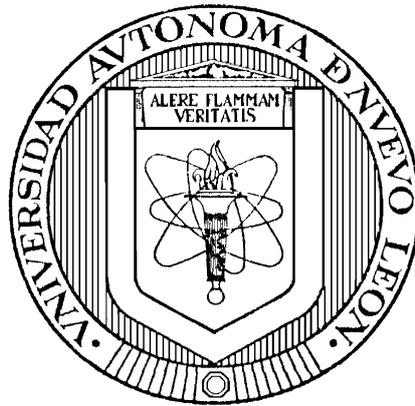


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN DE LA TRANSMISIÓN DE LA INFECCIÓN DE
VIH-1 POR LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA RECUBIERTAS POR
POLIVINILPIRROLIDONA, EN UN MODELO DE CULTIVO DE TEJIDO DE
CÉRVIX HUMANO *IN VITRO*

Por

LILIANA DEL CARMEN IXTEPAN TURRENT

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

Noviembre, 2010

ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN DE LA TRANSMISIÓN DE LA INFECCIÓN DE
VIH-1 POR LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA RECUBIERTAS POR
POLIVINILPIRROLIDONA, EN UN MODELO DE CULTIVO DE TEJIDO DE
CÉRVIX HUMANO *IN VITRO*

Comité de tesis

DRA. CRISTINA RODRÍGUEZ PADILLA
Directora

DR. REYES TAMEZ GUERRA
Secretario

Dr. RICARDO GÓMEZ FLORES
Vocal

DRA. LYDIA G. RIVERA MORALES.
Vocal

DR. JUAN ALCOCER GONZÁLEZ.
Vocal

Comité académico de Doctorado

Subdirector de estudios de postgrado

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a la Dra. Cristina Rodríguez Padilla, Directora y 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.

A todas las mujeres que accedieron a donar una porción de su cérvix uterino ya que sin su valiosa donación no habría sido posible la realización de este estudio.

DEDICATORIA

A mi padre Enero que me enseñó con su ejemplo que con honestidad, dedicación y constancia se puede llegar muy lejos.

A mi madre María del Carmen que sin su amor y apoyo jamás hubiera llegado a completar esta etapa más de mi carrera profesional.

A mi esposo Herman que me llevo de la mano sin dejarme hasta el ultimo de los pasos en esta tesis, con amor, comprensión y admiración.

A mi hija Lucy que siempre tuvo una palabra de aliento para que llegara hasta la culminación de esta tesis.

A todos ustedes gracias.

ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN DE LA TRANSMISIÓN DE LA INFECCIÓN DE
HIV-1 POR LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA RECUBIERTAS POR
POLIVINILPIRROLIDONA, EN UN MODELO DE CULTIVO DE TEJIDO DE
CÉRVIX HUMANO *IN VITRO*

Comité de tesis


DRA. CRISTINA RODRÍGUEZ PADILLA
Directora


DR. REYES TAMEZ GUERRA
Secretario


Dr. RICARDO GÓMEZ FLORES
Vocal


DRA. LYDIA G. RIVERA MORALES.
Vocal


DR. JUAN ALCOCER GONZÁLEZ.
Vocal

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMEN	xii
1.ABSTRACT	xiii
2. INTRODUCCIÓN.....	1
3. HIPÓTESIS.....	4
4. OBJETIVOS.....	5
4.1 Objetivos Particulares.....	6
5. ANTECEDENTES.....	7
5.1 Historia del descubrimiento del virus de la Inmunodeficiencia humana (VIH).....	7
5.2 La Epidemiología.....	12
5.2.1 La transmisión del VIH-1.....	12
5.2.2 Patrones epidemiológicos de la pandemia del VIH.....	14
5.2.3 Situación actual de la epidemia mundial del VIH	15
5.3 Historia natural del VIH/SIDA	18
5.3.1 Infección primaria y la evolución de la infección del VIH.	18

5.3.2 Pronóstico del SIDA.....	22
5.4 El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)	22
5.4.1 La estructura del VIH	22
5.4.2 Ciclo replicativo del Virus de Inmunodeficiencia Humana VIH	26
5.5 Los antirretrovirales	29
5.5.1 Los fármacos antirretrovirales en el bloqueo del ciclo replicativo del VIH.....	29
5.5.2 Inhibidores de la entrada y la fusión del VIH.....	32
5.5.3. Inhibidores Nucleósidos e inhibidores de Nucleósidos de la Transcriptasa Inversa (INTI).....	36
5.6 Métodos Preventivos del control contra la infección de VIH-1	41
5.6.1 Uso de condón o preservativo	41
5.6.2 El desarrollo de vacunas contra el virus VIH-1	42
5.6.3 El cérvix uterino humano (órgano principal de la transmisión de la infección por VIH1).....	42
5.7 Microbicidas tópicos vaginales	46
5.7.1. Mecanismos de acción de los microbicidas.....	51
5.7.1.1. El Gel Replens.....	52
5.7.2. Microbicidas en el mundo.....	55
5.7.3. Microbicidas en avanzado desarrollo clínico.....	56
5.7.4. Resultados de ensayos clínicos	57
5.7.4.1 HPTN – 035 (BufferGel® y PRO 2000)	57
5.7.4.2. Sulfato de celulosa... ..	58
5.7.4.3. Savvy (c-31-G).....	59
5.7.4.4. Carraguard	59

5.7.4.5 UC781.....	59
5.8 Los iones de plata, sus usos en medicina.....	60
5.8.1 Los iones de plata	60
5.9. La nanotecnología	62
5.10. La nanomedicina.....	64
5.11. Las AgNPs-PVP como bactericida.....	64
5.12 Las AgNPs-PVP NPP como virucidas antivirales e inhibidores de fusión de VIH-1.....	65
5.13 Las etapas iniciales de la infección del VIH-1 en el tejido cervical Humano.	66
5.14 Las Nanopartículas de plata y su absorción por el tejido	67
6. MÉTODOS.	68
6.1 Origen de los reactivos.....	68
6.2 Material biológico.....	68
6.3 Biopsia de cévix humano	69
6.4 Estudio histopatológico de la biopsia del cévix humano por tinción de hematoxilina y Eosina	75
6.5 Ensayos de citotoxicidad.....	75
6.6 Formulación de AgNPs-PVP en un gel no-espermicida	76
6.7 Protección de las AgNPs-PVP en modelo de cultivo de órgano de Cérvix humano contra la infección de del virus VIH- 1 libre de células y asociado a células	76
6.8 Tiempo mínimo de exposición AgNPs-PVP para conferir protección al tejido en el modelo de cérvix humano	77
6.9 Tiempo máximo de protección de las AgNPs-PVP contra el VIH-1.....	78
6.10 Análisis estadísticos	78

7. RESULTADOS.....	79
7.1 La toxicidad de la AgNPs-PVP al tejido cervical	79
7.2 Inhibición de la infección con o sin Replens en virus libre células o asociado a células	82
7.3 Tiempo mínimo de exposición de las AgNPs-PVP necesarios para conferir protección contra VIH-1.....	85
7.4 Duración de la protección de las AgNPs-PVP para la infección de VIH-1.....	87
8. DISCUSION.....	89
9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	.93
10. LITERATURA CITADA.....	..94

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I.	Clasificación de la infección por VIH (1986)	10
II.	Clasificación de Walter Reed (1986).....	10
III.	Clasificación vigente desde 1993, para adolescentes y adultos infectados con VIH	12
IV.	Fases de ensayos clínicos aplicables a los microbicidas	56
V.	Microbicidas entrando en la fase III de ensayos clínicos	56

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Visión Global de la infección por el VIH 2009.	16
2. Porcentaje de mujeres adultas que viven con el virus VIH de 1990 a 2007.....	17
3. Estructura morfológica del VIH-1	26
4. El ciclo biológico del VIH-1 y los lugares de acción de los fármacos antivirales	32
5. Anatomía de aparato reproductor femenino	42
6. Localización anatómica de cérvix humano	46
7. Porcentaje de mujeres infectadas con VIH-1 en el mundo.....	48
8. Modelo de experimentación de la biopsia de cérvix humano.....	71
a) Control negativo, solo agar	71
b) Un control negativo	72
c) Control positivo	73
d) La inhibición de la transmisión del VIH-1 a través modelo del tejido cervical.	74
9. Estudio histopatológico del tejido de cérvix humano sin tratamiento con AgNPs-PVP.....	80
10. Toxicidad de las AgNPs-PVP en el cultivo tejido de cérvix humano.....	81
11. Inhibición de la transmisión del VIH-1 por las AgNPs-PVP con gel Replens utilizando el modelo de cultivo cervical humano.....	83
12. Inhibición de la transmisión del VIH-1 sin gel Replens	

utilizando el modelo de cultivo cervical humano.....	84
13. Tiempo necesario para conferir protección contra la transmisión de la infección del VIH-1 a través del tejido cervical por parte de las AgNPs-PVP.....	86
14. Tiempo necesario para conferir protección contra la transmisión de la infección del VIH-1 a través del tejido cervical por parte de las AgNPs-PVP.....	88

NOMENCLATURA

ADN	Ácido desoxiribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosina Trifosfato
AgNPs-PVP	Nanopartículas de plata recubiertas por polivinilpirrolidona.
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
AZT	Zidovudina y Retrovir
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	Sulfadiazina de Plata
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
TAE	Experimento por adición de tiempos
ETS	Enfermedades de transmisión sexual

MPD	Programa de desarrollo de microbicidas
ONUSIDA	Programa conjunto de las naciones unidas sobre el VIH SIDA
μg	Microgramo
μL	Microlitro.
mg/ml	Miligramos sobre mililitros.

1. RESUMEN.

Se ha demostrado que las nanopartículas de plata recubiertas con polivinilpirrolidona (AgNPs-PVP) tienen actividad antiviral contra el VIH-1. Al prevenir la interacción de la gp120 del VIH-1 con el CD4 de la célula huésped, y por consiguiente inhibir la fusión o entrada del virus.

En el presente estudio evaluamos la actividad virucida de las AgNPs-PVP, con potencial para prevenir la transmisión de la infección del VIH-1, utilizando un modelo humano *in vitro* de cultivo cervical. Las AgNPs-PVP de 30-50 nm formuladas en un gel Replens no espermicida a una dosis de 0.15 mg/mL, tienen la capacidad de prevenir la transmisión de la infección tanto del VIH-1 libre de células, como de virus asociados a células, el tiempo mínimo necesario para inhibir la infección fue de un minuto de exposición a las AgNPs-PVP. El pretratamiento por 20 minutos de la biopsia demostró un efecto protector hasta por 48 horas contra la transmisión de la infección por VIH-1. Es importante resaltar el hecho de que las AgNPs-PVP no fueron tóxicas para las biopsias aun después de 48 horas de exposición.

Basados en la información anterior, podemos decir que las AgNPs-PVP son candidatos potenciales para ser utilizados como microbicidas de aplicación vaginal tópica para prevenir la transmisión de la infección del VIH-1. Sin embargo se requieren más estudios tanto *in vitro* como *in vivo* para continuar con el desarrollo de esta línea de investigación.

ABSTRACT

Previous *in vitro* studies have demonstrated that polyvinylpyrrolidone-coated silver nanoparticles (PVP-coated AgNPs) have antiviral activity against HIV-1 at non-cytotoxic concentrations. These particles also showed broad spectrum virucidal activity by preventing the interaction of HIV-1 gp120 and cellular CD4, thereby inhibiting fusion or entry of the virus into the host cell. In the present study, we evaluated the antiviral activity of PVP-coated AgNPs to prevent transmission of HIV-1 infection using human cervical culture as an *in vitro* model that simulates *in vivo* conditions.

When formulated into a non-spermicidal gel (Replens) at a concentration of 0.15 mg/mL, PVP-coated AgNPs prevented the transmission of cell-associated HIV-1 and cell-free HIV-1 isolates. Importantly, PVP-coated AgNPs were not toxic to the explant, despite cervical tissues were continuously exposed to 0.15 mg/mL of PVP-coated AgNPs for 48 h. Only 1 min of PVP-coated AgNPs pretreatment to the explant was required to prevent transmission of HIV-1. Pre-treatment of the cervical explant with 0.15 mg/mL PVP-coated AgNPs for 20 min followed by extensive washing prevented the transmission of HIV-1 in this model for 48 h.

A formulation of PVP-coated AgNPs homogenized in Replens gel acts rapidly to inhibit HIV-1 transmission after 1 min and offers long-lasting protection of the cervical tissue from infection for 48 h, with no evidence of cytotoxicity observed in the explants. Based on this data, PVP-coated AgNPs are a promising microbicidal candidate for use in topical vaginal/cervical agents to prevent HIV-1 transmission, and further research is warranted.

2. INTRODUCCIÓN

El virus de inmunodeficiencia humana (VIH) es el agente causal del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (Gallo 1987; Gallo and Montagnier 2003; Montagnier 2010), fue descubierto e identificado como el agente causal de la epidemia de SIDA por el equipo de Luc Montagnier en Francia en 1983 (Montagnier 2002a). El virión es esférico, dotado de una envoltura y con una cápside proteica. Su genoma es una cadena de ARN monocatenario que debe copiarse provisionalmente a ADN para poder multiplicarse e integrarse en el genoma de la célula que infecta (Montagnier 2002).

El proceso de conversión de ARN en ADN es una característica principal de los retrovirus y se lleva a cabo mediante acciones enzimáticas de transcriptasa inversa. Con la demostración de la existencia de la transcriptasa inversa, se inició en la década de 1970 la búsqueda de los retrovirus humanos, que permitió el aislamiento en 1980 del virus de la leucemia de células T del adulto, HTLV-I (Gallo 1987; Montagnier 2002).

El virus aislado por Luc Montagnier en 1984 en el Instituto Pasteur de París se denominó como el virus de la linfadenopatía (LAV). Gallo denominó al virus como Virus Linfotrópico de las Células T humanas (HTLV III). Actualmente se le ha

denominado como Virus de Inmunodeficiencia humana (VIH) (Gallo and Montagnier 2003;Montagnier 2010).

El VIH tiene un diámetro de aproximadamente 100 nanómetros. En su parte exterior tiene como "cubierta", una membrana que originalmente pertenecía a la célula de donde el virus emergió. En la cubierta se encuentra una proteína del virus, la gp41, o "glicoproteína transmembranal". Conectada a la gp41, se encuentra la gp120, la cual se fusiona al receptor CD4 localizado en la superficie de los linfocitos T para penetrar en ellos. El núcleo tiene la "cápside", que está compuesta por la proteína p24. Su genoma posee una cadena de ARN monocatenario que se transcribe temporalmente a ADN para multiplicarse e integrarse en el genoma de la célula CD4 hospedera. Los antígenos proteicos de la envoltura exterior del virus se fusionan de forma específica con proteínas de la membrana de las células huésped, especialmente de los linfocitos CD4 (Hillis 2000;Joint United Nations Programme on HIV AIDS (UNAIDS) 2008;Wyatt *et al.* 1998).

Se ha estabilizado la epidemia de VIH a escala mundial, pero los niveles de nuevas infecciones y de fallecimientos por SIDA continúan siendo elevados (Hillis 2000;Levy 2009). Se estima que en el año 2008, vivían con VIH un promedio de 33 millones [30 millones–36 millones] de personas.

Las mujeres de todo el mundo se enfrentan al riesgo creciente de la infección por el VIH. En 1992, se estimaba que el 25% de la población infectada con el VIH eran mujeres, mientras que en 1996 esta cifra llegó al 42%. De los 5 millones de personas que en 2002 se agregaron a los infectados, más del 95% reside en países en desarrollo y casi

la mitad de las personas adultas que se sumaron a los infectados son mujeres (Joint United Nations Programme on HIV AIDS (UNAIDS) 2008;Wyatt *et al.* 1998).

El principal modo de transmisión de la infección del VIH-1 es por vía sexual siendo el cérvix el principal órgano afectado (Zussman et al. 2003), por lo que existe un gran consenso de que las estrategias para prevenir la transmisión heterosexual del VIH-1 deberán incluir métodos controlados por la mujer, tales como los microbicidas tópicos vaginales que tengan la capacidad de impedir la transmisión de la infección a través del tejido cérvico vaginal (Buckheit, Jr. et al. 2009). Estos son productos tópicos de administración vaginal o rectal que tienen la capacidad de reducir la transmisión del VIH y de otros microorganismos causantes de enfermedades de transmisión sexual (ETS), incluyendo virus, bacterias y parásitos (Borkow *et al.* 1997;McDonnell 2007;Pauwels *et al.* 1995;Zussman *et al.* 2003)

3. HIPÓTESIS

Las AgNPs-PVP, actúan como potentes virucidas capaces de proteger al tejido cervical durante un tiempo prolongado contra la transmisión de la infección del VIH-1.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar las propiedades microbidas de las AgNPs-PVP al aplicarlas como agentes tópicos vaginales contra la infección por VIH-1 en un modelo de cultivo de tejido cervical humano *in vitro* que simula las condiciones de infección *in vivo*.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la toxicidad de las AgNPs-PVP en el tejido cervical, mediante la técnica de luminiscencia (viabilidad celular) e histopatología en biopsia (HE).
2. Determinar la inhibición de la transmisión de la infección del VIH-1 (virus libre de células y asociado a células) por las AgNPs-PVP a través de un modelo de biopsia cervical humano tratado tópicamente con AgNPs-PVP a diferentes dosis, formulado con y sin gel Replens
3. Determinar el tiempo mínimo necesario para que las AgNPs-PVP actúen en el modelo de biopsia de cérvix para conferir protección contra el VIH-1.
4. Determinar el tiempo máximo de duración de la protección por la aplicación tópica del microbicida en el tejido cervical manteniendo la eficacia en la inhibición de la infección del VIH-1 en el modelo de biopsia de cérvix.

5. ANTECEDENTES

5.1. Historia del descubrimiento del virus de la Inmunodeficiencia humana (VIH).

Los primeros casos diagnosticados de neumonía por *Pneumocystis jirovecii* (antiguamente llamado *P. carinii*), y de sarcoma de Kaposi en la piel de jóvenes varones homosexuales radicados en la ciudad de San Francisco, Estados Unidos están reportados a partir de junio de 1981 (Gallo and Montagnier 1987); desde entonces a la fecha, la sociedad ha recibido un tremendo impacto por esta enfermedad denominada “Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida” o SIDA (Hillis 2000). Este impacto se explica no sólo en términos sociales, sino también científicos y económicos por su elevado costo en vidas, y por afectar a una población joven, entre 20 y 49 años, en el rango de edad más productiva para la sociedad (Montagnier 2010).

La aparición y extensión fulminante de esta infección, ha supuesto un grave problema de Salud Pública, mientras que, por otra parte está el sensacionalismo y la marginación social que van ligadas a algunas de las formas de transmisión de esta enfermedad infecciosa (Levy 2009).

Estas características especiales han hecho que se desarrolle un enorme esfuerzo científico para conocer, entender e intentar controlar esta infección. Posterior a los primeros casos de pacientes con SIDA, se concluyó que el causante de la enfermedad era un agente infeccioso vírico pues se describieron casos de la enfermedad en personas que recientemente habían recibido sangre o hemoderivados, en heroinómanos que compartían jeringuillas para inyectarse y entre las compañeras heterosexuales de estos sin encontrarse otros factores de riesgo. Esto permitió que se emitieran normas preventivas aun antes de poder aislar el agente infeccioso (Balin *et al.* 2008;Borkow *et al.* 1997;McDonnell 2007;Spira *et al.* 2003;Taylor *et al.* 2005;Zussman *et al.* 2003)

El Centro para el Control de Enfermedades de Atlanta publicó la primera definición de un caso de SIDA en el mes de Septiembre de 1982. En esta publicación se describieron las manifestaciones clínicas observadas: neumonía por *Pneumocystis jirovecii*, sarcoma de Kaposi, linfoma cerebral primario y otras infecciones oportunistas) en personas con disminución de la inmunidad celular, sin otra causa conocida de esta (Hillis 2000).

El equipo científico dirigido por Luc Montagnier en el Instituto Pasteur detecta por primera vez, la actividad de la transcriptasa inversa en el medio de cultivo de un tejido de un varón homosexual, lo que implicaba la presencia de un retrovirus al que denominaron virus asociado a la linfadenopatía (LAV) en 1983 (Montagnier 2002). Gallo y colaboradores trabajaron en el cultivo celular del patógeno causante del SIDA y consiguieron líneas celulares con los receptores específicos para poder aislar el agente denominado (HTLV-III), por su similitud con los virus HTLV 1 y II. Posteriormente se comprobó que HTLV-III y LAV eran el mismo virus por lo que una comisión

internacional recomendó el nombre de Virus de la Inmunodeficiencia Humana, VIH (Levy 1993). Posteriormente en 1986 se descubrió el VIH tipo 2, un virus muy similar al virus de la inmunodeficiencia de los simios (SIV) en el continente Africano (Peeters et al. 2008).

Después de estos descubrimientos y con una experiencia clínica más amplia, se intentó estudiar más a fondo la evolución clínica de la infección viral, pues se identificaron varios estadios clínicos de la enfermedad: el síndrome de linfadenopatía crónica, el complejo relacionado con el SIDA y el SIDA (Andiman *et al.* 2009; Balin *et al.* 2008; Borkow *et al.* 1997; Levy 2009; Lightfoot and Milburn 2009; McDonnell 2007; Uy *et al.* 2009; Wallace 2006; Zussman *et al.* 2003).

Las clasificaciones clínicas para los pacientes con SIDA surgieron como una necesidad de agrupar a los enfermos con las mismas características, con el propósito de mejorar el diagnóstico y la terapéutica en condiciones uniformes y establecer un pronóstico para el individuo.

A mediados de los años ochenta, la primera clasificación de la enfermedad dos de las clasificaciones más conocidas y utilizadas fueron útiles para aclarar la gran confusión entonces existente; en ese entonces se utilizaban conceptos difíciles de definir tales como pre - SIDA. Esta primera clasificación el Centro para el Control de Enfermedades de Atlanta permitió uniformar criterios clínicos. Sin embargo, ésta no permitía hacer pronósticos en casos individuales ver (tabla I). Pronto se publicarían nuevas formas de clasificación clínica y pronóstica del SIDA (Alcami *et al.* 1988; Als and Stoffels 1989; Wintrebart and Certain 1990).

Tabla I Clasificación de la infección por VIH (1986)

GRUPO I. Infección aguda
GRUPO II. Infección asintomática
GRUPO III Linfadenopatía generalizada persistente
GRUPO IV. Otras enfermedades
Subgrupo A. Enfermedad constitucional
Subgrupo B. Enfermedad neurológica
Subgrupo C. Enfermedades infecciosas secundarias
Subgrupo D. Tumores secundarios
Subgrupo E. Otros procesos

La clasificación de Walter Reed es más orientada al paciente en forma individual y valora una serie de parámetros clínicos, inmunológicos y de laboratorio, que son fáciles de recolectar por el personal médico. La evaluación clínica de Walter Reed es progresiva en sus diferentes estadios lo que permite establecer un valor pronóstico de la enfermedad (Tabla II)

Tabla II Clasificación de Walter Reed (1986)

ESTADIOS	0	1	2	3	4	5	6
Anticuerpos VIH	-	+	+	+	+	+	+
Linfadenopatía generalizada	-	-	+	+	+	+	+
Linfocitos T CD4 (mm ³)	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400
Hipersensibilidad cutánea	N	N	N	N	P	C/P	C/P
Muguet	-	-	-	-	-	+	+
Infección oportunista	-	-	-	-	-	-	+

N: Respuesta cutánea normal

P: Anergia parcial

C: Anergia completa

El Centro para el Control de Enfermedades de Atlanta presentó otra clasificación de la enfermedad según los grados de progresión, dividiéndola en 4 grupos, desde la primoinfección hasta el grupo de enfermedades asociadas a la inmunodeficiencia. Esta fue revisada en 1987, añadiendo infecciones oportunistas. Posteriormente la Organización Mundial de la Salud (O.M.S.) propuso un nuevo modelo de estadios clínicos basándose en la evolución clínica de los pacientes, que se divide también en 4 grupos, y se basa en parámetros inmunológicos. Esta última clasificación fue tomada de la clasificación del Centro para el Control de Enfermedades de Atlanta de 1993 (Tabla III), que con algunas particularidades es la más utilizada en nuestro ámbito médico desde principios de 1994 (Aida 2009; Balin *et al.* 2008; Borkow *et al.* 1997; Dvaranauskaite *et al.* 2009; Ichikawa and Ito 1993; Levy 2009; Lightfoot and Milburn 2009; McDonnell 2007; Shimada 1993; Wallace 2006; Zussman *et al.* 2003). En los pacientes pediátricos, en los que se han observado casos desde 1982, se utiliza un sistema de clasificación distinta, pues la infección en ese rango de edades presenta muchas peculiaridades (Levy 1993).

Tabla III Clasificación vigente desde 1993, para adolescentes y adultos infectados con VIH

Clínica	Cuenta de linfocitos CD4		
	>500	200 - 499	<199
A) Asintomático o autodelimitado*	A1	A2	A3
B) Síntomas** no A ni C	B1	B2	B3
C) Determinantes de SIDA***	C1	C2	C3

* Es decir: Infección primaria del VIH (parecido a mononucleosis); Linfadenopatía persistente (ganglios de ≥ 1 cm de diámetro, en ≥ 2 sitios por ≥ 3 meses)

** Ejemplos: Angiomatosis basilar, Candidiasis vulvovaginal (>1 mes poca respuesta al tratamiento), Displasia cervical grave o carcinoma *in situ*, Candidiasis orofaríngea, Fiebre (38.5°C) o Diarrea >1 mes

*** Candidiasis (esófago, tráquea, bronquios); Coccidioidomicosis extrapulmonar; Criptosporidiosis intestinal (>1 mes); Cáncer cervical invasor; Encefalopatía por VIH; CMV en retina u otro lugar fuera de hígado, bazo o ganglios; Herpes simple neumonía o úlcera mucocutánea >1 mes; Histoplasmosis diseminada, extrapulmonar; Isosporidiasis >1 mes; Sarcoma de Kaposi; Linfoma de Burkitt ; *M. avium* o *M. kansassi* extrapulmonar; Neumonía por *Pneumocystis carinii*; Leucoencefalopatía multifocal progresiva; Bacteremia por *Salmonella* recurrente; Toxoplasmosis cerebral; Síndrome de emaciación.

5.2. La epidemiología

5.2.1 La transmisión del VIH-1

En la década de los años ochentas con el descubrimiento del VIH-1, la comunidad científica enfocó sus esfuerzos para conocer los mecanismos de transmisión del VIH-1 (Gouws et al. 2008).

Las células blanco de la infección por el VIH-1 son los linfocitos que expresan el receptor CD4 y células macrófago-linfocitarias, las cuales se encuentran en la sangre y sus hemoderivados también se localizan en los siguientes tejidos y secreciones: semen, secreciones vaginales, líquido cefalorraquídeo, leche materna de madres seropositivas, lágrimas y saliva de pacientes infectados.

Las vías de transmisión del VIH son tres: contacto sexual, la vía parenteral (transfusión de sangre o hemoderivados e inyección intravenosa de drogas con jeringas contaminadas) y lactancia materna al recién nacido por una madre seropositiva.(Hillis 2000),(Levy 1993),(2005;Balin *et al.* 2008;Borkow *et al.* 1997;Ciminale *et al.* 1990;Gallo 2006;Husstedt *et al.* 2009;Kawamura *et al.* 1993;Levy 2009;Lightfoot and Milburn 2009;Masuda 2007;McDonnell 2007;Wallace 2006;Zussman *et al.* 2003)

- A. La transmisión heterosexual, es el mecanismo de transmisión más frecuente en países africanos.
- B. El contagio de los trabajadores de la salud, posterior a una exposición directa en mucosas, por medio de la sangre o fluidos de muestras de pacientes infectados. La posibilidad de infección tras exposición parenteral es inferior al 1%.(Hillis 2000) (Gouws *et al.* 2008;Levy 2009;Walker *et al.* 2003)
- C. Transmisión por medio de relaciones homosexuales o bisexuales
- D. La vía parenteral por los usuarios de drogas intravenosas con agujas infectadas que se comparten, es la forma de transmisión más común en los países altamente industrializados
- E. La vía parenteral por medio de la transfusión de sangre y productos hemoderivados. Para evitar la transmisión por medio de esta vía se desarrolló un estudio serológico muy sensible y específico, el ensayo inmunoenzimático, para identificar muestras de pacientes seropositivos, posteriormente se instituyó como obligatorio en todos los bancos de sangre del país que todas las unidades de sangre para transfusión se analizaran previamente en busca de los anticuerpos contra el VIH-1, las sangres de pacientes seropositivos son descartadas, aunque

desafortunadamente el ensayo inmunoenzimático puede reportar ocasionalmente falsos negativos cuando el paciente es analizado en un periodo ventana clínico entre la infección y la seroconversión , en este periodo de ventana los anticuerpos contra el VIH-1 aun son indetectables, dando falsos negativos.

- F. El contagio perinatal. Esta vía de transmisión es más frecuente en países en vías de desarrollo. El contagio vía hematogena por el cordón umbilical o por secreciones genitales en el canal del parto al momento del parto son los mecanismos de contagio más probables.

5.2.2. Patrones epidemiológicos de la pandemia del VIH.

Se pueden describir tres patrones epidemiológicos en la diseminación de la infección y son los siguientes:

- I. La transmisión de la infección por la vía sexual.
- II. La transmisión vertical de (madre –hijo).
- III. La transmisión sanguínea

(Balin *et al.* 2008;Borkow *et al.* 1997;Gouws *et al.* 2008;Husstedt *et al.* 2009;Kawamura *et al.* 1993;Lemey *et al.* 2004;Levy 2009;Lightfoot and Milburn 2009;Masuda 2007;McDonnell 2007;Wallace 2006;Zussman *et al.* 2003).

El primer caso demostrado de infección por VIH en humanos se descubrió en un hombre residente de Kinshasa, República Democrática del Congo al analizar una muestra de sangre crioconservada desde 1959, probablemente el VIH-1 comenzó a diseminarse en esa zona a principios de la década de los años 50 (Worobey *et al.* 2008).

En la transmisión de la infección por la vía sexual o tipo I, la prevalencia de la infección del VIH, no llega al 1%, con predominio de los varones con una relación 10/1

en relación a las mujeres. La conducta sexual de más riesgo se encuentra en la homosexualidad y bisexualidad. En cambio la transmisión del tipo II y III es poco importante estadísticamente con respecto al total de casos de pacientes infectados (Joint United Nations Programme on HIV AIDS (UNAIDS) 2008).

En el continente Africano, donde la forma de transmisión del virus más importante es debido las relaciones heterosexuales, con una mayor prevalencia de la enfermedad (4 a 15%), la proporción de afectación es similar entre hombre y mujeres dando como resultado un incremento en la transmisión vertical (madre-hijo) al haber más mujeres infectadas y por la carencia del medicamento preventivo antes del parto. Lo anterior nos da como resultado el patrón tipo II de la transmisión, y se comienza a observar en ciertos países Latinoamericanos, principalmente en las islas del Caribe (Borkow *et al.* 1997;Gouws *et al.* 2008;Lemey *et al.* 2004;McDonnell 2007;Yerly *et al.* 2009;Zussman *et al.* 2003).

El patrón tipo III es el patrón de infección más frecuente en los países desarrollados debido al uso de drogas intravenosas, en México la prevalencia de la infección debido a este patrón es aún escasa.

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)

5.2.3. Situación actual de la epidemia mundial del VIH.

El número total de personas que viven con el VIH-1 continúa en aumento debido al número incesante de nuevas infecciones contraídas cada año y debido a la mayor disponibilidad de terapia antirretrovírica que permite que los enfermos de SIDA vivan más años y con mejor calidad de vida, aumentando el número de personas que viven con esta infección y por lo tanto las probabilidades de contagio.

África subsahariana actualmente continua siendo la región más afectada por el VIH, ya que en 2007 tenía el 67% de las personas infectadas y el 72% de los fallecimientos (Walker et al. 2003)

Se estima que en 2009 alrededor de 33,4 millones [31,1 millones–35,8 millones] de personas vivan con el VIH, y se reportaron unos 2,7 millones [2,4 millones–3,0 millones] de nuevas infecciones así como 2 millones [1,7 millones–2,4 millones] de defunciones.

Personas viviendo con VIH por región, como porcentaje del total mundial, 2009

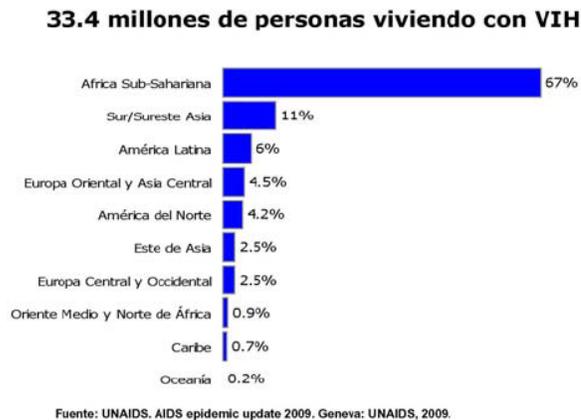


Figura 1. Visión Global de la infección por el VIH 2009. (Flynn and Kort 2009)

La tasa de nuevas infecciones por el VIH-1 ha disminuido en varios países, aunque, a nivel mundial, estas tendencias favorables se ven contrarrestadas, en parte, por el incremento de las nuevas infecciones en otros países.

En África subsahariana, la mayoría de las epidemias nacionales se han estabilizado o han empezado a declinar. Sin embargo, las últimas informaciones

procedentes de Kenia sugieren que, en 2007, la prevalencia del VIH osciló entre el 7,1% y el 8,5%, en comparación con el 6,7% estimado en 2003. Fuera de África, las infecciones continúan al alza en diversos países (Andiman *et al.* 2009).

En 14 de 17 países africanos, el porcentaje de mujeres jóvenes (15-24 años) embarazadas que viven con el VIH ha disminuido desde 2000-2001. En siete países, el descenso en el número de infecciones ha igualado o superado la reducción objetivo del 25% establecida para 2010. En jóvenes africanos, la prevalencia del VIH tiende a ser notablemente más alta entre las mujeres que entre los hombres (Buchacz *et al.* 2008).

