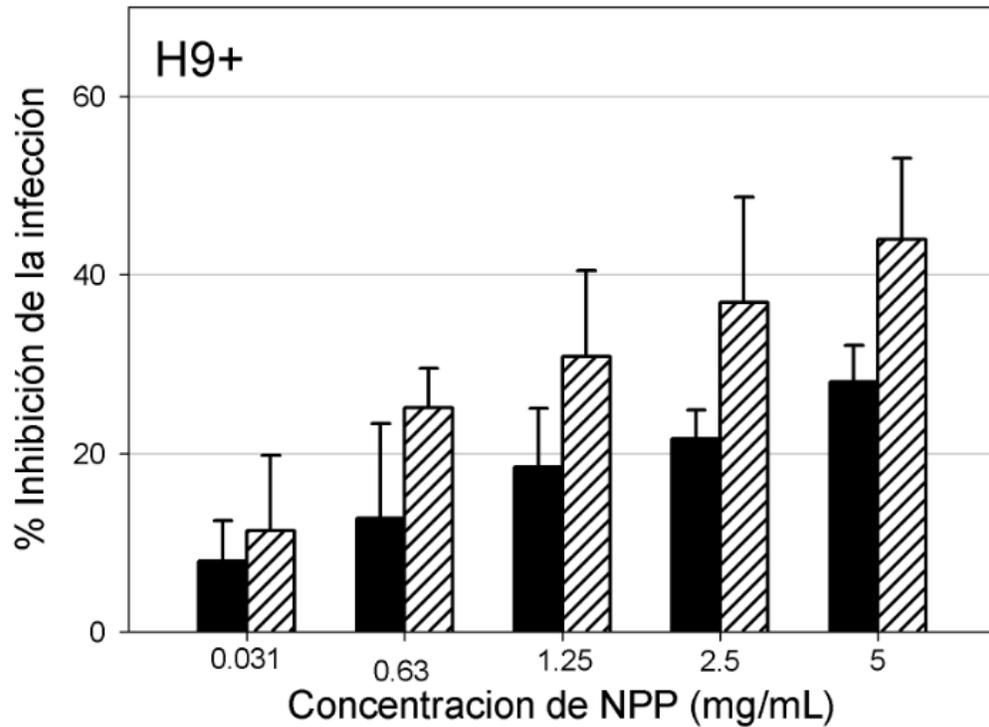


Figura 16. Inhibición de la infectividad del VIH-1 asociado a células. Infección crónica del VIH-1 asociado a la línea celular crónicamente infectada H9+, son incubadas con diluciones seriadas de NPP por 1 min y 60 min. Las células tratadas fueron centrifugadas y lavadas 3 veces con medio, y después se agregaron estas células para cocultivarlas a las células indicadoras TZM-bl se incubaron a 37°C por 72 horas. El ensayo de la infección del VIH-1 se cuantificó mediante un ensayo con luciferasa. El ensayo se realizó por triplicado, las barras indican la media \pm la media del error estándar.

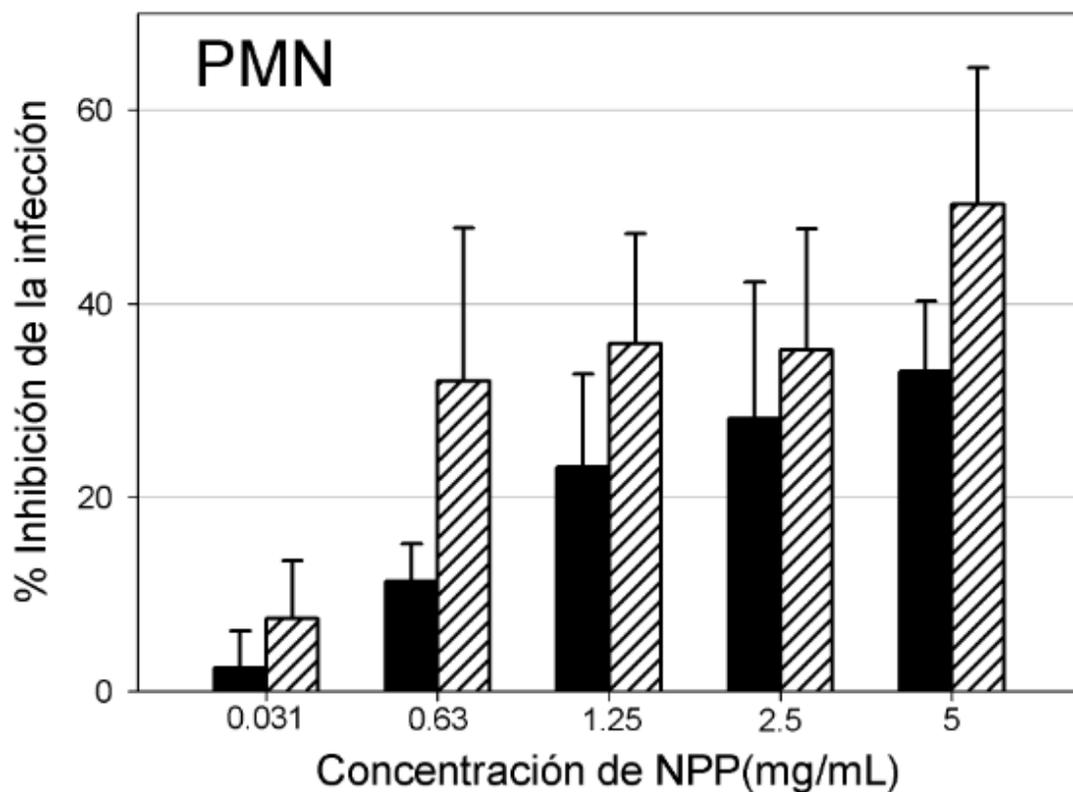


Figura 17. Inhibición de la infectividad del VIH-1 asociado a células. Las células polimorfonucleares o PMN fueron incubadas con diluciones seriadas de NPP por 1min y 60 min. Las células tratadas fueron centrifugadas y lavadas 3 veces con medio, y después se agregaron a las células indicadoras TZM-bl e incubadas a 37 °C. El ensayo de la infección del VIH-1 se hizo mediante un ensayo con luciferasa después de 48h. El ensayo se realizó por triplicado; donde las barras indican la media \pm la media del error estándar.

