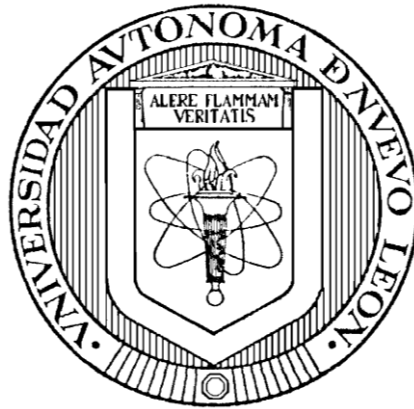


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**NANOPARTÍCULAS DE PLATA COMO MICROBICIDAS:
ACTIVIDAD Y MECANISMOS DE ACCIÓN CONTRA LA
INFECCIÓN POR EL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA
(VIH) Y DIFERENTES BACTERIAS RESISTENTES A
ANTIBIÓTICOS**

Por

NILDA VANESA AYALA NÚÑEZ

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

Febrero, 2010

NANOPARTÍCULAS DE PLATA COMO MICROBICIDAS:
ACTIVIDAD Y MECANISMOS DE ACCIÓN CONTRA LA
INFECCIÓN POR EL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA
(VIH) Y DIFERENTES BACTERIAS RESISTENTES A
ANTIBIÓTICOS

Comité de tesis

DRA. CRISTINA RODRÍGUEZ PADILLA
Director

DR. REYES TAMEZ GUERRA
Secretario

DRA. LICET VILLARREAL TREVIÑO
Vocal

DRA. DIANA RESÉNDEZ PÉREZ
Vocal

DRA. LYDIA RIVERA MORALES
Vocal

NANOPARTÍCULAS DE PLATA COMO MICROBICIDAS:
ACTIVIDAD Y MECANISMOS DE ACCIÓN CONTRA LA
INFECCIÓN POR EL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA
(VIH) Y DIFERENTES BACTERIAS RESISTENTES A
ANTIBIÓTICOS

Comité académico de Doctorado

Subdirector de estudios de postgrado

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Humberto H. Lara Villegas, Asesor de mi tesis.
Sin su apoyo y guía la presente tesis nunca se hubiera llevado a cabo.

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

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

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

DEDICATORIA

A los microorganismos del mundo, sin los cuales no estaríamos aquí.

A mis amadas células y bacterias que dieron su vida por este proyecto.

A los árboles que murieron por estas hojas.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
1. RESUMEN Y ABSTRACT.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	3
3. HIPÓTESIS.....	6
4. OBJETIVOS	
4.1. Objetivo general.....	7
4.2. Objetivos particulares.....	7
5. ANTECEDENTES	
5.1. Nanotecnología y nanomateriales.....	9
5.1.1. La plata: metal noble con actividad antimicrobiana.....	10
5.1.2. Nanopartículas de plata: actividad antimicrobiana.....	11
5.2. Microorganismos drogo resistentes.....	15
5.3. El VIH/SIDA.....	17
5.3.1. El virus de inmunodeficiencia humana (VIH).....	18
5.3.1.1. Estructura.....	18
5.3.1.2. Ciclo de replicación del VIH.....	21
5.3.1.3. La entrada del virus a la célula.....	24
5.3.1.3.1. La proteína gp120.....	26
5.3.2. Patogénesis e infección por VIH-1.....	28
5.3.3. La epidemia del VIH/SIDA.....	29
5.3.4. El SIDA en México.....	29
5.3.5. Transmisión.....	32
5.3.6. Población en riesgo.....	34
5.3.7. Tratamiento antirretroviral.....	35
5.3.7.1. Inhibidores de entrada o fusión.....	36
5.4. Bacterias resistentes a antibióticos.....	38
5.4.1. Resistencia bacteriana.....	38
5.4.2. Mecanismos de resistencia a antibióticos.....	40
5.4.3. Bacterias resistentes a antibióticos: ejemplos de importancia clínica.....	41

5.4.3.1.	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina (MRSA).....	41
5.4.3.2.	<i>Streptococcus pyogenes</i> resistente a Eritromicina.....	42
5.4.3.3.	<i>Escherichia coli</i> entero-hemorrágica O157:H7 resistente a Ampicilina.....	44
5.4.3.4.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> multirresistente.....	45
6.	MÉTODOS.....	
6.1.	Origen de los reactivos.....	47
6.2.	Material biológico.....	47
6.3.	Determinación de la citotoxicidad <i>in vitro</i>	49
6.4.	Determinación de la inhibición de la infección por VIH-1.....	50
6.5.	Prueba basada en la fusión celular.....	51
6.6.	Prueba del tiempo de adición.....	52
6.7.	ELISA HIV-1 gp120/CD4.....	53
6.8.	Determinación de la actividad antiviral directa sobre el virus.....	54
6.9.	Concentración inhibitoria mínima y concentración bactericida mínima.....	54
6.10.	Curvas de muerte bacteriana.....	55
6.11.	Desarrollo de bacterias resistentes a nanopartículas de plata.....	56
6.12.	Análisis estadístico.....	56
7.	RESULTADOS.....	
7.1.	Citotoxicidad de las nanopartículas de plata.....	57
7.2.	Actividad antiviral de las nanopartículas de plata.....	58
7.3.	Prueba basada en la fusión celular.....	60
7.4.	Prueba del tiempo de adición.....	62
7.5.	ELISA HIV-1 gp120/CD4.....	64
7.6.	Determinación de la actividad antiviral directa sobre el virus.....	65
7.7.	Actividad bactericida de las nanopartículas de plata.....	66
7.8.	Efecto de las nanopartículas de plata en el crecimiento bacteriano.....	70
7.9.	Desarrollo de bacterias resistentes a nanopartículas de plata.....	75
8.	DISCUSIÓN.....	77

9. CONCLUSIONES.....	84
10. LITERATURA CITADA.....	86

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I.	Porcentaje de casos acumulados de SIDA por categoría de transmisión totales para México al 15 de noviembre de 2007.....	32
II.	Efecto antiviral de las nanopartículas de plata contra diferentes cepas de VIH-1...	59
III.	Concentración inhibitoria mínima (CIM) y concentración bactericida mínima (CBM) de nanopartículas de plata para ocho cepas bacterianas.....	68
IV.	Concentración inhibitoria mínima (CIM) y concentración bactericida mínima (CBM) promedio de nanopartículas de plata para ocho cepas bacterianas.....	70
V.	Perfil de resistencias de cepa resistente a nanopartículas de plata (NPP ^R) y cepa sensible a nanopartículas de plata (NPP ^S)	76

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Micrografía de VIH-1 (a) expuesto a nanopartículas de plata y (b) control.....	14
2. Estructura del VIH-1.....	19
3. Genoma del VIH-1.....	20
4. Ciclo de replicación del VIH-1.....	23
5. Proceso de fusión del VIH-1 a su célula huésped	25
6. Estructura del <i>core</i> o centro de la gp120.....	27
7. Historia natural de la infección por VIH-1.....	29
8. Mecanismo de inhibición de los diferentes tipos de inhibidores de entrada o fusión.....	38
9. Citotoxicidad de nanopartículas de plata.....	58
10. Prueba basada en la fusión celular de células HL2/3 y HeLa-CD4-LTR- β -gal.....	61
11. Pruebas del tiempo de adición.....	63
12. ELISA gp120-CD4.....	65
13. Efecto de las nanopartículas de plata sobre el VIH-1.....	66
14. Curvas de muerte bacteriana y gráficas de inhibición del crecimiento de bacterias.....	75

NOMENCLATURA

Ag	Plata
AZT	Zidovudine
II	Inhibidor de integrasa
IP	Inhibidor de proteasa
IT	Índice terapéutico
LPS	Lipopolisacárido
mM	Mili molar
NNRTI	Inhibidores nucleósidos/nucleótidos de la transcriptasa reversa
NPP	Nanopartículas de plata
NPP ^R	Cepa resistente a nanopartículas de plata
NPP ^S	Cepa sensible a nanopartículas de plata
NRTI	Inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa reversa
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana

1. RESUMEN

Una infección causada por un microorganismo drogo resistente (ya sea virus o bacteria), generalmente resulta en un incremento significativo en la mortalidad, morbilidad y costos relacionados con lo prolongado de los tratamientos. Debido a ello, nuevas opciones para el tratamiento y prevención de la infección de estos microorganismos se deben seguir buscando. La actividad antibacteriana y antiviral de las nanopartículas de plata se ha establecido con anterioridad, sin embargo, para determinar si realmente pueden ser consideradas como una opción para tratar y/o prevenir infecciones causadas por microorganismos drogo resistentes, se debe investigar con mayor profundidad su actividad microbicida contra diferentes tipos de patógenos. Debido a ello, en este trabajo se seleccionó al VIH-1 y a diferentes bacterias resistentes a antibióticos (*S. aureus* resistente a meticilina, *S. pyogenes* resistente a eritromicina, *P. aeruginosa* multirresistente y *E. coli* O157:H7 resistente a ampicilina) como modelos para el estudio, tanto de la actividad microbicida como del mecanismo de acción, de las nanopartículas de plata. Mediante diferentes técnicas *in vitro*, definimos que las nanopartículas de plata inhiben una amplia gama de cepas de VIH-1 (M y T trópicas) y a bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas (resistentes y no resistentes a los antibióticos), por lo que pueden ser consideradas como agentes microbicidas de amplio espectro. Además, al estudiar el mecanismo de acción de las nanopartículas de plata en estos patógenos, se determinó que: (i) inhiben la fase inicial de fusión o entrada del VIH-1 al actuar a nivel de la gp120, (ii) inhiben fases posteriores del ciclo de replicación del VIH-1, e (iii) impiden el crecimiento bacteriano al poco tiempo de exposición al inhibir los procesos de síntesis de la pared bacteriana.

Abstract

An infection caused by a drug-resistant microorganism (virus or bacteria) results in a significant increase in mortality, morbidity, and cost related to prolonged treatments. For this reason, new options for the treatment and prevention of the infections of these microorganisms must be continuously searched. The antibacterial and the antiviral activity of silver nanoparticles has been established, but to determine whether they could be an option for treatment and prevention of drug-resistant microbial infections, further investigation is needed to explore its microbicidal action against different types of pathogens. Therefore, in this project the human immunodeficiency virus (HIV) and different drug-resistant bacteria (Methicilin-resistant *S. aureus*, Erythromycin-resistant *S. pyogenes*, multidrug-resistant *P. aeruginosa* y Ampicillin-resistant *E. coli* O157:H7) were used as models to study both therapeutic effect and mode of action of silver nanoparticles. Based on several *in vitro* approaches, the capacity of silver nanoparticles to inhibit infection of several HIV-1 strains (M- and T-tropic) and growth of Gram positive and Gram negative (drug-resistant and non-resistant) was defined, which makes them broad-spectrum microbicidal agents. Besides, by studying its mode of action against these pathogens, it was determined that silver nanoparticles: (i) inhibit fusion or entry of HIV-1 by blocking gp120, (ii) inhibit post-entry stages of the HIV-1 cycle, and (iii) impede bacterial growth by targeting the synthesis processes of the bacterial membrane.

2. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades causadas por patógenos virales y bacterianos han sido el principal foco de atención del sector salud en el mundo entero. La Organización Mundial de la Salud reporta que cerca de 50,000 personas mueren cada día por este tipo de enfermedades, siendo la principal causa de muerte prematura al provocar el 33% del total de defunciones anuales (Centers for Disease Control, 2004). Actualmente, unos de los patógenos más importantes en esta área son al virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y las bacterias resistentes a antibióticos. Estos patógenos se caracterizan por ser difíciles o imposibles de eliminar, y difíciles de controlar al momento del contagio.

El Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) es considerado como uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial. El Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH, su agente etiológico), es un retrovirus que infecta las células del sistema inmune humano, causando un estado de inmunodepresión al reducir la cantidad de linfocitos T CD4⁺ en sangre. Desde que fue descubierto en 1983, el VIH ha logrado establecerse en la población humana mundial y, hasta el momento no se ha podido detener su transmisión.

Con el paso de los años se observó la necesidad del uso de terapias antirretrovirales combinadas para lograr un mejor efecto para el paciente, como lo es la disminución de la carga viral, aumento en el conteo de células CD4⁺ y extensión del tiempo de desarrollo de SIDA para los seropositivos. Sin embargo, las cepas resistentes

han obligado a la renovación constante del cuadro de antirretrovirales utilizados, elevando el costo por paciente. Por ende, se vuelve necesario el desarrollo de nuevos fármacos que tengan como blanco diferentes puntos en el ciclo de infección viral para complementar las terapias antirretrovirales combinadas.

El descubrimiento de los antibióticos en 1940 constituyó unos de los acontecimientos más importantes en la historia de la medicina, su uso ha permitido el tratamiento de las enfermedades infecciosas desde aquel tiempo hasta nuestros días. Sin embargo a lo largo de los años muchos factores principalmente la capacidad de adaptación de las bacterias y el uso indiscriminado o incompleto de los agentes antimicrobianos han conducido al desarrollo de resistencia y al surgimiento de enfermedades infecciosas producidas por microorganismos que ya no responden a las terapias con antibióticos comunes. Este hecho constituye un problema de salud pública de distribución mundial el cual además tiene implicaciones importantes desde el punto de vista económico y social.

Impulsados por la necesidad de estudiar nuevos compuestos para combatir la pandemia del SIDA y la diseminación de bacterias resistentes a antibióticos, se decidió evaluar diferentes nanomateriales para determinar su posible aplicación en esta área.

Los nanomateriales son compuestos que se encuentran a 100 nm en cualquiera de sus dimensiones. Dentro de la amplia gama de nanomateriales existentes se encuentran las nanopartículas de plata (NPP), compuestos cuya forma y tamaño han permitido su aplicación en diferentes ramas de las Ciencias Biológicas.

En 2005, un grupo de investigación cuyos miembros forman parte de la Universidad de Texas (UT) y de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), publicó un artículo en el cual se postulaba la actividad antirretroviral de nanopartículas metálicas de plata sobre VIH-1 (Elechiguerra *et al.*, 2005). Dados los resultados obtenidos por dicho grupo de investigadores, en particular lo obtenido por miembros del Laboratorio de Bioseguridad Nivel 3 de la Universidad Autónoma de Nuevo León, se propuso la idea de definir el mecanismo de inhibición a través del cual estas NPP actúan sobre el VIH y sobre diferentes bacterias resistentes a antibióticos.

3. HIPÓTESIS

Las nanopartículas de plata son agentes microbicidas de amplio espectro que inhiben la infección por VIH-1 al bloquear la entrada a la célula, e impiden el crecimiento bacteriano al interactuar con proteínas de membrana en bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar el mecanismo de acción de nanopartículas de plata sobre el VIH-1 y bacterias resistentes a antibióticos.

4.2 Objetivos particulares

1. Determinar la citotoxicidad de las nanopartículas de plata *in vitro* (CC₅₀) en células HeLa.
2. Determinar el grado de inhibición de la infectividad *in vitro* (IC₅₀) de las nanopartículas de plata en diferentes cepas de VIH-1.
3. Determinar el Índice Terapéutico del efecto de las nanopartículas sobre el VIH-1.
4. Determinar si las nanopartículas de plata inhiben la fusión al actuar sobre los correceptores CXCR4 y/o CCR5.

5. Determinar si las nanopartículas de plata actúan a nivel de la interacción gp120-CD4.
6. Definir si las nanopartículas de plata actúan directamente sobre la partícula viral o solamente durante el ciclo de replicación.
7. Estudiar el efecto de las nanopartículas de plata sobre el crecimiento bacteriano.
8. Definir si son un compuesto bactericida.
9. Determinar la concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima bactericida de las nanopartículas de plata.
10. Desarrollar bacterias resistentes a nanopartículas de plata para usarlas como modelo para proponer un mecanismo de acción del modo en que las nanopartículas interfieren con el crecimiento bacteriano.

5. ANTECEDENTES

5.1 Nanotecnología y nanomateriales

Nanotecnología se refiere a la investigación y desarrollo de tecnología en la escala atómica y molecular que lleva a la manipulación controlada y el estudio de estructuras y dispositivos con una longitud en el rango de 1 a 100 nanómetros. Los objetos en esta escala, como las nanopartículas, presentan propiedades y funciones nuevas que difieren de aquellas observadas en una mayor escala. El tamaño pequeño, la solubilidad mejorada y la multifuncionalidad de las nanopartículas abren nuevas líneas de investigación para el área de Ciencias Biológicas (McNeil, 2005).

Debido al cambio de escala, los nanomateriales presentan nuevas funciones y propiedades, tal como modificaciones en su luminiscencia, su conductividad o su actividad catalítica. El aumento en la relación área-volumen de estas estructuras puede convertir un compuesto inerte en escala micro en un compuesto catalíticamente activo en escala nano. McNeil hace énfasis en que los dispositivos y componentes que se encuentran en la nanoescala son del mismo tamaño que las entidades biológicas, como proteínas (enzimas o receptores) y moléculas de ácidos nucleicos, por lo que podrían interactuar con biomoléculas en formas en las que no se modifiquen su comportamiento ni sus propiedades bioquímicas (McNeil, 2005).

El uso de nanopartículas presenta otra ventaja conferida por su tamaño, podrían ser capaces de entrar a las células, transitar a través de vasos sanguíneos, atravesar la barrera hematoencefálica y llegar a sitios donde los compuestos convencionales no logran llegar (McNeil, 2005). Esta particularidad debe ser manejada con cuidado debido a los posibles efectos tóxicos que conlleva. En general, el uso de nanomateriales se ha enfocado en el diagnóstico y tratamiento de cáncer, no tanto de enfermedades infecciosas (McNeil, 2005).

En lo particular, en esta tesis estamos interesados en las nanopartículas de plata, nanomateriales que han atraído la atención por sus propiedades antimicrobianas. A continuación se describen las propiedades de la plata y de las nanopartículas de plata que las convierten en una posible herramienta para tratar infecciones por diferentes tipos de microorganismos.

5.1.1 La plata: metal noble con actividad antimicrobiana

La plata ha sido utilizada por sus propiedades antimicrobianas por cientos de años. Originalmente, se usaban conductos construidos con este metal para preservar el agua y su aplicación como propuesta médica está documentada desde 750 D.C. El primer artículo científico que describe el uso de la plata como antibacteriano fue atribuido a Credé para la prevención de infecciones oculares en los neonatos en 1881 y como antiséptico en 1901. La eficacia del nitrato de plata contra *Pseudomonas aeruginosa* se vio como un importante beneficio debido a que estos microorganismos

eran considerados una causa primaria de muerte en pacientes con heridas por quemaduras extensas (Hoyme, 1993).

Los iones de plata han sido ampliamente conocidos por tener efectos inhibitorios, bactericidas y propiedades antimicrobianas de amplio espectro. Algunas sales de plata han demostrado ser efectivas contra quemaduras, osteomielitis crónica severa, infecciones del tracto urinario e infecciones por catéteres venoso centrales (Feng *et al.*, 2000).

El más importante compuesto de plata utilizado actualmente es la sulfadiazina de plata (AgSD), aunque la plata metálica y otras sales como el acetato de plata, el nitrato de plata (AgNO_3) y las proteínas de plata las cuales tienen propiedades antimicrobianas están enlistadas en *Martindale, The Extra Pharmacopoeia* (McDonnell, 2007). Actualmente, la plata forma parte del listado de medicamentos esenciales de la Organización Mundial de la Salud (World Health Organization, 2007).

Según Carr *et al.*, los iones de plata liberados por dichos fármacos interactúan con estructuras dentro (enzimas y ADN) y sobre la membrana del patógeno, inhibiendo su actividad (Carr *et al.*, 1973).

5.1.2 Nanopartículas de plata: actividad antimicrobiana

Las investigaciones dirigidas a la búsqueda de otras alternativas para el tratamiento de las infecciones causadas por bacterias y virus resistentes se incrementan cada día. Dentro de la gama de compuestos cuya actividad bactericida se está

investigando, las nanopartículas de plata surgen como un prometedor agente antibacteriano que podría ser utilizado para enfrentarnos a esta y otras bacterias resistentes a los antibióticos.

En diversos estudios se han observado las propiedades antimicrobianas de las nanopartículas de plata tanto en virus como en bacterias. Se ha determinado que las nanopartículas de plata tienen efecto en bacterias Gram negativas como *Escherichia coli*, *Vibrio cholera*, y *Pseudomonas aeruginosa* (Morones *et al.*, 2005; Sondi and Salopek-Sondi, 2004; Yoon *et al.*, 2008) y, Gram positivas como *Bacillus subtilis* (Yoon *et al.*, 2008), *Staphylococcus aureus* (Shrivastava *et al.*, 2007) y *Enterococcus faecalis* (Panacek *et al.*, 2006). Aunado a ello, nuestro grupo de investigación determinó la capacidad antiviral de nanopartículas de plata en el virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (Elechiguerra *et al.*, 2005).

A pesar de todos los hallazgos no se ha podido establecer hasta el momento el mecanismo de acción por el cual estos nanomateriales llevan a cabo su efecto antibacteriano. Sin embargo los resultados obtenidos gracias al empleo de la proteómica por Lok *et al.*, los cuales mostraron un claro efecto de las nanopartículas de plata sobre la expresión proteínicas de la membrana interna de *E. coli* sugiriendo que un posible sitio de acción de estos compuestos es la membrana celular (Lok *et al.*, 2006).

Las nanopartículas derivadas de este metal presentan nuevas funciones y propiedades, tal como modificaciones en su luminiscencia, su conductividad o su actividad catalítica. Sus novedosas aplicaciones incluyen gases antimicrobianas para las

quemaduras (Tredget *et al.*, 1998), filtros para el agua (Jain and Pradeep, 2005a), entre otros.

En 2005 en el *Journal of Nanotechnology* fue publicado un artículo titulado *Interaction of silver nanoparticles with HIV-1* en el cual se establece la actividad antiviral de nanopartículas metálicas. Este grupo de autores demostró que, sin ser citotóxicas, las nanopartículas de plata son capaces de inhibir la infección por VIH-1 a cultivos celulares *in vitro* actuando en la etapa de fusión del virus a la célula (Elechiguerra *et al.*, 2005). Como parte del grupo de investigación responsable de dicha publicación se encuentran miembros del Laboratorio de Bioseguridad Nivel 3 de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Elechiguerra *et al.* establecieron que las nanopartículas de plata inhibieron la infección por VIH-1 en cultivo celular a dosis que no resultaron tóxicas para las células utilizadas. Además, por microscopía electrónica de transmisión, determinaron que las nanopartículas se unen al exterior de la membrana viral en estructuras proteicas que se postula son los trímeros de gp120 (Elechiguerra *et al.*, 2005).

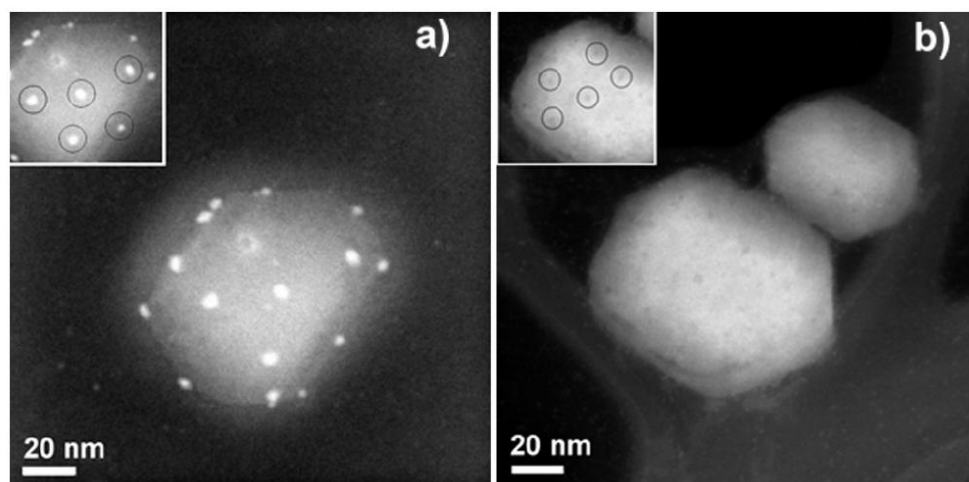


Figura 1. Micrografía de VIH-1 expuesto a nanopartículas de plata. Se observa una imagen obtenida por microscopía electrónica de transmisión de muestra (a) tratada con nanopartículas y una muestra (b) control (Elechiguerra *et al.*, 2005).

Como se observa en la Figura 1, las nanopartículas de plata están unidas al exterior del virus en una distribución que coincide con la de las espículas de gp120. Por lo tanto, se propuso que las nanopartículas de plata se unen a los trímeros de gp120 localizados en la membrana viral. Leonard *et al.* reportaron que la subunidad gp120 tiene nueve uniones disulfuro, tres de las cuales están localizadas en la vecindad del dominio de unión gp120-CD4 (Leonard *et al.*, 1990). Estas uniones disulfuro podrían ser los sitios más atractivos para que las nanopartículas interactúen con el virus. A pesar de esta propuesta, no se pudo aclarar de forma definitiva el mecanismo de acción de las nanopartículas de plata sobre la infección del VIH-1.

Dados estos resultados, consideramos necesario profundizar en la investigación del potencial antibacteriano de las nanopartículas de plata en microorganismos

peligrosos y de gran importancia para el ambiente hospitalario, como lo son las bacterias resistentes a antibióticos.

5.2 Microorganismos drogo resistentes

Las enfermedades causadas por patógenos virales y bacterianos han sido el principal foco de atención del sector salud en el mundo entero. La Organización Mundial de la Salud, en el reporte de salud mundial 1 sit a a la neumonía, el cólera, la disentería, la tuberculosis, la tifoidea, la hepatitis B y, el VIH/SIDA dentro de las primeras diez causas de muerte por enfermedades infecciosas en el mundo. Esta institución reporta que cerca de 50,000 personas mueren cada día por este tipo de enfermedades, siendo la principal causa de muerte prematura al provocar el 33% del total de defunciones anuales. Aunado a ello, millones de personas han desarrollado cáncer como resultado directo de infecciones bacterianas y virales que no pudieron prevenirse (Centers for Disease Control, 2004).

La resistencia a algún medicamento desarrollada por diferentes microorganismos es uno de los problemas más serios a nivel mundial. Una infección causada por un microorganismo drogo resistente resulta en el incremento significativo de la mortalidad, morbilidad (enfermedad prolongada, mayor riesgo de que los microorganismos resistentes se diseminen a otras personas) y, de los costos debido a tratamientos nuevos y más caros (World Health Organization, 2000). Tanto virus como bacterias pueden desarrollar resistencia al tratamiento. Dentro de este tipo de microorganismos cuya infección ha tenido un considerable impacto en el sector se encuentra el virus de

inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) y diferentes bacterias resistentes a antibióticos.

Las cepas de VIH-1 resistentes a antirretrovirales son uno de los principales para contener la diseminación de la pandemia. En los Estados Unidos, aproximadamente un 50% de pacientes que reciben tratamiento antirretroviral están infectados con virus que expresan al menos una resistencia a los fármacos disponibles (Clavel and Hance, 2004).

Asimismo, las bacterias resistentes a antibióticos han causado problemas serios en el sector salud. El *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), por ejemplo, es responsable de infecciones sencillas (lesiones de la piel) y muy severas (post-quirúrgicas y bacteremias) (Hardy *et al.*, 2004). Además, el MRSA es la principal causa de infecciones nosocomiales a nivel mundial. La *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente es un patógeno invasivo responsable de causar infecciones nosocomiales severas, incluyendo neumonía, infecciones del tracto urinario y bacteremias (Slama, 2008); también contribuye a la muerte del 90% de los pacientes con fibrosis quística (Junker and Clardy, 2007). *P. aeruginosa* fue la bacteria Gram negativa aislada con más frecuencia en unidades de cuidados intensivos en los Estados Unidos (Neuhauser *et al.*, 2003). *Streptococcus pyogenes* la bacteria come carne invade la piel y los tejidos blandos, es la causa más común de faringitis bacteriana y, causa fiebre escarlatina, impétigo, síndrome del shock tóxico estreptocócico y secuelas autoinmunes (Cunningham, 2008). *Escherichia coli* O157:H7 es un patógeno que se encuentra en los alimentos cuya infección puede producir dolor abdominal severo con un poco de fiebre, diarrea (en ocasiones con sangrado), el síndrome urémico hemolítico y, púrpura trombocitopénica (Su and Brandt, 1995).

5.3 El VIH/SIDA

En 1981, en los Estados Unidos se registraron varios casos de pacientes con inmunosupresión grave manifestada por la ocurrencia de neumonía por *Pneumocystis carinii*, situación que se consideró poco usual al presentarse en individuos jóvenes sin factores de riesgo conocidos. En ese mismo año, se reportaron varios casos de sarcoma de Kaposi también en un grupo de individuos jóvenes, lo cual fue considerado un indicador de la presencia de una situación clínica poco común (Ponce de León and Lazcano, 2008).

En 1982, el *Centers for Disease Control and Prevention* (Centro para el Control y Prevención de Enfermedades, CDC) de Estados Unidos bautizó a este conjunto de enfermedades causadas por patógenos oportunistas como síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (World Health Organization, 2009a).

En 1983, el grupo dirigido por Luc Montagnier en el Instituto Pasteur detectó en nódulos linfáticos de pacientes con linfadenopatía generalizada de origen desconocido, evidencias bioquímicas de transcriptasa reversa, lo cual los llevó al descubrimiento del llamado *Lymphadenopathy Associated Virus*. Poco después, el grupo de Robert Gallo llevó a cabo la descripción final del agente etiológico del SIDA, el virus actualmente conocido como virus de inmunodeficiencia humana (VIH) (Ponce de León and Lazcano, 2008).

5.3.1 El virus de inmunodeficiencia humana (VIH)

El VIH es un lentivirus perteneciente a la familia *Retroviridae* que infecta células CD4⁺ como linfocitos T, macrófagos, células dendríticas, entre otras. Hasta el momento se conocen dos tipos, el VIH-1 y el VIH-2, siendo el tipo 1 el más común y el más agresivo. El VIH-1 contiene tres grupos: M (mayor), O (*outlier*) y N (no M ni O). El grupo M incluye el 95% de las cepas aisladas a nivel mundial, las cuales pueden subagruparse en ocho clados (A, B, C, D, F, G, H y J) de acuerdo a la secuencia del genoma completo (Freed and Martin, 2001).

5.3.1.1 Estructura

El VIH es un virus envuelto y presenta dentro de su cápside dos moléculas de RNA (+) de 9.3 Kb que son introducidas a la célula huésped junto con enzimas como la transcriptasa inversa y la integrasa (Velasco and Lazcano, 2008). Las partículas virales del VIH son de 100 a 120 nm de diámetro, con morfología heterogénea y una cápside de forma cónica. Como se muestra en la Figura 2, el virión contiene varias capas protéicas formadas por las proteínas p24, p6 y p17, que se encuentran dentro de la bicapa lipídica que toma de la célula huésped (Schwartz and Nair, 1999). Además de las proteínas de superficie gp120 y gp41, el virión presenta moléculas de HLA clase I y clase II.

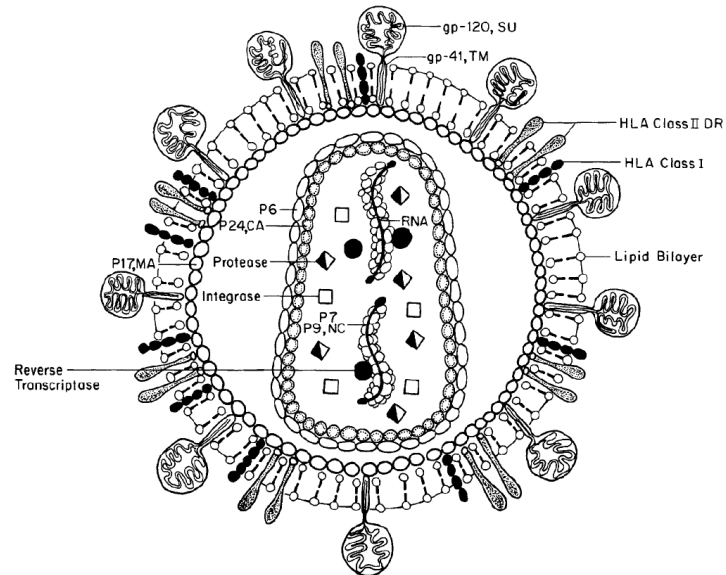


Figura 2. Estructura del VIH-1. El virión maduro mide aproximadamente 100 nm. El virión contiene dos copias no complementarias de hebras de RNA localizadas dentro de una cápside protéica de estructura cónica compuesta de la proteína p24. La cápside está rodeada por la proteína p6, la cual regula la liberación de virus de la célula. Esta, su vez, está rodeada por una matriz de proteínas p17 y una bicapa lipídica de fosfolípidos. Las enzimas transcriptasa inversa, integrasa y proteasa se encuentran dentro de la cápside. Las glicoproteínas de superficie (SU) y transmembranales (TM), gp120 y gp41 respectivamente, forman un complejo no covalente (Schwartz and Nair, 1999).

Como se muestra en la Figura 3, el genoma viral está conformado por once marcos de lectura abierta (ORFs) que codifican tres proteínas estructurales (gag, pol y, env) y ocho accesorias (vif, vpr, rev, tat, vpu, nef, tat y, rev). Gag, pol y env son poliproteínas que posteriormente son clivadas por la proteasa para dar lugar a péptidos que conformarán la matriz, la cápside y otras estructuras virales.

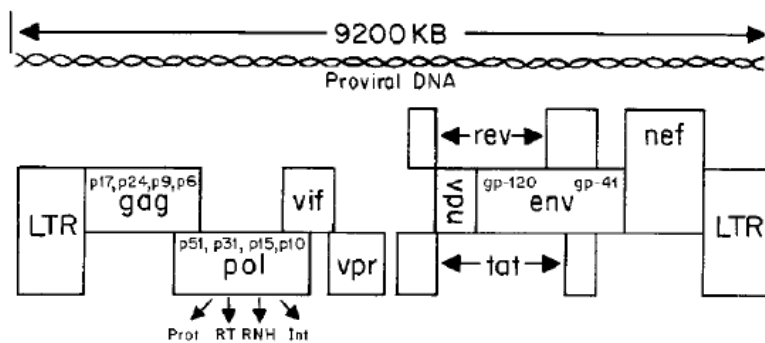


Figura 3. Genoma del VIH-1. En el estado proviral, el DNA viral se encuentra rodeado en ambos extremos por secuencias LTR (*long terminal repeat*). La unión de varias proteínas regulatorias a los LTR puede regular la transcripción del virus (Schwartz and Nair, 1999).

El VIH comparte los tres genes característicos que codifican para las proteínas estructurales y enzimas en todos los retrovirus: gag (gen antígeno grupo específico), que codifica para las proteínas de la cápside y nucleocápside virales, pol (polimerasa) que codifica para las enzimas virales, y env (envoltura) que codifica para las glicoproteínas de la envoltura viral (Ávila and Reyes, 2008).

El gen *gag* (antígeno específico del grupo) codifica para las proteínas estructurales del núcleo o cápside, mientras que el gen *env* (envoltura) codifica para una glicoproteína de 160 kDa (gp160) precursora de gp120 y gp41. El gen *pol* (polimerasa) codifica para varias enzimas, incluyendo la transcriptasa inversa, las cuales están involucradas en la replicación e integración viral. Las proteínas accesorias regulan prácticamente todos los pasos de la replicación viral. El producto del gen *tat* es un

regulador positivo de la transcripción, mientras que el producto del gen *rev* es un regulador de la expresión de genes estructurales. El gen *vif* codifica para proteínas de infectividad, permitiendo el transporte del virus al núcleo celular y la estabilización de los intermediarios de DNA. El gen *vpr* codifica para la proteína viral R, un regulador positivo de la transcripción viral temprana. La proteína U, codificada por el gen *vpu*, regula de forma negativa al receptor CD4 y promueve la liberación de viriones de las células infectadas. Uno de los primeros genes reguladores en ser identificados, *nef*, inicialmente se pensaba que regulaba de forma negativa la replicación del virus, por lo que se le consideraba un factor negativo. Recientemente, se demostró que *nef* regula de forma negativa los receptores CD4, aumentando la replicación viral *in vitro* e *in vivo*, y promueve la infectividad del virus libre de célula.