Aunque a nivel mundial, el porcentaje de mujeres que viven con el VIH ha permanecido estable desde hace varios años. El porcentaje de infecciones en mujeres está aumentando en diferentes países (Figura 3) (Walker *et al.* 2003).

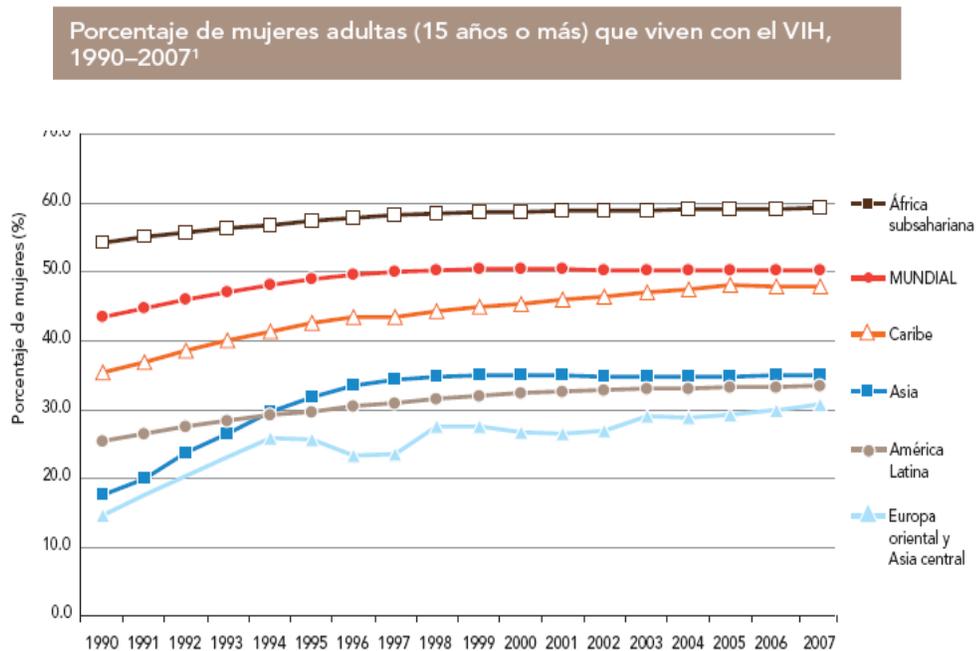


Figura 2. Porcentaje de mujeres adultas que viven con el virus VIH de 1990 a 2007. (Buchbinder 2009;Tapper 1998)

5.3. Historia natural del VIH/SIDA

5.3.1. Infección primaria y la evolución de la infección del VIH.

Posterior al contagio o infección primaria, no hay evidencia clínica de la enfermedad lo cual puede ser por un tiempo variable. Aunque se ha demostrado en forma cuantitativa que el VIH prolifera continuamente. Por lo tanto, aunque el periodo clínico es de aparente latencia, el virus se multiplica continuamente. Clínicamente se pueden distinguir las siguientes fases clínicas de la enfermedad:

- 1) La fase aguda, con únicamente semanas de evolución
- 2) La fase crónica, de varios años de duración clínica.
- 3) La fase final, clínicamente corresponde con el complejo relacionado a SIDA.

La fase aguda es por lo general asintomática y eventualmente cursa con el síndrome mononucleósico (SMN) hasta un 10 - 30% de las ocasiones. Después de dos semanas aparece circulando el antígeno p24. Se caracteriza por una replicación viral acelerada y una inmunodepresión, lo que puede favorecer las infecciones oportunistas, como candidiasis o CMV en una forma transitoria. En el primer y tercer mes después de la infección aparecen anticuerpos anti-VIH circulantes y la respuesta inmune específica contra la infección, recuperando consecuentemente el número de linfocitos CD4 y disminuyendo la replicación viral debido a esta respuesta inmune. Los anticuerpos específicos contra la membrana viral (Env) se encuentran presentes en la gran mayoría de los pacientes. Además los anticuerpos contra las proteínas del core (GAG), se pueden detectar aunque con menos frecuencia (Buchacz *et al.* 2008;Gouws *et al.* 2008;McClelland *et al.* 2001a).

La fase crónica clínicamente cursa con linfocitos CD4 circulantes infectados en menor cantidad siendo aproximadamente 1 por cada 10000 linfocitos, únicamente el 10% de los pacientes infectados presentan una producción viral activa. En esta fase clínica, los órganos linfoides presentan una carga viral de entre diez a cien veces mayor comparada con la carga viral circulante del paciente. Los pacientes en la fase crónica de la enfermedad infecciosa no presentan síntomas clínicos, y algunos cursan con adenopatías, plaquetopenia y mínimos trastornos neurológicos. El 30 a 70% de los pacientes progresan a la siguiente fase en aproximadamente 8 años.

Los síntomas clínicos predictivos de progresión al SIDA, son la aparición del muguet, la leucoplasia vellosa oral (LVO), o cualquier síntoma de los incluidos en el grupo E de la clasificación del Centro para el Control de Enfermedades de Atlanta (Tabla I) y puede diagnosticarse contabilizando el número total de linfocitos CD4 y la relación CD4/CD8 como marcadores celulares, la neutropenia y la microglobulina B2 como marcadores serológicos de progresión (Tabla III).

En la fase final y progresión al SIDA, se puede observar clínicamente que los pacientes presentan infecciones oportunistas, neoplasias o el síndrome consuntivo, también llamado de desgaste físico, además en las pruebas de laboratorio se detecta el incremento en la actividad replicativa del virus junto a una caída drástica del recuento por citometría de flujo de los linfocitos CD4 (Tabla III). En esta fase clínica final es factible que se detecte el antígeno vírico circulante y la ausencia de este antígeno vírico con el deterioro progresivo revela la destrucción masiva de linfocitos CD4 que son utilizados por el VIH para la replicación viral acelerada (Lightfoot and Milburn 2009)

La Clasificación del Centro para el Control de Enfermedades de Atlanta

En esta clasificación, la parte fundamental se basa en el conteo de los linfocitos CD4. Las categorías son excluyentes y el enfermo debe clasificarse en la más avanzada de las clasificaciones (Alcami *et al.* 1988; Als and Stoffels 1989; Wintrebert and Certain 1990).

Categorías según la cifra de linfocitos CD4 con respecto a los linfocitos totales:

- La categoría 1: Más de 500 linfocitos CD4 por microlítro (> 28%) dentro de esta se encuentran las categorías clínicas: A1, B1 y C1
- La categoría 2: Entre 499 y 200 linfocitos CD4 por microlítro (28-14%) dentro de esta categoría incluimos las categorías clínicas: A2, B2 y C2
- La categoría 3: Menos de 199 linfocitos CD4 por microlítro (< 14%) dentro de esta categoría se encuentran las categorías clínicas: A3, B3 y C3

La categoría clínica A del Centro para el Control de Enfermedades de Atlanta está incluida en los pacientes con infección primaria y se refiere a los pacientes seropositivos asintomáticos con o sin linfadenopatía generalizada persistente.

La categoría clínica B del Centro para el Control de Enfermedades de Atlanta incluye a los pacientes seropositivos que presentan síntomas de enfermedades relacionadas con el VIH pero que no entran en la categoría clínica C.

La categoría clínica C incluye a todos los pacientes que han presentado alguno de los síntomas incluidos en la definición de SIDA de 1987 y se presenta cuando el paciente seropositivo tiene una infección asociada o secundaria al VIH bien demostrada y no existen otras causas de inmunodeficiencia que pueda explicarla.

Los pacientes que se incluyen dentro de las categorías C1, C2, C3, A3 y B3 son considerados todos afectados con SIDA.

(2005;Lightfoot and Milburn 2009).

Las enfermedades relacionadas al SIDA son:

1) candidiasis de boca, esófago, pulmón o tráquea 2) Angiomatosis bacilar 3) criptococosis de localización extrapulmonar, 4) criptosporidiasis con diarrea de más de un mes de evolución, 5) Listeriosis, 6) citomegalovirus sistémico, 7) isosporidiasis acompañado con diarrea de más de un mes de evolución 8) herpes simplex con ulcera crónica 9) sarcoma de Kaposi en piel 10) linfoma cerebral primario, 11) neumonía intersticial linfoide de varios años de evolución 12) toxoplasmosis localizado en cerebro, 13) neumonía por *Pneumocystis jirovecii* (antiguamente llamado *P. carinii*), 13) micobacterias atípicas con afección sistémica, 14) leucoencefalopatía multifocal progresiva, 15) infecciones bacterianas múltiples de forma crónica y recurrentes, 16) coccidiomicosis sistémica, 17) demencia asociada a VIH-1, 18) histoplasmosis sistémica diseminada, 19) linfoma no Hodgkin de células B, 20) Tuberculosis sistémica diseminada, 21) septicemia recurrente por la salmonella no tiphy, 22) síndrome de desgaste, 23) carcinoma invasivo del cuello de cérvix.

Cuando un paciente seropositivo tiene sus linfocitos $CD4 < 200/mm^3$ y además presenta una enfermedad asociada al SIDA, se puede considerar que ya entro en la fase denominada Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (Buchacz *et al.* 2008;Lightfoot and Milburn 2009).

5.3.2. Pronóstico del SIDA

Antes del descubrimiento de la Zidovudina, el primer antirretroviral utilizado en pacientes con SIDA, y antes de la profilaxis terapéutica con antibióticoterapia específica contra las infecciones oportunistas, las estadísticas reportaban una supervivencia media de 12.5 meses, esta media de supervivencia aumento posteriormente a más de 21 meses en el grupo tratado con el nuevo fármaco, la Zidovudina o AZT, el primer antirretroviral aprobado por la Administración de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos para los pacientes seropositivos.

Otra investigación clínica demostró un aumento de la supervivencia los pacientes del 73% en hasta 44 semanas a partir de la enfermedad por un estudio de supervivencia con 4800 pacientes diagnosticados con SIDA y que recibían tratamiento de monoterapia con Zidovudina (De 2007;Lightfoot and Milburn 2009).

5.4 El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

5.4.1 La estructura del VIH

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es un miembro de la familia Retroviridae (retrovirus), clasificado dentro de la subfamilia de los Lentiviridae (lentivirus), los cuales comparten algunas propiedades comunes: como el periodo de incubación prolongado antes de la aparición de los síntomas de la enfermedad, infección de las células linfocíticas de la sangre y del sistema nervioso cursando con supresión del sistema inmunitario (Yao et al. 2008). La característica peculiar que distingue a los

retrovirus de otros virus y que permite su clasificación es la necesidad del retrovirus de transformar su información genética, que está en forma de ARN, en ADN (proceso de transcripción inversa) mediante una enzima conocida como transcriptasa inversa. La infección humana por el virus VIH produce una compleja enfermedad denominada síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), que en el paciente infectado puede tardar más de diez años en desarrollarse. El descubrimiento de la relación entre la enfermedad del síndrome de inmunodeficiencia adquirida y la infección por VIH se atribuye al grupo dirigido por Luc Montagnier del instituto Pasteur de París. Otros investigadores estuvieron implicados en el descubrimiento, como el equipo de Robert Gallo, o el equipo de Jay Levy de la Universidad de California en San Francisco (Montagnier 2002)

El VIH tipo 1 es una partícula esférica de 80 a 110 nanómetros de diámetro, con una estructura en tres capas: en la más interna se encuentra el mensaje genético codificado en una secuencia monocatenaria de ARN y las enzimas virales; la capa intermedia es una cápside proteica de forma icosaédrica y la capa más externa del virus o envoltura es una membrana que expresa glicoproteínas virales y los antígenos de histocompatibilidad tipo I y II de la célula huésped. La estructura genética del virus ha sido ampliamente estudiada (Borkow *et al.* 1997;Gouws *et al.* 2008;Kawamura *et al.* 1993;Lemey *et al.* 2004;Masuda 2007;McDonnell 2007;Shimada 1993;Yerly *et al.* 2009;Zussman *et al.* 2003).

Ambos extremos del genoma del VIH contienen las secuencias LTR, secuencias repetitivas de nucleótidos, son secuencias promotoras y potenciadoras que contienen las

señales que gobiernan la transcripción y la terminación de esta (Dar *et al.* 2009;Forster *et al.* 2000).

Los genes estructurales son 3: Gag, Pol y Env. El gen *gag* es traducido a una proteína precursora del core, la p55, que posteriormente se asocia a dos copias del ARN viral, para presentar una región afín a otras proteínas virales, celulares y a membranas celulares durante la gemación, liberándose nuevas partículas víricas desde la célula infectada, Una proteasa, producto del gen *pol* corta durante la maduración del virión la p55 en cuatro proteínas que se incorporan a sus lugares respectivos:

- La proteína p24 forma parte de la cápside del virus.
- La proteína p17 es parte de la matriz del virión, se localiza por debajo de la envoltura viral, la función de esta proteína es estabilizar la membrana. Una parte de las proteínas P17 se unen al complejo molecular que acompaña al ADN viral hacia el interior del núcleo de la célula blanco. En la superficie de esta proteína se encuentra una región cariofílica (literalmente afín al núcleo) la cual es reconocida por la maquinaria molecular de importación nuclear.
- Las p6 y p7 son proteínas que forman la nucleocápside. La región de la p55 que corresponde al polipéptido p6 es responsable de la incorporación de la proteína accesoria Vpr, producto de la traducción del gen *vpr* al virión que se encuentra en formación y de su interacción con la membrana de la célula blanco y por consiguiente hace posible la gemación del virión en formación. La proteína p7 (p9) reconoce e incorpora el ARN al virión y además interviene en la transcripción inversa facilitando ésta (Zennou *et al.* 2000).

El gen Env es expresado como una proteína que se glicosilará posteriormente dando como resultado la gp160, la cual es precursora de la gp120, glicoproteína de la envoltura superficial viral, y la gp41 que es una glicoproteína transmembranal y son fundamentales en la fusión viral a las células CD4. Estas dos estructuras de la membrana en el VIH tipo 2 son distintas, la gp125 y la gp36, y su precursora pesa 300 Kd (Balin *et al.* 2008;Borkow *et al.* 1997;Gouws *et al.* 2008;Kawamura *et al.* 1993;Lemey *et al.* 2004;McDonnell 2007;Yerly *et al.* 2009;Zussman *et al.* 2003).

Además existen una serie de genes reguladores cuya función aún está sometida a revisión.

La Tat es una proteína fundamental para la producción de nuevos viriones de VIH. La proteína se une a una secuencia regulatoria en el extremo 5' del ARN viral llamada TAR (Región Activa de Transcripción), y se unen al ADN, no al ARN. En cuanto este extremo inicial del genoma viral es transcrito desde el ADN proviral, la proteína Tat se une a este y realiza su elongación facilitando la transcripción del resto de la cadena. El gen Nef tiene un papel en la infectividad del virus VIH codificando la proteína p27, la cual se encuentra en la membrana de este virus (Abulafia-Lapid *et al.* 2007;Grdisa *et al.* 2006;Zucchi *et al.* 2002).

El gen Vif expresa la proteína p23, asociada a la infectividad. El gen Vpr expresa la proteína p18 la cual acelera el ciclo de replicación viral en la célula huésped.

El gen Rev tiene la capacidad de codificar la proteína p26 siendo una activadora de Tat y Rev. Este gen posee tres fragmentos en Tat, Env y Rev.

El gen Vpu únicamente se encuentra en el VIH tipo 1. El producto de la expresión del gen Vpu es la proteína p15 la cual aumenta la salida de los viriones y evita la formación de sincitios y la apoptosis de la célula huésped (Balin *et al.* 2008; Gallo 1988; Nickle *et al.* 2007).

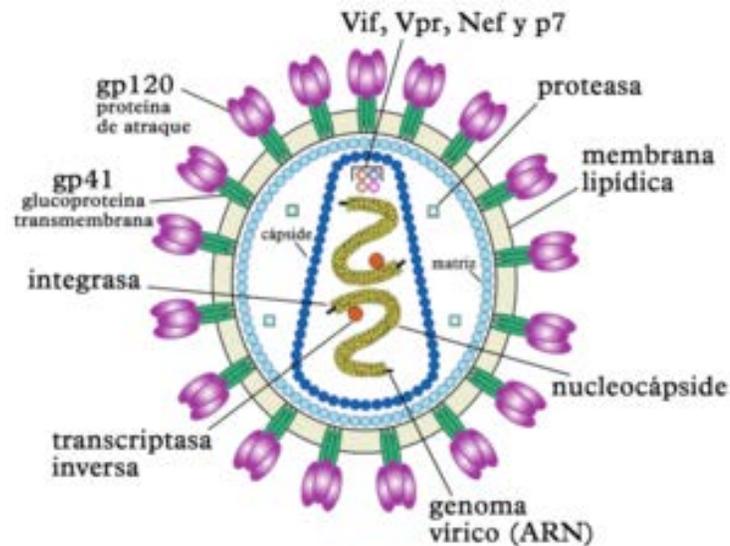


Figura 3. Estructura morfológica del VIH-1 (Nickle *et al.* 2007)

5.4.2. Ciclo replicativo del Virus de Inmunodeficiencia Humana VIH.

El estudio de este ciclo es de vital importancia, el análisis del ciclo replicativo del VIH y su comprensión permiten dilucidar las distintas posibilidades existentes para luchar contra el virus. Se pueden distinguir distintas fases en el ciclo replicativo del virus:

- 1) La adsorción, fusión e internalización del virión en etapas tempranas de la infección;
- 2) La transcripción inversa; 3) integración al genoma; 4) transcripción del mensaje

genético; 5) maduración y ensamblaje de las diferentes proteínas virales; y 6) salida de los viriones de la célula (Balin *et al.* 2008;Borkow *et al.* 1997;Gaertner *et al.* 2008;Masuda 2007;McDonnell 2007).

La fase temprana de la infección es la adsorción y fusión viral, la cual comienza con la interacción de la glicoproteína de membrana viral gp 120 con el receptor celular CD4, aunque existen otros receptores como los de la fracción Fc de las inmunoglobulinas o los del complemento. Las células infectadas expresarán estas moléculas espontáneamente, como ocurre con los linfocitos CD4. También se han encontrado receptores distintos en líneas celulares de glioma, y existen condicionantes diferentes del tropismo en la gp120 fuera de la región de unión específica a CD4, esto explica la unión del VIH a células fagocíticas mononucleares. Las líneas celulares susceptibles de infectarse por el VIH son los linfocitos T, las células dendríticas, los macrófagos, las células hematopoyéticas progenitoras, los oligodendrocitos, los astrocitos, la microglia, los fibroblastos de la piel, las células del intestino columnares y epiteliales y las células trofoblásticas en la placenta del útero materno. Después de la interacción de la gp120 viral y el CD4 celular, se produce la fusión de ambas membranas, previa a la internalización viral en la célula huésped, donde tiene un papel principal la gp41, siendo específicamente una proteína lipofílica (Daugherty *et al.* 2010).

Cuando el VIH se interna al interior de la célula huésped después de haberse separado de su membrana viral, es cuando empieza la replicación del mensaje genético por la transcriptasa inversa. La transcriptasa inversa es una enzima producida por la unión que realiza la proteasa con la poliproteína Gag - Pol, y de esta se distinguen dos subunidades, la de 66 y 51 Kd respectivamente, ambas tienen la capacidad de formar un

heterodímero (Aguiar *et al.* 2006;Chiang *et al.* 2010;Figueiredo *et al.* 2006;Westerman *et al.* 2007). La transcripción del retrovirus principia en una cadena simple de ADN. La síntesis de la segunda cadena requiere de la ribonucleasa H la cual degrada parcialmente el ARN original. La doble cadena de ADN viral se incorpora a la célula huésped con la ayuda de la enzima integrasa. A veces entran simultáneamente varios viriones en la célula hospedera por consiguiente se realiza un acumulo de ADN el cual no se integra produciendo como resultado la lisis de la célula. A continuación la infección entrara en un estado de latencia clínica caracterizada porque el material genético del VIH se integra únicamente al 1% de los linfocitos CD4 y solamente la décima parte de estos linfocitos CD4 tienen la capacidad de expresar el ARN viral. La presencia del provirus o de formas incompletas de transcripción no produce alteraciones patológicas en el paciente, por lo cual el paciente se mantiene asintomático (Soto et al. 2010).

La activación de los linfocitos debido a antígenos virales y citocinas produce la expresión génica del VIH en dos fases. Primero transcribe los genes reguladores del virus y posteriormente los genes estructurales del VIH que son: El gen Gag, Pol, Env y el gen regulador Rev, este último es responsable de la traducción del ARNm en el citoplasma celular. El paso de la transcripción “no estructural” a la transcripción “estructural” es un punto crítico en la replicación viral del VIH-1.En el citoplasma celular se realiza el empalme y la maduración de las proteínas virales, en este paso la proteasa viral desempeña un papel primordial. La proteasa debe ser eficaz para que la infectividad viral no se vea comprometida.

En las etapas finales de la replicación viral, cuando el virión sale de la célula huésped, ayudado por la proteína Vpu, es en ese momento cuando se realiza la

miristilación de la p17 y entonces se envuelve el virión por la membrana celular en donde se encontraban expresadas las glicoproteínas de la cubierta viral, la gp160. Sucesivamente a la replicación del VIH-1 se produce la lisis de la célula huésped. Este efecto citopático del virus se debe a diversos mecanismos, como el acumulo de ADN viral no integrado, el acumulo de proteínas de la membrana del VIH, la apoptosis o muerte celular programada la cual es producida por la misma célula huésped (Armstrong et al. 2009).

No obstante lo anterior, los monocitos son capaces de resistir los efectos citopáticos del VIH-1, debido a que la expresión de CD4 de los monocitos es menor, por lo tanto, esto constituye un mecanismo de perpetuación y almacenaje para el VIH, y de esta forma, la falta de efectos citopáticos en el monocito permite la distribución del virus por distintos órganos del organismo del paciente infectado (Balin *et al.* 2008; Morris and Rossi 2004).

5.5. Los antirretrovirales.

5.5.1. Los fármacos antirretrovirales en el bloqueo del ciclo replicativo del VIH.

El estudio del ciclo replicativo del VIH-1 nos ayuda a conocer las dificultades contra la lucha frente al VIH por los diversos mecanismos de defensa del virus, y además nos brinda más conocimiento sobre el progreso farmacológico de los medicamentos que bloquean el ciclo viral del VIH dentro de la célula huésped. Algunos medicamentos antirretrovíricos no han pasado de las fases clínicas de investigación farmacológica, sin embargo otros medicamentos se han podido utilizar con eficacia comprobada en los pacientes infectados, son pocos fármacos los que han pasado las

fases clínicas previas con éxito siendo aprobados para su uso médico por la FDA (Denizot *et al.* 2008;Diazgranados *et al.* 2009).

En la replicación del VIH-1, la transcripción del ARN en ADN, realizado por la enzima transcriptasa inversa es esencial, y diversos antirretrovirales actúan bloqueando la acción de esta enzima. Estos medicamentos antirretrovirales se dividen en: inhibidores análogos de nucleósidos de la transcriptasa inversa (INTI) y los inhibidores no análogos de nucleósidos de la transcriptasa inversa (INNTI). Los INNTI inhiben la enzima por un mecanismo similar al INTI, aunque los INNTI no compiten con los nucleósidos fisiológicos. Los INNTI incluyen, derivados del TIBO que es un análogo de las benzodiazepinas, la nevirapina, el piperacidínico BHAPs, y los provenientes compuestos de las piridinonas L69.639 y L697.661. (Forster *et al.* 2000;Gaertner *et al.* 2008).

La primera fase de expresión del genoma viral se debe a los genes reguladores. Por lo tanto la expresión de la proteína codificada por el gen Tat es vital para la transcripción del resto de proteínas virales. Se ha descubierto un producto, el Ro 5-3335, que inhibe la transactivación del gen Tat y además tiene una estructura muy parecida a las benzodiazepinas, pero a diferencia del TIBO, no inhibe la transcriptasa inversa (TI) y es efectivo contra el VIH-2, por su mecanismo de acción el Ro 5-3335 inhibe la replicación en células huésped crónicamente infectadas, superando a los inhibidores de la TI, sin embargo el Ro 5-3335 no tiene acción dentro del sistema nervioso central (SNC) del paciente (Kiso and Kisanuki 1993).

La enzima proteasa es un punto crítico en la replicación del VIH, para que la proteasa se active debe realizar un proceso autocatalítico del precursor Gag-Pol. Los

intentos terapéuticos para inhibir la proteasa en este punto del ciclo viral, incluyen el desarrollo de los inhibidores del C2 simétrico, siendo un lugar de unión específico de la proteasa y los péptidos que mimetizan a la proteasa. Aunque son varios los inhibidores de la proteasa que ha comprobado la eficacia farmacológica tanto *in vivo* como *in vitro*, del Saquinavir, el inhibidor de la proteasa líder en múltiples ensayos clínicos demostrando la disminución de la carga viral y un aumento en el número de linfocitos CD4 en los pacientes infectados con VIH, tanto en monoterapia como asociado a la Zidovudina (Danaher et al. 2010).

El Ritonavir, otro inhibidor de la proteasa ha comprobado con éxito la disminución efectiva de la carga viral en los pacientes tratados, también se han reportado la aparición de resistencias virales tempranas al medicamento por lo que debe combinarse con otros antirretrovirales (Barnard *et al.* 1997a; Borkow *et al.* 1999; Buckheit, Jr. *et al.* 2009).

Se han utilizado terapias inmunológicas también para combatir al SIDA, como el interferón, el cual actúa de diferentes formas, pues no sólo tiene efectos antivirales sino también inmunomoduladores, de los tres tipos descritos de interferones, parece ser que el alfa y el beta son los más utilizados dejando en tercer y último lugar al interferón gamma en la lucha contra el VIH-1. El interferón alfa se ha utilizado en pacientes seropositivos con sarcoma de Kaposi y como resultado se observó que este medicamento disminuía la aparición de infecciones oportunistas en estos pacientes, aunque efecto benéfico sobre la enfermedad no se ha demostrado en pacientes seropositivos sin sarcoma Kaposi, por lo que deberá indicarse el interferón con terapia combinada. Se han empleado otros inmunomoduladores, como la interleucina-2, aunque se comprobó que

la estimulación indiscriminada de linfocitos CD4 era perjudicial, aumentando la replicación viral (Rozenberg et al. 2009).

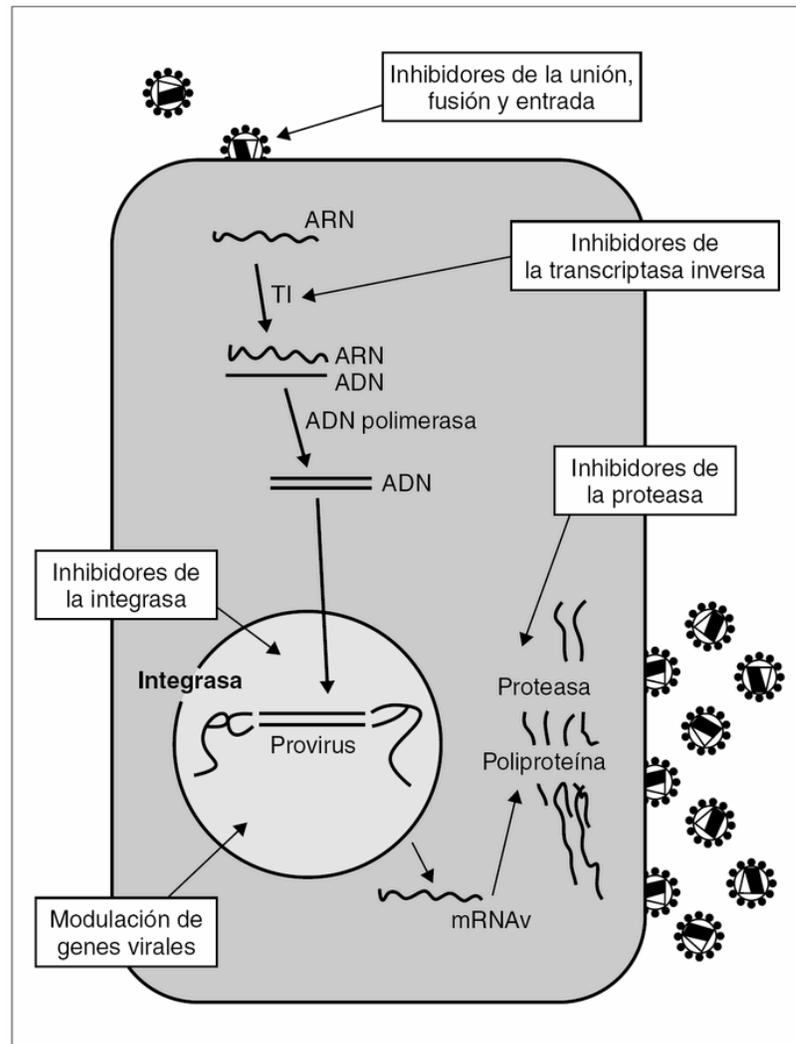


Figura 4. El ciclo biológico del VIH-1 y los lugares de acción de los fármacos antivirales. (Fang and Beland 2009)

5.5.2. Inhibidores de la entrada y la fusión del VIH-1.

Los inhibidores de la entrada evitan la fusión (IF) del VIH-1 a las células CD4 (células huésped) en el organismo humano. Estos inhibidores actúan de una manera diferente a la mayoría de los medicamentos inhibidores de la infección del VIH-1, ya que estos IF no permiten la entrada del virus a la célula huésped, en cambio los antirretrovirales (los inhibidores de la proteasa, los inhibidores nucleósidos de la transcriptasa inversa y los inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa inversa), son activos contra el VIH-1 después de que el virus penetra a la célula huésped.

Los inhibidores de la entrada se adhieren a las proteínas de superficie de la membrana externa de las células T, utilizan la proteína CD4, los correceptores CCR5 ó CXCR4 de la superficie de las células blanco, también se adhieren a las proteínas gp120 y gp41 de la membrana del VIH-1. Si los inhibidores de la entrada logran adherirse eficientemente a las proteínas mencionadas anteriormente, éstas se bloquean y por consecuencia el VIH no logre unirse a la superficie de las células blanco e ingresar a las mismas (Denizot *et al.* 2008;Este 2003;Este and Telenti 2007;Wyatt *et al.* 1998).

La Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos ha aprobado dos inhibidores de la entrada. El Fuzeon (enfuvirtide) de la empresa farmacéutica Roche en marzo de 2003, actúa a nivel de la proteína gp41 en la superficie del VIH-1 y Selzentry (Maraviroc) de Pfizer, aprobado en agosto de 2007 que actúa a nivel del correceptor CCR5 en la célula inhibiendo la infección de los virus M-trópicos. Los medicamentos en experimentación incluyen actualmente al Vicriviroc (un inhibidor de la entrada, bloqueador de CCR5) de Shering-Plough, el anticuerpo monoclonal bloqueador de CCR5 PRO 140 de Progenics y TNX-355 de Tanox, que actúa a nivel del receptor CD4 en las células blanco (Kim and Chang 1992;Ray 2009a).

Las personas VIH-1 positivas que tienen resistencia a los IP, INTI e INNTI probablemente se beneficien de la combinación sinérgica de los inhibidores de entrada, dado que son una clase diferente de medicamentos. Estas son buenas noticias para las personas VIH-1 positivas que han probado y fracasado con muchos de los medicamentos inhibidores de la infección del VIH-1 aprobados actualmente (Ray 2009a).

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-1 positivas que hayan tomado otros medicamentos antirretrovíricos anteriormente y que no pueden mantener sus cargas virales indetectables con los medicamentos con los que han sido tratados. Aún no se ha aprobado como medicamento de primera elección para el tratamiento antirretroviral. El Fuzeon debe administrarse en combinación con otros medicamentos para tratar a los pacientes seropositivos.

Enfuvirtida

La enfuvirtida es un antirretroviral polipeptídico de la familia de los inhibidores de fusión, y se destaca como el medicamento líder en esta clasificación. Ha sido utilizado en pacientes seropositivos adultos y en niños mayores de 6 meses de edad que han recibido tratamiento antirretroviral altamente supresor cuando el virus ha desarrollado resistencia a otros antirretrovirales (Gabrielli *et al.* 2010; Joly *et al.* 2010).

La enfuvirtida es un péptido mimético de una región de la gp41 lo cual bloquea la unión entre la membrana del virus (gp41) y la membrana celular (receptor CD4). Ha demostrado ser un potente inhibidor de la fusión mediada por la glicoproteína transmembranal (gp41). Dada la naturaleza polipeptídica de la enfuvirtida, si su administración fuera por vía oral, el medicamento sería destruido por los ácidos gástricos, por lo que se descarta su uso por vía oral, la enfuvirtida se administra por vía

subcutánea. (Este and Telenti 2007;Oliveira *et al.* 2009;Pauwels *et al.* 1995;Pauwels and De 1996).

Entre los efectos adversos de la enfuvirtida están: evacuaciones diarreicas, náuseas, vómitos, cefalea, insomnio, mialgias y parestesias en miembros inferiores.

El Maraviroc, también conocido como Celsentri®, es también un inhibidor de entrada, fue autorizado por la Administración de Alimentos y Medicamentos para el tratamiento de pacientes con infección por el VIH-1 con tropismo por el correceptor CCR5, en adultos que ya han sido tratados con múltiples antirretrovirales y presentan resistencias virales a 2 o 3 fármacos antirretrovirales. Se administra en combinación con otros 2 o 3 fármacos antirretrovirales activos.

En 2006, Pfizer estableció un programa mundial de acceso ampliado para suministrar el Maraviroc a los pacientes con poca o ninguna opción de tratamiento. 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, se administra en tabletas por vía oral en una dosis de 300 mg dos veces al día.

Además de sus efectos farmacológicos antivirales, el Maraviroc puede causar también algunos efectos secundarios adversos. Entre los efectos secundarios más comunes observados en estudios hasta la fecha, se puede encontrar: tos, fiebre, vértigo, cefalea, hipotensión arterial, náuseas e irritación en la vejiga urinaria. En dos estudios de fase III se notificaron posibles trastornos hepáticos y cardíacos, mayor riesgo de infección y además un ligero aumento de las concentraciones de colesterol sérico (Ray 2009a).