8.0 DISCUSIÓN

Las NPP han probado ser un agente antiviral contra el VIH-1, pero su mecanismo de acción contra la infección del VIH-1 no había sido comprobado. Nos planteamos varias interrogantes: ¿es la gp120 el principal blanco de las NPP?, ¿las NPP actúan como inhibidores de entrada? Investigamos los mecanismos de acción de las NPP contra el VIH-1. Nuestros resultados demuestran, por primera vez que las NPP actúan en la etapa temprana de replicación viral del VIH-1 como un agente virucida o inhibidor de entrada en un rango de concentración no tóxico.

No encontramos diferencias significativas en las actividades de inhibición de la infección del VIH-1 de diferentes cepas resistentes a medicamentos antirretrovirales (Tabla 1), así que las mutaciones en las cepas de VIH-1 que confieren a estas la resistencia no afectan la eficacia de las nanopartículas de plata. Estos resultados concuerdan con hallazgos previos de Lara HH y colaboradores, donde se ha comprobado que las NPP son biocidas de amplio espectro (Ayala-Núñez *et al.*, 2009; Lara *et al.*, 2010; Neurath *et al.*, 2001; Lara *et al.*, 2009)

Las cepas de VIH-1 que se han encontrado en la población infectada puede diferir ampliamente en su patogenicidad, virulencia y sensibilidad a los medicamentos antirretrovirales (Spira *et al.*, 2003). El hecho de que las NPP inhiban a una variedad de cepas las hace efectivas como agentes de amplio espectro contra el VIH-1. Esta

propiedad en particular puede reducir la posibilidad de emergencia de resistencias del virus y su subsecuente proliferación.

Las NPP además inhibieron una variedad de cepas VIH-1 sin que el tropismo del virus impidiera de algún modo la inhibición (Tabla IV). La variabilidad de la gp120 entre las cepas del VIH-1 es el mayor determinante por el cual varía el tropismo de las cepas del VIH-1, con el asa del V3 de la gp120 que reconoce los receptores de las quimiosinas tanto las CXCR4 (virus T-trópico), CCR5 (virus M-trópico), o para ambos o virus dual trópico (Chavda *et al.*, 1994). El hecho de que las NPP inhiben las cepas virales que se probaron nos indica que su mecanismo de acción no depende del determinante de su tropismo viral. En estudios anteriores se postuló que las NPP tienen una interacción específica contra el VIH-1 uniéndose de forma específica a la gp120 (Elechiguerra *et al.*, 2005a). Nuestros resultados muestran que la inhibición por las NPP no depende en la gp120 de la región del asa V3 la cual contiene cargas positivas lo que contribuye en su papel determinante del tropismo hacia los correceptores celulares (Naganawa *et al.*, 2008). Las NPP también tienen cargas positivas, por lo que el Asa V3 no sería su sitio preferido de interacción, por lo tanto las NPP pudieran actuar como inhibidoras de la unión impidiendo la interacción gp120-CD4, en vez de ser inhibidoras o antagonistas de los correceptores los cuales interfieren con el contacto gp120-CXCR4/CCR5 (Borkow and Lapidot, 2005a).

En el ensayo de adsorción viral se demostró que el mecanismo de acción contra el VIH-1 está basado en la inhibición de la etapa inicial del ciclo replicativo viral. Además, con la captura de gp120 en el ensayo de ELISA (Figura 8), y con los resultados del estudio de fusión basado en células (Figura 6 -7), apoya la hipótesis de

que las NPP inhiben la infección viral bloqueando la entrada del virus a la célula, particularmente en la interacción gp120-CD4. Observaciones previas en microscopía electrónica apoyan aun más esta hipótesis ya que las NPP se distribuyeron e la membrana viral (Borkow and Lapidot, 2005a; Elechiguerra et al., 2005c). Si las NPP no se unen al asa V3 por tener cargas positivas, entonces interactúan con la cavidad negativa del gp120 (Kwong *et al.*, 1998), la cual se une al CD4. La interacción entre la CD4 y la Gp120 es electrostática (Wyatt and Sodroski, 1998). Además las NPP pudieran interactuar con los dos disulfuros localizados en la mitad carboxílico de la glicoproteína gp120 del VIH-1, un área que se ha relacionado con la unión al receptor CD4 (Lekutis *et al.*, 1992).

Las NPP demostraron actuar rápidamente inhibiendo la fusión en un ensayo basado en células fusogénicas, siendo este un ensayo que mide fusión de gp120 con las células indicadoras CD4, con lo que se puede medir que las NPP son virucidas que actúan en tan solo un minuto y además mantienen su capacidad inhibitoria, aun después de lavar las células hasta por una hora. Los virucidas para poder ser considerados microbicidas potenciales requieren de actuar rápidamente y mantener su capacidad de acción por tiempo prolongado (Zussman et al., 2003).