La proteasa (p10) actúa cortando las piezas de las proteínas Gag, Pol y de la Gag-Pol. La transcriptasa inversa (p50) sintetiza el ADN de doble cadena del provirus usando como patrón la cadena singular del ARN viral. Es una ADN-polimerasa que puede actuar como dependiente del ADN tanto como del ARN. La ARNasa (p15), que como se ha dicho separa las cadenas de ARN de las de la ADN durante la transcripción inversa. La integrasa (p31) realiza la inserción del ADN proviral en el genoma de la célula huésped (Turner and Summers, 1999).

5.3.1.2 Ciclo de replicación del VIH

El ciclo del VIH se lleva a cabo dentro de la célula huésped (linfocitos, células dendríticas, macrófagos, entre otras). En general, el ciclo de replicación incluye las siguientes etapas:

1. Interacción gp120-CD2 y correceptores.
2. Fusión
3. Pérdida de envoltura del genoma viral
4. Transcripción inversa (RT)
5. Formación del complejo de pre-integración (PIC)
6. Entrada al núcleo del PIC
7. Integración del DNA proviral al genoma de la célula huésped
8. Transcripción de mRNAs tempranos
9. Traducción de proteínas de regulación Tat y Rev
10. Entrada de Tat y Rev al núcleo. La proteína Tat incrementa la transcripción de los mRNAs virales
11. Rev media la exportación de mRNAs virales que han pasado o no por *splicing*.
12. Traducción de proteínas estructurales
13. Ensamble en la membrana plasmática del genoma viral, proteínas y factores celulares incluyendo tRNA (Lys3), el *primer* obligado para la transcripción inversa.
14. Gemación
15. Maduración de la partícula viral

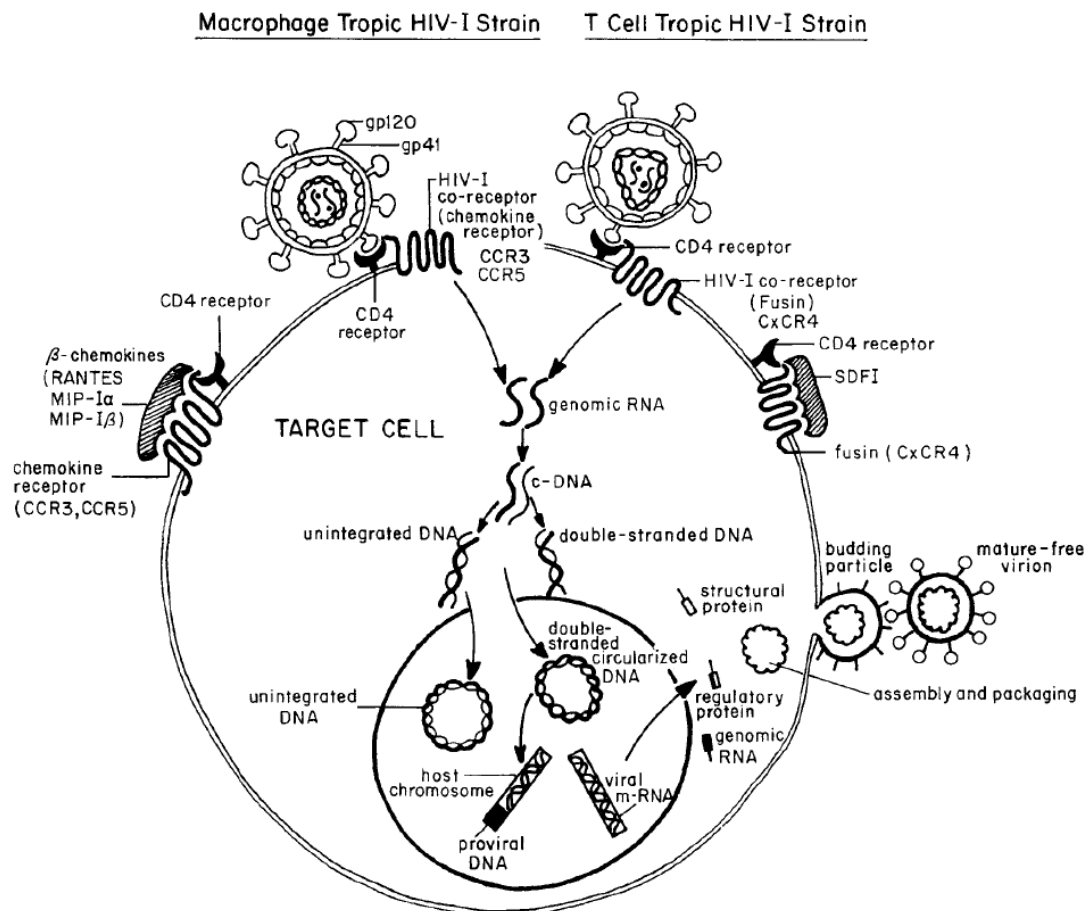


Figura 4. Ciclo de replicación del VIH-1. La fusión y entrada del VIH-1 a la célula huésped es facilitada por el receptor CD4 y correceptores. El correceptor para las cepas T-trópicas es CXCR4, un receptor de quimiocinas llamado fusina. Las cepas M-trópicas utilizan el receptor de quimiocinas CCR5 o CCR3 como correceptor. Los ligandos naturales para los virus T y M trópicos son SDF-1 y las quimiocinas-b, respectivamente. Después de que el VIH-1 entra a la célula, el RNA genómico es transcrito a una doble cadena de DNA. El DNA es circularizado e integrado en el genoma del huésped en forma de un provirus latente. Cuando las células son activadas, la transcripción ocurre seguida por la síntesis de proteínas virales. Después del ensamble intracelular, los

viriones maduros salen de la célula por gemación en la membrana, causando lisis de la célula infectada (Schwartz and Nair, 1999).

5.3.1.3 La entrada del virus a la célula

La envoltura viral presenta aproximadamente 72 espículas, cada cual está formada por una pieza de la proteína gp41, integral en la membrana, y una cabeza externa formada por la proteína gp120, esencial para el acoplamiento con el exterior de ciertas células previo a su invasión. Entre los dos componentes de las espículas existe una unión no covalente. Tanto la gp120 como la gp41 participan en el proceso de fusión de membranas del virus con la célula huésped.

El proceso empieza con las interacciones entre el complejo trimérico de envoltura (Figura 5A) un cluster de proteínas en la membrana externa del VIH, algunas veces referido como espícula gp160 y los receptores CD4 y los de quimiocinas (CCR5 o CXCR4) en la superficie celular. Este complejo está conformado por glicoproteínas transmembranales (gp41), las cuales anclan al cluster con el virus, y tres glicoproteínas extracelulares (gp120), las cuales contienen los dominios de unión a los receptores celulares.

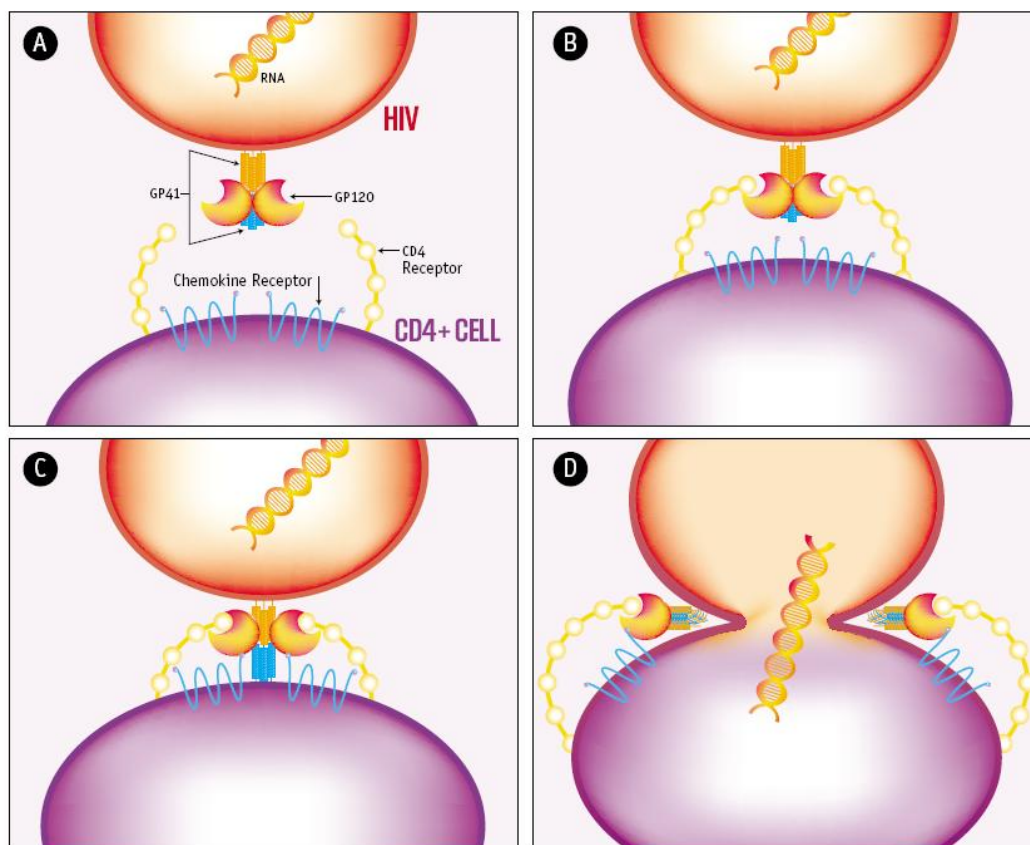


Figura 5. Proceso de fusión del VIH-1 a su célula huésped. (A) Interacción de trímero de envoltura viral con receptores celulares. (B) Interacción gp120 con CD4. (C) Cambio conformacional de gp120 para interacción con correceptores. (D) Participación de gp41 (Eron and Hogan, 2002).

El primer paso en la fusión (Figura 5B) involucra la unión de alta afinidad de los dominios de unión a CD4 de la gp120 a los dominios en la parte amino-terminal en CD4. Los inhibidores de unión actúan en esta parte.

Una vez que gp120 se unió con la proteína CD4 (Figura 5C), el complejo de envoltura sufre un cambio conformacional, trayendo a los dominios de unión a

correceptores de la gp120 a la proximidad de los receptores de quimiocinas, permitiendo una interacción más estable. Los antagonistas de correceptores actúan en esta parte.

Dos secuencias de la gp41 (HR1 y HR2) interactúan (Figura 5D), resultando en el colapso de la porción extracelular de gp41 para formar una horquilla, la cual es en ocasiones referida como *coiled-coil bundle*. Los inhibidores de fusión T-20 y T-1249 actúan al mimetizar HR2, resultando en una formación distorsionada de la horquilla. En ausencia del inhibidor, la estructura de horquilla permite que las membranas del virus y de la célula se unan, llevando a la fusión de membranas y la subsecuente entrada del RNA viral.

5.3.1.3.1 La proteína gp120

La proteína Env del VIH-1 media funciones que son críticas para el ciclo de replicación viral, incluyendo unión a la célula huésped y fusión de las membranas virales y celulares. El precursor Env (gp160) es constantemente translocado al retículo endoplásmico, donde suceden pasos esenciales en su maduración, como la glicosilación del extremo amino terminal, la formación de puentes disulfuro y la oligomerización. El clivaje se lleva a cabo en el complejo de Golgi por una proteasa celular antes de salir a la superficie celular, paso que es necesario para la infectividad del virus. Los productos del clivaje, la subunidad de superficie gp120 (SU) y la subunidad transmembranal gp41 (TM), permanecen asociados a través de interacciones no covalentes. El dominio TM ancla el complejo oligomérico de la gp41 y gp120 a la superficie de las células

infectadas y, después que la gemación ocurrió, a la superficie de los viriones. Por lo tanto, la forma funcional de Env es oligomérica (Center *et al.*, 2002).

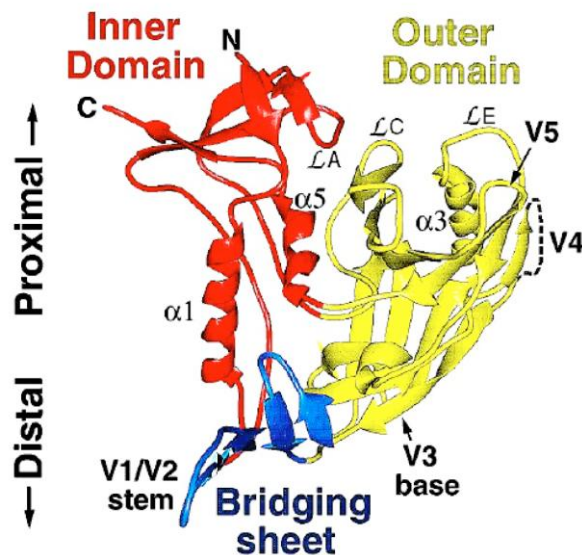


Figura 6. Estructura del *core* o centro de la gp120. En rojo se indica el dominio interno, en amarillo el dominio externo, y en azul el puente que conecta ambos dominios (Wyatt *et al.*, 1998).

La gp120 es una proteína versátil con diferentes funciones dentro del proceso de infección viral. Por su interacción no covalente con gp41, la proteína gp120 está constantemente liberándose del virus y de las células infectadas (Hart *et al.*, 1991), por lo que en su forma soluble es capaz de inducir diversos efectos tóxicos en el huésped. En resumen, la gp120 participa en la interacción con CD4, la fusión, colabora en la definición del tropismo (Freed and Martin, 1995), induce apoptosis en linfocitos T y neurotoxicidad (Wallace, 2006).

5.3.2 Patogénesis e infección por VIH-1

El progreso de la infección por VIH tiene varias etapas (Figura 7). Las primeras semanas después de la infección primaria se caracterizan por una mononucleosis aguda o enfermedad tipo resfriado. Durante esta etapa ocurre la seroconversión, la cual está asociada con un incremento rápido en el título viral. Esto es seguido por la diseminación viral a los órganos linfoides. La inmunidad adaptativa, que incluye anticuerpos neutralizantes y linfocitos T citotóxicos contra células infectadas, se desarrolla posteriormente. Mientras esta respuesta puede controlar de forma temporal la infección, generalmente es incapaz de eliminar al virus (Schwartz and Nair, 1999).

La primera etapa de la infección es de suma importancia porque representa un buen periodo que puede ser utilizado como objetivo para estrategias de prevención o tratamiento (Hansasuta and Rowland-Jones, 2001).

El paciente entonces entra en la etapa de latencia clínica o periodo asintomático. Un decremento progresivo de linfocitos sanguíneos periféricos CD4 continúa durante la latencia (Nowak, 1995). Cuando el conteo de linfocitos T CD4⁺ cae por debajo de los 200/mm³, la enfermedad usualmente entra en una fase sintomática caracterizada por infecciones oportunistas. Esta etapa es conocida como Síndrome de Inmunodeficiencia Humana (Schwartz and Nair, 1999).

Actualmente, el CDC define a una individuo con SIDA como aquel al que se le haya detectado infección por VIH y que presente alguna de las 26 enfermedades causadas por patógenos oportunistas enlistadas por dicho centro (tuberculosis pulmonar, neumonía recurrente, sarcoma de Kaposi, etc.). Aunado a ello, se toma en cuenta el

conteo de células T CD4⁺ menor a 200/mm³ en sangre como parámetro para diagnóstico de SIDA (Centers of Disease Control and Prevention, 2009).

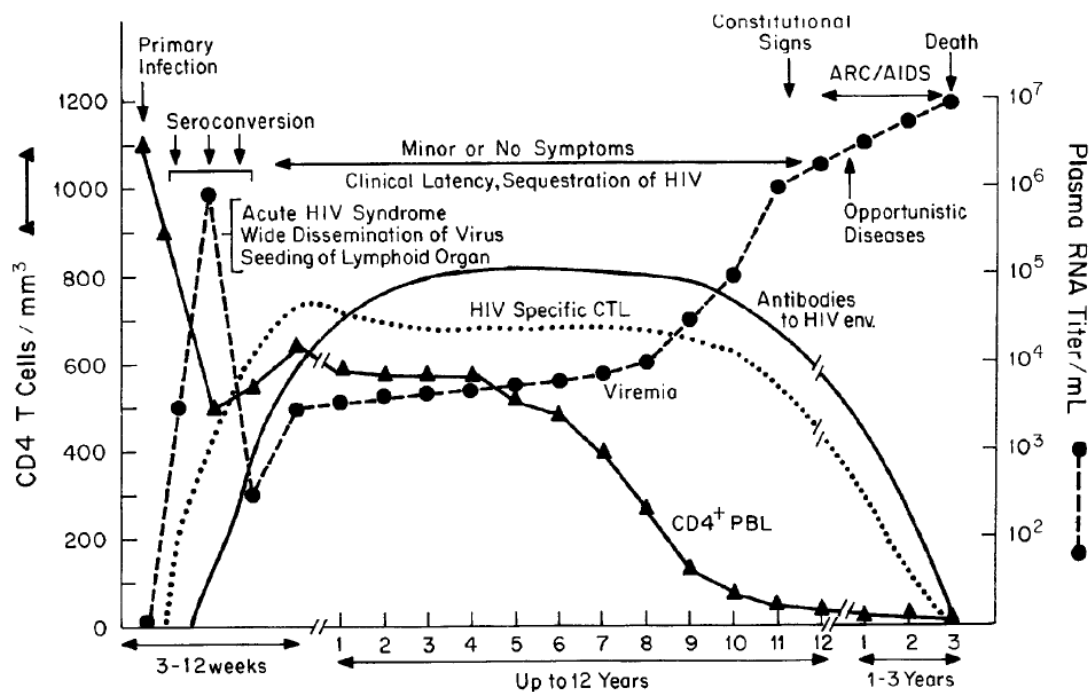


Figura 7. Historia natural de la infección por VIH-1. Se espera que el 95% de los pacientes infectados con VIH-1 desarrollen SIDA de forma progresiva después de 15 años de la infección. (Schwartz and Nair, 1999).

5.3.3 La epidemia del VIH/SIDA

Desde la aparición de los primeros brotes, el problema de salud causado por la epidemia de VIH/SIDA a nivel mundial no se ha podido detener a pesar del número de antirretrovirales que se encuentran en el mercado. Desde 1982, la investigación que se ha hecho en lo que a este patógeno respecta ha sido intensa, ya que las cifras de

individuos infectados colocan a esta enfermedad infecciosa entre una de las diez más comunes en el mundo (Organización Mundial de la Salud, 2009). La importancia de la pandemia se ve reflejada en los datos reportados por el Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA (ONUSIDA) para el 2007: 33 millones de personas infectadas con el VIH, 2.7 millones de nuevas infecciones y, 2.0 millones de defunciones causadas por SIDA (Programa Conjunto de las Naciones Unidas para el VIH/SIDA (ONUSIDA), 2008).

Mientras que el porcentaje de personas viviendo con VIH se ha estabilizado desde el 2000, el número total de personas que se infectan cada año ha ido incrementando.

5.3.4 El SIDA en México

En 1984 se reportaron los primeros casos de SIDA en México. Estos casos se dieron en varones jóvenes provenientes de Estados Unidos, los cuales expresaban cuadros clínicos distintos a los previamente reportados. En México, las infecciones oportunistas más comunes fueron criptosporidiasis y tuberculosis. En 1985 se desencadenó una epidemia secundaria causada por el uso de transfusiones cuando aún no se hacían pruebas para determinar si la sangre estaba contaminada (Ponce de León and Lazcano, 2008).

Desde el primer brote en 1983 hasta el 15 de noviembre del 2007, en el Registro Nacional de Casos de SIDA se han contabilizado en forma acumulada 115,651 casos, de las cuales 83% son hombres y 17% son mujeres. Por cada cinco casos

acumulados de SIDA en hombres se ha observado un caso en mujeres. En la Encuesta Nacional de Salud (ENSA) realizada en el 2000 se determinó que la prevalencia de VIH en población adulta de mayores de 20 años de edad es de 0.25%.

Lamentablemente, han ocurrido alrededor de 62 mil defunciones asociadas al VID/SIDA en población general en México durante el período de 1988-2005 y casi 43 mil en el grupo de 25 a 44 años de edad, precisamente el núcleo central de la población económicamente activa (Magis and Hernández, 2008). Considerando el número total de casos reportados, México ocupa el tercer lugar en el continente americano, después de Estados Unidos y Brasil (Magis and Hernández, 2008).

En México, en 1986 se agregó el SIDA a la lista de enfermedades sujetas a notificación inmediata de casos. Un año después se publicó la primera definición mexicana de caso (Valdespino *et al.*, 2008).

De acuerdo a reportes del CONASIDA, en México las vías de transmisión son muy variadas ya que se dan casos de transmisión por vía sexual, vía sanguínea, vía perinatal y otros (Magis and Hernández, 2008). Como se puede observar en la Tabla I, la vía sexual (tanto entre hombres que tienen sexo con hombres (HSH) como en relaciones heterosexuales), es la más común. La vía sanguínea incluye casos por transfusión, hemofílicos, donadores y exposición ocupacional. La vía perinatal es la menos común, con sólo el 2.3% del total de los casos.

Tabla I. Porcentaje de casos acumulados de SIDA por categoría de transmisión totales para México al 15 de noviembre de 2007 (Magis and Hernández, 2008).

Vía sexual	%	Vía sanguínea	%	Perinatal	%
HSH	45.9	Transfusión	3.0	Perinatal	2.3
Heterosexual	46.6	Hemofílicos	0.4		
		Donadores	0.5		
		UDI	1.1		
		Exp. ocupacional	<0.1		
Total	92.5	Total	4.9	Total	2.3

5.3.5 Transmisión

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, el VIH puede encontrarse en fluidos corporales como sangre, semen, fluidos vaginales y leche materna. Este virus puede transmitirse por vía sexual (oral, anal o vaginal), por transfusión sanguínea, por compartir agujas contaminadas y, por vía materna (embarazo, parto o lactancia) (World Health Organization, 2009b).

La transmisión a través del contacto sexual es causa del 75 al 85% del total de infecciones causadas por este virus (Royce *et al.*, 1997). Por ende, a nivel mundial los esfuerzos se han enfocado en una ampliación rápida y sostenida de la prevención de la infección por esta vía. Se ha observado que, para lograrlo efectivamente, se requieren herramientas que estén bajo el control del individuo, que requieran poco o ningún apoyo del compañero sexual y que sean invisibles para las otras personas.

Las vías de transmisión sexual en el humano incluyen el coito peniano-vaginal, el coito peniano-anal y el sexo oral. En general se reconoce que este último involucra menor riesgo que el vaginal o el anal. La probabilidad de transmisión durante el encuentro sexual depende mayormente de la carga viral del individuo infectado, de la etapa de la infección en la que se encuentre, del estado de salud del individuo no infectado y de la presencia o ausencia de otras enfermedades de transmisión sexual (Public Health, 2008). En todos los casos, la pareja pasiva (*receptive partner*) se encuentra en mayor riesgo de contagio que la pareja activa (*insertive partner*). Un microbicida es una herramienta que está, al contrario del condón masculino, en control de la pareja pasiva.

La transmisión heterosexual es la vía más común de contagio en la mayoría de los países. Este tipo de interacción involucra las tres vías de transmisión antes mencionadas. Una encuesta realizada a 12,571 hombres y mujeres de entre 25 y 44 años de edad en Estados Unidos por el *National Center for Health Statistics* (Centro Nacional para Estadísticas de la Salud) refiere que, en parejas de sexo opuesto, el 97% de hombres y 98% de mujeres han experimentado coito vaginal, 90% de hombres y 88% de mujeres han experimentado sexo oral y, un 40% de hombres y 35% de mujeres han experimentado coito anal. Tomando en cuenta que la mayoría de las relaciones sexuales a nivel mundial son heterosexuales, este porcentaje de hombres y mujeres que han practicado el sexo anal es mayor que el 100% de hombres que tienen sexo con hombres (HSH). De acuerdo al *Global Campaign for Microbicides*, esta premisa desmiente la idea común que el sexo anal es exclusivo de la población homosexual y,

refuerza la necesidad de desarrollar un microbicida rectal (Global Campaign for Microbicides, 2008).

5.3.6 Población en riesgo

La Organización Mundial de la Salud y el Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA señalan que debido a las diferentes prácticas sexuales y a determinadas características fisiológicas, las mujeres son la fracción de la población que en mayor riesgo se encuentra en lo que a la pandemia de SIDA respecta. En la década de los ochenta las relaciones sexuales entre hombres eran consideradas la principal vía de contagio del VIH. Al pasar de los años se ha observado una modificación en el comportamiento de la epidemia: la proporción de mujeres contagiadas por el VIH-1 ha aumentado considerablemente. Al comparar información actual con datos de 1997 se constata un incremento del 41% al 47% del índice de mujeres infectadas. En 2004, el 47% de las personas con VIH 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 (Alliance for Microbicide Development, 2009). A nivel mundial, 5,000 mujeres son infectadas cada día, de las cuales el 90% se encuentra en países en vías de desarrollo (Ricciotti, 2008).

5.3.7 El tratamiento antirretroviral

A raíz de la extensa investigación llevada a cabo en el VIH, en 1987 surge el primer antirretroviral, el AZT (zidovudina) para combatir la infección. A partir de entonces han salido al mercado decenas de otros medicamentos que han logrado amainar el avance de la epidemia. Los antirretrovirales son compuestos que tienen como blanco algún punto en la etapa de la infección viral a la célula huésped, como la actividad de la transcriptasa inversa o de la proteasa. La *Food and Drug Administration* (FDA) ha aprobado cuatro tipos diferentes de estos fármacos: inhibidores de la proteasa (IP), inhibidores nucleósidos/nucleótidos de la transcriptasa reversa (INTR), inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa reversa (INNTR) e, inhibidores de la entrada. Se recomienda que el tratamiento esté conformado por una combinación de al menos dos o tres de los diferentes tipos mencionados, formando así la terapia antirretroviral altamente supresiva (HAART, por sus siglas en inglés).

La forma de evitar la propagación viral en el hospedero se logra al atacar estructuras que participen en las diferentes fases del ciclo del VIH en la célula, es decir, mediante el uso de compuestos con actividad antirretroviral. (Dhawan and Mayer, 2006) La *Food and Drug Administration* (FDA) de los Estados Unidos ha aprobado cuatro tipos diferentes de antirretrovirales: inhibidores de la proteasa (IP), inhibidores nucleósidos/nucleótidos de la transcriptasa reversa (INTR), inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa reversa (INNTR) e, inhibidores de la entrada, los cuales generalmente son utilizados para la terapia antirretroviral altamente supresiva (HAART, por sus siglas en inglés).

La utilidad del tratamiento anti-VIH se ve limitada por el desarrollo de cepas que resisten los efectos de los diferentes fármacos ya que la tasa de mutación del virus es de 3.4×10^{-5} /pb/división. Asimismo, el alto precio del tratamiento antirretroviral no ha permitido su uso generalizado, ONUSIDA reporta que una de cada diez personas que necesitaban tratamiento antirretrovírico en África, y una de cada siete en Asia, lo recibían a mediados de 2005 (Joint United Nations Programme on HIV AIDS (UNAIDS), 2008). Organismos como la OMS, el ONUSIDA y el CDC están impulsando el desarrollo de nuevos compuestos que permitan complementar las terapias múltiples ya existentes. Específicamente se ha prestado atención a los llamados inhibidores de entrada, ya que sólo uno es el que ha sido aprobado por la FDA para uso humano (Fuzeon o T-20).

5.3.7.1 Inhibidores de entrada o fusión

Los inhibidores de entrada, como su nombre lo dice, impiden el ingreso del virus a la célula al actuar sobre el proceso de fusión. Los primeros eventos que inician la infección son: (1) unión de la partícula viral a la superficie celular y, (2) fusión del virus y membranas celulares para insertar el núcleo del virión dentro del citoplasma celular (Clapham and McKnight, 2002). En estos procesos participan las proteínas virales gp120 y gp41, las cuales conforman las estructuras proteicas de la membrana viral que interactúan con el receptor (CD4) y los correceptores celulares (CXCR4 y CCR5) (Figura 3). Gp120 es una glicoproteína de aproximadamente 500 amino ácidos que interactúa con el receptor CD4 en sitios específicos de su estructura y que sufre un

cambio conformacional que permite el descubrimiento de gp41 (Doms and Moore, 2000). Gp41, en cambio, es una glicoproteína transmembranal que al quedar expuesta por el cambio en gp120 interactúa con los correceptores (uno u otro) y permite la formación del poro de fusión (Markovic *et al.*, 2004). Los inhibidores de entrada entran en contacto con alguna de las estructuras proteicas virales, evitando así que la fusión sea completada (University of Southampton, 2009).

Borkow y Lapidot clasifican a los inhibidores de entrada según su mecanismo de inhibición como inhibidores de unión, del correceptor y de fusión (Figura 8) (Borkow and Lapidot, 2005).

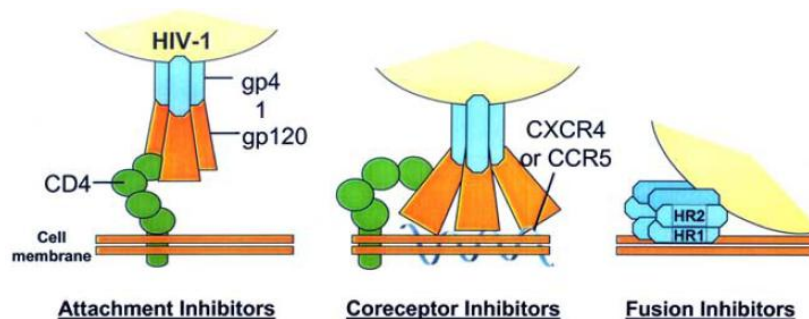


Figura 8. Mecanismo de inhibición de los diferentes tipos de inhibidores de entrada o fusión (Borkow and Lapidot, 2005).

Según estos autores, los inhibidores de entrada tienen una mayor ventaja sobre otro tipo de fármacos ya que el bloquear la entrada del VIH a la célula huésped conlleva la supresión de la infectividad viral, la replicación y, la citotoxicidad inducida por interacciones virus-célula (Borkow and Lapidot, 2005).

5.4 Bacterias resistentes a antibióticos

El desarrollo tecnológico pone a nuestro alcance herramientas que nos permiten buscar soluciones a una diversidad de problemas que aquejan a la humanidad, el descubrimiento de los antibióticos en 1940 constituyó uno de los acontecimientos más importantes en la historia de la medicina, su uso ha permitido el tratamiento de las enfermedades infecciosas desde aquel tiempo hasta nuestros días. Sin embargo a lo largo de los años muchos factores principalmente la capacidad de adaptación de las bacterias y el uso indiscriminado de los agentes antimicrobianos han conducido al desarrollo de resistencia y al surgimiento de enfermedades infecciosas producidas por microorganismos que ya no responden a las terapias con antibióticos comunes.

5.4.1 Resistencia bacteriana

El descubrimiento de los antibióticos constituyó uno de los acontecimientos más importantes en la historia de la medicina, ya que su uso permitió el tratamiento de enfermedades infecciosas que antes causaban grandes daños a la humanidad. A la par de este beneficio, el uso indiscriminado de estos medicamentos dio lugar al surgimiento de microorganismos resistentes que actualmente son considerados un gran problema de salud pública a nivel mundial (World Health Organization, 2004a). De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, las infecciones bacterianas más comunes son aquellas en las que el problema de resistencia a antibióticos es más evidente: diarreas, infecciones del tracto respiratorio, meningitis, infecciones de transmisión sexual e infecciones nosocomiales (World Health Organization, 2004a). Las personas infectadas

con microorganismos resistentes a antibióticos, tienden a permanecer por más tiempo en los hospitales y requieren un tratamiento con dos o tres antibióticos que puede resultar menos efectivo, más tóxico y más caro.

Este hecho constituye un problema de salud pública de distribución mundial el cual además tiene implicaciones importantes desde el punto de vista económico y social. De acuerdo a datos publicados por el Centro de Control de Enfermedades de los Estados Unidos (Centers for Disease Control, 2004):

- Cerca de 2 millones de pacientes en los Estados Unidos contraen una infección en el hospital cada año.
- De estos pacientes, alrededor de 90.000 mueren cada año como resultado de la sobreinfección.
- Más del 70 por ciento de las enfermedades adquiridas en los hospitales son resistentes por lo menos a uno de los antibióticos comúnmente usados para tratarlas.
- Las personas infectadas con microorganismos resistentes a antibióticos, tienden a permanecer por más tiempo en los hospitales y requieren un tratamiento con dos o tres antibióticos que puede resultar menos efectivo, más tóxico y más caro.

Entre las bacterias resistentes a antibióticos más comúnmente aisladas en los hospitales se encuentran: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* y más recientemente *Acinetobacter*, por otro lado se encuentran las bacterias multirresistentes que producen enfermedades

infecciones adquiridas en la comunidad como *Pneumococcus*, *Gonococcus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus pyogenes* (Centers for Disease Control, 2004).

5.2.2 Mecanismos de resistencia a antibióticos

Cepa resistente es aquella cuyo fenotipo silvestre le permite "resistir" de modo natural a un determinado antibiótico. La base de dicha resistencia suele ser alguna estructura de la bacteria que actúa como barrera (Iañez, 1998). Los mecanismos de resistencia a antibióticos pueden estar agrupados en cuatro categorías principales (Salyers and Whitt, 1994):

- Restricción del acceso del antibiótico a su blanco.
- Inactivación Enzimática del antibiótico.
- Bombeo activo del antibiótico (efecto *Efflux*).
- Modificación o protección del blanco del antibiótico.

La restricción al acceso del antibiótico al sitio blanco se da por la participación de porinas de la membrana externa y por la reducción del paso a través de la membrana citoplasmática. Las enzimas que son capaces de inactivar un antibiótico incl yen β -lactamasas y enzimas modificadoras de aminoglucósidos.

5.4.3 Bacterias resistentes a antibióticos: ejemplos de importancia clínica

5.4.3.1 *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA)

El *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM o MRSA por sus siglas en inglés) es un patógeno de gran importancia en el sector salud que no se ha podido eliminar del ambiente hospitalario ni de la comunidad (Velazquez-Meza, 2005). En los humanos, el *Staphylococcus aureus* produce lesiones superficiales de la piel y abscesos localizados, infecciones en sistema nervioso central, osteomielitis, endocarditis invasora, artritis séptica, septicemia, neumonía e infecciones del tracto urinario (Velazquez-Meza, 2005). Una bacteremia causada por *S. aureus* produce entre el 25 y 63% de mortalidad (Bustos-Martinez *et al.*, 2006).

En 1960, en el Reino Unido se aisló la primera cepa de *S. aureus* resistente a meticilina, sólo un año después de que este fármaco empezó a ser utilizado como alternativa a las penicilinas. En la actualidad, las cepas de *S. aureus* tienen un amplio rango de resistencias, que incluye a más de dieciséis tipos de antibióticos. En lo particular, la resistencia a meticilina se debe al gen *mecA*, que codifica para la proteína PBP2a, la cual presenta una afinidad por la meticilina y todos los β -lactámicos (Bustos-Martinez *et al.*, 2006).

Las infecciones causadas por SARM son de gran importancia clínica por su alta tasa de morbilidad y mortalidad y, por ser la principal causa de infecciones nosocomiales a nivel mundial (Bustos-Martinez *et al.*, 2006). De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, en varios países asiáticos la incidencia actual del SARM es del 70-80% de los aislados de *S. aureus* totales (World Health Organization,

2004b). El Sistema Nacional de Vigilancia de Infecciones Nosocomiales (*National Nosocomial Infectious Surveillance System*, NNIS) de los Estados Unidos determinó que, en pacientes hospitalizados, la prevalencia de cepas de SARM se incrementó del 4% en 1980 al 60.7% en 2004. En algunos hospitales estadounidenses se han reportado incidencias hasta del 80% (Bustos-Martinez *et al.*, 2006). En México, se han registrado centros hospitalarios con una resistencia global a meticilina del 24% (Velazquez-Meza, 2005). En general, en México se podría hablar de un incremento nacional del 7% al 30% en la prevalencia de cepas de SARM en los últimos años, sin embargo, dado el limitado número de estudios realizados, esta cifra podría incrementarse (Bustos-Martinez *et al.*, 2006).

5.4.3.2 *Streptococcus pyogenes* resistente a Eritromicina

El *Streptococcus pyogenes* (estreptococo β -hemolítico del grupo A) es uno de los patógenos más importantes de los seres humanos, es la causa más frecuente de infecciones del tracto respiratorio superior como faringitis aguda y también origina distintas infecciones cutáneas y sistémicas. Ocupa un lugar importante en la microbiología médica debido a las secuelas que pueden quedar después de la infección por *S. pyogenes* como la fiebre reumática aguda que ha sido causa de incapacidad y mortalidad en todo el mundo, y la glomerulonefritis aguda postestreptocócica (Aracil, 2002; Malhotra-Kumar, 2005).