Los estudios clínicos de interacciones medicamentosas demuestran cambios en la exposición al Maraviroc cuando se administra con otros medicamentos contra el VIH-1,

incluyendo al efavirenz y lopinavir. Estos efectos provocan el cambio a diferentes dosis del Maraviroc (Este and Telenti 2007;Kitchen *et al.* 2008;Oliveira *et al.* 2009;Pauwels *et al.* 1995;Pauwels and De 1996;Wallace 2006;Wyatt *et al.* 1998).

5.5.3. Inhibidores Nucleósidos e inhibidores de Nucleósidos de la Transcriptasa Inversa (INTI)

La primera clase de agentes antirretrovirales contra el VIH-1 que se desarrollaron científicamente fueron los inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de los Nucleósidos (INTI). La transcriptasa inversa (TI) es un enzima, presente en el virión, la cual es requerida por el virus para realizar la replicación a través de una fase ADN que se integra en el genoma de la célula blanco infectada (formación de cadenas de ADN a partir del ARN viral). La inhibición de la TI pueden ser de forma competitiva (el antirretroviral mimetiza los sustratos naturales para la síntesis del ADN) o por la terminación temprana de la cadena lo cual impide que se añadan nuevos nucleótidos a la cadena de ADN.

Está demostrado que los medicamentos de este primer grupo, los mimetizadores aumentan la supervivencia y disminuyen la frecuencia y la severidad de las infecciones oportunistas en los pacientes con una infección avanzada; además disminuyen la progresión de la infección por el VIH en fases iniciales de la enfermedad obteniendo recuentos basales de CD4 menores de 500 células/mm³. De cualquier forma y a pesar de lo anterior, estos beneficios puedan ser transitorios ya que si bien, estos retrasan la progresión a SIDA, el beneficio disminuye con el paso del tiempo, ya que el mismo desarrolla mutaciones con resistencia a los antirretrovirales (Annan *et al.* 2009;Ortega *et al.* 2009;Stegen *et al.* 2009).

Está demostrado ampliamente que los medicamentos antirretrovíricos son menos efectivos en monoterapia que cuando se combinan entre ellos, evitándose de esta forma que rápidamente el virus pueda mutar y presentar resistencias.

El término Tratamiento Antirretroviral de Gran Actividad (TARGA) se refiere a la combinación de tres o más medicamentos anti-VIH. Alguna de las pautas establecidas en el tratamiento de combinación de antirretrovirales asocia dos INTI como AZT-ddI, AZT-ddC, AZT-3TC, 4dT-3TC o 4dT-ddI. Aunque estas combinaciones usadas de modo exclusivo no logran una reducción marcada y sostenida de la carga viral en los pacientes seropositivos y por consiguiente deben asociarse con otros antirretrovirales como los inhibidores de la proteasa (IP) o los inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa inversa (INNTI).

En 1986 se inicio el primer ensayo clínico de monoterapia con AZT contra un placebo, doble ciego controlado, al cual se nombró ensayo BW02. Después de 6 meses con el análisis estadístico se comprobó que los pacientes seropositivos a los que se les administró únicamente el placebo, presentaban más infecciones oportunistas y muerte de forma significativa comparados con los recibían el medicamento. El ensayo ACTG 002 comparó el efecto de la administración de dosis altas de AZT con dosis más bajas; se demostró que las dosis menores resultaron menos tóxicas para los pacientes, los cuales tuvieron una mayor supervivencia sin presentar un aumento significativo de evolución clínica a SIDA comparado con la administración de dosis mayores (1500 mg vs 1200 mg diarios por 4 semanas y posteriormente 600 mg por día).

En el continente Europeo de 1988 a 1990 se realizó el ensayo de fase clínica Concorde; en este estudio se comparó la diferencia entre el tratamiento en la fase clínica inicial de la enfermedad (pacientes con más de 500 CD4/mm³) a los que se les

administraba el medicamento AZT contra un estudio de la terapia diferida en pacientes asintomáticos a los cuales se les administraba un placebo, se incluyeron más de 1700 pacientes aleatorios que recibieron AZT (250 mg divididos en 4 veces al día) y en el otro estudio, los pacientes que recibieron el placebo durante 3 años. Los pacientes en el grupo placebo pasaban al grupo que recibió el AZT en el momento que bajaba su recuento de CD4 a menos de 500 células por mm³. En los pacientes del grupo de pacientes que recibieron el tratamiento de AZT, se observaron aumentos en el conteo de células CD4 y las proporciones de supervivencia en el periodo de 3 años no mostraron diferencias significativas entre ambos grupos (Ortega *et al.* 2009b; Schiller and Youssef-Bessler 2009; Souza *et al.* 2009).

En los ensayos clínicos denominados ACTG 116 / A y el ACTG 116 / B /ACTG 117 se comparo la diferencia entre las monoterapias con AZT y además la monoterapia con ddI mientras que el ensayo clínico ACTG114 comparó la combinación entre el AZT con ddC mientras que el ensayo clínico ACTG106 fue el análisis de la eficacia de la combinación AZT+ddC. Estos estudios fueron realizados con pacientes con enfermedad avanzada y en ellos se utilizaron diferentes dosis de los fármacos en un intento de establecer la dosificación más adecuada (Ortega *et al.* 2009a).

El ensayo clínico ACTG175 aportó a la comunidad científica la primera prueba de que la terapia combinada de dos antirretrovirales era clínicamente superior en cuanto a la progresión de la infección viral y la mayor supervivencia de los pacientes, comparando los resultados obtenidos a los del empleo de la monoterapia. Además se obtuvo evidencia por primera vez en relación a que la terapia combinada en pacientes con enfermedad avanzada prolongaba la supervivencia a la vez que comprobó que el AZT en monoterapia no debía ser primera elección. En el ensayo clínico ACTG175 se

inscribieron a 2500 pacientes con conteos moderados de linfocitos CD4 (entre 250 a 500 CD4 por mm^3), a 1400 pacientes se les habían administrado previamente antirretrovirales; se distribuyeron en forma aleatoria en cuatro diferentes grupos: a) monoterapia con AZT, b) monoterapia con ddI, c) combinación de AZT+ddI y d) combinación de AZT+ddC. El tiempo de seguimiento del ensayo clínico fue de 143 semanas. Se comprobó que las combinaciones de los dos antirretrovirales y la monoterapia con ddI resultaron más eficaces clínicamente comparadas con la monoterapia con AZT. El 16% de los pacientes con monoterapia de AZT empeoró o fallecieron, comparado con los que recibieron la combinación terapéutica de AZT+ddI los cuales únicamente en el 11% de los pacientes se demostró la progresión de la enfermedad, 12% tuvieron progresión con la combinación AZT+ddC y 11% tuvieron progresión con la monoterapia de ddI. Los resultados fueron similares en los subgrupos de pacientes que no recibieron tratamiento previo en comparación con los pacientes tratados anteriormente con antirretrovirales, salvo en la rama AZT+ddC se demostró el beneficio únicamente en los pacientes que no habían recibido tratamiento previo. (Al-Jabri and Alenzi 2009; Balzarini *et al.* 1998; Barnard *et al.* 1997

;De 2002; Rajesh *et al.* 2009; Ray 2009b; Souza *et al.* 2009; Stevens *et al.* 2006).

Los ensayos clínicos NUC A y NUC B analizaron los efectos de la combinación de AZT con 3TC y aportaron información importante sobre una mejoría clínica sostenida de los marcadores de progresión los cuales apoyan la combinación de los ITIAN. EL ensayo clínico NUC A se realizó en 366 pacientes que no habían recibido anteriormente el AZT y que tenían sus conteos linfocitarios de CD4 entre 200 y 500 por mm^3 . Se aleatorizaron los pacientes en 4 diferentes grupos: 1) monoterapia AZT 2) monoterapia 3TC, 3) combinación de AZT+3TC (150 mg cada 12 horas) y 4)

combinación de AZT+3TC (300 mg cada 12 horas). Los grupos que recibieron monoterapia tuvieron como resultado un leve incremento en el recuento de células linfocíticas CD4 posteriormente regresaban a sus niveles basales, un descenso medio de la carga viral volvía a los niveles previos en menos de 6 meses. Contrariamente en los grupos con combinación antirretroviral, el aumento medio del conteo de las células CD4 resultó mayor (30 contra 80 células por mm^3) y persistió después de año de seguimiento y la carga viral descendía para posteriormente estabilizarse. En el ensayo clínico NUC B (europeo) los resultados fueron similares. (Balzarini *et al.* 1998;Lightfoot and Milburn 2009).

De igual forma, el ensayo clínico llamado CEASAR la evidencia clínica de la combinación terapéutica de AZT+3TC produjo un retraso en la progresión de la enfermedad. En los ensayos clínicos donde se compararon el AZT+3TC con el grupo AZT+placebo, se pudo comprobar una reducción mayor al 50% del riesgo de progresión de la enfermedad en el grupo que recibió AZT+3TC. (Barnard *et al.* 1997;Lightfoot and Milburn 2009).

Los inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de los nucleósidos son: La Zidovudina. AZT (Retrovir), Didanosina. ddI (Videx), Zalcitabina. ddC (Hivid), Estavudina. d4T (Zerit), Lamivudina 3TC (Epivir) y el Abacavir (Ziagen)

La información publicada más recientemente parece apuntar a que los beneficios clínicos reportados sobre los inhibidores de la transcriptasa inversa son moderados tanto en su eficacia a largo plazo como en la duración de su efectividad antirretroviral. La aparición de VIH resistentes a los medicamentos es el mayor problema en la terapéutica médica de los pacientes seropositivos, ya que la resistencia antiviral es responsable de la

menor eficacia antirretroviral. Este problema es mayor en los pacientes que reciben los medicamentos del grupo de los inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de los nucleósidos (INNTI) entre ellos se encuentran, la delavirdina y la nevirapina (Al-Jabri and Alenzi 2009;Cutler and Justman 2008;Lightfoot and Milburn 2009)

5.6 Métodos preventivos contra la infección del VIH-1.

5.6.1 Uso del condón o preservativo.

No se ha demostrado la transmisión del virus por la respiración, la saliva, el contacto casual por el tacto, dar la mano, abrazar, besar en la mejilla, o compartir utensilios como vasos, tazas o cucharas. En cambio es teóricamente posible que el virus se transmita entre personas a través del beso boca a boca, si ambas personas tienen llagas sangrantes o encías llagadas, pero ese caso no ha sido documentado y además es considerado muy improbable, ya que la saliva tiene enzimas que lo destruyen, y además contiene concentraciones de virus mucho más bajas que otras secreciones como el semen. (Elias and Coggins 1996).

El condón masculino es recomendable para todo tipo de actividad sexual que incluya penetración. Es muy importante enfatizar que se debe usar el condón hecho del material látex, pues otro condón (de carnero) que existe en el mercado, hecho a base de material orgánico, no es efectivo para la prevención. Los condones tienen una tasa estimada del 90-95% de efectividad para evitar el embarazo o el contagio de enfermedades de transmisión sexual, y usado correctamente, esto es, bien conservado, abierto cuidadosamente su empaque y correctamente colocado, es el mejor medio de protección contra la transmisión del VIH-1. Se ha demostrado repetidamente que el VIH-1 no pasa efectivamente a través de los condones de látex intactos.

En el caso del sexo anal, debido a la delicadeza de los tejidos del ano y la facilidad con la que se lacera, se considera que es la actividad sexual de más riesgo. Por eso los condones deben utilizarse. (Coleman et al. 2007)

5.6.2 El desarrollo de vacunas contra el virus VIH-1.

Como no se conoce aún cura alguna para el SIDA, la búsqueda de una vacuna efectiva se ha convertido en una parte importante de la lucha contra la enfermedad.

La urgencia de la búsqueda de una vacuna contra el VIH-1 SIDA se deriva de la cifra de muertos de los más de 25 millones de personas desde 1981.

Por lo tanto, una vacuna contra el VIH-1 es tal vez la única manera de que la pandemia del SIDA se puede detener. Sin embargo, después de más de 20 años de investigación, sigue siendo un objetivo a alcanzar (Montagnier 2010).

5.6.3 El cérvix uterino humano (órgano principal de la transmisión de la infección por VIH-1).

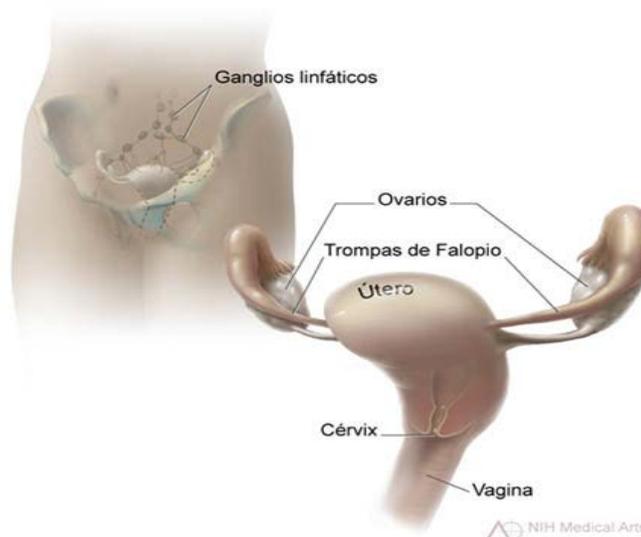


Figura 5. Anatomía de aparato reproductor femenino (Blander 2010;Pan *et al.* 2010;Radulovic *et al.* 2010;Takagi *et al.* 2010)

El cuello uterino o cérvix uterino es la porción fibromuscular inferior del útero que se proyecta dentro de la vagina, y es un componente anatómico exclusivo de la hembra de los mamíferos. Esta apertura o hueco deja que salga la sangre del útero durante la menstruación (período menstrual). También deja que entren los espermatozoides al útero y a las trompas de Falopio (Blander 2010;Pan *et al.* 2010;Radulovic *et al.* 2010;Takagi *et al.* 2010).

Aunque, por lo general mide de 3 a 4 cm de longitud y unos 2.5 cm de diámetro, el cérvix se puede dilatar unos 10 cm durante el parto para dejar que pase el bebé, y su tamaño puede variar según la edad, el número de partos y el momento del ciclo menstrual de la mujer. El cuello uterino o cérvix tiene una superficie lisa y brillante con un orificio cervical pequeño y redondeado en la nulípara y como la boca de un pez en las que ya han dado a luz por parto vaginal.

El Exocérvix o ectocérvix:

Es la parte que se visualiza más fácilmente del cuello uterino a través de la vagina en una colposcopia. Está rodeado por los fondos de saco vaginales. Está recubierto por un epitelio escamoso estratificado rosado, de múltiples capas celulares. Las capas celulares intermedia y superficial del epitelio escamoso contienen glucógeno (Blander 2010;Pan *et al.* 2010;Radulovic *et al.* 2010;Takagi *et al.* 2010).

El Endocérvix:

No es visible en gran parte, porque se encuentra en el centro del cérvix formando el canal endocervical que une el orificio cervical externo con la cavidad uterina. Está

recubierto por un epitelio cilíndrico rojizo de una única capa celular (Blander 2010;Pan *et al.* 2010;Radulovic *et al.* 2010;Takagi *et al.* 2010).

El canal endocervical:

Se extiende desde el orificio cervical externo hasta el orificio cervical interno, mide unos 6 mm de diámetro, está revestido en todo su trayecto del epitelio endocervical cilíndrico monoestratificado secretor de mucus, lo que le permite estar ocluido totalmente en su luz por el moco cervical, constituyendo el llamado tapón mucoso endocervical, que impide que los gérmenes procedentes de la vulva, vagina y exocérnix asciendan a los genitales internos (Gouws *et al.* 2008;Zussman *et al.* 2003)

El orificio cervical externo:

Es el que comunica en canal cervical del cuello uterino con el orificio cervical interno. Varía de acuerdo al número de partos, encontrándose en la nulípara en forma de una abertura circular de poco diámetro, en la multípara el aspecto cambia a causa de los desgarros del parto, adquiriendo el aspecto de hendidura transversal y estrellada en casos de desgarros oblicuos, que deforman la arquitectura del cérvix trayendo como consecuencia el ectropión o eversión del epitelio endocervical.

El epitelio es el tejido formado por una o varias capas de células yuxtapuestas que recubren todas las superficies libres del organismo, y constituyen el recubrimiento interno de las cavidades, órganos huecos, conductos del cuerpo y la piel y que también forman las mucosas y las glándulas. Los epitelios también forman el parénquima de muchos órganos, como el hígado (Blander 2010;Pan *et al.* 2010;Radulovic *et al.* 2010;Takagi *et al.* 2010).

Las mujeres son físicamente más vulnerables que los hombres a la transmisión sexual del VIH-1, seguramente debido a la naturaleza del cuello uterino. A diferencia del epitelio (superficie) vaginal, que consiste en varias capas de células escamosas planas y resistentes, algunas partes de la superficie del cuello uterino están constituidas por una capa simple de células columnares frágiles, las cuales se pueden lastimar más fácilmente. Esto es el equivalente celular a una pila de luchadores de sumo versus una sola línea de patinadores artísticos (McClelland *et al.* 2001b; van der Straten *et al.* 1995)

En mujeres más jóvenes, estas células cervicales columnares están aún más expuestas que en las mujeres adultas, lo cual probablemente constituye un factor importante en el mayor riesgo de las niñas adolescentes. Adicionalmente, varias de las células que son blancos del VIH-1, incluyendo las células CD4, se encuentran más frecuentemente en el cuello uterino que por todo el resto de la vagina. El paso de fluidos infecciosos en el tracto genital superior (que también es altamente susceptible) vía el cuello uterino, puede ser otro factor en el contagio del VIH-1 en las mujeres. Otras ITS también tienen el cuello uterino como objetivo. Por ejemplo, las bacterias que causan la gonorrea y la clamidia que pueden reproducirse solamente en el epitelio cervical y no en el epitelio escamoso de la vagina. (Campaña Global por los Microbicidas. 2009).

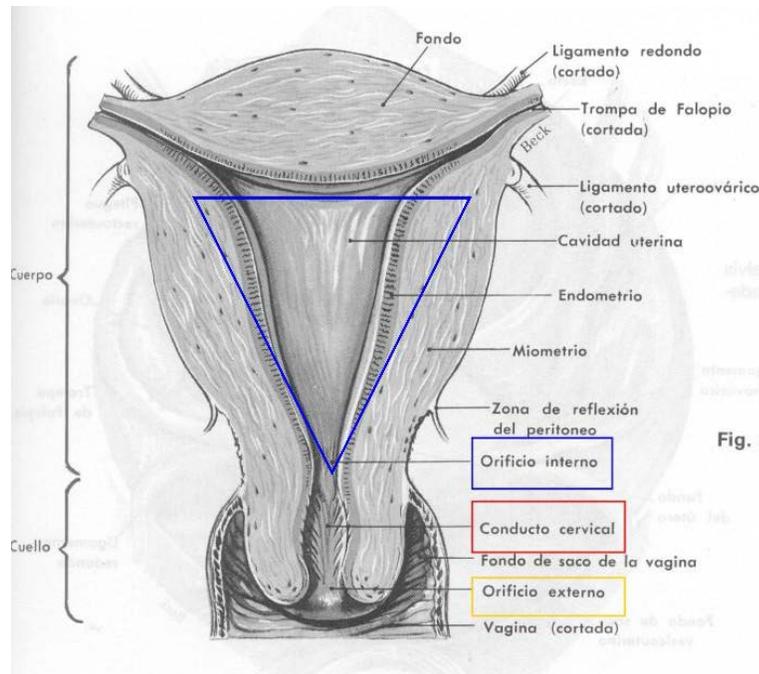


Figura 6. Localización anatómica de cérvix humano. El cérvix o cuello uterino es la abertura de útero que se prolonga en el interior de la vagina. El canal cervical se encuentra en el centro del cuello uterino y comunica la vagina con la cavidad uterina. Este canal se encuentra habitualmente lleno de moco, cuya consistencia cambia a lo largo del ciclo menstrual de la mujer. El canal cervical mide normalmente tan sólo 2-3 mm de ancho, pero se ensancha durante el parto para que éste pueda tener lugar (Mei-Ling et al. 2010).

5.7 Los microbicidas tópicos vaginales.

Los microbicidas son productos de administración vaginal o rectal que pueden reducir la transmisión del VIH-1 y de otros microorganismos causantes de enfermedades de transmisión sexual (ETS), incluyendo virus, bacterias y parásitos (Bhol and Schechter 2005; Klebanoff and Coombs 1991; McGowan 2006; Moscicki 2008; Tian et al. 2007).

Si bien aún no se han desarrollado a nivel comercial, la investigación sobre las formas de presentación, su dosificación y otros detalles está siendo impulsada aceleradamente por la necesidad de encontrar nuevas vías de prevención no sólo contra el VIH-1, sino contra muchos otros agentes de ETS. Muchos de ellos aún están siendo probados en humanos.

En la década de los ochentas, las relaciones sexuales entre hombres (HSH) eran consideradas la principal vía de contagio del VIH-1. Al pasar de los años se ha observado una modificación en el comportamiento de la epidemia: la proporción de mujeres infectadas ha aumentado considerablemente (Yerly *et al.* 2009; Zussman *et al.* 2003).

Al comparar información actual con datos de 1997 se observa un incremento del 41% al 47% del índice de mujeres infectadas. En 2004, el 47% de las personas con VIH-1 eran mujeres de entre 15 y 49 años, lo cual abarca a individuos en edad reproductiva. En el mismo año, esta enfermedad fue considerada la principal causa de muerte en mujeres afro-americanas de 25 a 34 años de edad. A nivel mundial, 5,000 mujeres son infectadas cada día, de las cuales el 90% se encuentra en países en vías de desarrollo. En la Figura 6 se muestra la distribución de proporciones de mujeres con VIH-1 en el mundo

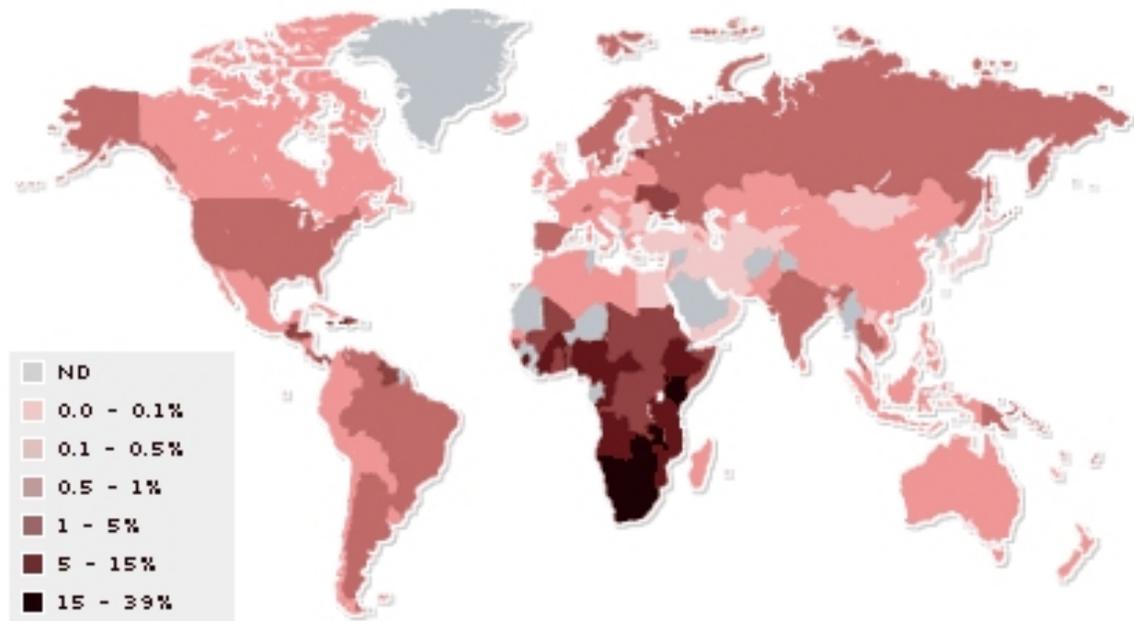


Figura 7. Porcentaje de mujeres infectadas con VIH-1 en el mundo.

(ONUSIDA)(Walker *et al.* 2003)

Las mujeres de todo el mundo se enfrentan al riesgo creciente de la infección por el VIH-1. En 1992, se estimaba que el 25% de la población infectada con el VIH-1 eran mujeres, mientras que en 1996 esta cifra llegó al 42%. De los 5 millones de personas que en 2002 se agregaron a los infectados, más del 95% reside en países en desarrollo y casi la mitad de las personas adultas que se sumaron a los infectados son mujeres.

De acuerdo al Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos, las mujeres son particularmente vulnerables a la transmisión del VIH-1 por vía heterosexual debido a la gran superficie de membrana mucosa expuesta a los fluidos seminales. El Dr. Hope Ricciotti de la Escuela de Medicina de Harvard agrega que por ser mayor la cantidad de

fluídos corporales transferidos del hombre a la mujer y, mayor la carga viral en los fluídos sexuales masculinos, en países como Estados Unidos es más probable que un hombre infectado contagie a una mujer que una mujer infectada contagie a un hombre (Montagnier 2010;Rohan *et al.* 2007).

Aunado a estos factores biológicos, las mujeres se ven afectadas por la infección por VIH-1 debido a la desigualdad de género de carácter social, cultural y económica, lo cual se ve reflejado en su capacidad de protegerse al momento de tener relaciones sexuales. Las estrategias actuales de prevención –monogamia mutua en parejas VIH-1 negativas, uso del condón y abstinencia- no son viables para gran número de mujeres debido a que dependen del consentimiento de su pareja para poder ser llevadas a cabo con efectividad. Por consiguiente, se vuelve necesario la búsqueda de métodos que otorguen el control a la mujer en lo que respecta a protección contra enfermedades de transmisión sexual (Buckheit, Jr. *et al.* 2009;Cutler and Justman 2008) .

Dentro de las medidas preventivas para la infección por VIH-1 y otras infecciones de transmisión sexual, el uso del preservativo ha sido el elemento de control de mayor importancia., las organizaciones internacionales de la salud, como la OMS (Organización Mundial de la Salud), la OPS (Organización Panamericana de la Salud), etc., han recomendado especialmente su uso y la educación necesaria para quienes necesitan prevención.

Sin embargo, esta medida preventiva en muchos casos ha fracasado debido a una falta de conciencia en el uso del preservativo observada mayormente en los varones. Por otra parte, el desarrollo de preservativos femeninos no ha logrado imponer su uso por diversos factores, entre los cuales el desconocimiento y su mayor costo son los más importantes.

A pesar de ser el condón un método de protección para ambos integrantes de la pareja, el hombre sigue siendo el depositario de la responsabilidad y el supuesto derecho de elegir usarlo o no.

Los microbicidas de uso tópico serán una alternativa validera para esas mujeres, ya que dependerán mucho más de su decisión e iniciativa.

Sin embargo, un microbicida eficaz debe proteger a los dos miembros de la pareja. Los microbicidas no solamente están indicados para la prevención contra el VIH-1 en las mujeres, sino también en los hombres. (D'Cruz and Uckun 2004; Elias and Coggins 2001).

Los investigadores de microbicidas enfrentan retos formidables, el primero de los cuales es cómo diseñar estudios para determinar la eficacia de los mismos en seres humanos. La manera ideal de evaluar la eficacia de un microbicida es poner a la prueba un producto en un grupo numeroso de mujeres que corren un riesgo elevado de contraer enfermedades de transmisión sexual.

Otro factor que complica la interpretación de los resultados de las investigaciones es la medida en que se usan sistemáticamente los condones y los microbicidas en esos estudios. También se plantean interrogantes acerca de las formulaciones de base (o medios de administración) que se usan para los ingredientes activos en los productos posibles. Estos vehículos tienen el objetivo de mantener los principios activos y facilitan su distribución en la vagina, pero pueden tener efectos protectores o tóxicos.

Así mismo, en un ensayo en el que se usa placebo como testigo, se proporciona a algunas participantes un producto placebo que se parece al microbicida investigado. Pero el placebo mismo puede influir en las tasas de infección. Por ejemplo, el producto lubricante del placebo puede prevenir las abrasiones vaginales, lo cual podría reducir el

número de infecciones (Breslow *et al.* 2010;Cady *et al.* 2010;Fellay *et al.* 2010;Tafesse and Holthuis 2010).

5.7.1 Mecanismo de la acción de los microbicidas.

Los microbicidas se encuentran en diferentes presentaciones: en forma de geles, óvulos, crema, etc., por lo tanto son de fácil aplicación en la vagina incluso horas antes de una relación sexual para brindar protección a mujeres y al mismo tiempo protegerán al hombre.

Los mecanismos de acción serían, al menos, tres:

- Unos actuarían reforzando los mecanismos naturales de defensa del organismo.
- Otros, en cambio, actuarían inactivando los agentes patógenos, como el VIH-1 y otros agentes causantes de ETS.
- Por último, otros productos crearían una barrera entre la mucosa vaginal y esos agentes patógenos.

Los investigadores intentan combinar estos mecanismos de acción en un solo producto, lo cual le conferiría mayor eficacia y seguridad (Gouws *et al.* 2008;Greenhead *et al.* 2000) .

Algunos de los productos en desarrollo presentan la posibilidad de ser usados también como anticonceptivos, previniendo así embarazos no deseados. Otros, en cambio, permitirán la concepción, dando la posibilidad de un embarazo con protección (2010;Becker *et al.* 2010;Boddey *et al.* 2010;Russo *et al.* 2010;Sarewitz 2010).

Se han propuesto previamente varios agentes como microbicidas tópicos anti-VIH. El gel-buffer, un gel diseñado para proteger contra la infección por VIH-1, por el

mantenimiento de la normalidad de la acidez del pH de la vagina es un inhibidor de la absorción del virus, es un candidato a ser microbicida tópico (Kresge 2010;McCormack *et al.* 2010;Nau 2010).

Otros microbicidas potenciales que están siendo probados incluyen: antagonistas de correceptores de virus, inhibidores de fusión, inhibidores de virus desnudos e inhibidores de la transcriptasa inversa (Al-Jabri and Alenzi 2009;Cutler and Justman 2008;McGowan 2006;Rohan and Sassi 2009) .

La estrategia deseable para prevenir de la transmisión del VIH-1 durante el acto sexual es el desarrollo de microbicidas no-tóxicos y efectivos contra la infección del virus tanto del libre de células como del asociado a células, los modelos cervicales para el estudio de microbicidas demostraron ser efectivos para la transmisión de VIH-1 tanto libre de células como asociado a células (Collins *et al.* 2000;Dezzutti *et al.* 2004;Zussman *et al.* 2003). Este modelo provee la arquitectura tisular natural *in vivo*, incluyendo el epitelio escamoso estratificado, la submucosa y las células inmunes para poder estudiar la inhibición de la infección y toxicidad de los microbicidas tópicos vaginales (Zussman *et al.* 2003).

A través de este método se pudo demostrar el efecto microbicida del compuesto denominado UC781 formulado en un Gel Replens o Buffer-gel.

5.7.1.1 El gel Replens.

El gel Replens es únicamente un gel hidratante vaginal, no es un microbicida y proporciona: Una disminución de los síntomas de atrofia y sequedad vaginal, el picor, la irritación y las relaciones sexuales dolorosas con el uso tópico regular de 3 veces por semana. Se aplica directamente en el interior de la vagina utilizando el aplicador

diseñado específicamente para este fin. La hidratación dura de más de 72 horas continuada con la primera aplicación, ya que, el agua purificada de la composición se absorbe por los tejidos, las células más externas de la piel se eliminan naturalmente y deja la piel inferior más sana y flexible.

Estudios clínicos demuestran que los mejores resultados llegan con un uso regular (3 aplicaciones a la semana, preferentemente por la mañana). La dosis se puede reducir cuando la sequedad disminuye, mejorando clínicamente la sintomatología de la mujer (van der Laak et al. 2002).

5.7.2 Microbicidas en el mundo.

Actualmente no disponemos de un microbicida tópico vaginal contra el VIH-1 aceptado por la FDA, todos se encuentran en diferentes fases de investigación. El tiempo promedio que se llevan las pruebas requeridas y el registro de un producto es de 10.5 años.

Se han reportado 60 productos en desarrollo, de los cuales sólo seis están listos para entrar a la fase III. En la siguiente tabla se muestran catorce ejemplos de distintos microbicidas con diferentes mecanismos de acción que se encuentran en distintas fases. En la fase I se maneja un grupo de 20 a 80 personas, se realizan pruebas para evaluar seguridad, determinar el rango de dosis, e identificar efectos secundarios (Craigie 2010;Cross 2010;Frearson *et al.* 2010;Gao *et al.* 2010;Haase 2010;Murray and Rice 2010).

En la fase II el estudio se realiza en un grupo de 100 a 300 personas para verificar la efectividad del producto y evaluar de nuevo su seguridad. En la fase III, en cambio, se incluyen grupos de 1,000 a 3,000 individuos para confirmar la efectividad, monitorear

efectos secundarios y, hacer comparaciones con tratamientos de uso común (Kalichman et al. 1998)

De llegar pronto al mercado, se ha estimado que el uso de un microbicida con efectividad del 60% en el 20% de las mujeres de la población, podría evitar alrededor de 2.5 millones de infecciones con el VIH-1 en el curso de 3 años. Dada su importancia, varias han sido las organizaciones internacionales que se han creado con el propósito de atender el problema. Entre estas, sobresalen : International Partnership for Microbicides (IPM), Global Campaign for Microbicides, Microbicides Development Programme, Alliance for Microbicide Development, entre otras. Estos organismos han permitido lograr la colaboración de distintos países e instituciones internacionales con el objetivo de proveer fondos a los distintos proyectos de investigación sobre microbicidas. IPM, por ejemplo, ha recibido fondos de la Fundación Rockefeller (\$5 millones de dólares), Holanda (\$8 millones), Irlanda (\$7 millones), Gran Bretaña (\$1.2 millones) y, de la Fundación Bill y Melinda Gates (\$60 millones) (Al-Jabri and Alenzi 2009;Asres *et al.* 2005;Borkow *et al.* 2007;Cutler and Justman 2008;Elechiguerra *et al.* 2005;McGowan 2006;Moscicki 2008;Rohan and Sassi 2009).