Los iones de plata se unen a los grupos sulfidrilo, lo cual produce a las proteínas su desnaturalización debido a la reducción de las uniones disulfuro (McDonnell, 2007). Por lo tanto nosotros concluimos que las NPP no solamente se unen a la gp120, sino que además modifican la proteína viral desnaturalizando sus uniones disulfuro las cuales están localizadas en la región de unión a la CD4. Esto correlaciona con nuestros resultados ya que las NPP disminuyen su capacidad infectiva del virus a

los 60 minutos comparada con 5 minutos de incubación a temperatura ambiente (Figura 13,14 y 15). Una vez que establecimos que el efecto de la inhibición de la infección del VIH-1 aumenta según aumenta el tiempo de incubación de las NPP contra el virus, es posible establecer que las NPP inicialmente se unen a las espículas gp120 inhibiendo la capacidad infectiva del virus modificando de forma irreversible la estructura de la membrana de envoltura viral. De cualquier forma se necesitaran más estudios para poder definir si las NPP se unen a la cavidad de carga negativa y en los 2 disulfuros localizados en la región de unión gp120 y CD4.

El desarrollo de resistencias virales pudieran ser un problema para la efectividad de compuestos diseñados contra la membrana de envoltura del VIH-1 debido al alto grado de substituciones en las regiones de la proteína Env , aunque las posiciones de los residuos de cisteína , el patrón de unión a los disulfuros en la gp120 y la habilidad de la gp120 para unirse a los receptores virales de la CD4 están altamente conservados en las diversas cepas de VIH-1, el desarrollo de resistencia hacia las NPP seria muy complicado . Comparando el efecto antiviral de las NPP medido por su índice terapéutico con dos sales de plata utilizadas ampliamente (AgSD y AgNO₃), se observó que los iones de plata por si mismo no son tan eficientes como las NPP, por lo tanto si se observa la actividad contra el VIH-1 fuera debido a los iones de plata, entonces el índice terapéutico hubiera sido menor para las NPP. La gran actividad de las NPP es debido a que estas se disuelven y liberan Ag⁰ (atómico) and racimos de Ag⁺ (iónico) mientras que las sales de plata solo libera Ag⁺ (Taylor *et al.*, 2005a).

El ensayo TAE confirma aun mas que las NPP son inhibidoras de entrada del virus (Figuras 9-12) , además se encontró que las NPP tienen otros sitios de

intervención en el ciclo replicativo viral además de ser un inhibidor de entrada o fusión, ya que los iones de plata forman complejos con grupos donadores de electrones que contienen sulfuro, oxígeno, o nitrógeno los cuales están normalmente presentes como tioles o fosfatos en los aminoácidos o ácidos nucleicos, ellos pudieran inhibir etapas posteriores del ciclo replicativo viral bloqueando así las proteínas del VIH-1 diferentes a la gp120 o reduciendo la transcriptasa reversa o la transcripción proviral uniéndose de forma directa a las moléculas de ARN o ADN.

Estudios recientes han demostrado que las NPP suprimen la expresión de TNF- α (Bhol and Schechter, 2005), la cual es una citocina que tiene un papel primordial en la patogénesis del VIH-1 incrementando su transcripción (Lawn et al., 2001; Taylor et al., 2005b). La inhibición de la transcripción activada de la TNF- α puede ser otro blanco de las NPP contra la infectividad del VIH-1. Teniendo así una gran cantidad de blancos contra la infección del VIH-1 en diversas etapas de los ciclos replicativos del virus, hace que las NPP sean agentes que difícilmente pueda permitir la aparición de cepas de virus resistente a las NPP.

Las NPP probaron ser virucidas tanto para virus libre de células como para los virus asociados a células como se puede deducir de los ensayos de infectividad viral. La infectividad es efectivamente eliminada posteriormente a una exposición corta de los aislados virales a las NPP. El tratamiento de las células crónicamente infectadas H9⁺ así como de los linfocitos polimorfonucleares resultó en un decremento en su infectividad.

Un agente virucida debe trabajar rápidamente para poder prevenir la infección a las células blanco que son vulnerable. Se define un agente retrovirucidal ideal es aquel que actúa rápidamente, actúa en las etapas de a replicación viral antes de que el virus se

integre al genoma proviral del ADN en la célula huésped, debe absorberse en las células sanas para proveer una barrera a la infección por virus activo residual, debe ser efectivo a dosis no tóxicas que pueda ser comparado *in vivo*. Las NPP actúan directamente en el virus en las etapas previniendo la integración dentro de la célula huésped, aunque se requieren de más pruebas farmacéuticas y toxicológicas en modelos animales para definir los parámetros de seguridad para el uso de las NPP como herramientas que prevengan la transmisión del virus (Borkow *et al.*, 1997; Taylor *et al.*, 2005b).

9. CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES

Para finalizar en este estudio se propone que la actividad antiviral de las NPP resulta de la inhibición de la interacción entre la GP120 y receptores de los blancos de la membrana celular CD4. De acuerdo a los resultados anteriormente expuestos este mecanismo de acción antiviral permite que las NPP inhiban la infección del VIH-1 sin importar su tropismo viral o el perfil de resistencia del virus a los antirretrovirales, uniéndose las nanopartículas a la GP120 de forma que prevengan su unión a las CD4, evitando la fusión, infectividad y además bloqueando tanto los virus VIH-1 libre de células como los que están asociados a células y por lo tanto actuando como virucida. En conclusión las NPP son virucidas efectivas ya que inactivan partículas de VIH en un periodo de tiempo muy corto, siendo su mecanismo de acción en una etapa temprana de la replicación viral (entrada o fusión) además en etapas posteriores a la entrada. La información presentada aquí contribuye a una área nueva que permanece ampliamente aun sin explorar; el uso de nanomateriales contra blancos específicos de partículas virales. Son necesarias pruebas *in vivo* sobre toxicidad, farmacocinética y farmacodinamia de las NPP. Pues se desconoce sobre la toxicología de las NPP en estudios animales.

11. LITERATURA CITADA

Aguilella,V.M. and Alcaraz,A. (2009). Nanobiotechnology: A fluid approach to simple circuits. *Nat. Nanotechnol.* 4, 403-404.