El tratamiento de elección es la penicilina, su eficacia clínica se basa en la excelente sensibilidad que presentan a este antibiótico todas las cepas del agente causal,

sin embargo debido a que un buen número de casos presentan hipersensibilidad a la penicilina es descartada por los médicos para el tratamiento, por otra parte, el fracaso terapéutico con penicilina ha ido incrementando gradualmente desde 1958 y esto ha conducido al uso de otros antibióticos de mayor espectro como los macrólidos (Aracil, 2002).

El problema de las infecciones causadas por esta bacteria es el incremento de la resistencia a los macrólidos, que comúnmente son usados para este tratamiento. El *Streptococcus pyogenes* adquiere resistencia por dos principales mecanismos:

- En el primer mecanismo el gen *erm(A)* o *erm(B)* (erythromycin ribosomal methylase) codifica una metilasa que al expresarse dimetila el sitio de unión a macrólidos, es decir, un residuo específico de adenina del ARN ribosómico 23S, induciendo un cambio conformacional que impide la unión tanto de los macrólidos como lincosamidas y estreptobramina B (MLS). Este patrón de resistencia es demostrado ya sea por un fenotipo constitutivo (cMLS) o por un fenotipo inducible (iMLS) (Malhotra-Kumar, 2005).
- El segundo es una expulsión activa del antibiótico (Efflux) mediada por un cassette transportador unido a ATP donde el gen *mef (A)* codifica los dominios transmembrana y el gen *msr (D)* codifica el dominio de unión a ATP, este patrón de resistencia está demostrado por un fenotipo M y confiere resistencia a macrólidos de 14 y 15 átomos y sensibilidad a los de 16 y a las lincosamidas. Un tercer mecanismo de resistencia raro es la modificación del sitio de unión sobre

rRNA por mutación que es expresado por el fenotipo M o cMLS (Malhotra-Kumar, 2005).

5.4.3.3 *Escherichia coli* entero-hemorrágica O157:H7 resistente a Ampicilina

La *Escherichia coli* O157:H7 productora de toxina Shiga (STEC), de origen zoonótico fue reconocida por primera vez como un patógeno entérico en 1982 durante la investigación de un brote de colitis hemorrágica. La infección por esta bacteria conduce al síndrome urémico hemolítico (HUS), caracterizado por anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia y daño renal (Rangel, 2005).

En 1993, después de un gran brote de *E. coli* O157:H7 asociado a carne de res mal cocinada de un restaurante chino de comida rápida, este microorganismo fue ampliamente reconocido como un patógeno importante y amenazante. En 1994 se convierte en una infección nacional notificable y para el 2000 se presentan reportes en 48 estados. Un estimado de 73,480 enfermedades debidas a una infección por *E. coli* O157:H7 ocurre cada año en los Estados Unidos, conduciendo a un número estimado de 2,168 hospitalizados y 61 muertes anualmente y es una importante causa de falla renal aguda en niños (Rangel, 2005).

Esta bacteria tiene una considerable importancia en salud pública tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo, siendo su principal reservorio el ganado bovino. El rango de manifestaciones clínicas debidas a la infección por esta bacteria varía desde infección asintomática, diarrea acuosa, hasta enfermedad severa con diarrea sanguinolenta o colitis hemorrágica y síndrome hemolítico urémico (Rangel, 2005).

Desde 1982 hasta el 2002, un total de 350 brotes fueron reportados de 49 estados, contando 8,598 casos de infecciones por *E. coli* O157: H7, dentro de los cuales se encontraron 1,493 (17.4%) hospitalizaciones, 354 (4.1%) casos de HUS y 40 (0.5%) muertes. La principal ruta de transmisión en estos casos sigue siendo la comida (Rangel, 2005).

5.4.3.4 *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo Gram negativo, no fermentador, que se comporta básicamente como un patógeno nosocomial oportunista. Ocupa el segundo lugar de los patógenos Gram negativos reportados al Sistema Nacional de Vigilancia de Infecciones Nosocomiales (NISS) en los Estados Unidos (Carmeli, 1999). Sus mínimos requerimientos nutricionales, su tolerancia a una amplia variedad de condiciones físicas y su resistencia intrínseca a un gran número de antibióticos explican su importancia como patógeno intrahospitalario. Aunque se ha detectado como parte de la flora normal, rara vez causa enfermedad en individuos sanos.

En la mayoría de los casos, la infección comienza con alguna alteración de los mecanismos de defensa del huésped; esto puede involucrar la disrupción en la integridad de barreras físicas como catéteres urinarios, catéteres intravenosos, quemaduras extensas de la piel o tubos endotraqueales que facilitan la colonización bacteriana. Por otro lado, existen otras situaciones propias del huésped que comprometen los mecanismos de defensa como neutropenia, inmunosupresión iatrogénica o adquirida y las patologías que cursan con deterioro del sistema

inmunológico como cáncer, desnutrición y diabetes, que también son factores de riesgo para la infección. Definitivamente, la estancia hospitalaria prolongada, especialmente en unidades de cuidado intensivo (UCI) y la inadecuada selección de antibióticos son los factores que favorecen la aparición de cepas multirresistentes (Carmeli, 1999). Este hecho, convierte a la infección por *P. aeruginosa* en un verdadero problema de salud pública.

La resistencia de esta bacteria a diferentes antibióticos como cefalosporinas de primera y segunda generación, tetraciclinas, cloranfenicol y macrólidos se debe a las características de su membrana celular que tiene características excepcionales de impermeabilidad constituyendo un mecanismo de resistencia intrínseca de la bacteria a una gran variedad de antibióticos (Angus, 1983).

Los principales mecanismos de resistencia en *P. aeruginosa* comprenden: presencia de β -lactamasas y alteraciones de la permeabilidad de membrana dadas por la presencia de bombas de expulsión y las mutaciones de las porinas transmembranales.

6. MÉTODOS

6.1 Origen de los reactivos

Se utilizaron nanopartículas de plata de 30-50 nm producidas comercialmente (Sigma-Aldrich). Se preparó una solución de nanopartículas en medio de cultivo RPMI 1640. Para las diferentes pruebas, se partió de dicha solución y se realizaron diluciones seriadas.

6.2 Material biológico

Las cepas de VIH -1, las líneas celulares y los antirretrovirales fueron obtenidas a través del *AIDS Research and Reference Reagent Program*, NIH. Las líneas celulares utilizadas fueron HeLa-CD4-LTR- β -gal, MT-2 y HL2/3. Los antirretrovirales utilizados fueron AZT, Indinavir, y Enfuvirtide. Además, se utilizó UC781, el cual fue donado por el Dr. Gadi Borkow.

Los virus de cultivo primario fueron propagados por subcultivo en MT-2 y células HeLa. El VIH-1_{IIB} fue reproducido de acuerdo al manual de Virología DAIDS para laboratorios, compilado por la División de SIDA del Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas y el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos.

Las células MT-2 fueron cultivadas en RPMI 1640, el cual contiene 10% suero fetal (FCS) y antibióticos. Las células HeLa-CD4-LTR- β -gal son células dual trópicas, es decir, tanto cepas T-trópicas como M-trópicas pueden infectarlas. Las HL2/3 fueron cultivadas en DMEM Dulbecco's modificado (DMEM) con fosfato de sodio y piruvato de sodio, 4,500 mg/L de D-glucosa y L-glutamina, con 10% de suero fetal bovino (FBS), 0.2 mg/mL geneticina (G418), y 0.1 μ g/mL puromicina.

La cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) fue obtenida del Departamento de Infectología del Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González de la UANL gracias a la colaboración de la Dra. Rosa María Hinojosa Robles y del Dr. Javier Ramos Jiménez, Jefe del Servicio de Infectología. Las cepas de *Streptococcus pyogenes* resistente a eritromicina, *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente a los antibióticos y *Escherichia coli* O157:H7 resistente a ampicilina fueron proporcionadas por el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la UANL gracias a la colaboración del Dr. Rolando Tijerina Menchaca. Las bacterias no resistentes como *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* fueron obtenidas del cepario del Departamento de Microbiología e Inmunología de la UANL. La cepa de *Streptococcus sp.* fue aislada del exudado faríngeo de un estudiante de nuestro laboratorio.

Las ocho cepas bacterianas utilizadas se mantuvieron en cultivo en agar Mueller Hinton y agar sangre (sólo los *Streptococcus*) a 35 °C y 5% de CO₂ en una incubadora. A cada una de las bacterias se le realizó la prueba de Kirby-Bauer con multidiscos (Bio-Rad), para establecer el perfil de resistencias correspondiente (Boyle *et al.*, 1973).

6.3 Determinación de la citotoxicidad *in vitro*

El proceso de valoración de las nanopartículas de plata da inicio con la determinación de la citotoxicidad de los compuestos sobre diferentes líneas celulares. Mediante la prueba de Celltiter-Glo de Promega se definió la toxicidad celular de las nanopartículas de plata en las células HeLa.

La prueba de Celltiter-Glo fue realizada para determinar la viabilidad celular posterior a la exposición a diferentes concentraciones de nanopartículas de plata, de tal forma que se logre definir una respuesta dependiente de la dosis al graficar el porcentaje de viabilidad celular vs. la concentración utilizada. Una vez completado esto, se definió el parámetro conocido como CC_{50} , es decir, la concentración que produce una inhibición del crecimiento celular del 50%, el cual puede ser utilizado para determinar si las nanopartículas de plata manejadas son o no compuestos citotóxicos (Freshney, 2000). El valor de CC_{50} servirá como referencia para definir la concentración de nanopartículas de plata a utilizar en los siguientes experimentos, por lo que la concentración estará en función de las nanopartículas de plata a evaluar.

Células HeLa-CD4-LTR- β -gal se plaquearon en placas de 96 a una densidad de 5×10^4 células/pozo. Posteriormente, se agregaron diluciones seriadas de nanopartículas de plata y se incubaron 24 horas. Al terminar el periodo de incubación, se evaluó la viabilidad celular con el kit de Celltiter-glo siguiendo las instrucciones del fabricante (Riss and Moravec, 2004).

6.4 Determinación de la inhibición de la infección por VIH-1

Una vez obtenida la información que respecta a la citotoxicidad de las nanopartículas de plata se procede a determinar si estos compuestos tienen la capacidad de inhibir la infección de distintas cepas de VIH-1 mediante la prueba MAGI y la de luciferasa.

Las prueba de células azules o MAGI (*multinuclear activation of a galactosidase indicator*) surgió en 1992 como forma de medir cuantitativamente la infección por VIH. Las cMAGI son células HeLa transfectadas con una construcción de DNA que incluye un gene de CD4 y uno de β -galactosidasa antecedido por un LTR truncado de VIH-1 (Kimpton and Emerman, 1992). La expresión del gene de β -galactosidasa depende de Tat, de tal forma que si la célula es infectada por un virus que completa su ciclo y Tat es producido en el citoplasma, la expresión del gen reportero se llevará a cabo. Si esto ocurre, el núcleo celular se teñirá de azul, lo cual puede ser observado con facilidad en un microscopio de luz. El número de células azules equivale al número de partículas virales infectivas presentes en el inóculo (Borkow *et al.*, 2004).

Otra forma de determinar el grado de inhibición de la infección por parte de las nanopartículas de plata es mediante el uso de células transfectadas con el gene reportero de la luciferasa que se encuentre regulado por un LTR truncado de HIV-1. La luciferasa es una enzima que oxida a la luciferina para emitir luz a 562 nm. La actividad luciferasa está relacionada con la transcripción regulada por elementos virales, como el Tat. Se esperaría que dicha actividad se vea modificada en función del cambio de la concentración de las nanopartículas de plata (Freed and Martin, 1995).

En conjunto, las pruebas antes mencionadas pueden definir si un tipo de nanopartículas de plata en particular es capaz o no de inhibir la infección por VIH-1. Aunado a ello, el adecuado manejo de estos ensayos permitirá obtener más información en lo que a la actividad de las nanopartículas de plata respecta. El uso de diferentes cepas virales, tanto T como M-trópicas puede especificar la dependencia de las nanopartículas de plata sobre los correceptores (Ward *et al.*, 2007). Aquellas nanopartículas de plata que sean inhibidoras de la infección por igual para las diferentes cepas podrán ser etiquetadas como independientes del correceptor ya que el tropismo de las cepas está en función del correceptor. Además se podrá definir la amplitud del espectro de acción de cualquier compuesto sobre varias cepas virales (Lin *et al.*, 2003).

Células HeLa-CD4-LTR- β -gal se plaquearon en placas de 96 a una densidad de 5×10^4 células/pozo. Posteriormente, se agregaron diluciones seriadas de nanopartículas de plata y virus a un TCID₅₀ de 10^5 , y se incubaron 48 horas (Borkow *et al.*, 2003). Al terminar el periodo de incubación, se evaluó la infección viral con el kit de Beta-Glo Assay System de Promega siguiendo las instrucciones del fabricante.

6.5 Prueba basada en la fusión celular

Se utilizó a las células HL2/3 como modelo del proceso de fusión mediado por gp120/CD4. Estas células expresan las proteínas virales Env, Tat, Gag, Rev y Nef. Al cocultivarlas con la línea celular HeLa-CD4-LTR- β -gal se fusionarán y permitirán la expresión del gen reportero Beta-gal presente en las HeLa-CD4-LTR- β -gal.

En este caso, se cocultivaron células HL2/3 y HeLa-CD4-LTR- β -gal en un radio 1:1 por 48 horas en ausencia o presencia de diluciones seriadas de nanopartículas de plata y UC781 (un NNRTI) para poder examinar si los compuestos interferían con el proceso de unión de Env con CD4. Después de la fusión de ambas líneas celulares, la proteína Tat de las HL2/3 activará la expresión del gen de Beta galactosidasa (Ciminale *et al.*, 1990; Yang *et al.*, 2005). La actividad de β -gal se cuantificó con el kit Beta-Glo Assay System (Promega). El porcentaje de inhibición de la fusión se calculó con respecto al control positivo de células no tratadas.

6.6 Prueba del tiempo de adición

Conocer la actividad antiviral de las nanopartículas de plata irá trazando el camino por el cual seguir en el estudio. Una nanopartículas de plata podría inhibir la infección en uno o varios puntos del ciclo viral. Por ejemplo, podría darse el caso en el que las nanopartículas de plata interfirieran con la actividad de la enzima transcriptasa inversa (RT), de la proteasa (PR) o de la gp120.

Si al incubar al virus con nanopartículas de plata antes de utilizarlo para infectar algún cultivo celular se observa que la infección es reducida o evitada, se puede suponer que las nanopartículas de plata están actuando sobre el proceso de fusión viral (Elechiguerra *et al.*, 2005). En tal caso, se haría la propuesta de que el virus es recubierto por las nanopartículas de plata en los trímeros de gp120 que sobresalen de la membrana lipídica de tal forma que se evita la interacción con el receptor CD4 y la posterior entrada de la cápside. Con la llamada prueba del tiempo de adición utilizada

por Witvrouw *et al.* (2000) se podría no sólo saber si las nanopartículas de plata actúan en la fusión, sino si también están actuando o no sobre otra etapa (Witvrouw *et al.*, 2000). Es posible que surja un compuesto que tenga la capacidad de inhibir la infección viral no sólo al evitar la entrada del virus, sino al interrumpir el ciclo dentro de la célula.

Células HeLa-CD4-LTR- β -gal fueron infectadas con virus libre a un 10^5 TCID₅₀ con un m.o.i. de 0.2-0.5. Nanopartículas de plata (10 mM), T-20 (inhibidor de fusión, 2 μ M), AZT (NRTI, 20 μ M), o Indinavir (inhibidor de proteasa, 0.25 μ M) fueron agregados en diferentes tiempos post infección (Lin *et al.*, 2003; Neurath *et al.*, 2001). La inhibición de la infección se cuantificó después de 48 h con el Beta-Glo Assay System.

6.7 ELISA HIV-1 gp120/CD4

Para conocer cómo es que las nanopartículas de plata serían capaces de inhibir la entrada del virus se utilizará un método de ELISA *sandwich*. El ELISA permitirá conocer si las nanopartículas de plata inhiben la infección al unirse con gp120 y evitar la interacción con CD4 (Neurath *et al.*, 2004). Además, se podrá descartar el hecho de que las nanopartículas de plata inhiban la infección al unirse a CD4 y no a gp120. Al manejar diferentes diluciones seriadas de las nanopartículas de plata se podrá establecer la concentración mínima inhibitoria del 50% de la interacción gp120-CD4 (IC₅₀).

Se utilizó un ELISA gp120 *capture* de ImmunoDiagnostics, Inc. (Woburn, MA). La proteína gp120 recombinante se pre-incubó por 10 minutos en ausencia o presencia de diluciones seriadas de nanopartículas de plata, y luego se agregó al pozo recubierto

con CD4. La cantidad de gp120 capturada se detectó con un anticuerpo monoclonal anti-gp120 conjugado con peroxidasa. En experimentos diferentes, la proteína gp120 soluble se agregó al pozo recubierto con CD4 el cual fue pre-tratado con nanopartículas de plata por 10 minutos. Antes de agregar la gp120, el pozo fue lavado tres veces (Yang *et al.*, 2005).

6.8 Determinación de la actividad antiviral directa sobre el virus

Para definir si las nanopartículas de plata se unen directamente a las espículas de gp120 expuestas en la membrana viral, se realizó la presente prueba. A un inóculo viral se le agregaron diluciones seriadas de nanopartículas de plata, luego se lavaron los virus y se usaron para infectar células HeLa-CD4-LTR- β -gal (Jiang *et al.*, 2004). Se siguió el mismo procedimiento utilizado para medir la infección viral.

6.9 Concentración inhibitoria mínima y concentración bactericida mínima

La concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración bactericida mínima (CBM) se determinaron al incubar las bacterias con diluciones seriadas de nanopartículas de plata y medir el efecto en la viabilidad celular bacteriana después de 24 de incubación. El valor de la CIM correspondió a aquella dosis a la cual se inhibió al menos el 99% del crecimiento con respecto al control positivo (sin tratamiento). El valor de la CBM correspondió a aquella dosis a la cual se inhibió el 100% del crecimiento con respecto al control positivo (Susumu *et al.*, 2003).

La viabilidad celular se cuantificó mediante la prueba BacTiter- lo Microbial Cell Viability Assay de Promega (Fagerlund *et al.*, 2008; Susumu *et al.*, 2003). Dicho ensayo está basado en el uso de la enzima luciferasa para cuantificar la cantidad de ATP presente, el cual es proporcional a la cantidad de células metabólicamente activas. La luz emitida durante la reacción se midió con un luminómetro Veritas. Las pruebas se realizaron por triplicado en placas de 96 en caldo Luria Bertani (LB) adicionado con anfotericina 2.5 g/m . En todas las pruebas se trabajó con una concentración inicial de bacterias de 10^5 UFC/mL (Diederer *et al.*, 2006). Los estudios *in vitro* de inhibición se realizaron en el Laboratorio de Bioseguridad Nivel 3 (BSL-3) del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

6.10 Curvas de muerte bacteriana

Las curvas de muerte bacteriana se realizaron al medir la viabilidad celular a las 0, 2, 4, 6, 8 y 24 horas después de la exposición e incubación de las bacterias con distintas dosis de nanopartículas de plata (12.5 mM, 25 mM, 50 mM y 100 mM). El porcentaje de inhibición del crecimiento se obtuvo con respecto al control positivo. La viabilidad celular se cuantificó de la misma forma que en el apartado anterior. Las pruebas se realizaron por triplicado en placas de 96 en caldo LB adicionado con anfotericina (2.5 g/mL). En todas las pruebas se trabajó con una concentración inicial de bacterias de 10^5 UFC/mL (Nix *et al.*, 1995).

6.11 Desarrollo de bacterias resistentes a nanopartículas de plata

Para estudiar el mecanismo de acción de las nanopartículas de plata en bacterias, se desarrollaron cepas resistentes a estos compuestos de plata. Diferentes cepas fueron expuestas a dosis crecientes de nanopartículas de plata hasta que dejaron de crecer (Aarts *et al.*, 2001; Zugravu *et al.*, 2006). Estas fueron entonces consideradas como resistentes a nanopartículas de plata y fueron etiquetadas como NPP^R. Aquellas cepas control no resistentes a nanopartículas de plata fueron etiquetadas como NPP^S (Gupta *et al.*, 1992).

A todas las cepas bacterianas se les hizo una prueba de Kirby-Bauer con Bio-Rad multidiscs (Hercules, CA) y siguiendo parámetros de la NCCLS. La sensibilidad a cada antibiótico fue proporcional al diámetro del halo de inhibición.

6.12 Análisis Estadístico

Los resultados del IC₅₀, CC₅₀, CIM y CBM se expresaron como el valor de la media \pm el error estándar de la media, los cuales fueron obtenidos mediante el programa SigmaStat 3.1. Se utilizó la prueba t-Student para comparar estos resultados. Los valores P menores a 0.05 se consideraron significativos.

7. RESULTADOS

7.1 Citotoxicidad de las nanopartículas de plata

Se llevó a cabo una evaluación *in vitro* del efecto citotóxico de las nanopartículas de plata sobre células HeLa-CD4-LTR- β -gal, una línea de células humanas derivada de cáncer cervical. Después de 24 horas de incubación con diluciones seriadas de nanopartículas de plata, se obtuvo el rango de dosis capaces de inhibir la viabilidad celular. Una vez completado esto, se definió el parámetro conocido como CC_{50} , es decir, la concentración que produce una inhibición del crecimiento celular del 50%, el cual puede ser utilizado para determinar si las nanopartículas de plata son o no compuestos citotóxicos. El valor de CC_{50} se utilizó como referencia para definir la concentración de nanopartículas a utilizar en los siguientes experimentos.

Como se observa en la Figura 9, las nanopartículas de plata indujeron una respuesta dependiente de la dosis. En el rango de concentración manejado, las nanopartículas produjeron un efecto citotóxico sobre las células HeLa-CD4-LTR- β -gal. Después de llevar a cabo el triplicado de la prueba, se determinó que la concentración citotóxica media (CC_{50}) es de 36.15 (\pm 14.8) mM.

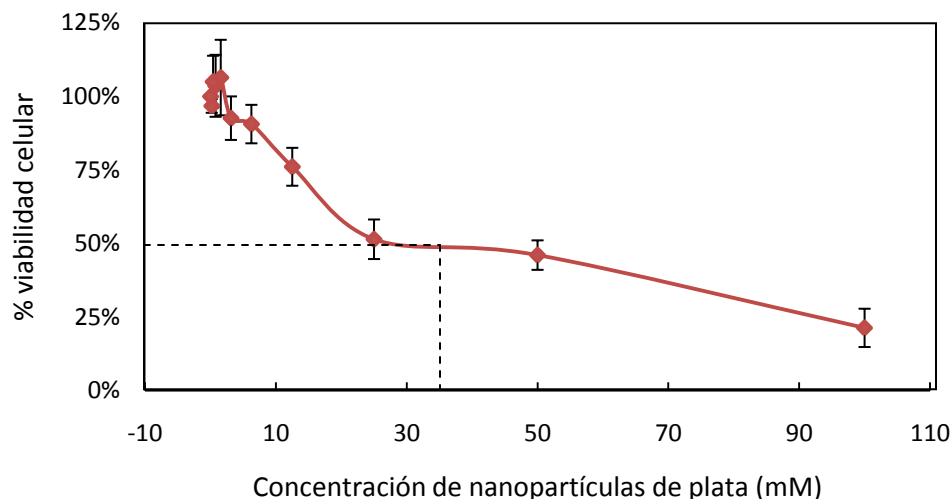


Figura 9. Citotoxicidad de nanopartículas de plata. La prueba se llevó a cabo en células HeLa-CD4-LTR- β -gal. El efecto en la viabilidad celular en respuesta al tratamiento se cuantificó con el Celltiter-Glo de Promega a las 24 de incubación. El valor de CC_{50} se encuentra indicado con las líneas punteadas. Los puntos en la gráfica representan el promedio del triplicado \pm error estándar de la media.

7.2 Actividad antiviral de las nanopartículas de plata

Una vez definido el rango en el cual las nanopartículas de plata son citotóxicas, se procedió a estudiar su capacidad de inhibir la infección por VIH-1. La inhibición de la infección se cuantificó con una prueba que se basa en el uso de la enzima luciferasa como indicador de la replicación viral. Después de realizar la prueba (condiciones descritas en Materiales y métodos), se definió que las nanopartículas de plata lograron inhibir la infección de diferentes cepas virales de VIH-1.

Como se muestra en la Tabla II, las cepas inhibidas incluyen cepas M-trópicas, T-trópicas y dual-trópicas. El tropismo está definido por el tipo de correceptor que los virus requieren para poder infectar una célula. En la Tabla II se incluye una descripción del tropismo de cada cepa, además de los valores de IC₅₀, CC₅₀ y el índice terapéutico. En esta tabla se muestra el Índice Terapéutico (IT), el cual es un parámetro indicador de la actividad del compuesto evaluado en función de su citotoxicidad (CC₅₀) y de su habilidad para inhibir la infección (IC₅₀). Un valor cercano al 1 indica baja eficacia del compuesto, pues la citotoxicidad es alta (Dai *et al.*, 2009).

Tabla II. Efecto antiviral de las nanopartículas de plata contra diferentes cepas de VIH-1.

Cepa de VIH-1	Tropismo	IC ₅₀ (mM)	CC ₅₀ (mM)	IT
IIIB	T	4.1 (± 2.8)	36.2 (± 14.8)	8.9
Eli	T	3.9 (± 1.9)		9.3
96USSN20	T/M	3.4 (± 1.9)		12.5
Bal	M	2.5 (± 1.8)		14.4
BCF01	M	3.4(± 2.8)		10.5

Como se puede observar en los resultados, las nanopartículas de plata inhibieron la infección de todas las cepas de VIH-1 sin importar el tropismo de cada una de ellas. Las cepas IIIB y Bal son cepas de laboratorio, en cambio, Eli, 96USSN20 y BCF01 son aislados clínicos, por lo que este factor tampoco influyó en la actividad antiviral de las

nanopartículas de plata. Las cepas fueron inhibidas en un rango de concentración muy similar, siendo Bal la cepa más sensible y IIB la cepa menos sensible a las nanopartículas. Al comparar la capacidad de inhibir la infección de las diferentes cepas, con el rango de concentración a la cual las nanopartículas son tóxicas (IT), se observa que la cepa Bal fue la que fue inhibida con una mayor eficiencia.

7.3 Prueba basada en la fusión celular

Se utilizó a las células HL2/3 como modelo del proceso de fusión mediado por gp120/CD4. Las células HL2/3, que expresan Env en su superficie y Tat en su citoplasma (Yang *et al.*, 2005), y las células HeLa-CD4-LTR- β -gal (células indicadoras) pueden fusionarse como resultado de la interacción gp120-CD4. La cantidad de células fusionadas se midió al utilizar al gen β -gal como reportero. La enzima β -galactosidasa cataliza la hidrólisis de β -galactósidos en monosacáridos. La expresión del gen se cuantificó al asociar la actividad de esta enzima con el proceso enzimático catalizado por la enzima luciferasa. Este método es altamente sensible y permite cuantificar de forma muy específica la infección del VIH-1 *in vitro*.

En este caso, la prueba nos permitió definir que las nanopartículas de plata bloquearon la fusión de las líneas celulares HL2/3 y HeLa-CD4-LTR- β -gal (Figura 10) en una forma dosis dependiente. En presencia de UC781 (utilizado como control), un inhibidor de la transcriptasa inversa, la fusión no fue inhibida.

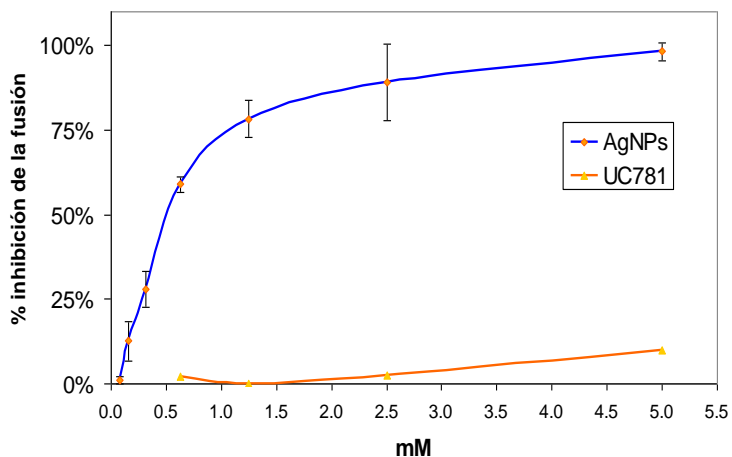


Figura 10. Prueba basada en la fusión celular de células HL2/3 y HeLa-CD4-LTR- β -gal. Ambas líneas celulares fueron mezcladas e incubadas en presencia de diluciones seriadas de nanopartículas de plata y UC781. La prueba fue leída con el Beta-Glo Assay System de Promega a las 48 horas de incubación. Los puntos en la gráfica representan el promedio del triplicado \pm error estándar de la media.

Al bloquear la fusión de estas dos líneas celulares se demuestra que las nanopartículas de plata pueden impedir la fusión mediada por la interacción gp120-CD4 que se da entre el virus y la célula huésped. Este modelo permite estudiar el fenómeno de fusión sin hacer uso del virus activo, sin embargo, las siguientes pruebas se llevaron a cabo para definir de forma más específica el mecanismo de acción de las nanopartículas de plata contra el VIH-1.

7.4 Prueba del tiempo de adición

Para explorar con más detalle cuál es el blanco de la actividad antiviral de las nanopartículas de plata, se llevó a cabo una prueba del tiempo de adición. Esta prueba permite estudiar las diferentes fases del ciclo viral al utilizar como control antirretrovirales ya conocidos. Células HeLa-CD4-LTR- β -gal fueron infectadas con VIH-1. Después de la infección, se agregaron en diferentes tiempos nanopartículas de plata (10 mM) y alguno de los siguientes antirretrovirales: T-20 (2.0 μ M), AZT (20.0 μ M) o Indinavir (0.25 μ M).

Esta prueba permite definir el momento en el que el compuesto actúa sobre el ciclo de replicación viral, de tal forma que cada compuesto presenta una gráfica diferente que va de acuerdo con su mecanismo de acción. Como se muestra en la Figura 11, la actividad de las nanopartículas de plata (Fig. 11a) coincide con el T-20 (Fig. 11b), un inhibidor de fusión (observar comportamiento de ambas gráficas en las primeras horas de la infección). Tanto las nanopartículas de plata como el T-20 inhiben al menos un 75% de la infección por VIH-1 en la primera hora post-infección, sin embargo, AZT e Indinavir (Fig. 11 c y d) tienen actividad en etapas posteriores a la fusión. Este comportamiento era de esperarse, dado que AZT inhibe la actividad de la transcriptasa inversa e, Indinavir inhibe a la proteasa viral. Además, las nanopartículas de plata mantienen su actividad una vez terminado el periodo inicial de fusión (varias horas después de la infección).

Estos resultados nos indican que las nanopartículas de plata son capaces de entrar a la célula e inhibir otra fase del ciclo viral. Sin embargo, más estudios se tienen

que llevar a cabo para definir con exactitud cuáles son las etapas que también son inhibidas por las nanopartículas de plata además de la fusión.

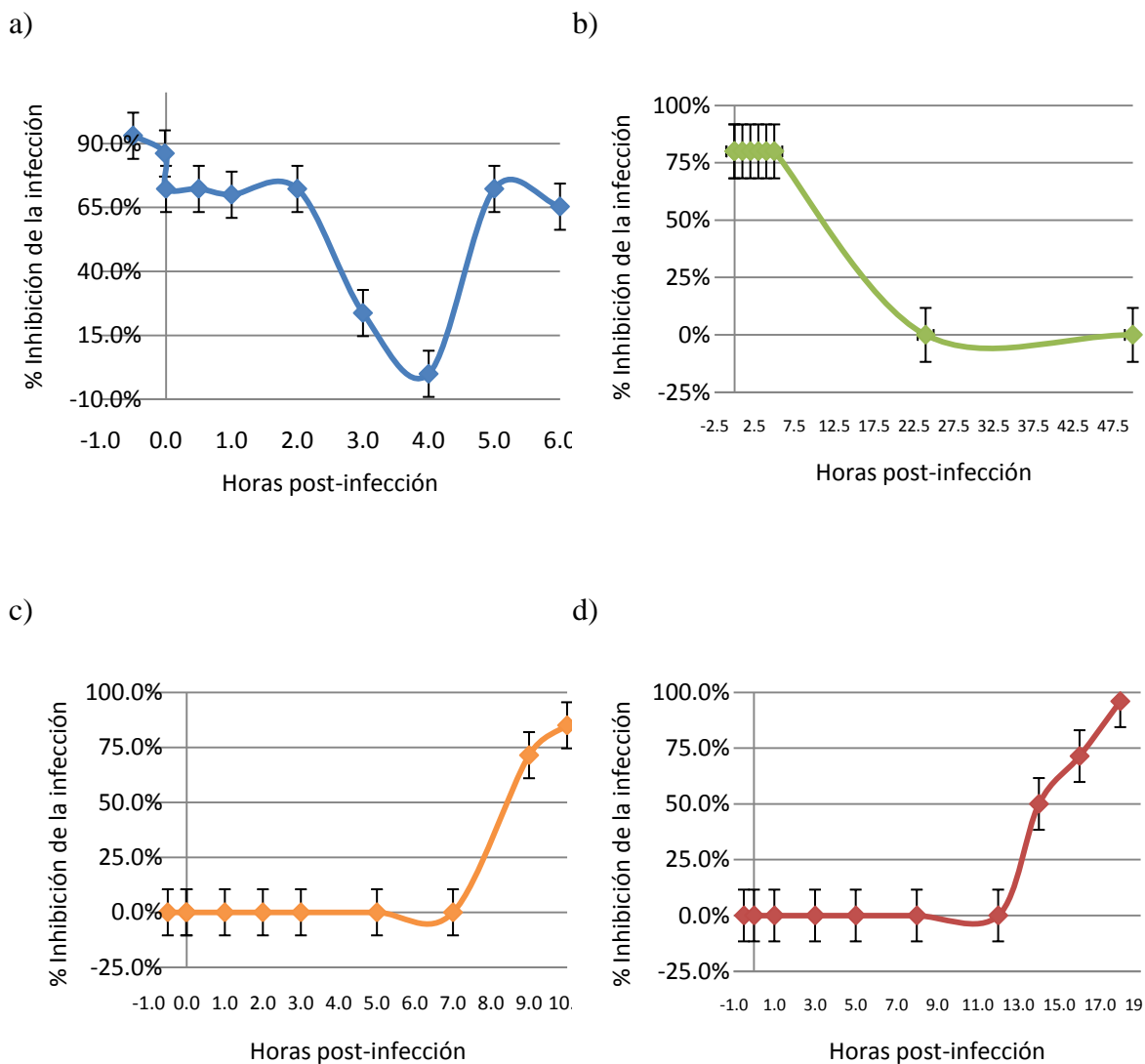


Figura 11. Pruebas del tiempo de adición. Células HeLa-CD4-LTR- β -gal fueron infectadas con VIH-1 y en diferentes momentos post-infección se agregaron (a) nanopartículas de plata (10 mM), (b) T-20 (2.0 μ M), (c) AZT (20.0 μ M), o (d) Indinavir (0.25 μ M). La infección se cuantificó 48 horas después del inicio de la prueba mediante el uso del Beta-Glo Assay System de Promega. Los puntos en la gráfica representan el

promedio de la prueba realizada por triplicado. Las barras representan la desviación estándar de dicho triplicado.

7.5 ELISA HIV-1 gp120/CD4

Para conocer cómo es que las nanopartículas de plata son capaces de inhibir la entrada del virus se utilizó un método de ELISA sándwich. El ELISA permitió conocer si las nanopartículas de plata inhiben la fusión al unirse con gp120 y evitar la interacción con CD4. La descripción de dicho método se encuentra en el apartado anterior.

Una cantidad constante de proteína gp120 soluble fue incubada por 10 minutos con diluciones seriadas de nanopartículas de plata, luego la mezcla se agregó a pozos cubiertos de CD4 y la cantidad de gp120 unida se cuantificó por colorimetría en un lector de ELISA.