A pesar de los esfuerzos internacionales, faltan todavía algunos años para que un microbicida seguro y efectivo salga al mercado (Elechiguerra *et al.* 2005;Papapostolou and Howorka 2009;Soule *et al.* 1998). Dhawan y Mayer mencionan que la problemática en el desarrollo de los microbicidas se debe a que el proceso biológico de infección por VIH-1 aún no está del todo comprendido, a las dificultades ocasionadas por la extrapolación en modelos animales y, a la complejidad dada por las diferentes fases de evaluación del producto. Aquí cabe resaltar que al ser el microbicida un tratamiento de tipo preventivo, los participantes en las fases de evaluación deben ser individuos no

infectados que se expongan al virus y no pacientes con VIH-1 que busquen una cura, por lo que las limitantes para realizar las pruebas en humanos son considerables (Zussman *et al.* 2003)

El microbicida ideal debe ser:

1. Eficaz contra el VIH y todas las demás ETS,
2. Activo desde el momento de su aplicación tópica y durante largo tiempo,
3. Seguro,
4. Barato y accesible para la población,
5. Disponible sin necesidad de receta médica,
6. Sin color, olor ni sabor
7. Estable,
8. Fácil de almacenar,
9. Puede tener o carecer de propiedades anticonceptivas.

El microbicida ideal aun está en proceso de investigación. Afortunadamente, en unos estudios de formulación de preferencias llevados a cabo por el Consejo de Población (Population Council) en cinco países, los participantes indicaron que usarían un producto incómodo y desagradable siempre y cuando se demostrara su eficacia contra el VIH.

Tabla IV. Fases de ensayos clínicos aplicables a los microbicidas. (McGowan 2006)

Fases de ensayos clínicos aplicables a los microbicidas			
Fase	Número de participantes	Duración del seguimiento	Objetivos tratamiento y
Fase I	10–100	1 a 2 semanas	Evaluar la seguridad y aceptabilidad a nivel local y sistémico y determinar la dosis y formulación. El ensayo podría llegar hasta una fase II (llamada fase I/II).
Fase II	50–200	2 a 6 meses	Evaluar la seguridad y aceptabilidad durante un período más prolongado.
Fase II/IIb	50–500	6 meses a 2 años	Seleccionar los productos que alcanzan el mínimo nivel de eficacia. Es más reducida y menos costosa que la fase III, pero el número de participantes y la duración del seguimiento indican si valdría la pena continuar con otro ensayo a mayor escala. De ser así, los participantes pasan de un ensayo al siguiente y se reclutan más participantes (llamada fase II/III).
Fase III	1.000–30.000	1 a 2 años	Evaluar la eficacia para prevenir la infección por VIH y otras ITS, y determinar la seguridad y aceptabilidad a largo plazo. Algunos ensayos en la fase III involucran varios productos, lo cual requiere más participantes que en los ensayos que someten a prueba un único producto.

Nota: Se denominan Fases I/II, II/IIb y II/III a las variaciones de los diseños de estudio o a los estudios que se mueven de una fase a la siguiente fase del ensayo clínico. El número de participantes y la duración del tratamiento y el seguimiento son variables. Fuentes: Adaptado de Stone, 2003 (112), Fleming, 2004 (27), Mauck et al., 2001 (71) y Alliance for Microbicide Development (Alianza para el Desarrollo de Microbicidas), 2004 (3). **INFO Reports**

(Feldblum *et al.* 2008;Gali *et al.* 2010;Hanna 1999;Nicol and Kashuba 2010;Peterson *et al.* 2007;Stadler and Saethre 2010)

Tabla V. Microbicidas entrando en la fase III de ensayos clínicos.

(Balzarini *et al.* 1998;McGowan 2006) (Kresge 2010;McCormack *et al.* 2010;Nau 2010)

Microbicidas entrando a la fase III de ensayos clínicos				
Mecanismo de acción	Nombre del microbicida	Descripción	¿Preven- ción poten- cial del embarazo?	Protección potencial con- tra ITS/VIH*
Refuerza las defensas vaginales	BufferGel (carbomer 974P)	Gel polímero que refuerza la acidez vaginal al acidificar el eyaculado.	Sí	VIH, clamidia, herpes
Surfactante	C31G (Savvy)	Detergente que daña las membranas virales, bacterianas y celulares, incluyendo las de los espermatozoides.	Sí	VIH, clamidia, herpes
Inhibe la entrada y fusión	Carraguard (PC-515)	El carragenano (un derivado de algas marinas) se junta con los virus para evitar que éstos penetren a las células sanas y las infecten.	No	Herpes, VPH, gonorrea
	PRO 2000 (sulfonato de polinaftaleno)	Se junta con los virus y bacterias para prevenir que se unan a las células sanas y las infecten.	Sí	VIH, gonorrea, herpes
	Sulfato de celulosa (Ushercell)	Se junta con los virus y bacterias para prevenir que se unan a las células sanas y las infecten.	Sí	Gonorrea

*Comprobado en modelos de animales
VIH = Virus de inmunodeficiencia humana

PVH = Papilomavirus humano
Fuente de datos para protección potencial contra ITS/VIH: Zeitlin, 2002 (128)

INFO Reports

5.7.3 Microbicidas en avanzado desarrollo clínico.

Son productos farmacéuticos en Fase II/IIB o Fase III, estos ensayos clínicos están diseñados para evaluar la efectividad en la prevención de la infección por el VIH-1 en pacientes o participantes voluntarios en cuanto a su seguridad, aceptabilidad y adherencia al producto (Gali *et al.* 2010;Kresge 2010;Nicol and Kashuba 2010;Nicol and Kashuba 2010;Nuttall 2010;Stadler and Saethre 2010).

5.7.4. Resultado de los ensayos clínicos.

A partir de 2005, los ensayos de efectividad para otros cuatro candidatos a microbicidas han sido completados o cancelados por diferentes razones.

5.7.4.1 HPTN – 035 (Buffer Gel® y PRO 2000).

El 9 de febrero de 2009, los Institutos Nacionales de Salud de los EE.UU. anunciaron resultados promisorios de un ensayo clínico de dos candidatos a microbicidas, realizado en sitios múltiples (Kresge 2010;Nicol and Kashuba 2010;Nuttall 2010).

El estudio (HPTN 035) fue conducido entre febrero de 2005 y septiembre de 2008; y reclutó a 3,099 participantes en Sudáfrica, Malawi, Zambia, Zimbabue y los E.U, se evaluó la seguridad y efectividad del Buffer Gel® y PRO 2000 , para prevenir la transmisión sexual del VIH-1 de hombre a mujer. El ensayo encontró que las mujeres a las que se les ofreció PRO 2000 gel y condones tuvieron 30% menos infecciones por VIH-1 que aquellas a las que solamente se les ofreció condones o condones y un gel placebo. Mientras que, el Buffer Gel, no redujo el riesgo de VIH-1.

Según Salim S. Abdool Karim, de la Universidad de KwaZulu-Natal en Durban (Sudáfrica) y responsable de la presentación de los datos: “Estos hallazgos proporcionan la primera señal de que un gel microbicida podría ser capaz de prevenir la infección por VIH-1 en mujeres. De hecho, para los millones de mujeres que están en riesgo de

contraer el virus, sobre todo mujeres jóvenes en África, existe un rayo de esperanza. Pero estos hallazgos también indican que se requiere más investigación; no podemos decir todavía que tenemos un microbicida eficaz” (Kalichman *et al.* 1998; Klebanoff and Coombs 1991) .

5.7.4.2 Sulfato de celulosa.

También conocido como CS, se estudia actualmente como un microbicida en fase experimental contra el VIH, llamado Ushercell. A finales de enero de 2007, se reunió el Consejo de Seguridad de Datos y Monitoreo (CSDM) de CONRAD y, con base en una revisión de datos preliminares, recomendó que se descontinuara el ensayo de Fase III del candidato a microbicida Sulfato de Celulosa (SC) en Benín, India, Uganda y Sudáfrica. Los datos preliminares sugieren que el SC podría contribuir a un mayor riesgo de infección por VIH-1. Grupos de científicos están luchando para entender qué es lo que esto significa exactamente, dado que 11 ensayos de seguridad anteriores no habían revelado elemento alguno que causara preocupaciones por la seguridad (Kresge 2010).

Con un exceso de cautela del lado de la seguridad, el Consejo de Salud Familiar Internacional, recomendó que el ensayo de SC que se realizaba en Nigeria también fuera cerrado, aunque la revisión que realizó el Consejo de Salud Familiar Internacional de los datos de Nigeria no arrojó evidencia de un mayor riesgo. Ahora sabemos que el gel de SC no es efectivo contra la infección por VIH-1. Los resultados del estudio de CONRAD sugieren que el uso del gel de SC podría aumentar la susceptibilidad de la mujer a la infección por VIH-1. Por lo tanto, CONRAD y FHI tomaron una decisión correcta al detener el estudio de inmediato, con base en los resultados intermedios.(Nicol and Kashuba 2010; Nuttall 2010)

5.7.4.3. SAVVY (C-31G) Biosyn, Inc.

En noviembre de 2005, un comité independiente de monitoreo de datos revisó los resultados de un estudio en Ghana que mostró que la incidencia del VIH-1 (frecuencia con las personas se vuelven VIH-1 positivas) era tan baja en el área de ensayo que el estudio no fue capaz de determinar si usar el gel SAVVY podría realmente reducir la tasa de transmisión del VIH-1. También se observó que hubo un mayor número de mujeres que se infectaron en el grupo que usó SAVVY y comparado con el grupo que usó placebo aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa porque no puede concluirse si fue casualidad o el SAVVY incrementó el riesgo de infección (Feldblum *et al.* 2008; Hanna 1999; Peterson *et al.* 2007).

5.7.4.4. Carraguard.

En un estudio clínico Fase III conducido entre 2004-2007 que enroló a 6,202 mujeres participantes en Sudáfrica se demostró que el Carraguard era seguro y aceptable para las mujeres, pero no redujo su riesgo de adquirir el VIH-1 (Klebanoff and Coombs 1991; Klebanoff and Coombs 1991; Moscicki 2008).

5.7.4.5. UC781

Este microbicida fue investigado en Israel por nuestro grupo y publicamos los resultados de las investigaciones *in vitro* realizados en el Instituto de Inmunología Clínica, R. Ben -Ari y Centro de Investigaciones del SIDA en Israel (Barnard *et al.* 1997; Borkow *et al.* 1999; Zussman *et al.* 2003).

Este microbicida basado en el compuesto químico denominado Uc781 es avalado por la Universidad de Pittsburgh y el Instituto para la investigación en la mujer

McGee (MWRI) es capaz de inhibir la enzima transcriptasa inversa (RT) al penetrar a través de la membrana y cápside del VIH-1 (Borkow *et al.* 1999; Borkow *et al.* 1997; Borkow and Lapidot 2005; Borkow *et al.* 2004; Borkow *et al.* 2008; Borkow *et al.* 2007; Borkow *et al.* 2003; Elechiguerra *et al.* 2005). Se determinó su efectividad como microbicida al demostrar que era estable administrado intravaginalmente en conejos. Además, se estableció que el UC781 no afecta la flora vaginal, no causa inflamación, no daña la mucosa, ni tiene efectos sistémicos colaterales. (Balzarini *et al.* 1998; Borkow and Lapidot 2005).

Se realizaron pruebas de bloqueo de VIH-1 libre de células y asociado células en biopsias de cérvix con UC781 teniendo como resultado el bloqueo del VIH-1 a través de la biopsia de cérvix, sin ser tóxico para el tejido y manteniendo una buena capacidad para proteger el tejido cervical humano. Por lo tanto, UC781 es un excelente candidato como microbicida tópico vaginal. (Al-Jabri and Alenzi 2009; Cutler and Justman 2008; McGowan 2006; Rohan and Sassi 2009).

5.8 Los iones de plata, sus usos en medicina

5.8.1 Los iones de plata

La plata tiene diversas aplicaciones en la medicina convencional y se utiliza como antiséptico, desinfectante y en el tratamiento de quemaduras. Además se usa como medicamento alternativo en forma ingerida para tratar una enorme variedad de enfermedades (Chaloupka *et al.* 2010; Elliott 2010; Miller *et al.* 2010; Moiemmen *et al.* 2010; Spear 2010).

La plata tiene muchas aplicaciones para la salud. Los usos médicos de la plata incluyen el antiséptico y el desinfectante. Los iones y nano partículas de plata son bioactivos, y en suficiente concentración, aniquilan las bacterias al contacto.

Algunos ejemplos de su uso son:

- Los médicos utilizan productos certificados en una serie de vendajes que contienen nano partículas de plata para el tratamiento de infecciones externas.
- Las propiedades desinfectantes de la plata se utilizan en aplicaciones médicas tales como catéteres urinarios y tubos respiradores endotraqueales, con los que se ha demostrado una reducción en la incidencia de infecciones urinarias relacionadas con el catéter y la neumonía asociada con respiradores.
- La plata también se utiliza en superficies y textiles para reducir la propagación de infecciones.

Históricamente, desde la antigüedad la plata coloidal, (una suspensión líquida de partículas microscópicas de plata), ha sido utilizada como un medicamento ingerido para tratar una variedad de enfermedades (Lara *et al.* 2009;Lara *et al.* 2010a).

Para ser eficaces, los iones de plata deben interaccionar con el microorganismo y penetrar en él. La plata se introduce en el interior de la célula a través de unos transportadores de metales presentes en su membrana compitiendo con ellos por los lugares de captación (Ayala-Nuñez 2009).

Los iones de plata actúan interfiriendo en la permeabilidad gaseosa de la membrana (respiración celular) y una vez en el interior de la célula, alteran el sistema enzimático, inhibiendo su metabolismo, producción de energía y modificando su material genético. El resultado es que el microorganismo pierde rápidamente toda capacidad de crecer y

reproducirse. De esta manera se evita el desarrollo de microorganismos patógenos como *Salmonella*, *Legionella*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, entre otros.

Una de las virtudes de la plata es que constituye un antimicrobiano de amplio espectro. La plata iónica destruye las bacterias, hongos, virus y protozoos, aunque es menos activa frente a microorganismos más resistentes, como las esporas. Además, los estudios revelan que es muy poco probable que los microorganismos desarrollen algún tipo de resistencia al tratamiento (Ayala-Núñez 2009).

5.9 La Nanotecnología

La nanotecnología es un campo de las ciencias aplicadas dedicados al control y manipulación de la materia a una escala menor que un micrómetro, es decir, a nivel de átomos y moléculas (nanomateriales). La manipulación se establece en un rango de uno a cien nanómetros. (Aguilella and Alcaraz 2009;das *et al.* 2009;Fadeel *et al.* 2010;Klippstein and Pozo 2010;McGee 2009;McNeil 2005;Ozpolat *et al.* 2010;Sandler 2009;Singhal *et al.* 2010;Swai *et al.* 2009).

Nano- es un prefijo griego que indica una medida, 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 trabaja.

La nanotecnología promete soluciones vanguardistas y más eficientes para los problemas 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 (McNeil 2005).

El ganador del premio Nobel de Física (1965), Richard Feynman fue el primero en hacer referencia a las posibilidades de la nano ciencia y la nanotecnología en el célebre discurso que dio en el Caltech (Instituto Tecnológico de California) el 29 de diciembre de 1959 titulado “En el fondo hay espacio de sobra” (There's Plenty of Room at the Bottom) (Pierotti et al. 2008).

Pero estos conocimientos fueron más allá ya que con esto se pudo modificar la estructura de las moléculas como es el caso de los polímeros que hoy en día los encontramos en todos nuestros hogares. 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 (das *et al.* 2009; Fadeel *et al.* 2010; McGee 2009; McNeil 2005).

La característica fundamental de la nanotecnología es que constituye un ensamblaje interdisciplinario de varios campos de las ciencias naturales que están altamente especializados. Los físicos, por ejemplo juegan un importante papel no sólo en la construcción del microscopio usado para investigar tales fenómenos sino también sobre 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 y biología, las nanopartículas prometen 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 (Li *et al.* 2006; McNeil 2005; Morones *et al.* 2005; Oberdorster 2010; Sandler 2009) .

5.10 La Nanomedicina

Se puede definir como el monitoreo, reparación, construcción y control de sistemas biológicos humanos a un nivel molecular, empleando nanopartículas, nanocápsulas y nanoinstrumentos. La nanotecnología hoy en día está siendo utilizada para manipular biomoléculas relacionadas a enfermedades y padecimientos, para ello se requiere del diseño y construcción de estructuras y máquinas de muy pequeño tamaño, no más grandes que una molécula de ADN. Dentro de las aplicaciones que se han dado a la nanomedicina podemos mencionar: monitorización, reparación de tejidos, control de evolución de las enfermedades, defensa y mejora de los sistemas biológicos humanos, diagnóstico, tratamiento y prevención, alivio del dolor, etc.

Otro de los ejemplos de las aplicaciones de la nanomedicina se encuentra el empleo de las nanocápsulas creadas con materiales conductores y adheridos a la superficie de tumores, las cuales al ser irradiadas, se calientan y destruyen el tumor. También se han utilizado nanopartículas, las cuales se inyectan en el cuerpo y se unen preferentemente a células cancerosas, definiendo el contorno anatómico de la lesión y haciéndola visible. A través de estas nanopartículas se podría monitorear la eficiencia de la terapia y ver cuando una célula ha sido mortalmente herida o cuando es activada, también podrían tener como función el transporte de medicamentos (Swai *et al.* 2009; West and Halas 2000).

5.11 Las AgNPs-PVP como bactericidas.

Las nanopartículas más prometedoras con propiedades antibacterianas son las nanopartículas metálicas, las cuales exhiben una actividad química incrementada debido a una mayor superficie en relación a su volumen. (Alidaee *et al.* 2005a; Alidaee *et al.*

2005b;Ayala-Nuñez *et al.* 2009;Kokura *et al.* 2010;Kumari A *et al.* 2008;Lowe *et al.* 1988a;Lowe *et al.* 1988b;Lu *et al.* 2008;Sondi and Salopek-Sondi 2004;Starodub and Trevors 1989).

El estudio de nanomateriales bactericidas es particularmente importante considerando el reciente incremento en la resistencia de nuevas cepas bacterianas a los antibióticos, con ese objetivo se han realizado investigaciones de los efectos bactericidas de los iones metálicos (Ayala-Nuñez *et al.* 2009;Elechiguerra *et al.* 2005;Lara *et al.* 2009;Lara *et al.* 2010b).

5.12 Las AgNPs-PVP como virucidas, antivirales e inhibidores de fusión.

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 AgNPs-PVP 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 probablemente al unirse a

la gp120. Siendo su IC_{50} de 0.44mg/ml. (Elechiguerra *et al.* 2005; Lara *et al.* 2009; Lara *et al.* 2010b).

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 (Ayala-Núñez *et al.* 2009; Lara *et al.* 2009; Lara *et al.* 2010b).

5.13 **Las etapas iniciales de la infección del VIH-1 en el tejido cervical humano.**

Recientemente para poder dilucidar los eventos iniciales en la infección por el virus del VIH-1 y entender cómo se establece esta infección a través de las relaciones heterosexuales, se han investigado con la ayuda de los modelos de tejido cervical, como interactúa el virus con el tejido, que hasta ahora esta interacción es poco conocida (Greenhead *et al.* 2000; Lara *et al.* 2010b; Zussman *et al.* 2003).

En este modelo se investigo cual es el papel que desempeña el epitelio y cómo funcionan los virucidas tópicos vaginales para proteger contra la infección del VIH- 1. Greenhead y colaboradores demostraron que las células blanco de la infección residen por debajo del epitelio genital, y por lo tanto, el VIH debe atravesar esta barrera para poder ser capaz de establecer la infección (Greenhead *et al.* 2000).

La activación inmune debido a inflamación crónica parece aumentar la infección en las células blanco que residen en el subepitelio cervical. Además demostraron que las

células del epitelio genital no son células blanco para la infección del VIH, y por lo tanto no intervienen en la transferencia de los virus infecciosos a través del epitelio y por lo tanto proveen de una barrera funcional contra la infección (Greenhead *et al.* 2000;Lara *et al.* 2010b).

También se pudo comprobar por primera vez que los agentes virucidas como microbicidas tópicos vaginales son capaces de bloquear la infección del VIH a través del tejido cervical. Los agentes virucidas tienen implicaciones en la salud mundial y así las mujeres son provistas de mecanismos eficaces para que se protejan contra la infección del VIH-1 (Lara *et al.* 2009;Lara *et al.* 2010a).

5.14 Las nanopartículas de plata y su absorción por el tejido

Se ha incrementado el interés sobre la seguridad farmacológica del uso de las AgNPs-PVP. Debido a que los beneficios de las AgNPs-PVP en diversos campos científicos se han demostrando continuamente a través del tiempo, por lo tanto, en estudios previos, se estudio la penetración de las AgNPs-PVP en tejidos de piel, en un estudio de difusión en células llamado método Franz en el cual se estudio piel humana intacta o con heridas.

Los resultados mostraron que las AgNPs-PVP se absorbieron poco a través de la piel intacta y la dañada. Las AgNPs-PVP fueron detectadas únicamente en el estrato corneo y en la parte más externa de la epidermis, lo cual fue estudiado por microscopia electrónica. Estos resultados son alentadores para el uso tópico de estas nanopartículas (Larese *et al.* 2009)

6. MÉTODOS

6.1. Origen de los reactivos

Las nanopartículas que se usaron fueron de 30 – 50 nm de manufactura comercial. (Nanoamor, Houston, TX). El Stock fue preparado en medio de cultivo RPMI (Sigma, St. Louis, MO) con suero fetal 10% (FCS). Se realizaron una serie de diluciones para generar un stock en un rango de 0.05 a 6.0 mg/mL.

Se utilizaron pozos estériles de soporte permeable con membrana de policarbonato de 12mm con 12 pozos para tratamiento de cultivo de tejido llamadas cámaras Transwell de 3 micras, marca Corning.

6.2. Material biológico

Las líneas celulares HeLa-CD4-LTR- β -gal, MT-2, H9⁺ los virus VIH-1_{III B}, VIH-1_{Bal}, VIH-1_{BCF01}, VIH-1_{96USSN20}, fueron obtenidos a través de programa de referencia del NIH en los Estados Unidos. Los aislados virales VIH-1_{Eli} y VIH-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 los cuales fueron utilizados como inóculos virales en medio de cultivo celular RPMI.

Las células MT-2 y H9⁺ fueron preparadas y cultivadas de acuerdo al manual DAIDS Manual de Virología de Laboratorios de VIH, versión 1997, escrita por la

División of AIDS of the National Institute of Allergies and Infectious Diseases and the National Institute of Health, and Collaborators. Las células MT-2 y H9⁺ fueron cultivadas con RPMI 1640 (Sigma-Aldrich), con 10% de suero fetal y antibióticos. Todo este trabajo fue realizado en el laboratorio de Bioseguridad nivel 3 (BSL-3) Laboratorio de Inmunología y Virología, Departamento de Microbiología e Inmunología Universidad Autónoma de Nuevo León, México.

6.3. Biopsias de cérvix humano.

Se utilizó un método para el estudio *in vitro* de tejidos del cuello uterino basado en el cultivo de órganos, desarrollado para estudiar la transmisión heterosexual del VIH-1. Las biopsias de cuello uterino se obtuvieron a partir de mujeres VIH-1 seronegativas, pre-menopáusicas mayores de 45 años de edad o menos, sometidas a la histerectomía debido a condiciones médicas no relacionadas con el cuello del útero, con un examen histopatológico normal y se les solicitó su consentimiento informado. Todos los tejidos fueron procesados para el cultivo de órganos hasta 5 hrs posteriores a la cirugía como máximo, tomando piezas de 0.5 x 0.4 x 0.3 cm de los tejidos del cuello uterino que fueron colocados en las cámaras Transwell superiores de 12-Pozos, con la capa epitelial orientada hacia la parte superior, se sellan con agarosa al 3% (Fig. 8 a). Posteriormente se agregaron las diluciones de Gel Replens en cantidad de 200 µL formulado con AgNPs-PVP a diferentes diluciones de 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 6.0 mg/mL de acuerdo a las concentraciones necesarias para cada experimento en las cámaras superiores del Transwell, después de 0, 1, 15 y 30 minutos de pre-tratamiento el medio en las cámaras superiores que contenía el gel de pretratamiento fue removido para después realizar un

lavado del tejido en la cámara superior del Transwell cinco veces con 500 μ l de medio de cultivo. Después de lavar las cámaras superiores, se agregaron virus VIH-1 libre de células o asociado a células infectadas (5×10^4) suspendidos en 200 μ l de medio de cultivo (Fig. 8 d). En las cámaras inferiores del Transwell se añadieron (5×10^4) de células diana (MT-2) al momento de la infección.

Las cámaras inferiores del Transwell contienen células diana MT-2, la mitad de estas células diana y el medio de cultivo se cambiaron cada 3 días, y se observaron al microscopio invertido hasta 10 días después de retirar la biopsia en la cámara superior y se esperó la presencia de sincitios o infectividad del virus de VIH. Para poder descartar posibles fugas en el sello de la agarosa, al día 5 del experimento (Fig. 8 c), antes de retirar la cámara superior donde se encuentra el tejido de cérvix se utilizó azul dextrano que fue añadido a dicha cámara y su presencia en la cámara baja se determinó 20 h después. Los pozos en los que había una fuga fueron descartadas (Zussman *et al.* 2003)

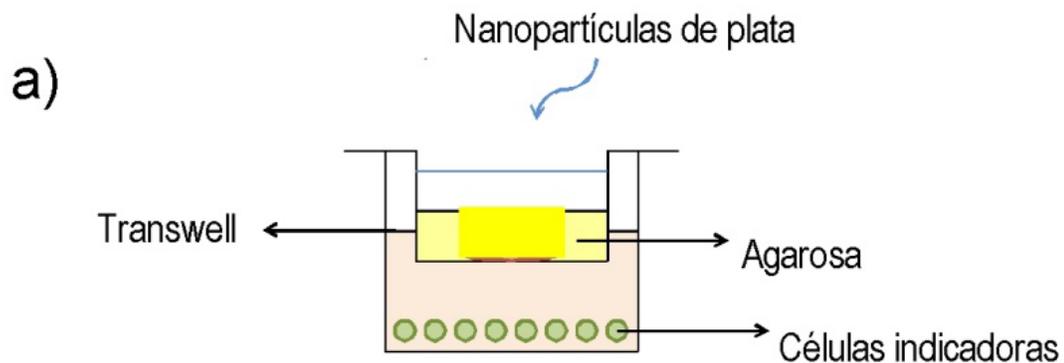


Figura 8. a) Modelo de experimentación de la biopsia de cérvix humano (control negativo).

- a) Control negativo, solo agar. Para descartar alguna filtración en el sello de agarosa del modelo de cérvix humano, se agrega el Azul de dextrano en la cámara superior en el día 6 del cultivo, la presencia 20 horas después del azul de dextrano en la cámara inferior invalida el experimento en ese pozo. Esto se realiza en todo los pozos del modelo.

b)

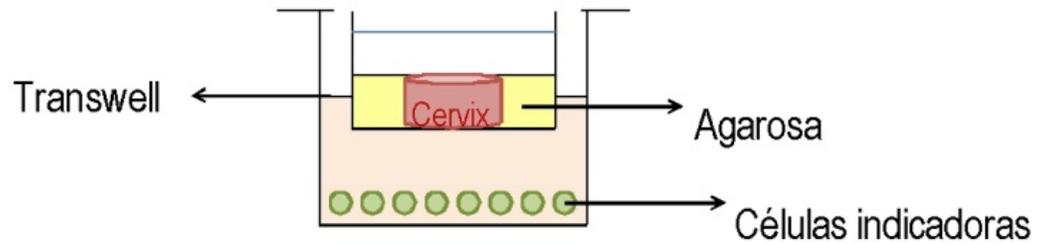


Figura 8. b) Modelo de experimentación de la biopsia de cérvix humano.

b) Un control negativo, el pozo se prepara con la biopsia de cérvix, no se aplica tratamiento con el gel formulado con AgNPs-PVP, tampoco se infecta este tejido con el VIH-1.

Las células indicadoras en la cámara inferior del Modelo de Cérvix humano, deberán permanecer negativas, sin sincitios. Si se observaran sincitios, todo el experimento se descarta.

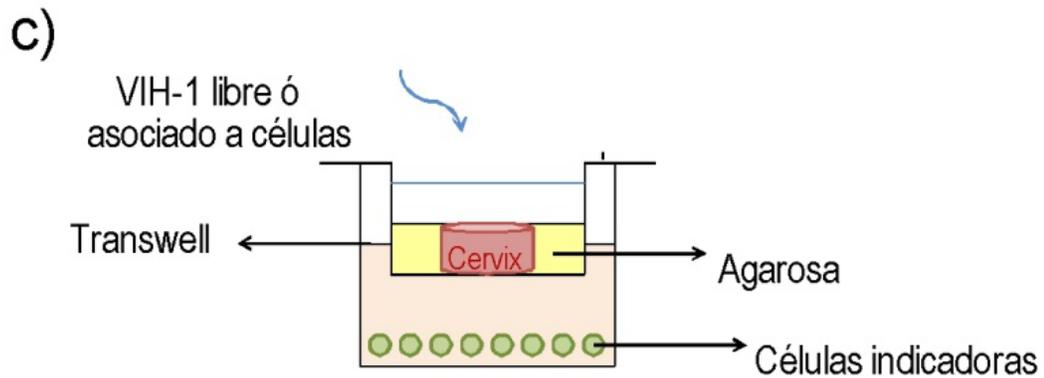


Figura 8. c) Modelo de experimentación de la biopsia de cérvix humano (control positivo).

c) Control positivo. Este control se prepara en cada experimento o serie de experimentos, en el pozo se prepara la biopsia del cérvix y se infecta con el VIH-1 libre de células o el virus asociado a células infectadas crónicamente, según el experimento. No se aplica tratamiento del gel con AgNPs-PVP.

Deben observarse sincitios, de no encontrarse sincitios en estas células MT-2, el experimento se desecha.

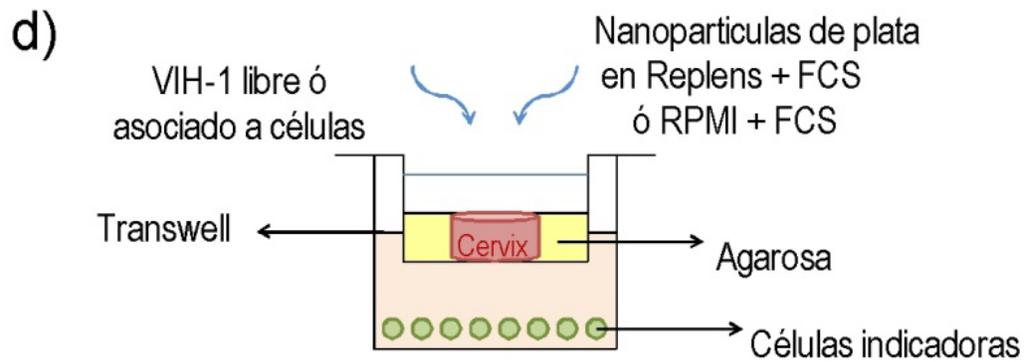


Figura 8. d) Modelo de experimentación de la biopsia de cérvix humano (Inhibición de la infección).

d) La inhibición de la transmisión del VIH-1 a través modelo del tejido cervical.

El tejido cervical es pretratado con AgNPs-PVP en diferente dosis formuladas en gel Replens o RPMI con FCS al 10%, posteriormente a los 2 min se lava el tejido 3 veces y se aplica el VIH-1. La transmisión de la infección a través del tejido cervical se determina por la formación de sincitios en las células blanco MT-2, que son contabilizados en la parte inferior del modelo. Siempre se preparan con controles positivos y negativos.

6.4 Estudio histopatológico de la biopsia del cérvix humano por tinción de hematoxilina y Eosina.

La tinción de hematoxilina y eosina es el método más popular de tinción utilizado en histología y medicina diagnóstica. Después de sumergir los preparados histológicos en xilol para eliminar los excesos de parafina, se pasaron por una serie de alcoholes (100°, 95° y 70°), posteriormente se sumergieron en agua para eliminar exceso de alcohol, y se sumergió en hematoxilina por 10 minutos, luego se lavó con agua para eliminar exceso de tinción y se pasó rápidamente por alcohol ácido. Después de lavar nuevamente se sumergió 30 segundos en la tinción de eosina. De nuevo se pasó en alcohol en orden creciente (70°, 95° y 100°). Finalmente se dejó por 10 minutos en xilol, antes de realizar el montaje final.

6.5. Ensayos de citotoxicidad

El efecto de varias concentraciones de nanopartículas de plata con las que fueron tratadas las biopsias de tejido de cérvix humano por 48 horas, posteriormente fueron examinadas por histoquímica para buscar efectos de toxicidad en la biopsia buscando cambios morfológicos e histopatológicos, como edema en el tejido tratado con el gel, utilizando la tinción de contraste en la técnica de Hematoxilina – eosina.

Además en otro estudio se cuantificó la viabilidad de las biopsias de cérvix humano después de 24 hrs de expuestas a 0.6 mg/ml y 0.3 mg/ml de nanopartículas de plata usando CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega G7572). Se utilizaron platos para microtitulación los cuales fueron incubados a 37°C y 5% de CO₂ de atmósfera humificada por 24 hrs. Todos los ensayos se realizaron teniendo un control

positivo y un negativo. El ensayo fue realizado de acuerdo al protocolo del reactivo. Las Microplacas del luminómetro Veritas que fueron utilizadas para este estudio, son de Turnes Biosystems (modelo 9100-002).

La citotoxicidad fue evaluada en base al porcentaje de células vivas tomando en cuenta el control positivo (células sin tratamiento).

6.6. Formulación de AgNPs-PVP del gel no-espermicida.

El Gel Replens/ AgNPs-PVP está compuesto por un gel no-espermicida Re(3% glicerina, 0.08 ácido ascórbico, 1% carbopol 949, 4% de parafina líquida y 16% de 1N NaOH). Con AgNPs-PVP (0.5 mM, 1 mM, 2.5 mM y 3 mM).

6.7 Protección de las AgNPs-PVP en modelo de cultivo de órgano de Cérvix humano contra la infección de del virus VIH- 1 libre de células y asociado a células.

En el modelo de biopsia de cérvix se agregaron por la cámara superior, medio RPMI (control positivo) y medio RPMI con 0.1 o 0.15 mg/mL de AgNPs-PVP por 20 minutos como pretratamiento. Posteriormente este medio con AgNPs-PVP fue removido para después realizar un lavado del tejido en la cámara superior del Transwell cinco veces con 500 µl de medio de cultivo. Después de lavar las cámaras superiores, se agregaron virus VIH-1 libre de células suspendidos en 200 µl de medio de cultivo

(Fig. 8 d). En las cámaras inferiores del Transwell se añadieron (5×10^4) de células diana (MT-2) al momento de la infección.