Aida,Y. (2007). [Nuclear import of retroviruses]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 52, 1214-1220.

Al-Jabri,A.A. and Alenzi,F.Q. (2009). Vaccines, virucides and drugs against HIV/AIDS: hopes and optimisms for the future. *Open. AIDS J.* 3, 1-3.

Alemayehu,Y.K., Bushen,O.Y., and Muluneh,A.T. (2009). Evaluation of HIV/AIDS clinical care quality: the case of a referral hospital in North West Ethiopia. *Int. J. Qual. Health Care* 21, 356-362.

Andiman,W.A., Chernoff,M.C., Mitchell,C., Purswani,M., Oleske,J., Williams,P.L., Spiegel,H., Gona,P., and Seage,G.R., III (2009). Incidence of persistent renal dysfunction in human immunodeficiency virus-infected children: associations with the use of antiretrovirals, and other nephrotoxic medications and risk factors. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 28, 619-625.

Arora,S., Jain,J., Rajwade,J.M., and Paknikar,K.M. (2008). Cellular responses induced by silver nanoparticles: In vitro studies. *Toxicol. Lett.* 179, 93-100.

Ayala-Nuñez,N.V., Lara,H.H., Ixtapan-Turrent,L., and Rodriguez-Padilla,C. (2009). Silver Nanoparticles Toxicity and Bactericidal Effect Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Nanoscale Does Matter . *J. Nanobiotechnology.*

Balin,S.J., Ross,T.M., Platt,J.L., and Cascalho,M. (2008). HIV genes diversify in B cells. *Curr. HIV Res.* 6, 10-18.

Balzarini,J., Naesens,L., Verbeken,E., Laga,M., Van,D.L., Parniak,M., Van,M.L., Anne,J., and De,C.E. (1998). Preclinical studies on thiocarboxanilide UC-781 as a virucidal agent. *AIDS* 12, 1129-1138.

Barnard,J., Borkow,G., and Parniak,M.A. (1997). The thiocarboxanilide nonnucleoside UC781 is a tight-binding inhibitor of HIV-1 reverse transcriptase. *Biochemistry* 36, 7786-7792.

Bhol,K.C. and Schechter,P.J. (2005). Topical nanocrystalline silver cream suppresses inflammatory cytokines and induces apoptosis of inflammatory cells in a murine model of allergic contact dermatitis. *Br. J. Dermatol.* *152*, 1235-1242.

Borkow,G., Barnard,J., Nguyen,T.M., Belmonte,A., Wainberg,M.A., and Parniak,M.A. (1997). Chemical barriers to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection: retrovirucidal activity of UC781, a thiocarboxanilide nonnucleoside inhibitor of HIV-1 reverse transcriptase. *J. Virol.* *71*, 3023-3030.

Borkow,G. and Lapidot,A. (2005a). Multi-targeting the entrance door to block HIV-1. *Curr. Drug Targets. Infect. Disord.* *5*, 3-15.

Borkow,G. and Lapidot,A. (2005b). Multi-targeting the entrance door to block HIV-1. *Curr. Drug Targets. Infect. Disord.* *5*, 3-15.

Borkow,G., Lara,H.H., and Lapidot,A. (2003). Mutations in gp41 and gp120 of HIV-1 isolates resistant to hexa-arginine neomycin B conjugate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *312*, 1047-1052.

Borkow,G., Sidwell,R.W., Smee,D.F., Barnard,D.L., Morrey,J.D., Lara-Villegas,H.H., Shemer-Avni,Y., and Gabbay,J. (2007). Neutralizing viruses in suspensions by copper oxide-based filters. *Antimicrob. Agents Chemother.* *51*, 2605-2607.

Centers for Disease Control. Emerging and Re-emerging Infectious Diseases 2002-2004. 2004. 10-10-2008.

Ref Type: Online Source

Chavda,S.C., Griffin,P., Han-Liu,Z., Keys,B., Vekony,M.A., and Cann,A.J. (1994). Molecular determinants of the V3 loop of human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp120 responsible for controlling cell tropism. *J. Gen. Virol.* *75 (Pt 11)*, 3249-3253.

Chen,X. and Schluesener,H.J. (2008). Nanosilver: a nanoparticle in medical application. *Toxicol. Lett.* *176*, 1-12.

Ciminale,V., Felber,B.K., Campbell,M., and Pavlakis,G.N. (1990). A bioassay for HIV-1 based on Env-CD4 interaction. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* *6*, 1281-1287.

Cox,L.E. (2009). Predictors of medication adherence in an AIDS clinical trial: patient and clinician perceptions. *Health Soc. Work* *34*, 257-264.

Cutler,B. and Justman,J. (2008). Vaginal microbicides and the prevention of HIV transmission. *Lancet Infect. Dis.* *8*, 685-697.

Dar,M.J., Monel,B., Krishnan,L., Shun,M.C., Di,N.F., Helland,D.E., and Engelman,A. (2009). Biochemical and virological analysis of the 18-residue C-terminal tail of HIV-1 integrase. *Retrovirology* *6*, 94.

De,C.E. (2001). New developments in anti-HIV chemotherapy. *Farmacology* *56*, 3-12.