Como se muestra en la Figura 12, la presencia de las nanopartículas de plata interfirió con la interacción gp120-CD4 en un modo dependiente de la dosis. Es decir, a mayor concentración de nanopartículas, mayor interferencia de la interacción gp120-CD4. Dado que se realizaron varios lavados entre cada fase de la prueba, los resultados nos indican que las nanopartículas de plata fueron capaces de unirse a la proteína gp120 (en su forma soluble), y que esta unión impidió la interacción con la proteína CD4.

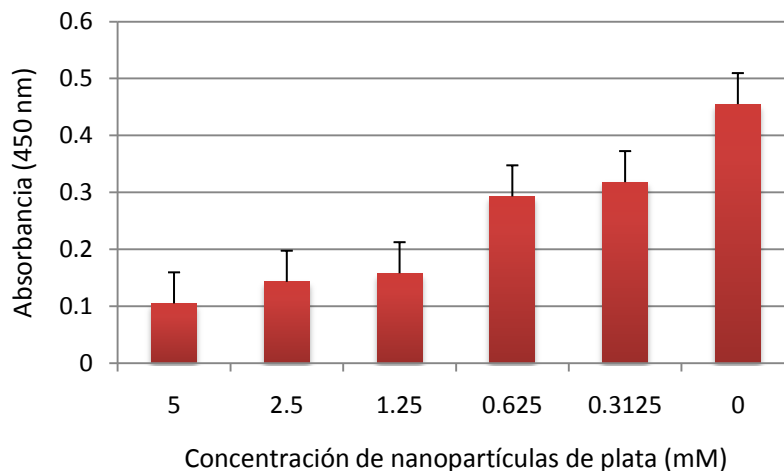


Figura 12. ELISA gp120-CD4. Diluciones seriadas de nanopartículas de plata se usaron para pre-tratar gp120 en estado soluble. La capacidad de inhibir la interacción gp120-CD4 por parte de las nanopartículas de plata se cuantificó en un ELISA sándwich. Las barras representan el promedio del triplicado.

7.6 Determinación de la actividad antiviral directa sobre el virus

Para definir si las nanopartículas de plata se unen directamente a las espículas de gp120 expuestas en la membrana viral, se trató un inóculo viral con diluciones seriadas de nanopartículas de plata, el virus expuesto fue lavado y posteriormente utilizado para infectar células HeLa-CD4-LTR- β -gal. El lavado se llevó a cabo al centrifugar el virus en varias ocasiones para eliminar las nanopartículas no unidas.

Como se observa en la Figura 13, diferentes concentraciones de nanopartículas de plata inactivaron al inóculo viral antes de que éste fuera utilizado para infectar las células. Este resultado nos indica que, efectivamente, las nanopartículas de plata son

capaces de actuar directamente sobre el virus sin necesidad de que el virus haya iniciado su ciclo de replicación.

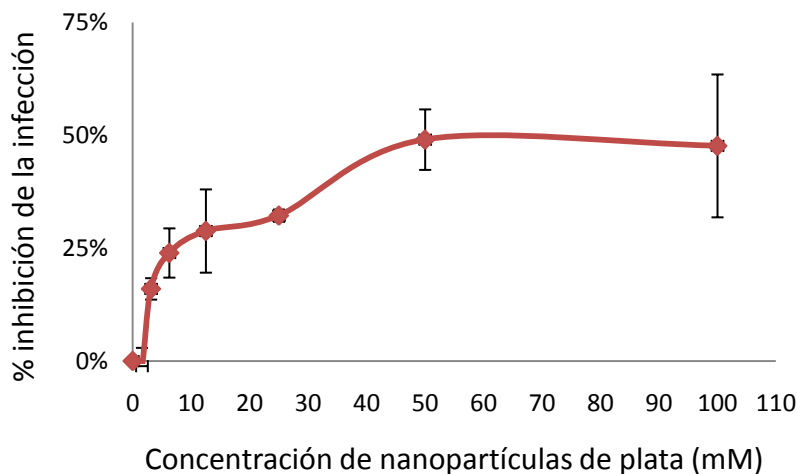


Figura 13. Efecto de las nanopartículas de plata sobre el VIH-1. Virus en su estado libre fue tratado con nanopartículas de plata, luego fue usado para infectar células HeLa-CD4-LTR- β -gal. El efecto en la infección viral se cuantificó con el Beta-Glo Assay System de Promega. Los puntos en la gráfica representan el promedio del triplicado \pm error estándar de la media.

7.7 Actividad bactericida de las nanopartículas de plata

Mediante una prueba de viabilidad celular bacteriana basada en la enzima luciferasa, se determinó el efecto tóxico de distintas dosis de nanopartículas de plata sobre las ocho cepas bacterianas con las que se trabajó. Para cada una de las bacterias, se determinó por triplicado la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración bactericida mínima (CBM), resultados que se muestran en la Tabla III.

Como es posible observar, las nanopartículas de plata fueron capaces de inhibir el crecimiento bacteriano de las ocho cepas trabajadas, aunque los valores varían de acuerdo a cada bacteria. El valor más alto observado de la CIM correspondió a la *E. Coli* 0157:H7 resistente a ampicilina (54.17 mM) y el más bajo al *Streptococcus* sp. (12.5 mM). El valor más alto de la CBM fue de 75 mM (SARM, *E. Coli* 0157:H7 resistente a Ampicilina y *P. aeruginosa* multirresistente) y el más bajo fue de 12.5 mM (*Streptococcus* sp.). *Streptococcus* sp. fue la bacteria más sensible al efecto de las nanopartículas de plata ya que fue la que presentó los valores menores de CIM y CBM, lo cual se corrobora con el radio CBM/CIM mencionado a continuación.

El radio o razón CBM/CIM es un parámetro que permite relacionar ambos valores de tal forma que refleja la capacidad bactericida del compuesto en cuestión. Un valor distante de 1 ($CBM \gg CIM$) indica que se requiere una gran cantidad de compuesto para lograr el efecto bactericida y que el compuesto se podría considerar un agente bacteriostático o que la bacteria es resistente o tolerante (Galante *et al.*, 1986). En este caso, las nanopartículas de plata tuvieron un efecto bactericida sobre las ocho cepas bacterianas ya que los valores del radio CBM/CIM son pequeños (todos menores a 3.6). La bacteria más susceptible fue el *Streptococcus* sp. y la menos susceptible fue el *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (ambas Gram positivas). Comparando estos resultados con el rango que se maneja para la vancomicina en el *S. aureus*, donde la tolerancia se define como un radio $M / MI \leq 2$ o 1 se corrobora que ninguna de las cepas es tolerante ni resistente a nanopartículas de plata (Velazquez-Meza, 2005).

Tabla III. Concentración inhibitoria mínima (CIM) y concentración bactericida mínima (CBM) de nanopartículas de plata para ocho cepas bacterianas.

	CIM (mM)*	CBM (mM)	Radio CBM/CIM
SARM	20.83 (\pm 4.17)	75.00 (\pm 25.0)	3.6
<i>S. aureus</i>	37.50 (\pm 12.5)	58.33 (\pm 22.05)	1.6
<i>S. pyogenes</i> / Eritromicina	33.33 (\pm 8.33)	50.00 (\pm 0.0)	1.5
<i>Streptococcus</i> sp.	12.50 (\pm 0.0)	12.50 (\pm 0.0)	1.0
<i>E. coli</i> 0157:H7 / Ampicilina	54.17 (\pm 25.35)	75.00 (\pm 25.0)	1.4
<i>E. coli</i>	45.83 (\pm 27.32)	58.33 (\pm 22.05)	1.3
<i>P. aeruginosa</i> / MR	29.17 (\pm 11.02)	75.00 (\pm 25.0)	2.6
<i>P. aeruginosa</i>	29.17 (\pm 11.02)	50.00 (\pm 25.0)	1.7

* Se muestran los valores de la media junto con el error estándar de la media. Las pruebas se realizaron por triplicado en microdilución en placa, con una concentración de bacterias de 10^5 UFC/mL. La viabilidad bacteriana se cuantificó por una prueba dependiente de la luciferasa. (SARM: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina) (MR: multirresistente)

En la Tabla IV se agrupan los valores promedio de la CIM y la CBM mostradas en la Tabla III para poder observar mejor diferencias y similitudes entre los grupos. El radio CBM/CIM promedio del total de las bacterias es 1.7, lo cual indica que las nanopartículas de plata tienen un efecto bactericida y no bacteriostático. La CIM y la

CBM de las bacterias Gram positivas son un poco menores que las de las bacterias Gram negativas, por lo que se requiere una mayor cantidad de nanopartículas de plata para alcanzar el efecto inhibitorio o bactericida en las negativas. El radio CBM/CIM de las Gram negativas es menor que el de las Gram positivas, es decir, a pesar de que se requiera una mayor dosis de nanopartículas de plata para inhibir a las bacterias Gram negativas, la dosis que se utiliza es más efectiva. A pesar de estas diferencias, no existe una diferencia estadística significativa entre los valores promedio de las CIM ($P = 0.162$) y CBM ($P = 0.326$) de las bacterias Gram positivas y negativas, es decir, las nanopartículas de plata son de amplio espectro.

Las bacterias resistentes a antibióticos mostraron ser un poco menos susceptibles al efecto bactericida de las nanopartículas de plata en comparación con las bacterias no resistentes, a pesar de ello, no se encontró diferencia significativa entre los valores promedio de las CIM ($P = 0.766$) y CBM ($P = 0.114$) de las bacterias resistentes y no resistentes. En estas circunstancias, no es posible relacionar el efecto de las nanopartículas de plata o su mecanismo de acción con las particularidades estructurales que le confieren la resistencia a antibióticos a las bacterias.

Tabla IV. Concentración inhibitoria mínima (CIM) y concentración bactericida mínima (CBM) promedio de nanopartículas de plata para ocho cepas bacterianas.

	CIM promedio	CBM promedio	Radio CBM/CIM
Total	32.81* (\pm 4.69)	56.77 (\pm 7.38)	1.7
Gram +	26.04 (\pm 5.7)	48.96 (\pm 13.22)	1.9
Gram -	39.58 (\pm 6.25)	64.58 (\pm 6.25)	1.6
Resistentes	34.38 (\pm 7.09)	68.75 (\pm 6.25)	2
No resistentes	31.25 (\pm 7.12)	44.79 (\pm 10.94)	1.4

* Valores en mM. Se muestran los valores de la media junto con el error estándar de la media.

7.8 Efecto de las nanopartículas de plata en el crecimiento bacteriano

La actividad bactericida de distintas dosis de nanopartículas de plata (12.5 mM, 25 mM, 50 mM, 100) se comparó entre las diferentes bacterias con base en curvas de muerte bacteriana. La dosis de 12.5 mM se encuentra 2.6 veces por debajo de la CIM de las ocho bacterias y la de 100 mM 3 veces por arriba. Mediante las curvas de muerte bacteriana se estableció la viabilidad bacteriana posterior a distintos tratamientos, la capacidad inhibitoria de cada uno de los mismos y, el tiempo necesario para lograr un efecto inhibitorio o bactericida.

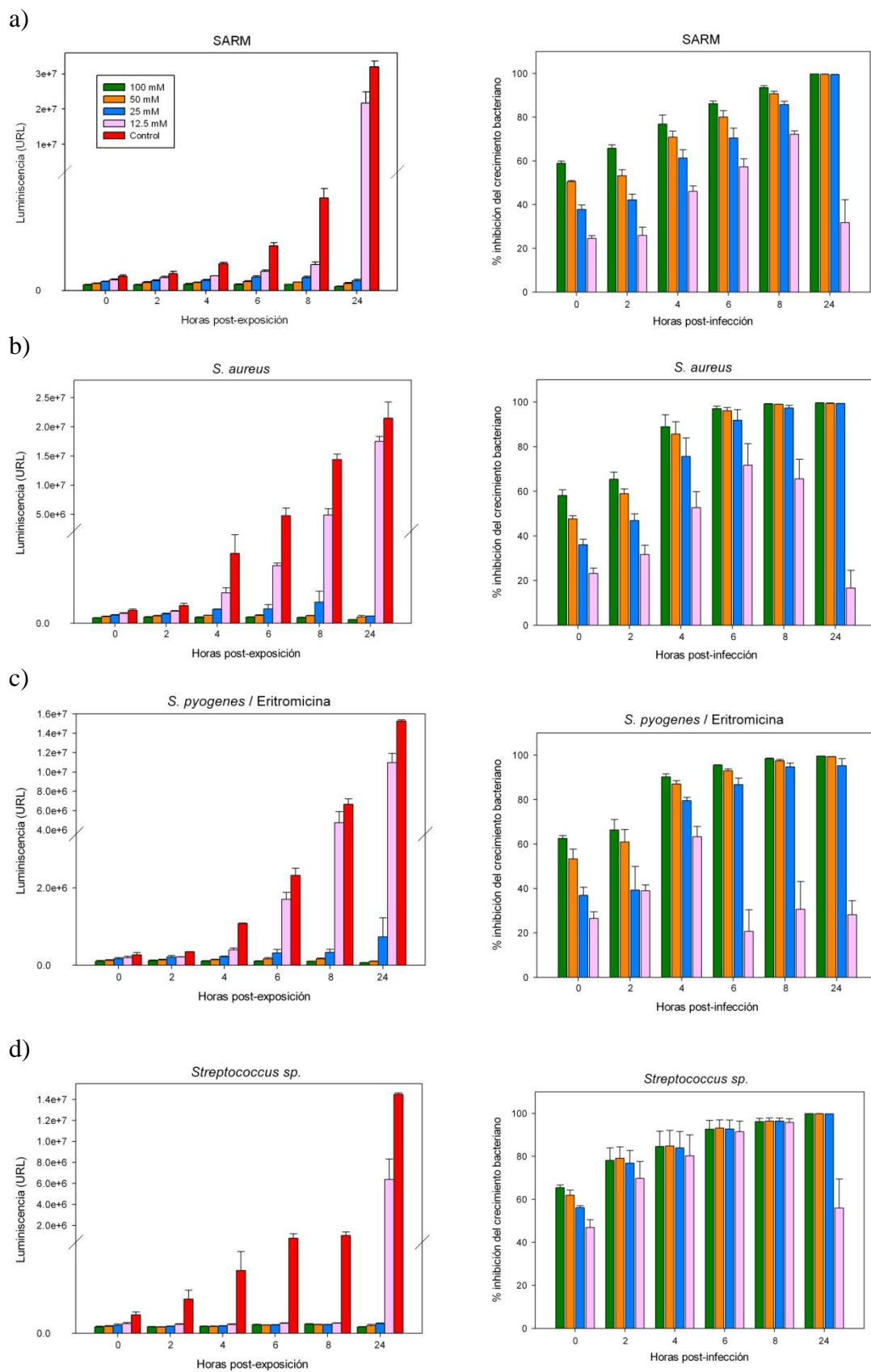
Como se muestra en las curvas de muerte bacteriana de la Figura 15, las curvas de crecimiento llegaron a su pico máximo (fase estacionaria) a las 24 horas de incubación. La *Pseudomonas aeruginosa* (h) y la *E. coli* (f) presentaron curvas de crecimiento cortas, ya que el punto máximo de crecimiento fue a las 8 h y a las 24 h la población había decaído.

Todos los tratamientos de nanopartículas de plata afectaron la forma de crecimiento de las bacterias. Dicho efecto fue proporcional a la dosis, siendo 100 mM la dosis más efectiva (la población de bacterias no se recuperó) y, 12.5 mM la dosis menos efectiva (la mayoría de las bacterias se recuperaron a las 24 horas de incubación). Este efecto de las nanopartículas de plata se ilustra de forma más clara en las gráficas de inhibición del crecimiento bacteriano (Figura 15), donde a 100 mM se tiene la mayor capacidad inhibitoria y a 12.5 mM se tiene el menor porcentaje de inhibición en todos los tiempos muestreados.

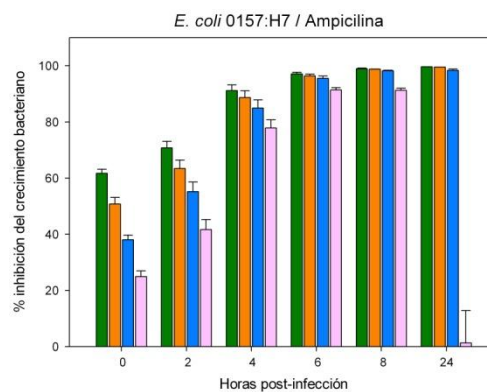
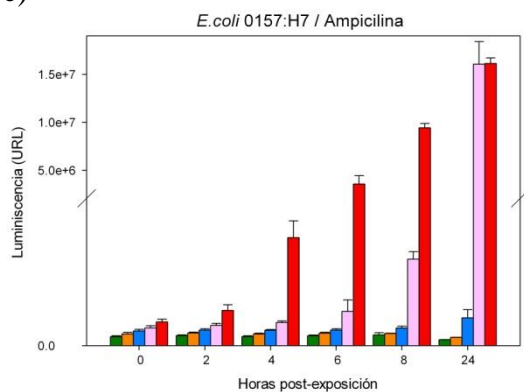
Las gráficas de inhibición del crecimiento bacteriano permiten observar el porcentaje de inhibición en cada momento del proceso de crecimiento de la población bacteriana expuesta a distintas dosis de nanopartículas. En todos los casos, las nanopartículas de plata tuvieron un efecto inhibitorio inicial (aunque no total) desde el tiempo 0 de exposición, efecto que es proporcional a la dosis de nanopartículas y al tiempo de exposición, es decir, entre mayor es la dosis, mayor es el porcentaje de inhibición en todos los tiempos y, entre mayor es el tiempo de exposición, mayor es el efecto. En el caso del tratamiento de 12.5 mM, el efecto inhibitorio disminuye a las 24 horas, ya que es el momento en el que la población de bacterias se recuperó (comparar con curva de muerte bacteriana).

Las nanopartículas de plata no fueron capaces de inhibir el 100% del crecimiento bacteriano al primer contacto con las bacterias, es decir, su efecto inhibitorio no es inmediato. Sin embargo, en bacterias como *Streptococcus sp.* y *E. coli*, este efecto es superior al 60% de inhibición con sólo el primer contacto con 50 mM, que es la más cercana a la CBM promedio (Tabla 2). En promedio, se observó una inhibición en tiempo 0 del 55.67% (± 3.02) a 50 mM y de 62.33% (± 1.30) a 100 mM para todas las bacterias.

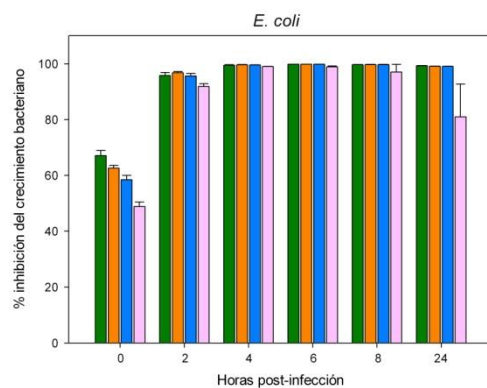
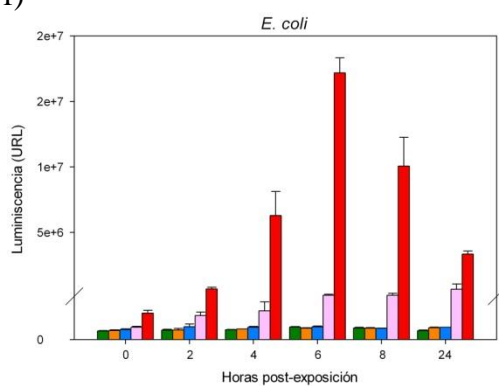
Además, cada una de las ocho bacterias respondió de forma diferente a los distintos tratamientos en los diferentes tiempos. Por ejemplo, a la dosis de 50 mM, el 100% de inhibición se logró en *S. aureus* a las 24 h de exposición (Figura 15a), en SARM a las 8 h (Figura 15b), en *S. pyogenes* resistente a eritromicina a las 8 h (Figura 15c), en *Streptococcus sp.* a las 6 h (Figura 15d), en *E. coli* 0157:H7 resistente a ampicilina a las 8 h (Figura 15e), en *E. coli* a las 4 h (Figura 15f), en *P. aeruginosa* MR a las 8 h (Figura 15g) y, en *P. aeruginosa* a las 4 h (Figura 15h). Para las 8 cepas tratadas, se requiere una dosis mínima de 50 mM de nanopartículas de plata para lograr la CBM en aproximadamente 8.45 h. Si se aumenta la dosis, se obtendrá un efecto inhibitorio en un plazo más corto.



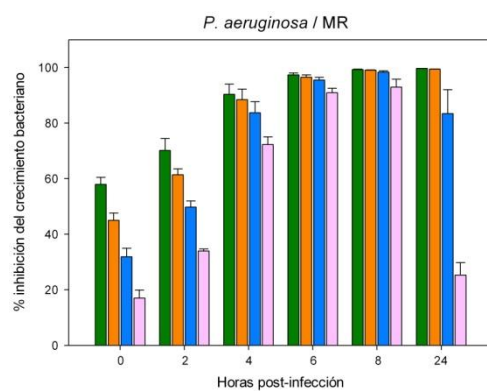
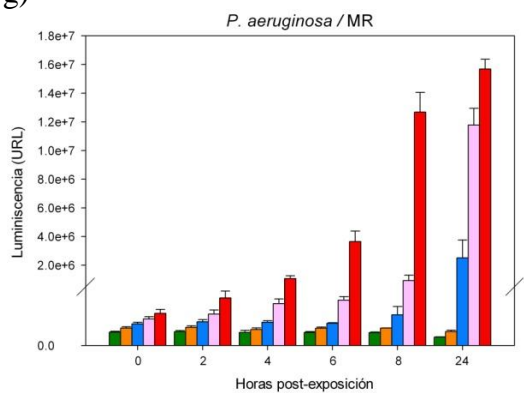
e)



f)



g)



h)

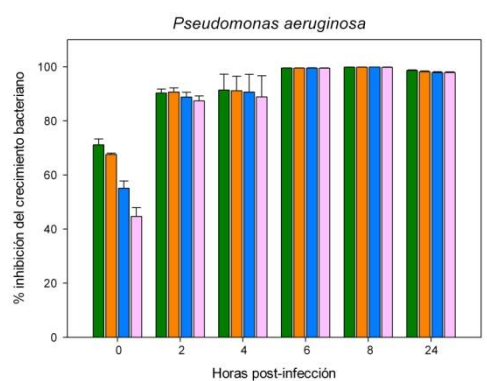
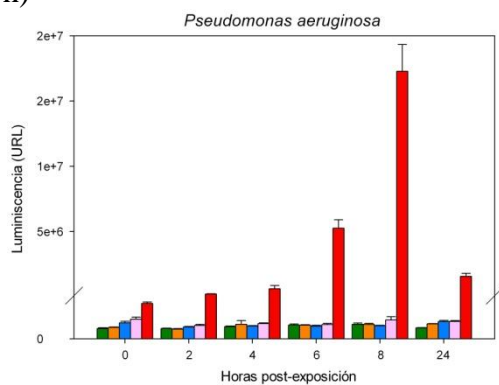


Figura 14. Curvas de muerte bacteriana y gráficas de inhibición del crecimiento. Las ocho cepas bacterianas fueron expuestas a distintas dosis de nanopartículas de plata en distintos tiempos (0, 2, 4, 6, 8 y 24 h de exposición). Las barras muestran los valores de la media junto con el error estándar de la media. Las pruebas se realizaron por triplicado en microdilución en placa, con una concentración inicial de bacterias de 10^5 UFC/mL. La viabilidad bacteriana se cuantificó por una prueba dependiente de la luciferasa descrita en Materiales y métodos. La clave de los colores es la siguiente: control (rojo), 12.5 mM (rosa), 25 mM (azul), 50 mM (naranja) y 100 mM (verde).

7.9 Desarrollo de bacterias resistentes a nanopartículas de plata

Para estudiar el mecanismo de acción de las nanopartículas de plata en bacterias, se desarrollaron cepas resistentes a estos compuestos de plata. Se usó a la bacteria *S. aureus* como modelo para el desarrollo de la cepa resistente (NPP^R). Una cepa de *S. aureus* fue cultivada en agar Mueller Hinton preparado con diferentes dosis de nanopartículas de plata. Se inició cultivando las bacterias en las dosis más bajas y poco a poco la dosis se fue aumentando. Se logró cultivar bacterias hasta una dosis similar a su CIM, dosis a la cual se esperaba que las bacterias no crecieran. Una vez desarrolladas las bacterias NPP^R, se llevó a cabo el análisis de su perfil de resistencias mediante la prueba de Kirby-Bauer y se comparó con el perfil de las bacterias sensibles a nanopartículas de plata (NPP^S). En teoría, se esperaba que las NPP^R desarrollaran algún cambio para volverse resistentes a las nanopartículas de plata, y este cambio podría reflejarse en un cambio en su perfil de resistencias a antibióticos comunes.

Después de realizada la prueba de Kirby-Bauer, se encontraron diferencias entre la cepa NPP^R y la NPP^S. En la Tabla V se muestra el perfil de resistencias, siendo la resistencia a Cefuroxima el único cambio detectado en esta prueba.

Tabla V. Perfil de resistencias de cepa resistente a nanopartículas de plata (NPP^R) y cepa sensible a nanopartículas de plata (NPP^S).

Antibiótico	NPP ^R	NPP ^S
Ampicilina	R	R
Ceftazidima	R	R
Cefuroxima	R	S
Dicloxacilina	R	R
Eritromicina	R	R
Gentamicina	R	R
Pefloxacina	R	R
Penicilina	R	R

* R, resistente; S, sensible

8. DISCUSIÓN

El surgimiento de microorganismos emergentes ha impactado de forma considerable al sector salud a nivel mundial. Microorganismos como el virus de inmunodeficiencia humana y bacterias resistentes a antibióticos han generado tantos problemas que se encuentran dentro de las listas de los principales problemas de salud. Ambos son microorganismos que no se han podido erradicar de la población, y cuya diseminación no se ha podido detener.

A pesar del enorme esfuerzo en investigación que se ha hecho y de las decenas de los antirretrovirales que podemos encontrar en el mercado, la infección causada por VIH no tiene cura y la pandemia sigue en constante aumento (Duesberg, 1989). Un factor muy importante que no ha permitido que la pandemia de VIH/SIDA se haya podido detener es el rápido desarrollo de cepas resistentes a los diferentes antirretrovirales (Al-Jabri and Alenzi, 2009). Por otra parte, las bacterias resistentes a antibióticas están fuera de control tanto en el ambiente nosocomial como en la comunidad. El uso indiscriminado e inadecuado de antibióticos y las incorrectas medidas de higiene en hospitales permiten el surgimiento de nuevas resistencias y la difusión de las existentes (Rutala *et al.*, 1997). Los problemas de salud causados tanto por el VIH como por las bacterias resistentes a antibióticos nos impulsaron a la búsqueda de nuevos compuestos que puedan ser utilizados para el tratamiento y/o la prevención de la infección por estos microorganismos.

Las nanopartículas de plata son agentes cuya actividad antimicrobiana previamente se definió contra un amplio grupo de bacterias y contra el VIH. Estas pruebas se realizaron en condiciones netamente *in vitro*, por lo que es necesario llevar a cabo estudios en modelo animal para determinar el efecto tóxico de las nanopartículas de plata y su posible aplicación contra las infecciones. Además, para poder llegar a un nivel clínico de estudio, hacen falta estudios del mecanismo de acción de las nanopartículas de plata contra los microorganismos mencionados. En la presente tesis, por lo tanto, se pretende estudiar el mecanismo de acción de las nanopartículas de plata contra el VIH y contra diferentes bacterias resistentes a antibióticos.

En el caso del VIH, en una publicación del 2005 hecha por nuestro grupo de investigación se definió que las nanopartículas de plata tienen la capacidad de inhibir la infección por VIH *in vitro* a dosis no tóxicas para la célula. Además, se postuló que las nanopartículas de plata podrían inhibir la infección al unirse a las espículas de gp120 localizadas en la membrana viral (Elechiguerra *et al.*, 2005). Sin embargo, no se definió con claridad su mecanismo de acción. ¿Realmente es gp120 su sitio blanco de acción? ¿Cómo es que actúan las nanopartículas de plata sobre el VIH?

Inicialmente, se realizó una prueba para determinar la capacidad de las nanopartículas de plata de inhibir diferentes cepas virales, tanto T- como M-trópicas. Estas cepas se diferencian en su capacidad de reconocer los receptores de quimiocinas CCR5 y CXCR4 respectivamente (Spira *et al.*, 2003). En la región V3 de la glicoproteína gp120 se encuentra una secuencia de aminoácidos donde se da el reconocimiento de los correceptores (Chavda *et al.*, 1994). Dado que las nanopartículas de plata fueron capaces de inhibir a todas las cepas de forma similar (Tabla II), no se

puede decir que reconozcan una secuencia de V3 en forma particular. Dados estos resultados, no podríamos afirmar que las nanopartículas de plata inhiban la infección por VIH-1 al ser antagonistas de los correceptores (Borkow and Lapidot, 2005).

Los resultados de la prueba basada en la fusión celular (Figura 10) y el ELISA HIV-1 gp120/CD4 (Figura 12) nos indican que las nanopartículas de plata se unen a la gp120 para inhibir la interacción con el receptor CD4, lo cual resulta en la inhibición de la primera etapa del ciclo viral. Estos resultados corroboran lo propuesto por Elechiguerra *et al.* en el 2005, donde por microscopía electrónica de transmisión se observó cómo las nanopartículas de plata se unían a lo que se pensaba eran los trímeros de gp120 (Elechiguerra *et al.*, 2005).

La comparación en las secuencias de diferentes aislados de VIH indican que la gp120 es altamente variable entre los aislados y, que esta variabilidad no es uniforme en la proteína, llevando a la designación de regiones conservadas (C) y regiones hipervariables (V). La gp120 es una proteína con cinco regiones hipervariables y cinco regiones constantes, nueve puentes disulfuro altamente conservados, y veinticuatro sitios de N-glicosilación (Freed and Martin, 1995). De hecho, la gp120 está altamente glicosilada; aproximadamente la mitad de su masa molecular está compuesta por oligosacáridos. El sitio de interacción con CD4 se encuentra en las regiones C3 y C4 (Kwong *et al.*, 1998), sitio donde posiblemente las nanopartículas se unan. En este sitio se encuentran L125, W427, G473, E370, D368, N280 y D457, los definen el tipo de interacción con CD4 (Wyatt and Sodroski, 1998). Dados los resultados encontrados, se esperaría que las nanopartículas de plata se unieran a esta región, bloqueando así la interacción con CD4.

Se sabe que los iones de plata se unen a grupos sulfidrilos, desnaturalizando las proteínas al reducir los puentes disulfuro ($S-S \rightarrow S-H + H-S$) (McDonnell, 2007). Dadas estas propiedades de la plata y asumiendo que las nanopartículas de plata tienen propiedades similares, podemos proponer que las nanopartículas de plata se unen a los dos puentes disulfuro que se encuentran localizados en la sección de la proteína gp120 encargada de la interacción con CD4 (Lekutis *et al.*, 1992; Leonard *et al.*, 1990), lo cual también fue propuesto por Elechiguerra *et al* (2005).

Con la prueba del tiempo de adición (Figura 11) se confirmó que, efectivamente, las nanopartículas de plata son inhibidores de la primera fase del ciclo viral. Además, se vio que las nanopartículas de plata tienen la capacidad de actuar sobre fases posteriores del ciclo de replicación, como la transcripción inversa o la integración. Desde hace décadas se ha observado que los iones de plata actúan no sólo a nivel de grupos sulfidrilo, sino también de grupos fosfato y de ácidos nucleicos (Starodub and Trevors, 1989). Estas propiedades podrían hacer que las nanopartículas de plata actuaran a nivel de proteínas del ciclo de replicación del VIH que actúan dentro de la célula.

Para definir si las nanopartículas de plata se unen directamente a las espículas de gp120 expuestas en la membrana viral, se trató un inóculo viral con diluciones seriadas de nanopartículas de plata (Figura 13). Los resultados obtenidos nos indican que, efectivamente, las nanopartículas de plata son capaces de actuar directamente sobre el virus sin necesidad de que el virus haya iniciado su ciclo de replicación. La capacidad de inhibir la infección transmitida por esta vía hace a las nanopartículas de plata un agente antiviral más efectivo (Borkow *et al.*, 1997).

Por otra parte, por ensayos *in vitro* se estudiaron las propiedades antibacterianas de nanopartículas de plata sobre bacterias resistentes a los antibióticos que constituyen una amenaza constante para la comunidad y cuya incidencia en los centros hospitalarios ha ido aumentando en los últimos años.

Las nanopartículas de plata demostraron ser agentes antibacterianos con actividad sobre las ocho cepas trabajadas (cuatro resistentes y cuatro no resistentes). Su eficacia, reflejada por un ratio CBM/CIM menor a 3.6, indica que las nanopartículas son sustancias bactericidas y no bacteriostáticas, lo cual confirma lo encontrado para otros compuestos de plata como el nitrato y la sulfadiazina.

Las bacterias Gram negativas y las Gram positivas respondieron de diferente forma al efecto de las distintas dosis de nanopartículas, sin embargo, no hubo diferencia significativa entre la CIM y CBM promedio de los dos grupos. Estos resultados corroboran lo encontrado por otros grupos de investigación donde se confirma que las nanopartículas de plata son agentes de amplio espectro (Shrivastava *et al.*, 2007; Yoon *et al.*, 2008). Shrivastava, *et al.*, de forma interesante, propusieron que las cargas positivas de las nanopartículas de plata interactúan con el lipopolisacárido (LPS) de las Gram negativas con mayor afinidad que con la pared celular de las Gram positivas, la cual tiene menos sitios de interacción con cargas positivas, es más rígida y no permite que entren las nanopartículas (Shrivastava *et al.*, 2007). Sin embargo, Shrivastava *et al.*, sólo trabajaron con una bacteria Gram positiva, el *Staphylococcus aureus*, para corroborar esta teoría. Habría que realizar pruebas con una gama más amplia de bacterias y de otros microorganismos para delimitar los alcances de la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de plata y proponer subsecuentes aplicaciones.

La capacidad infectiva de las bacterias dada por su capacidad de rápida reproducción se vio afectada por estos compuestos de plata, los cuales fueron capaces de inhibir el crecimiento bacteriano en una forma dependiente de la dosis y del tiempo de exposición. El efecto inhibitorio se observó desde el primer contacto, alcanzando un 55.67% a 50 mM, dosis que después de 24 h de incubación se convierte en la CBM. No se requiere de un prolongado tiempo de exposición para que las nanopartículas de plata tengan actividad, pero sí se necesitan al menos 9 horas para lograr eliminar el total de la población bacteriana. De igual forma, Yamanaka, *et al.* encontraron que iones de plata tardaban alrededor de 14 horas en reducir la población de 10^7 a 10^1 UFC/mL (Yamanaka *et al.*, 2005). Como Pal, *et al.* mencionan, la acción de las nanopartículas de plata podría ser similar a la de los iones de plata (Pal *et al.*, 2007). De hecho, aún no se ha aclarado el mecanismo mediante el cual estos compuestos logran su efecto bactericida, si lo hacen como entidades particuladas *per se* o como proveedores de iones de plata.

Para estudiar el mecanismo de acción sobre bacterias, se desarrollaron cepas resistentes a nanopartículas de plata. Se usó a la bacteria *Staphylococcus aureus* como modelo para el desarrollo de la cepa resistente a plata (NPP^R). Después de la prueba de Kirby-Bauer, se encontró una diferencias entre la cepa NPP^R y la NPP^S, un cambio en la respuesta a una cefalosporina (Tabla 5). Este cambio es un indicador de que un posible sitio de acción de las nanopartículas sobre las bacterias son los procesos de síntesis de la pared bacteriana, el cual es el sitio de acción de las cefalosporinas.

El tener efecto en bacterias de distintos tipos y con un variado perfil de resistencias, el tiempo mínimo de exposición necesario para alcanzar el efecto

antibacteriano, la poca resistencia bacteriana que se desarrolla a la plata (Ip *et al.*, 2006) y el potencial de la plata para ser utilizada como parte de polímeros (Kong and Jang, 2008; Kumar *et al.*, 2008), convierten a las nanopartículas de plata en elementos con gran potencial para la elaboración de múltiples productos que podrían ser utilizados para evitar la propagación de microorganismos resistentes en el ambiente hospitalario, como filtros (Jain and Pradeep, 2005b), recubrimientos (Shrivastava *et al.*, 2007), polímeros para construir equipo médico (Furno *et al.*, 2004), máscaras (Li *et al.*, 2006), y gasas antimicrobianas para las quemaduras (Burd *et al.*, 2007; Dunn and Edwards-Jones, 2004). Un buen complemento a las ventajas del uso de la plata es su baja toxicidad y mínimos efectos secundarios que se han reportado posteriores a su ingesta (Chopra, 2007), siendo la argiria la única consecuencia notable y relacionada solamente con el aspecto estético (Drake and Hazelwood, 2005).