Las cámaras inferiores del Transwell contienen las células diana MT-2, la mitad de estas células diana y el medio de cultivo se cambiaron cada 3 días, y se observaron al microscopio invertido hasta por 10 días después de retirar la biopsia en la cámara superior y se esperó la presencia de sincitios o infectividad del virus de VIH. Para poder descartar posibles fugas en el sello de la agarosa, al día 5 del experimento (Fig. 8 c), antes de retirar la cámara superior donde se encuentra el tejido de cérvix se utilizó azul dextrano que fue añadido a dicha cámara y su presencia en la cámara baja se determinó 20 h después. Los pozos en los que había una fuga fueron descartadas (Zussman *et al.* 2003)

6.8 Tiempo mínimo de exposición AgNPs-PVP para conferir protección al tejido en el modelo de cérvix humano.

Para definir el tiempo mínimo de exposición requerido para proteger al tejido en el modelo cervical humano, se preparó a una concentración de 0.15 mg/ml de nanopartículas de plata diluida en un medio DMEM que se aplicaron a las biopsias en diferentes tiempos de 1 min, 15 min y 30 min, posteriormente, las AgNPs-PVP fueron removidas con tres lavados, y se agregó el virus de VIH-1 asociado a células crónicamente infectadas.

Las células blanco de VIH-1 (MT-2) fueron colocadas en el pozo inferior del modelo de cérvix humano para valorar la inhibición de la transmisión de la infección.

El medio de cultivo de las células blanco, fue cambiado parcialmente cada 3 días y monitoreado durante 15 días.

Las biopsias fueron retiradas de las celdas superiores el día 6 después de iniciado el experimento, agregando el día 5 Azul de dextrano (Sigma) por 20 hrs para comprobar el buen sellado de la agarosa con la que fue fijada inicialmente.

(Borkow *et al.* 2004;Borkow *et al.* 2003).

6.9 Tiempo máximo de protección de las AgNPs-PVP contra el VIH-1.

Para poder definir el tiempo de protección del tejido se aplico por 20 min un pretratamiento con AgNPs-PVP (0.1 y 0.15 mg/mL), posteriormente se removieron las nanopartículas y se aplicaron lavados 3 veces. Después de los lavados se infecto el tejido cervical a diferentes tiempos (1 min, 24h, 48h, 72h). Para después contabilizar la infección transmitida al pozo inferior y conocer cuánto tiempo quedo el tejido protegido después del pretratamiento y los lavados.

6.10. Análisis estadísticos

Las gráficas de los ensayos fueron realizadas con el programa estadístico SigmaPlot 10.0, cada barra representa la media \pm la media del error estándar de tres experimentos independientes hechos cada uno por duplicado.

7. RESULTADOS

7.1. La toxicidad de la AgNPs-PVP al tejido cervical

Para determinar la toxicidad de la AgNPs-PVP realizamos estudios histopatológicos del estroma cervical por hematoxilina - Eosina. Primero tratamos el tejido ectocervical con 0.6, 0.3, 0.15, 0.1, y 0.05 mg/mL de AgNPs-PVP por 48 horas. La concentración utilizada de 0.3mg/ml no induce inflamación aguda, edema, o muerte celular en las biopsias, comparado con los controles negativos sin tratamiento con AgNPs-PVP. El tejido cervical incubado con 0.15 mg/ml de AgNPs-PVP por 48 horas mostro una pequeña infiltración linfoide (fig.9.b) y no se observó daño celular.

También evaluamos la viabilidad basada en el porcentaje de células vivas relativas al control positivo del tejido cervical (cantidad de ATP de células viables con un ensayo basado en luciferasa) después de 24 horas de incubación con altas concentraciones de AgNPs-PVP de 0.3 mg/mL, 0.6 mg/mL y 0.15 mg/mL, la citotoxicidad celular fue de 23 % con 0.6 mg/ml de AgNPs-PVP, y de 20% con 0.3mg/ml de AgNPs-PVP, formulado en el Gel Replens de 5% y Raft-medio de 18%.(Fig.10).

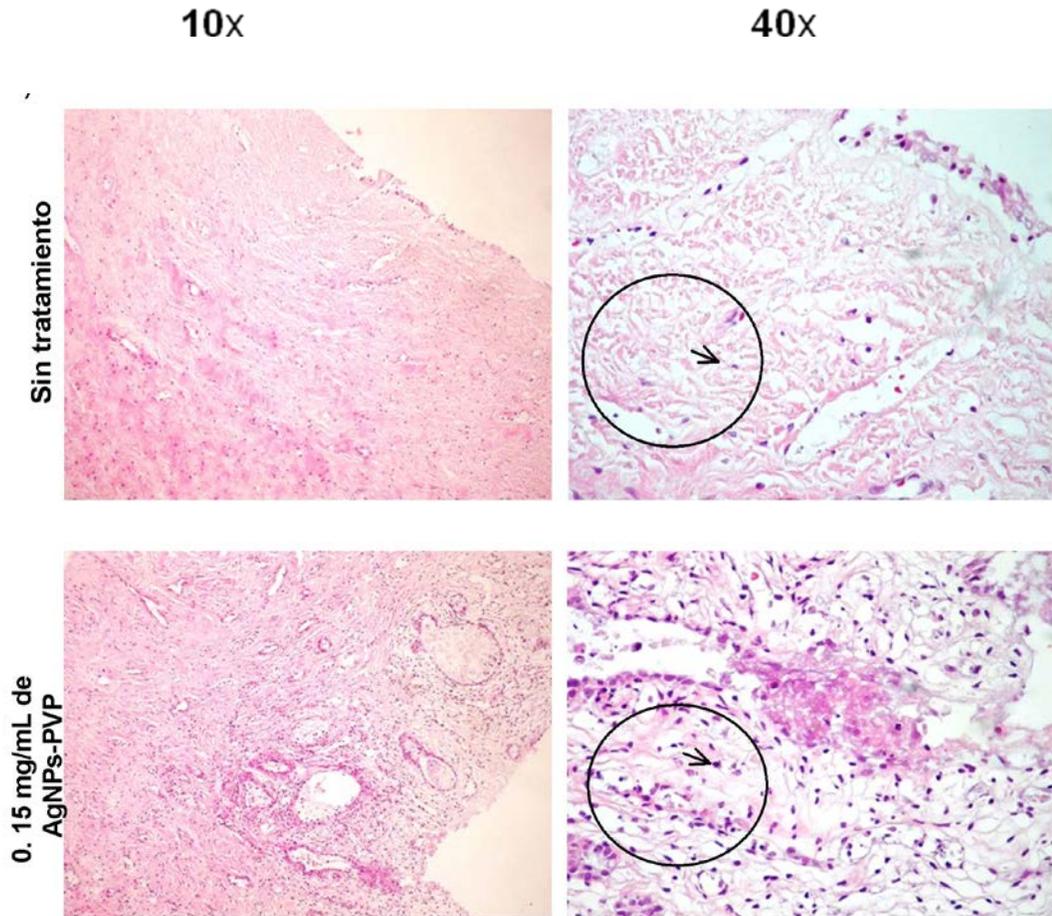


Figura 9. Estudio histopatológico del tejido de cérvix humano sin tratamiento con AgNPs-PVP

El epitelio escamoso y el estroma del tejido ectocervical no fueron expuestos en forma tónica al gel Replens formulado con 0.15 mg/mL de AgNPs-PVP por 48 h. Las biopsias ectocervicales de 5 mm de diámetro fueron tratadas con gel Replens solo como control positivo. Después de 48 h en incubadora a 37° C, los tejidos se lavaron y fijados en parafina, posteriormente fueron teñidos con colorante de Hematoxilina y Eosina

No se observa edema agudo en el estudio histopatológico. Las flechas indican la presencia de linfocitos observados. Se observa ligera linfoproliferación en la biopsia tratada con AgNPs-PVP.

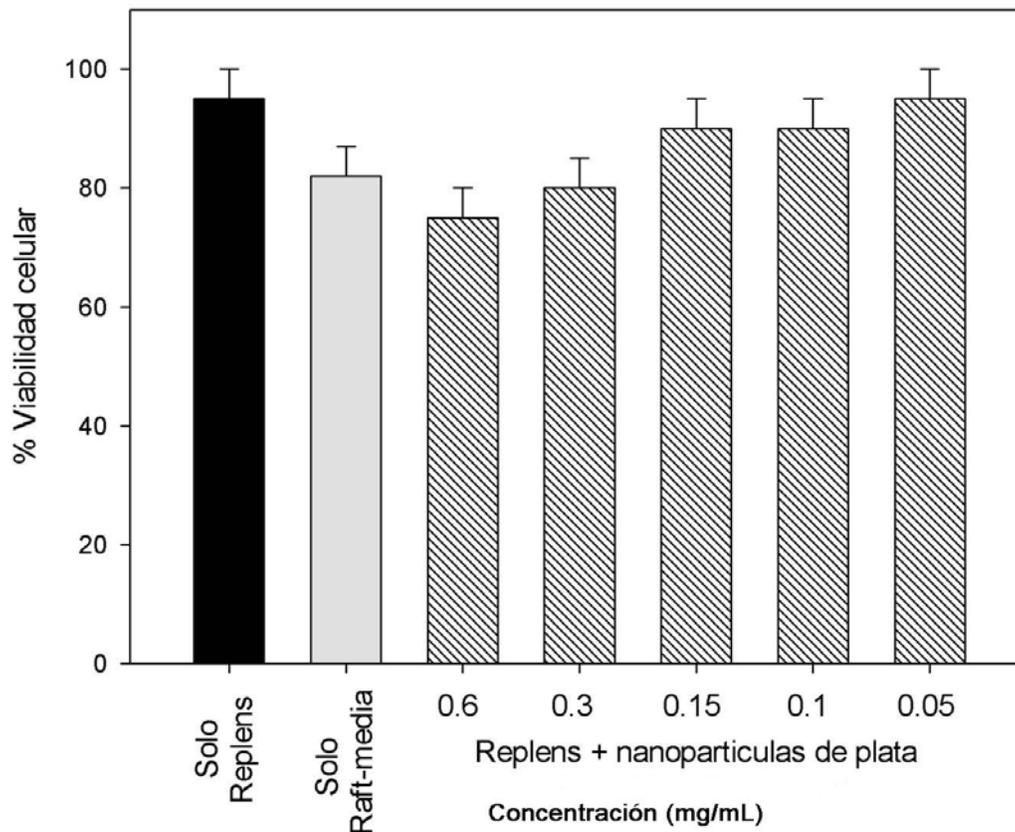


Figura 10. Toxicidad de las AgNPs-PVP en el cultivo tejido de cérvix humano.

Las biopsias cervicales humanas fueron selladas en la cámara superior del modelo y se trataron con gel Replens sin AgNPs-PVP como control, con medio Raft o con gel Replens formulado con diferentes concentraciones de AgNPs-PVP (0.6, 0.3, 0.15, 0.1, 0.05 mg/mL). Después de 24 h, se removieron las AgNPs-PVP y se lavaron las biopsias. Posteriormente se midió la viabilidad celular por el ensayo CellTiter-Glo®.

Las graficas muestran la media \pm la desviación estándar de tres experimentos por separado. Las graficas fueron creadas utilizando el programa de SigmaPlot 10.0

7.2. Inhibición de la infección del virus libre de células o asociado a células.

Para evaluar el efecto de AgNPs-PVP formuladas en gel Replens se expuso el tejido cervical a las AgNPs-PVP con o sin Gel Replens para neutralizar la transmisión de la infección de VIH-1 como se determinó por formación de sincitios con células MT2. El resultado demostró que con tan solo 2 minutos de pre-tratamiento con 0.025 a 0.15mg/mL de nanopartículas de plata en gel Replens obtuvimos una protección del tejido cervical contra la infección del virus de VIH-1_{III B}. Además las AgNPs-PVP neutralizaron por completo la transmisión de la infección de VIH-1 asociado a células H9+ a través del tejido cervical usando gel Replens con 0.05mg/ml de AgNPs-PVP. Las nanopartículas AgNPs-PVP confirieron una protección parcial cuando fueron mezcladas únicamente en medio de cultivo a la dosis de 0.05mg/ml (Fig. 11).

También se evaluó el tiempo necesario para reducir la transmisión de VIH-1 usando 0.025 a 0.15 mg/ml de AgNPs-PVP que resultó en un 100% de protección usando 0.15 mg/ml de AgNPs-PVP a partir de 1 minuto hasta 30 minutos, no encontramos ninguna toxicidad en el tejido cervical después de 48 horas de incubación con 0.15mg/ml de AgNPs-PVP. Además las AgNPs-PVP neutralizaron completamente el VIH-1_{III B} a través de cultivo de tejido cervical, así como de transmisión VIH-1 asociado a células H9+. La concentración de AgNPs-PVP fue de 0.15 mg/ml por 48 horas causando inhibición de la infección viral como es determinado por la formación de sincitios en la parte baja de la cámara en el modelo de cultivo cervical. En todos los casos las AgNPs-PVP protegieron al cérvix de la infección por VIH-1 (Fig.11).

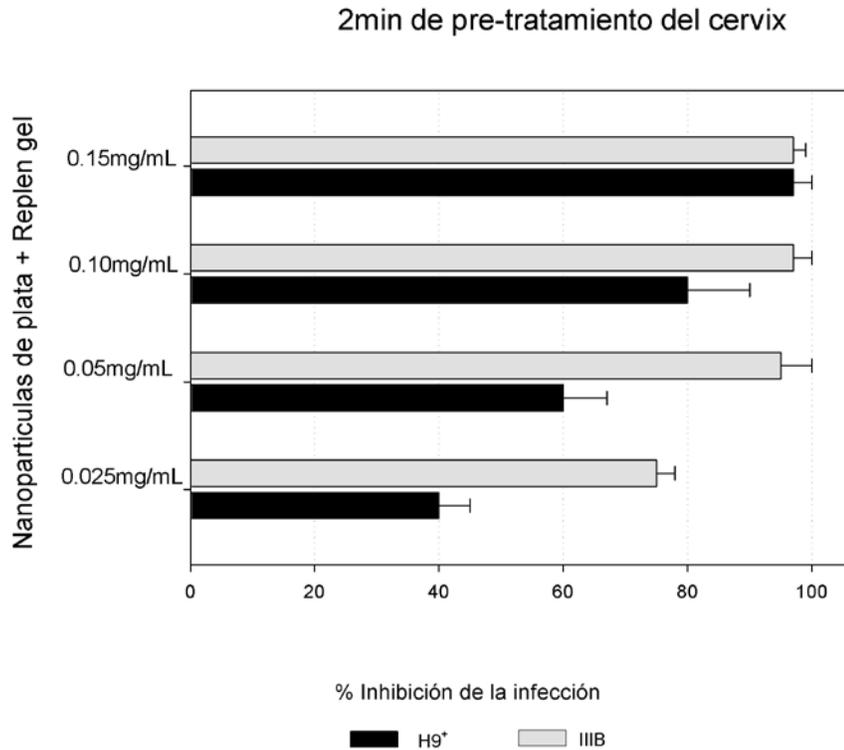


Figura 11. Inhibición de la transmisión del VIH-1 por las AgNPs-PVP con gel Replens utilizando el modelo de cultivo cervical humano.

En la cámara superior del pozo del modelo de cultivo cervical humano se coloca la biopsia cervical posteriormente se aplica pretratamiento por 2 min a diferentes concentraciones con AgNPs-PVP (0.0, 0.025, 0.05, 0.1 and 0.15 mg/mL), formulado en RPMI con FCS 10%, También como control se agrega el medio RPMI sin AgNPs-PVP. Después de remover el gel y lavar la biopsia, ésta se infecta con virus libre (VIH-1_{IIBB}) [(5 x 10⁵ TCID₅₀)] o virus asociado a células (H9⁺) (5 x 10⁵). Para evaluar la inhibición de la transmisión de la infección del VIH-1, se cultivaron células indicadoras (MT-2) en la cámara inferior, donde se cuantificó la formación de sincitios por diez días. Las graficas muestran la media ± la desviación estándar de tres experimentos por separado. Las graficas fueron creadas utilizando el programa de SigmaPlot 10.0

2min de pre-tratamiento del cervix

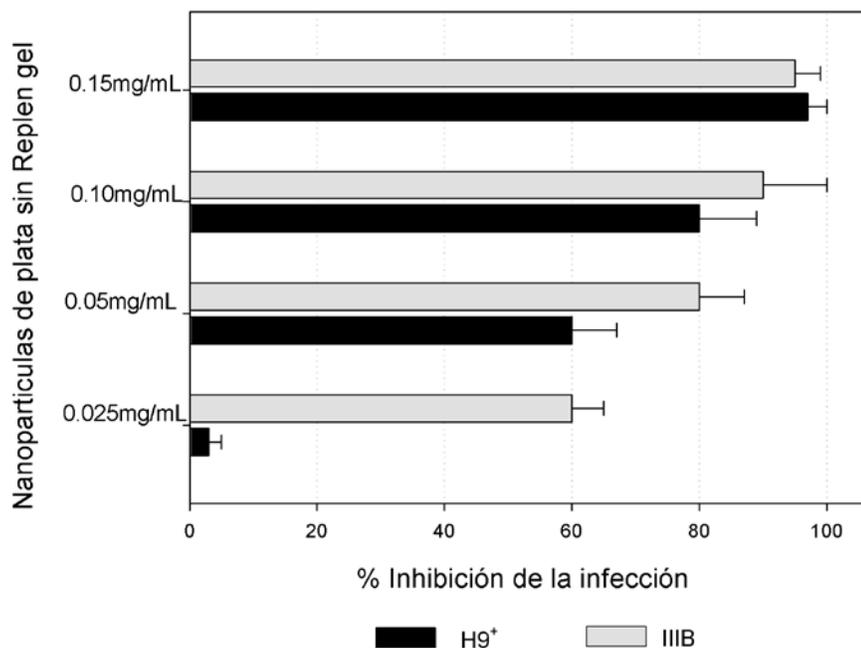


Figura 12. Inhibición de la transmisión del VIH-1 sin gel Replens utilizando el modelo de cultivo cervical humano.

En la cámara superior del pozo del modelo de cultivo cervical humano se coloca y sella la biopsia cervical posteriormente se aplica pretratamiento por 2 min a diferentes concentraciones con AgNPs-PVP (0.025, 0.05, 0.1 and 0.15 mg/mL) el cual no es formulado en gel Replens y además sin AgNPs-PVP como control. Después de remover las AgNPs PVP y lavar la biopsia, ésta se infecta con virus libre (VIH-1_{IIB}) [(5 x 10⁵ TCID₅₀)] o virus asociado a células (H9⁺) (5 x 10⁵). Para evaluar la inhibición de la transmisión de la infección del VIH-1, se cultivaron células indicadoras (MT-2) en la cámara inferior, donde se cuantificó la formación de sincitios por diez días. Las graficas muestran la media ± la desviación estándar de tres experimentos por separado. Todas las gráficas fueron creadas utilizando el programa de SigmaPlot 10.0

7.3. Tiempo mínimo de exposición de las AgNPs-PVP necesarios para conferir protección contra VIH-1.

Para examinar el potencial de las AgNPs-PVP como agente tópico protector de la mucosa cervical contra la transmisión de la infección de VIH-1, se utilizó un cultivo de modelo de órgano de tejido cervical escamoso *in vitro*. La exposición del tejido cervical a las AgNPs-PVP neutralizó totalmente la transmisión de VIH-1, como se determinó por formación de sincitios en las células MT2. Como se demuestra en la (Fig. 13), el pretratamiento del tejido del cérvix con 0.15mg/ml de AgNPs-PVP fue de tan solo por un minuto, y después de 3 lavados, confirió la neutralización total de la transmisión de virus de VIH-1 _{III B} a través del cultivo de tejido de cérvix.

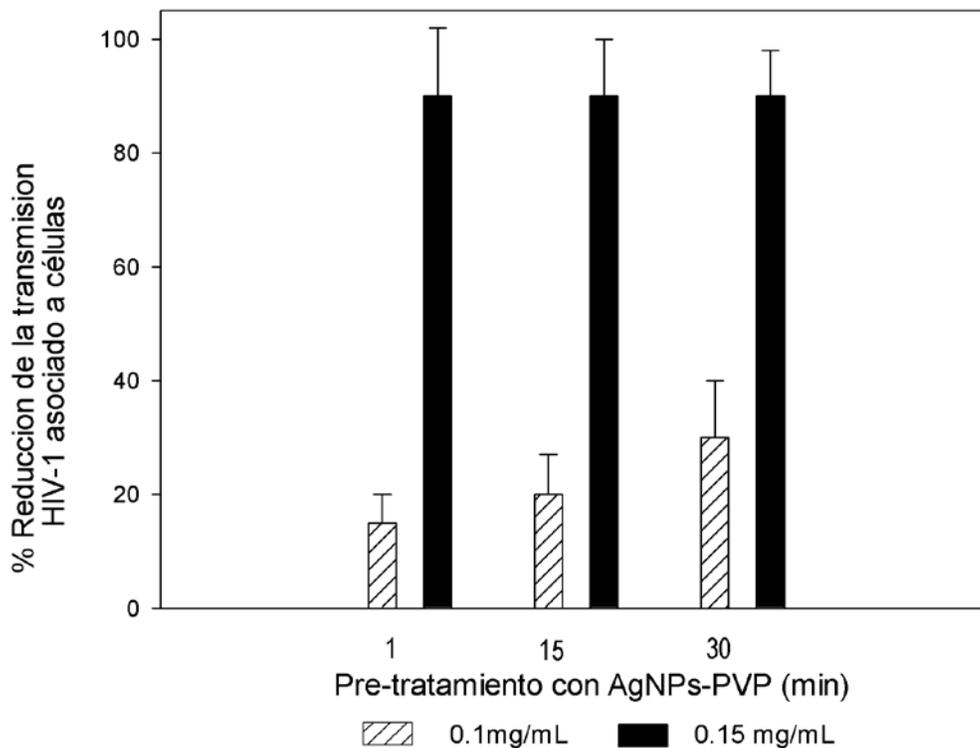


Figura 13. Tiempo necesario para conferir protección contra la transmisión de la infección del VIH-1 a través del tejido cervical por parte de las AgNPs-PVP

Las biopsias de tejido cervical humano fueron pretratadas por 1, 15 y 30 minutos con una aplicación tópica de AgNPs-PVP a una dosis de 0.1 o 0.15 mg/mL. Después de haber removido las AgNPs-PVP y lavado el tejido cervical, se agregaron los virus asociados a células ($H9^+$) (5×10^5) en la cámara superior del modelo de cultivo. Se cultivaron células indicadoras (MT-2) en la cámara inferior para poder cuantificar por medio de sincitios la inhibición de la infección por VIH_{III}B.

Las graficas muestran la media \pm la desviación estándar de tres experimentos por separado. Las graficas fueron creadas utilizando el programa de SigmaPlot 10.0

7.4.- Duración de la protección de las AgNPs-PVP para la infección de VIH-1.

El pre-tratamiento del tejido con 0.1 y 0.15 mg/ml de las AgNPs-PVP por 20 minutos y después de remover las nanopartículas con un lavado exhaustivo se consiguió la inhibición de la transmisión de VIH-1 aun cuando el tejido fue expuesto al virus VIH-1 después de haber sido removido totalmente las nanopartículas protegiendo aun después de 48 horas. . Observamos que después de 48 horas de tratamiento con 0.15mg/ml de AgNPs-PVP se confirió una total protección de la transmisión al VIH-1 (fig.5) indicando un efecto protector contra la infección en la biopsia de cérvix por las AgNPs-PVP.

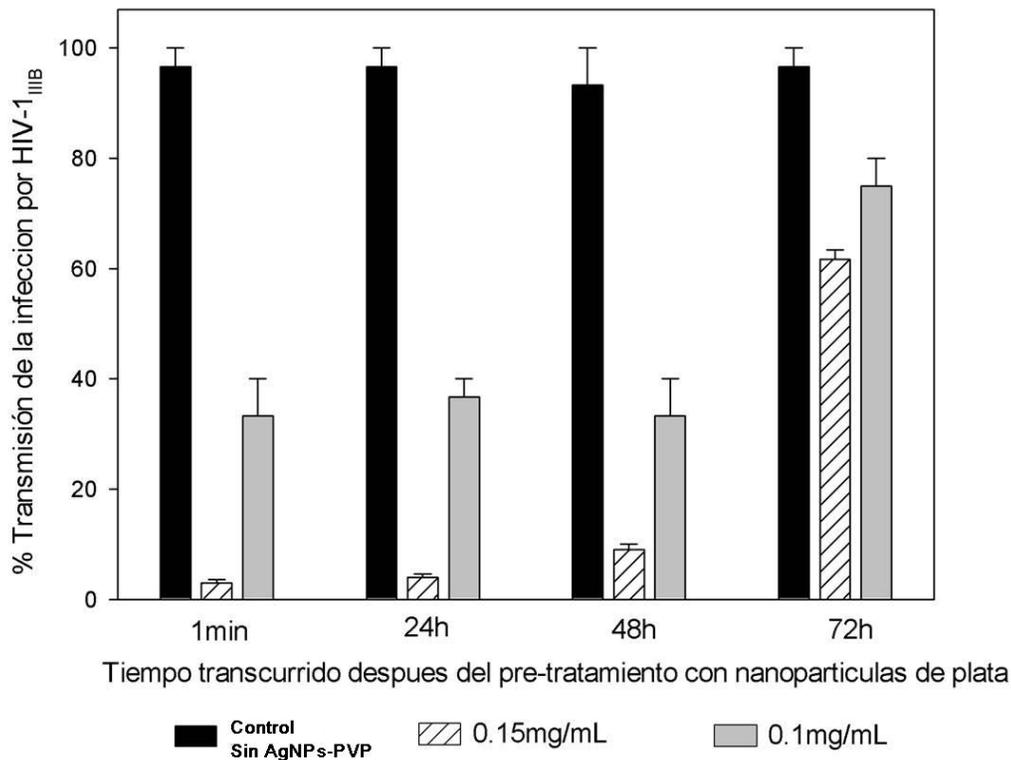


Figura 14. Tiempo necesario para conferir protección contra la transmisión de la infección del VIH-1 a través del tejido cervical por parte de las AgNPs-PVP.

Las biopsias de tejido cervical humano fueron pretratadas por 1,15 y 30 minutos con una aplicación tópica de AgNPs-PVP a una dosis de 0.1 o 0.15 mg/mL. Después de haber removido las AgNPs-PVP y lavado el tejido cervical, se agregaron los virus asociados a células (H9⁺) (5×10^5) en la cámara superior del modelo de cultivo. Se cultivaron células indicadoras (MT-2) en la cámara inferior para poder cuantificar por medio de sincitios la inhibición de la infección por VIH_{III}B.

Las graficas muestran la media \pm la desviación estándar de tres experimentos por separado. Las graficas fueron creadas utilizando el programa de SigmaPlot 10.0

8. DISCUSIÓN

El desarrollo de microbicidas tópicos que sean no tóxicos y efectivos contra la transmisión de la infección tanto del virus libre como del virus asociado a células infectadas, que posean además un efecto antiviral de acción prolongada en el tejido cervical tratado con el medicamento (Terrazas-Aranda *et al.* 2008; Weeks *et al.* 2004) y que su acción antiviral sea de forma rápida (Klasse *et al.* 2008), son las propiedades necesarias para la prevención de la transmisión del VIH-1 en el transcurso de las relaciones sexuales.

Para que se inhiba la transmisión de la infección *in vivo*, tal vez se requiera en un futuro de una combinación de agentes microbicidas que tengan la capacidad de ser antivirales de amplio espectro y que además no permitan el desarrollo de cepas de VIH-1 resistentes a estos microbicidas (Sexton *et al.* 2009).

La forma de la transmisión de la infección del VIH-1 en el tejido cervical humano, las principales células blanco que interactúan en la transmisión de la infección del VIH-1, residen por debajo del epitelio genital. Por consiguiente el VIH-1 debe cruzar esta barrera epitelial para poder establecer la infección. Se ha observado que la presencia de inflamación en el tejido cervical produce de forma secundaria una activación inmune lo cual predispone al establecimiento de la infección por VIH-1 en las células blanco que

se encuentran localizadas en el estroma subepitelial cervical (Greenhead *et al.* 2000). Consecuentemente al aplicar en las células epiteliales genitales un microbicida que actúa como potente virucida, provee a este tejido una barrera importante contra la transmisión de la infección, inactivando al VIH-1 a través del tejido cervical (Lara *et al.* 2010b).

En el primer estudio sobre las nanopartículas de plata y su interacción contra el VIH-1 se utilizaron diferentes agentes estabilizantes de nanopartículas, uno de ellos fue el polímero polivinilpirrolidona (PVP), los cuales no influyeron en la inhibición viral (Elechiguerra *et al.* 2005).

El mecanismo de acción antiviral de las AgNPs-PVP como virucida ha sido establecido previamente por Lara *et al.* 2010b. Demostrando en pruebas *in vitro* lo siguiente:

a) las AgNPs-PVP inactivan el VIH-1 bloqueando la entrada del virus inhibiendo de la interacción gp120-CD4. b) Las AgNPs-PVP (1.0-2.5 mg/mL) bloquean eficientemente en forma de dosis respuesta la fusión de las células HL2/3 y las células HeLa CD4. c) Las AgNPs-PVP actúan como virucida contra el virus libre de células y el asociado a células (cepas clínicas, cepas de laboratorio, cepas tanto M trópicas como T trópicas, y cepas de VIH-1 resistentes a medicamentos). d) Las AgNPs-PVP son virucida efectivos debido a que inactivan rápidamente las proteínas glicociladas del VIH-1, siendo su mecanismo de acción inhibir desde la entrada o fusión hasta otras etapas después de entrar el virus a la célula huésped (Lara *et al.* 2010b).

Debido a lo anteriormente expuesto se probaron las AgNPs-PVP como microbicidas tópicos en un modelo de cérvix humano. Las AgNPs-PVP en este estudio

que fueron disueltas en gel Replens, resultaron más efectivas como virúcida comparadas con las AgNPs-PVP sin gel Replens. Esta mejoría en la efectividad de la formulación con el gel Replens es debido a su composición farmacológica, la cual difunde homogéneamente los medicamentos, incluyendo en este caso a las AgNPs-PVP, ya que sin el Gel Replens no tiene estas características de homogeneizar (Fig. 3) (Greulich *et al.* 2009).

Se demostró con estos resultados que el pretratamiento de los tejidos cervicales humanos con AgNPs-PVP neutralizó la transmisión del VIH-1 (VIH-_{IIB} y VIH-_{AZT-RV}), a una dosis de 0.15 mg/mL de AgNPs-PVP, y de igual forma inhibió la transmisión de la infección del VIH-1 asociado a células infectadas. La inhibición de la entrada del VIH-1 a la célula huésped probablemente se debió a la interacción de las AgNPs-PVP que bloquean las glicoproteínas gp120 de la membrana viral de los virus T y M trópicos como fue demostrado in – vitro previamente Lara *et al.* 2010b.

Se observó por histopatología que en el tejido tratado a una dosis de 0.15 mg/mL de AgNPs-PVP se produjo linfoproliferación en comparación con el control del tejido cervical que no se trató con las AgNPs-PVP (Fig.2A) (Gougeon and Piacentini 2009;Lara *et al.* 2009;Lara *et al.* 2010b;Poon and Burd 2004;Tian *et al.* 2007;Wright *et al.* 2002).

Se demostró que a elevadas concentraciones de AgNPs-PVP (0.6 mg/mL) la citotoxicidad afecta a un pequeño número de población celular del tejido, ya que afecto la viabilidad en 23%, comparado con la biopsia que no fue tratada con AgNPs-PVP que se utilizo de control (Fig. 2).

Un microbicida vaginal tópico idóneo debe actuar de forma rápida (Klasse *et al.* 2008), nosotros comprobamos que se requiere de un minuto después de la aplicación tópica como pretratamiento al tejido cervical con las AgNPs-PVP (0.15 mg/mL) para que el tejido cervical quede protegido contra la transmisión de la infección del VIH-1 tanto de virus libre de células como del virus asociado a células infectadas (Fig. 4) (Lara *et al.* 2010b).

Utilizando en esta investigación el modelo cervical humano, se pudo evaluar la efectividad antiviral en el tejido a largo plazo de las AgNPs-PVP, lo cual es un factor farmacodinámico muy importante para el desarrollo de un microbicida tópico vaginal idóneo, este parámetro nos ayuda a elegir los medicamentos tópicos más efectivos y se define como el tiempo durante el cual se suprime la infección del VIH-1 después de una breve exposición tópica en el tejido cervical humano por parte de un microbicida vaginal. El microbicida idóneo permanece efectivo varias horas después de la aplicación tópica (Mauck *et al.* 2001), en esta investigación, la transmisión de la infección del VIH-1 a través del tejido cervical humano fue inhibida por 48 horas cuando se aplicaron tópicamente las AgNPs-PVP (0.15 mg/mL) (Fig. 5) (Lara *et al.* 2010b).

La dosis de AgNPs-PVP 0.15 mg/mL representa la cantidad requerida para la inhibición de la transmisión de la infección del VIH-1 aun después de 48 horas de haberse removido el compuesto del tejido (Fig. 5). Comparado con otros microbicidas como Carraguard, Savvy, Buffer Gel, PRO-2000, Ushercell en investigación las AgNPs-PVP tiene un tiempo de protección duradero en el tejido cervical humano, como es el caso de un microbicida que actualmente se encuentra en etapas clínicas de investigación, el Uc781 (Collins *et al.* 2000; Dezzutti *et al.* 2004; Zussman *et al.* 2003).

9.0 Conclusiones

La formulación de las AgNPs-PVP probablemente sea el primer microbicida de amplio espectro virucida (Lara *et al.* 2010a), bactericida (Ayala-Núñez 2009; Lara *et al.* 2009) y con propiedades anti-inflamatorias para el tejido cervical humano (Bhol and Schechter 2005; Lara *et al.* 2009; Lara *et al.* 2010b; Tian *et al.* 2007).