- De,C.E. (2002). New developments in anti-HIV chemotherapy. *Biochim. Biophys. Acta* 1587, 258-275.
- De,C.E. (2007). Anti-HIV drugs. *Verh. K. Acad. Geneesk. Belg.* 69, 81-104.
- Diazgranados,C.A., Mantilla,M., and Lenis,W. (2009). Antiretroviral drug resistance in HIV-infected patients in Colombia. *Int. J. Infect. Dis.*
- Dubey,V., Mishra,D., Nahar,M., Jain,V., and Jain,N.K. (2010). Enhanced transdermal delivery of an anti HIV agent via ethanolic liposomes. *Nanomedicine.*
- Dunn,K. and Edwards-Jones,V. (2004). The role of Acticoat with nanocrystalline silver in the management of burns. *Burns* 30 *Suppl 1*, S1-S9.
- Dunn,P.M. (2000). Dr Carl Crede (1819-1892) and the prevention of ophthalmia neonatorum. *Arch. Dis. Child Fetal Neonatal Ed* 83, F158-F159.
- Dvaranauskaite,L., Velyvyte,D., Kurklietyte,V., Gumbelevicius,A., Keleras,E., Laiskonis,A., and Mickiene,A. (2009). [Acquired Immunodeficiency Syndrome and opportunistic infections]. *Medicina (Kaunas.)* 45, 929-935.
- Elechiguerra,J.L., Burt,J.L., Morones,J.R., Camacho-Bragado,A., Gao,X., Lara,H.H., and Yacaman,M.J. (2005a). Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. *J. Nanobiotechnology.* 3, 6.
- Elechiguerra,J.L., Burt,J.L., Morones,J.R., Camacho-Bragado,A., Gao,X., Lara,H.H., and Yacaman,M.J. (2005b). Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. *J. Nanobiotechnology.* 3, 6.
- Elechiguerra,J.L., Burt,J.L., Morones,J.R., Camacho-Bragado,A., Gao,X., Lara,H.H., and Yacaman,M.J. (2005c). Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. *J. Nanobiotechnology.* 3, 6.
- Eron,J.J. and Hogan,C.M. (2002a). Entry and Fusion Inhibitors: and Update. *The PRN Notebook* 7, 16-22.
- Eron,J.J. and Hogan,C.M. (2002b). Entry and Fusion Inhibitors: and Update. *The PRN Notebook* 7, 16-22.
- Esimone,C.O., Eck,G., Nworu,C.S., Hoffmann,D., Uberla,K., and Proksch,P. (2009). Dammarenolic acid, a secodammarane triterpenoid from *Aglaia* sp. shows potent anti-retroviral activity in vitro. *Phytomedicine.*
- Este,J.A. and Telenti,A. (2007). HIV entry inhibitors. *Lancet* 370, 81-88.
- Fadeel,B., Kasemo,B., Malmsten,M., and Stromme,M. (2010). Nanomedicine: reshaping clinical practice. *J. Intern. Med.* 267, 2-8.

Feldkamp,U. (2009). CANADA: Designing nucleic acid sequences for nanobiotechnology applications. *J. Comput. Chem.*

Furukawa,A., Nagata,T., Matsugami,A., Habu,Y., Sugiyama,R., Hayashi,F., Kobayashi,N., Yokoyama,S., Takaku,H., and Katahira,M. (2009). Structure, interaction and real-time monitoring of the enzymatic reaction of wild-type APOBEC3G. *EMBO J.* 28, 440-451.

Gadeberg,O.V., Bollerup,A.C., Kolmos,H.J., Larsen,S.O., and Lind,I. (1991). [Neonatal conjunctivitis after the abolition of compulsory Crede prophylaxis]. *Ugeskr. Laeger* 153, 284-288.

Gallo,R.C. (2006). A reflection on HIV/AIDS research after 25 years. *Retrovirology* 3, 72.

Gershon,A.A., Levin,M.J., Weinberg,A., Song,L.Y., LaRussa,P.S., Steinberg,S.P., and Bartlett,P. (2009). A phase I-II study of live attenuated varicella-zoster virus vaccine to boost immunity in human immunodeficiency virus-infected children with previous varicella. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 28, 653-655.

Gitai,L.L., Jalali,P.S., and Takayanagui,O.M. (2009). Neurosyphilis in the age of AIDS: clinical and laboratory features. *Neurol. Sci.* 30, 465-470.

Gouws,E., Stanecki,K.A., Lyerla,R., and Ghys,P.D. (2008). The epidemiology of HIV infection among young people aged 15-24 years in southern Africa. *AIDS* 22 *Suppl* 4, S5-16.

Gronlund,J., Kaspersen,P., Kristiansen,F.V., Hansen,K.B., and Moller,B.R. (1987). [Neonatal eye infection following cessation of Crede prophylaxis]. *Ugeskr. Laeger* 149, 3399-3400.

Guillen,S., Garcia San,M.L., Resino,S., Bellon,J.M., Gonzalez,I., Jimenez de,O.S., Munoz-Fernandez,M.A., Navarro,M.L., Gurbindo,M.D., de Jose,M.I., Mellado,M.J., Martin-Fontelos,P., Gonzalez-Tome,M.I., Martinez,J., Beceiro,J., Roa,M.A., and Ramos,J.T. (2009). Opportunistic infections and organ-specific diseases in HIV-1-infected children: a cohort study (1990-2006). *HIV Med.*

He,Y., Cheng,J., Li,J., Qi,Z., Lu,H., Dong,M., Jiang,S., and Dai,Q. (2008a). Identification of a critical motif for the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) gp41 core structure: implications for designing novel anti-HIV fusion inhibitors. *J. Virol.* 82, 6349-6358.

He,Y., Cheng,J., Lu,H., Li,J., Hu,J., Qi,Z., Liu,Z., Jiang,S., and Dai,Q. (2008b). Potent HIV fusion inhibitors against Enfuvirtide-resistant HIV-1 strains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105, 16332-16337.

Henao-Mejia,J., Liu,Y., Park,I.W., Zhang,J., Sanford,J., and He,J.J. (2009). Suppression of HIV-1 Nef translation by Sam68 mutant-induced stress granules and nef mRNA sequestration. *Mol. Cell* 33, 87-96.

Hillis,D.M. (2000). AIDS. Origins of HIV. *Science* 288, 1757-1759.