Como se puede ver en nuestros resultados, las nanopartículas de plata actúan tanto sobre VIH como bacterias resistentes a antibióticos, por lo que se les podría considerar un agente de amplio espectro. Esto coincide con lo expuesto por otros grupos de investigación donde también se demostró que las nanopartículas de plata actúan sobre una gran variedad de microorganismos (Ayala-Núñez *et al.*, 2009; Lara *et al.*, 2009).

9. CONCLUSIONES

El principal objetivo de esta tesis fue el de estudiar el mecanismo de acción mediante el cual las nanopartículas de plata llevan a cabo su actividad antimicrobiana. En lo particular, nos enfocamos a la actividad antiviral contra el VIH-1 y a la actividad antibacteriana contra bacterias resistentes a antibióticos de las nanopartículas de plata. Se trabajó con este tipo de microorganismos dado que son de los principales causantes de problemas en el área de la salud.

Nuestro estudio estuvo inicialmente enfocado al análisis del VIH-1. Mediante diversos ensayos *in vitro*, se analizó la actividad de las nanopartículas de plata contra diferentes cepas de VIH-1. Además, se trabajaron con modelos celulares y de ELISA que nos permitieron realizar un estudio más detallado del mecanismo de acción de las nanopartículas. Partimos de la hipótesis de que, mediante su interacción con gp120, las nanopartículas de plata inhiben la infección al impedir la entrada del virus a la célula. Nuestros resultados nos indicaron que, efectivamente, las nanopartículas de plata actúan a nivel de la gp120 para impedir la entrada del virus. Al parecer, se unen a gp120 para impedir la interacción con el receptor celular CD4. Además, observamos que las nanopartículas de plata tienen otros sitios de acción en el ciclo de replicación viral. Finalmente, pudimos demostrar que las nanopartículas de plata pueden actuar directamente sobre el virus.

Por otra parte, las nanopartículas de plata resultaron ser efectivos agentes antibacterianos capaces de inhibir el crecimiento de diversas bacterias resistentes a antibióticos (tanto Gram positivas como Gram negativas). Siguiendo con nuestra hipótesis, se desarrolló un modelo bacteriano que permitió estudiar el mecanismo de acción de las nanopartículas de plata. Las cepas NPP^R nos indicaron que las nanopartículas de plata actúan a nivel de membrana de las bacterias.

En conclusión, las nanopartículas de plata son agentes antivirales y antibacterianos que efectivamente pueden ser usados contra el VIH-1 y bacterias resistentes a antibióticos, patógenos emergentes de gran importancia. Su mecanismo de acción reside en su capacidad de interactuar con proteínas presentes en cualquiera de estos microorganismos, inhibiendo así algún proceso y actividad esencial para que la infección se lleve a cabo. En el caso del VIH, las nanopartículas impiden que el virus entre a la célula al unirse a gp120. En el caso de las bacterias resistentes a antibióticos, las nanopartículas de plata interfieren con su crecimiento al unirse a proteínas que participan en el proceso de síntesis de pared celular.

LITERATURA CITADA

- Aarts, H. J., Boumedine, K. S., Nesme, X., and Cloeckert, A. 2001. Molecular tools for the characterisation of antibiotic-resistant bacteria. *Vet.Res.* 32:363-380.
- 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.
- Alliance for Microbicide Development. 2009 Alliance for Microbicide Development [internet]. Disponible en el sitio red: <http://www.microbicide.org>. [Revisado el 5-7-2008]
- Angus, B. L. 1983. Outer membrane porin proteins F, P, and D1 of *Pseudomonas aeruginosa* and PhoE of *Escherichia coli*: chemical cross-linking to reveal native oligomers.
- Aracil, B. 2002. Susceptibility of strains of *Streptococcus agalactiae* to macrolides and lincosamides, phenotype patterns and resistance genes.
- Ávila, S. and Reyes, G. 2008. Virología del VIH: buscando nuevas estrategias antirretrovirales. In: 25 años de SIDA en México: Logros, desaciertos y retos, Córdoba, J. A., Ponce de León, S., and Valdespino, J. L. (eds). Instituto Nacional de Salud Pública: Cuernavaca, Mx, pp. 135-160.
- Ayala-Núñez, N. V., Lara, H. H., Ixtapan-Turrent, L., and Rodriguez-Padilla, C. 2009. Silver Nanoparticles Toxicity and Bactericidal Effect Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Nanoscale Does Matter. *NanoBiotechnology*
- 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., 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.
- Boyle, V. J., Fancher, M. E., and Ross, R. W., Jr. 1973. Rapid, modified Kirby-Bauer susceptibility test with single, high-concentration antimicrobial disks. *Antimicrob.Agents Chemother.* 3:418-424.
- Burd, A., Kwok, C. H., Hung, S. C., Chan, H. S., Gu, H., Lam, W. K., and Huang, L. 2007. A comparative study of the cytotoxicity of silver-based dressings in monolayer cell, tissue explant, and animal models. *Wound.Repair Regen.* 15:94-104.
- Bustos-Martinez, J. A., Hamdan-Partida, A., and Gutierrez-Cardenas, M. 2006. *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. *Rev Biomed* 17:287-305.
- Carmeli, Y. 1999. Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of risks associated with different antipseudomonal agents.
- Carr, H. S., Wlodkowski, T. J., and Rosenkranz, H. S. 1973. Silver sulfadiazine: in vitro antibacterial activity. *Antimicrob.Agents Chemother.* 4:585-587.
- Center, R. J., Leapman, R. D., Lebowitz, J., Arthur, L. O., Earl, P. L., and Moss, B. 2002. Oligomeric structure of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein on the virion surface. *J.Virol.* 76:7863-7867.
- Centers for Disease Control. 2004 Emerging and Re-emerging Infectious Diseases 2002-2004 [internet]. Disponible en el sitio red: http://www.cdc.gov/ncidod/id_links.htm. [Revisado el 10-10-2008]
- Centers of Disease Control and Prevention. 2009 <http://www.cdc.gov>.

- Chavda, S. C., Griffin, P., Han-Liu, Z., Keys, B., Vekony, M. A., and Cann, A. J. 1994. Molecular determinants of the V3 loop of human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp120 responsible for controlling cell tropism. *J.Gen.Virol.* 75 (Pt 11):3249-3253.
- Chopra, I. 2007. The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: a useful development or a cause for concern? *J.Antimicrob.Chemother.* 59:587-590.
- 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.
- Clapham, P. R. and McKnight, A. 2002. Cell surface receptors, virus entry and tropism of primate lentiviruses. *J.Gen.Virol.* 83:1809-1829.
- Clavel, F. and Hance, A. J. 2004. HIV drug resistance. *N.Engl.J.Med.* 350:1023-1035.
- Cunningham, M. W. 2008. Pathogenesis of group A streptococcal infections and their sequelae. *Adv.Exp.Med.Biol.* 609:29-42.
- Dai, H. L., Liu, W. Q., Xu, H., Yang, L. M., Lv, M., and Zheng, Y. T. 2009. Anti human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) agents 1. Discovery of benzyl phenyl ethers as new HIV-1 inhibitors in vitro. *Chem.Pharm.Bull.(Tokyo)* 57:84-86.
- Dhawan, D. and Mayer, K. H. 2006. Microbicides to prevent HIV transmission: overcoming obstacles to chemical barrier protection. *J.Infect.Dis.* 193:36-44.
- Diederens, B. M., van, Duijn, I, Willemsse, P., and Kluytmans, J. A. 2006. In vitro activity of daptomycin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, including heterogeneously glycopeptide-resistant strains. *Antimicrob.Agents Chemother.* 50:3189-3191.
- Doms, R. W. and Moore, J. P. 2000. HIV-1 membrane fusion: targets of opportunity. *J.Cell Biol.* 151:F9-14.
- Drake, P. L. and Hazelwood, K. J. 2005. Exposure-related health effects of silver and silver compounds: a review. *Ann.Occup.Hyg.* 49:575-585.

- Duesberg, P. H. 1989. Human immunodeficiency virus and acquired immunodeficiency syndrome: correlation but not causation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86:755-764.
- Dunn, K. and Edwards-Jones, V. 2004. The role of Acticoat with nanocrystalline silver in the management of burns. *Burns* 30 Suppl 1:S1-S9.
- 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-
- Eron, J. J. and Hogan, C. M. 2002. Entry and Fusion Inhibitors: and Update. *The PRN Notebook* 7:16-22.
- Fagerlund, A., Lindback, T., Storset, A. K., Granum, P. E., and Hardy, S. P. 2008. *Bacillus cereus* Nhe is a pore-forming toxin with structural and functional properties similar to the ClyA (HlyE, SheA) family of haemolysins, able to induce osmotic lysis in epithelia. *Microbiology* 154:693-704.
- Feng, Q. L., Wu, J., Chen, G. Q., Cui, F. Z., Kim, T. N., and Kim, J. O. 2000. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J.Biomed Mater.Res.* 52:662-668.
- Freed, E. O. and Martin, M. A. 1995. The role of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins in virus infection. *J.Biol.Chem.* 270:23883-23886.
- Freed, E. O. and Martin, M. A. 2001. HIVs and their Replication. In: *Fields Virology*, Knipe, D. M. and Howley, P. M. (eds). Lippincott Williams and Wilkins: Philadelphia, pp. 1971-1990.
- Freshney, R. I. 2000. <[13] Book Title>. Wiley-Liss, Inc.: USA, pp.
- Furno, F., Morley, K. S., Wong, B., Sharp, B. L., Arnold, P. L., Howdle, S. M., Bayston, R., Brown, P. D., Winship, P. D., and Reid, H. J. 2004. Silver nanoparticles and polymeric medical devices: a new approach to prevention of infection? *J.Antimicrob.Chemother.* 54:1019-1024.
- Galante, D., Esposito, S., and Barba, D. 1986. Antibacterial activity of six beta-lactams and six quinolones against urinary gram negative bacteria. *Boll.Ist.Sieroter.Milan* 65:361-367.

- Global Campaign for Microbicides. 2008 A comparison of the potential impact of microbicides in two contrasting African settings, Johannesburg, South Africa and Cotonou, Benin [internet]. Disponible en el sitio red: <http://www.global-campaign.org/clientfiles/LSHTM-Benin-SA.pdf>. [Revisado el 5-6-2008]
- Gupta, L. K., Jindal, R., Beri, H. K., and Chhibber, S. 1992. Virulence of silver-resistant mutant of *Klebsiella pneumoniae* in burn wound model. *Folia Microbiol.(Praha)* 37:245-248.
- Hansasuta, P. and Rowland-Jones, S. L. 2001. HIV-1 transmission and acute HIV-1 infection. *British Medical Bulletin* 58:109-127.
- Hardy, K. J., Hawkey, P. M., Gao, F., and Oppenheim, B. A. 2004. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in the critically ill. *Br.J.Anaesth.* 92:121-130.
- Hart, T. K., Kirsh, R., Ellens, H., Sweet, R. W., Lambert, D. M., Petteway, S. R., Jr., Leary, J., and Bugelski, P. J. 1991. Binding of soluble CD4 proteins to human immunodeficiency virus type 1 and infected cells induces release of envelope glycoprotein gp120. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88:2189-2193.
- Hoyme, U. B. 1993. Clinical Significance of Crede's Prophylaxis in Germany at Present. *Infect.Dis.Obstet.Gynecol.* 1:32-36.
- Iañez, E. 1998 Curso de Microbiología General [internet]. Disponible en el sitio red: http://fai.unne.edu.ar/biologia/microgeneral/micro-ianez/21_micro.htm. [Revisado el 6-6-2009]
- Ip, M., Lui, S. L., Poon, V. K., Lung, I., and Burd, A. 2006. Antimicrobial activities of silver dressings: an in vitro comparison. *J.Med.Microbiol.* 55:59-63.
- Jain, P. and Pradeep, T. 2005a. Potential of silver nanoparticle-coated polyurethane foam as an antibacterial water filter. *Biotechnol.Bioeng.* 90:59-63.
- Jain, P. and Pradeep, T. 2005b. Potential of silver nanoparticle-coated polyurethane foam as an antibacterial water filter. *Biotechnol.Bioeng.* 90:59-63.
- Jiang, S., Lu, H., Liu, S., Zhao, Q., He, Y., and Debnath, A. K. 2004. N-substituted pyrrole derivatives as novel human immunodeficiency virus type 1 entry

inhibitors that interfere with the gp41 six-helix bundle formation and block virus fusion. *Antimicrob.Agents Chemother.* 48:4349-4359.

Joint United Nations Programme on HIV AIDS (UNAIDS). 2008. Report on the Global AIDS Epidemic.

Junker, L. M. and Clardy, J. 2007. High-throughput screens for small-molecule inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Antimicrob.Agents Chemother.* 51:3582-3590.

Kimpton, J. and Emerman, M. 1992. Detection of replication-competent and pseudotyped human immunodeficiency virus with a sensitive cell line on the basis of activation of an integrated beta-galactosidase gene. *J.Virol.* 66:2232-2239.

Kong, H. and Jang, J. 2008. Antibacterial properties of novel poly(methyl methacrylate) nanofiber containing silver nanoparticles. *Langmuir* 24:2051-2056.

Kumar, A., Vemula, P. K., Ajayan, P. M., and John, G. 2008. Silver-nanoparticle-embedded antimicrobial paints based on vegetable oil. *Nat.Mater.* 7:236-241.

Kwong, P. D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R. W., Sodroski, J., and Hendrickson, W. A. 1998. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* 393:648-659.

Lara, H. H., Ayala-Nuñez, N. V., Ixtapan-Turrent, L., and Rodriguez-Padilla, C. 2009. Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*

Lekutis, C., Olshevsky, U., Furman, C., Thali, M., and Sodroski, J. 1992. Contribution of disulfide bonds in the carboxyl terminus of the human immunodeficiency virus type I gp120 glycoprotein to CD4 binding. *J.Acquir.Immune.Defic.Syindr.* 5:78-81.

Leonard, C. K., Spellman, M. W., Riddle, L., Harris, R. J., Thomas, J. N., and Gregory, T. J. 1990. Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells. *J.Biol.Chem.* 265:10373-10382.

- 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.
- Lin, P. F., Blair, W., Wang, T., Spicer, T., Guo, Q., Zhou, N., Gong, Y. F., Wang, H. G., Rose, R., Yamanaka, G., Robinson, B., Li, C. B., Fridell, R., Deminie, C., Demers, G., Yang, Z., Zadjura, L., Meanwell, N., and Colonno, R. 2003. A small molecule HIV-1 inhibitor that targets the HIV-1 envelope and inhibits CD4 receptor binding. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100:11013-11018.
- Lok, C. N., Ho, C. M., Chen, R., He, Q. Y., Yu, W. Y., Sun, H., Tam, P. K., Chiu, J. F., and Che, C. M. 2006. Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *J.Proteome.Res.* 5:916-924.
- Magis, C. and Hernández, M. 2008. Epidemiología del SIDA en México. In: 25 años de SIDA en México: Logros, desaciertos y retos, Córdoba, J. A., Ponce de León, S., and Valdespino, J. L. (eds). Instituto Nacional de Salud Pública: Cuernavaca, Mx, pp. 101-120.
- Malhotra-Kumar, S. 2005. Macrolide- and telithromycin-resistant *Streptococcus pyogenes*, Belgium, 1999-2003.
- Markovic, I., Stantchev, T. S., Fields, K. H., Tiffany, L. J., Tomic, M., Weiss, C. D., Broder, C. C., Strebel, K., and Clouse, K. A. 2004. Thiol/disulfide exchange is a prerequisite for CXCR4-tropic HIV-1 envelope-mediated T-cell fusion during viral entry. *Blood* 103:1586-1594.
- McDonnell, G. E. 2007. Chemical Disinfection. In: Antisepsis, disinfection, and sterilization, 111-115.
- McNeil, S. E. 2005. Nanotechnology for the biologist. *J.Leukoc.Biol.* 78:585-594.
- 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.
- Neuhauser, M. M., Weinstein, R. A., Rydman, R., Danziger, L. H., Karam, G., and Quinn, J. P. 2003. Antibiotic resistance among gram-negative bacilli in US intensive care units: implications for fluoroquinolone use. *JAMA* 289:885-888.

- Neurath, A. R., Strick, N., Li, Y. Y., and Debnath, A. K. 2001. Cellulose acetate phthalate, a common pharmaceutical excipient, inactivates HIV-1 and blocks the coreceptor binding site on the virus envelope glycoprotein gp120. *BMC.Infect.Dis.* 1:17
- Neurath, A. R., Strick, N., Li, Y. Y., and Debnath, A. K. 2004. Punica granatum (Pomegranate) juice provides an HIV-1 entry inhibitor and candidate topical microbicide. *BMC.Infect.Dis.* 4:41-
- Nix, D. E., Tyrrell, R., and Muller, M. 1995. Pharmacodynamics of metronidazole determined by a time-kill assay for *Trichomonas vaginalis*. *Antimicrob.Agents Chemother.* 39:1848-1852.
- Nowak, M. A. 1995. AIDS pathogenesis: from models to viral dynamics in patients. *J.Acquir.Immune.Defic.Syndr.Hum.Retrovirol.* 10 Suppl 1:S1-S5.
- Organización Mundial de la Salud. 2009 HIV surveillance, estimations and monitoring and evaluation. [internet]. Disponible en el sitio red: <http://www.who.int/hiv/topics/me/en/index.html>. [Revisado el 5-7-2008]
- Pal, S., Tak, Y. K., and Song, J. M. 2007. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Appl.Environ.Microbiol.* 73:1712-1720.
- Panacek, A., Kvitek, L., Pucek, R., Kolar, M., Vecerova, R., Pizurova, N., Sharma, V. K., Nevecna, T., and Zboril, R. 2006. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *J.Phys.Chem.B* 110:16248-16253.
- Ponce de León, S. and Lazcano, A. 2008. La evolución del SIDA: una suma de epidemias. In: 25 años de SIDA en México: Logros, desaciertos y retos, Córdoba, J. A., Ponce de León, S., and Valdespino, J. L. (eds). Instituto Nacional de Salud Pública: Cuernavaca, Mx, pp. 17-26.
- Programa Conjunto de las Naciones Unidas para el VIH/SIDA (ONUSIDA). 2008. Report on the global AIDS epidemic 2008.
- Public Health, Seattle and King County. 2008 HIV Infogram: Update on Sexual Transmission of HIV [internet]. Disponible en el sitio red:

http://www.metrokc.gov/HEALTH/apu/infograms/hiv_transmission_0302.htm.
[Revisado el 6-6-2008]

Rangel, J. M. 2005. Epidemiology of Escherichia coli O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002.

Ricciotti, H. 2008 HIV and Women: Alarming Increases Call For Women-Controlled Prevention Tools [internet]. Disponible en el sitio red: <http://www.bidmc.harvard.edu/>. [Revisado el 8-7-2008]

Riss, T. L. and Moravec, R. A. 2004. Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays. *Assay Drug Dev Technol.* 2:51-62.

Royce, R. A., Sena, A., Cates, W., Jr., and Cohen, M. S. 1997. Sexual transmission of HIV. *N.Engl.J.Med.* 336:1072-1078.

Rutala, W. A., Stiegel, M. M., Sarubbi, F. A., and Weber, D. J. 1997. Susceptibility of antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant hospital bacteria to disinfectants. *Infect.Control Hosp.Epidemiol.* 18:417-421.

Salyers, A. A. and Whitt, D. D. 1994. How Bacteria Become Resistant to Antibiotics. In: *Bacterial Pathogenesis a Molecular Approach*, ASM Press: 168-181.

Schwartz, S. A. and Nair, M. P. 1999. Current concepts in human immunodeficiency virus infection and AIDS. *Clin Diagn.Lab Immunol.* 6:295-305.

Shrivastava, S., Bera, T., Roy, A., Singh, G., Ramachandrarao, P., and Dash, D. 2007. Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology* 18:1-9.

Slama, T. G. 2008. Gram-negative antibiotic resistance: there is a price to pay. *Crit Care* 12 Suppl 4:S4-

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.

- Spira, S., Wainberg, M. A., Loemba, H., Turner, D., and Brenner, B. G. 2003. Impact of clade diversity on HIV-1 virulence, antiretroviral drug sensitivity and drug resistance. *J.Antimicrob.Chemother.* 51:229-240.
- Starodub, M. E. and Trevors, J. T. 1989. Silver resistance in *Escherichia coli* R1. *J.Med.Microbiol.* 29:101-110.
- Su, C. and Brandt, L. J. 1995. *Escherichia coli* O157:H7 infection in humans. *Ann.Intern.Med.* 123:698-714.
- Susumu, A., Hiroki, O., Keiko, N., Kaoru, U., and Masafumi, Y. 2003. In vitro bactericidal activity of telithromycin-MBC/MIC ratio and killing curve. *Japanese Journal of Chemotherapy* 51:77-82.
- Tredget, E. E., Shankowsky, H. A., Groeneveld, A., and Burrell, R. 1998. A matched-pair, randomized study evaluating the efficacy and safety of Acticoat silver-coated dressing for the treatment of burn wounds. *J.Burn Care Rehabil.* 19:531-537.
- Turner, B. G. and Summers, M. F. 1999. Structural biology of HIV. *J.Mol.Biol.* 285:1-32.
- University of Southampton. 2009 Ectoparasites and Endoparasites [internet]. Disponible en el sitio red: <http://www.soton.ac.uk/~ceb/teaching/2005/Image65.gif>. [Revisado el 12-5-2009]
- Valdespino, J. L., García, M. L., and Palacios, M. 2008. El diagnóstico epidemiológico 1981-1995 y el primer Programa Nacional de Prevención: 1990-1994. In: 25 años de SIDA en México: Logros, desaciertos y retos, Córdoba, J. A., Ponce de León, S., and Valdespino, J. L. (eds). Instituto Nacional de Salud Pública: Cuernavaca, Mx, pp. 27-58.
- Velasco, A. M. and Lazcano, A. 2008. Origen y evolución del VIH. In: 25 años de SIDA en México: Logros, desaciertos y retos, Córdoba, J. A., Ponce de León, S., and Valdespino, J. L. (eds). Instituto Nacional de Salud Pública: Cuernavaca, Mx, pp. 123-134.
- Velazquez-Meza, M. E. 2005. [Staphylococcus aureus methicillin-resistant: emergence and dissemination]. *Salud Publica Mex.* 47:381-387.

- Wallace, D. R. 2006. HIV Neurotoxicity: Potential Therapeutic Interventions. *J.Biomed Biotechnol.* 2006:65741.
- Ward, M., Yu, B., Wyatt, V., Griffith, J., Craft, T., Neurath, A. R., Strick, N., Li, Y. Y., Wertz, D. L., Pojman, J. A., and Lowe, A. B. 2007. Anti-HIV-1 activity of poly(mandelic acid) derivatives. *Biomacromolecules.* 8:3308-3316.
- Witvrouw, M., Fikkert, V., Pluymers, W., Matthews, B., Mardel, K., Schols, D., Raff, J., Debyser, Z., De, Clercq E., Holan, G., and Pannecouque, C. 2000. Polyanionic (i.e., polysulfonate) dendrimers can inhibit the replication of human immunodeficiency virus by interfering with both virus adsorption and later steps (reverse transcriptase/integrase) in the virus replicative cycle. *Mol.Pharmacol.* 58:1100-1108.
- World Health Organization. 2000. Overcoming antimicrobial resistance. Report on infectious diseases 2000.
- World Health Organization. 2004a. Monitoring of Antimicrobial Resistance. Report of an Intercountry Workshop; 2003 Oct 14-17; Tamil Nadu, India. 3-4.
- World Health Organization. 2004b. Monitoring of Antimicrobial Resistance. Report of an Intercountry Workshop; 2003 Oct 14-17; Tamil Nadu, India. 3-4.
- World Health Organization. 2007 WHO Model of Essential Medicines [internet]. Disponible en el sitio red: <http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en/index.html>. [Revisado el 12-15-2008]
- World Health Organization. 2009a <http://www.who.int>. [Revisado el 3-5-2007a]
- World Health Organization. 2009b <http://www.who.int>. [Revisado el 3-5-2007b]
- 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.
- Wyatt, R. and Sodroski, J. 1998. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science* 280:1884-1888.

- Yamanaka, M., Hara, K., and Kudo, J. 2005. Bactericidal actions of a silver ion solution on *Escherichia coli*, studied by energy-filtering transmission electron microscopy and proteomic analysis. *Appl.Environ.Microbiol.* 71:7589-7593.
- Yang, Q., Stephen, A. G., Adelsberger, J. W., Roberts, P. E., Zhu, W., Currens, M. J., Feng, Y., Crise, B. J., Gorelick, R. J., Rein, A. R., Fisher, R. J., Shoemaker, R. H., and Sei, S. 2005. Discovery of Small-Molecule Human Immunodeficiency Virus Type 1 Entry Inhibitors That Target the gp120-Binding Domain of CD4. *J.Virol.* 6122-6133.
- Yoon, K. Y., Byeon, J. H., Park, J. H., Hi, J. H., Bae, G. N., and Hwang, J. 2008. Antimicrobial Characteristics of Silver Aerosol Nanoparticles against *Bacillus subtilis* Bioaerosols. *Environmental Engineering Science* 25:289-294.
- Zugravu, R., Licker, M., Berceanu-Vaduva, D., Radulescu, M., Adamut, M., Dragomirescu, L., Branea, D., Hoge, E., Muntean, D., Mihaela, D. P., Moldovan, R., and Loredana, G. P. 2006. The establishment of resistance phenotypes for bacteria isolated from outpatients in urine cultures. *Roum.Arch Microbiol.Immunol.* 65:93-99.

RESUMEN CURRICULAR

Nilda Vanesa Ayala Núñez

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Especialidad en Microbiología

Tesis: NANOPARTÍCULAS DE PLATA COMO MICROBICIDAS: ACTIVIDAD Y MECANISMOS DE ACCIÓN CONTRA EL VIH Y BACTERIAS RESISTENTES A LOS ANTIBIÓTICOS

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Datos Personales: Nacida en Nva. Rosita, Coahuila el 16 de abril de 1981, hija de Gregorio Ayala Fuentes y Ma. Sanjuana Núñez Flores.

Educación: Egresada de la Universidad de las Américas-Puebla, grado obtenido Licenciado en Biología en 2005 con *Magna cum laudae*

Número de publicaciones: 3 internacionales y 3 nacionales

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

Abstract Silver nanoparticles, which are being used increasingly as antimicrobial agents, may extend its antibacterial application to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), the main cause of nosocomial infections worldwide. To explore the antibacterial properties of silver nanoparticles against MRSA, the present work includes an analysis of the relation between nanosilver effect and MRSA's resistance mechanisms, a study of the size dependence of the bactericidal activity of nanosilver and a toxicity assessment of nanoparticles against epithelial human cells. Minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC), and MBC/MIC ratio of silver nanoparticles were quantified by using a luciferase-based assay. The cytotoxic effect (CC_{50} and CC_{90}) of three different nanosilver sizes (10, 30–40, and 100 nm) were assessed in HeLa cells by a similar method. The therapeutic index was used as an indicator of nanosilver overall efficacy and safety. Silver nanoparticles inhibited bacterial growth of both MRSA and non-MR

S. aureus in a bactericidal rather than a bacteriostatic manner (MBC/MIC ratio ≤ 4). Silver nanoparticle's therapeutic index varied when nanoparticle's size diminished. At the same dose range, 10 nm nanoparticles were the most effective since they did not affect HeLa's cell viability while inhibiting a considerable percentage of MRSA growth. Silver nanoparticles are effective bactericidal agents that are not affected by drug-resistant mechanisms of MRSA. Nanosilver size mediates MRSA inhibition and the cytotoxicity to human cells, being smaller nanoparticles the ones with a better antibacterial activity and nontoxic effect.

Keywords silver nanoparticles · methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* · toxicity · bactericidal agent

Introduction

Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is an important pathogen in the healthcare sector that has not been eliminated from the hospital nor community environment. In humans, *S. aureus* causes superficial lesions in the skin and localized abscesses, central nervous system infections, osteomyelitis, invasive endocarditis, septic arthritis, septicemia, pneumonia, and urinary tract infections [1]. A bacteremia caused by *S. aureus* produces between 25% and 63% of mortality [2].

In 1960, the first strain of MRSA was isolated in the UK, just 1 year after methicillin started to be used as an alternative to penicillin. Nowadays, MRSA strains have a wide range of drug resistances, including to more than 16 types of antibiotics. Resistance to methicillin is related to the gen *mecA*, which codifies the protein PBP2a that has low affinity to methicillin and to all β -lactamics [2].

NV Ayala and HH Lara made equal contributions to this study.

N. V. Ayala-Núñez (✉) · H. H. Lara Villegas ·
L. del Carmen Ixtepan Turrent · C. Rodríguez Padilla
Immunology and Virology Laboratory,
Universidad Autónoma de Nuevo Leon,
Edificio C, 3er piso, Facultad de Ciencias Biológicas,
Ave. Pedro de Alba S/N, Ciudad Universitaria,
C.P. 66451 San Nicolas de los Garza, Nuevo Leon, Mexico
e-mail: vanesa.aya@gmail.com

H. H. Lara Villegas
e-mail: dr.lara.v@gmail.com

L. del Carmen Ixtepan Turrent
e-mail: liliana.ixtepan@gmail.com

C. Rodríguez Padilla
e-mail: crrodrig@ccr.dsi.uanl.mx

MRSA's medical importance is attributed to the high mortality and morbidity rate of its infections and for being the main cause of nosocomial infections worldwide [2]. According to the World Health Organization, in some Asian countries, the incidence of MRSA has reached 70% to 80% of all the *S. aureus* isolates [3]. The National Nosocomial Infectious Surveillance System determined that in hospitalized patients, the prevalence of MRSA strains raised from 4% in 1980 to 60.7% in 2004 in the USA [2]. The Centers for Disease Control estimated for 2005 that invasive MRSA caused 94,360 infections and 18,650 associated deaths. Of these infections, about 86% are healthcare-associated and 14% are community-associated [4].

Investigations focused in the search of other alternatives for the treatment of MRSA infections are continuously being held. Among the range of compounds whose bactericidal activity is being investigated, silver nanoparticles rise as a promising new antibacterial agent that could be helpful to confront this and other drug-resistant bacteria.

Antibacterial properties of silver are documented since 1000 B.C., when silver vessels were used to preserve water. The first scientific papers describing the medical use of silver report the prevention of eye infection in neonates in 1881 and internal antisepsis in 1901. After this, silver nitrate and silver sulfadiazine have been widely used for the treatment of superficial and deep dermal burns of wounds and for the removal of warts [5]. Silver's mode of action is presumed to be dependent on Ag^+ ions, which strongly inhibit bacterial growth through suppression of respiratory enzymes and electron transport components and through interference with DNA functions [6].

Silver in a nanometric scale (less than 100 nm) has different catalytical properties compared with those attributed to the bulk form of the noble metal, like surface Plasmon resonance, large effective scattering cross section of individual silver nanoparticles, and strong toxicity to a wide range of microorganisms [7].

Different studies have established the bactericidal effect of nanosilver in Gram negative and Gram positive bacteria, but the bactericidal mechanism of this compound has not been clearly elucidated. Morones et al. [8] defined the antibacterial activity of silver nanoparticles in four types of Gram negative bacteria: *Escherichia coli*, *Vibrio cholera*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Salmonella tify* and suggested that silver nanoparticles attach to the surface of the cell membrane and disturb its function, penetrate bacteria, and release silver ions [9]. Other groups determined a similar antibacterial activity in Gram positive bacteria, such as *Bacillus subtilis* [8], *S. aureus* [10], and *Enterococcus faecalis* [11]. Silver nanoparticles have also been found to exert antibacterial activity against some drug-resistant bacteria [12, 13].

Furthermore, the antiviral capability of silver nanoparticles against the human immunodeficiency virus type 1 [7] and hepatitis B virus [14] has been established. Current applications of silver nanoparticles include antimicrobial bandages for burns [15], water filters [16], and others.

Toxicity of silver nanoparticles has been studied in different mammalian cell systems, including rat liver cells [17], human keratinocytes and fibroblasts cultures [18], and human spermatogonial stem cells [19]. In vitro, an elevated dose of nanosilver induces oxidative stress (liberation of reactive oxygen species) as a mechanism of cytotoxicity [20]. But, what happens at nanosilver concentrations that are nontoxic? Can they be used for a therapeutic purpose? At an innocuous concentration range, silver nanoparticles have been described to exert anti-inflammatory effects as: acceleration of wound healing [21], modulation of cytokine production and induction of peripheral blood mononuclear cells proliferation [22], inhibition of allergic contact dermatitis in mice, suppression of the expression of TNF- α and IL-12, and induction of apoptosis of inflammatory cells [23].

In this research, a comparison of nanosilver's efficacy and safety was determined by analyzing, for the first time, the antibacterial potency of noncytotoxic nanosilver concentrations against MRSA. We report the effect of three nanoparticle sizes (10, 30–40, and 100 nm) against MRSA and HeLa cells. We explored (1) if the mechanisms that give MRSA its drug-resistance status influence its response to silver nanoparticles, (2) the MRSA size-dependent response to nanosilver, and (3) nanosilver toxicity to human cells at concentrations defined as antibacterial.

Materials and Methods

Silver Nanoparticles Formulation

Silver nanoparticles of ~100 nm were obtained from Sigma–Aldrich (No. 576832, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) and 10 and 30–40 nm from Nanoamor (Stock No. 0478YD and 0477YD, Houston, TX, USA) in powder presentation. A solution was prepared in RPMI-1640 (No. R8758, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) culture media enriched with 10% fetal calf serum (FCS) and following dilutions were made in culture media.

Bacterial Strains

MRSA was obtained from the Department of Infectology of the University Hospital of the UANL, Monterrey, Mexico. The nonmethicillin-resistant (non-MR) *S. aureus* was obtained from the Microbiology and Immunology

Department of the Biological Sciences Faculty of the UANL. Bacteria were cultured at 35°C in Mueller Hinton agar (Code 211667, BD Bioxon, Mexico).

MRSA was typed with the latex agglutination assay Slidex MRSA Detection (No. 73117, Biomerieux, Marcy l'Etoile, France) and by using a cefoxitin disk [24]. Besides, a resistance profile was determined for both strains using the Kirby–Bauer test with multidisc (Bio-Rad, DF, Mexico) and NCCLS parameters.

MIC and MBC Determination

The minimal inhibitory concentration (MIC) and the minimal bactericidal concentration (MBC) were determined by a microdilution method, using LB broth (Sigma–Aldrich) and final inocula of 10^5 and 10^6 CFU/ml. Bacteria were incubated with serial twofold dilutions of silver nanoparticles, and the effect on cell viability was measured after a 24-h period of incubation. The MIC₉₉ and MIC₉₀ value corresponded to the doses that inhibited 99% and 90% of bacterial growth and, the MBC value, to the silver nanoparticles doses where 100% of the bacterial growth was inhibited compared with the positive control (no treatment).

Bacterial cell viability was measured with the BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay (Cat. G8230, Promega, Madison, WI, USA), a luciferase based assay that quantifies ATP produced by metabolically active cells. Light generated during the process was registered in a Veritas Microplate Luminometer from Turner Biosystems (Model 9100-002).

MBC was also done by using a colony-forming capacity assay in blood agar [25]. All the assays were run in parallel with a negative and a positive control.

The experimental process was done at the Biosafety Laboratory Level 3 (BSL-3) of the Immunology and Virology Laboratory of the UANL, Mexico.

HeLa Cells Cytotoxicity Assay

HeLa-CD4-LTR-β-gal cells (human epithelial cells) were obtained from the AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH from Dr. Michael Emerman. HeLa-CD4-LTR-β-gal were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (1×) liquid without sodium phosphate and sodium pyruvate. The medium contained 4,500 mg/L D-glucose and L-glutamine (Sigma–Aldrich), with 10% FCS and 0.2 mg/ml geneticin (G418).

The 50% cytotoxic concentration (CC₅₀) and the 90% cytotoxic concentration (CC₉₀) were determined by a microdilution method, using DMEM culture media and 5×10^4 HeLa-CD4-LTR-β-gal cells/well.