Nuestros resultados demuestran que las AgNPs-PVP funcionan como potentes microbicidas con propiedades virucida, que son capaces de prevenir la transmisión de la infección del VIH-1 a través de un modelo cultivo de órgano cervical humano a dosis dentro del rango no tóxico (Lara *et al.* 2010b), actuando al minuto de aplicación. También se comprobó que la protección contra la infección permaneció en el tejido durante 48 horas, esta capacidad de proteger el tejido cervical humano por largos periodos de tiempo es un atributo farmacológico muy importante para un microbicida idóneo de uso tópico (Weeks *et al.* 2004).

Es recomendable que en las próximas investigaciones de las AgNPs-PVP como microbicidas vaginales tópicos, se descarten otros efectos secundarios que pudieran tener estas AgNPs-PVP (genéticas, reproductivas, carcinogénicas) y además de los efectos a largo plazo como pudieran ser la evaluación de estudios de hipersensibilidad y fotosensibilidad (McGowan 2006).

LITERATURA CITADA

Abulafia-Lapid, R., Keren-Zur, Y., Yachnin, Y., and Atlan, H. (2007). Major CD4 epitopes involved in anti-CD4 T-cell autoimmunity in HIV-1 patients. *Vaccine* **25**, 3192-3199.

Aguiar, R. S., Pereira, H. S., Costa, L. J., Brindeiro, R. M., and Tanuri, A. (2006). Gag-Pol bearing a reverse transcriptase drug-resistant mutation influences viral genomic RNA incorporation into human immunodeficiency virus type 1 particles. *J.Gen.Virol.* **87**, 2669-2677.

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

Aida, Y. (2009). [Novel nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpr promoted by importin alpha]. *Seikagaku* **81**, 720-725.

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.

Alcami, Pertejo J., Lizasoain, Hernandez M., Martinez, Fernandez R., Rubio, Garcia R., Mesa, Latorre J., Medina, Asensio J., and Costa Perez-Herrero, J. R. (1988). [Is the Walter Reed classification applicable for the staging of HIV infection in heroin-addicted patients?]. *Rev.Clin.Esp.* **182**, 311-313.

Alidaee, M. R., Taheri, A., Mansoori, P., and Ghodsi, S. Z. (2005). Silver nitrate cautery in aphthous stomatitis: a randomized controlled trial. *Br.J.Dermatol.* **153**, 521-525.

Als, C. and Stoffels, G. (1989). [Natural history and classification of HIV-virus infections]. *Rev.Med.Brux.* **10**, 320-326.

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.

Annan, N. T., Nelson, M., Mandalia, S., Bower, M., Gazzard, B. G., and Stebbing, J. (2009). The nucleoside backbone affects durability of efavirenz- or nevirapine-based highly active antiretroviral therapy in antiretroviral-naive individuals. *J.Acquir.Immune.Defic.Sydr.* **51**, 140-146.

- Armstrong, K. L., Lee, T. H., and Essex, M. (2009). Replicative capacity differences of thymidine analog resistance mutations in subtype B and C human immunodeficiency virus type 1. *J.Virol.* **83**, 4051-4059.
- 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.
- Asres, K., Seyoum, A., Veeresham, C., Bucar, F., and Gibbons, S. (2005). Naturally derived anti-HIV agents. *Phytother.Res.* **19**, 557-581.
- Ayala-Nuñez, N. V., Lara, H. H., Ixtepan-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, Damme L., Parniak, M., Van, Mellaert L., Anne, J., and De, Clercq 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.
- Becker, T., Loch, G., Beyer, M., Zinke, I., Aschenbrenner, A. C., Carrera, P., Inhester, T., Schultze, J. L., and Hoch, M. (2010). FOXO-dependent regulation of innate immune homeostasis. *Nature* **463**, 369-373.
- 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.
- Blander, C. L. (2010). Cervical cytology screening. *Obstet.Gynecol.* **115**, 1091.
- Boddey, J. A., Hodder, A. N., Gunther, S., Gilson, P. R., Patsiouras, H., Kapp, E. A., Pearce, J. A., de Koning-Ward, T. F., Simpson, R. J., Crabb, B. S., and Cowman, A. F. (2010). An aspartyl protease directs malaria effector proteins to the host cell. *Nature* **463**, 627-631.
- Borkow, G., Arion, D., Wainberg, M. A., and Parniak, M. A. (1999). The thiocarboxanilide nonnucleoside inhibitor UC781 restores antiviral activity of 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) against AZT-resistant human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob.Agents Chemother.* **43**, 259-263.
- 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. (2005). Multi-targeting the entrance door to block HIV-1. *Curr. Drug Targets. Infect. Disord.* **5**, 3-15.

Borkow, G., Lara, H. H., Ayash-Rashkovsky, M., Tavor, E., Lapidot, A., Bentwich, Z., and Honigman, A. (2004). Adenovirus expressing a bioluminescence reporter gene and cMAGI cell assay for the detection of HIV-1. *Virus Genes* **29**, 257-265.

Borkow, G., Lara, H. H., Covington, C. Y., Nyamathi, A., and Gabbay, J. (2008). Deactivation of human immunodeficiency virus type 1 in medium by copper oxide-containing filters. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 518-525.

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.

Borkow, G., Vijayabaskar, V., Lara, H. H., Kalinkovich, A., and Lapidot, A. (2003). Structure-activity relationship of neomycin, paromomycin, and neamine-arginine conjugates, targeting HIV-1 gp120-CXCR4 binding step. *Antiviral Res.* **60**, 181-192.

Breslow, D. K., Collins, S. R., Bodenmiller, B., Aebersold, R., Simons, K., Shevchenko, A., Ejsing, C. S., and Weissman, J. S. (2010). Orm family proteins mediate sphingolipid homeostasis. *Nature* **463**, 1048-1053.

Buchacz, K., Baker, R. K., Moorman, A. C., Richardson, J. T., Wood, K. C., Holmberg, S. D., and Brooks, J. T. (2008). Rates of hospitalizations and associated diagnoses in a large multisite cohort of HIV patients in the United States, 1994-2005. *AIDS* **22**, 1345-1354.

Buchbinder, S. (2009). The epidemiology of new HIV infections and interventions to limit HIV transmission. *Top. HIV. Med.* **17**, 37-43.

Buckheit, R. W., Jr., Watson, K. M., Morrow, K. M., and Ham, A. S. (2009). Development of topical microbicides to prevent the sexual transmission of HIV. *Antiviral Res.*

Cady, S. D., Schmidt-Rohr, K., Wang, J., Soto, C. S., Degrado, W. F., and Hong, M. (2010). Structure of the amantadine binding site of influenza M2 proton channels in lipid bilayers. *Nature* **463**, 689-692.

Chaloupka, K., Malam, Y., and Seifalian, A. M. (2010). Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. *Trends Biotechnol.* **28**, 580-588.

Chiang, C. C., Wang, S. M., Pan, Y. Y., Huang, K. J., and Wang, C. T. (2010). A single amino acid substitution in HIV-1 reverse transcriptase significantly reduces virion release. *J. Virol.* **84**, 976-982.

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.

- Coleman, J. S., Hitti, J., Bukusi, E. A., Mwachari, C., Muliro, A., Nguti, R., Gausman, R., Jensen, S., Patton, D., Lockhart, D., Coombs, R., and Cohen, C. R. (2007). Infectious correlates of HIV-1 shedding in the female upper and lower genital tracts. *AIDS* **21**, 755-759.
- Collins, K. B., Patterson, B. K., Naus, G. J., Landers, D. V., and Gupta, P. (2000). Development of an in vitro organ culture model to study transmission of HIV-1 in the female genital tract. *Nat.Med.* **6**, 475-479.
- Craigie, R. (2010). Structural biology: When four become one. *Nature* **464**, 167-168.
- Cross, G. A. (2010). Drug discovery: Fat-free proteins kill parasites. *Nature* **464**, 689-690.
- Cutler, B. and Justman, J. (2008a). Vaginal microbicides and the prevention of HIV transmission. *Lancet Infect.Dis.* **8**, 685-697.
- Cutler, B. and Justman, J. (2008b). Vaginal microbicides and the prevention of HIV transmission. *Lancet Infect.Dis.* **8**, 685-697.
- D'Cruz, O. J. and Uckun, F. M. (2004). Clinical development of microbicides for the prevention of HIV infection. *Curr.Pharm.Des* **10**, 315-336.
- Danaher, R. J., Wang, C., Roland, A. T., Kaetzel, C. S., Greenberg, R. N., and Miller, C. S. (2010). HIV protease inhibitors block oral epithelial cell DNA synthesis. *Arch.Oral Biol.* **55**, 95-100.
- Dar, M. J., Monel, B., Krishnan, L., Shun, M. C., Di, Nunzio 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.
- das, Neves J., Amiji, M. M., Bahia, M. F., and Sarmiento, B. (2009). Nanotechnology-based systems for the treatment and prevention of HIV/AIDS. *Adv.Drug Deliv.Rev.*
- Daugherty, M. D., Liu, B., and Frankel, A. D. (2010). Structural basis for cooperative RNA binding and export complex assembly by HIV Rev. *Nat.Struct.Mol.Biol.*
- De, Clercq E. (2002). New developments in anti-HIV chemotherapy. *Biochim.Biophys.Acta* **1587**, 258-275.
- De, Clercq E. (2007). Anti-HIV drugs. *Verh.K.Acad.Geneeskd.Belg.* **69**, 81-104.
- Denizot, M., Varbanov, M., Espert, L., Robert-Hebmann, V., Sagnier, S., Garcia, E., Curriu, M., Mamoun, R., Blanco, J., and Biard-Piechaczyk, M. (2008). HIV-1 gp41 fusogenic function triggers autophagy in uninfected cells. *Autophagy.* **4**, 998-1008.
- Dezzutti, C. S., James, V. N., Ramos, A., Sullivan, S. T., Siddig, A., Bush, T. J., Grohskopf, L. A., Paxton, L., Subbarao, S., and Hart, C. E. (2004). In vitro comparison of topical microbicides for prevention of human immunodeficiency virus type 1 transmission. *Antimicrob.Agents Chemother.* **48**, 3834-3844.
- Diazgranados, C. A., Mantilla, M., and Lenis, W. (2009). Antiretroviral drug resistance in HIV-infected patients in Colombia. *Int.J.Infect.Dis.*

- Dvaranauskaitė, 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. (2005). Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. *J.Nanobiotechnology.* **3**, 6.
- Elias, C. and Coggins, C. (2001). Acceptability research on female-controlled barrier methods to prevent heterosexual transmission of HIV: Where have we been? Where are we going? *J.Womens Health Gen.Based.Med.* **10**, 163-173.
- Elias, C. J. and Coggins, C. (1996). Female-controlled methods to prevent sexual transmission of HIV. *AIDS* **10 Suppl 3**, S43-S51.
- Elliott, C. (2010). The effects of silver dressings on chronic and burns wound healing. *Br.J.Nurs.* **19**, S32-S36.
- Este, J. A. (2003). Virus entry as a target for anti-HIV intervention. *Curr.Med.Chem.* **10**, 1617-1632.
- 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.
- Fang, J. L. and Beland, F. A. (2009). Long-term exposure to zidovudine delays cell cycle progression, induces apoptosis, and decreases telomerase activity in human hepatocytes. *Toxicol.Sci.* **111**, 120-130.
- Feldblum, P. J., Adeiga, A., Bakare, R., Wevill, S., Lendvay, A., Obadaki, F., Olayemi, M. O., Wang, L., Nanda, K., and Rountree, W. (2008). SAVVY vaginal gel (C31G) for prevention of HIV infection: a randomized controlled trial in Nigeria. *PLoS.One.* **3**, e1474.
- Fellay, J., Thompson, A. J., Ge, D., Gumbs, C. E., Urban, T. J., Shianna, K. V., Little, L. D., Qiu, P., Bertelsen, A. H., Watson, M., Warner, A., Muir, A. J., Brass, C., Albrecht, J., Sulkowski, M., McHutchison, J. G., and Goldstein, D. B. (2010). ITPA gene variants protect against anaemia in patients treated for chronic hepatitis C. *Nature* **464**, 405-408.
- Figueiredo, A., Moore, K. L., Mak, J., Sluis-Cremer, N., de Bethune, M. P., and Tachedjian, G. (2006). Potent nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors target HIV-1 Gag-Pol. *PLoS.Pathog.* **2**, e119.
- Flynn, M. and Kort, R. (2009). XVII International AIDS Conference: From Evidence to Action - Epidemiology. *J.Int.AIDS Soc.* **12 Suppl 1**, S2.
- Forster, M. J., Mulloy, B., and Nermut, M. V. (2000). Molecular modelling study of HIV p17gag (MA) protein shell utilising data from electron microscopy and X-ray crystallography. *J.Mol.Biol.* **298**, 841-857.

- Frearson, J. A., Brand, S., McElroy, S. P., Cleghorn, L. A., Smid, O., Stojanovski, L., Price, H. P., Guther, M. L., Torrie, L. S., Robinson, D. A., Hallyburton, I., Mpamhanga, C. P., Brannigan, J. A., Wilkinson, A. J., Hodgkinson, M., Hui, R., Qiu, W., Raimi, O. G., van Aalten, D. M., Brenk, R., Gilbert, I. H., Read, K. D., Fairlamb, A. H., Ferguson, M. A., Smith, D. F., and Wyatt, P. G. (2010). N-myristoyltransferase inhibitors as new leads to treat sleeping sickness. *Nature* **464**, 728-732.
- Gabrielli, E., Ferraioli, G., Ferraris, L., Riva, A., Galli, M., Filice, C., and Gervasoni, C. (2010). Enfuvirtide administration in HIV-positive transgender patient with soft tissue augmentation: US evaluation. *New Microbiol.* **33**, 263-265.
- Gaertner, H., Lebeau, O., Borlat, I., Cerini, F., Dufour, B., Kuenzi, G., Melotti, A., Fish, R. J., Offord, R., Springael, J. Y., Parmentier, M., and Hartley, O. (2008). Highly potent HIV inhibition: engineering a key anti-HIV structure from PSC-RANTES into MIP-1 beta/CCL4. *Protein Eng Des Sel* **21**, 65-72.
- Gali, Y., Delezay, O., Brouwers, J., Addad, N., Augustijns, P., Bourlet, T., Hamzeh-Cognasse, H., Arien, K. K., Pozzetto, B., and Vanham, G. (2010). IN VITRO EVALUATION OF VIABILITY, INTEGRITY AND INFLAMMATION IN GENITAL EPITHELIA UPON EXPOSURE TO PHARMACEUTICAL EXCIPIENTS AND CANDIDATE MICROBICIDES. *Antimicrob.Agents Chemother.*
- Gallo, R. C. (1987). The AIDS virus. *Sci.Am.* **256**, 46-56.
- Gallo, R. C. (1988). HIV--the cause of AIDS: an overview on its biology, mechanisms of disease induction, and our attempts to control it. *J.Acquir.Immune.Defic.Syndr.* **1**, 521-535.
- Gallo, R. C. (2006). A reflection on HIV/AIDS research after 25 years. *Retrovirology.* **3**, 72.
- Gallo, R. C. and Montagnier, L. (1987). The chronology of AIDS research. *Nature* **326**, 435-436.
- Gallo, R. C. and Montagnier, L. (2003). The discovery of HIV as the cause of AIDS. *N.Engl.J.Med.* **349**, 2283-2285.
- Gao, M., Nettles, R. E., Belema, M., Snyder, L. B., Nguyen, V. N., Fridell, R. A., Serrano-Wu, M. H., Langley, D. R., Sun, J. H., O'Boyle, D. R., Lemm, J. A., Wang, C., Knipe, J. O., Chien, C., Colonno, R. J., Grasela, D. M., Meanwell, N. A., and Hamann, L. G. (2010). Chemical genetics strategy identifies an HCV NS5A inhibitor with a potent clinical effect. *Nature* **465**, 96-100.
- Gougeon, M. L. and Piacentini, M. (2009). New insights on the role of apoptosis and autophagy in HIV pathogenesis. *Apoptosis.* **14**, 501-508.
- 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.
- Grdisa, M., Mikecin, A. M., and Poznic, M. (2006). Does transduced p27 induce apoptosis in human tumor cell lines? *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **1090**, 120-129.
- Greenhead, P., Hayes, P., Watts, P. S., Laing, K. G., Griffin, G. E., and Shattock, R. J. (2000). Parameters of human immunodeficiency virus infection of human cervical tissue and inhibition by vaginal virucides. *J.Virol.* **74**, 5577-5586.

Greulich, C., Kittler, S., Epple, M., Muhr, G., and Koller, M. (2009). Studies on the biocompatibility and the interaction of silver nanoparticles with human mesenchymal stem cells (hMSCs). *Langenbecks Arch.Surg.* **394**, 495-502.

Haase, A. T. (2010). Targeting early infection to prevent HIV-1 mucosal transmission. *Nature* **464**, 217-223.

Hanna, L. (1999). New microbicide enters clinical testing. *BETA.* **12**, 19.

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

Husstedt, I. W., Reichelt, D., Neuen-Jakob, E., Hahn, K., Kastner, F., von, Einsiedel R., Vielhaber, B., Arendt, G., and Evers, S. (2009). [Highly active antiretroviral therapy of neuro-AIDS : Side effects on the nervous system and interactions.]. *Nervenarzt.*

Ichikawa, S. and Ito, A. (1993). [Detection of antibodies to HIV and HIV-genes in saliva and urine]. *Nippon Rinsho* **51 Suppl**, 299-305.

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

Ref Type: Report

Joly, V., Jidar, K., Tatay, M., and Yeni, P. (2010). Enfuvirtide: from basic investigations to current clinical use. *Expert.Opin.Pharmacother.* **11**, 2701-2713.

Kalichman, S. C., Williams, E. A., Cherry, C., Belcher, L., and Nachimson, D. (1998). Sexual coercion, domestic violence, and negotiating condom use among low-income African American women. *J.Womens Health* **7**, 371-378.

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

Kim, Y. W. and Chang, T. W. (1992). Potential use of immunoconjugates for AIDS therapy. *AIDS Res.Hum.Retroviruses* **8**, 1033-1038.

Kiso, Y. and Kisanuki, S. (1993). [Anti-HIV compounds]. *Nippon Rinsho* **51 Suppl**, 235-240.

Kitchen, C. M., Nuno, M., Kitchen, S. G., and Krogstad, P. (2008). Enfuvirtide antiretroviral therapy in HIV-1 infection. *Ther.Clin.Risk Manag.* **4**, 433-439.

Klasse, P. J., Shattock, R., and Moore, J. P. (2008). Antiretroviral drug-based microbicides to prevent HIV-1 sexual transmission. *Annu.Rev.Med.* **59**, 455-471.

Klebanoff, S. J. and Coombs, R. W. (1991). Viricidal effect of *Lactobacillus acidophilus* on human immunodeficiency virus type 1: possible role in heterosexual transmission. *J.Exp.Med.* **174**, 289-292.

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). Silver nanoparticles as a safe preservative for use in cosmetics. *Nanomedicine*.
- Kresge, K. J. (2010). Microbicides finally gel, securing spotlight at the International AIDS Conference. *IAVI.Rep.* **14**, 10-15.
- Kumari A, Kumar P, Ajayan PM, and John G (2008). Silver-nanoparticle-embedded antimicrobial paints based on vegetable oil. *Nature Materials* **7**.
- 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. (2010a). Mode of antiviral action of silver nanoparticles against HIV-1. *J.Nanobiotechnology*.
- Lara, H. H., Ixtepan-Turrent, L., Garza-Trevino, E. N., and Rodriguez-Padilla, C. (2010b). PVP-coated silver nanoparticles block the transmission of cell-free and cell-associated HIV-1 in human cervical culture. *J.Nanobiotechnology*. **8**, 15.
- Larese, F. F., D'Agostin, F., Crosera, M., Adami, G., Renzi, N., Bovenzi, M., and Maina, G. (2009). Human skin penetration of silver nanoparticles through intact and damaged skin. *Toxicology* **255**, 33-37.
- Lemey, P., Pybus, O. G., Rambaut, A., Drummond, A. J., Robertson, D. L., Roques, P., Worobey, M., and Vandamme, A. M. (2004). The molecular population genetics of HIV-1 group O. *Genetics* **167**, 1059-1068.
- Levy, J. A. (1993). 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.
- Li, Y., Leung, P., Yao, L., Song, Q. W., and Newton, E. (2006). Antimicrobial effect of surgical masks coated with nanoparticles. *J.Hosp.Infect.* **62**, 58-63.
- 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**.
- Lowe, D. G., Levison, D. A., Crocker, P. R., and Shepherd, J. H. (1988). Silver deposition in the cervix after application of silver nitrate as a cauterising agent. *J.Clin.Pathol.* **41**, 871-874.
- 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.
- Masuda, M. (2007). [HIV replication and host cell cycle]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* **52**, 1161-1167.

- Mauck, C., Rosenberg, Z., and Van, Damme L. (2001). Recommendations for the clinical development of topical microbicides: an update. *AIDS* **15**, 857-868.
- McClelland, R. S., Wang, C. C., Mandaliya, K., Overbaugh, J., Reiner, M. T., Panteleeff, D. D., Lavreys, L., Ndinya-Achola, J., Bwayo, J. J., and Kreiss, J. K. (2001a). Treatment of cervicitis is associated with decreased cervical shedding of HIV-1. *AIDS* **15**, 105-110.
- McClelland, R. S., Wang, C. C., Mandaliya, K., Overbaugh, J., Reiner, M. T., Panteleeff, D. D., Lavreys, L., Ndinya-Achola, J., Bwayo, J. J., and Kreiss, J. K. (2001b). Treatment of cervicitis is associated with decreased cervical shedding of HIV-1. *AIDS* **15**, 105-110.
- McCormack, S., Ramjee, G., Kamali, A., Rees, H., Crook, A. M., Gafos, M., Jentsch, U., Pool, R., Chisembele, M., Kapiga, S., Mutemwa, R., Vallely, A., Palanee, T., Sookrajh, Y., Lacey, C. J., Darbyshire, J., Grosskurth, H., Profy, A., Nunn, A., Hayes, R., and Weber, J. (2010). PRO2000 vaginal gel for prevention of HIV-1 infection (Microbicides Development Programme 301): a phase 3, randomised, double-blind, parallel-group trial. *Lancet* **376**, 1329-1337.
- McDonnell, G. E. (2007). Chemical Disinfection. In 'Antisepsis, disinfection, and sterilization'. pp. 111-115.
- McGee, E. M. (2009). Nanomedicine: ethical concerns beyond diagnostics, drugs, and techniques. *Am.J.Bioeth.* **9**, 14-15.
- McGowan, I. (2006). Microbicides: a new frontier in HIV prevention. *Biologicals* **34**, 241-255.
- McNeil, S. E. (2005). Nanotechnology for the biologist. *J.Leukoc.Biol.* **78**, 585-594.
- Mei-Ling, L., Xin-Quan, S., and Meng-Chun, J. (2010). Differentially expressed genes in early gestational chorionic villi after administration of mifepristone. *Gynecol.Endocrinol.*
- Miller, A. C., Rashid, R. M., Falzon, L., Elamin, E. M., and Zehtabchi, S. (2010). Silver sulfadiazine for the treatment of partial-thickness burns and venous stasis ulcers. *J.Am.Acad.Dermatol.*
- Moiemen, N. S., Shale, E., Drysdale, K. J., Smith, G., Wilson, Y. T., and Papini, R. (2010). Acticoat dressings and major burns: Systemic silver absorption. *Burns*.
- Montagnier, L. (2002). Historical essay. A history of HIV discovery. *Science* **298**, 1727-172
- Montagnier, L. (2010). 25 years after HIV discovery: prospects for cure and vaccine. *Virology* **397**, 248-254.
- Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J. B., Tapia, J., and Yacaman, M. J. (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* **16**, 2346-2353.
- Morris, K. V. and Rossi, J. J. (2004). Anti-HIV-1 gene expressing lentiviral vectors as an adjunctive therapy for HIV-1 infection. *Curr.HIV Res.* **2**, 185-191.
- Moscicki, A. B. (2008). Vaginal microbicides: where are we and where are we going? *J.Infect.Chemother.* **14**, 337-341.

- Murray, C. L. and Rice, C. M. (2010). Hepatitis C: An unsuspected drug target. *Nature* **465**, 42-44.
- Nau, J. Y. (2010). [AIDS and a new microbicidal gel]. *Rev.Med.Suisse* **6**, 1562-1563.
- Nickle, D. C., Heath, L., Jensen, M. A., Gilbert, P. B., Mullins, J. I., and Kosakovsky Pond, S. L. (2007). HIV-specific probabilistic models of protein evolution. *PLoS.One.* **2**, e503.
- Nicol, M. R. and Kashuba, A. D. (2010). Pharmacologic opportunities for HIV prevention. *Clin.Pharmacol.Ther.* **88**, 598-609.
- Nuttall, J. (2010). Microbicides in the prevention of HIV infection: current status and future directions. *Drugs* **70**, 1231-1243.
- 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. (2009a). Impact of PI and NNRTI HAART-based therapy on oral lesions of Brazilian HIV-infected patients. *J.Oral Pathol.Med.* **38**, 489-494.
- Ortega, K. L., Vale, D. A., and Magalhaes, M. H. (2009b). 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.
- Pan, Z., Repertinger, S., Leonard, R., Bewtra, C., Gatalica, Z., and Sharma, P. (2010). Cervical and endometrial metastases of appendiceal goblet cell carcinoid. *Arch.Pathol.Lab Med.* **134**, 776-780.
- Papapostolou, D. and Howorka, S. (2009). Engineering and exploiting protein assemblies in synthetic biology. *Mol.Biosyst.* **5**, 723-732.
- Pauwels, R., de Bethune, M. P., Andries, K., Stoffels, P., Janssen, P., and De, Clercq E. (1995). Discovery, development and characterization of agents active against the AIDS virus. *J.Recept.Signal.Transduct.Res.* **15**, 609-616.
- Pauwels, R. and De, Clercq E. (1996). Development of vaginal microbicides for the prevention of heterosexual transmission of HIV. *J.Acquir.Immune Defic.Syndr.Hum.Retrovirol.* **11**, 211-221.
- Peeters, M., Chaix, M. L., and Delaporte, E. (2008). [Genetic diversity and phylogeographic distribution of SIV: how to understand the origin of HIV]. *Med.Sci.(Paris)* **24**, 621-628.
- Peterson, L., Nanda, K., Opoku, B. K., Ampofo, W. K., Owusu-Amoako, M., Boakye, A. Y., Rountree, W., Troxler, A., Dominik, R., Roddy, R., and Dorflinger, L. (2007). SAVVY (C31G) gel for

prevention of HIV infection in women: a Phase 3, double-blind, randomized, placebo-controlled trial in Ghana. *PLoS.One.* **2**, e1312.

Pierotti, M. A., Lombardo, C., and Rosano, C. (2008). Nanotechnology: going small for a giant leap in cancer diagnostics and therapeutics. *Tumori* **94**, 191-196.

Poon, V. K. and Burd, A. (2004). In vitro cytotoxicity of silver: implication for clinical wound care. *Burns* **30**, 140-147.

Radulovic, N. V., Ekerhovd, E., Abrahamsson, G., and Norstrom, A. (2010). Cervical tissue changes in women with miscarriage: a morphological and biochemical investigation. *Acta Obstet.Gynecol.Scand.* **89**, 54-64.

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.

Rohan, L. C., Hillier, S. L., and Dezzutti, C. S. (2007). Preventing the sexual transmission of HIV-1 with topical microbicides: another piece of the equation. *J.Infect.Dis.* **196**, 1285-1287.

Rohan, L. C. and Sassi, A. B. (2009). Vaginal drug delivery systems for HIV prevention. *AAPS.J.* **11**, 78-87.

Rozenberg, L., Haagmans, B. L., Neumann, A. U., Chen, G., McLaughlin, M., Levy-Drummer, R. S., Masur, H., Dewar, R. L., Ferenci, P., Silva, M., Viola, M. S., Polis, M. A., and Kottlilil, S. (2009). Therapeutic response to peg-IFN-alpha-2b and ribavirin in HIV/HCV co-infected African-American and Caucasian patients as a function of HCV viral kinetics and interferon pharmacodynamics. *AIDS* **23**, 2439-2450.

Russo, I., Babbitt, S., Muralidharan, V., Butler, T., Oksman, A., and Goldberg, D. E. (2010). Plasmepsin V licenses Plasmodium proteins for export into the host erythrocyte. *Nature* **463**, 632-636.

Sandler, R. (2009). Nanomedicine and nanomedical ethics. *Am.J.Bioeth.* **9**, 16-17.

Sarewitz, D. (2010). Better all the time. *Nature* **463**, 607.

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.

Sexton, A., Harman, S., Shattock, R. J., and Ma, J. K. (2009). Design, expression, and characterization of a multivalent, combination HIV microbicide. *FASEB J.* **23**, 3590-3600.

Shimada, T. (1993). [Anti-HIV genes: strategies for gene therapy of AIDS]. *Nippon Rinsho* **51 Suppl**, 229-234.

- Sibbald, R. G., Contreras-Ruiz, J., Coutts, P., Fierheller, M., Rothman, A., and Woo, K. (2007). Bacteriology, inflammation, and healing: a study of nanocrystalline silver dressings in chronic venous leg ulcers. *Adv.Skin Wound.Care* **20**, 549-558.
- Singhal, S., Nie, S., and Wang, M. D. (2010). Nanotechnology applications in surgical oncology. *Annu.Rev.Med.* **61**, 359-373.
- Sondi, I. and Salopek-Sondi, B. (2004). Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria. *J.Colloid Interface Sci.* **275**, 177-182.
- Soto, M. J., Pe, X., and Garcia-Vallejo, F. (2010). A Genomic and Bioinformatics analysis of the Integration of HIV in Peripheral Blood Mononuclear Cells. *AIDS Res.Hum.Retroviruses*.
- 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, Santos 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.
- Spear, M. (2010). Silver: an age-old treatment modality in modern times. *Plast.Surg.Nurs.* **30**, 90-93.
- 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.
- Stadler, J. and Saethre, E. (2010). Blockage and flow: intimate experiences of condoms and microbicides in a South African clinical trial. *Cult.Health Sex* **1**.
- Starodub, M. E. and Trevors, J. T. (1989). Silver resistance in Escherichia coli R1. *J.Med.Microbiol.* **29**, 101-110.
- Steege, K., Luchters, S., Dauwe, K., Reynaerts, J., Mandaliya, K., Jaoko, W., Plum, J., Temmerman, M., and Verhofstede, C. (2009). Effectiveness of antiretroviral therapy and development of drug resistance in HIV-1 infected patients in Mombasa, Kenya. *AIDS Res.Ther.* **6**, 12.
- Stevens, M., De, Clercq 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.
- Tafesse, F. G. and Holthuis, J. C. (2010). Cell biology: A brake on lipid synthesis. *Nature* **463**, 1028-1029.

- Takagi, H., Miura, S., Matsunami, K., Ikeda, T., and Imai, A. (2010). Cervical cancer metastasis to the scalp: case report and literature review. *Eur.J.Gynaecol.Oncol.* **31**, 217-218.
- Tapper, A. (1998). Bridging the gender gap: a blue-print for global guidelines? Human rights: women's issues. *AIDS Anal.Afr.* **8**, 12-13.
- Taylor, P. L., Omotoso, O., Wiskel, J. B., Mitlin, D., and Burrell, R. E. (2005). Impact of heat on nanocrystalline silver dressings. Part II: Physical properties. *Biomaterials* **26**, 7230-7240.
- Terrazas-Aranda, K., Van, Herrewewege Y., Hazuda, D., Lewi, P., Costi, R., Di, Santo R., Cara, A., and Vanham, G. (2008). Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) integration: a potential target for microbicides to prevent cell-free or cell-associated HIV-1 infection. *Antimicrob.Agents Chemother.* **52**, 2544-2554.
- Tian, J., Wong, K. K., Ho, C. M., Lok, C. N., Yu, W. Y., Che, C. M., Chiu, J. F., and Tam, P. K. (2007). Topical delivery of silver nanoparticles promotes wound healing. *ChemMedChem.* **2**, 129-136.
- 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.Syindr.* **51**, 450-453.
- van der Laak, J. A., de Bie, L. M., de, Leeuw H., de Wilde, P. C., and Hanselaar, A. G. (2002). The effect of Replens on vaginal cytology in the treatment of postmenopausal atrophy: cytomorphology versus computerised cytometry. *J.Clin.Pathol.* **55**, 446-451.
- van der Straten, A., King, R., Grinstead, O., Serufilira, A., and Allen, S. (1995). Couple communication, sexual coercion and HIV risk reduction in Kigali, Rwanda. *AIDS* **9**, 935-944.
- 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.
- Wallace, D. R. (2006). HIV Neurotoxicity: Potential Therapeutic Interventions. *J.Biomed Biotechnol.* **2006**, 65741.
- Weeks, M. R., Mosack, K. E., Abbott, M., Sylla, L. N., Valdes, B., and Prince, M. (2004). Microbicide acceptability among high-risk urban U.S. women: experiences and perceptions of sexually transmitted HIV prevention. *Sex Transm.Dis.* **31**, 682-690.
- West, J. L. and Halas, N. J. (2000). Applications of nanotechnology to biotechnology commentary. *Curr.Opin.Biotechnol.* **11**, 215-217.
- Westerman, K. A., Ao, Z., Cohen, E. A., and Leboulch, P. (2007). Design of a trans protease lentiviral packaging system that produces high titer virus. *Retrovirology.* **4**, 96.
- Wintrebart, F. and Certain, A. (1990). [Evolution of the definition of AIDS. The main classifications of HIV infection]. *Presse Med.* **19**, 1892-1898.