Hombrouck,A., Van,R.B., Michiels,M., Noppe,W., Christ,F., Eneroth,A., Sahlberg,B.L., Benkestock,K., Vrang,L., Johansson,N.G., Barreca,M.L., De,L.L., Ferro,S., Chimirri,A., Debyser,Z.,

and Witvrouw,M. (2008). Preclinical evaluation of 1H-benzylindole derivatives as novel human immunodeficiency virus integrase strand transfer inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* *52*, 2861-2869.

Huang,J., Wang,F., Argyris,E., Chen,K., Liang,Z., Tian,H., Huang,W., Squires,K., Verlinghieri,G., and Zhang,H. (2007). Cellular microRNAs contribute to HIV-1 latency in resting primary CD4+ T lymphocytes. *Nat. Med.* *13*, 1241-1247.

Huet,T., Kerbarh,O., Schols,D., Clayette,P., Gauchet,C., Dubreucq,G., Vincent,L., Bompais,H., Mazinghien,R., Querolle,O., Salvador,A., Lemoine,J., Lucidi,B., Balzarini,J., and Petitou,M. (2010). Long-lasting enfuvirtide carrier pentasaccharide conjugates with potent anti-human immunodeficiency virus type 1 activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* *54*, 134-142.

Izumi,K., Kodama,E., Shimura,K., Sakagami,Y., Watanabe,K., Ito,S., Watabe,T., Terakawa,Y., Nishikawa,H., Sarafianos,S.G., Kitaura,K., Oishi,S., Fujii,N., and Matsuoka,M. (2009). Design of peptide-based inhibitors for human immunodeficiency virus type 1 strains resistant to T-20. *J. Biol. Chem.* *284*, 4914-4920.

Ji,C., Kopetzki,E., Jekle,A., Stubenrauch,K.G., Liu,X., Zhang,J., Rao,E., Schlothauer,T., Fischer,S., Cammack,N., Heilek,G., Ries,S., and Sankuratri,S. (2009). CD4-anchoring HIV-1 fusion inhibitor with enhanced potency and in vivo stability. *J. Biol. Chem.* *284*, 5175-5185.

Joint United Nations Programme on HIV AIDS (UNAIDS). Report on the global AIDS epidemic. 2008a. Geneva, Switzerland.

Ref Type: Report

Joint United Nations Programme on HIV AIDS (UNAIDS). Report on the global AIDS epidemic. 2008b. Geneva, Switzerland.

Ref Type: Report

Kamimura,M. and Oka,S. (2009). [HIV infection/AIDS]. *Nippon Rinsho* *67*, 119-124.

Kawamura,M., Sakai,H., and Adachi,A. (1993). [Structure and function of HIV genes]. *Nippon Rinsho* *51 Suppl*, 31-36.

Kiertiburanakul,S. and Sungkanuparph,S. (2009). Emerging of HIV drug resistance: epidemiology, diagnosis, treatment and prevention. *Curr. HIV Res.* *7*, 273-278.

Klippstein,R. and Pozo,D. (2010). Nanotechnology-based manipulation of dendritic cells for enhanced immunotherapy strategies. *Nanomedicine*.

Kokura,S., Handa,O., Takagi,T., Ishikawa,T., Naito,Y., and Yoshikawa,T. (2010). Ag nanoparticles as a safe preservative for use in cosmetics. *Nanomedicine*.

Kumari A, Kumar P, Ajayan PM, and John G (2008). Silver-nanoparticle-embedded antimicrobial paints based on vegetable oil. *Nature Materials* *7*.

- Kwong,P.D., Wyatt,R., Robinson,J., Sweet,R.W., Sodroski,J., and Hendrickson,W.A. (1998). Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* 393, 648-659.
- Lara,H.H., Ayala-Nuñez,N.V., Ixtepan-Turrent,L., and Rodriguez-Padilla,C. (2009). Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*.
- Lara,H.H., Ayala-Nuñez,N.V., Ixtepan-Turrent,L., and Rodriguez-Padilla,C. (2010). Mode of antiviral action of silver nanoparticles against HIV-1. *J. Nanobiotechnology*.
- Lawn,S.D., Butera,S.T., and Folks,T.M. (2001). Contribution of immune activation to the pathogenesis and transmission of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clin Microbiol. Rev* 14, 753-77, table.
- Lekutis,C., Olshevsky,U., Furman,C., Thali,M., and Sodroski,J. (1992). Contribution of disulfide bonds in the carboxyl terminus of the human immunodeficiency virus type I gp120 glycoprotein to CD4 binding. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 5, 78-81.
- Levy,J.A. (1993a). Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiol. Rev* 57, 183-289.
- Levy,J.A. (1993b). Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiol. Rev* 57, 183-289.
- Levy,J.A. (2009). HIV pathogenesis: 25 years of progress and persistent challenges. *AIDS* 23, 147-160.
- Lightfoot,M.A. and Milburn,N.G. (2009). HIV prevention and African American youth: examination of individual-level behaviour is not the only answer. *Cult. Health Sex* 1.
- Lin,P.F., Blair,W., Wang,T., Spicer,T., Guo,Q., Zhou,N., Gong,Y.F., Wang,H.G., Rose,R., Yamanaka,G., Robinson,B., Li,C.B., Fridell,R., Deminie,C., Demers,G., Yang,Z., Zadjura,L., Meanwell,N., and Colonna,R. (2003). A small molecule HIV-1 inhibitor that targets the HIV-1 envelope and inhibits CD4 receptor binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 11013-11018.
- Lu,L., Sun,R.W., Chen,R., Hui,C.K., Ho,C.M., Luk,J.M., Lau,G.K., and Che,C.M. (2008). Silver nanoparticles inhibit hepatitis B virus replication. *Antivir. Ther.* 13, 253-262.
- Makinson,A. and Reynes,J. (2009). The fusion inhibitor enfuvirtide in recent antiretroviral strategies. *Curr. Opin. HIV AIDS* 4, 150-158.
- Mascolini,M., Larder,B.A., Boucher,C.A., Richman,D.D., and Mellors,J.W. (2008). Broad advances in understanding HIV resistance to antiretrovirals: report on the XVII International HIV Drug Resistance Workshop. *Antivir. Ther.* 13, 1097-1113.
- Masuda,M. (2007). [HIV replication and host cell cycle]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 52, 1161-1167.