A stock solution of the silver nanoparticles was twofold diluted to desired concentrations in growth medium and

subsequently added into 96-plate wells with HeLa-CD4-LTR-β-gal cells. Microtitre plates were incubated at 37°C in a 5% CO₂ air-humidified atmosphere for further 2 days. All the assays were run in parallel with a negative and a positive control. Assessments of the cell viability were carried out by using a CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega). A Veritas Microplate Luminometer from Turner Biosystems was used. Cytotoxicity was evaluated based on the percentage cell survival in a dose-dependent manner relative to the positive control. The CC₉₀ and CC₅₀ value corresponded to the cytotoxic concentration that inhibited 90% and 50% of cellular viability compared with the positive control (no treatment).

Statistical Analysis

MIC and MBC results were expressed as the mean ± the standard error of the mean. A Student *t* test was used to compare these results. *P* values lower than 0.05 were considered significant.

Results

Resistance Profile

The presence of PBP2a protein was confirmed by a latex agglutination assay in the MRSA strain and in the non-MR *S. aureus* was not found. Besides, the MRSA isolate differed from non-MR *S. aureus* in its response to cefuroxime, gentamicin, pefloxacin, trimethoprim–sulfamethoxazole, and vancomycin (Table 1). According to the Kirby Bauer test, this MRSA strain could be a vancomycin-intermediate *S. aureus*, but further assays should be done to establish this status.

Bactericidal Activity of Silver Nanoparticles Against MRSA and non-MR *S. aureus*

MRSA and a non-MR *S. aureus* isolate were challenged with twofold 100 nm nanosilver serial dilutions for 24 h. Silver nanoparticles affected bacterial cellular viability in a dose-dependent manner. Both MRSA (Fig. 1a) and non-MR *S. aureus* (Fig. 1b) were inhibited at concentrations over 1.35 mg/ml for the 10^5 -CFU/ml inoculum and over 2.7 mg/ml for the 10^6 -CFU/ml inoculum. As expected, the antibacterial effect of 100 nm nanosilver was inversely related to the amount of bacteria, since the best performance was achieved at 10^5 CFU/ml than 10^6 CFU/ml, even though the latter is 1,000 times higher than the standard for susceptibility tests. Performance was defined as the capacity to inhibit bacterial growth under these conditions.

Table 1 Resistance profile of MRSA and non-MR *S. aureus* according to a Kirby–Bauer test.

	MRSA	Non-MR <i>S. aureus</i>	Antibiotic type	Mechanism of resistance [2]
Cefuroxime	R	I	Cephalosporin	β -lactamase drug inactivation, alteration of PBPs, increased permeability
Gentamicin	R	S	Aminoglycoside	Modification of acetyltransferase or phosphotransferase
Pefloxacin	R	S	Fluoroquinolone	Mutation in girase subunit A and topoisomerase IV
Trimethoprim-Sulfamethoxazole	R	S	Trimethoprim-Sulfamethoxazole	Reduced affinity of the dihydrofolate reductase, overproduction of <i>p</i> -aminobenzoic acid
Vancomycin	I	S	Vancomycin	Transposable element for the modification of target site

R resistant, I intermediate response, S susceptible

The bactericidal effect of 100 nm nanosilver was also assessed by a colony-forming capacity assay (Fig. 2). The value defined as MBC was the nanosilver concentration that completely inhibited visible colony growth in the blood agar. The MBC values obtained by the colony-forming capacity method were smaller than those obtained by the luciferase-based assay for the 10^6 CFU/ml. This difference can be attributed to bacteria that are not visible in the agar plate but are still alive and have lost its growth capacity for the nanosilver exposure. The luciferase method quantifies ATP produced during metabolic activity, making it a more sensitive method. MBC results from the luciferase-based assay were the ones used to obtain the MBC/MIC ratio.

MRSA and HeLa Cells: Size Matters

Silver nanoparticles of 100, 30–40, and 10 nm were assayed to determine their antibacterial properties against MRSA and cytotoxic effect against HeLa cells. Smaller nanosilver sizes were chosen because the decrease in volume will increase surface area and antibacterial activity.

The three nanosilver sizes exerted a bactericidal rather than a bacteriostatic effect, since MBC/MIC ratio values were lower than 4 (Table 2). However, each size had a distinct

behavior against MRSA. Silver nanoparticles of 100 nm were the least effective against this bacteria, because a larger dose is needed to reach a bactericidal effect (MBC) compared to the dose needed to inhibit 99% of the population (MIC_{99}). Furthermore, the comparison among the CC_{50} 's reflects that 100 nm nanosilver particles were the most cytotoxic to HeLa epithelial cells.

The therapeutic index (TI) relates nanosilver therapeutic effect (antibacterial concentrations, MIC_{90}) to its toxic effect (cytotoxic concentrations, CC_{90}). A high therapeutic index, used as an indicator of overall nanosilver efficacy, corresponds to a situation in which one would need non-toxic concentrations of nanoparticles to inhibit MRSA growth. As seen in Table 2, TI is inversely proportional to silver nanoparticles size: the smaller ones (10 nm) were the most effective considering its anti-MRSA activity and non-cytotoxic effect.

A direct comparison of the three nanosilver sizes under the same dose range (Fig. 3) showed that size does matter. Nanosilver of 100 nm did not inhibit MRSA at doses that did not affect HeLa cell viability (≤ 0.34 mg/ml); besides, antibacterial doses were cytotoxic (Fig. 3a). Nontoxic concentrations of 30–40 nm nanosilver (≤ 0.67 mg/ml) interfered with a $\sim 30\%$ of MRSA growth, and mild

Fig. 1 Silver nanoparticles inhibition of bacterial growth (MIC) of MRSA and non-MR *S. aureus*. **a** 10^5 CFU/ml and **b** 10^6 CFU/ml of MRSA and non-MR *S. aureus* were challenged against serial twofold dilutions of 100 nm nanosilver. After a 24-h incubation period cell viability was assessed with a luciferase-based assay and the MIC was defined. The assay was performed in triplicate; the error bars indicate the SEM.

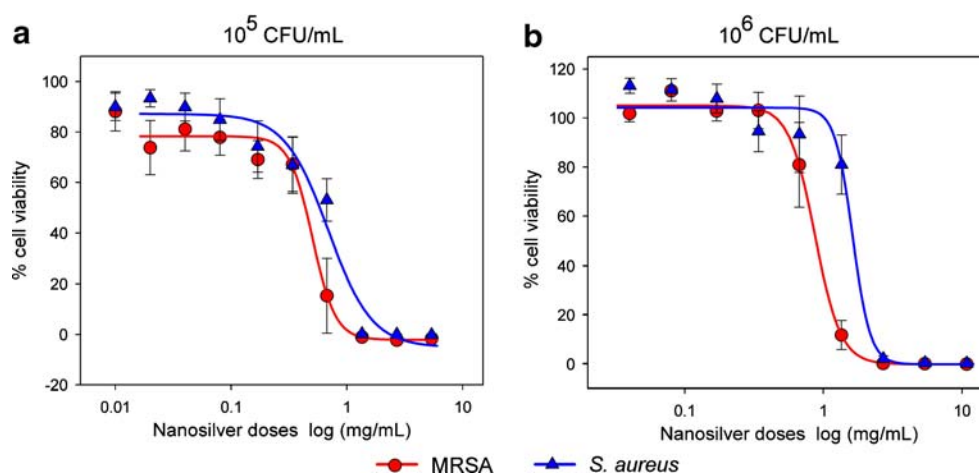
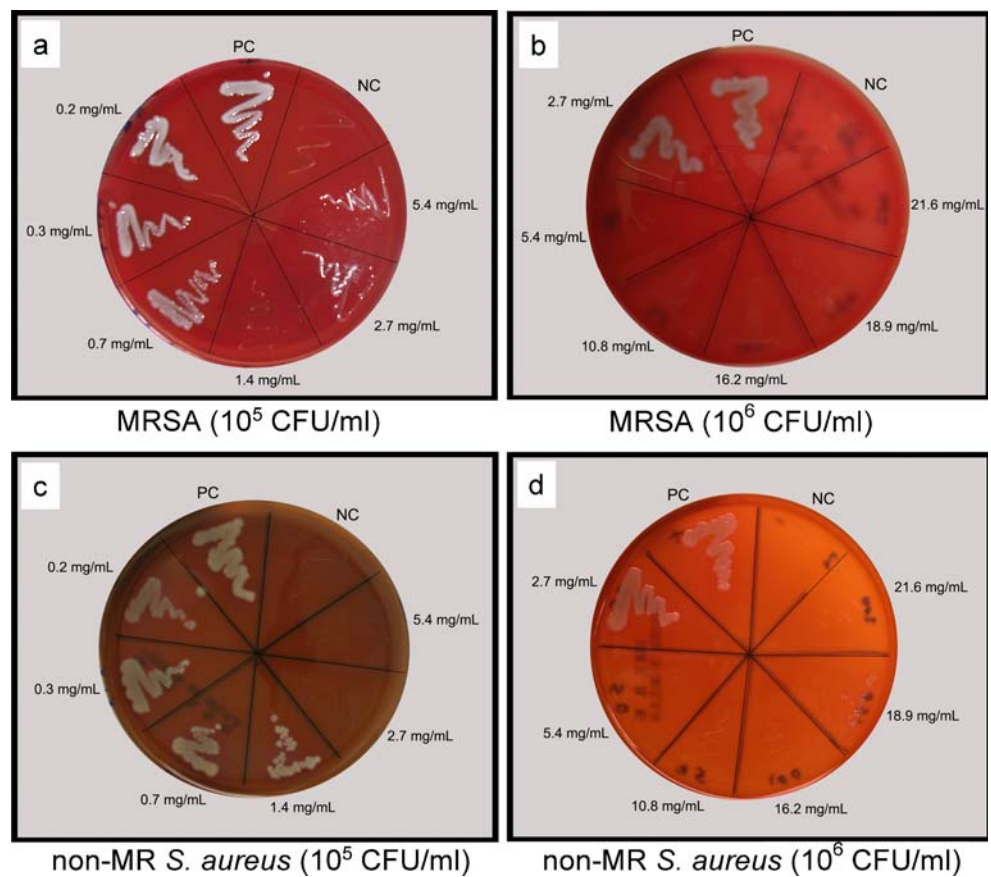


Fig. 2 Bactericidal effect (MBC) of silver nanoparticles against MRSA and non-MR *S. aureus*. A colony-forming capacity assay was used to define the MBC of silver nanoparticles against MRSA (a, b) and non-MR *S. aureus* (c, d). After a 24-h challenge with serial twofold dilutions of 100 nm nanosilver, bacteria were grown in blood agar, and colony growth was recorded after 24 h of incubation. *PC* positive control, *NC* negative control.



cytotoxic concentrations (1.35 mg/ml) inhibited ~50% (Fig. 3b). Finally, 10 nm silver nanoparticles effectively inhibited MRSA growth and kept HeLa cells viable at the same dose range (Fig. 3c). For example, at a 1.35-mg/ml dose, MRSA is almost eliminated without affecting HeLa cells viability.

Discussion

A wide variety of synthetic compounds exert antibacterial effect, but just some of them can be used as biocides to

develop drugs or coatings. The primary impediment for their use is their toxicity compared with their bactericidal effect; some of them are so toxic for eukaryotic cells that cannot be proposed as antibiotics. Among these materials, silver compounds (salts and colloids) raise as potent bactericidal agents whose application is restricted to topical creams used to reduce the risk of wound infection and to treat infected wounds. In order to challenge silver nanoparticles as novel antimicrobial agents, the principal aim of this research was to assess, by in vitro assays, the bactericidal properties of silver nanoparticles against a clinical isolate of MRSA. These bacteria were chosen

Table 2 Silver nanoparticles antibacterial and cytotoxic effect.

Silver nanoparticles size	MRSA ^a				HeLa cells ^b		TI
	MBC	MIC ₉₉	MIC ₉₀	MBC/MIC ₉₉ ratio	CC ₉₀	CC ₅₀	
100 nm	8.99 ^a	2.25	1.37	4	0.85	0.55	0.62
30–40 nm	10.79	10.79	4.17	1	>10.79	2.84	>2.6
10 nm	2.7	1.80	0.90	1.5	7.85	3.75	8.72

Values in mg/ml

MBC minimal bactericidal effect, *MIC* minimal inhibitory effect, *CC* cytotoxic concentration, *TI* therapeutic index

^a 10⁶ CFU/ml

^b 5 × 10⁴ cells/well

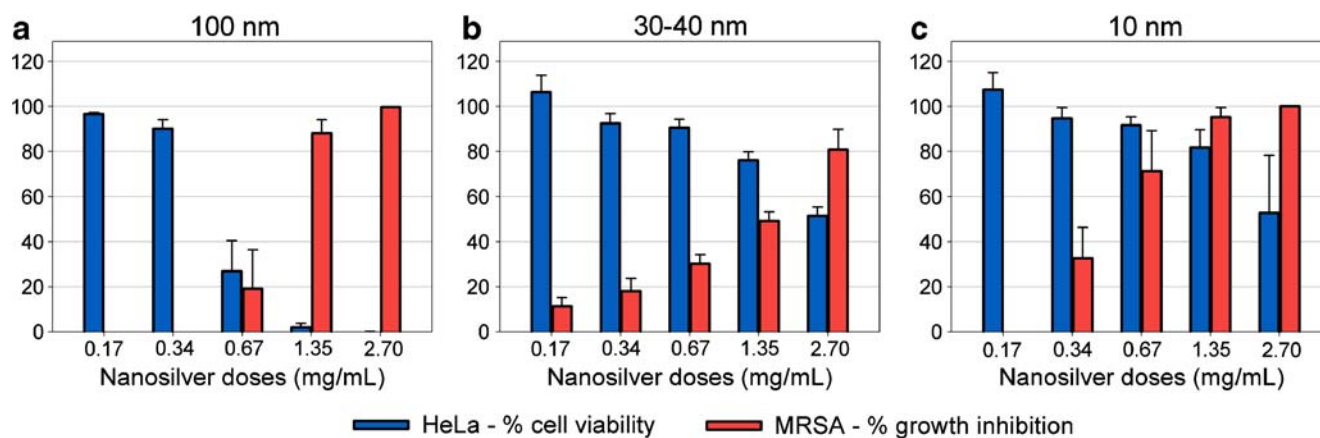


Fig. 3 Toxicity assessment of silver nanoparticles compared with MRSA growth inhibition activity. MRSA (10^6 CFU/ml) and HeLa cells (5×10^4 cells/well) were challenged with twofold serial dilutions of 100 nm (a), 30–40 nm (b), and 10 nm (c) silver nanoparticles. Cell

viability assessment of both bacteria and human cells was done with a luciferase-based assay 24 h after nanosilver exposure. Percentage values are relative to the positive control (no treatment). The assay was performed in triplicate; the error bars indicate the SEM.

because of its importance in the hospital environment and its growing appearance in the community.

The MBC/MIC ratio is a parameter that reflects the bactericidal capacity of a compound by relating both values. A ratio with a value superior to 1 ($MBC \gg MIC$) indicates that a great amount of compound is needed to reach the bactericidal effect and that this compound could be considered a bacteriostatic agent. Besides, the MBC/MIC ratio can reflect if the bacteria are susceptible, tolerant, or resistant to the agent that is being challenged. The results show that silver nanoparticles inhibited bacterial growth of both MRSA and non-MR *S. aureus* in a bactericidal rather than a bacteriostatic manner (MBC/MIC ratio ≤ 4).

There was no significant difference between the effect of silver nanoparticles on MRSA and non-MR *S. aureus*, demonstrating that nanosilver activity was not affected by those resistant mechanisms that differentiate these strains. As seen in Table 1, MRSA expresses several resistant mechanisms that are not present in the non-MR *S. aureus*, including (1) the PBP2a protein for β -lactamic resistance, (2) the acetyltransferase and phosphotransferase for aminoglycoside resistance, (3) a mutated girase subunit A and topoisomerase IV for quinolone resistance, (4) reduced affinity in dihydrofolate reductase for trimethoprim-sulfamethoxazole resistance [2], and (5) abnormal thickened cell walls for vancomycin resistance [26]. PBP2a protein, for example, has low affinity for β -lactam antibiotics and, therefore, is capable of substituting the biosynthetic functions of the normal PBPs even in the presence of the β -lactams, thereby preventing cell lysis [26]. Apparently, silver nanoparticles do not act by directly inhibiting the expression or the activity of the PBP2a protein, since both drug-resistant and susceptible strains were inhibited in the same manner. Therefore, it can be said that silver nanoparticles are broad spectrum agents whose

performance is not blocked by the drug-resistant mechanisms mentioned above.

These data also indicates that silver nanoparticles' mode of action is not the same as the mode of action exerted by the mentioned antibiotics (β -lactamics, quinolones, aminoglycosides, trimethoprim-sulfamethoxazole, and vancomycin). Silver ions are known to bind to sulfhydryl groups, which lead to protein denaturation by the reduction of disulfide bonds ($S-S \rightarrow S-H + H-S$) [27]. Besides, silver ions can complex with electron donor groups containing sulfur, oxygen, or nitrogen that are normally present as thiols or phosphates on amino acids and nucleic acids [28]. Thus, silver nanoparticles would not bind to specific proteins or structures of the bacterial cell of both MRSA and non-MR *S. aureus* but to a broad spectrum of targets that would include membrane and cytoplasmic proteins and genomic or plasmid DNA. Indeed, silver nanoparticles have been found to attach to the surface of the cell membrane and disturb its function, penetrate bacteria, and release silver ions [29]. Sondi et al. and Lok et al. also found that nano-Ag target the bacterial membrane, leading to a dissipation of the proton motive force [29, 30].

The TI was used as an indicator of silver nanoparticles overall efficacy and safety. A high therapeutic index is preferable since it corresponds to a situation in which a lower dose of silver nanoparticles is needed elicit the therapeutic effect (measured as the antibacterial activity) than the one needed to reach the toxic threshold for human cells. After evaluating silver nanoparticles of 100, 30–40, and 10 nm, it was observed that the TI improved when nanoparticle's size diminished. At 0.67 mg/ml (Fig. 3), 100 nm particles were toxic for both MRSA and HeLa cells, 30–40 nm particles kept HeLa alive but partially inhibited MRSA, and 10 nm nanoparticles did not affect HeLa's cell viability while inhibiting a considerable percentage of MRSA growth.

Discoveries in the past have demonstrated that physico-chemical properties of noble metal nanocrystals are influenced by size [31]. Other researches also defined that the bactericidal and antiviral properties of silver nanoparticles are size dependent and that the only nanoparticles that present a direct interaction with the bacteria or virus preferentially have a diameter of ~1–10 nm [7, 9]. A smaller size implies the ability to reach structures that otherwise is not available for bigger nanoparticles.

But, why do 10-nm silver nanoparticles eliminate bacteria while keeping human cells alive? As mentioned before, silver compounds are not specific and have several targets that can be present in both eukaryotic and bacterial cells. However, bacteria have a larger surface area-to-volume ratio than eukaryotic cells, which allows for rapid uptake and intracellular distribution of nutrients and excretion of wastes. This characteristic is achieved by having a rigid cell wall composed of peptidoglycan [32]. For that reason, at the same concentration, silver nanoparticles would be preferentially absorbed and accumulated by bacteria, thus exerting its antibacterial effect without significantly damaging human cells. In addition, as mentioned before, silver nanoparticles have been found to bound and disturb bacterial cell membrane activity [30]. Considering that the bacterial plasma membrane is the site of active transport, respiratory chain components, energy-transducing systems, membrane stages in the biosynthesis of phospholipids, peptidoglycan, LPS and capsular polysaccharides, and the anchoring for DNA [33], an alteration of the membrane's integrity would have a great impact in bacterial growth.

From these studies, it can be concluded that silver-based nanoparticles of approximately 10 nm inhibit MRSA growth in vitro at noncytotoxic concentrations, supporting their potential use as antibacterial agents with a wide number of biomedical and therapeutic applications. Since drug resistance does not interfere with the bactericidal effect of nanosilver, they may prove useful in manufacturing pharmaceutical products and medical devices that may help to prevent the transmission of drug-resistant pathogens, but toxicological limitations for eukaryotic cells should be taken in account since nanosilver is not a target-specific antibacterial agent.

The data presented here are novel in that they prove that silver nanoparticles are effective bactericidal agents against MRSA regardless of the resistance mechanisms that confer importance to these bacteria as an emergent pathogen. Besides, it is the first time that the efficacy and safety of nanosilver in different sizes is determined for MRSA and human cells in vitro.

Acknowledgments This project was done with the economical support of the *Programa de Apoyo a la Investigacion Cientifica y*

Tecnologica (PAICyT) of the Universidad Autonoma de Nuevo Leon, Mexico.

References

1. Velazquez-Meza ME. [*Staphylococcus aureus* methicillin-resistant: emergence and dissemination]. *Salud Publica Mex.* 2005;47: 381–7.
2. Bustos-Martinez JA, Hamdan-Partida A, Gutierrez-Cardenas M. *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. *Rev Biomed.* 2006;17:287–305.
3. World Health Organization. Monitoring of Antimicrobial Resistance. Report of an Intercountry Workshop; 2003 Oct 14–17; Tamil Nadu, India. 2004.
4. Klevens RM, Morrison MA, Nadle J, Petit S, Gershman K, Ray S, et al. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *JAMA.* 2007;298:1763–71.
5. Rai M, Yadav A, Gade A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol Adv.* 2009;27:76–83.
6. Li Y, Leung P, Yao L, Song QW, Newton E. Antimicrobial effect of surgical masks coated with nanoparticles. *J Hosp Infect.* 2006;62:58–63.
7. Elechiguerra JL, Burt JL, Morones JR, Camacho-Bragado A, Gao X, Lara HH, et al. Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. *J Nanobiotechnology.* 2005;3:6.
8. Yoon KY, Byeon JH, Park JH, Ji JH, Bae GN, Hwang J. Antimicrobial Characteristics of Silver Aerosol Nanoparticles against *Bacillus subtilis* Bioaerosols. *Environ Eng Sci.* 2008;25: 289–93.
9. Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Tapia J, et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology.* 2005;16:2346–53.
10. Shrivastava S, Bera T, Roy A, Singh G, Ramachandrarao P, Dash D. Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology.* 2007;18:1–9.
11. Panacek A, Kvitek L, Prucek R, Kolar M, Vecerova R, Pizurova N, et al. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *J Phys Chem B.* 2006;110:16248–53.
12. Birla SS, Tiwari VV, Gade AK, Ingle AP, Yadav AP, Rai MK. Fabrication of silver nanoparticles by Phoma glomerata and its combined effect against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Lett Appl Microbiol.* 2009;48:173–9.
13. Inoue Y, Uota M, Torikai T, Watari T, Noda I, Hotokebuchi T, et al. Antibacterial properties of nanostructured silver titanate thin films formed on a titanium plate. *J Biomed Mater Res A.* 2009.
14. Lut L, Sun RW, Chen R, Hui CK, Ho CM, Luk JM, et al. Silver nanoparticles inhibit hepatitis B virus replication. *Antivir Ther.* 2008;13:253–62.
15. Tredget EE, Shankowsky HA, Groeneveld A, Burrell R. A matched-pair, randomized study evaluating the efficacy and safety of Acticoat silver-coated dressing for the treatment of burn wounds. *J Burn Care Rehabil.* 1998;19:531–7.
16. Jain P, Pradeep T. Potential of silver nanoparticle-coated polyurethane foam as an antibacterial water filter. *Biotechnol Bioeng.* 2005;90:59–63.
17. Hussain SM, Hess KL, Gearhart JM, Geiss KT, Schlager JJ. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicol In Vitro.* 2005;19:975–83.
18. Burd A, Kwok CH, Hung SC, Chan HS, Gu H, Lam WK, et al. A comparative study of the cytotoxicity of silver-based dressings in monolayer cell, tissue explant, and animal models. *Wound Repair Regen.* 2007;15:94–104.

19. Braydich-Stolle L, Hussain S, Schlager JJ, Hofmann MC. In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Toxicol Sci.* 2005;88:412–9.
20. Arora S, Jain J, Rajwade JM, Paknikar KM. Cellular responses induced by silver nanoparticles: In vitro studies. *Toxicol Lett.* 2008;179:93–100.
21. Tian J, Wong KK, Ho CM, Lok CN, Yu WY, Che CM, et al. Topical delivery of silver nanoparticles promotes wound healing. *Chem Med Chem.* 2007;2:129–36.
22. Shin SH, Ye MK, Kim HS, Kang HS. The effects of nano-silver on the proliferation and cytokine expression by peripheral blood mononuclear cells. *Int Immunopharmacol.* 2007;7:1813–8.
23. 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;152:1235–42.
24. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control. Detection of: Oxacillin/Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. URL: http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/ar_lab_mrsa.html. Access date: Apr./14/2008.
25. Cleusix V, Lacroix C, Vollenweider S, Duboux M, Le Blay G. Inhibitory activity spectrum of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* against intestinal bacteria. *BMC Microbiol.* 2007;7:101.
26. Palavecino E. Clinical, Epidemiological, and Laboratory Aspects of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Infections. In: Yinduo J, editor. *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) Protocols. Humana Press; 2007. pp. 3–4.
27. McDonnell GE. Chemical Disinfection. In: *Antisepsis, disinfection, and sterilization.* 2007;111–5.
28. Starodub ME, Trevors JT. Silver resistance in *Escherichia coli* R1. *J Med Microbiol.* 1989;29:101–10.
29. Lok CN, Ho CM, Chen R, He QY, Yu WY, Sun H, et al. Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *J Proteome Res.* 2006;5:916–24.
30. 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;275:177–82.
31. Pal S, Tak YK, Song JM. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73:1712–20.
32. Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. *Medical Microbiology.* In: MMII Mosby, Inc.: Spain; 2005. pp. 12–3.
33. Salton MRJ, Kim KS. Structure. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology.* 2009.

Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria

Humberto H. Lara · Nilda V. Ayala-Núñez ·
Liliana del Carmen Ixtepan Turrent ·
Cristina Rodríguez Padilla

Received: 9 June 2009 / Accepted: 5 October 2009
© Springer Science+Business Media B.V. 2009

Abstract Infections caused by drug-resistant microorganisms result in significant increases in mortality, morbidity, and cost related to prolonged treatments. The antibacterial activity of silver nanoparticles against some drug-resistant bacteria has been established, but further investigation is needed to determine whether these particles could be an option for the treatment and prevention of drug-resistant microbial infections. Hence, we challenged different drug-resistant pathogens of clinical importance (multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, ampicillin-resistant *Escherichia coli* O157:H7 and erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes*) with a suspension of silver nanoparticles. By means of a luciferase-based assay, it was determined that silver nanoparticles (1) inactivate a panel of drug-resistant and drug-susceptible bacteria (Gram positive and Gram negative), (2) exert their antibacterial activity through a bactericidal rather than bacteriostatic mechanism, and (3) inhibit the bacterial growth rate from the time of first contact between the bacteria and the nanoparticles. Additionally, strains with a resistant phenotype to silver nanoparticle were developed and used to explore the bactericidal mode of action of silver nanoparticles. Through

a Kirby–Bauer test, it was shown that silver nanoparticles' general mechanism of bactericidal action is based on inhibition of cell wall synthesis, protein synthesis mediated by the 30s ribosomal subunit, and nucleic acid synthesis. Our data suggest that silver nanoparticles are effective broad-spectrum biocides against a variety of drug-resistant bacteria, which makes them a potential candidate for use in pharmaceutical products and medical devices that may help to prevent the transmission of drug-resistant pathogens in different clinical environments.

Keywords Drug-resistant bacteria · Silver nanoparticles · Silver resistance · Broad-spectrum agent · Bactericidal agent · Nanobiotechnology

Introduction

Drug-resistant bacteria are emerging pathogens whose resistance profiles present a major challenge for containing their spread and their impact on human health. Currently, over 70% of bacterial nosocomial infections in the United States are resistant to one or more of the antibiotics traditionally used to eliminate them. People who become infected with drug-resistant microorganisms usually spend more time in the hospital and require a form of treatment that uses two or three different antibiotics and is less effective, more toxic, and more expensive (Webb et al. 2005).

Nanotechnology offers opportunities to re-explore the biological properties of already known antimicrobial compounds by manipulating their size to alter the effect. Silver has long been known for its antimicrobial properties, but its medical applications declined with the development of antibiotics. Nonetheless, Credés prophylaxis for gonococcal *ophthalmia neonatorum* remained the standard of care in

Humberto H. Lara and Nilda V. Ayala-Núñez made equal contributions to this study.

H. H. Lara (✉) · N. V. Ayala-Núñez ·
L. d. C. Ixtepan Turrent · C. Rodríguez Padilla
Laboratorio de Inmunología y Virología, Universidad Autónoma
de Nuevo Leon, Edificio C, 3er piso, Facultad de Ciencias
Biologicas, Ave. Pedro de Alba S/N, Ciudad Universitaria,
C.P. 66451 San Nicolás de los Garza, Nuevo León, Mexico
e-mail: dr.lara.v@gmail.com

N. V. Ayala-Núñez
e-mail: vanesa.aya@gmail.com

many countries until the end of the twentieth century (Hoyme 1993). Currently, silver sulfadiazine is listed by the World Health Organization as an essential anti-infective topical medicine (World Health Organization 2007). Since silver works as a bulk material, the use of nano-size silver may also be appealing.

Different studies have established the bactericidal effect of nanosilver against Gram negative and Gram positive bacteria, but the bactericidal mechanism of this compound has not been clearly elucidated. Morones et al. (2005) defined the antibacterial activity of silver nanoparticles against four types of Gram negative bacteria, *E. coli*, *V. cholera*, *P. aeruginosa* and *S. typhus*, and suggested that silver nanoparticles attach to the surface of the cell membrane and disturb its function, penetrate bacteria, and release silver ions (Morones et al. 2005). Other groups have worked with Gram positive bacteria, such as *Staphylococcus aureus* (Shrivastava et al. 2007). Furthermore, the antiviral capability of silver nanoparticles against human immunodeficiency virus type 1 (Elechiguerra et al. 2005) and hepatitis B virus (Lut et al. 2008) has been established.

The development of nanosilver products is expanding. Nowadays, nanosilver is found in clothing, food containers, wound dressings, ointments, implant coatings, and other items; some nanosilver applications have received approval from the US Food and Drug Administration (Dunn and Edwards-Jones 2004). Whether silver nanoparticles are an option to confront the transmission of and infection by pathogenic drug-resistant bacteria remains to be determined.

To explore the biocidal properties of silver nanoparticles against these drug-resistant pathogens, we challenged clinical isolates of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, ampicillin-resistant *E. coli* O157:H7 and erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* and drug-susceptible strains of the same pathogens with a suspension of silver nanoparticles. By means of a luciferase-based assay, the antibacterial activity of the silver nanoparticles was assessed by determining the minimal inhibitory concentration (MIC), the minimal bactericidal concentration (MBC) and the MBC/MIC ratio; time-kill assays were also used. Furthermore, silver nanoparticle-resistant strains were developed and used to explore the bactericidal mode of action of silver nanoparticles against these bacteria.

Materials and methods

Silver nanoparticles and bacterial strains

A stock solution of commercially manufactured 100 nm silver nanoparticles (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO) was prepared in culture media. The subsequent dilutions were made in Luria–Bertani broth.

Methicillin-resistant *S. aureus*, ampicillin-resistant *Escherichia coli* O157:H7, multidrug-resistant *P. aeruginosa*, and drug-susceptible *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *Escherichia coli* were cultured at 35°C on Mueller–Hinton agar. Erythromycin-resistant *S. pyogenes* and *Streptococcus* sp. were cultured at 35°C on blood agar.

MIC and MBC determination

MIC and the MBC were determined by a microdilution method, using Luria–Bertani broth (Sigma–Aldrich) and an inoculum of 2.5×10^5 CFU/mL. Bacteria were incubated with serial twofold dilutions of silver nanoparticles, and the effect on cell viability was measured after 24 h. The MIC value corresponded to the concentration that inhibited 99% of bacterial growth and the MBC value corresponded to the concentration where 100% of the bacterial growth was inhibited, compared to the positive control (no treatment). Bacterial cell viability was measured with the BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay from Promega (Madison, WI), a luciferase based assay that quantifies ATP produced by metabolically active cells. All assays were performed in the Biosafety Laboratory Level 3 (BSL-3) at the Universidad Autonoma de Nuevo Leon.

Time-kill assays

Bacterial growth after treatment was measured by quantifying cell viability at 0, 2, 4, 6, and 24 h after incubation with different concentrations of silver nanoparticles (0.0, 6.25, 12.5, 25.0 and 50.0 mM). The growth inhibition percentage was obtained with respect to the positive control. Bacterial cell viability was measured with the BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay from Promega.

Silver nanoparticle-resistant strains

A strain of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), drug-susceptible *S. aureus*, ampicillin-resistant *E. coli* O157:H7, and multidrug-resistant *P. aeruginosa* were serially transferred on Mueller–Hinton agar containing graded concentrations of silver nanoparticles (12.5–200 mM) until they could grow in the presence of concentrations near or over the MIC. In the case of MRSA and drug-susceptible *S. aureus*, the MIC reference value that was used was obtained from other publications from our group (in press). These strains were labeled as AgNP^R (silver nanoparticle resistant) whereas the parent strain was designed as AgNP^S (silver nanoparticle susceptible). Both strains were maintained on nutrient agar with or without silver nanoparticles for AgNP^S and AgNP^R, respectively (Gupta et al. 1992).

To confirm the resistance to silver nanoparticles, AgNP^S and AgNP^R strains were both cultured on a 50 mM silver nanoparticle agar plate. As expected, only the AgNP^R strain was able to grow in these conditions. Once the resistant status to silver nanoparticles was defined, a resistance profile for a panel of antibiotics was determined for each strain using the Kirby–Bauer test with Bio-Rad multidiscs (Hercules, CA) and NCCLS parameters. The sensitivity to each antibiotic was proportional to the diameter of the inhibition halo.

Statistical analysis

Minimal inhibitory concentration, MBC and the Kirby–Bauer tests were performed in triplicate, and the results are expressed as means \pm the standard errors of the means. A Student's *t*-test was used to compare these results. *P* values lower than 0.05 were considered significant. SigmaPlot 10.0 was used to create the figures.

Results

Bactericidal activity of silver nanoparticles

A luciferase-based bacterial cell viability assay was used to determine the bactericidal effect of different concentrations of silver nanoparticles on erythromycin-resistant *S. pyogenes*, ampicillin-resistant *E. coli* O157:H7, multidrug-resistant *P. aeruginosa*, and three drug-susceptible strains (Table 1). The minimum inhibitory concentrations and minimum bactericidal concentrations of silver nanoparticles ranged between 30 and 100 mM, respectively. The MBC/MIC ratio is a parameter that reflects the bactericidal capacity of the analyzed compound. In our study, silver nanoparticles exerted a bactericidal effect against the six bacterial strains because the MBC/MIC

ratio values were lower than 1.2. As seen in Table 1, there was no significant difference between the bactericidal effects of silver nanoparticles on drug-resistant and non-drug-resistant microorganisms. The bactericidal activity was not affected by the cell membrane structure, given that both Gram positive and Gram negative bacteria were inhibited.

Effect of Ag-NPs on bacterial growth

The bactericidal activity of different concentrations of silver nanoparticles (0.0, 6.25, 12.5, 25.0 and 50.0 mM) was compared among the different drug-resistant strains using time-kill assays. The time-kill assays were used to analyze post-treatment bacterial viability and to define the minimum time necessary to reach an inhibitory or bactericidal effect. Since no significant difference was found between the bactericidal effects of silver nanoparticles on the different bacteria, drug-susceptible strains were not used in this assay.

Silver nanoparticle treatment affected bacterial growth to different extents (Fig. 1). The effect was proportional to the dose since 50.0 mM was the most effective treatment (the bacterial population did not recover) and 6.25 was the least effective. Although 6.25 mM is considerably under the MIC–MBC range of silver nanoparticles, the bacterial population did not reach normal levels of growth after 24 h of incubation.

No minimum time of exposure to silver nanoparticles is needed to achieve an inhibitory effect. At the initial time point (0 h), 50.0 mM of silver nanoparticles inhibited most of the bacterial populations (data not shown). After 24 of incubation, no significant recovery was observed since the same nanosilver concentration inhibited 99.7% of erythromycin-resistant *S. pyogenes* (Fig. 1a), 95.7% of ampicillin-resistant *E. coli* O157:H7 (Fig. 1b) and 92.8% of multidrug-resistant *P. aeruginosa* (Fig. 1c).