- Worobey, M., Gemmel, M., Teuwen, D. E., Haselkorn, T., Kunstman, K., Bunce, M., Muyembe, J. J., Kabongo, J. M., Kalengayi, R. M., Van, Marck 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.
- Wright, J. B., Lam, K., Buret, A. G., Olson, M. E., and Burrell, R. E. (2002). Early healing events in a porcine model of contaminated wounds: effects of nanocrystalline silver on matrix metalloproteinases, cell apoptosis, and healing. *Wound.Repair Regen.* **10**, 141-151.
- Wyatt, R., Kwong, P. D., Desjardins, E., Sweet, R. W., Robinson, J., Hendrickson, W. A., and Sodroski, J. G. (1998). The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature* **393**, 705-711.
- Yao, W. X., Wu, Y. L., and Guo, Y. (2008). [Process of HIV-1 reverse transcription and its detection by using PCR]. *Yao Xue.Xue.Bao.* **43**, 118-122.
- Yerly, S., Junier, T., Gayet-Ageron, A., Amari, E. B., von, Wyl, 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.
- Zennou, V., Petit, C., Guetard, D., Nerhbass, U., Montagnier, L., and Charneau, P. (2000). HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell* **101**, 173-185.
- Zhang, L. W. and Monteiro-Riviere, N. A. (2008). Assessment of quantum dot penetration into intact, tape-stripped, abraded and flexed rat skin. *Skin Pharmacol.Physiol* **21**, 166-180.
- Zucchi, F., Focchi, J., Silva, I. D., Baracat, E. C., Stavale, J. N., and Ribalta, J. C. (2002). P27 expression in normal epithelium and condylomas of the vulva in HIV positive and negative women. *Clin.Exp.Obstet.Gynecol.* **29**, 62-64.
- 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.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Liliana del Carmen Ixtepan Turrent

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Especialidad en Microbiología

Tesis. “ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN DE LA TRANSMISIÓN DE LA INFECCIÓN DE HIV-1 POR LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA RECUBIERTAS POR POLIVINILPIRROLIDONA, EN UN MODELO DE CULTIVO DE TEJIDO DE CÉRVIX HUMANO *IN VITRO*”

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Datos Personales: Nacida en San Andrés Tuxtla , Veracruz el 16 de Abril de 1961, hija de Juanuario Ixtepan Escribano y Ma. Del Carmen Turrent Simoneen.

Educación: Egresado de la Facultad de Medicina de la Universidad Veracruzana en Xalapa, Veracruz, grado obtenido Medico Cirujano Partero en 1987

Maestría en Ciencias Biológicas en el país de Israel en el año 2000.

Experiencia Profesional: Maestro de Tiempo Completo de la Universidad Autónoma

de Nuevo León desde 2003, responsable del Área de consulta del Centro de Especialidades Inmunológicas de la FCB, UANL 2003-2010.

Investigador de tiempo completo en el Instituto de investigación del SIDA Ruth Ben Ari en el BSL-3, en Rehovot Israel perteneciente al Hospital Kaplan. 1997-2003.

Reconocida por la SEP como perfil deseable de **PROMEP** desde 2004.

Citas en artículos indexados: 45

Al día de hoy el artículo producto de esta tesis muestra el impacto que ha tenido desde su publicación con 870 accesos. en menos de un mes .

Artículos publicados:

1. PVP-coated silver nanoparticles block the transmission of cell-free and cell-associated HIV-1 in human cervical culture.

Humberto H Lara * **Liliana Ixtepan-Turrent*** Elsa N Garza-Treviño and Cristina Rodriguez-Padilla *Contributed equally

Journal of Nanobiotechnology 2010, 8:15doi:10.1186/1477-3155-8-15

2. Mode of antiviral action of silver nanoparticles against HIV-1

Humberto H Lara, Nilda V Ayala-Núñez, **Liliana Ixtepan-Turrent** and Cristina Rodriguez-Padilla. Journal of Nanobiotechnology . 2010. **Citas: 8**
8:1doi:10.1186/1477-3155-8-1(artículo altamente accesado con 8500 accesos.)

3. **Clinical and immunological assessment in breast cancer patients receiving anticancer therapy and bovine dialyzable leukocyte extract as an adjuvant.** Humberto H. Lara*, **Liliana Ixtepan Turrent***, Elsa N. Garza-Treviño, Reyes Tamez-Guerra and Cristina Rodriguez-Padilla * Contributed equally .

Experimental and Therapeutic Medicine 1: 425-431, 2010. Received December 21, 2009; Accepted March 22, 2010. DOI: 10.3892/etm_00000066.

(Este artículo está en el lugar 5 de los más accesados a 5 meses de su publicación)

4. - Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria.

Humberto H. Lara Villegas • N. Vanesa Ayala-Núñez • **Liliana del Carmen Ixtepan Turrent** • Cristina Rodríguez Padilla.

Received: 9 June 2009 / Accepted: 5 October 2009.

World J Microbiol Biotechnol DOI 10.1007/s11274-009-0211-3. **Citas: 2**

5. Silver Nanoparticles Toxicity and Bactericidal Effect Against Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus: Nanoscale Does Matter.

Nilda Vanesa Ayala-Núñez & Humberto H. Lara Villegas & **Liliana del Carmen Ixtepan Turrent** & Cristina Rodríguez Padilla. # Humana Press Inc. 2009

Nanobiotechnol DOI 10.1007/s12030-009-9029-1

Citas : 2

6.- Blocking of Cell-free and Cell-associated HIV-1 Transmission Through Human Cervix Organ Culture With UC781

*Arielah Zussman, ***Liliana Lara**, Humberto Lara, Zvi Bentwich and Gadi Borkow.

*Ariela Zuzzman y Liliana Lara colaboraron de igual forma en la investigación y son PRIMER AUTOR en esta publicación.

AIDS 2003,17:1-9.

Citas: 33

RESEARCH

Open Access

PVP-coated silver nanoparticles block the transmission of cell-free and cell-associated HIV-1 in human cervical culture

Humberto H Lara*[†], Liliana Ixtepan-Turrent[†], Elsa N Garza-Treviño and Cristina Rodriguez-Padilla

Abstract

Background: Previous *in vitro* studies have demonstrated that polyvinylpyrrolidone coated silver nanoparticles (PVP-coated AgNPs) have antiviral activity against HIV-1 at non-cytotoxic concentrations. These particles also demonstrate broad spectrum virucidal activity by preventing the interaction of HIV-1 gp120 and cellular CD4, thereby inhibiting fusion or entry of the virus into the host cell. In this study, we evaluated the antiviral activity of PVP-coated AgNPs as a potential topical vaginal microbicide to prevent transmission of HIV-1 infection using human cervical culture, an *in vitro* model that simulates *in vivo* conditions.

Results: When formulated into a non-spermicidal gel (Replens) at a concentration of 0.15 mg/mL, PVP-coated AgNPs prevented the transmission of cell-associated HIV-1 and cell-free HIV-1 isolates. Importantly, PVP-coated AgNPs were not toxic to the explant, even when the cervical tissues were exposed continuously to 0.15 mg/mL of PVP-coated AgNPs for 48 h. Only 1 min of PVP-coated AgNPs pretreatment to the explant was required to prevent transmission of HIV-1. Pre-treatment of the cervical explant with 0.15 mg/mL PVP-coated AgNPs for 20 min followed by extensive washing prevented the transmission of HIV-1 in this model for 48 h.

Conclusions: A formulation of PVP-coated AgNPs homogenized in Replens gel acts rapidly to inhibit HIV-1 transmission after 1 min and offers long-lasting protection of the cervical tissue from infection for 48 h, with no evidence of cytotoxicity observed in the explants.

Based on this data, PVP-coated AgNPs are a promising microbicidal candidate for use in topical vaginal/cervical agents to prevent HIV-1 transmission, and further research is warranted.

Background

Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), the disease caused by human immunodeficiency virus (HIV), is responsible for over two million deaths per year. Highly active anti-retroviral therapy (HAART), a treatment regimen that employs a cocktail of drugs to suppress HIV infection, has significantly improved the quality of life and life expectancy of millions of HIV-infected individuals. Numerous HIV-infected individuals are currently treated with HAART, and these individuals harbor chronic long-term infection; as a result, HIV eventually

develops resistance to these drugs, resulting in a need to change medication regimens and a subsequent increase in the cost of treatment [1].

Worldwide, nearly half of all individuals living with HIV are females who have acquired the virus through heterosexual exposure [2]. Although the use of prophylactic agents during sexual intercourse can reduce the transmission of HIV-1, this option is not always feasible for many women due to limited economic options and gender inequality. Women cannot reliably negotiate the use of condoms with their sexual partners [3-5], which leaves them vulnerable to unwanted pregnancy and sexually transmitted infections (STIs), including HIV [6,7].

Consequently, women urgently need infection prevention technology [8] that is within their personal control [9,10]. As the clinical deployment of a safe and effective

* Correspondence: dr.lara.v@gmail.com

¹ Laboratorio de Inmunología y Virología, Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolas de los Garza, México

[†] Contributed equally

Full list of author information is available at the end of the article

HIV vaccine is likely to be years away, topical microbicide formulations that are applied vaginally or rectally are receiving increasing attention as an alternative strategy for HIV prevention [11,12].

Infection prevention agents, such as vaginal microbicides, must be controlled by women [13] and provide a defense against HIV infection. As such, a contraceptive microbicide could help prevent unintended pregnancies worldwide. To be a microbicide, these agents must be safe and effective [14] following vaginal or rectal administration [15], should cause minimal or no genital symptoms following long-term repeated usage [16], should act rapidly and should offer long-lasting protection from infection [17].

However, proper evaluation of the efficacy of such agents in blocking HIV infection of female genital tissue has been hampered by the lack of appropriate experimental models [18].

Previously demonstrated with a cervical tissue model, the major target cells of infection reside below the genital epithelium. As a result, HIV must cross this barrier to establish infection. Immune activation due to inflammation secondary to venereal diseases enhances HIV infection of subepithelial cells, suggesting that genital epithelial cells are not susceptible to HIV infection and play no part in the transfer of infectious virus across the epithelium. As a result, these cells may provide a barrier to infection. They also demonstrated that virucidal agents designed for topical vaginal use block HIV infection of genital tissue. Such agents have major implications as microbicides [18]. However the application of microbicides directly to the cervical tissue can damage commensal vaginal flora and result in increased inflammation, [19] leaving women susceptible to opportunistic infections and HIV acquisition [20-22]. Therefore, it is necessary that a microbicidal agent possess virucidal, bactericidal, and anti-inflammatory activities. In addition, the treatment of sexually transmitted diseases may decrease the infectivity of HIV-seropositive women by reducing their exposure to HIV-1 in genital secretions [20].

Ideally, a retrovirucidal agent should fulfill several requirements. First, it should act directly on the virus. Dideoxynucleoside antivirals, such as AZT, require cellular metabolic activation and are, therefore, of little use in this respect. Second, a retrovirucide should act at replication steps prior to the integration of proviral DNA into the infected host cell's genome. Although protease inhibitors prevent maturation of newly synthesized viral particles, they are ineffective against pre-existing HIV infection. Third, a retrovirucide should be able to be absorbed by uninfected cells and provide protection from infection by the residual active virus [23,24].

Silver ions have demonstrated activity against both bacteria and viruses. For example, AgNO₃ has been widely

used as a cauterizing agent for patients with aphthous stomatitis [25,26], as a treatment of epistaxis in children [27], and to stanch hemorrhages in cervixes following biopsies [28]. Additionally, AgNO₃ has been used to prevent gonococcal ophthalmia neonatorum in newborns for centuries [29]. Other agents derived from silver, such as silver sulfadiazine (AgSD) cream, have been used by physicians as topical treatments for burn wounds for the past 60 years. During these treatments, erythema decreases, whereas the expression of matrix metalloproteinases (MMPs) increases. This combination reduces chronic inflammation without altering the patients' resistance to bacteria and, importantly, does so without inducing scars.

Recent advances in nanotechnology have resulted in the ability to produce pure silver as nanoparticles [30-35], which are more efficient against HIV than silver ions (AgSD and AgNO₃) [36]. In addition, silver ions, silver nanoparticles and silver nanocrystals are able to reduce inflammation by altering the levels of cytokines involved in the wound-healing process [37,38]. Decreased levels of IL-10 and IL-6 may be important in preventing the formation of scars during wound repair [37]; as such, silver nanoparticles may represent a possible microbicide alternative for the treatment of HIV-1 [39-42].

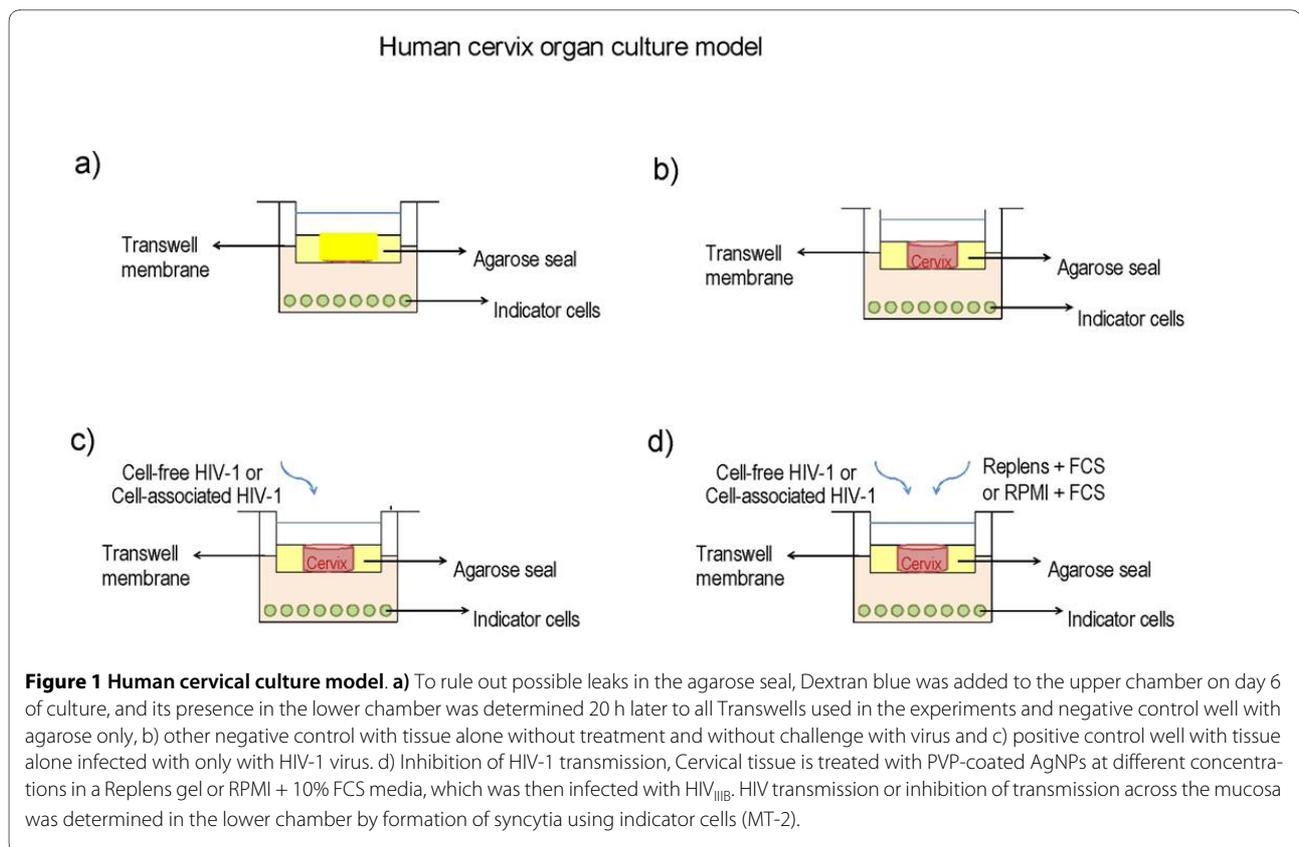
According to our previous *in vitro* results, polyvinylpyrrolidone coated silver nanoparticles (PVP-coated AgNPs) inhibit HIV-1 infection (regardless of viral tropism or resistance profile) by binding to gp120 in a manner that prevents CD4-dependent virion binding, fusion, and infection. As such, PVP-coated AgNPs block HIV-1 cell-free and cell-associated infection and act as a virucidal agent. As previously described, PVP-coated AgNPs are an interesting virucidal candidate.

Therefore, we investigated the antiviral potency of PVP-coated AgNPs in an *in vitro* human cervical tissue-based organ culture that simulates *in vivo* conditions [36]. We chose this model, as it included all of the natural architecture found *in vivo*: stratified squamous epithelium, submucosa, and immune cells (Fig. 1) [23,24,43]. This model has been used to quantify inhibition of HIV infection transmission throughout a cervical explant in a non cytotoxic range of microbicide. In addition, this model is useful for delimiting the time needed to observe antiviral activity and for defining the duration of protection rendered against infection after application of the gel on human tissue.

Results

Toxicity of PVP-coated AgNPs to the cervical tissue

To determine the toxic effect of PVP-coated AgNPs, we analyzed the cervical stroma using hematoxylin and eosin staining. First, we treated ecto-cervical tissues with 0.6, 0.3, 0.15, 0.1 and 0.05 mg/mL PVP-coated AgNPs for 48



h. The highest dose of PVP-coated AgNPs (0.6 mg/mL) did not cause an acute inflammatory response in the cervical explant or induce cell death, as determined by the histopathology with no signs of cell damage (no edema, eosinophils or apoptosis). Compared to the negative control (no treatment), cervical tissue that had been incubated with 0.6, 0.3, 0.15, 0.1, and 0.05 mg/mL PVP-coated AgNPs for 48 h showed mild lymphoid infiltration compared with the negative control (Fig 2a).

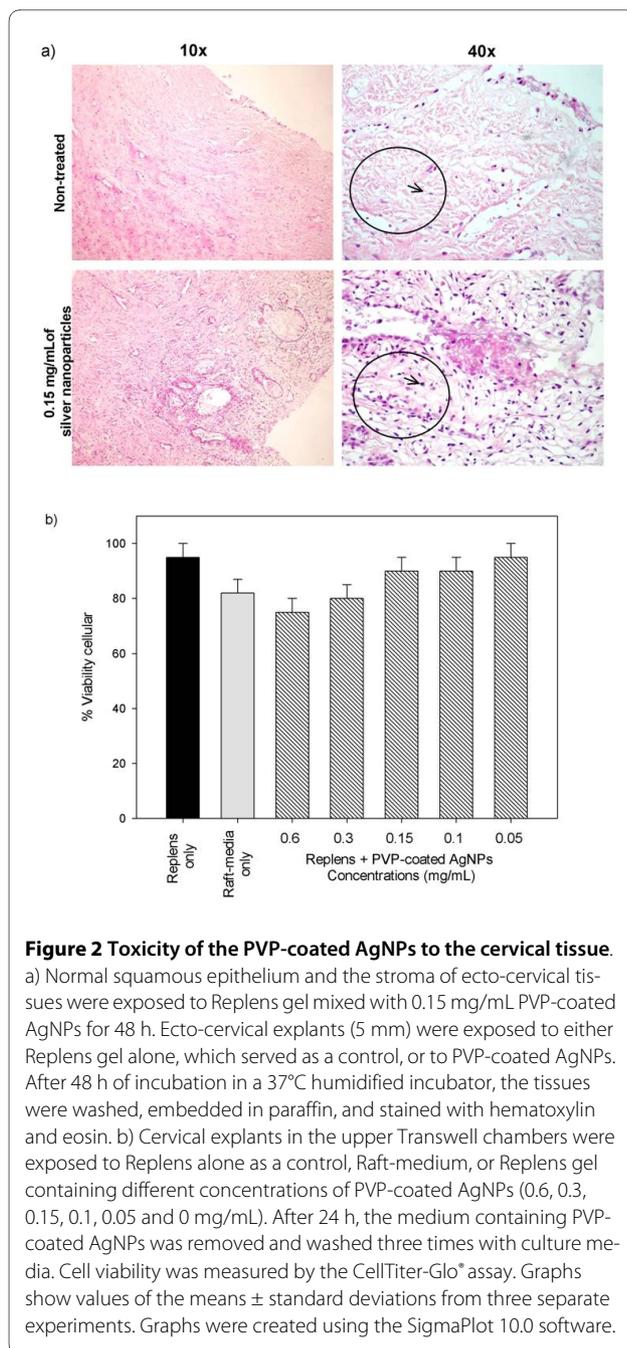
Next, we evaluated cell viability after 24 h of treatment with various concentrations of PVP-coated AgNPs (0.6, 0.3, 0.15, 0.1 and 0.05 mg/mL) by comparing the percentage of viable cells in the cervical tissue without treatment with PVP-coated AgNPs, relative to the positive control, which was measured as the amount of ATP released from viable cells using a luciferase-based assay. The values of PVP-coated AgNPs chosen for toxicity studies exceeded the amount necessary to inhibit transmission of HIV-1 infection *in vitro* through the cervical explant [36]. Treatment with 0.3 mg/mL PVP-coated AgNPs was cytotoxic in only 20% of the cells of the cervical explant, whereas a dose of 0.6 mg/mL was cytotoxic to 23% of the cells. PVP-coated AgNPs formulated in Replens gel inhibited cell viability by 5%, and Raft-media was cytotoxic to 18% of cells (Fig. 2b). Raft-media has many antibiotics, which, when combined, result in cytotoxicity.

Inhibition of cell-free and cell-associated HIV-1 viral infection in the presence or absence of Replens gel

Results showed that two minutes of pre-treatment of the cervical explant with 0.025 to 0.15 mg/mL of PVP-coated AgNPs formulated in the Replens gel protected the cervical tissues from HIV-1_{IIB} infection; this inhibitory effect was independent of the effect of the Replens gel alone. In addition, PVP-coated AgNPs with or without the Replens gel completely neutralized cell-free and cell-associated HIV-1 transmission of infection through cervical tissues at a dose of 0.15 mg/mL, although a similar result was obtained at doses of 0.1 and 0.05 mg/mL Replens gel conferred protection in a dose-dependent manner, inhibiting infection associated with the (H9+) cells more efficiently than PVP-coated AgNPs in RPMI media containing 10% FCS alone; the result was most significant at a dose of 0.025 mg/mL (Fig. 3).

Minimal time of exposure to PVP-coated AgNPs needed to confer protection against the HIV-1 transmission of cell-associated infection in the cervical culture model

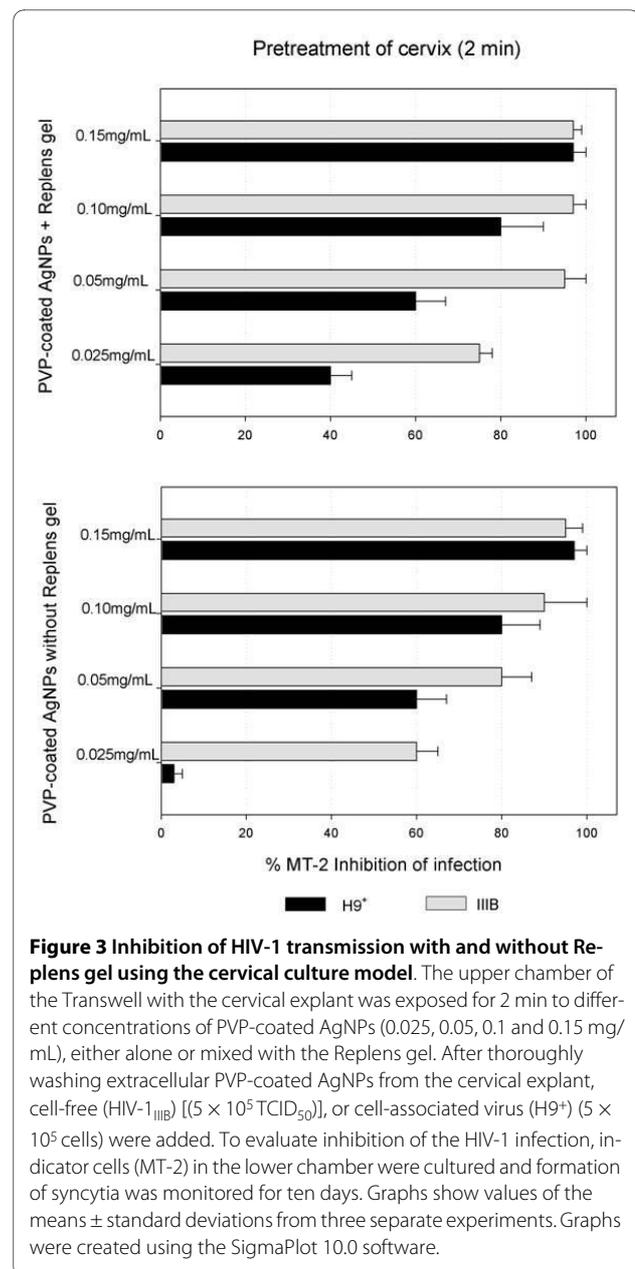
We evaluated the time required for 0.1 and 0.15 mg/mL doses of PVP-coated AgNPs to block HIV-1_{IIB} infection of cell-associated (H9 +) transmission through the cervical tissue. Complete protection occurred within one minute of pre-treatment with 0.15 mg/mL PVP-coated AgNPs incubated for different times and after washing



away of the extracellular drug. Furthermore, PVP-coated AgNPs completely blocked the T tropic wild type (HIV-1_{IIIB}) virus, the drug resistant viral isolate (AZT_{RV}), and cell-associated HIV-1 (H9⁺ cells) transmission through cervical tissue after one minute of pre-treatment (Fig. 4).

Duration of the protection time from HIV-1 infection following 20 minutes pre-treatment of the cervical explants with PVP-coated AgNPs

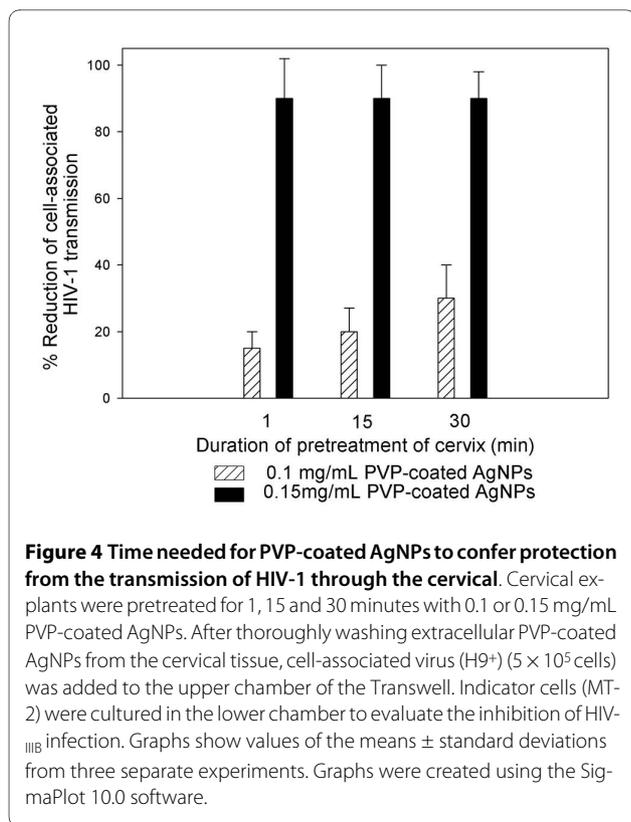
After 20 minutes of pre-treatment of the cervical explants with 0.15 mg/mL PVP-coated AgNPs, the drug was



removed and washed from the upper chamber, which conferred almost total protection (90%) against HIV-1 transmission of infection for 48 h (Fig. 5), indicating a long-lasting protective effect by the PVP-coated AgNPs in the cervical explant.

Discussion

The development of non-toxic microbicides effective against the transmission of cell-free and cell-associated virus, which have long-lasting efficacy on the treated tissue [17,44] and are rapidly acting [45], is a highly desirable approach to the prevention of HIV-1 transmission during sexual intercourse. Inhibiting the transmission of



HIV *in vivo* will likely require a combination of microbical products that provide broad anti-viral effects and prevent the development of HIV strains resistant to the microbicides [46]. It is clear that the development of a topical vaginal microbicide is technically, ethically, and culturally complicated. However, the number of lives saved with such an agent may exceed the risks involved [47].

In fact, microbicides could have the potential to eliminate drug-resistant bacteria, in addition to sexually transmitted diseases that cause inflammation. Previous studies have reported that silver ions and silver nanoparticles exert anti-inflammatory effects, induce lymphoproliferation, and inhibit bacterial and HIV-1 infection. These characteristics make silver nanoparticles of interest in microbicide research [48,49].

The mechanism of the antiviral action of PVP-coated AgNPs as an HIV-1 virucidal agent has been previously established by Lara HH et al. First, studies have revealed that PVP-coated AgNPs inactivate HIV-1 and block viral entry through gp120-CD4 interaction. Second, PVP-coated AgNPs (1.0-2.5 mg/mL) efficiently block the fusion of HL2/3 and HeLa CD4 cells in a dose-dependent manner. Third, PVP-coated AgNPs act as an effective broad-spectrum microbicide against cell-free virus (i.e., laboratory strains, clinical isolates, T- and M-tropic strains, and resistant strains), as well as the cell-associ-

ated virus. Fourth, PVP-coated AgNPs are effective virucides, as they inactivate HIV particles in a short period of time, exerting their activity at an early stage of viral replication (i.e., entry or fusion) and at post-entry stages [36].

Recent studies have shown that silver nanoparticles are capable of being internalized into cells and can penetrate through skin cells (HEKs) [50]. Other authors have described the localization of PVP-coated AgNPs only in the superficial layers of the stratum corneum, a result similar to that found in a static cell diffusion study [51]. Other nanoparticles have not been shown to penetrate into the deeper epidermis [52,53].

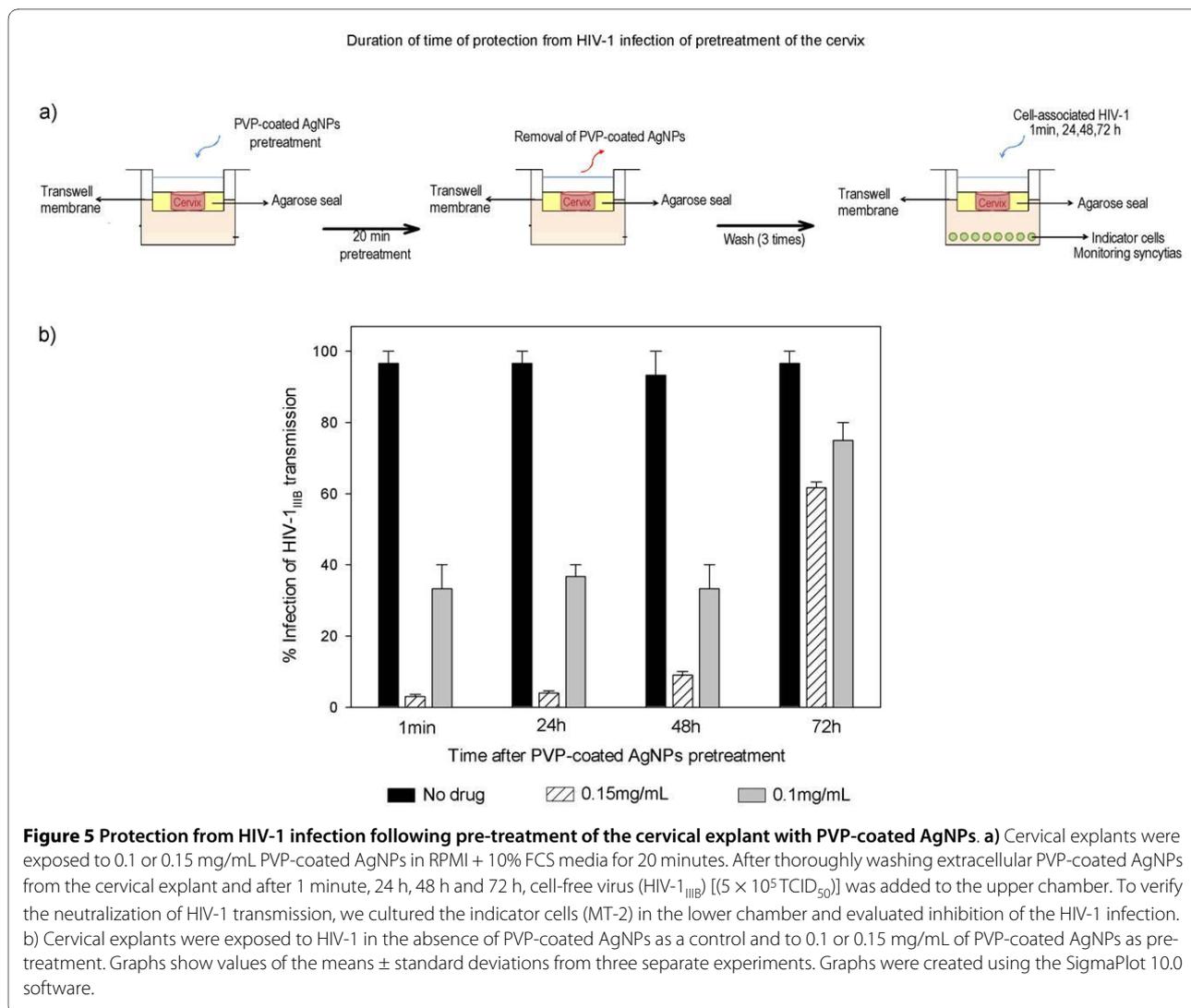
Finally, previous studies report that silver nanoparticles and silver nanocrystals suppress the expression of TNF- α , which is a cytokine that plays a pivotal role in HIV-1 pathogenesis by up-regulating the transcription of HIV-1 [48,49]. It also prevents inflammation and, as such, may enhance wound healing *in vivo* [54]. Moreover, inflammation produces immune activation, enhancing HIV-1 infection of subepithelial cells of the human cervical tissue. Consequently, an agent that prevents inflammation should inhibit the transmission of HIV infection by impeding the enhancement of HIV infection [18].

Based on the previous studies mentioned above, the purpose of this study was to demonstrate the ability of PVP-coated AgNPs to inhibit HIV-1 transmission of infection in a rapid manner with long-lasting effects and efficiently throughout the human cervical explant in an *in vitro* model that simulates *in vivo* conditions.

For these studies, we used a model of a human cervical explant, which contained the natural *in vivo* tissue architecture of stratified squamous epithelium, submucosa, and immune cells (Fig. 1). In this model, the infectious virus is transmitted across the mucosal barrier by both cell-free and cell-associated HIV-1 [7]. Although some researchers have questioned whether HIV transmission in this model is a result of leakage around the polarized cervical tissues [55], these concerns were rebutted [56] based on additional data not shown in the original description of the model. This model has also been used by Greenhead and colleagues to study the effects of various microbicides [57].