- McDonnell,G.E. (2007). Chemical Disinfection. In *Antisepsis, disinfection, and sterilization*, pp. 111-115.
- McElrath,M.J., Ballweber,L., Terker,A., Kreger,A., Sakchalathorn,P., Robinson,B., Fialkow,M., Lentz,G., and Hladik,F. (2010). Ex Vivo Comparison of Microbicide Efficacies for Preventing HIV-1 Genomic Integration in Intraepithelial Vaginal Cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* *54*, 763-772.
- McGee,E.M. (2009). Nanomedicine: ethical concerns beyond diagnostics, drugs, and techniques. *Am. J. Bioeth.* *9*, 14-15.
- McNeil,S.E. (2005a). Nanotechnology for the biologist. *J. Leukoc. Biol.* *78*, 585-594.
- McNeil,S.E. (2005b). Nanotechnology for the biologist. *J. Leukoc. Biol.* *78*, 585-594.
- Naganawa,S., Yokoyama,M., Shiino,T., Suzuki,T., Ishigatsubo,Y., Ueda,A., Shirai,A., Takeno,M., Hayakawa,S., Sato,S., Tochikubo,O., Kiyoura,S., Sawada,K., Ikegami,T., Kanda,T., Kitamura,K., and Sato,H. (2008). Net positive charge of HIV-1 CRF01_AE V3 sequence regulates viral sensitivity to humoral immunity. *PLoS. One.* *3*, e3206.
- Neurath,A.R., Strick,N., Li,Y.Y., and Debnath,A.K. (2001). Cellulose acetate phthalate, a common pharmaceutical excipient, inactivates HIV-1 and blocks the coreceptor binding site on the virus envelope glycoprotein gp120. *BMC Infect. Dis.* *1*, 17.
- Noor,M.A. (2007). The role of protease inhibitors in the pathogenesis of HIV-associated insulin resistance: cellular mechanisms and clinical implications. *Curr. HIV/AIDS Rep.* *4*, 126-134.
- Oberdorster,G. (2010). Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology. *J. Intern. Med.* *267*, 89-105.
- Oliveira,A.C., Martins,A.N., Pires,A.F., Arruda,M.B., Tanuri,A., Pereira,H.S., and Brindeiro,R.M. (2009). Enfuvirtide (T-20) resistance-related mutations in HIV type 1 subtypes B, C, and F isolates from Brazilian patients failing HAART. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* *25*, 193-198.
- Ortega,K.L., Vale,D.A., and Magalhaes,M.H. (2009). Impact of PI and NNRTI HAART-based therapy on oral lesions of Brazilian HIV-infected patients. *J. Oral Pathol. Med.* *38*, 489-494.
- Ozpolat,B., Sood,A.K., and Lopez-Berestein,G. (2010). Nanomedicine based approaches for the delivery of siRNA in cancer. *J. Intern. Med.* *267*, 44-53.
- Rajesh,L., Karunaianantham,R., Narayanan,P.R., and Swaminathan,S. (2009). Antiretroviral drug-resistant mutations at baseline and at time of failure of antiretroviral therapy in HIV type 1-coinfected TB patients. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* *25*, 1179-1185.
- Ray,N. (2009). Maraviroc in the treatment of HIV infection. *Drug Des Devel. Ther.* *2*, 151-161.
- Retnakumari,A., Setua,S., Menon,D., Ravindran,P., Muhammed,H., Pradeep,T., Nair,S., and Koyakutty,M. (2010). Molecular-receptor-specific, non-toxic, near-infrared-emitting Au cluster-protein nanoconjugates for targeted cancer imaging. *Nanotechnology.* *21*, 55103.