Table 1 MICs and MBCs for individual strains

	MIC (mM) ^a	MBC (mM) ^a	MBC/MIC ratio
Drug-resistant bacteria			
Erythromycin-resistant <i>S. pyogenes</i>	66.7 (\pm 16.7)	66.7 (\pm 16.7)	1.0
Ampicillin-resistant <i>E. coli</i> O157:H7	83.3 (\pm 16.7)	83.3 (\pm 16.7)	1.0
Multidrug-resistant <i>P. aeruginosa</i>	83.3 (\pm 16.7)	100.0 (\pm 0.0)	1.2
Average	79.4	83.3	1.1
Drug-susceptible bacteria			
<i>Streptococcus</i> sp.	29.2 (\pm 11.0)	29.2 (\pm 11.0)	1.0
<i>Escherichia coli</i>	83.3 (\pm 16.7)	83.3 (\pm 16.7)	1.0
<i>P. aeruginosa</i>	83.3 (\pm 16.7)	83.3 (\pm 16.7)	1.0
Average	65.3	65.3	1.0
All	71.5	74.3	1.1

MIC minimal inhibitory concentration, MBC minimal bactericidal concentration

^a Mean \pm standard error of the mean

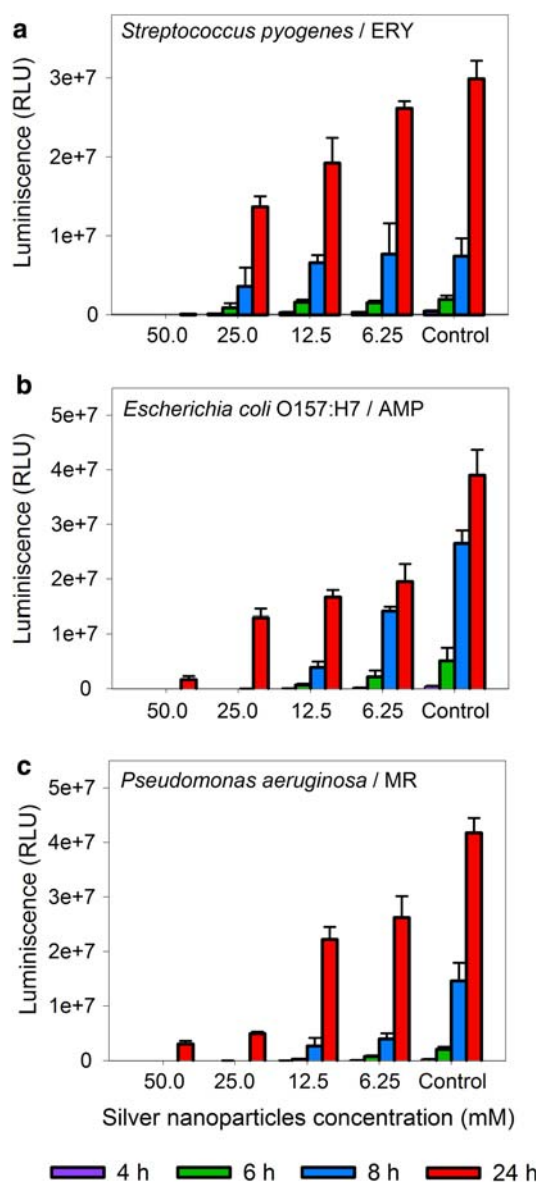


Fig. 1 Time-kill assays of drug-resistant bacteria. Viability results were measured by a luciferase-based assay of **a** erythromycin-resistant *S. pyogenes*, **b** ampicillin-resistant *E. coli* O157:H7, and **c** multidrug-resistant *P. aeruginosa* against different concentrations of silver nanoparticles. The measurements were made at 4, 6, 8, and 24 h post-treatment. The assay was performed in triplicate and the data points represent the mean \pm SEM. RLU relative light units, ERY erythromycin, AMP ampicillin, MR multidrug-resistant

Mode of bactericidal action of silver nanoparticles against drug-resistant bacteria

Once the bactericidal effect of silver nanoparticles against distinct drug-resistant bacteria was defined, the mode of action was examined by analyzing silver nanoparticle-resistant strains. For this study, MRSA and drug-susceptible *S. aureus* were used as model Gram positive

microorganisms, and multidrug-resistant *P. aeruginosa* and ampicillin-resistant *E. coli* O157:H7 were used as Gram negative models. These bacteria were serially transferred on agar prepared with increasing concentrations of silver nanoparticles until they reached a concentration that inhibited colony growth. After 3 weeks, MRSA was able to grow at a silver nanoparticle concentration of 100 mM, drug-susceptible *S. aureus* at 200 mM, multidrug-resistant *P. aeruginosa* at 75 mM, and ampicillin-resistant *E. coli* O157:H7 at 75 mM. These strains were labeled as AgNP^R whereas the parent susceptible strains were designed as AgNP^S.

The colony morphology of the AgNP^R strains was considerably different than the AgNP^S strains grown in agar without nanoparticles. As seen in Fig. 2a–c, AgNP^R colonies acquired a grayish silver color after growing on silver nanoparticle agar. These colonies presented a circular or irregular form, smooth surface, and mucoid or butyrous texture. The grayish color indicates that AgNP^R strains were able to take in silver nanoparticles from the substrate, absorb them, accumulate them inside the cell, and block the bactericidal effect of the silver nanoparticles.

To define the differences between AgNP^R and AgNP^S strains, antibiograms (Kirby–Bauer tests) were performed. All AgNP^R strains presented modified resistance profiles compared to the AgNP^S strains (Fig. 3a–d), which indicates that the acquisition of silver nanoparticle resistance causes changes in structures that also participate in the response to common antibiotics. Basically, the antibiotics that showed altered effects in AgNP^R strains include antibiotics that inhibit wall synthesis (Fig. 3a, d), protein synthesis mediated by the 30s ribosomal subunit (Fig. 3b), or nucleic acids synthesis (Fig. 3c). As shown in Fig. 3, variations in the response to antibiotics included both increases and decreases in sensitivity. Sensitivity to cefuroxime (cephalosporin) for the drug-susceptible *S. aureus* AgNP^R strain was considerably decreased, resulting in a change of status from Susceptible (S) to Resistant (R) according to NCCLS parameters.

Discussion

In the current study, we aimed to determine through different in vitro assays the antibacterial properties of silver nanoparticles against drug-resistant bacteria, infectious agents that represent a constant threat in hospital and community environments. To achieve this goal, we challenged three Mexican clinical isolates classified as resistant to one or more antibiotics with different concentrations of a nanosilver suspension and described the effect on bacterial cell viability and growth rate. To gain a more complete

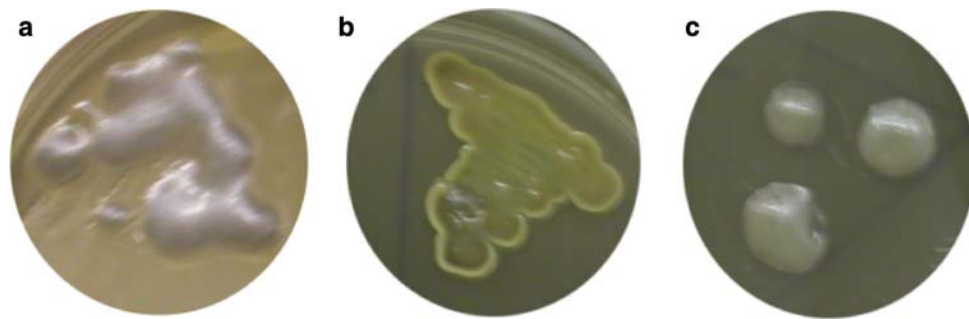


Fig. 2 AgNP^R colonies of drug-susceptible *S. aureus* grown at 20 mM (a) and 25 mM (b), multidrug-resistant *P. aeruginosa* grown at 25 mM (c). All strains were serially transferred on Mueller–Hinton

agar containing graded concentrations of silver nanoparticles until a concentration near or over the MIC was reached on which the bacteria could grow

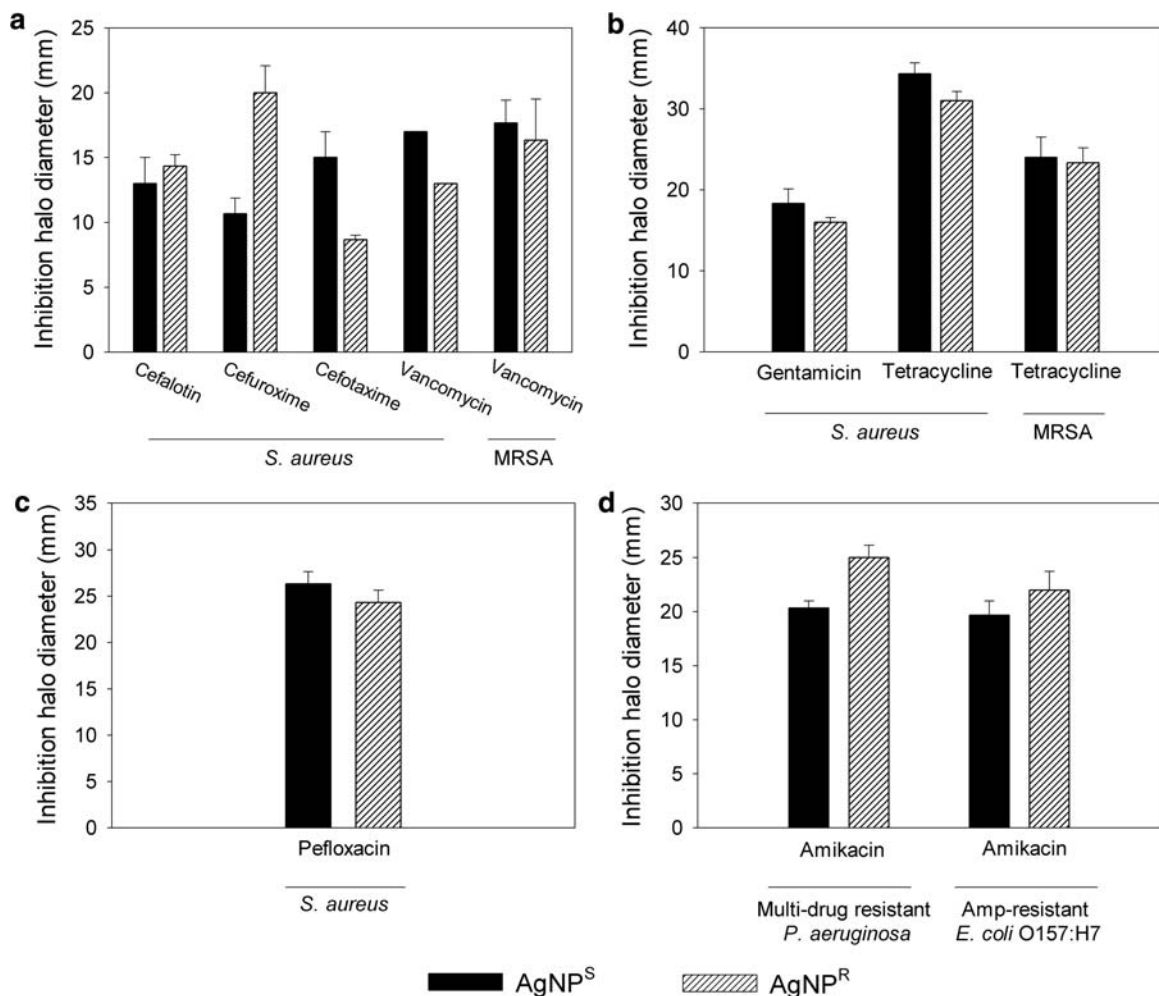


Fig. 3 Characterization of AgNP^R strains with respect to their resistance to a panel of different antibiotics. An antibiotic sensitivity test (Kirby–Bauer) was performed for AgNP^R strains of MRSA, drug-susceptible *S. aureus*, multidrug-resistant *P. aeruginosa*, and ampicillin-resistant *E. coli* O157:H7. The sensitivity to each antibiotic was proportional to the diameter of the inhibition halo. Gram positive

AgNP^R bacteria altered their sensitivity to antibiotics that **a** inhibit wall synthesis, **b** inhibit protein synthesis mediated by the 30s ribosomal subunit, and **c** inhibit nucleic acid synthesis. Gram negative bacteria altered their sensitivity to antibiotics that **d** inhibit protein synthesis. The assay was performed in triplicate and the bars represent the mean ± SEM

understanding and to attempt a preliminary approach to determining the mechanism of inhibition of silver nanoparticles, a comparison was made between multidrug-

resistant strains and drug-susceptible strains of the same species and between Gram negative and Gram positive bacteria.

For all strains, the average ratio of the minimum bactericidal concentration to the minimum inhibitory concentration indicated that silver nanoparticles have a bactericidal rather than bacteriostatic effect on the tested bacteria. In theory, a bactericidal agent is preferred clinically because bacterial killing should produce a faster resolution of the infection, improve clinical outcome, and reduce the likelihood of the emergence of resistance and the spread of infection. If pathogens are killed rather than inhibited, resistance mutations that might otherwise emerge as the result of antibiotic pressure are eliminated (French 2006).

No significant differences in bactericidal activity were found among the different compared groups (drug-resistant vs. susceptible, Gram positive vs. negative), which suggests that silver nanoparticles are broad spectrum antibacterial agents. These results further agree with previous findings by other research teams, where it was proven that silver nanoparticles exert the same effect on Gram positive and Gram negative strains (Kong and Jang 2008; Petica et al. 2008). Shrivastava et al. postulated that Gram negative bacteria are less susceptible to silver nanoparticles because the positive charges of the silver nanoparticles interact with the Gram negative lipopolysaccharide with more affinity than with the Gram positive cellular wall, which is thought to have fewer interaction sites with positive charges (Shrivastava et al. 2007). However, in our results *E. coli* and *P. aeruginosa* were less susceptible (although not significantly) to silver nanoparticles, so lipopolysaccharide might not be a structure that makes bacterial cells more receptive to the effect of silver nanoparticles. Instead, lipopolysaccharide might trap and block the positive charges of silver nanoparticles and make Gram negative bacteria less susceptible to them. Indeed, silver nanoparticles attach to the surface of the cell membrane and disturb its function, penetrate bacteria, and release silver ions. Sondi and Salopek-Sondi (2004) and Lok et al. (2006) found that silver nanoparticles target the bacterial membrane, leading to a dissipation of the proton motive force (Lok et al. 2007; Sondi and Salopek-Sondi 2004). Consequently silver nanoparticles need to reach the cell membrane to achieve an antibacterial effect.

The fact that the drug-resistant and drug-susceptible strains were affected by silver nanoparticles in the same manner indicates that the drug-resistant proteins that give bacteria the capacity to avoid antibiotics do not affect the efficacy of nanosilver.

One of the principal elements of bacteria's infectivity is their rapid reproduction time, a characteristic that could be a good target for impeding a viable infection. As shown by time-kill assays, silver nanoparticles were effective in inhibiting bacterial growth in a dose and time dependent manner. Yamanaka, et al. (2005) found that silver ions require about 14 h to reduce an *E. coli* population from 10^7

to 10^1 CFU/mL. As mentioned by Pal et al. (2007) the activity of nanoparticles might be similar to that of silver ions.

By using AgNP^R strains (Fig. 2), the mode of the bactericidal action of silver nanoparticles was explored. Resistance to silver nanoparticles implies changes in the inhibited cellular target(s). Therefore, if a change occurs in a protein or pathway targeted by an antibiotic, the bacterial sensitivity to this antibiotic is modified. To characterize the AgNP^R strains with respect to their resistance to a panel of different antibiotics, a sensitivity test (Kirby–Bauer) was performed. For the AgNP^R strains of MRSA, drug-susceptible *S. aureus*, multidrug-resistant *P. aeruginosa*, and ampicillin-resistant *E. coli* O157:H7, the Kirby–Bauer test showed an altered antibiotic resistance phenotype (Fig. 3), indicating that silver nanoparticles and these antibiotics share a common target in the bacteria.

Gram positive AgNP^R strains exhibited altered responses to different cephalosporins, glycopeptides, aminoglycosides, tetracyclins, and fluoroquinolones (Fig. 3a–c), but Gram negative AgNP^R strains only exhibited altered responses to Amikacin, an aminoglycoside (Fig. 3d). Since aminoglycosides inhibit protein synthesis by blocking the 30s ribosomal subunit, silver nanoparticles may inhibit this pathway while exerting their bactericidal activity against Gram negative bacteria. On the other hand, silver nanoparticles target protein synthesis, nucleic acid synthesis, and Gram positive cell wall synthesis, which explains why these bacteria were more susceptible (although not significantly more) to silver nanoparticles (Table 1). Gram negative bacteria tend to be less susceptible to the effect of compounds that act on the cell wall, including β -lactam antibiotics.

Our findings suggest that the mode of action of silver nanoparticles is similar to that of silver ions, which complex with electron donor groups containing sulfur, oxygen or nitrogen atoms that are normally present as thiols or phosphates (McDonnell 2007) on amino acids and nucleic acids. Like silver nanoparticles, silver ions also exert their activity through a broad range of mechanisms, including denaturing the 30s ribosome subunit, suppressing the expression of enzymes and proteins essential to ATP production (Yamanaka et al. 2005), inhibiting respiratory enzymes thereby inducing the production of reactive oxygen species (Matsumura et al. 2003; Yamanaka et al. 2005), binding and dimerizing RNA and DNA (Rai et al. 2009), and destabilizing and disrupting the outer membrane (Lok et al. 2006).

Reports of silver ion-resistant strains have also indicated a modification in the response to antibiotics, such as the acquisition of resistance to mercuric chloride, ampicillin, chloramphenicol, tetracycline, streptomycin and sulfonamides (Chopra 2007).

Interestingly, after subculturing the AgNP^R strains in the absence of silver nanoparticles, the resistance phenotype was lost (data not shown). Other clinical studies identified silver resistance in members of the *Enterobacteriaceae*, and the resistance phenotype was also unstable in the absence of silver selective pressure. According to Chopra (2007), this instability of the phenotype could reflect reversions of the chromosomal mutations conferring silver resistance, especially if they impose fitness costs, or it may reflect the loss of plasmids encoding resistance (Chopra 2007).

Besides their bactericidal activity and immediate antibacterial effect against a wide variety of drug-resistant bacteria, silver nanoparticles have particular characteristics provided by the silver itself. This noble metal tends to induce low bacterial resistance (Ip et al. 2006) and has low toxicity and minimal side effects when ingested since at most 2–4% is retained in tissues after absorption by the body. A notable health effect has been argyria, an irreversible pigmentation of the skin that is mostly an aesthetic concern (Drake and Hazelwood 2005).

The bactericidal activity of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria could be used in conjunction with advances in impregnation techniques and polymer technology to expand the range of applications of these nanoparticles in the preservation of food, disinfection of medical supplies and equipment, and decontamination of the surfaces of items such as toys and kitchenware (Matsumura et al. 2003).

The data presented here are novel in that they prove that silver nanoparticles are effective bactericidal agents regardless of the drug-resistance mechanisms that exist in multidrug-resistant *P. aeruginosa*, ampicillin-resistant *E. coli* O157:H7 and erythromycin-resistant *S. pyogenes* and show the importance of silver nanoparticles in the nosocomial and community environment. Therefore, silver nanoparticles can be recommended as an effective broad-spectrum bactericidal agent.

Acknowledgments The following funding sources supported the data collection process: the *Programa de Apoyo a la Investigacion en Ciencia y Tecnologia* (PAICyT) from the Universidad Autonoma de Nuevo Leon, Mexico.

References

- Chopra I (2007) The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: a useful development or a cause for concern? *J Antimicrob Chemother* 59:587–590
- Drake PL, Hazelwood KJ (2005) Exposure-related health effects of silver and silver compounds: a review. *Ann Occup Hyg* 49:575–585

- Dunn K, Edwards-Jones V (2004) The role of Acticoat with nanocrystalline silver in the management of burns. *Burns* 30(Suppl 1):S1–S9
- Elechiguerra JL, Burt JL, Morones JR, Camacho-Bragado A, Gao X, Lara HH, Yacamán MJ (2005) Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. *J Nanobiotechnology* 3:6
- French GL (2006) Bactericidal agents in the treatment of MRSA infections—the potential role of daptomycin. *J Antimicrob Chemother* 58:1107–1117
- Gupta LK, Jindal R, Beri HK, Chhibber S (1992) Virulence of silver-resistant mutant of *Klebsiella pneumoniae* in burn wound model. *Folia Microbiol (Praha)* 37:245–248
- Hoyme UB (1993) Clinical significance of Crede's prophylaxis in Germany at present. *Infect Dis Obstet Gynecol* 1:32–36
- Ip M, Lui SL, Poon VK, Lung I, Burd A (2006) Antimicrobial activities of silver dressings: an in vitro comparison. *J Med Microbiol* 55:59–63
- Kong H, Jang J (2008) Antibacterial properties of novel poly (methyl methacrylate) nanofiber containing silver nanoparticles. *Langmuir* 24:2051–2056
- Lok CN, Ho CM, Chen R, He QY, Yu WY, Sun H, Tam PK, Chiu JF, Che CM (2006) Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *J Proteome Res* 5:916–924
- Lok CN, Ho CM, Chen R, He QY, Yu WY, Sun H, Tam PK, Chiu JF, Che CM (2007) Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. *J Biol Inorg Chem* 12:527–534
- Lut L, Sun RW, Chen R, Hui CK, Ho CM, Luk JM, Lau GK, Che CM (2008) Silver nanoparticles inhibit hepatitis B virus replication. *Antivir Ther* 13:253–262
- Matsumura Y, Yoshikata K, Kunisaki S, Tsuchido T (2003) Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate. *Appl Environ Microbiol* 69:4278–4281
- McDonnell GE (2007) Chemical disinfection. In: *Antisepsis, disinfection, and sterilization*, pp 111–115
- Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Tapia J, Yacamán MJ (2005) The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* 16:2346–2353
- Pal S, Tak YK, Song JM (2007) Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 73:1712–1720
- Petica A, Gavrilu S, Lungu M, Buruntea N, Panzaru C (2008) Colloidal silver solutions with antimicrobial properties. *Mater Sci Eng* 152:22–27
- Rai M, Yadav A, Gade A (2009) Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol Adv* 27:76–83
- Shrivastava S, Bera T, Roy A, Singh G, Ramachandrarao P, Dash D (2007) Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology* 18:1–9
- Sondi I, 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
- Webb GF, D'Agata EM, Magal P, Ruan S (2005) A model of antibiotic-resistant bacterial epidemics in hospitals. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:13343–13348
- World Health Organization (2007) WHO Model of essential medicines. Online source
- Yamanaka M, Hara K, Kudo J (2005) Bactericidal actions of a silver ion solution on *Escherichia coli*, studied by energy-filtering transmission electron microscopy and proteomic analysis. *Appl Environ Microbiol* 71:7589–7593

RESEARCH

Open Access

Mode of antiviral action of silver nanoparticles against HIV-1

Humberto H Lara*, Nilda V Ayala-Nuñez, Liliana Ixtepan-Turrent, Cristina Rodriguez-Padilla

Abstract

Background: Silver nanoparticles have proven to exert antiviral activity against HIV-1 at non-cytotoxic concentrations, but the mechanism underlying their HIV-inhibitory activity has not been fully elucidated. In this study, silver nanoparticles are evaluated to elucidate their mode of antiviral action against HIV-1 using a panel of different *in vitro* assays.

Results: Our data suggest that silver nanoparticles exert anti-HIV activity at an early stage of viral replication, most likely as a virucidal agent or as an inhibitor of viral entry. Silver nanoparticles bind to gp120 in a manner that prevents CD4-dependent virion binding, fusion, and infectivity, acting as an effective virucidal agent against cell-free virus (laboratory strains, clinical isolates, T and M tropic strains, and resistant strains) and cell-associated virus. Besides, silver nanoparticles inhibit post-entry stages of the HIV-1 life cycle.

Conclusions: These properties make them a broad-spectrum agent not prone to inducing resistance that could be used preventively against a wide variety of circulating HIV-1 strains.

Background

According to the Joint United Nations Programme on HIV/AIDS, an estimated 33 million people were living with HIV in 2007, 2.7 million fewer than in 2001 [1]. Although the rate of new HIV infections has fallen in several countries, the HIV/AIDS pandemic still stands as a serious public health problem worldwide. The emergence of resistant strains is one of the principal challenges to containing the spread of the virus and its impact on human health. In different countries, studies have shown that 5%-78% of treated patients receiving antiretroviral therapy are infected with HIV-1 viruses that are resistant to at least one of the available drugs [2]. For these reasons, there is a need for new anti-HIV agents that function over viral stages other than retrotranscription or protease activity and that can be used for treatment and prevention of HIV/AIDS dissemination [3].

Fusion or entry inhibitors are considered an attractive option, since blocking HIV entry into its target cell leads to suppression of viral infectivity, replication, and the cytotoxicity induced by the virus-cell interaction [4].

Since 2005, only two fusion inhibitors have been approved by the FDA (Enfuvirtide and Maraviroc).

In addition to fusion inhibitors, virucidal agents are urgently needed for HIV/AIDS prevention because they directly inactivate the viral particle (virion), which prevents the completion of the viral replication cycle. Virucidal agents differ from virustatic drugs in that they act directly and rapidly by lysing viral membranes on contact or by binding to virus coat proteins [5]. These compounds would directly interact with HIV-1 virions to inactivate infectivity or prevent infection and could be used as an approach to provide a defense against sexual transmission of the virus [6].

Previously, we explored the antiviral properties of silver nanoparticles against HIV-1 and found by *in vitro* assays that they are active against a laboratory-adapted HIV-1 strain at non-cytotoxic concentrations. Images obtained by high angle annular dark field (HAADF) scanning transmission electron microscopy (STEM) show gp120 as its possible molecular target. Using this technique, a regular spatial arrangement of the silver nanoparticles attached to HIV-1 virions was observed. The center-to-center distance between the silver nanoparticles (~28 nm) was similar to the spacing of gp120 spikes over the viral membrane (~22 nm). It was

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

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

hypothesized that the exposed sulfur-bearing residues of the glycoprotein knobs would be attractive sites for nanoparticle interaction [7]. However, the mechanism underlying the HIV-inhibitory activity of silver nanoparticles was not fully elucidated.

Nanotechnology offers opportunities to re-explore biological properties of known antimicrobial compounds by manipulation of their sizes. Silver has long been known for its antimicrobial properties, but its medical applications declined with the development of antibiotics. Nonetheless, Credés prophylaxis of gonococcal *ophthalmia neonatorum* remained the standard of care in many countries until the end of the 20th century [8]. Currently, silver sulfadiazine is listed by the World Health Organization as an essential anti-infective topical medicine [9]. Silver's mode of action is presumed to be dependent on Ag⁺ ions, which strongly inhibit bacterial growth through suppression of respiratory enzymes and electron transport components and through interference with DNA functions [10]. If silver as a bulk material works, would nano-size silver be appealing? In medicine, the potential of metal nanoparticles has been explored for early detection, diagnosis, and treatment of diseases, but their biological properties have largely remained unexplored [11].

Silver nanoparticles have been studied for their antimicrobial potential and have proven to be antibacterial agents against both Gram-negative and Gram-positive bacteria [12-16], and antiviral agents against the HIV-1 [17] hepatitis B virus [18] respiratory syncytial virus [19] herpes simplex virus type 1 [20] and monkeypox virus [21]. The development of silver nanoparticle products is expanding. They are now used as part of clothing, food containers, wound dressings, ointments, implant coatings, and other items [22,23]; some silver nanoparticle applications have received approval from the US Food and Drug Administration [24].

To better understand the mode of action by which silver nanoparticles inactivate HIV-1 and their potential as a virucidal agent, we used a panel of assays that included: (i) a challenge against a panel of various HIV-1 strains, (ii) virus adsorption assays, (iii) cell-based fusion assays, (iv) a gp120/CD4 capture ELISA, (v) time-of-addition experiments, (vi) virucidal activity assays with cell-free virus, and (vii) a challenge against cell-associated virus. The data from these experiments suggest that silver nanoparticles exerted anti-HIV activity at an early stage of viral replication, most likely as a virucidal agent or viral entry inhibitor.

Results

Cytotoxic effect

HeLa-CD4-LTR-β-gal cells (which express both CXCR4 and CCR5), MT-2 cells (lymphoid human cell line

expressing CXCR4), and human PBMC, were used as models to assess silver nanoparticles' cytotoxicity. By means of a luciferase-based assay, the 50% cytotoxic concentration (CC₅₀) of silver nanoparticles was defined as 3.9 ± 1.6 mg/mL against HeLa-CD4-LTR-β-gal cells, as 1.11 ± 0.32 mg/mL against human PBMC, and 1.3 ± 0.58 mg/mL against MT-2 cells.

Range of antiviral activity

Silver nanoparticles of 30-50 nm were tested against a panel of HIV-1 isolates using indicator cells in which infection was quantified by a luciferase-based assay. Silver nanoparticles inhibited all strains, showing comparable antiviral potency against T-tropic, M-tropic, dual-tropic, and resistant isolates (Table 1). The concentration of silver nanoparticles at which infectivity was inhibited by 50% (IC₅₀) ranged from 0.44 to 0.91 mg/mL. The therapeutic index reflects a compound's overall activity by relating cytotoxicity (CC₅₀) and effectiveness, measured as the ability to inhibit infection (IC₅₀), under the same assay conditions. For these strains of HIV-1, no significant reduction of the therapeutic index was observed in strains that were resistant toward NNRTI, NRTI, PI, and PII compared with laboratory strains catalogued as wild type virus (Table 1).

Antiviral activity of silver nanoparticles and ions

To define that the observed antiviral effect of silver nanoparticles is due to nanoparticles, rather than just silver ions present in the solution, we also assessed the antiviral activity of silver sulfadiazine (AgSD) and silver nitrate (AgNO₃), known antimicrobial silver salts that exert their antimicrobial effect through silver ions [25]. Both salts inhibited HIV-1 infection *in vitro* (Table 2), however, their therapeutic index is 12 times lower than

Table 1 Antiviral effect of silver nanoparticles against HIV-1 strains

HIV-1 strain	Tropism (co-receptor)	IC ₅₀ (mg/mL)*	HeLa cells CC ₅₀ (mg/mL)*	TI
IIIB	T (X4)	0.44 (± 0.3)	3.9 (± 1.6)	8.9
Eli	T (X4)	0.42 (± 0.2)		9.3
Beni	T (X4)	0.19 (± 0.1)		20.5
96USSN20	T (X4)/M (R5)	0.36 (± 0.2)		12.5
Bal	M (R5)	0.27 (± 0.2)		14.4
BCF01	M (R5)	0.37 (± 0.3)		10.5
AZT _{RV}	T (X4)	0.19 (± 0.01)		20.5
NNRTI _{RV}	T (X4)	0.61 (± 0.24)		6.4
PI _{RV}	T (X4)	0.91 (± 0.09)		4.3
3TC _{RV}	T (X4)	0.73 (± 0.12)		5.3
Saquinavir _{RV}	T (X4)	0.81 (± 0.11)		4.8

*Values represent the mean of the triplicate ± standard error of the mean. NNRTI: non-nucleoside retrotranscriptase inhibitor, PI: protease inhibitor, RV: resistant virus

Table 2 Antiviral effect of silver salts and nanoparticles against HIV-1

Silver compound	IC ₅₀ *	HeLa cells CC ₅₀ *	TI
Silver nanoparticles	0.44 mg/mL (± 0.3)	3.9 mg/mL (± 1.6)	8.9
Silver sulfadiazine	39.33 µg/mL (± 14.60)	28.25 µg/mL (± 7.28)	0.7
Silver nitrate	0.00059% (± 0.00022%)	0.00044% (± 0.00002%)	0.7

*Values represent the mean of the triplicate ± standard error of the mean.

the one of silver nanoparticles, which indicates that silver ions by itself have a lower efficiency than silver nanoparticles.

Inhibition of viral adsorption

To confirm that the anti-HIV activity of silver nanoparticles can be attributed to the inhibition of virus binding or fusion to the cells, a virus adsorption assay was performed [26]. One fusion inhibitor (Enfuvirtide) was included as control specimen. Silver nanoparticles inhibited the binding of IIB virus to cells with an IC₅₀ of 0.44 mg/mL. As expected, the fusion inhibitor inhibited virus adsorption. These results indicate that silver nanoparticles inhibit the initial stages of the HIV-1 infection cycle.

Inhibition of Env/CD4-mediated membrane fusion

A cell-based fusion assay was used to mimic the gp120-CD4-mediated fusion process of HIV-1 to the host cell. HL2/3 cells, which express HIV-1 Env on their surfaces and Tat protein in their cytoplasm (effector cells) [27] and HeLa-CD4-LTR-β-gal (indicator cells) can fuse as the result of the gp120-CD4 interaction, and the amount of fused cells can be measured with the β-gal reporter gene. In the presence of a HL2/3-HeLa CD4 mixture, silver nanoparticles efficiently blocked fusion between both cells (Figure 1A) in a dose-dependent manner (1.0-2.5 mg/mL range). This concentration range is close to what we previously reported for silver nanoparticles IC₅₀. Known antiretroviral drugs used as controls, such as UC781 (NNRTI), AZT (NRTI), and Indinavir (PI), did not inhibit cell fusion in this cell-based fusion assay.

Silver nanoparticles interfere with gp120-CD4 interaction

The inhibitory activity of silver nanoparticles against the gp120-CD4 interaction was also investigated in a competitive gp120-capture ELISA. A constant amount of gp120 was incubated for 10 min with increasing amounts of silver nanoparticles, the mixture was then added to a CD4-coated plate, and the amount of gp120 bound to the plate was quantified. Compared with the control (0.0 mg/mL), there was a decrease of over 60% of gp120 bound to CD4 coated-plates at the highest dose of silver nanoparticles. As shown in Figure 1B, significant decreases in absorbance values were observed in the presence of silver nanoparticles (0.3-5.0 mg/mL).

The gp120-capture ELISA data, combined with the results of the cell-based fusion assay, support the hypothesis that silver nanoparticles inhibit HIV-1 infection by blocking the viral entry, particularly the gp120-CD4 interaction.

Although silver nanoparticles feature characteristic absorption at 400-500 nm [28] no interference to the absorption signals of the ELISA assay was observed. This can be assumed since the wells with the highest concentration of silver nanoparticles did display higher absorption levels (see Figure 1B) than the controls (0.0 mg/mL). Besides, the absorption levels obtained in the presence of silver nanoparticles were lower than the ones of the calibration curve (as defined by the manufacturer).

Time (Site) of Intervention

To further determine the antiviral target of silver nanoparticles, a time-of-addition experiment was performed using a single cycle infection assay. The time-of-addition experiment was used to delimit the stage(s) of the viral life cycle that is blocked by silver nanoparticles. HeLa cells (expressing CD4, CXCR4 and CCR5) were infected with HIV-1_{IIB} cell-free virus and either silver nanoparticles (1.0 mg/mL), Tak-779 (2.0 µM), AZT (20.0 µM), Indinavir (0.25 µM), or 118-D-24 (100.0 µM) was added upon HIV-1 inoculation (time zero) or at various time points post-inoculation. These antiretroviral drugs were chosen as controls as they point out different stages of the viral cycle (fusion or entry, retrotranscription, protease activity, and integration to the genome). As seen in Figure 2(A-D), the antiviral activity of Tak-779, AZT, Indinavir, and 118-D-24 started to decline after the cycle stage that they target has passed. The fusion inhibitor's activity declined after 2 h (Figure 2A), RT inhibitors after 4 h (Figure 2B), protease inhibitors after 7 h (Figure 2C), and integrase inhibitors after 12 h (Figure 2D). In contrast, silver nanoparticles retained their antiviral activity even when added 12 h after the HIV inoculation. These results show that silver nanoparticles intervene with the viral life cycle at stages besides fusion or entry. These post-entry stages cover a time period between and including viral entry and the integration into the host genome.