PVP-coated AgNPs that were formulated using Replens gel were more effective as a virucide compared to the PVP-coated AgNPs dissolved in RPMI+10% FCS media. This increased activity is due to the ability of this gel to diffuse the PVP-coated AgNPs more homogeneously into the cervical tissue as compared to the medium [6] (Fig. 3), even though RPMI with FCS prevents agglomeration of PVP-coated AgNPs [58]

We demonstrated that pre-treatment of cervical tissues with PVP-coated AgNPs neutralized the transmission of HIV-1 using human cervical explants. Specifically, we found that 0.15 mg/mL PVP-coated AgNPs inhibited



infection by HIV-_{IIIb} and HIV-_{AZT-RV} cell-free viruses as well as cell-associated infection at doses that were not toxic to the human cervical tissue. In addition, treatment of the cervical tissue with 0.15 mg/mL PVP-coated AgNPs augmented the number of lymphocytes relative to the control (Fig 2a). The increased proliferation of lymphocytes was presumably due to activation of the immune system, which was induced by the continuous expression of death factors (mutations of Fas-L or CD95). This resulted in activation of lymphocytes, including CD4 T cells, CD8 CTL, or APC and turned them into effectors of apoptosis, leading to the destruction of healthy, non-infected cells [59-61]. Silver ions and silver nanoparticles improve wound healing by reducing inflammation, inducing the proliferation of lymphocytes [37] and inhibiting bacterial and HIV-1 infection; thus, PVP-coated AgNPs are a potential therapeutic agent against the dissemination of drug-resistant bacteria, thereby providing protection from sexually transmitted

diseases. Importantly, we demonstrated that high concentrations of PVP-coated AgNPs (0.3 and 0.6 mg/mL) were only cytotoxic to a small population of cells, affecting the viability of 20-23% of the cells in the cervical explant, which correlates with low off-target cytotoxic effects (Fig. 2).

An ideal microbicide should act rapidly [45]; in accordance with this, we observed that one minute of exposure to PVP-coated AgNPs (0.15 mg/mL) was the minimal time necessary to achieve protection of the cervical tissue against the transmission of infection by cell-free and cell-associated viruses (Fig. 4). Previously, *in vitro* studies demonstrated that when PVP-coated AgNPs (2.5-5 mg/mL) were dissolved in RPMI+10% FCS media, they conferred partial protection (50%) from HIV-1 cell-associated infection in a dose-dependent manner [36]. In further support of PVP-coated AgNPs as microbicides, PVP-coated AgNPs were also effective in the presence of

cell-associated infection, even under 'non-optimal' conditions.

First-generation microbicides are only effective for a few hours and, therefore, require administration shortly before coitus [62]. Previously, we reported that treatment with PVP-coated AgNPs in concentrations ranging from 0.031 mg/mL to 5.0 mg/mL for one minute reduced the transmission of HIV-1 infection in PBMC and H9+ cells by 20%-30% and that this protection lasted for several hours [36].

Using the cervical explant model, we evaluated the long-term effectiveness of PVP-coated AgNPs, which is an important pharmacodynamic parameter investigated during the development of a topical microbicide agent. It contributes to the choice of antiviral dosing regimens and is defined as the length of time that infection is suppressed following brief exposure to the antimicrobial agent. Ideally, a microbicide should remain effective for several hours after topical application [63]. In this study, the transmission of HIV-1 infectivity through the cervical explant was inhibited in almost all cases when PVP-coated AgNPs were formulated in the Replens gel. Additionally, PVP-coated AgNPs (0.15 mg/mL) that were applied to the cervical tissue for 20 min in a gel formulation were able to abolish HIV-1 transmission for a period of 48 h after the gel was removed and washed thoroughly; after this period of time, the HIV-1 was added to the cervical explant at different times until 72 hours to evaluate the duration of protection to the tissue (Fig. 5). These results are in accordance with our previous findings that showed pre-treatment of uninfected cells with PVP-coated AgNPs conferred protection from acquiring HIV-1 *in vitro*, even in the absence of extracellular drug [36]. A dose of 0.15 mg/mL PVP-coated AgNPs represents a threshold level necessary for inhibition of transmission, even after 48 h (Fig 5). PVP-coated AgNPs were able to confer protection for similar lengths of time compared to other microbicides, including UC781 [64,65,23,24,66].

In comparison to various viral entry inhibitors, PVP-coated AgNPs offer many advantages. For example, although dextrin sulfate reduced the ability of virus (HIV-1H5Bc2) to infect cells *in vitro* by 77%, it did not protect cells against the R5 virus (HIV-1 JRCSF) [67]. Further, although nonoxynol-9 is a microbicide that is active against a wide range of pathogens, it is potentially cytotoxic to host cells. In contrast to these compounds, PVP-coated AgNPs have low cytotoxicity, protect cervical tissue against HIV infection in a manner independent of co-receptors [36] and could possibly reduce inflammation. As such, PVP-coated AgNPs are an ideal microbicide to study [68].

Our hypotheses concerning the inactivation of HIV-1 transmission throughout the cervical explant model using the PVP-coated AgNPs is that the drug acts as a potent virucidal agent that attaches at the viral mem-

brane, [36,69] and may protect the natural barrier of the genital epithelium, therefore inactivating the ability of the HIV virus to reach the target cells that reside below. Thus, when the HIV virus crosses the genital epithelium, it is already inactivated and unable to transfer infection to the target cells that reside in the subepithelium [36], as evidenced by an absence of infection (absence of syncytia on indicator cells) on the lower chamber of the cervical model after treatment with PVP-coated AgNPs.

In addition to their virucidal activity, PVP-coated AgNPs also impair the ability of the HIV-1 virus to develop resistance [36]. Importantly, these nanoparticles have potent activity against most strains of HIV and provide broad protection against other STIs. These compounds are stable at room temperature, accessible in terms of cost, and have demonstrated *in vitro* safety [36,70,71].

Conclusions

Previous *in vitro* studies evaluating PVP-coated AgNPs as potential virucidal agents have revealed that these compounds, in addition to providing broad-spectrum bactericidal and HIV-1 virucidal activity, also blocked the infection of cell-free and cell-associated HIV-1 [72]. The gel formulation of PVP-coated AgNPs is probably the first microbicide with broad spectrum virucidal, bactericidal, and anti-inflammatory properties in cervical tissue [36,54,73].

Our results show that PVP-coated AgNPs function as potential microbicides with virucidal properties that are capable of preventing the transmission of HIV-1 in a human cervical tissue explant model when used at a non-toxic dosage range. PVP-coated AgNPs protect against infection transmission of cell-free and cell-associated HIV-1, acting within one minute after the treatment of the cervical tissue. Importantly, after 20 minutes of pre-treatment with PVP-coated AgNPs and subsequent washing, the cervical culture remained protected against infection with HIV-1 for as long as 48 h, demonstrating long-lasting protection. This feature is necessary for a topical vaginal microbicide to ensure protection many hours after gel application and even more so after the gel is washed away [17].

However, further studies are necessary to evaluate the potential toxicities (i.e., genetic, reproductive, and carcinogenic toxicities) and long-term side effects associated with the use of PVP-coated AgNPs as an inhibitor of HIV-1 infection. Studies evaluating hypersensitivity/photosensitivity and condom integrity are also necessary [7].

Methods

Silver Compounds

Commercially manufactured 30-50 nm spherical silver nanoparticles surface-coated with 0.2 wt% PVP (PVP-coated AgNPs) were used for these studies (NanoAmor,

Houston, TX). Stock solutions of PVP-coated AgNPs were prepared in RPMI 1640 cell culture media with 10% FCS.

Serial dilutions of the stock solution were made using RPMI + 10% FCS media.

HIV-1 isolates and cell culture

The following reagents were obtained from the AIDS Research and Reference Reagent Program, AIDS Division, the National Institute of Allergies and Infectious Diseases and the National Institute of Health and Collaborators: MT-2 (from Dr. Douglas Richman), H9⁺ cells (from Dr. Robert Gallo), HeLa-CD4-LTR- β -gal cells and the viral strains HIV-1_{IIIIB} and HIV-1_{AZT-RV}. HIV-1_{IIIIB} was propagated by sub-culturing in the MT-2 and H9⁺ cells, according to the DAIDS Virology Manual for HIV Laboratories. Aliquots of the cell-free supernatants from virulent cultures were used for viral inoculation. MT-2 and H9⁺ cells were cultured in RPMI 1640 (Sigma-Aldrich), supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and antibiotics. Commercially manufactured 30-50 nm PVP-coated AgNPs were used in these studies (NanoAmor, Houston, TX). A stock solution was prepared in RPMI culture media enriched with 10% fetal calf serum (FCS), which prevents agglomeration. Serial dilutions of the stock solution yielded four different solutions with concentrations ranging from 0.025 to 0.6 mg/mL. All work related to HIV-1 and cell culture manipulation was done in a biosafety level 3 (BSL-3) laboratory at the Laboratorio de Inmunología y Virología, Universidad Autónoma de Nuevo Leon, Mexico.

Formulation of Replens gel/PVP-coated AgNPs

PVP-coated AgNPs were formulated in a non-spermicidal Replens gel (3% glycerin, 0.08% sorbic acid, 1% carbopol 940, 4% liquid paraffin and 16% 1 N NaOH) [24]. Gels containing PVP-coated AgNPs at serial concentrations from 0.025- 0.6 mg/mL were added to the upper chambers of the cervical culture model.

Toxicity of PVP-coated AgNPs to the cervical tissue

The effect of various concentrations of PVP-coated AgNPs (0.6, 0.3, 0.15, 0.1 and 0.05 mg/mL) on cervical explant tissues for 48 h was examined by histochemistry, as previously described [23,24]. The viability of cervical biopsies was quantified after 24 h of exposure to Replens gel mixed with 0.6, 0.3, 0.15, 0.1 and 0.05 mg/mL PVP-coated AgNPs, using the CellTiter-Glo[®] luminescent cell viability assay (Promega Cat. G7572). Microtiter plates were incubated at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere for 24 h and were used to determine the number of viable cells in a culture by quantification of ATP. All assays were run in parallel according to the producer's protocol and included both a negative (measure of only

reagent) and positive control (explant without treatment). A Veritas microplate luminometer from Turner Biosystems (Model 9100-002) was used in these experiments. Cytotoxicity was evaluated in a dose-dependent manner and was based on the percentage of viable cells relative to the positive control.

Cervical explant model

Ecto-cervical tissue was collected from HIV-1-negative, pre-menopausal women undergoing planned therapeutic hysterectomies after their informed consent was obtained. All tissues were processed for organ culture within 5 hours of the completion of surgery. Tissue samples were soaked in a concentrated antibiotic wash solution (20,000 U/mL penicillin and streptomycin, 250 μ g/mL fungizone, and 120 U/mL nystatin) for 10 min. The tissues were then washed three times in Raft-media 21 (Dulbecco's modified Eagle medium supplemented with 25% Ham's F12 medium, 0.1 nM cholera toxin, 5 μ g/mL apo-transferrin, 4 mg/mL hydrocortisone, 0.5 ng/mL EGF, 10% FBS and 10,000 U/mL penicillin, and streptomycin) and cut into 0.4 \times 0.5 cm pieces. A piece of tissue with the epithelial layer oriented on top was placed in the top chamber of a 12-well Transwell plate, a permeable tissue culture support that uses microporous membranes. These permeable wells permit cells to uptake and secrete molecules on both their basal and apical surfaces and, thereby, carry out metabolic activities in a more physiological fashion. A 3% solution of agarose in Hank's medium was added to the area surrounding the tissue in the top well, which upon solidification created a tight seal around the tissue. Cervical and vaginal explants, comprising epithelial and stromal tissues, were kept at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ [23,74].

To rule out possible leaks in the agarose seal, Dextran blue was added to the upper chamber on day 6 of culture, and its presence in the lower chamber was determined 20 h later [13].

Inhibition of cell-free and cell-associated HIV-1 viral infection in the presence or absence of Replens gel

In these experiments we used an *in vitro* cervical tissue-based organ culture model that was developed to study the heterosexual transmission of HIV-1 infection simulating *in vivo* conditions.

The upper chamber of the Transwell with cervical explant was pre-treated for 2 min at different concentrations of PVP-coated AgNPs (0.025, 0.05, 0.1 and 0.15 mg/mL), either alone or in formulation with the Replens gel, followed by thorough washing of the extracellular PVP-coated AgNPs from the cervical explant. Cell-free (HIV-1_{IIIIB}) [(5 \times 10⁵ TCID₅₀)] or cell-associated virus (H9⁺) (5 \times 10⁵ cells) was added to the cervical explant in the upper chamber. To evaluate the inhibition of HIV-1 transmis-

sion through the cervical explant, indicator cells (MT-2) were cultured in the lower chamber and were monitored for the formation of syncytia for ten days, as previously described [13,75,76]. A positive virus control (cervical explant infected with HIV-1 without treatment) must produce observable syncytia within seven days of incubation, which reflects the presence of infection. The first reading of the plate must be made by day three. Negative control wells (cervical explants not infected with HIV-1) must not develop syncytia, which reflect an absence of infection. If either control does not react as expected, the assay is suspect and should be repeated.

In the case of the MT-2 cells, half of the media were changed for new RPMI+10% FCS media with MT-2 uninfected cells every three days, and the formation of syncytia was monitored for ten days. The cytopathic effects of the viral infection of MT2 cells were analyzed by microscopic assessment of syncytia formation. These latter data were obtained by analysis of duplicate samples by two independent observers [13,75,76].

Minimal time of exposure to PVP-coated AgNPs needed to confer protection from HIV-1 transmission of cell-associated infection in the cervical culture model

To define the minimal time of exposure needed to confer protection to the cervical explant from transmission of infection, RPMI+10% FCS media containing 0, 0.1 and 0.15 mg/mL PVP-coated AgNPs was added to the upper chambers, and 1, 15, or 30 minutes later, the medium was removed. The upper chambers were then washed three times with the culture media. H9⁺ (5×10^5 cells) were then added to the upper chamber of the Transwell to evaluate inhibition of HIV-1 cell-associated transmission. Target cells (MT- 2) were added to the lower chambers. In the case of the MT-2 cells, half of the media were replenished with the new media and added to the MT-2 uninfected cells every three days. The formation of syncytia was monitored for ten days.

Duration of time of protection from HIV-1 infection following 20 minutes of pre-treatment of the cervical explants with PVP-coated AgNPs

Five millimeter circular pieces of ectocervical tissues were placed in the top chambers of a 12-well Transwell sealed with 3% agarose with the epithelial layer oriented on top. Media containing PVP-coated AgNPs was added to the upper chambers, and after 20 min of treatment, the RPMI+10% FCS media containing PVP-coated AgNPs in the upper chambers was removed from ectocervical tissues on the upper chambers and was then washed thoroughly three times with media. After washing of the top chambers, HIV-1_{IIB} [$(5 \times 10^5$ TCID₅₀)] was added after 1 min, 24 h, 48 h and 72 h. Indicator cells (MT- 2) were

added to the lower chambers to measure the percentage of inhibition of infection transmission through the cervical explant to the lower chamber where the indicator cells are cultured. With respect to the culture of MT-2 cells, half of the media were exchanged for new media and added to the MT-2 uninfected cells every three days. The formation of syncytia was monitored for ten days after infection.

MT-2 infectivity assay

MT-2 cells were added as indicator cells to monitor the transmission of HIV-1 infectivity to the lower chambers as soon as the HIV-1 was added to infect the cervical tissue of the upper chamber with or without PVP-coated AgNPs formulated into gel or RPMI+10% FCS media. In the case of MT-2 cells, half of the media was replenished with the new media and added to the MT-2 uninfected cells every three days. The formation of syncytia was monitored every day for ten days. For a positive control on cervical tissue, only HIV_{IIB} was added without treatment with PVP-coated AgNPs, syncytia were counted for all cells in the tissue. For the negative control, only cervical tissue without HIV_{IIB} and PVP-coated AgNPs were used. Syncytia were counted in the lower chamber; for the negative control, all cells were expected to be without syncytia.

The percentages of cells with tissue showing signs of inhibition of HIV-1 infection transmission were evaluated with respect to the positive control. The cytopathic effects of the viral infection of MT2 cells were analyzed by microscopic assessment of syncytial formation. These latter data were obtained by analysis of duplicate samples by two independent observers [75-77].

Statistical analysis

Graphs show values of the means \pm standard deviations from three separate experiments. Graphs were created using the SigmaPlot 10.0 software.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

All authors read and approved the final manuscript. H.H.L. participated in the conception and experimental design of the *in vitro* HIV-1 manipulation and infection assays, in the analysis and interpretation of the data, and in the writing and revision of this report. L.I-T. participated in designing the *in vivo* cervical tissue model and helped analyze and interpret the results. H.H.L. and L.I-T. made equal contributions to this study working in the cervical model, working designing, and authoring E.N.G-T. participated in the analysis and interpretation of the data and in writing and revising this report. C.R-P. participated in the experimental design of this study.

Acknowledgements

The following funding sources supported our experiments: the Programa de Apoyo a la Investigacion en Ciencia y Tecnologia (PAICyT) of the Universidad Autonoma de Nuevo Leon, Mexico, and the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia (CONACyT) of Mexico.

Author Details

Laboratorio de Inmunología y Virología, Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolas de los Garza, México

Received: 12 April 2010 Accepted: 13 July 2010

Published: 13 July 2010

References

1. Ray N: **Maraviroc in the treatment of HIV infection.** *Drug Des Devel Ther* 2009, **2**:151-161.
2. Walker PR, Worobey M, Rambaut A, Holmes EC, Pybus OG: **Epidemiology: Sexual transmission of HIV in Africa.** *Nature* 2003, **422**:679.
3. Elias C, Coggins C: **Acceptability research on female-controlled barrier methods to prevent heterosexual transmission of HIV: Where have we been? Where are we going?** *J Womens Health Gen Based Med* 2001, **10**:163-173.
4. Kalichman SC, Williams EA, Cherry C, Belcher L, Nachimson D: **Sexual coercion, domestic violence, and negotiating condom use among low-income African American women.** *J Womens Health* 1998, **7**:371-378.
5. van der Straten A, King R, Grinstead O, Seruflira A, Allen S: **Couple communication, sexual coercion and HIV risk reduction in Kigali, Rwanda.** *AIDS* 1995, **9**:935-944.
6. Balzarini J, Naesens L, Verbeke E, Laga M, Van DL, Pariani M, Van ML, Anne J, De CE: **Preclinical studies on thio-carboxanilide UC-781 as a virucidal agent.** *AIDS* 1998, **12**:1129-1138.
7. McGowan I: **Microbicides: a new frontier in HIV prevention.** *Biologicals* 2006, **34**:241-255.
8. Fowler MG, Melnick SL, Mathieson BJ: **Women and HIV. Epidemiology and global overview.** *Obstet Gynecol Clin North Am* 1997, **24**:705-729.
9. Elias CJ, Coggins C: **Female-controlled methods to prevent sexual transmission of HIV.** *AIDS* 1996, **10**(Suppl 3):S43-S51.
10. Brown H: **Marvellous microbicides. Intravaginal gels could save millions of lives, but first someone has to prove that they work.** *Lancet* 2004, **363**:1042-1043.
11. Cutler B, Justman J: **Vaginal microbicides and the prevention of HIV transmission.** *Lancet Infect Dis* 2008, **8**:685-697.
12. Pauwels R, De CE: **Development of vaginal microbicides for the prevention of heterosexual transmission of HIV.** *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1996, **11**:211-221.
13. Zussman A, Lara L, Lara HH, Bentwich Z, Borkow G: **Blocking of cell-free and cell-associated HIV-1 transmission through human cervix organ culture with UC781.** *AIDS* 2003, **17**:653-661.
14. Moscicki AB: **Vaginal microbicides: where are we and where are we going?** *J Infect Chemother* 2008, **14**:337-341.
15. Severy LJ, Tolley E, Woodsong C, Guest G: **A framework for examining the sustained acceptability of microbicides.** *AIDS Behav* 2005, **9**:121-131.
16. D'Cruz OJ, Uckun FM: **Clinical development of microbicides for the prevention of HIV infection.** *Curr Pharm Des* 2004, **10**:315-336.
17. Weeks MR, Mosack KE, Abbott M, Sylla LN, Valdes B, Prince M: **Microbicide acceptability among high-risk urban U.S. women: experiences and perceptions of sexually transmitted HIV prevention.** *Sex Transm Dis* 2004, **31**:682-690.
18. Greenhead P, Hayes P, Watts PS, Laing KG, Griffin GE, Shattock RJ: **Parameters of human immunodeficiency virus infection of human cervical tissue and inhibition by vaginal virucides.** *J Virol* 2000, **74**:5577-5586.
19. Sadeghi-Nejad H, Wasserman M, Weidner W, Richardson D, Goldmeier D: **Sexually transmitted diseases and sexual function.** *J Sex Med* 2010, **7**:389-413.
20. McClelland RS, Wang CC, Mandalia K, Overbaugh J, Reiner MT, Panteleeff DD, Lavreys L, Ndinya-Achola J, Bwayo JJ, Kreiss JK: **Treatment of cervicitis is associated with decreased cervical shedding of HIV-1.** *AIDS* 2001, **15**:105-110.
21. Coleman JS, Hitti J, Bukusi EA, Mwachari C, Muliro A, Nguti R, Gausman R, Jensen S, Patton D, Lockhart D, Coombs R, Cohen CR: **Infectious correlates of HIV-1 shedding in the female upper and lower genital tracts.** *AIDS* 2007, **21**:755-759.
22. Weiler AM, Li Q, Duan L, Kaizu M, Weisgrau KL, Friedrich TC, Reynolds MR, Haase AT, Rakasz EG: **Genital ulcers facilitate rapid viral entry and dissemination following intravaginal inoculation with cell-associated simian immunodeficiency virus SIVmac239.** *J Virol* 2008, **82**:4154-4158.
23. Collins KB, Patterson BK, Naus GJ, Landers DV, Gupta P: **Development of an in vitro organ culture model to study transmission of HIV-1 in the female genital tract.** *Nat Med* 2000, **6**:475-479.
24. Zussman A, Lara L, Lara HH, Bentwich Z, Borkow G: **Blocking of cell-free and cell-associated HIV-1 transmission through human cervix organ culture with UC781.** *AIDS* 2003, **17**:653-661.
25. Alidaee MR, Taheri A, Mansoori P, Ghodsi SZ: **Silver nitrate cautery in aphthous stomatitis: a randomized controlled trial.** *Br J Dermatol* 2005, **153**:521-525.
26. Tanweer F, Hanif J: **Re: Silver nitrate cauterisation, does concentration matter?** *Clin Otolaryngol* 2008, **33**:503-504.
27. Link TR, Conley SF, Flanary V, Kerschner JE: **Bilateral epistaxis in children: efficacy of bilateral septal cauterization with silver nitrate.** *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2006, **70**:1439-1442.
28. Lowe DG, Levison DA, Crocker PR, Shepherd JH: **Silver deposition in the cervix after application of silver nitrate as a cauterising agent.** *J Clin Pathol* 1988, **41**:871-874.
29. Hoyme UB: **Clinical Significance of Crede's Prophylaxis in Germany at Present.** *Infect Dis Obstet Gynecol* 1993, **1**:32-36.
30. Lok CN, Ho CM, Chen R, He QY, Yu WY, Sun H, Tam PK, Chiu JF: **Che CM: Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities.** *J Biol Inorg Chem* 2007, **12**:527-534.
31. Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim JH, Park SJ, Lee HJ, Kim SH, Park YK, Park YH, Hwang CY, Kim YK, Lee YS, Jeong DH, Cho MH: **Antimicrobial effects of silver nanoparticles.** *Nanomedicine* 2007, **3**:95-101.
32. Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Tapia J, Yacaman MJ: **The bactericidal effect of silver nanoparticles.** *Nanotechnology* 2005, **16**:2346-2353.
33. Shahverdi AR, Fakhimi A, Shahverdi HR, Minaian S: **Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against Staphylococcus aureus and Escherichia coli.** *Nanomedicine* 2007, **3**:168-171.
34. Sondi I, Salopek-Sondi B: **Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria.** *J Colloid Interface Sci* 2004, **275**:177-182.
35. Lara HH, Ayala-Nuñez NV, Ixtepan-Turrent L, Rodriguez-Padilla C: **Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria.** *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2009.
36. Lara HH, Ayala-Nuñez NV, Ixtepan-Turrent L, Rodriguez-Padilla C: **Mode of antiviral action of silver nanoparticles against HIV-1.** *J Nanobiotechnology* 2010.
37. Tian J, Wong KK, Ho CM, Lok CN, Yu WY, Che CM, Chiu JF, Tam PK: **Topical delivery of silver nanoparticles promotes wound healing.** *ChemMedChem* 2007, **2**:129-136.
38. Dunn K, Edwards-Jones V: **The role of Acticoat with nanocrystalline silver in the management of burns.** *Burns* 2004, **30**(Suppl 1):S1-S9.
39. Neurath AR, Strick N, Li YY, Debnath AK: **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* 2001, **1**:17.
40. Elechiguerra JL, Burt JL, Morones JR, Camacho-Bragado A, Gao X, Lara HH, Yacaman MJ: **Interaction of silver nanoparticles with HIV-1.** *J Nanobiotechnology* 2005, **3**:6.
41. Ayala-Nuñez NV, Lara HH, Ixtepan-Turrent L, Rodriguez-Padilla C: **Silver Nanoparticles Toxicity and Bactericidal Effect Against Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus: Nanoscale Does Matter.** *J Nanobiotechnology* 2009.
42. Borkow G, Lara HH, Covington CY, Nyamathi A, Gabbay J: **Deactivation of human immunodeficiency virus type 1 in medium by copper oxide-containing filters.** *Antimicrob Agents Chemother* 2008, **52**:518-525.
43. Cummins JE Jr, Guarner J, Flowers L, Guenther PC, Bartlett J, Morken T, Grohskopf LA, Paxton L, Dezzutti CS: **Preclinical testing of candidate topical microbicides for anti-human immunodeficiency virus type 1 activity and tissue toxicity in a human cervical explant culture.** *Antimicrob Agents Chemother* 2007, **51**:1770-1779.
44. Terrazas-Aranda K, Van HY, Hazuda D, Lewi P, Costi R, Di SR, Cara A, Vanham G: **Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) integration: a potential target for microbicides to prevent cell-free or cell-associated HIV-1 infection.** *Antimicrob Agents Chemother* 2008, **52**:2544-2554.
45. Klasse PJ, Shattock R, Moore JP: **Antiretroviral drug-based microbicides to prevent HIV-1 sexual transmission.** *Annu Rev Med* 2008, **59**:455-471.

46. Sexton A, Harman S, Shattock RJ, Ma JK: **Design, expression, and characterization of a multivalent, combination HIV microbicide.** *FASEB J* 2009, **23**:3590-3600.
47. Cutler B, Justman J: **Vaginal microbicides and the prevention of HIV transmission.** *Lancet Infect Dis* 2008, **8**:685-697.
48. Bhol KC, Schechter PJ: **Topical nanocrystalline silver cream suppresses inflammatory cytokines and induces apoptosis of inflammatory cells in a murine model of allergic contact dermatitis.** *Br J Dermatol* 2005, **152**:1235-1242.
49. Sibbald RG, Contreras-Ruiz J, Coutts P, Fierheller M, Rothman A, Woo K: **Bacteriology, inflammation, and healing a study of nanocrystalline silver dressings in chronic venous leg ulcers.** *Adv Skin Wound Care* 2007, **20**:549-558.
50. Arora S, Jain J, Rajwade JM, Paknikar KM: **Cellular responses induced by silver nanoparticles: In vitro studies.** *Toxicol Lett* 2008, **179**:93-100.
51. Larese FF, D'Agostin F, Crosera M, Adami G, Renzi N, Bovenzi M, Maina G: **Human skin penetration of silver nanoparticles through intact and damaged skin.** *Toxicology* 2009, **255**:33-37.
52. Larese FF, D'Agostin F, Crosera M, Adami G, Renzi N, Bovenzi M, Maina G: **Human skin penetration of silver nanoparticles through intact and damaged skin.** *Toxicology* 2009, **255**:33-37.
53. Zhang LW, Monteiro-Riviere NA: **Assessment of quantum dot penetration into intact, tape-stripped, abraded and flexed rat skin.** *Skin Pharmacol Physiol* 2008, **21**:166-180.
54. Tian J, Wong KK, Ho CM, Lok CN, Yu WY, Che CM, Chiu JF, Tam PK: **Topical delivery of silver nanoparticles promotes wound healing.** *ChemMedChem* 2007, **2**:129-136.
55. Shattock RJ, Griffin GE, Gorodeski GI: **In vitro models of mucosal HIV transmission.** *Nat Med* 2000, **6**:607-608.
56. Gupta P, Collins K, Patterson B, Naus G, Landers D: **Reply to 'In vitro models of mucosal HIV transmission'.** *Nat Med* 2000, **6**:607-608.
57. Greenhead P, Hayes P, Watts PS, Laing KG, Griffin GE, Shattock RJ: **Parameters of human immunodeficiency virus infection of human cervical tissue and inhibition by vaginal virucides.** *J Virol* 2000, **74**:5577-5586.
58. Greulich C, Kittler S, Epple M, Muhr G, Koller M: **Studies on the biocompatibility and the interaction of silver nanoparticles with human mesenchymal stem cells (hMSCs).** *Langenbecks Arch Surg* 2009, **394**:495-502.
59. Gougeon ML, Lecoeur H, Duloust A, Enouf MG, Crouvoiser M, Goujard C, Debord T, Montagnier L: **Programmed cell death in peripheral lymphocytes from HIV-infected persons: increased susceptibility to apoptosis of CD4 and CD8 T cells correlates with lymphocyte activation and with disease progression.** *J Immunol* 1996, **156**:3509-3520.
60. Poon VK, Burd A: **In vitro cytotoxicity of silver: implication for clinical wound care.** *Burns* 2004, **30**:140-147.
61. Wright JB, Lam K, Buret AG, Olson ME, Burrell RE: **Early healing events in a porcine model of contaminated wounds: effects of nanocrystalline silver on matrix metalloproteinases, cell apoptosis, and healing.** *Wound Repair Regen* 2002, **10**:141-151.
62. Benkop-Schnurch A, Hornof M: **Intravaginal drug delivery systems: Design, Challenges and Solutions.** *Adv Drug Deliv Rev* 2003, **4**:241-254.
63. Mauck C, Rosenberg Z, Van DL: **Recommendations for the clinical development of topical microbicides: an update.** *AIDS* 2001, **15**:857-868.
64. Lynch G, Low L, Li S, Sloane A, Adams S, Parish C, Kemp B, Cunningham AL: **Sulfated polyanions prevent HIV infection of lymphocytes by disruption of the CD4-gp120 interaction, but do not inhibit monocyte infection.** *J Leukoc Biol* 1994, **56**:266-272.
65. Harrison PF, Rosenberg Z, Bowcut J: **Topical microbicides for disease prevention: status and challenges.** *Clin Infect Dis* 2003, **36**:1290-1294.
66. Dezzutti CS, James VN, Ramos A, Sullivan ST, Siddig A, Bush TJ, Grohskopf LA, Paxton L, Subbarao S, Hart CE: **In vitro comparison of topical microbicides for prevention of human immunodeficiency virus type 1 transmission.** *Antimicrob Agents Chemother* 2004, **48**:3834-3844.
67. Moulard M, Lortat-Jacob H, Mondor I, Roca G, Wyatt R, Sodroski J, Zhao L, Olson W, Kwong PD, Sattentau QJ: **Selective interactions of polyanions with basic surfaces on human immunodeficiency virus type 1 gp120.** *J Virol* 2000, **74**:1948-1960.
68. Moscicki AB: **Vaginal microbicides: where are we and where are we going?** *J Infect Chemother* 2008, **14**:337-341.
69. Elechiguerra JL, Burt JL, Morones JR, Camacho-Bragado A, Gao X, Lara HH, Yacaman MJ: **Interaction of silver nanoparticles with HIV-1.** *J Nanobiotechnology* 2005, **3**:6.
70. Rohan LC, Sassi AB: **Vaginal drug delivery systems for HIV prevention.** *AAPS J* 2009, **11**:78-87.
71. Elechiguerra JL, Burt JL, Morones JR, Camacho-Bragado A, Gao X, Lara HH, Yacaman MJ: **Interaction of silver nanoparticles with HIV-1.** *J Nanobiotechnology* 2005, **3**:6.
72. Ndesendo VM, Pillay V, Choonara YE, Buchmann E, Bayever DN, Meyer LC: **A review of current intravaginal drug delivery approaches employed for the prophylaxis of HIV/AIDS and prevention of sexually transmitted infections.** *AAPS PharmSciTech* 2008, **9**:505-520.
73. Bhol KC, Schechter PJ: **Topical nanocrystalline silver cream suppresses inflammatory cytokines and induces apoptosis of inflammatory cells in a murine model of allergic contact dermatitis.** *Br J Dermatol* 2005, **152**:1235-1242.
74. Balzarini J, Brouwer WG, Dao DC, Osika EM, De CE: **Identification of novel thiocarboxanilide derivatives that suppress a variety of drug-resistant mutant human immunodeficiency virus type 1 strains at a potency similar to that for wild-type virus.** *Antimicrob Agents Chemother* 1996, **40**:1454-1466.
75. Borkow G, Vijayabaskar V, Lara HH, Kalinkovich A, Lapidot A: **Structure-activity relationship of neomycin, paromomycin, and neamine-arginine conjugates, targeting HIV-1 gp120-CXCR4 binding step.** *Antiviral Res* 2003, **60**:181-192.
76. Borkow G, Lara HH, Lapidot A: **Mutations in gp41 and gp120 of HIV-1 isolates resistant to hexa-arginine neomycin B conjugate.** *Biochem Biophys Res Commun* 2003, **312**:1047-1052.
77. Montefiori DC, Robinson WE Jr, Schuffman SS, Mitchell WM: **Evaluation of antiviral drugs and neutralizing antibodies to human immunodeficiency virus by a rapid and sensitive microtiter infection assay.** *J Clin Microbiol* 1988, **26**:231-235.

doi: 10.1186/1477-3155-8-15

Cite this article as: Lara et al., PVP-coated silver nanoparticles block the transmission of cell-free and cell-associated HIV-1 in human cervical culture *Journal of Nanobiotechnology* 2010, **8**:15

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