- Saliou,J.M., Bourgeois,C.F., Ayadi-Ben,M.L., Ropers,D., Jacquenet,S., Marchand,V., Stevenin,J., and Branlant,C. (2009). Role of RNA structure and protein factors in the control of HIV-1 splicing. *Front Biosci.* *14*, 2714-2729.
- Sandler,R. (2009). Nanomedicine and nanomedical ethics. *Am. J. Bioeth.* *9*, 16-17.
- Schiller,D.S. and Youssef-Bessler,M. (2009). Etravirine: a second-generation nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) active against NNRTI-resistant strains of HIV. *Clin. Ther.* *31*, 692-704.
- Shimada,T. (1993). [Anti-HIV genes: strategies for gene therapy of AIDS]. *Nippon Rinsho* *51 Suppl*, 229-234.
- Sidhu,H.K., Tvetenstrand,C.D., Chaffee,B.H., and Sidhu,J.S. (2009a). Fuzeon-Induced Collagenophagic Granuloma: A Peculiar Granulomatous Injection Site Reaction to Fuzeon--A Case Report and Review of Literature. *Int. J. Surg. Pathol.*
- Sidhu,H.K., Tvetenstrand,C.D., Chaffee,B.H., and Sidhu,J.S. (2009b). Fuzeon-Induced Collagenophagic Granuloma: A Peculiar Granulomatous Injection Site Reaction to Fuzeon--A Case Report and Review of Literature. *Int. J. Surg. Pathol.*
- Silverberg,M.J., Leyden,W., Quesenberry,C.P., Jr., and Horberg,M.A. (2009). Race/Ethnicity and risk of AIDS and death among HIV-infected patients with access to care. *J. Gen. Intern. Med.* *24*, 1065-1072.
- Singhal,S., Nie,S., and Wang,M.D. (2010). Nanotechnology applications in surgical oncology. *Annu. Rev. Med.* *61*, 359-373.
- Soule,H., Duc,D.L., Mallaret,M.R., Chanzy,B., Charvier,A., Gratacap-Cavallier,B., Morand,P., and Seigneurin,J.M. (1998). [Virus resistance in a hospital environment: overview of the virucide activity of disinfectants used in liquid form]. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* *56*, 693-703.
- Souza,T.M., Rodrigues,D.Q., Ferreira,V.F., Marques,I.P., da Costa,S.F., Cunha,A.C., de Souza,M.C., de Palmer Paixao Frugulhetti IC, Bou-Habib,D.C., and Fontes,C.F. (2009). Characterization of HIV-1 enzyme reverse transcriptase inhibition by the compound 6-chloro-1,4-dihydro-4-oxo-1-(beta-D-ribofuranosyl) quinoline-3-carboxylic acid through kinetic and in silico studies. *Curr. HIV Res.* *7*, 327-335.
- Spira,S., Wainberg,M.A., Loemba,H., Turner,D., and Brenner,B.G. (2003). Impact of clade diversity on HIV-1 virulence, antiretroviral drug sensitivity and drug resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* *51*, 229-240.
- Starodub,M.E. and Trevors,J.T. (1989). Silver resistance in *Escherichia coli* R1. *J. Med. Microbiol.* *29*, 101-110.
- Steffen,I. and Pohlmann,S. (2009). Peptide-Based Inhibitors of the HIV Envelope Protein and other Class I Viral Fusion Proteins. *Curr. Pharm. Des.*

- Stevens,M., De,C.E., and Balzarini,J. (2006). The regulation of HIV-1 transcription: molecular targets for chemotherapeutic intervention. *Med. Res. Rev.* 26, 595-625.
- Swai,H., Semete,B., Kalombo,L., Chelule,P., Kisich,K., and Sievers,B. (2009). Nanomedicine for respiratory diseases. *Wiley. Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 1, 255-263.
- Taylor,P.L., Ussher,A.L., and Burrell,R.E. (2005a). Impact of heat on nanocrystalline silver dressings. Part I: Chemical and biological properties. *Biomaterials* 26, 7221-7229.
- Taylor,P.L., Ussher,A.L., and Burrell,R.E. (2005b). Impact of heat on nanocrystalline silver dressings. Part I: Chemical and biological properties. *Biomaterials* 26, 7221-7229.
- Trauger,R.J., Giermakowska,W.K., Ferre,F., Duffy,P.C., Wallace,M.R., Lewis,D.E., Beecham,H.J., Burnett,K.G., Jensen,F.C., and Carlo,D.J. (1993). Cell-mediated immunity to HIV-1 in Walter Reed stages 1-6 individuals: correlation with virus burden. *Immunology* 78, 611-615.
- Tremblay,C.L. (2008). Combating HIV resistance - focus on darunavir. *Ther. Clin. Risk Manag.* 4, 759-766.
- Uy,J., Armon,C., Buchacz,K., Wood,K., and Brooks,J.T. (2009). Initiation of HAART at higher CD4 cell counts is associated with a lower frequency of antiretroviral drug resistance mutations at virologic failure. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 51, 450-453.
- Vercauteren,J., Deforche,K., Theys,K., Debruyne,M., Duque,L.M., Peres,S., Carvalho,A.P., Mansinho,K., Vandamme,A.M., and Camacho,R. (2008). The incidence of multidrug and full class resistance in HIV-1 infected patients is decreasing over time (2001-2006) in Portugal. *Retrovirology.* 5, 12.
- Visnegarwala,F., Shlay,J.C., Barry,V., Gibert,C.L., Xiang,Y., Wang,J., Kotler,D., Raghavan,S., and El-Sadr,W.M. (2007). Effects of HIV infection on body composition changes among men of different racial/ethnic origins. *HIV Clin. Trials* 8, 145-154.
- Walker,P.R., Worobey,M., Rambaut,A., Holmes,E.C., and Pybus,O.G. (2003). Epidemiology: Sexual transmission of HIV in Africa. *Nature* 422, 679.
- Webber,M.J., Kessler,J.A., and Stupp,S.I. (2010). Emerging peptide nanomedicine to regenerate tissues and organs. *J. Intern. Med.* 267, 71-88.
- Winslow,D.L. (2009). Guidelines: opportunistic infections and HIV patients. *AIDS Alert.* 24, 81.
- Worobey,M., Gemmel,M., Teuwen,D.E., Haselkorn,T., Kunstman,K., Bunce,M., Muyembe,J.J., Kabongo,J.M., Kalengayi,R.M., Van,M.E., Gilbert,M.T., and Wolinsky,S.M. (2008). Direct evidence of extensive diversity of HIV-1 in Kinshasa by 1960. *Nature* 455, 661-664.
- Wyatt,R. and Sodroski,J. (1998). The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science* 280, 1884-1888.

Yerly,S., Junier,T., Gayet-Ageron,A., Amari,E.B., von,W., V, Gunthard,H.F., Hirschel,B., Zdobnov,E., and Kaiser,L. (2009). The impact of transmission clusters on primary drug resistance in newly diagnosed HIV-1 infection. *AIDS* 23, 1415-1423.

Zussman,A., Lara,L., Lara,H.H., Bentwich,Z., and Borkow,G. (2003). Blocking of cell-free and cell-associated HIV-1 transmission through human cervix organ culture with UC781. *AIDS* 17, 653-661.