Virucidal activity of silver nanoparticles: inactivation of cell-free and cell-associated virus

To study the effect that silver nanoparticles have over the virus itself, cell-free and cell-associated HIV-1 were treated with different concentrations of nanoparticles. Cell-free and cell-associated virus are the infectious HIV-1 forms present in semen and cervicovaginal secretions and can be transmitted across the mucosal barrier [29] Cell-associated virus includes infected cells that transmit the infection by fusing with non-infected receptor cells. By means of a luciferase-based assay, the

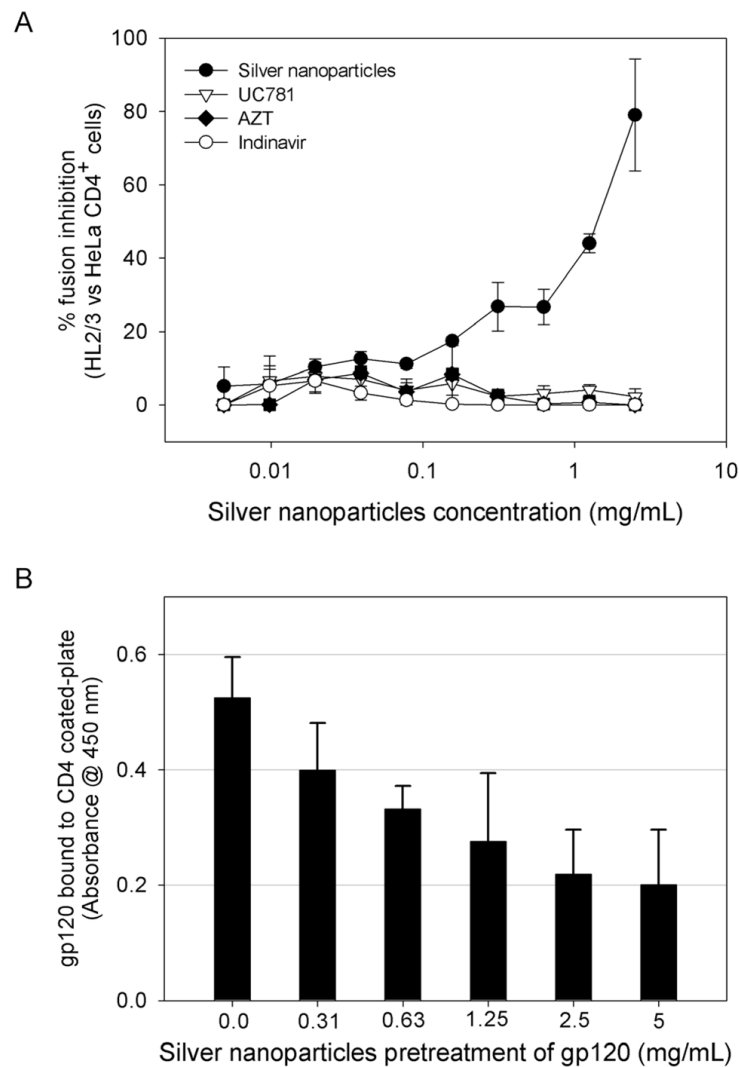


Figure 1 Inhibition of the gp120-CD4 interaction. (A) A cell-based fusion assay was used to mimic the gp120-CD4 mediated fusion of the viral and host cell membranes. HL2/3 and HeLa-CD4-LTR- β -gal cells were incubated with a two-fold serial dilution of silver nanoparticles and known antiretrovirals. The assay was performed in triplicate; the data points represent the mean \pm s.e.m. (B) The degree of inhibition of the gp120-CD4 protein binding was assessed with a gp120/CD4 ELISA capture in the presence or absence of silver nanoparticles. Gp120 protein was pretreated for 10 min with a two-fold serial dilution of silver nanoparticles, then added to a CD4-coated plate. The assay was done twice; the error bars indicate the s.e.m.

residual infectivity of cell-free viruses (one T-tropic and one M-tropic) was quantified after silver nanoparticle treatment. As shown in Figure 3(A-B), silver nanoparticle pretreatment of HIV-1_{IIB} and HIV-1_{Bal} decreased the infectivity of the viral particles after just 5 min of exposure. The effect increased after 60 min of exposure (particularly in Bal), indicating that silver nanoparticles act directly on the virion, inactivating it.

Silver nanoparticles were also effective against the transmission of HIV-1 infection mediated by chronically infected PBMC and H9 (human lymphoid cell line). Transmission was 50% reduced, even when both cell types were treated with the nanoparticles for 1 min (Figure 4A-B).

Discussion

Silver nanoparticles proved to be an antiviral agent against HIV-1, but its mode of action was not fully elucidated. Is gp120 its principal target? Do silver nanoparticles act as entry inhibitors? In this study, we investigated the mode of antiviral action of silver nanoparticles against HIV-1. Our results reveal, for the first time, that silver nanoparticles exert anti-HIV activity at an early stage of viral replication, most likely as a virucidal agent or viral entry inhibitor.

No significant difference was found in the antiviral activities of silver nanoparticles against the different drug-resistant strains (Table 1), so the mutations in

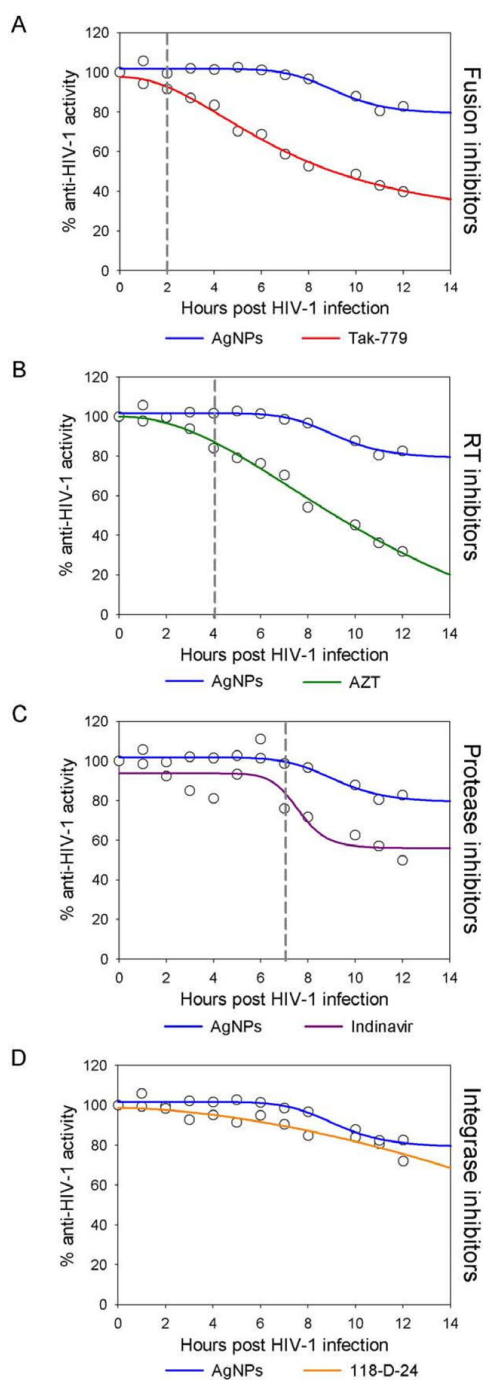


Figure 2 Time-of-addition experiment. HeLa-CD4-LTR- β -gal cells were infected with HIV-1_{IIIB}, and silver nanoparticles (1 mg/mL) and different antiretrovirals were added at different times post infection. Activity of silver nanoparticles was compared with (A) Fusion inhibitors (Tak-779, 2 μ M), (B) RT inhibitors (AZT, 20 μ M), (C) Protease inhibitors (Indinavir, 0.25 μ M), and (D) Integrase inhibitors (118-D-24, 100 μ M). Dashed lines indicate the moment when the activity of the silver nanoparticles and the antiretroviral differ. The assay was performed in triplicate; the data points represent the mean and the colored lines are nonlinear regression curves done with SigmaPlot 10.0 software.

antiretroviral HIV strains that confer resistance do not affect the efficacy of silver nanoparticles. These results further agree with previous findings, where it was proven that silver nanoparticles are broad-spectrum biocides [30,31] HIV-1 strains found in the human population can differ widely in their pathogenicity, virulence, and sensitivity to particular antiretroviral drugs [32] The fact that silver nanoparticles inhibit such a varied panel of strains makes them an effective broad-spectrum agent against HIV-1. This particular property can reduce the likelihood of the emergence of resistance and the subsequent spread of infection.

Silver nanoparticles inhibited a variety of HIV-1 strains regardless of their tropism (Table 1). Variation in gp120 among HIV strains is the major determinant of differing tropism among strains, with the V3 loop of gp120 recognizing the chemokine receptors CXCR4 (T-tropic virus), CCR5 (M-tropic virus), or both (dual-tropic virus) [33] The fact that silver nanoparticles inhibited all tested strains indicates that their mode of action does not depend on this determinant of cell tropism. Elechiguerra *et al.* postulated that silver nanoparticles undergo specific interaction with HIV-1 via preferential binding with gp120 [7] If so, then our findings show that inhibition by silver nanoparticles is not dependent on the V3 loop, which has a net positive charge that contributes to its role in determining viral co-receptor tropism [34] Since silver particles have a positive surface charge, the V3 loop would not be their preferred site of interaction. Hence, the nanoparticles may possibly act as attachment inhibitors by impeding the gp120-CD4 interaction, rather than as co-receptor antagonists that interfere with the gp120-CXCR4/CCR5 contact [4]

By means of a viral adsorption assay, it was shown that silver nanoparticles' mechanism of anti-HIV action is based on the inhibition of the initial stages of the HIV-1 cycle. In addition, the gp120-capture ELISA data (Figure 1B), combined with the results of the cell-based fusion assay (Figure 1A), supported the hypothesis that silver nanoparticles inhibit HIV-1 infection by blocking viral entry, particularly the gp120-CD4 interaction. The observations previously made by STEM analysis support this idea, since silver nanoparticles were seen to bind protein structures distributed over the viral membrane [7] If silver nanoparticles do not bind to the V3 loop, then they might preferentially interact with the negative cavity of gp120 that binds to CD4 [35] The attraction between CD4 and gp120 is mostly electrostatic, with the primary end of CD4 binding in a recessed pocket on gp120, making extensive contacts over $\sim 800 \text{ \AA}^2$ of the gp120 surface [36]

In addition, silver nanoparticles might interact with the two disulfide bonds located in the carboxyl half of the HIV-1 gp120 glycoprotein, an area that has been

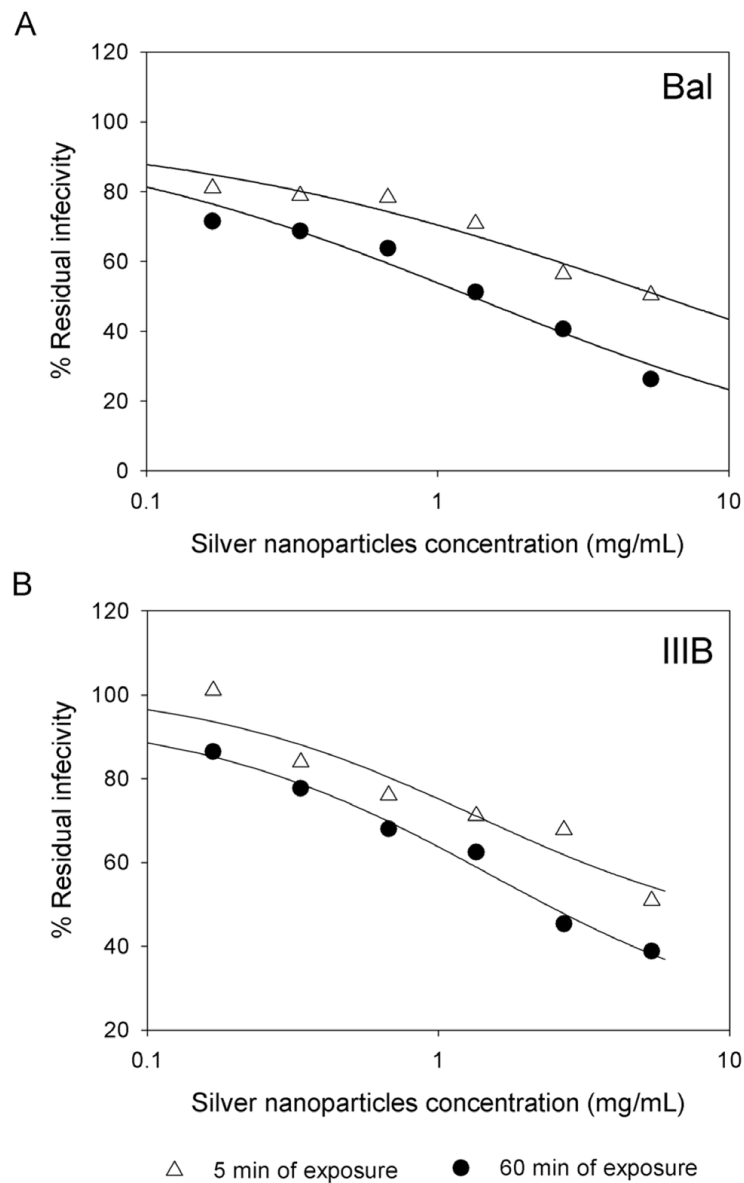


Figure 3 Virucidal activity of silver nanoparticles against M and T tropic HIV-1. Serial two-fold dilutions of silver nanoparticles were added to 10^5 TCID₅₀ of HIV-1_{Bal} (A) and HIV-1_{IIIB} (B) cell-free virus with a 0.2-0.5 m.o.i. After incubation for 5 min and 60 min, the mixtures were centrifuged three times at 10,000 rpm, the supernatant fluids removed, and the pellets washed three times. The final pellets were placed into 96-well plates with HeLa-CD4-LTR- β -gal cells. Assessment of HIV-1 infection was made with a luciferase-based assay. The percentage of residual infectivity after silver nanoparticle treatment was calculated with respect to the positive control of untreated virus. The assay was performed in triplicate; the data points represent the mean, and the solid lines are nonlinear regression curves done with SigmaPlot 10.0 software.

implicated in binding to the CD4 receptor [37] Silver ions bind to sulfhydryl groups, which lead to protein denaturation by the reduction of disulfide bonds [38] Therefore, we hypothesize that silver nanoparticles not only bind to gp120 but also modify this viral protein by denaturing its disulfide-bonded domain located in the CD4 binding region. This can be seen in our results of silver nanoparticles' capacity to more strongly diminish residual infectivity of viral particles after 60 minutes of

incubation than after 5 minutes of incubation (Figure 3). Since the antiviral effect of silver nanoparticles increases with the incubation time, we can hypothesize that silver nanoparticles initially bind to gp120 knobs and then inhibit infection by irreversibly modifying these viral structures. However, further research is needed to define if silver nanoparticles interact with the negatively charged cavity and the two disulfide bonds located in gp120's CD4 binding region.

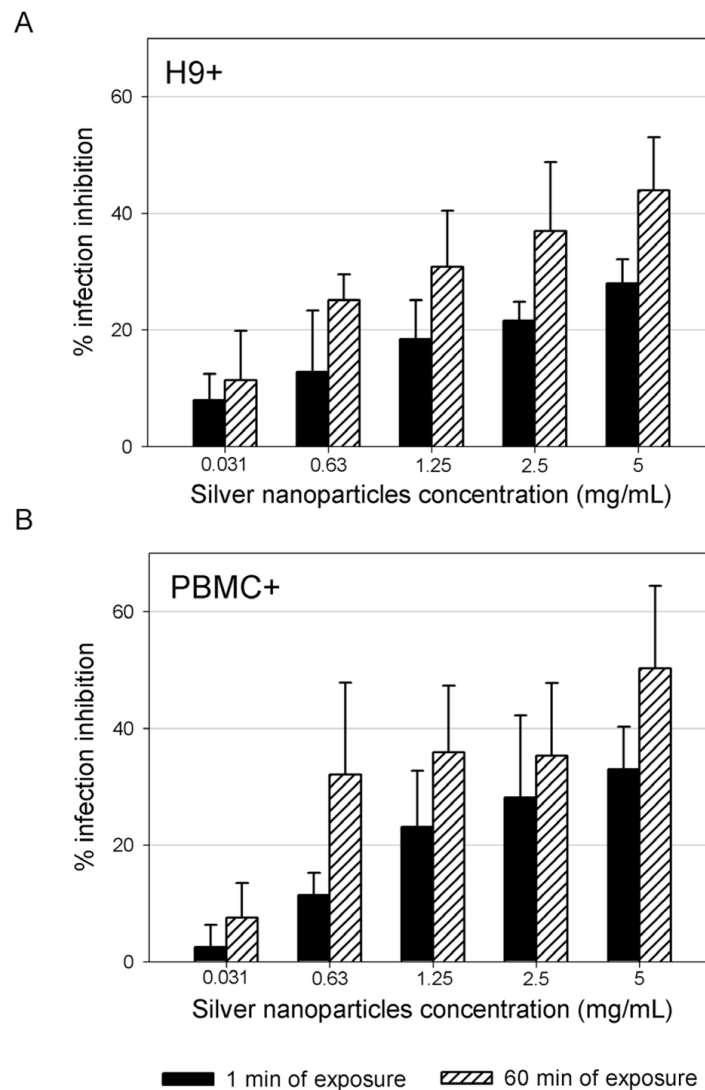


Figure 4 Treatment of HIV-1 cell-associated virus. Chronically HIV-1-infected H9 (A) and PBMC (B) cells were incubated with serial two-fold dilutions of silver nanoparticles for 1 min and 60 min. Treated cells were centrifuged, washed three times with cell culture media, and then added to TZM-bl cells. Assessment of HIV-1 infection was made with a luciferase-based assay after 48 h. The assay was performed in triplicate; the error bars indicate the s.e.m.

Resistance development may be an issue for compounds that target the envelope because of the high rate of substitutions in the variable regions of the Env protein. However, since the positions of the cysteine residues, the disulfide bonding pattern in gp120, and the ability of gp120 to bind to the viral receptor CD4 are highly conserved between isolates [39] the development of resistance to silver nanoparticles would be complicated.

By comparing the antiviral effect (measured by the therapeutic index) of silver nanoparticles with two commonly used silver salts (AgSD and AgNO_3), it was observed that silver ions by themselves are less efficient than silver nanoparticles. Hence, if the observed anti-

HIV-1 activity of silver nanoparticles would just have been due to silver ions present in the nanoparticles' solution, the therapeutic index would have been lower. High activity of silver nanoparticles is suggested to be due to species difference as they dissolve to release Ag^0 (atomic) and Ag^+ (ionic) clusters, whereas silver salts release Ag^+ only [40]

The time-of-addition experiments further confirmed silver nanoparticles as entry inhibitors (Figure 2). In addition, it was revealed that silver nanoparticles have other sites of intervention on the viral life cycle, besides fusion or entry. Since silver ions can complex with electron donor groups containing sulfur, oxygen, or nitrogen that are normally present as thiols or phosphates on

amino acids and nucleic acids [41] they might inhibit post-entry stages of infection by blocking HIV-1 proteins other than gp120, or reducing reverse transcription or proviral transcription rates by directly binding to the RNA or DNA molecules. Besides, earlier studies have shown that silver nanoparticles suppress the expression of TNF- α [42] which is a cytokine that plays a pivotal role in HIV-1 pathogenesis by incrementing HIV-1 transcription [43] The inhibition of the TNF- α activated transcription might also be a target for the anti-HIV activity of silver nanoparticles. Having such a varied panel of targets in the HIV-1 replication cycle makes silver nanoparticles an agent that is not prone to contribute to the appearance of resistant strains.

Silver nanoparticles proved to be virucidal to cell-free and cell-associated HIV-1 as judged by viral infectivity assays (Figures 3 and 4). HIV infectivity is effectively eliminated following short exposure of isolated virus to silver nanoparticles. Silver nanoparticle treatment of chronically infected H9⁺ cells as well as human PBMC⁺ resulted in decreased infectivity.

A virucide must operate quickly and effectively in preventing infection of vulnerable target cells. According to Borkow *et al.* (1997), an ideal retrovirucidal agent should act directly on the virus, act at replication steps prior to integration of proviral DNA into the infected host cell genome, be absorbable by uninfected cells in order to provide a barrier to infection by residual active virus, and be effective at non-cytotoxic concentrations readily attainable *in vivo* [44] Silver nanoparticles act directly on the virus at steps that prevent integration inside the host cell, but further pharmacokinetic, pharmacodynamic, and toxicological studies in animal models are needed to define safety parameters for the use of silver nanoparticles as preventive tools for HIV-1 transmission.

Conclusions

Finally, we propose that the antiviral activity of silver nanoparticles results from their inhibition of the interaction between gp120 and the target cell membrane receptors. According to our results, this mode of antiviral action allows silver nanoparticles to inhibit HIV-1 infection regardless of viral tropism or resistance profile, to bind to gp120 in a manner that prevents CD4-dependent virion binding, fusion, and infectivity, and to block HIV-1 cell-free and cell-associated infection, acting as a virucidal agent. In conclusion, silver nanoparticles are effective virucides as they inactivate HIV particles in a short period of time, exerting their activity at an early stage of viral replication (entry or fusion) and at post-entry stages. The data presented here contribute to a new and still largely unexplored area; the use of nanomaterials against specific targets of viral particles.

Methods

Silver compounds

Commercially manufactured 30-50 nm silver nanoparticles, surface coated with 0.2 wt% PVP, were used (Nanoamor, Houston, TX). Stock solutions of silver nanoparticles, silver sulfadiazine (Sigma-Aldrich) and silver nitrate (Sigma-Aldrich) were prepared in RPMI 1640 cell culture media. Following serial dilutions of the stock were made in culture media.

Cells, HIV-1 isolates, and antiretrovirals

HeLa-CD4-LTR- β -gal cells, MT-2 cells, HL2/3 cells, H9 cells, TZM-bl cells, HIV-1_{IIIB}, HIV-1_{Bal}, HIV-1_{BCF01}, HIV-1_{96USSN20}, AZT, Indinavir, 118-D-24, Tak-779, and Enfuvirtide were obtained through the AIDS Research and Reference Reagent Program, NIH. HIV-1_{Eli} and HIV-1_{Beni} are clinical isolates from patients from the Ruth Ben-Ari Institute of Clinical Immunology and AIDS Center, Israel. They were kindly donated by Gadi Borkow. Aliquots of cell-free culture viral supernatants were used as viral inocula. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from healthy donors using Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions. UC781 was kindly donated by Dr. Gadi Borkow.

Cytotoxicity assays

A stock solution of silver nanoparticles was two-fold diluted to desired concentrations in growth medium and subsequently added into 96-wells plates containing HeLa-CD4-LTR- β -gal cells, PBMC and MT-2 cells (5×10^4 cells/well). Microtiter plates were incubated at 37°C in a 5% CO₂ air humidified atmosphere for a further 2 days. Assessments of cell viability were carried out using a CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay (Promega). The 50% cytotoxic concentration (CC₅₀) was defined based on the percentage cell survival relative to the positive control.

HIV-1 infectivity inhibition assays

Serial two-fold dilutions of silver nanoparticles were mixed with 10⁵ TCID₅₀ of HIV-1 cell-free virus and added to HeLa-CD4-LTR- β -gal cells with a 0.2-0.5 multiplicity of infection [7] HIV-1 infection was assessed after two days of incubation by quantifying the activity of the β -galactosidase produced after infection with the Beta-Glo Assay System (Promega). The 50% inhibitory concentration (IC₅₀) was defined according to the percentage of infectivity inhibition relative to the positive control.

Virus adsorption assays

In this assay the inhibitory effects of silver nanoparticles on virus adsorption to HeLa-CD4-LTR- β -gal cells were measured as previously described [26] HeLa-CD4-LTR- β -gal cells (5×10^4 cells/well) were incubated with HIV_{IIIB} in the absence or presence of serial dilutions of silver nanoparticles and Enfuvirtide. After 2 h of

incubation at 37°C, the cells were extensively washed with 1× PBS to remove the unadsorbed virus particles. Then the cells were incubated for 48 h, and the amount of viral infection was quantified with the Beta-Glo Assay System (Promega).

Cell-based fusion assay

HeLa-derived HL2/3 cells, which express the HIV-1_{HXB2} Env, Tat, Gag, Rev, and Nef proteins, were co-cultured with HeLa-CD4-LTR-β-gal cells at a 1:1 cell density ratio (2.5×10^4 cells/well each) for 48 h in the absence or presence of two-fold dilutions of silver nanoparticles, UC781, AZT, and Indinavir in order to examine whether the compounds interfered with the binding process of HIV-1 Env and the CD4 receptor. Upon fusion of both cell lines, the Tat protein from HL2/3 cells activates β-galactosidase indicator gene expression in HeLa-CD4-LTR-β-gal cells [45,27] β-gal activity was quantified with the Beta-Glo Assay System (Promega). The percentage of inhibition of HL2/3-HeLa CD4 cell fusion was calculated with respect to the positive control of untreated cells.

HIV-1 gp120/CD4 ELISA

A gp120 capture ELISA (ImmunoDiagnostics, Inc., Woburn, MA) was used to test the inhibitory activity of silver nanoparticles against gp120-CD4 binding. Briefly, recombinant HIV-1_{IIIB} gp120 protein (100 ng/mL) was pre-incubated for 10 min in the absence or presence of serial two-fold dilutions of silver nanoparticles, and then added to a CD4-coated plate. The amount of captured gp120 was detected by peroxidase-conjugated murine anti-gp120 MAbs. In separate experiments, gp120 (100 ng/mL) was added to CD4-coated plates pretreated with silver nanoparticles for a 10 min period. Before the addition of the gp120 protein, plates were washed three times to remove unbound silver nanoparticles [27]

Time-of-addition experiments

HeLa-CD4-LTR-β-gal cells were infected with 10^5 TCID₅₀ of HIV-1 cell-free virus with a 0.2-0.5 multiplicity of infection (m.o.i.). Silver nanoparticles (1 mg/mL), Tak-779 (fusion inhibitor, 2 μM), AZT (NRTI, 20 μM), Indinavir (protease inhibitor, 0.25 μM), and 118-D-24 (integrase inhibitor, 100 μM) were then added at different times (0, 1, 2, 3 ... 12 h) after infection [3,31] Infection inhibition was quantified after 48 h by measuring β-gal activity with the Beta-Glo Assay System.

Virucidal activity assay

Serial two-fold dilutions of silver nanoparticles were added to 10^5 TCID₅₀ of HIV-1_{IIIB} and HIV-1_{Bal} cell-free virus with a 0.2-0.5 m.o.i. After incubation for 5 min and 60 min at room temperature, the mixtures were centrifuged three times at 10,000 rpm, the supernatant fluids removed, and the pellets washed three times. The final pellets were resuspended in DMEM and placed into 96-well plates with HeLa-CD4-LTR-β-gal cells. The

cells were incubated in a 5% CO₂ humidified incubator at 37°C for 2 days. Assessment of HIV-1 infection was made with the Beta-Glo Assay System. The percentage of residual infectivity after silver nanoparticle treatment was calculated with respect to the positive control of untreated virus [31]

Treatment of HIV-1 cell-associated virus

Chronically HIV-1-infected PBMC and H9 cells were incubated with serial two-fold dilutions of silver nanoparticles for 1 min and 60 min. Treated cells were centrifuged, washed three times with cell culture media, and then added to TZM-bl cells. HIV-1 infection triggers, through the Tat protein, β-galactosidase expression in TZM-bl cells. β-gal activity was quantified with the Beta-Glo Assay System.

Statistical analysis

Graphs show values of the means ± standard deviations from three separate experiments, each of which was carried out in duplicate. Time-of-addition experiment graphs are nonlinear regression curves done with Sigma-Plot 10.0 software.

Acknowledgements

The following funding sources supported the data collection process: the *Programa de Apoyo a la Investigación en Ciencia y Tecnología* (PAICYT) of the Universidad Autónoma de Nuevo León, Mexico, and the *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología* (CONACYT) of Mexico.

Authors' contributions

All authors read and approved the final manuscript. HHL participated in the conception and experimental design of the *in vitro* HIV-1 manipulation and infectivity assays, in analysis and interpretation of the data, and in writing and revision of this report. NVAN. participated in the conception and design of the *in vitro* HIV-1 manipulation and infectivity assays, in analysis and interpretation of the data, and in writing and revision of this report. LIT participated in collection of *in vitro* HIV-1 manipulation and infectivity assays. C.R-P. participated in the experimental design of this research.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 21 July 2009

Accepted: 20 January 2010 Published: 20 January 2010

References

1. Joint United Nations Programme on HIV AIDS (UNAIDS): **Report on the global AIDS epidemic.** Geneva, Switzerland 2008.
2. Vercauteren J, Deforche K, Theys K, Debruyne M, Duque LM, Peres S, Carvalho AP, Mansinho K, Vandamme AM, Camacho R: **The incidence of multidrug and full class resistance in HIV-1 infected patients is decreasing over time (2001-2006) in Portugal.** *Retrovirology* 2008, **5**:12.
3. Lin PF, Blair W, Wang T, Spicer T, Guo Q, Zhou N, Gong YF, Wang HG, Rose R, Yamanaka G, Robinson B, Li CB, Fridell R, Deminie C, Demers G, Yang Z, Zadjura L, Meanwell N, Colonna R: **A small molecule HIV-1 inhibitor that targets the HIV-1 envelope and inhibits CD4 receptor binding.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, **100**:11013-11018.
4. Borkow G, Lapidot A: **Multi-targeting the entrance door to block HIV-1.** *Curr Drug Targets Infect Disord* 2005, **5**:3-15.
5. Al-Jabri AA, Alenzi FQ: **Vaccines, Virucides and Drugs Against HIV/AIDS: Hopes and Optimisms for the Future.** *Open AIDS J* 2009, **3**:1-3.
6. O'Connor T: **Assessment of Activity of Topical Virucidal Agents.** *Methods in Molecular Medicine, Antiviral Methods and Protocols* Totowa, NJ: Kinchington, D. and Schinazi, R. F 2000, **24**:207-212.

7. 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.
8. Hoyme UB: **Clinical Significance of Crede's Prophylaxis in Germany at Present.** *Infect Dis Obstet Gynecol* 1993, **1**:32-36.
9. World Health Organization: **WHO Model of Essential Medicines.** <http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en/index.html>.
10. Li Y, Leung P, Yao L, Song QW, Newton E: **Antimicrobial effect of surgical masks coated with nanoparticles.** *J Hosp Infect* 2006, **62**:58-63.
11. Bhattacharya R, Mukherjee P: **Biological properties of "naked" metal nanoparticles.** *Adv Drug Deliv Rev* 2008, **60**:1289-1306.
12. 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.
13. Lok CN, Ho CM, Chen R, He QY, Yu WY, Sun H, Tam PK, Chiu JF, Che CM: **Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles.** *J Proteome Res* 2006, **5**:916-924.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. Sun RW, Rong C, Chung NPY, Ho CM, Lin CLS, Che CM: **Silver nanoparticles fabricated in Hepes buffer exhibit cytoprotective activities toward HIV-1 infected cells.** *Chem Commun* 2005, **5059**-5061.
18. Lu L, Sun RW, Chen R, Hui CK, Ho CM, Luk JM, Lau GK, Che CM: **Silver nanoparticles inhibit hepatitis B virus replication.** *Antivir Ther* 2008, **13**:253-262.
19. Sun L, Singh AK, Vig K, Pillai SR, Singh SR: **Silver Nanoparticles Inhibit Replication of Respiratory Syncytial Virus.** *J Biomed Biotechnol* 2008, **4**:149-158.
20. Baram-Pinto D, Shukla S, Perkas N, Gedanken A, Sarid R: **Inhibition of Herpes Simplex Virus Type 1 Infection by Silver Nanoparticles Capped with Mercaptoethane Sulfonate.** *Bioconjugate Chem* 2009, **20**:1497-1502.
21. Rogers JV, Parkinson CV, Choi YW, Speshock JL, Hussain SM: **A Preliminary Assessment of Silver Nanoparticle Inhibition of Monkeypox Virus Plaque Formation.** *Nanoscale Research Letters* 2008, **3**:129-133.
22. Arora S, Jain J, Rajwade JM, Paknikar KM: **Cellular responses induced by silver nanoparticles: In vitro studies.** *Toxicol Lett* 2008, **179**:93-100.
23. Kumari A, Kumar P, Ajayan PM, John G: **Silver-nanoparticle-embedded antimicrobial paints based on vegetable oil.** *Nature Materials* 2008, **7**:236-41.
24. Dunn K, Edwards-Jones V: **The role of Acticoat with nanocrystalline silver in the management of burns.** *Burns* 2004, **30**(Suppl 1):S1-S9.
25. McDonnell G, Russell AD: **Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance.** *Clin Microbiol Rev* 1999, **12**:147-179.
26. Witvrouw M, Fikkert V, Pluyms W, Matthews B, Mardel K, Schols D, Raff J, Debyser Z, De Clercq E, Holan G, Pannecouque C: **Polyanionic (i.e., polysulfonate) dendrimers can inhibit the replication of human immunodeficiency virus by interfering with both virus adsorption and later steps (reverse transcriptase/integrase) in the virus replicative cycle.** *Mol Pharmacol* 2000, **58**:1100-1108.
27. Yang Q, Stephen AG, Adelsberger JW, Roberts PE, Zhu W, Currens MJ, Feng Y, Crise BJ, Gorelick RJ, Rein AR, Fisher RJ, Shoemaker RH, Sei S: **Discovery of Small-Molecule Human Immunodeficiency Virus Type 1 Entry Inhibitors That Target the gp120-Binding Domain of CD4.** *J Virol* 2005, **6**:6122-6133.
28. Bae CH, Nam AH, Park SM: **Formation of silver nanoparticles by laser ablation of a silver target in NaCl solution.** *Appl Surf Sci* 2002, **197-198**:628-634.
29. 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.
30. Lara HH, Ayala-Nuñez NV, Ixtapan-Turrent L, Rodríguez-Padilla C: **Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria.** *World J Microbiol Biotechnol* 2009.
31. 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.
32. Spira S, Wainberg MA, Loemba H, Turner D, Brenner BG: **Impact of clade diversity on HIV-1 virulence, antiretroviral drug sensitivity and drug resistance.** *J Antimicrob Chemother* 2003, **51**:229-240.
33. Chavda SC, Griffin P, Han-Liu Z, Keys B, Vekony MA, Cann AJ: **Molecular determinants of the V3 loop of human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp120 responsible for controlling cell tropism.** *J Gen Virol* 1994, **75**(Pt 11):3249-3253.
34. Naganawa S, Yokoyama M, Shiino T, Suzuki T, Ishigatsubo Y, Ueda A, Shirai A, Takeno M, Hayakawa S, Sato S, Tochikubo O, Kiyoura S, Sawada K, Ikegami T, Kanda T, Kitamura K, Sato H: **Net positive charge of HIV-1 CRF01_AE V3 sequence regulates viral sensitivity to humoral immunity.** *PLoS One* 2008, **3**:e3206.
35. Kwong PD, Wyatt R, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J, Hendrickson WA: **Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody.** *Nature* 1998, **393**:648-659.
36. Wyatt R, Sodroski J: **The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens.** *Science* 1998, **280**:1884-1888.
37. Lekutis C, Olshevsky U, Furman C, Thali M, Sodroski J: **Contribution of disulfide bonds in the carboxyl terminus of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 glycoprotein to CD4 binding.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 1992, **5**:78-81.
38. McDonnell GE: **Chemical Disinfection.** *Antisepsis, disinfection, and sterilization* 2007, **111**-115.
39. Leonard CK, Spellman MW, Riddle L, Harris RJ, Thomas JN, Gregory TJ: **Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells.** *J Biol Chem* 1990, **265**:10373-10382.
40. Taylor PL, Ussher AL, Burrell RE: **Impact of heat on nanocrystalline silver dressings. Part I: Chemical and biological properties.** *Biomaterials* 2005, **26**:7221-7229.
41. Starodub ME, Trevors JT: **Silver resistance in *Escherichia coli* R1.** *J Med Microbiol* 1989, **29**:101-110.
42. 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.
43. Lawn SD, Butera ST, Folks TM: **Contribution of immune activation to the pathogenesis and transmission of human immunodeficiency virus type 1 infection.** *Clin Microbiol Rev* 2001, **14**:753-77, table.
44. Barnard J, Nguyen TM, Belmonte A, Wainberg MA, Parniak MA: **Chemical barriers to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection: retroviral activity of UC781, a thiocarboxanilide nonnucleoside inhibitor of HIV-1 reverse transcriptase.** *J Virol* 1997, **71**:3023-3030.
45. Ciminale V, Felber BK, Campbell M, Pavlakis GN: **A bioassay for HIV-1 based on Env-CD4 interaction.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 1990, **6**:1281-1287.

doi:10.1186/1477-3155-8-1

Cite this article as: Lara et al.: Mode of antiviral action of silver nanoparticles against HIV-1. *Journal of Nanobiotechnology* 2010 **8**:1.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp

